(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-542107
(P2023-542107A)
(43)公表日　令和5年10月5日(2023.10.5)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N 15/13 (2006.01)		C12N	15/13		4B064
C12N 15/63 (2006.01)		C12N	15/63	Z	4B065
C12N 1/15 (2006.01)		C12N	1/15		4C076
C12N 1/19 (2006.01)		C12N	1/19		4C085
C12N 1/21 (2006.01)		C12N	1/21		4H045

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全127頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-516720(P2023-516720)
(86)(22)出願日　令和3年9月14日(2021.9.14)
(85)翻訳文提出日　令和5年5月15日(2023.5.15)
(86)国際出願番号　PCT/GB2021/052383
(87)国際公開番号　WO2022/053839
(87)国際公開日　令和4年3月17日(2022.3.17)
(31)優先権主張番号　2014451.5
(32)優先日　令和2年9月14日(2020.9.14)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(31)優先権主張番号　2014453.1
(32)優先日　令和2年9月14日(2020.9.14)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(31)優先権主張番号　2108319.1
最終頁に続く

(71)出願人　523090191
ザ ロザリンド フランクリン インスティテュート
イギリス国、オーエックス１１　０キューエックス オックスフォードシャー、ディドコット、ハーウェル キャンパス、ラザフォード アップルトン ラボラトリー、ビルディング アール１１３
(74)代理人　100136629
弁理士　鎌田 光宜
(74)代理人　100080791
弁理士　高島 一
(74)代理人　100125070
弁理士　土井 京子
(74)代理人　100121212
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を標的とするシングルドメイン抗体

(57)【要約】
本発明は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を標的とする改善されたシングルドメイン抗体、該シングルドメイン抗体を含む多価ポリペプチド及び融合タンパク質に関する。本発明はまた、コロナウイルスのスパイクタンパク質の受容体結合ドメインにおける２つの異なるエピトープに結合するコロナウイルス結合分子を提供する。コロナウイルス結合分子は、リンカーを介して２つの抗原結合分子を互いに接合させることに基づく。本発明は、コロナウイルスの治療及び／又は予防における該シングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、及びコロナウイルス結合分子の使用、並びに様々な方法、アッセイ、及びキットを用いたコロナウイルスの検出及び診断における該シングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、及びコロナウイルス結合分子の使用も提供する。
【選択図】図１Ａ

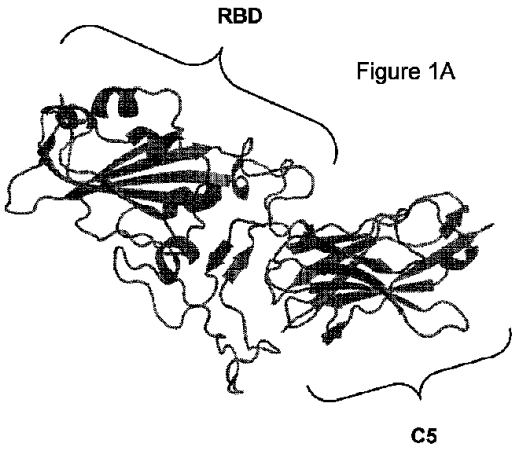


Figure 1A

【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ａ）配列番号１２（Ｃ５　ＣＤＲ３）；
（ｂ）配列番号１９８（２＿Ａ８）；
（ｃ）配列番号９（Ｃ１　ＣＤＲ３）；
（ｄ）配列番号３（Ｂ１２　ＣＤＲ３）；
（ｅ）配列番号６（Ｆ２　ＣＤＲ３）；
（ｆ）配列番号１５（Ｈ３　ＣＤＲ３）；
（ｇ）配列番号１９２（ＮｂＳＡ＿Ａ１０）；
（ｈ）配列番号１９５（ＮｂＳＡ＿Ｄ１０）；
（ｉ）配列番号２０１（３＿Ｃ５）；
（ｊ）配列番号２０４（８＿Ｇ１１）；
（ｋ）配列番号２０７（１２＿Ｆ１１）；及び
（ｌ）配列番号２３７（ＶＨＨ＿Ｈ６）
からなる群から選択される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）を含み、前記ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含む、抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体。
【請求項２】
前記シングル抗体ドメインが、
（ａ）配列番号１１を含むＣＤＲ２及び配列番号１２を含むＣＤＲ３（Ｃ５）；
（ｂ）配列番号１９７を含むＣＤＲ２及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３（２＿Ａ８）；
（ｃ）配列番号８を含むＣＤＲ２及び配列番号９を含むＣＤＲ３（Ｃ１）；
（ｄ）配列番号２を含むＣＤＲ２及び配列番号３を含むＣＤＲ３（Ｂ１２）；
（ｅ）配列番号５を含むＣＤＲ２及び配列番号６を含むＣＤＲ３（Ｆ２）；
（ｆ）配列番号１４を含むＣＤＲ２及び配列番号１５を含むＣＤＲ３（Ｈ３）；
（ｇ）配列番号１９１を含むＣＤＲ２及び配列番号１９２を含むＣＤＲ３；
（ｈ）配列番号１９４を含むＣＤＲ２及び配列番号１９５を含むＣＤＲ３；
（ｉ）配列番号２００を含むＣＤＲ２及び配列番号２０１を含むＣＤＲ３；
（ｊ）配列番号２０３を含むＣＤＲ２及び配列番号２０４を含むＣＤＲ３；
（ｋ）配列番号２０６を含むＣＤＲ２及び配列番号２０７を含むＣＤＲ３；又は
（Ｌ）配列番号２３６を含むＣＤＲ２及び配列番号２３７を含むＣＤＲ３；
を含み、前記ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、前記ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含む、請求項１に記載の抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体。
【請求項３】
前記シングル抗体ドメインが、
（ａ）配列番号１０を含むＣＤＲ１、配列番号１１を含むＣＤＲ２、及び配列番号１２を含むＣＤＲ３（Ｃ５）；
（ｂ）配列番号１９６を含むＣＤＲ１、配列番号１９７を含むＣＤＲ２、及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３；
（ｃ）配列番号７を含むＣＤＲ１、配列番号８を含むＣＤＲ２、及び配列番号９を含むＣＤＲ３（Ｃ１）；
（ｄ）配列番号１を含むＣＤＲ１、配列番号２を含むＣＤＲ２、及び配列番号３を含むＣＤＲ３（Ｂ１２）；
（ｅ）配列番号４を含むＣＤＲ１、配列番号５を含むＣＤＲ２、及び配列番号６を含むＣＤＲ３（Ｆ２）；
（ｆ）配列番号１３を含むＣＤＲ１、配列番号１４を含むＣＤＲ２、及び配列番号１５を含むＣＤＲ３（Ｈ３）；
（ｇ）配列番号１９０を含むＣＤＲ１、配列番号１９１を含むＣＤＲ２、及び配列番号

１９２を含むＣＤＲ３；
（ｈ）配列番号１９３を含むＣＤＲ１、配列番号１９４を含むＣＤＲ２、及び配列番号１９５を含むＣＤＲ３；
（ｉ）配列番号１９９を含むＣＤＲ１、配列番号２００を含むＣＤＲ２、及び配列番号２０１を含むＣＤＲ３；
（ｊ）配列番号２０２を含むＣＤＲ１、配列番号２０３を含むＣＤＲ２、及び配列番号２０４を含むＣＤＲ３；
（ｋ）配列番号２０５を含むＣＤＲ１、配列番号２０６を含むＣＤＲ２、及び配列番号２０７を含むＣＤＲ３；又は
（ｌ）配列番号２３５を含むＣＤＲ１、配列番号２３６を含むＣＤＲ２、及び配列番号２３７を含むＣＤＲ３；
を含み、前記ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、前記ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含み、前記ＣＤＲ１のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含む、請求項１に記載の抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体。
【請求項４】
請求項１～３のいずれか一項に記載のシングルドメイン抗体のうちの１つ又は任意で２つ以上を含む、多価ポリペプチド。
【請求項５】
１つ又は２つ以上のシングルドメイン抗体が、１つ以上のリンカーによって、任意で単一の融合タンパク質として接合されており、任意で、前記リンカー（複数可）が、同じであっても異なっていてもよく、ポリＡリンカー、ＧＳリンカー、及び／又はユビキチン若しくはユビキチン様のリンカー、任意でＳＵＭＯ又はＳＵＭＯ様のリンカーのうちの１つ以上を含み得る、請求項４に記載の多価ポリペプチド。
【請求項６】
請求項１、２、又は３のいずれか一項に記載の２つのシングルドメイン抗体、任意で、
ａ）
ｉ）それぞれ配列番号１２（Ｃ５　ＣＤＲ３）を含む２つのシングルドメイン抗体；
ｉｉ．それぞれ配列番号１９８（２＿Ａ８）を含む２つのシングルドメイン抗体；
ｉｉｉ）それぞれ配列番号９（Ｃ１　ＣＤＲ３）を含む２つのシングルドメイン抗体；
ｉｖ）それぞれ配列番号３（Ｂ１２　ＣＤＲ３）を含む２つのシングルドメイン抗体；
ｖ）それぞれ配列番号６（Ｆ２　ＣＤＲ３）を含む２つのシングルドメイン抗体；
ｖｉ）それぞれ配列番号１５（Ｈ３　ＣＤＲ３）を含む２つのシングルドメイン抗体；
ｖｉｉ．それぞれ配列番号１９２（ＮｂＳＡ＿Ａ１０）を含む２つのシングルドメイン抗体；
ｖｉｉｉ．それぞれ配列番号１９５（ＮｂＳＡ＿Ｄ１０）を含む２つのシングルドメイン抗体；
ｉｘ．それぞれ配列番号２０１（３＿Ｃ５）を含む２つのシングルドメイン抗体；
ｘ．それぞれ配列番号２０４（８＿Ｇ１１）を含む２つのシングルドメイン抗体；及び
ｘｉ．それぞれ配列番号２０７（１２＿Ｆ１１）を含む２つのシングルドメイン抗体；
ｘｉｉ．それぞれ配列番号２３７（ＶＨＨ＿Ｈ６）を含む２つのシングルドメイン抗体からなる群のうちの１つ；
又は
ｂ）請求項２の（ａ）；（ｂ）；（ｃ）；（ｄ）；若しくは（ｅ）に係る２つのシングルドメイン抗体；
又は
ｃ）請求項３の（ａ）；（ｂ）；（ｃ）；（ｄ）；若しくは（ｅ）に係る２つのシングルドメイン抗体；
を含む二価抗体である、請求項４又は５に記載の多価ポリペプチド。
【請求項７】

請求項１、２、又は３のいずれか一項に記載のシングルドメイン抗体のうちの３つ以上を含み、
任意で、リンカーによって接合されており、
任意で、式Ｉ又はＩＩ：
式Ｉ：（ｓｄＡＢ）Ｎ－（リンカー）Ｎ－１
式ＩＩ：（ｓｄＡＢ）Ｎ－（リンカー）Ｎ
（式中、数Ｎは、シングルドメイン抗体（ｓｄＡｂ）の数であり、任意で、前記リンカー（複数可）は、同じであっても異なっていてもよく、ポリＡリンカー、ＧＳリンカー、及び／又はユビキチン若しくはユビキチン様のリンカー、任意でＳＵＭＯ又はＳＵＭＯ様のリンカーのうちの１つ以上を含み得る）
によって表される、請求項４又は５に記載の多価ポリペプチド。
【請求項８】
前記シングルドメイン抗体が、
ａ．少なくとも配列番号１２（Ｃ５　ＣＤＲ３）、並びに任意で配列番号１０（Ｃ５　ＣＤＲ１）及び／若しくは配列番号１１（Ｃ５　ＣＤＲ２）も含む；
又は
ｂ．少なくとも配列番号１９８（２＿Ａ８　ＣＤＲ３）、並びに任意で配列番号１９６（２＿Ａ８　ＣＤＲ１）及び／若しくは配列番号１９７（２＿Ａ８　ＣＤＲ２）も含む、請求項４～７のいずれか一項に記載の多価ポリペプチド。
【請求項９】
任意で、２つ以上のシングルドメイン抗体を含み、前記シングルドメイン抗体のうちの少なくとも１つが、他のシングルドメイン抗体とは異なるシングルドメイン抗体である、請求項４又は５に記載の多価ポリペプチド。
【請求項１０】
任意で二座抗体であり、異なっておりかつそれぞれが請求項１、２、又は３のいずれか一項に記載の第１及び第２のシングルドメイン抗体を含む、請求項９に記載の多価ポリペプチド。
【請求項１１】
前記ポリペプチドが、３つのシングルドメイン抗体を含む三量体であり、各シングルドメイン抗体が、
（ａ）配列番号７を含むＣＤＲ１、配列番号８を含むＣＤＲ２、及び配列番号９を含むＣＤＲ３（Ｃ１）；
（ｂ）配列番号１３を含むＣＤＲ１、配列番号１４を含むＣＤＲ２、及び配列番号１５を含むＣＤＲ３（Ｈ３）；
（ｃ）配列番号１０を含むＣＤＲ１、配列番号１１を含むＣＤＲ２、及び配列番号１２を含むＣＤＲ３（Ｃ５）；又は
（ｄ）配列番号１９６を含むＣＤＲ１、配列番号１９７を含むＣＤＲ２、及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３（２＿Ａ８）；
を含み、前記ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、前記ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含み、前記ＣＤＲ１のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含む、請求項１０に記載の多価ポリペプチド。
【請求項１２】
前記アミノ酸改変が、置換、挿入、又は欠失である、請求項１～１１のいずれか一項に記載の抗体又は多価ポリペプチド。
【請求項１３】
配列番号２１３（２＿Ａ８）、１９（Ｃ５）、１６（Ｂ１２）、１７（Ｆ２）、１８（Ｃ１）、２０（Ｈ３）、２０９（ＮｂＳＡ＿Ａ１０）、２１１（ＮｂＳＡ＿Ｄ１０）、２１５（３＿Ｃ５）、２１７（８＿Ｇ１１）、２１９（１２＿Ｆ１１）、２２０（Ｃ１（Ｎ７６Ｑ））、及び２３９（ＶＨＨ＿Ｈ６）からなる群から選択される配列に対して少なくとも７０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１～１２のいずれか一項に記

載の抗体又は多価ポリペプチド。
【請求項１４】
（ａ）コロナウイルスタンパク質内に含まれる第１のエピトープの全部又は一部に結合する第１の抗原結合分子；
（ｂ）コロナウイルスタンパク質内に含まれる第２のエピトープの全部又は一部に結合する第２の抗原結合分子；及び
（ｃ）リンカー
を含み、前記リンカーが、
（ｉ）ユビキチン又はユビキチン様タンパク質；
（ｉｉ）前記ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｎ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；及び
（ｉｉｉ）前記ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｃ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；
を含み、前記リンカーが、前記第１の抗原結合分子を前記第２の抗原結合分子に接合させ、
任意で、前記第１及び第２のエピトープが実質的に重複していない、コロナウイルス結合分子。
【請求項１５】
（ａ）配列番号２３２内に含まれる第１のエピトープの全部又は一部に結合する第１の抗原結合分子；
（ｂ）配列番号２３３内に含まれる第２のエピトープの全部又は一部に結合する第２の抗原結合分子；及び
（ｃ）リンカー
を含み、前記リンカーが、
（ｉ）ユビキチン又はユビキチン様タンパク質；
（ｉｉ）前記ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｎ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；及び
（ｉｉｉ）前記ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｃ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；
を含み、前記リンカーが、前記第１の抗原結合分子を前記第２の抗原結合分子に接合させ、
任意で、前記第１及び第２のエピトープが実質的に重複していない、コロナウイルス結合分子。
【請求項１６】
請求項１～１５のいずれか一項に記載の抗体又は多価ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド。
【請求項１７】
請求項１６に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。
【請求項１８】
請求項１７に記載のベクターを含む宿主細胞又は細胞株。
【請求項１９】
発現ベクターのポリヌクレオチド配列を発現させる条件下で培養培地中において請求項１８に記載の宿主細胞を培養することを含む、抗体又は多価ポリペプチドの生産方法。
【請求項２０】
請求項１～１５のいずれか一項に記載の抗体、多価ポリペプチド、又はコロナウイルス結合分子を含む医薬組成物。
【請求項２１】
医薬において使用するための、請求項１～１５のいずれか一項に記載の抗体、多価ポリペプチド、若しくはコロナウイルス結合分子、又は請求項２０に記載の医薬組成物。
【請求項２２】

コロナウイルス感染症の治療又は予防において使用するための、請求項１～１５のいずれか一項に記載の抗体、多価ポリペプチド、若しくはコロナウイルス結合分子、又は請求項２０に記載の医薬組成物。
【請求項２３】
コロナウイルスを治療又は予防する方法であって、治療活性量の請求項１～１５のいずれか一項に記載の抗体、多価ポリペプチド、若しくはコロナウイルス結合分子、又は請求項２０に記載の医薬組成物を対象に投与することを含む方法。
【請求項２４】
コロナウイルスの治療において使用するための医薬の製造における、請求項１～１５のいずれか一項に記載の抗体、多価ポリペプチド、又はコロナウイルス結合分子の使用。
【請求項２５】
前記コロナウイルスが、中東呼吸症候群（ＭＥＲＳ－ＣｏＶ）、重症急性呼吸症候群コロナウイルス１（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１）、及びＣＯＶＩＤ－１９からなる群から選択される、請求項２２に記載の通り使用するための抗体、多価ポリペプチド、若しくはコロナウイルス結合分子、又は請求項２３に記載のコロナウイルスを治療若しくは予防する方法、又は請求項２４に記載の抗体、多価ポリペプチド、若しくはコロナウイルス結合分子の使用。
【請求項２６】
吸入又はネブライゼーションを介した前記抗体又は多価ポリペプチドの送達に好適である、請求項１～１５のいずれか一項に記載の抗体、多価ポリペプチド、若しくはコロナウイルス結合分子を含む医療装置。
【請求項２７】
対象におけるコロナウイルス感染を診断する方法であって、
（ａ）単離されたサンプルを、請求項１～１５のいずれか一項に記載の抗体、多価ポリペプチド、又はコロナウイルス結合分子と接触させることと、
（ｂ）抗体－抗原複合体の数を検出することと、
（ｃ）前記サンプル中のコロナウイルスの存在を検出することと、
を含み、前記複合体の存在が、前記対象におけるコロナウイルスの陽性診断を提供する方法。
【請求項２８】
対象におけるコロナウイルスタンパク質を検出する方法であって、
（ａ）対象からサンプルを得る工程と；
（ｂ）前記対象からのサンプルを、請求項１～１５のいずれか一項に記載の抗体、多価ポリペプチド、又はコロナウイルス結合分子と接触させる工程と、
（ｃ）抗体－抗原複合体を検出する工程と、
を含み、前記複合体の存在が、前記対象におけるコロナウイルスタンパク質の存在を示す方法。
【請求項２９】
患者からのサンプルにおけるコロナウイルスタンパク質を検出する方法であって、
（ａ）前記対象からのサンプルを、請求項１～１５のいずれか一項に記載の抗体、多価ポリペプチド、又はコロナウイルス結合分子と接触させる工程と、
（ｂ）抗体－抗原複合体を検出する工程と、
を含み、前記複合体の存在が、前記対象におけるコロナウイルスタンパク質の存在を示す方法。
【請求項３０】
前記コロナウイルスが、中東呼吸器症候群（ＭＥＲＳ－ＣｏＶ）、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス１（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１）、及び重症急性呼吸器症候群コロナウイルス１（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）からなる群から選択される、請求項２７、２８、又は２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１】

コロナウイルスを検出するためのアッセイであって、患者から得られたサンプルを、請求項１～１５のいずれか一項に記載の抗体、多価ポリペプチド、又はコロナウイルス結合分子と接触させることを含み、前記シングルドメイン抗体が、前記患者のサンプル中のコロナウイルスを選択的に単離するために検出可能な標識又はレポーター分子を含み、任意で、前記アッセイが、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、又は蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）であるアッセイ。

【請求項３２】

コロナウイルスを検出するためのキットであって、

（ａ）検出可能なマーカーと、

（ｂ）請求項１～１５のいずれか一項に記載の抗体、多価ポリペプチド、又はコロナウイルス結合分子と、

を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を標的とする改善されたシングルドメイン抗体、該シングルドメイン抗体を含む多価ポリペプチド及び融合タンパク質、コロナウイルスの治療及び／又は予防における該シングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、及び融合タンパク質の使用、並びに様々な方法、アッセイ、及びキットを用いたコロナウイルスの検出及び診断における該シングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、及び融合タンパク質の使用を提供する。本発明はまた、コロナウイルスのスパイクタンパク質の受容体結合ドメインにおける２つの異なるエピトープに結合するコロナウイルス結合分子、コロナウイルスの治療及び／又は予防における該コロナウイルス結合分子の使用、並びに様々な方法、アッセイ、及びキットを用いたコロナウイルスの検出及び診断における該コロナウイルス結合分子の使用も提供する。コロナウイルス結合分子は、リンカーを介して２つの抗原結合分子を互いに接合させることに基づく。

【背景技術】

【０００２】

最近出現したＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスと闘う方法の特定が急務であることから、ウイルスを中和することができ、従って、受動免疫療法による急性感染症のための治療薬として使用することができる抗体の探索が行われた。ＣＯＶＩＤ－１９から回復した患者から中和モノクローナル抗体を同定することに多くの注目が集まっている（例えば、（Ｒｏｇｅｒｓ，Ｚｈａｏ　ｅｔ　ａｌ．２０２０）。しかし、ラクダ科の免疫グロブリンの重鎖のみのサブセットに由来するナノボディ又はＶＨＨ（重鎖抗体の可変重鎖ドメイン）は、従来の抗体よりも優れた選択肢を提供する。典型的には生産に哺乳類細胞が必要となる、２つのジスルフィド結合したポリペプチドである重鎖及び軽鎖を含む従来の抗体とは対照的に、シングルドメイン抗体は、微生物系を用いてより低コストで製造することができる。また、分子サイズが小さく、安定性である、つまり、感染した患者の気道に直接局所送達するためにナノボディを製剤化することも可能である。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染の阻害剤としてのシングルドメイン抗体の潜在力は、細胞ベースのアッセイで最近実証されている（Ｈｕｏ，Ｌｅ　Ｂａｓ　ｅｔ　ａｌ．２０２０、Ｗｒａｐｐ，Ｄｅ　Ｖｌｉｅｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．２０２０）。

【０００３】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２によって引き起こされる疾患であるＣＯＶＩＤ－１９は、世界規模の重大な健康問題であるので、有効な治療法が非常に必要とされている。更に、ウイルスの正確な診断及びモニタリングを可能にするために、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を迅速かつ効率的に検出するのに好適なツールが必要である。本発明は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の受容体結合ドメインにおける異なるエピトープに高い親和性で結合し、野生型ウイルス中和アッセイにおいて極めて強力なシングルドメイン抗体の単離について説明する。更に、別々の構成要素に比べて結合親和性の増強を示す様々なポリペプチドが作製されている。

【０００４】
同じ抗原における異なる２つのエピトープに結合する２つのナノボディを連結させて１つのポリペプチドにすることで、いわゆる「キレート効果」の恩恵を受けられる可能性を与えることができる。化学的には、これは、金属イオンに対するキレート配位子の親和性が単一部位結合に比べて増強されることを表し、多価性から得られるアビディティの効果とは異なる。最も単純な例では、二座分子は、その両方の結合基が同じ標的に結合したときにキレート効果を得る。キレート効果をブーストするために重要なのは、構成要素を接合させたときにそれぞれの相互作用のエンタルピーが保たれることである。このように、短すぎたり長すぎたりする又は誤った角度で配置されたスペーサー（リンカーとしても知られている）で２つのバインダーを接合させることは、エンタルピーを大きく失うことなく２つの部位を同時に結合させることができないことを意味する。これは、キレート効果によって得られる任意の利益を減少させ、消滅させる可能性もある。これに対する解決策は、より柔軟なリンカーを導入して、その完全なエンタルピーを得ながらそれぞれを結合させることである。しかし、柔軟性を導入すると、結合が硬直化し、エントロピー的に束縛されるので、問題が生じる。従って、スペーサー構成要素の柔軟性と剛性との間で絶妙にバランスをとる必要がある（ｖｏｎ　Ｋｒｂｅｋ，Ａｃｈａｚｉ　ｅｔ　ａｌ．２０１７）。エンタルピーをエントロピーとトレードオフするリンカーを設計する多くの方法が存在するが、高いエントロピーコストを支払うことなくエンタルピーが得られるリンカーの範囲は非常に限られていることが多い。このように、単なるアビディティではなく、（熱力学的な）キレート効果を得るには、慎重な設計及び洞察が必要である。

【０００５】
また、本発明は、コロナウイルスのスパイクタンパク質の受容体結合ドメインにおける２つの異なるエピトープに高い親和性で結合するコロナウイルス二座分子も提供する。これらは、別々の構成要素に比べて驚くほど結合親和性が増強されることを示す。

【発明の概要】

【０００６】
本発明は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のＳタンパク質の受容体結合ドメインに特異的に結合するシングルドメイン抗体を提供する。

【０００７】
第１の態様では、相補性決定領域である相補性決定領域３（ＣＤＲ３）を含むシングルドメイン抗体が提供される。

【０００８】
第２の態様では、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３を含むシングルドメイン抗体が提供される。

【０００９】
第３の態様では、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むシングルドメイン抗体が提供される。

【００１０】
更なる態様では、配列番号１９、２１３、１８、１６、１７、２０、２０９、２１１、２１５、２１７、２１９、２２０、及び２３９からなる群から選択される配列に対して少なくとも７０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。

【００１１】
一態様では、本発明は、コロナウイルスのスパイクタンパク質、好ましくはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質の受容体結合ドメインにおける２つの異なるエピトープに結合するコロナウイルス結合分子を提供する。

【００１２】
一態様では、
（ａ）コロナウイルスタンパク質内に含まれる第１のエピトープの全部又は一部に結合する第１の抗原結合分子；
（ｂ）コロナウイルスタンパク質内に含まれる第２のエピトープの全部又は一部に結合

する第２の抗原結合分子；及び
（ｃ）リンカー
を含み、該リンカーが、
（ａ）ユビキチン又はユビキチン様タンパク質；
（ｂ）該ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｎ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；及び
（ｃ）該ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｃ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；
を含み、該リンカーが、該第１の抗原結合分子を該第２の抗原結合分子に接合させ、
任意で、該第１及び第２のエピトープが実質的に重複していない、コロナウイルス結合分子が提供される。一実施形態では、コロナウイルスタンパク質は、スパイクタンパク質、任意でスパイクタンパク質の受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）である。コロナウイルスは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２、及びＭＥＲＳからなる群から選択されるコロナウイルス、好ましくはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２であってよい。

【００１３】

一態様では、
（ａ）配列番号２３２内に含まれる第１のエピトープの全部又は一部に結合する第１の抗原結合分子；
（ｂ）配列番号２３３内に含まれる第２のエピトープの全部又は一部に結合する第２の抗原結合分子；及び （ｃ）リンカー
を含み、該リンカーが、
（ｉ）ユビキチン又はユビキチン様タンパク質；
（ｉｉ）該ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｎ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；及び
（ｉｉｉ）該ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｃ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；
を含み、該リンカーが、該第１の抗原結合分子を該第２の抗原結合分子に接合させ、
任意で、該第１及び第２のエピトープが実質的に重複していない、コロナウイルス結合分子が提供される。

【００１４】

一態様では、
（ａ）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２受容体結合ドメインへの結合についてＣ５、Ｈ３、Ｈ１１－Ｄ４、Ｈ１１－Ｈ４、Ｈ１１－Ａ１０、Ｈ１１－Ｂ５、Ｈ１１－Ｈ６、又はＶＨＨ＿Ｈ６と競合する第１の抗原結合分子；
（ｂ）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２受容体結合ドメインへの結合についてＡ８、ＣＲ３０２２、ＶＨＨ７２、又はＥＹ６Ａ、Ｆ２、Ｃ１、又はＢ１２と競合する第２の抗原結合分子；及び
（ｃ）リンカー
を含み、該リンカーが、
（ａ）ユビキチン又はユビキチン様タンパク質；
（ｂ）該ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｎ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；及び
（ｃ）該ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｃ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；
を含み、該リンカーが、該第１の抗原結合分子を該第２の抗原結合分子に接合させ、
任意で、第１及び第２のエピトープが実質的に重複していない、コロナウイルス結合分子が提供される。

【００１５】

更なる態様では、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、又はコロナウイルス結合分子をコードしているポリヌクレオチド配列が提供される。

【００１６】
更なる態様では、本発明のシングルドメイン抗体のうちの１つ又は任意で２つ以上を含む多価ポリペプチドが提供される。
【００１７】
更なる態様では、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、又はコロナウイルス結合分子の親和性成熟変異体が提供される。
【００１８】
更なる態様では、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、又はコロナウイルス結合分子を生産する方法が提供される。
【００１９】
更なる態様では、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、又はコロナウイルス結合分子を含む医薬組成物が提供される。
【００２０】
更なる態様では、医薬において使用するための本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、若しくはコロナウイルス結合分子、又は本発明の医薬組成物が提供される。
【００２１】
更なる態様では、対象におけるコロナウイルスを治療する方法であって、治療活性量の本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、又はコロナウイルス結合分子を対象に投与することを含む方法が提供される。
【００２２】
更なる態様では、コロナウイルスの治療及び／又は予防において使用するための医薬の製造における、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、又はコロナウイルス結合分子の使用が提供される。
【００２３】
更なる態様では、コロナウイルスタンパク質を検出する方法が提供される。
【００２４】
更なる態様では、対象におけるコロナウイルス感染を診断する方法が提供される。
【図面の簡単な説明】
【００２５】
【図１】（ａ）Ｃ５に結合しているＲＢＤの結晶構造。（ＰＤＢ　ｉｄ　６ＹＺ５を探索モデルとして使用して分子置換によって解析）；（ｂ）Ｆ２に結合しているＲＢＤの結晶構造。（ａ）を（ｂ）と対比すると、ＲＢＤ上のＦ２の結合位置（ｂ）が、Ｃ５の結合位置（ａ）とは異なることが分かる。
【図２】Ｓ１三量体複合体の１つのＲＢＤにそれぞれ結合している３つのＣ５を示す電子顕微鏡構造。
【図３】（ａ）Ｃ５に結合しているＲＢＤの結晶構造。ＡＣＥ２（ＲＢＤ：ＡＣＥ２複合体ＰＤ　ｉｄ　６Ｍ０Ｊから）及びＨ１１－Ｈ４（Ｈ１１－Ｈ４：ＲＢＤ複合体ＰＤＢ　ｉｄ　６ＹＬＡ（Ｈｕｏ，Ｚｈａｏ　ｅｔ　ａｌ．２０２０）から）を重ねて示す。（ｂ）ＶＨＨ７２の構造（ＰＤＢ　ｉｄ　６ＷＡＱ（Ｗｒａｐｐ，Ｄｅ　Ｖｌｉｅｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．２０２０）から）を重ねた、ＣＲ３０２２及びＨ１１－Ｈ４に結合しているＲＢＤ（ＰＤＢ　ｉｄ　６Ｚ２Ｍから）の結晶構造。Ｈ１１－Ｈ４（及びＣ５）に結合するＲＢＤの領域がＣＲ３０２２（及びＶＨＨ７２）とは異なることを示す。
【図４】Ｃ１及びＨ３の両方に結合しているＲＢＤの結晶構造。Ｃ１のＣ末端を濃い灰色の球形で、Ｈ３のＮ末端を薄い灰色の球形で示す。Ｃ１のＣ末端（濃い灰色の球形）とＨ３のＮ末端（薄い灰色の球形）との間の距離は６３Åである。
【図５】（ａ）Ｃ１－ＲＢＤ－Ｈ３（図４）、Ｃ１－ＲＢＤ、及びＣ５－ＲＢＤ（図３ａ）のＲＢＤ部分を重ねることによって構築した、Ｃ１及びＣ５に結合しているＲＢＤの複合結晶構造。Ｃ１のＣ末端を濃い灰色の球形で、Ｃ５のＮ末端を薄い灰色の球形で示す。Ｃ１のＣ末端（濃い灰色の球形）とＣ５のＮ末端（薄い灰色の球形）との間の距離は５７Åである。（ｂ）Ｃ１及びＨ１１－Ｈ４に結合しているＲＢＤの複合結晶構造。Ｃ１のＣ

末端（濃い灰色の球形）とＨ４のＮ末端（薄い灰色の球形）との間の距離は６０Åである。

【図６】ＶＨＨ７２及びＣ５に結合しているＲＢＤの複合結晶構造。ＶＨＨ７７のＣ末端を濃い灰色の球形で、Ｃ５のＮ末端を薄い灰色の球形で示す。ＶＨＨ７２のＣ末端（濃い灰色の球形）とＣ５のＮ末端（薄い灰色の球形）との間の距離は５２Åである。

【図７】ＲＢＤと様々なＣ５ポリペプチドとの結合反応速度。Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）を実施し、結果を時間（秒）に対する応答（ＲＵ）のプロットとして提供する。（ａ）単量体Ｃ５、（ｂ）Ｃ５－Ｆｃ、（ｃ）Ｃ５－ＡＡＡ－Ｃ５、（ｄ）Ｃ５－９ＧＳ－Ｃ５、（ｅ）Ｃ５－６ＧＳ－ＳＵＭＯ－６ＧＳ－Ｃ５

【図８】（ａ）Ｃ１－Ｆｃ及びＣ５－Ｆｃ；（ｂ）単量体Ｃ５及びＣ５－Ｆｃのマイクロタイター中和曲線。

【図９】インビトロにおけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２株の中和。マイクロ中和アッセイで測定したＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の（ａ）ビクトリア株、（Ｂ）（ｂ）アルファ又はケント（Ｂ．１．１．７）株、及び（ｃ）ベータ又は南アフリカ（Ｂ．１．３５１）株の抗ＲＢＤナノボディ三量体の中和曲線。データを、平均＋／－９５％ＣＩとして示す。

【図１０】シリアンハムスターモデルにおけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のＣ５－Ｆｃ中和。（ａ）０日目に動物をＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（Ｂビクトリア５×１０４ｐｆｕ）に曝露し、次いで、曝露２４時間後に腹腔内経路によって送達したＣ５－Ｆｃ（ＩＰ　４ｍｇ／ｋｇ）又はＰＢＳで処理した。（ｂ）体重を毎日記録し、ベースラインからの平均体重変化率をプロットした（＋／－１　ＳＥ）。（ｃ）Ｈ＆Ｅ及びＩＳＨで染色した肺の代表的な画像を用いた、肺の患部領域の百分率及びウイルスＲＮＡのＩＳＨ染色された肺領域の百分率を示す肺の病理組織学的画像解析。ボックス及びバーは、中央値及び９５％Ｃ．Ｉ．を示す。中央値比較についてはマンホイットニーのＵ検定。

【図１１】シリアンハムスターモデルにおけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のＣ５三量体中和。（ａ）０日目に動物を曝露し、次いで、２時間後（４ｍｇ／ｋｇ）若しくは２４時間後（０．４及び４ｍｇ／ｋｇ）に鼻腔内設置によってＣ５三量体で、又は２４時間後にＩＰ（４ｍｇ／ｋｇ）で処理した。対照群は、ビヒクル単独（ＰＢＳ）で処理した。０日目から毎日の平均体重変化（±ＳＥＭ）を算出した。（ｂ）肺におけるウイルス量。（ｃ）気道の浸潤。（ｄ）Ｈ＆Ｅ及び抗ＳＡＲＳ－Ｃｏｖ－２　ＮＰで染色した肺の代表的な画像。

【図１２】（ａ）及び（ｂ）ＮｂＳＡ＿Ａ１０（ａ）又はＮｂＳＡ＿Ｄ１０（ｂ）のベータ（南アフリカ株）への結合反応速度を示すセンサグラム。（ｃ）及び（ｄ）ＲＢＤをナノボディＮｂＳＡ＿Ａ１０（ｃ）又はＮｂＳＡ＿Ｄ１０（ｄ）と共にインキュベートしても、ＲＢＤのＡＣＥ２又はＣＲ３０２２へのいずれの結合も妨げられなかったことを示すセンサグラム。

【図１３】（ａ）Ａ８のベータ（南アフリカ株）ＲＢＤへの結合反応速度を示すセンサグラム。（ｂ）ＲＢＤをナノボディＡ８と共にインキュベートすると、ＲＢＤのＡＣＥ２及びＣＲ３０２２への結合がいずれも妨げられたことを示すセンサグラム。

【図１４】Ａ８によるビクトリア及び南アフリカＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２株の中和。

【図１５】受動的吸収による捕捉剤の固定化。（ａ）捕捉剤としてプレートに受動的に吸収されたＨ４を、プローブとしてＣ１－Ｆｃを用いた場合を緑色で示す。捕捉抗体及びプローブ抗体を逆にした場合を赤色で示す。（ｂ）Ｃ１－Ｆｃを捕捉として、Ｈ４－ＨＲＰをプローブとして使用したが、異なるＥＬＩＳＡプレートを使用した。赤色はＣ１－Ｆｃの受動的吸収（本質的にｐａｒ　ａと同じ結果）である。ストレプトアビジンプレートに結合したビオチンｘ－Ｃ１－Ｆｃを使用した場合を青色で示す。いずれの実験でも、１を超える実際の吸光度値は、希釈し、次いで、掛け合わせることから得られた。

【図１６】捕捉としてのビオチン化ナノボディ（ビオチンｘ－ＸＸ－Ｆｃ）及びプローブ（ＹＹ－Ｆｃ－ＨＲＰ）の対合。

【図１７】ビオチンｘ－Ｆ２－ＦｃとＣ５－ＨＲＰとの組み合わせを用いて、ウイルス形態で提示されたときの抗原を測定することができた。（ａ）偽型ウイルスは、２１　ＴＣ

ＩＤ５０／ｍＬまで検出された。（ｂ）１０３ｆｆｕ／ｍＬの熱／ｅｍｐｉｇｅｎ不活性化ウイルス。
【図１８】部位選択的なビオチン－ＳＳ－Ｆ２－Ｆｃの結合及びＣ５－ＨＲＰの使用により、検出感度が向上した。（ａ）スパイクタンパク質は、１４７ｐｇ／ｍＬまで検出された。（ｂ）ＲＢＤは、３３ｐｇ／ｍＬまで検出された。（ｃ）偽型ウイルスは、１６　ＴＣＩＤ５０／ｍＬまで検出された。（ｄ）Ｅｍｐｉｇｅｎ不活性化ウイルスは、１６ｆｆｕ／ｍＬまで検出された。
【図１９】ＶＨＨ＿Ｈ６と競合するＲＢＤへのＡＣＥ－２又はＣＲ３０２２の結合のセンサグラム。
【図２０】Ｃ５、Ｈ３、及びＨ６　ＲＢＤ複合体の結晶構造。
【図２１】ＲＢＤに結合しているＡ８の結晶構造。ＡＣＥ２を重ねて示す。
【発明を実施するための形態】
【００２６】
「抗体」は、本明細書で使用するとき、特定の抗原を認識する免疫原性タンパク質を指す。各抗体は、抗原に特異的に結合する抗原結合部位を有する。抗体は、天然であってもよく、一部又は全部が合成であってもよい。また、抗体という用語は、抗体の抗原結合部位であるか又はそれに相同な抗原結合部位を有する任意のポリペプチド又はタンパク質も包含する。抗体は、ポリクローナルであってもモノクローナルであってもよい。従来の抗体は、２本の同一の重鎖と２本の同一の軽鎖を含み、各鎖は可変領域及び定常領域を含む。重鎖及び軽鎖の各可変領域は、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３の３つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む。抗体は、本明細書で使用するとき、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、ｄＡｂ、Ｆｄ等の抗原結合ドメインを含む抗体断片、及びダイアボディも包含する。
【００２７】
「二座」は、本明細書で使用するとき、２つの異なるシングルドメイン抗体、すなわち、２つの異なる抗原結合部位を有する２つのシングルドメイン抗体を含むポリペプチドを指す。好ましくは、二座分子は、２つの異なるシングルドメイン抗体が同じ抗原における２つの異なるエピトープに結合するように設計される。
【００２８】
「単量体」は、本明細書で使用するとき、１つの単一単位、例えば、シングルドメイン抗体（公知のシングルドメイン抗体又は本発明のシングルドメイン抗体のいずれか）、融合タンパク質、又は抗体を指す。
【００２９】
「ポリマー」とは、本明細書で使用するとき、互いに共有結合的に及び非共有結合的に結合している複数の単量体で構成される分子を指す。例えば、本発明のシングルドメイン抗体は、単一のポリペプチド鎖内で本発明のシングルドメイン抗体等の１つ以上の追加のシングルドメイン抗体に共有結合することができる。この場合、１つの遺伝子が、複数の連結したシングルドメイン抗体をコードすることができる。あるいは、２つ以上の別々の合成されたシングルドメイン抗体を共有結合及び／又は非共有結合で連結させることによってポリマーを形成することもできる。一例では、Ｆｃ分子に融合した合成シングルドメイン抗体は、Ｆｃ分子間にジスルフィド架橋を形成することを通じて、Ｆｃ分子に融合した別の合成シングルドメイン抗体に共有結合することができる。本発明のシングルドメイン抗体はまた、例えば二量体化又は三量体化のドメインの使用を通じて、非共有結合のみを介して他のシングルドメイン抗体（例えば、本発明のもの）に連結することもできる。この一例は、コラーゲン由来の三量体化ドメインに一本鎖抗体を融合させることである。例えば、「二量体」は、本明細書で使用するとき、互いに共有結合又は非共有結合で結合している２つの単量体を指す。「ホモ二量体」は、２つの同一の単量体で形成される。「ヘテロ二量体」は、２つの異なる単量体で形成される。「三量体」は、本明細書で使用するとき、互いに共有結合又は非共有結合で結合している３つの単量体を指す。
【００３０】

「二量化ドメイン」又は「三量化ドメイン」とは、本明細書で使用するとき、それぞれシングルドメイン抗体間の二量化又は三量化を可能にする配列タンパク質又はモチーフを指す。配列タンパク質又はモチーフは、シングルドメイン抗体に融合させることができる。例えば、コラーゲン由来の三量体化ドメインにシングルドメイン抗体配列を融合させると、単一抗体配列を有するポリペプチド鎖をコードしている遺伝子産物が得られるが、タンパク質を合成すると、実際の産物は三量体となる（Ｃｏｍｐｔｅ　ｅｔ　ａｌ）。

【００３１】

「単一特異性」とは、本明細書で使用するとき、全てが同じエピトープに結合する抗原結合部位を有するポリペプチドを指す。

【００３２】

「多重特異性」とは、本明細書で使用するとき、存在する異なる抗原の結合部位特異性の数を指す。例えば、「二重特異性」ポリペプチドは、２つの異なるエピトープ（同じ抗原上又は異なる抗原上のいずれか）に結合する抗原結合部位を有し、「三重特異性」ポリペプチドは、３つの異なるエピトープ（同じ抗原上又は異なる抗原上のいずれか）に結合する抗原結合部位を有し、「四重特異性」ポリペプチドは、４つの異なるエピトープ（同じ抗原上又は異なる抗原上のいずれか）に結合する抗原結合部位を有する。

【００３３】

「一価」とは、本明細書で使用するとき、１つの抗原結合部位を有するシングルドメイン抗体を指す。

【００３４】

「多価（ｍｕｌｔｉｖａｌｅｎｔ）」とは、本明細書で使用するとき、複数の抗原結合部位を有するポリペプチドを指す。多価という用語は、用語「多価（ｐｏｌｙｖａｌｅｎｔ）」と互換性がある。例えば、「二価」とは、本明細書で使用するとき、２つの抗原結合部位を有するポリペプチドを指し、「三価」とは、本明細書で使用するとき、３つの抗原結合部位を有するポリペプチドを指し、「四価」とは、本明細書で使用するとき、４つの抗原結合部位を有するポリペプチドを指す。多価抗体は、本明細書で定義するように、単一特異性、二重特異性、三重特異性、四重特異性、又は多重特異性であり得る。例えば、「単一特異性多価」ポリペプチドは、全てが同じエピトープに結合する複数の抗原結合部位を有する。「二重特異性多価」ポリペプチドは、複数の抗原結合部位を有し、ある数の抗原結合部位が第１のエピトープに結合し、ある数の抗原結合部位が（第１のエピトープとは異なる）第２のエピトープに結合する。

【００３５】

「保存的置換」とは、本明細書で使用するとき、タンパク質の機能（例えば、特定の標的、特に本発明の文脈ではＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のコロナウイルスのスパイクタンパク質に結合する能力、又は対象において免疫応答を誘発する能力）に実質的に影響を与えないアミノ酸置換を指す。当業者はアミノ酸の特性を容易に理解し、得られるポリペプチドの特性を実質的に変化させることなく保存的置換を容易に行うことができる。保存的置換の例を下表に提供する。

【００３６】

クラス	交換可能なアミノ酸
脂肪族	グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン
ヒドロキシル又は硫黄／セレン含有	セリン、システイン、スレオニン、メチオニン
芳香族	フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン
塩基性	ヒスチジン、リジン、アルギニン
酸性及びそのアミド	アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン

【００３７】
「欠失」とは、本明細書で使用するとき、ポリペプチド配列中のアミノ酸を除去すること（すなわち、アミノ酸配列の長さが１アミノ酸短くなるように、１つのアミノ酸をアミノ酸無しで置換すること）を指す。欠失は、ポリヌクレオチド配列、及びポリヌクレオチド配列から１つの核酸を除去すること（ポリヌクレオチド配列の長さが１核酸短くなるように、１つの核酸を核酸なしで置換すること）を指すこともある。
【００３８】
「同一性」とは、本明細書で使用するとき、２つ以上のポリペプチドのポリヌクレオチド配列を比較することによって決定される、２つの配列が関連している度合いである。同一性は、２つの配列がどの程度一致しているかの尺度を提供するために、２つの配列の関連度を用いて決定することができる。ポリペプチド又はポリヌクレオチドの配列を比較するための多数のプログラムが当業者に周知であり、例えば様々なＢＬＡＳＴ及びＣＬＵＳＴＡＬプログラムが挙げられる（が、これらに限定されない。配列の同一性を定量化するために、同一性パーセントを使用することができる。同一性パーセントを計算するには、２つの配列（ポリペプチド又はヌクレオチド）を最適にアラインし（すなわち、２つの配列が対応する各位置で最も多数の同一残基を有し、従って最も高い同一性パーセントを有するように配置し）、各位置のアミノ酸又は核酸の残基を、その位置の対応するアミノ酸又は核酸と比較する。幾つかの例では、第２の配列に最適に適合させるために配列にスペース（複数可）を挿入することによって、最適な配列アライメントを達成することができる。同一のアミノ酸残基又はヌクレオチドの数から同一性パーセントが得られる、すなわち、１０残基長の配列のうちの９残基が比較対象の２つの配列間で同一であった場合、同一性パーセントは９０％になる。同一性パーセントは、一般的に、比較される２つの配列の全長に沿って計算される。
【００３９】
「挿入」とは、ポリペプチド配列にアミノ酸を付加すること（すなわち、１アミノ酸の挿入とは、アミノ酸配列の長さが１アミノ酸長くなるように、既存のアミノ酸配列に１つの新規アミノ酸を付加すること）を指す。挿入は、ポリヌクレオチド配列、及びポリヌクレオチド配列に１つの核酸を付加することを指すこともある（すなわち、１核酸の挿入とは、核酸配列が１アミノ酸長くなるように、既存のポリヌクレオチド配列に１つの新規核酸を付加することを意味する）。
【００４０】
「改変」とは、本明細書で使用するとき、ポリペプチド配列におけるアミノ酸残基の変更を意味する。改変は、本明細書で定義するように、置換、欠失、又は挿入であり得る。また、改変とは、ポリヌクレオチド配列を指すこともある。
【００４１】
「シングルドメイン抗体」とは、本明細書で使用するとき、抗体の重鎖の可変領域を指

し、該可変領域は、ラクダ科免疫グロブリンの重鎖のみ（すなわち、軽鎖を含まない）サブセットに由来するものである。シングルドメイン抗体という用語は、（ラクダ科重鎖のみ抗体の可変ドメイン、ＶＨＨ）及びＮａｎｏｂｏｄｙ（登録商標）と互換的に使用することができる。本発明の文脈では、シングルドメイン抗体は、コロナウイルス、好ましくはＳＡＲ－ＣｏＶ－２のスパイクタンパク質と結合できる単一の重鎖可変領域を指すために使用される。抗体は、本明細書に記載するように、親和性成熟、ヒト化、又は改変することができる。このシングルドメイン抗体は、他の構成要素とコンジュゲートすることができる。

【００４２】

「置換」とは、本明細書で使用するとき、アミノ酸を異なるアミノ酸に置き換えることを指す。置換は、ポリヌクレオチド配列、すなわち、ある核酸を異なる核酸で置き換えることを指すこともある。置換は、上記で定義したように、保存的置換であってもよい。

【００４３】

「四価」とは、本明細書で使用するとき、４つの抗原結合部位を有するポリペプチドを指す。

【００４４】

本発明のシングルドメイン抗体は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のＳタンパク質の受容体結合ドメイン（「ＲＢＤ」）に対して陽性結合を有する１２種のＶＨＨ配列、すなわち、Ｂ１２、Ｆ２、Ｃ１、Ｃ５　Ｈ３、ＮｂＳＡ＿Ａ１０、ＮｂＳＡ＿Ｄ１０、Ａ８、３＿Ｃ５、８＿Ｇ１、１２＿Ｆ１１、及びＶＨ＿Ｈ６（アミノ酸配列は、配列番号１６～２０、２０９～２２０、及び２３９）として提供され、ポリヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号２１～２５、２０８～２１８、及び２３８として提供される）に基づく。

【００４５】

本明細書では、指定のＣＤＲのアミノ酸配列を定義するために、特定のアミノ酸配列を提供する。便宜上、これらを下表に列挙する。これら指定のＣＤＲ配列を含む本発明のシングルドメイン抗体は、本明細書で詳述するように、１つ以上の改変を含んでいてもよく、コロナウイルスペプチド、好ましくはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のＳタンパク質の受容体結合ドメインに対する結合親和性を保持する。

【００４６】

ID	CDR1	配列番号	CDR2	配列番号	CDR3	配列番号
B12	GGTFSTY	1	IRRSGST	2	AARRAGREYEY	3
F2	GRTFHSYV	4	ISWSSTPT	5	AADRGESYYYTRPTEYEF	6
C1	GFTNDFYS	7	LSVSDNTP	8	AAGRFAGRDTWPSSYDY	9
C5	GVTLGRHA	10	IRTFDGIT	11	ALGVTAACSDNPYF	12
H3	GRTFSTYS	13	MRWTGSST	14	AITTIVRAYYTEYTEADFGS	15
NbSA_A10	GRTFSTTR	190	IFLNTGTT	191	AAGRFSAAPLTQSTAFES	192
NbSA_D10	GRTSSDYS	193	LAWTVGAT	194	AGRYGAGLGFTERIYDY	195
A8	GGTFSTAA	196	IGWRGVRT	197	AASVGNYGLPWAHFEYDF	198
3_C5	GRTLSMR	199	INWSSGSI	200	AVQVDIGGYLDGYDY	201
8_G11	GRTITEYT	202	ISKSTDST	203	AAGSFYGRDSDAGGYDY	204
12_F11	GGAFSTSA	205	IGWRGVRT	206	AASDGNYGLPWAHFEYDF	207
VHH_H6	ESSLAPYR	235	ISRDAHPTST	236	ATDLGGYCSDSNYPRAW	237

ナノボディのＣＤＲアラインメント

【００４７】

Ｂ１２、Ｃ１、Ｃ５、Ｆ２、Ｈ３、ＮｂＳＡ＿Ａ１０、ＮｂＳＡ＿Ｄ１０、Ａ８、３＿Ｃ５、８＿Ｇ１１、１２＿Ｆ１１、及びＶＨＨ＿Ｈ６のアミノ酸配列及びヌクレオチド配

列（ＣＤＲは、太字で強調）

> B12 （配列番号 21)
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTCGTGCAGCCTGGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGCGCCGTTTCT
GGAGGCACCTTCAGTACCTATGGCATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAGATTGTAGCAGCG
ATTAGACGGAGTGGTAGCACATACTATGCAGACTCCGTGAGGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG
AACTCGGTGCTCCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCCAGGAGAGCG
GGTAGGGAGTATGAGTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

> B12 （配列番号 16)
QVQLVESGGGFVQPGGSLRLSCAVS**GGTFSTYG**MGWFRQAPGKEREIVAA**IRRSGST**YYADSVRGRFTISRDNAK
NSVLLQMNSLKPEDTAVYYC**AARRAGREYEY**WGQGTQVTVSS

> F2 （配列番号 22)
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGGCTCTCTAAGACTCGCTTGTATAGCCTCT
GGACGCACCTTCCATAGCTATGTCATGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAGTTTGTAGCAGCT
ATTAGTTGGAGTAGTACACCGACATACTATGGAGAATCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCC
AAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACCGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTTCTGTGCAGCAGACCGG
GGTGAAAGTTACTACTACACTCGACCCACCGAGTATGAATTCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

> F2 （配列番号 17)
QVQLVESGGGLVQAGGSLRLACIAS**GRTFHSYV**MAWFRQAPGKEREFVAA**ISWSSTPT**YYGESVKGRFTISRDNA
KNTVYLQMNRLKPEDTAVYFC**AADRGESYYYTRPTEYEF**WGQGTQVTVSS

> C1 （配列番号 23)
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGATTCACTAATGATTTTTATAGCATCGCGTGGTTCCGCCAGGCCCCAGGAAAGGAGCGTGAGGGGGTCTCATGG
CTTAGTGTCAGTGATAATACCCCAACCTACGTAGACTCCGTGAAGGACCGGTTCACCATCTCCAGACACAACGCC
AACAACACCGTGTACCTGCAAATGAACATGCTGAAACCTGAGGACACGGCCATTTACTATTGTGCAGCAGGACGC
TTCGCGGGAAGGGATACTTGGCCCTCGTCCTATGATTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

> C1 （配列番号 18)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTNDFYS**IAWFRQAPGKEREGVSW**LSVSDNTP**TYVDSVKDRFTISRHNA
NNTVYLQMNMLKPEDTAIYYC**AAGRFAGRDTWPSSYDY**WGQGTQVTVSS

> C1 alternative sequence (N76Q), difference to C1 shown with underline
（配列番号 220)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTNDFYS**IAWFRQAPGKEREGVSW**LSVSDNTP**TYVDSVKDRFTISRHNA
QNTVYLQMNMLKPEDTAIYYC**AAGRFAGRDTWPSSYDY**WGQGTQVTVSS

> C5 （配列番号 24)
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGGGGGTCTCTGACACTCTCCTGTGTCGCCTCT
GGAGTCACTTTGGGACGTCATGCCATAGGCTGGTTCCGCCAGGCCCCCGGGAAGGAGCGTGAGAGAGTCTCGTGT
ATTAGAACATTTGATGGCATCACAAGTTATGTAGAGTCCACGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGTAACAATGCC
ATGAACACGGTGTATCTGCAAATGAATAGCCTCAAACCTGAAGACACGGCCGTTTATTTCTGTGCACTGGGAGTG
ACTGCAGCCTGTTCAGATAATCCCTACTTCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

> C5 （配列番号 19)
QVQLVESGGGSVQAGGSLTLSCVAS**GVTLGRHA**IGWFRQAPGKERERVSC**IRTFDGIT**SYVESTKGRFTISSNNA
MNTVYLQMNSLKPEDTAVYFC**ALGVTAACSDNPYF**WGQGTQVTVSS

> H3 （配列番号 25)
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGAAGACTGGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGCCGCACCTTCAGTACCTACAGCATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAGTTTGTAGCAGGT
ATGCGCTGGACGGGTAGTAGTACATTCTACTCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCGTCTCCAGAAACAACGCC
AAGGACACGGTGTATCTGCACATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAATCACGACT
ATCGTAAGAGCTTACTATACTGAGTATACCGAAGCTGACTTTGGTTCCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTC
TCCTCA

> H3 （配列番号 20)
QVQLVESGGGLVKTGGSLRLSCAAS**GRTFSTYS**MGWFRQAPGKEREFVAG**MRWTGSST**FYSDSVKGRFTVSRNNA
KDTVYLHMNSLKPEDTAVYYC**AITTIVRAYYTEYTEADFGS**WGQGTQVTVSS

>NbSA_A10 （配列番号 208)
CAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGGGGACTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGACGTACCTTCAGTACCACTCGCATGGCCTGGTTCCGCCAGCCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGTTTGTAGCGGCG
ATTTTTCTGAATACTGGCACGACATACTATGCAGATCCCGTGAAGGACCGATTCGCCATCTCCAGAGACAATGCC
AAAAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGCGCAGCGGGTCGG
TTCAGCGCTGCTCCGCTTACACAGTCAACTGCCTTTGAGTCCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCC

>NbSA_A10（配列番号 209)
QVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAAS**GRTFSTTR**MAWFRQPPGKEREFVAA**IFLNTGTT**YYAD
PVKDRFAISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC**AAGRFSAAPLTQSTAFES**WGQGTQVTVS
A

>NbSA_D10 ((配列番号 210)
CAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGATTGGTACAGGTTGGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCT
GGACGCACCAGCAGTGACTATTCCGTGGGCTGGTTCCGCCGGGCTCAAGGGAAGGAGCGTGAGTTTGTGGCTGCT
CTGGCGTGGACTGTTGGCGCCACACACTATGGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCGTCTCCAGAGACAACGCC
AAGAACATGGTGTATCTGCAAATAGACAGCCTGAAACCTGAAGACACGGGCGTTTATTACTGTGCAGGTCGATAT
GGAGCGGGATTGGGGTTCACCGAAAGAATCTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTTTCCTCA

>NbSA_D10 ((配列番号 211)
QVQLVESGGGLVQVGGSLRLSCAVS**GRTSSDYS**VGWFRRAQGKEREFVAA**LAWTVGAT**HYGD
SVKGRFTVSRDNAKNMVYLQIDSLKPEDTGVYYC**AGRYGAGLGFTERIYDY**WGQGTQVTVSS

>A8 ((配列番号 212)
CAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGAGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGAGGCACCTTCAGTACCGCTGCCATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGCGAGGAGCGTGAGTGTGTAGCATCT
ATAGGCTGGAGAGGTGTTAGAACATGGTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTTACCATCTCCAGAGATAATCCC
CAGAATACGGTGTATTTGCAGATGAACAACCTGAAATCTGGCGACACGGCCGTTTATTACTGCGCAGCCTCAGTC
GGCAACTACGGGTTGCCGTGGGCCCACTTCGAATATGACTTCTGGGGCCAGGGGATCCAGGTCACCGTGTCGTCA

>A8 (配列番号 213)
QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS**GGTFSTAA**MGWFRQAPGEERECVAS**IGWRGVRT**WYAD
SVKGRFTISRDNPQNTVYLQMNNLKSGDTAVYYC**AASVGNYGLPWAHFEYDF**WGQGIQVTVS
S

>3_C5 (配列番号 214)
CAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGGCTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCTTGAGTATGCGTCGCATGAGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGT
GAGTTTGTAGCCACTATTAACTGGAGTAGTGGTAGTATATACGTTACAGACTCCGTGAAGGACCGATTCACCATC
TCCAGAGACAACGCCGAGAACACGGTGCATCTGCAAATGAACATGCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTCG
TGTGCAGTCCAAGTCGATATTGGGGGGTACCTCGACGGCTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTC
TCCTCA

>3_C5 (配列番号 215)
QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS**GRTLSMR**RMSWFRQAPGKEREFVAT**INWSSGSI**YVTD
SVKDRFTISRDNAENTVHLQMNMLKPEDTAVYSC**AVQVDIGGYLDGYDY**WGQGTQVTVSS

>8_G11 (配列番号 216)
CAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGACGCACCATCACTGAATATACCATAGGGTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAGTTTGTAACACTT
ATTAGCAAGAGTACTGATAGTACATGGGATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCGCCAGAGATTACGCC
AAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCTGGCTCC
TTTTACGGGCGCGATTCGGATGCTGGGGGCTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

>8_G11 (配列番号 217)
QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS**GRTITEYT**IGWFRQAPGKEREFVTL**ISKSTDST**WDAD
SVKGRFTIARDYAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC**AAGSFYGRDSDAGGYDY**WGQGTQVTVSS

>12_F11 (配列番号 218)
CAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGAGGAGGATTGGTGCAGGCTGGAGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGAGGCGCCTTCAGTACCTCTGCCATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAACGTGAGTTTGTCGCAGTT
ATAGGCTGGAGAGGTGTTAGAACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGTTTCACCATCGCCAGAGATAATCCC
CAGAACAGGGTGTATCTGGAGATGAGCAGCCTGAAATCTGACGACACGGGCGTTTATTTCTGTGCAGCCTCAGAC
GGCAACTACGGATTGCCGTGGGCCCATTTCGAGTATGACTTCTGGGGCCAGGGGATCCAGGTCACCGTCTCCTCA

>12_F11 (配列番号 219)
QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS**GGAFSTSA**MGWFRQAPGKEREFVAV**IGWRGVRT**YYAD
SVKGRFTIARDNPQNRVYLEMSSLKSDDTGVYFC**AASDGNYGLPWAHFEYDF**WGQGIQVTSS

VHH_H6 (配列番号 238)

CAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGACACTCTC
CTGTGTAGCGTCGGAATCATCTTTGGCGCCTTATCGCGTAGCCTGGTTCCGTCAGGCCCCAG
GGAAGGAGCGCGAGGGGGTCTCATGTATTAGTCGTGATGCACATCCTACTAGTACATACTAT
ACAGCCTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATGTCCAGAGACAATGCCAAGAACACGGTGTATCT
GCAAATGAACAGCCTGAAACCATCGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGACAGATTTGGGAG
GATACTGTTCGGATTCTAATTATCCCCGCGCCTGGTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTC
TCCTCA

VHH_H6 (配列番号 239)
QVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCVAS**ESSLAPYR**VAWFRQAPGKEREGVSC**ISRDAHPTST**YY
TASVKGRFTMSRDNAKNTVYLQMNSLKPSDTAVYYC**ATDLGGYCSDSNYPRAW**WGQGTQVTV
SS

【００４８】
一態様では、相補性決定領域である相補性決定領域３（ＣＤＲ３）を含むシングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、ＣＤＲ１、相補性決定領域２（ＣＤＲ２）、又は相補性決定領域３（ＣＤＲ３）から選択される相補性決定領域を含むシングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、又はＣＤＲ３から選択される少なくとも１つの相補性決定領域を含むシングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、シングルドメイン抗体は、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、又はＣＤＲ３から選択される少なくとも２つの相補性決定領域を含む。一実施形態では、３つの相補性決定領域ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含むシングルドメイン抗体が提供される。
【００４９】
一実施形態では、配列番号１２、１９８、９、３、６、１５、１９２、１９５、２０１、２０４、２０７、及び２３７からなる群から選択される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）を含むシングルドメイン抗体であって、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が０～７個のアミノ酸改変を含むシングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、ＣＤＲ３領域は、０～６個、０～５個、０～４個、０～３個、０～２個、及び０～１個のアミノ酸改変を含む。改変は、置換、欠失、又は挿入であってよい。一実施形態では、改変は置換である。
【００５０】
一実施形態では、配列番号１２、９、３、６、及び１５からなる群から選択される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）を含むシングルドメイン抗体であって、配列番号６、９、及び１５のアミノ酸配列のＣＤＲ３領域が、０～７個のアミノ酸改変、任意で０～２個の改変を含み、配列番号３及び１２のアミノ酸配列のＣＤＲ３領域が、０～５個のアミノ酸改変、任意で０～２個のアミノ酸改変を含むシングルドメイン抗体が提供される。
【００５１】
一実施形態では、相補性決定領域３（ＣＤＲ３）は、配列番号３である。一実施形態では、相補性決定領域３（ＣＤＲ３）は、配列番号６である。一実施形態では、相補性決定領域３（ＣＤＲ３）は、配列番号１５である。好ましい実施形態では、相補性決定領域３（ＣＤＲ３）は、配列番号１２又は１９８である。最も好ましい実施形態では、相補性決定領域３（ＣＤＲ３）は、配列番号１２である。一実施形態では、ＣＤＲ３領域は、０～６個、０～５個、０～４個、０～３個、０～２個、又は０～１個のアミノ酸改変を含む。改変は、置換、欠失、又は挿入であってよい。一実施形態では、改変は置換である。
【００５２】
一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体は、ＣＤＲ２領域を更に含んでいてもよい。ＣＤＲ２領域は、本明細書に開示される配列番号に従って定義することができる。更なる実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体は、ＣＤＲ１領域及びＣＤＲ２領域を更に含んでいてもよい。ＣＤＲ１領域及びＣＤＲ２領域は、本明細書に開示される配列番号に従って定義することができる。各実施形態では、シングルドメイン抗体は、４つのフレームワーク領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及びＦＲ４）を更に含んでいてもよい。
【００５３】

一態様では、抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体であって、単一抗体ドメインが、
（ａ）配列番号１１を含むＣＤＲ２及び配列番号１２を含むＣＤＲ３；
（ｂ）配列番号１９７を含むＣＤＲ２及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３；
（ｃ）配列番号８を含むＣＤＲ２及び配列番号９を含むＣＤＲ３；
（ｄ）配列番号２を含むＣＤＲ２及び配列番号３を含むＣＤＲ３；
（ｅ）配列番号５を含むＣＤＲ２及び配列番号６を含むＣＤＲ３；
（ｆ）配列番号１４を含むＣＤＲ２及び配列番号１５を含むＣＤＲ３；
（ｇ）配列番号１９１を含むＣＤＲ２及び配列番号１９２を含むＣＤＲ３；
（ｈ）配列番号１９４を含むＣＤＲ２及び配列番号１９５を含むＣＤＲ３；
（ｉ）配列番号２００を含むＣＤＲ２及び配列番号２０１を含むＣＤＲ３；
（ｊ）配列番号２０３を含むＣＤＲ２及び配列番号２０４を含むＣＤＲ３；
（ｋ）配列番号２０６を含むＣＤＲ２及び配列番号２０７を含むＣＤＲ３；又は
（ｌ）配列番号２３６を含むＣＤＲ２及び配列番号２３７を含むＣＤＲ３；
を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含むシングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、ＣＤＲ３領域は、０～６個、０～５個、０～４個、０～３個、０～２個、又は０～１個のアミノ酸改変を含む。一実施形態では、ＣＤＲ２領域は、０～３個、０～２個、０～４個、０～１個のアミノ酸改変を含む。

【００５４】

好ましい実施形態では、抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体であって、単一抗体ドメインが、配列番号１９７を含むＣＤＲ２及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含むシングルドメイン抗体が提供される。好ましい実施形態では、抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体であって、単一抗体ドメインが、配列番号１１を含むＣＤＲ２及び配列番号１２を含むＣＤＲ３を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含むシングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、ＣＤＲ３領域は、０～６個、０～５個、０～４個、０～３個、０～２個、又は０～１個のアミノ酸改変を含む。

【００５５】

一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体は、ＣＤＲ１領域を更に含んでいてもよい。ＣＤＲ１領域は、本明細書に開示される配列番号に従って定義することができる。各実施形態では、シングルドメイン抗体は、４つのフレームワーク領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及びＦＲ４）を更に含んでいてもよい。

【００５６】

一態様では、抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体であって、単一抗体ドメインが、
（ａ）配列番号１０を含むＣＤＲ１、配列番号１１を含むＣＤＲ２、及び配列番号１２を含むＣＤＲ３；
（ｂ）配列番号１９６を含むＣＤＲ１、配列番号１９７を含むＣＤＲ２、及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３；
（ｃ）配列番号７を含むＣＤＲ１、配列番号８を含むＣＤＲ２、及び配列番号９を含むＣＤＲ３；
（ｄ）配列番号１を含むＣＤＲ１、配列番号２を含むＣＤＲ２、及び配列番号３を含むＣＤＲ３；
（ｅ）配列番号４を含むＣＤＲ１、配列番号５を含むＣＤＲ２、及び配列番号６を含むＣＤＲ３；
（ｆ）配列番号１３を含むＣＤＲ１、配列番号１４を含むＣＤＲ２、及び配列番号１５を含むＣＤＲ３；

（ｇ）配列番号１９０を含むＣＤＲ１、配列番号１９１を含むＣＤＲ２、及び配列番号１９２を含むＣＤＲ３；
（ｈ）配列番号１９３を含むＣＤＲ１、配列番号１９４を含むＣＤＲ２、及び配列番号１９５を含むＣＤＲ３；
（ｉ）配列番号１９９を含むＣＤＲ１、配列番号２００を含むＣＤＲ２、及び配列番号２０１を含むＣＤＲ３；
（ｊ）配列番号２０２を含むＣＤＲ１、配列番号２０３を含むＣＤＲ２、及び配列番号２０４を含むＣＤＲ３；又は
（ｋ）配列番号２０５を含むＣＤＲ１、配列番号２０６を含むＣＤＲ２、及び配列番号２０７を含むＣＤＲ３；又は
（ｌ）配列番号２３５を含むＣＤＲ１、配列番号２３６を含むＣＤＲ２、及び配列番号２３７を含むＣＤＲ３；
を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ１のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含むシングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、ＣＤＲ３領域は、０～６個、０～５個、０～４個、０～３個、０～２個、又は０～１個のアミノ酸改変を含む。一実施形態では、ＣＤＲ２領域は、０～３個、０～２個、０～４個、０～１個のアミノ酸改変を含む。一実施形態では、ＣＤＲ１領域は、０～３個、０～２個、０～４個、０～１個のアミノ酸改変を含む。

【００５７】

好ましい実施形態では、抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体であって、単一抗体ドメインが、配列番号１９６を含むＣＤＲ１、配列番号１９７を含むＣＤＲ２、及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ１のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含むシングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、ＣＤＲ３領域は、０～６個、０～５個、０～４個、０～３個、０～２個、又は０～１個のアミノ酸改変を含む。

【００５８】

最も好ましい実施形態では、抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体であって、単一抗体ドメインが、配列番号１０を含むＣＤＲ１、配列番号１１を含むＣＤＲ２、及び配列番号１２を含むＣＤＲ３を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ１のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含むシングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、ＣＤＲ３領域は、０～６個、０～５個、０～４個、０～３個、０～２個、又は０～１個のアミノ酸改変を含む。

【００５９】

一実施形態では、一本鎖抗体又は抗原結合分子は、４つのフレームワーク領域を含む。フレームワーク領域は、ＣＤＲ配列を分離する。一実施形態では、４つのフレームワーク領域は、フレームワーク領域１（ＦＲ１）、フレームワーク領域２（ＦＲ２）、フレームワーク領域３（ＦＲ３）、及びフレームワーク領域４（ＦＲ４）であり、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３の間に散在している（すなわち、ＦＲ１－ＣＤＲ１－ＦＲ２－ＣＤＲ２－ＦＲ３－ＣＤＲ３－ＦＲ４）。一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体又は抗原結合分子は、４つのフレームワーク領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及びＦＲ４）及び３つのＣＤＲ（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３）を含むか又はから本質的になる。一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体又は抗原結合分子は、４つのフレームワーク領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及びＦＲ４）及び３つのＣＤＲ（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３）からなる。

【００６０】

一態様では、配列番号１９、２１３、１８、１６、１７、２０、２０９、２１１、２１５、２１７、２１９、２２０、及び２３９からなる群から選択される配列に対して少なく

とも７０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一態様では、配列番号１９、１８、１６、１７、及び２０からなる群から選択される配列に対して少なくとも７０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。これら配列はそれぞれ、３つのＣＤＲ領域（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３）及び４つのフレームワーク領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及びＦＲ４）を含む。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号１９、２１３、１８、１６、１７、２０、２０９、２１１、２１５、２１７、２１９、２２０、及び２３９からなる群から選択される配列に対して、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、配列番号１９、２１３、１８、１６、１７、２０、２０９、２１１、２１５、２１７、２１９、２２０、及び２３９からなる群から選択される配列を含む、抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、配列番号１９、１８、１６、１７、及び２０からなる群から選択される配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、配列番号１９、２１３、１８、１６、１７、２０、２０９、２１１、２１５、２１７、２１９、２２０、及び２３９からなる群から選択される配列からなるか又はから本質的になる抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、配列番号１９、１８、１６、１７、及び２０からなる群から選択される配列からなるか又はから本質的になる抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。

【００６１】

本明細書及び全体を通して、少なくともは、幾つかの実施形態では、列挙された百分率から最大１００％までを意味する。例えば、少なくとも７５％は、幾つかの実施形態では、７５％～１００％を意味し得る。

【００６２】

一実施形態では、配列番号１６に対して少なくとも７０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号１６に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号１６である。

【００６３】

一実施形態では、配列番号１７に対して少なくとも７０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号１７に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号１７である。

【００６４】

一実施形態では、配列番号１８に対して少なくとも７０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号１８に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００

％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号１８である。

【００６５】

最も好ましい実施形態では、配列番号１９に対して少なくとも７０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号１９に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号１９である。

【００６６】

一実施形態では、配列番号２０に対して少なくとも７０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号２０に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号２０である。

【００６７】

一実施形態では、配列番号２０９に対して少なくとも７０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号２０９に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号２０９である。

【００６８】

一実施形態では、配列番号２１１に対して少なくとも７０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号２１１に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号２１１である。

【００６９】

一実施形態では、配列番号２１３に対して少なくとも７０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号２１３に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号２１３である。

【００７０】

一実施形態では、配列番号２１５に対して少なくとも７０％の同一性を有するアミノ酸

配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号２１５に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号２１５である。

【００７１】

一実施形態では、配列番号２１７に対して少なくとも７０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号２１７に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号２１７である。

【００７２】

一実施形態では、配列番号２１９に対して少なくとも７０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号２１９に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号２１９である。

【００７３】

一実施形態では、配列番号２２０に対して少なくとも７０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号２２０に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号２２０である。

【００７４】

一実施形態では、配列番号２３９に対して少なくとも７０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号２３９に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号２３９である。

【００７５】

一態様では、本発明のシングルドメイン抗体をコードしているポリヌクレオチド配列が提供される。一実施形態では、ポリヌクレオチドは、ＤＮＡ又はＲＮＡである。そのような核酸配列は、遺伝子コンストラクトの形態であってもよい。

【００７６】

一実施形態では、配列番号２４、２１２、２３、２１、２２、２５、２０８、２１０、２１４、２１６、２１８、及び２３８からなる群から選択される配列に対して少なくとも

７０％の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、配列番号２４、２３、２１、２２、及び２５からなる群から選択される配列に対して少なくとも７０％の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、配列番号２４、２３、２１、２２、２５、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、及び２３８からなる群から選択される配列に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性を有する。一実施形態では、配列番号２４、２３、２１、２２、及び２５からなる群から選択される配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、配列番号２４、２３、２１、２２、２５、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、及び２３８からなる群から選択される配列を含む、抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、配列番号２４、２３、２１、２２、及び２５からなるか又はから本質的になる抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、配列番号２４、２３、２１、２２、２５、２０８、２１０、２１２、２１４、２１６、２１８、及び２３８からなるか又はから本質的になる抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。

【００７７】

一実施形態では、配列番号２１に対して少なくとも７０％の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、配列番号２１に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、配列番号２１である。

【００７８】

一実施形態では、配列番号２２に対して少なくとも７０％の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、配列番号２２に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、配列番号２２である。

【００７９】

一実施形態では、配列番号２３に対して少なくとも７０％の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、配列番号２３に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、配列番号２３である。

【００８０】

好ましい実施形態では、配列番号２４に対して少なくとも７０％の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、配列番号２４に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～

１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、配列番号２４である。

【００８１】

一実施形態では、配列番号２５に対して少なくとも７０％の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、配列番号２５に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、配列番号２５である。

【００８２】

一実施形態では、配列番号２０８に対して少なくとも７０％の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、配列番号２０８に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、配列番号２０８である。

【００８３】

一実施形態では、配列番号２１０に対して少なくとも７０％の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、配列番号２１０に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、配列番号２１０である。

【００８４】

好ましい実施形態では、配列番号２１２に対して少なくとも７０％の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、配列番号２１２に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、配列番号２１２である。

【００８５】

一実施形態では、配列番号２１４に対して少なくとも７０％の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、配列番号２１４に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、配列番号２１４である。

【００８６】

一実施形態では、配列番号２１６に対して少なくとも７０％の同一性を有するポリヌク

レオチド配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、配列番号２１６に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、配列番号２１６である。

【００８７】

一実施形態では、配列番号２１８に対して少なくとも７０％の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、配列番号２１８に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、配列番号２１８である。

【００８８】

一実施形態では、配列番号２３８に対して少なくとも７０％の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シングルドメイン抗体が提供される。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、配列番号２３８に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、配列番号２３８である。

【００８９】

一態様では、本発明は、コロナウイルスのスパイクタンパク質、好ましくはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質の受容体結合ドメインにおける２つの異なるエピトープに結合するコロナウイルス結合分子を提供する。コロナウイルス結合分子は、リンカーを介して２つの抗原結合分子を互いに接合させることに基づく。リンカーは、ユビキチン様タンパク質スーパーファミリーのタンパク質、ユビキチン（Ｕｂ）自体又はユビキチン様タンパク質（ＵＬＰ）のいずれかを含む。リンカーは、任意で、ユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質のｎ末端に４～５０アミノ酸残基を含むスペーサー、及び任意で、ユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質のｃ末端に４～５０アミノ酸残基を含むスペーサーを更に含む。抗原結合分子は、コロナウイルスのスパイクタンパク質、好ましくはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質の受容体結合ドメインにおける２つの異なるエピトープを標的とする。第１の抗原結合分子は、配列番号２３２内に含まれる第１のエピトープの全部又は一部に結合する。第２の抗原結合分子は、配列番号２３３内に含まれる第１のエピトープの全部又は一部に結合する。驚くべきことに、受容体結合ドメインにおける異なるエピトープに結合する２つの抗原結合分子を組み合わせることによって、全体の結合親和性が著しく増大することが実証された。

【００９０】

コロナウイルス結合分子は、以下の一般的な設計に従って作製される：

Ｎ’－ＡＢＭ（１）－スペーサー１－リンカー－スペーサー２－ＡＢＭ（２）－Ｃ’

ＡＢＭ（１）－エピトープ１を標的とする抗原結合分子

ＡＢＭ（２）－エピトープ２を標的とする抗原結合分子

リンカー－ユビキチン又はユビキチン様タンパク質

スペーサー１（任意）－５～５０アミノ酸

スペーサー２（任意）－５～５０アミノ酸

【００９１】

コロナウイルス結合分子は、第１の抗原結合分子がコロナウイルス結合分子のｎ末端又はそれに最近接して配置され、第２の抗原結合分子がコロナウイルス結合分子のｃ末端又はそれに最近接して配置されるように順序付けてよい。あるいは、コロナウイルス結合分子は、第２の抗原結合分子がコロナウイルス結合分子のｎ末端又はそれに最近接して配置され、第１の抗原結合分子がコロナウイルス結合分子のｃ末端又はそれに最近接して配置されるように順序付けてもよく、例えば、

Ｎ’－ＡＢＭ（１）－スペーサー１－リンカー－スペーサー２－ＡＢＭ（２）－Ｃ’

Ｎ’－ＡＢＭ（２）－スペーサー１－リンカー－スペーサー２－ＡＢＭ（１）－Ｃ’

である。

【００９２】

本発明のコロナウイルス結合分子は、第１及び第２の抗原結合分子を含む。抗原結合分子は、本明細書で使用するとき、抗体又はその断片、シングルドメイン抗体又はその断片であり得る。一実施形態では、第１の抗原結合分子は、抗体、又はその断片若しくはバリアントである。一実施形態では、第１の抗原結合分子は、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）である。一実施形態では、第２の抗原結合分子は、抗体、又はその断片若しくはバリアントである。一実施形態では、第２の抗原結合分子は、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）である。一実施形態では、第１の抗原結合分子は、シングルドメイン抗体である。一実施形態では、第２の抗原結合分子は、シングルドメイン抗体である。好ましくは、第１の抗原結合分子及び第２の抗原結合分子は、シングルドメイン抗体である。

【００９３】

第１及び第２の抗原結合分子は、それぞれ第１及び第２のエピトープの全部又は一部に結合し、該第１及び第２のエピトープは、実質的に重複していない。第１及び第２のエピトープは、いずれもコロナウイルス、好ましくはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイクの受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）に位置する。コロナウイルスのスパイクタンパク質間の相同性の程度に鑑みて、リンカーを介して互いに接合された２つの抗原結合分子を含む本発明のコロナウイルス結合分子は、有利なことにＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２、及びＭＥＲＳを含む様々なコロナウイルスのスパイクタンパク質における２つの重複しないエピトープを標的とすることができるように、空間的に構成される。これに関して、本発明のコロナウイルス結合分子は、１種を超えるコロナウイルスを標的とすることができ、それによって、汎コロナウイルス結合分子を提供することができる。一実施形態では、本発明のコロナウイルス結合分子は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１における第１及び第２エピトープの両方に結合することができ、また、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２における対応する第１及び第２エピトープにも結合することができる。

【００９４】

一実施形態では、第１の抗原結合分子は、コロナウイルスのスパイクタンパク質の受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）に位置する第１のエピトープの全部又は一部に結合する。コロナウイルスは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２、及びＭＥＲＳからなる群から選択されるコロナウイルス、好ましくはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２、最も好ましくはヒトＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２であってよい。一実施形態では、第１の抗原結合分子は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１のスパイクの受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）に位置する第１のエピトープの全部又は一部に結合する。好ましい実施形態では、第１の抗原結合分子は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイクの受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）に位置する第１のエピトープの全部又は一部に結合する。エピトープ１は、ＡＣＥ２受容体に結合するＲＢＤの表面を含む。従って、このエピトープに結合する抗原結合分子は、ヒトＡＣＥ２タンパク質に結合するコロナウイルスの受容体結合ドメインを直接ブロックする。このエピトープは、本明細書に記載の通り、シングルドメイン抗体Ｃ５、Ｈ１１－Ｈ４、Ｈ１１－Ｄ４、Ｈ３、Ｈ１１－Ａ１０、Ｈ１１－Ｂ５、Ｈ１１－Ｈ６、及びＶＨＨ＿Ｈ６によって標的とされる。

【００９５】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイク糖タンパク質の配列を以下に提供するが、エピトープ１の領域を強調し、太字で示す：

【００９６】

スパイク糖タンパク質（ＵｎｉＰｒｏｔ、ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ／ｕｎｉｐｒｏｔ／Ｐ５９５９４）（配列番号２３１）

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAI
HVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFC
NDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIY
SKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQP
RTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGE
VFNAT**RFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVR**
QIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAG
STPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFN
GLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLY
QDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNS
PRRARSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTE
CSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRS
FIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITS
GWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVV
NQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRA
SANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAH
FPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYF
KNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGL
IAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT

【００９７】

エピトープ１は、以下の配列番号２３２として提供されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイク糖タンパク質の残基３４６から５０５に及ぶものとして定義される：

RFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPG
QTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCN
GVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGY

【００９８】

特に、本発明のコロナウイルス結合分子が標的とするエピトープ１は非線形であり、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイク糖タンパク質の以下のアミノ酸で構成される：Ａｒｇ３４６、Ａｒｇ４０３、Ｌｙｓ４４４、Ｇｌｙ４４６、Ｇｌｙ４４７、Ｔｙｒ４４９、Ａｓｎ４５０、Ｌｅｕ４５２、Ｔｙｒ４５３、Ｌｅｕ４５５、Ｐｈｅ４５６、Ｔｈｒ４７０、Ｉｌｅ４７２、Ｇｌｙ４８２、Ｖａｌ４８３、Ｇｌｕ４８４、Ｇｌｙ４８５、Ｐｈｅ４８６、Ｃｙｓ４８８、Ｔｙｒ４８９、Ｐｈｅ４９０、Ｌｅｙ４９２、Ｇｌｎ４９３、Ｓｅｒ４９４、Ｔｙｒ４９５、Ｇｌｙ４９６、Ｇｌｎ４９８、Ｔｈｒ５００、Ａｓｎ５０１、Ｔｙｒ５０５。

【００９９】

一実施形態では、第２の抗原結合分子は、コロナウイルスのスパイクタンパク質の受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）に位置する第２のエピトープの全部又は一部に結合する。コロナウイルスは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２、及びＭＥＲＳからなる群から選択されるコロナウイルス、好ましくはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２、最も好ましくはヒトＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２であってよい。一実施形態では、第２の抗原結合分子は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１のスパイクの受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）に位置する第１のエピトープの全部又は一部に結合する。好ましい実施形態では、第２の抗原結合分子は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイクの受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）に位置する第２のエピトープの全部又は一部に結合する。エピトープ２は、ＡＣＥ２結合部位（すなわち、エピトープ１の領域）から離れて位置し、Ａ８、Ｆ２、ＶＨＨ７２、ＣＲ３０２２、ＥＹ６Ａ、Ｃ１、及びＢ１２によって標的とされる。

【０１００】
スパイク糖タンパク質の配列を以下に提供するが、エピトープ２の領域を強調し、太字で示す：
【０１０１】
スパイク糖タンパク質（ＵｎｉＰｒｏｔ、ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ／ｕｎｉｐｒｏｔ／Ｐ５９５９４）（配列番号２３１）

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAI
HVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFC
NDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIY
SKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQP
RTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGE
VFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSV**LYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVR**
QIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAG
STPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFN
GLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLY
QDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNS
PRRARSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTE
CSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRS
FIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITS
GWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVV
NQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRA
SANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAH
FPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYF
KNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGL
IAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT

【０１０２】
エピトープ２は、以下の配列番号２３３として提供されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイク糖タンパク質の残基３６８から５１９に及ぶものとして定義される：

LYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIA
WNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGV
GYQPYRVVVLSFELLH

【０１０３】
本発明のコロナウイルス結合分子が標的とするエピトープ２は非線形であり、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイク糖タンパク質の以下のアミノ酸で構成される：
Ｌｅｕ３６８、Ｔｙｒ３６９、Ａｓｎ３７０、Ｓｅｒ３７１、Ａｌａ３７２、Ｐｈｅ３７４、Ｓｅｒ３７５、Ｔｈｒ３７６、Ｐｈｅ３７７、Ｌｙｓ３７８、Ｃｙｓ３７９、Ｔｙｒ３８０、Ｇｌｙ３８１、Ｖａｌ３８２、Ｓｅｒ３８３、Ｐｒｏ３８４、Ｔｈｒ３８５、Ｌｙｓ３８６、Ａｓｎ３８８、Ａｓｐ３８９、Ｌｅｕ３９０、Ｐｈｅ３９２、Ａｒｇ４０８、Ａｌａ４１１、Ｐｒｏ４１２、Ｇｌｙ４１３、Ｇｌｎ４１４、Ａｓｐ４２７、Ａｓｐ４２８、Ｐｈｅ４２９、Ｔｈｒ４３０、Ｐｈｅ５１５、Ｇｌｕ５１６、Ｌｅｕ５１７、Ｌｅｕ５１８、Ｈｉｓ５１９。
【０１０４】
一態様では、
（ａ）コロナウイルスタンパク質内に含まれる第１のエピトープの全部又は一部に結合する第１の抗原結合分子；
（ｂ）コロナウイルスタンパク質内に含まれる第２のエピトープの全部又は一部に結合する第２の抗原結合分子；及び
（ｃ）リンカー
を含み、該リンカーが、
（ａ）ユビキチン又はユビキチン様タンパク質；
（ｂ）該ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｎ末端に接合している４～５０アミ

ノ酸の更なる任意のスペーサー；及び
（ｃ）該ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｃ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；
を含み、該リンカーが、該第１の抗原結合分子を該第２の抗原結合分子に接合させ、
任意で、該第１及び第２のエピトープが実質的に重複していない、コロナウイルス結合分子が提供される。一実施形態では、コロナウイルスタンパク質は、スパイクタンパク質、任意でスパイクタンパク質の受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）である。コロナウイルスは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２、及びＭＥＲＳからなる群から選択されるコロナウイルス、好ましくはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２であってよい。

【０１０５】

一態様では、
（ａ）配列番号２３２内に含まれる第１のエピトープの全部又は一部に結合する第１の抗原結合分子；
（ｂ）配列番号２３３内に含まれる第２のエピトープの全部又は一部に結合する第２の抗原結合分子；及び
（ｃ）リンカー
を含み、該リンカーが、
（ｉ）ユビキチン又はユビキチン様タンパク質；
（ｉｉ）該ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｎ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；及び
（ｉｉｉ）該ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｃ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；
を含み、該リンカーが、該第１の抗原結合分子を該第２の抗原結合分子に接合させ、
任意で、該第１及び第２のエピトープが実質的に重複していない、コロナウイルス結合分子が提供される。

【０１０６】

一実施形態では、コロナウイルスタンパク質は、スパイクタンパク質、任意でスパイクタンパク質の受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）である。コロナウイルスは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２、及びＭＥＲＳからなる群から選択されるコロナウイルス、好ましくはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２であってよい。

【０１０７】

抗原結合分子は、標的エピトープの全部又は一部に結合する。一態様では、第１の抗原結合分子は、Ｃ５、Ｈ４、Ｈ３、Ｄ４、Ａ１０、Ｂ５、及びＨ６からなる群から選択される。一実施形態では、第２の抗原結合分子は、Ｃ１、Ｂ１２、Ｆ２、Ｖｈｈ７２、ＣＲ３０２２、ＥＹ６Ａからなる群から選択される。一実施形態では、第２の抗原結合分子は、エピトープ１から離れて位置する。

【０１０８】

一実施形態では、コロナウイルス結合分子は、コロナウイルスタンパク質、任意でＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質内に含まれる第３、第４、又は第５のエピトープの全部又は一部に結合する第３及び任意で第４又は第５の抗原結合分子を更に含み、
任意で、該第３、第４、又は第５の抗原結合分子は、より多くのリンカーのうちの１つを介して第１及び第２の抗原結合分子に連結され、第１若しくは第２の抗原結合分子又はユビキチン若しくはユビキチン様タンパク質又は更なる任意スペーサーのうちの１つに直接連結される。

【０１０９】

一実施形態では、第１の抗原結合分子は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイク糖タンパク質（配列番号２３１）の残基３４６、４０３、４４４、４４６、４４７、４４９、４５０、４５２、４５３、４５５、４５６、４７０、４７２、４８２、４８３、４８４、４８５、４８６、４８８、４８９、４９０、４９２、４９３、４９４、４９５、４９６、４９８、５００、５０１、及び５０５からなる群から選択される少なくとも１０個のアミノ酸に

結合する。一実施形態では、第１の抗原結合分子は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイク糖タンパク質（配列番号２３１）の残基３４６、４０３、４４４、４４６、４４７、４４９、４５０、４５２、４５３、４５５、４５６、４７０、４７２、４８２、４８３、４８４、４８５、４８６、４８８、４８９、４９０、４９２、４９３、４９４、４９５、４９６、４９８、５００、５０１、及び５０５からなる群から選択される少なくとも２０個のアミノ酸に結合する。一実施形態では、第１の抗原結合分子は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイク糖タンパク質（配列番号２３１）の残基３４６、４０３、４４４、４４６、４４７、４４９、４５０、４５２、４５３、４５５、４５６、４７０、４７２、４８２、４８３、４８４、４８５、４８６、４８８、４８９、４９０、４９２、４９３、４９４、４９５、４９６、４９８、５００、５０１、及び５０５からなる群から選択される少なくとも２５個のアミノ酸に結合する。一実施形態では、第１の抗原結合分子は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイク糖タンパク質（配列番号２３１）の残基３４６、４０３、４４４、４４６、４４７、４４９、４５０、４５２、４５３、４５５、４５６、４７０、４７２、４８２、４８３、４８４、４８５、４８６、４８８、４８９、４９０、４９２、４９３、４９４、４９５、４９６、４９８、５００、５０１、及び５０５からなる群から選択される少なくとも２６個、少なくとも２７個、少なくとも２８個、又は少なくとも２９個のアミノ酸に結合する。一実施形態では、第１の抗原結合分子は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイク糖タンパク質（配列番号２３１）の残基３４６、４０３、４４４、４４６、４４７、４４９、４５０、４５２、４５３、４５５、４５６、４７０、４７２、４８２、４８３、４８４、４８５、４８６、４８８、４８９、４９０、４９２、４９３、４９４、４９５、４９６、４９８、５００、５０１、及び５０５に結合する。

【０１１０】

一実施形態では、第２の抗原結合分子は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイク糖タンパク質（配列番号２３１）の残基３６８、３６９、３７０、３７１、３７２、３７４、３７５、３７６、３７７、３７８、３７９、３８０、３８１、３８２、３８３、３８４、３８５、３８６、３８８、３８９、３９０、３９２、４０８、４１１、４１２、４１３、４１４、４２７、４２８、４２９、４３０、５１５、５１６、５１７、５１８、及び５１９からなる群から選択される少なくとも１０個のアミノ酸に結合する。一実施形態では、第２の抗原結合分子は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイク糖タンパク質（配列番号２３１）の残基３６８、３６９、３７０、３７１、３７２、３７４、３７５、３７６、３７７、３７８、３７９、３８０、３８１、３８２、３８３、３８４、３８５、３８６、３８８、３８９、３９０、３９２、４０８、４１１、４１２、４１３、４１４、４２７、４２８、４２９、４３０、５１５、５１６、５１７、５１８、及び５１９からなる群から選択される少なくとも２０個のアミノ酸に結合する。一実施形態では、第２の抗原結合分子は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイク糖タンパク質（配列番号２３１）の残基３６８、３６９、３７０、３７１、３７２、３７４、３７５、３７６、３７７、３７８、３７９、３８０、３８１、３８２、３８３、３８４、３８５、３８６、３８８、３８９、３９０、３９２、４０８、４１１、４１２、４１３、４１４、４２７、４２８、４２９、４３０、５１５、５１６、５１７、５１８、及び５１９からなる群から選択される少なくとも３０個のアミノ酸に結合する。一実施形態では、第２の抗原結合分子は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイク糖タンパク質（配列番号２３１）の残基３６８、３６９、３７０、３７１、３７２、３７４、３７５、３７６、３７７、３７８、３７９、３８０、３８１、３８２、３８３、３８４、３８５、３８６、３８８、３８９、３９０、３９２、４０８、４１１、４１２、４１３、４１４、４２７、４２８、４２９、４３０、５１５、５１６、５１７、５１８、及び５１９からなる群から選択される少なくとも３１個、少なくとも３２個、少なくとも３３個、少なくとも３４個、又は少なくとも３５個のアミノ酸に結合する。一実施形態では、第２の抗原結合分子は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイク糖タンパク質（配列番号２３１）の残基３６８、３６９、３７０、３７１、３７２、３７４、３７５、３７６、３７７、３７８、３７９、３８０、３８１、３８２、３８３、３８４、３８５、３８６、３８８、３８９、３９０、３９２、４０８、４１１、４１２、４１３、４１４、４２７、４２８、４

２９、４３０、５１５、５１６、５１７、５１８、及び５１９に結合する。
【０１１１】
一実施形態では、第１の抗原結合分子は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質内に含まれる第１のエピトープの全部又は一部に結合し、第２の抗原結合分子は、コロナウイルスタンパク質内に含まれる第２のエピトープＣｏＶ－２の全部又は一部に結合し、該第１及び第２のエピトープは実質的に重複していない。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質は、スパイク糖タンパク質［配列番号２３１］、任意でスパイクタンパク質のＳ１サブユニットにおける受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）であってよい。
【０１１２】
本発明のリンカーは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイクタンパク質のＲＢＤ結合ドメインに結合したときの非常に優れた特性を促進するために、２つの抗原結合分子を最適な空間配置で連結させる。リンカーによって、第１及び第２の抗原結合分子をそれぞれ第１及び第２のエピトープに結合できるような角度配置で配置させることが可能になる。本発明のコロナウイルス結合分子がその２つの標的エピトープに結合した場合、リンカーのＮ’末端からＣ’末端までの距離は約４０～７０オングストローム、任意で５０～６５オングストロームである。一実施形態では、距離は、約５０～５５オングストロームである。一実施形態では、距離は、約５５～６０オングストロームである。一実施形態では、距離は、約６０～６５オングストロームである。指定の距離は、リンカー自体の全長であり、存在する場合は任意の追加のスペーサー（複数可）を含む。本発明のコロナウイルス結合分子は、ユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質を天然の折り畳まれた状態でリンカーとして使用するので、本明細書で指定する距離は、ユビキチンフォールドを有する、その天然の三次元構造のユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質を指す。
【０１１３】
一実施形態では、コロナウイルス分子は、ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｎ末端又はｃ末端に接合している４～５０アミノ酸の任意のスペーサーを含み、該スペーサーは、
ａ．１つ以上のＧｌｙＳｅｒリピート；及び／又は
ｂ．１つ以上のポリＡストレッチ
を含む。
【０１１４】
一態様では、コロナウイルス結合分子は、追加の抗原結合分子を更に含む。一実施形態では、コロナウイルス結合分子は、コロナウイルスタンパク質、任意でＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質内に含まれる第３、第４、又は第５のエピトープの全部又は一部に結合する第３及び任意で第４又は第５の抗原結合分子を含み、任意で、該第３、第４、又は第５の抗原結合分子は、より多くのリンカーのうちの１つを介して第１及び第２の抗原結合分子に連結され、第１若しくは第２の抗原結合分子に直接連結されるか、あるいはユビキチン若しくはユビキチン様タンパク質又は更なる任意のスペーサーのうちの１つに連結される。一実施形態では、コロナウイルスタンパク質は、スパイクタンパク質、任意でスパイクタンパク質の受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）である。
【０１１５】
本発明のコロナウイルス結合分子は、本明細書で定義する通り、特異的シングルドメイン抗体を含み得る。一実施形態では、本発明の二座分子を形成する抗原結合分子は、本明細書に開示される特定のアミノ酸配列のうちの１つ又は１つ超を含み得る。二座分子は、本明細書で指定される第１のアミノ酸配列を含む第１の抗原結合分子、及び本明細書で指定される第２のアミノ酸配列を含有する第２の抗原結合分子を提供することによって形成され得る。本発明の二座分子を形成する抗原結合分子又はシングルドメイン抗体は、本明細書で詳述するように、１つ以上の改変を含んでいてもよく、コロナウイルスペプチド、好ましくはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のＳタンパク質の受容体結合ドメインに対する結合親和性を保持する。
【０１１６】

一実施形態では、Ｃ５、Ｈ３、Ｈ１１＿Ｄ４、Ｈ１１＿Ｈ４、Ｈ１１＿Ａ１０、Ｈ１１＿Ｂ５、若しくはＶＨＨ＿Ｈ６に基づくアミノ酸若しくはポリヌクレオチドの配列を有する第１の抗原結合分子及び／又はＡ８、Ｆ２、ＶＨＨ７２、ＣＲ３０２２、ＥＹ６Ａ、Ｃ１、若しくはＢ１２に基づくアミノ酸若しくはポリヌクレオチドの配列を有する第２の抗原結合分子を含むコロナウイルス結合分子が提供される。以下の表は、本発明の二座ポリペプチドを形成し得る抗原結合分子の様々な組み合わせを例示する。

【０１１７】

好ましい実施形態では、Ｃ５に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を含む第１のシングルドメイン抗体と、Ａ８、Ｆ２、ＶＨＨ７２、Ｃ１、又はＢ１２に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を有する第２のシングルドメイン抗体と、を含むコロナウイルス結合分子が提供される。好ましい実施形態では、Ｃ５、Ｈ３、Ｈ１１＿Ｄ４、Ｈ１１＿Ｈ４、Ｈ１１＿Ａ１０、Ｈ１１＿Ｂ５、又はＶＨＨ＿Ｈ６に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を含む第１のシングルドメイン抗体と、Ａ８に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を有する第２のシングルドメイン抗体と、を含むコロナウイルス結合分子が提供される。最も好ましい実施形態では、Ｃ５に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を含む第１のシングルドメイン抗体と、Ａ８に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を有する第２のシングルドメイン抗体と、を含むコロナウイルス結合分子が提供される。

【０１１８】

全体を通して詳述する通り、アミノ酸又はポリヌクレオチドの配列は、指定のシングルドメイン抗体のＣＤＲ３、ＣＤＲ２、及び／若しくはＣＤＲ１、又はそれらのバリアントを含んでいてもよく、指定のシングルドメイン抗体のアミノ酸配列又はそのバリアントを含んでいてもよく、指定のシングルドメイン抗体のポリヌクレオチド配列のそのバリアントを含んでいてもよい。

【０１１９】

エピトープ1 / エピトープ2	C5	H11-H4	H11-D4	H3	H11-A10	H11-B5	H11-H6	VHH_H6
F2	C5/F2	H11-H4/F2	H11-D4/F2	H3/F2	H11-A10/F2	H11-B5/F2	H11-H6/F2	VHH_H6/F2
VHH72	C5/VHH72	H11-H4/VHH72	H11-D4/VHH72	H3/VHH72	H11-A10/VHH72	H11-B5/VHH72	H11-H6/VHH72	VHH_H6/VHH72
CR3022	C5/CR3022	H11-H4/CR3022	H11-D4/CR3022	H3/CR3022	H11-A10/CR3022	H11-B5/CR3022	H11-6/CR3022	VHH_H6/CR3022
EY6A	C5/EY6A	H11-H4/EY6A	H11-D4/EY6A	H3/EY6A	H11-A10/EY6A	H11-B5/EY6A	H11-H6/EY6A	VHH_H6/EY6A
C1	C5/C1	H11-H4/C1	H11-D4/C1	H3/C1	H11-A10/C1	H11-B5/C1	H11-H6/C1	VHH_H6/C1
B12	C5/B12	H11-H4/B12	H11-D4/B12	H3/B12	H11-A10/B12	H11-B5/B12	H11-H6/B12	VHH_H6/B12
A8	C5/A8	H11-H4/A8	H11-D4/A8	H3A8	H11-A10/A8	BH11-5/A8	H11-H6/A8	VHH_H6/A8

エピトープ2 / エピトープ1	F2	VHH72	CR3022	EY6A	C1	B12
C5	F2/C5	VHH72/C5	CR3022/C5	EY6A/C5	C1/C5	B12/C5
H11-H4	F2/H4	VHH72/H11-H4	CR3022/H11-H4	EY6A/H11-H4	C1/H11-H4	B12/H11-H4
H11-D4	F2/D4	VHH72/H11-D4	CR3022/H11-D4	EY6A/H11-D4	C1/H11-D4	B12/H11-D4
H3	F2/H3	VHH72/H3	CR3022/H3	EY6A/H3	C1/H3	B12/H3
H11-A10	F2/A10	VHH72/H11-A10	CR3022/H11-A10	EY6A/H11-A10	C1/H11-A10	B12/H11-A10
H11-B5	F2/B5	VHH72H11-/B5	CR3022/H11-B5	EY6A/H11-B5	C1/H11-B5	B12/H11-B5
H11-H6	F2/H6	VHH72/H11-H6	CR3022/H11-H6	EY6A/H11-H6	C1/H11-H6	B12/H11-H6
VHH_H6	F2/VH_H6	VHH72/VH_H6	CR3022/VH_H6	EY6A/VH_H6	C1/VH_H6	B12/VH_H6

【０１２０】

一実施形態では、本発明の第１の抗原結合分子は、配列番号１２、１５、７２、７３、７４、７５、７６、又は２３７からなる群から選択される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）を含むシングルドメイン抗体であって、アミノ酸配列が０～７個のアミノ酸改変、任意で０～６個、０～５個、０～４個、０～３個、０～２個、及び０～１個のアミノ酸改変を含む、シングルドメイン抗体である。好ましい実施形態では、相補性決定領域３（ＣＤＲ３）は、配列番号１２である。一実施形態では、相補性決定領域３（ＣＤＲ３）は、配列番号１５である。一実施形態では、相補性決定領域３（ＣＤＲ３）は、配列番号７２である。一実施形態では、相補性決定領域３（ＣＤＲ３）は、配列番号７３である。一実施形態では、相補性決定領域３（ＣＤＲ３）は、配列番号７４である。一実施形態では、相補性決定領域３（ＣＤＲ３）は、配列番号７５である。一実施形態では、相補性決定領域３（ＣＤＲ３）は、配列番号７６である。好ましい実施形態では、相補性決定領域３（ＣＤＲ３）は、配列番号２３７である。

【０１２１】

一実施形態では、本発明の第１の抗原結合分子は、配列番号１２、１５、７２、７３、７４、７５、７６、及び２３７からなる群から選択される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）を含み、上記配列番号のアミノ酸配列は、０～７個のアミノ酸改変、任意で０～５個又は０～２個の改変を含み、該配列番号１２のＣＤＲ３領域は、０～５個のアミノ酸改変、任

意で０～２個のアミノ酸改変を含む。

【０１２２】

一実施形態では、本発明の第２の抗原結合分子は、配列番号１９８、３、６、及び９からなる群から選択される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）を含むシングルドメイン抗体であって、アミノ酸配列が０～７個のアミノ酸改変、任意で０～６個、０～５個、０～４個、０～３個、０～２個、及び０～１個のアミノ酸改変を含む、シングルドメイン抗体である。一実施形態では、相補性決定領域３（ＣＤＲ３）は、配列番号３である。一実施形態では、相補性決定領域３（ＣＤＲ３）は、配列番号６である。一実施形態では、相補性決定領域３（ＣＤＲ３）は、配列番号９である。好ましい実施形態では、相補性決定領域３（ＣＤＲ３）は、配列番号１９８である。

【０１２３】

一実施形態では、本発明の第２の抗原結合分子は、配列番号３、６、及び９からなる群から選択される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）を含み、該配列番号６及び９のアミノ酸配列は、０～７個のアミノ酸改変、任意で０～２個の改変を含み、該配列番号３のアミノ酸配列のＣＤＲ３領域は、０～５個のアミノ酸改変、任意で０～２個のアミノ酸改変を含む。

【０１２４】

一実施形態では、本発明の抗原結合分子は、ＣＤＲ２領域を更に含んでいてもよい。ＣＤＲ２領域は、本明細書に開示される配列番号に従って定義することができる。各実施形態では、抗原結合分子は、４つのフレームワーク領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及びＦＲ４）を更に含んでいてもよい。

【０１２５】

一実施形態では、第１の抗原結合分子は、

（ａ）配列番号１１を含むＣＤＲ２及び配列番号１２を含むＣＤＲ３；
（ｂ）配列番号３４を含むＣＤＲ２及び配列番号１５を含むＣＤＲ３；
（ｃ）配列番号３４を含むＣＤＲ２及び配列番号７２を含むＣＤＲ３；
（ｄ）配列番号３４を含むＣＤＲ２及び配列番号７３を含むＣＤＲ３；
（ｅ）配列番号３４を含むＣＤＲ２及び配列番号７４を含むＣＤＲ３；
（ｆ）配列番号３４を含むＣＤＲ２及び配列番号７５を含むＣＤＲ３；
（ｇ）配列番号３４を含むＣＤＲ２及び配列番号７６を含むＣＤＲ３；又は
（ｈ）配列番号２３６を含むＣＤＲ２及び配列番号２３７を含むＣＤＲ３；

を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列は、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列は、０～４個のアミノ酸改変を含む。一実施形態では、ＣＤＲ３領域は、０～６個、０～５個、０～４個、０～３個、０～２個、又は０～１個のアミノ酸改変を含む。一実施形態では、ＣＤＲ２領域は、０～３個、０～２個、０～４個、０～１個のアミノ酸改変を含む。

【０１２６】

一実施形態では、第２の抗原結合分子は、

（ａ）配列番号１９７を含むＣＤＲ２及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３；
（ｂ）配列番号２を含むＣＤＲ２及び配列番号３を含むＣＤＲ３；
（ｃ）配列番号５を含むＣＤＲ２及び配列番号６を含むＣＤＲ３；又は
（ｄ）配列番号８を含むＣＤＲ２及び配列番号９を含むＣＤＲ３；

を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列は、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列は、０～４個のアミノ酸改変を含む。一実施形態では、ＣＤＲ３領域は、０～６個、０～５個、０～４個、０～３個、０～２個、又は０～１個のアミノ酸改変を含む。一実施形態では、ＣＤＲ２領域は、０～３個、０～２個、０～４個、０～１個のアミノ酸改変を含む。

【０１２７】

一実施形態では、本発明の抗原結合分子は、ＣＤＲ１領域及びＣＤＲ２領域を更に含んでいてもよい。ＣＤＲ１領域及びＣＤＲ２領域は、本明細書に開示される配列番号に従っ

て定義することができる。各実施形態では、シングルドメイン抗体は、４つのフレームワーク領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及びＦＲ４）を更に含んでいてもよい。

【０１２８】

一実施形態では、第１の抗原結合分子は、

（ａ）配列番号１０を含むＣＤＲ１、配列番号１１を含むＣＤＲ２、及び配列番号１２を含むＣＤＲ３；

（ｂ）配列番号１３を含むＣＤＲ１、配列番号１４を含むＣＤＲ２、及び配列番号１５を含むＣＤＲ３；

（ｃ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７２を含むＣＤＲ３；

（ｄ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７３を含むＣＤＲ３；

（ｅ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７４を含むＣＤＲ３；

（ｆ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７５を含むＣＤＲ３；

（ｇ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７６を含むＣＤＲ３；又は

（ｈ）配列番号２３５を含むＣＤＲ１、配列番号２３６を含むＣＤＲ２、及び配列番号２３７を含むＣＤＲ３；

を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列は、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列は、０～４個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ１のアミノ酸配列は、０～４個のアミノ酸改変を含む。一実施形態では、ＣＤＲ３領域は、０～６個、０～５個、０～４個、０～３個、０～２個、又は０～１個のアミノ酸改変を含む。一実施形態では、ＣＤＲ２領域は、０～３個、０～２個、０～４個、０～１個のアミノ酸改変を含む。一実施形態では、ＣＤＲ１領域は、０～３個、０～２個、０～４個、０～１個のアミノ酸改変を含む。

【０１２９】

一実施形態では、第２の抗原結合分子は、

（ａ）配列番号１９６を含むＣＤＲ１、配列番号１９７を含むＣＤＲ２、及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３；

（ｂ）配列番号１を含むＣＤＲ１、配列番号２を含むＣＤＲ２、及び配列番号３を含むＣＤＲ３；

（ｂ）配列番号４を含むＣＤＲ１、配列番号５を含むＣＤＲ２、及び配列番号６を含むＣＤＲ３；又は

（ｃ）配列番号７を含むＣＤＲ１、配列番号８を含むＣＤＲ２、及び配列番号９を含むＣＤＲ３；

を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列は、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列は、０～４個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ１のアミノ酸配列は、０～４個のアミノ酸改変を含む。一実施形態では、ＣＤＲ３領域は、０～６個、０～５個、０～４個、０～３個、０～２個、又は０～１個のアミノ酸改変を含む。一実施形態では、ＣＤＲ２領域は、０～３個、０～２個、０～４個、０～１個のアミノ酸改変を含む。一実施形態では、ＣＤＲ１領域は、０～３個、０～２個、０～４個、０～１個のアミノ酸改変を含む。

【０１３０】

一実施形態では、第２の抗原結合分子は、公知の抗体ＣＲ３０２２又はそのバリアント若しくは断片を含む。公知の抗体ＣＲ３０２２は、配列番号２６若しくは２７から選択される配列を有する重鎖及び／又は配列番号２８若しくは２９から選択される配列を有する軽鎖を含み得る。

【０１３１】

一実施形態では、第２の抗原結合分子は、公知の抗体ＥＹ６Ａ又はそのバリアント若しくは断片を含む。公知の抗体ＥＹ６Ａは、配列番号３０の配列を有する重鎖を含み得る及び／又は配列番号３１の配列を有する軽鎖を含み得る。

【０１３２】

一実施形態では、第２の抗原結合分子は、公知のシングルドメイン抗体（ナノボディ）ＶＨＨ７２又はそのバリアント若しくは断片を含む。ＶＨＨ７２は、配列番号３２の配列を含んでいてもよい。

【０１３３】

公知の抗体の重鎖及び／又は軽鎖は、１個以上の追加の改変、例えば０～１０個、０～９個、０～８個、０～７個、０～６個、０～５個、０～４個、０～３個、０～２個、又は０～１個のアミノ酸改変を含んでいてもよい。改変は、置換、欠失、又は挿入であってよい。一実施形態では、改変は置換である。

【０１３４】

一態様では、

（ａ）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２受容体結合ドメインへの結合についてＣ５、Ｈ３、Ｈ１１－Ｄ４、Ｈ１１－Ｈ４、Ｈ１１－Ａ１０、Ｈ１１－Ｂ５、Ｈ１１－Ｈ６、又はＶＨＨ＿Ｈ６と競合する第１の抗原結合分子；

（ｂ）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２受容体結合ドメインへの結合についてＡ８、ＣＲ３０２２、ＶＨＨ７２、又はＥＹ６Ａ、Ｆ２、Ｃ１、又はＢ１２と競合する第２の抗原結合分子；及び

（ｃ）リンカー

を含み、該リンカーが、

（ａ）ユビキチン又はユビキチン様タンパク質；

（ｂ）該ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｎ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；及び

（ｃ）該ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｃ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；

を含み、該リンカーが、該第１の抗原結合分子を該第２の抗原結合分子に接合させ、

任意で、第１及び第２のエピトープが実質的に重複していない、コロナウイルス結合分子が提供される。

【０１３５】

一実施形態では、

（ａ）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２受容体結合ドメインへの結合についてＣ５と競合する第１の抗原結合分子；

（ｂ）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２受容体結合ドメインへの結合についてＣＲ３０２２と競合する第２の抗原結合分子；及び

（ｃ）リンカー

を含み、該リンカーが、

（ａ）ユビキチン又はユビキチン様タンパク質；

（ｂ）該ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｎ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；及び

（ｃ）該ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｃ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；

を含み、該リンカーが、該第１の抗原結合分子を該第２の抗原結合分子に接合させ、

任意で、第１及び第２のエピトープが実質的に重複していない、コロナウイルス結合分子が提供される。

【０１３６】

一実施形態では、

（ａ）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２受容体結合ドメインへの結合についてＣＲ３０２２と競合する第１の抗原結合分子；

（ｂ）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２受容体結合ドメインへの結合についてＨ１１－Ｈ４（配列番号１２０）と競合する第２の抗原結合分子；及び
（ｃ）リンカー
を含み、該リンカーが、
（ａ）ユビキチン又はユビキチン様タンパク質；
（ｂ）該ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｎ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；及び
（ｃ）該ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｃ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；
を含み、該リンカーが、該第１の抗原結合分子を該第２の抗原結合分子に接合させ、
任意で、第１及び第２のエピトープが実質的に重複していない、コロナウイルス結合分子が提供される。

【０１３７】

一実施形態では、
（ａ）本明細書に開示されるアミノ酸配列を含む第１の抗原結合分子；
（ｂ）エピトープ２に結合する第２の抗原結合分子；
（ｃ）リンカー
を含み、該リンカーが、
（ｉ）ユビキチン又はユビキチン様タンパク質；
（ｉｉ）該ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｎ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；及び
（ｉｉｉ）該ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｃ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；
を含み、該リンカーが、第１の抗原結合分子を第２の抗原結合分子に接合させ、任意で、第１及び第２のエピトープが、実質的に重複していない、コロナウイルス結合分子が提供される。

【０１３８】

更に、
（ａ）エピトープ１に結合する第１の抗原結合分子；
（ｂ）本明細書に開示されるアミノ酸配列を含む第２の抗原結合分子；
（ｃ）リンカー
を含み、該リンカーが、
（ｉ）ユビキチン又はユビキチン様タンパク質；
（ｉｉ）該ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｎ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；及び
（ｉｉｉ）該ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｃ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；
を含み、該リンカーが、第１の抗原結合分子を第２の抗原結合分子に接合させ、任意で、第１及び第２のエピトープが、実質的に重複していない、コロナウイルス結合分子が提供される。

【０１３９】

更に、
（ａ）本明細書に開示されるアミノ酸配列を含む第１の抗原結合分子；
（ｂ）本明細書に開示されるアミノ酸配列を含む第２の抗原結合分子；
（ｃ）リンカー
を含み、該リンカーが、
（ｉ）ユビキチン又はユビキチン様タンパク質；
（ｉｉ）該ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｎ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；及び
（ｉｉｉ）該ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｃ末端に接合している４～５

０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；
を含み、該リンカーが、第１の抗原結合分子を第２の抗原結合分子に接合させ、任意で、第１及び第２のエピトープが、実質的に重複していない、コロナウイルス結合分子が提供される。
【０１４０】
一実施形態では、
（ａ）配列番号１２、１５、７２、７３、７４、７５、７６、及び２３７からなる群から選択される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）を含む第１の抗原結合分子であって、該ＣＤＲ３が、０～７個のアミノ酸改変を含む第１の抗原結合分子と；
（ｂ）配列番号１９８、３、６、及び９からなる群から選択される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）を含む第２の抗原結合分子であって、該ＣＤＲ３が、０～７個のアミノ酸改変を含む第２の抗原結合分子と；
（ｃ）リンカーと
を含み、該リンカーが、
（ｉ）ユビキチン又はユビキチン様タンパク質；
（ｉｉ）該ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｎ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；及び
（ｉｉｉ）該ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｃ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；
を含み、該リンカーが、該第１の抗原結合分子を該第２の抗原結合分子に接合させるコロナウイルス結合分子が提供される。
【０１４１】
一実施形態では、
（ａ）
（ｉ）配列番号１１を含むＣＤＲ２及び配列番号１２を含むＣＤＲ３；
（ｉｉ）配列番号１４を含むＣＤＲ２及び配列番号１５を含むＣＤＲ３；
（ｉｉｉ）配列番号３４を含むＣＤＲ２及び配列番号７２を含むＣＤＲ３；
（ｉｖ）配列番号３４を含むＣＤＲ２及び配列番号７３を含むＣＤＲ３；
（ｖ）配列番号３４を含むＣＤＲ２及び配列番号７４を含むＣＤＲ３；
（ｖｉ）配列番号３４を含むＣＤＲ２及び配列番号７５を含むＣＤＲ３；
（ｖｉｉ）配列番号３４を含むＣＤＲ２及び配列番号７６を含むＣＤＲ３；又は
（ｖｉｉｉ）配列番号２３６を含むＣＤＲ２及び配列番号２３７を含むＣＤＲ３；
を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含む第１の抗原結合分子と；
（ｂ）
（ｉ）配列番号１９７を含むＣＤＲ２及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３；
（ｉｉ）配列番号２を含むＣＤＲ２及び配列番号３を含むＣＤＲ３；
（ｉｉｉ）配列番号５を含むＣＤＲ２及び配列番号６を含むＣＤＲ３；又は
（ｉｖ）配列番号８を含むＣＤＲ２及び配列番号９を含むＣＤＲ３；
を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含む第２の結合分子と；
（ｃ）リンカーと
を含み、該リンカーが、
（ｉ）ユビキチン又はユビキチン様タンパク質；
（ｉｉ）該ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｎ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；及び
（ｉｉｉ）該ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｃ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；
を含み、該リンカーが、該第１の抗原結合分子を第２の抗原結合分子に接合させるコロナウイルス結合分子が提供される。

【０１４２】
一実施形態では、
（ａ）
（ｉ）配列番号１０を含むＣＤＲ１、配列番号１１を含むＣＤＲ２、及び配列番号１２を含むＣＤＲ３；
（ｉｉ）配列番号１３を含むＣＤＲ１、配列番号１４を含むＣＤＲ２、及び配列番号１５を含むＣＤＲ３；
（ｉｉｉ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７２を含むＣＤＲ３；
（ｉｖ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７３を含むＣＤＲ３；
（ｖ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７４を含むＣＤＲ３；
（ｖｉ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７５を含むＣＤＲ３；
（ｖｉｉ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７６を含むＣＤＲ３；又は
（ｖｉｉｉ）配列番号２３５を含むＣＤＲ１、配列番号２３６を含むＣＤＲ２、及び配列番号２３７を含むＣＤＲ３
を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ１のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含む第１の抗原結合分子と；
（ｂ）
（ｉ）配列番号１９６を含むＣＤＲ１、配列番号１９７を含むＣＤＲ２、及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３；
（ｉｉ）配列番号１を含むＣＤＲ１、配列番号２を含むＣＤＲ２、及び配列番号３を含むＣＤＲ３；
（ｉｉｉ）配列番号４を含むＣＤＲ１、配列番号５を含むＣＤＲ２、及び配列番号６を含むＣＤＲ３、配列番号５を含むＣＤＲ２、及び配列番号６を含むＣＤＲ３；又は
（ｉｖ）配列番号７を含むＣＤＲ１、配列番号８を含むＣＤＲ２、及び配列番号９を含むＣＤＲ３；
を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ１のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含む第２の抗原結合分子と；
（ｃ）リンカーと
を含み、該リンカーが、
（ｉ）ユビキチン又はユビキチン様タンパク質；
（ｉｉ）該ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｎ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；及び
（ｉｉｉ）該ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｃ末端に接合している４～５０アミノ酸の更なる任意のスペーサー；
を含み、該リンカーが、該第１の抗原結合分子を該第２の抗原結合分子に接合させるコロナウイルス結合分子が提供される。
【０１４３】
一実施形態では、
（ａ）配列番号１２、１５、７２、７３、７４、７５、７６、及び２３７からなる群から選択される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）を含む第１の抗原結合分子であって、該ＣＤＲ３が、０～７個のアミノ酸改変を含む第１の抗原結合分子と；
（ｂ）配列番号１９８、３、６、及び９からなる群から選択される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）を含む第２の抗原結合分子であって、該ＣＤＲ３が、０～７個のアミノ酸改変

を含む第２の抗原結合分子と；
（ｃ）リンカーであって、ＳＵＭＯを含み；任意で、
（ｉ）ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｎ－末端に接合している４～５０アミノ酸のスペーサー；及び
（ｉｉ）ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｃ末端に接合している４～５０アミノ酸のスペーサー；
を更に含み、
該第１の抗原結合分子を該第２の抗原結合分子に接合させるリンカーと
を含むコロナウイルス結合分子が提供される。
【０１４４】
一実施形態では、
（ａ）
（ｉ）配列番号１１を含むＣＤＲ２及び配列番号１２を含むＣＤＲ３；
（ｉｉ）配列番号１４を含むＣＤＲ２及び配列番号１５を含むＣＤＲ３；
（ｉｉｉ）配列番号３４を含むＣＤＲ２及び配列番号７２を含むＣＤＲ３；
（ｉｉｉ）配列番号３４を含むＣＤＲ２及び配列番号７３を含むＣＤＲ３；
（ｉｖ）配列番号３４を含むＣＤＲ２及び配列番号７４を含むＣＤＲ３；
（ｖ）配列番号３４を含むＣＤＲ２及び配列番号７５を含むＣＤＲ３；
（ｖｉ）配列番号３４を含むＣＤＲ２及び配列番号７６を含むＣＤＲ３；又は
（ｖｉｉ）配列番号２３６を含むＣＤＲ２及び配列番号２３６を含むＣＤＲ３；
を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含む第１の抗原結合分子と；
（ｂ）
（ｉ）配列番号１９７を含むＣＤＲ２及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３；
（ｉｉ）配列番号２を含むＣＤＲ２及び配列番号３を含むＣＤＲ３；
（ｉｉｉ）配列番号５を含むＣＤＲ２及び配列番号６を含むＣＤＲ３；又は
（ｉｖ）配列番号８を含むＣＤＲ２及び配列番号９を含むＣＤＲ３；
を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含む第２の結合分子と；
（ｃ）リンカーであって、ＳＵＭＯを含み；任意で、
（ｉ）ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｎ－末端に接合している４～５０アミノ酸のスペーサー；及び
（ｉｉ）ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｃ末端に接合している４～５０アミノ酸のスペーサー；
を更に含み、
該第１の抗原結合分子を第２の抗原結合分子に接合させるリンカーと
を含むコロナウイルス結合分子が提供される。
【０１４５】
一実施形態では、
（ａ）
（ｉ）配列番号１０を含むＣＤＲ１、配列番号１１を含むＣＤＲ２、及び配列番号１２を含むＣＤＲ３；
（ｉｉ）配列番号１３を含むＣＤＲ１、配列番号１４を含むＣＤＲ２、及び配列番号１５を含むＣＤＲ３；
（ｉｉｉ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７２を含むＣＤＲ３；
（ｉｉｉ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７３を含むＣＤＲ３；
（ｉｖ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７４を含むＣＤＲ３；

（ｖ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７５を含むＣＤＲ３；
（ｖｉ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７６を含むＣＤＲ３；又は
（ｖｉｉ）配列番号２３５を含むＣＤＲ１、配列番号２３６を含むＣＤＲ２、及び配列番号２３７を含むＣＤＲ３
を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ１のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含む第１の抗原結合分子と；
（ｂ）
（ｉ）配列番号１９６を含むＣＤＲ１、配列番号１９７を含むＣＤＲ２、及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３；
（ｉｉ）配列番号１を含むＣＤＲ１、配列番号２を含むＣＤＲ２、及び配列番号３を含むＣＤＲ３；
（ｉｉｉ）配列番号４を含むＣＤＲ１、配列番号５を含むＣＤＲ２、及び配列番号６を含むＣＤＲ３、配列番号５を含むＣＤＲ２、及び配列番号６を含むＣＤＲ３；又は
（ｉｖ）配列番号７を含むＣＤＲ１、配列番号８を含むＣＤＲ２、及び配列番号９を含むＣＤＲ３；
を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ１のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含む第２の抗原結合分子と；
（ｃ）リンカーであって、ＳＵＭＯを含み；任意で、
（ｉ）ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｎ－末端に接合している４～５０アミノ酸のスペーサー；及び
（ｉｉ）ユビキチン又はユビキチン様タンパク質のｃ末端に接合している４～５０アミノ酸のスペーサー；
を更に含み、
該第１の抗原結合分子を該第２の抗原結合分子に接合させるリンカーと
を含むコロナウイルス結合分子が提供される。

【０１４６】

一実施形態では、
（ａ）配列番号１２、１５、７２、７３、７４、７５、７６、及び２３７からなる群から選択される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）を含む第１の抗原結合分子であって、該ＣＤＲ３が、０～７個のアミノ酸改変を含む第１の抗原結合分子と；
（ｂ）配列番号１９８、３、６、及び９からなる群から選択される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）を含む第２の抗原結合分子であって、該ＣＤＲ３が、０～７個のアミノ酸改変を含む第２の抗原結合分子と；
（ｃ）リンカーであって、ＳＵＭＯ；
ＳＵＭＯのｎ末端に接合している４～８アミノ酸；及び
ＳＵＭＯのｃ末端に接合している４～８アミノ酸
を含み、該第１の抗原結合分子を該第２の抗原結合分子に接合させるリンカーと
を含むコロナウイルス結合分子が提供される。

【０１４７】

一実施形態では、
（ａ）
（ｉ）配列番号１１を含むＣＤＲ２及び配列番号１２を含むＣＤＲ３；
（ｉｉ）配列番号１４を含むＣＤＲ２及び配列番号１５を含むＣＤＲ３；
（ｉｉｉ）配列番号３４を含むＣＤＲ２及び配列番号７２を含むＣＤＲ３；
（ｉｖ）配列番号３４を含むＣＤＲ２及び配列番号７３を含むＣＤＲ３；
（ｖ）配列番号３４を含むＣＤＲ２及び配列番号７４を含むＣＤＲ３；

（ｖｉ）配列番号３４を含むＣＤＲ２及び配列番号７５を含むＣＤＲ３；
（ｖｉｉ）配列番号３４を含むＣＤＲ２及び配列番号７６を含むＣＤＲ３；又は
（ｖｉｉｉ）配列番号２３６を含むＣＤＲ２及び配列番号２３７を含むＣＤＲ３；
を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含む第１の抗原結合分子と；
（ｂ）
（ｉ）配列番号１９７を含むＣＤＲ２及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３；
（ｉｉ）配列番号２を含むＣＤＲ２及び配列番号３を含むＣＤＲ３；
（ｉｉｉ）配列番号５を含むＣＤＲ２及び配列番号６を含むＣＤＲ３；又は
（ｉｖ）配列番号８を含むＣＤＲ２及び配列番号９を含むＣＤＲ３；
を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含む第２の抗原結合分子と；
（ｃ）リンカーであって、ＳＵＭＯ；
ＳＵＭＯのｎ末端に接合している４～８アミノ酸；及び
ＳＵＭＯのｃ末端に接合している４～８アミノ酸
を含み、該第１の抗原結合分子を該第２の抗原結合分子に接合させるリンカーと
を含むコロナウイルス結合分子が提供される。
【０１４８】
一実施形態では、
（ａ）
（ｉ）配列番号１０を含むＣＤＲ１、配列番号１１を含むＣＤＲ２、及び配列番号１２を含むＣＤＲ３；
（ｉｉ）配列番号１３を含むＣＤＲ１、配列番号１４を含むＣＤＲ２、及び配列番号１５を含むＣＤＲ３；
（ｉｉｉ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７２を含むＣＤＲ３；又は
（ｉｖ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７３を含むＣＤＲ３；
（ｖ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７４を含むＣＤＲ３；
（ｖｉ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７５を含むＣＤＲ３；
（ｖｉｉ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７６を含むＣＤＲ３；又は
（ｖｉｉｉ）配列番号２３５を含むＣＤＲ１、配列番号２３６を含むＣＤＲ２、及び配列番号２３７を含むＣＤＲ３
を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ１のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含む第１の抗原結合分子と；
（ｂ）
（ｉ）配列番号１９６を含むＣＤＲ１、配列番号１９７を含むＣＤＲ２、及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３；
（ｉｉ）配列番号１を含むＣＤＲ１、配列番号２を含むＣＤＲ２、及び配列番号３を含むＣＤＲ３；
（ｉｉｉ）配列番号４を含むＣＤＲ１、配列番号５を含むＣＤＲ２、及び配列番号６を含むＣＤＲ３、配列番号５を含むＣＤＲ２、及び配列番号６を含むＣＤＲ３；又は
（ｉｖ）配列番号７を含むＣＤＲ１、配列番号８を含むＣＤＲ２、及び配列番号９を含むＣＤＲ３；
を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ１のアミノ酸配列が、０～４個

のアミノ酸改変を含む第２の抗原結合分子と；
（ｃ）リンカーであって、ＳＵＭＯ；
ＳＵＭＯのｎ末端に接合している４～８アミノ酸；及び
ＳＵＭＯのｃ末端に接合している４～８アミノ酸
を含み、該第１の抗原結合分子を該第２の抗原結合分子に接合させるリンカーと
を含むコロナウイルス結合分子が提供される。
【０１４９】
一実施形態では、
（ａ）配列番号１２、１５、７２、７３、７４、７５、７６、及び２３７からなる群から選択される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）を含む第１の抗原結合分子と；
（ｂ）配列番号１９８、３、及び９からなる群から選択される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）を含む第２の抗原結合分子と；
（ｃ）リンカーであって、ＳＵＭＯ；
ＳＵＭＯのｎ末端に接合している４～８アミノ酸；及び
ＳＵＭＯのｃ末端に接合している４～８アミノ酸
を含み、該第１の抗原結合分子を該第２の抗原結合分子に接合させるリンカーと
を含むコロナウイルス結合分子が提供される。
【０１５０】
一実施形態では、
（ａ）
（ｉ）配列番号１１を含むＣＤＲ２及び配列番号１２を含むＣＤＲ３；
（ｉｉ）配列番号１４を含むＣＤＲ２及び配列番号１５を含むＣＤＲ３；
（ｉｉｉ）配列番号３４を含むＣＤＲ２及び配列番号７２を含むＣＤＲ３；
（ｉｖ）配列番号３４を含むＣＤＲ２及び配列番号７３を含むＣＤＲ３；
（ｖ）配列番号３４を含むＣＤＲ２及び配列番号７４を含むＣＤＲ３；
（ｖｉ）配列番号３４を含むＣＤＲ２及び配列番号７５を含むＣＤＲ３；又は
（ｖｉｉ）配列番号３４を含むＣＤＲ２及び配列番号７６を含むＣＤＲ３；
（ｖｉｉｉ）配列番号２３６を含むＣＤＲ２及び配列番号２３７を含むＣＤＲ３；
を含む第１の抗原結合分子と；
（ｂ）
（ｉ）配列番号１９７を含むＣＤＲ２及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３；
（ｉ）配列番号２を含むＣＤＲ２及び配列番号３を含むＣＤＲ３；
（ｉｉ）配列番号５を含むＣＤＲ２及び配列番号６を含むＣＤＲ３；又は
（ｉｉｉ）配列番号８を含むＣＤＲ２及び配列番号９を含むＣＤＲ３；
を含む第２の結合分子と；
（ｃ）リンカーであって、ＳＵＭＯ；
ＳＵＭＯのｎ末端に接合している４～８アミノ酸；及び
ＳＵＭＯのｃ末端に接合している４～８アミノ酸
を含み、該第１の抗原結合分子を第２の抗原結合分子に接合させるリンカーと
を含むコロナウイルス結合分子が提供される。
【０１５１】
一実施形態では、
（ａ）
（ｉ）配列番号１０を含むＣＤＲ１、配列番号１１を含むＣＤＲ２、及び配列番号１２を含むＣＤＲ３；
（ｉｉ）配列番号１３を含むＣＤＲ１、配列番号１４を含むＣＤＲ２、及び配列番号１５を含むＣＤＲ３；
（ｉｉｉ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７２を含むＣＤＲ３；
（ｉｖ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号

７３を含むＣＤＲ３；及び
（ｖ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７４を含むＣＤＲ３；
（ｖｉ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７５を含むＣＤＲ３；
（ｖｉｉ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７６を含むＣＤＲ３；又は
（ｖｉｉｉ）配列番号２３５を含むＣＤＲ１、配列番号２３６を含むＣＤＲ２、及び配列番号２３７を含むＣＤＲ３
を含む第１の抗原結合分子と；
（ｂ）
（ｉ）配列番号１９６を含むＣＤＲ１、配列番号１９７を含むＣＤＲ２、及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３；
（ｉｉ）配列番号１を含むＣＤＲ１、配列番号２を含むＣＤＲ２、及び配列番号３を含むＣＤＲ３；
（ｉｉ）配列番号４を含むＣＤＲ１、配列番号５を含むＣＤＲ２、及び配列番号６を含むＣＤＲ３、配列番号５を含むＣＤＲ２、及び配列番号６を含むＣＤＲ３；又は
（ｉｉｉ）配列番号７を含むＣＤＲ１、配列番号８を含むＣＤＲ２、及び配列番号９を含むＣＤＲ３；
を含む第２の抗原結合分子と；
（ｃ）リンカーであって、ＳＵＭＯ；
ＳＵＭＯのｎ末端に接合している４～８アミノ酸；及び
ＳＵＭＯのｃ末端に接合している４～８アミノ酸
を含み、該第１の抗原結合分子を該第２の抗原結合分子に接合させるリンカーと
を含むコロナウイルス結合分子が提供される。

【０１５２】

一態様では、本発明の第１及び第２の抗原結合分子を含むアミノ酸配列が提供される。

【０１５３】

一実施形態では、配列番号１９、２０、１１９、１２０、１２１、１２２、１２３、及び２３９からなる群から選択される配列に対して少なくとも７０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む第１の抗原結合分子が提供される。これら配列はそれぞれ、３つのＣＤＲ領域（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３）及び４つのフレームワーク領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及びＦＲ４）を含む。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号１９、２０、１１９、１２０、１２１、１２２、及び１２３からなる群から選択される配列に対して、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、配列番号１９、２０、１１９、１２０、１２１、１２２、１２３、及び２３９からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む第１の抗原結合ドメインが提供される。一実施形態では、配列番号１９、２０、１９、１２０、１２１、１２２、及び１２３からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるか又はから本質的になるか又は含む第１の抗原結合ドメインが提供される。

【０１５４】

一実施形態では、配列番号２１３、１６、１７、及び１８からなる群から選択される配列に対して少なくとも７０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む第２の抗原結合分子が提供される。これら配列はそれぞれ、３つのＣＤＲ領域（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３）及び４つのフレームワーク領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及びＦＲ４）を含む。一実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号２１３、１６、１７、及び１８からなる群から選択される配列に対して、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２

％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、配列番号２１３、１６、１７、及び１８からなる群から選択される配列を含む第２の抗原結合分子が提供される。一実施形態では、配列番号２１３、１６、１７、及び１８からなる群から選択される配列からなるか又はから本質的になる第２の抗原結合分子が提供される。

【０１５５】

一実施形態では、配列番号２４、２５、１４０、１４１、１４２、１４３、１４４、及び２３８からなる群から選択される配列に対して少なくとも７０％の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む第１の抗原結合分子が提供される。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、配列番号２４、２５、１４０、１４１、１４２、１４３、１４４、及び２３８からなる群から選択される配列に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性を有する。一実施形態では、第１の抗原結合分子は、配列番号２４、２５、１４０、１４１、１４２、１４３、１４４、及び２３８からなる群から選択される配列を含む。一実施形態では、第１の抗原結合分子は、配列番号２４、２５、１４０、１４１、１４２、１４３、１４４、及び２３８からなる群から選択される配列からなるか又はから本質的になる。

【０１５６】

一実施形態では、第２の抗原結合分子は、配列番号２１２、２１、２２、及び２３からなる群から選択される配列に対して少なくとも７０％の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、配列番号２１２、２１、２２、及び２３からなる群から選択される配列に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性を有する。一実施形態では、第２の抗原結合分子は、配列番号２１２、２１、２２、及び２３からなる群から選択される配列を含む。一実施形態では、第２の抗原結合分子は、配列番号２１２、２１、２２、又は２３からなるか又はから本質的になる。

【０１５７】

一態様では、本発明のシングルドメイン抗体のうちの１つ又は任意で２つ以上を含む多価ポリペプチドが提供される。

【０１５８】

一実施形態では、本発明の１つ以上のシングルドメイン抗体及び１つ以上の追加の公知の抗体又はシングルドメイン抗体を含む多価ポリペプチドが提供される。この実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体を追加の公知抗体又はシングルドメイン抗体と互いに接合又は連結させて、多価ポリペプチドを形成する。一実施形態では、第１及び／又は第２の抗原結合分子は、公知の抗体を含む。

【０１５９】

一実施形態では、公知の抗体は、ＣＲ３０２２若しくはＥＹ６Ａ、又はそれらのバリアントである。公知の抗体ＣＲ３０２２は、配列番号２６又は２７から選択される配列を有する重鎖を含んでいてもよい。公知の抗体ＣＲ３０２２は、配列番号２８又は２９から選択される配列を有する軽鎖を更に含んでいてもよい。

【０１６０】

ＣＲ３０２２の重鎖及び／又は軽鎖は、１個以上の追加の改変、例えば０～１０個、０～９個、０～８個、０～７個、０～６個、０～５個、０～４個、０～３個、０～２個、又は０～１個のアミノ酸改変を含んでいてもよい。改変は、置換、欠失、又は挿入であってよい。一実施形態では、改変は置換である。

【０１６１】

一実施形態では、公知の抗体ＥＹ６Ａは、配列番号３０又は３１の配列を有する重鎖を

含んでいてもよい。

【０１６２】

ＥＹ６Ａの重鎖及び／又は軽鎖は、１個以上の追加の改変、例えば０～１０個、０～９個、０～８個、０～７個、０～６個、０～５個、０～４個、０～３個、０～２個、又は０～１個のアミノ酸改変を含んでいてもよい。改変は、置換、欠失、又は挿入であってよい。一実施形態では、改変は置換である。

【０１６３】

一実施形態では、公知のシングルドメイン抗体（ナノボディ）は、配列番号３２の配列を有するＶＨＨ７２である。

【０１６４】

ＥＹ６Ａの配列は、１個以上の追加の改変、例えば０～１０個、０～９個、０～８個、０～７個、０～６個、０～５個、０～４個、０～３個、０～２個、又は０～１個のアミノ酸改変を含んでいてもよい。改変は、置換、欠失、又は挿入であってよい。一実施形態では、改変は置換である。

【０１６５】

一実施形態では、公知の抗体は、Ｈ１１、Ａ７、Ｆ９、Ｃ１０、Ｂ１１、Ｅ１１、Ｄ１、Ｇ７、Ｆ５、Ｇ１１、Ｂ４、Ｇ９及びＣ７、Ｈ１１－Ｄ４、Ｈ１１－Ｈ４、Ｈ１１－Ｈ６、Ｈ１１－Ａ１０、Ｈ１１－Ｂ５、Ｈ１１－Ａ７、Ｈ１１－Ｆ７、Ｈ１１－Ｆ６、Ｈ１１－Ｇ８、Ｈ１１－Ｄ１、Ｈ１１－Ａ９、Ｈ１１－Ｃ６、Ｈ１１－Ｅ３、Ｈ１１－Ｆ４、Ｈ１１－Ｃ５、Ｈ１１－Ｃ２、Ｈ１１－Ｂ１１、Ｈ１１－Ａ３、Ｈ１１－Ｄ１２、Ｈ１１－Ｄ６、並びにＨ１１－Ｆ８（それぞれ配列番号９３～１０５として提供されるアミノ酸配列、配列番号１０６～１１８として提供されるポリヌクレオチド配列）又はそれらの断片若しくはバリアントからなる群から選択される。

【０１６６】

一実施形態では、公知の抗体は、Ｈ１１－Ｄ４、Ｈ１１－Ｈ４、Ｈ１１－Ｈ６、Ｈ１１－Ａ１０、Ｈ１１－Ｂ５、Ｈ１１－Ａ７、Ｈ１１－Ｆ７、Ｈ１１－Ｆ６、Ｈ１１－Ｇ８、Ｈ１１－Ｄ１、Ｈ１１－Ａ９、Ｈ１１－Ｃ６、Ｈ１１－Ｅ３、Ｈ１１－Ｆ４、Ｈ１１－Ｃ５、＿Ｈ１１－Ｃ２、Ｈ１１－Ｂ１１、Ｈ１１－Ａ３、Ｈ１１－Ｄ１２、Ｈ１１－Ｄ６、及びＨ１１－Ｆ８（それぞれ配列番号１１９～１３９として提供されるアミノ酸配列、配列番号１４０～１６０として提供されるポリヌクレオチド配列）又はそれらの断片若しくはバリアントからなる群から選択されるＨ１１の親和性成熟バージョンである。

【０１６７】

一実施形態では、公知のシングルドメイン抗体は、表７又は表８から選択される相補性決定領域である相補性決定領域３（ＣＤＲ３）を含むか又は更に含む。一実施形態では、公知のシングルドメイン抗体は、ＣＤＲ１、相補性決定領域２（ＣＤＲ２）、又は相補性決定領域３（ＣＤＲ３）から選択される相補性決定領域を含み、該ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、又はＣＤＲ３は、表７又は８から選択される。一実施形態では、公知のシングルドメイン抗体は、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、又はＣＤＲ３から選択される少なくとも１つ又は少なくとも２つの相補性決定領域（複数可）を含み、該ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、又はＣＤＲ３は、表７又は８から選択される。一実施形態では、公知のシングルドメイン抗体は、３つの相補性決定領域：ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含み、該ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、又はＣＤＲ３は、表７又は８から選択される。

【０１６８】

ID	CDR1	配列番号	CDR2	配列番号	CDR3	配列番号
H11	GRTFSTAA	33	IRWSGGSA	34	AQTRVTRSLLSDYATWPYDY	35
A7	**GFTFDDYA**	36	ISWNGGGT	37	AKDFHRYGSSTLEYDY	38
F9	GFTFSSYF	39	IGDRGNT	40	YSRNRILQHY	41
C10	GFAFSSYD	42	IDSGGGVT	43	NAVDGLGYLEYDY	44
B11	**GFTFDDYA**	45	IYSYISTT	46	AARRLDTTDYKY	47
E11	GFTFSNYA	48	IGSDGRHP	49	LPGWSTVGTFLDA	50
D1	GFTFSSYG	51	INSGGGST	52	AKDASEDAGRLYWTDY	53
G7	GFTFDTYD	54	EDSTGNK	55	AKGLRSWGA	56
F5	GTIFRINA	57	ISNGDSGD	58	YCNVEASWPHKY	59
G11	GFTFDDYG	60	VNSGGGT	61	AKRDGSWWGYTTDY	62
B4	GFTFSSYW	63	INTGGDTT	64	ARTGVVRGPGDLDA	65
G9	GFTFYDYH	66	IDTGGGRT	67	VRDGDARGPDYDY	68
C7	GFTFSSYD	69	ISGSDSTT	70	ARPLGQYTS	71

表７．一次ヒットＨ１１、Ａ７、Ｆ９、Ｃ１０、Ｂ１１、Ｅ１１、Ｄ１、Ｇ７、Ｆ５、Ｇ１１、Ｂ４、Ｇ９及びＣ７、Ｈ１１－Ｄ４、Ｈ１１－Ｈ４、Ｈ１１－Ｈ６、Ｈ１１－Ａ１０、Ｈ１１－Ｂ５、Ｈ１１－Ａ７、Ｈ１１－Ｆ７、Ｈ１１－Ｆ６、Ｈ１１－Ｇ８、Ｈ１１－Ｄ１、Ｈ１１－Ａ９、Ｈ１１－Ｃ６、Ｈ１１－Ｅ３、Ｈ１１－Ｆ４、Ｈ１１－Ｃ５、Ｈ１１－Ｃ２、Ｈ１１－Ｂ１１、Ｈ１１－Ａ３、Ｈ１１－Ｄ１２、Ｈ１１－Ｄ６、及びＨ１１－Ｆ８のＣＤＲアラインメント

【０１６９】

Clone_ID	CDR1	配列番号	CDR2	配列番号	CD3	配列番号
H11（親）	GRTFSTAA	33	IRWSGGSA	34	AQTRVTRSLLSDYATWPYDY	35
H11-D4	GRTFSTAA	33	IRWSGGSA	34	ARTENVRSLLSDYATWPYDY	72
H11-H4	GRTFSTAA	33	IRWSGGSA	34	AQTHYVSYLLSDYATWPYDY	73
H11-H6	GRTFSTAA	33	IRWSGGSA	34	AGSKITRSLLSDYATWPYDY	74
H11-A10	GRTFNTAA	33	IMWSGGSA	34	AGFSATRSLLSDYATWPYDY	75
H11-B5	GRTFSTAA	33	IRWSGGSA	34	ASYQATRSLLSDYATWPYDY	76
H11-A7	GRTFSTAA	33	IRWSGGSA	34	AQTDNVRALLSDYATWPYDY	77
H11-F7	GRTFSTAA	33	IRWSGGSA	34	AIFSNVRSLLSDYATWPYDY	78
H11-F6	GRTFSTAA	33	IRWSGGSA	34	ARTSNVRSLLSDYATWPYDY	79
H11-G8	GRTFSTAA	33	IRWSGGSA	34	AGSGVTRSLLSDYATWPYDY	80
H11-D1	GRTFSTAA	33	IRWSGGSA	34	AGWRATRSLLSDYATWPYDY	81
H11-A9	GRTFSTAA	33	IRWSGGSA	34	APYEATRSLLSDYATWPYDY	82
H11-C6	GRTFSTAA	33	IRWSGGSA	34	AQTGYTSWLLSDYATWPYDY	83
H11-E3	GRTFSTAA	33	IRWSGGSA	34	AVYHATRSLLSDYATWPYDY	84
H11-F4	GRTFSTAA	33	IRWSGGSA	34	AESTITRSLLSDYATWPYDY	85
H11-C5	GRTFSTAA	33	IRWSGGSA	34	AQTSYVSFLLSDYATWPYDY	86
H11-C2	GRTFSTAA	33	IRWSGGSA	34	AGSRATRSLLSDYATWPYDY	87
H11-B11	GRTFSTAA	33	IRWSGGSA	34	AETLNTRSLLSDYATWPYDY	88
H11-A3	GRTFSTAA	33	IRWSGGSA	34	ARSDNVRSLLSDYATWPYDY	89
H11-D12	GRTFSTAA	33	IRWSGGSA	34	ADWGVTRSLLSDYATWPYDY	90
H11-D6	GRTFSTAA	33	IRWSGGSA	34	ASSSVTRSLLSDYATWPYDY	91
H11-F8	GRTFSTAA	33	IRWSGGSA	34	ADASATRSLLSDYATWPYDY	92

表８．親和性成熟ヒットＨ１１－Ｄ４、Ｈ１１－Ｈ４、Ｈ１１－Ｈ６、Ｈ１１－Ａ１０、Ｈ１１－Ｂ５、Ｈ１１－Ａ７、Ｈ１１－Ｆ７、Ｈ１１－Ｆ６、Ｈ１１－Ｇ８、Ｈ１１－Ｄ１、Ｈ１１－Ａ９、Ｈ１１－Ｃ６、Ｈ１１－Ｅ３、Ｈ１１－Ｆ４、Ｈ１１－Ｃ５、Ｈ１１－Ｃ２、Ｈ１１－Ｂ１１、Ｈ１１－Ａ３、Ｈ１１－Ｄ１２、Ｈ１１－Ｄ６、及びＨ１１－Ｆ８のＣＤＲアライメント

【０１７０】

一実施形態では、公知のシングルドメイン抗体は、

（ａ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号３５を含むＣＤＲ３；

（ｂ）配列番号３６を含むＣＤＲ１、配列番号３７を含むＣＤＲ２、及び配列番号３８を含むＣＤＲ３；

（ｃ）配列番号３９を含むＣＤＲ１、配列番号４０を含むＣＤＲ２、及び配列番号４１を含むＣＤＲ３；

（ｄ）配列番号４２を含むＣＤＲ１、配列番号４３を含むＣＤＲ２、及び配列番号４４を含むＣＤＲ３；

（ｅ）配列番号４５を含むＣＤＲ１、配列番号４６を含むＣＤＲ２、及び配列番号４７を含むＣＤＲ３；

（ｆ）配列番号４８を含むＣＤＲ１、配列番号４９を含むＣＤＲ２、及び配列番号５０を含むＣＤＲ３；

（ｇ）配列番号５１を含むＣＤＲ１、配列番号５２を含むＣＤＲ２、及び配列番号５３を含むＣＤＲ３；

（ｈ）配列番号５４を含むＣＤＲ１、配列番号５５を含むＣＤＲ２、及び配列番号５６を含むＣＤＲ３；

（ｉ）配列番号５６を含むＣＤＲ１、配列番号５８を含むＣＤＲ２、及び配列番号５９を含むＣＤＲ３；

（ｊ）配列番号６０を含むＣＤＲ１、配列番号６１を含むＣＤＲ２、及び配列番号６２を含むＣＤＲ３；

（ｋ）配列番号６３を含むＣＤＲ１、配列番号６４を含むＣＤＲ２、及び配列番号６５を含むＣＤＲ３；

（ｌ）配列番号６６を含むＣＤＲ１、配列番号６７を含むＣＤＲ２、及び配列番号６８を含むＣＤＲ３；

（ｍ）配列番号６９を含むＣＤＲ１、配列番号７０を含むＣＤＲ２、及び配列番号７１を含むＣＤＲ３；

（ｎ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７２を含むＣＤＲ３；

（ｏ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７３を含むＣＤＲ３；

（ｐ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７４を含むＣＤＲ３；

（ｑ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７５を含むＣＤＲ３；

（ｒ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７６を含むＣＤＲ３；

（ｓ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７７を含むＣＤＲ３；

（ｔ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７８を含むＣＤＲ３；

（ｕ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７９を含むＣＤＲ３；

（ｖ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号８０

を含むＣＤＲ３；
（ｗ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号８１を含むＣＤＲ３；
（ｘ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号８２を含むＣＤＲ３；
（ｙ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号８３を含むＣＤＲ３；
（ｚ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号８４を含むＣＤＲ３；
（ａａ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号８５を含むＣＤＲ３；
（ｂｂ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号８６を含むＣＤＲ３；
（ｃｃ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号８７を含むＣＤＲ３；
（ｄｄ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号５６を含むＣＤＲ３；
（ｅｅ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号８８を含むＣＤＲ３；
（ｆｆ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号８９を含むＣＤＲ３；
（ｇｇ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号９０を含むＣＤＲ３；又は
（ｈｈ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号９１を含むＣＤＲ３；
を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列は、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列は、０～４個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ１のアミノ酸配列は、０～４個のアミノ酸改変を含む。好ましい実施形態では、公知のシングルドメイン抗体は、
（ａ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７３を含むＣＤＲ３；又は
（ｂ）配列番号３３を含むＣＤＲ１、配列番号３４を含むＣＤＲ２、及び配列番号７４を含むＣＤＲ３
を含む。

【０１７１】

一実施形態では、ＣＤＲ３領域は、０～６個、０～５個、０～４個、０～３個、０～２個、又は０～１個のアミノ酸改変を含む。一実施形態では、ＣＤＲ２領域は、０～３個、０～２個、０～４個、０～１個のアミノ酸改変を含む。一実施形態では、ＣＤＲ１領域は、０～３個、０～２個、０～４個、０～１個のアミノ酸改変を含む。

【０１７２】

一実施形態では、公知のシングルドメイン抗体は、配列番号９３～１０５からなる群から選択される配列に対して少なくとも７０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、公知のシングルドメイン抗体は、配列番号１１９～１３９からなる群から選択される配列に対して少なくとも７０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。これら配列はそれぞれ、３つのＣＤＲ領域（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３）及び４つのフレームワーク領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及びＦＲ４）を含む。一実施形態では、公知のシングルドメイン抗体は、配列番号９３～１０５からなる群から選択される配列に対して、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００

％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、公知のシングルドメイン抗体は、配列番号１１９～１３９からなる群から選択される配列に対して、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。本明細書及び全体を通して、少なくともは、幾つかの実施形態では、列挙された百分率から最大１００％までを意味する。例えば、少なくとも７５％は、幾つかの実施形態では、７５％～１００％を意味し得る。

【０１７３】

一実施形態では、公知のシングルドメイン抗体は、配列番号９３～１０５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、公知のシングルドメイン抗体は、配列番号１１９～１３９からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、公知のシングルドメイン抗体は、配列番号９３～１０５の群から選択される配列からなるか又はから本質的になる。一実施形態では、公知のシングルドメイン抗体は、配列番号１１９～１３９の群から選択される配列からなるか又はから本質的になる。

【０１７４】

一実施形態では、公知のシングルドメイン抗体は、配列番号１０６～１１８からなる群から選択される配列に対して少なくとも７０％の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、公知のシングルドメイン抗体は、配列番号１４０～１６０からなる群から選択される配列に対して少なくとも７０％の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。これら配列はそれぞれ、３つのＣＤＲ領域（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３）及び４つのフレームワーク領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及びＦＲ４）を含む。一実施形態では、公知のシングルドメイン抗体は、配列番号１０６～１１８からなる群から選択される配列に対して、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。一実施形態では、公知のシングルドメイン抗体は、配列番号１４０～１６０からなる群から選択される配列に対して、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は少なくとも９９％の同一性、任意で、７５～１００％、８０～１００％、８５～１００％、９０～１００％、９１～１００％、９２～１００％、９３～１００％、９４～１００％、９５～１００％、９６～１００％、９７～１００％、９８～１００％の同一性を有する。

【０１７５】

一実施形態では、公知のシングルドメイン抗体は、配列番号１０６～１１８からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、公知のシングルドメイン抗体は、配列番号１４０～１６０からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、公知のシングルドメイン抗体は、配列番号１０６～１１８の群から選択される配列からなるか又はから本質的になる。一実施形態では、公知のシングルドメイン抗体は、配列番号１４０～１６０の群から選択される配列からなるか又はから本質的になる。本明細書及び全体を通して、少なくともは、幾つかの実施形態では、列挙された百分率から最大１００％までを意味する。例えば、少なくとも７５％は、幾つかの実施形態では、７５％～１００％を意味し得る。

【０１７６】

多価ポリペプチドは、二価、任意で、単一特異性二価又は二重特異性二価であってもよい。一実施形態では、二価ポリペプチドは、１つの本発明のシングルドメイン抗体及び１つの公知の抗体又はナノボディを含んでいてよい。一実施形態では、二重特異性二価ポリペプチドは、更に、バイパラトピックであってもよい、すなわち、同じ標的抗原における

２つの異なる非重複エピトープを認識する。

【０１７７】

多価ポリペプチドは、三価、任意で、単一特異性三価、二重特異性三価、又は三重特異性三価であってもよい。一実施形態では、三価ポリペプチドは、２つの本発明のシングルドメイン抗体及び１つの公知の抗体又はナノボディを含んでいてもよく、あるいは、１つの本発明のシングルドメイン抗体及び２つの公知の抗体又はシングルドメイン抗体を含んでいてもよい。多価ポリペプチドは、四価、任意で、単一特異性四価、二重特異性四価、三重特異性四価、又は四重特異性四価であってもよい。一実施形態では、四重特異性ポリペプチドは、３つの本発明のシングルドメイン抗体及び１つの公知の抗体又はナノボディを含んでいてもよく、あるいは、２つの本発明のシングルドメイン抗体及び２つの公知の抗体又はナノボディを含んでいてもよく、あるいは、１つの本発明のシングルドメイン抗体及び３つの公知の抗体又はシングルドメイン抗体を含んでいてもよい。１つ以上の本発明のシングルドメイン抗体及びより高い価数を有する１つ以上の追加の公知の抗体又はシングルドメイン抗体の両方を含む追加の多価ポリペプチド、例えば、５個、６個、７個、８個、９個、又は１０個以上の抗原結合部位に結合する多価ポリペプチドも提供される。そのような多価ポリペプチドは、単一特異性、二重特異性、三重特異性、四重特異性、又は多重特異性であってよい。

【０１７８】

多価ポリペプチドは、二量体（ホモ二量体又はヘテロ二量体）、三量体（ホモ三量体又はヘテロ三量体）、四量体（ホモ四量体又はヘテロ四量体）、又は多量体（ホモ多量体又はヘテロ多量体）であってよい。

【０１７９】

一態様では、本明細書に開示される２つ以上のシングルドメイン抗体を含む多価ポリペプチドが提供される。この態様では、本発明のシングルドメイン抗体を互いに接合又は連結させて、多価ポリペプチドを形成する。

【０１８０】

多価ポリペプチドは、二価、任意で、単一特異性二価又は二重特異性二価であってもよい。これに関して、二価ポリペプチドは、２つの同じ本発明のシングルドメイン抗体、又は２つの異なる本発明のシングルドメイン抗体を含んでいてよい。多価ポリペプチドは、三価、任意で、単一特異性三価、二重特異性三価、又は三重特異性三価であってもよい。これに関して、三価ポリペプチドは、３つの同じ本発明のシングルドメイン抗体、２つの同じ本発明の同じシングルドメイン抗体及び１つの本発明の異なるシングルドメイン抗体、又は３つの異なる本発明のシングルドメイン抗体を含んでいてよい。多価ポリペプチドは、四価、任意で、単一特異性四価、二重特異性四価、三重特異性四価、又は四重特異性四価であってもよい。これに関して、四価ポリペプチドは、４つの同じ本発明のシングルドメイン抗体、３つの同じ本発明のシングルドメイン抗体及び１つの異なる本発明のシングルドメイン抗体、２つの同じ本発明のシングルドメイン抗体及び２つの異なる更なる本発明のシングルドメイン抗体（更なるシングルドメイン抗体自体は、同じであるか又は異なる）、又は４つの異なる本発明のシングルドメイン抗体を含んでいてよい。より高い価数を有する本発明の１つ以上のシングルドメイン抗体を含む追加の多価ポリペプチド、例えば、５個、６個、７個、８個、９個、又は１０個以上の抗原結合部位に結合する多価ポリペプチドも提供される。そのような多価ポリペプチドは、単一特異性、二重特異性、三重特異性、四重特異性、又は多重特異性であってよい。

【０１８１】

多価ポリペプチドは、二量体（ホモ二量体又はヘテロ二量体）、三量体（ホモ三量体又はヘテロ三量体）、四量体（ホモ四量体又はヘテロ四量体）、又は多量体（ホモ多量体又はヘテロ多量体）であってよい。

【０１８２】

一実施形態では、Ｂ１２、Ｃ１、Ｃ５、Ｆ２、Ｈ３、ＮｂＳＡ＿Ａ１０、ＮｂＳＡ＿Ｄ１０、Ａ８、３＿Ｃ５、８＿Ｇ１１、１２＿Ｆ１１、又はＶＨＨ＿Ｈ６（以下の表の最初

の行）に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を有する第１のシングルドメイン抗体と、Ｂ１２、Ｃ１、Ｃ５、Ｆ２、Ｈ３、ＮｂＳＡ＿Ａ１０、ＮｂＳＡ＿Ｄ１０、Ａ８、３＿Ｃ５、８＿Ｇ１１、１２＿Ｆ１１、又はＶＨＨ＿Ｈ６（以下の表の最初の列）に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドを有する第２のシングルドメイン抗体と、を含む二価ポリペプチドが提供される。以下の表は、二価ポリペプチドを形成し得る、２つの本発明のシングルドメイン抗体の様々な組み合わせを示す。好ましい実施形態では、Ｃ５又はＡ８に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を含む第１のシングルドメイン抗体と、Ｂ１２、Ｃ１、Ｃ５、Ｆ２、Ｈ３、ＮｂＳＡ＿Ａ１０、ＮｂＳＡ＿Ｄ１０、Ａ８、３＿Ｃ５、８＿Ｇ１１、１２＿Ｆ１１、又はＶＨＨ＿Ｈ６（以下の表の４番目及び８番目の列）に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドを有する第２のシングルドメイン抗体と、を含む二価ポリペプチドが提供される。好ましい実施形態では、Ａ８に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を含む第１のシングルドメインと、Ａ８に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を含む第２のシングルドメイン抗体と、を含む二価ポリペプチドが提供される。更に好ましい実施形態では、Ｃ５に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を含む第１のシングルドメインと、Ｃ５に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を含む第２のシングルドメイン抗体と、を含む二価ポリペプチドが提供される。全体を通して詳述する通り、アミノ酸又はポリヌクレオチドの配列は、指定のシングルドメイン抗体のＣＤＲ３、ＣＤＲ２、及び／若しくはＣＤＲ１、又はそれらのバリアントを含んでいてもよく、指定のシングルドメイン抗体のアミノ酸配列又はそのバリアントを含んでいてもよく、指定のシングルドメイン抗体のそのバリアントのポリヌクレオチド配列を含んでいてもよい。

【０１８３】

	B12	F2	C1	C5	H3	NbSA_A10	NbSA_D10	A8	3_C5	8_G11	12_F11	VHH_H6
B12	B12/B12	F2/B12	C1/B12	C5/B12	H3/B12	NbSA_A10/B12	NbSA_D10/B12	2_A8/B12	3_C5/B12	8_G3/B12	12_F11/B12	VHH_H6/B12
F2	B12/F2	F2/F2	C1/F2	C5/F2	H3/F2	NbSA_A10/F2	NbSA_D10/F2	2_A8/F2	3_C5/F2	8_G3/F2	12_F11/F2	VHH_H6/F2
C1	B12/C1	F2/C1	C1/C1	C5/C1	H3/C1	NbSA_A10/C1	NbSA_D10/C1	A8/C1	3_C5/C1	8_G3/C1	12_F11/C1	VHH_H6/C1
C5	B12/C5	F2/C5	C1/C5	C5/C5	H3/C5	NbSA_A10/C5	NbSA_D10/C5	A8/C5	3_C5/C5	8_G3/C5	12_F11/C5	VHH_H6/C5
H3	B12/H3	F2/H3	C1/H3	C5/H3	H3/H3	NbSA_A10/H3	NbSA_D10/H3	A8/H3	3_C5/H3	8_G3/H3	12_F11/H3	VHH_H6/H3
NbSA_A10	B12/NbSA_A10	F2/NbSA_A10	C1/NbSA_A10	C5/NbSA_A10	H3/NbSA_A10	NbSA_A10/NbSA_A10	NbSA_D10/NbSA_A10	A8/NbSA_A10	3_C5/NbSA_A10	8_G3 NbSA_A10/	12_F11/NbSA_A10	VHH_H6/NbSA_A10
NbSA_D10	B12/NbSA_D10	F2/NbSA_D10	C1/NbSA_D10	C5/NbSA_D10	H3/NbSA_D10	NbSA_A10/NbSA_D10	NbSA_D10/NbSA_D10	A8/NbSA_D10	3_C5/NbSA_D10	8_G3/NbSA_D10	12_F11/NbSA_D10	VHH_H6/NbSA_D10
A8	B12/A8	F2/A8	C1/A8	C5/A8	H3/A8	NbSA_A10/A8	NbSA_D10/A8	A8/A8	3_C5/2_A8	8_G3/2_A8	12_F11/2_A8	VHH_H6 /2_A8
3_C5	B12/3_C5	F2/3_C5	C1/3_C5	C5/3_C5	H3/3_C5	NbSA_A10/3_C5	NbSA_D10/3_C5	A8/3_C5	3_C5/3_C5	8_G3/3_C5	12_F11/3_C5	VHH_H6/3_C5
8_G11	B12/8_G11	F2/8_G11	C1/8_G11	C5/8_G11	H3/8_G11	NbSA_A10/8_G11	NbSA_D10/8_G11	A8/8_G11	3_C5/8_G11	8_G3/8_G11	12_F11/8_G11	VHH_H6/8_G11
12_F11	B12/12_F11	F2/12_F11	C1/12_F11	C5/12_F11	H3/12_F11	NbSA_A10/12_F11	NbSA_D10/12_F11	A8/12_F11	3_C5/12_F11	8_G3/12_F11	12_F11/12_F11	VHH_H6/12_F11
VHH_H6	B12/VHH_H6	F2/VHH_H6	C1/VH_H6	C5/VH_H6	H3/VH_H6	NbSA_A10/VHH_H6	NbSA_D10/VHH_H6	A8/VHH_H6	3_C5/VHH_H6	8_G3/VHH_H6	12_F11/VHH_H6	VHH_H6/VHH_H6

【０１８４】

一実施形態では、Ｃ５に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を有する第１のシングルドメインアミノ抗体と、Ｂ１２、Ｃ１、Ｃ５、Ｆ２、Ｈ３、ＮｂＳＡ＿Ａ１０、ＮｂＳＡ＿Ｄ１０、Ａ８、３＿Ｃ５、８＿Ｇ１１、１２＿Ｆ１１、又はＶＨＨ＿Ｈ６に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドを有する第２のシングルドメイン抗体と、Ｂ１２、Ｃ１、Ｃ５、Ｆ２、Ｈ３、ＮｂＳＡ＿Ａ１０、ＮｂＳＡ＿Ｄ１０、Ａ８、３＿Ｃ５、８＿Ｇ１１、１２＿Ｆ１１、又はＶＨＨ＿Ｈ６に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドを有する第３のシングルドメイン抗体と、を含む三価ポリペプチドが提供される。一実施形態では、Ｃ５に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を有する２つのシングルドメインアミノ抗体と、Ｂ１２、Ｃ１、Ｃ５、Ｆ２、Ｈ３、ＮｂＳＡ＿Ａ１０、ＮｂＳＡ＿Ｄ１０、Ａ８、３＿Ｃ５、８＿Ｇ１１、１２＿Ｆ１１、又はＶＨＨ＿Ｈ６に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドを有する第３のシングルドメイン抗体と、を含む三価ポリペプチドが提供される。一実施形態では、Ｃ５に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を有する３つのシングルドメインアミノ抗体を含む三価ポリペプチドが提供される。一実施形態では、Ｃ１に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を有する第１のシングルドメインアミノ抗体と、Ｂ１２、Ｃ１、Ｃ５、Ｆ２、Ｈ３、ＮｂＳＡ＿Ａ１０、ＮｂＳＡ＿Ｄ１０、Ａ８、３＿Ｃ５、８＿Ｇ１１、１２＿Ｆ１１、又はＶＨＨ＿Ｈ６に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドを有する第２のシングルドメイン抗体と、Ｂ１２、Ｃ１、Ｃ５、Ｆ２、Ｈ３、ＮｂＳＡ＿Ａ１０、ＮｂＳＡ＿Ｄ１０、Ａ８、３＿Ｃ５、８＿Ｇ１１、１２＿Ｆ１１、

又はＶＨＨ＿Ｈ６に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドを有する第３のシングルドメイン抗体と、を含む三価ポリペプチドが提供される。一実施形態では、Ｃ１に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を有する２つのシングルドメインアミノ抗体と、Ｂ１２、Ｃ１、Ｃ５、Ｆ２、Ｈ３、ＮｂＳＡ＿Ａ１０、ＮｂＳＡ＿Ｄ１０、Ａ８、３＿Ｃ５、８＿Ｇ１１、１２＿Ｆ１１、又はＶＨＨ＿Ｈ６に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドを有する第３のシングルドメイン抗体と、を含む三価ポリペプチドが提供される。一実施形態では、Ｃ１に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を有する３つのシングルドメインアミノ抗体を含む三価ポリペプチドが提供される。一実施形態では、Ａ８に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を有する第１のシングルドメインアミノ抗体と、Ｂ１２、Ｃ１、Ｃ５、Ｆ２、Ｈ３、ＮｂＳＡ＿Ａ１０、ＮｂＳＡ＿Ｄ１０、Ａ８、３＿Ｃ５、８＿Ｇ１１、１２＿Ｆ１１、又はＶＨＨ＿Ｈ６に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドを有する第２のシングルドメイン抗体と、Ｂ１２、Ｃ１、Ｃ５、Ｆ２、Ｈ３、ＮｂＳＡ＿Ａ１０、ＮｂＳＡ＿Ｄ１０、Ａ８、３＿Ｃ５、８＿Ｇ１１、１２＿Ｆ１１、又はＶＨＨ＿Ｈ６に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドを有する第３のシングルドメイン抗体と、を含む三価ポリペプチドが提供される。一実施形態では、Ａ８に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を有する２つのシングルドメインアミノ抗体と、Ｂ１２、Ｃ１、Ｃ５、Ｆ２、Ｈ３、ＮｂＳＡ＿Ａ１０、ＮｂＳＡ＿Ｄ１０、Ａ８、３＿Ｃ５、８＿Ｇ１１、１２＿Ｆ１１、又はＶＨＨ＿Ｈ６に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドを有する第３のシングルドメイン抗体と、を含む三価ポリペプチドが提供される。一実施形態では、２＿Ａ８に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を有する３つのシングルドメインアミノ抗体を含む三価ポリペプチドが提供される。全体を通して詳述する通り、アミノ酸又はポリヌクレオチドの配列は、指定のシングルドメイン抗体のＣＤＲ３、ＣＤＲ２、及び／若しくはＣＤＲ１、又はそれらのバリアントを含んでいてもよく、指定のシングルドメイン抗体のアミノ酸配列又はそのバリアントを含んでいてもよく、指定のシングルドメイン抗体のポリヌクレオチド配列のそのバリアントを含んでいてもよい。

【０１８５】

一実施形態では、３つのシングルドメイン抗体を含む三量体であって、各シングルドメイン抗体が、

（ａ）配列番号７を含むＣＤＲ１、配列番号８を含むＣＤＲ２、及び配列番号９を含むＣＤＲ３（Ｃ１）；

（ｂ）配列番号１３を含むＣＤＲ１、配列番号１４を含むＣＤＲ２、及び配列番号１５を含むＣＤＲ３（Ｈ３）；

（ｃ）配列番号１０を含むＣＤＲ１、配列番号１１を含むＣＤＲ２、及び配列番号１２を含むＣＤＲ３（Ｃ５）；又は

（ｄ）配列番号１９６を含むＣＤＲ１、配列番号１９７を含むＣＤＲ２、及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３（Ａ８）；

を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ１のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含む三量体が提供される。

【０１８６】

一実施形態では、３つのシングルドメイン抗体を含む三量体であって、各シングルドメイン抗体が、

（ａ）配列番号７を含むＣＤＲ１、配列番号８を含むＣＤＲ２、及び配列番号９を含むＣＤＲ３（Ｃ１）；

（ｂ）配列番号１３を含むＣＤＲ１、配列番号１４を含むＣＤＲ２、及び配列番号１５を含むＣＤＲ３（Ｈ３）；

（ｃ）配列番号１０を含むＣＤＲ１、配列番号１１を含むＣＤＲ２、及び配列番号１２を含むＣＤＲ３（Ｃ５）；又は

（ｄ）配列番号１９６を含むＣＤＲ１、配列番号１９７を含むＣＤＲ２、及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３（Ａ８）

を含む三量体が提供される。

【０１８７】

本発明のコロナウイルス結合分子又は多価ポリペプチドは、本明細書で更に説明する通り、好適なリンカーを含んでいてもよい。リンカーは、本発明の１つ以上のシングルドメイン抗体を、１つ以上の公知の抗体若しくはシングルドメイン抗体及び／又は更なる本発明のシングルドメイン抗体に接合させて、多価ポリペプチドを形成するために使用される。

【０１８８】

一実施形態では、リンカーは、１～５０個のアミノ酸を含む。一実施形態では、リンカーは、５～３５個、任意で５～２５個、又は５～１５個のアミノ酸を含む。一実施形態では、リンカーは、４～８個のアミノ酸、任意で４個、５個、６個、７個、又は８個のアミノ酸を含む。一実施形態では、リンカーは、１個以上のアミノ酸、例えば、２個以上のアミノ酸、３個以上のアミノ酸、４個以上のアミノ酸、５個以上のアミノ酸、６個以上のアミノ酸、７個以上のアミノ酸、８個以上のアミノ酸、９個以上のアミノ酸、又は１０個以上のアミノ酸を含む。リンカーは、任意の公知のアミノ酸残基を含み得るが、好ましくは、グリシン及びセリンの残基を含み得る。一実施形態では、リンカーは、１つ以上のグリシン残基及び／又は１つ以上のセリン残基を含む。一実施形態では、リンカーは、少なくとも１個、少なくとも５個、少なくとも１０個、又は少なくとも２０個のグリシン及び／又はセリンの残基を含む。一実施形態では、リンカーは、５～３５個、任意で、５～２５個又は５～１５個のグリシン及び／又はセリンの残基を含む。一実施形態では、リンカーは、２つのグリシン－セリンリピート（ＧＳＧＳ）を含む。一実施形態では、リンカーは、３つのグリシン－セリンリピート（ＧＳＧＳＧＳ）を含む。一実施形態では、リンカーは、４つのグリシン－セリンリピート（ＧＳＧＳＧＳＧＳ）を含む。一実施形態では、リンカーは、一般式（ＧＳ）ｎ（式中、ｎは、存在するＧＳリピートの数であり、例えば、ｎは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、又は２０である）によって表される複数のグリシン－セリンリピートを含む。リンカーは、ｎ末端、ｃ末端のいずれかに接合されていてもよく、又は多価ポリペプチドが複数のリンカーを含む場合には、リンカーは、本発明のシングルドメイン抗体のｎ末端及びｃ末端の両方に接合されていてもよい。

【０１８９】

一実施形態では、リンカーは、ユビキチン様タンパク質スーパーファミリーのタンパク質、ユビキチン（Ｕｂ）自体又はユビキチン様タンパク質（ＵＬＰ）のいずれかを含む。そのようなタンパク質は、広範に特性評価されており、当業者に周知である。そのようなタンパク質は、ユビキチン様折り畳みモチーフを含む。本発明のリンカーは、本発明の第１及び第２の抗原結合分子又はシングルドメイン抗体を連結させ、第１及び第２のエピトープを標的とするために最適な空間配置に配置するための最適な配置になるように設計を調整するために、組成及び長さを変化させてもよい。リンカーは、更に、本明細書に記載の通り、コロナウイルス結合分子又はシングルドメイン抗体の結合特性、例えばＫｄを最適化するために、組成及び長さを最適化してもよい。

【０１９０】

一実施形態では、リンカーは、ユビキチン、低分子ユビキチン様修飾因子１（ＳＵＭＯ－１、ヒトではＳｍｔ３ｃ、ＰＩＣ１、ＧＭＰ１、セントリン、及びＵｂｌ１としても知られている）、低分子ユビキチン様修飾因子２（ＳＵＭＯ－２、ヒトではＳｍｔ３ａ及びセントリン３としても知られている）、低分子ユビキチン様修飾因子３（ＳＵＭＯ－３、Ｓｍｔ３ｂ及びセントリン２としても知られている）、低分子ユビキチン様修飾因子４（ＳＵＭＯ－４）、ＦＡＵ、ＮＥＤＤ－８、ＵＢＬ－１、及びＧＤＸ、Ｒｕｂ１、ＡＰＧ８、ＩＳＧ１５、ＵＲＭ１、ＨＵＢ１、エロンギンＢ、又はＰＬＩＣ２からなる群から選択されるタンパク質を含む。一実施形態では、タンパク質は、ユビキチンである。好ましい実施形態では、タンパク質は、低分子ユビキチン様修飾因子（ＳＵＭＯ）である。一実施形態では、リンカーは、２つ以上のユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質（Ｕ

ＬＰ）、任意で、２つ、３つ、４つ、又は５つのユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質（ＵＬＰ）を含む。リンカーは、ユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質リンカーのｎ末端及びｃ末端の両方にアミノ酸を更に含むように伸長させてもよい。一実施形態では、ユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質リンカーのｎ末端に追加のアミノ酸が接合される。一実施形態では、ユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質リンカーのｃ末端に追加のアミノ酸が接合される。一実施形態では、ユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質リンカーのｃ末端及びｎ末端に追加のアミノ酸が接合される。ユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質リンカーのｎ末端、ｃ末端、又はｎ末端及びｃ末端の両方に接合したアミノ酸は、１つ以上の追加のアミノ酸を含んでいてもよい。一実施形態では、５～５０個のアミノ酸が、ユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質リンカーのｎ末端、ｃ末端、又はｎ末端及びｃ末端の両方に接合され得る。一実施形態では、４～８個のアミノ酸、任意で４個、５個、６個、７個、又は８個のアミノ酸が、ユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質リンカーのｎ末端、ｃ末端、又はｎ末端及びｃ末端の両方に接合され得る。一実施形態では、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、２０個、２１個、２２個、２３個、２４個、２５個、２６個、２７個、２８個、２９個、３０個、３１個、３２個、３３個、３４個、３５個、３６個、３７個、３８個、３９個、４０個、４１個、４２個、４３個、４４個、４５個、４６個、４７個、４８個、４９個、又は５０個のアミノ酸が、ユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質リンカーのｎ末端、ｃ末端、又はｎ末端及びｃ末端の両方に接合され得る。一実施形態では、１～１０個、１～８個、１～６個、１～４個、又は１～２個のアミノ酸が、ユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質リンカーのｎ末端、ｃ末端、又はｎ末端及びｃ末端の両方に接合され得る。好ましい実施形態では、６個のアミノ酸残基が、ユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質リンカーのｎ末端、ｃ末端、又はｎ末端及びｃ末端の両方に接合され得る。

【０１９１】

ユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質リンカーのｎ末端及びｃ末端の両方にアミノ酸が接合している場合、各末端のアミノ酸の数は同じでも異なっていてもよい、すなわち、両側の伸長が同じ長さであってもよく、又は各末端の伸長が異なる長さであってもよい。

【０１９２】

シングルドメイン抗体又はユビキチン（Ｕｂ）若しくはユビキチン様タンパク質リンカーのいずれかのｎ末端、ｃ末端、又はｎ末端及びｃ末端の両方に接合させるアミノ酸は、任意のアミノ酸を含んでいてよい。好ましい実施形態では、１つ以上のアミノ酸は、グリシン－セリン（ＧＳ）リンカーである。グリシン－セリンリンカーは、鎖長を長くするために反復させてもよく、例えば、２つのグリシン－セリンリンカー（ＧＳＧＳ）、３つのグリシン－セリンリンカー（ＧＳＧＳＧＳ）、４つのグリシン－セリンリンカー（ＧＳＧＳＧＳＧＳ）、又は５つの３つのグリシン－セリンリンカー（ＧＳＧＳＧＳＧＳＧＳ）を、ユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質リンカーのｎ末端、ｃ末端、又はｎ末端及びｃ末端の両方に接合させてよい。好ましい実施形態では、ユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質リンカーのｎ末端、ｃ末端、又はｎ末端及びｃ末端の両方に接合させるアミノ酸は、ＧＳＧＳＧＳである。一実施形態では、リンカーは、ユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質リンカーのｃ末端及びｎ末端の両方にＧＳＧＳＧＳを含む。一実施形態では、リンカーは、ポリＡテールを含む。

【０１９３】

好ましい実施形態では、リンカーは、ＳＵＭＯと、ＳＵＭＯのｎ末端における３つのグリシン－セリンリンカーの伸長（ＧＳＧＳＧＳ）と、ｃ末端における３つのグリシン－セリンリンカーの伸長（ＧＳＧＳＧＳ）と、を含む。

【０１９４】

一実施形態では、ＳＵＭＯ－１は、配列番号２４０若しくは２４１又はそれらのバリア

ント（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ／ｕｎｉｐｒｏｔ／Ｐ６３１６５）を含む。一実施形態では、ＳＵＭＯ－２は、配列番号２４２若しくは２４３又はそれらのバリアント（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ／ｕｎｉｐｒｏｔ／Ｐ６１９５６；ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ／ｕｎｉｐｒｏｔ／Ｐ６１９５６）を含む。一実施形態では、ＳＵＭＯ－３は、配列番号２４４若しくは２４５又はそれらのバリアント（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ／ｕｎｉｐｒｏｔ／Ｐ５５８５４；ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ／ｕｎｉｐｒｏｔ／Ｐ５５８５４）を含む。一実施形態では、ＳＵＭＯ－４は、配列番号２４６又はそのバリアント（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ／ｕｎｉｐｒｏｔ／Ｑ６ＥＥＶ６）を含む。

【０１９５】

リンカーは、任意で、ユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質リンカーのｎ末端及び／又はｃ末端に接合したスペーサーを更に含む。一実施形態では、ユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質リンカーのｎ末端にスペーサーを接合させる。一実施形態では、ユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質リンカーのｃ末端にスペーサーを接合させる。一実施形態では、ユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質リンカーのｃ末端及びｎ末端にスペーサーを接合させる。

【０１９６】

ユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質のｎ及び／又はｃ末端に結合している何らかの任意のスペーサーを含むリンカーを、第１の抗原結合分子のｃ末端を第２の抗原結合分子のｎ末端に連結させるために使用することもでき、あるいは、第２の抗原結合分子のｃ末端を第１の抗原結合分子のｎ末端に連結させるために使用することもできる。

【０１９７】

スペーサーは、１つ以上のアミノ酸、好ましくは４～５０アミノ酸を含み得る。一実施形態では、４～５０アミノ酸を、ユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質リンカーのｎ末端、ｃ末端、又はｎ末端及びｃ末端の両方に接合させてよい。一実施形態では、４～８個のアミノ酸、任意で４個、５個、６個、７個、又は８個のアミノ酸を、ユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質リンカーのｎ末端、ｃ末端、又はｎ末端及びｃ末端の両方に接合させてよい。一実施形態では、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、２０個、２１個、２２個、２３個、２４個、２５個、２６個、２７個、２８個、２９個、３０個、３１個、３２個、３３個、３４個、３５個、３６個、３７個、３８個、３９個、４０個、４１個、４２個、４３個、４４個、４５個、４６個、４７個、４８個、４９個、又は５０個のアミノ酸を、ユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質リンカーのｎ末端、ｃ末端、又はｎ末端及びｃ末端の両方に接合させてよい。一実施形態では、１～１０個、１～８個、１～６個、１～４個、又は１～２個のアミノ酸を、ユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質リンカーのｎ末端、ｃ末端、又はｎ末端及びｃ末端の両方に接合させてよい。好ましい実施形態では、６個のアミノ酸残基を、ユビキチン（Ｕｂ）又はユビキチン様タンパク質リンカーのｎ末端、ｃ末端、又はｎ末端及びｃ末端の両方に接合させてよい。

【０１９８】

一実施形態では、

ｉ．それぞれ配列番号１２（Ｃ５　ＣＤＲ３）を含む２つのシングルドメイン抗体；

ｉｉ．それぞれ配列番号１９８（Ａ８　ＣＤＲ３）を含む２つのシングルドメイン抗体；

ｉｉｉ．それぞれ配列番号９（Ｃ１　ＣＤＲ３）を含む２つのシングルドメイン抗体；

ｉｖ．それぞれ配列番号３（Ｂ１２　ＣＤＲ３）を含む２つのシングルドメイン抗体；

ｖ．それぞれ配列番号６（Ｆ２　ＣＤＲ３）を含む２つのシングルドメイン抗体；

ｖｉ．それぞれ配列番号１５（Ｈ３　ＣＤＲ３）を含む２つのシングルドメイン抗体；

ｖｉｉ．それぞれ配列番号１９２（ＮｂＳＡ＿Ａ１０　ＣＤＲ３）を含む２つのシングルドメイン抗体；

ｖｉｉｉ．それぞれ配列番号１９５（ＮｂＳＡ＿Ｄ１０　ＣＤＲ３）を含む２つのシングルドメイン抗体；
ｉｘ．それぞれ配列番号２０１（３＿Ｃ５　ＣＤＲ３）を含む２つのシングルドメイン抗体；
ｘ．それぞれ配列番号２０４（８＿Ｇ１１　ＣＤＲ３）を含む２つのシングルドメイン抗体；及び
ｘｉ．それぞれ配列番号２０７（１２＿Ｆ１１　ＣＤＲ３）を含む２つのシングルドメイン抗体；及び
ｘｉｉｉ．それぞれ配列番号２３７（ＶＨＨ＿Ｈ６　ＣＤＲ３）を含む２つのシングルドメイン抗体；
からなる群から選択される２つのシングルドメイン抗体を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含む多価ポリペプチドが提供される。一実施形態では、多価ポリペプチドは、単一特異性二価ポリペプチドである。好ましい実施形態では、多価ポリペプチドは、それぞれ配列番号１９８（２＿Ａ８　ＣＤＲ３）を含む２つのシングルドメイン抗体を含み、ＣＤＲ３のアミノ酸配列は、０～７個のアミノ酸改変を含む。好ましい実施形態では、多価ポリペプチドは、それぞれ配列番号１２（Ｃ５　ＣＤＲ３）を含む２つのシングルドメイン抗体を含み、ＣＤＲ３のアミノ酸配列は、０～７個のアミノ酸改変を含む。

【０１９９】

一実施形態では、
ｉ．それぞれ配列番号１１を含むＣＤＲ２及び配列番号１２を含むＣＤＲ３（Ｃ５）を含む２つのシングルドメイン抗体；
ｉｉ．それぞれ配列番号１９７を含むＣＤＲ２及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３（Ａ８）を含む２つのシングルドメイン抗体；
ｉｉｉ．それぞれ配列番号８を含むＣＤＲ２及び配列番号９を含むＣＤＲ３（Ｃ１）を含む２つのシングルドメイン抗体；
ｉｖ．それぞれ配列番号２を含むＣＤＲ２及び配列番号３を含むＣＤＲ３（Ｂ１２）を含む２つのシングルドメイン抗体；
ｖ．それぞれ配列番号５を含むＣＤＲ２及び配列番号６を含むＣＤＲ３（Ｆ２）を含む２つのシングルドメイン抗体；及び
ｖｉ．それぞれ配列番号１４を含むＣＤＲ２及び配列番号１５を含むＣＤＲ３（Ｈ３）を含む２つのシングルドメイン抗体；
ｖｉｉ．それぞれ配列番号１９１を含むＣＤＲ２及び配列番号１９２を含むＣＤＲ３を含む２つのシングルドメイン抗体
ｖｉｉｉ．それぞれ配列番号１９４を含むＣＤＲ２及び配列番号１９５を含むＣＤＲ３を含む２つのシングルドメイン抗体
ｉｘ．それぞれ配列番号２００を含むＣＤＲ２及び配列番号２０１を含むＣＤＲ３を含む２つのシングルドメイン抗体
ｘ．それぞれ配列番号２０３を含むＣＤＲ２及び配列番号２０４を含むＣＤＲ３を含む２つのシングルドメイン抗体
ｘｉ．それぞれ配列番号２０６を含むＣＤＲ２及び配列番号２０７を含むＣＤＲ３を含む２つのシングルドメイン抗体；及び
ｘｉｉ．それぞれ配列番号２３６を含むＣＤＲ２及び配列番号２３７を含むＣＤＲ３を含む２つのシングルドメイン抗体；
からなる群から選択される２つのシングルドメイン抗体を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含む多価ポリペプチドが提供される。一実施形態では、多価ポリペプチドは、単一特異性二価ポリペプチドである。好ましい実施形態では、多価ポリペプチドは、それぞれ配列番号１９７を含むＣＤＲ２及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３（２＿Ａ８）を含む２つのシングルドメイン抗体を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列は、０～７個のアミノ酸

改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列は、０～４個のアミノ酸改変を含む。好ましい実施形態では、多価ポリペプチドは、それぞれ配列番号１１を含むＣＤＲ２及び配列番号１２を含むＣＤＲ３（Ｃ５）を含む２つのシングルドメイン抗体を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列は、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列は、０～４個のアミノ酸改変を含む。

【０２００】

一実施形態では、

ｉ．それぞれ配列番号１０を含むＣＤＲ１、配列番号１１を含むＣＤＲ２、及び配列番号１２を含むＣＤＲ３（Ｃ５）を含む２つのシングルドメイン抗体；

ｉｉ．それぞれ配列番号１９６を含むＣＤＲ１、配列番号１９７を含むＣＤＲ２、及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３（Ａ８）を含む２つのシングルドメイン抗体；

ｉｉｉ．それぞれ配列番号７を含むＣＤＲ１、配列番号８を含むＣＤＲ２、及び配列番号９を含むＣＤＲ３（Ｃ１）を含む２つのシングルドメイン抗体；

ｉｖ．それぞれ配列番号１を含むＣＤＲ１、配列番号２を含むＣＤＲ２、及び配列番号３を含むＣＤＲ３（Ｂ１２）を含む２つのシングルドメイン抗体；

ｖ．それぞれ配列番号４を含むＣＤＲ１、配列番号５を含むＣＤＲ２、及び配列番号６を含むＣＤＲ３（Ｆ２）を含む２つのシングルドメイン抗体；並びに

ｖｉ．それぞれ配列番号１３を含むＣＤＲ１、配列番号１４を含むＣＤＲ２、及び配列番号１５を含むＣＤＲ３（Ｈ３）を含む２つのシングルドメイン抗体；

ｖｉｉ．それぞれ配列番号１９０を含むＣＤＲ１、配列番号１９１を含むＣＤＲ２、及び配列番号１９２を含むＣＤＲ３を含む２つのシングルドメイン抗体；

ｖｉｉｉ．それぞれ配列番号１９３を含むＣＤＲ１、配列番号１９４を含むＣＤＲ２、及び配列番号１９５を含むＣＤＲ３を含む２つのシングルドメイン抗体；

ｉｘ．それぞれ配列番号１９９を含むＣＤＲ１、配列番号２００を含むＣＤＲ２、及び配列番号２０１を含むＣＤＲ３を含む２つのシングルドメイン抗体；

ｘ．それぞれ配列番号１９４を含むＣＤＲ１、配列番号２０３を含むＣＤＲ２、及び配列番号２０４を含むＣＤＲ３を含む２つのシングルドメイン抗体；

ｘｉ．それぞれ配列番号２０５を含むＣＤＲ１、配列番号２０６を含むＣＤＲ２、及び配列番号２０７を含むＣＤＲ３を含む２つのシングルドメイン抗体；並びに

ｘｉｉ．それぞれ配列番号２３５を含むＣＤＲ１、配列番号２３６を含むＣＤＲ２、及び配列番号２３７を含むＣＤＲ３を含む２つのシングルドメイン抗体；

からなる群から選択される２つのシングルドメイン抗体を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ１のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含む多価ポリペプチドが提供される。一実施形態では、多価ポリペプチドは、単一特異性二価ポリペプチドである。好ましい実施形態では、多価ポリペプチドは、それぞれ配列番号７を含むＣＤＲ１、配列番号８を含むＣＤＲ２、及び配列番号９を含むＣＤＲ３（Ａ８）を含む２つのシングルドメイン抗体を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列は、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列は、０～４個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ１のアミノ酸配列は、０～４個のアミノ酸改変を含む。好ましい実施形態では、多価ポリペプチドは、それぞれ配列番号１０を含むＣＤＲ１、配列番号１１を含むＣＤＲ２、及び配列番号１２を含むＣＤＲ３（Ｃ５）を含む２つのシングルドメイン抗体を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列は、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列は、０～４個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ１のアミノ酸配列は、０～４個のアミノ酸改変を含む。

【０２０１】

一実施形態では、

ｉ．それぞれ配列番号１２（Ｃ５　ＣＤＲ３）を含む３つのシングルドメイン抗体；

ｉｉ．それぞれ配列番号１９８（Ａ８）を含む３つのシングルドメイン抗体；

ｉｉｉ．それぞれ配列番号９（Ｃ１　ＣＤＲ３）を含む３つのシングルドメイン抗体；

ｉｖ．それぞれ配列番号３（Ｂ１２　ＣＤＲ３）を含む３つのシングルドメイン抗体；

ｖ．それぞれ配列番号６（Ｆ２　ＣＤＲ３）を含む３つのシングルドメイン抗体；
ｖｉ．それぞれ配列番号１５（Ｈ３　ＣＤＲ３）を含む３つのシングルドメイン抗体；
ｖｉｉ．それぞれ配列番号１９２を含む３つのシングルドメイン抗体；
ｖｉｉｉ．それぞれ配列番号１９５を含む３つのシングルドメイン抗体；
ｉｘ．それぞれ配列番号２０１を含む３つのシングルドメイン抗体；
ｘ．それぞれ配列番号２０４を含む３つのシングルドメイン抗体；
ｘｉ．それぞれ配列番号２０７を含む３つのシングルドメイン抗体；及び
ｘｉｉ．それぞれ配列番号２３７を含む３つのシングルドメイン抗体；
からなる群から選択される３つのシングルドメイン抗体を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含む三価ポリペプチドが提供される。一実施形態では、三価ポリペプチドは、単一特異性三価ポリペプチドである。好ましい実施形態では、三価ポリペプチドは、それぞれ配列番号９（Ｃ１　ＣＤＲ３）を含む３つのシングルドメイン抗体を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列は、０～７個のアミノ酸改変を含む。好ましい実施形態では、三価ポリペプチドは、それぞれ配列番号１９８（Ａ８）を含む３つのシングルドメイン抗体を含み、ＣＤＲ３のアミノ酸配列は、０～７個のアミノ酸改変を含む。最も好ましい実施形態では、三価ポリペプチドは、それぞれ配列番号１２（Ｃ５　ＣＤＲ３）を含む３つのシングルドメイン抗体を含み、ＣＤＲ３のアミノ酸配列は、０～７個のアミノ酸改変を含む。

【０２０２】

一実施形態では、
ｉ．それぞれ配列番号１１を含むＣＤＲ２及び配列番号１２を含むＣＤＲ３（Ｃ５）を含む３つのシングルドメイン抗体；
ｉｉ．それぞれ配列番号１９７を含むＣＤＲ２及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３を含む３つのシングルドメイン抗体
ｉｉｉ．それぞれ配列番号８を含むＣＤＲ２及び配列番号９を含むＣＤＲ３（Ｃ１）を含む３つのシングルドメイン抗体；
ｉｖ．それぞれ配列番号２を含むＣＤＲ２及び配列番号３を含むＣＤＲ３（Ｂ１２）を含む３つのシングルドメイン抗体；
ｖ．それぞれ配列番号５を含むＣＤＲ２及び配列番号６を含むＣＤＲ３（Ｆ２）を含む３つのシングルドメイン抗体；及び
ｖｉ．それぞれ配列番号１４を含むＣＤＲ２及び配列番号１５を含むＣＤＲ３（Ｈ３）を含む３つのシングルドメイン抗体；
ｖｉｉ．それぞれ配列番号１９１を含むＣＤＲ２及び配列番号１９２を含むＣＤＲ３を含む３つのシングルドメイン抗体
ｖｉｉｉ．それぞれ配列番号１９４を含むＣＤＲ２及び配列番号１９５を含むＣＤＲ３を含む３つのシングルドメイン抗体
ｉｘ．それぞれ配列番号２００を含むＣＤＲ２及び配列番号２０１を含むＣＤＲ３を含む３つのシングルドメイン抗体
ｘ．それぞれ配列番号２０３を含むＣＤＲ２及び配列番号２０４を含むＣＤＲ３を含む３つのシングルドメイン抗体
ｘｉ．それぞれ配列番号２０６を含むＣＤＲ２及び配列番号２０７を含むＣＤＲ３を含む３つのシングルドメイン抗体；及び
ｘｉｉ．それぞれ配列番号２３６を含むＣＤＲ２及び配列番号２３７を含むＣＤＲ３を含む３つのシングルドメイン抗体；
からなる群から選択される３つのシングルドメイン抗体を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含む三価ポリペプチドが提供される。一実施形態では、三価ポリペプチドは、単一特異性三価ポリペプチドである。好ましい実施形態では、三価ポリペプチドは、それぞれ配列番号１９７を含むＣＤＲ２及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３（Ａ８）を含む３つのシングルドメイン抗体を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列は、０～７個のアミノ酸改変

を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列は、０～４個のアミノ酸改変を含む。好ましい実施形態では、三価ポリペプチドは、それぞれ配列番号１１を含むＣＤＲ２及び配列番号１２を含むＣＤＲ３（Ｃ５）を含む３つのシングルドメイン抗体を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列は、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列は、０～４個のアミノ酸改変を含む。

【０２０３】

一実施形態では、

ｉ．それぞれ配列番号１０を含むＣＤＲ１、配列番号１１を含むＣＤＲ２、及び配列番号１２を含むＣＤＲ３（Ｃ５）を含む３つのシングルドメイン抗体；

ｉｉ．それぞれ配列番号１９６を含むＣＤＲ１、配列番号１９７を含むＣＤＲ２、及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３（Ａ８）を含む３つのシングルドメイン抗体；

ｉｉｉ．それぞれ配列番号７を含むＣＤＲ１、配列番号８を含むＣＤＲ２、及び配列番号９を含むＣＤＲ３（Ｃ１）を含む３つのシングルドメイン抗体；

ｉｖ．それぞれ配列番号１を含むＣＤＲ１、配列番号２を含むＣＤＲ２、及び配列番号３を含むＣＤＲ３（Ｂ１２）を含む３つのシングルドメイン抗体；

ｖ．それぞれ配列番号４を含むＣＤＲ１、配列番号５を含むＣＤＲ２、及び配列番号６を含むＣＤＲ３（Ｆ２）を含む３つのシングルドメイン抗体；並びに

ｖｉ．それぞれ配列番号１３を含むＣＤＲ１、配列番号１４を含むＣＤＲ２、及び配列番号１５を含むＣＤＲ３（Ｈ３）を含む３つのシングルドメイン抗体；

ｖｉｉ．それぞれ配列番号１９０を含むＣＤＲ１、配列番号１９１を含むＣＤＲ２、及び配列番号１９２を含むＣＤＲ３を含む３つのシングルドメイン抗体；

ｖｉｉｉ．それぞれ配列番号１９３を含むＣＤＲ１、配列番号１９４を含むＣＤＲ２、及び配列番号１９５を含むＣＤＲ３を含む３つのシングルドメイン抗体；

ｉｘ．それぞれ配列番号１９９を含むＣＤＲ１、配列番号２００を含むＣＤＲ２、及び配列番号２０１を含むＣＤＲ３を含む３つのシングルドメイン抗体；

ｘ．それぞれ配列番号２０２を含むＣＤＲ１、配列番号２０３を含むＣＤＲ２、及び配列番号２０４を含むＣＤＲ３を含む３つのシングルドメイン抗体；

ｘｉ．それぞれ配列番号２０５を含むＣＤＲ１、配列番号２０６を含むＣＤＲ２、及び配列番号２０７を含むＣＤＲ３を含む３つのシングルドメイン抗体；並びに

ｘｉｉ．それぞれ配列番号２３５を含むＣＤＲ１、配列番号２３６を含むＣＤＲ２、及び配列番号２３７を含むＣＤＲ３を含む３つのシングルドメイン抗体；

からなる群から選択される３つのシングルドメイン抗体を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ１のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含む三価ポリペプチドが提供される。好ましい実施形態では、三価ポリペプチドは、それぞれ配列番号１９６を含むＣＤＲ１、配列番号１９７を含むＣＤＲ２、及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３（Ａ８）を含む３つのシングルドメイン抗体を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列は、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列は、０～４個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ１のアミノ酸配列は、０～４個のアミノ酸改変を含む。好ましい実施形態では、三価ポリペプチドは、それぞれ配列番号１０を含むＣＤＲ１、配列番号１１を含むＣＤＲ２、及び配列番号１２を含むＣＤＲ３（Ｃ５）を含む３つのシングルドメイン抗体を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列は、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列は、０～４個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ１のアミノ酸配列は、０～４個のアミノ酸改変を含む。

【０２０４】

一実施形態では、式Ｉ又はＩＩ：

式Ｉ：（ｓｄＡＢ）$_{N}$－（リンカー）$_{N-1}$

式ＩＩ：（ｓｄＡＢ）$_{N}$－（リンカー）$_{N}$

（式中、数Ｎは、シングルドメイン抗体（ｓｄＡｂ）の数であり、リンカー（複数可）は、同じであっても異なっていてもよく、ポリＡリンカー、ＧＳリンカー、及び／又はユビ

キチン若しくはユビキチン様のリンカー、任意でＳＵＭＯ又はＳＵＭＯ様のリンカーのうちの１つ以上を含み得る）によって表される３つ以上の本発明のシングルドメイン抗体（ｓｄＡＢ）を含む多価ポリペプチドが提供される。一実施形態では、ｎは、３、４、５、６、７、８、９、及び１０からなる群から選択される。一実施形態では、ｎは、３である。一実施形態では、ｎは、４である。一実施形態では、ｎは、５である。

【０２０５】

一実施形態では、式Ｉ又はＩＩ：

式Ｉ：（ｓｄＡＢ）$_{N}$－（リンカー）$_{N-1}$

式ＩＩ：（ｓｄＡＢ）$_{N}$－（リンカー）$_{N}$

によって表される３つ以上のシングルドメイン抗体（ｓｄＡＢ）を含み、各シングルドメイン抗体が、配列番号１２（Ｃ５　ＣＤＲ３）を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含む、多価ポリペプチドが提供される（式中、数Ｎは、シングルドメイン抗体（ｓｄＡｂ）の数であり、リンカー（複数可）は、同じであっても異なっていてもよく、ポリＡリンカー、ＧＳリンカー、及び／又はユビキチン若しくはユビキチン様のリンカー、任意でＳＵＭＯ又はＳＵＭＯ様のリンカーのうちの１つ以上を含み得る）。一実施形態では、ｎは、３、４、５、６、７、８、９、及び１０からなる群から選択される。一実施形態では、ｎは、３である。一実施形態では、ｎは、４である。一実施形態では、ｎは、５である。

【０２０６】

一実施形態では、式Ｉ又はＩＩ：

式Ｉ：（ｓｄＡＢ）$_{N}$－（リンカー）$_{N-1}$

式ＩＩ：（ｓｄＡＢ）$_{N}$－（リンカー）$_{N}$

によって表される３つ以上のシングルドメイン抗体（ｓｄＡＢ）を含み、各シングルドメイン抗体が、配列番号１１を含むＣＤＲ２及び配列番号１２を含むＣＤＲ３（Ｃ５）を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列が０～４個のアミノ酸改変を含む多価ポリペプチドが提供される（式中、数Ｎは、シングルドメイン抗体（ｓｄＡｂ）の数であり、リンカー（複数可）は、同じであっても異なっていてもよく、ポリＡリンカー、ＧＳリンカー、及び／又はユビキチン若しくはユビキチン様のリンカー、任意でＳＵＭＯ又はＳＵＭＯ様のリンカーのうちの１つ以上を含み得る）。一実施形態では、ｎは、３、４、５、６、７、８、９、及び１０からなる群から選択される。一実施形態では、ｎは、３である。一実施形態では、ｎは、４である。一実施形態では、ｎは、５である。

【０２０７】

一実施形態では、式Ｉ又はＩＩ：

式Ｉ：（ｓｄＡＢ）$_{N}$－（リンカー）$_{N-1}$

式ＩＩ：（ｓｄＡＢ）$_{N}$－（リンカー）$_{N}$

によって表される３つ以上のシングルドメイン抗体（ｓｄＡＢ）を含み、各シングルドメイン抗体が、配列番号１０を含むＣＤＲ１、配列番号１１を含むＣＤＲ２、及び配列番号１２を含むＣＤＲ３（Ｃ５）を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ１のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含む、多価ポリペプチドが提供される（式中、数Ｎは、シングルドメイン抗体（ｓｄＡｂ）の数であり、リンカー（複数可）は、同じであっても異なっていてもよく、ポリＡリンカー、ＧＳリンカー、及び／又はユビキチン若しくはユビキチン様のリンカー、任意でＳＵＭＯ又はＳＵＭＯ様のリンカーのうちの１つ以上を含み得る）。一実施形態では、ｎは、３、４、５、６、７、８、９、及び１０からなる群から選択される。一実施形態では、ｎは、３である。一実施形態では、ｎは、４である。一実施形態では、ｎは、５である。

【０２０８】

一実施形態では、式Ｉ又はＩＩ：

式Ｉ：（ｓｄＡＢ）$_{N}$－（リンカー）$_{N-1}$

式ＩＩ：（ｓｄＡＢ）$_N$－（リンカー）$_N$
によって表される３つ以上のシングルドメイン抗体（ｓｄＡＢ）を含み、各シングルドメイン抗体が、配列番号１９６を含むＣＤＲ１、配列番号１９７を含むＣＤＲ２、及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３（２＿Ａ８）を含み、該ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含み、該ＣＤＲ１のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含む、多価ポリペプチドが提供される（式中、数Ｎは、シングルドメイン抗体（ｓｄＡｂ）の数であり、リンカー（複数可）は、同じであっても異なっていてもよく、ポリＡリンカー、ＧＳリンカー、及び／又はユビキチン若しくはユビキチン様のリンカー、任意でＳＵＭＯ又はＳＵＭＯ様のリンカーのうちの１つ以上を含み得る）。一実施形態では、ｎは、３、４、５、６、７、８、９、及び１０からなる群から選択される。一実施形態では、ｎは、３である。一実施形態では、ｎは、４である。一実施形態では、ｎは、５である。

【０２０９】

一実施形態では、配列番号１６２若しくは１８１のヌクレオチド配列又はそれらのバリアントを有する二価ポリペプチド（Ｃ５－ＡＡＡ－Ｃ５）が提供される。一実施形態では、配列番号１７１若しくは１８２のアミノ酸配列又はそれらのバリアントを有する二価ポリペプチド（Ｃ５－ＡＡＡ－Ｃ５）が提供される。一実施形態では、配列番号１６３若しくは配列番号１８３のヌクレオチド配列又はそれらのバリアントを有する二価ポリペプチド（Ｃ５－９ＧＳ－Ｃ５）が提供される。一実施形態では、配列番号１７２若しくは配列番号１８４のアミノ酸配列又はそれらのバリアントを有する二価ポリペプチド（Ｃ５－９ＧＳ－Ｃ５）が提供される。一実施形態では、配列番号１６４若しくは配列番号１８５のヌクレオチド配列又はそれらのバリアントを有する二価ポリペプチド（Ｃ５－ＧＳＧＳＧＳ－ＳＵＭＯ－ＧＳＧＳＧＳ－Ｃ５）が提供される。一実施形態では、配列番号１７３若しくは配列番号１８６のアミノ酸配列又はそれらのバリアントを有する二価ポリペプチド（Ｃ５－ＧＳＧＳＧＳ－ＳＵＭＯ－ＧＳＧＳＧＳ－Ｃ５）が提供される。

【０２１０】

一実施形態では、配列番号１６５のヌクレオチド配列又はそのバリアントを有する二座ポリペプチド（Ｃ５－ＧＳＧＳＧＳ－ＳＵＭＯ－ＧＳＧＳＧＳ－Ｃ５）が提供される。

【０２１１】

一実施形態では、配列番号１７４のアミノ酸配列又はそのバリアントを有する二座ポリペプチド（Ｃ５－ＧＳＧＳＧＳ－ＳＵＭＯ－ＧＳＧＳＧＳ－Ｆ２）が提供される。一実施形態では、配列番号１６６のヌクレオチド配列又はそのバリアントを有する二座ポリペプチド（Ｆ２－ＧＳＧＳＧＳ－ＳＵＭＯ－ＧＳＧＳＧＳ－Ｃ５）が提供される。

【０２１２】

一実施形態では、配列番号１７５のアミノ酸配列又はそのバリアントを有する二座ポリペプチド（Ｆ２－ＧＳＧＳＧＳ－ＳＵＭＯ－ＧＳＧＳＧＳ－Ｃ５）が提供される。一実施形態では、配列番号１６７のヌクレオチド配列又はそのバリアントを有する二座ポリペプチド（Ｃ１－ＧＳＧＳＧＳ－ＳＵＭＯ－ＧＳＧＳＧＳ－Ｃ５）が提供される。

【０２１３】

一実施形態では、配列番号１７６のアミノ酸配列又はそのバリアントを有する二座ポリペプチド（Ｃ１－ＧＳＧＳＧＳ－ＳＵＭＯ－ＧＳＧＳＧＳ－Ｃ５）が提供される。一実施形態では、配列番号１６８のヌクレオチド配列又はそのバリアントを有する二座ポリペプチド（Ｃ１－ＧＳＧＳＧＳ－ＳＵＭＯ－ＧＳＧＳＧＳ－Ｈ３）が提供される。一実施形態では、配列番号１７７のアミノ酸配列又はそのバリアントを有する二座ポリペプチド（Ｃ１－ＧＳＧＳＧＳ－ＳＵＭＯ－ＧＳＧＳＧＳ－Ｈ３）が提供される。一実施形態では、配列番号１７８のヌクレオチド配列又はそのバリアントを有する二座ポリペプチド（Ｃ１－ＧＳＧＳＧＳ－ＳＵＭＯ－ＧＳＧＳＧＳ－Ｈ１１－Ｈ４）が提供される。一実施形態では、配列番号１７９のヌクレオチド配列又はそのバリアントを有する二座ポリペプチド（Ｃ１－ＧＳＧＳＧＳ－ＳＵＭＯ－ＧＳＧＳＧＳ－Ｈ１１－Ｈ４）が提供される。

【０２１４】

一実施形態では、配列番号２４７のアミノ酸配列又はそのバリアントを有する二座ポリペプチド（Ｆ２－ＧＳＧＳＧＳ－ＳＵＭＯ－ＧＳＧＳＧＳ－ＶＨＨ＿Ｈ６）が提供される。一実施形態では、配列番号２４８のアミノ酸配列又はそのバリアントを有する二座ポリペプチド（Ｆ２－ＧＳＧＳＧＳ－ＳＵＭＯ－ＧＳＧＳＧＳ－ＶＨＨ＿Ｈ６）が提供される。一実施形態では、配列番号１８７のヌクレオチド配列又はそのバリアントを有する三価ポリペプチド（Ｃ５－６ＧＳ－Ｃ５－６ＧＳ－Ｃ５）が提供される。一実施形態では、配列番号１８８若しくは配列番号１８９のアミノ酸配列又はそれらのバリアントを有する三価ポリペプチド（Ｃ５－６ＧＳ－Ｃ５－６ＧＳ－Ｃ５）が提供される。一実施形態では、配列番号２３０のヌクレオチド配列又はそのバリアントを有する三価ポリペプチド（Ａ８）が提供される。

【０２１５】

一実施形態では、配列番号２２１若しくは配列番号２２２のアミノ酸配列又はそれらのバリアントを有する三価ポリペプチド（Ａ８）が提供される。一実施形態では、配列番号２２３のヌクレオチド配列又はそのバリアントを有する三価ポリペプチド（Ｃ１）が提供される。一実施形態では、配列番号２２４のアミノ酸配列若しくは配列番号２２５のアミノ酸配列又はそれらのバリアントを有する三価ポリペプチド（Ｃ１）が提供される。

【０２１６】

一実施形態では、配列番号２２６のヌクレオチド配列又はそのバリアントを有する三価ポリペプチド（Ｆ２）が提供される。一実施形態では、配列番号２２７のアミノ酸配列又はそのバリアントを有する三価ポリペプチド（Ｆ２）が提供される。一実施形態では、配列番号２２８のヌクレオチド配列又はそのバリアントを有する三価ポリペプチド（Ｈ３）が提供される。一実施形態では、配列番号２２９のアミノ酸配列又はそのバリアントを有する三価ポリペプチド（Ｈ３）が提供される。一実施形態では、配列番号２３４のアミノ酸配列又はそのバリアントを有する二座ポリペプチド（ＶＨＨ＿７２－ＳＵＭＯ－Ｃ５）が提供される。

【０２１７】

指定の配列の変異体は、１個以上の改変（アミノ酸又はヌクレオチドの置換、欠失、又は挿入）、２個以上、３個以上の改変、４個以上、５個以上、６個以上、７個以上、８個以上、９個、又は１０個以上の改変を含み得る。一実施形態では、バリアントは、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、又は１０個の改変を含む。１個以上の改変を含むバリアントは、本明細書で詳述する通り、コロナウイルスペプチド、好ましくはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のＳタンパク質の受容体結合ドメインへの結合親和性を保持する。

【０２１８】

一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、又は抗原結合分子を、ヒトＦｃ等のＦｃドメインに融合又はコンジュゲートさせて、融合タンパク質を作製する。一実施形態では、本発明の二座ポリペプチドをＦｃドメインに融合させる。一実施形態では、本発明の第１の抗原結合分子をヒトＦｃ等のＦｃドメインに融合又はコンジュゲートさせて、融合タンパク質を作製する。一実施形態では、本発明の第２の抗原結合分子をヒトＦｃ等のＦｃドメインに融合又はコンジュゲートさせて、融合タンパク質を作製する。

【０２１９】

ＩｇＧ　Ｆｃ領域は、２つの半体で構成され、各半体はＣＨ２及びＣＨ３を含み、各半体はヒンジ領域によって接合される。一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、又は抗原結合分子を、ＣＨ２及びＣＨ３を含むＦｃ断片（すなわち、Ｆｃ領域の半分）に融合させてもよく、任意で、該Ｆｃ断片はヒンジ領域を含む。一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、又は抗原結合分子を、２つの半体を含むＦｃドメインに融合させてもよく、各半体はＣＨ２及びＣＨ３を含み、各半体はヒンジ領域によって接合される。

【０２２０】

一実施形態では、ＦｃドメインはＩｇＧ　Ｆｃドメインであり、任意で、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４の場合のＦｃドメインからなる群から選択される。一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、又は抗原結合分子を、ヒトＩｇＧ１のＦｃドメインに融合又はコンジュゲートさせる。一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、又は抗原結合分子を、ヒトＩｇＧ４のＦｃドメインに融合又はコンジュゲートさせる。

【０２２１】

一実施形態では、ＩｇＧ１　Ｆｃドメインは、配列番号１６９又はそのバリアントを含む。一実施形態では、ＩｇＧ１　Ｆｃドメイン配列番号１８０又はそのバリアントを含む。

【０２２２】

ＩｇＧ１　Ｆｃドメインのバリアントは、１個以上の改変（アミノ酸又はヌクレオチドの置換、欠失、又は挿入）、２個以上の改変、３個以上の改変を含んでいてもよい。一実施形態では、ＩｇＧ１　Ｆｃドメインは、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、又は１０個の改変を含む。

【０２２３】

Ｆｃドメインは、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、又は抗原結合分子のｃ末端又はｎ末端に接合し得る。好ましい実施形態では、Ｆｃドメインは、本発明のシングルドメイン抗体又は多価ポリペプチドのｃ末端に接合される。

【０２２４】

Ｆｃ領域の改変、例えば、アミノ酸の改変（置換、欠失、挿入）は当業者に周知であり、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、又は抗原結合分子は、１個以上の改変を含むＦＣドメイン、例えば、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）又は細胞媒介性細胞傷害（ＣＤＣ）等のエフェクター媒介機能を低減又は増強して、Ｆｃ受容体又はＣ１ｑ受容体等の受容体への結合を低減又は増強する改変を含むＦｃドメインに融合又はコンジュゲートさせてもよい。一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、又は抗原結合分子をＩｇＧ１　Ｆｃ変異体に融合又はコンジュゲートさせ、該Ｆｃ変異体は、Ｓ２６７Ｅ／Ｈ２６８Ｆ／Ｓ３２４Ｔ／　Ｓ２３９Ｄ／Ｉ３３２Ｅ、Ｈ２６８Ｆ／Ｓ３２４Ｔ／　Ｓ２３９Ｄ／Ｉ３３２Ｅ、Ｓ２６７Ｅ／Ｈ２６８Ｆ／Ｓ３２４Ｔ／Ｇ２３６Ａ／Ｉ３３２Ｅ、Ｓ２６７Ｅ／Ｈ２６８Ｆ／Ｓ３２４Ｔ、Ｈ２６８Ｆ／Ｓ３２４Ｔ、Ｇ２３６Ａ／Ｉ３３２Ｅ、Ｆ２４３Ｌ／Ｒ２９２Ｐ／Ｙ３００Ｌ／Ｖ３０５Ｉ／Ｐ３９６Ｌ、Ｓ２３９Ｄ／Ｉ３３２Ｅ、Ｓ２３９Ｄ／Ｉ３３２Ｅ／Ａ３３０Ｌ、Ｓ２９８Ａ／Ｅ３３３Ａ／Ｋ３３４Ａ、Ｇ２３６Ａ／Ｓ２３９Ｄ／Ｉ３３２Ｅ、Ｋ３２６Ｗ／Ｅ３３３Ｓ、Ｓ２６７Ｅ／Ｈ２６８Ｆ／Ｓ３２４Ｔ、Ｅ３４５Ｒ／Ｅ４３０Ｇ／Ｓ４４０Ｙ、Ｎ２９７Ａ、Ｎ２９７Ｑ、Ｎ２９７Ｇ、Ｌ２３５Ｅ、Ｌ２３４Ａ／Ｌ２３５Ａ、Ａ３３０Ｓ／Ｐ３３１Ｓ、Ｍ２５２Ｙ／Ｓ２５４Ｔ／Ｔ２５６Ｅ、Ｍ４２８Ｌ／Ｎ４３４Ｓ、Ｓ２６７Ｅ／Ｌ３２８Ｆ、及びＮ３２５Ｓ／Ｌ３２８Ｆからなる群から選択される。一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、又は抗原結合分子をＩｇＧ２　Ｆｃ変異体に融合又はコンジュゲートさせ、該Ｆｃ変異体は、Ｈ２６８Ｑ／Ｖ３０９Ｌ／Ａ３３０Ｓ／Ｐ３３１Ｓ及びＶ２３４Ａ／Ｇ２３７Ａ／Ｐ２３８Ｓ／Ｈ２６８Ａ／Ｖ３０９Ｌ／Ａ３３０Ｓ／Ｐ３３１Ｓからなる群から選択される。一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、又は抗原結合分子をＩｇＧ４　Ｆｃ変異体に融合又はコンジュゲートさせ、該Ｆｃ変異体は、Ｆ２３４Ａ／Ｌ２３５Ａである。一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、又は抗原結合分子を、Ｓ２２８ＰであるＩｇＧ４　Ｆｃドメインに融合又はコンジュゲートさせる。一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、又は抗原結合分子を、Ｌ２３５ＡであるＩｇＧ１　Ｆｃドメインに融合又はコンジュゲートさせる。

【０２２５】

多量体、例えば、二量体、三量体、及び四量体は、本発明のシングルドメイン抗体が１つ以上の追加のシングルドメイン抗体と共有結合したときに形成され得る。一実施形態では、本明細書で定義する通り、２つ以上の本発明のシングルドメイン抗体を含む単一のポ

リペプチド鎖が提供される。一実施形態では、本明細書で定義する通り、３つ以上の本発明のシングルドメイン抗体を含む単一のポリペプチド鎖が提供される。一実施形態では、本明細書で定義する通り、２つ以上の本発明のシングルドメイン抗体をコードしている単一のポリヌクレオチド鎖が提供される。一実施形態では、本明細書で定義する通り、３つ以上の本発明のシングルドメイン抗体をコードしている単一のポリヌクレオチド鎖が提供される。一実施形態では、本明細書で定義する通り、１つ以上の本発明のシングルドメイン抗体及び１つ以上の公知のシングルドメイン抗体を含む単一のポリペプチド鎖が提供される。一実施形態では、本明細書で定義する通り、２つ以上の本発明のシングルドメイン抗体及び１つ以上の公知のシングルドメイン抗体を含む単一のポリペプチド鎖が提供される。一実施形態では、本明細書で定義する通り、１つ以上の本発明のシングルドメイン抗体及び１つ以上の公知のシングルドメイン抗体をコードしている単一のポリヌクレオチドが提供される。一実施形態では、本明細書で定義する通り、２つ以上の本発明のシングルドメイン抗体及び１つ以上の公知のシングルドメイン抗体をコードしている単一のポリヌクレオチド鎖が提供される。多量体は、リンカー配列、例えば、本明細書で定義されるリンカーを含んでいてもよく、含んでいなくてもよい。

【０２２６】

二量体は、Ｆｃドメインに融合した本発明のシングルドメイン抗体が、Ｆｃドメインに融合した本発明の第２のシングルドメイン抗体と二量化したときに形成され得る。二量体化は、共有結合的相互作用と非共有結合的相互作用との組み合わせを介してＦｃ部分間で生じる。二量体の各半体は、本発明のシングルドメイン抗体を含む。一実施形態では、二量体は、Ｆｃドメインを介して互いに共有結合している２つの同一のシングルドメイン抗体を含む（ホモ二量体）。一実施形態では、二量体は、Ｆｃドメインを介して互いに共有結合している２つの異なるシングルドメイン抗体を含む（ヘテロ二量体）。一実施形態では、Ｆｃドメインに融合した第１の二価の、任意で二座のポリペプチドと、Ｆｃドメインに融合した第２の二価の、任意で二座のポリペプチドと、を含む二量体が提供される。この場合、得られる二量体は四価になる。

【０２２７】

また、二量体は、Ｆｃドメインに融合した抗原結合分子を含むコロナウイルス結合分子が、Ｆｃドメインに融合した抗原結合分子を含む第２のコロナウイルス結合分子と二量化したときにも形成され得る。二量体化は、共有結合的相互作用と非共有結合的相互作用との組み合わせを介してＦｃ部分間で生じる。二量体の各半体は、本発明の二座コロナウイルス結合分子を含む。得られる二量体は四価になる。

【０２２８】

多量体、例えば、二量体、三量体、及び四量体は、本発明のシングルドメイン抗体が他のシングルドメイン抗体、例えば、公知のシングルドメイン抗体又は本発明の追加のシングルドメイン抗体に非共有結合的に連結したときにも形成され得る。一実施形態では、２つの本発明のシングルドメイン抗体を含み、該シングルドメイン抗体が二量体化ドメインを介して非共有結合的に連結している二量体が提供される。一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体及び公知のシングルドメイン抗体を含み、該シングルドメイン抗体が二量体化ドメインを介して非共有結合的に連結している二量体が提供される。一実施形態では、３つの本発明のシングルドメイン抗体を含み、該シングルドメイン抗体が三量体化ドメインを介して非共有結合的に連結している三量体が提供される。一実施形態では、２つの本発明のシングルドメイン抗体及び１つの公知のシングルドメイン抗体を含み、該シングルドメイン抗体が三量体化ドメインを介して非共有結合的に連結している三量体が提供される。一実施形態では、１つの本発明のシングルドメイン抗体及び２つの公知のシングルドメイン抗体を含み、該シングルドメイン抗体が三量体化ドメインを介して非共有結合的に連結している三量体が提供される。

【０２２９】

一実施形態では、Ｆｃドメインに融合した本発明のシングルドメイン抗体がＦｃに融合した更なる本発明のシングルドメイン抗体と二量化している、二量体が提供される。Ｆｃ

ドメイン自体が二量体化を引き起こす。一実施形態では、
ａ）Ｃ５、Ｂ１２、Ｆ２、Ｃ１、又はＨ３に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を有する第１のシングルドメイン抗体であって、Ｆｃドメインに融合している第１のシングルドメイン抗体；及び
ｂ）Ｃ５、Ｂ１２、Ｆ２、Ｃ１、又はＨ３に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドを有する第２のシングルドメイン抗体であって、Ｆｃドメインに融合している第２のシングルドメイン抗体；又は
ａ）Ｃ５、Ａ８、Ｂ１２、Ｆ２、Ｃ１、Ｈ３、ＮｂＳＡ＿Ａ１０、ＮｂＳＡ＿Ｄ１０、３＿Ｃ５、８＿Ｇ１１、１２＿Ｆ１１、及びＶＨＨ＿Ｈ６に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を有する第１のシングルドメイン抗体であって、Ｆｃドメインに融合している第１のシングルドメイン抗体；及び
ｂ）Ｃ５、Ａ８、Ｂ１２、Ｆ２、Ｃ１、Ｈ３、ＮｂＳＡ＿Ａ１０、ＮｂＳＡ＿Ｄ１０、３＿Ｃ５、８＿Ｇ１１、１２＿Ｆ１１、及びＶＨＨ＿Ｈ６に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドを有する第２のシングルドメイン抗体であって、Ｆｃドメインに融合している第２のシングルドメイン抗体
を含む二量体が提供される。

【０２３０】

全体を通して詳述する通り、アミノ酸又はポリヌクレオチドの配列は、指定のシングルドメイン抗体のＣＤＲ３、ＣＤＲ２、及び／若しくはＣＤＲ１、又はそれらのバリアントを含んでいてもよく、指定のシングルドメイン抗体のアミノ酸配列又はそのバリアントを含んでいてもよく、指定のシングルドメイン抗体のポリヌクレオチド配列のそのバリアントを含んでいてもよい。

【０２３１】

一実施形態では、
ａ）配列番号１０を含むＣＤＲ１、配列番号１１を含むＣＤＲ２、及び配列番号１２を含むＣＤＲ３を含み、Ｆｃドメインがｃ末端に融合している第１のシングルドメイン抗体；
ｂ）配列番号１０を含むＣＤＲ１、配列番号１１を含むＣＤＲ２、及び配列番号１２を含むＣＤＲ３を含み、Ｆｃドメインがｃ末端に融合している第２のシングルドメイン抗体、
を含み、各ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、各ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含み、各ＣＤＲ１のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含む、抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２二量体（（Ｃ５－Ｆｃ）２）が提供される。好ましい実施形態では、Ｆｃドメインは、ヒトＩｇＧ１又はそのバリアントである。

【０２３２】

一実施形態では、
ａ）配列番号１９６を含むＣＤＲ１、配列番号１９７を含むＣＤＲ２、及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３を含み、Ｆｃドメインがｃ末端に融合している第１のシングルドメイン抗体；
ｂ）配列番号１９６を含むＣＤＲ１、配列番号１９７を含むＣＤＲ２、及び配列番号１９８を含むＣＤＲ３を含み、Ｆｃドメインがｃ末端に融合している第２のシングルドメイン抗体、
を含み、各ＣＤＲ３のアミノ酸配列が、０～７個のアミノ酸改変を含み、各ＣＤＲ２のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含み、各ＣＤＲ１のアミノ酸配列が、０～４個のアミノ酸改変を含む、抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２二量体（（Ａ８－Ｆｃ）２）が提供される。好ましい実施形態では、Ｆｃドメインは、ヒトＩｇＧ１又はそのバリアントである。

【０２３３】

一実施形態では、Ｆｃドメインに融合している、Ｂ１２、Ｃ１、Ｃ５、Ｆ２、Ｈ３、ＮｂＳＡ＿Ａ１０、ＮｂＳＡ＿Ｄ１０、Ａ８、３＿Ｃ５、８＿Ｇ１１、１２＿Ｆ１１、又はＶＨＨ＿Ｈ６（以下の表の最初の行）に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を有

する第１のシングルドメイン抗体と、Ｂ１２、Ｃ１、Ｃ５、Ｆ２、Ｈ３、ＮｂＳＡ＿Ａ１０、ＮｂＳＡ＿Ｄ１０、Ａ８、３＿Ｃ５、８＿Ｇ１１、１２＿Ｆ１１、又はＶＨＨ＿Ｈ６（以下の表の最初の列）に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドを有する第２のシングルドメイン抗体と、を含む二量体が提供される。一実施形態では、Ｂ１２、Ｃ１、Ｃ５、Ｆ２、Ｈ３、ＮｂＳＡ＿Ａ１０、ＮｂＳＡ＿Ｄ１０、Ａ８、３＿Ｃ５、８＿Ｇ１１、１２＿Ｆ１１、又はＶＨＨ＿Ｈ６（以下の表の最初の列）に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドを有する第２のシングルドメイン抗体に共有結合している、Ｂ１２、Ｃ１、Ｃ５、Ｆ２、Ｈ３、ＮｂＳＡ＿Ａ１０、ＮｂＳＡ＿Ｄ１０、Ａ８、３＿Ｃ５、８＿Ｇ１１、１２＿Ｆ１１、又はＶＨＨ＿Ｈ６（以下の表の最初の行）に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を有する第１のシングルドメイン抗体を含む二量体が提供される。一実施形態では、Ｂ１２、Ｃ１、Ｃ５、Ｆ２、Ｈ３、ＮｂＳＡ＿Ａ１０、ＮｂＳＡ＿Ｄ１０、Ａ８、３＿Ｃ５、８＿Ｇ１１、１２＿Ｆ１１、又はＶＨＨ＿Ｈ６（以下の表の最初の列）に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドを有する第２のシングルドメイン抗体に、任意で二量体化ドメインを介して非共有結合している、Ｂ１２、Ｃ１、Ｃ５、Ｆ２、Ｈ３、ＮｂＳＡ＿Ａ１０、ＮｂＳＡ＿Ｄ１０、Ａ８、３＿Ｃ５、８＿Ｇ１１、１２＿Ｆ１１、又はＶＨＨ＿Ｈ６（以下の表の最初の行）に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を有する第１のシングルドメイン抗体を含む二量体が提供される。以下の表は、二量体を形成し得る、２つの本発明のシングルドメイン抗体の様々な組み合わせを示す。好ましい実施形態では、Ｆｃドメインに融合している２＿Ａ８又はＣ５に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を含む第１のシングルドメイン抗体と、Ｆｃドメインに融合している、Ｂ１２、Ｃ１、Ｃ５、Ｆ２、Ｈ３、ＮｂＳＡ＿Ａ１０、ＮｂＳＡ＿Ｄ１０、Ａ８、３＿Ｃ５、８＿Ｇ１１、１２＿Ｆ１１、又はＶＨＨ＿Ｈ６（以下の表の最初の列）に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドを有する第２のシングルドメイン抗体と、を含む二量体が提供される。好ましい実施形態では、Ｂ１２、Ｃ１、Ｃ５、Ｆ２、Ｈ３、ＮｂＳＡ＿Ａ１０、ＮｂＳＡ＿Ｄ１０、Ａ８、３＿Ｃ５、８＿Ｇ１１、１２＿Ｆ１１、又はＶＨＨ＿Ｈ６（以下の表の最初の列）に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドを有する第２のシングルドメイン抗体に共有結合している、２＿Ａ８又はＣ５に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を含む第１のシングルドメイン抗体を含む二量体が提供される。好ましい実施形態では、Ｂ１２、Ｃ１、Ｃ５、Ｆ２、Ｈ３、ＮｂＳＡ＿Ａ１０、ＮｂＳＡ＿Ｄ１０、Ａ８、３＿Ｃ５、８＿Ｇ１１、１２＿Ｆ１１、又はＶＨＨ＿Ｈ６（以下の表の最初の列）に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドを有する第２のシングルドメイン抗体に、任意で二量体化ドメインを介して非共有結合している、２＿Ａ８又はＣ５に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を含む第１のシングルドメイン抗体を含む二量体が提供される。更に好ましい実施形態では、Ｆｃドメインに融合している、Ａ８又はＣ５に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を含む第１のシングルドメインと、Ｆｃドメインに融合している、Ａ８又はＣ５に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を含む第２のシングルドメイン抗体と、を含む二量体が提供される。更に好ましい実施形態では、Ａ８又はＣ５に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を含む第２のシングルドメイン抗体に共有結合している、Ａ８又はＣ５に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を含む第１のシングルドメインを含む二量体が提供される。更に好ましい実施形態では、Ａ８又はＣ５に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を含む第２のシングルドメイン抗体に、任意で二量体化ドメインを介して非共有結合している、２＿Ａ８又はＣ５に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を含む第１のシングルドメインと、を含む二量体が提供される。全体を通して詳述する通り、アミノ酸又はポリヌクレオチドの配列は、指定のシングルドメイン抗体のＣＤＲ３、ＣＤＲ２、及び／若しくはＣＤＲ１、又はそれらのバリアントを含んでいてもよく、指定のシングルドメイン抗体のアミノ酸配列又はそのバリアントを含んでいてもよく、指定のシングルドメイン抗体のポリヌクレオチド配列のそのバリアントを含んでいてもよい。

【０２３４】

	B12	F2	C1	C5	H3	NbSA_A10	NbSA_D10	A8	3_C5	8_G11	12_F11	VHH_H6
B12	B12/B12	F2/B12	C1/B12	C5/B12	H3/B12	NbSA_A10/B12	NbSA_D10/B12	A8/B12	3_C5/B12	8_G3/B12	12_F11/B12	VHH_H6/B12
F2	B12/F2	F2/F2	C1/F2	C5/F2	H3/F2	NbSA_A10/F2	NbSA_D10/F2	A8/F2	3_C5/F2	8_G3/F2	12_F11/F2	VHH_H6/F2
C1	B12/C1	F2/C1	C1/C1	C5/C1	H3/C1	NbSA_A10/C1	NbSA_D10/C1	A8/C1	3_C5/C1	8_G3/C1	12_F11/C1	VHH_H6/C1
C5	B12/C5	F2/C5	C1/C5	C5/C5	H3/C5	NbSA_A10/C5	NbSA_D10/C5	A8/C5	3_C5/C5	8_G3/C5	12_F11/C5	VHH_H6/C5
H3	B12/H3	F2/H3	C1/H3	C5/H3	H3/H3	NbSA_A10/H3	NbSA_D10/H3	A8/H3	3_C5/H3	8_G3/H3	12_F11/H3	VHH_H6/H3
NbSA_A10	B12/NbSA_A10	F2/NbSA_A10	C1/NbSA_A10	C5/NbSA_A10	H3/NbSA_A10	NbSA_A10/NbSA_A10	NbSA_D10/NbSA_A10	A8/NbSA_A10	3_C5/NbSA_A10	8_G3NbSA_A10/	12_F11/NbSA_A10	VHH_H6/NbSA_A10
NbSA_D10	B12/NbSA_D10	F2/NbSA_D10	C1/NbSA_D10	C5/NbSA_D10	H3/NbSA_D10	NbSA_A10/NbSA_D10	NbSA_D10/NbSA_D10	A8/NbSA_D10	3_C5/NbSA_D10	8_G3/NbSA_D10	12_F11/NbSA_D10	VHH_H6/NbSA_D10
A8	B12A8	F2/A8	C1A8	C5A8	H3A8	NbSA_A10/A8	NbSA_D10/A8	A8/A8	3_C5/_A8	8_G3/A8	12_F11/A8	VHH_H6 /A8
3_C5	B12/3_C5	F2/3_C5	C1/3_C5	C5/3_C5	H3/3_C5	NbSA_A10/3_C5	NbSA_D10/3_C5	A8/3_C5	3_C5/3_C5	8_G3/3_C5	12_F11/3_C5	VHH_H6/3_C5
8_G11	B12/8_G11	F2/8_G11	C1/8_G11	C5/8_G11	H3/8_G11	NbSA_A10/8_G11	NbSA_D10/8_G11	A8/8_G11	3_C5/8_G11	8_G3/8_G11	12_F11/8_G11	VHH_H6/8_G11
12_F11	B12/12_F11	F2/12_F11	C1/12_F11	C5/12_F11	H3/12_F11	NbSA_A10/12_F11	NbSA_D10/12_F11	A8/12_F11	3_C5/12_F11	8_G3/12_F11	12_F11/12_F11	VHH_H6/12_F11
VHH_H6	B12/H6	F2/H6	C1/H6	C5/H6	H3/H6	NbSA_A10/H6	NbSA_D10/H6	A8/H6	3_C5/H6	8_G3/H6	12_F11/H6	VHH_H6/VHH_H6

【０２３５】

一実施形態では、以下の配列を有するｈＩｇＧ１のＦｃ領域に融合したシングルドメイン抗体（Ｃ５）、又はそのバリアントを含む融合タンパク質（Ｃ５－Ｆｃ）が提供される：

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGGGGGTCTCTGACACTCTCCTGTGTCGCCTCT
GGAGTCACTTTGGGACGTCATGCCATAGGCTGGTTCCGCCAGGCCCCCGGGAAGGAGCGTGAGAGAGTCTCGTGT
ATTAGAACATTTGATGGCATCACAAGTTATGTAGAGTCCACGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGTAACAATGCC
ATGAACACGGTGTATCTGCAAATGAATAGCCTCAAACCTGAAGACACGGCCGTTTATTTCTGTGCACTGGGAGTG
ACTGCAGCCTGTTCAGATAATCCCTACTTCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGTCGACCGAG
CCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC
CTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG
AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG
CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG
CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACC
TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTAC
AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG
TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCCCCGGGTAAA

配列番号 161

QVQLVESGGGSVQAGGSLTLSCVAS**GVTLGRHA**IGWFRQAPGKERERVSC**IRTFDGIT**SYVESTKGRFTISSNNA
MNTVYLQMNSLKPEDTAVYFC**ALGVTAACSDNPYF**WGQGTQVTVSSASTEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号 170

【０２３６】

幾つかの実施形態では、１つ以上のアミノ酸改変は、ＣＤＲ領域（複数可）にある。幾つかの実施形態では、１つ以上のアミノ酸改変は、フレームワーク領域にある、すなわち、ＣＤＲ領域（複数可）にはない。幾つかの実施形態では、１つ以上のポリヌクレオチド改変は、ＣＤＲ領域（複数可）にある。幾つかの実施形態では、１つ以上のポリヌクレオチド改変は、フレームワーク領域にある、すなわち、ＣＤＲ領域（複数可）にはない。幾つかの実施形態では、１つ以上のアミノ酸改変は、ＣＤＲ領域（複数可）及びフレームワーク領域にある。幾つかの実施形態では、１つ以上のポリヌクレオチド改変は、ＣＤＲ領域（複数可）及びフレームワーク領域にある。

【０２３７】

一実施形態では、ＣＤＲ３領域は、０～７個、０～６個、０～５個、０～４個、０～３、０～２個、又は０～１個のアミノ酸改変を含む。一実施形態では、ＣＤＲ２領域は、０～４個、０～３個、０～２個、又は０～１個のアミノ酸改変を含む。一実施形態では、ＣＤＲ１領域は、０～４個、０～３個、０～２個、又は０～１個のアミノ酸改変を含む。改変は、置換、欠失、又は挿入であってよい。一実施形態では、改変は置換である。

【０２３８】

一実施形態では、１つ以上の改変を含む本発明のシングルドメイン抗体又は抗原結合分子は、全く改変のない指定の配列と実質的に等しいか又はそれよりも良好な（例えば、Ｋｄ値が低い）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ－タンパク質の受容体結合ドメインに対する結合親和性を有する。

【０２３９】

本発明のシングルドメイン抗体又はコロナウイルス結合分子は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２Ｓタンパク質の受容体結合ドメインに結合する。一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体又はコロナウイルス結合分子は、コロナウイルス、特にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク（Ｓ）タンパク質の受容体結合ドメインとアンジオテンシン変換酵素２受容体（ＡＣＥ２受容体）との間の結合をブロック又は調節する。一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体又はコロナウイルス結合分子は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク（Ｓ）タンパク質の受容体結合ドメインのＡＣＥ２受容体への結合を阻害し、該ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク（Ｓ）タンパク質の受容体結合ドメインのＡＣＥ２受容体への結合は、少なくとも１０％、任意で少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、又は１００％阻害される。ＡＣＥ２受容体への結合の阻害率は、

当業者であれば深く理解できるように、表面プラズモン共鳴を含むがこれに限定されない多数の方法で測定することができる。

【０２４０】

一実施形態では、第１の抗原結合分子が、第１のエピトープに結合したときに、コロナウイルスのＲＢＤがヒトＡＣＥ２タンパク質に結合するのをブロックする、コロナウイルス結合分子が提供される。

【０２４１】

コロナウイルスのスパイクタンパク質とその標的との間の相互作用に干渉することにより、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、又はコロナウイルス結合分子は、コロナウイルス感染を中和することができる。一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、又はコロナウイルス結合分子は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染を中和することができる。一実施形態では、シングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、又はコロナウイルス結合分子は、１００μＭ未満、１０μＭ未満、５μＭ未満、１μＭ未満、０．５μＭ未満、０．１μＭ未満、又は０．０１μＭ未満のＮＤ５０値（ＮＤ５０＝感染細胞数を５０％減少させる抗体の濃度）を有する。一実施形態では、シングルドメイン抗体は、１００ｎＭ未満、１０ｎＭ未満、５ｎＭ未満、１ｎＭ未満、０．５ｎＭ未満、又は０．１ｎＭ未満のＮＤ５０値を有する。一実施形態では、シングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、又はコロナウイルス結合分子は、０．１ｎＭ未満、１０ｐＭ未満、５ｐＭ未満、１ｐＭ未満、０．５ｐＭ未満、又は０．１ｐＭ未満のＮＤ５０値を有する。ＮＤ５０値は、本明細書に開示されるものを含む、任意の標準的な中和アッセイを用いて求めることができる。

【０２４２】

幾つかの実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、又はコロナウイルス結合分子を投与すると、非中和ウイルスの複製及び／又は伝播が防止又は実質的に低減される。幾つかの実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、又はコロナウイルス結合分子は、ポジティブコントロール、例えばＣＲ３０２２の存在下よりも５％小さいプラークを形成することができる。幾つかの実施形態では、プラークは、ポジティブコントロール（例えばＣＲ３０２２）の存在下よりも１０％小さく、幾つかの実施形態では、プラークは、ポジティブコントロール（例えばＣＲ３０２２）の存在下よりも１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、又は９５％小さい。

【０２４３】

一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、又はコロナウイルス結合分子は、５００ｐＭ未満、４００ｐＭ未満、２００ｐＭ未満、１００ｐＭ未満、７５ｐＭ未満、５０ｐＭ未満、２５ｐＭ未満、１０ｐＭ未満、５ｐＭ未満、１ｐＭ未満、又は０．１ｐＭ未満のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパクに対するＫｄ値を有する。結合親和性は、例えば表面プラズマ共鳴を含む幾つかの標準的な周知の技術に従って測定することができる。一実施形態では、本明細書で指定される１つ以上の改変を有する本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、又はコロナウイルス結合分子は、１つ以上の改変を有しない対応するシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、又はコロナウイルス結合分子の結合親和性値の２０％以内（すなわち、１つ以上の改変を有しない対応するシングルドメイン抗体の結合親和性値よりも２０％下又は２０％上の範囲内）である結合親和性値を有する。一実施形態では、本明細書で指定される１つ以上の改変を有する本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、又はコロナウイルス結合分子の結合親和性値は、１つ以上の改変を有しない対応するシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、又はコロナウイルス結合分子の結合親和性値の１０％、任意で５％、４％、３％、２％、又は１％以内である。

【０２４４】
更に、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、又はコロナウイルス結合分子は、コロナウイルスの感染力を調節、低減、又は抑止することができる。本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、又は融合タンパク質は、コロナウイルスの標的宿主細胞への融合を調節、ブロック、又は阻害することができる。本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、又はコロナウイルス結合分子は、コロナウイルスの標的宿主細胞への侵入を調節、ブロック、又は阻害することができる。
【０２４５】
一態様では、本発明のシングルドメイン抗体の親和性成熟変異体が提供される。一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体のＣＤＲ１は、親和性成熟している。一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体のＣＤＲ２は、親和性成熟している。一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体のＣＤＲ３は、親和性成熟している。一実施形態では、ＣＤＲ３が親和性成熟しており、ＣＤＲ１又はＣＤＲ２のいずれかも親和性成熟している。一実施形態では、ＣＤＲ３が親和性成熟しており、ＣＤＲ２も親和性成熟している。一実施形態では、ＣＤＲ３が親和性成熟しており、ＣＤＲ１も親和性成熟している。一実施形態では、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３の各々が親和性成熟している。一実施形態では、フレームワーク領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及びＦＲ４）のうちの少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、又は４つ全てが親和性成熟している。一実施形態では、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３、ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及びＦＲ４の各々が親和性成熟している。一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体の親和性成熟変異体の親和性は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）に対して、その由来となった親抗体よりも高い親和性を有する。
【０２４６】
一態様では、本発明のヒト化シングルドメイン抗体が提供される。ヒト化には、抗体のアミノ酸配列の改変が必要である。本発明のシングルドメイン抗体の免疫原性を低下させる方法としては、好適な抗体フレームワークスカフォールドへのＣＤＲの移植又は例えば部位特異的変異誘発による可変表面残基のリモデリングが挙げられる。Ｎａｎｏｂｏｄｉｅｓ（登録商標）をヒト化する方法は当業者に公知である。例えばＶｉｎｃｋｅ ｅｔａｌ，２００９を参照。一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体のＣＤＲ１が、ヒト化されている。一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体のＣＤＲ２が、ヒト化されている。一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体のＣＤＲ３が、ヒト化されている。一実施形態では、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３のうち少なくとも１つ又は少なくとも２つが、ヒト化されている。一実施形態では、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３の各々が、ヒト化されている。一実施形態では、フレームワーク領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及びＦＲ４）のうちの少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、又は４つ全てがヒト化されている。一実施形態では、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３、ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及びＦＲ４の各々がヒト化されている。幾つかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、例えば、より優れた抗原結合を保持するために、保存的にヒト化される。
【０２４７】
一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、又は融合タンパク質の配列を発現させるのに好適なベクターが提供される。ベクターは、プラスミド、ウイルスベクター、コスミド、ファージ、又は人工染色体であってよい。一態様では、発現ベクター又はプラスミドを含む宿主細胞であって、該発現ベクター又はプラスミドが本発明のポリヌクレオチドを含む宿主細胞が提供される。一実施形態では、宿主細胞は、宿主細胞のゲノム内に組み込まれた本発明のポリヌクレオチドを含む。一実施形態では、宿主細胞は、原核細胞、例えば細菌細胞、又は真核細胞、例えば酵母細胞若しくは哺乳類細胞である。一実施形態では、宿主細胞は、大腸菌又はＣＨＯ細胞である。
【０２４８】

一態様では、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、又は融合タンパク質を生産する方法であって、（ａ）シングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、又は融合タンパク質の生産に好適な条件下において本明細書で提供される宿主細胞を培養して、シングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、又は融合タンパク質を含有する培養物を得る工程と、（ｂ）該シングルドメイン抗体を該培養物から単離する工程と、を含む方法が提供される。

【０２４９】

本発明の一態様は、組成物又は医薬組成物において、上で定義されたシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、又はコロナウイルス結合分子を提供する。組成物は、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、又はコロナウイルス結合分子を含んでいてもよく、から本質的になっていてもよく、又はからなっていてもよい。

【０２５０】

一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、又はコロナウイルス結合分子を含む医薬組成物が提供される。医薬組成物は、ヒト及び動物用の医薬においてヒト又は動物に使用するためのものであってよい。医薬組成物は、投与経路に応じて製剤化することができる。一実施形態では、医薬組成物は、経口、鼻内、眼内、頬側、膣内、直腸、経皮、静脈内、筋肉内、又は皮下への投与用に製剤化される。好ましい投与経路では、医薬組成物は、吸入、任意で鼻腔吸入及び又は経口吸入による投与用に製剤化される。この形態の医薬組成物は、エアロゾル、微粒子、又は粉塵を含んでいてよい。

【０２５１】

一実施形態では、組成物又は医薬組成物は、任意で、１つ以上の薬学的に許容し得る賦形剤を含む。一実施形態では、組成物又は医薬組成物は、任意で、１つ以上の薬学的に許容し得るアジュバントを含む。一実施形態では、組成物又は医薬組成物は、任意で、１つ以上の薬学的に許容し得る希釈剤、賦形剤、又は担体と混和される。本明細書に記載される異なる形態の医薬組成物のためのそのような好適な賦形剤の例は、「Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｅｘｃｉｐｉｅｎｔｓ、第２版、（１９９４）、Ａ Ｗａｄｅ及びＰＪ Ｗｅｌｌｅｒ編に見出すことができる。

【０２５２】

組成物又は医薬組成物は、１つ以上の追加成分を含んでいてもよい。一実施形態では、組成物又は医薬組成物は、更に、薬学的に許容し得る担体を含む。一実施形態では、担体は、肺送達に好適である。一実施形態では、組成物又は医薬組成物は、更に、治療活性剤を含む。

【０２５３】

一実施形態では、組成物又は医薬組成物は、タンパク質又は生物活性分子に接合又はコンジュゲートされ得る。一実施形態では、組成物又は医薬組成物は、融合タンパク質の一部であり、１つ以上のタンパク質又は生物活性分子に融合する。タンパク質又は生物活性分子は、蛍光タンパク質、生物発光タンパク質、分割蛍光タンパク質（すなわち、薬物の存在下で互いに接合する２つ以上の部分に分割）、分割生物発光タンパク質、バイオセンサ、蛍光バイオセンサ、又は分割若しくはヒンジ式バイオセンサであってよい。

【０２５４】

一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、又はコロナウイルス結合分子を含むワクチンが提供される。一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、又はコロナウイルス結合分子をコードしているポリヌクレオチドを含むワクチンが提供される。

【０２５５】

本発明の組成物、医薬組成物、及びワクチンは、対象において免疫応答、好ましくはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対する免疫応答を誘発することができる。幾つかの実施形態では、免疫応答は、防御免疫応答である。幾つかの実施形態では、免疫応答は、対象におけるＳ

ＡＲＳ－ＣｏＶ－２の症状又は重症度を軽減する。

【０２５６】

本発明の医薬組成物を投与するのに好適な医療装置、例えば吸入器又はネブライザーも提供される。一実施形態では、医療装置、例えば吸入器又はネブライザーは、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、又はコロナウイルス結合分子を含む。

【０２５７】

また、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、又はコロナウイルス結合分子を提供するキットも提供される。このようなキットには、使用説明書及び／又は追加の薬学的活性成分が含まれる場合もある。シングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、又はコロナウイルス結合分子、及び追加の薬学的活性成分は、一緒に製剤化されてもよく、あるいは幾つかの実施形態では、シングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、又はコロナウイルス結合分子、及び追加の薬学的活性成分は、キット内に別々に存在してもよい。

【０２５８】

一態様では、医薬において使用するための本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、若しくはコロナウイルス結合分子、又は本発明の医薬組成物が提供される。本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、コロナウイルス結合分子、又は医薬組成物は、コロナウイルス、任意で中東呼吸器症候群（ＭＥＲＳ－ＣｏＶ）又は重症急性呼吸器症候群コロナウイルス１（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１）、好ましくはＣＯＶＩＤ－１９を治療するために使用することができる。本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、コロナウイルス結合分子、又は医薬組成物は、原型の武漢／ビクトリア株、Ｂ．１．１．７バリアント（ＵＫ又はケントバリアント／アルファ）、Ｂ．１．３５１バリアント（南アフリカバリアント／ベータ）、Ｐ．１バリアント（ブラジル／ガンマ）、Ｂ．１．６１７．２バリアント（インドバリアント／デルタ）、Ｂ．１．４２７／Ｂ．１．４２９バリアント（イプシロン）、Ｐ．２バリアント（ゼータ）、Ｂ．１．５２５バリアント（エータ）、Ｐ．３バリアント（シータ）、Ｂ．１．５２６バリアント（イオタ）、及びＢ．１．６１７．１バリアント（カッパ）を含むＣＯＶＩＤ－１９の特定の株を治療するために使用することができる。本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、コロナウイルス結合分子、又は医薬組成物は、コロナウイルス、特にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイクタンパク質とその標的であるアンジオテンシン変換酵素２受容体との相互作用をブロック又は調節するために使用することができる。一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、コロナウイルス結合分子、又は医薬組成物は、コロナウイルス、特にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイクタンパク質とその標的であるアンジオテンシン変換酵素２（ＡＣＥ２）受容体との結合をブロック、低減、又は阻害する。スパイクタンパク質とその標的との間の相互作用に干渉することにより、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、又は医薬組成物は、コロナウイルスを中和することができる及び／又はコロナウイルスの感染力を調節、低減、若しくは抑止することができる。本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、コロナウイルス結合分子、又は医薬組成物は、コロナウイルスの標的宿主細胞への融合を調節、ブロック、又は阻害することができる。本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、コロナウイルス結合分子、又は医薬組成物は、標的宿主細胞へのコロナウイルスの侵入を調節、ブロック、又は阻害することができる。

【０２５９】

本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、コロナウイルス結合分子、又は医薬組成物は、コロナウイルス感染症、特にＣＯＶＩＤ－１９を治療又は予防するために使用することができる。一実施形態では、コロナウイルス感染症、任意で中東呼吸器症候群（ＭＥＲＳ－ＣｏＶ）又は重症急性呼吸器症候群コロナウイルス１（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１）、好ましくはＣＯＶＩＤ－１９の治療又は予防において使用するた

めの本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、コロナウイルス結合分子、又は医薬組成物が提供される。一実施形態では、ＣＯＶＩＤ－１９の治療又は予防において使用するための、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、コロナウイルス結合分子、又は医薬組成物が提供される。

【０２６０】

一態様では、対象におけるコロナウイルスを治療する方法であって、治療活性量の本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、コロナウイルス結合分子、又は医薬組成物を対象に投与することを含む方法が提供される。一実施形態では、対象は、哺乳類、好ましくはヒトである。

【０２６１】

一態様では、コロナウイルスの治療及び／又は予防において使用するための医薬の製造における、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、コロナウイルス結合分子、又は医薬組成物の使用が提供される。一実施形態では、コロナウイルスの治療において使用するための医薬の製造における、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、コロナウイルス結合分子、又は医薬組成物の使用が提供される。

【０２６２】

一実施形態では、コロナウイルスは、ＭＥＲＳ－ＣｏＶ、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１、及びＣＯＶＩＤ－１９からなる群から選択される。一実施形態では、コロナウイルスは、ＣＯＶＩＤ－１９である。一実施形態では、コロナウイルスは、原型の武漢／ビクトリア株、Ｂ．１．１．７バリアント（ＵＫ又はケントバリアント／アルファ）、Ｂ．１．３５１バリアント（南アフリカバリアント／ベータ）、Ｐ．１バリアント（ブラジル／ガンマ）、Ｂ．１．６１７．２バリアント（インドバリアント／デルタ）、Ｂ．１．４２７／Ｂ．１．４２９バリアント（イプシロン）、Ｐ．２バリアント（ゼータ）、Ｂ．１．５２５バリアント（エータ）、Ｐ．３バリアント（シータ）、Ｂ．１．５２６バリアント（イオタ）、及びＢ．１．６１７．１バリアント（カッパ）から選択されるＣＯＶＩＤ－１９株である。本発明は、ＣＯＶＩＤ－１９の重度の症状を示す対象の治療、あるいはＣＯＶＩＤ－１９のより軽度の症状を示す対象の治療、あるいはＣＯＶＩＤ－１９についての検査は陽性であるが疾患は無症状である対象の治療に関し得る。幾つかの実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、コロナウイルス結合分子、又は医薬組成物は、コロナウイルス感染に伴うサイトカインストームを治療するのに有用である。

【０２６３】

一実施形態では、ＣＯＶＩＤ－１９（武漢／ビクトリア株）、Ｂ．１．１．７　ＣＯＶＩＤ＿１９バリアント（ＵＫ又はケントバリアント／アルファ）、及び／又はＢ．１．３５１　ＣＯＶＩＤ－１９バリアント（南アフリカバリアント／ベータ）の治療において使用するための、Ｃ１に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を有する３つの単一ドメインアミノ抗体を含む本発明の三価ポリペプチドが提供される。一実施形態では、ＣＯＶＩＤ－１９（武漢／ビクトリア株）、Ｂ．１．１．７　ＣＯＶＩＤ＿１９バリアント（ＵＫ又はケントバリアント／アルファ）、及び／又はＢ．１．３５１　ＣＯＶＩＤ－１９バリアント（南アフリカバリアント／ベータ）の治療において使用するための、Ａ８に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を有する３つの単一ドメインアミノ抗体を含む本発明の三価ポリペプチドが提供される。一実施形態では、ＣＯＶＩＤ－１９（武漢／ビクトリア株）及び／又はＢ．１．１．７　ＣＯＶＩＤ＿１９バリアント（ＵＫ又はケントバリアント／アルファ）の治療において使用するための、Ｈ３に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を有する３つの単一ドメインアミノ抗体を含む本発明の三価ポリペプチドが提供される。一実施形態では、ＣＯＶＩＤ－１９（武漢／ビクトリア株）及び／又はＢ．１．１．７　ＣＯＶＩＤ＿１９バリアント（ＵＫ又はケントバリアント／アルファ）の治療において使用するための、Ｃ５に基づくアミノ酸又はポリヌクレオチドの配列を有する３つの単一ドメインアミノ抗体を含む本発明の三価ポリペプチドが提供される。

【０２６４】
一実施形態では、ＭＥＲＳ－ＣｏＶ、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１、及びＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２等のコロナウイルスタンパク質を検出する方法が提供される。好ましい実施形態では、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質を検出する方法が提供される。一実施形態では、コロナウイルスＳタンパク質の存在を検出する方法が提供される。一実施形態では、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質の存在を検出する方法のための方法が提供される。
【０２６５】
一実施形態では、サンプル中のコロナウイルスタンパク質を検出する方法であって、（ａ）サンプルを本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、又はコロナウイルス結合分子と接触させる工程と、（ｂ）抗体－抗原複合体を検出する工程であって、該複合体の存在がコロナウイルスタンパク質の存在を示す工程とを含む方法が提供される。方法の工程（ａ）では、抗体－抗原複合体を形成するのに好適な条件下でサンプルをシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、又はコロナウイルス結合分子と接触させる。抗原は、コロナウイルスタンパク質である。一実施形態では、コロナウイルスＳタンパク質の存在を検出する方法が提供される。一実施形態では、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質、任意でＳタンパク質の受容体結合ドメインの存在を検出する方法のための方法が提供される。
【０２６６】
サンプルは、生物学的サンプル、任意で、血液、血清、鼻汁、喀痰、血漿、尿、又は髄液等の体液であってよい。一実施形態では、生物学的サンプルは、咽頭又は鼻腔のスワブを用いて得られた体液である。幾つかの実施形態では、生物学的サンプルは、組織サンプルである。サンプルは、哺乳類、好ましくはヒトから得ることができるか又は単離することができる。一実施形態では、サンプルは、コロナウイルスを有すると疑われる対象から得られるか又は単離される。
【０２６７】
対象由来のサンプルにおけるコロナウイルスタンパク質の存在の検出は、対象がコロナウイルスに感染していることの陽性指標を提供する。一実施形態では、検出方法の結果は、コロナウイルスに関連して対象を診断するために使用される。検出方法においてコロナウイルスのタンパク質が存在することは、コロナウイルスについての陽性診断を提供する。また、検出方法は、コロナウイルス感染症の感染に関連する転帰の予測を提供するために使用することもできる。
【０２６８】
一実施形態では、対象におけるコロナウイルスタンパク質を検出する方法であって、（ａ）対象に本発明のシングルドメイン抗体、多価ポリペプチド、融合タンパク質、又はコロナウイルス結合分子を投与する工程と、（ｂ）抗体－抗原複合体を検出する工程であって、該複合体の存在が該対象におけるコロナウイルスタンパク質の存在を示す工程とを含む方法が提供される。一実施形態では、対象におけるコロナウイルスタンパク質を検出する方法であって、（ａ）本発明のシングルドメイン抗体を対象に投与する工程と、（ｂ）該対象からサンプルを得、該サンプルを本発明のシングルドメイン抗体と接触させる工程と、（ｃ）抗体－抗原複合体を検出する工程であって、該複合体の存在が該対象におけるコロナウイルスタンパク質の存在を示す工程と、を含む方法が提供される。抗原は、コロナウイルスタンパク質である。一実施形態では、対象におけるコロナウイルスタンパク質を検出する方法であって、（ａ）対象からサンプルを得る工程と、（ｂ）該対象からのサンプルを本発明のシングルドメイン抗体と接触させる工程と、（ｃ）抗体－抗原複合体を検出する工程であって、該複合体の存在が、該対象におけるコロナウイルスタンパク質の存在を示す工程と、を含む方法が提供される。サンプルは、単離サンプル（すなわち、対象から以前に得られたもの）であってもよい。
【０２６９】
一態様では、対象におけるコロナウイルス感染を診断する方法であって、（ａ）本発明のシングルドメイン抗体を対象に投与する工程と、（ｂ）抗体－抗原複合体を検出する工

程であって、該複合体の存在が、該対象におけるコロナウイルスの陽性診断を提供する工程と、を含む方法が提供される。一実施形態では、対象におけるコロナウイルス感染を診断する方法であって、（ａ）本発明のシングルドメイン抗体を対象に投与する工程と、（ｂ）該対象からサンプルを得、該サンプルを本発明のシングルドメイン抗体と接触させる工程と、（ｃ）抗体－抗原複合体を検出する工程であって、該複合体の存在が、該対象におけるコロナウイルスの陽性診断を提供する工程と、を含む方法が提供される。一実施形態では、対象におけるコロナウイルス感染を診断する方法であって、（ａ）対象からサンプルを得る工程と、（ｂ）該対象からのサンプルを本発明のシングルドメイン抗体と接触させる工程と、（ｃ）抗体－抗原複合体を検出する工程であって、該複合体の存在が、該対象におけるコロナウイルスの陽性診断を提供する工程と、を含む方法が提供される。一実施形態では、対象におけるコロナウイルス感染を診断する方法であって、（ａ）サンプルを本発明のシングルドメイン抗体と接触させることと、（ｂ）抗体－ポリペプチド複合体の数を検出することと、（ｃ）該サンプル中のコロナウイルスの存在を検出することであって、該複合体の存在が、該対象におけるコロナウイルスの陽性診断を提供することと、を含む方法。サンプルは、単離サンプル（すなわち、対象から以前に得られたもの）であってもよい。

【０２７０】

一実施形態では、方法は、抗体－抗原複合体のレベルについて、サンプルの値を基準サンプルの値と比較する工程を含む。基準サンプルの値を上回る抗原－抗体複合体の値は、コロナウイルス感染の陽性指標を提供することができる。サンプルは、単離サンプル（すなわち、対象から以前に得られたもの）であってもよい。

【０２７１】

幾つかの実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体は、放射性標識マーカー、イメージングマーカー、ＭＲＩマーカー、蛍光マーカー、又は他の検出可能なマーカー等のマーカーを更に含んでいてもよい。そのような抗体を本明細書に記載の各検出方法又は診断方法において用いて、対象において抗体をリアルタイムで検出することができる。また、そのような抗体を本明細書に記載の各検出方法又は診断方法において用いて、対象から単離又は入手された組織又は血液のサンプル等のサンプル中の抗体を検出することができる。

【０２７２】

一実施形態では、コロナウイルスを検出するためのアッセイであって、（ａ）患者から得られたサンプルを本発明のシングルドメイン抗体と接触させることを含み、該シングルドメイン抗体が、患者サンプル中のコロナウイルスを選択的に単離するために検出可能な標識又はレポーター分子を含むアッセイが提供される。一実施形態では、コロナウイルスを検出するためのアッセイであって、（ａ）患者から得られたサンプルを本発明のシングルドメイン抗体及びバイオセンサ、任意で蛍光又はヒンジ式のバイオセンサを含む融合タンパク質と接触させることを含むアッセイが提供される。アッセイは、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、免疫蛍光アッセイ、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、又は蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）であってよい。検出可能な標識又はレポーター分子は、蛍光分子又は化学分子（例えば、フルオレセインイソチオシアネート又はローダミン）、バイオセンサ、ラジオアイソトープ、又は酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、セイヨウワサビパーオキシダーゼ、又はルシフェラーゼ）であってよい。

【０２７３】

一実施形態では、（ａ）検出可能なマーカーと、（ｂ）本発明のシングルドメイン抗体と、を含むキットが提供される。検出可能な標識又はレポーター分子は、蛍光分子又は化学分子（例えば、フルオレセインイソチオシアネート又はローダミン）、バイオセンサ、任意で蛍光又はヒンジ式のバイオセンサ、又はラジオアイソトープ、又は酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、セイヨウワサビパーオキシダーゼ、又はルシフェラーゼ）であってよい。

【０２７４】
本明細書に記載の方法は、インビトロ又はエクスビボであってよい。本明細書に記載の方法は、インビボで実施してもよい。
【０２７５】
以下の非限定的な実施例を参照して本発明を説明する。以下の実施例で使用したＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２株は、特に指定がある場合を除いて、原型の武漢／ビクトリアバリアント（「ＷＴ」）である。
【実施例】
【０２７６】
実施例１
ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイク（Ｓ）タンパク質に特異的にタンパク質を結合させるシングルドメイン抗体（又はナノボディ）のアミノ酸配列について説明する。発現したタンパク質は、ウイルスの受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）にピコモル単位の高い親和性で結合する。
【０２７７】
精製ＲＢＤ単独とヒトＩｇＧ１に融合した精製ＲＢＤとの組み合わせで一次免疫を行い、続いて、ＲＢＤと混合した精製Ｓタンパク質で一回追加免疫することによって、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の受容体結合ドメインに対する抗体をラマで産生させた。末梢血単核細胞のｃＤＮＡからファージディスプレイＶＨＨライブラリを構築し、２ラウンドのバイオパニングによってＲＢＤバインダーを選択した。ＲＢＤに対して最も親和性の高いファージクローンを阻害ＥＬＩＳＡによって同定し、シーケンシングによって固有の相補性決定領域３（ＣＤＲ３）に分類した。既に、一連の抗ＲＢＤ　ＶＨＨが非免疫ラマＶＨＨライブラリから単離されており、その中で最も強力なバインダーはＨ１１－Ｈ４と命名され、ＫＤは５ｎＭであった（Ｈｕｏ，Ｌｅ　Ｂａｓ　ｅｔ　ａｌ．２０２０）。ＥＬＩＳＡフォーマットでＲＢＤへの結合についてＨ１１－Ｈ４－Ｆｃと競合させることを用いて、免疫ライブラリからＨ１１－Ｈ４と同じエピトープに結合するが親和性のより高い新規バインダーだけでなく、異なるエピトープを認識するものも同定した。これらの分析から、生産及び更なる特性評価のために５つのＶＨＨを選択した：
（１）Ｂ１２－配列番号１６
（２）Ｆ２－配列番号１７
（３）Ｃ１－配列番号１８
（４）Ｃ５－配列番号１９
（５）Ｈ３－配列番号２０
【０２７８】
免疫及びＶＨＨライブラリの構築
Ｈｕｏ　ｅｔ　ａｌ　２０２０に記載の通り、原型（武漢／ビクトリア）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２受容体結合ドメイン（アミノ酸３３０～５３２）、ｈＩｇＧ１　Ｆｃ（ＲＢＤ－Ｆｃ）に融合したＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２受容体結合ドメイン、及び三量体スパイクタンパク質（アミノ酸１～１２０８）を生産した。０日目に組み換えＲＢＤ２００μｇ及びＲＢＤ－Ｆｃ２００μｇで、次いで、２８日目にＲＢＤ２００μｇ及びＳタンパク質２００μｇで筋肉内免疫することによって、ラマで抗体を産生させた。使用したアジュバントは、Ｇｅｒｂｕ　ＬＱ＃３０００であった。３８日目に血液（１５０ｍＬ）を回収した。免疫及びラマの取り扱いについては、プロジェクトライセンスＰＡ１ＦＢ１６３Ａの権限の下で行った。製造業者のプロトコルに従ってＦｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ　ＰＬＵＳを用いて末梢血単核細胞を調製し；ＴＲＩｚｏｌ（商標）を用いて全ＲＮＡを抽出し；ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＶ逆転写酵素を用い、逆転写プライマーを用いて、逆転写及びＰＣＲを実施した：
ＣＡＬＬ＿ＧＳＰ（５’－ＣＣＴＧＣＧＧＣＴＣＣＣＧＧＧＴＣＴＧＣＣＣＴＴＴＧＧＣＣ－３’）
【０２７９】

ＶＨＨをコードしている配列のプールを、表１に示すプライマーを用いてＰＣＲによって増幅させた。

【０２８０】

プライマー	配列
ラウンド１	
CALL_001	5’- GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG -3’
CALL_002	5’- GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC -3’
ラウンド２	
VHH_For	5’- GTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCGATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG -3’
VHH_Rev_IgG2	5’- GGTGATGGTGTTGGCCTCCCGGGCCGGCCGCTGGTTGTGGTTTTGGTGTCTT -3’
VHH_Rev_IgG3	5’- GGTGATGGTGTTGGCCTCCCGGGCCGGCCGCGGAGCTGGGGTCTTCGCTGTG -3’

表１：ＶＨＨをコードしている配列のＰＣＲ増幅に使用したプライマー

【０２８１】

アガロースゲル電気泳動によって精製した後、ＶＨＨ　ｃＤＮＡをファージミドベクターｐＡＤＬ－２３ｃのＳｆｉＩ部位にクローニングした。このベクターでは、ＶＨＨをコードしている配列の前にｐｅｌＢリーダー配列があり、その後にリンカー、Ｈｉｓ６、及びｃＭｙｃタグ（ＧＰＧＧＱＨＨＨＨＨＨＧＡＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬＳ）が続く。エレクトロコンピテント大腸菌ＴＧ１細胞を組換えｐＡＤ－２３ｃベクターで形質転換した結果、約４×１０^{9}個の独立した形質転換体のＶＨＨライブラリが得られた。次いで、得られたＴＧ１ライブラリストックをＭ１３Ｋ０７ヘルパーファージに感染させ、ＶＨＨを提示するファージのライブラリを得た。

【０２８２】

ＶＨＨの単離

Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（商標）Ｍ－２８０（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で捕捉することを通して、それぞれ５０ｎＭ及び２ｎＭのビオチン化ＲＢＤで２ラウンドのバイオパニングを行った後、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のＲＢＤに特異的なＶＨＨをディスプレイするファージを濃縮した。１０倍段階希釈で細胞培養物をプレーティングすることによって、各ラウンドのパンニング後の濃縮度を求めた。２回目のラウンドのパニング後、９３個の個々のファージミドクローンをピックアップし、Ｍ１３Ｋ０７ヘルパーファージに感染させることによって、ＶＨＨをディスプレイしているファージを回収し、競合及び阻害ＥＬＩＳＡの組み合わせによってＲＢＤへの結合について試験した。これらアッセイでは、ＲＢＤを９６ウェルプレートに固定化し、過剰の可溶性ＲＢＤ（阻害ＥＬＩＳＡ）又はＲＢＤに結合しているＨ１１－Ｈ４－Ｆｃ（Ｈｕｏ，Ｌｅ　Ｂａｓ　ｅｔ　ａｌ．２０２０）（競合ＥＬＩＳＡ）の存在下でファージクローンの結合を測定した。ファージバインダーを阻害アッセイに従って採点し、次いで、Ｈ１１－Ｈ４と競合するもの（すなわち、同じエピトープを共有する）又は競合しないもの（すなわち、ＲＢＤにおける異なるエピトープに結合する）に分類した。クローンをシーケンシングし、ＣＤＲ３配列の同一性に従ってグループ分けした。

【０２８３】

タンパク質の生産

注入反応を通して、ＯｍｐＡリーダー配列及びＣ末端Ｈｉｓ６タグを含有する、ＫｐｎＩ及びＰｍｅＩで消化されたベクターｐＯＰＩＮＯ（Ｂｉｒｄ，Ｒａｄａ　ｅｔ　ａｌ．２０１４）に、一価のＶＨＨをクローニングした。得られたベクターをＷＫ６大腸菌株に形質転換し、１ｍＭ　ＩＰＴＧによってタンパク質発現を誘導し、２０℃で一晩成長させた。浸透圧ショックによって周辺質抽出物を調製し、リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）ｐＨ７．４バッファを用い、ＡＫＴＡｘｐｒｅｓｓ（Ａはウムラウト付き）に続いてＨｉｌｏａｄ　１６／６０　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　７５又はＳｕｐｅｒｄｅｘ　７５　１０／３００Ｇ

Ｌカラムにおいて実施した自動化プロトコルを用いて、固定化金属親和性によってＶＨＨタンパク質を精製した。

【０２８４】

ＶＨＨをＩｇＧ　Ｆｃ、例えば二量体化して二価の（Ｃ５－Ｆｃ）$_2$となるＣ５－Ｆｃ（配列番号１７０）に融合させることによって、二価ポリペプチドも生産した。これら二価のＦｃ融合体を生産するために、ＶＨＨをベクターＡｂＶｅｃ－ｈＩｇＧ１にクローニングし、ＡｇｅＩ及びＳａｌＩで消化した。ＡｂＶｅｃ－ｈＩｇＧ１は、マウス重鎖リーダー配列及びヒトＩｇＧ１　Ｆｃを含有する。例えば、Ｓ２８８Ｐ等の安定化及び／又はヒト化改変並びに例えばＡｔｙｅｏ　ｅｔ　ａｌ．２０２０、Ｓｕｚｕｋｉ　ｅｔ　ａｌ．２０１８、及びＤｕｍｅｔ　ｅｔ　ａｌ　２０１９に教示されている改変を有する又は有しないＩｇＧ４を含む他のＦｃｓも同様に好適である。ｅｘｐｉ２９３細胞で一過的に発現させた後、プロテインＡセファロースにおけるアフィニティークロマトグラフィーによってＦｃ融合タンパク質を精製した（Ｈｕｏ，Ｌｅ　Ｂａｓ　ｅｔ　ａｌ．２０２０）。

【０２８５】

結合活性

選択された５つのシングルドメイン抗体のＲＢＤ結合反応速度を表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）によって測定したところ、計算されたK_D値は、親和性がピコモル範囲であることを示した（表２）。

【０２８６】

ナノボディVHH	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	K_D(pM)	$T_{1/2}$(分)
B12	3.6E+06	2.7E-04	77	42
C1	9.3E+05	5.7E-04	615	20
C5	9.8E+06	9.8E-04	99	12
F2	4.7E+06	1.9E-04	40	61
H3	1.3E+07	3.3E-04	25	35

表２：大腸菌で生産された単離ＶＨＨのＳＰＲ　ＲＢＤ結合反応速度（Ｃ１、Ｈ３、Ｆ２、及びＣ５のアナライトを複数回注入した反復アッセイからのデータ）

【０２８７】

ＶＨＨがＲＢＤのＡＣＥ２への結合、並びにヒトモノクローナル抗体ＣＲ３０２２（Ｊａｎ　ｔｅｒ　Ｍｅｕｌｅｎ　Ｅｄｗａｒｄ　Ｎ．ｖａｎ　ｄｅｎ　Ｂｒｉｎｋ　Ｌｅｏ　Ｌ．Ｍ．Ｐｏｏｎ　２００６）及び又はＨ１１－Ｈ４（Ｈｕｏ，Ｌｅ　Ｂａｓ　ｅｔ　ａｌ．２０２０）によって認識されるエピトープとの重複をブロックするかどうかについて調べるために、ＳＰＲによって競合結合実験を実施した。結果は、Ｃ１及びＣ５はＡＣＥ－２の結合を完全にブロックしたが、Ｆ２は部分的にしか阻害せず、Ｂ１２は結合をブロックすることができなかったことを示した（表３）。これは、Ｆ２及びＢ１２の両方が、ＲＢＤのＡＣＥ－２結合部位とは反対側の領域に結合するＣＲ３０２２と競合するという所見と一致している（Ｈｕｏ，Ｚｈａｏ　ｅｔ　ａｌ．２０２０）。表３にまとめた結果は、Ｃ５及びＣ１がＡＣＥ２の結合を完全にブロックできたことを示した。ＲＢＤへの結合についてＣ５はＨ１１－Ｈ４と競合したがＣ１は競合せず、一方、ＲＢＤへの結合については、Ｃ１はＣＲ３０２２と競合したがＣ５は競合しなかった。これは、ＣＲ３０２２及びＨ１１－Ｈ４がＡＣＥ２結合領域の反対側の部位に結合するという所見と一致している。対照的に、Ｂ１２及びＦ２はいずれもＣＲ３０２２と競合したが、それぞれＡＣＥ２結合とは競合しなかったか又は部分的にしか競合しなかった。

【０２８８】

	ACE2-Fc	H11-H4-Fc	CR3022-Fc
B12	非競合	非競合	競合
C1	競合	非競合	競合
C5	競合	競合	非競合
F2	非競合	非競合	競合
H3	競合	競合	非競合

表３：単離ＶＨＨの特性評価されたＲＢＤ抗体との相互作用の性質のまとめ

【０２８９】

Ｃ５及びＨ３は、Ｈ１１－Ｈ４、ヒトモノクローナル抗体、及びスパイクタンパク質とＡＣＥ２受容体との間の相互作用に直接競合することによってＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を中和する他のナノボディと同様のエピトープを標的とすると予測される（クラスタ２抗体（Ｋｕａｎ－Ｙｉｎｇ ｅｔ ａｌ ２０２１））。Ｃ１及びＦ２は、ＡＣＥ２受容体結合界面とは異なる領域に結合するＣＲ３０２２２１及びＥＹ－６Ａ２４を含む抗体群（クラスタ１抗体（Ｋｕａｎ－Ｙｉｎｇ ｅｔ ａｌ ２０２１））に属する。これら２つの抗体は、三量体スパイクタンパク質を不安定化させ、この機序によって受容体の会合を阻止し（Ｈｕｏ，Ｊ ｅｔ ａｌ ２０２０；Ｚｈｏｕ，Ｄ ｅｔ ａｌ ２０２０）、それによってウイルスを中和することが報告されている。

【０２９０】

Ｂｉａｃｏｒｅ Ｔ２００（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて、表面プラズモン共鳴実験を行った。全てのアッセイをＳｅｎｓｏｒ Ｃｈｉｐ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して実施し、ランニングバッファは、２５℃で０．００５％ｖ／ｖ Ｓｕｒｆａｃｔａｎｔ Ｐ２０（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を補充したＰＢＳ ｐＨ７．４であった。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のＲＢＤと単離ＶＨＨとの間の結合反応速度を求めるために、ＲＢＤ－Ｆｃをセンサチップに固定化した。レシプロアッセイでは、抗体のＦｃ融合体を固定化し、センサチップ上にＲＢＤを注入した。Ｂｉａｃｏｒｅ Ｔ２００ Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ Ｓｏｆｔｗａｒｅ ３．１を用いて、全てのデータを１：１結合モデルに当てはめた。競合アッセイでは、約１，０００ＲＵのＣＲ３０２２－Ｆｃ、ＡＣＥ２－Ｆｃ、又はＨ１１－Ｈ４－Ｆｃをリガンドとして固定化し、ＲＢＤと共にインキュベートした単離ＶＨＨをアナライトとして使用した。競合アッセイは、Ｓｅｎｓｏｒ Ｃｈｉｐ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａ（Ｃｙｔｉｖａ）を用いて行った。

【０２９１】

中和活性

マイクロタイター中和アッセイ（ＭＮ）（Ａｍａｎａｔ，Ｗｈｉｔｅ ｅｔ ａｌ．２０２０）で、Ｃ１及びＣ５のウイルス中和活性を試験した。ＶＨＨ－Ｆｃ融合体を、９６ウェルプレートにおいて１％（ｗ／ｖ）ウシ胎児血清（ＦＢＳ）を含有するダルベッコ変法イーグル培地（ＤＭＥＭ）で連続希釈した。ＤＭＥＭ－ＦＢＳで１：５希釈した、４回継代したＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ビクトリア株（ｖｅｒｏ ７６）［9×10^{4}ｐｆｕ／ｍＬ］を各ウェルに添加し、培地のみをネガティブコントロールとした。３７℃で３０分間インキュベートした後、Ｖｅｒｏ細胞（１００μＬ）を各ウェルに添加し、プレートを３７℃で２時間インキュベートした。次いで、カルボキシメチルセルロース（１００μＬ、１．５％ｖ／ｖ）を各ウェルに添加し、プレートを３７℃で更に１８～２０時間インキュベートした。細胞を室温で３０分間パラホルムアルデヒド（１００μＬ／ウェル ４％ｖ／ｖ）で固定し、次いで、ヒトモノクローナル抗体（ＥＹ２Ａ）を用いてＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２核タンパク質を染色した。ヤギ抗ヒトＩｇＧ ＨＲＰコンジュゲートと共にインキュベートし、基質を添加した後、ＥＬＩＳＰＯＴリーダーで画像化することによって、結合した抗体を検出した。中和力価は、対照ウェルと比較して、フォーカス形成単位（ＦＦＵ）を５０％低下させるＶＨＨ－Ｆｃの力価と定義された。

【０２９２】
Ｃ１－Ｆｃ及びＣ５－Ｆｃのウイルス中和活性は、細胞のウイルス感染の１００％阻害を示し（図８Ａ）、ＮＴ５０はそれぞれ４０２ｐＭ及び２６．５ｐＭであった（ｎ＝２実験の平均）。一価のＶＨＨ　Ｃ５は、３２ｎＭのＩＣ５０でＳＡＲＳ－ＣｏＶ２を中和する（図８Ｂ）。
【０２９３】
Ｘ線結晶構造解析及び構造解析
Ｃ５－ＲＢＤ複合体（図１Ａ）及びＦ２－ＲＢＤ複合体（図１Ｂ）の結晶構造をＸ線結晶構造解析によって解明した。精製したＶＨＨ＿Ｃ５又はＶＨＨ＿Ｃ１を脱グリコシル化ＲＢＤと１：１のモル比で混合し、Ｈｕｏ　ｅｔ　ａｌ．２０２０に記載されている通りサイズ排除クロマトグラフィーによって複合体を精製した。
【０２９４】
結晶をシッティングドロップ蒸気拡散法によって２０℃で成長させ、ダイヤモンド光源で回折データを収集及び処理した。標準的な方法及び検索モデルとしてＰＤＢ　ｉｄ　６ＹＺ５を使用して、分子置換によって構造を解明し、高解像度まで精密化した。
【０２９５】
Ｃ５－ＲＢＤ構造（図１Ａ）は、Ｃ５によって認識されるエピトープがＡＣＥ２のＲＢＤ結合部位（図３Ａ）と非常に大きく重複していることを示した。従って、Ｃ５がＡＣＥ２の結合を阻止し、強力に中和する理由は明らかである。Ｃ５エピトープは、Ｈ１１クラスのナノボディエピトープ（例えば、Ｈ１１－Ｈ４）と部分的に重複しており、このことから、Ｃ５がＲＢＤへの結合についてＨ１１－Ｈ４と競合する理由が説明できる。文献では、ＲＢＤの異なる領域に位置する別のエピトープ（ＣＲ３０２２エピトープ）が同定されている（図３Ｂ）。ＲＢＤに結合したＦ２及び別個にＣ１の構造は、Ｆ２及びＣ１の両方がこのＣＲ３０２２エピトープと重複していていることを示す。
【０２９６】
クライオ電子顕微鏡によるタンパク質の精製及びデータ収集
一粒子電子顕微鏡（「ＥＭ」）によってスパイク－Ｃ５三量体の構造を決定した（図２）。１０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ、ｐＨ８、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ中の精製スパイクタンパク質を、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、ｐＨ７、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ中の精製Ｃ５と共にモル比１：３．６（スパイク三量体：ナノボディ）で１６℃においてインキュベートした。Ｈｕｏ　ｅｔ　ａｌ（２０２０）Ｎａｔ　Ｓｔｒｕｃｔ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ．の方法論に従って、構造決定及び精密化を実施した。
【０２９７】
これは、Ｃ５ナノボディがスパイク三量体の「３　ｄｏｗｎ」（不活性）型に結合していることを示し（図２）、ナノボディがスパイクタンパク質をこの高次構造のスパイクタンパク質にすることを示唆している。Ｃ５は（Ｈ１１－Ｈ４とは異なり）、立体的な衝突に起因して「１　ｕｐ　２　ｄｏｗｎ」活性型に結合することはできない。Ｃ１又はＦ２を三量体スパイクタンパク質と共にインキュベートすると、ＥＭグリッド上で不定形の凝集体が形成され、これは、該凝集体が三量体を不安定化し、ＡＣＥ２の会合を妨げることを示す。
【０２９８】
受容体結合ドメインバリアントの構築
プライマー対（１）ＴＴＧｎｅｏ＿ＲＢＤ＿Ｆ及びＮ５０１Ｙ＿Ｒ並びに（２）ＴＴＧｎｅｏ＿ＲＢＤ＿Ｒ及びＮ５０１Ｙ＿Ｆで２つの断片を増幅させ、次いで、プライマーＴＴＧｎｅｏ＿ＲＢＤ＿Ｆ及びＴＴＧｎｅｏ＿ＲＢＤ＿Ｒを用いてＰＣＲによって互いに接合させることによって、ＲＢＤ－ＷＴをテンプレートとして用いて、アルファＲＢＤバリアントを作製した（表４参照）。次いで、Ｉｎｆｕｓｉｏｎ（登録商標）クローニングによってアルファＲＢＤ遺伝子産物をｐＯＰＩＮＴＴＧｎｅｏベクターにクローニングした。（１）ＴＴＧｎｅｏ＿ＲＢＤ＿Ｆ及びＥ４８４Ｋ＿Ｒ並びに（２）ＴＴＧｎｅｏ＿ＲＢＤ＿Ｒ及びＥ４８４Ｋ＿Ｆのプライマーで２つの断片を増幅させ、次いで、ＰＣＲプライ

マーＴＴＧｎｅｏ＿ＲＢＤ＿Ｆ及びＴＴＧｎｅｏ＿ＲＢＤ＿ＲのＰＣＲによって該２つの断片を互いに接合させることによって、アルファＲＢＤをテンプレートとして用いてベータＲＢＤを作製した。次いで、Ｉｎｆｕｓｉｏｎ（登録商標）クローニングによって遺伝子産物をｐＯＰＩＮＴＴＧｎｅｏベクターにクローニングして中間ベクターを作製し、次いで、これをテンプレートとして用いて、（１）ＴＴＧｎｅｏ＿ＲＢＤ＿Ｆ及びＫ４１７Ｖ＿Ｒ並びに（２）ＴＴＧｎｅｏ＿ＲＢＤ＿Ｒ及びＫ４１７Ｖ＿Ｆのプライマー対で２つの断片を増幅させ、次いで、プライマーＴＴＧｎｅｏ＿ＲＢＤ＿Ｆ及びＴＴＧｎｅｏ＿ＲＢＤ＿Ｒを用いたＰＣＲ反応で該２つの断片を互いに接合させた。次いで、Ｉｎｆｕｓｉｏｎ（登録商標）クローニングにより最終ベータＲＢＤ遺伝子産物をｐＯＰＩＮＴＴＧｎｅｏベクターにクローニングした。ＲＢＤのｈｕＩｇＧ１　Ｆｃ融合バージョンを作製するために、ｐＯＰＩＮＴＴＧｎｅｏベクターのＲＢＤ遺伝子をプライマー対ＴＴＧｎｅｏ＿ＲＢＤ＿Ｆ及びＲＢＤ＿Ｆｃ＿Ｒで増幅させ、続いて、Ｉｎｆｕｓｉｏｎ（登録商標）クローニングによってｐＯＰＩＮＴＴＧｎｅｏ－Ｆｃベクターにクローニングした。ｐＯＰＩＮＴＴＧｎｅｏ－Ｆｃは、ｍｕ－ホスファターゼリーダー配列、ｈｕＩｇＧ１　Ｆｃ、及びＣ末端Ｈｉｓ６タグ４４を含む。デルタＲＢＤを、完全長デルタスパイクＤＮＡを含むプラスミドからＰＣＲによって増幅させ、Ｉｎｆｕｓｉｏｎ（登録商標）クローニングによってｐＯＰＩＮＴＴＧｎｅｏにクローニングした。

【０２９９】

TTGneo_RBD_F	gcgtagctgaaaccggcccgaatatcacaaatctttgt
TTGneo_RBD_R	GTGATGGTGATGTTTATTTGTACTTTTTTTCGGTCCGCACAC
N501Y_F	Cagtcatacggatttcaaccaacttacggggttggctatcagccgtaccgc
N501Y_R	gcggtacggctgatagccaaccccgtaagttggttgaaatccgtatgactG
K417V_F	CAGATCGCGCCGGGCCAAACGGGCGTGATAGCTGACTATAATTATAAG
K417V_R	CTTATAATTATAGTCAGCTATCACGCCCGTTTGGCCCGGCGCGATCTG
E484K_F	ggttcaaccccctgcaatggcgtcAAGGGTTTTAACTGTTACTTCCCAC
E484K_R	GTGGGAAGTAACAGTTAAAACCCTTgacgccattgcaggggttgaacc
RBD_Fc_R	5’-CAGAACTTCCAGTTTATTTGTACTTTTTTTCGGTCCGC-3’

表４．ＲＢＤバリアントを構築するためのプライマー

【０３００】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＲＢＤバリアントへの結合

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントのＲＢＤに対するＶＨＨ（Ｃ１、Ｃ５、Ｈ３、及びＦ２）の結合をＳＰＲによって測定した。構造解析から予想される通り、ＷＴ　ＲＢＤ複合体においてＣ５及びＨ３と重要な塩橋相互作用を形成する残基４８４のＧｌｕからＬｙｓへの変異のチャージに起因して、Ｃ５もＨ３も最初に南アフリカで同定されたベータバリアント（系統Ｂ．１．３５１）には結合しなかった。Ｃ５との相互作用に関与するアルファＲＢＤにおけるＮ５０１Ｙの変異に恐らく起因して、Ｃ５のアルファバリアントへの結合はＲＢＤ－ＷＴと比較して著しく減少した。Ｎ５０１と相互作用するＨ３の結合は、わずかに減少しただけであった。対照的に、ＲＢＤの異なる領域を認識するＣ１及びＦ２の結合は、Ｎ５０１Ｙ変異にもＥ４８４Ｋ変異にも影響を受けなかった。

【０３０１】

アナライト	リガンド	K_a(1/Ms)	K_d(1/s)	K_D(pM)	$T_{1/2}$(分)
C1	Bio-RBD-WT	9.3E+05	5.7E-04	615	20
C1	Bio-RBD-アルファ	7.5E+05	5.4E-04	725	21
C1	Bio-RBD-ベータ	9.2E+05	6.0E-04	648	19
C1	Bio-RBD-デルタ	5.8E+05	6.2E-04	1065	19
C5	Bio-RBD-WT	9.8E+06	9.8E-04	99	12
C5	Bio-RBD-アルファ	6.8E+06	1.7E-02	2523	1
C5	Bio-RBD-デルタ	2.7E+06	4.2E-03	1600	3
H3	Bio-RBD-WT	1.3E+07	3.3E-04	25	35
H3	Bio-RBD-アルファ	1.2E+07	1.2E-03	102	10
H3	Bio-RBD-デルタ	1.6E+06	1.9E-03	1200	6
F2	Bio-RBD-WT	4.7E+06	1.9E-04	40	61
F2	Bio-RBD-アルファ	4.8E+06	2.3E-04	47	51
F2	Bio-RBD-ベータ	5.9E+06	2.2E-04	38	52
F2	Bio-RBD-デルタ	3.9E+06	1.9E-04	49	61

表５：ＳＰＲによって決定したＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントのＲＢＤＳへの結合親和性

【０３０２】

実施例２

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアント、特に南アフリカで最初に検出されたベータ株（系統Ｂ．１．３５１）に対する新規ＶＨＨバインダーを得るために、２つの戦略を用いた。第１のアプローチでは、原型（武漢／ビクトリア）のスパイクタンパク質（０日目に組換えＲＢＤ２００μｇ及びＲＢＤ－Ｆｃ２００μｇ、２８日目にＲＢＤ２００μｇ及びＳタンパク質２００μｇ、５６日目にＲＢＤ２００μｇ及びＳタンパク質２００μｇ、６５日目に血液（１５０ｍＬ）を回収）で免疫したラマから作製した実施例１のライブラリを、変異Ｅ４８４Ｋ及びＮ５０１Ｙを含むベータ株のＲＢＤで再スクリーニングした。ライブラリのＲＢＤ－ＡＣＥ－２界面（Ｃ５エピトープ）におけるバインダーを濃縮させるために、予め単離され、この界面から遠位のエピトープに結合するＣ１ナノボディと共にプレインキュベートした。しかし、このアプローチでは、Ｃ５エピトープに対するいかなるバインダーも同定されなかった。予想に反して、それぞれ３０ｐＭ及び９３６ｐＭのＫＤで新規エピトープ（複数可）に結合した２つの新規ナノボディＮｂＳＡ＿Ａ１０及びＮｂＳＡ＿Ｄ１０が単離された（図１２ａ及びｂ）。これらナノボディは、ＡＣＥ２の結合もＣＲ３０２２の結合もブロックしなかった（図１２ｃ及びｄ）。実施例１に示した方法論に従って、ＮｂＳＡ＿Ａ１０及びＮｂＳＡ＿Ｄ１０を単離及び生産した。

【０３０３】

ライブラリをＮｂＳＡ＿Ａ１０と共にプレインキュベートして、同じ又は類似のエピトープに結合するＶＨＨバインダーを除去し、次いで、ＳＡ　ＲＢＤで再スクリーニングを行った。この反復スクリーニングから多数の新規ナノボディが単離され、ＳＰＲによってその結合反応速度を測定した（表６）。これらのうち、Ａ８がＲＢＤに対して最も高い結合親和性を有し（ＫＤは３５ｐＭ）（図１３ａ）、ＳＡ　ＲＢＤへの結合についてＡＣＥ－２及びＣＲ３０２２と競合することが示された（図１３ｂ）。

【０３０４】

アナライト	リガンド	K_a(1/Ms)	K_d(1/s)	K_D(pM)	$T_{1/2}$(分)
A8	ベータRBD-Fc	5.00E+06	1.80E-04	35	65
3_C5	ベータRBD-Fc	9.00E+05	8.00E-04	895	14
8_G11	ベータRBD-Fc	1.30E+06	5.70E-04	443	20
12_F11	ベータRBD-Fc	4.10E+06	9.60E-04	236	12
C1	β-RBD-ビオチン	9.20E+05	6.00E-04	648	19

表６：ナノボディアナライトのＳＰＲ　ＲＢＤ結合反応速度

【０３０５】

ＲＢＤとの複合体におけるＡ８の構造をＸ線結晶構造解析によって決定し、ＲＢＤのＣＲ３０２２と同じ領域に結合することが確認された（図２１）。

【０３０６】

ベータ型ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対する潜在的な新規ＶＨＨバインダーを単離するための第２のアプローチでは、実施例１に記載の通り、ベータＲＢＤ及びベータバリアントの完全長スパイクタンパク質との組み合わせでラマを免疫した。免疫したラマのＰＢＭＣから構築したＶＨＨライブラリをベーター－ＲＢＤでスクリーニングしたところ、ベーター－ＲＢＤだけでなく、カッパ及び原型ビクトリア／武漢の配列にもナノモル以下の結合を示したＶＨＨバインダー（配列番号２３８／２３９）ＶＨＨ＿Ｈ６（表１７）が得られた。興味深いことに、ＶＨＨ＿Ｈ６の二価Ｆｃ融合バージョンではＲＢＤ－ベータに対する結合親和性は１０倍の増加を示したが、ＲＢＤ－ビクトリア又はＲＢＤ－デルタに対する結合では差がなかった。

【０３０７】

ＶＨＨ＿Ｈ６はＡＣＥ－２の結合と競合したが、その結合部位がＡＣＥ－２相互作用表面にあるか又は近接しているＣＲ３０２２とは競合しなかった（図１９）ので、中和アッセイで細胞のウイルス感染をブロックする可能性が高い。Ｘ線結晶構造解析によってＶＨＨ＿Ｈ６－ＲＢＤ複合体の構造を決定し、Ｃ５及びＨ３とは異なるＲＢＤの表面における新規の抗体エピトープを同定することにより、Ｈ６によって認識されるエピトープをマッピングした（図２０）。特に注目すべきは、一部のヒトモノクローナル抗体による結合を妨げる（Ｚｈｏｕ　ｅｔ　ａｌ　２０２１）ベータ（Ｅ４８４Ｋ）、ガンマ（Ｅ４８４Ｋ）、及びカッパ（Ｅ４８４Ｑ）のバリアントで変異しているＲＢＤの残基４８４が、結合部位に関与していないことである。

【０３０８】

アナライト	リガンド	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(pM)	T1/2(分)
VHH_H6	RBD-カッパ-Fc	6.2E+05	4.1E-04	666	28
VHH_H6	RBD-ベータ-Fc	7.8E+05	4.4E-04	564	26
VHH_H6	RBD-ビクトリア-Fc	7.9E+05	3.7E-04	472	31
RBD-デルタ	VHH_H6-Fc	1.2E+05	7.0E-04	592	28
RBD-ベータ	VHH_H6-Fc	3.9E+06	1.2E-04	30	99
RBD-ビクトリア	VHH_H6-Fc	1.6E+06	4.2E-04	261	28

表１７：ＳＰＲによって求めた結合反応速度

【０３０９】

実施例３

２つ以上の同じＶＨＨを互いに接合させると、単一特異性二価ポリペプチドが形成され、これは、アビディティの効果に起因して一価ＶＨＨよりも高い親和性で結合すると予測される。これを検証するために、ＶＨＨ　Ｃ５の３つの二価バージョンを単一ポリペプチドとして設計し、ＰＣＲによって構築した。

（１）Ｃ５－ＡＡＡ－Ｃ５－配列番号１７１又は１８２の残基２２～２６６

（２）Ｃ５－ＧＧＧＧＳＧＧＧＳ－Ｃ５－配列番号１７２又は１８４の残基２２～２７２

（３）Ｃ５－ＧＳＧＳ－ＳＵＭＯ－ＧＳＧＳ－Ｃ５－配列番号１７３又は１８６の残基２２～３６９

【０３１０】

タンパク質の生産

注入反応を通して、ＯｍｐＡリーダー配列及びＣ末端Ｈｉｓ６タグを含有する、ＫｐｎＩ及びＰｍｅＩで消化されたベクターｐＯＰＩＮＯ（Ｂｉｒｄ，Ｒａｄａ　ｅｔ　ａｌ．２０１４）に、二価ポリペプチドをクローニングした。得られたベクターをＷＫ６大腸菌

株に形質転換し、１ｍＭ　ＩＰＴＧによってタンパク質発現を誘導し、２０℃で一晩成長させた。浸透圧ショックによって周辺質抽出物を調製し、リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）ｐＨ７．４バッファを用い、ＡＫＴＡｘｐｒｅｓｓ（Ａはウムラウト付き）に続いてＨｉｌｏａｄ　１６／６０　ｓｕｐｅｒｄｅｘ　７５又はＳｕｐｅｒｄｅｘ　７５　１０／３００ＧＬカラムにおいて実施した自動化プロトコルを用いて、固定化金属親和性によってＶＨＨタンパク質を精製した。

【０３１１】

結合活性

実施例１で提供した方法論に従って、ＳＰＲによって結合活性を測定した。全ての曲線を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　８を使用してプロットした。Ｃ５ポリペプチドの三量体スパイクタンパク質への結合をＳＰＲ動態解析したところ、単一特異性二価Ｃ５ポリペプチドの驚くほど強固な結合が明らかになった（表４；図７）。リンカーＡＡＡ及び６ＧＳ－ＳＵＭＯ－６ＧＳによって接合されたＣ５　ＶＨＨで得られた１桁の単離定数は非常に低く、実施例１に記載した二価Ｃ５－Ｆｃの結果と同等である。

【０３１２】

試験した全ての単一特異的二価Ｃ５構造は、三量体スパイクタンパク質への結合に関するＳＰＲ生物物理学的アッセイにおいて同等に機能する（表４；図７）。オン速度（図７中初期の正の急勾配によって示される）は、全てのリガンドで同等である。下り勾配がオフ速度である。単一特異性二価分子は、いずれもオフ速度が遅く（ほとんど洗い流されない）、極めて強固なバインダーである（１桁のｐＭ解離定数によって示される通り）。

【０３１３】

ナノボディ	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	K_D(pM)	$T_{1/2}$(h)
C5	1.4E+07	1.9E-03	134	0.1
C5-Fc	1.6E+07	9.0E-05	6	2.1
C5-AAA-C5	1.4E+07	7.6E-05	5	2.5
C5-9GS-C5	1.0E+06	4.2E-05	11	1.7
C5-6GS-SUMO-6GS-C5	8.6E+06	4.2E-05	5	4.6

表１８：Ｃ５及びＣ５二価ポリペプチドのＳＰＲ三量体スパイク結合反応速度；Ｃ５－Ｆｃは哺乳類細胞で、Ｃ５、Ｃ５－ＡＡＡ－Ｃ５、Ｃ５－９ＧＳ－Ｃ５、及びＣ５－６ＧＳ－ＳＵＭＯ－６ＧＳ－Ｃ５は大腸菌で生産した。

【０３１４】

実施例４

２つ以上の異なるＶＨＨを互いに接合させると、二座としても知られている二重特異性二価ポリペプチドが形成される。これら二座のポリペプチドは、アビディティの効果に起因して一価ＶＨＨよりも高い親和性で結合すると予測される。更に、２つ以上の接合した異なるＶＨＨを有することで、更なる機能的な利点及び有用性が付与されると予測される。

【０３１５】

Ｆ２はＣＲ３０２２と競合するが、Ｈ１１－Ｈ４とは競合しないことに鑑みて、このＶＨＨはＣＲ３０２２とエピトープを共有している可能性が高いと思われる。入念なモデリングは、Ｃ５及びＦ２のエピトープがＲＢＤの表面をまたいでリンカーによって架橋され得ることを示す。Ｆ２のＣ末端とＣ５のＮ末端とは約５２Å離れている。エピトープの三次元配置について調べたところ、短いスパンのグリシン及びセリンの残基（ＧＳ）に続いてタンパク質ＳＵＭＯ（低分子ユビキチン様修飾因子）の配列、次いで別のＧＳ配列からなるリンカーを使用して、それぞれのエピトープに結合した２つのＶＨＨを接続できることが示唆された。ＳＵＭＯは、タンパク質の翻訳後修飾に関与する低分子（約１１．６ＫＤａ）タンパク質のファミリーであり、細胞周期の制御及び細胞内輸送を含む様々な細胞プロセスにおいて役割を果たす（Ｈａｙ　２００５）。二座分子の設計は、このロジック

（Ｎ’－ＶＨＨ→エピトープ１－（ＧＳ）６－ＳＵＭＯ－（ＧＳ）６　ＶＨＨ→エピトープ２－Ｃ’）に従ったか又はその逆であった。

【０３１６】

ＳＵＭＯは剛性分子であるため、剛性を促進し、エントロピー的なペナルティを最小化する。ＳＵＭＯの端から端までの距離は３２Åである。従って、少なくとも更に２０Å離すことが必要である（細長いストランドとして６～８残基程度）。両方のナノボディをそれぞれのエピトープに結合させ、エンタルピーを獲得させるために、ＧＳ残基を導入した。該ＧＳ残基によって、エントロピー的なペナルティが導入される。これは、明示的に、ＧＳ領域内で残基（Ｐｒｏ及び他の１７個の天然残基を含む）を付加又は除去して、エンタルピー利得の最大化とエントロピー的ペナルティの最小化との間のバランスを最適化する設計の一部である。

【０３１７】

このようにして、最初のコンストラクトを作製した：

Ｆ２－ＳＵＭＯ－Ｃ５（配列番号１７５）

【０３１８】

この同じ設計根拠を、Ｃ１及びＣ５（Ｃ１のＣ末端とＣ５のＮ末端との間の距離約５７Å；図５ａ）、Ｃ１及びＨ３（Ｃ１のＣ末端とＨ３のＮ末端との間の距離約６３Å；図４）、Ｃ１及びＨ４（配列番号１２０）（Ｃ１のＣ末端とＨ４のＮ末端との間の距離約６０Å；図５ｂ）、並びにＶＨＨ＿７２（配列番号３２）及びＣ５（ＶＨＨ＿７２のＣ末端とＣ５のＮ末端との間の距離約５４Å；図６）の入念なモデリングに適用した。

【０３１９】

このようにして、５つの追加のコンストラクトを作製した：

Ｃ１－ＳＵＭＯ－Ｃ５（図５ａ；配列番号１７６）

Ｃ１－ＳＵＭＯ－Ｈ３（図４；配列番号１７７）

Ｃ１－ＳＵＭＯ－Ｈ１１－Ｈ４（図５ｂ；配列番号１７９）

ＶＨＨ７２－ＳＵＭＯ－Ｃ５（図６；配列番号２３４）

Ｆ２－ＳＵＭＯ－ＶＨＨ＿Ｈ６（配列番号２４８）

【０３２０】

Ｃ１、Ｆ２、及びＶＨＨ＿Ｈ６は、Ｈ３及びＨ１１－Ｈ４の両方によって認識されるエピトープとは異なるエピトープ（ＣＲ３０２２と同じ）に結合する。Ｃ５は、Ｈ３及びＨ１１－Ｈ４によって認識されるのと同じエピトープに結合する（表３）。

【０３２１】

タンパク質の生産

本明細書に記載する二座抗体ポリペプチドは、Ｎ末端のＶＨＨ、中央のＳＵＭＯ、及びＣ末端のＶＨＨの３つの部分からなる。これらの各構成要素をコードしている遺伝子をＰＣＲによって増幅させ、プライマーＡｂＶｅｃ＿ＮＳＮ＿Ｆ１及びＡｂＶｅｃ＿ＮＳＮ＿Ｒ３を用いたストランドオーバーラップＰＣＲによって互いに接合させた（表５）。次いで、得られたＰＣＲ断片を、ＡｇｅＩ及びＳａｌＩで消化した人工ＡｂＶｅｃ－ｈＩｇＧ１ベクターにクローニングした。ＡｂＶｅｃ－ｈＩｇＧ１ベクターは、マウス重鎖リーダー配列及びヒトＩｇＧ１融合体を含む。例えば、Ｓ２８８Ｐ等の安定化及び／又はヒト化改変並びに例えばＡｔｙｅｏ　ｅｔ　ａｌ．２０２０、Ｓｕｚｕｋｉ　ｅｔ　ａｌ．２０１８、及びＤｕｍｅｔ　ｅｔ　ａｌ　２０１９に教示されている改変を有する又は有しないＩｇＧ４を含む他のＦｃｓも同様に好適である。ｅｘｐｉ２９３細胞で一過的に発現させた後、プロテインＡセファロースにおけるアフィニティークロマトグラフィーによってタンパク質を精製した（Ｈｕｏ，Ｌｅ　Ｂａｓ　ｅｔ　ａｌ．２０２０）。

【０３２２】

プライマー	配列
N末端Nbドメイン	
AbVec_NSN_F1（Fc-融合）	5’- CTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTTCACTCTCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG -3’
NSN_R1	5’- CTGGTTCACTTCGCTATCGGAGCCAGAACCGCTCCCTGAGGAGACGGTGACCTG GGTCCC -3’
SUMO	
NSN_F2	5’- GGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGGGAGCGGTTCTGGCTCCGATAG CGAAGTGAACCAG -3’
NSN_R2	5’- CCAGACTCCACCAGCTGCACCTGCGACCCGCTACCTGAGCCGATCTG TTCGCGATGCGC -3’
C末端Nbドメイン	
NSN_F3	5’- GCGCATCGCGAACAGATCGGCTCAGGTAGCGGGTCGCAGGTGCAGCTGGTGGAG TCTGG -3’
AbVec_NSN_R3（Fc-融合）	5’- GATTTGGGCTCGGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACCTGGGTCCC -3’

表９：二座ポリペプチドの構築に使用したプライマー

【０３２３】

結合活性

実施例１で提供した方法論に従って、ＳＰＲによって結合活性を測定した。ＶＨＨ＿Ｃ１とＶＨＨ＿Ｈ３又はＶＨＨ＿Ｈ１１－Ｈ４のいずれかとを組み合わせることで、親和性が約４０倍増大することが判明した（表１０）。Ｃ１とＣ５とを組み合わせると、親和性は約２４０倍増大する。Ｆ２とＣ５とを組み合わせると、親和性は約８５倍増大する。

【０３２４】

特に、Ｆ２－ＳＵＭＯ－ＶＨＨ＿Ｈ６－Ｆｃ　Ｆ２－ＳＵＭＯ－Ｃ５－Ｆｃ及びＣ１－ＳＵＭＯ－Ｃ５－ＦｃバイパラトピックⅡ価ポリペプチドは、著しく高い結合親和性を示し、解離定数はそれぞれ０．６ｐＭ、０．７５ｐＭ、及び１．６３ｐＭである。

【０３２５】

ナノボディ	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	K_D(pM)	$T_{1/2}$(h)
F2-SUMO-VHH_H6_Fc	1.3E+07	7.6E-06	0.6	25.4
F2-SUMO-C5-Fc	2.3E+07	1.7E-05	0.75	11.0
C1-SUMO-C5-Fc	3.0E+07	4.9E-05	1.63	246
C1-SUMO-H3-Fc	4.3E+06	4.7E-05	11	4.1
C1-SUMO-H11-H4-Fc	5.1E+06	6.8E-05	13	2.8

表１０：バイパラトピックＶＨＨポリペプチドのＳＰＲ　ＲＢＤ結合反応速度

【０３２６】

中和活性

実施例１で提供した方法論に従って、マイクロタイター中和（「ＭＮ」）アッセイによって中和活性を測定した。Ｆｃ融合体を、９６ウェルプレートにおいて１％（ｗ／ｖ）ウシ胎児血清（ＦＢＳ）を含有するダルベッコ変法イーグル培地（ＤＭＥＭ）で連続希釈した。ＤＭＥＭ－ＦＢＳで１：５希釈した、４回継代したＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ビクトリア株（ｖｅｒｏ　７６）［９×１０^{4}ｐｆｕ／ｍＬ］を各ウェルに添加し、培地のみをネガティブコントロールとした。３７℃で３０分間インキュベートした後、Ｖｅｒｏ細胞（１００μＬ）を各ウェルに添加し、プレートを３７℃で２時間インキュベートした。次いで、カルボキシメチルセルロース（１００μＬ、１．５％ｖ／ｖ）を各ウェルに添加し、プレートを３７℃で更に１８～２０時間インキュベートした。細胞を室温で３０分間パラホルムアルデヒド（１００μＬ／ウェル　４％ｖ／ｖ）で固定し、次いで、ヒトモノクローナル抗体（ＥＹ２Ａ）を用いてＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２核タンパク質を染色した。ヤギ抗ヒ

トＩｇＧ　ＨＲＰコンジュゲートと共にインキュベートし、基質を添加した後、ＥＬＩＳＰＯＴリーダーで画像化することによって、結合した抗体を検出した。中和力価は、対照ウェルと比較して、フォーカス形成単位（ＦＦＵ）を５０％低下させるＶＨＨ－Ｆｃの力価と定義された。

【０３２７】

Ｆ２－ＳＵＭＯ－Ｃ５、Ｃ１－ＳＵＭＯ－Ｈ３、Ｃ１－ＳＵＭＯ－Ｈ１１－Ｈ４を、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２マイクロ中和アッセイで試験したところ、ナノモル以下の中和活性を示した。

【０３２８】

実施例５

ＶＨＨドメインをグリシン－セリン柔軟性リンカー（ＧＳ）６で接合させることによって、Ｃ５（配列番号１８９）、Ｃ１（配列番号２２５）Ｈ３（配列番号２２９）、及びＡ８（配列番号２２１）の４つのナノボディの三価バージョンを構築した。三量体ＶＨＨを作製するために、Ｃ１、Ｃ５、Ｈ３、及びＡ８の遺伝子断片をテンプレートとして使用して、以下のプライマー対を用いたＰＣＲによって３つの断片を増幅させた：ＴｒｉＮｂ＿Ｎｅｏ＿Ｆ１及びＴｒｉＮｂ＿Ｒ１；ＴｒｉＮｂ＿Ｆ２及びＴｒｉＮｂ＿Ｒ２；ＴｒｉＮｂ＿Ｆ３及びＴｒｉＮｂ＿Ｎｅｏ＿Ｒ１（表Ｃ）。次いで、プライマーＴｒｉＮｂ＿Ｎｅｏ＿Ｆ２及びＴｒｉＮｂ＿Ｎｅｏ＿Ｒ２を用いたＰＣＲ反応で該３つの断片を互いに接合させた（表Ｃ）。次いで、Ｉｎｆｕｓｉｏｎ（登録商標）クローニングによって三量体遺伝子産物をｐＯＰＩＮＴＴＧｎｅｏベクターに挿入した。ｐＯＰＩＮＴＴＧは、ｍｕ－ホスファターゼリーダー配列及びＣ末端Ｈｉｓ６タグ４４を含む。ｅｘｐｉ２９３細胞で一過的に発現させ、金属キレートアフィニティクロマトグラフィー及びサイズ排除により精製することによって、ナノボディホモ三量体（Ｃ５、Ｃ１、Ａ８、及びＨ３）を生産した。

【０３２９】

TriNb_Neo_F1	5’-GCGTAGCTGAAACCGGCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGG-3’
TriNb_R1	5’-GACTCCACCAGCTGCACCTGGGAGCCAGAACCGCTCCCTGAGGAGACGGTGACCTGG-3’
TriNb_F2	5’-CCCAGGTCACCGTCTCCTCAGGGAGCGGTTCTGGCTCCCAGGTGCAGCTGGTGGAG-3’
TriNb_R2	5’-GACTCCACCAGCTGCACCTGCGACCCGCTACCTGAGCCTGAGGAGACGGTGACCTGG-3’
TriNb_F3	5’-CCCAGGTCACCGTCTCCTCAGGCTCAGGTAGCGGGTCGCAGGTGCAGCTGGTGGAG-3’
TriNb_Neo_R1	5’-GTGATGGTGATGTTTTGAGGAGACGGTGACCTGGGTCCC-3’
TriNb_Neo_F2	5’-GCGTAGCTGAAACCGGCCAG-3’
TriNb_Neo_R2	5’-GTGATGGTGATGTTTTGAGG-3’

表１１：三価ＶＨＨを構築するためのプライマー

【０３３０】

三量体ナノボディによるインビトロにおけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ２バリアントの強力な中和

ｅｘｐｉ２９３細胞で一過的に発現させ、金属キレートアフィニティクロマトグラフィー及びサイズ排除により精製することによって、ナノボディ三量体Ｃ５（配列番号１８９）、Ｃ１（配列番号２２５）、Ｈ３（配列番号２２９）、Ａ８（配列番号２２１）を生産した。ＲＢＤに結合する三量体ナノボディの結合を実施例１と同様にＳＰＲによって測定したところ、単量体と比較して約１０～１００倍のK_Dの増強が観察された（表１２）。注目すべきことに、Ｈ３三量体がＲＢＤ－ＷＴ（ＷＴは武漢／ビクトリア株）に対してピコモル以下のＫＤを有することが示され、オフ速度は約６時間であった。ＳＡＲＳ－Ｃｏ

Ｖ－２アルファ（系統Ｂ．１．１．７）及びデルタ（系統Ｂ．１．１６７．２）のバリアント由来のＲＢＤへのＣ５三量体の結合はＲＢＤ－ＷＴと同様であったが、Ｃ５単量体の結合はそれぞれ約２５倍及び約１００倍弱かった（表５）。Ｃ１及びＡ８のみが、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ベータバリアント（Ｂ．１．３５１系統由来のＲＢＤ（南アフリカ）への結合を示した（表１２）。

【０３３１】

アナライト	リガンド	K_a(1/Ms)	K_d(1/s)	K_D(pM)	$T_{1/2}$(分)
C5三量体	RBD-WT-Fc	7.1E+06	1.2E-04	18	92
C5三量体	Bio-RBD-アルファ	9.9E+06	2.8E-04	29	41
C5三量体	Bio-RBD-デルタ	1.0E+7	1.4E-04	14	82
H3三量体	RBD-WT-Fc	1.2E+08	3.3E-05	0.3	349
H3三量体	Bio-RBD-アルファ	1.8E+07	1.2E-04	6	98
C1三量体	RBD-WT-Fc	9.0E+05	4.8E-05	53	242
C1三量体	Bio-RBD-アルファ	1.0E+06	7.4E-05	73	154
C1三量体	Bio-RBD-ベータ	8.2E+05	6.2E-05	75	186
A8三量体	RBD-WT-Fc	9.1E+06	4.1E-0.5	5	278
A8三量体	Bio-RBD-ベータ	9.4E+06	4.6E-0.5	5	251
A8三量体	Bio-RBD-デルタ	9.2E+06	5.2E-0.5	6	222

表１２：ナノボディ三量体のＳＰＲ　ＲＢＤ結合反応速度

【０３３２】

マイクロ中和アッセイを実施し（実施例１と同様）、ウイルスのビクトリア（ＷＴ）、アルファ、ベータ、及びデルタの株のいずれかによるＶｅｒｏ　Ｅ６細胞の感染をブロックする３つのナノボディ三量体の有効性について試験した。全てのナノボディは、全てではないが、幾つかの株を強力に中和した。インビトロにおける結合データから予想される通り、Ａ８及びＣ１のみがベータ株に対して活性であった。Ｈ３はインビトロではＣ５よりもＲＢＤに強固に結合したが、ＷＴ株及びアルファ株の両方に対してＣ５よりも効力が弱かった。特に、Ｃ５は、ビクトリア（ＷＴ）、アルファ、及びデルタウイルスの中和において等効力であったのに対し、Ａ８及びＣ１は４つの株全てを中和した（表１３）。

【０３３３】

ND 50 MNアッセイ				
バリアント / ナノボディ	B（ビクトリア）	アルファ（ケントB.1.1.7）	ベータ（南アフリカB.1.351）	デルタ（B.1.617.2）
C1三量体	4.9nM	8.2nM	4.5nM	3.1nM
C5三量体	0.02nM	0.25nM	0	0.02nM
H3三量体	0.4nM	0.6nM	0	0.3nM
A8三量体	0.09nM	0.1nM	0.2nM	0.1nM

表１３：ＭＮアッセイにおける生ウイルスの中和

【０３３４】

Ｃ５三量体の中和効力は、ＢＶＩＣ０１株に対するゴールドスタンダードプラーク減少中和試験（ＰＲＮＴ）で確認され、ＮＤ５０は３ｐＭであった（データ図９）。

【０３３５】
プラーク減少中和試験（ＰＲＮＴ）は、Ｐ１でＴｈｅ Ｄｏｈｅｒｔｙ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）によって供与され、Ｖｅｒｏ／ｈＳＬＡＭ細胞［ＥＣＡＣＣ ０４０９１５０１］で２回継代されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（ｈＣｏＶ－１９／オーストラリア／ＶＩＣ０１／２０２０）（ＧＩＳＡＩＤアクセッション番号ＥＰＩ＿ＩＳＬ＿４０６８４４）を用いて、英国公衆衛生庁において実施された。ウイルスを９３３ｐ．ｆ．ｕ． ｍｌ－１（７０ｐ．ｆ．ｕ．／７５μＬ）の濃度に希釈し、９６ウェルＶ底プレートにおいて、１％ＦＢＳ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）及び２５ｍＭ ＨＥＰＥＳバッファ（Ｓｉｇｍａ）を含む最小必須培地（ＭＥＭ；Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）中で倍加抗体希釈物と５０：５０混合した。プレートを加湿ボックス内において３７℃で１時間インキュベートして中和させた。その後、１０％（ｖ／ｖ）ＦＢＳを含むＭＥＭで培養したＶｅｒｏ Ｅ６細胞（ＥＣＡＣＣ ８５０２０２０６、ＰＨＥ）のコンフルエントな単層を含むダルベッコのＰＢＳで２回洗浄した２４ウェルプレートのウェルにウイルス－抗体混合物を移した。加湿ボックス内において３７℃で更に１時間、ウイルスを細胞に吸着させた後、１．５％カルボキシメチルセルロース（Ｓｉｇｍａ）、４％（ｖ／ｖ）ＦＢＳ、及び２５ｍＭ ＨＥＰＥＳバッファを含むＭＥＭに細胞を重ねた。加湿ボックス内において３７℃で５日間インキュベートした後、プレートを２０％ホルマリン／ＰＢＳ（ｖ／ｖ）で一晩固定し、水道水で洗浄した後、０．２％クリスタルバイオレット溶液（Ｓｉｇｍａ）で染色し、プラークを計数した。ミッドポイントプロビット解析（統計学的計算及びグラフィックスのためのプログラミング言語Ｒで記述）を用いて、ウイルスのみの対照（ｎ＝５）と比較してＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスのプラークを５０％（ＮＤ５０）減少させるのに必要な抗体の希釈度を求めた。Ｒで使用したスクリプトは、以前に報告されているソーススクリプト（Ｎｅｔｔｌｅｓｈｉｐ，ＪＥ ｅｔ ａｌ ２００９）をベースにしていた。抗体の希釈をデュープリケートで行い、熱不活性化（５６℃で３０分）したヒトＭＥＲＳ回復期血清ｐＨ７．４、１３７ｍＭ ＮａＣｌ、１ｍＭ ＣａＣｌ）、及び１ｍｇ ｍｌ－１トリプシン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）のサンプルを使用してＰＲＮＴアッセイの内部ポジティブコントロールもデュープリケートで行って、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を中和した（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｆｏｒ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｓｔａｎｄａｒｄｓ ａｎｄ Ｃｏｎｔｒｏｌ，ＵＫ）。

【０３３６】
Ｃ５－Ｆｃ融合体はインビボで治療効力を示す
インビボでの中和について調べるために、ＳＡＲＳ－ＣｏＶで臨床疾患（体重減少及び臨床徴候）、呼吸器組織に限定されたウイルス複製、及び鼻汁におけるウイルス排出を示すことが実証されているＣＯＶＩＤ－１９のシリアンハムスターモデルにおいてＣ５－Ｆｃ融合体を試験した（Ｃｈａｎ，Ｊ．Ｆ．ｅｔ ａｌ ２０２０；Ｉｍａｉ，Ｍ．ｅｔ ａｌ．２０２０；Ｓｉａ，Ｓ．Ｆ．ｅｔ ａｌ ２０２０）。Ｃ５－ＦｃのＲＢＤ結合親和性（ＫＤ ３７ｐＭ）及びウイルス中和効力（ＮＤ５０ ２ｐＭ；１８０ｐｇ／ｍＬ）は三価のタンパク質と同様であり、多価性の重要性が確認された（表１８）。この研究は、各６匹の実験群及び対照群からなっていた。両群の動物をＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ビクトリア（５×１０４ｐｆｕ）に鼻腔内曝露し、次いで、１群は２４時間後に腹腔内投与（「ＩＰ」）した単一用量のＣ５－Ｆｃ（４ｍｇ／ｋｇ）で処理したが、対照にはＰＢＳのみを注射した。疾患進行の尺度として、７日間にわたって毎日動物の体重を測定し、１日おきに鼻腔内スワブを採取した。７日目に動物を殺処分し、肺、気管、及び十二指腸におけるウイルス量をＩＳＨ及びｓｇ－ＰＣＲによって測定した。病理組織学的検査及び抗ＳＡＲＳ Ｃｏｖ２核タンパク質（ＮＰ）による抗体染色のために重要器官をホルマリン固定して、ウイルスの存在を検出した。ビヒクル（ＰＢＳ）のみを投与した６匹の対照群は、７日目までに１６％の体重減少を示したが、処理群は最初の体重減少の後、曝露前の体重に対して５％の体重減少まで回復し、曝露されなかったセンチネル群と同じ体重になる傾向がみられた（図１０）。病理組織学的検査及びＲＮＡＳｃｏｐｅ ＩＳＨ技術を用いて

、ナノボディで処理したハムスター及び未処理対照ハムスターの組織における病理及びウイルスＲＮＡの存在を比較し、半定量的スコアリングシステム及びデジタル画像解析を組み合わせて、肺炎を有する肺の面積及びウイルスの量を算出した。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の感染と一致する病変は、肺及び鼻腔でしか観察されなかった。試験した他の器官ではいずれも病変は観察されなかった。ウイルスＲＮＡは、肺及び鼻腔でしか観察されなかった。肺病変は、肺硬化領域を示す気管支間質性肺炎からなっており、マクロファージ及び好中球だけではなく、幾つかのリンパ球及び形質細胞の浸潤も特徴としていた。ナノボディで処理したハムスターでは、鼻腔の病理組織学的スコアが顕著に減少したと共に、肺炎の面積が有意に減少した（肺又は鼻腔におけるウイルスＲＮＡの存在についても統計的に有意な差がみられた（図１０））。まとめると、これら結果は、ＩＰ投与した単一治療用量のＣ５－Ｆｃは、肺及び鼻腔の作用部位に到達し、ウイルス量及び関連する病態を低減することを示した。従って、この好ましい結果に基づいて、シリアンハムスターモデルでＣ５三量体を評価するためのより大規模な研究を実施した。

【０３３７】

三量体Ｃ５ナノボディは局所的な治療効力を示す

Ｃ５三量体（４０ｋＤａ）の分子サイズがＣ５－Ｆｃ（８０ｋＤａ＋２本のＮ結合型糖鎖）と比較して小さくなるほど、気道に直接局所投与するのに適したものになる。従って、２回目の動物試験では、ＩＰ及び鼻腔内経路の両方を用いて投与することにより、ＣＯＶＩＤ－１９ハムスターモデルでＣ５の三量体バージョンの効力を評価した。この研究は、１日目にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ビクトリア（１×１０４ｐｆｕ）に曝露し、７日間にわたって体重の変化を追跡する６匹の動物の５群からなっていた。Ｃ５－Ｆｃで得られた結果と比較するために、４ｍｇ／ｋｇの三量体をＩＰ投与し、鼻腔内設置を介して同用量を気道に直接送達した。また、１０倍低い０．４ｍｇ／ｋｇの鼻腔内用量のＣ５三量体についても試験した。最初の研究と同様に、未処理群の動物は有意かつ進行性の体重減少（７日目までに２０％）を示したが、治療的に処理した動物は全て、ウイルス曝露の２４時間後に最初の体重減少しか示さず、２日目からは曝露前の体重に回復した（図１１）。鼻腔経路を通じてウイルスの２時間前に予防的に前処理した動物は、体重の変化を示さず、これは、１日目に感染が有効にブロックされたことを示す。核タンパク質（ＮＰ）ＲＮＡのｑＰＣＲによる肺のウイルス量の解析では、未処理の対照動物に比べて、処理した動物では中央値の有意な減少を示したが、２匹の動物は依然として比較的高いレベルのＮＰ　ＲＮＡを有していた（図１１）。

【０３３８】

まとめると、全身又は局所に送達されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質のＲＢＤを標的とした多価ナノボディ（Ｆｃ融合体又は三量体）は、ＣＯＶＩＤ－１９の疾患モデルにおいて治療効果を有することが動物実験によって証明された。具体的には、０．４ｍｇ／ｋｇ（約４０ｕｇ／動物に等しい）の単一鼻腔内用量のＣ５三量体で効力が観察され、この生物学的製剤の高い効力が実証された。更なる用量決定試験によって、ハムスター疾患モデルで治療的に有効であるために必要なナノボディの最小量が確定されるであろう。

【０３３９】

実施例６

抗体検査キットの製造におけるスパイク生産のインプロセスモニタリングに応用できる、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクタンパク質の量を測定するための定量ＥＬＩＳＡが開発されている。ＳＡＲＳ－Ｃｏｖ２特異的ＶＨＨによって認識されるエピトープについての知見を得ることで、サンドイッチＥＬＩＳＡの設計においてＶＨＨ／抗体の適切なペアを選択することが可能になる。定量ＥＬＩＳＡでは、ＲＢＤにおける空間的に異なり、空間的に分離しているエピトープに結合するＶＨＨ及び／又は抗体の組み合わせを使用する。

【０３４０】

ビオチン化ＶＨＨ＿Ｃ１－Ｆｃを９６ウェルＥＬＩＳＡプレートにコーティングし、捕捉されたスパイクタンパク質をＨＲＰ（セイヨウワサビペルオキシダーゼ）にコンジュゲ

ートしたＶＨＨ　Ｈ１１－Ｈ４によって検出するＥＬＩＳＡアッセイの結果は、スパイクタンパク質の入力レベルを代表するものであり、１００ｎｇ／ｍＬまで感受性である。

【０３４１】

化学物質

ＰＮＧａｓｅ　ＦはＮＥＢから購入し、ｍＴＧａｓｅはＺｅｄｉｒａ（Ｔ００１）から供給された。アミノ－ＰＥＧ３－ビオチンは、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒから購入した。ＭＥＳバッファ及びＳＤＳ　ＰＡＧＥゲルは、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎから購入した。ＶｉｖａｓｐｉｎフィルターメンブレンはＳａｒｔｏｒｉｕｓから購入し、使用前にｍｉｌｌｉＱ水及びＰＢＳでメンブレンを洗浄した。他の化学物質は、特に断りのない限り、ＳｉｇｍａＡｌｄｒｉｃｈから購入した。

【０３４２】

タンパク質の生産

精製されたＨ４、Ｈ４－Ｆｃ、Ｃ５－Ｆｃ、Ｃ１－Ｆｃ、Ｆ２－Ｆｃ、ＲＢＤ、及びＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイクを、既述の通り調製した。ＨＲＰ－ナノボディコンジュゲートは、Ａｂｃａｍ　Ｌｉｇｈｔｎｉｎｇ　Ｌｉｎｋ　ＨＲＰ　ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ　ｋｉｔ（ｗｗｗ．ａｂｃａｍ．ｃｏｍ）に付属の方法に従って調製し、いかなる更なる処理も行うことなく使用した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル電気泳動におけるコンジュゲートしたナノボディのバンドを分析することによって、コンジュゲーションの程度を推定した。ナノボディのリジン残基へのビオチンの非特異的な付加は、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　ＥＺ－Ｌｉｎｋ　Ｓｕｌｆｏ－ＮＨＳ－Ｂｉｏｔｉｎｙｌａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ又はＥＺ－Ｌｉｎｋ　Ｓｕｌｆｏ－ＮＨＳ－ＬＣ－Ｂｉｏｔｉｎｙｌａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（ｗｗｗ．ｔｈｅｒｍｏ．ｃｏｍ）を用いて実現した。キットは、付属の説明書に従って使用した。完了したら、反応溶液をＰＢＳで透析して任意の未反応のビオチン試薬を除去し、ナノドロップによって濃度を求めた。Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ　Ｂｉｏｔｉｎ　Ｑｕａｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｋｉｔを用いてビオチン化の程度を確立した。

【０３４３】

部位特異的標識

５ｕＬの５×ＰＢＳバッファ及び１０ｕＬのＰＮＧａｓｅＦ酵素と３７℃で１８時間インキュベートすることによって、５００ｕｇのＣ５－Ｆｃ（ＰＢＳ中１ｍｇ／ｍＬ）におけるＮ結合型グリカンを除去した。反応の完了は、ゲル電気泳動によって判定した。脱グリコシル化Ｃ５－Ｆｃ（ｄｇＣ５－Ｆｃ）をプロテインＡアフィニティーカラム（ＧＥ　ｌｉｆｅｓｃｉｅｎｃｅｓ）で精製し、クエン酸バッファ（ｐＨ３）で溶出し、１Ｍ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ９）を用いて中和した。精製されたｄｇＣ５－Ｆｃを、１０ｋＤａのＶｉｖａｓｐｉｎフィルターメンブレンを用いてＰＢＳにバッファ交換した。次いで、１００μｇのｄｇＣ５－Ｆｃ（１ｍｇ／ｍＬ）を、アミノ－ｐｅｇ３－ビオチン（８０当量）及びｍＴＧａｓｅ酵素（６Ｕ／ｍＬ）（ＰＲＥＥＱＹＮＳＴを改変）と共に３７℃でインキュベートした。反応物の１ｕＬのアリコートを回収し、還元ＬＣＭＳによって分析した（水中０．００２ｍｇ／ｍＬタンパク質の濃度、２０ｍＭ　ＤＴＴによって還元）。改変されたナノボディを、０．１％ギ酸水溶液及び９５％アセトニトリルを移動相として用いてＰｒｏＳｗｉｆｔ　ＴＭ　ＲＰ－４Ｈ　ＨＰＬＣカラムで分析した。ＭａｓｓＬｙｎｘ　ｖ４ソフトウェアを用いてデータをデコンボリューションし、解析した。本発明者らの反応では、１５Ｄａの質量減少を示す別の生産物が一貫して観察された。これは、競合反応でリジンとの内部結合が形成され、その結果、質量が失われたためであると推測された。任意のそのような生産物は、ストレプトアビジンでコーティングされたＥＬＩＳＡプレートに結合しないため、影響を及ぼさないので、プロテインＡアフィニティークロマトグラフィーによる反応混合物の精製を継続した。Ｃ５－Ｆｃ単量体あたり１個のビオチン部分を有する精製された生産物をＥＬＩＳＡアッセイで使用した。

【０３４４】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＷＴ（熱／Ｅｍｐｉｇｅｎ及び４％ＦＡ）及び偽ウイルス

感染性ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスをＶｅｒｏ　ＣＣＬ８１又はＶｅｒｏ　Ｅ６－ＴＭＰＲＳＳ２において成長させた。Ｔ１７５組織培養フラスコで伝播させた。細胞が約７０％のコンフルエンスに達した時点で、全ての培地を除去し、１ｍＬ（ＤＭＥＭ、１％ＦＢＳ、１％Ｐ／Ｓ）のウイルス含有培地を各フラスコに添加した（ＭＯＩ　～０．００１）。これを室温で１０分間放置してインキュベートした後、更に１９ｍＬの培地を継ぎ足した。

【０３４５】

感染後４８～７２時間、培養物中で顕著な細胞変性効果が見られるようになるまで、フラスコをインキュベートしたままにした。収集は、培地をプールし、細胞残屑をペレット化し（５分間、５００ＲＣＦ）、その後上清を分注することからなっていた。

【０３４６】

フォーカス形成アッセイによってウイルス力価を求めた。Ｖｅｒｏ　ＣＣＬ８１細胞懸濁液を、連続希釈したウイルスストックに添加し、２時間インキュベートした。粘性のカルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）オーバーレイを添加し、プレートを更に２２時間インキュベートした。次いで、培地を除去し、単層を４％ホルムアルデヒドで固定（３０分）し、標準的な一次／二次ＨＲＰ手順によって細胞のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ヌクレオキャプシドを染色した。１ｍＬあたりのフォーカス形成単位（ｆｆｕ／ｍＬ）として力価を測定した（Ｓｋｅｌｌｙ　ｅｔ　ａｌ．２０２１－ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．２１２０３／ｒｓ．３．ｒｓ－２２６８５７／ｖ２）。

【０３４７】

ｐＮＬ４－３（ΔＥｎｖ、ルシフェラーゼ）レンチウイルスプラスミド及びＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク遺伝子をコードしているプラスミドをＨＥＫ－２９３Ｔ細胞とコトランスフェクトすることによって、偽ウイルスを作製した。トランスフェクションは、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）を用いて４時間行った。その後、細胞を洗浄し、新鮮培地（ＤＭＥＭ、１０％ＦＢＳ、１％Ｐ／Ｓ）を適用し、４８時間放置してウイルス生産を進行させた。上清をプールし、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）沈殿によって濃縮することによりウイルスを収集した。

【０３４８】

ＡＣＥ２を過剰発現している細胞（ＭＤＣＫ－ＡＣＥ２）にウイルスストックの限界希釈物を４８時間感染させることによって、偽ウイルスのタイトレーションを行った。細胞溶解液の標準的なルシフェラーゼアッセイによって読み出しを行い、各ウェルを感染について陽性又は陰性に分類した。力価はＴＣＩＤ５０／ｍＬの単位で測定した。

【０３４９】

ホルムアルデヒド固定又は熱／洗剤の併用による不活性化によって、感染性ウイルスストックの不活性化を行った。ホルムアルデヒド固定の場合：３２％原液を最終的に４％のホルムアルデヒド濃度になるようにウイルスサンプルと混合し、３０分間インキュベートした後、ＣＬ３設備から取り出した。

【０３５０】

熱／洗剤による不活性化の場合：Ｅｍｐｉｇｅｎ洗剤をＭｉｌｌｉＱ水で５％溶液に希釈した。これをウイルスサンプル（最終Ｅｍｐｉｇｅｎ濃度０．５％）と１：１０混合した。次いで、サンプルを５６℃で３０分間加熱した。

ＥＬＩＳＡ

【０３５１】

受動的吸収のために、Ｓｉｇｍａ製の高結合Ｎｕｎｃ　９６ウェルマイクロプレートをまずリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ、３×２００μＬ）ですすいだ。各ウェルに、５μｇ／ｍＬの精製タンパク質（Ｃ１－Ｆｃ又はＨ４）を１００μＬ添加し、３７℃で３時間インキュベートした。次いで、プレートをＰＢＳで洗浄し、３％ミルク／ＰＢＳ（２００μＬ／ウェル）を添加することによって４℃で一晩ブロッキングした。ＰＢＳで更に洗浄した後、１００μｇ／ｍＬから０．０１μｇ／ｍＬの範囲で連続希釈した組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質を添加し、３７℃で９０分インキュベートし、ＰＢＳをネ

ガティブコントロールとした。ウェルをＰＢＳで再度洗浄し、ＰＢＳで（０．５ｍｇ／ｍＬから）希釈（１：３０００）したＨＲＰコンジュゲートプローブ分子１００μＬ／ウェルを各ウェルに添加し、室温で２時間インキュベートした。ウェルをＰＢＳで再度洗浄した後、新たに調製した現像液を添加した。

【０３５２】

ビオチン化ナノボディの場合、Ｓｉｇｍａ製のストレプトアビジンコーティング高容量９６ウェルマイクロプレートをＴｒｉｓ－ＨＣｌ　５０ｍＭ、ＮａＣｌ　１５０ｍＭ、０．１％ＢＳＡ、及び０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０（ＥＷＢ）で洗浄した。予めＥＷＢで０．５μｇ／ｍＬに希釈しておいたビオチン化ナノボディの溶液１００μＬを各ウェルに添加し、室温で２時間インキュベートした。プレートをＥＷＢで洗浄し、スパイクタンパク質の連続希釈物（通常１０～０．０００１μｇ／ｍＬ）１００μＬをウェルに整列させ、続いて、室温で３０分インキュベートした。その後のＥＷＢによる洗浄工程に続いて、ＥＷＢで希釈（１：１０００）した１００μＬ／ＨＲＰ－Ｆｃコンジュゲートナノボディ（０．５ｍｇ／ｍＬ）を各ウェルに添加し、室温で３０分間放置した。

【０３５３】

２種類の現像液を使用し、まず過酸化物溶液（０．０１％）中ＡＢＴＳ（０．３ｍｇ／ｍＬ）１００μＬを添加し、プレートを遮光して２０分間放置し、その時点でＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　Ｍ３マイクロプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）によって４０５ｎｍ及び４１０ｎｍでの吸光度を読み取った。第２の現像液については、過酸化物溶液（０．０１％）に１００μＬの３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ、０．２ｍｇ／ｍＬ）を入れ、その後２０分間プレートを遮光した。Ｈ２ＳＯ４（２Ｍ、１００μＬ／ウェル）を各ウェルに添加し、上記と同じＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　Ｍ３マイクロプレートリーダーを用いて４５０ｎｍにおけるＯＤを記録した。

【０３５４】

ウイルスを用いたＥＬＩＳＡ

Ｃ５－Ｆｃを上記の通り特異的にビオチン化し、選択されたプローブナノボディは、上記の通りＨＲＰにコンジュゲートさせたＦ２－Ｆｃであった。ストレプトアビジンでコーティングされたプレート及び上記のＴＭＢ現像プロトコルを使用した。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の不活性化には、洗剤（Ｅｍｐｉｇｅｎ）の添加に続いて加熱（６０℃、３０分）する；４％ホルムアルデヒド（ＦＡ）を添加する；及び１２．２ｋＧｙのＸ線照射に曝露する、の３つの異なる手段を使用した。また、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質を発現している偽型のレンチウイルスＮＬ４．３も評価し、ＰＢＳ中生ウイルスとして供給した。４０００ｆｆｕ／ｍＬから１６．３８４ｆｆｕ／ｍＬの範囲で連続希釈したＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスサンプルを試験した。偽ウイルスの希釈系列は、２５００　ＴＣＩＤ５０／ｍＬから１０．２４　ＴＣＩＤ５０／ｍＬまででであった。

【０３５５】

検出限界

ＥＬＩＳＡの感度は、大部分が、検出限界（ＬＯＤ）、つまりバックグラウンドと確実に区別することができるアナライトの最低検出可能レベルによって判断される。ＬＯＤ＝（３．３×Ｓｙ）／ｋ（式中、Ｓｙはブランク複製サンプルの標準偏差であり、ｋは線形回帰分析からの傾斜の勾配である）を使用した。標準偏差は大きく変化し得るため、ｋが感度を測るのに役立つ方法であり得る。

【０３５６】

結果：

捕捉構成要素の最適化

ｐＭバインダーＣ１－Ｆｃ（ヒトＩｇＧ１　ＦｃにコンジュゲートしているｖＨＨ（二価及びグリコシル化されている））及びｎＭバインダーＨ４（ＶＨＨドメインのみ）で始めた｛Ｈｕｏ　ｅｔ　ａｌ．，２０２０，＃６７７９０｝。Ｃ１－Ｆｃを捕捉剤として、Ｈ４－ＨＲＰをプローブとして使用すると、スパイクタンパク質の検出限界は約１．８５μｇ／ｍＬとなった（ブランクサンプルの標準偏差の＞３倍と推定）。Ｈ４をプレートに

吸着させ、Ｃ１－ＦｃのＨＲＰコンジュゲートをプローブとして使用した場合、検出限界は２０μｇ／ｍＬのスパイクタンパク質まで増加した。本発明者らは、ＶＨＨドメイン単独ではプレートに容易には吸着しないか、吸着した場合もその結合部位が不明であると結論付けた。次いで、ビオチン化したナノボディとストレプトアビジン処理したプレートへの結合とがアッセイの感度を向上させるかどうかについて調べた。高結合Ｎｕｎｃプレートを非改変Ｃ１－Ｆｃで処理し、別個に、ストレプトアビジンでコーティングされたプレートをＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　ＥＺ－Ｌｉｎｋ　Ｓｕｌｆｏ－ＮＨＳ－Ｂｉｏｔｉｎを用いて調製したビオチンｘ－Ｃ１－Ｆｃで処理した。この試薬は、リジン残基の側鎖を非特異的で確率的にビオチン化する。両プレートを、１００μＭから０．２５μＭの範囲の組換えＳ糖タンパクで処理し、次いで、Ｈ４－ＨＲＰでプロービングした。Ｃ１－Ｆｃが受動的に吸収された場合、Ｓタンパク質の検出限界は１．３μｇ／ｍＬと計算され、本質的に標準プレートと同じ結果になった（図１５）。ストレプトアビジンプレートと共にビオチンｘ－Ｃ１－Ｆｃを使用することによって、検出限界は０．１μｇ／ｍＬまで低下した。

【０３５７】

ナノボディ対の評価

ビオチンｘ－Ｎｂ－Ｆｃ（０．５μｇ／ｍＬ）の形態の捕捉ナノボディ及びプローブナノボディＨＲＰ－Ｎｂ（０．５ｍｇ／ｍＬストックから１：１０００希釈）を用いたストレプトアビジンでコーティングされたプレートで続けた。ＨＲＰの基質としてＡＢＴＳを使用することに切り替えたが、その理由は、この市販の分子がＴＭＢよりも高感度であり、発色も早いためである｛Ｈｏｓｏｄａ　ｅｔ　ａｌ．，１９８６，＃３２２９５｝。Ｈ４－Ｆｃ－ＨＲＰをプローブとして使用した場合、信頼性の低い検出結果が得られることが判明した。他のナノボディによるＨ４－Ｆｃ－ＨＲＰのドットブロッティングにより、それが非特異的な相互作用を有する可能性が示唆されたが、他のナノボディはこの挙動を示さなかった。様々な残りの組み合わせによる結果を、表１４及び図１６に示す。推定検出限界は４μｇ／ｍＬ（ビオチンｘ－Ｈ４－Ｆｃ、Ｃ１－Ｆｃ－ＨＲＰ）から１μｇ／ｍＬ未満の間で変動した（表Ａ）。ビオチンｘ－Ｃ５－Ｆｃ、Ｆ２－Ｆｃ－ＨＲＰの組み合わせから回帰勾配（７９ｎｇ／ｍＬ）、強い吸光度、及び感度限界０．５μｇ／ｍＬが得られたので、本発明者らは最適性能であると判断した。ネガティブコントロールとして、エピトープの組み合わせが重複するナノボディ対合でＥＬＩＳＡを繰り返した。これらは予想通り感度がはるかに低く、プロットすると著しく傾きが緩やかな勾配の線となるので、濃度の変化に対してそれほど強く応答しなかった。

【０３５８】

		プローブ		
キャプチャー		C1-Fc-HRP	F2-Fc-HRP	C5-Fc-HRP
	ビオチン$_x$-C1-Fc	-	9(12)	0.1 (64)
	ビオチン$_x$-F2-Fc	1 (9)	-	0.4 (79)
	ビオチン$_x$-C5-Fc	0.2 (47)	0.51 (79)	-
	ビオチン$_x$-H4-Fc	5 (2)	3 (8)	3 (6.5)

表１４：推定検出限界（ｎｇ／ｍＬ）＊括弧内は直線の勾配である（×１０００）。太字は選択した組み合わせである。

【０３５９】

ウイルスに対する試験

安全上の制約から生ウイルスを試験することができなかったので、代わりに表面ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ糖タンパク質をディスプレイしているインタクトな偽型のＮＬ４．３ＨＩＶ－１バックボーンウイルスを試験した。検出下限は、２１　ＴＣＩＤ５０／ｍＬの感染性偽型ウイルスであった（図１７ａ）。不活性化したＷＴ　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスは試験することができた。３つの異なる不活性化の方法を選択した：ａ）４％ホル

ムアルデヒド、ｂ）Ｘ線照射（１２．１９ｋＧｙ）、ｃ）ｅｍｐｉｇｅｎ（０．０５％）及び熱（６０℃、３０分）。ホルムアルデヒドで不活性化したＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を検出することはできなかったが、Ｘ線で不活性化したウイルスは３０５ｐｆｕ／ｍＬで、熱／ｅｍｐｉｇｅｎで不活性化したウイルスは１０３ｆｆｕ／ｍＬで検出された（図１７ｂ）。

【０３６０】

	勾配（$\times 10^4$）	標準偏差	LOD	r^2
偽ウイルス	7.0	0.00442	21 TCID50/mL	0.996
SARS-CoV-2 (Empigen)	8.9	0.0277	103ffu/mL	0.980

表１５：図１７のパラメータ

【０３６１】

	勾配	標準偏差	LOD	r^2
スパイク	0.1241	0.00552	147pg/mL	0.911
RBD	1.421	0.0143	33pg/mL	0.993
偽ウイルス	14.7×10^{-4}	0.00711	15.8 TCID50/mL	0.993
SARS-CoV-2 (empigen)	18.4×10^{-4}	0.00889	15.9ffu/mL	0.997

表１６：図１８のパラメータ

【０３６２】

部位選択的ビオチン化

捕捉剤の部位特異的な位置選択的に制御されたビオチン化がアッセイの感度を向上させるかどうかを評価した。ストレプトアビジンでコーティングした９６ウェルプレートを、同濃度のビオチンｘ－Ｃ５－Ｆｃ－ビオチン及び部位特異的にビオチン化されたＣ５－Ｆｃ（ビオチン－ＳＳ－Ｃ５－Ｆｃ－ビオチン）で処理した。基質として組み換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ糖タンパク質、ＲＢＤ（図１８ｂ）、偽ウイルス（図１８ｃ）、及び熱－ｅｍｐｉｇｅｎ不活性化ＷＴ　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（図１８ｄ）を使用した。プレートをＦ２－Ｆｃ－ＨＲＰでプロービングした。ビオチン－ＳＳ－Ｃ５－Ｆｃ－ビオチンをキャプチャーとして用いると、精製スパイクタンパク質（１４７ｐｇ／ｍＬ対５１４ｐｇ／ｍＬ）及び精製ＲＢＤ（３３ｐｇ／ｍＬ対８５ｐｇ／ｍＬ）ではマルチビオチン化形態と比較して感度の上昇を示し、これは低分子量の単離ドメインと一致していた。また、ウイルスサンプルでも感度の上昇が観察された：偽ウイルス（１６　ＴＣＩＤ５０／ｍＬ対２１　ＴＣＩＤ５０／ｍＬ）、熱ｅｍｐｉｇｅｎ不活性化ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（１６ｆｆｕ／ｍＬ対１０３ｆｆｕ／ｍＬ）、及びＸ線不活性化ウイルス（２８６対３０５ｐｆｕ／ｍＬ）。精製ＲＢＤの検出下限は４６ｐｇ／ｍＬであることが判明し、これは、低分子量の単離ドメインと一致していた。

【０３６３】

ナノボディをサンドイッチＥＬＩＳＡに使用した他の報告と同様に、ナノボディをシンプルなプレートに直接吸着させると、ビオチン化タンパク質及びストレプトアビジンでコーティングしたプレートよりもＥＬＩＳＡの成功率が低くなった。Ｆｃ融合体を使用すると、Ｆｃ部分は多くのリジン残基を有しているためビオチン化戦略が簡略化される、すなわち、標準的なプロトコルを採用することができる。捕捉剤としてのビオチンｘ－Ｃ５－Ｆｃとプローブ剤としてＦ２－Ｆｃ－ＨＲＰとからなる最適な組み合わせが同定された。この組み合わせにより、５１４ｐｇ／ｍＬの間の検出限界を有するＥＬＩＳＡが得られた（図１６）。ＥＬＩＳＡは線形応答を示し、これはスパイクを確実に定量するのに好適であることを示す。他の組み合わせでも、１ｎｇ／ｍＬ未満の検出限界が得られた。部位選択的なビオチン化を使用することにより、スパイクタンパク質で検出限界が１４７ｎｇ／

ｍＬに低下した。このように、ナノボディ対を使用することによって、スパイクタンパク質の異種生産をモニタリングするための実験室ツールとして簡単に使用できるＥＬＩＳＡが得られた。例えばＥ４８４Ｋ変異体を保有するスパイクタンパク質の新規バリアントが重要になるにつれて、プローブナノボディであるＣ５を変更する必要がでてくるであろう。ナノボディの利点は、ヒトの対応物と比較して、新たな抗原に対して比較的簡単に産生される点である。このように、この技術はプロセスをモニタリングするためのロバストなアッセイプラットフォームを提供する。

【０３６４】

また、偽型ウイルスを用いることによってインタクトなウイルス粒子として提示した場合にもＥＬＩＳＡがスパイクタンパク質に適合することが確認され、ナノボディが感染性ウイルスの一部としてネイティブに折り畳まれたタンパク質を認識できることが確認された。また、このアッセイがタンパク質の「品質」に対して感受性であり、（結合エピトープを化学的に変化させることが予想される）ホルムアルデヒドによって不活性化されたウイルスは検出されないことの証拠も得られた。中性洗剤ｅｍｐｉｇｅｎで不活性化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスは、１０３ｆｆｕ／ｍＬ（１４０　ＴＣＩＤ５０／ｍＬ）の感度で検出された。ｅｍｐｉｇｅｎがスパイクタンパク質の検出に影響を及ぼさなかったことを示すことによって、ｅｍｐｉｇｅｎが増加に関与している可能性が排除された。ｆｆｕ単位で１０００バイロン、各ビリオン中に２５個のスパイク、スパイク三量体の重量として６００ｋＤａの報告されている推定値を用いた場合、これは１ｍＬあたり約３０ｐｇのスパイクに対応する。この２０倍の増加は、スパイクタンパク質のウイルス膜の一部としての多価提示（アビディティ効果）に起因しているという仮説を立てた。タンパク質がウイルス膜上に提示される偽ウイルスは、２６　ＴＣＩＤ５０／ｍＬの比較的高感度で検出され、ＥＬＩＳＡ感度におけるアビディティ効果と一致していた。最後に、異なるプロトコルを用いて異なるラボで調製されたＸ線で不活性化（Ｌｅｕｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２０２０；Ａｆｒｏｕｇｈ　ｅｔ　ａｌ．，２０２０）されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２は、９０ｐｇ／ｍＬのスパイクに対応する３０５ｐｆｕ／ｍＬ（４３６　ＴＣＩＤ５０／ｍＬ）で検出され、これもアビディティ効果と一致していた。電離放射線とｅｍｐｉｇｅｎサンプルとの差は、プロトコルの違い及びスパイクへの損傷の可能性に起因すると考えられる。

【０３６５】

Ｃ１－Ｆｃ捕捉剤の部位特異的なビオチン化により、非特異的なビオチン化と比較して、全ての試験サンプルでＥＬＩＳＡが改善された。注目すべきは、これら剤で同じアビディティ効果が観察されたことである。ビオチン－ＳＳ－Ｃ５－ＦｃとＦ２－Ｆｃ－ＨＲＰとの組み合わせは、絶対項で＜２ｆｆｕのｅｍｐｉｇｅｎ不活性化ウイルスを検出することができた。

【０３６６】

参照文献

References

Amanat, F., K. M. White, L. Miorin, S. Strohmeier, M. McMahon, P. Meade, W. C. Liu, R. A. Albrecht, V. Simon, L. Martinez-Sobrido, T. Moran, A. Garcia-Sastre and F. Krammer (2020). "An In Vitro Microneutralization Assay for SARS-CoV-2 Serology and Drug Screening." Curr Protoc Microbiol 58(1): e108.

Atyeo, C. Slein, M.D. Fischinger, S. Burke, J. Schafer, A. Leist, S.R. Honko, A. Johnson, R. Storm, N. Bernett, M. Linde, C. Suscovich, T. Griffiths, A. Desjarlais, J.R. Juelg, B.D. Goutsmit, J. Baris, R., Alter, G. (2020) “Therapeutic potential of SARS-CoV-2-specific monoclonal antibody CR3022.” Cell Host and Microbe, Pre-Print SSRN: ssrn.com/abstract=3612156

Bird, L. E., H. Rada, J. Flanagan, J. M. Diprose, R. J. Gilbert and R. J. Owens (2014). "Application of In-Fusion cloning for the parallel construction of E. coli expression vectors." Methods Mol Biol 1116: 209-234.

Compte, M.; Harwood, S.L.; Muñoz, I.G.; Navarro, R.; Zonca, M.; Perez-Chacon, G.; Erce-Llamazares, A.; Merino, N.; Tapia-Galisteo, A.; Cuesta, A.M.; et al. A tumor-targeted trimeric 4-1BB-agonistic antibody induces potent anti-tumor immunity without systemic toxicity. Nat. Commun. 2018, 9, 4809

Detalle, L., T. Stohr, C. Palomo, P. A. Piedra, B. E. Gilbert, V. Mas, A. Millar, U. F. Power, C. Stortelers, K. Allosery, J. A. Melero and E. Depla (2016). "Generation and Characterization of ALX-0171, a Potent Novel Therapeutic Nanobody for the Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection." Antimicrob Agents Chemother 60(1): 6-13.

Dumet, C. Pottier, J. Gouilleux-Gruart, V. Watier, H. (2019) “Insights into the IgG heavy chain engineering patent landscape as applied to IgG4 antibody development.” MABS 11(8): 1341-1350

Els Conrath, K., M. Lauwereys, L. Wyns and S. Muyldermans (2001). "Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs." J Biol Chem 276(10): 7346-7350.

Hay, R. T. (2005). "SUMO: a history of modification." Mol Cell 18(1): 1-12.

Huo, J., A. Le Bas, R. R. Ruza, H. M. E. Duyvesteyn, H. Mikolajek, T. Malinauskas, T. K. Tan, P. Rijal, M. Dumoux, P. N. Ward, J. Ren, D. Zhou, P. J. Harrison, M. Weckener, D. K. Clare, V. K. Vogirala, J. Radecke, L. Moynie, Y. Zhao, J. Gilbert-Jaramillo, M. L. Knight, J. A. Tree, K. R. Buttigieg, N. Coombes, M. J. Elmore, M. W. Carroll, L. Carrique, P. N. M. Shah, W. James, A. R. Townsend, D. I. Stuart, R. J. Owens and J. H. Naismith (2020). "Neutralizing nanobodies bind SARS-CoV-2 spike RBD and block interaction with ACE2." Nat Struct Mol Biol. https://doi.org/10.1038/ s41594-020-0469-6.

Huo, J., Y. Zhao, J. Ren, D. Zhou, H. M. E. Duyvesteyn, H. M. Ginn, L. Carrique, T. Malinauskas, R. R. Ruza, P. N. M. Shah, T. K. Tan, P. Rijal, N. Coombes, K. R. Bewley, J. A. Tree, J. Radecke, N. G. Paterson, P. Supasa, J. Mongkolsapaya, G. R. Screaton, M. Carroll, A. Townsend, E. E. Fry, R. J. Owens and D. I. Stuart (2020). "Neutralization of SARS-CoV-2 by Destruction of the Prefusion Spike." Cell Host Microbe. https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.06.010

Jan ter Meulen Edward N. van den Brink Leo L. M. Poon, W. E. M., Cynthia S. W. Leung Freek Cox, Chung Y. Cheung, Arjen Q. Bakker, Johannes A. Bogaards, Els van Deventer, Wolfgang Preiser, Hans Wilhelm Doerr, Vincent T. Chow4 John de Kruif, Joseph S. M. Peiris, Jaap Goudsmit (2006). "Human Monoclonal Antibody Combinationagainst SARS Coronavirus: Synergy and Coverage of Escape Mutants." PLoS MEDICINE 3(7): e237.

Rogers, T. F., F. Zhao, D. Huang, N. Beutler, A. Burns, W. T. He, O. Limbo, C. Smith, G. Song, J. Woehl, L. Yang, R. K. Abbott, S. Callaghan, E. Garcia, J. Hurtado, M. Parren, L. Peng, S. Ramirez, J. Ricketts, M. J. Ricciardi, S. A.

Rawlings, N. C. Wu, M. Yuan, D. M. Smith, D. Nemazee, J. R. Teijaro, J. E. Voss, I. A. Wilson, R. Andrabi, B. Briney, E. Landais, D. Sok, J. G. Jardine and D. R. Burton (2020). "Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model." Science 15 Jun 2020: eabc7520 DOI: 10.1126/science.abc7520

Schepens, X. Saelens and J. S. McLellan (2020). "Structural Basis for Potent Neutralization of Betacoronaviruses by Single-Domain Camelid Antibodies." Cell 181(6): 1436-1441.

Suzuki, S. Annaka, H. Konno, S. Kumagai, I. Asano, R (2018). "Engineering the hinge region of human IfF1 Fc-fused bispecific antibodies to improve fragmentation resistance." Nature Scientific Reports 8:17253 DOI:10.1038/s41598-018-35489-y

von Krbek, L. K., A. J. Achazi, S. Schoder, M. Gaedke, T. Biberger, B. Paulus and C. A. Schalley (2017). "The Delicate Balance of Preorganisation and Adaptability in Multiply Bonded Host-Guest Complexes." Chemistry 23(12): 2877-2883.

Wrapp, D., D. De Vlieger, K. S. Corbett, G. M. Torres, N. Wang, W. Van Breedam, K. Roose, L. van Schie, V.-C. C.-R. Team, M. Hoffmann, S. Pohlmann, B. S. Graham, N. Callewaert, B.

Zivanov, J. et al. New tools for automated high-resolution cryo-EM structure determination in RELION-3. *Elife* **7**, (2018).

Punjani, A., Rubinstein, J. L., Fleet, D. J. & Brubaker, M. A. cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nat Methods* **14**, 290-296 (2017).

Asarnow, D., Palovcak, E. & Cheng, Y. UCSF pyem v0.5. Zenodo. *https://doi.org/10.5281/zenodo.3576630* (2019).

Pettersen, E. F. et al. UCSF chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comp.l Chem,* **25**, 1605-1612 (2004).

Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Struct Biol* **60**, 2126-2132 (2004).

Liebschner, D. et al. Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in Phenix. *Acta Crystallogr D Struct Biol* **75**, 861-877 (2019).

Walls, A. C. et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* **181**, 281-292.e6 (2020).

Murshudov, G. N. et al. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**, 355-367 (2011).

Burnley, T., Palmer, C. M. & Winn, M. Recent developments in the CCP-EM software suite. *Acta Crystallogr D Struct Biol* **73**, 469-477 (2017).

Wagner, T. et al. SPHIRE-crYOLO is a fast and accurate fully automated particle picker for cryo-EM. *Commun Biol* **2**, 218 (2019).

Huo, J. *et al.* Neutralization of SARS-CoV-2 by Destruction of the Prefusion Spike. *Cell Host Microbe*, doi:10.1016/j.chom.2020.06.010 (2020).

Kuan-Ying A. Huangl, T. K. T., Ting-Hua Chenl, Chung-Guei Huangl, Ruth Harvey, Saira Hussain, Cheng-Pin Chenl, Adam Hardingl, Javier Gilbert- Jaramillol, Xu Liul, Michael Knightl, Lisa Schimanskil, Shin-Ru Shihl, Yi- Chun Lin, Chien-Yu Chengl, Shu-Hsing Chengl, Yhu-Chering Huang, Tzou-Yien ,Linl Jia-Tsrong Jan, Che Ma, William Jamesl, Rodney S. Danielsl, John W. McCauleyl, Pramila Rijall, Alain R. Townsend. Breadth and function of antibody response to acute SARSCoV-2 infection in humans. *Plos pathogens* **17**, e1009352 (2021).

Zhou, D. *et al.* Structural basis for the neutralization of SARS-CoV-2 by an antibody from a convalescent patient. *Nat Struct Mol Biol* **27**, 950-958, doi:10.1038/s41594-020-0480-y (2020).

Nettleship, J. E., Rahman-Huq, N. & Owens, R. J. The production of glycoproteins by transient expression in Mammalian cells. *Methods Mol Biol* **498**, 245-263 doi:10.1007/978-1-59745-196-3_16 (2009).

Chan, J. F. et al. Simulation of the Clinical and Pathological Manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in a Golden Syrian Hamster Model: Implications for Disease Pathogenesis and Transmissibility. *Clin Infect Dis* **71**, 2428-2446, doi:10.1093/cid/ciaa325 (2020).

Imai, M. et al. Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 16587-16595, doi:10.1073/pnas.2009799117 (2020).

Sia, S. F. et al. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature* **583**, 834-838, doi:10.1038/s41586-020-2342-5 (2020).

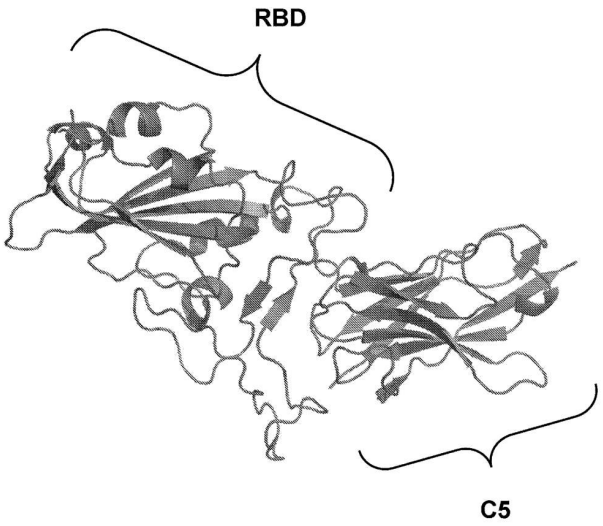
Zhou D et al Evidence of escape of SARS-CoV-2 variant B.1.351 from natural and vaccine-induced sera Cell 2021 Apr 29;184(9):2348-2361

Leung, B., Tran, K., Audet, J. et al. In Vitro inactivation of SARS-CoV-2 using gamma radiation. Applied Biosafety 25(3) (2020). https:// doi.org/10.1177/1535676020934242

Afrough, B., Eakins, J., Durley-White, S. et al. X-ray inactivation of RNA viruses without loss of biological characteristics. Sci Rep 10, 21431 (2020).

【図面】

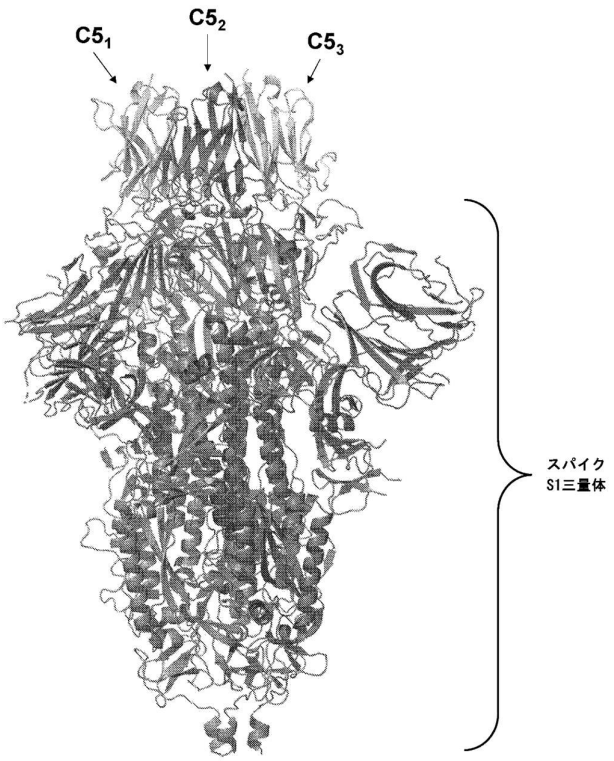
【図１Ａ】



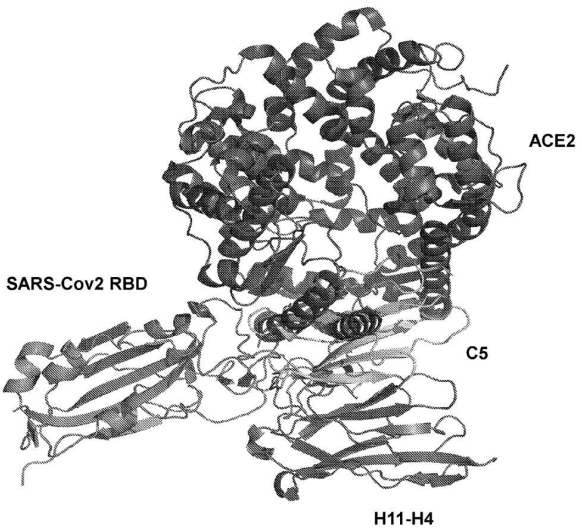
【図１Ｂ】



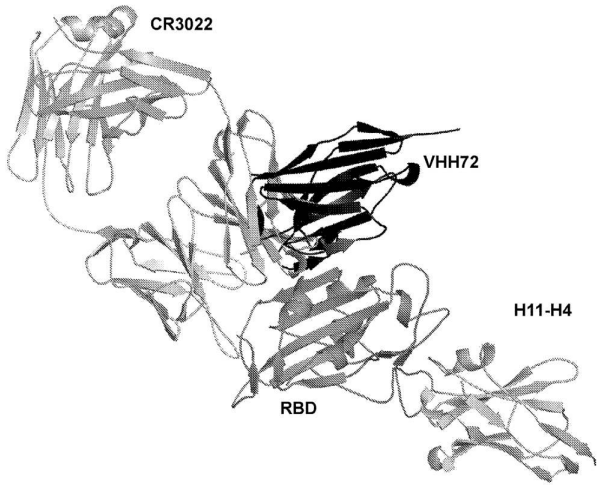
【図２】



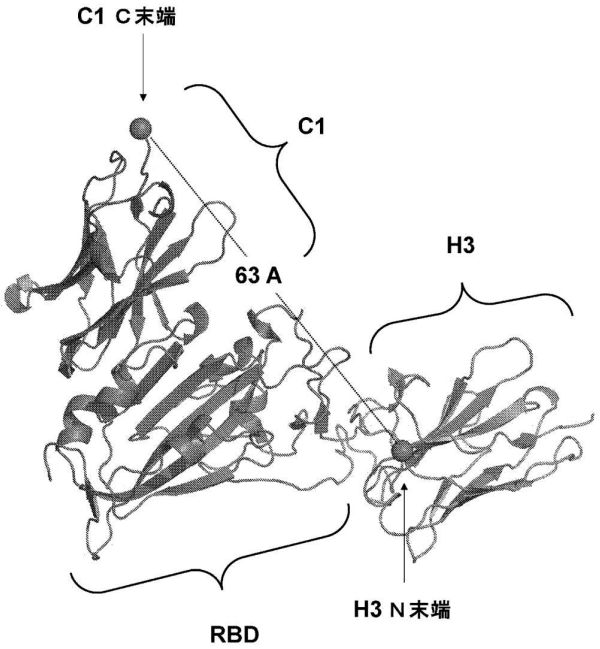
【図３Ａ】



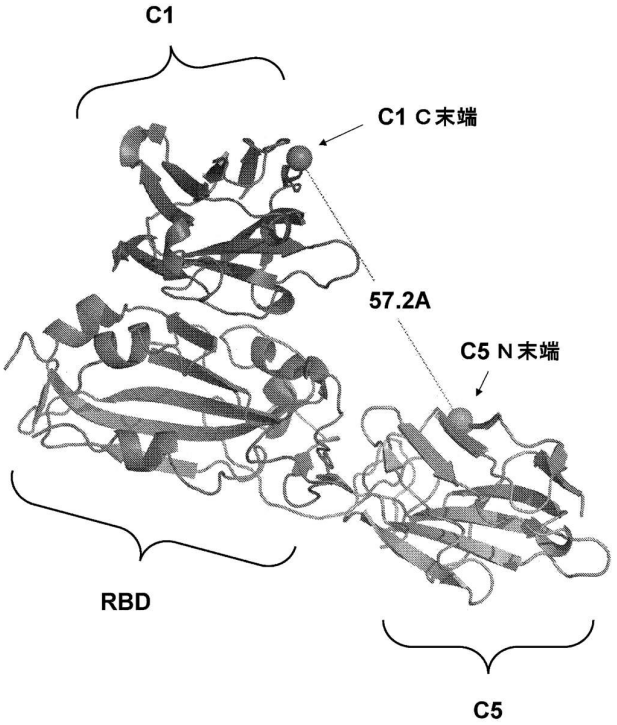
【図３Ｂ】



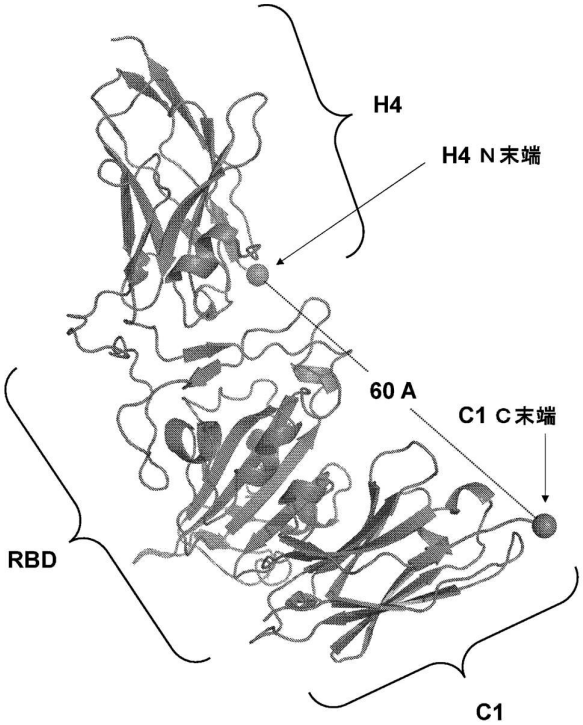
【図４】



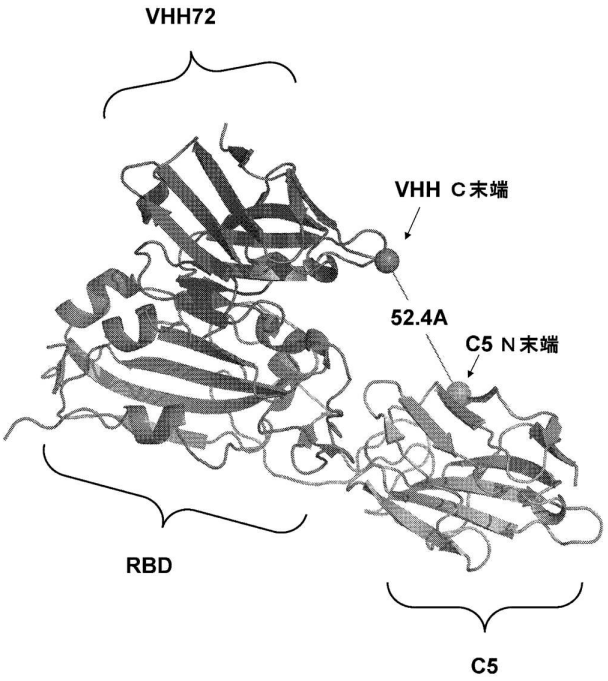
【図５ａ】



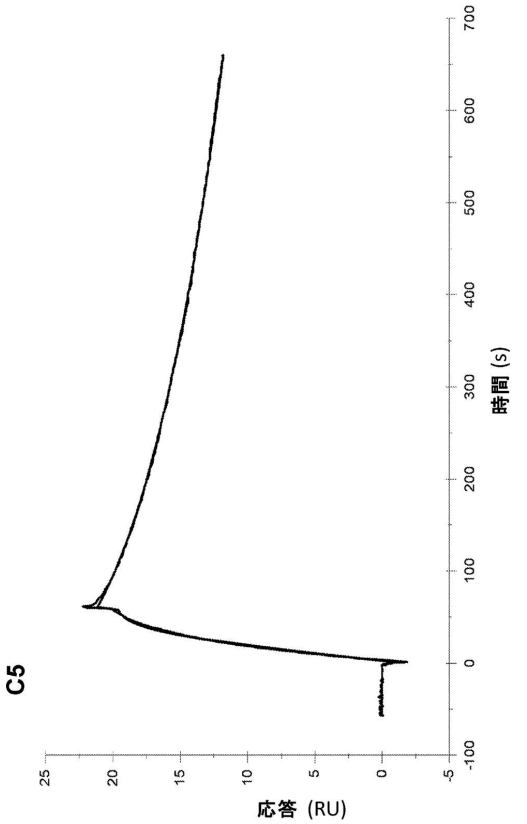
【図５ｂ】



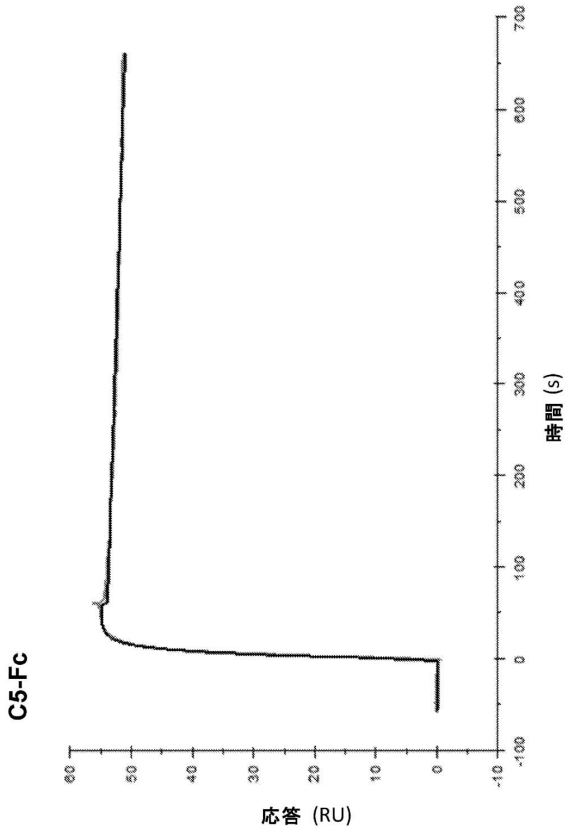
【図６】



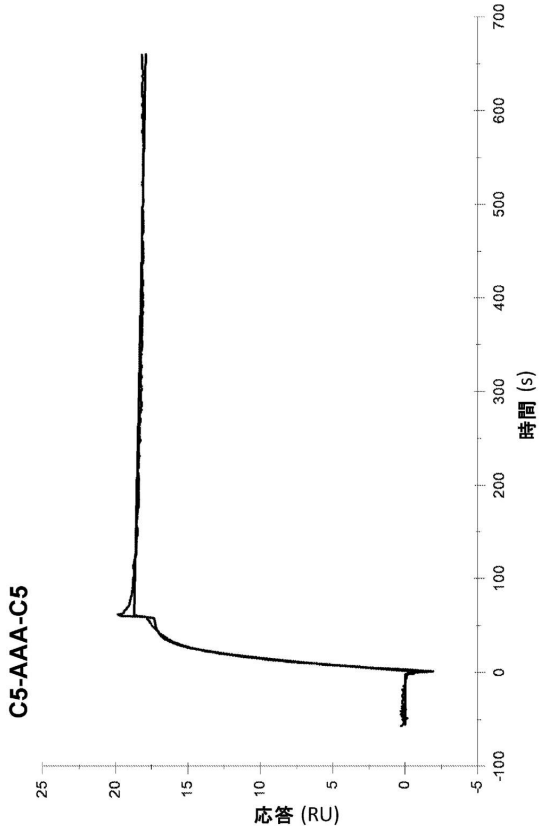
【図７Ａ】



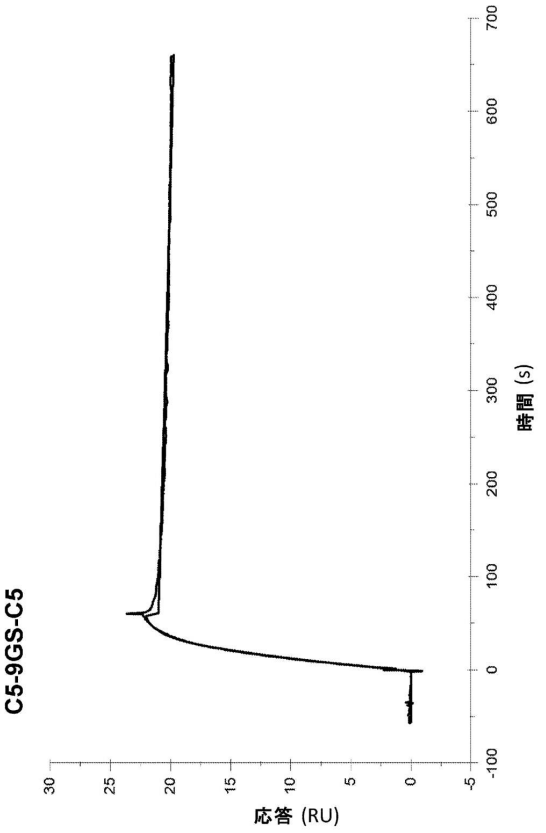
【図７Ｂ】



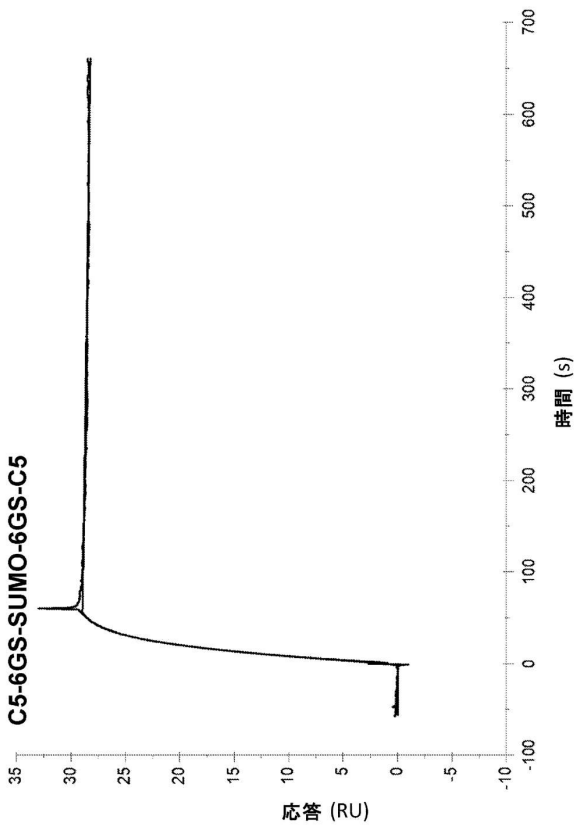
【図７Ｃ】



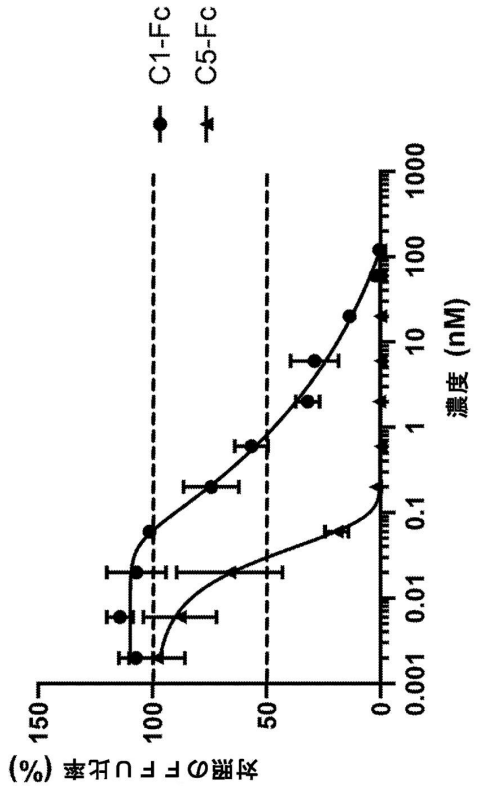
【図７Ｄ】



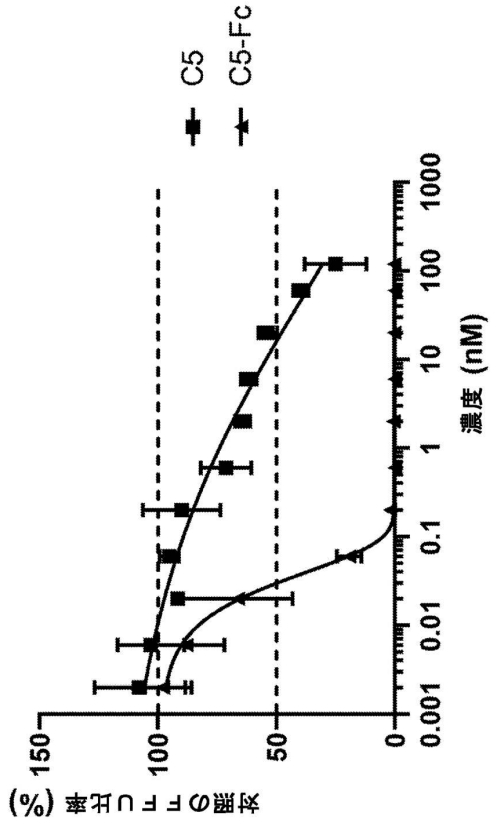
【図７Ｅ】



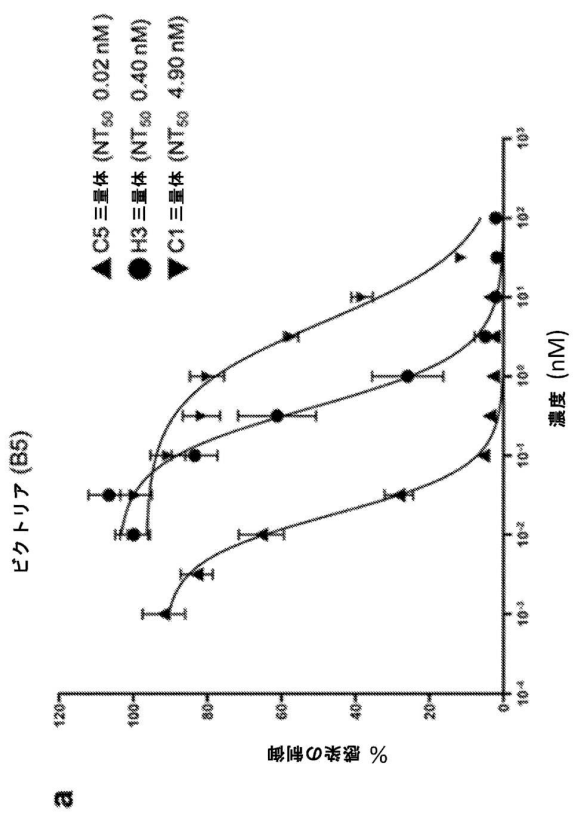
【図８Ａ】



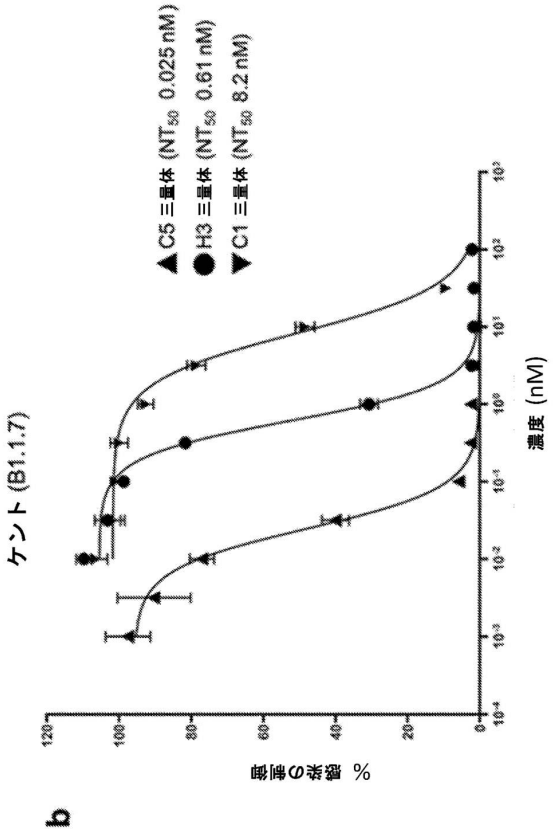
【図８Ｂ】



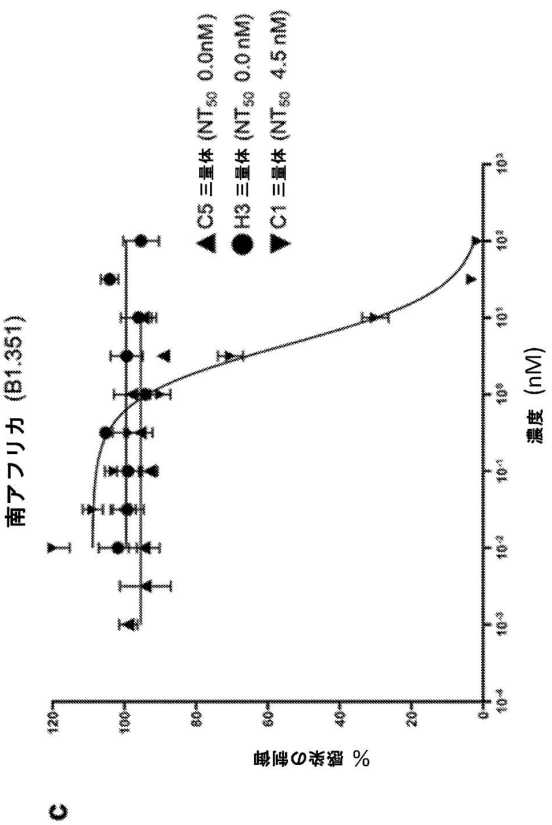
【図９Ａ】



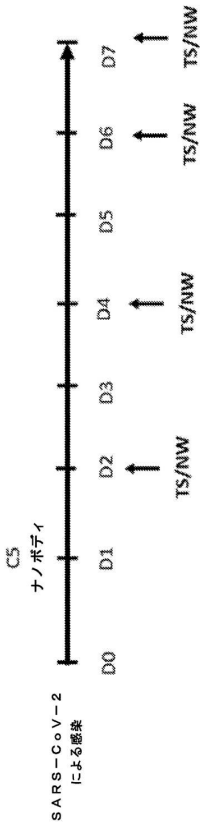
【図９Ｂ】



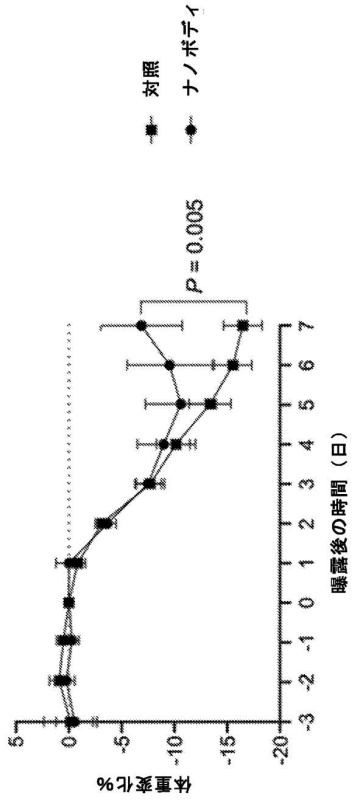
【図９Ｃ】



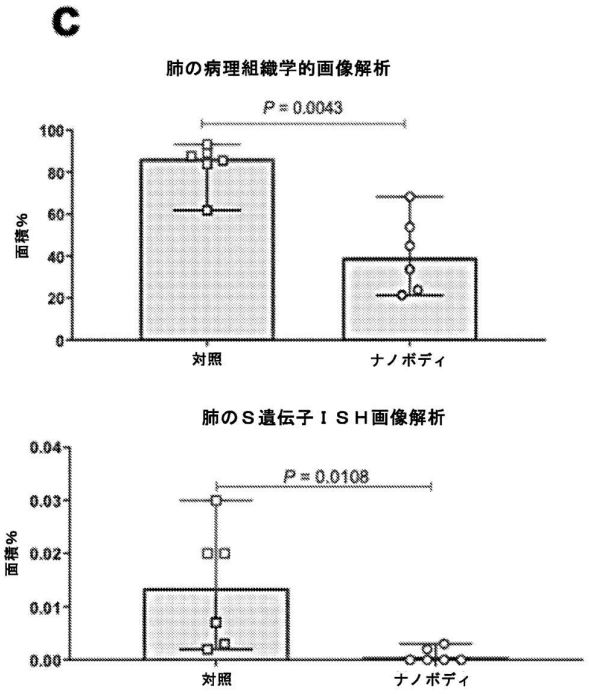
【図１０Ａ】



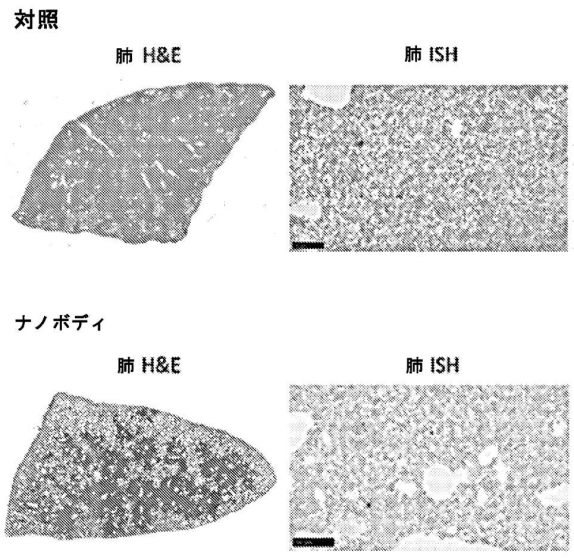
【図１０Ｂ】



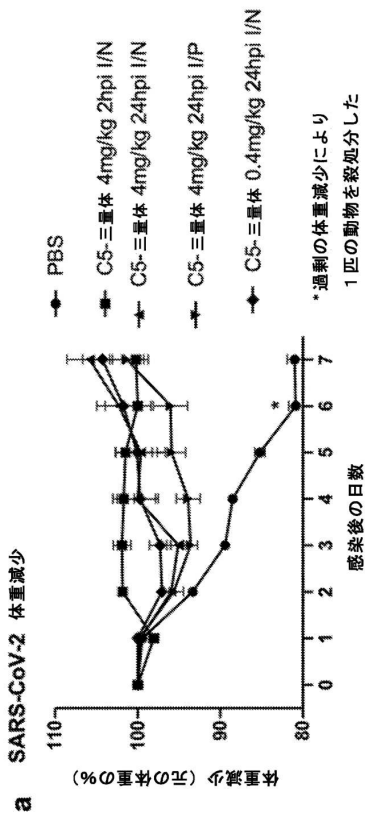
【図１０Ｃ】



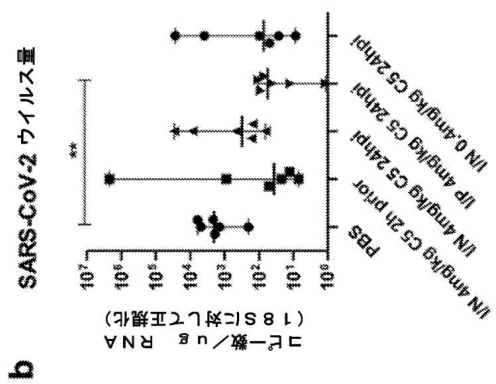
【図１０Ｄ】



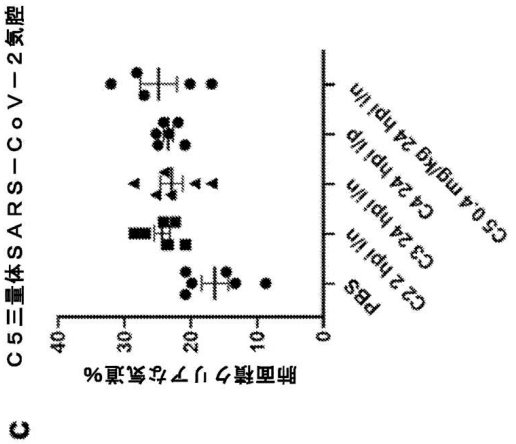
【図１１Ａ】



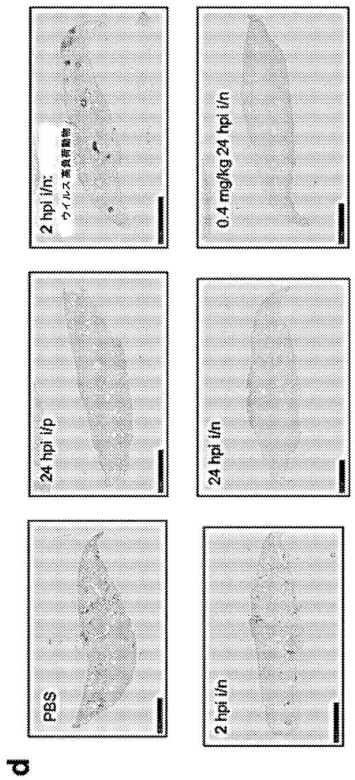
【図１１Ｂ】



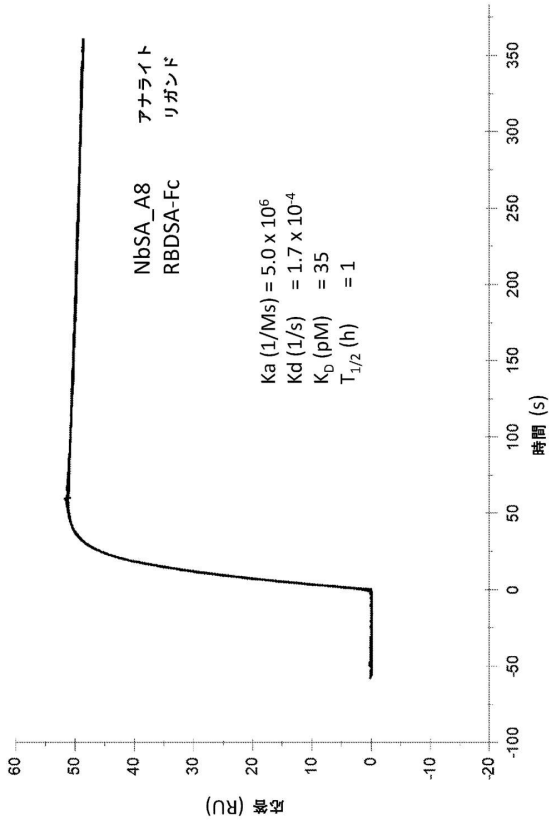
【図１１Ｃ】



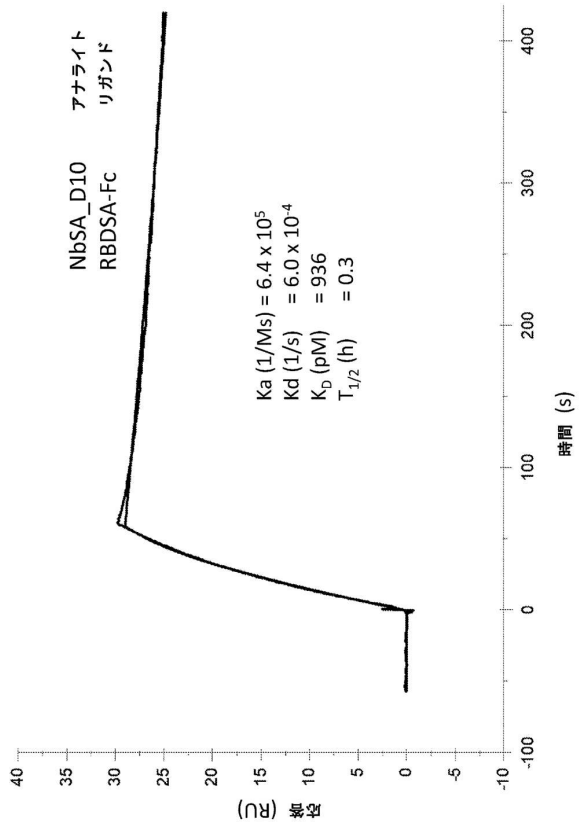
【図１１Ｄ】



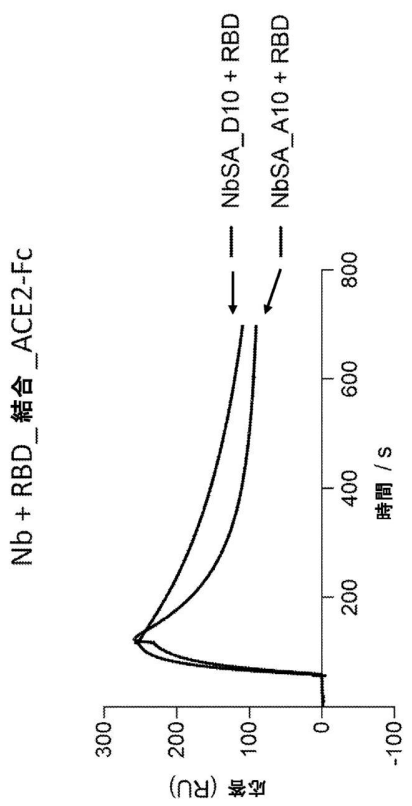
【図１２Ａ】



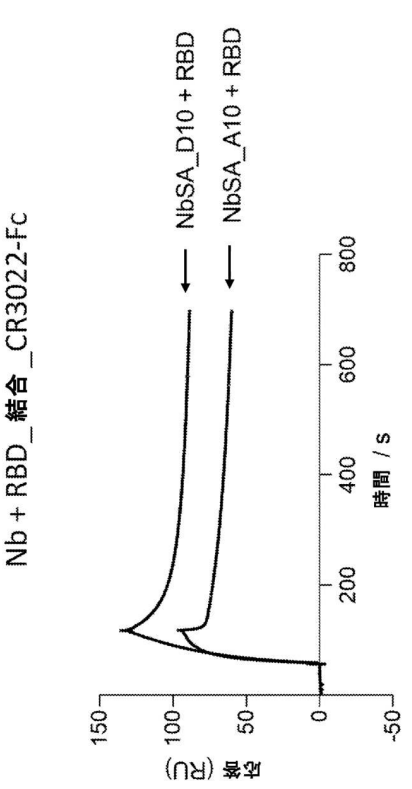
【図１２Ｂ】



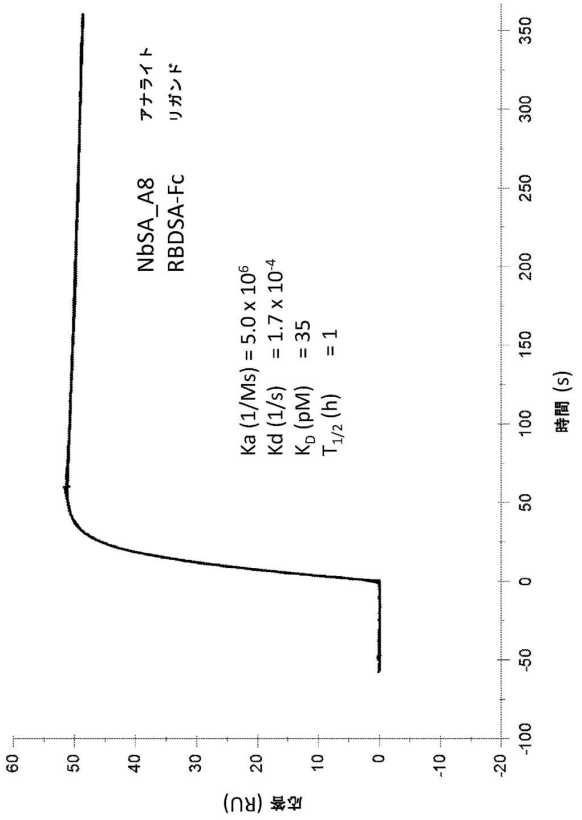
【図１２Ｃ】



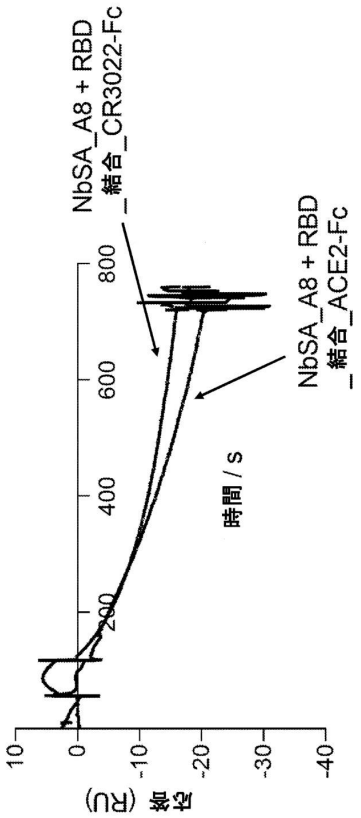
【図１２Ｄ】



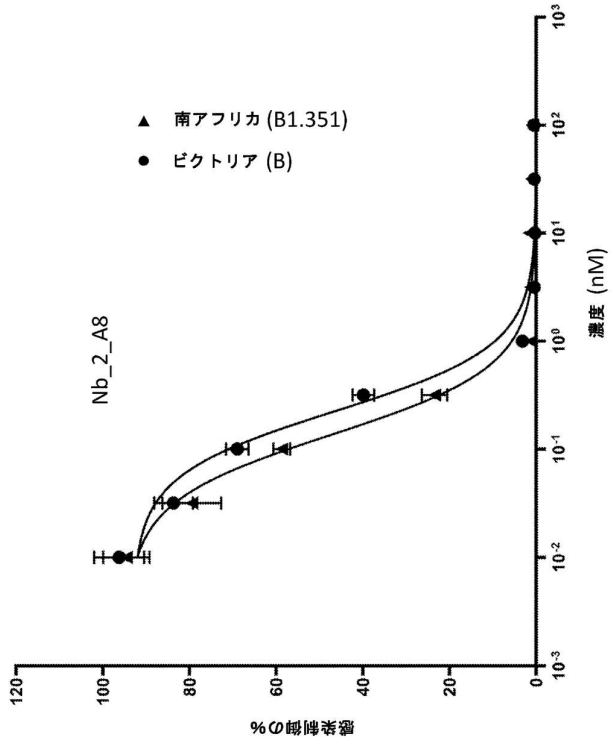
【図１３Ａ】



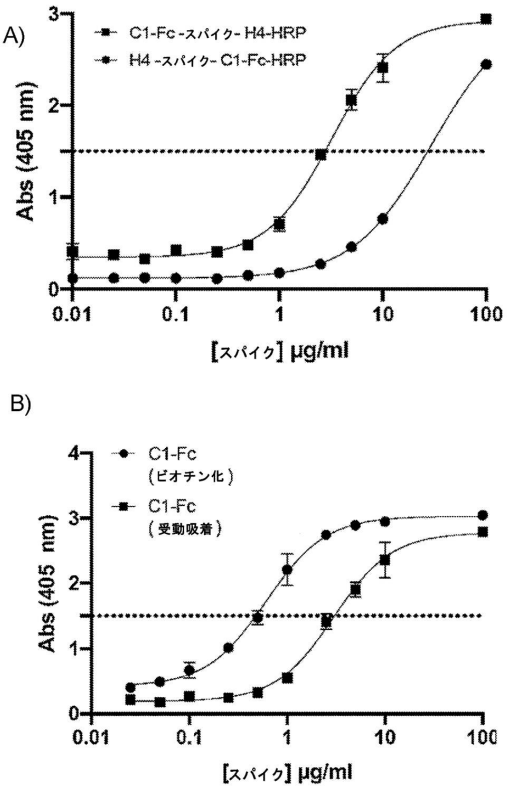
【図１３Ｂ】



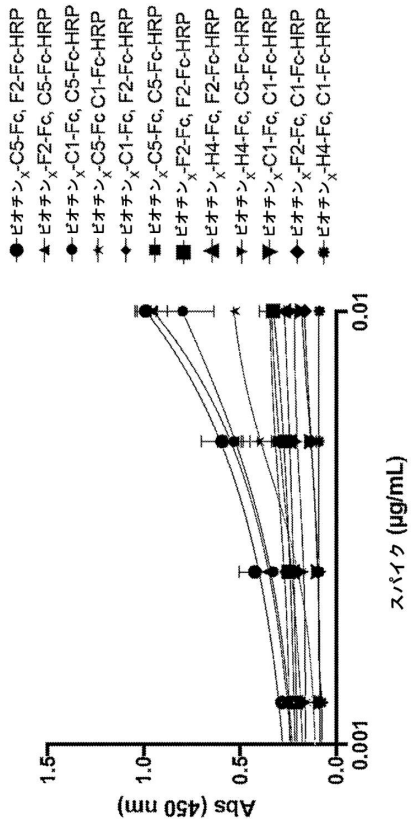
【図１４】



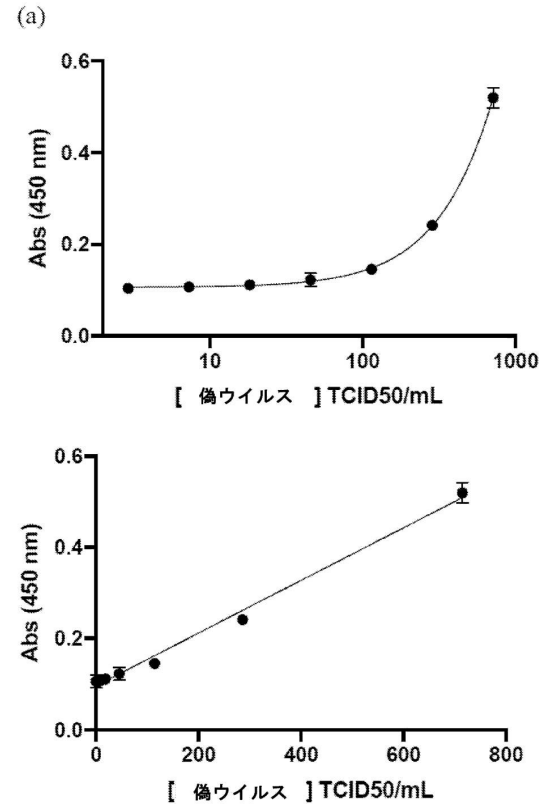
【図１５】



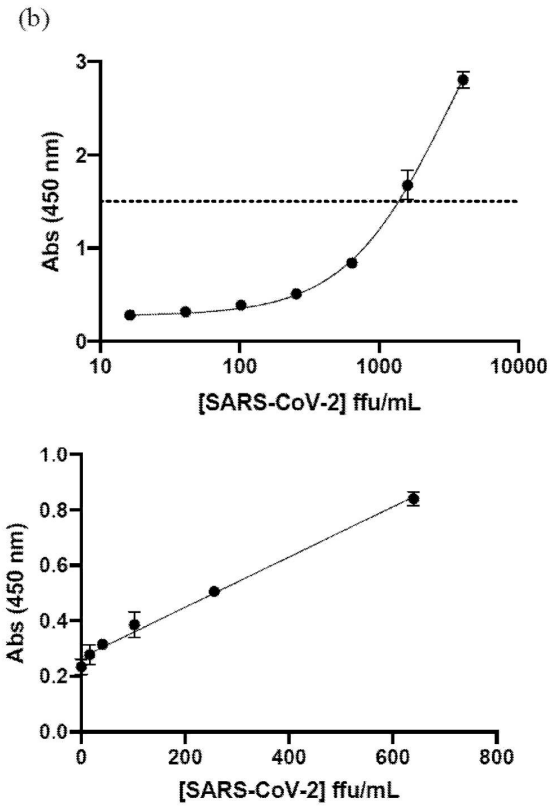
【図１６】



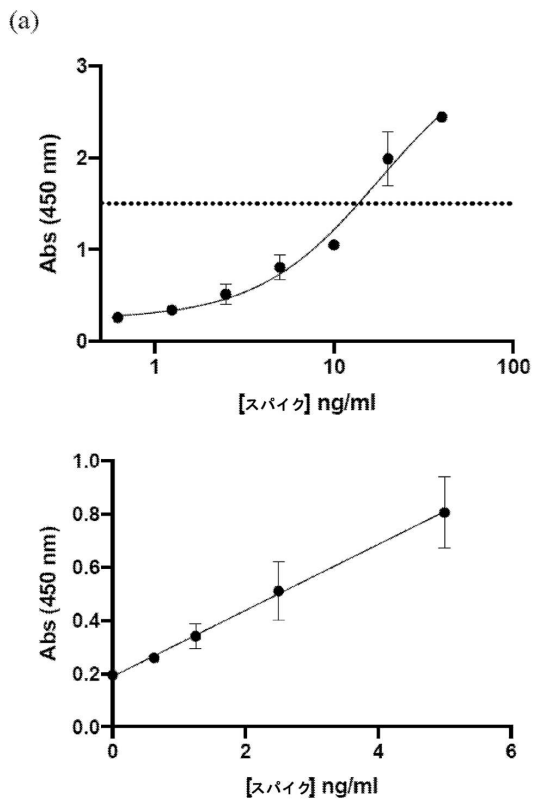
【図１７Ａ】



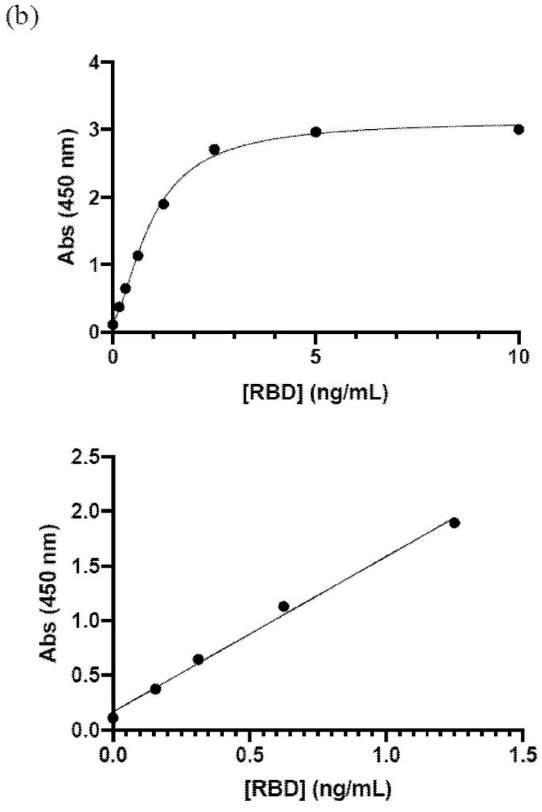
【図１７Ｂ】



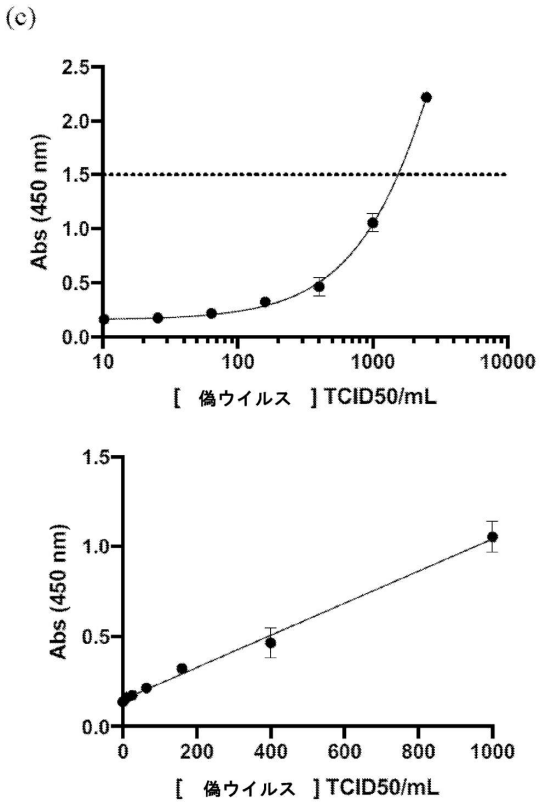
【図１８Ａ】



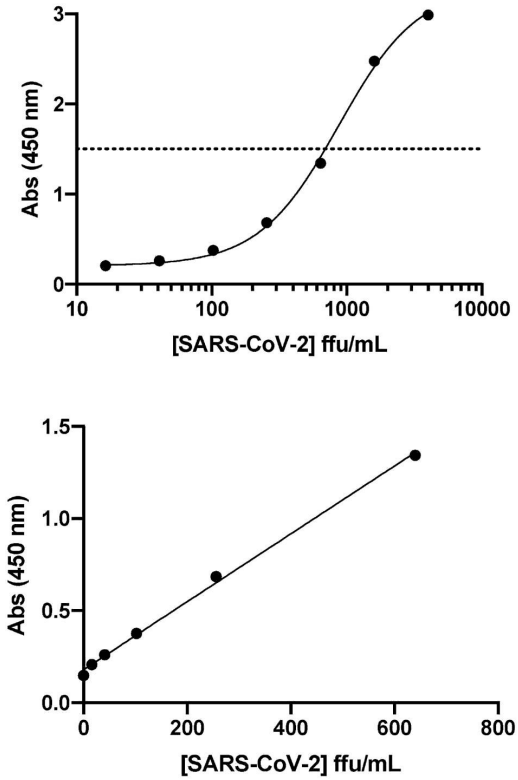
【図１８Ｂ】



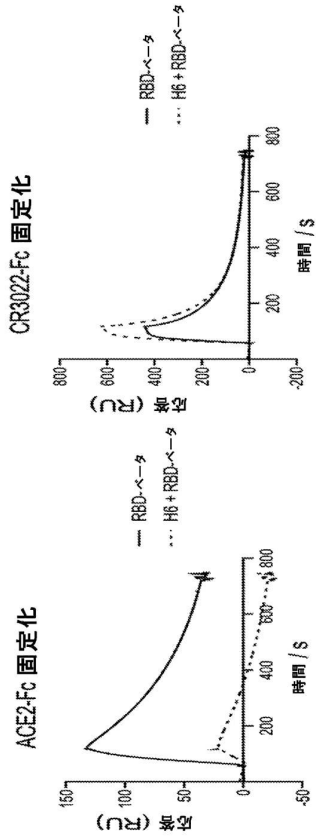
【図１８Ｃ】



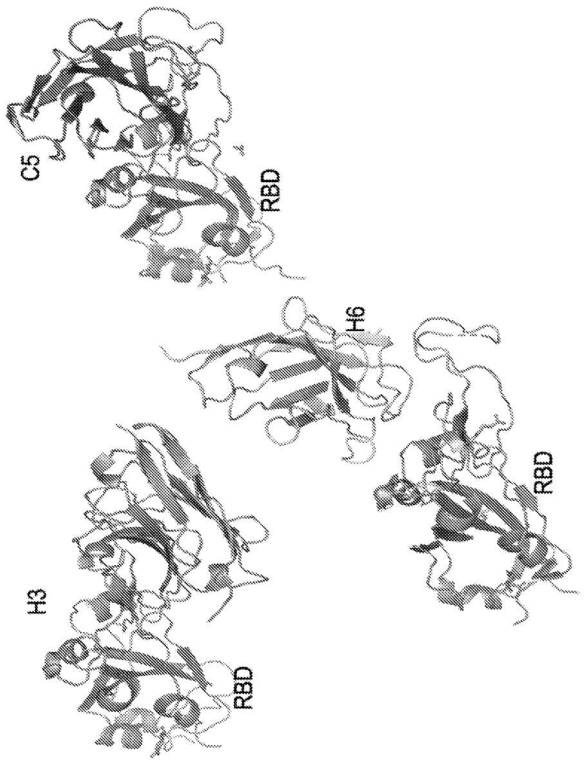
【図１８Ｄ】



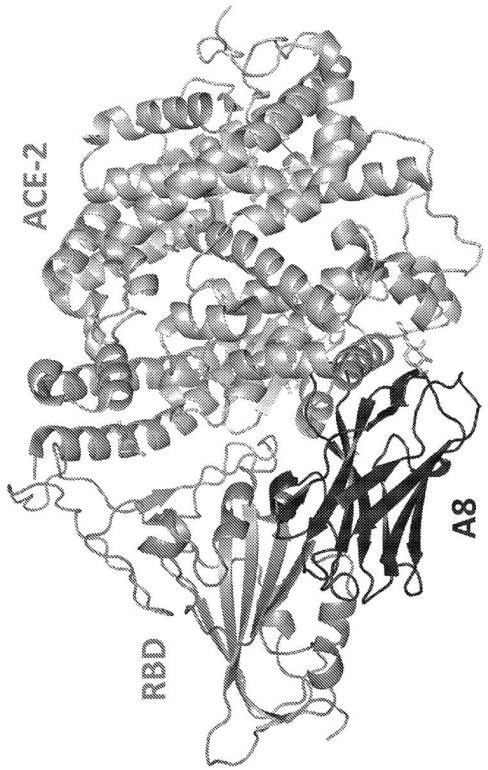
【図１９】



【図２０】



【図２１】



【配列表】

2023542107000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2021/052383

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/10 A61K39/395 A61P31/14 G01N33/569 G01N33/577
ADD.

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)
C07K G01N A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Schoof Michael ET AL: "An ultra-potent synthetic nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by locking Spike into an inactive conformation", bioRxiv, 17 August 2020 (2020-08-17), XP055865529, DOI: 10.1101/2020.08.08.238469 Retrieved from the Internet: URL:https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.08.08.238469v2.full.pdf [retrieved on 2021-11-24] table 1 figures 3, 4 page 6, lines 192-194 ----- -/--	3-32

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] 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	Date of mailing of the international search report
13 December 2021	11/02/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Brouns, Gaby

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2021/052383

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. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] 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 13ter.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 13ter.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.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

International application No.
PCT/GB2021/052383

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

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

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

2. ☒ Claims Nos.: 1, 2(completely); 4-7, 9-32(partially)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

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

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:
3-32(partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 3-32(partially)

Related to an ISVD antibody binding to SARS-CoV-2 spike protein comprising the CDRs defined by SEQ ID NO10-12 (C5); interrelated multivalent polypeptides, coronavirus binding molecule, polynucleotide, expression vector, host cell or cell line, method of production, pharmaceutical composition, as well as ISVD antibody for use in medicine, in particular in a method of treatment or prophylaxis of coronavirus, pharmaceutical device, method of diagnosing coronavirus infection, method of detecting coronavirus, assay or kit

---

2. claims: 3-32(partially)

As for invention 1 but relating to an ISVD defined by SEQ ID NO:196-198 (2_A8).

---

3. claims: 3-32(partially)

As for invention 1 but relating to an ISVD defined by SEQ ID NO:7-9 (C1).

---

4. claims: 3-32(partially)

As for invention 1 but relating to an ISVD defined by SEQ ID NO:1-3 (B12).

---

5. claims: 3-32(partially)

As for invention 1 but relating to an ISVD defined by SEQ ID NO:4-6 (F2).

---

6. claims: 3-32(partially)

As for invention 1 but relating to an ISVD defined by SEQ ID NO:13-15 (H3).

---

7. claims: 3-32(partially)

As for invention 1 but relating to an ISVD defined by SEQ ID NO:190-192 (NbSA_A10).

---

8. claims: 3-32(partially)

As for invention 1 but relating to an ISVD defined by SEQ ID

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

NO:193-195 (NbSA_D10).
---

9. claims: 3-32(partially)

As for invention 1 but relating to an ISVD defined by SEQ ID NO:199-201 (3_C5).
---

10. claims: 3-32(partially)

As for invention 1 but relating to an ISVD defined by SEQ ID NO:202-204 (8_G11).
---

11. claims: 3-32(partially)

As for invention 1 but relating to an ISVD defined by SEQ ID NO:205-207 (12_F11).
---

12. claims: 3-32(partially)

As for invention 1 but relating to an ISVD defined by SEQ ID NO:235-237 (VHH_6).
---

13. claims: 14-32(partially)

Related to a coronavirus binding molecule comprising a first and second antigen binding molecule that binds to all or part of a first and second epitope comprised within a coronavirus protein, respectively, linked via a ubiquitin or ubiquitin-like spacer, wherein the antigen binding molecules are not the defined ISVD of inventions 1-12; the invention encompasses interrelated polynucleotide, expression vector, host cell or cell line, method of production, pharmaceutical composition, as well as ISVD antibody for use in medicine, in particular in a method of treatment or prophylaxis of coronavirus, pharmaceutical device, method of diagnosing coronavirus infection, method of detecting coronavirus, assay or kit.

International Application No. PCT/GB2021/052383

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 1, 2(completely); 4-7, 9-32(partially)

Claims 1 and 2 define the immunoglobulin single domain (ISVD) antibodies by only one or two CDRs respectively, which does not sufficiently structurally define the claimed ISVD antibodies and does not allow a meaningful search.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines C-IV, 7.2), should the problems which led to the Article 17(2) PCT declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2021/052383

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Bracken Colton J ET AL: "Bi-paratopic and multivalent human VH domains neutralize SARS-CoV-2 by targeting distinct epitopes within the ACE2 binding interface of Spike", bioRxiv, 10 August 2020 (2020-08-10), XP055852805, DOI: 10.1101/2020.08.08.242511 Retrieved from the Internet: URL:https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.08.08.242511v1.full.pdf [retrieved on 2021-10-19] page 6, paragraphs 1,2 figures 3B, 3C, 3D, 4A, 4B table 2	3-32
X	& Bracken Colton J ET AL: "Supplemental Information: Bi-paratopic and multivalent human VH domains neutralize SARS-CoV-2 by targeting distinct epitopes within the ACE2 binding interface of Spike", bioRxiv, 10 August 2020 (2020-08-10), XP055869139, DOI: 10.1101/2020.08.08.242511 Retrieved from the Internet: URL:https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.08.08.242511v1.supplementary-material [retrieved on 2021-12-03] figures S7, S8, S12 table S3	3-32
X	LI WEI ET AL: "High Potency of a Bivalent Human VH Domain in SARS-CoV-2 Animal Models", CELL, ELSEVIER, AMSTERDAM NL, vol. 183, no. 2, 4 September 2020 (2020-09-04), page 429, XP086297482, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/J.CELL.2020.09.007 [retrieved on 2020-09-04] figures 1B, 1E, 3, 5, 6	3-32
X	HUO JIANDONG ET AL: "Neutralizing nanobodies bind SARS-CoV-2 spike RBD and block interaction with ACE2", NAT. STRUCT. MOL. BIOL, vol. 27, no. 9, 13 July 2020 (2020-07-13), pages 846-854, XP037398758, ISSN: 1545-9993, DOI: 10.1038/S41594-020-0469-6 cited in the application figures 2, 3	3-32

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2021/052383

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Xiang Yufei ET AL: "Versatile, Multivalent Nanobody Cocktails Efficiently Neutralize SARS-CoV-2", bioRxiv, 25 August 2020 (2020-08-25), XP055852802, United States DOI: 10.1101/2020.08.24.264333 Retrieved from the Internet: URL:https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.08.24.264333v3.full.pdf [retrieved on 2021-10-19] figures 1, 5 -----	3-32
X	DANIEL WRAPP ET AL: "Structural Basis for Potent Neutralization of Betacoronaviruses by Single-Domain Camelid Antibodies", CELL, vol. 181, no. 5, 28 May 2020 (2020-05-28), pages 1004-1015.e15, XP055764639, Amsterdam NL ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.031 figures 4, 6, 7 -----	3-32
A	EP 2 727 940 A1 (SAMSUNG ELECTRONICS CO LTD [KR]) 7 May 2014 (2014-05-07) figure 3 claim 5 -----	5,7,14, 15
A	TESFAYE GELANEW ET AL: "Development and characterization of serotype-specific monoclonal antibodies against the dengue virus-4 (DENV-4) non-structural protein (NS1)", VIROLOGY JOURNAL, vol. 15, no. 1, 1 December 2018 (2018-12-01), XP055606816, DOI: 10.1186/s12985-018-0925-7 -----	5,7,14, 15
X,P	Wu Xilin ET AL: "Increased neutralization of SARS-CoV-2 Delta variant by nanobody (Nb22) and the structural basis", bioRxiv, 7 September 2021 (2021-09-07), XP055871899, DOI: 10.1101/2021.09.06.459055 Retrieved from the Internet: URL:https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.09.06.459055v1.full.pdf [retrieved on 2021-12-11] figures 1, 2 ----- -/--	3-32

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2021/052383

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	GÜTTLER THOMAS ET AL: "Neutralization of SARS-CoV-2 by highly potent, hyperthermostable, and mutation-tolerant nanobodies", THE EMBO JOURNAL / EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION, vol. 40, no. 19, 9 August 2021 (2021-08-09), page 107985, XP055858032, Oxford ISSN: 0261-4189, DOI: 10.15252/embj.2021107985 Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8420576/pdf/EMBJ-40-e107985.pdf> page 15, left-hand column, paragraph 1 - right-hand column, paragraph 1 figure 9 -----	3-32
X,P	XU JIANLIANG ET AL: "Nanobodies from camelid mice and llamas neutralize SARS-CoV-2 variants", NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP UK, LONDON, vol. 595, no. 7866, 7 June 2021 (2021-06-07), pages 278-282, XP037500110, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/S41586-021-03676-Z [retrieved on 2021-06-07] figures 3, S6B, S6C -----	3-32
X,P	Anonymous: "VIB - ExeVir's COVID-19 antibody candidate neutralizes coronavirus Variants of Concern", , 13 July 2021 (2021-07-13), XP055871900, Retrieved from the Internet: URL:https://vib.be/news/exevirs-covid-19-antibody-candidate-neutralizes-coronavirus-variants-concern [retrieved on 2021-12-11] the whole document ----- -/--	3-32

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2021/052383

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	HUO JIANDONG ET AL: "A potent SARS-CoV-2 neutralising nanobody shows therapeutic efficacy in the Syrian golden hamster model of COVID-19", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 12, no. 1, 22 September 2021 (2021-09-22), XP055871897, DOI: 10.1038/s41467-021-25480-z Retrieved from the Internet: URL:https://www.nature.com/articles/s41467-021-25480-z.pdf>	

T	Girt Georgina C ET AL: "The use of nanobodies in a sensitive ELISA test for SARS-CoV-2 Spike 1 protein", Royal Society open science, 30 September 2021 (2021-09-30), pages 211016-211016, XP055872145, DOI: 10.1098/rsos.211016 Retrieved from the Internet: URL:https://royalsocietypublishing.org/doi/pdf/10.1098/rsos.211016 [retrieved on 2021-12-13] & Girt Georgina C. ET AL: "Supporting information for The use of nanobodies in a sensitive ELISA test for SARS-CoV-2 Spike 1 protein", Royal Society Open Science, vol. 8, no. 9, 30 September 2021 (2021-09-30), XP055872156, DOI: 10.1098/rsos.211016 Retrieved from the Internet: URL:https://rs.figshare.com/articles/journal_contribution/Additional_Figures_from_The_use_of_nanobodies_in_a_sensitive_ELISA_test_for_SARS-CoV-2_Spike_1_protein/16704916?backTo=/collections/Supplementary_material_from_The_use_of_nanobodies_in_a_sensitive_ELISA_test_for_SARS-CoV-2_Spike_1_protein_/564172>	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/GB2021/052383

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2727940 A1	07-05-2014	CN 103788212 A	14-05-2014
		EP 2727940 A1	07-05-2014
		JP 2014090721 A	19-05-2014
		KR 20140055536 A	09-05-2014
		US 2014127210 A1	08-05-2014

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		
Ｃ１２Ｐ	*21/08 (2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	21/08		
Ｃ０７Ｋ	*16/46 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/46		
Ｃ０７Ｋ	*16/10 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/10		
Ａ６１Ｋ	*39/395 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｓ	
Ａ６１Ｐ	*31/14 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/14		
Ａ６１Ｋ	*47/66 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/66		
Ｇ０１Ｎ	*33/53 (2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｄ	
Ｇ０１Ｎ	*33/569 (2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/569	Ｌ	

(32)優先日　令和3年6月10日(2021.6.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＷＥＥＮ

弁理士　田村 弥栄子
(74)代理人　100174296
弁理士　當麻 博文
(74)代理人　100137729
弁理士　赤井 厚子
(74)代理人　100151301
弁理士　戸崎 富哉
(74)代理人　100152308
弁理士　中 正道
(74)代理人　100201558
弁理士　亀井 恵二郎
(72)発明者　フォ、ジェンドン
イギリス国、オーエックス１１　０エフエー オックスフォードシャー ディドコット、ハーウェル キャンパス、リサーチ コンプレックス アット ハーウェル、ザ ロザリンド フランクリン インスティテュート内
(72)発明者　オーウェンズ、レイモンド
イギリス国、オーエックス１１　０エフエー オックスフォードシャー ディドコット、ハーウェル キャンパス、リサーチ コンプレックス アット ハーウェル、ザ ロザリンド フランクリン インスティテュート内
(72)発明者　ネイスミス、ジェイムズ
イギリス国、オーエックス１１　０エフエー オックスフォードシャー ディドコット、ハーウェル キャンパス、リサーチ コンプレックス アット ハーウェル、ザ ロザリンド フランクリン インスティテュート内

Ｆターム（参考）　4B064　AG27 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065　AA01X AA57X AA72X AA88X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46

Fターム（参考） 4C076 AA95 BB11 CC35 CC41 EE59 FF70
4C085 AA14 BA71 CC23 DD61 EE01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74