(19) Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 20 2021 004 130 U1** 2022.12.01

(12) # Gebrauchsmusterschrift

(21) Aktenzeichen: **20 2021 004 130.3**
(22) Anmeldetag: **03.02.2021**
(67) aus Patentanmeldung: **EP 21 70 4439.5**
(47) Eintragungstag: **26.10.2022**
(45) Bekanntmachungstag im Patentblatt: **01.12.2022**

(51) Int Cl.: ***C12N 15/86*** (2006.01)
C12N 15/50 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

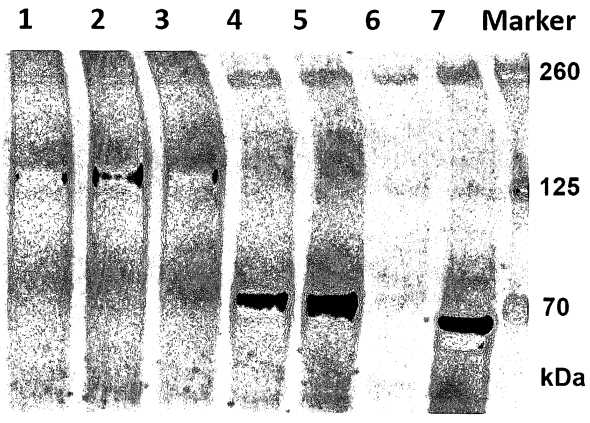
PCT/EP2020/052775	**04.02.2020**	**WO**
63/129,395	**22.12.2020**	**US**
PCT/EP2020/059687	**03.04.2020**	**WO**
PCT/EP2020/065091	**29.05.2020**	**WO**
PCT/EP2020/079831	**22.10.2020**	**WO**
PCT/EP2020/079973	**23.10.2020**	**WO**
PCT/EP2020/080713	**02.11.2020**	**WO**
63/112,106	**10.11.2020**	**US**
63/113,159	**12.11.2020**	**US**
63/119,390	**30.11.2020**	**US**

(73) Name und Wohnsitz des Inhabers:
CureVac AG, 72076 Tübingen, DE

(74) Name und Wohnsitz des Vertreters:
Graf von Stosch Patentanwaltsgesellschaft mbH, 80538 München, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen.

(54) Bezeichnung: **Coronavirus-Vakzine**



(57) Hauptanspruch: Eine mRNA, umfassend
• mindestens eine kodierende Sequenz, die für ein Spike-Protein (S), das zu mindestens 95% mit SEQ ID NO: 10 identisch ist, kodiert,
wobei das kodierte Spike-Protein (S) eine präfusionsstabilisierende K986P und V987P Mutation und weiterhin die Mutation D614G umfasst,
und
• mindestens eine heterologe untranslatierte Region (UTR).

Beschreibung

Einleitung:

[0001] Die vorliegende Erfindung ist auf mRNA, Zusammensetzungen, und Vakzine gerichtet, die eine mRNA in Verbindung mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger umfassen. Sie ist zur Verwendung bei der Behandlung oder Prophylaxe einer Infektion mit einem Coronavirus, vorzugsweise mit einem Coronavirus SARS-CoV-2, oder einer mit einer solchen Infektion verbundenen Störung, vorzugsweise COVID-19, geeignet,. Die Erfindung ist auch auf erste und zweite medizinische Verwendungen der Zusammensetzung der Vakzine und des Kits zur Behandlung oder Vorbeugung einer Coronavirus-Infektion, vorzugsweise einer SARS-CoV-2-Infektion, gerichtet.

[0002] Coronaviren sind umhüllte, positive einzelsträngige RNA-Viren aus der Familie der Coronaviridae.

[0003] Ihre Vertreter verursachen sehr unterschiedliche Erkrankungen bei verschiedenen Wirbeltieren, wie beispielsweise Säugetieren, Vögeln und Fischen.

[0004] Coronaviren sind genetisch äußerst variabel, und einzelne Virusspezies können durch Überwindung der Artenbarriere auch mehrere Wirtsspezies infizieren. Solche Übertragungen führten beim Menschen zu Infektionen mit dem SARS-assoziierten Coronavirus (SARS-CoV) und mit dem Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV). Die um die Jahreswende 2019/2020 in der chinesischen Stadt Wuhan ausgebrochene Coronavirus-Epidemie wird auf ein bisher unbekanntes Coronavirus zurückgeführt, das die vorläufigen Namen nCoV-2019 oder Wuhan Human Coronavirus (WHCV) erhielt; später wurde das Virus mit dem offiziellen Namen SARS-CoV-2 versehen.

[0005] Typische Symptome einer durch SARS-CoV-2 verursachten Virusinfektion, die auch als COVID-19-Erkrankung (Coronavirus-Disease 2019) bezeichnet wird, sind Fieber, Husten, Kurzatmigkeit, Lungenentzündung und gastrointestinale Symptome (z.B. Durchfall). Eine schwere Erkrankung kann zu respiratorischer Insuffizienz führen, die eine mechanische Beatmung und Unterstützung auf einer Intensivstation erfordert. Am 30. Januar 2020 rief die Weltgesundheitsorganisation (WHO) wegen dieses neuartigen Coronavirus-Ausbruchs einen globalen Gesundheitsnotstand aus. Am 11. März erklärte die WHO COVID-19 zur Pandemie und verwies auf die mehr als 118.000 Fälle der Coronavirus-Erkrankung in über 110 Ländern und Territorien weltweit und das anhaltende Risiko einer weiteren globalen Ausbreitung. Bis Ende März 2020 gab es mehr als 800.000 bestätigte Fälle einer SARS-CoV-2-Infektion, die sich über fast alle Länder der Welt erstreckten, mit mehr als 40.000 COVID-19-assoziierten Todesfällen.

[0006] Gegenwärtig gibt es keinen Impfstoff und keine spezifische Behandlung für eine SARS-CoV-2-Infektion und/oder COVID-19-Erkrankung.

[0007] Patienten, bei denen eine SARS-CoV-2-Infektion diagnostiziert wird, erhalten lediglich eine unterstützende Behandlung, die sich nach den individuellen Symptomen und dem klinischen Zustand des Patienten richtet. Aufgrund des erheblichen Risikos einer schweren globalen Pandemie besteht ein dringender Bedarf an einer sicheren und wirksamen Behandlung oder Prophylaxe von SARS-CoV-2-Infektionen. Insbesondere wird ein Impfstoff benötigt, um die ältere Bevölkerung zu schützen, bei der eine hohe Sterblichkeitsrate beobachtet wurde.

[0008] Die Vakzinierung auf Basis von Nukleinsäuren, einschließlich DNA oder RNA, stellt eine vielversprechende Technik für neuartige Vakzine gegen neu auftretende Viren dar. Nukleinsäuren können gentechnisch hergestellt und einem menschlichen Individuum verabreicht werden. Transfizierte Zellen produzieren direkt das kodierte Antigen (das z.B. durch eine DNA oder eine RNA, insbesondere eine mRNA, bereitgestellt wird), was zu schützenden immunologischen Antworten führt.

[0009] Eine zentrale Rolle von virusspezifischen T-Gedächtnis-Zellen beim breiten und langanhaltenden Schutz vor einer SARS-CoV-Infektion ist aufgeklärt (siehe z.B. Channappanavar, Rudragouda, et al. „Virus-specific memory CD8 T cells provide substantial protection from lethal severe acute respiratory syndrome coronavirus infection.“ Journal of Virology 88.19 (2014): 11034-11044). Virus-spezifische CD8-T-Zellen sind zum Beispiel für die Pathogen-Beseitigung (Clearance) und für die Vermittlung von Schutz nach viraler Challenge erforderlich. Ein wirksamer SARS-CoV-2-Impfstoff sollte daher nicht nur starke funktionale humorale Immunantworten, sondern auch SARS-CoV-2-spezifische $CD8^+$-T-Zell- und $CD4^+$-T-Zell-Antworten induzieren.

[0010] Daher ist es die Aufgabe der zugrunde liegenden Erfindung, einen Nukleinsäure-basierten Impfstoff (Vakzine) für Coronavirus-Infektionen, insbesondere für SARS-CoV-2-Infektionen, bereitzustellen. Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine wirksame Coronavirus-Vakzine bereitzustellen, die ohne Kühlkette gelagert und transportiert werden kann und die eine schnelle und skalierbare Coronavirus-Vakzin-Produktion ermöglicht.

[0011] Wie in den Ansprüchen und der zugrundeliegenden Beschreibung weiter definiert, werden diese Aufgaben unter anderem dadurch gelöst, dass eine mRNA oder eine Zusammensetzung oder Vakzine bereitgestellt wird, die eine mRNA als Nukleinsäure umfasst, die mindestens eine kodierende Sequenz umfasst, die für mindestens ein antigenes Peptid oder Protein kodiert, das von einem SARS-CoV-2-Coronavirus abgeleitet ist.

[0012] Weiterhin wäre es wünschenswert, dass eine solche mRNA oder Zusammensetzung/Vakzine, die diese Nukleinsäure umfasst, zumindest einige der folgenden vorteilhaften Eigenschaften aufweist:

- Translation der Nukleinsäure an der Stelle der Injektion/Vakzinierung (z.B. Muskel);
- Sehr effiziente Induktion von antigenspezifischen Immunantworten gegen das kodierte SARS-CoV-2-Protein bei einer sehr niedrigen Dosierung und einem sehr niedrigen Dosierungsschema;
- Eignung zur Vakzinierung von Säuglingen und/oder Neugeborenen oder älteren Menschen, insbesondere von älteren Menschen;
- Eignung der Zusammensetzung/Vakzine für die intramuskuläre Verabreichung;
- Induktion einer spezifischen und funktionalen humoralen Immunantwort gegen Coronaviren, z.B. gegen SARS-CoV-2;
- Induktion einer breiten, funktionalen zellulären T-Zell-Antwort gegen das Coronavirus, z.B. bei SARS-CoV-2;
- Induktion eines spezifischen B-Zell-Gedächtnisses gegen das Coronavirus, z.B. bei SARS-CoV-2;
- Induktion von funktionalen Antikörpern, die das Virus, z.B. SARS-CoV-2, effektiv neutralisieren können;
- Induktion von funktionalen Antikörpern, die neu auftretende Varianten von SARS-CoV-2 effektiv neutralisieren können;
- Hervorrufen einer mukosalen IgA-Immunität durch Induktion von mukosalen IgA-Antikörpern,
- Induktion einer ausgewogenen B-Zell- und T-Zell-Antwort;
- Induktion einer schützenden Immunität gegen eine Coroanvirus-Infektion, z.B. gegen SARS-CoV-2 oder neu auftretende Varianten davon;
- Schnelles Einsetzen des Immunschutzes gegen das Coronavirus, z.B. bei SARS-CoV-2;
- Langlebigkeit der induzierten Immunantworten gegen das Coronavirus, z.B. bei SARS-CoV-2;
- Keine Verstärkung einer SARS-CoV-2-Infektion durch die Vakzinierung oder immunpathologische Effekte;
- Keine Antikörper-abhängige Verstärkung (Antibody Dependent Enhancement, ADE) durch die Nukleinsäure-basierte SARS-CoV-2-Vakzine;
- Keine übermäßige Induktion einer systemischen Zytokin- oder Chemokinantwort nach Applikation der Vakzine, die zu einer unerwünscht hohen Reaktogenität nach der Vakzinierung führen könnte;
- Gute Verträglichkeit, keine Nebenwirkungen, keine Toxizität der Vakzine;
- Vorteilhafte Stabilitätseigenschaften der nukleinsäurebasierten Vakzine;
- Schnelligkeit, Anpassungsfähigkeit, Einfachheit und Skalierbarkeit der Produktion der Coronavirus-Vakzine;
- Vorteilhaftes Vakzinierungsschema, das nur eine oder zwei Vakzinierungen für einen ausreichenden Schutz erfordert.
- Vorteilhaftes Vakzinierungsschema, das für einen ausreichenden Schutz nur eine geringe Dosis der Zusammensetzung/Vakzine erfordert.

Definitionen

[0013] Der Klarheit und Lesbarkeit halber werden die folgenden Definitionen gegeben. Jedes technische Merkmal, das bei diesen Definitionen erwähnt wird, kann auf jede Ausführungsform der Erfindung angewendet werden. Zusätzliche Definitionen und Erläuterungen können speziell im Zusammenhang mit diesen Ausführungsformen angegeben werden.

[0014] Prozentangaben im Zusammenhang mit Zahlen sind als relativ zur Gesamtzahl der jeweiligen Angaben zu verstehen. In anderen Fällen, und sofern der Kontext nichts anderes vorgibt, sollten Prozentangaben als Gewichtsprozente (Gew.-%) verstanden werden.

[0015] Etwa: Der Begriff „etwa“ wird verwendet, wenn Determinanten oder Werte nicht identisch, d.h. zu 100% gleich, sein müssen. Dementsprechend bedeutet „etwa“, dass eine Determinante oder ein Wert um 0,1% bis 20%, vorzugsweise um 0,1% bis 10%, insbesondere um 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, abweichen kann. Die fachkundige Person wird wissen, dass z.B. bestimmte Parameter oder Determinanten leicht variieren können, je nachdem, wie der Parameter bestimmt wurde. Wenn z.B. eine bestimmte Determinante oder ein bestimmter Wert hier so definiert ist, dass er z.B. eine Länge von „etwa 1000 Nukleotiden“ hat, kann die Länge um 0,1% bis 20%, vorzugsweise um 0,1% bis 10%, insbesondere um 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, abweichen. Dementsprechend wird die fachkundige Person wissen, dass in diesem spezifischen Beispiel die Länge um 1 bis 200 Nukleotide, insbesondere um 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 Nukleotide, abweichen kann.

[0016] Adaptive Immunantwort: Der Begriff „adaptive Immunantwort“, wie er hier verwendet wird, wird von einer auf dem betreffenden Gebiet fachkundigen Person erkannt und verstanden und soll sich z.B. auf eine antigenspezifische Antwort des Immunsystems (des adaptiven Immunsystems) beziehen. Die Antigenspezifität ermöglicht die Erzeugung von Antworten, die auf spezifische Pathogene oder Pathogen-infizierte Zellen zugeschnitten sind. Die Fähigkeit, diese maßgeschneiderten Antworten auszulösen, wird normalerweise im Körper durch „Gedächtniszellen“ (B-Zellen) aufrechterhalten. Im Kontext der Erfindung wird das Antigen durch die Nukleinsäure (nämlich eine mRNA) bereitgestellt, die für mindestens ein antigenes Peptid oder Protein kodiert, das von einem Coronavirus, vorzugsweise von SARS-CoV-2 (nCoV-2019), abgeleitet ist.

[0017] Antigen: Der Begriff „Antigen“, wie er hier verwendet wird, wird von einer fachkundigen Person erkannt und verstanden und soll sich z.B. auf eine Substanz beziehen, die vom Immunsystem, vorzugsweise vom adaptiven Immunsystem, erkannt werden kann und in der Lage ist, eine antigenspezifische Immunantwort auszulösen, z.B. durch Bildung von Antikörpern und/oder antigenspezifischen T-Zellen als Teil einer adaptiven Immunantwort. Typischerweise kann ein Antigen ein Peptid oder ein Protein sein oder umfassen, das durch den MHC den T-Zellen präsentiert werden kann. Auch Fragmente, Varianten und Derivate von Peptiden oder Proteinen, die z.B. vom Spike-Protein (S) des Coronavirus, vorzugsweise von SARS-CoV-2 (nCoV-2019), stammen und mindestens ein Epitop umfassen, werden im Kontext der Erfindung als Antigene verstanden. Im Kontext der vorliegenden Erfindung kann ein Antigen das Produkt der Translation einer bereitgestellten Nukleinsäure, wie hierin spezifiziert, sein.

[0018] Antigenes Peptid oder Protein: Der Begriff „antigenes Peptid oder Protein“ oder „immunogenes Peptid oder Protein“ wird von der auf dem Gebiet fachkundigen Person erkannt und verstanden und soll sich z.B. auf ein Peptid oder ein Protein beziehen, das von einem (antigenen oder immunogenen) Protein abgeleitet ist, das das adaptive Immunsystem des Körpers stimuliert, um eine adaptive Immunantwort bereitzustellen. Daher umfasst ein antigenes/immunogenes Peptid oder Protein mindestens ein Epitop (wie hier definiert) oder Antigen (wie hier definiert) des Proteins, von dem es abgeleitet ist (z.B. Spike-Protein (S) des Coronavirus, vorzugsweise von SARS-CoV-2 (nCoV-2019)).

[0019] Kationisch: Sofern sich nicht aus dem spezifischen Kontext eine andere Bedeutung ergibt, bedeutet der Begriff „kationisch“, dass die jeweilige Struktur eine positive Ladung trägt, entweder permanent oder nicht permanent, jedoch in Abhängigkeit von bestimmten Bedingungen, wie zum Beispiel dem pH-Wert. Somit umfasst der Begriff „kationisch“ sowohl „permanent kationisch“ als auch „kationisierbar“.

[0020] Kationisierbar: Der hier verwendete Begriff „kationisierbar“ bedeutet, dass eine Verbindung oder eine Gruppe oder ein Atom bei einem niedrigeren pH-Wert positiv geladen und bei einem höheren pH-Wert der Umgebung ungeladen ist. Auch in nichtwässrigen Umgebungen, in denen kein pH-Wert bestimmt werden

kann, ist eine kationisierbare Verbindung, eine Gruppe oder ein Atom bei einer hohen Wasserstoffionenkonzentration positiv geladen und bei einer niedrigen Konzentration oder Aktivität von Wasserstoffionen ungeladen. Es hängt von den individuellen Eigenschaften der kationisierbaren oder polykationisierbaren Verbindung, insbesondere dem pKa der jeweiligen kationisierbaren Gruppe oder des Atoms, ab, bei welchem pH-Wert oder welcher Wasserstoffionenkonzentration sie/es geladen oder ungeladen ist. In verdünnter wässriger Umgebung kann der Anteil der kationisierbaren Verbindungen, Gruppen oder Atome, die eine positive Ladung tragen, mit Hilfe der sogenannten Henderson-Hasselbalch-Gleichung abgeschätzt werden, die der fachkundigen Person bestens bekannt ist. Zum Beispiel ist in einigen Ausführungsformen eine kationisierbare Verbindung oder Gruppe bevorzugt bei einem pH-Wert von etwa 1 bis 9, bevorzugt 4 bis 9, 5 bis 8 oder auch 6 bis 8, bevorzugter bei einem pH-Wert von oder unter 9, von oder unter 8, von oder unter 7, am meisten bevorzugt bei physiologischen pH-Werten, z.B. etwa 7,3 bis 7,4, d.h. unter physiologischen Bedingungen, insbesondere unter physiologischen Salzbedingungen der Zelle in vivo, positiv geladen. In anderen Ausführungsformen ist die kationisierbare Verbindung oder Gruppe bevorzugt bei physiologischen pH-Werten, z.B. bei etwa 7,0 bis 7,4, überwiegend neutral, wird aber bei niedrigeren pH-Werten positiv geladen. In einigen Ausführungsformen ist der bevorzugte Bereich von pKa für die kationisierbare Verbindung oder Gruppe etwa 5 bis etwa 7.

[0021] Kodierende Sequenz/kodierender Bereich: Die Begriffe „kodierende Sequenz“ oder „kodierender Bereich“ und die entsprechende Abkürzung „cds“, wie sie hier verwendet werden, werden von der fachkundigen Person erkannt und verstanden und sollen sich z.B. auf eine Sequenz aus mehreren Nukleotidtripletts beziehen, die in ein Peptid oder Protein translatiert werden kann. Eine kodierende Sequenz im Kontext der vorliegenden Erfindung kann eine DNA-Sequenz, vorzugsweise eine RNA-Sequenz, sein, die aus einer durch drei teilbaren Anzahl von Nukleotiden besteht, mit einem Startcodon beginnt und vorzugsweise mit einem Stoppcodon endet.

[0022] Abgeleitet von: Der Begriff „abgeleitet von“, wie er in der vorliegenden Beschreibung im Zusammenhang mit einer Nukleinsäure verwendet wird, d.h. für eine Nukleinsäure „abgeleitet von“ einer (anderen) Nukleinsäure, bedeutet, dass die Nukleinsäure, die von einer (anderen) Nukleinsäure abgeleitet ist, z.B. mindestens 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% Sequenzidentität mit der Nukleinsäure aufweist, von der sie abgeleitet ist. Der fachkundigen Person ist bekannt, dass die Sequenzidentität typischerweise für die gleichen Typen von Nukleinsäuren berechnet wird, d.h. für DNA-Sequenzen oder für RNA-Sequenzen. Es versteht sich also, dass, wenn eine DNA von einer RNA „abgeleitet“ ist oder wenn eine RNA von einer DNA „abgeleitet“ ist, in einem ersten Schritt die RNA-Sequenz in die entsprechende DNA-Sequenz umgewandelt wird (insbesondere durch Ersetzen der Uracile (U) durch Thymidine (T) in der gesamten Sequenz), oder umgekehrt die DNA-Sequenz in die entsprechende RNA-Sequenz umgewandelt wird (insbesondere durch Ersetzen von T durch U in der gesamten Sequenz). Anschließend wird die Sequenzidentität der DNA-Sequenzen bzw. die Sequenzidentität der RNA-Sequenzen bestimmt. Vorzugsweise handelt es sich bei einer von einer Nukleinsäure „abgeleiteten“ Nukleinsäure auch um eine Nukleinsäure, die im Vergleich zu der Nukleinsäure, von der sie abgeleitet ist, modifiziert ist, z.B. um die RNA-Stabilität weiter zu erhöhen und/oder die Proteinproduktion zu verlängern und/oder zu steigern. Im Zusammenhang mit Aminosäuresequenzen (z.B. antigene Peptide oder Proteine) bedeutet der Begriff „abgeleitet von“, dass die Aminosäuresequenz, die von einer (anderen) Aminosäuresequenz abgeleitet ist, z.B. mindestens 60%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% Sequenzidentität mit der Aminosäuresequenz aufweist, von der sie abgeleitet ist.

[0023] Epitop: Der Begriff „Epitop“ (auch als „Antigen-Determinante“ bezeichnet), wie er hier verwendet wird, wird von der fachkundigen Person erkannt und verstanden und soll sich z.B. auf T-Zell-Epitope und B-Zell-Epitope beziehen. T-Zell-Epitope oder Teile der antigenen Peptide oder Proteine und können Fragmente umfassen, die vorzugsweise eine Länge von etwa 6 bis etwa 20 oder auch mehr Aminosäuren aufweisen, z.B. Fragmente, wie sie von MHC-Klasse-I-Molekülen prozessiert und präsentiert werden, vorzugsweise mit einer Länge von etwa 8 bis etwa 10 Aminosäuren, z.B. 8, 9 oder 10 (oder auch 11 oder 12 Aminosäuren), oder Fragmente, wie sie von MHC-Klasse-II-Molekülen prozessiert und präsentiert werden, vorzugsweise mit einer Länge von etwa 13 bis etwa 20 oder auch mehr Aminosäuren. Diese Fragmente werden typischerweise von T-Zellen in Form eines Komplexes, bestehend aus dem Peptidfragment und einem MHC-Molekül, erkannt, d.h. die Fragmente werden typischerweise nicht in ihrer nativen Form erkannt. B-Zell-Epitope sind typischerweise Fragmente, die sich auf der äußeren Oberfläche von (nativen) Protein- oder Peptidantigenen befinden, und vorzugsweise 5 bis 15 Aminosäuren, bevorzugter 5 bis 12 Aminosäuren, noch bevorzugter 6 bis 9 Aminosäuren, aufweisen, die von Antikörpern erkannt werden können, d.h. in ihrer nativen Form. Solche Epitope von Proteinen oder Peptiden können darüber hinaus aus jeder der hier genannten Varianten sol-

cher Proteine oder Peptide ausgewählt werden. In diesem Zusammenhang können Epitope konformationelle oder diskontinuierliche Epitope sein, die aus Segmenten der hierin definierten Proteine oder Peptide zusammengesetzt sind, die in der Aminosäuresequenz der hier definierten Proteine oder Peptide diskontinuierlich sind, aber in der dreidimensionalen Struktur zusammengebracht werden, oder kontinuierliche oder lineare Epitope, die aus einer einzigen Polypeptidkette bestehen.

[0024] Fragment: Der Begriff „Fragment“, wie er in der vorliegenden Beschreibung im Zusammenhang mit einer Nukleinsäuresequenz (z.B. RNA oder einer DNA) oder einer Aminosäuresequenz verwendet wird, kann typischerweise ein kürzerer Abschnitt einer Volllängensequenz von z.B. einer Nukleinsäuresequenz oder einer Aminosäuresequenz sein. Dementsprechend besteht ein Fragment typischerweise aus einer Sequenz, die mit dem entsprechenden Abschnitt innerhalb der Volllängensequenz identisch ist. Ein bevorzugtes Fragment einer Sequenz im Kontext der vorliegenden Erfindung besteht aus einem kontinuierlichen Abschnitt von Entitäten, wie zum Beispiel Nukleotiden oder Aminosäuren, die einem kontinuierlichen Abschnitt von Entitäten in dem Molekül entsprechen, von dem das Fragment abgeleitet ist, das mindestens 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% des gesamten (d.h. Volllängen-) Moleküls darstellt, von dem das Fragment abgeleitet ist (z.B. Spike-Protein (S) des Coronavirus, vorzugsweise von SARS-CoV-2 (nCoV-2019)). Der Begriff „Fragment“, wie er in der vorliegenden Beschreibung im Zusammenhang mit Proteinen oder Peptiden verwendet wird, kann typischerweise eine Sequenz eines Proteins oder Peptids, wie hierin definiert, umfassen, die im Hinblick auf ihre Aminosäuresequenz gegenüber der Aminosäuresequenz des ursprünglichen Proteins N-terminal und/oder C-terminal verkürzt (trunkiert) ist. Eine solche Trunkierung kann also entweder auf der Aminosäureebene oder entsprechend auf der Nukleinsäureebene auftreten. Eine Sequenzidentität in Bezug auf ein solches Fragment, wie hier definiert, kann sich daher vorzugsweise auf das gesamte Protein oder Peptid, wie hier definiert, oder auf das gesamte (kodierende) Nukleinsäuremolekül eines solchen Proteins oder Peptids beziehen. Fragmente von Proteinen oder Peptiden können mindestens ein Epitop dieser Proteine oder Peptide umfassen.

[0025] Heterolog: Die Begriffe „heterolog“ oder „heterologe Sequenz“, wie sie in der vorliegenden Beschreibung im Zusammenhang mit einer Nukleinsäuresequenz oder einer Aminosäuresequenz verwendet werden, beziehen sich auf eine Sequenz (z.B. RNA, DNA, Aminosäure), die als eine Sequenz zu verstehen ist, die von einem anderen Gen, einem anderen Allel oder z.B. einer anderen Spezies oder einem anderen Virus abgeleitet ist. Zwei Sequenzen werden typischerweise als „heterolog“ verstanden, wenn sie nicht vom gleichen Gen oder vom gleichen Allel ableitbar sind. Das heißt, obwohl heterologe Sequenzen vom selben Organismus oder Virus ableitbar sein können, kommen sie in der Natur nicht in derselben Nukleinsäure oder demselben Protein vor.

[0026] Humorale Immunantwort: Die Begriffe „humorale Immunität“ oder „humorale Immunantwort“ werden von der fachkundigen Person erkannt und verstanden und sollen sich z.B. auf die B-Zellvermittelte Antikörperproduktion und optional auf akzessorische Prozesse beziehen, die die Antikörperproduktion begleiten. Eine humorale Immunantwort kann typischerweise z.B. charakterisiert werden durch Th2-Aktivierung und Zytokinproduktion, Keimzentrumsbildung und Isotyp-Switching, Affinitätsreifung und Gedächtniszellenbildung. Die humorale Immunität kann sich auch auf die Effektor-Funktionen von Antikörpern beziehen, zu denen die Neutralisierung von Pathogenen und Toxinen, die klassische Komplementaktivierung und die durch Opsonin vermittelte Phagozytose und Pathogeneliminierung gehören.

[0027] Identität (einer Sequenz): Der Begriff „Identität“, wie er in der vorliegenden Beschreibung im Zusammenhang mit einer Nukleinsäuresequenz oder einer Aminosäuresequenz verwendet wird, wird von der fachkundigen Person erkannt und verstanden und soll sich z.B. auf den Prozentsatz beziehen, zu dem zwei Sequenzen identisch sind. Um den Prozentsatz zu bestimmen, zu dem zwei Sequenzen, z.B. Nukleinsäuresequenzen oder Aminosäuresequenzen (aa-Sequenzen), wie hier definiert, vorzugsweise die Aminosäuresequenzen, die von der Nukleinsäuresequenz, wie hier definiert, kodiert werden, oder die Aminosäuresequenzen selbst, identisch sind, können die Sequenzen angeordnet werden (Alignment), um anschließend miteinander verglichen zu werden. So kann z.B. eine Position einer ersten Sequenz mit der entsprechenden Position der zweiten Sequenz verglichen werden. Ist eine Position in der ersten Sequenz mit dem gleichen Rest besetzt wie an einer Position in der zweiten Sequenz, sind die beiden Sequenzen an dieser Position identisch. Ist dies nicht der Fall, unterscheiden sich die Sequenzen an dieser Position. Treten in der zweiten Sequenz Insertionen im Vergleich zur ersten Sequenz auf, können Lücken in die erste Sequenz eingefügt werden, um ein weiteres Alignment zu ermöglichen. Treten in der zweiten Sequenz im Vergleich zur ersten Sequenz Deletionen auf, so können in die zweite Sequenz Lücken eingefügt werden, um ein weiteres Alignment zu ermöglichen. Der Prozentsatz, zu dem zwei Sequenzen identisch sind, ist dann eine Funktion der Anzahl der identischen Positionen geteilt durch die Gesamtzahl der Positionen einschließlich der Positionen,

die nur in einer Sequenz besetzt sind. Der Prozentsatz, zu dem zwei Sequenzen identisch sind, kann unter Verwendung eines Algorithmus bestimmt werden, z.B. eines im BLAST-Programm integrierten Algorithmus.

[0028] Immunogen, immunogen: Die Begriffe „immunogen“ oder „immunogen“ werden von der fachkundigen Person erkannt und verstanden und sollen sich z.B. auf eine Verbindung beziehen, die in der Lage ist, eine Immunantwort zu stimulieren/zu induzieren. Vorzugsweise ist ein Immunogen ein Peptid, Polypeptid oder Protein. Ein Immunogen im Sinne der vorliegenden Erfindung ist das Produkt der Translation einer bereitgestellten Nukleinsäure, die mindestens eine kodierende Sequenz umfasst, die für mindestens ein vom Spike-Protein (S) von SARS-CoV-2 (nCoV-2019) abgeleitetes antigenes Peptid oder Protein, wie hier definiert, kodiert. Typischerweise löst ein Immunogen eine adaptive Immunantwort aus.

[0029] Immunantwort: Der Begriff „Immunantwort“ wird von der fachkundigen Person erkannt und verstanden und soll sich z.B. auf eine spezifische Reaktion des adaptiven Immunsystems auf ein bestimmtes Antigen (sogenannte spezifische oder adaptive Immunantwort) oder eine unspezifische Reaktion des angeborenen Immunsystems (sogenannte unspezifische oder angeborene Immunantwort) oder eine Kombination davon beziehen.

[0030] Immunsystem: Der Begriff „Immunsystem“ wird von der fachkundigen Person erkannt und verstanden und soll sich z.B. auf ein System des Organismus beziehen, das den Organismus vor Infektionen schützen kann. Gelingt es einem Pathogen, eine physikalische Barriere eines Organismus zu überwinden und in diesen Organismus einzudringen, sorgt das angeborene Immunsystem für eine sofortige, aber unspezifische Reaktion. Wenn Pathogene dieser angeborenen Antwort ausweichen, verfügen Wirbeltiere über eine zweite Schutzebene, das adaptive Immunsystem. Hier passt das Immunsystem seine Antwort während einer Infektion an, um die Erkennung des Pathogens zu verbessern. Diese verbesserte Antwort bleibt dann nach der Eliminierung des Pathogens in Form eines immunologischen Gedächtnisses erhalten und ermöglicht es dem adaptiven Immunsystem, bei jedem erneuten Auftreten des Pathogens schnellere und stärkere Angriffe durchzuführen. Demnach umfasst das Immunsystem das angeborene und das adaptive Immunsystem. Jeder dieser beiden Teile enthält typischerweise so genannte humorale und zelluläre Komponenten.

[0031] Angeborenes Immunsystem: Der Begriff „angeborenes Immunsystem“ (auch bekannt als unspezifisches oder nicht-spezifisches Immunsystem) wird von der fachkundigen Person erkannt und verstanden und soll sich z.B. auf ein System beziehen, das typischerweise die Zellen und Mechanismen umfasst, die den Wirt auf unspezifische Weise vor einer Infektion durch andere Organismen schützen. Das bedeutet, dass die Zellen des angeborenen Systems Pathogene auf generische Weise erkennen und darauf reagieren können, aber im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem verleiht es dem Wirt keine lang anhaltende oder schützende Immunität. Das angeborene Immunsystem kann durch Liganden von Mustererkennungsrezeptoren aktiviert werden, z.B. Toll-ähnliche Rezeptoren, NOD-ähnliche Rezeptoren oder RIG-I-ähnliche Rezeptoren usw.

[0032] Lipidoid-Verbindung: Eine lipidoide Verbindung, auch einfach als Lipidoid bezeichnet, ist eine lipidartige Verbindung, d.h. eine amphiphile Verbindung mit lipidartigen physikalischen Eigenschaften. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird der Begriff Lipid so verstanden, dass er lipidoide Verbindungen mit einschließt.

[0033] Permanent kationisch: Der Begriff „permanent kationisch“, wie er hier verwendet wird, wird von der fachkundigen Person erkannt und verstanden und bedeutet z.B., dass die jeweilige Verbindung oder Gruppe oder das jeweilige Atom bei jedem pH-Wert oder jeder Wasserstoffionenaktivität ihrer Umgebung positiv geladen ist. Typischerweise resultiert die positive Ladung aus der Anwesenheit eines quaternären Stickstoffatoms. Wenn eine Verbindung eine Vielzahl solcher positiver Ladungen trägt, kann sie als permanent polykationisch bezeichnet werden.

[0034] Stabilisierte RNA: Der Begriff „stabilisierte RNA“ bezieht sich auf eine RNA, die so modifiziert ist, dass sie im Vergleich zu einer RNA ohne eine solche Modifikation stabiler gegenüber Zerfall oder Abbau, z.B. durch Umweltfaktoren oder enzymatischen Verdau, wie zum Beispiel durch Exo- oder Endonuklease-Abbau, ist. Vorzugsweise wird eine stabilisierte RNA im Kontext der vorliegenden Erfindung in einer Zelle, wie zum Beispiel einer prokaryotischen oder eukaryotischen Zelle, vorzugsweise in einer Säugetierzelle, wie zum Beispiel einer menschlichen Zelle, stabilisiert. Der Stabilisierungseffekt kann auch außerhalb von Zellen, z.B. in einer Pufferlösung usw., ausgeübt werden, z.B. zur Lagerung einer Zusammensetzung, welche die stabilisierte RNA umfasst.

[0035] T-Zell-Antworten: Die Begriffe „zelluläre Immunität“ oder „zelluläre Immunantwort“ oder „zelluläre T-Zell-Antworten“, wie sie hier verwendet werden, werden von der fachkundigen Person erkannt und verstanden und sollen sich beispielsweise auf die Aktivierung von Makrophagen, natürlichen Killerzellen (NK), antigenspezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten und die Freisetzung verschiedener Zytokine als Antwort auf ein Antigen beziehen. Allgemeiner ausgedrückt, basiert die zelluläre Immunität nicht auf Antikörpern, sondern auf der Aktivierung von Zellen des Immunsystems. Typischerweise kann eine zelluläre Immunantwort z.B. durch die Aktivierung von Antigen-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten charakterisiert werden, die in der Lage sind, Apoptose in Zellen zu induzieren, z.B. spezifischen Immunzellen wie dendritischen Zellen oder anderen Zellen, die Epitope von Fremdantigenen auf ihrer Oberfläche präsentieren.

[0036] Variante (einer Sequenz): Der Begriff „Variante“, wie er in der vorliegenden Beschreibung im Zusammenhang mit einer Nukleinsäuresequenz verwendet wird, wird von der fachkundigen Person erkannt und verstanden und soll sich z.B. auf eine Variante einer Nukleinsäuresequenz beziehen, die von einer anderen Nukleinsäuresequenz abgeleitet ist. Eine Variante einer Nukleinsäuresequenz kann z.B. eine oder mehrere Nukleotiddeletionen, -insertionen, - additionen und/oder -substitutionen gegenüber der Nukleinsäuresequenz aufweisen, von der die Variante abgeleitet ist. Eine Variante einer Nukleinsäuresequenz kann mindestens 50%, 60%, 70%, 80%, 90% oder 95% identisch mit der Nukleinsäuresequenz sein, von der die Variante abgeleitet ist. Die Variante ist eine funktionale Variante in dem Sinne, dass die Variante mindestens 50%, 60%, 70%, 80%, 90% oder 95% oder mehr der Funktion der Sequenz, von der sie abgeleitet ist, beibehalten hat. Eine „Variante“ einer Nukleinsäuresequenz kann mindestens 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% oder 99% Nukleotididentität über einen Abschnitt von mindestens 10, 20, 30, 50, 75 oder 100 Nukleotiden einer solchen Nukleinsäuresequenz aufweisen.

[0037] Der Begriff „Variante“, wie er in der vorliegenden Beschreibung im Zusammenhang mit Proteinen oder Peptiden verwendet wird, soll sich z.B. auf eine Protein- oder Peptidvariante beziehen, die eine Aminosäuresequenz aufweist, die sich von der ursprünglichen Sequenz durch eine oder mehrere Mutation(en)/Substitution(en) unterscheidet, wie z.B. eine oder mehrere substituierte, eingefügte (inserierte) und/oder deletierte Aminosäure(n). Vorzugsweise haben diese Fragmente und/oder Varianten die gleiche oder eine vergleichbare spezifische antigene Eigenschaft (immunogene Varianten, antigene Varianten). Insertionen und Substitutionen sind insbesondere an solchen Sequenzpositionen möglich, die keine Veränderung der dreidimensionalen Struktur bewirken oder die Bindungsregion nicht beeinflussen. Modifikationen der dreidimensionalen Struktur durch Insertion(en) oder Deletion(en) können z.B. mit Hilfe von CD-Spektren (Zirkulardichroismus-Spektren) leicht ermittelt werden. Eine „Variante“ eines Proteins oder Peptids kann mindestens 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% oder 99% Aminosäureidentität über einen Abschnitt von mindestens 10, 20, 30, 50, 75 oder 100 Aminosäuren eines solchen Proteins oder Peptids aufweisen. Vorzugsweise umfasst eine Variante eines Proteins eine funktionale Variante des Proteins, was im Kontext der Erfindung bedeutet, dass die Variante im Wesentlichen die gleiche oder mindestens 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% der Immunogenität ausübt wie das Protein, von dem sie abgeleitet ist.

Kurze Beschreibung der Erfindung

[0038] Die vorliegende Erfindung basiert auf der überraschenden Erkenntnis der Erfinder, dass mindestens ein vom Coronavirus SARS-CoV-2 (früher nCoV-2019 genannt) abgeleitetes Peptid oder Protein, das durch die kodierende Sequenz einer Nukleinsäure, z.B. einer RNA, bereitgestellt wird, effizient in humanen Zellen exprimiert werden kann (Beispiele 2a, 2b und 2c). Noch überraschender und unerwarteter ist, dass die Verabreichung einer Zusammensetzung, die diese Nukleinsäure, nämlich mRNA, enthält, antigenspezifische Immunantworten gegen Coronaviren, insbesondere gegen das Coronavirus SARS-CoV-2, induziert (siehe Beispielabschnitt).

[0039] Noch unerwarteter zeigten die Erfinder, dass die kodierende mRNA der Erfindung hohe Mengen an funktionalen Antikörpern induziert, gezeigt durch hohe Virus-neutralisierende Titer (VNTs) und T-Zell-Antworten (Vakzine induzieren doppelt positive $CD4^+$-und $CD8^+$-T-Zellen (siehe z.B. Beispiel 7 und Beispiel 10), und auch Hamster und NHPs vor einer SARS-CoV-2-Challenge-Infektion schützt (siehe Beispiel 9 und Beispiel 15), was darauf hindeutet, dass die kodierende mRNA bzw. die Zusammensetzung/Vakzine der Erfindung somit für die Verwendung als Impfstoff, z.B. als Impfstoff beim Menschen, geeignet ist.

[0040] Diese Erkenntnisse bilden die Grundlage für die Bereitstellung einer nukleinsäurebasierten Coronavirus-Vakzine.

[0041] In einem ersten Aspekt liegt der vorliegenden Erfindung eine Nukleinsäure, nämlich eine mRNA, für eine Coronavirus-Vakzine, vorzugsweise eine Coronavirus-SARS-CoV-2-Vakzine, zugrunde, wobei die mRNA mindestens eine kodierende Sequenz umfasst, die für mindestens ein antigenes Peptid oder Protein eines SARS-CoV-2-Coronavirus oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante davon kodiert, wie in Schutzanspruch 1 definiert.

[0042] In einem zweiten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung eine Zusammensetzung, vorzugsweise eine immunogene Zusammensetzung bereit, die mindestens eine mRNA des ersten Aspekts umfasst.

[0043] In einem dritten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung eine Coronavirus-Vakzine, vorzugsweise eine SARS-CoV-2-Vakzine, bereit, wobei die Vakzine mindestens eine Nukleinsäure, nämlich die mRNA des ersten Aspekts umfasst.

[0044] In einem vierten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Kit oder Kit von Teilen bereit, das mindestens eine Nukleinsäure, nämlich die mRNA des ersten Aspekts und/oder mindestens eine Vakzine des dritten Aspekts umfasst.

[0045] Weitere Aspekte der Erfindung betreffen die Verwendung zur Behandlung oder Vorbeugung einer Coronavirus-Infektion, vorzugsweise einer SARS-CoV-2-Infektion in einem Individuum, und erste und zweite medizinische Verwendungen von Nukleinsäuren, nämlich mRNA und Vakzinen. Außerdem werden Verfahren zur Herstellung der Nukleinsäure, der Zusammensetzung oder Vakzine offenbart.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0046] Die vorliegende Anmeldung wird zusammen mit einem Sequenzprotokoll in elektronischem Format eingereicht, das Teil der Beschreibung der vorliegenden Anmeldung ist (WIPO-Standard ST.25). Die im Sequenzprotokoll enthaltenen Informationen sind hierin durch Bezugnahme in vollem Umfang enthalten. Wo hier auf eine „SEQ ID NO“ Bezug genommen wird, ist die entsprechende Nukleinsäuresequenz oder Aminosäuresequenz (aa) im Sequenzprotokoll mit der jeweiligen Kennzeichnung gemeint. Für viele Sequenzen enthält das Sequenzprotokoll auch zusätzliche detaillierte Informationen, z.B. zu bestimmten strukturellen Merkmalen, Sequenzoptimierungen, GenBank (NCBI)- oder GISAID (epi)-Kennungen, oder zusätzliche detaillierte Informationen bezüglich ihrer kodierenden Fähigkeit. Insbesondere werden solche Informationen unter der Kennziffer <223> im WIPO-Standard ST.25 Sequenzprotokoll bereitgestellt. Dementsprechend sind die Informationen, die unter dieser numerischen Kennung <223> bereitgestellt werden, hier ausdrücklich in ihrer Gesamtheit enthalten und als integraler Bestandteil der Beschreibung der zugrunde liegenden Erfindung zu verstehen.

Nukleinsäure für eine Coronavirus-Vakzine:

[0047] In einem ersten Aspekt betrifft die Erfindung eine Nukleinsäure, die für eine Coronavirus-Vakzine geeignet ist, nämlich eine mRNA.

[0048] Es ist zu beachten, dass spezifische Merkmale und Ausführungsformen, die im Zusammenhang mit dem ersten Aspekt der Erfindung, d.h. der erfindungsgemäßen mRNA, beschrieben werden, gleichermaßen auf den zweiten Aspekt (erfindungsgemäße Zusammensetzung), den dritten Aspekt (erfindungsgemäße Vakzine), den vierten Aspekt (erfindungsgemäßer Kit oder Kit von Teilen) oder weitere Aspekte, einschließlich medizinischer Verwendungen anwendbar sind.

[0049] Coronaviren lassen sich in die Gattungen Alpha-Coronavirus, Beta-Coronavirus, Delta-Coronavirus, Gamma-Coronavirus und nicht klassifizierte Coronaviren einteilen. Coronaviren sind genetisch äußerst variabel, und einzelne Virusspezies können durch Überwindung der Artenbarriere auch mehrere Wirtspezies infizieren. Zu den humanen Coronaviren gehören das SARS-assoziierte Coronavirus (SARS-CoV), das Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) und das Coronavirus SARS-CoV-2 (früher „Wuhan Human coronavirus“ oder nCoV-2019 genannt). Dementsprechend kann die Nukleinsäure für eine Vakzine gegen ein Coronavirus, vorzugsweise gegen ein Coronavirus, das ein humanes Pathogen ist, am meisten bevorzugt gegen das neu auftretende Coronavirus SARS-CoV-2 (nCoV-2019), geeignet sein.

[0050] Die Begriffe „Nukleinsäure“ oder „Nukleinsäuremolekül“ werden von der fachkundigen Person erkannt und verstanden. Der Begriff „Nukleinsäure“ oder „Nukleinsäuremolekül“, wie er hier verwendet wird, bezieht sich vorzugsweise auf DNA(-Moleküle) oder RNA(-Moleküle). Er wird vorzugsweise synonym mit dem Begriff

Polynukleotid verwendet. Vorzugsweise ist eine Nukleinsäure oder ein Nukleinsäuremolekül ein Polymer, das Nukleotidmonomere umfasst oder aus diesen besteht, die durch Phosphodiesterbindungen eines Zucker/-Phosphat-Rückgrats kovalent miteinander verknüpft sind. Der Begriff „Nukleinsäuremolekül“ umfasst auch modifizierte Nukleinsäuremoleküle, wie zum Beispiel basenmodifizierte, zuckermodifizierte oder rückgratmodifizierte DNA- oder RNA-Moleküle, wie hierin definiert.

[0051] Als Nukleinsäure des ersten Aspekts bildet die mRNA gemäß Schutzanspruch 1 die Grundlage für eine nukleinsäurebasierte Zusammensetzung oder Vakzine. Im Allgemeinen sind Vakzine auf Proteinbasis oder abgeschwächte Lebendvakzine aufgrund ihrer hohen Produktionskosten suboptimal für den Einsatz in Entwicklungsländern. Darüber hinaus benötigen proteinbasierte Vakzine oder attenuierte Lebendvakzine lange Entwicklungszeiten und sind nicht für eine schnelle Reaktion auf pandemische Virusausbrüche, wie zum Beispiel den Ausbruch des Coronavirus SARS-CoV-2 in 2019/2020, geeignet. Im Gegensatz dazu ermöglichen die nukleinsäurebasierten Vakzine gemäß der vorliegenden Erfindung eine sehr schnelle und kostengünstige Herstellung. Im Vergleich zu bekannten Vakzinen kann eine Vakzine auf Basis der erfindungsgemäßen Nukleinsäure daher deutlich kostengünstiger und schneller hergestellt werden, was insbesondere für den Einsatz in Entwicklungsländern sehr vorteilhaft ist. Ein weiterer Vorteil einer Vakzine auf Basis der erfindungsgemäßen Nukleinsäure kann seine Temperaturstabilität im Vergleich zu protein- oder peptidbasierten Vakzinen sein.

[0052] Die Begriffe „Nukleinsäuresequenz“, „DNA-Sequenz“, „RNA-Sequenz“ werden von der fachkundigen Person erkannt und verstanden und beziehen sich z.B. auf eine bestimmte und individuelle Reihenfolge der Abfolge ihrer Nukleotide.

[0053] Gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst die mRNA als Nukleinsäure mindestens eine kodierende Sequenz, die für mindestens ein antigenes Peptid oder Protein von einem SARS-CoV-2 (nCoV-2019)-Coronavirus oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante davon kodiert.

[0054] Der Begriff „antigenes Peptid oder Protein von einem SARS-CoV-2-Coronavirus“ ist zu verstehen als (i) ein Antigen, das von einem SARS-CoV-2-Coronavirus stammt, was bedeutet, dass die Aminosäuresequenz des antigenen Peptids oder Proteins (oder eines Fragments davon) mit einem SARS-CoV-2-Coronavirus-Protein (oder einem Fragment davon) identisch ist, oder (ii) ein Antigen, das von einem SARS-CoV-2-Coronavirus abgeleitet ist, was bedeutet, dass die Aminosäuresequenz des antigenen Peptids oder Proteins (oder eines Fragments davon) nicht mit einem entsprechenden SARS-CoV-2-Coronavirus-Protein (oder einem Fragment davon) identisch ist.

[0055] Dementsprechend umfasst der erste Aspekt mRNA als Nukleinsäure mindestens eine kodierende Sequenz, die für mindestens ein antigenes Peptid oder Protein kodiert, das von einem SARS-CoV-2 (nCoV-2019)-Coronavirus stammt oder von diesem abgeleitet ist, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogenen Variante davon.

[0056] Der Begriff „antigenes Peptid oder Protein, das von einem SARS-CoV-2 (nCoV-2019)-Coronavirus stammt oder von diesem abgeleitet ist“ ist zu verstehen als (i) ein Antigen, das „von einem SARS-CoV-2-Coronavirus stammt“, was bedeutet, dass die Aminosäuresequenz des antigenen Peptids oder Proteins (oder eines Fragments davon) in der Sequenz mit einem SARS-CoV-2-Coronavirus-Protein (oder einem Fragment davon) identisch ist, oder (ii) ein Antigen, das „von einem SARS-CoV-2-Coronavirus abgeleitet ist“, was bedeutet, dass die Aminosäuresequenz des antigenen Peptids oder Proteins (oder eines Fragments davon) nicht mit einer Sequenz eines entsprechenden SARS-CoV-2-Coronavirus-Proteins (oder eines Fragments davon) identisch ist.

[0057] Die mRNA umfasst mindestens eine kodierende Sequenz, die für mindestens ein antigenes Peptid oder Protein kodiert, das von einem SARS-CoV-2 (nCoV-2019)-Coronavirus stammt oder davon abgeleitet ist oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante davon, wobei die Nukleinsäure mindestens eine heterologe untranslatierte Region (UTR) umfasst.

[0058] Der Begriff „untranslatierte Region“ oder „UTR“ oder „UTR-Element“ wird von der fachkundigen Person erkannt und verstanden und soll sich z.B. auf einen Teil eines Nukleinsäuremoleküls beziehen, der typischerweise 5' oder 3' einer kodierenden Sequenz liegt. Eine UTR wird nicht in Protein übersetzt. Eine UTR kann Teil einer Nukleinsäure sein, z.B. einer DNA oder einer RNA. Eine UTR kann Elemente zur Kontrolle der Genexpression, auch regulatorische Elemente genannt, enthalten. Solche regulatorischen Elemente können z.B. ribosomale Bindungsstellen, miRNA-Bindungsstellen usw. sein.

[0059] Wie hierin verwendet, können die Begriffe „Humanes Coronavirus 2019“, „Wuhan Humanes Coronavirus“ (WHCV), „nCoV-2019 Coronavirus“, „nCoV-2019“, „Wuhan Seafood Market Pneumonia Virus“, „Wuhan Coronavirus“, „WHCV Coronavirus“, „HCoV-19“, „SARS2“, „COVID-19 Virus“, „hCoV-19“, „SARS-CoV-2“ oder „Coronavirus SARS-CoV-2“ im Rahmen der vorliegenden Erfindung austauschbar verwendet werden und beziehen sich auf ein neues pandemisches Coronavirus, das um die Jahreswende 2019/2020 in der chinesischen Stadt Wuhan aufgetreten ist und die Krankheit COVID-19 verursacht. Nach Angaben der WHO (Februar 2020) wird das Virus offiziell als „SARS-CoV-2“ bezeichnet, und die zugehörige Krankheit wird offiziell als „COVID-19“ bezeichnet.

[0060] Das Virus SARS-CoV-2 gehört zu den Coronaviridae, insbesondere zu den Orthocoronaviren, genauer gesagt zur Gattung der Betacoronaviren. Exemplarische SARS-CoV-2-Coronaviren sind Isolate, welche die in den nachstehenden Listen A und B aufgeführten einschließen, aber nicht beschränkt darauf sind.

[0061] Liste A: Exemplarische SARS-CoV-2-Coronavirus-Isolate (EPI/CISAID):

EPI_ISL_402119, EPI_ISL 402120, EPI_ISL_402121, EPI_ISL_402123, EPI_ISL 402124 (hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019), EPI_ISL 402125, EPI_ISL 402127, EPI_ISL 402128 (hCoV-19/Wuhan/WIV05/2019; WIV05; SARS-CoV-2/Wuhan/WIV05/2019_EPI_ISL_402128),

EPI_ISL_402129, EPI_ISL_402130, EPI_ISL_402131, EPI_ISL_402132, EPI_ISL_403928,

EPI_ISL_403929, EPI_ISL_403930, EPI_ISL_403931, EPI_ISL_403932, EPI_ISL_403933,

EPI_ISL_403934, EPI_ISL_403935, EPI_ISL_403936, EPI_ISL_403937, EPI_ISL_403962,

EPI_ISL_403963, EPI_ISL_404227, EPI_ISL_404228, EPI_ISL_404253, EPI_ISL_404895,

EPI_ISL_405839, EPI_ISL_406030, EPI_ISL_406031, EPI_ISL_406034, EPI_ISL_406036,

EPI_ISL_406223, EPI_ISS_406531, EPI_ISL_406533, EPI_ISL_406534, EPI_ISL_406535,

EPI_ISL_406536, EPI_ISL_406538, EPI_ISL_406592, EPI_ISL_406593, EPI_ISL_406594,

EPI_ISL_406595, EPI_ISL_406596, EPI_ISL_406597, EPI_ISL 406798, EPI_ISL_406800,

EPI_ISL_406801, EPI_ISL_406844, EPI_ISL_406862, EPI_ISL_406716, EPI_ISL_406717,

EPI_ISL_406970, EPI_ISL_406973, EPI_ISL407071, EPI_ISL_407073, EPI_ISL_407079,

EPI_ISL_407084, EPI_ISL_407193, EPI_ISL_407214, EPI_ISL_407215, EPI_ISL_407313,

EPI_ISL_407893, EPI_ISL_407894, EPI_ISL_407896, EPI_ISL_407976, EPI_ISL_407987,

EPI_ISL_407988, EPI_ISL_408008, EPI_ISL_408009, EPI_ISL_408010, EPI_ISL_408430,

EPI_ISL_408431, EPI_ISL_408478, EPI_ISL_408479, EPI_ISL_408480, EPI_ISL_408481,

EPI_ISL_408482, EPI_ISL_408484, EPI_ISL_408486, EPI_ISL_408488, EPI_ISL_408489,

EPI_ISL_408514, EPI_ISL_408515, EPI_ISL_408665, EPI_ISL_408666, EPI_ISL 408667,

EPI_ISL_408668, EPI_ISL_408669, EPI_ISL_408670, EPI_ISL_408976, EPI_ISL_408977,

EPI_ISL_409067, EPI_ISL_410044, EPI_ISL_410045, EPI_ISL_410218, EPI_ISL_410301,

EPI_ISL_410486, EPI_ISL_410531, EPI_ISL_410532, EPI_ISL_410535, EPI_ISL_410536,

EPI_ISL_410537, EPI_ISL_410538, EPI_ISL_410539, EPI_ISL_410540, EPI_ISL_410541,

EPI_ISL_410542, EPI_ISL 410713, EPI_ISL 410714, EPI_1SL_410715, EPI_ISL_410716,

EPI_ISL_410717, EPI_ISL_41_0718, EPI_ISL_41 0719, EPI_ISL_410720, EPI_ISL_410984,

EPI_ISL411060, EPI_ISL411066, EPI_ISL_411218, EPI_ISL_411219, EPI_ISL_411220,

EPI_ISL411902, EPI_ISL_411915, EPI_ISL_411926, EPI_ISL_411927, EPI_ISL_411929,

EPI_ISL_411950, EPI_ISL_411951, EPI_ISL_411952, EPI_ISL_411953, EPI_ISL_411954,

EPI_ISL_411955, EPI_ISL_411956, EP1_ISL_411957, EPI_ISL_412026, EPI_ISL_412028,

EPI_ISL_412029, EPI_ISL_412030, EPI_ISL_412459, EPI_ISL_412862, EPI_ISL_412869,

EPI_ISL_412870, EPI_ISL_412871, EPI_ISL_412872, EPI_ISL_412873, EPI_ISL_412898, EPI_ISL_412899, EPI_ISL_412912, EPI_ISL_412966, EPI_ISL_412967, EPI_ISL_412968, EPI_ISL_412969, EPI_ISL_412970, EPI_ISL_412972, EPI_ISL_412973, EPI_ISL_412974, EPI_ISL_412975, EPI_ISL_412978, EPI_ISL_412979, EPI_ISL_412980, EPI_ISL_412981, EPI_ISL_412982, EPI_ISL_412983, EPI_ISL_413014, EPI_ISL_413015, EPI_ISL_413016, EPI_ISL_413017, EPI_ISL_413018, EPI_ISL_413021, EPI_ISL_413022, EPI_ISL_413023, EPI_ISL_413024, EPI_ISL_413213, EPI_ISL_413214, EPI_ISL_413455, EPI_ISL_413456, EPI_ISL_413457, EPI_ISL_413458, EPI_ISL_41 3459, EPI_ISL_413485, EPI_ISL_41 3486, EPI_ISL_413488, EPI_ISL_413489, EPI_ISL_413490, EPI_ISL413513, EPI_ISL_413514, EPI_ISL_413515, EPI_ISL_413516, EPI_ISL_413518, EPI_ISL_413519, EPI_ISL_413520, EPI_ISL_413521, EPI_ISL_413522, EPI_ISL_413523, EPI_ISL_413555, EPI_ISL_413557, EPI_ISL_413558, EPI_ISL_413559, EPI_ISL_41 3560, EPI_ISL_413562, EPI_ISL_41 3563, EPI_ISL_413566, EPI_ISL_413572, EPI_ISL_413573, EPI_ISS_413577, EPI_ISL_413579, EPI_ISL_413580, EPI_ISL_413581, EPI_ISL_413582, EPI_ISL_413583, EPI_ISL_413584, EPI_ISL_413587, EPI_ISL_413589, EPI_ISL_413590, EPI_ISL_413591, EPI_ISL_413592, EPI_ISL_413593, EPI_ISL_413594, EPI_ISL_413595, EPI_ISL_413596, EPI_ISL 413597, EPI_ISL_413598, EPI_ISL_413599, EPI_ISL_413600, EPI_ISL_413602, EPI_ISL_413603, EPI_ISL_413604, EPI_ISL_413606, EPI_ISL_413607, EPI_ISL_413608, EPI_ISL_413609, EPI_ISL_413610, EPI_ISL_413611, EPI_ISL_413612, EPI_ISL_413613, EPI_ISL_413614, EPI_ISL_413615, EPI_ISL_41361 6, EPI_ISL_41361 7, EPI_ISL_413618, EP1_ISL_413619, EPI_ISL_413620, EPI_ISL_413621, EPI_ISL_413622, EPI_ISL_413647, EPI_ISL_413648, EPI_ISL_413691, EPI_ISL_413692, EPI_ISL_413693, EPI_ISL_413694, EPI_ISL_413697, EP1_ISL_413711, EPI_ISL_413729, EPI_ISL_413746, EPI_ISL_413748, EPI_ISL_413749, EPI_ISL_413750, EPI_ISL_413751, EPI_ISL_413761, EPI_ISL_413791, EPI_ISL_413809, EPI_ISL_413852, EPI_ISL_413853, EPI_ISL 413854, EPI_ISL_41 3856, EPI_ISL_41 3857, EPI_ISL_413858, EPI_ISL_413860, EPI_ISL_413861, EPI_ISL_413862, EPI_ISL_413863, EPI_ISL_413928, EPI_ISL_413931, EPI_ISL_413996, EPI_ISL_413997, EPI_ISL_413999, EPI_ISL_414005, EPI_ISL_414006, EPI_ISL_414007, EPI_ISL_414008, EPI_ISL_414009, EPI_ISL_414011, EPI_ISL_414012, EPI_ISL_414019, EPI_ISL 414020, EPI_1SL_414021, EPI_ISL_414022, EPI_ISL_414023, EPI_ISL_414027, EPI_ISL_414040, EPI_ISL_414041, EPI_ISL_414042, EPI_ISL_414043, EPI_ISL_414044, EPI_ISL_414045, EPI_ISL_414363, EPI_ISL_414366, EPI_ISL_414367, EPI_ISL_414368, EPI_ISL_414369, EPI_ISL_414414, EPI_ISL_414423, EPI_ISL_414428, EPI_ISL_414429, EPI_ISL_414433, EPI_ISL_414435, EPI_ISL_414439, EPI_ISL_414443, EPI_ISL_414445, EPI_ISL_414446, EPI_ISL_414451, EPI_ISL_414457, EPI_ISL_414468, EPI_ISL_414470, EPI_ISL_414476, EPI_ISL_414477, EPI_ISL_414479, EPI_ISL_414480, EPI_ISL_414481, EPI_ISL_414482, EPI_ISL_414483, EPI_ISL_414484, EPI_ISL_414485, EPI_ISL_414487, EPI_ISL_414500, EPI_ISL_414505, EPI_ISL_414509, EPI_ISL_414510, EPI_ISL_414511, EPI_ISL_414517, EPI_ISL_414519, EPI_ISL_414520, EPI_ISL_414521, EPI_ISL_414522, EPI_ISL_414523, EPI_ISL_414524, EPI_ISL_414525, EPI_ISL_414526, EPI_ISL_414527, EPI_ISL_414528, EPI_ISL_414529,

EPI_ISL_41 4530, EPI_ISL_414531, EPI_ISL_414532, EPI_ISL_414534, EPI_ISL_414535, EPI_ISL_414545, EPI_ISL_414546, EPI_ISL_414547, EPI_ISL_414548, EPI_ISL_414549, EPI_ISL_414552, EPI_ISL_414554, EPI_ISL_414555, EPI_ISL_414556, EPI_ISL_414557, EPI_ISL_414558, EPI_ISL_414559, EPI_ISL_414560, EPI_ISL_414561, EPI_ISL_414562, EPI_ISL_414564, EPI_ISL_414565, EPI_ISL414566, EPI_ISL_414569, EPI_ISL_414571, EPI_ISL_414574, EPI_ISL_414577, EPI_ISL_414578, EPI_ISL_414579, EPI_ISL_414580, EPI_ISL_414586, EPI_ISL_414587, EPI_ISL_414588, EPI_ISL_414589, EPI_ISL_414590, EPI_ISL_414591, EPI_ISL_414592, EPI_ISL_414593, EPI_ISL_414594, EPI_ISL 414595, EPI_ISL_414596, EPI_ISL_414597, EPI_ISL414600, EPI_ISL_414601, EPI_ISL_414616, EPI_ISL_414617, EPI_ISL_414618, EPI_ISL_414619, EPI_ISL_414620, EPI_ISL_414621, EPI_ISL_414622, EPI_ISL_414623, EPI_ISL_414624, EPI_ISL_414625, EPI_ISL_414626, EPI_ISL_414627, EPI_ISL_414628, EPI_ISL_414629, EPI_ISL_414630, EPI_ISL_414631, EPI_ISL_414632, EPI_ISL_414633, EPI_ISL_414635, EPI_ISL_414637, EPI_ISL_414638, EPI_ISL_414641, EPI_ISL_414642, EP1_ISL_414643, EPI_ISL_414646, EPI_ISL_414648, EPI_ISL_414663, EPI_ISL_414684, EPI_ISL_414685, EPI_ISL_414686, EPI_ISL_414687, EPI_ISL_414688, EPI_ISL_414689, EPI_ISL_414690, EPI_ISL_414691, EPI_ISL_414692, EPI_ISL_414936, EPI_ISL_414937, EPI_ISL_414938, EPI_ISL_414940, EPI_ISL_414941, EPI_ISL_41 5105, EPI_ISL_415128, EPI_ISS_415129, EPI_ISL_415136, EPI_ISL_415141, EPI_ISL_415142, EPI_ISL_415147, EPI_ISL_415150, EPI_ISL_415151, EPI_ISL_415152, EPI_ISL_415153, EPI_ISL_415154, EPI_ISL_4151 55, EPI_ISL_415156, EPI_ISL_415157, EPI_ISL 415158, EPI_ISL_415159, EPI_ISL_415710, EPI_1SL_416426, EPI_ISL_416457, EPI_ISL_416481, EPI_ISL_416489, EPI_ISL_416491, EPI_ISL_416492, EPI_ISL_416514, EPI_ISL_41 6515, EPI_ISL_41 6516, EPI_ISL_41 6517, EPI_ISL_41 6518, EPI_ISL_41 6538, EPI_ISL_416539, EPI_ISL_416683, EPI_ISL_416685, EPI_ISL_416704, EPI_ISL_416711, EPI_ISL_416713, EPI_ISL_416715, EPI_ISL_41671 7, EPI_ISL_416744, EPI_ISL_416830, EPI_ISL_41 6831, EPI_ISL_416832, EPI_ISL_41 7020, EPI_ISL_41 7021, EPI_ISL_41 7022, EPI_ISL_417023, EPI_ISL_417024, EPI_ISL_417025, EPI_ISL_417026, EPI_ISL_417027, EPI_ISL_417028, EPI_ISL_417034, EPI_ISL_41 7200, EPI_ISL_41 7201, EPI_ISL_41 7202, EPI_ISL 417203, EPI_ISL_417204, EPI_ISL_417374, EPI_ISL_417375, EPI_ISL_417376, EPI_ISL_417377, EPI_ISL_41 7379, EPI_ISL_417382, EPI_ISL_417408, EPI_ISL_417409, EPI_ISL_417410, EPI_ISL_417411, EPI_ISL_417412, EPI_ISL_417413, EPI_ISL_417420, EPI_ISL_417435, EPI_ISL_417436, EPI_ISL 417437, EPI_ISL_417438, EPI_ISL_417439, EPI_ISL_417440, EPI_ISL_417441, EPI_ISL_417442, EPI_ISL_417467, EPI_ISL_417468, EPI_ISL_417504, EPI_ISL_417505, EPI_ISL 417506, EPI_ISL_417507, EPI_ISL_417508, EPI_ISL_41 7509, EPI_ISL 417510, EPI_ISL_417512, EPI_ISL_41 7513, EPI_ISL_41 7514, EPI_ISL_417515, EPI_ISL_417516, EPI_ISL_417517, EPI_ISL_417526, EPI_ISL_417527, EPI_ISL_417528, EPI_ISL_417529, EPI_ISL_417530, EPI_ISL_417531, EPI_ISL_417532, EPI_ISL_417533, EPI_ISL_417534, EPI_ISL_417536, EPI_ISL_417537, EPI_ISL_417538, EPI_ISL_417539, EPI_ISL_417540, EPI_ISL_417541, EPI_ISL_417542, EPI_ISL_417543, EPI_ISL_417544, EPI_ISL_41 7545, EPI_ISL_417546, EPI_ISL_417547, EPI_ISL_41 7548,

EPI_ISL_417550, EPI_ISL_417551, EPI_ISL_417552, EPI_ISL_417553, EPI_ISL_417554, EPI_ISL_417555, EPI_ISL_417556, EPI_ISL_417557, EPI_ISL_417558, EPI_ISL_417559, EPI_ISL 417560, EPI_ISL_417561, EPI_ISL_417562, EPI_ISL 417563, EPI_ISL 417564, EPI_ISL_417565, EPI_ISL_417566, EPI_ISL 417567, EPI_ISL_417568, EPI_ISL_417569, EPI_ISL_417570, EPI_ISL_417571, EPI_ISL 417572, EPI_ISL_417573, EPI_ISL_417574, EPI_ISL_41 7575, EPI_ISL_41 7576, EPI_ISL_41 7577, EPI_ISL_41 7578, EPI_ISL_41 7579, EPI_ISL_417580, EPI_ISL_41 7581, EPI_ISL_417582, EPI_ISL_417583, EPI_ISL_417584, EPI_ISL_417585, EPI_ISL_41 7586, EPI_ISL_417587, EPI_ISL_417588, EPI_ISL_417589, EPI_ISL_41 7590, EPI_ISL_41 7591, EPI_ISL_41 7592, EPI_ISL_41 7593, EPI_ISL_417594, EPI_ISL_417595, EPI_ISL_41 7596, EPI_ISL_417597, EPI_ISL_41 7598, EPI_ISL_417599, EPI_ISL_417600, EPI_ISL_41 7601, EPI_ISL_41 7602, EPI_ISL_41 7603, EPI_ISL_417604, EPI_ISL_41 7605, EPI_ISL_417606, EPI_ISL_41 7607, EPI_ISL_41 7608, EPI_ISL_417609, EPI_ISL_41 7610, EPI_ISL_417611, EPI_ISL_41 7612, EPI_ISL_417613, EPI_ISL_417614, EPI_ISL_417615, EPI_ISL_417616, EPI_ISL_417617, EPI_ISL_417618, EPI_ISL_417619, EPI_ISL_417620, EPI_ISL_417621, EPI_ISL_417622, EPI_ISL_417623, EPI_ISL_417624, EPI_ISL_417625, EPI_ISL_417626, EPI_ISL 417627, EPI_ISL_417628, EPI_ISL_417629, EPI_ISL_417630, EPI_ISL_417631, EPI_ISL_417632, EPI_ISL_41 7633, EPI_ISL_417634, EPI_ISL_41 7635, EPI_ISL_41 7636, EPI_ISL_41 7637, EPI_ISL_41 7638, EPI_ISL_41 7639, EPI_ISL_41 7640, EPI_ISL_417641, EPI_ISL_41 7642, EPI_ISL_41 7643, EPI_ISL_417644, EPI_ISL_41 7645, EPI_ISL_417646, EPI_ISL_41 7647, EPI_ISL_417648, EPI_ISL_417649, EPI_ISL_417650, EPI_ISL_417651, EPI_ISL_417652, EPI_ISL_417653, EPI_ISL_417654, EPI_ISL_417666, EPI_ISL_417667, EPI_ISL_417668, EPI_ISL_417669, EPI_ISL_41 7670, EPI_ISL_417671, EPI_ISL_41 7672, EPI_ISL_417676, EPI_ISL_41 7678, EPI_ISL_417680, EPI_ISL_41 7685, EPI_ISL_41 7699, EPI_ISL_41 7700, EPI_ISL_41 7703, EPI_ISL_41 7706, EPI_ISL_417709, EPI_ISL_417712, EPI_ISL_417716, EPI_ISL_417717, EPI_ISL_417724, EPI_ISL_417733, EPI_ISL_417737, EPI_ISL_417740, EPI_ISL_417742, EPI_ISL_417743, EPI_ISL_417746, EPI_ISL_417750, EPI_ISL_41 7752, EPI_ISL_41 7753, EPI_ISL 417754, EPI_ISL_417762, EPI_ISL 417763, EPI_ISL_417764, EPI_ISL 417766, EPI_ISL_417774, EPI_ISL_41 7808, EPI_ISL_417809, EPI_ISL_41 7813, EPI_ISL_41 7814, EPI_ISL_41 7815, EPI_ISL_41 7816, EPI_ISL_41 7818, EPI_ISL_41 7819, EPI_ISL_41 7820, EPI_ISL 417821, EPI_ISL_41 7822, EPI_ISL_41 7823, EPI_ISL_41 7824, EPI_ISL_41 7825, EPI_ISL 417826, EPI_ISL_417827, EPI_ISL_417829, EPI_ISL_417830, EPI_ISL_417831, EPI_ISL_417832, EPI_ISL_417833, EPI_ISL_417834, EPI_ISL_417835, EPI_ISL_417836, EPI_ISL_417837, EPI_ISL_417838, EPI_ISL_417839, EPI_ISL_417864, EPI_ISL_417917, EPI_ISL_417918, EPI_ISL_41 7920, EPI_ISL_41 7925, EPI_ISL_41 7926, EPI_ISL_41 7931, EPI_ISL_417932, EPI_ISL_41 7933, EPI_ISL_41 7935, EPI_ISL_41 7936, EPI_ISL_41 7937, EPI_ISL_41 7938, EPI_ISL_417939, EPI_ISL_417940, EPI_ISL 417941, EPI_ISL_417942, EPI_ISL_417943, EPI_ISL_41 7944, EPI_ISL_41 7945, EPI_ISL_41 7946, EPI_ISL_41 7947, EPI_ISL_41 7948, EPI_ISL_41 7949, EPI_ISL_41 7950, EPI_ISL_41 7951, EPI_ISL_41 7953, EPI_ISL_41 7955, EPI_ISL_41 7958, EPI_ISL_41 7959, EPI_ISL_41 7960, EPI_ISL_41 7962, EPI_ISL_41 7964,

EPI_ISL_41 7965, EPI_ISL_41 7966, EPI_ISL_41 7968, EPI_ISL_41 7970, EPI_ISL_41 7971, EPI_ISL_41 7973, EPI_ISL_41 7974, EPI_ISL_41 7976, EPI_ISL_417977, EPI_ISL 417982, EPI_ISL_41 7983, EPI_ISL_41 7984, EPI_ISL_41 7985, EPI_ISL_418009, EPI_ISL_418017, EPI_ISL_418018, EPI_ISL_418019, EPI_ISL_418020, EPI_ISL_418021, EPI_ISL_418022, EPI_ISL_418023, EPI_ISL_418024, EPI-ISL-41 8025, EPI_ISL_418026, EPI_ISL_418027, EPI_ISL_418029, EPI_ISL_418030, EPI_ISL_418031, EPI_ISL_418032, EPI_ISL_418033, EPI_ISL_418034, EPI_ISL_418037, EPI_ISL_418038, EPI_ISL_418040, EPI_ISL_418046, EPI_ISL_41 8047, EPI_ISL_41 8048, EPI_ISL_41 8050, EPI_ISL_41 8052, EPI_ISL_418053, EPI_ISL_41 8054, EPI_ISL_41 8063, EPI_ISL_41 8064, EPI_ISL_418067, EP1_ISL_418071, EPI_ISL_418072, EPI_ISL_418073, EPI_ISL_418074, EPI_ISL_418075, EPI_ISL_418076, EPI_ISL_41 8077, EPI_ISL_418078, EPI_ISL_418079, EPI_ISL_41 8080, EPI_ISL_418081, EPI_ISL_418082, EPI_ISL 418101, EPI_ISL_418102, EPI_ISL_41 8103, EPI_ISL_418104, EPI_ISL_418105, EPI_ISL_418126, EPI_ISL_418127, EPI_ISL_418128, EPI_ISL_418129, EPI_ISL_418130, EPI_ISL_418131, EPI_ISL_418132, EPI_ISL_418133, EPI_ISL_418134, EPI_ISL_418135, EPI_ISL_418136, EPI_ISL_418137, EPI_ISL_418138, EPI_ISL_418139, EPI_ISL_418140, EPI_ISL 418148, EPI_ISL_418149, EPI_ISL_418150, EPI_ISL_418151, EPI_ISL_418152, EPI_ISL_418153, EPI_ISL_418154, EPI_ISL_418155, EPI_ISL_418156, EPI_ISL_418157, EPI_ISL_418158, EPI_ISL_418159, EPI_ISL_4181 60, EPI_ISL_418161, EPI_ISL_4181 62, EPI_ISL_418163, EPI_ISL_418164, EPI_ISL_418165, EPI_ISL_418183, EPI_ISL_418184, EPI_ISL_418185, EPI_ISL_418186, EPI_1SL_418187, EPI_ISL_418188, EPI_ISL_418189, EPI_ISL_418190, EPI_ISL_418191, EPI_ISL_418192, EPI_ISL_418193, EPI_ISL_418194, EPI_ISL_418195, EPI_ISL_418197, EPI_ISL_418198, EPI_ISL_418199, EPI_ISL_418200, EPI_ISL_418201, EPI_ISL_418202, EPI_ISL_418203, EPI_ISL_418204, EPI_ISL_418231, EPI_ISL_418232, EPI_ISL_418233, EPI_ISL_418235, EPI_ISL_418236, EPI_ISL_418237, EPI_ISL_418238, EPI_ISL_418239, EPI_ISL_418240, EPI_ISL_418257, EPI_ISL 418260, EPI_ISL 418263, EPI_ISL_418264, EPI_ISL_418265 or EPI_ISL_616802 (hCoV-19/Denmark/DCGC-3024/2020).

[0062] Exemplarische SARS-CoV-2-Coronaviren können auch durch genetische Informationen definiert oder identifiziert werden, die durch GenBank-Zugangsnummern bereitgestellt werden, wie in Liste B unten angegeben.

[0063] Liste B: GenBank-Zugangsnummern verschiedener SARS-Co V-2-Isolate:

NC_045512, LC528232, LC528233, LC529905, MN908947, MN938384, MN938385, MN938386, MN938387, MN938388, MN938389, MN938390, MN970003, MN970004, MN975262, MN975263, MN975264, MN975265, MN975266, MN975267, MN975268, MN985325, MN988668, MN988669, MN994467, MN994468, MN996527, MN996528, MN996529, MN996530, MN996531, MN997409, MT007544, MT012098, MT019529, MT019530, MT019531, MT019532, MT019533, MT020880, MT020881, MT027062, MT027063, MT027064, MT039873, MT039887, MT039888, MT039890, MT044257, MT044258, MT049951, MT050493, MT066156, MT066175, MT066176, MT072688, MT093571, MT093631, MT106052, MT106053, MT106054, MT118835, MT121215, MT123290, MT123291, MT123292, MT123293, MT126808, MT135041, MT135042, MT135043, MT135044, MT152824, MT159705, MT159706, MT159707, MT159708, MT159709, MT159710, MT159711, MT159712, MT159713, MT159714, MT159715, MT159716, MT159717, MT159718, MT159719, MT159720, MT159721, MT159722, MT163716, MT163717, MT163718, MT163719, MT163720, MT163721, MT184907, MT184908, MT184909, MT184910, MT184911, MT184912, MT184913, MT188339, MT188340, MT188341, MT192759, MT192765, MT192772 oder MT192773.

[0064] Dem Coronavirus SARS-CoV-2 wurde die NCBI Taxonomie-ID (NCBI:txid oder taxID): 2697049 zugewiesen.

[0065] Der Begriff „antigenes Peptid oder Protein eines nCoV-2019-Coronavirus“ oder „antigenes Peptid oder Protein eines SARS-CoV-2-Coronavirus“ bezieht sich auf jedes Peptid oder Protein, das von einem SARS-CoV-2 (nCoV-2019)-Coronavirus, wie oben definiert, stammt oder von diesem ableitet ist, aber auch auf Fragmente, Varianten oder Derivate davon, vorzugsweise auf immunogene Fragmente oder immunogene Varianten davon.

[0066] Unter dem Begriff „immunogenes Fragment“ oder „immunogene Variante“ ist jedes Fragment/jede Variante des entsprechenden SARS-CoV-2 (nCoV-2019)-Coronavirus-Antigens zu verstehen, das in der Lage ist, eine Immunantwort bei einem Individuum hervorzurufen. Vorzugsweise führt die intramuskuläre oder intradermale Verabreichung der mRNA als Nukleinsäure des ersten Aspekts zur Expression des kodierten SARS-CoV-2-Antigens (Peptid oder Protein) in einem Individuum.

[0067] Der hier verwendete Begriff „Expression“ bezieht sich auf die Produktion eines SARS-CoV-2-Coronavirus-Peptids oder -Proteins, wobei das SARS-CoV-2-Coronavirus-Peptid oder -Protein durch eine kodierende Sequenz einer Nukleinsäure des ersten Aspekts bereitgestellt wird. Zum Beispiel bezieht sich „Expression“ einer RNA auf die Produktion eines Proteins (z.B. nach Verabreichung der RNA an eine Zelle oder ein Individuum) durch Translation der RNA in ein Polypeptid, z.B. in ein Peptid oder Protein, das von einem SARS-CoV-2-Coronavirus stammt oder von diesem abgeleitet ist. „Expression“ einer DNA bezieht sich auf die Produktion eines Proteins (z.B. nach Verabreichung der DNA an eine Zelle oder ein Individuum) durch Transkription der DNA in RNA und anschließende Translation in ein Polypeptid, z.B. in ein Peptid oder Protein, das von einem SARS-CoV-2-Coronavirus stammt oder davon abgeleitet ist. Der Begriff „Expression“ und der Begriff „Produktion“ können hier austauschbar verwendet werden. Ferner bezieht sich der Begriff „Expression“ vorzugsweise auf die Produktion eines bestimmten Peptids oder Proteins nach Verabreichung einer Nukleinsäure an eine Zelle oder einen Organismus. In Ausführungsformen ist die Nukleinsäure, also die mRNA des ersten Aspekts, für eine Vakzine, vorzugsweise eine Coronavirus-Vakzine, geeignet. In bevorzugten Ausführungsformen ist die Nukleinsäure, also die mRNA des ersten Aspekts, für eine SARS-CoV-2-Coronavirus-Vakzine geeignet.

[0068] Grundsätzlich kann jedes Protein, das von einem SARS-CoV-2-Coronavirus stammt oder davon abgeleitet ist, verwendet werden und kann in geeigneter Weise von der kodierenden Sequenz oder der mRNA als Nukleinsäure des ersten Aspekts kodiert werden. Zum Umfang der zugrunde liegenden Erfindung gehört außerdem, dass das mindestens eine antigene Peptid oder Protein ein synthetisch hergestelltes oder ein artifizielles Coronavirus-Peptid oder -Protein umfassen oder daraus bestehen kann. Der Begriff „synthetisch hergestelltes“ Coronavirus-Peptid oder -Protein bzw. der Begriff „artifizielles Coronavirus-Peptid oder -Protein“ bezieht sich auf ein Protein, das in der Natur nicht vorkommt. Dementsprechend kann sich ein „artifizielles Coronavirus-Peptid oder -Protein“ oder ein „synthetisch hergestelltes Coronavirus-Peptid oder -Protein“ beispielsweise in mindestens einer Aminosäure von dem natürlichen Coronavirus-Peptid oder - Protein unterscheiden und/oder ein zusätzliches heterologes Peptid- oder Proteinelement umfassen und/oder N-terminal oder C-terminal verlängert oder trunkiert sein.

[0069] Es wird offenbart, dass die mRNA als Nukleinsäure insbesondere mindestens eine kodierende Sequenz, die mindestens ein antigenes Peptid oder Protein des SARS-CoV-2-Coronavirus oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante davon kodiert, umfasst, wobei das mindestens eine antigene Peptid oder Protein mindestens ein Peptid oder Protein umfasst, das ein Strukturprotein, ein akzessorisches Protein oder ein Replikaseprotein ist oder davon abgeleitet ist, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante von diesen ist.

[0070] Insbesondere wird offenbart, dass die Nukleinsäure, also die mRNA, mindestens eine kodierende Sequenz, die für mindestens ein antigenes Peptid oder Protein des SARS-CoV-2-Coronavirus kodiert, umfasst, wobei das mindestens eine antigene Peptid oder Protein mindestens ein Peptid oder Protein umfasst, das ein Strukturprotein ist oder von einem Strukturprotein abgeleitet ist, wobei das Strukturprotein aus einem Spike-Protein (S), einem Hüllprotein (E), einem Membranprotein (M) oder einem Nukleokapsidprotein (N) oder einem immunogenen Fragment oder einer Variante von diesen ausgewählt ist.

[0071] Erfindungsgemäß umfasst das kodierte mindestens eine antigene Peptid oder Protein ein Spike-Protein (S) oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante davon oder besteht daraus.

[0072] Spike-Protein ist ein typisches virales Fusionsprotein vom Typ I, das als Trimer auf der viralen Oberfläche vorliegt, wobei jedes Monomer aus einem Kopf (S1) und einem Stamm (S2) besteht. Einzelne Vorläufer-S-Polypeptide bilden ein Homotrimer und durchlaufen eine Glykosylierung innerhalb des Golgi-Apparats sowie eine Prozessierung zur Entfernung des Signalpeptids und eine Spaltung durch eine zelluläre Protease, um separate S1- und S2-Polypeptidketten zu erzeugen, die als S1/S2-Protomere innerhalb des Homotrimers assoziiert bleiben und somit ein Trimer aus Heterodimeren darstellen. Die S1-Domäne des Spike-Glykoproteins umfasst die Rezeptorbindungsdomäne (RBD), die sich (wahrscheinlich) mit den Rezeptoren des Angiotensinkonvertierenden Enzyms 2 verbindet und die virale Fusion in die Wirtszelle vermittelt, eine N-terminale Domäne, die möglicherweise den ersten Kontakt mit den Zielzellen herstellt, sowie 2 Subdomänen, die alle für neutralisierende Antikörper empfänglich sind. Die S2-Domäne besteht aus einem Sechs-Helix-Bündel-Fusionskern, der an der Membranfusion mit der endosomalen Membran des Wirts beteiligt ist und ebenfalls ein Ziel für die Neutralisierung darstellt. Die S2-Untereinheit umfasst außerdem zwei Heptad-Repeat-Sequenzen (HR1 und HR2) und eine für Fusionsglykoproteine typische zentrale Helix, eine Transmembrandomäne und die zytosolische Schwanzdomäne.

[0073] Geeignete antigene Peptid- oder Proteinsequenzen, die durch die mRNA als Nukleinsäure bereitgestellt werden, sind in Tabelle 1, Zeilen 1 bis 41, Spalte A und B offenbart. Darüber hinaus sind weitere Informationen zu den geeigneten antigenen Peptid- oder Proteinsequenzen unter der Kennziffer <223> des ST25-Sequenzprotokolls angegeben.

[0074] Im Folgenden werden bevorzugte antigene Peptid- oder Proteinsequenzen, die durch die offenbarte mRNA als Nukleinsäure bereitgestellt werden, im Detail beschrieben.

[0075] Insbesondere umfasst das kodierte mindestens eine antigene Peptid oder Protein mindestens eine der Aminosäuresequenzen, die identisch oder zu mindestens 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 1-111, 274-11663, 13176-13510, 13521-14123, 22732-22758, 22917, 22923, 22929-22964, 26938, 26939 sind, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante irgendeiner dieser Sequenzen oder besteht daraus. Weitere Informationen zu diesen Aminosäuresequenzen sind auch in Tabelle 1 (siehe Zeilen 1 bis 41 der Spalte A und B) und unter der Kennziffer <223> des ST25-Sequenzprotokolls der jeweiligen Sequenz-SEQ ID NOs angegeben. Erfindungsgemäß umfasst das Spike-Protein insbesondere die Aminosäuresequenzen oder besteht aus diesen, die zu mindestens 95% identisch mit SEQ ID NOs: 22738, 22758, 22959, 22961-22964 sind.

[0076] Es ist zu beachten, dass dort, wo auf Aminosäurereste (aa) und ihre Position in einem Spike-Protein (S) Bezug genommen wird, jede hier verwendete Nummerierung - sofern nicht anders angegeben - sich auf die Position des jeweiligen Aminosäurerests in einem entsprechenden Spike-Protein (S) des SARS-CoV-2 (nCoV-2019) Coronavirus-Isolats EPI_ISL_402128 (BetaCoV_Wuhan_WIV05_2019_EPI_ISL_402128) gemäß SEQ ID NO: 1 bezieht. Entsprechende Aminosäurepositionen sind in der gesamten Offenbarung beispielhaft für das Spike-Protein (S) des SARS-CoV-2-Coronavirus-Isolats EPI_ISL_402128 (SEQ ID NO: 1) angegeben. Die fachkundige Person wird natürlich in der Lage sein, die in der vorliegenden Beschreibung beispielhaft für SARS-CoV-2 EPI_ISL_402128 (SEQ ID NO: 1) dargestellte Lehre auf andere antigene Peptide oder Proteine in anderen SARS-CoV-2-Coronavirus-Isolaten anzupassen, z.B. auf Isolate einschließlich, aber nicht beschränkt auf EPI_ISL_404227, EPI_ISL_403963, EPI_ISL_403962, EPI_ISL_403931, EPI_ISL_403930, EPI_ISL_403929, EPI_ISL_402130, EPI_ISL_402129, EPI_ISL_402128, EPI_ISL_402126, EPI_ISL_402125, EPI_ISL_402124, EPI_ISL_402123, EPI_ISL_402120, EPI_ISL_402119 (weitere SARS-CoV-2-Isolate sind in Liste A und/oder Liste B bzw. Tabelle 25 aufgeführt).

[0077] Die Proteinannotation wurde unter Verwendung von SEQ ID NO: 1 als Referenzprotein durchgeführt. Das Volllängen-Spike-Protein (S) des SARS-CoV-2-Coronavirus-Referenzproteins besitzt 1273 Aminosäurereste und umfasst die folgenden Elemente:

- sekretorisches Signalpeptid: Aminosäureposition aa 1 bis aa 15 (siehe SEQ ID NO: 28)
- Spike-Protein-Fragment S1: Aminosäureposition aa 1 bis aa 681 (siehe SEQ ID NO: 27)
- Rezeptorbindungsdomäne (RBD): Aminosäureposition aa 319 bis aa 541 (siehe SEQ ID NO: 13243)
- Haupt-Neutralisationsdomäne (Critical Neutralisation Domain; CND): Aminosäureposition aa 329 bis aa 529 (siehe SEQ ID NO: 13310)
- Spike-Protein-Fragment S2: Aminosäureposition aa 682 bis aa 1273 (siehe SEQ ID NO: 30)

- Transmembrandomäne (TM): Aminosäureposition aa 1212 bis aa 1273 (siehe SEQ ID NO: 49)
- Transmembrandomäne (TMflex): Aminosäureposition aa 1148 bis aa 1273 (siehe SEQ ID NO: 13176)

[0078] Es ist zu beachten, dass zwischen Spike-Proteinen, die von verschiedenen SARS-CoV-2-Isolaten abgeleitet sind, naturgemäß Variationen auf Aminosäureebene auftreten (beispielhafte SARS-CoV-2-Isolate sind in Liste A und Liste B aufgeführt). Im Kontext der Erfindung können solche Aminosäurevariationen auf jedes antigene Peptid oder Protein angewendet werden, das von einem Spike-Protein, wie hierin beschrieben, abgeleitet ist.

[0079] Dementsprechend kann jedes Spike-Protein, das hierin bereitgestellt und als geeignetes Antigen im Kontext der Erfindung in Betracht gezogen wird, eine oder mehrere der folgenden Aminosäurevariationen aufweisen (Aminosäurepositionen gemäß der Bezugssequenz SEQ ID NO: 1), wobei das kodierte Spike-Protein wie in Schutzanspruch 1 definiert ist:

- D614G oder G614D
- H49Y oder Y49H
- V367F oder F367V
- P1263L oder L1263P
- V483A oder A483V
- S939F oder F939S
- S943P oder P943S
- L5F oder F5L
- L8V oder V8L
- S940F oder F940S
- C1254F oder F1254C
- Q239K oder K239Q
- M153T oder T153M
- V1040F oder F1040V
- A845S oder S845A
- Y145H oder H145Y
- A831V oder V831A
- M1229I oder I1229M
- H69 oder H69del/aa deletiert
- V70 oder H70del/aa deletiert
- H69_V70 oder H69del und H70del/aa deletiert
- A222V oder V222A
- Y453F oder F453Y
- S477N oder N477S
- I692V oder V692I
- R403K oder K403R
- K417N oder N417K
- N437S oder S437N
- N439K oder K439N
- V445A oder A445V
- V445I oder I445V

- V445F oder F445V
- G446V oder V446G
- G446S oder S446G
- G446A oder A446G
- L455F oder F455L
- F456L oder L456F
- K458N oder N458K
- A475V oder V475A
- G476S oder S476G
- G476A oder A476G
- S477I oder I477S
- S477R oder R477S
- S477G oder G477S
- S477T oder T477S
- T478I oder 1478T
- T478K oder K478T
- T478R oder R478T
- T478A oder A478T
- E484Q oder Q484E
- E484K oder K484E
- E484A oder A484E
- E484D oder D484E
- G485R oder R485G
- G485S oder S485G
- F486L oder L486F
- N487I oder I487N
- Y489H oder H489Y
- F490S oder S490F
- F490L oder L490F
- Q493L oder L493Q
- Q493K oder K493Q
- S494P oder P494S
- S494L oder L494S
- P499L oder L499P
- T500I oder I500T
- N501Y oder Y501N
- N501T oder T501 N
- N501S oder S501N
- V503F oder F503V
- V503I oder I503V

- G504D oder D504G
- Y505W oder W505Y
- Q506K oder K506Q
- Q506H oder H506Q
- Y144 oder Y144del/aa deletiert
- A570D oder D570A
- P681H oder H681P
- T716I oder I716T
- S982A oder A982S
- D1118H oder H1118D
- L18F oder F18L
- D80A oder A80D
- D215G oder G215D
- L242 oder L242del/aa deletiert
- A243 oder A243del/aa deletiert
- L244 oder L244del/aa deletiert
- L242_A243_L244 oder L242del und A243del und L244del/aa deletiert
- R246I oder 1246R
- A701V oder V701A
- T20N oder N20T
- P26S oder S26P
- D138Y oder Y138D
- R190S oder S190R
- H655Y oder Y655H
- T10271 oder I1027T
- S13I oder I13S
- W152C oder C152W
- L452R oder R452L
- R346T oder T346R
- P384L oder L384P
- L452M oder M452L
- F456A oder A456F
- F456K oder K456F
- F456V oder V456F
- E484P oder P484E
- K417T oder T417K
- G447V oder V447G
- L452Q oder Q452L
- A475S oder S475A
- F486I oder I486F

- F490Y oder Y490F
- Q493R oder R493Q
- S494A oder A494S
- P499H oder H499P
- P499S oder S499P
- G502V oder V502G
- T748K oder K748T
- A522S oder S522A
- V1176F oder F1176V

[0080] Erfindungsgemäß weist das kodierte Spike-Protein (S) die Mutation D614G auf.

[0081] Die folgenden Aminosäurevariationen (Aminosäurepositionen gemäß der Bezugssequenz SEQ ID NO: 1) sind besonders bevorzugt:

- H69del, V70del, Y144del, N501Y, A570D, D614G, P681H, T7161, S982A und D1118H
- L18F, D80A, D215G, L242del, A243del, L244del, R246I, K417N, E484K, N501Y, D614G und A701V
- K417N, E484K, N501Y und D614G
- E484K und D614G
- L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y und T1027I
- S13I, W152C, L452R und D614G
- delH69, delV70, Y453F, D614G, I692V und MI229I
- E484K, E484P oder E484Q
- G446V
- G485R

[0082] In einigen Ausführungsformen kann ein Fragment eines Spike-Proteins (S) durch die erfindungsgemäße mRNA als Nukleinsäure kodiert werden, wobei das Fragment N-terminal trunkiert (trunkiert) sein kann, so dass ihm die N-terminalen Aminosäuren von 1 bis zu 100 des Volllängen-SARS-CoV-2-Coronavirus-Referenzproteins (SEQ ID NO: 1) fehlen und/oder wobei das Fragment C-terminal trunkiert sein kann, so dass die C-terminalen Aminosäuren (aa) von 531 bis zu aa 1273 des Volllängen-SARS-CoV-2-Coronavirus-Referenzproteins (SEQ ID NO: 1) fehlen. Ein solches „Fragment eines Spike-Proteins (S)“ kann zusätzlich Aminosäuresubstitutionen (wie unten beschrieben) umfassen und kann zusätzlich mindestens ein heterologes Peptid oder Proteinelement (wie unten beschrieben) umfassen. In bevorzugten Ausführungsformen kann ein Fragment eines Spike-Proteins (S) C-terminal trunkiert sein, so dass die C-terminale Transmembrandomäne fehlt (d.h. es fehlen aa 1212 bis aa 1273 oder es fehlen aa 1148 bis aa 1273).

[0083] In anderen Ausführungsformen umfasst das kodierte mindestens eine antigene Peptid oder Protein ein Spike-Protein (S) oder besteht aus einem Spike-Protein (S), wobei dem vom SARS-CoV-2-Coronavirus abgeleiteten Spike-Protein (S) die Transmembrandomäne (TM) (Aminosäureposition aa 1212 bis aa 1273) fehlt. In Ausführungsformen umfasst das kodierte mindestens eine antigene Peptid oder Protein ein Spike-Protein (S) oder besteht aus einem Spike-Protein (S), wobei dem vom SARS-CoV-2-Coronavirus abgeleiteten Spike-Protein (S) ein verlängerter Teil der Transmembrandomäne (TMflex) fehlt (Aminosäureposition aa 1148 bis aa 1273). Ohne an die Theorie gebunden sein zu wollen, könnte ein Spike-Protein (S), dem die Transmembrandomäne (TM oder TMflex), wie hier definiert, fehlt, für eine Coronavirus-Vakzine geeignet sein, da ein solches Protein löslich und nicht in der Zellmembran verankert wäre. Ein lösliches Protein kann daher bei der Verabreichung an ein Individuum in höheren Konzentrationen produziert (d.h. translatiert) werden, was zu verbesserten Immunantworten führt.

[0084] Ohne an die Theorie gebunden sein zu wollen, könnten die Domänen RBD (aa 319 bis aa 541) und CND (aa 29 bis aa 529) für die Immunogenität entscheidend sein. Beide Regionen befinden sich am S1-Fragment des Spike-Proteins. Dementsprechend kann es im Kontext der Erfindung zweckmäßig sein, dass

das antigene Peptid oder Protein ein S1-Fragment des Spike-Proteins oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante davon umfasst oder daraus besteht. Geeigneterweise kann ein solches S1-Fragment mindestens eine RBD- und/oder eine CND-Domäne, wie oben definiert, umfassen.

[0085] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst das kodierte mindestens eine antigene Peptid oder Protein eine Rezeptorbindungsdomäne (RBD; aa 319 bis aa 541) oder besteht aus einer RBD, wobei die RBD ein Spike-Protein-Fragment oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante davon umfasst oder daraus besteht.

[0086] In weiteren bevorzugten Ausführungsformen umfasst das kodierte mindestens eine antigene Peptid oder Protein eine verkürzte (trunkierte) Rezeptorbindungsdomäne (truncRBD; aa 334 bis aa 528) oder besteht daraus, wobei die RBD ein Spike-Protein-Fragment oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante davon umfasst oder daraus besteht.

[0087] Ein solches „Fragment eines Spike-Proteins (S)“ (RBD; aa 319 bis aa 541 oder truncRBD, aa 334 bis aa 528), kann zusätzlich Aminosäuresubstitutionen (wie unten beschrieben) umfassen und kann zusätzlich mindestens ein heterologes Peptid- oder Proteinelement (wie unten beschrieben) umfassen.

[0088] In besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst das kodierte mindestens eine antigene Peptid oder Protein ein Spike-Protein (S) oder besteht aus diesem, wobei das Spike-Protein (S) ein Spike-Protein-Fragment S1 oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante davon umfasst oder daraus besteht.

[0089] Dementsprechend kann das kodierte mindestens eine antigene Peptid oder Protein (das ein Spike-Protein-Fragment S1 umfasst oder daraus besteht) mindestens eine der Aminosäuresequenzen umfassen, die identisch oder zu mindestens 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 1-27, 29, 31-48, 58-111, 274-1345, 1480-1546, 1614-11663, 13377-13510, 13521-14123, 22732, 22737-22758, 22929-22964 sind, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante dieser Sequenzen oder besteht daraus. Weitere Informationen zu den genannten Aminosäuresequenzen sind auch in Tabelle 1 (siehe Zeilen 1 bis 6, 9, 11-41 der Spalte A und B) und unter der Kennziffer <223> des ST25-Sequenzprotokolls der jeweiligen Sequenz-SEQ ID NOs angegeben. Erfindungsgemäß sind insbesondere die Aminosäuresequenzen, die zu mindestens 95% identisch mit den SEQ ID NOs: 22738, 22959, 22758, und 22961-22964 sind.

[0090] Auch kann das kodierte mindestens eine antigene Peptid oder Protein ein Spike-Protein-Fragment S1 umfassen, und es fehlen ihm mindestens 70%, 80%, 90%, vorzugsweise 100% des Spike-Protein-Fragments S2 (aa 682 bis aa 1273). Solche Ausführungsformen können vorteilhaft sein, da das S1-Fragment neutralisierende Epitope umfasst, ohne die potenziellen Probleme des Volllängenproteins, das S1 und S2 umfasst, aufzuweisen.

[0091] Dementsprechend kann das kodierte mindestens eine antigene Peptid oder Protein (das im Wesentlichen aus einem Spike-Proteinfragment S1 besteht) mindestens eine der Aminosäuresequenzen umfassen, die identisch oder zu mindestens 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 27, 1279-1345, 29, 1480-1546, 13243-13309, 22733-22736, 26938, 26939 sind, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante dieser Sequenzen oder besteht daraus. Weitere Informationen zu den genannten Aminosäuresequenzen sind auch in Tabelle 1 (siehe Zeilen 6 und 9 der Spalte A und B) und unter der Kennziffer <223> des ST25-Sequenzprotokolls der jeweiligen Sequenz-SEQ ID NOs angegeben.

[0092] Ohne an die Theorie gebunden sein zu wollen, kann es zweckmäßig sein, dass das antigene Peptid oder Protein das Spike-Protein-Fragment S1 und (zumindest ein Fragment des) Spike-Protein-Fragment S2 umfasst oder daraus besteht, da die Bildung eines immunogenen Spike-Proteins gefördert werden kann.

[0093] Dementsprechend umfasst in besonders bevorzugten Ausführungsformen das kodierte mindestens eine antigene Peptid oder Protein ein Spike-Protein (S) oder besteht daraus, wobei das Spike-Protein (S) ein Spike-Protein-Fragment S1 oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante davon und ein Spike-Protein-Fragment S2 oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante davon umfasst oder daraus besteht.

[0094] Das mindestens eine kodierte antigene Peptid oder Protein, das das Spike-Protein-Fragment S1 und das Spike-Protein-Fragment S2 umfasst oder daraus besteht, kann mindestens eine der Aminosäuresequenzen umfassen, die identisch oder zu mindestens 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 1-26, 31-48, 58-111, 274-1278, 1614-11663, 13377-13510, 13521-14177, 22732, 22737-22758, 22929-22964 sind, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante dieser Sequenzen. Weitere Informationen zu diesen Aminosäuresequenzen sind auch in Tabelle 1 (siehe Zeilen 1 bis 5, 11-35, 38 der Spalte A und B) und unter der Kennziffer <223> des ST25-Sequenzprotokolls der jeweiligen Sequenz SEQ ID NOs angegeben. Erfindungsgemäß sind insbesondere die Aminosäuresequenzen, die zu mindestens 95% identisch mit SEQ ID NOs: 22738, 22758, 22959, und 22961-22964 sind.

[0095] In besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst das kodierte mindestens eine antigene Peptid oder Protein ein Volllängen-Spike-Protein oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante davon oder besteht aus diesen.

[0096] Der Begriff „Volllängen-Spike-Protein“ bezeichnet ein Spike-Protein, vorzugsweise abgeleitet von einem SARS-CoV-2-Coronavirus, mit einer Aminosäuresequenz, die im Wesentlichen dem vollständigen Spike-Protein entspricht. Dementsprechend kann ein „Volllängen-Spike-Protein“ aa 1 bis aa 1273 (Referenzprotein: SEQ ID NO: 1) umfassen. Dementsprechend kann ein Volllängen-Spike-Protein typischerweise ein sekretorisches Signalpeptid, ein Spike-Protein-Fragment S1, ein Spike-Protein-Fragment S2, eine Rezeptorbindungsdomäne (RBD) und eine entscheidende („Critical“) Neutralisationsdomäne CND sowie eine Transmembrandomäne umfassen. Insbesondere werden auch Varianten, die bestimmte Aminosäuresubstitutionen (z.B. zur Ermöglichung einer Präfusionsstabilisierung des S-Proteins) oder natürlich vorkommende Aminosäuredeletionen umfassen, von dem Begriff „Volllängen-Spike-Protein“ umfasst.

[0097] Dementsprechend kann das mindestens eine kodierte antigene Peptid oder Protein ein Volllängen-S-Protein umfassen, das mindestens eine der Aminosäuresequenzen, die identisch oder mindestens zu 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 1-9, 274-340, 22737, 22739, 22741, 22743, 22745, 22747, 22749, 22751, 22753, 22755, 22757, 22929-22946 sind, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante dieser Sequenzen umfasst oder daraus besteht. Weitere Informationen zu den genannten Aminosäuresequenzen sind auch in Tabelle 1 (siehe Zeile 1 der Spalte A und B) und unter der Kennziffer <223> des ST25-Sequenzprotokolls der jeweiligen Sequenz-SEQ ID NOs angegeben.

[0098] Das Spike-Protein (S), das durch die mRNA als Nukleinsäure des ersten Aspekts bereitgestellt wird, ist so designt oder angepasst, dass es das Antigen in einer Präfusionskonformation stabilisiert. Eine Präfusionskonformation ist im Kontext einer effizienten Coronavirus-Vakzine besonders vorteilhaft, da mehrere potentielle Epitope für neutralisierende Antikörper nur in dieser Präfusionsproteinkonformation zugänglich sind. Darüber hinaus wird das Verbleiben des Proteins in der Präfusionskonformation angestrebt, um immunpathologische Effekte, wie z.B. eine verstärkte Erkrankung und/oder eine Antikörper-abhängige Verstärkung (Antibody dependent Enhancement; ADE), zu vermeiden.

[0099] In bevorzugten Ausführungsformen ruft die Verabreichung einer mRNA als Nukleinsäure bzw. einer Zusammensetzung oder einer Vakzine (jeweils enthaltend eine solche mRNA), die für ein präfusionsstabilisiertes Spike-Protein kodiert, an ein Individuum Spike-Protein-neutralisierende Antikörper hervor und ruft keine krankheitsverstärkenden Antikörper hervor. Insbesondere löst die Verabreichung einer mRNA als Nukleinsäure (oder einer Zusammensetzung oder einer Vakzine), die für ein präfusionsstabilisiertes Spike-Protein kodiert, an ein Individuum keine immunpathologischen Effekte, wie z.B. eine verstärkte Krankheit und/oder Antikörper-abhängige Verstärkung (ADE), aus.

[0100] Dementsprechend umfasst die erfindungsgemäße mRNA als Nukleinsäure mindestens eine kodierende Sequenz, die für mindestens ein antigenes Peptid oder Protein kodiert, das von einem SARS-CoV-2-Coronavirus stammt oder abgeleitet ist, wobei das mindestens eine antigene Peptid oder Protein ein Spike-Protein (S) ist oder von einem Spike-Protein (S) abgeleitet ist, wobei das Spike-Protein (S) ein präfusionsstabilisiertes Spike-Protein (S_stab) ist. Geeigneterweise umfasst das präfusionsstabilisierte Spike-Protein mindestens eine präfusionsstabilisierende Mutation, wie in Schutzanspruch 1 definiert.

[0101] Der Begriff „Präfusionskonformation“, wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf eine strukturelle Konformation, die von der Ektodomäne des Coronavirus-S-Proteins nach der Prozessierung zu einem reifen

Coronavirus-S-Protein im sekretorischen System und vor dem Auslösen des fusogenen Ereignisses, das zum Übergang des Coronavirus S in die Postfusionskonformation führt, angenommen wird.

[0102] Ein „präfusionsstabilisiertes Spike-Protein (S_stab)“, wie hier beschrieben, umfasst eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen, -deletionen oder -insertionen gegenüber einer nativen Coronavirus-S-Sequenz, die für eine erhöhte Retention der Präfusionskonformation im Vergleich zu Coronavirus-S-Ektodomänen-Trimeren, die aus einer entsprechenden nativen Coronavirus-S-Sequenz gebildet werden, sorgen. Die „Stabilisierung“ der Präfusionskonformation durch die eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen, -deletionen oder -insertionen kann z.B. eine energetische Stabilisierung (z.B. Verringerung der Energie der Präfusionskonformation gegenüber der offenen Postfusionskonformation) und/oder eine kinetische Stabilisierung (z.B. Verringerung der Übergangsrate von der Präfusionskonformation zur Postfusionskonformation) sein. Zusätzlich kann die Stabilisierung des Coronavirus-S-Ektodomänen-Trimers in der Präfusionskonformation eine Erhöhung der Beständigkeit gegenüber Denaturierung im Vergleich zu einer entsprechenden nativen Coronavirus-S-Sequenz beinhalten.

[0103] Dementsprechend enthält das Spike-Protein eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen, die das S-Protein in der Präfusionskonformation stabilisieren, zum Beispiel Substitutionen, die den membranfernen Teil des S-Proteins (einschließlich der N-terminalen Region) in der Präfusionskonformation stabilisieren.

[0104] Die Stabilisierung des SARS-CoV-2-Coronavirus-Spike-Proteins wird erfindungsgemäß durch Substitution mindestens einer Aminosäure an der Position K986 und/oder V987 durch Aminosäuren erreicht werden, die das Spike-Protein in einer Perfusionskonformation stabilisieren (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1).

[0105] Die präfusionsstabilisierende Mutation kann eine Aminosäuresubstitution an der Position K986 umfassen, wobei die Aminosäure K986 mit einer aus A, I, L, M, F, V, G oder P (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1) ausgewählten Aminosäure substituiert sein kann, wobei erfindungsgemäß die Aminosäure K986 mit P substituiert ist. Weiterhin kann die fusionsstabilisierende Mutation eine Aminosäuresubstitution an der Position V987 umfassen, wobei die Aminosäure V987 mit einer aus A, I, L, M, F, V, G oder P (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1) ausgewählten Aminosäure substituiert sein kann, wobei erfindungsgemäß die Aminosäure V987 mit P substituiert ist.

[0106] So erfolgt erfindungsgemäß die Stabilisierung des SARS-CoV-2-Coronavirus-Spike-Proteins durch Substitution von zwei aufeinanderfolgenden Aminosäuren an den Positionen K986 und V987 durch Aminosäuren erreicht werden, die das Spike-Protein in einer Präfusionskonformation stabilisieren (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1).

[0107] So kann die präfusionsstabilisierende Mutation eine Aminosäuresubstitution an den Positionen K986 und V987 umfassen, wobei die Aminosäuren K986 und/oder V987 mit einer aus A, I, L, M, F, V, G oder P (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1) ausgewählten Aminosäure substituiert sind.

[0108] Erfindungsgemäß wird die Stabilisierung der Perfusionskonformation durch Einführen von zwei aufeinanderfolgenden Prolin-Substitutionen an den Resten K986 und V987 in das Spike-Protein (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1) erreicht.

[0109] Dementsprechend umfasst das präfusionsstabilisierte Spike-Protein (S_stab) erfindungsgemäß mindestens eine präfusionsstabilisierende Mutation, wobei die mindestens eine präfusionsstabilisierende Mutation die folgenden Aminosäuresubstitutionen umfasst: K986P und V987P (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1).

[0110] Dementsprechend kann jede der oben angegebenen NCBI-Protein-Zugangsnummern oder jedes Protein, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 1-9, 274-340, 22737, 22739, 22741, 22743, 22745, 22747, 22749, 22751, 22753, 22755, 22757, 22929-22946 oder Fragmente oder Varianten davon von der fachkundigen Person ausgewählt werden, um solche Aminosäureänderungen, vorzugsweise Aminosäuresubstitutionen, einzuführen: K986P und V987P (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1).

[0111] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mindestens eine präfusionsstabilisierende Mutation eine hohlraumfüllende Mutation, die den Präfusionszustand weiter stabilisiert, wobei die Mutation/Aminosäuresubstitution aus der Liste ausgewählt ist, die T887WN; A1020W; T887WN und A1020W; oder P1069F (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1) umfasst.

[0112] Der Begriff „hohlraumfüllende Mutation“ oder „hohlraumfüllende Aminosäuresubstitution“ bezieht sich auf eine Aminosäuresubstitution, die einen Hohlraum innerhalb des Proteinkerns eines Proteins, wie z.B. einer Coronavirus-S-Protein-Ektodomäne, füllt. Hohlräume sind im Wesentlichen Kavitäten innerhalb eines gefalteten Proteins, in denen keine Aminosäuren oder Aminosäureseitenketten vorhanden sind. In einigen Ausführungsformen wird eine hohlraumfüllende Aminosäuresubstitution eingeführt, um einen Hohlraum zu füllen, der in der Präfusionskonformation eines Coronavirus-S-Ektodomänenkerns vorliegt, der nach dem Übergang zur Postfusionskonformation kollabiert (z.B. ein verringertes Volumen aufweist).

[0113] In einigen Ausführungsformen kann mindestens eine der folgenden Aminosäuresubstitutionen F817P, A892P, A899P und A942P mit einer (K986P- und V987P-) Substitution kombiniert sein (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1).

[0114] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst das SARS-CoV-2-Coronavirus-Spike-Protein mindestens eine der folgenden Aminosäuresubstitutionen (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1):

- F817P; K986P und V987P
- A892P; K986P und V987P
- A899P; K986P und V987P
- A942P; K986P und V987P

[0115] In besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst das SARS-CoV-2-Coronavirus-Spike-Protein die folgenden Aminosäuresubstitutionen (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1):

- F817P, A892P, A899P, A942P, K986P und V987P (S_stab_PP_hex)

[0116] Dementsprechend können alle oben angegebenen NCBI-Protein-Zugangsnummern oder jedes Protein, ausgewählt aus den SEQ ID NOs: 1-9, 274-340, 22737, 22739, 22741, 22743, 22745, 22747, 22749, 22751, 22753, 22755, 22757, 22929-22946, oder Fragmente oder Varianten davon von der fachkundigen Person ausgewählt werden, um solche Aminosäureänderungen, geeigneterweise Aminosäuresubstitutionen, ausgewählt aus F81 7P, A892P, A899P, A942P; oder Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus (F817P; K986P und V987P); (A892P; K986P und V987P); (A899P; K986P und V987P); (A942P; K986P und V987P); (F817P, A892P, A899P, A942P, K986P und V987P) (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1) einzuführen.

[0117] In besonders bevorzugten Ausführungsformen kann mindestens eine der folgenden Aminosäuresubstitutionen T887W; A1020W; T887W und A1020W; oder P1069F mit einer (K986P- und V987P-) Substitution kombiniert sein (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1).

[0118] In anderen besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst das SARS-CoV-2-Coronavirus-Spike-Protein mindestens eine der folgenden Aminosäuresubstitutionen (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1):

- T887W; K986P und V987P
- A1020W; K986P und V987P
- T887W und A1020W; K986P und V987P
- P1069F; K986P und V987P

[0119] Dementsprechend können alle oben angegebenen NCBI-Protein-Zugangsnummern oder irgendein Protein, ausgewählt aus den SEQ ID NOs: 1-9, 274-340, 22737, 22739, 22741, 22743, 22745, 22747, 22749, 22751, 22753, 22755, 22757, 22929-22946, oder Fragmente oder Varianten davon von der fachkundigen Person ausgewählt werden, um solche Aminosäureveränderungen, geeigneterweise Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus T887W; A1020W; T887W und A1020W; oder P1069F; oder Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus (T887W; K986P und V987P); (A1020W; K986P und V987P); (T887W und A1020W; K986P und V987P); (P1069F; K986P und V987P) (Aminosäurepositionen gemäß der Bezugssequenz SEQ ID NO: 1) einzuführen.

[0120] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mindestens eine präfusionsstabilisierende Mutation eine mutierte Protonierungsstelle, die den Präfusionszustand weiter stabilisiert, wobei diese Mutation/Amino-

säuresubstitution ausgewählt ist aus H1048Q und H1064N; H1083N und H1101 N; oder H1048Q und H1064N und H1083N und H1101N (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1).

[0121] In einigen Ausführungsformen kann mindestens eine der folgenden Aminosäuresubstitutionen H1048Q und H1064N; H1083N und H1101N; oder H1048Q und H1064N und H1083N und H1101N mit einer (K986P- und V987P-) Substitution kombiniert sein (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1).

[0122] In besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst das SARS-CoV-2-Coronavirus-Spike-Protein mindestens eine der folgenden Aminosäuresubstitutionen (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1):

- H1048Q und H1064N; K986P und V987P
- H1083N und H1101N; K986P und V987P
- H1048Q und H1064N und H1083N und H1101N; K986P und V987P

[0123] Dementsprechend können alle oben angegebenen NCBI-Protein-Zugangsnummern oder irgendein Protein, ausgewählt aus den SEQ ID NOs: 1-9, 274-340, 22737, 22739, 22741, 22743, 22745, 22747, 22749, 22751, 22753, 22755, 22757, 22929-22946, oder Fragmente oder Varianten davon von der fachkundigen Person ausgewählt werden, um solche Aminosäureveränderungen, geeigneterweise Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus H1048Q und H1064N; H1083N und H1101N; oder H1048Q und H1064N und H1083N und H1101N; oder Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus (H1048Q und H1064N; K986P und V987P); (H1083N und H1101N; K986P und V987P); (H1048Q und H1064N und H1083N und H1101N; K986P und V987P) (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1) einzuführen.

[0124] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mindestens eine präfusionsstabilisierende Mutation eine artifizielle intramolekulare Disulfidbindung. Eine solche artifizielle intramolekulare Disulfidbindung kann eingeführt werden, um den membranfernen Teil des S-Proteins (einschließlich der N-terminalen Region) in der Präfusionskonformation weiter zu stabilisieren, d.h. in einer Konformation, die spezifisch an einen oder mehrere Präfusions-Spezifizierungs-Antikörper bindet und/oder eine geeignete antigene Stelle aufweist, die in der Präfusionskonformation, aber nicht in der Postfusionskonformation des S-Proteins, vorhanden ist.

[0125] In bevorzugten Ausführungsformen erzeugt die mindestens eine präfusionsstabilisierende Mutation eine artifizielle intramolekulare Disulfidbindung, wobei die mindestens eine artifizielle intramolekulare Disulfidbindung durch mindestens zwei der folgenden Aminosäuresubstitutionen erzeugt wird, die aus der Liste ausgewählt sind, umfassend I712C, I714C, P715C, T874C, G889C, A890C, I909C, N914C, Q965C, F970C, A972C, R995C, G999C, S1003C, L1034C, V1040C, Y1047C, S1055C, P1069C, T1077C, oder Y1110C, S1123C (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1).

[0126] In bevorzugten Ausführungsformen erzeugt die mindestens eine präfusionsstabilisierende Mutation eine artifizielle intramolekulare Disulfidbindung, wobei die mindestens eine artifizielle intramolekulare Disulfidbindung durch mindestens eine der folgenden Aminosäuresubstitutionen erzeugt wird: I712C und T1077C; I714C und Y1110C; P715C und P1069C; G889C und L1034C; I909C und Y1047C; Q965C und S1003C; F970C und G999C; A972C und R995C; A890C und V1040C; T874C und S1055C, oder N914C und S1123C (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1).

[0127] In weiteren Ausführungsformen umfasst die mindestens eine präfusionsstabilisierende Mutation 2, 3, 4, 5, 6, 7 oder 8 verschiedene artifizielle intramolekulare Disulfidbindungen, wobei jede aus den folgenden Aminosäuresubstitutionen ausgewählt sein kann: I712C und T1077C; I714C und Y1110C; P715C und P1069C; G889C und L1034C; I909C und Y1047C; Q965C und S1003C; F970C und G999C; A972C und R995C; A890C und V1040C; T874C und S1055C, oder N914C und S1123C (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1).

[0128] In weiteren Ausführungsformen können mindestens eine, vorzugsweise 2, 3, 4, 5 oder mehr der folgenden Aminosäuresubstitutionen I712C und T1077C; I714C und Y1110C; P715C und P1069C; G889C und L1034C; I909C und Y1047C; Q965C und S1003C; F970C und G999C; A972C und R995C; A890C und V1040C; T874C und S1055C, oder N914C und S1123C mit einer (K986P- und V987P-) Substitution kombiniert sein. Zum Beispiel kann ein präfusionsstabilisiertes S-Protein zwei verschiedene artifizielle intramolekulare Disulfidbindungen umfassen, z.B. I712C und T1077C; P715C und P1069C; und zusätzlich eine K986P- und V987P-Substitution, usw. (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1).

[0129] In besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst das SARS-CoV-2-Coronavirus-Spike-Protein mindestens eine der folgenden Aminosäuresubstitutionen (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1):

- I712C und T1077C; K986P und V987P
- I714C und Y1110C; K986P und V987P
- P715C und P1069C; K986P und V987P
- G889C und L1034C; K986P und V987P
- I909C und Y1047C; K986P und V987P
- Q965C und S1003C; K986P und V987P
- F970C und G999C; K986P und V987P
- A972C und R995C; K986P und V987P
- A890C und V1040C; K986P und V987P
- T874C und S1055C; K986P und V987P
- N914C und S1123C; K986P und V987P

[0130] Dementsprechend können alle oben angegebenen NCBI-Protein-Zugangsnummern oder jedes Protein, ausgewählt aus den SEQ ID NOs: 1-9, 274-340, 22737, 22739, 22741, 22743, 22745, 22747, 22749, 22751, 22753, 22755, 22757, 22929-22946, oder Fragmente oder Varianten davon von der fachkundigen Person ausgewählt werden, um solche Aminosäureveränderungen, geeigneterweise Aminosäuresubstitutionen, ausgewählt aus I712C und T1077C; I714C und Y1110C; P715C und P1069C; G889C und L1034C; I909C und Y1047C; Q965C und S1003C; F970C und G999C; A972C und R995C; A890C und V1040C; T874C und S1055C, oder N914C und S1123C; oder Aminosäuresubstitutionen, ausgewählt aus (I712C; T1077C; K986P; V987P) oder (I714C; Y1110C; K986P; V987P) oder (P715C; P1069C; K986P; V987P) oder (G889C; L1034C; K986P; V987P) oder (I909C; Y1047C; K986P; V987P) oder (Q965C; S1003C; K986P; V987P) oder (F970C; G999C; K986P; V987P) oder (A972C; R995C; K986P; V987P) oder (A890C und V1040C; K986P und V987P) oder (T874C und S1055C; K986P und V987P) oder (N914C und S1123C; K986P und V987P) (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1) einzuführen.

[0131] Es sei darauf hingewiesen, dass im Kontext der Erfindung jedes SARS-CoV-2-Coronavirus-Spike-Protein, wie oben (beispielhaft für Referenzprotein SEQ ID NO: 1) beschrieben, mutiert sein kann, um das Spike-Protein in der Präfusionskonformation zu stabilisieren.

[0132] Dementsprechend kann das präfusionsstabilisierte Spike-Protein (S_stab) mindestens eine der Aminosäuresequenzen umfassen, die identisch oder zu mindestens 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 10-26, 40-48, 85-111, 341-1278, 1681-2618, 2686-3623, 3691-4628, 4696-5633, 5701-6638, 6706-7643, 7711-8648, 8716-9653, 9721-10658, 10726-11663, 13377-13510, 13521-14123, 22732, 22738, 22740, 22742, 22744, 22746, 22748, 22750, 22752, 22754, 22756, 22758, 22947-22964 sind, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante dieser Sequenzen oder besteht daraus. Weitere Informationen zu diesen Aminosäuresequenzen sind auch in Tabelle 1 (siehe Zeilen 2 bis 5, 12-15, 17-20, 22-25, 27-30, 32-35, 38 der Spalte A und B) und unter der Kennziffer <223> des ST25-Sequenzprotokolls der jeweiligen Sequenz-SEQ ID NOs angegeben.

[0133] Das präfusionsstabilisierte Spike-Protein kann (S_stab) mindestens eine der Aminosäuresequenzen umfassen, die identisch oder zu mindestens 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 10-26, 341-407, 609-1278, 13521-13587, 22738, 22740, 22742, 22744, 22746, 22748, 22750, 22752, 22754, 22756, 22758, 22947-22964 sind, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante dieser Sequenzen oder besteht daraus. Weitere Informationen bezüglich dieser Aminosäuresequenzen sind auch in Tabelle 1 (siehe Zeilen 2 und 5 der Spalte A und B) und unter der Kennziffer <223> des ST25-Sequenzprotokolls der jeweiligen Sequenz-SEQ ID NOs angegeben. Erfindungsgemäß sind insbesondere die Aminosäuresequenzen, die zu mindestens 95% identisch sind mit SEQ ID NOs: 22738, 22758, 22959 und 22961-22964.

[0134] Das präfusionsstabilisierte Spike-Protein kann (S_stab) mindestens eine der Aminosäuresequenzen umfassen, die identisch oder zu mindestens 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 10-18, 341-407, 22947-22964 sind, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante dieser Sequenzen oder besteht daraus. Weitere Informationen bezüglich dieser Aminosäuresequenzen sind auch in Tabelle 1 (siehe Zeile 2 der Spalte A und B) und unter der Kennziffer <223> des ST25-Sequenzprotokolls der jeweiligen Sequenz-SEQ ID NOs angegeben.

[0135] Das präfusionsstabilisierte Spike-Protein (S_stab) kann mindestens eine der Aminosäuresequenzen umfassen, die identisch oder zu mindestens 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 22960, 22961, 22963 sind, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante dieser Sequenzen oder besteht daraus.

[0136] Das präfusionsstabilisierte Spike-Protein (S_stab) kann mindestens eine der Aminosäuresequenzen umfassen, die identisch oder zu mindestens 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 10 oder 341 sind, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante dieser Sequenzen oder besteht daraus. Erfindungsgemäß weist das präfusionsstabilisierte Spike-Protein (S_stab) eine Aminosäuresequenz, die zu mindestens 95% identisch ist mit SEQ ID NO: 10, auf.

[0137] Die mRNA als Nukleinsäure kann mindestens ein antigenes Peptid oder Protein aus dem SARS-CoV-2-Coronavirus, wie hierin definiert, und zusätzlich mindestens ein heterologes Peptid- oder Proteinelement, umfassen.

[0138] Geeigneterweise kann das mindestens eine heterologe Peptid- oder Proteinelement die Sekretion des kodierten antigenen Peptids oder Proteins der Erfindung fördern oder verbessern (z.B. über sekretorische Signalsequenzen), die Verankerung des kodierten antigenen Peptids oder Proteins der Erfindung in der Plasmamembran fördern oder verbessern (z.B. über Transmembranelemente), die Bildung von Antigenkomplexen (z.B. über Multimerisierungsdomänen oder Antigen-Clustering-Elemente) fördern oder verbessern oder die Bildung virusartiger Partikel fördern oder verbessern (VLP-bildende Sequenz). Darüber hinaus kann die mRNA als Nukleinsäure zusätzlich Peptid-Linkerelemente, selbstspaltende Peptide, immunologische Adjuvans-Sequenzen oder Targeting-Sequenzen für dendritische Zellen kodieren.

[0139] Geeignete Multimerisierungsdomänen können aus der Liste der Aminosäuresequenzen gemäß SEQ ID NOs: 1116-1167 der WO2017/081082 oder Fragmenten oder Varianten dieser Sequenzen ausgewählt werden. Geeignete Transmembranelemente können aus der Liste der Aminosäuresequenzen gemäß SEQ ID NOs: 1228-1343 von WO2017/081082 oder Fragmenten oder Varianten dieser Sequenzen ausgewählt werden. Geeignete VLP-bildende Sequenzen können aus der Liste der Aminosäuresequenzen gemäß SEQ ID NOs: 1168-1227 der Patentanmeldung WO2017/081082 oder Fragmenten oder Varianten dieser Sequenzen ausgewählt werden. Geeignete Peptidlinker können aus der Liste der Aminosäuresequenzen gemäß SEQ ID NOs: 1509-1565 der Patentanmeldung WO2017/081082 oder Fragmenten oder Varianten dieser Sequenzen ausgewählt werden. Geeignete selbstspaltende Peptide können aus der Liste der Aminosäuresequenzen gemäß SEQ ID NOs: 1434-1508 der Patentanmeldung WO2017/081082 oder Fragmenten oder Varianten dieser Sequenzen ausgewählt werden. Geeignete immunologische Adjuvans-Sequenzen können aus der Liste der Aminosäuresequenzen gemäß SEQ ID NOs: 1360-1421 der Patentanmeldung WO2017/081082 oder Fragmenten oder Varianten dieser Sequenzen ausgewählt werden. Geeignete Targeting-Sequenzen für dendritische Zellen (DCs) können aus der Liste der Aminosäuresequenzen gemäß SEQ ID NOs: 1344-1359 der Patentanmeldung WO2017/081082 oder Fragmenten oder Varianten dieser Sequenzen ausgewählt werden. Geeignete sekretorische Signalpeptide können aus der Liste der Aminosäuresequenzen gemäß SEQ ID NOs: 1-1115 und SEQ ID NO: 1728 der veröffentlichten PCT-Patentanmeldung WO2017/081082 oder Fragmenten oder Varianten dieser Sequenzen ausgewählt werden.

[0140] In bevorzugten Ausführungsformen kodiert die mindestens eine kodierende Sequenz zusätzlich für ein oder mehrere heterologe Peptid- oder Proteinelemente, ausgewählt aus einem Signalpeptid, einem Linker-Peptid, einem Helfer-Epitop, einem Antigen-Clustering-Element, einem Trimerisierungs- oder Multimerisierungselement, einem Transmembranelement oder einer VLP-bildenden Sequenz.

[0141] In bevorzugten Ausführungsformen kodiert die erfindungsgemäße mRNA als Nukleinsäure, die für mindestens ein von einem SARS-CoV-2-Coronavirus abgeleitetes antigenes Protein kodiert, zusätzlich für

mindestens ein heterologes Trimerisierungselement, ein Antigen-Clustering-Element oder eine VLP-bildende Sequenz.

Antigen-Clustering-Elemente oder Multimerisierungselemente

[0142] In bevorzugten Ausführungsformen können die Antigen-Clustering-Elemente aus einem Ferritin-Element oder einem Lumazin-Synthase-Element, einem Oberflächenantigen des Hepatitis-B-Virus (HBsAg) oder einem Encapsulin ausgewählt sein. Die Expression eines stabil geclusterten Spike-Proteins, vorzugsweise in seiner Präfusionskonformation, kann das Ausmaß und die Breite der neutralisierenden Aktivität gegen SARS-CoV-2 erhöhen.

[0143] Lumazin-Synthase (Lumazin, LS, LumSynth) ist ein Enzym mit partikelbildenden Eigenschaften, das in einer Vielzahl von Organismen vorhanden und an der Riboflavin-Biosynthese beteiligt ist.

[0144] In besonders bevorzugten Ausführungsformen wird Lumazin-Synthase zur Förderung der Antigen-Clusterbildung eingesetzt und kann daher die Immunantworten des kodierten Coronavirus-Antigens der Erfindung fördern oder verstärken.

[0145] In besonders bevorzugten Ausführungsformen ist das Antigen-Clustering-Element (Multimerisierungselement) Lumazin-Synthase oder ist davon abgeleitet, wobei die Aminosäuresequenz der Antigen-Clustering-Domäne vorzugsweise identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 112 ist, oder ist ein Fragment oder eine Variante davon.

[0146] Ferritin ist ein Protein, dessen Hauptfunktion die intrazelluläre Eisenspeicherung ist. Fast alle lebenden Organismen produzieren Ferritin, das aus 24 Untereinheiten besteht, die jeweils aus einem Vier-alpha-Helix-Bündel zusammengesetzt sind und sich selbst in einer quaternären Struktur mit oktaedrischer Symmetrie zusammenbauen. Seine Eigenschaften, sich selbst zu Nanopartikeln zusammenzubauen, sind bestens geeignet, um Antigene zu tragen und zu exponieren.

[0147] In besonders bevorzugten Ausführungsformen wird Ferritin verwendet, um das Antigen-Clustering zu fördern, und es kann daher Immunantworten des kodierten Coronavirus-Antigens, vorzugsweise eines Spike-Proteins, fördern.

[0148] In besonders bevorzugten Ausführungsformen ist das Antigen-Clustering-Element (Multimerisierungselement) Ferritin oder ist davon abgeleitet, wobei die Aminosäuresequenz der Antigen-Clustering-Domäne vorzugsweise identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 113 ist, oder ist ein Fragment oder eine Variante davon.

[0149] In einigen Ausführungsformen ist die Antigen-Clustering-Domäne ein Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg). HBsAg bildet kugelförmige Partikel. Die Zugabe eines Fragments der Sequenz des Oberflächenantigens des Hepatitis-B-Virus (HBsAg) kann besonders effektiv sein, um die Immunantwort der nukleinsäurebasierten Vakzine gegen das Coronavirus zu verstärken.

[0150] In besonders bevorzugten Ausführungsformen wird HBsAg verwendet, um das Antigen-Clustering zu fördern und kann daher Immunantworten des kodierten Coronavirus-Antigens, vorzugsweise Spike-Proteins, wie hier definiert, fördern.

[0151] In einigen Ausführungsformen ist das Antigen-Clustering-Element ein Encapsulin-Element. Die Zugabe einer Encapsulin-Sequenz kann besonders effektiv sein, um die Immunantwort der Nukleinsäurebasierten Vakzine gegen das Coronavirus zu verstärken. In besonders bevorzugten Ausführungsformen wird Encapsulin verwendet, um das Antigen-Clustering zu fördern und kann daher Immunantworten des kodierten Coronavirus-Antigens, vorzugsweise eines Spike-Proteins, wie hier definiert, fördern.

[0152] Encapsulin ist ein Protein, das aus dem thermophilen Thermotoga maritima isoliert wurde und als Element verwendet werden kann, um die Selbstassemblierung von Antigenen zu Antigen(nano)-Partikeln zu ermöglichen. Encapsulin wird aus 60 Kopien identischer 31-kDa-Monomere zusammengesetzt, die eine dünne und ikosaedrische T = 1 symmetrische Käfigstruktur mit Innen- und Außendurchmessern von 20 bzw. 24 nm aufweisen.

[0153] In einigen Ausführungsformen, in denen die kodierende Sequenz der mRNA als Nukleinsäure zusätzlich ein heterologes Antigen-Clustering-Element kodiert, ist es besonders bevorzugt und zweckdienlich, ein Fusionsprotein zu erzeugen, das ein Antigen-Clustering-Element und ein von SARS-CoV-2 abgeleitetes antigenes Peptid oder Protein umfasst. Geeigneterweise fehlt dem antigenen Peptid oder Protein, vorzugsweise dem Spike-Protein, die C-terminale Transmembrandomäne (TM) (es fehlen aa 1212 bis aa 1273) oder es fehlt ein Teil der C-terminalen Transmembrandomäne (TMflex), es fehlen z.B. aa 1148 bis aa 1273.

[0154] Dementsprechend können alle Aminosäuresequenzen, die identisch oder zu mindestens 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 1-26, 274-1278, 13521-13587, 22732, 22737-22758, 22929-22964 sind, modifiziert werden, um die endogene Transmembrandomäne (TM) an der Position aa 1212 bis aa 1273 zu entfernen und können daher als „C-terminal trunkierte“ Proteine im Kontext der Erfindung verwendet werden (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1). Des Weiteren können alle Aminosäuresequenzen, die identisch oder zu mindestens 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 1-26, 274-1278, 13521-13587, 22732, 22737-22758, 22929-22964 sind, modifiziert werden, um einen Teil der endogenen Transmembrandomäne (TMflex) an der Position aa 1148 bis aa 1273 zu entfernen und können daher als „C-terminal trunkierte“ Proteine im Kontext der Erfindung verwendet werden (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1). Geeignete Spike-Proteine, denen die C-terminale Transmembrandomäne (TM oder TMflex) fehlt, können ausgewählt sein aus SEQ ID NOs: 31-39, 1614-3623, 13377-13510.

[0155] In anderen Ausführungsformen, in denen die kodierende Sequenz der mRNA als Nukleinsäure zusätzlich für ein heterologes Antigen-Clustering-Element, wie oben definiert, kodiert, ist es besonders bevorzugt und zweckdienlich, ein Fusionsprotein zu erzeugen, das ein Antigen-Clustering-Element und ein antigenes Peptid oder Protein umfasst, das von dem SARS-CoV-2-Spike-Proteinfragment S1 (dem S2 und/oder TM und/oder TMflex fehlen) abgeleitet ist. Weiterhin kann es zweckdienlich sein, Linker-Elemente zur Trennung des heterologen Antigen-Clustering-Elements von dem antigenen Peptid oder Protein zu verwenden (z.B. ein Linker gemäß SEQ ID NO: 115, 13148, 13152).

[0156] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst das mindestens eine antigene Peptid oder Protein, das ein heterologes Antigen-Clustering-Element umfasst, mindestens eine der Aminosäuresequenzen, die identisch oder zu mindestens 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 58-75, 85-102, 3624-5633, 7644-9653, 13588-13721, 13856-13989, 22733, 22735, 22736 sind, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante dieser Sequenzen oder besteht daraus. Weitere Informationen zu diesen Aminosäuresequenzen sind auch in Tabelle 1 (siehe Zeilen 16 und 25 der Spalte A und B) und unter der Kennziffer <223> des ST25-Sequenzprotokolls der jeweiligen Sequenz-SEQ ID NOs angegeben.

[0157] Weitere geeignete Multimerisierungselemente können aus der Liste der Aminosäuresequenzen gemäß SEQ ID NOs: 1116-1167 der WO2017/081082 oder Fragmenten oder Varianten dieser Sequenzen ausgewählt werden. Die SEQ ID NOs: 1116-1167 aus WO2017/081082 werden hiermit durch Bezugnahme aufgenommen.

Trimerisierungselemente

[0158] In bevorzugten Ausführungsformen kann das Trimerisierungselement aus einem Foldon-Element ausgewählt sein. In bevorzugten Ausführungsformen ist das Foldon-Element ein Fibritin-Foldon-Element. Die Expression eines stabilen trimeren Spike-Proteins, vorzugsweise in seiner Präfusionskonformation, kann das Ausmaß und die Breite der neutralisierenden Aktivität gegen SARS-CoV-2 erhöhen.

[0159] In besonders bevorzugten Ausführungsformen wird ein Fibritin-Foldon-Element verwendet, um die Antigen-Trimerisierung zu fördern und kann daher die Immunantwort des kodierten Coronavirus-Antigens, vorzugsweise des Spike-Proteins, fördern. Vorzugsweise stammt das Foldon-Element von einem Bakteriophagen oder leitet sich von einem Bakteriophagen ab, vorzugsweise vom Bakteriophagen T4, besonders bevorzugt vom Fibritin des Bakteriophagen T4.

[0160] In besonders bevorzugten Ausführungsformen ist das Trimerisierungselement Foldon oder von Foldon abgeleitet, wobei die Aminosäuresequenz des Trimerisierungselements vorzugsweise identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder

99% identisch mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 114 ist, oder ist ein Fragment oder eine Variante davon.

[0161] In anderen Ausführungsformen, in denen die kodierende Sequenz der mRNA als Nukleinsäure zusätzlich für ein heterologes Trimerisierungselement kodiert, ist es besonders bevorzugt und zweckdienlich, ein Fusionsprotein zu erzeugen, das ein Trimerisierungselement und ein von SARS-CoV-2 abgeleitetes antigenes Peptid oder Protein umfasst. Geeigneterweise fehlt dem antigenen Peptid oder Protein, vorzugsweise dem von SARS-CoV-2 abgeleiteten Spike-Protein, die C-terminale Transmembrandomäne (es fehlen aa 1212 bis aa 1273) oder es fehlt ein Teil der C-terminalen Transmembrandomäne (TMflex), z.B. fehlen aa 1148 bis aa 1273.

[0162] Dementsprechend können alle Aminosäuresequenzen, die identisch oder zu mindestens 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 1-26, 274-1278, 13521-13587, 22732, 22737-22758, 22947-22964 sind, so modifiziert werden, dass ihnen das endogene Transmembranelement an Position aa 1212 bis aa 1273 fehlt, und können daher als „C-terminal trunkierte“ Proteine im Kontext der Erfindung verwendet werden. Darüber hinaus können alle Aminosäuresequenzen, die identisch oder zu mindestens 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 1-26, 274-1278, 13521-13587, 22732, 22737-22758, 22947-22964 sind, so modifiziert werden, dass ein Teil der endogenen Transmembrandomäne (TMflex) an der Position aa 1148 bis aa 1273 entfernt wird, und können daher als „C-terminal trunkierte“ Proteine im Kontext der Erfindung verwendet werden (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1). Geeignete Spike-Proteine, denen die C-terminale Transmembrandomäne (TM oder TMflex) fehlt, können ausgewählt sein aus SEQ ID NOs: 31-39, 1614-3623, 13377-13510.

[0163] In anderen Ausführungsformen, in denen die kodierende Sequenz der mRNA als Nukleinsäure zusätzlich für ein heterologes Trimerisierungselement, wie oben definiert, kodiert, ist es besonders bevorzugt und zweckdienlich, ein Fusionsprotein zu erzeugen, das ein Trimerisierungselement und ein antigenes Peptid oder Protein umfasst, das vom SARS-CoV-2-Spike-Proteinfragment S1 abgeleitet ist (dem S2 und/oder TM und/oder TMflex fehlen). Weiterhin kann es zweckdienlich sein, Linker-Elemente zur Trennung des heterologen Antigen-Clustering-Elements von dem antigenen Peptid oder Protein zu verwenden (z.B. einen Linker gemäß SEQ ID NO: 115, 13148, 13152).

[0164] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst das mindestens eine antigene Peptid oder Protein, das ein heterologes Trimerisierungselement umfasst, mindestens eine der Aminosäuresequenzen, die identisch oder mindestens zu 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 76-84, 103-111, 5634-6638, 9654-10658, 13722-13788, 13990-14056, 22734 sind, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante dieser Sequenzen oder besteht daraus. Weitere Informationen zu diesen Aminosäuresequenzen sind auch in Tabelle 1 (siehe Zeilen 26, 30 und 41 der Spalte A und B) und unter der Kennziffer <223> des ST25-Sequenzprotokolls der jeweiligen Sequenz-SEQ ID NOs angegeben.

[0165] Weitere geeignete Trimerisierungselemente können aus der Liste der Aminosäuresequenzen gemäß SEQ ID NOs: 1116-1167 der WO2017/081082, oder Fragmenten oder Varianten dieser Sequenzen ausgewählt werden. Die SEQ ID NOs: 1116-1167 aus WO2017/081082 werden hiermit durch Bezugnahme aufgenommen.

VIP-bildende Elemente

[0166] In bevorzugten Ausführungsformen kann die VLP-bildende Sequenz ausgewählt und mit dem Coronavirus-Antigen, wie hierin definiert, fusioniert sein. Die Expression eines stabil geclusterten Spike-Proteins in VLP-Form kann das Ausmaß und die Breite der neutralisierenden Aktivität gegen SARS-CoV-2 erhöhen. VLPs ahmen infektiöse Viren strukturell nach und können potente zelluläre und humorale Immunantworten induzieren.

[0167] Geeignete VLP-bildende Sequenzen können aus Elementen ausgewählt sein, die vom Hepatitis-B-Virus-Kernantigen, dem HIV-1-Gag-Protein oder dem Woodchuck-Hepatitis-Kernantigenelement (WhcAg) abgeleitet sind.

[0168] In besonders bevorzugten Ausführungsformen ist die mindestens eine VLP-bildende Sequenz ein Woodchuck-Hepatitis-Kernantigen-Element (WhcAg). Das WhcAg-Element wird verwendet, um die VLP-Bildung zu fördern und kann daher die Immunantwort des kodierten Coronavirus-Antigens, vorzugsweise des Spike-Proteins, fördern.

[0169] In besonders bevorzugten Ausführungsformen ist die VLP-bildende Sequenz ein Foldon oder von diesem abgeleitet, wobei die Aminosäuresequenz der VLP-bildenden Sequenz vorzugsweise identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 13171 ist, oder ein Fragment oder eine Variante davon.

[0170] In weiteren Ausführungsformen, in denen die kodierende Sequenz der mRNA als Nukleinsäure zusätzlich für eine heterologe VLP-bildende Sequenz kodiert, ist es besonders bevorzugt und zweckdienlich, ein Fusionsprotein zu erzeugen, das eine VLP-bildende Sequenz und ein von SARS-CoV-2 abgeleitetes antigenes Peptid oder Protein umfasst. Das antigene Peptid oder Protein ist vorzugsweise das von SARS-CoV-2 abgeleitete Spike-Protein, dem die C-terminale Transmembrandomäne fehlt (es fehlen aa 1212 bis aa 1273) oder dem ein Teil der C-terminalen Transmembrandomäne (TMflex), z.B. aa 1148 bis aa 1273, fehlt.

[0171] Dementsprechend können alle Aminosäuresequenzen, die identisch oder zu mindestens 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 1-26, 274-1278, 13521-13587, 22732, 22737-22758, 22929-22964 sind, so modifiziert werden, dass ihnen das endogene Transmembranelement an der Position aa 1212 bis aa 1273 fehlt und können daher als „C-terminal trunkierte“ Proteine im Kontext der Erfindung verwendet werden. Darüber hinaus können alle Aminosäuresequenzen, die identisch oder zu mindestens 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 1-26, 274-1278, 13521-13587, 22732, 22737-22758, 22929-22964 sind, so modifiziert werden, dass ein Teil der endogenen Transmembrandomäne (TMflex) an der Position aa 1148 bis aa 1273 entfernt wird, und können daher als „C-terminal trunkierte“ Proteine im Kontext der Erfindung verwendet werden (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1). Geeignete Spike-Proteine, denen die C-terminale Transmembrandomäne (TM oder TMflex) fehlt, können ausgewählt sein aus den SEQ ID NOs: 31-39, 1614-3623, 13377-13510 .

[0172] In anderen Ausführungsformen, in denen die kodierende Sequenz der mRNA als Nukleinsäure zusätzlich für eine heterologe VLP-bildende Sequenz, wie oben definiert, kodiert, ist es besonders bevorzugt und zweckdienlich, ein Fusionsprotein zu erzeugen, das eine VLP-bildende Sequenz und ein antigenes Peptid oder Protein, das von dem SARS-CoV-2-Spike-Proteinfragment S1 abgeleitet ist (dem S2 und/oder TM und/oder TMflex fehlen), umfasst. Weiterhin kann es zweckdienlich sein, Linker-Elemente zur Trennung des heterologen Antigen-Clustering-Elements von dem antigenen Peptid oder Protein zu verwenden (z.B. ein Linker gemäß SEQ ID NO: 115, 13148, 13152).

[0173] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst das mindestens eine antigene Peptid oder Protein, das eine heterologe VLP-bildende Sequenz umfasst, mindestens eine der Aminosäuresequenzen, die identisch oder zu mindestens 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 6639-7643, 10659-11663, 13789-13855, 14057-14123 sind, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante dieser Sequenzen oder besteht daraus. Weitere Informationen bezüglich dieser Aminosäuresequenzen sind auch in Tabelle 1 (siehe Zeilen 31 und 35 der Spalte A und B) und unter der Kennziffer <223> des ST25-Sequenzprotokolls der jeweiligen Sequenz-SEQ ID NOs angegeben.

[0174] Weitere geeignete VLP-bildende Sequenzen in diesem Zusammenhang können aus der Liste der Aminosäuresequenzen gemäß SEQ ID NOs: 1168-1227 der Patentanmeldung WO2017/081082 oder Fragmenten oder Varianten dieser Sequenzen ausgewählt sein. Die SEQ ID NOs: 1168-1227 der Patentanmeldung WO2017/081082 werden hiermit durch Bezugnahme aufgenommen.

Heterolose sekretorische Sisnalpeptide

[0175] In einigen Ausführungsformen umfasst das antigene Peptid oder Protein ein heterologes Signalpeptid. Ein heterologes Signalpeptid kann verwendet werden, um die Sekretion des kodierten Coronavirus-Antigens zu verbessern.

[0176] Geeignete sekretorische Signalpeptide können aus der Liste der Aminosäuresequenzen gemäß den SEQ ID NOs: 1-1115 und SEQ ID NO: 1728 der veröffentlichten PCT-Patentanmeldung WO2017/081082 oder Fragmenten oder Varianten dieser Sequenzen ausgewählt sein. SEQ ID NO: 1-1115 und SEQ ID NO: 1728 der WO2017/081082 werden hiermit durch Bezugnahme aufgenommen.

[0177] In Ausführungsformen, in denen die kodierende Sequenz der mRNA als Nukleinsäure zusätzlich für ein heterologes sekretorisches Signalpeptid kodiert, ist es besonders bevorzugt und zweckdienlich, ein Fusionsprotein zu erzeugen, das ein heterologes sekretorisches Signalpeptid und ein von SARS-CoV-2 abgeleitetes antigenes Peptid oder Protein umfasst. Geeigneterweise fehlt dem antigenen Peptid oder Protein, vorzugsweise dem von SARS-CoV-2 abgeleiteten Spike-Protein, das N-terminale endogene sekretorische Signalpeptid (es fehlen aa 1 bis aa 15). Dementsprechend können alle Aminosäuresequenzen, die identisch oder zu mindestens 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 1-26, 274-1278, 13521-13587, 22732, 22737-22758, 22929-22964 sind, so modifiziert werden, dass ihnen das endogene sekretorische Signalpeptid an der Position aa 1 bis aa 15 fehlt und können daher als „N-terminal trunkierte“ Proteine im Kontext der Erfindung verwendet werden.

[0178] In der folgenden Liste 1 sind geeignete antigene SARS-CoV-2-Coronavirus-Peptide und -Proteine gemäß obiger Definition näher spezifiziert (z.B. Nomenklatur, Proteinelemente usw.).

[0179] Liste 1: Exemplarische geeignete Proteindesigns:

- Volllängen-Spike-Protein (S), umfassend aa1 bis aa1273;
  - siehe z.B. SEQ ID NO: 1, 274.
- Stabilisiertes S-Protein, umfassend aa1-aa1273 und K986P-, V987P-Substitutionen (S_stab_PP);
  - siehe zum Beispiel SEQ ID NO: 10, 341.
- Stabilisiertes S-Protein, umfassend aa1-aa1273 und K986P-, V987P-Substitutionen (S_stab_PP);
  - siehe zum Beispiel SEQ ID NO: 22961.
- Stabilisiertes S-Protein, umfassend aa1-aa1273 und K986P-, V987P-Substitutionen (S_stab_PP);
  - siehe z.B. SEQ ID NO: 22960.
- Stabilisiertes S-Protein, umfassend aa1-aa1273 und K986P-, V987P-, F817P-, A892P-, A899P-, A942P-Prolinsubstitutionen; S_stab_PP_hex
  - siehe zum Beispiel SEQ ID NO: 22732.
- Stabilisiertes S-Protein umfassend aa1-aa1273 und K986P-, V987P-Substitutionen und eine hohlraumfüllende Mutation (T887W, A1020W); S_stab_PP_cav
  - siehe zum Beispiel SEQ ID NO: 408.
- Stabilisiertes S-Protein umfassend aa1-aa1273 und K986P-, V987P-Substitutionen und eine hohlraumfüllende Mutation (P1069F); S_stab_PP_cav
  - siehe zum Beispiel SEQ ID NO: 475.
- Stabilisiertes S-Protein umfassend aa1-aa1273 und K986P-, V987P-Substitutionen und eine hohlraumfüllende Mutation (H1048Q, H1064N, H1083N, H1101N); S_stab_PP_prot
  - siehe zum Beispiel SEQ ID NO: 542.
- Stabilisiertes S-Protein umfassend aa1-aa1273 und eine artifizielle Disulfidbindung (S_stab_disul) I712C, T1077C;
  - siehe zum Beispiel SEQ ID NO: 19, 609.
- S ohne Transmembrandomäne umfassend aa1-aa1211 (S_woTM);
  - siehe z.B. SEQ ID NO: 31, 1614.
- S ohne Transmembrandomäne flex, umfassend aa1-aa1147 (S_woTMflex);
  - siehe z.B. SEQ ID NO: 2619.

- S_woTM umfassend K986P-, V987P-Substitutionen (S_stab_PP_woTM)
  - siehe z.B. SEQ ID NO: 40, 1681.
- S_woTMflex umfassend K986P-, V987P-Substitutionen (S_stab_PP_woTMflex)
  - siehe z.B. SEQ ID NO: 2686.
- Spike-Proteinfragment S1, umfassend aa 1 bis aa 681 (S1);
  - siehe z.B. SEQ ID NO: 27, 1279.
- S_woTM umfassend eine Lumazin-Synthase;
  - siehe z.B. SEQ ID NO: 58, 3624.
- S_woTMflex umfassend eine Lumazin-Synthase;
  - siehe z.B. SEQ ID NO: 7644.
- S_stab_PP_woTM umfassend eine Lumazin-Synthase;
  - siehe z.B. SEQ ID NO: 85, 3691.
- S_stab_PP_woTMflex umfassend eine Lumazin-Synthase;
  - siehe z.B. SEQ ID NO: 7711.
- S_woTM umfassend ein Ferritin-Element;
  - siehe z.B. SEQ ID NO: 67, 4629.
- S_woTMflex umfassend ein Ferritin-Element;
  - siehe z.B. SEQ ID NO: 8649.
- S_stab_PP_woTM umfassend ein Ferritin-Element;
  - siehe z.B. SEQ ID NO: 94, 4696.
- S_stab_PP_woTMflex umfassend ein Ferritin-Element;
  - siehe z.B. SEQ ID NO: 8716.
- S_woTM umfassend ein Foldon-Element;
  - siehe z.B. SEQ ID NO: 76, 5634.
- S_woTMflex umfassend ein Foldon-Element;
  - siehe z.B. SEQ ID NO: 9654.
- S_stab_PP_woTM umfassend ein Foldon-Element;
  - siehe z.B. SEQ ID NO: 103, 5701.
- S_stab_PP_woTMflex umfassend ein Foldon-Element;
  - siehe z.B. SEQ ID NO: 9721.
- S_woTM umfassend eine VLP-Sequenz (WhcAg);
  - siehe z.B. SEQ ID NO: 6639.
- S_woTMflex umfassend eine VLP-Sequenz (WhcAg);
  - siehe z.B. SEQ ID NO: 10659.
- S_stab_PP_woTM umfassend eine VLP-Sequenz (WhcAg);
  - siehe z.B. SEQ ID NO: 6706.
- S_stab_PP_woTMflex umfassend eine VLP-Sequenz (WhcAg);
  - siehe z.B. SEQ ID NO: 10726.
- truncRBD umfassend ein Foldon-Element:
  - siehe z.B. SEQ ID NO: 22734.

- truncRBD umfassend eine Lumazin-Synthase (C-terminal)
  - siehe z.B. SEQ ID NO: 22735.
- truncRBD umfassend eine Lumazin-Synthase (N-terminal)
  - siehe z.B. SEQ ID NO: 22736
- truncRBD umfassend ein Ferritin-Element:
  - siehe z.B. SEQ ID NO: 22733.

[0180] Die in der Liste 1 angegebenen Aminosäurepositionen entsprechen der Bezugssequenz SEQ ID NO: 1.

[0181] Das mindestens eine antigene Peptid oder Protein kann mindestens eine der Aminosäuresequenzen umfassen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 10, 21, 22, 25, 27, 274, 341, 408, 475, 542, 743, 810, 1011, 1145, 1212, 1279, 8716, 10726, 22732-22758, 22929-22942, 22947-22964 sind, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante dieser Sequenzen oder besteht daraus.

[0182] Bevorzugte antigene Peptide oder Proteine, die von einem SARS-CoV-2-Coronavirus, wie oben definiert, abgeleitet sind, sind in Tabelle 1 (Zeilen 1 bis 41) angegeben. Darin entspricht jede Zeile 1 bis 41 einem geeigneten SARS-CoV-2-Coronavirus-Konstrukt. Spalte A der Tabelle 1 enthält eine kurze Beschreibung geeigneter Antigenkonstrukte. Spalte B der Tabelle 1 enthält die Protein- (Aminosäure-) SEQ ID NOs der jeweiligen Antigenkonstrukte. Spalte C der Tabelle 1 enthält die SEQ ID NO der entsprechenden kodierenden Wildtyp-Nukleinsäuresequenzen. Spalte D der Tabelle 1 enthält die SEQ ID NOs der entsprechenden G/C-optimierten kodierenden Nukleinsäuresequenzen (opt1, gc). Spalte E der Tabelle 1 enthält die SEQ ID NOs der entsprechenden an die humane Codon-Verwendung angepassten kodierenden Nukleinsäuresequenzen (opt 3, human). Spalte F der Tabelle 1 enthält die SEQ ID NOs der entsprechenden G/C-Gehalt-modifizierten kodierenden Nukleinsäuresequenzen (opt10, gc mod) (für eine detaillierte Beschreibung von „kodierenden Sequenzen“, siehe Abschnitt „geeignete kodierende Sequenzen“).

[0183] Insbesondere schließt die Beschreibung der Erfindung explizit die unter der Kennziffer <223> des ST25-Sequenzprotokolls der vorliegenden Anmeldung enthaltene Information ein. Bevorzugte Nukleinsäurekonstrukte, die kodierende Sequenzen der Tabelle 1 umfassen, z.B. mRNA-Sequenzen, die die kodierenden Sequenzen der Tabelle 1 umfassen, sind in Tabelle 3a und Tabelle 3b aufgeführt.

Tabelle 1: Bevorzugte Coronavirus-Konstrukte (Aminosäuresequenzen und kodierende Nukleinsäuresequenzen):

Spalte	A	B	C	D	E	F
1	Vollängen-Spike-Protein; S	1-9, 274-340, 22737, 22739, 22741, 22743, 22745, 22747, 22749, 22751, 22753, 22755, 22757; 22929-22946	116-131, 11664-11730	136, 11731-11797, 22764, 22766, 22768, 22770, 22772, 22774, 22776, 22778, 22780, 22782, 22784; 22969-23040	11967-12033	12034; 23041-23076
2	Stabilisiertes Spike-Protein; S_stab_PP	10-18, 341-407, 22738, 22740, 22742, 22744, 22746, 22748, 22750, 22752, 22754, 22756, 22758; 22947-22964		137, 11798, 22765, 22767, 22769, 22771, 22773, 22775, 22777, 22779, 22781, 22783, 22785; 23077-23148	142	146, 12035; 23149-23184
3	Stabilisiertes Spike-Protein; S_stab_PP_cav	408-541		11799, 11800		12036, 12037
4	Stabilisiertes Spike-Protein; S_stab_PP_prot	542-608		11801		12038
5	Stabilisiertes Spike-Protein; S_stab_disul	19-26, 609-1278, 13521-1358-7		11802-1181-1, 14124		12039-1204-8, 14133
6	Spike-Protein Fragment S1	27, 1279-1345	132	138, 11812	143	147, 12049

Spalte	A	B	C	D	E	F
7	Spike-Protein Fragment S2	30, 1346-1412	135	141, 11813		12050
8	Signalpeptid des Spike-Proteins; SP	28, 1413-1479	133	139, 11814	144	12051
9	S1 ohne Signalpeptid; S1_woSP	29, 1480-1546	134	140, 11815	145	12052
10	Transmembrandomäne des Spike-Proteins; TM/ TMflex	49-57, 1547-1613, 13176-1324-2		11816, 13511		12053, 13516
11	S ohne Transmembrandomäne; S_woTM/ woTMflex	31-39, 1614-1680, 2619-2685		11817, 11832		12054, 12069
12	Stabilisiertes S ohne Transmembrandomäne; S_stab_PP_woTM/ woTMflex	40-48, 1681-1747, 2686-2752		11818, 11833		12055, 12070
13	Stabilisiertes S ohne Transmembrandomäne; S_stab_PP_cav_woTM/ woTMflex	1748-1881, 2753-2886		11819, 11820, 11834, 11835		12056, 12057, 12071, 12072
14	Stabilisiertes S ohne Transmembrandomäne; S_stab_PP_prot_woTM/ woTMflex	1882-1948, 2887-2953		11821, 11836		12058, 12073
15	Stabilisiertes S ohne Transmembrandomäne; S_stab_disul_woTM/ woTMflex	1949-2618, 2954-3623, 13377-1351-0		11822-1183-1, 11837-1184-6, 13514, 13515		12059-1206-8, 12074-1208-3, 13519, 13520
16	S _ woTM/ woTMflex umfassend eine Lumazin-Synthase	58-66, 3624-3690, 7644-7710		11847, 11907		12084, 12144
17	S_stab_PP_woTM/ woTMflex umfassend eine Lumazin-Synthase	85-93, 3691-3757, 7711-7777		11848, 11908		12085, 12145
18	S_stab_PP_cav_woTM/ woTMflex umfassend eine Lumazin-Synthase	3758-3891, 7778-7911		11849, 11850, 11909, 11910		12086, 12087, 12146, 12147
19	S_stab_PP_prot_woTM/ woTMflex umfassend eine Lumazin-Synthase	3892-3958, 7912-7978		11851, 11911		12088, 12148
20	S_stab_disul_woTM/ woTMflex umfassend eine Lumazin-Synthase	3959-4628, 7979-8648, 13588-1365-4, 13856-1392-2		11852-1186-1, 11912-1192-1, 14125, 14129		12089-1209-8, 12149-1215-8, 14134, 14138
21	S _ woTM/ woTMflex umfassend ein Ferritin	67-75, 4629-4695, 8649-8715		11862, 11922		12099, 12159

Spalte	A	B	C	D	E	F
22	S_stab_PP_woTM/ woTMflex umfassend ein Ferriti n	94-102, 4696-4762, 8716-8782		11863, 11923		12100, 12160
23	S_stab_PP_cav_woTM/ woTMflex umfassend ein Ferritin	4763-4896, 8783-8916		11864, 11865, 11924, 11925		12101, 12102, 12161, 12162
24	S_stab_PP_prot_woTM/ woTMflex umfassend ein Ferriti n	4897-4963, 8917-8983		11866, 11926		12103, 12163
25	S_stab_disul_woTM/ woTMflex umfassend ein Ferriti n	4964-5633, 8984-9653, 13655-1372-1, 13923-1398-9		11867-1187-6, 11927-1193-6, 14126, 14130		12104-1211-3, 12164-1217-3, 14135, 14139
26	S _ woTM/ woTMflex umfassend ein Foldon	76-84, 5634-5700, 9654-9720		11877, 11937		12114, 12174
27	S_stab_PP_woTM/ woTMflex umfassend ein Foldon	103-111, 5701-5767, 9721-9787		11878, 11938		12115, 12175
28	S_stab_PP_cav_woTM/ woTMflex umfassend ein Foldon	5768-5901, 9788-9921		11879, 11880, 11939, 11940		12116, 12117, 12176, 12177
29	S_stab_PP_prot_woTM/ woTMflex umfassend ein Foldon	5902-5968, 9922-9988		11881, 11941		12118, 12178
30	S_stab_disul_woTM/ woTMflex umfassend ein Foldon	5969-6638, 9989-10658, 13722-13788, 13990-14056		11882-1189-1, 11942-11951, 14127, 14131		12119-1212-8, 12179-12188, 14136, 14140
31	S _ woTM/ woTMflex umfassend ein WhcAg (VLP)	6639-6705, 10659-1072-5		11892, 11952		12129, 12189
32	S_stab_PP_woTM/ woTMflex umfassend ein WhcAg (VLP)	6706-6772, 10726-1079-2		11893, 11953		12130, 12190
33	S_stab_PP_cav_woTM/ woTMflex umfassend ein WhcAg (VLP)	6773-6906, 10793-1092-6		11894, 11895, 11954, 11955		12131, 12132, 12191, 12192
34	S_stab_PP_prot_woTM/ woTMflex umfassend ein WhcAg (VLP)	6907-6973, 10927-1099-3		11896, 11956		12133, 12193

Spalte	A	B	C	D	E	F
35	S_stab_disul_woTM/ woTMflex umfassend ein WhcAg (VLP)	6974-7643, 10994-11663, 13789-13855, 14057-14123		11897-11906, 11957-11966, 14128, 14132		12134-12143, 12194-12203, 14137, 14141
36	Rezeptorbindungsdomäne; RBD	13243-13309, 22917, 22923		13512, 22914, 22918, 22919, 22924, 22925		13517, 22915, 22916, 22920-22922, 22926-22928
37	Entscheidende Neutralisationsdomäne; CND	13310-13376		13513		13518
38	Stabilisiertes Spike-Protein; S_stab_PP_hex	22732		22759		
39	RBD umfassend eine Lumazin-Synthase	22735, 22736		22762, 22763, 22967, 22968		
40	RBD umfassend ein Ferritin	22733		22760, 22965		
41	RBD umfassend ein Foldon	22734, 26938, 26939		22761, 22966, 26940, 26941		

Geeignete kodierende Sequenzen:

[0184] Die erfindungsgemäße mRNA als Nukleinsäure umfasst mindestens eine kodierende Sequenz, die für mindestens ein antigenes Peptid oder Protein kodiert, das vom Coronavirus SARS-CoV-2 (nCoV-2019) abgeleitet ist, vorzugsweise wie oben definiert, oder Fragmente und Varianten davon. In diesem Zusammenhang kann jede kodierende Sequenz, die für mindestens ein antigenes Protein, wie hierin definiert, oder für Fragmente und Varianten davon kodiert, als geeignete kodierende Sequenz verstanden werden und kann daher von der mRNA als Nukleinsäure umfasst werden.

[0185] Die mRNA als Nukleinsäure kann mindestens eine kodierende Sequenz umfassen oder daraus bestehen, die für mindestens ein antigenes Peptid oder Protein aus dem SARS-CoV-2-Coronavirus, wie hierin definiert, vorzugsweise für irgendeine der SEQ ID NOs: 1-111, 274-11663, 13176-13510, 13521-14123, 22732-22758, 22917, 22923, 22929-22964, 26938, 26939 oder Fragmente oder Varianten davon, kodiert. Es sei darauf hingewiesen, dass auf Nukleinsäureebene jede Sequenz (DNA- oder RNA-Sequenz), die für eine Aminosäuresequenz kodiert, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 1-111, 274-11663, 13176-13510, 13521-14123, 22732-22758, 22917, 22923, 22929-22964, 26938, 26939 ist, oder Fragmente oder Varianten davon ausgewählt werden können und dementsprechend als geeignete kodierende Sequenz der Erfindung verstanden werden können. Weitere Informationen zu den genannten Aminosäuresequenzen sind auch in Tabelle 1 (siehe Zeilen 1 bis 41 der Spalte A und B), Tabelle 3a und 3b sowie unter der Kennziffer <223> des ST25-Sequenzprotokolls der jeweiligen Sequenz-SEQ ID NOs angegeben.

[0186] Die mRNA als Nukleinsäure kann eine kodierende Sequenz, die mindestens eine der Nukleinsäuresequenzen umfasst, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%,

92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit den Sequenzen gemäß SEQ ID NOs: 116-132, 134-138, 140-143, 145-175, 11664-11813, 11815, 11817-12050, 12052, 12054-13147, 13514, 13515, 13519, 13520, 14124-14177, 22759, 22764-22786, 22791-22813, 22818-22839, 22969-23184, 23189-23404, 23409-23624, 23629-23844, 23849-24064, 24069-24284, 24289-24504, 24509-24724, 24729-24944, 24949-25164, 25169-25384, 25389-25604, 25609-25824, 25829-26044, 26049-26264, 26269-26484, 26489-26704, 26709-26937 sind, oder ein Fragment oder eine Variante irgendeiner dieser Sequenzen umfassen. Weitere Informationen bezüglich dieser Nukleinsäuresequenzen sind auch in Tabelle 1 (siehe Zeilen 1 bis 7, 9, 11-41 der Spalte C-F), Tabelle 3a und 3b und unter der Kennziffer <223> des ST25-Sequenzprotokolls der jeweiligen Sequenz-SEQ ID NOs angegeben. Erfindungsgemäß sind insbesondere die Nukleinsäuresequenzen, die zu mindestens 80% identisch sind mit den SEQ ID NOs: 22765, 23096, 23114, 23132, 23150, 23168, 23092, 23110, 23128, 23146, 23164, 23182, 22785, 23106, 23124, 23142, 23160, 23178, 23089, 23092, 23107, 23125, 23143, 23161, 23179, 23091, 23109, 23127, 23145, 23163, 23181, 23093, 23111, 23129, 23147, 23165, 23183, 23094, 23112, 23130, 23148, 23166 und 23184.

[0187] Alternativ kann die mRNA als Nukleinsäure eine kodierende Sequenz umfassen, die mindestens eine der Nukleinsäuresequenzen umfasst, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit den Sequenzen gemäß SEQ ID NOs: 116-132, 134-138, 140-143, 145-175, 11664-11813, 11815, 11817-12050, 12052, 12054-13147, 13514, 13515, 13519, 13520, 14124-14177, 22759, 22764-22786, 22791-22813, 22818-22839, 22969-23184, 23189-23404, 23409-23624, 23629-23844, 23849-24064, 24069-24284, 24289-24504, 24509-24724, 24729-24944, 24949-25164, 25169-25384, 25389-25604, 25609-25824, 25829-26044, 26049-26264, 26269-26484, 26489-26704, 26709-26937 sind, wobei alle Uracile (U) in den jeweiligen Sequenzen durch Thymidine (T) ersetzt sind, oder ein Fragment oder eine Variante irgendeiner dieser Sequenzen. Weitere Informationen bezüglich dieser Nukleinsäuresequenzen sind auch in Tabelle 1 (siehe Zeilen 1 bis 7, 9, 11-41 der Spalte C-F), Tabelle 3a und 3b und unter der Kennziffer <223> des ST25-Sequenzprotokolls der jeweiligen Sequenz-SEQ ID NOs angegeben. Erfindungsgemäß sind insbesondere die Nukleinsäuresequenzen, die zu mindestens 80% identisch sind mit SEQ ID NOs: 22765, 23096, 23114, 23132, 23150, 23168, 23092, 23110, 23128, 23146, 23164, 23182, 22785, 23106, 23124, 23142, 23160, 23178, 23089, 23092, 23107, 23125, 23143, 23161, 23179, 23091, 23109, 23127, 23145, 23163, 23181, 23093, 23111, 23129, 23147, 23165, 23183, 23094, 23112, 23130, 23148, 23166 und 23184.

[0188] Die mRNA als Nukleinsäure kann eine kodierende Sequenz, die mindestens eine der Nukleinsäuresequenzen umfasst, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit den Sequenzen gemäß SEQ ID NOs: 116-132, 134-138, 140-143, 145-175, 11664-11813, 11815, 11817-12050, 12052, 12054-12203, 13514, 13515, 13519, 13520, 14124-14141, 22759, 22764-22785, 22969-23184 sind, oder ein Fragment oder eine Variante irgendeiner dieser Sequenzen umfassen. Weitere Informationen zu diesen Nukleinsäuresequenzen sind auch in Tabelle 1 (siehe Zeilen 1 bis 7, 9, 11-41 der Spalte C-F), Tabelle 3a und 3b und unter der Kennziffer <223> des ST25-Sequenzprotokolls der jeweiligen Sequenz-SEQ ID NOs angegeben. Erfindungsgemäß sind insbesondere die Nukleinsäuresequenzen, die zu mindestens 80% identisch sind mit SEQ ID NOs: 22765, 23096, 23114, 23132, 23150, 23168, 23092, 23110, 23128, 23146, 23164, 23182, 22785, 23106, 23124, 23142, 23160, 23178, 23089, 23092, 23107, 23125, 23143, 23161, 23179, 23091, 23109, 23127, 23145, 23163, 23181, 23093, 23111, 23129, 23147, 23165, 23183, 23094, 23112, 23130, 23148, 23166 und 23184.

[0189] Alternativ kann die mRNA als Nukleinsäure eine kodierende Sequenz umfassen, die mindestens eine der Nukleinsäuresequenzen umfasst, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit den Sequenzen gemäß SEQ ID NOs: 116-132, 134-138, 140-143, 145-175, 11664-11813, 11815, 11817-12050, 12052, 12054-12203, 13514, 13515, 13519, 13520, 14124-14141, 22759, 22764-22785, 22969-23184 sind, wobei alle Uracile (U) in den jeweiligen Sequenzen durch Thymidine (T) ersetzt sind, oder ein Fragment oder eine Variante einer dieser Sequenzen. Weitere Informationen bezüglich dieser Nukleinsäuresequenzen sind auch in Tabelle 1 (siehe Zeilen 1 bis 7, 9, 11-41 der Spalte C-F), Tabelle 3a und 3b und unter der Kennziffer <223> des ST25-Sequenzprotokolls der jeweiligen Sequenz-SEQ ID NOs angegeben. Erfindungsgemäß sind insbesondere die Nukleinsäuresequenzen, die zu mindestens 80% identisch sind mit SEQ ID NOs: 22765, 23096, 23114, 23132, 23150, 23168, 23092, 23110, 23128, 23146, 23164, 23182, 22785, 23106, 23124, 23142, 23160, 23178, 23089, 23092, 23107, 23125, 23143, 23161, 23179, 23091, 23109, 23127, 23145, 23163, 23181, 23093, 23111, 23129, 23147, 23165, 23183, 23094, 23112, 23130, 23148, 23166 und 23184.

[0190] Die mRNA als Nukleinsäure des ersten Aspektskann eine artifizielle Nukleinsäure sein.

[0191] Der Begriff „artifizielle Nukleinsäure“, wie er hier verwendet wird, soll sich auf eine Nukleinsäure beziehen, die nicht natürlich vorkommt. Mit anderen Worten, eine artifizielle Nukleinsäure kann als ein nichtnatürliches Nukleinsäuremolekül verstanden werden. Solche Nukleinsäuremoleküle können aufgrund ihrer individuellen Sequenz (z.B. im G/C-Gehalt modifizierte kodierende Sequenz, UTRs) und/oder aufgrund anderer Modifikationen, z.B. struktureller Modifikationen von Nukleotiden, nicht natürlich sein. Typischerweise kann eine artifizielle Nukleinsäure durch Gentechnik designt und/oder erzeugt werden, um einer gewünschten künstlichen Sequenz von Nukleotiden zu entsprechen, In diesem Zusammenhang ist eine artifizielle Nukleinsäure eine Sequenz, die in der Natur nicht vorkommt, d.h. eine Sequenz, die sich von der Wildtyp-Sequenz/der natürlich vorkommenden Sequenz in mindestens einem Nukleotid unterscheidet. Der Begriff „artifizielle Nukleinsäure“ ist nicht auf „ein einzelnes Molekül“ beschränkt, sondern wird so verstanden, dass er eine Gesamtheit von im Wesentlichen identischen Nukleinsäuremolekülen umfasst. Dementsprechend kann er sich auf eine Vielzahl von im Wesentlichen identischen Nukleinsäuremolekülen beziehen. Der Begriff „artifizielle Nukleinsäure“, wie er hier verwendet wird, kann sich auf eine artifizielle DNA oder, vorzugsweise, auf eine artifizielle RNA beziehen.

[0192] Die mRNA als Nukleinsäure ist eine modifizierte und/oder stabilisierte artifizielle Nukleinsäure.

[0193] Daher wird die mRNA als Nukleinsäure der vorliegenden Erfindung somit als „stabilisierte artifizielle Nukleinsäure“ oder „stabilisierte kodierende Nukleinsäure“ bereitgestellt werden, d.h. als eine Nukleinsäure, die eine verbesserte Beständigkeit gegenüber dem Abbau in vivo aufweist und/oder als eine Nukleinsäure, die eine verbesserte Stabilität in vivo aufweist und/oder als eine Nukleinsäure, die eine verbesserte Translatierbarkeit in vivo aufweist. Im Folgenden werden in diesem Zusammenhang spezifische geeignete Modifikationen/Adaptionen beschrieben, die geeignet sind, die Nukleinsäure zu „stabilisieren“. Daher wird die Nukleinsäure der vorliegenden Erfindung als „stabilisierte RNA“, „stabilisierte kodierende RNA“ bereitgestellt.

[0194] Eine solche Stabilisierung kann durch Bereitstellung einer „getrockneten Nukleinsäure“ (z.B. einer getrockneten DNA oder RNA) und/oder einer „gereinigten Nukleinsäure“ (z.B. einer gereinigten DNA oder RNA), wie hierin beschrieben, erfolgen. Alternativ oder zusätzlich kann eine solche Stabilisierung z.B. durch ein modifiziertes Phosphatrückgrat der Nukleinsäure der vorliegenden Erfindung erfolgen. Eine Rückgrat-Modifikation im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ist eine Modifikation, bei der Phosphate des Rückgrats der in der Nukleinsäure enthaltenen Nukleotide chemisch modifiziert sind. Nukleotide, die in diesem Zusammenhang bevorzugt eingesetzt werden können, enthalten z.B. ein Phosphorothioat-modifiziertes Phosphatrückgrat, wobei bevorzugt mindestens einer der im Phosphatrückgrat enthaltenen Phosphatsauerstoffe durch ein Schwefelatom ersetzt ist. Stabilisierte Nukleinsäuren, vorzugsweise stabilisierte RNAs, können zum Beispiel außerdem umfassen: nicht-ionische Phosphatanaloga, wie z.B. Alkyl- und Arylphosphonate, bei denen der geladene Phosphonatsauerstoff durch eine Alkyl- oder Arylgruppe ersetzt ist, oder Phosphodiester und Alkylphosphotriester, bei denen der geladene Sauerstoffrest in alkylierter Form vorliegt. Zu solchen Rückgrat-Modifikationen gehören typischerweise, ohne dass damit eine Einschränkung verbunden ist, Modifikationen aus der Gruppe der Methylphosphonate, Phosphoramidate und Phosphorthioate (z.B. Cytidin-5'-O-(1-thiophosphat)).

[0195] Im Folgenden werden geeignete Modifikationen beschrieben, die geeignet sind, die erfindungsgemäße Nukleinsäure zu „stabilisieren“.

[0196] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure mindestens eine Codon-modifizierte kodierende Sequenz.

[0197] In bevorzugten Ausführungsformen ist die mindestens eine kodierende Sequenz der mRNA als Nukleinsäure eine Codon-modifizierte kodierende Sequenz, wobei die Aminosäuresequenz, die von der mindestens einen Codon-modifizierten kodierenden Sequenz kodiert wird, gegenüber der Aminosäuresequenz, die von der entsprechenden kodierenden Wildtyp- oder Referenzsequenz kodiert wird, vorzugsweise nicht verändert ist.

[0198] Der Begriff „Codon-modifizierte kodierende Sequenz“ bezieht sich auf kodierende Sequenzen, die sich in mindestens einem Codon (Triplets von Nukleotiden, die für eine Aminosäure kodieren) im Vergleich zur entsprechenden kodierenden Wildtyp- oder Referenzsequenz unterscheiden. Zweckmäßigerweise kann eine Codon-modifizierte kodierende Sequenz im Rahmen der Erfindung eine verbesserte Beständigkeit gegenüber dem Abbau in vivo und/oder eine verbesserte Stabilität in vivo und/oder eine verbesserte Translatierbarkeit in vivo aufweisen. Codon-Modifikationen im weitesten Sinne nutzen die Degeneration des genetischen Codes, wobei mehrere Codons für dieselbe Aminosäure kodieren und austauschbar verwendet wer-

den können (siehe Tabelle 2), um die kodierende Sequenz für In-vivo-Anwendungen, wie oben beschrieben, zu optimieren/modifizieren.

[0199] Der Begriff „kodierende Referenzsequenz“ bezieht sich auf die kodierende Sequenz, die die zu modifizierende und/oder zu optimierende Ausgangssequenz darstellt.

[0200] In bevorzugten Ausführungsformen ist die mindestens eine kodierende Sequenz der Nukleinsäure eine Codon-modifizierte kodierende Sequenz, wobei die Codon-modifizierte kodierende Sequenz ausgewählt ist aus der C-maximierten kodierenden Sequenz, der CAI-maximierten kodierenden Sequenz, der an die humane Codonverwendung angepassten kodierenden Sequenz, der G/C-Gehalt-modifizierten kodierenden Sequenz und der G/C-optimierten kodierenden Sequenz oder einer beliebigen Kombination davon.

[0201] Wenn sie in Säugetier-Wirtszellen transfiziert wird, besitzt die Nukleinsäure, die eine Codon-modifizierte kodierende Sequenz umfasst, eine Stabilität von zwischen 12-18 Stunden oder mehr als 18 Stunden, z.B. 24, 36, 48, 60, 72 oder mehr als 72 Stunden, und ist in der Lage, von der Säugetier-Wirtszelle (z.B. einer Muskelzelle) exprimiert zu werden.

[0202] Wenn sie in Säugetier-Wirtszellen transfiziert wird, wird die Nukleinsäure, die eine Codon-modifizierte kodierende Sequenz umfasst, in Protein translatiert, wobei die Proteinmenge mindestens vergleichbar mit der Proteinmenge ist, die durch eine natürlich vorkommende oder kodierende Wildtyp- oder Referenzsequenz erhalten wird, die in Säugetier-Wirtszellen transfiziert wurde, oder vorzugsweise um mindestens 10% höher oder um mindestens 20% höher oder um mindestens 30% höher oder um mindestens 40% höher oder um mindestens 50% höher oder um mindestens 100% höher oder um mindestens 200% höher als diese ist.

[0203] In bevorzugten Ausführungsformen kann die erfindungsgemäße Nukleinsäure modifiziert sein, wobei der C-Gehalt der mindestens einen kodierenden Sequenz gegenüber dem C-Gehalt der entsprechenden kodierenden Wildtyp- oder Referenzsequenz erhöht, vorzugsweise maximiert, sein kann (hier als „C-maximierte kodierende Sequenz“ bezeichnet). Die Aminosäuresequenz, die von der C-maximierten kodierenden Sequenz der Nukleinsäure kodiert wird, ist vorzugsweise gegenüber der Aminosäuresequenz, die von der entsprechenden kodierenden Wildtyp- oder Referenzsequenz kodiert wird, nicht verändert. Die Erzeugung einer C-maximierten Nukleinsäuresequenz kann zweckmäßigerweise mit einem Modifikationsverfahren gemäß WO2015/062738 durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang wird die Offenbarung von WO2015/062738 hiermit durch Bezug aufgenommen.

[0204] In bevorzugten Ausführungsformen kann die mRNA als Nukleinsäure modifiziert sein, wobei der G/C-Gehalt der mindestens einen kodierenden Sequenz gegenüber dem G/C-Gehalt der entsprechenden kodierenden Wildtyp- oder Referenzsequenz optimiert sein kann (hierin als „G/C-Gehalt-optimierte kodierende Sequenz“ bezeichnet). „Optimiert“ bezieht sich in diesem Zusammenhang auf eine kodierende Sequenz, in der der G/C-Gehalt vorzugsweise auf den im Wesentlichen höchstmöglichen G/C-Gehalt erhöht ist. Die Aminosäuresequenz, die von der G/C-Gehalt-optimierten kodierenden Sequenz der Nukleinsäure kodiert wird, ist vorzugsweise gegenüber der Aminosäuresequenz, die von der jeweiligen kodierenden Wildtyp- oder Referenzsequenz kodiert wird, nicht verändert. Die Erzeugung einer G/C-Gehalt-optimierten Nukleinsäuresequenz (mRNA) kann unter Anwendung eines Verfahrens gemäß WO2002/098443 durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang ist die Offenbarung von WO2002/098443 in vollem Umfang in der vorliegenden Erfindung enthalten. In der gesamten Beschreibung, einschließlich der <223>-Kennung des Sequenzprotokolls, sind G/C-optimierte kodierende Sequenzen durch die Abkürzungen „opt1“ oder „gc“ gekennzeichnet.

[0205] In bevorzugten Ausführungsformen kann die Nukleinsäure so modifiziert sein, dass die Codons in der mindestens einen kodierenden Sequenz an die humane Codon-Verwendung angepasst sind (hier als „an die humane Codon-Verwendung angepasste kodierende Sequenz“ bezeichnet). Codons, die für dieselbe Aminosäure kodieren, treten beim Menschen mit unterschiedlicher Häufigkeit auf. Dementsprechend ist die kodierende Sequenz der Nukleinsäure vorzugsweise so modifiziert, dass die Häufigkeit der Codons, die dieselbe Aminosäure kodieren, der natürlich vorkommenden Häufigkeit dieses Codons gemäß der humanen Codon-Verwendung entspricht. Zum Beispiel wird im Fall der Aminosäure Ala die kodierende Wildtyp- oder Referenzsequenz vorzugsweise so angepasst, dass das Codon „GCC“ mit einer Häufigkeit von 0,40, das Codon „GCT“ mit einer Häufigkeit von 0,28, das Codon „GCA“ mit einer Häufigkeit von 0,22 und das Codon „GCG“ mit einer Häufigkeit von 0,10 verwendet wird usw. (siehe Tabelle 2). Dementsprechend wird ein solches Verfahren (wie beispielhaft für Ala aufgeführt) für jede Aminosäure angewendet, die von der kodierenden Sequenz der Nukleinsäure kodiert wird, um Sequenzen zu erhalten, die an die humane Codon-Verwendung angepasst sind. In der gesamten Beschreibung, einschließlich der <223>-Kennung des Sequenzprotokolls,

werden an die humane Codon-Verwendung angepasste kodierende Sequenzen durch die Abkürzung „opt3“ oder „human“ gekennzeichnet.

Tabelle 2: Tabelle der humanen Codon- Verwendung mit Angabe der Häufigkeiten für jede Aminosäure

Aminosäure	**Codon**	**Häufigkeit**		**Aminosäure**	**Codon**	**Häufigkeit**
Ala	GCG	0,10		Pro	CCG	0,11
Ala	GCA	0,22		Pro	CCA	0,27
Ala	GCT	0,28		Pro	CCT	0,29
Ala	GCC*	0,40		Pro	CCC*	0,33
Cys	TGT	0,42		Gln	CAG*	0,73
Cys	TGC*	0,58		Gln	CAA	0,27
Asp	GAT	0,44		Arg	AGG	0,22
Asp	GAC*	0,56		Arg	AGA*	0,21
Glu	GAG*	0,59		Arg	CGG	0,19
Glu	GAA	0,41		Arg	CGA	0,10
Phe	TTT	0,43		Arg	CGT	0,09
Phe	TTC*	0,57		Arg	CGC	0,19
Gly	GGG	0,23		Ser	AGT	0,14
Gly	GGA	0,26		Ser	AGC*	0,25
Gly	GGT	0,18		Ser	TCG	0,06
Gly	GGC*	0,33		Ser	TCA	0,15
His	CAT	0,41		Ser	TCT	0,18
His	CAC*	0,59		Ser	TCC	0,23
Ile	ATA	0,14		Thr	ACG	0,12
Ile	ATT	0,35		Thr	ACA	0,27
Ile	ATC*	0,52		Thr	ACT	0,23
Lys	AAG*	0,60		Thr	ACC*	0,38
Lys	AAA	0,40		Val	GTG*	0,48
Leu	TTG	0,12		Val	GTA	0,10
Leu	TTA	0,06		Val	GTT	0,17
Leu	CTG*	0,43		Val	GTC	0,25
Leu	CTA	0,07		Trp	TGG*	1
Leu	CTT	0,12		Tyr	TAT	0,42
Leu	CTC	0,20		Tyr	TAC*	0,58
Met	ATG*	1		Stop	TGA*	0,61
Asn	AAT	0,44		Stop	TAG	0,17
Asn	AAC*	0,56		Stop	TAA	0,22

*: häufigstes humanes Codon

[0206] In Ausführungsformen kann die erfindungsgemäße mRNA als Nukleinsäure modifiziert sein, wobei der G/C-Gehalt der mindestens einen kodierenden Sequenz gegenüber dem G/C-Gehalt der entsprechenden kodierenden Wildtyp- oder Referenzsequenz modifiziert sein kann (hierin als „G/C-Gehalt modifizierte kodierende Sequenz“ bezeichnet). In diesem Zusammenhang beziehen sich die Begriffe „G/C-Optimierung“

oder „G/C-Gehalt-Modifikation“ auf eine Nukleinsäure, die eine modifizierte, vorzugsweise eine erhöhte, Anzahl von Guanosin- und/oder Cytosin-Nukleotiden im Vergleich zur entsprechenden kodierenden Wildtyp- oder Referenzsequenz aufweist. Eine solche erhöhte Anzahl kann durch Substitution von Codons, die Adenosin- oder Thymidin-Nukleotide enthalten, durch Codons, die Guanosin- oder Cytosin-Nukleotide enthalten, erzeugt werden. Vorteilhafterweise sind Nukleinsäuresequenzen mit erhöhtem G/C-Gehalt stabiler oder zeigen eine bessere Expression als Sequenzen mit erhöhtem A/U-Gehalt. Die Aminosäuresequenz, die von der im G/C-Gehalt modifizierten kodierenden Sequenz der Nukleinsäure kodiert wird, ist vorzugsweise gegenüber der Aminosäuresequenz, die von der jeweiligen Wildtyp- oder Referenzsequenz kodiert wird, nicht verändert. Vorzugsweise ist der G/C-Gehalt der kodierenden Sequenz der Nukleinsäure um mindestens 10%, 20%, 30%, vorzugsweise um mindestens 40% gegenüber dem G/C-Gehalt der kodierenden Sequenz der entsprechenden Wildtyp- oder Referenz-Nukleinsäuresequenz erhöht (hier als „opt 10“ oder „gc mod“ bezeichnet)

[0207] In Ausführungsformen kann die Nukleinsäure modifiziert sein, wobei der Codon-Adaptions-Index (CAI) in der mindestens einen kodierenden Sequenz erhöht oder vorzugsweise maximiert sein kann (im Folgenden als „CAI-maximierte kodierende Sequenz“ bezeichnet). Vorzugsweise sind alle Codons der Wildtyp- oder Referenz-Nukleinsäuresequenz, die in z.B. einem Menschen relativ selten sind, gegen ein entsprechendes Codon ausgetauscht, das in z.B. einem Menschen häufig ist, wobei das häufige Codon für die gleiche Aminosäure kodiert wie das relativ seltene Codon. Zweckmäßigerweise werden für jede Aminosäure des kodierten Proteins die häufigsten Codons verwendet (siehe Tabelle 2, die häufigsten humanen Codons sind mit Sternchen markiert). Zweckmäßigerweise umfasst die Nukleinsäure mindestens eine kodierende Sequenz, wobei der Codon-Adaptations-Index (CAI) der mindestens einen kodierenden Sequenz mindestens 0,5, mindestens 0,8, mindestens 0,9 oder mindestens 0,95 beträgt. Am meisten bevorzugt ist der Codon-Adaptions-Index (CAI) der mindestens einen kodierenden Sequenz 1 (CAI=1). Beispielsweise kann im Falle der Aminosäure Ala die kodierende Wildtyp- oder Referenzsequenz so angepasst werden, dass für diese Aminosäure immer das häufigste humane Codon „GCC“ verwendet wird. Dementsprechend kann ein solches Verfahren (wie für Ala beispielhaft dargestellt) für jede Aminosäure, die von der kodierenden Sequenz der Nukleinsäure kodiert wird, angewendet werden, um CAI-maximierte kodierende Sequenzen zu erhalten.

[0208] In besonders bevorzugten Ausführungsformen ist die mindestens eine kodierende Sequenz der Nukleinsäure eine Codon-modifizierte kodierende Sequenz, wobei die Codon-modifizierte kodierende Sequenz aus einer G/C-optimierten kodierenden Sequenz, einer an die humane Codon-Verwendung angepassten kodierenden Sequenz oder einer G/C-modifizierten kodierenden Sequenz ausgewählt ist.

[0209] Die mRNA als Nukleinsäure kann mindestens eine kodierende Sequenz umfassen, die eine Codon-modifizierte Nukleinsäuresequenz umfasst oder aus einer solchen besteht, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Codon-modifizierten Nukleinsäuresequenz ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 136-138, 140-143, 145-175, 11731-11813, 11815, 11817-12050, 12052, 12054-13147, 14142-14177, 22759, 22764-22786, 22791-22813, 22818-22839, 22969-23184, 23189-23404, 23409-23624, 23629-23844, 23849-24064, 24069-24284, 24289-24504, 24509-24724, 24729-24944, 24949-25164, 25169-25384, 25389-25604, 25609-25824, 25829-26044, 26049-26264, 26269-26484, 26489-26704, 26709-26937, oder ein Fragment oder eine Variante irgendeiner dieser Sequenzen. Zusätzliche Informationen zu jeder dieser geeigneten kodierenden Nukleinsäuresequenzen können auch dem Sequenzprotokoll entnommen werden, insbesondere den dortigen Angaben unter der Kennziffer <223>. Geeignete kodierende Sequenzen des ersten Aspekts sind in Tabelle 1 aufgeführt. Weitere Informationen zu diesen Nukleinsäuresequenzen sind auch in Tabelle 1 (siehe Zeilen 1 bis 7, 9, 11-41 der Spalte D-F), in Tabelle 3a und 3b sowie unter der Kennziffer <223> des ST25-Sequenzprotokolls der jeweiligen Sequenz-SEQ ID NOs angegeben. Erfindungsgemäß sind insbesondere die Nukleinsäuresequenzen die zu mindestens 80% identisch sind mit SEQ ID NOs: 22765, 23096, 23114, 23132, 23150, 23168, 23092, 23110, 23128, 23146, 23164, 23182, 22785, 23106, 23124, 23142, 23160, 23178, 23089, 23092, 23107, 23125, 23143, 23161, 23179, 23091, 23109, 23127, 23145, 23163, 23181, 23093, 2311 1, 23129, 23147, 23165, 23183, 23094, 23112, 23130, 23148, 23166 und 23184.

[0210] Alternativ kann die mRNA als Nukleinsäure mindestens eine kodierende Sequenz, umfassen, die eine Codon-modifizierte Nukleinsäuresequenz umfasst oder aus einer solchen besteht, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit den Sequenzen gemäß SEQ ID NOs: 136-138, 140-143, 145-175, 11731-11813, 11815, 11817-12050, 12052, 12054-13147, 14142-14177, 22759, 22764-22786, 22791-22813, 22818-22839, 22969-23184, 23189-23404, 23409-23624, 23629-23844, 23849-24064, 24069-24284, 24289-24504,

24509-24724, 24729-24944, 24949-25164, 25169-25384, 25389-25604, 25609-25824, 25829-26044, 26049-26264, 26269-26484, 26489-26704, 26709-26937 ist, wobei alle Uracile (U) in den jeweiligen Sequenzen durch Thymidine (T) ersetzt sind, oder ein Fragment oder eine Variante irgendeiner dieser Sequenzen. Weitere Informationen bezüglich der genannten Nukleinsäuresequenzen sind auch in Tabelle 1 (siehe Zeilen 1 bis 7, 9, 11-41 der Spalte D-F), Tabelle 3a und 3b und unter der Kennziffer <223> des ST25-Sequenzprotokolls der jeweiligen Sequenz-SEQ ID NOs angegeben.

[0211] Die mRNA als Nukleinsäure kann mindestens eine kodierende Sequenz, die eine G/C-optimierte kodierende Sequenz umfasst oder aus einer solchen besteht, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Codon-modifizierten Nukleinsäuresequenz ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 136-138, 140, 141, 148, 149, 152, 155, 156, 159, 162, 163, 166, 169, 170, 173, 11731-11813, 11815, 11817-11966, 12271-12472, 12743-12944, 13514, 13515, 14124-14132, 14142-14150, 14160-14168, 22759, 22764-22786, 22791-22813, 22818-22839, 22969-23040, 23077-23148, 23189-23260, 23297-23368, 23409-23480, 23517-23588, 23629-23700, 23737-23808, 23849-23920, 23957-24028, 24069-24140, 24177-24248, 24289-24360, 24397-24468, 24509-24580, 24617-24688, 24729-24800, 24837-24908, 24949-25020, 25057-25128, 25169-25240, 25277-25348, 25389-25460, 25497-25568, 25609-25680, 25717-25788, 25829-25900, 25937-26008, 26049-26120, 26157-26228, 26269-26340, 26377-26448, 26489-26560, 26597-26668, 26709-26780, 26817-26888, 26925-26937, oder ein Fragment oder eine Variante irgendeiner dieser Sequenzen, umfassen. Zusätzliche Informationen zu jeder dieser geeigneten kodierenden Nukleinsäuresequenzen können auch dem Sequenzprotokoll entnommen werden, insbesondere den dortigen Angaben unter der Kennziffer <223>. Geeignete kodierende Sequenzen des ersten Aspekts sind in Tabelle 1 aufgeführt. Weitere Informationen zu diesen Nukleinsäuresequenzen sind auch in Tabelle 1 (siehe Zeilen 1 bis 7, 9, 11-41 der Spalte D), in Tabelle 3a und 3b sowie unter der Kennziffer <223> des ST25-Sequenzprotokolls der jeweiligen Sequenz-SEQ ID NOs angegeben.

[0212] Die mRNA als Nukleinsäure kann mindestens eine kodierende Sequenz umfassen, die eine an die humane Codon-Verwendung angepasste kodierende Sequenz umfasst oder aus einer solchen besteht, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Codon-modifizierten Nukleinsäuresequenz ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 142, 143, 145, 150, 153, 157, 160, 164, 167, 171, 174, 11967-12033, 12473-12539, 12945-13011, oder ein Fragment oder eine Variante irgendeiner dieser Sequenzen. Zusätzliche Informationen zu jeder dieser geeigneten kodierenden Nukleinsäuresequenzen können auch dem Sequenzprotokoll entnommen werden, insbesondere den dortigen Angaben unter der Kennziffer <223>. Geeignete kodierende Sequenzen des ersten Aspekts sind in Tabelle 1 aufgeführt. Weitere Informationen zu diesen Nukleinsäuresequenzen sind auch in Tabelle 1 (siehe Zeilen 1 bis 7, 9, 11-41 der Spalte E), in Tabelle 3a und unter der Kennziffer <223> des ST25-Sequenzprotokolls der jeweiligen Sequenz-SEQ ID NOs angegeben.

[0213] Die mRNA als Nukleinsäure kann mindestens eine kodierende Sequenz umfassen, die eine G/C-modifizierte kodierende Sequenz umfasst oder aus einer solchen besteht, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Codon-modifizierten Nukleinsäuresequenz ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 146, 147, 151, 154, 158, 161, 165, 168, 172, 175, 12034-12050, 12052, 12054-12203, 12540-12675, 13012-13147, 13519, 13520, 14133-14141, 14151-14159, 14169-14177, 23041-23076, 23149-23184, 23261-23296, 23369-23404, 23481-23516, 23589-23624, 23701-23736, 23809-23844, 23921-23956, 24029-24064, 24141-24176, 24249-24284, 24361-24396, 24469-24504, 24581-24616, 24689-24724, 24801-24836, 24909-24944, 25021-25056, 25129-25164, 25241-25276, 25349-25384, 25461-25496, 25569-25604, 25681-25716, 25789-25824, 25901-25936, 26009-26044, 26121-26156, 26229-26264, 26341-26376, 26449-26484, 26561-26596, 26669-26704, 26781-26816, 26889-26924, oder ein Fragment oder eine Variante irgendeiner dieser Sequenzen. Zusätzliche Informationen zu jeder dieser geeigneten kodierenden Nukleinsäuresequenzen können auch dem Sequenzprotokoll entnommen werden, insbesondere den dort unter der Kennziffer <223> gemachten Angaben. Geeignete kodierende Sequenzen des ersten Aspekts sind in Tabelle 1 aufgeführt. Weitere Informationen zu diesen Nukleinsäuresequenzen sind ebenfalls in Tabelle 1 (siehe Zeilen 1 bis 7, 9, 11-41 der Spalte F) und unter der Kennziffer <223> des ST25-Sequenzprotokolls der jeweiligen Sequenz-SEQ ID NOs angegeben.

[0214] Die mRNA als Nukleinsäure kann mindestens eine kodierende Sequenz umfassen, die eine G/Cmodifizierte kodierende Sequenz umfasst oder aus einer solchen besteht, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% iden-

tisch mit einer Codon-modifizierten Nukleinsäuresequenz ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 136-138, 142, 143, 146, 147, 11731, 11798-11801, 11804, 11805, 11808, 11810-11812, 11923, 11953, 12035, 12049, 22759-22785, 22965-22982, 23077-23094, 23149, oder ein Fragment oder eine Variante irgendeiner dieser Sequenzen. Zusätzliche Informationen zu jeder dieser geeigneten kodierenden Nukleinsäuresequenzen können auch dem Sequenzprotokoll entnommen werden, insbesondere den dort unter der Kennziffer <223> gemachten Angaben. Geeignete kodierende Sequenzen des ersten Aspekts sind in Tabelle 1 aufgeführt. Weitere Informationen zu diesen Nukleinsäuresequenzen sind ebenfalls in Tabelle 1 (siehe Zeilen 1 bis 7, 9, 11-41 der Spalte F) und unter der Kennziffer <223> des ST25-Sequenzprotokolls der jeweiligen Sequenz-SEQ ID NOs angegeben.

[0215] Die mRNA als Nukleinsäure kann mindestens eine kodierende Sequenz umfassen, die eine G/Cmodifizierte kodierende Sequenz umfasst oder aus einer solchen besteht, die für ein SARS-CoV-2-Antigen kodiert, das identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Codon-modifizierten Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NOs: 137 ist, oder ein Fragment oder eine Variante davon.

[0216] Die mRNA als Nukleinsäure kann mindestens eine kodierende Sequenz umfassen, die eine G/Cmodifizierte kodierende Sequenz umfasst oder aus einer solchen besteht, die ein SARS-CoV-2-Antigen kodiert, das identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Codon-modifizierten Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NOs: 23090, 23091, 23093, 23094 ist, oder ein Fragment oder eine Variante davon.

[0217] Die mRNA als Nukleinsäure kann mindestens eine kodierende Sequenz umfassen, die eine kodierende Sequenz umfasst oder aus einer solchen besteht, die ein SARS-CoV-2-Antigen kodiert, das identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Codon-modifizierten Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NOs: 23113, 23167 ist, oder ein Fragment oder eine Variante davon.

UTRs:

[0218] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die erfindungsgemäße mRNA als Nukleinsäure eine Protein-kodierende Region („kodierende Sequenz“ oder „cds“), und eine 5'-UTR und/oder 3'-UTR. Insbesondere können UTRs regulatorische Sequenzelemente beherbergen, die den Umsatz, die Stabilität und die Lokalisierung der Nukleinsäure, z.B. der RNA, bestimmen. Darüber hinaus können UTRs Sequenzelemente beherbergen, die die Translation verstärken. Bei der medizinischen Anwendung von Nukleinsäuresequenzen (also mRNA) ist die Translation der mRNA als Nukleinsäure in mindestens ein Peptid oder Protein von entscheidender Bedeutung für die therapeutische Wirksamkeit. Bestimmte Kombinationen von 3'-UTRs und/oder 5'-UTRs können die Expression von operabel verbundenen kodierenden Sequenzen, die für Peptide oder Proteine der Erfindung kodieren, verstärken. mRNA-Moleküle als Nukleinsäuremoleküle, die diese UTR-Kombinationen beherbergen, ermöglichen vorteilhafterweise eine schnelle und transiente Expression von antigenen Peptiden oder Proteinen nach Verabreichung an ein Individuum, vorzugsweise nach intramuskulärer Verabreichung. Dementsprechend ist die mRNA als Nukleinsäure, die bestimmte Kombinationen von 3'-UTRs und/oder 5'-UTRs umfasst, wie hierin bereitgestellt, besonders geeignet für die Verabreichung als Vakzine, insbesondere geeignet für die Verabreichung in den Muskel, die Dermis oder die Epidermis eines Individuums.

[0219] Geeigneterweise umfasst die erfindungsgemäße mRNA als Nukleinsäure mindestens eine heterologe 5'-UTR und/oder mindestens eine heterologe 3'-UTR. Die heterologen 5'-UTRs oder 3'-UTRs können von natürlich vorkommenden Genen abgeleitet sein oder synthetisch konstruiert werden. In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure mindestens eine kodierende Sequenz, wie hier definiert, die operabel mit mindestens einer (heterologen) 3'-UTR und/oder mindestens einer (heterologen) 5'-UTR verknüpft ist.

[0220] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure mindestens eine heterologe 3'-UTR.

[0221] Der Begriff „3'-untranslatierte Region“ oder „3'-UTR“ oder „3'-UTR-Element“ wird von der fachkundigen Person erkannt und verstanden und soll sich z.B. auf einen Teil eines Nukleinsäuremoleküls beziehen, der sich 3' (d.h. stromabwärts) von einer kodierenden Sequenz befindet und nicht in Protein translatiert wird. Eine 3'-UTR kann ein Teil einer Nukleinsäure sein, z.B. einer DNA oder einer RNA, der sich zwischen einer

kodierenden Sequenz und einer (optionalen) terminalen Poly(A)-Sequenz befindet. Eine 3'-UTR kann Elemente zur Steuerung der Genexpression, auch regulatorische Elemente genannt, enthalten. Solche regulatorischen Elemente können z.B. ribosomale Bindungsstellen, miRNA-Bindungsstellen usw. sein.

[0222] Vorzugsweise umfasst die mRNA als Nukleinsäure eine 3'-UTR, die von einem Gen ableitbar ist, das eine RNA mit erhöhter Halbwertszeit betrifft (d.h. eine stabile RNA liefert).

[0223] In einigen Ausführungsformen umfasst eine 3'-UTR ein oder mehrere Polyadenylierungssignal(e), eine Bindungsstelle für Proteine, die die Stabilität einer Nukleinsäure an ihrem Ort in einer Zelle beeinflussen, oder eine oder mehrere miRNA(s) oder Bindungsstellen für miRNAs.

[0224] MicroRNAs (oder miRNAs) sind 19-25 Nukleotide lange nichtkodierende RNAs, die an die 3'-UTR von Nukleinsäuremolekülen binden und die Genexpression entweder durch Verringerung der Stabilität des Nukleinsäuremoleküls oder durch Hemmung der Translation herunterregulieren. Zum Beispiel sind microRNAs dafür bekannt, dass sie die RNA- und damit die Proteinexpression z.B. in Leber (miR-122), Herz (miR-ld, miR-149), Endothelzellen (miR-17-92, miR-126), Fettgewebe (let-7, miR-30c), Niere (miR-192, miR-194, miR-204), myeloischen Zellen (miR-142-3p, miR-142-5p, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24, miR-27), Muskel (miR-133, miR-206, miR-208) und Lungenepithelzellen (let-7, miR-133, miR-126) regulieren. Die mRNA kann eine oder mehrere microRNA-Zielsequenzen, microRNA-Sequenzen oder microRNA-Seeds umfassen. Solche Sequenzen können z.B. jeder bekannten microRNA entsprechen, wie sie beispielsweise in US2005/0261218 und US2005/0059005 offenbart sind.

[0225] Dementsprechend können miRNA oder Bindungsstellen für miRNAs, wie oben definiert, aus der 3'-UTR entfernt oder in die 3'-UTR eingeführt werden, um die Expression der mRNA als Nukleinsäure auf gewünschte Zelltypen oder Gewebe (z.B. Muskelzellen) zuzuschneiden.

[0226] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure mindestens eine heterologe 3'-UTR, wobei die mindestens eine heterologe 3'-UTR eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die von einer 3'-UTR eines Gens, ausgewählt aus PSMB3, ALB7, alpha-Globin (bezeichnet als „muag“), CASP1, COX6B1, GNAS, NDUFA1 und RPS9, oder von einem Homologon, einem Fragment oder einer Variante irgendeines dieser Gene abgeleitet ist, vorzugsweise gemäß Nukleinsäuresequenzen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NOs: 253-268, 22902-22905, 22892-22895 sind, oder ein Fragment oder eine Variante irgendeiner dieser Sequenzen. Besonders bevorzugte Nukleinsäuresequenzen können in diesem Zusammenhang aus der veröffentlichten PCT-Anmeldung WO2019/077001 A1, insbesondere Anspruch 9 der WO2019/077001 A1, abgeleitet werden. Die entsprechenden 3'-UTR-Sequenzen des Anspruchs 9 der WO2019/077001 A1 werden hiermit durch Bezugnahme aufgenommen (z.B. SEQ ID NOs: 23-34 der WO2019/077001A1, oder Fragmente oder Varianten davon).

[0227] In besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure eine 3'-UTR, die von einem alpha-Globin-Gen abgeleitet ist. Diese von einem alpha-Globin-Gen („muag“) abgeleitete 3'-UTR kann eine Nukleinsäuresequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NOs: 267, 268, 22896-22901, 22906-22911 ist, oder ein Fragment oder eine Variante davon umfassen oder aus daraus bestehen.

[0228] In weiteren Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure eine 3'-UTR, die von einem RPS9-Gen abgeleitet ist. Diese von einem RPS9-Gen abgeleitete 3'-UTR kann eine Nukleinsäuresequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NOs: 263 oder 264, 22894, 22895, 22904, 22905 ist, oder ein Fragment oder eine Variante davon umfassen oder daraus bestehen.

[0229] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure eine 3'-UTR, die von einem PSMB3-Gen abgeleitet ist. Diese von einem PSMB3-Gen abgeleitete 3'-UTR kann eine Nukleinsäuresequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NOs: 253 oder 254, 22892, 22893, 22902, 22903 ist, oder ein Fragment oder eine Variante davon umfassen oder daraus bestehen.

[0230] In anderen Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure eine 3'-UTR, die eine Nukleinsäuresequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 22876-22891 ist, oder ein Fragment oder eine Variante davon umfasst oder daraus besteht.

[0231] In anderen Ausführungsformen kann die mRNA als Nukleinsäure eine 3'-UTR umfassen, wie in WO2016/107877 beschrieben, wobei die Offenbarung von WO2016/107877 bezüglich 3'-UTR-Sequenzen hiermit durch Bezugnahme aufgenommen wird. Geeignete 3'-UTRs sind SEQ ID NOs: 1-24 und SEQ ID NOs: 49-318 aus WO2016/107877 oder Fragmente oder Varianten dieser Sequenzen. In anderen Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure eine 3'-UTR, wie in WO2017/036580 beschrieben, wobei die Offenbarung von WO2017/036580 bezüglich 3'-UTR-Sequenzen hiermit durch Bezugnahme aufgenommen wird. Geeignete 3'-UTRs sind SEQ ID NOs: 152-204 aus WO2017/036580 oder Fragmente oder Varianten dieser Sequenzen. In anderen Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure eine 3'-UTR, wie in WO2016/022914 beschrieben, wobei die Offenbarung von WO2016/022914 bezüglich 3'-UTR-Sequenzen hiermit durch Bezugnahme aufgenommen wird. Besonders bevorzugte 3'-UTRs sind Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID NOs: 20-36 der WO2016/022914 oder Fragmente oder Varianten dieser Sequenzen.

[0232] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure mindestens eine heterologe 5'-UTR.

[0233] Die Begriffe „5'-untranslatierte Region“ oder „5'-UTR“ oder „5'-UTR-Element“ werden von der fachkundigen Person erkannt und verstanden und sollen sich z.B. auf einen Teil eines Nukleinsäuremoleküls beziehen, der sich 5' (d.h. „stromaufwärts“) von einer kodierenden Sequenz befindet und nicht in Protein translatiert wird. Eine 5'-UTR kann ein Teil einer Nukleinsäure sein, der sich 5' der kodierenden Sequenz befindet. Typischerweise beginnt eine 5'-UTR mit der Transkriptionsstartstelle und endet vor dem Startcodon der kodierenden Sequenz. Eine 5'-UTR kann Elemente zur Kontrolle der Genexpression, auch regulatorische Elemente genannt, enthalten. Solche regulatorischen Elemente können z.B. ribosomale Bindungsstellen, miRNA-Bindungsstellen usw. sein. Die 5'-UTR kann posttranskriptionell modifiziert sein, z.B. durch enzymatische oder posttranskriptionelle Addition einer 5'-Cap-Struktur (z.B. für mRNA, wie unten definiert).

[0234] Vorzugsweise umfasst die mRNA als Nukleinsäure eine 5'-UTR, die von einem Gen abgeleitet sein kann, das eine RNA mit erhöhter Halbwertszeit betrifft (d.h. das eine stabile RNA liefert).

[0235] In einigen Ausführungsformen umfasst eine 5'-UTR eine oder mehrere Bindungsstellen für Proteine, die die Stabilität einer RNA oder den Ort der RNA in einer Zelle beeinflussen, oder eine oder mehrere miRNA(s) oder Bindungsstellen für miRNAs (wie oben definiert). Dementsprechend können miRNA(s) oder Bindungsstellen für miRNAs, wie oben definiert, aus der 5'-UTR entfernt oder in die 5'-UTR eingeführt werden, um die Expression der mRNA als Nukleinsäure auf gewünschte Zelltypen oder Gewebe (z.B. Muskelzellen) zuzuschneiden.

[0236] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure mindestens eine heterologe 5'-UTR, wobei die mindestens eine heterologe 5'-UTR eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die von einer 5'-UTR eines Gens, ausgewählt aus HSD17B4, RPL32, ASAH1, ATP5A1, MP68, NDUFA4, NOSIP, RPL31, SLC7A3, TUBB4B und UBQLN2 oder einem Homologon, einem Fragment oder einer Variante eines dieser Gene, gemäß Nukleinsäuresequenzen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NOs: 231-252, 22870-22875 sind, oder einem Fragment oder einer Variante irgendeiner dieser Sequenzen abgeleitet ist. Besonders bevorzugte Nukleinsäuresequenzen können in diesem Zusammenhang aus der veröffentlichten PCT-Anmeldung WO2019/077001A1 ausgewählt werden, insbesondere aus Anspruch 9 der WO2019/077001 A1. Die entsprechenden 5'-UTR-Sequenzen des Anspruchs 9 von WO2019/077001A1 werden hiermit durch Bezugnahme aufgenommen (z.B. SEQ ID NOs: 1-20 von WO2019/077001 A1, oder Fragmente oder Varianten davon).

[0237] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure eine 5'-UTR, die von einem RPL31-Gen abgeleitet ist, wobei die von einem RPL31-Gen abgeleitete UTR eine Nukleinsäuresequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NOs: 243, 244, 22872, 22873 ist, oder ein Fragment oder eine Variante davon umfasst oder daraus besteht.

[0238] In anderen Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure eine von einem SLC7A3-Gen abgeleitete 5'-UTR, wobei die von einem SLC7A3-Gen abgeleitete 5'-UTR eine Nukleinsäuresequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NOs: 245, 246, 22874, 22875 ist, oder ein Fragment oder eine Variante davon umfasst oder daraus besteht.

[0239] In besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure eine 5'-UTR, die von einem HSD17B4-Gen abgeleitet ist, wobei die von einem HSD17B4-Gen abgeleitete 5'-UTR eine Nukleinsäuresequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NOs: 231, 232, 22870, 22871 ist, oder ein Fragment oder eine Variante davon umfasst oder daraus besteht.

[0240] In anderen Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure eine 5'-UTR, die eine Nukleinsäuresequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 22848-22869 ist, oder ein Fragment oder eine Variante davon umfasst daraus besteht.

[0241] In anderen Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure eine 5'-UTR, wie in WO2013/143700 beschrieben, wobei die Offenbarung von WO2013/143700 bezüglich 5'-UTR-Sequenzen hiermit durch Bezugnahme aufgenommen wird. Besonders bevorzugte 5'-UTRs sind Nukleinsäuresequenzen, die von den SEQ ID NOs: 1-1363, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1421 und SEQ ID NO: 1422 der WO2013/143700 abgeleitet sind, oder Fragmente oder Varianten dieser Sequenzen. In anderen Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure eine 5'-UTR, wie in WO2016/107877 beschrieben, wobei die Offenbarung von WO2016/107877 bezüglich 5'-UTR-Sequenzen hiermit durch Bezugnahme aufgenommen wird. Besonders bevorzugte 5'-UTRs sind Nukleinsäuresequenzen gemäß den SEQ ID NOs: 25-30 und SEQ ID NOs: 319-382 von WO2016/107877, oder Fragmente oder Varianten dieser Sequenzen. In anderen Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure eine 5'-UTR, wie in WO2017/036580 beschrieben, wobei die Offenbarung von WO2017/036580 bezüglich 5'-UTR-Sequenzen hiermit durch Bezugnahme aufgenommen wird. Besonders bevorzugte 5'-UTRs sind Nukleinsäuresequenzen gemäß den SEQ ID NOs: 1-151 von WO2017/036580, oder Fragmente oder Varianten dieser Sequenzen. In anderen Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure eine 5'-UTR, wie in WO2016/022914 beschrieben, wobei die Offenbarung von WO2016/022914 bezüglich der 5'-UTR-Sequenzen hiermit durch Bezugnahme aufgenommen wird. Besonders bevorzugte 5'-UTRs sind Nukleinsäuresequenzen gemäß den SEQ ID NOs: 3-19 der WO2016/022914 oder Fragmente oder Varianten dieser Sequenzen.

[0242] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure mindestens eine kodierende Sequenz, wie hierin beschrieben, die für mindestens ein antigenes Protein, wie hierin definiert, kodiert, das vorzugsweise vom Coronavirus SARS-CoV-2 (nCoV-2019) abgeleitet ist und operabel mit einer 3'-UTR und/oder einer 5'-UTR verbunden ist, die aus den folgenden 5'-UTR/3'-UTR-Kombinationen („auch als UTR-Designs bezeichnet“) ausgewählt ist:

a-1 (HSD17B4/PSMB3), a-2 (NDUFA4/PSMB3), a-3 (SLC7A3/PSMB3), a-4 (NOSIP/PSMB3), a-5 (MP68/PSMB3), b-1 (UBQLN2/RPS9), b-2 (ASAH1/RPS9), b-3 (HSD17B4/RPS9), b-4 (HSD17B4/CASP1), b-5 (NOSIP/COX6B1), c-1 (NDUFA4/RPS9), c-2 (NOSIP/NDUFA1), c-3 (NDUFA4/-COX6B1), c-4 (NDUFA4 /NDUFA1), c-5 (ATP5A1/PSMB3), d-1 (Rpl31/PSMB3), d-2 (ATP5A1/CASP1), d-3 (SLC7A3/GNAS), d-4 (HSD17B4/NDUFA1), d-5 (Slc7a3/Ndufa1), e-1 (TUBB4B/RPS9), e-2 (RPL31/RPS9), e-3 (MP68/RPS9), e-4 (NOSIP/RPS9), e-5 (ATP5A1/RPS9), e-6 (ATP5A1/COX6B1), f-1 (ATP5A1/GNAS), f-2 (ATP5A1/NDUFA1), f-3 HSD17B4/COX6B1), f-4 (HSD17B4/GNAS), f-5 (MP68/COX6B1), g-1 (MP68/NDUFA1), g-2 (NDUFA4/CASP1), g-3 (NDUFA4/GNAS), g-4 (NOSIP/-CASP1), g-5 (RPL31/CASP1), h-1 (RPL31/COX6B1), h-2 (RPL31/GNAS), h-3 (RPL31/NDUFA1), h-4 (Slc7a3/CASP1), h-5 (SLC7A3/COX6B1), i-1 (SLC7A3/RPS9), i-2 (RPL32/ALB7), i-2 (RPL32/ALB7), oder i-3 (alpha -Globin-Gen).

[0243] In besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure mindestens eine kodierende Sequenz, wie hierin spezifiziert, die für mindestens ein antigenes Protein, wie hierin definiert, kodiert, das vorzugsweise vom Coronavirus SARS-CoV-2 (nCoV-2019) abgeleitet ist, wobei die kodierende Sequenz operabel mit einer HSD17B4-5'-UTR und einer PSMB3-3'-UTR verknüpft ist (HSD17B4/PSMB3 (UTR-Design a-1)).

[0244] Es wurde von den Erfindern gezeigt, dass diese Ausführungsform besonders vorteilhaft für die Induktion einer Immunantwort gegen SARS-CoV-2 ist. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass bereits eine Vakzinierung ausreicht, um Virus-neutralisierende Antikörpertiter hervorzurufen.

[0245] In weiteren bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure mindestens eine kodierende Sequenz, wie hierin spezifiziert, die für mindestens ein antigenes Protein, wie hierin definiert, kodiert, das vorzugsweise vom SARS-CoV-2 (nCoV-2019) Coronavirus abgeleitet ist, wobei die kodierende Sequenz operabel mit einer SLC7A3-5'-UTR und einer PSMB3-3'-UTR verknüpft ist (SLC7A3/PSMB3 (UTR-Design a-3)).

[0246] In weiteren bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure mindestens eine kodierende Sequenz, wie hierin spezifiziert, die für mindestens ein antigenes Protein, wie hierin definiert, kodiert, das vorzugsweise vom SARS-CoV-2 (nCoV-2019) Coronavirus abgeleitet ist, wobei die kodierende Sequenz operabel mit einer RPL31-5'-UTR und einer RPS9-3'-UTR verknüpft ist (RPL31/ RPS9 (UTR-Design e-2)).

[0247] In besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure mindestens eine kodierende Sequenz, wie hierin spezifiziert, die für mindestens ein antigenes Protein, wie hierin definiert, kodiert, das vorzugsweise vom SARS-CoV-2 (nCoV-2019) Coronavirus abgeleitet ist, wobei die kodierende Sequenz operabel mit einer alpha-Globin („muag“)-3'-UTR verknüpft ist (-/muag)(UTR-Design i-3)).

[0248] In einigen Ausführungsformen kann die mRNA als Nukleinsäuremonocistronisch, bicistronisch oder multicistronisch sein.

[0249] Der Begriff „monocistronisch“ wird von der fachkundigen Person erkannt und verstanden und soll sich z.B. auf eine Nukleinsäure beziehen, die nur eine kodierende Sequenz umfasst. Die Begriffe „bicistronisch“ oder „multicistronisch“, wie sie hier verwendet werden, werden von der fachkundigen Person erkannt und verstanden und sollen sich z.B. auf eine Nukleinsäure beziehen, die zwei (bicistronisch) oder mehr (multicistronisch) kodierende Sequenzen umfassen kann.

[0250] In bevorzugten Ausführungsformen ist die mRNA als Nukleinsäure des ersten Aspekts monocistronisch.

[0251] In anderen Ausführungsformen ist die mRNA als Nukleinsäure monocistronisch, und die kodierende Sequenz der Nukleinsäure kodiert für mindestens zwei verschiedene antigene Peptide oder Proteine, die von einem SARS-CoV-2-Coronavirus abgeleitet sind. Dementsprechend kann die kodierende Sequenz für mindestens zwei, drei, vier, fünf, sechs, sieben, acht und mehr antigene Peptide oder Proteine kodieren, die von einem SARS-CoV-2-Coronavirus abgeleitet sind, verknüpft mit einer Aminosäure-Linkersequenz oder ohne eine Aminosäure-Linkersequenz, wobei die Linkersequenz starre Linker, flexible Linker, spaltbare Linker oder eine Kombination davon umfassen kann. Solche Konstrukte werden hier als „Multi-Antigen-Konstrukte“ bezeichnet.

[0252] In weiteren Ausführungsformen kann die mRNA als Nukleinsäure bicistronisch oder multicistronisch sein und mindestens zwei kodierende Sequenzen umfassen, wobei die mindestens zwei kodierenden Sequenzen zwei oder mehr verschiedene antigene Peptide oder Proteine kodieren, die von einem SARS-CoV-2-Coronavirus abgeleitet sind. Dementsprechend kodieren die kodierenden Sequenzen in einer bicistronischen oder multicistronischen Nukleinsäure zweckmäßigerweise unterschiedliche antigene Proteine oder Peptide, wie hier definiert, oder immunogene Fragmente oder immunogene Varianten davon. Vorzugsweise können die kodierenden Sequenzen in den bicistronischen oder multicistronischen Konstrukten durch mindestens eine IRES-Sequenz („Internal Ribosomal Entry Site“; interne Ribosomeneintrittsstelle) getrennt sein. Somit kann der Begriff „zwei oder mehr antigene Peptide oder Proteine kodierend“ bedeuten, ohne darauf beschränkt zu sein, dass die bicistronische oder multicistronische Nukleinsäure z.B. mindestens zwei, drei, vier, fünf, sechs oder mehr (vorzugsweise unterschiedliche) antigene Peptide oder Proteine verschiedener SARS-CoV-2-Coronavirus-Isolate kodiert. Alternativ kann die bicistronische oder multicistronische Nukleinsäure z.B. mindestens zwei, drei, vier, fünf, sechs oder mehr (vorzugsweise unterschiedliche) antigene Peptide oder Proteine kodieren, die von demselben SARS-CoV-2-Coronavirus abgeleitet sind. In diesem Zusammenhang können geeignete IRES-Sequenzen aus der Liste der Nukleinsäuresequenzen gemäß den SEQ ID NOs: 1566-1662 der Patentanmeldung WO2017/081082 oder Fragmenten oder Varianten dieser Sequenzen ausgewählt werden. In diesem Zusammenhang wird die Offenbarung der WO2017/081082, die sich auf IRES-Sequenzen bezieht, hiermit durch Bezugnahme aufgenommen.

[0253] Im Kontext der Erfindung können bestimmte Kombinationen von kodierenden Sequenzen durch eine beliebige Kombination von monocistronischen, bicistronischen und multicistronischen RNA-Konstrukten

und/oder Multi-Antigen-Konstrukten erzeugt werden, um einen Nukleinsäuresatz zu erhalten, der für mehrere antigene Peptide oder Proteine, wie hierin definiert, kodiert.

[0254] In bevorzugten Ausführungsformen kann der A/U (A/T)-Gehalt in der Umgebung der Ribosomenbindungsstelle der Nukleinsäure gegenüber dem A/U (A/T)-Gehalt in der Umgebung der Ribosomen-Bindungsstelle ihrer jeweiligen Wildtyp- oder Referenz-Nukleinsäure erhöht sein. Diese Modifikation (ein erhöhter A/U (A/T)-Gehalt in der Umgebung der Ribosomenbindungsstelle) erhöht die Effizienz der Ribosomenbindung an die mRNA als Nukleinsäure. Eine effektive Bindung der Ribosomen an die Ribosomenbindungsstelle hat wiederum den Effekt einer effizienten Translation der Nukleinsäure.

[0255] Dementsprechend umfasst die mRNA als Nukleinsäure in einer besonders bevorzugten Ausführungsform eine Ribosomenbindungsstelle, auch als „Kozak-Sequenz“ bezeichnet, die identisch oder zu mindestens 80%, 85%, 90%, 95% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 180, 181, 22845-22847 ist, oder Fragmente oder Varianten davon.

[0256] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die erfindungsgemäße mRNA als Nukleinsäure mindestens eine Poly(N)-Sequenz, z.B. mindestens eine Poly(A)-Sequenz, mindestens eine Poly(U)-Sequenz, mindestens eine Poly(C)-Sequenz, oder Kombinationen davon.

[0257] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die erfindungsgemäße mRNA als Nukleinsäure mindestens eine Poly(A)-Sequenz.

[0258] Die Begriffe „Poly(A)-Sequenz“, „Poly(A)-Schwanz“ oder „3'-Poly(A)-Schwanz“, wie sie hierin verwendet werden, werden von der fachkundigen Person erkannt und verstanden, und sollen z.B. eine Sequenz von Adenosin-Nukleotiden sein, die typischerweise am 3'-Ende einer linearen RNA (oder in einer zirkulären RNA) angeordnet ist und bis zu etwa 1000 Adenosin-Nukleotide umfasst. Vorzugsweise ist die Poly(A)-Sequenz im Wesentlichen homopolymer, d.h., eine Poly(A)-Sequenz von z.B. 100 Adenosin-Nukleotiden hat im Wesentlichen die Länge von 100 Nukleotiden. In anderen Ausführungsformen kann die Poly(A)-Sequenz durch mindestens ein Nukleotid unterbrochen sein, das sich von einem Adenosin-Nukleotid unterscheidet, z.B. kann eine Poly(A)-Sequenz von z.B. 100 Adenosin-Nukleotiden eine Länge von mehr als 100 Nukleotiden aufweisen (umfassend 100 Adenosin-Nukleotide und zusätzlich das mindestens eine Nukleotid oder einen Abschnitt von Nukleotiden, die sich von einem Adenosin-Nukleotid unterscheiden). Die „Poly(A)-Sequenz“, wie hierin definiert, bezieht sich typischerweise auf mRNA; der Begriff kann sich jedoch ebenso auf entsprechende Sequenzen in einem DNA-Molekül (z.B. eine „Poly(T)-Sequenz“) beziehen.

[0259] Die Poly(A)-Sequenz kann etwa 10 bis etwa 500 Adenosin-Nukleotide, etwa 10 bis etwa 200 Adenosin-Nukleotide, etwa 40 bis etwa 200 Adenosin-Nukleotide oder etwa 40 bis etwa 150 Adenosin-Nukleotide umfassen. Geeigneterweise kann die Länge der Poly(A)-Sequenz mindestens etwa oder auch mehr als etwa 10, 50, 64, 75, 100, 200, 300, 400 oder 500 Adenosin-Nukleotide betragen.

[0260] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure mindestens eine Poly(A)-Sequenz, die etwa 30 bis etwa 200 Adenosin-Nukleotide umfasst. In besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst die Poly(A)-Sequenz etwa 64 Adenosin-Nukleotide (A64). In anderen besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst die Poly(A)-Sequenz etwa 100 Adenosin-Nukleotide (A100). In anderen Ausführungsformen umfasst die Poly(A)-Sequenz etwa 150 Adenosin-Nukleotide.

[0261] In weiteren Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure mindestens eine Poly(A)-Sequenz, die etwa 100 Adenosin-Nukleotide umfasst, wobei die Poly(A)-Sequenz durch Nicht-Adenosin-Nukleotide, vorzugsweise durch 10 Nicht-Adenosin-Nukleotide, unterbrochen ist (A30-N10-A70).

[0262] Die Poly(A)-Sequenz, wie hierin definiert, kann direkt am 3'-Terminus der mRNA als Nukleinsäure, vorzugsweise direkt am 3'-Terminus einer RNA, angeordnet sein.

[0263] In bevorzugten Ausführungsformen ist das 3'-terminale Nukleotid (das heißt das letzte 3'-terminale Nukleotid in der Polynukleotidkette) das 3'-terminale A-Nukleotid der mindestens einen Poly(A)-Sequenz. Der Begriff „direkt am 3'-Terminus gelegen“ ist so zu verstehen, dass er sich genau am 3'-Terminus befindet; mit anderen Worten, der 3'-Terminus der mRNA als Nukleinsäure besteht aus einer Poly(A)-Sequenz, die mit einem A-Nukleotid endet.

[0264] Es wurde von den Erfindern gezeigt, dass diese Ausführungsform besonders vorteilhaft für die Induktion einer Immunantwort gegen SARS-CoV-2 ist. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass bereits eine Vakzinierung ausreicht, um Virus-neutralisierende Antikörpertiter hervorzurufen.

[0265] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst die mRNA als Nukleinsäuresequenz, vorzugsweise die RNA, eine Poly(A)-Sequenz aus mindestens 70 Adenosin-Nukleotiden, wobei das 3'-terminale Nukleotid ein Adenosin-Nukleotid ist.

[0266] In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass das Ende auf einem Adenosin-Nukleotid die Induktion von IFNalpha durch die RNA-Vakzine verringert. Dies ist besonders wichtig, da die Induktion von IFNalpha als Hauptfaktor für die Induktion von Fieber bei vakzinierten Individuen gilt, was natürlich vermieden werden sollte.

[0267] Es wird die Poly(A)-Sequenz der mRNA als Nukleinsäure vorzugsweise von einer DNA-Matrize (Template) während der In-vitro-Transkription der RNA erhalten. In anderen Ausführungsformen wird die Poly(A)-Sequenz in vitro durch übliche Methoden der chemischen Synthese erhalten, ohne dass sie notwendigerweise von einem DNA-Template transkribiert wird. In anderen Ausführungsformen werden Poly(A)-Sequenzen durch enzymatische Polyadenylierung der RNA (nach Transkription der RNA in-vitro) unter Verwendung von kommerziell erhältlichen Polyadenylierungskits und entsprechenden auf dem Gebiet bekannten Protokollen oder alternativ unter Verwendung von immobilisierten Poly(A)-Polymerasen, z.B. unter Verwendung eines Verfahrens und einer Vorrichtung, wie in WO2016/1 74271 beschrieben, erzeugt.

[0268] Die mRNA als Nukleinsäure kann eine Poly(A)-Sequenz umfassen, die durch enzymatische Polyadenylierung erhalten wird, wobei die Mehrheit der Nukleinsäuremoleküle etwa 100 (+/-20) bis etwa 500 (+/-50), vorzugsweise etwa 250 (+/- 20) Adenosin-Nukleotide umfasst.

[0269] In anderen Ausführungsformen kann die mRNA als Nukleinsäure eine Poly(A)-Sequenz umfassen, die von einer Template-DNA abgeleitet ist, und kann zusätzlich mindestens eine zusätzliche Poly(A)-Sequenz umfassen, die durch enzymatische Polyadenylierung erzeugt wird, z.B. wie in WO2016/091391 beschrieben.

[0270] In weiteren Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure mindestens ein Polyadenylierungssignal.

[0271] In anderen Ausführungsformen kann die mRNA als Nukleinsäure mindestens eine Poly(C)-Sequenz umfassen.

[0272] Der Begriff „Poly(C)-Sequenz“, wie er hier verwendet wird, soll eine Sequenz von Cytosin-Nukleotiden von bis zu etwa 200 Cytosin-Nukleotiden sein. In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die Poly(C)-Sequenz etwa 10 bis etwa 200 Cytosin-Nukleotide, etwa 10 bis etwa 100 Cytosin-Nukleotide, etwa 20 bis etwa 70 Cytosin-Nukleotide, etwa 20 bis etwa 60 Cytosin-Nukleotide oder etwa 10 bis etwa 40 Cytosin-Nukleotide. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst die Poly(C)-Sequenz etwa 30 Cytosin-Nukleotide.

[0273] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die erfindungsgemäße mRNA als Nukleinsäure mindestens einen Histon-Stem-Loop (hSL).

[0274] Der Begriff „Histon-Stem-Loop“ (im Sequenzprotokoll z.B. mit „hSL“ abgekürzt) soll sich auf Nukleinsäuresequenzen beziehen, die eine Stamm-Schleifen-Sekundärstruktur bilden, die vorwiegend in Histon-mRNAs vorkommt.

[0275] Histon-Stem-Loop-Sequenzen/Strukturen können zweckmäßigerweise aus Histon-Stem-Loop-Sequenzen ausgewählt sein, wie sie in WO2012/019780 offenbart sind, wobei die Offenbarung bezüglich Histon-Stem-Loop-Sequenzen/Histon-Stem-Loop-Strukturen hiermit durch Bezugnahme aufgenommen wird. Eine Histon-Stem-Loop-Sequenz, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann, kann vorzugsweise von den Formeln (I) oder (II) der WO2012/019780 abgeleitet sein. Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Nukleinsäure mindestens eine Histon-Stem-Loop-Sequenz umfassen, die von mindestens einer der spezifischen Formeln (Ia) oder (IIa) der Patentanmeldung WO2012/019780 abgeleitet ist.

[0276] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die erfindungsgemäße mRNA als Nukleinsäure mindestens einen Histon-Stem-Loop, wobei der Histon-Stem-Loop (hSL) eine Nukleinsäuresequenz umfasst oder aus einer Nukleinsäuresequenz besteht, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NOs: 178 oder 179 ist, oder Fragmente oder Varianten davon.

[0277] In anderen Ausführungsformen umfasst die mRNA des ersten Aspekts keinen Histon-Stem-Loop, wie hierin definiert.

[0278] In einigen Ausführungsformen umfasst die mRNA als Nukleinsäure ein 3'-terminales Sequenzelement. Dieses 3'-terminale Sequenzelement umfasst eine Poly(A)-Sequenz und optional eine Histon-Stem-Loop-Sequenz. Dementsprechend umfasst die erfindungsgemäße mRNA als Nukleinsäure mindestens ein 3'-terminales Sequenzelement, das eine Nukleinsäuresequenz umfasst oder aus einer Nukleinsäuresequenz besteht, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NOs: 182-230, 22912, 22913 ist, oder ein Fragment oder eine Variante davon.

[0279] In bevorzugten Ausführungsformenumfasst die mRNA als Nukleinsäure ein 3'-terminales Sequenzelement. Dieses 3'-terminale Sequenzelement umfasst eine Poly(A)-Sequenz und optional eine Histon-Stem-Loop-Sequenz. Dementsprechend umfasst die erfindungsgemäße Nukleinsäure mindestens ein 3'-terminales Sequenzelement, das eine Nukleinsäuresequenz umfasst oder aus einer Nukleinsäuresequenz besteht, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NOs: 182, 187, 189, 192, 199, 207 ist, oder ein Fragment oder eine Variante davon.

[0280] In verschiedenen Ausführungsformen kann die mRNA als Nukleinsäure ein 5'-terminales Sequenzelement gemäß SEQ ID NOs: 176 oder 177, 22840-22844 oder ein Fragment oder eine Variante davon umfassen. Ein solches 5'-terminales Sequenzelement umfasst z.B. eine Bindungsstelle für die T7-RNA-Polymerase. Ferner kann das erste Nukleotid der 5'-terminalen Startsequenz vorzugsweise eine 2'O-Methylierung umfassen, z.B. 2'O-methyliertes Guanosin oder ein 2'O-methyliertes Adenosin.

[0281] Vorzugsweise umfasst die mRNA als Nukleinsäure des ersten Aspektstypischerweise etwa 50 bis etwa 20000 Nukleotide, oder etwa 500 bis etwa 10000 Nukleotide, oder etwa 1000 bis etwa 10000 Nukleotide, oder bevorzugt etwa 1000 bis etwa 5000 Nukleotide, oder noch mehr bevorzugt etwa 2000 bis etwa 5000 Nukleotide.

[0282] Offenbart sind Nukleinsäuren als DNA oder RNA.

[0283] Offenbart ist die DNA als Plasmid-DNA oder als lineares kodierendes DNA-Konstrukt, wobei die DNA die hierin definierten Nukleinsäureelemente umfasst oder daraus besteht (z.B. einschließlich kodierender Sequenzen, UTRs, Poly(A/T), Polyadenylierungssignal, Promotor).

[0284] Offenbart ist die Nukleinsäure als DNA-Expressionsvektor. Ein solcher DNA-Expressionsvektor kann ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus einem bakteriellen Plasmid, einem Adenovirus, einem Pockenvirus, einem Parapockenvirus (orf-Virus), einem Vaccinia-Virus, einem Vogelpocken-Virus, einem Herpes-Virus, einem Adeno-assoziierten Virus (AAV), einem Alphavirus, einem Lentivirus, einem Lambda-Phagen, einem lymphozytäre Choriomeningitis-Virus und Listeria sp, Salmonella sp.

[0285] Geeigneterweise kann die DNA auch einen Promotor umfassen, der operabel mit der SARS-CoV-2-Antigen kodierenden Sequenz verbunden ist. Der Promotor, der operabel mit der Antigenkodierenden Sequenz verbunden ist, kann z.B. ein Promotor aus dem Simian-Virus 40 (SV40), ein Promotor aus dem Maus-Mammatumor-Virus (MMTV), ein Promotor aus dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV), wie z.B. der Long-Terminal-Repeat (LTR)-Promotor des Bovinen Immundefizienz-Virus (BIV), ein Moloney-Virus-Promotor, ein Aviäres Leukose-Virus (ALV)-Promotor, ein Cytomegalovirus (CMV)-Promotor, wie zum Beispiel der Immediate-Early-CMV-Promotor, ein Epstein-Barr-Virus (EBV)-Promotor oder ein Rous-Sarkom-Virus (RSV)-Promotor sein. Der Promotor kann auch ein Promotor von einem humanen Gen, wie z.B. humanem Aktin, humanem Myosin, humanem Hämoglobin, humanem Muskelkreatin oder humanem Metalothionein, sein. Der Promotor kann auch ein gewebespezifischer Promotor, wie z.B. ein muskel- oder hautspezifischer Promotor, natürlich oder synthetisch, sein. Beispiele für solche Promotoren sind in der US-Patentanmeldungsveröffentlichung Nr. US20040175727 beschrieben. In bevorzugten Ausführungsformen kann der Vektor pVAX, pcDNA3.0 oder provax oder irgendein anderer Expressionsvektor sein, der in der Lage ist, DNA zu

exprimieren, die für das Coronavirus-Antigen kodiert und eine Zelle in die Lage versetzt, die Sequenz in ein Antigen zu translatieren, das vom Immunsystem erkannt wird.

[0286] Weitere geeignete Plasmid-DNA kann erzeugt werden, um eine effiziente Produktion des kodierten SARS-CoV-2-Antigens in Zelllinien, z.B. in Insektenzelllinien, zu ermöglichen, z.B. unter Verwendung von Vektoren, wie sie in WO2009150222A2 beschrieben sind und wie sie in den PCT-Ansprüchen 1 bis 33 definiert sind, wobei die Offenbarung betreffend die Ansprüche 1 bis 33 von WO2009150222A2 hiermit durch Bezugnahme aufgenommen wird.

[0287] Offenbart ist die Nukleinsäure als ein Adenovirus-basierter Vektor. Ein solcher Adenovirus-basierter Vektor kann mindestens eine kodierende Sequenz umfassen, die für mindestens ein SARS-CoV-2-Antigen-Peptid oder -Protein, wie hierin definiert, kodiert.

[0288] Jeder geeignete Adenovirus-basierte Vektor kann verwendet werden, wie solche, die in WO2005/071093 oder WO2006/048215 beschrieben sind. Geeigneterweise handelt es sich bei dem verwendeten Adenovirus-basierten Vektor um ein Simian-Adenovirus, wodurch eine Dämpfung der Immunantwort nach der Vakzinierung durch bereits vorhandene Antikörper gegen gängige humane Entitäten, wie zum Beispiel AdHu5, vermieden wird. Zu geeigneten Simian-Adenovirus-Vektoren gehören z.B. AdCh63 (Patentnummer WO/2005/071093) oder AdCh68 (Cohen et al J. Gen Virol 2002 83:151), aber auch andere können verwendet werden. Zweckmäßigerweise ist bei dem Adenovirus-Vektor die E1-Region deletiert, wodurch er in humanen Zellen nicht replizieren kann. Andere Regionen des Adenovirus, wie z.B. E3 und E4, können ebenfalls deletiert sein.

[0289] Offenbart ist die Nukleinsäure als ein orf-Virus-basierter Vektor. Ein solcher Adenovirus-basierter Vektor kann mindestens eine kodierende Sequenz umfassen, die für mindestens ein SARS-CoV-2-Antigen-Peptid oder -Protein, wie hierin definiert, kodiert.

[0290] Gemäß der Erfindung ist die Nukleinsäure eine mRNA.

[0291] Offenbart ist, dass die RNA typischerweise etwa 50 bis etwa 20000 Nukleotide, oder etwa 500 bis etwa 10000 Nukleotide, oder etwa 1000 bis etwa 10000 Nukleotide, oder bevorzugt etwa 1000 bis etwa 5000 Nukleotide, oder noch mehr bevorzugt etwa 2000 bis etwa 5000 Nukleotide umfassen kann.

[0292] Gemäß der Erfindung ist die Nukleinsäure eine kodierende mRNA.

[0293] Offenbart ist auch eine (kodierende) selbstreplizierende RNA, eine (kodierende) zirkuläre RNA, eine (kodierende) virale RNA oder eine (kodierende) Replikon-RNA.

[0294] Offenbart ist die kodierende RNA als eine zirkuläre RNA. Wie hier verwendet, sind „zirkuläre RNA“ oder „circRNAs“ als zirkuläre Polynukleotidkonstrukte zu verstehen, die für mindestens ein antigenes Peptid oder Protein, wie hier definiert, kodieren. Vorzugsweise ist eine solche circRNA ein einzelsträngiges RNA-Molekül. Alternativ kann diese circRNA mindestens eine kodierende Sequenz umfassen, die mindestens ein antigenes Protein von einem SARS-CoV-2-Coronavirus oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante davon kodiert.

[0295] Offenbart ist die kodierende RNA als eine Replikon-RNA. Der Begriff „Replikon-RNA“ wird von der fachkundigen Person erkannt und verstanden und ist z.B. als optimierte selbstreplizierende RNA zu verstehen. Solche Konstrukte können Replikase-Elemente, die z.B. von Alphaviren (z.B. SFV, SIN, VEE oder RRV) abgeleitet sind, und die Substitution der strukturellen Virusproteine durch die interessierende Nukleinsäure (d.h. die kodierende Sequenz, die ein antigenes Peptid oder Protein eines SARS-CoV-2-Coronavirus kodiert) umfassen. Alternativ kann die Replikase auf einem unabhängigen kodierenden RNA-Konstrukt oder kodierenden DNA-Konstrukt bereitgestellt werden. Stromabwärts der Replikase kann sich ein subgenomischer Promotor befinden, der die Replikation der Replikon-RNA kontrolliert.

[0296] Offenbart ist, dass es sich bei der mindestens einen Nukleinsäure nicht um eine Replikon-RNA oder eine selbstreplizierende RNA handeln kann.

[0297] Die erfindungsgemäße Nukleinsäure ist eine mRNA.

[0298] Vorzugsweise umfasst die mRNA kein Replikase-Element (z.B. eine Nukleinsäure, die für eine Replikase kodiert).

[0299] Die Begriffe „RNA“ und „mRNA“ werden von der Person mit durchschnittlicher Fachkenntnis erkannt und verstanden und sind z.B. als Ribonukleinsäuremolekül, d.h. ein aus Nukleotiden bestehendes Polymer, zu verstehen. Bei diesen Nukleotiden handelt es sich in der Regel um Adenosin-Monophosphat-, Uridin-Monophosphat-, Guanosin-Monophosphat- und Cytidin-Monophosphat-Monomere, die entlang eines sogenannten Rückgrats (Backbone) miteinander verbunden sind. Das Rückgrat wird durch Phosphodiesterbindungen zwischen dem Zucker, d.h. der Ribose, eines ersten Monomers und einem Phosphatanteil eines zweiten, benachbarten Monomers gebildet. Die spezifische Abfolge der Monomere wird als RNA-Sequenz bezeichnet. Die mRNA (Messenger-RNA) stellt die kodierende Nukleotidsequenz bereit, die in eine Aminosäuresequenz eines bestimmten Peptids oder Proteins translatiert werden kann.

[0300] Im Kontext der Erfindung kann die mRNA mindestens eine kodierende Sequenz bereitstellen, die für ein antigenes Protein von einem SARS-CoV-2 kodiert, das nach Verabreichung (z.B. nach Verabreichung an ein Individuum, z.B. einen Menschen) in ein (funktionales) Antigen translatiert wird.

[0301] Entsprechend ist die die mRNA für eine Vakzine, vorzugsweise eine SARS-CoV-2-Vakzine, geeignet.

[0302] Zweckmäßigerweise kann die kodierende mRNA durch Hinzufügen einer 5'-Cap-Struktur modifiziert sein, die vorzugsweise die kodierende RNA stabilisiert und/oder die Expression des kodierten Antigens erhöht und/oder die Stimulation des angeborenen Immunsystems (nach Verabreichung an ein Individuum) reduziert. Eine 5'-Cap-Struktur ist von besonderer Bedeutung für eine mRNA ist, insbesondere eine lineare kodierende mRNA.

[0303] Dementsprechend umfasst in bevorzugten Ausführungsformen die mRNA eine 5'-Cap-Struktur, vorzugsweise cap0, cap1, cap2, eine modifizierte cap0- oder eine modifizierte cap1-Struktur.

[0304] Der Begriff „5'-Cap-Struktur“, wie er hier verwendet wird, wird von der fachkundigen Person erkannt und verstanden und soll sich z.B. auf ein 5'-modifiziertes Nukleotid, insbesondere ein Guanin-Nukleotid, beziehen, das am 5'-Ende einer mRNA angeordnet ist. Vorzugsweise ist die 5'-Cap-Struktur über eine 5'-5'-Triphosphat-Bindung mit der mRNA verbunden.

[0305] 5'-Cap-Strukturen, die im Kontext der vorliegenden Erfindung geeignet sein können, sind cap0 (Methylierung der ersten Nukleobase, z.B. m7GpppN), cap1 (zusätzliche Methylierung der Ribose des benachbarten Nukleotids von m7GpppN), cap2 (zusätzliche Methylierung der Ribose des 2. Nukleotids stromabwärts von m7GpppN), cap3 (zusätzliche Methylierung der Ribose des 3. Nukleotids stromabwärts von m7GpppN), cap4 (zusätzliche Methylierung der Ribose des 4. Nukleotids stromabwärts von m7GpppN), ARCA (anti-reverses Cap-Analogon), modifiziertes ARCA (z.B. Phosphothioat-modifiziertes ARCA), Inosin, N1-Methyl-Guanosin, 2'-Fluor-Guanosin, 7-Deaza-Guanosin, 8-Oxo-Guanosin, 2-Amino-Guanosin, LNA-Guanosin und 2-Azido-Guanosin.

[0306] Eine 5'-Cap-Struktur (cap0 oder cap1) kann bei der chemischen RNA-Synthese oder bei der RNA-in-vitro-Transkription (co-transkriptionelles Capping) unter Verwendung von Cap-Analoga gebildet werden.

[0307] Der Begriff „Cap-Analogon“, wie er hier verwendet wird, wird von der fachkundigen Person erkannt und verstanden und soll sich z.B. auf ein nicht polymerisierbares Di- oder Trinukleotid beziehen, das eine Cap-Funktionalität aufweist, indem es die Translation oder Lokalisierung erleichtert und/oder den Abbau eines Nukleinsäuremoleküls, insbesondere eines RNA-Moleküls, verhindert, wenn es am 5'-Ende des Nukleinsäuremoleküls eingebaut ist. Nicht polymerisierbar bedeutet, dass das Cap-Analogon nur am 5'-Terminus eingebaut wird, da es kein 5'-Triphosphat besitzt und daher nicht in die 3'-Richtung durch eine Template-abhängige Polymerase, insbesondere durch eine Template-abhängige RNA-Polymerase, verlängert werden kann. Beispiele für Cap-Analoga umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, eine chemische Struktur, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus m7GpppG, m7GpppA, m7GpppC; unmethylierten Cap-Analoga (z.B. GpppG); dimethylierten Cap-Analoga (z.B. m2,7GpppG), trimethylierten Cap-Analoga (z.B. m2,2,7GpppG), dimethylierten symmetrischen Cap-Analoga (z.B. m7Gpppm7G) oder anti-reversen Cap-Analoga (z.B. ARCA; m7,2'OmeGpppG, m7,2'dGpppG, m7,3'OmeGpppG, m7,3'dGpppG und deren Tetraphosphatderivate). Weitere Cap-Analoga wurden bereits beschrieben (WO2008/016473, WO2008/157688, WO2009/149253, WO2011/015347, und WO2013/059475). Weitere geeignete Cap-Analoga sind in diesem Zusammenhang in WO2017/066793, WO2017/066781, WO2017/066791, WO2017/066789,

WO2017/053297, WO2017/066782, WO2018/075827 und WO2017/066797 beschrieben, wobei die Offenbarungen, die sich auf Cap-Analoga beziehen, hiermit durch Bezugnahme aufgenommen werden.

[0308] In einigen Ausführungsformen wird eine modifizierte cap1-Struktur unter Verwendung eines TriNukleotid-Cap-Analogons erzeugt, wie in WO2017/053297, WO2017/066793, WO2017/066781, WO2017/066791, WO2017/066789, WO2017/066782, WO2018/075827 und WO2017/066797 offenbart. Insbesondere können beliebige Cap-Strukturen, die von der in Anspruch 1-5 von WO2017/053297 offenbarten Struktur ableitbar sind, zweckmäßigerweise verwendet werden, um eine modifizierte cap1-Struktur co-transkriptionell zu erzeugen.

[0309] Weiterhin können beliebige Cap-Strukturen, die von der in Anspruch 1 oder Anspruch 21 der WO2018/075827 offenbarten Struktur ableitbar sind, zweckmäßigerweise verwendet werden, um eine modifizierte cap1-Struktur co-transkriptionell zu erzeugen.

[0310] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA eine cap1-Struktur.

[0311] In bevorzugten Ausführungsformen kann die 5'-Cap-Struktur in geeigneter Weise co-transkriptionell unter Verwendung eines Trinukleotid-Cap-Analogons, wie hierin definiert, in einer RNA-in-vitro-Transkriptionsreaktion, wie hierin definiert, angefügt werden.

[0312] In bevorzugten Ausführungsformen wird die cap1-Struktur der kodierenden mRNA der Erfindung unter Verwendung von co-transkriptionellem Capping unter Verwendung der Trinukleotid-Cap-Analoga m7G (5')ppp(5')(2'OMeA)pG oder m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG gebildet. Ein bevorzugtes cap1-Analogon ist in diesem Zusammenhang m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG.

[0313] In anderen bevorzugten Ausführungsformen wird die cap1-Struktur der erfindungsgemäßen mRNA durch co-transkriptionelles Capping unter Verwendung des Trinukleotid-Cap-Analogons 3'OMe-m7G(5')ppp (5')(2'OMeA)pG gebildet.

[0314] In anderen Ausführungsformen wird eine cap0-Struktur der erfindungsgemäßen mRNA unter Verwendung von co-transkriptionellem Capping unter Verwendung des Cap-Analogons 3'OMe-m7G(5')ppp(5')G gebildet.

[0315] In anderen Ausführungsformen wird die 5'-Cap-Struktur über enzymatisches Capping unter Verwendung von Capping-Enzymen (z.B. Vaccinia-Virus-Capping-Enzyme und/oder Capabhängige 2'-O-Methyltransferasen) gebildet, um Cap0- oder Cap1- oder Cap2-Strukturen zu erzeugen. Die 5'-Cap-Struktur (cap0 oder cap1) kann unter Verwendung immobilisierter Capping-Enzyme und/oder Cap-abhängiger 2'-O-Methyltransferasen unter Verwendung der in WO2016/193226 offenbarten Methoden und Mittel angefügt werden.

[0316] In bevorzugten Ausführungsformen umfassen etwa 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% der mRNA (-Spezies) eine cap1-Struktur, wie mittels eines Capping-Assays bestimmt. In bevorzugten Ausführungsformen umfassen weniger als etwa 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% der mRNA (-Spezies) keine cap1 -Struktur, wie unter Verwendung eines Capping-Assays bestimmt. In anderen bevorzugten Ausführungsformen umfassen etwa 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% der mRNA (-Spezies) eine cap0-Struktur, wie unter Verwendung eines Capping-Assays bestimmt. In bevorzugten Ausführungsformen umfasst weniger als etwa 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% der mRNA (-Spezies) keine cap0-Struktur, wie unter Verwendung eines Capping-Assays bestimmt.

[0317] Der Begriff „mRNA-Spezies“ ist nicht auf „ein einzelnes Molekül“ beschränkt, sondern wird so verstanden, dass er eine Gesamtheit von im Wesentlichen identischen mRNA-Molekülen umfasst. Dementsprechend kann er sich auf eine Vielzahl von im Wesentlichen identischen (kodierenden) mRNA-Molekülen beziehen.

[0318] Zur Bestimmung des Vorhandenseins/Fehlens einer cap0- oder einer cap1-Struktur kann ein Capping-Assay, wie in der veröffentlichten PCT-Anmeldung WO2015/101416 beschrieben, insbesondere wie in den Ansprüchen 27 bis 46 der veröffentlichten PCT-Anmeldung WO2015/101416 beschrieben, verwendet werden. Andere Capping-Assays, die zur Bestimmung des Vorhandenseins/Fehlens einer cap0- oder einer cap1-Struktur einer RNA verwendet werden können, sind in PCT/EP2018/08667 oder den veröffentlichten PCT-Anmeldungen WO2014/152673 und WO2014/152659 beschrieben.

[0319] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA eine m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)-Cap-Struktur. In solchen Ausführungsformen umfasst die kodierende mRNA ein 5'-terminales m7G-Cap und eine zusätzliche Methylierung der Ribose des benachbarten Nukleotids von m7GpppN, in diesem Fall ein 2'O-methyliertes Adenosin. Vorzugsweise umfassen etwa 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% der mRNA (-Spezies) eine solche cap1-Struktur, wie unter Verwendung eines Capping-Assays bestimmt.

[0320] In anderen bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA eine m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)-Cap-Struktur. In solchen Ausführungsformen umfasst die kodierende mRNA ein 5'-terminales m7G-Cap und eine zusätzliche Methylierung der Ribose des benachbarten Nukleotids, in diesem Fall ein 2'O-methyliertes Guanosin. Vorzugsweise umfassen etwa 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% der kodierenden mRNA (-Spezies) eine solche cap1-Struktur, wie unter Verwendung eines Capping-Assays bestimmt.

[0321] Dementsprechend kann das erste Nukleotid der mRNA-Sequenz, d.h. das Nukleotid stromabwärts der m7G(5')ppp-Struktur, ein 2'O-methyliertes Guanosin oder ein 2'O-methyliertes Adenosin sein.

[0322] Gemäß einigen Ausführungsformen ist die mRNA eine modifizierte mRNA, wobei sich die Modifikation auf chemische Modifikationen bezieht, die sowohl Modifikationen des Rückgrats als auch Zuckermodifikationen oder Basenmodifikationen umfassen.

[0323] Eine modifizierte mRNA kann Nukleotid-Analoga/Modifikationen umfassen, z.B. Rückgrat-Modifikationen, Zuckermodifikationen oder Basenmodifikationen. Eine Rückgrat-Modifikation im Kontext der Erfindung ist eine Modifikation, bei der Phosphate des Rückgrats der Nukleotide der mRNA chemisch modifiziert sind. Eine Zuckermodifikation im Kontext der Erfindung ist eine chemische Modifikation des Zuckers der Nukleotide der mRNA. Weiterhin ist eine Basenmodifikation im Kontext der Erfindung eine chemische Modifikation des Basenanteils der Nukleotide der mRNA. In diesem Zusammenhang werden die Nukleotidanaloga oder -modifikationen vorzugsweise aus Nukleotidanaloga ausgewählt, die für die Transkription und/oder Translation geeignet sind.

[0324] In besonders bevorzugten Ausführungsformen sind die Nukleotidanaloga/Modifikationen, die in eine modifizierte RNA, wie hierin beschrieben, eingebaut sein können, vorzugsweise ausgewählt aus 2-Amino-6-chlorpurinribosid-5'-triphosphat, 2-Aminopurinribosid-5'-triphosphat; 2-Aminoadenosin-5'-triphosphat, 2'-Amino-2'-desoxycytidintriphosphat, 2-Thiocytidin-5'-triphosphat, 2-Thiouridin-5'-triphosphat, 2'-Fluorthymidin-5'-triphosphat, 2'-O-Methylinosin-5'-triphosphat, 4-Thiouridin-5'-triphosphat, 5-Aminoallylcytidin-5'-triphosphat, 5-Aminoallyluridin-5'-triphosphat, 5-Bromcytidin-5'-triphosphat, 5-Bromuridin-5'-triphosphat, 5-Brom-2'-desoxycytidin-5'-triphosphat, 5-Brom-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat, 5-Iodcytidin-5'-triphosphat, 5-Iod-2'-desoxycytidin-5'-triphosphat, 5-Ioduridin-5'-triphosphat, 5-Iod-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat, 5-Methylcytidin-5'-triphosphat, 5-Methyluridin-5'-triphosphat, 5-Propynyl-2'-desoxycytidin-5'-triphosphat, 5-Propynyl-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat, 6-Azacytidin-5'-triphosphat, 6-Azauridin-5'-triphosphat, 6-Chlorpurinribosid-5'-triphosphat, 7-Deazaadenosin-5'-triphosphat, 7-Deazaguanosin-5'-triphosphat, 8-Azaadenosin-5'-triphosphat, 8-Azidoadenosin-5'-triphosphat, Benzimidazolribosid-5'-triphosphat, N1-Methyladenosin-5'-triphosphat, N1-Methylguanosin-5'-triphosphat, N6-Methyladenosin-5'-triphosphat, O6-Methylguanosin-5'-triphosphat, Pseudouridin-5'-triphosphat, oder Puromycin-5'-triphosphat, Xanthosin-5'-triphosphat. Besonders bevorzugt sind Nukleotide für Basenmodifikationen ausgewählt aus der Gruppe der basenmodifizierten Nukleotide, bestehend aus 5-Methylcytidin-5'-triphosphat, 7-Desazaguanosin-5'-triphosphat, 5-Bromcytidin-5'-triphosphat und Pseudouridin-5'-triphosphat, Pyridin-4-on-Ribonukleosid, 5-Azauridin, 2-Thio-5-azauridin, 2-Thiouridin, 4-Thiopseudouridin, 2-Thiopseudouridin, 5-Hydroxyuridin, 3-Methyluridin, 5-Carboxymethyluridin, 1-Carboxymethylpseudouridin, 5-Propinyluridin, 1-Propinylpseudouridin, 5-Taurinomethyluridin, 1-Taurinomethylpseudouridin, 5-Taurinomethyl-2-thiouridin, 1-Taurinomethyl-4-thiouridin, 5-Methyluridin, 1-Methylpseudouridin, 4-Thio-1-methylpseudouridin, 2-Thio-1-methylpseudouridin, 1-Methyl-1-deazapseudouridin, 2-Thio-1-methyl-1-deaza-Pseudouridin Dihydrouridin, Dihydropseudouridin, 2-Thiodihydrouridin, 2-Thiodihydropseudouridin, 2-Methoxyuridin, 2-Methoxy-4-thiouridin, 4-Methoxypseudouridin und 4-Methoxy-2-thiopseudouridin, 5-Azacytidin, Pseudoisocytidin, 3-Methylcytidin, N4-Acetylcytidin, 5-Formylcytidin, N4-Methylcytidin, 5-Hydroxymethylcytidin, 1-Methylpseudoisocytidin, Pyrrolocytidin, Pyrrolopseudoisocytidin, 2-Thiocytidin, 2-Thio-5-methylcytidin, 4-Thiopseudoisocytidin, 4-Thio-1-methylpseudoisocytidin, 4-Thio-1-methyl-1-deaza-Pseudoisocytidin, 1-Methyl-1-deaza-Pseudoisocytidin, Zebularin, 5-Aza-Zebularin, 5-Methyl-Zebularin, 5-Aza-2-thio-Zebularin, 2-Thio-Zebularin, 2-Methoxycytidin, 2-Methoxy-5-methylcytidin, 4-Methoxypseudoisocytidin und 4-Methoxy-1-methylpseudoisocytidin, 2-Aminopurin, 2,6-Diaminopurin, 7-Deazaadenin, 7-Deaza-8-azaadenin, 7-Deaza-2-aminopurin, 7-Deaza-8-aza-2-Aminopurin, 7-Deaza-2,6-diaminopurin, 7-Deaza-8-aza-2,6-diaminopurin, 1-Methyladenosin, N6-Methyladenosin, N6-Isopentenyladenosin, N6-(cis-Hydroxyisopentenyl)adenosin, 2-Methylthio-N6-(cis-Hydroxyisopentenyl)adenosin, N6-Glycinylcarbamoyladenosin, N6-Threonylcarbamoyla-

denosin, 2-Methylthio-N6-threonylcarbamoyladenosin, N6,N6-Dimethyladenosin, 7-Methyladenin, 2-Methylthioadenin und 2-Methoxyadenin, Inosin, 1-Methylinosin, Wyosin, Wybutosin, 7-Deazaguanosin, 7-Deaza-8-azaguanosin, 6-Thioguanosin, 6-Thio-7-deazaguanosin, 6-Thio-7-deaza-8-azaguanosin, 7-Methylguanosin, 6-Thio-7-methyl-guanosin, 7-Methylinosin, 6-Methoxyguanosin, 1-Methylguanosin, N2-Methylguanosin, N2,N2-Dimethylguanosin, 8-Oxoguanosin, 7-Methyl-8-oxoguanosin, 1-Methyl-6-thioguanosin, N2-Methyl-6-thioguanosin und N2,N2-Dimethyl-6-thioguanosin, 5'-O-(1-Thiophosphat)adenosin, 5'-O-(1-Thiophosphat)cytidin, 5'-O-(1-Thiophosphat)guanosin, 5'-O-(1-Thiophosphat)uridin, 5'-O-(1-Thiophosphat)pseudouridin, 6-Azacytidin, 2-Thiocytidin, alpha-Thiocytidin, Pseudoisocytidin, 5-Aminoallyluridin, 5-Ioduridin, N1-Methylpseudouridin, 5,6-Dihydrouridin, alpha-Thiouridin, 4-Thiouridin, 6-Azauridin, 5-Hydroxyuridin, Desoxythymidin, 5-Methyluridin, Pyrrolocytidin, Inosin, alpha-Thioguanosin, 6-Methylguanosin, 5-Methylcytidin, 8-Oxoguanosin, 7-Deazaguanosin, N1-Methyladenosin, 2-Amino-6-chlorpurin, N6-Methyl-2-aminopurin, Pseudoisocytidin, 6-Chlorpurin, N6-Methyladenosin, alpha-Thioadenosin, 8-Azidoadenosin, 7-Deazaadenosin.

[0325] In einigen Ausführungsformen ist das mindestens eine modifizierte Nukleotid ausgewählt aus Pseudouridin, N1-Methylpseudouridin, N1-Ethylpseudouridin, 2-Thiouridin, 4'-Thiouridin, 5-Methylcytosin, 5-Methyluridin, 2-Thio-1-methyl-1-deazapseudouridin, 2-Thio-1-methylpseudouridin, 2-Thio-5-azauridin, 2-Thiodihydropseudouridin, 2-Thiodihydrouridin, 2-Thiopseudouridin, 4-Methoxy-2-thiopseudouridin, 4-Methoxypseudouridin, 4-Thio-1-methylpseudouridin, 4-Thiopseudouridin, 5-Azauridin, Dihydropseudouridin, 5-Methoxyuridin und 2'-O-Methyluridin.

[0326] In einigen Ausführungsformen weisen 100% des Uracils in der kodierenden Sequenz, wie hierin definiert, eine chemische Modifikation auf, vorzugsweise befindet sich eine chemische Modifikation in der 5-Position des Uracils.

[0327] Besonders bevorzugt im Kontext der Erfindung sind Pseudouridin (ψ), N1-Methylpseudouridin (m1ψ), 5-Methylcytosin und 5-Methoxyuridin.

[0328] In einigen Ausführungsformen enthält ein Polynukleotidmolekül der Ausführungsformen jedoch keine mit N1-Methylpseudouridin (m1Ψ) substituierten Positionen. In weiteren Aspekten enthält ein Polynukleotidmolekül der Ausführungsformen keine mit Pseudouridin (ψ), N1-Methylpseudouridin (m1ψ), 5-Methylcytosin und 5-Methoxyuridin substituierte Position. In noch weiteren Aspekten umfasst ein Polynukleotidmolekül der Ausführungsformen eine kodierende Sequenz, die nur aus den Nukleotiden G, C, A und U besteht.

[0329] Der Einbau von modifizierten Nukleotiden, wie beispielsweise Pseudouridin (ψ), N1-Methylpseudouridin (m1ψ), 5-Methylcytosin und/oder 5-Methoxyuridin in die kodierende Sequenz der mRNA kann vorteilhaft sein, da unerwünschte angeborene Immunantworten (nach Verabreichung der kodierenden mRNA oder der Vakzine) eingestellt oder reduziert werden können (falls erforderlich).

[0330] In einigen Ausführungsformen umfasst die mRNA mindestens eine kodierende Sequenz, die für ein SARS-CoV-2-Antigenprotein, wie hierin definiert, kodiert, wobei die kodierende Sequenz mindestens ein modifiziertes Nukleotid, ausgewählt aus Pseudouridin (ψ) und N1-Methylpseudouridin (m1ψ), umfasst, wobei vorzugsweise alle Uracil-Nukleotide durch Pseudouridin (ψ)-Nukleotide und/oder N1-Methylpseudouridin (m1ψ)-Nukleotide ersetzt sind.

[0331] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA keine mit N1-Methylpseudouridin (m1Ψ) substituierten Positionen. In weiteren Ausführungsformen umfasst die RNA keine mit Pseudouridin (ψ), N1-Methylpseudouridin (m1ψ), 5-Methylcytosin und 5-Methoxyuridin substituierte Position.

[0332] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA eine kodierende Sequenz, die nur aus G-, C-, A- und U-Nukleotiden besteht und somit keine modifizierten Nukleotide (außer dem Cap-Analogon) umfasst.

[0333] Nukleinsäuren, vorzugsweise mRNA-Konstrukte, die für eine Coronavirus-Vakzine geeignet sind: In verschiedenen Ausführungsformen umfasst die mRNA, vorzugsweise in 5'-3'-Richtung, die folgenden Elemente:

A) 5'-Cap-Struktur, vorzugsweise wie hier spezifiziert;

B) 5'-terminales Startelement, vorzugsweise wie hierin spezifiziert;

C) optional eine 5'-UTR, vorzugsweise wie hierin spezifiziert;

D) eine Ribosomen-Bindungsstelle, vorzugsweise wie hierin spezifiziert;

E) mindestens eine kodierende Sequenz, vorzugsweise wie hierin spezifiziert;

F) 3'-UTR, vorzugsweise wie hierin spezifiziert;

G) optional eine Poly(A)-Sequenz, vorzugsweise wie hierin spezifiziert;

H) optional eine Poly(C)-Sequenz, vorzugsweise wie hierin spezifiziert;

I) optional einen Histon-Stem-Loop, vorzugsweise wie hierin spezifiziert;

J) optional, 3'-terminales Sequenzelement, vorzugsweise wie hierin spezifiziert.

[0334] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA die folgenden Elemente, vorzugsweise in 5'-3'-Richtung:

A) 5'-Cap-Struktur, ausgewählt aus m7G(5'), m7G(5')ppp(5')(2'OMeA) oder m7G(5')ppp(5')(2'OMeG);

B) 5'-terminales Startelement, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 176 oder 177, oder Fragmente oder Varianten davon;

C) optional eine 5'-UTR, abgeleitet von einem HSD17B4-Gen;

D) eine Ribosomen-Bindungsstelle, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 180, 181, 22845-22847, oder Fragmente oder Varianten davon;

E) mindestens eine kodierende Sequenz, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 22765, 23096, 23114, 23132, 23150, 23168, 23092, 23110, 23128, 23146, 23164, 23182, 22785, 23106, 23124, 23142, 23160, 23178, 23089, 23092, 23107, 23125, 23143, 23161, 23179, 23091, 23109, 23127, 23145, 23163, 23181, 23093, 23111, 23129, 23147, 23165, 23183, 23094, 23112, 23130, 23148, 23166 und 23184, oder Fragmente oder Varianten davon;

F) 3'-UTR, abgeleitet von einer 3'-UTR eines PSMB3-Gens oder eines alpha-Globin-Gens („muag“);

G) optional eine Poly(A)-Sequenz, umfassend etwa 30 bis etwa 500 Adenosine;

H) optional eine Poly(C)-Sequenz, umfassend etwa 10 bis etwa 100 Cytosine

I) optional einen Histon-Stem-Loop, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 178 oder 179;

J) optional, 3'-terminales Sequenzelement, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 182-230.

[0335] In besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA die folgenden Elemente in 5'-3'-Richtung:

A) Cap1-Struktur wie hierin definiert;

B) kodierende Sequenz, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 22765, 23096, 23114, 23132, 23150, 23168, 23092, 23110, 23128, 23146, 23164, 23182, 22785, 23106, 23124, 23142, 23160, 23178, 23089, 23092, 23107, 23125, 23143, 23161, 23179, 23091, 23109, 23127, 23145, 23163, 23181, 23093, 23111, 23129, 23147, 23165, 23183, 23094, 23112, 23130, 23148, 23166 und 23184, oder Fragmente oder Varianten davon;

C) 3'-UTR, abgeleitet von einer 3'-UTR eines muag-Gens, wie hierin definiert, vorzugsweise gemäß SEQ ID NO: 267 oder 268, 22896-22901, 22906-22911;

D) Poly(A)-Sequenz, umfassend etwa 64 A-Nukleotide.

E) Poly(C)-Sequenz, umfassend etwa 10 bis etwa 100 Cytosine;

F) Histon-Stem-Loop, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 178 oder 179.

[0336] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA die folgenden Elemente in 5'-3'-Richtung:

A) Cap1-Struktur, wie hierin definiert;

B) 5'-UTR, abgeleitet von einem HSD17B4-Gen, wie hierin definiert, vorzugsweise gemäß SEQ ID NO: 231 oder 232;

C) kodierende Sequenz, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 22765, 23096, 23114, 23132, 23150, 23168, 23092, 23110, 23128, 23146, 23164, 23182, 22785, 23106, 23124, 23142, 23160, 23178, 23089, 23092, 23107, 23125, 23143, 23161, 23179, 23091, 23109, 23127, 23145, 23163, 23181, 23093,

23111, 23129, 23147, 23165, 23183, 23094, 23112, 23130, 23148, 23166 und 23184, oder Fragmente oder Varianten davon;

D) 3'-UTR, abgeleitet von einer 3'-UTR eines PSMB3-Gens, wie hierin definiert, vorzugsweise gemäß SEQ ID NO: 253 oder 254;

E) Poly(A)-Sequenz, umfassend etwa 64 A-Nukleotide.

F) optional eine Poly(C)-Sequenz, umfassend etwa 10 bis etwa 100 Cytosine;

G) Histon-Stem-Loop, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 178 oder 179;

H) optional, 3'-terminales Sequenzelement SEQ ID NOs: 182-230.

[0337] In besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA die folgenden Elemente in 5'-3'-Richtung:

A) Cap1-Struktur, wie hierin definiert;

B) 5'-UTR, abgeleitet von einem HSD17B4-Gen, wie hierin definiert, vorzugsweise gemäß SEQ ID NO: 231 oder 232;

C) kodierende Sequenz, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 22765, 23096, 23114, 23132, 23150, 23168, 23092, 23110, 23128, 23146, 23164, 23182, 22785, 23106, 23124, 23142, 23160, 23178, 23089, 23092, 23107, 23125, 23143, 23161, 23179, 23091, 23109, 23127, 23145, 23163, 23181, 23093, 23111, 23129, 23147, 23165, 23183, 23094, 23112, 23130, 23148, 23166 und 23184, oder Fragmente oder Varianten davon;

D) 3'-UTR, abgeleitet von einer 3'-UTR eines PSMB3-Gens, wie hier definiert, vorzugsweise gemäß SEQ ID NO: 253 oder 254;

E) einen Histon-Stem-Loop, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 178 oder 179;

F) Poly(A)-Sequenz, die etwa 100 A-Nukleotide umfasst und vorzugsweise den 3'-Terminus darstellt.

[0338] In weiteren bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA die folgenden Elemente in 5'-3'-Richtung:

A) Cap1-Struktur wie, hierin definiert;

B) 5'-UTR, abgeleitet von einem HSD17B4-Gen, wie hierin definiert, vorzugsweise gemäß SEQ ID NO: 231 oder 232;

C) kodierende Sequenz, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 22765, 23096, 23114, 23132, 23150, 23168, 23092, 23110, 23128, 23146, 23164, 23182, 22785, 23106, 23124, 23142, 23160, 23178, 23089, 23092, 23107, 23125, 23143, 23161, 23179, 23091, 23109, 23127, 23145, 23163, 23181, 23093, 23111, 23129, 23147, 23165, 23183, 23094, 23112, 23130, 23148, 23166 und 23184, oder Fragmente oder Varianten davon;

D) 3'-UTR, abgeleitet von einer 3'-UTR eines PSMB3-Gens, wie hier definiert, vorzugsweise gemäß SEQ ID NO: 253 oder 254;

E) Poly(A)-Sequenz, die etwa 100 A-Nukleotide umfasst und vorzugsweise den 3'-Terminus darstellt.

[0339] In weiteren bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA die folgenden Elemente in 5'-3'-Richtung:

A) Cap1-Struktur, wie hierin definiert;

B) 5'-UTR, abgeleitet von einem SLC7A3-Gen, wie hierin definiert, vorzugsweise gemäß SEQ ID NO: 245 oder 246;

C) kodierende Sequenz, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 22765, 23096, 23114, 23132, 23150, 23168, 23092, 23110, 23128, 23146, 23164, 23182, 22785, 23106, 23124, 23142, 23160, 23178, 23089, 23092, 23107, 23125, 23143, 23161, 23179, 23091, 23109, 23127, 23145, 23163, 23181, 23093, 23111, 23129, 23147, 23165, 23183, 23094, 23112, 23130, 23148, 23166 und 23184, oder Fragmente oder Varianten davon;

D) 3'-UTR, abgeleitet von einer 3'-UTR eines PSMB3-Gens, wie hier definiert, vorzugsweise gemäß SEQ ID NO: 253 oder 254;

E) optional einen Histon-Stem-Loop, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 178 oder 179;

F) Poly(A)-Sequenz, die etwa 100 A-Nukleotide umfasst und vorzugsweise den 3'-Terminus darstellt.

[0340] In weiteren bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA die folgenden Elemente in 5'-3'-Richtung:

A) Cap1-Struktur, wie hierin definiert;

B) 5'-UTR, abgeleitet von einem RPL31-Gen, wie hierin definiert, vorzugsweise gemäß SEQ ID NO: 243 oder 243;

C) kodierende Sequenz, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 22765, 23096, 23114, 23132, 23150, 23168, 23092, 23110, 23128, 23146, 23164, 23182, 22785, 23106, 23124, 23142, 23160, 23178, 23089, 23092, 23107, 23125, 23143, 23161, 23179, 23091, 23109, 23127, 23145, 23163, 23181, 23093, 23111, 23129, 23147, 23165, 23183, 23094, 23112, 23130, 23148, 23166 und 23184, oder Fragmente oder Varianten davon;

D) 3'-UTR, abgeleitet von einer 3'-UTR eines RPS9-Gens, wie hierin definiert, vorzugsweise gemäß SEQ ID NO: 263 oder 264;

E) optional einen Histon-Stem-Loop, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 178 oder 179;

F) Poly(A)-Sequenz, die etwa 100 A-Nukleotide umfasst und vorzugsweise den 3'-Terminus darstellt.

[0341] Nukleinsäuresequenzen, vorzugsweise mRNA-Sequenzen sind in Tabelle 3a dargestellt. Darin stellt jede Zeile ein spezifisches geeignetes SARS-CoV-2 (nCoV-2019)-Konstrukt der Erfindung dar (vgl. Tabelle 1), wobei die Beschreibung des SARS-CoV-2-Konstrukts in Spalte A der Tabelle 3a angegeben ist und die SEQ ID NOs der Aminosäuresequenz des jeweiligen SARS-CoV-2-Konstrukts in Spalte B angegeben sind. Die entsprechenden SEQ ID NOs der kodierenden Sequenzen, die die jeweiligen SARS-CoV-2-Konstrukte kodieren, sind in Tabelle 1 angegeben. Weitere Informationen sind unter der Kennziffer <223> der jeweiligen SEQ ID NOs im Sequenzprotokoll angegeben.

[0342] Die entsprechenden Nukleinsäuresequenzen, insbesondere mRNA-Sequenzen, die bevorzugt kodierende Sequenzen umfassen, sind in den Spalten C und D angegeben, wobei in Spalte C Nukleinsäuresequenzen mit einer UTR-Kombination „HSD17B4/PSMB3“, wie hierin definiert, aufgeführt sind, und in Spalte D Nukleinsäuresequenzen mit einer „alpha-Globin“-3'-UTR, wie hierin definiert, aufgeführt sind.

Tabelle 3a: Nukleinsäure-Konstrukte, vorzugsweise mRNA-Konstrukte, die für eine Coronavirus-Vakzine geeignet sind

Zeile	**A**	**B**	**C**	**D**
1	Volllängen-Spike-Protein; S	1-9, 274-340, 22737, 22739, 22741, 22743, 22745, 22747, 22749, 22751, 22753, 22755, 22757, 22929-22946	148, 155, 12204-12337, 12473-12540, 22791, 22793, 22795, 22797, 22799, 22801, 22803, 22805, 22807, 22809, 22811, 23409-23516	162, 169, 12676-12809, 12945-13012, 22818, 22820, 22822, 22824, 22826, 22828, 22830, 22832, 22834, 22836, 22838, 23189-23296

Zeile	A	B	C	D
2	Stabilisiertes Spike-Protein; S_stab_PP	10-18, 341-407, 22738, 22740, 22742, 22744, 22746, 22748, 22750, 22752, 22754, 22756, 22758, 22947-22964	149-151, 156-158, 12338, 12541, 22792, 22794, 22796, 22798, 22800, 22802, 22804, 22806, 22808, 22810, 22812, 23517-23624	163-165, 170-172, 12810, 13013, 22819, 22821 , 22823, 22825, 22827, 22829, 22831, 22833, 22835, 22837, 22839, 23297-23404
3	Stabilisiertes Spike-Protein; S_stab_PP_cav	408-541	12339, 12340, 12542, 12543	12811, 12812, 13014, 13015
4	Stabilisiertes Spike-Protein; S_stab_PP_prot	542-608	12341,12544	12813, 13016
5	Stabilisiertes Spike-Protein; S_stab_disul	19-26, 609-1278, 13521-13587	12342-12351, 12545-12554, 14142, 14151	12814-12823, 13017-13026, 14160, 14169
6	Spike-Protein-Fragment S1	27, 1279-1345	152-154, 159-161, 12352, 12555	166-168, 173-175, 12824, 13027
7	S_woTM umfassend eine Lumazin-Synthase	58-66, 3624-3690	12353, 12556	12825, 13028
8	S_stab_PP_woTM umfassend eine Lumazin-Synthase	85-93, 3691-3757	12354, 12557	12826, 13029
9	S_stab_PP_cav_woTM umfassend eine Lumazin-Synthase	3758-3891	12355, 12356, 12558, 12559	12827, 12828, 13030, 13031
10	S_stab_PP_proCwoTM umfassend eine Lumazin-Synthase	3892-3958	12357, 12560	12829, 13032
11	S_stab_disul_woTM umfassend eine Lumazin-Synthase	3959-4628, 13588-13654	12358-12367, 12561-12570, 14143, 14152	12830-12839, 13033-13042, 14161, 14170
12	S_woTM umfassend ein Ferritin	67-75, 4629-4695	12368, 12571	12840, 13043
13	S_stab_PP_woTM umfassend ein Ferriti n	94-102, 4696-4762	12369, 12572	12841, 13044
14	S_stab_PP_cav_woTM umfassend ein Ferritin	4763-4896	12370, 12371, 12573, 12574	12842, 12843, 13045, 13046
15	S_stab_PP_proCwoTM umfassend ein Ferritin	4897-4963	12372, 12575	12844, 13047
16	S_stab_disul_woTM umfassend ein Ferriti n	4964-5633, 13655-13721	12373-12382, 12576-12585, 14144, 14153	12845-12854, 13048-13057, 14162, 14171

Zeile	A	B	C	D
17	S_woTM umfassend ein Foldon	76-84, 5634-5700	12383, 12586	12855, 13058
18	S_stab_PP_woTM umfassend ein Foldon	103-111, 5701-5767	12384, 12587	12856, 13059
19	S_stab_PP_cav_woTM umfassend ein Foldon	5768-5901	12385, 12386, 12588, 12589	12857, 12858, 13060, 13061
20	S_stab_PP_proCwoTM umfassend ein Foldon	5902-5968	12387, 12590	12859, 13062
21	S_stab_disul_woTM umfassend ein Foldon	5969-6638, 13722-13788	12388-12397, 12591-12600, 14145, 14154	12860-12869, 13063-13072, 14163, 14172
22	S_woTM umfassend ein WhcAg (VLP)	6639-6705	12398, 12601	12870, 13073
23	S_stab_PP_woTM umfassend ein WhcAg (VLP)	6706-6772	12399, 12602	12871, 13074
24	S_stab_PP_cav_woTM umfassend ein WhcAg (VLP)	6773-6906	12400, 12401, 12603, 12604	12872, 12873, 13075, 13076
25	S_stab_PP_proCwoTM umfassend ein WhcAg (VLP)	6907-6973	12402, 12605	12874, 13077
26	S_stab_disul_woTM umfassend ein WhcAg (VLP)	6974-7643, 13789-13855	12403-12412, 12606-12615, 14146, 14155	12875-12884, 13078-13087, 14164, 14173
27	S_woTMflex umfassend eine Lumazin-Synthase	7644-7710	12413, 12616	12885, 13088
28	S_stab_PP woTMflex umfassend eine Lumazin-Synthase	7711-7777	12414, 12617	12886, 13089
29	S_stab_PP_cav_woTMflex umfassend eine Lumazin-Synthase	7778-7911	12415, 12416, 12618, 12619	12887, 12888, 13090, 13091
30	S_stab_PP_proCwoTMflex umfassend eine Lumazin-Synthase	7912-7978	12417, 12620	12889, 13092
31	S_stab_disul_woTMflex umfassend eine Lumazin-Synthase	7979-8648, 13856-13922	12418-12427, 12621-12630, 14147, 14156	12890-12899, 13093-13102, 14165, 14174
32	S_woTMflex umfassend ein Ferritin	8649-8715	12428, 12631	12900, 13103
33	S_stab_PP woTMflex umfassend ein Ferritin	8716-8782	12429, 12632	12901, 13104
34	S_stab_PP_cav_woTMflex umfassend ein Ferritin	8783-8916	12430, 12431, 12633, 12634	12902, 12903, 13105,13106
35	S_stab_PP_proCwoTMflex umfassend ein Ferritin	8917-8983	12432, 12635	12904,13107
36	S_stab_disul_woTMflex umfassend ein Ferritin	8984-9653, 13923-13989	12433-12442, 12636-12645, 14148, 14157	12905-12914, 13108-13117, 14166, 14175
37	S_woTMflex umfassend ein Foldon	9654-9720	12443, 12646	12915, 13118
38	S_stab_PP woTMflex umfassend ein Foldon	9721-9787	12444, 12647	12916, 13119

Zeile	A	B	C	D
39	S_stab_PP_cav_woTMflex umfassend ein Foldon	9788-9921	12445, 12446, 12648, 12649	12917, 12918, 13120, 13121
40	S_stab_PP_prot_woTMflex umfassend ein Foldon	9922-9988	12447, 12650	12919, 13122
41	S_stab_disul_woTMflex umfassend ein Foldon	9989-10658, 13990-14056	12448-12457, 12651-12660, 14149, 14158	12920-12929, 13123-13132, 14167, 14176
42	S_woTMflex umfassend ein WhcAg (VLP)	10659-10725	12458, 12661	12930, 13133
43	S_stab_PP woTMflex umfassend ein WhcAg (VLP)	10726-10792	12459, 12662	12931, 13134
44	S_stab_PP_cav_woTMflex umfassend ein WhcAg (VLP)	10793-10926	12460, 12461, 12663, 12664	12932, 12933, 13135, 13136
45	S_stab_PP_proCwoTMflex umfassend ein WhcAg (VLP)	10927-10993	12462, 12665	12934, 13137
46	S_stab_disul_woTMflex umfassend ein WhcAg (VLP)	10994-11663, 14057-4123	12463-12472, 12666-12675, 14150, 14159	12935-12944, 13138-13147, 14168, 14177
47	Stabilisiertes Spike-Protein; S_stab_PP_hex	22732	22786	22813
48	RBD umfassend eine Lumazin-synthase	22735, 22736	22789, 22790	22816, 22817
49	RBD umfassend ein Ferritin	22733	22787	22814
50	RBD umfassend ein Foldon	22734	22788	22815

[0343] Weitere Nukleinsäuresequenzen, vorzugsweise mRNA-Sequenzen, sind in Tabelle 3b aufgeführt. Darin ist in jeder Spalte ein spezifisches geeignetes SARS-CoV-2 (nCoV-2019)-Konstrukt der Erfindung angegeben (vgl. Tabelle 1 und Tabelle 3a), wobei Spalte B „Volllängen-Spike-Protein; S“, Zeile 1 der Tabelle 1 und Tabelle 3a und Spalte C „Stabilisiertes Spike-Protein; S_stab_PP“, vgl. Zeile 2 der Tabelle 1 und Tabelle 3a, darstellt.

[0344] Die SEQ ID NOs der Aminosäuresequenz des jeweiligen SARS-CoV-2-Konstrukts sind in Zeile 1 angegeben. Die entsprechenden SEQ ID NOs der kodierenden Sequenzen, die für die jeweiligen SARS-CoV-2-Konstrukte kodieren, sind in Tabelle 1 angegeben. Weitere Informationen sind unter der Kennziffer <223> der jeweiligen SEQ ID NOs im Sequenzprotokoll angegeben.

[0345] Die entsprechenden Nukleinsäuresequenzen, insbesondere mRNA-Sequenzen, die bevorzugt kodierende Sequenzen umfassen, sind in den Zeilen 2-16 angegeben, wobei in jeder Zeile Nukleinsäuresequenzen mit UTR-Kombinationen und geeigneten 3'-Enden angegeben sind.

Tabelle 3b: Nukleinsäure-Konstrukte, vorzugsweise mRNA-Konstrukte, die für eine Coronavirus-Vakzine geeignet sind

Zeile	A	B	C
1	Protein	1-9, 274-340, 22737, 22739, 22741, 22743, 22745, 22747, 22749, 22751, 22753, 22755, 22757, 22929-22946	10-18, 341-407, 22738, 22740, 22742, 22744, 22746, 22748, 22750, 22752, 22754, 22756, 22758, 22947-22964

Zeile	A	B	C
2	RNA i-3 (A64-N5-C30-hSL-N5)	162, 169, 12676-12809, 12945-13012, 22818, 22820, 22822, 22824, 22826, 22828, 22830, 22832, 22834, 22836, 22838, 23189-23296	163-165, 170-172, 12810, 13013, 22819, 22821, 22823, 22825, 22827, 22829, 22831, 22833, 22835, 22837, 22839, 23297-23404
3	RNA a-1 (hSL-A1 00)	148, 155,12204-12337, 12473-12540, 22791, 22793, 22795, 22797, 22799, 22801, 22803, 22805, 22807, 22809, 22811, 23409-23516	149-151, 156-158, 12338, 12541, 22792, 22794, 22796, 22798, 22800, 22802, 22804, 22806, 22808, 22810, 22812, 23517-23624
4	RNA a-3 (hSL-A1 00)	23629-23736	23737-23844
5	RNA e-2 (hSL-A1 00)	23849-23956	23957-24064
6	RNA i-3 (hSL-A100)	24069-24176, 24289-24396, 24509-24616	24177-24284, 24397-24504, 24617-24724
7	RNA a-1 (A100)	24729-24836	24837-24944
8	RNA a-3 (A100)	24949-25056	25057-25164
9	RNA e-2 (A100)	25169-25276	25277-25384
10	RNA i-3 (A100)	25389-25496, 25609-25716, 25829-25936	25497-25604, 25717-25824, 25937-26044
13	RNA x-1 (A100)	26049-26156	26157-26264
14	RNA x-2 (A100)	26269-26376	26377-26484
15	RNA x-1 (A100-N5)	26489-26596	26597-26704
16	RNA x-2 (A30-N10-A70)	26709-26816	26817-26924

[0346] Die mRNA kann eine Nukleinsäuresequenz umfassen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 148-175, 12204-13147, 14142-14177, 22786-22839, 23189-23404, 23409-23624, 23629-23844, 23849-24064, 24069-24284, 24289-24504, 24509-24724, 24729-24944, 24949-25164, 25169-25384, 25389-25604, 25609-25824, 25829-26044, 26049-26264, 26269-26484, 26489-26704, 26709-26937, ist, oder ein Fragment oder eine Variante irgendeiner dieser Sequenzen oder besteht daraus. Weitere Informationen zu den jeweiligen Nukleinsäuresequenzen sind unter der Kennziffer <223> der jeweiligen SEQ ID NO im Sequenzprotokoll sowie in Tabelle 3a (siehe insbesondere Spalte C und D) und Tabelle 3b (siehe insbesondere Zeilen 2-16) angegeben. Erfindungsgemäß sind insbesondere die Nukleinsäuresequenzen, die zu mindestens 70% identisch sind mit SEQ ID NOs: 22792, 23518, 23536, 23554, 23572, 23590, 23608, 23532, 23550, 23568, 23586, 23604, 23622, 22812, 23528, 23546, 23564, 23582, 23600, 23618, 23529, 23547, 23565, 23583, 23601, 23619, 23531, 23549, 23567, 23585, 23603, 23621, 23533, 23551, 23569, 23587, 23605, 23623, 23534, 23552, 23570, 23588, 23606 und 23624.

[0347] Die mRNA kann eine Nukleinsäuresequenz umfassen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 162-175, 12676-13147, 14160-14177, 22786-22839, 23189-23404 ist, oder ein Fragment oder eine Variante irgendeiner dieser Sequenzen oder besteht daraus. Weitere Informationen zu den jeweiligen Nukleinsäuresequenzen sind unter der Kennziffer <223> der jeweiligen SEQ ID NO im Sequenzprotokoll, sowie in Tabelle 3a (siehe insbesondere Spalte D), Tabelle 3b (Zeile 2) angegeben.

[0348] Die mRNA kann eine Nukleinsäuresequenz umfassen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 148-161, 12204-12675, 14142-14159, 22786-22812, 23409-23624, 24729-24944 ist, oder ein Fragment oder eine Variante irgendeiner dieser Sequenzen oder besteht daraus. Weitere Informationen zu den jeweiligen Nukleinsäuresequenzen sind unter der Kennziffer <223> der jeweiligen SEQ ID NO im Sequenzprotokoll, sowie in Tabelle 3a (siehe insbesondere Spalte C) und Tabelle 3b (siehe Zeilen 3, 7) angegeben. Erfindungsgemäß sind insbesondere die Nukleinsäuresequenzen, die zu mindestens 70% identisch sind mit SEQ ID NOs: 22792, 23518, 23536, 23554, 23572, 23590, 23608, 23532, 23550, 23568, 23586, 23604, 23622, 22812, 23528, 23546, 23564, 23582, 23600, 23618, 23529, 23547, 23565, 23583, 23601, 23619, 23531, 23549, 23567, 23585, 23603, 23621, 23533, 23551, 23569, 23587, 23605, 23623, 23534, 23552, 23570, 23588, 23606 und 23624.

[0349] Die mRNA kann eine Nukleinsäuresequenz umfassen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 149-154, 156-161, 163-168, 170-175, 12338, 12352, 12541, 12555, 12810, 12824, 13013, 13027, 22786, 22792, 22794, 22796, 22798, 22800, 22802, 22804, 22806, 22808, 22810, 22812, 22813, 22819, 22821, 22823, 22825, 22827, 22829, 22831, 22833, 22835, 22837, 22839, 23517-23624, 23297-23404, 24837-24944 ist, oder ein Fragment oder eine Variante irgendeiner dieser Sequenzen oder besteht daraus.Weitere Informationen zu den jeweiligen Nukleinsäuresequenzen sind unter der Kennziffer <223> der jeweiligen SEQ ID NO im Sequenzprotokoll und in Tabelle 3a (siehe Spalte C und D, Zeilen 2 und 6) und Tabelle 3b (siehe Spalte C) angegeben. Erfindungsgemäß sind insbesondere die Nukleinsäuresequenzen, die zu mindestens 70% identisch sind mit SEQ ID NOs: 22792, 23518, 23536, 23554, 23572, 23590, 23608, 23532, 23550, 23568, 23586, 23604, 23622, 22812, 23528, 23546, 23564, 23582, 23600, 23618, 23529, 23547, 23565, 23583, 23601, 23619, 23531, 23549, 23567, 23585, 23603, 23621, 23533, 23551, 23569, 23587, 23605, 23623, 23534, 23552, 23570, 23588, 23606 und 23624.

[0350] Die mRNAkann eine Nukleinsäuresequenz umfassen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 149, 156, 12338, 150, 157, 151, 158, 12541, 163, 170, 12810, 164, 171, 165, 172, 13013, 12342-12351, 12545-12554, 12814-12823, 13017-13026, 14133 ist, oder ein Fragment oder eine Variante irgendeiner dieser Sequenzen oder besteht daraus. Weitere Informationen zu den jeweiligen Nukleinsäuresequenzen sind unter der Kennziffer <223> der jeweiligen SEQ ID NO im Sequenzprotokoll und in Tabelle 3a und 3b angegeben.

[0351] Die mRNA kann eine Nukleinsäuresequenz umfassen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 149, 150, 151, 163, 164, 165, oder ein Fragment oder eine Variante irgendeiner dieser Sequenzen oder besteht daraus. Weitere Informationen zu den jeweiligen Nukleinsäuresequenzen sind unter der Kennziffer <223> der jeweiligen SEQ ID NO im Sequenzprotokoll und in Tabelle 3 (siehe Spalte C und D, Zeile 2) angegeben.

[0352] Die mRNA kann eine Nukleinsäuresequenz umfassen oder besteht aus einer Nukleinsäuresequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz der SEQ ID NO: 163 ist.

[0353] Die mRNA kann eine Nukleinsäuresequenz umfassen oder besteht aus einer Nukleinsäuresequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz der SEQ ID NO: 149 ist.

[0354] Die mRNA kann eine Nukleinsäuresequenz umfassen oder besteht aus einer Nukleinsäuresequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz der SEQ ID NO: 24837 ist.

[0355] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst die Nukleinsäure, vorzugsweise die RNA, eine Nukleinsäuresequenz oder besteht aus einer Nukleinsäuresequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz der SEQ ID NO: 23311, 23531, 24851 ist. Erfindungsgemäß sind insbesondere die Nukleinsäuresequenzen, die zu mindestens 70% identisch sind mit SEQ ID NO: 23531.

[0356] Die mRNA kann eine Nukleinsäuresequenz umfassen oder besteht aus einer Nukleinsäuresequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz der SEQ ID NO: 23310, 23530, 24850 ist.

[0357] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst die Nukleinsäure, vorzugsweise die RNA, eine Nukleinsäuresequenz oder besteht aus einer Nukleinsäuresequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz der SEQ ID NO: 23313, 23533, 24853, 23314, 23534, 24854 ist. Erfindungsgemäß sind insbesondere die Nukleinsäuresequenzen, die zu mindestens 70% identisch sind mit SEQ ID NO: 23533.

[0358] Die mRNA kann eine Nukleinsäuresequenz umfassen oder besteht aus einer Nukleinsäuresequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz der SEQ ID NO: 26633 ist.

[0359] Die mRNA kann eine Nukleinsäuresequenz umfassen oder besteht aus einer Nukleinsäuresequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz der SEQ ID NO: 26907 ist.

[0360] Die mRNA kann eine Nukleinsäuresequenz umfassen oder kann aus einer Nukleinsäuresequenz bestehen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 148-175, 12204-13147, 14142-14177, 22786-22839, 23189-23404, 23409-23624, 23629-23844, 23849-24064, 24069-24284, 24289-24504, 24509-24724, 24729-24944, 24949-25164, 25169-25384, 25389-25604, 25609-25824, 25829-26044, 26049-26264, 26269-26484, 26489-26704, 26709-26937, ist, wobei die RNA-Sequenzen eine cap1-Struktur, wie hierin definiert, umfassen. Weitere Informationen zu den jeweiligen Nukleinsäuresequenzen sind unter der <223>-Kennung der jeweiligen SEQ ID NO im Sequenzprotokoll und in Tabelle 3a und 3b angegeben. Erfindungsgemäß sind insbesondere die Nukleinsäuresequenzen, die zu mindestens 70% identisch sind mit SEQ ID NOs: 22792, 23518, 23536, 23554, 23572, 23590, 23608, 23532, 23550, 23568, 23586, 23604, 23622, 22812, 23528, 23546, 23564, 23582, 23600, 23618, 23529, 23547, 23565, 23583, 23601, 23619, 23531, 23549, 23567, 23585, 23603, 23621, 23533, 23551, 23569, 23587, 23605, 23623, 23534, 23552, 23570, 23588, 23606 und 23624.

[0361] Die mRNA kann eine Nukleinsäuresequenz umfassen oder kann aus einer Nukleinsäuresequenz bestehen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 148-175, 12204-13147, 14142-14177, 22786-22839, 23189-23404, 23409-23624, 23629-23844, 23849-24064, 24069-24284, 24289-24504, 24509-24724, 24729-24944, 24949-25164, 25169-25384, 25389-25604, 25609-25824, 25829-26044, 26049-26264, 26269-26484, 26489-26704, 26709-26937, ist, wobei mindestens ein, vorzugsweise alle Uracil-Nukleotide in den RNA-Sequenzen durch Pseudouridin (ψ)-Nukleotide und/oder N1-Methylpseudouridin (m1ψ)-Nukleotide ersetzt sind. Weitere Informationen zu den jeweiligen Nukleinsäuresequenzen sind unter der <223>-Kennung der jeweiligen SEQ ID NO im Sequenzprotokoll und in den Tabellen 3a und 3b angegeben. Erfindungsgemäß sind insbesondere die Nukleinsäuresequenzen, die zu mindestens 70% identisch sind mit SEQ ID NOs: 22792, 23518, 23536, 23554, 23572, 23590, 23608, 23532, 23550, 23568, 23586, 23604, 23622, 22812, 23528, 23546, 23564, 23582, 23600, 23618, 23529, 23547, 23565, 23583, 23601, 23619, 23531, 23549, 23567, 23585, 23603, 23621, 23533, 23551, 23569, 23587, 23605, 23623, 23534, 23552, 23570, 23588, 23606 und 23624.

[0362] mRNA kann eine Nukleinsäuresequenz umfassen oder kann aus einer Nukleinsäuresequenz bestehen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 148-175, 12204-13147, 14142-14177, 22786-22839, 23189-23404, 23409-23624, 23629-23844, 23849-24064, 24069-24284, 24289-24504, 24509-24724, 24729-24944, 24949-25164, 25169-25384, 25389-25604, 25609-25824, 25829-26044, 26049-26264, 26269-26484, 26489-26704, 26709-26937, ist, wobei die RNA-Sequenzen eine cap1-Struktur, wie hierin definiert, umfassen, und wobei mindestens ein, vorzugsweise alle Uracil-Nukleotide in den RNA-Sequenzen durch Pseudouridin (ψ)-Nukleotide und/oder N1-Methylpseudouridin (m1ψ)-Nukleotide ersetzt sind. Weitere Informationen zu den jeweiligen

Nukleinsäuresequenzen sind unter der Kennziffer <223> der jeweiligen SEQ ID NO im Sequenzprotokoll und in den Tabellen 3a und 3b angegeben. Erfindungsgemäß sind insbesondere die Nukleinsäuresequenzen, die zu mindestens 70% identisch sind mit SEQ ID NOs: 22792, 23518, 23536, 23554, 23572, 23590, 23608, 23532, 23550, 23568, 23586, 23604, 23622, 22812, 23528, 23546, 23564, 23582, 23600, 23618, 23529, 23547, 23565, 23583, 23601, 23619, 23531, 23549, 23567, 23585, 23603, 23621, 23533, 23551, 23569, 23587, 23605, 23623, 23534, 23552, 23570, 23588, 23606 und 23624.

[0363] Wie in der gesamten Beschreibung dargelegt, können zusätzliche Informationen bezüglich geeigneter Aminosäuresequenzen oder Nukleinsäuresequenzen (kodierende Sequenzen, DNA-Sequenzen, RNA-Sequenzen) auch aus dem Sequenzprotokoll abgeleitet werden, insbesondere aus den dort unter der Kennziffer <223> gemachten Angaben, wie im Folgenden erläutert.

[0364] Die mRNA als Nukleinsäure kann mit jedem im Stand der Technik bekannten Verfahren hergestellt werden, einschließlich chemischer Synthese, wie z.B. Festphasen-RNA-Synthese, sowie In-vitro-Verfahren, wie z.B. RNA-in-vitro-Transkriptionsreaktionen. Dementsprechend wird in einer bevorzugten Ausführungsform die mRNA durch RNA-in-vitro-Transkription gewonnen.

[0365] Dementsprechend ist in bevorzugten Ausführungsformen die erfindungsgemäße Nukleinsäure vorzugsweise eine in vitro transkribierte mRNA.

[0366] Die Begriffe „RNA-in-vitro-Transkription“ oder „In-vitro-Transkription“ beziehen sich auf ein Verfahren, bei dem RNA in einem zellfreien System (in vitro) synthetisiert wird. Die RNA kann durch DNA-abhängige In-vitro-Transkription eines geeigneten DNA-Templates erhalten werden, das gemäß der vorliegenden Erfindung ein linearisiertes Plasmid-DNA-Template oder ein PCRamplifiziertes DNA-Template ist. Der Promotor zur Steuerung der RNA-in-vitro-Transkription kann ein beliebiger Promotor für irgendeine DNA-abhängige RNA-Polymerase sein. Besondere Beispiele für DNA-abhängige RNA-Polymerasen sind die T7-, T3-, SP6- oder Syn5-RNA-Polymerasen. In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird das DNA-Template mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert, bevor es der RNA-in-vitro-Transkription unterzogen wird.

[0367] Die bei der RNA-in-vitro-Transkription verwendeten Reagenzien umfassen typischerweise: ein DNA-Template (linearisierte Plasmid-DNA oder PCR-Produkt) mit einer Promotorsequenz, die eine hohe Bindungsaffinität für die jeweilige RNA-Polymerase aufweist, wie z.B. Bakteriophagenkodierte RNA-Polymerasen (T7, T3, SP6 oder Syn5); Ribonukleotidtriphosphate (NTPs) für die vier Basen (Adenin, Cytosin, Guanin und Uracil); optional ein Cap-Analogon, wie hierin definiert; optional weitere modifizierte Nukleotide, wie hierin definiert; eine DNA-abhängige RNA-Polymerase, die in der Lage ist, an die Promotorsequenz innerhalb des DNA-Templates zu binden (z.B. T7-, T3-, SP6- oder Syn5-RNA-Polymerase); optional einen Ribonuklease (RNase)-Inhibitor, um jegliche potentiell kontaminierende RNase zu inaktivieren; optional eine Pyrophosphatase, um Pyrophosphat abzubauen, das die RNA-in-vitro-Transkription hemmen kann; MgCl2, das Mg^{2+}-Ionen als Co-Faktor für die Polymerase liefert; einen Puffer (TRIS oder HEPES), um einen geeigneten pH-Wert aufrechtzuerhalten, der auch Antioxidantien (z.B. DTT) und/oder Polyamine, wie zum Beispiel Spermidin, in optimalen Konzentrationen enthalten kann, z.B. ein Puffersystem, das TRIS-Citrat umfasst, wie in WO2017/109161 offenbart.

[0368] In bevorzugten Ausführungsformen wird die cap1-Struktur der erfindungsgemäßen mRNA durch co-transkriptionelles Capping unter Verwendung der Trinukleotid-cap-Analoga m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG oder m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG gebildet. Ein bevorzugtes cap1-Analogon, das zweckmäßigerweise bei der Herstellung der mRNA verwendet werden kann, ist m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG.

[0369] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die cap1 -Struktur der erfindungsgemäßen mRNA durch co-transkriptionelles Capping unter Verwendung des Trinukleotid-Cap-Analogons 3'OMe-m7G (5')ppp(5')(2'OMeA)pG gebildet.

[0370] In anderen Ausführungsformen wird eine capO-Struktur der erfindungsgemäßen mRNA unter Verwendung von co-transkriptionalem Capping unter Verwendung des cap-Analogons 3'OMe-m7G(5')ppp(5')G gebildet.

[0371] In weiteren Ausführungsformen kann die bei der RNA-in-vitro-Transkription verwendete Nukleotidmischung zusätzlich modifizierte Nukleotide, wie hierin definiert, umfassen. In diesem Zusammenhang können bevorzugte modifizierte Nukleotide ausgewählt sein aus Pseudouridin (ψ), N1-Methylpseudouridin (m1ψ), 5-

Methylcytosin und 5-Methoxyuridin. In besonderen Ausführungsformen werden die Uracil-Nukleotide in der Nukleotidmischung (entweder teilweise oder vollständig) durch Pseudouridin (ψ) und/oder N1-Methylpseudouridin (m1ψ) ersetzt, um eine modifizierte mRNA zu erhalten.

[0372] In bevorzugten Ausführungsformen enthält die bei der RNA-in-vitro-Transkription verwendete Nukleotidmischung keine modifizierten Nukleotide, wie hier definiert. In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die bei der RNA-in-vitro-Transkription verwendete Nukleotidmischung nur G-, C-, A- und U-Nukleotide und optional ein Cap-Analogon, wie hierin definiert.

[0373] In bevorzugten Ausführungsformen kann die Nukleotidmischung (d.h. der Anteil jedes Nukleotids in der Mischung), die für RNA-in-vitro-Transkriptionsreaktionen verwendet wird, für die bestimmte RNA-Sequenz optimiert sein, vorzugsweise wie in WO2015/188933 beschrieben. In diesem Zusammenhang wurde die In-vitro-Transkription in Gegenwart einer sequenzoptimierten Nukleotidmischung und optional eines Cap-Analogons durchgeführt, wobei die sequenzoptimierte Nukleotidmischung vorzugsweise keine chemisch modifizierten Nukleotide enthält.

[0374] In diesem Zusammenhang ist eine sequenzoptimierte Nukleosidtriphosphat (NTP)-Mischung eine Mischung von Nukleosidtriphosphaten (NTPs) zur Verwendung in einer In-vitro-Transkriptionsreaktion eines RNA-Moleküls einer bestimmten Sequenz, die die vier Nukleosidtriphosphate (NTPs) GTP, ATP, CTP und UTP umfasst, wobei der Anteil jedes der vier Nukleosidtriphosphate (NTPs) in der sequenzoptimierten Nukleosidtriphosphat (NTP)-Mischung dem Anteil des jeweiligen Nukleotids in dem RNA-Molekül entspricht. Wenn ein Ribonukleotid im RNA-Molekül nicht vorkommt, ist das entsprechende Nukleosidtriphosphat auch nicht in der sequenzoptimierten Nukleosidtriphosphat (NTP)-Mischung vorhanden.

[0375] In Ausführungsformen, in denen mehr als eine unterschiedliche mRNA, wie hierin definiert, hergestellt werden muss, z.B. wenn 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 oder noch mehr unterschiedliche RNAs hergestellt werden müssen (siehe erster Aspekt), können Verfahren, wie in WO2017/109134 beschrieben, zweckmäßigerweise verwendet werden.

[0376] Im Zusammenhang mit der Herstellung von nukleinsäurebasierten Vakzinen kann es erforderlich sein, Nukleinsäuren in GMP-Qualität bereitzustellen, z.B. eine RNA oder DNA in GMP-Qualität. RNA oder DNA in GMP-Qualität kann unter Verwendung eines von den Aufsichtsbehörden zugelassenen Herstellungsverfahrens hergestellt werden. Dementsprechend wird in einer besonders bevorzugten Ausführungsform die mRNA-Herstellung gemäß der aktuellen guten Herstellungspraxis („Good Manufacturing Practice“, GMP) durchgeführt, wobei verschiedene Qualitätskontrollschritte auf DNA- und RNA-Ebene implementiert werden, vorzugsweise gemäß WO2016/180430. In bevorzugten Ausführungsformen ist die mRNA der Erfindung eine mRNA in GMP-Qualität. Dementsprechend ist eine mRNA für eine Vakzine vorzugsweise eine mRNA in GMP-Qualität.

[0377] Die erhaltenen mRNA-Produkte werden vorzugsweise mittels PureMessenger® (CureVac, Tübingen, Deutschland; RP-HPLC gemäß WO2008/077592) und/oder Tangentialflussfiltration (wie in WO2016/193206 beschrieben) und/oder Oligo d(T)-Reinigung (siehe WO2016/180430) gereinigt.

[0378] Vorzugsweise wird die erfindungsgemäße mRNA mittels RP-HPLC aufgereinigt, vorzugsweise mittels Umkehrphasen-Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) mit einer makroporösen Styrol/Divinylbenzol-Säule (z.B. Partikelgröße 30 µm, Porengröße 4000 Ä) und zusätzlich unter Verwendung einer Filterkassette mit einer Membran auf Cellulosebasis mit einem Molekulargewichts-Cutoff von etwa 100 kDa.

[0379] In diesem Zusammenhang wurde besonders bevorzugt die gereinigte mRNA durch RP-HPLC und/oder TFF gereinigt, was zu etwa 5%, 10% oder 20% weniger doppelsträngigen mRNA-Nebenprodukten führt als bei mRNA, die nicht mit RP-HPLC und/oder TFF gereinigt wurde. Alternativ umfasst die gereinigte mRNA, die mit RP-HPLC und/oder TFF gereinigt wurde, etwa 5%, 10% oder 20% weniger doppelsträngige mRNA-Nebenprodukte als eine mRNA, die mit Oligo dT-Reinigung, Präzipitation, Filtration und/oder Anionenaustauschchromatographie gereinigt wurde.

[0380] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die mRNA als Nukleinsäure lyophilisiert (z.B. gemäß WO2016/165831 oder WO2011/069586), um eine temperaturstabile, getrocknete mRNA als Nukleinsäure (Pulver) wie hierin definiert zu erhalten. Die erfindungsgemäße mRNA als Nukleinsäure kann auch mittels Sprühtrocknung oder Sprühgefriertrocknung (z.B. gemäß WO2016/184575 oder WO2016/184576) getrocknet werden, um eine temperaturstabile mRNA (Pulver), wie hierin definiert, zu erhalten. Dementspre-

chend werden im Zusammenhang mit der Herstellung und Aufreinigung von mRNA als Nukleinsäure die Offenbarungen von WO2017/109161, WO2015/188933, WO2016/180430, WO2008/077592, WO2016/193206, WO2016/165831, WO2011/069586, WO2016/184575 und WO2016/184576 hiermit durch Bezugnahme aufgenommen.

[0381] Dementsprechend ist in bevorzugten Ausführungsformen die mRNA als Nukleinsäure eine getrocknete mRNA.

[0382] Der Begriff „getrocknete mRNA“, wie er hier verwendet wird, ist als mRNA zu verstehen, die lyophilisiert oder sprühgetrocknet oder sprühgefriergetrocknet wurde, wie oben definiert, um eine temperaturstabile getrocknete mRNA (Pulver) zu erhalten.

[0383] In bevorzugten Ausführungsformen ist die erfindungsgemäße Nukleinsäure eine gereinigte mRNA.

[0384] Der Begriff „gereinigte Nukleinsäure“, wie er hier verwendet wird, ist als Nukleinsäure zu verstehen, die nach bestimmten Reinigungsschritten eine höhere Reinheit aufweist als das Ausgangsmaterial. Typische Verunreinigungen, die in gereinigter Nukleinsäure im Wesentlichen nicht vorhanden sind, umfassen Peptide oder Proteine, Spermidin, BSA, abortive Nukleinsäuresequenzen, Nukleinsäurefragmente, freie Nukleotide, bakterielle Verunreinigungen oder Verunreinigungen, die von Reinigungsverfahren herrühren. Dementsprechend ist es in dieser Hinsicht wünschenswert, dass der „Nukleinsäure-Reinheitsgrad“ so nahe wie möglich bei 100% liegt. Für den „Reinheitsgrad der Nukleinsäure“ ist es außerdem wünschenswert, dass die Menge der Volllängen-Nukleinsäure möglichst nahe bei 100% liegt. Dementsprechend hat „gereinigte Nukleinsäure“, wie hierin verwendet, einen Reinheitsgrad von mehr als 75%, 80%, 85%, insbesondere von 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% und besonders bevorzugt von 99% oder mehr. Der Reinheitsgrad kann z.B. durch eine analytische HPLC bestimmt werden, wobei die oben angegebenen Prozentsätze dem Verhältnis zwischen der Fläche des Peaks für die Zielnukleinsäure und der Gesamtfläche aller Peaks, die die Nebenprodukte darstellen, entsprechen. Alternativ kann der Reinheitsgrad z.B. durch eine analytische Agarosegel-Elektrophorese oder Kapillargel-Elektrophorese bestimmt werden.

[0385] In bevorzugten Ausführungsformen ist die erfindungsgemäße Nukleinsäure eine gereinigte RNA.

[0386] Unter dem hier verwendeten Begriff „gereinigte RNA“ oder „gereinigte mRNA“ ist eine RNA zu verstehen, die nach bestimmten Reinigungsschritten (z.B. HPLC, TFF, Oligo d(T)-Aufreinigung, Fällungsschritte) eine höhere Reinheit aufweist als das Ausgangsmaterial (z.B. in vitro transkribierte RNA). Typische Verunreinigungen, die in gereinigter RNA im Wesentlichen nicht vorhanden sind, umfassen Peptide oder Proteine (z.B. Enzyme, die aus DNA-abhängiger RNA-in-vitro-Transkription stammen, z.B. RNA-Polymerasen, RNasen, Pyrophosphatase, Restriktionsendonuklease, DNase), Spermidin, BSA, abortive RNA-Sequenzen, RNA-Fragmente (kurze doppelsträngige RNA-Fragmente, abortive Sequenzen usw.), freie Nukleotide (modifizierte Nukleotide, konventionelle NTPs, Cap-Analoga), Template-DNA-Fragmente, Pufferkomponenten (HEPES, TRIS, MgCl2) usw. Weitere mögliche Verunreinigungen, die z.B. aus Fermentationsverfahren herrühren können, umfassen bakterielle Verunreinigungen (Bioburden, bakterielle DNA) oder Verunreinigungen, die von Reinigungsverfahren herrühren (organische Lösungsmittel usw.). Dementsprechend ist es in diesem Zusammenhang wünschenswert, dass der „RNA-Reinheitsgrad“ möglichst nahe bei 100% liegt. Für den „RNA-Reinheitsgrad“ ist es außerdem wünschenswert, dass die Menge an Volllängen-RNA-Transkripten möglichst nahe bei 100% liegt. Dementsprechend hat „gereinigte RNA“, wie hier verwendet, einen Reinheitsgrad von mehr als 75%, 80%, 85%, insbesondere 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% und am meisten bevorzugt 99% oder mehr. Der Reinheitsgrad kann z.B. durch eine analytische HPLC bestimmt werden, wobei die oben angegebenen Prozentsätze dem Verhältnis zwischen der Fläche des Peaks für die Ziel-RNA und der Gesamtfläche aller Peaks, die die Nebenprodukte darstellen, entsprechen. Alternativ kann der Reinheitsgrad z.B. durch eine analytische Agarosegel-Elektrophorese oder Kapillargel-Elektrophorese bestimmt werden.

[0387] In besonders bevorzugten Ausführungsformen wurde die mRNA durch RP-HPLC und/oder TFF gereinigt, um doppelsträngige mRNA, nicht-gecappte mRNA und/oder mRNA-Fragmente zu entfernen.

[0388] Die Bildung von doppelsträngiger mRNA als Nebenprodukte, z.B. während der In-vitro-Transkription von mRNA, kann zu einer Induktion der angeborenen Immunantwort führen, insbesondere von IFNalpha, das bei vakzinierten Individuen der Hauptfaktor bei der Induktion von Fieber ist, was natürlich eine unerwünschte Nebenwirkung darstellt. Gängige Techniken zum Immunoblotting von dsRNA (z.B. mittels Dot Blot,

serologischer spezifischer Elektronenmikroskopie (SSEM) oder ELISA) werden zum Nachweis und zur Größenbestimmung von dsRNA-Spezies aus einem Gemisch von Nukleinsäuren eingesetzt.

[0389] Geeigneterweise wurde die erfindungsgemäße mRNA durch RP-HPLC und/oder TFF, wie hierin beschrieben, gereinigt, um die Menge an dsRNA zu reduzieren.

[0390] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mRNA der Erfindung etwa 5%, 10% oder 20% weniger doppelsträngige mRNA-Nebenprodukte als eine mRNA, die nicht mit RP-HPLC und/oder TFF aufgereinigt wurde.

[0391] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die durch RP-HPLC und/oder TFF aufgereinigte mRNA der Erfindung etwa 5%, 10% oder 20% weniger doppelsträngige mRNA-Nebenprodukte als eine RNA, die mit Oligo dT-Reinigung, Präzipitation, Filtration und/oder AEX gereinigt wurde.

[0392] „Getrocknete RNA“, wie hier definiert, und „gereinigte RNA“, wie hier definiert, oder“ RNA von GMP-Qualität, wie hier definiert, können überlegene Stabilitätseigenschaften (in vitro, in vivo) und eine verbesserte Effizienz (z.B. bessere Translatierbarkeit der mRNA in vivo) aufweisen und sind daher für einen medizinischen Zweck, z.B. eine Vakzine, besonders geeignet.

[0393] Nach dem co-transkriptionellen Capping, wie hierin definiert, und nach der Aufreinigung, wie hierin definiert, kann der Capping-Grad der erhaltenen mRNA unter Verwendung von Capping-Assays, wie in der veröffentlichten PCT-Anmeldung WO2015/101416 beschrieben, insbesondere wie in den Ansprüchen 27 bis 46 der veröffentlichten PCT-Anmeldung WO2015/101416, beschrieben, bestimmt werden. Alternativ kann ein Capping-Assay, wie in PCT/EP2018/08667 beschrieben, verwendet werden.

[0394] In Ausführungsformen kann eine automatisierte Vorrichtung zur Durchführung einer RNA-in-vitro-Transkription verwendet werden, um die erfindungsgemäße mRNA als Nukleinsäure herzustellen und zu reinigen. Eine solche Vorrichtung kann auch zur Herstellung der Zusammensetzung oder der Vakzine verwendet werden (siehe Aspekte 2 und 3). Vorzugsweise kann eine Vorrichtung, wie sie in WO2020002598 beschrieben ist, insbesondere eine Vorrichtung, wie sie in den Ansprüchen 1 bis 59 und/oder 68 bis 76 von WO2020002598 (und **Fig. 1-18**) beschrieben ist, zweckdienlich verwendet werden.

[0395] Die hierin beschriebenen Verfahren können vorzugsweise auf ein Verfahren zur Herstellung einer mRNA-Zusammensetzung oder einer Vakzine angewendet werden, wie im Folgenden näher beschrieben.

Zusammensetzung, pharmazeutische Zusammensetzung:

[0396] Ein zweiter Aspekt bezieht sich auf eine Zusammensetzung, die mindestens eine mRNA des ersten Aspekts umfasst.

[0397] Insbesondere können Ausführungsformen, die sich auf die Zusammensetzung des zweiten Aspekts beziehen, ebenfalls als geeignete Ausführungsformen der Vakzine des dritten Aspekts gelesen und aufgefasst werden. Ebenso können Ausführungsformen, die sich auf die Vakzine des dritten Aspekts beziehen, als geeignete Ausführungsformen der Zusammensetzung des zweiten Aspekts (umfassend die mRNA des ersten Aspekts) gelesen und aufgefasst werden. Weiterhin sind Merkmale und Ausführungsformen, die im Zusammenhang mit dem ersten Aspekt (der erfindungsgemäßen mRNA) beschrieben werden, als geeignete Ausführungsformen der Zusammensetzung des zweiten Aspekts zu lesen und zu verstehen.

[0398] Die Zusammensetzung umfasst allgemein mindestens eine mRNA des ersten Aspekts, die für mindestens ein antigenes Peptid oder Protein kodiert, das von einem SARS-CoV-2 (ehemals nCoV-2019) Coronavirus stammt oder von diesem abgeleitet ist, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante davon.

[0399] Die Zusammensetzung ist vorzugsweise zur intramuskulären oder intradermalen Verabreichung vorgesehen.

[0400] Vorzugsweise führt die intramuskuläre oder intradermale Verabreichung der Zusammensetzung zur Expression des kodierten SARS-CoV-2-Antigenkonstrukts in einem Individuum. Die Verabreichung der Zusammensetzung des zweiten Aspekts führt zu einer Translation der mRNA und zu einer Produktion des kodierten SARS-CoV-2-Antigens in einem Individuum. Offenbart ist auch eine DNA als Nukleinsäure ist (z.B.

Plasmid-DNA, Adenovirus-DNA), wodurch die Verabreichung der Zusammensetzung zu einer Transkription der DNA in RNA und zu einer anschließenden Translation der RNA in das kodierte SARS-CoV-2-Coronavirus-Antigen in einem Individuum führt.

[0401] Vorzugsweise ist die Zusammensetzung des zweiten Aspekts geeignet für eine Vakzine, insbesondere geeignet für eine Coronavirus-Vakzine, vorzugsweise eine SARS-CoV-2 (nCoV-2019)-Vakzine.

[0402] Im Kontext der Erfindung bezieht sich eine „Zusammensetzung" auf jede Art von Zusammensetzung, in die die spezifizierten Bestandteile (mRNA, die für mindestens ein antigenes Peptid oder Protein kodiert, das von einem SARS-CoV-2-Coronavirus stammt oder abgeleitet ist, z.B. in Verbindung mit einem polymeren Träger oder LNP) integriert werden können, optional zusammen mit weiteren Bestandteilen, üblicherweise mit mindestens einen pharmazeutisch akzeptablen Träger oder Hilfsstoff. Bei der Zusammensetzung kann es sich um eine trockene Zusammensetzung, wie zum Beispiel ein Pulver oder Granulat, oder um eine feste Einheit, wie zum Beispiel eine lyophilisierte Form, handeln. Alternativ kann die Zusammensetzung in flüssiger Form vorliegen, und jeder Bestandteil kann unabhängig in gelöster oder dispergierter (z.B. suspendierter oder emulgierter) Form enthalten sein.

[0403] Die Zusammensetzung des zweiten Aspekts umfasst die mindestens eine mRNA und optional mindestens einen pharmazeutisch akzeptablen Träger oder Hilfsstoff.

[0404] Offenbart wird auch eine Zusammensetzung, die eine Plasmid-DNA, Adenovirus-DNA, und optional mindestens einen pharmazeutisch akzeptablen Träger oder Hilfsstoff umfasst.

[0405] Die Zusammensetzung kann mindestens eine mRNA umfassen, wobei die Nukleinsäure eine Nukleinsäuresequenz umfasst oder aus einer Nukleinsäuresequenz besteht, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz, ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 116-132, 134-138, 140-143, 145-175, 11664-11813, 11815, 11817-12050, 12052, 12054-13147, 13514, 13515, 13519, 13520, 14124-14177, 22759, 22764-22786, 22791-22813, 22818-22839, 22969-23184, 23189-23404, 23409-23624, 23629-23844, 23849-24064, 24069-24284, 24289-24504, 24509-24724, 24729-24944, 24949-25164, 25169-25384, 25389-25604, 25609-25824, 25829-26044, 26049-26264, 26269-26484, 26489-26704, 26709-26937, ist, und optional mindestens einen pharmazeutisch akzeptablen Träger oder Hilfsstoff. Erfindungsgemäß sind insbesondere die Nukleinsäuresequenzen, die zu mindestens 70% identisch sind mit SEQ ID NOs: 22792, 23518, 23536, 23554, 23572, 23590, 23608, 23532, 23550, 23568, 23586, 23604, 23622, 22812, 23528, 23546, 23564, 23582, 23600, 23618, 23529, 23547, 23565, 23583, 23601, 23619, 23531, 23549, 23567, 23585, 23603, 23621, 23533, 23551, 23569, 23587, 23605, 23623, 23534, 23552, 23570, 23588, 23606 und 23624.

[0406] Die Zusammensetzung kann mindestens eine mRNA umfassen, wobei die Nukleinsäure eine Nukleinsäuresequenz umfasst oder aus einer Nukleinsäuresequenz besteht, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz, ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 148-175, 12204-13147, 14142-14177, 22786-22839, 23189-23404, 23409-23624, 23629-23844, 23849-24064, 24069-24284, 24289-24504, 24509-24724, 24729-24944, 24949-25164, 25169-25384, 25389-25604, 25609-25824, 25829-26044, 26049-26264, 26269-26484, 26489-26704, 26709-26937, ist, und optional mindestens einen pharmazeutisch akzeptablen Träger oder Hilfsstoff. Erfindungsgemäß sind insbesondere die Nukleinsäuresequenzen, die zu mindestens 70% identisch sind mit SEQ ID NOs: 22792, 23518, 23536, 23554, 23572, 23590, 23608, 23532, 23550, 23568, 23586, 23604, 23622, 22812, 23528, 23546, 23564, 23582, 23600, 23618, 23529, 23547, 23565, 23583, 23601, 23619, 23531, 23549, 23567, 23585, 23603, 23621, 23533, 23551, 23569, 23587, 23605, 23623, 23534, 23552, 23570, 23588, 23606 und 23624.

[0407] Die Zusammensetzung kann mindestens eine mRNA umfassen, wobei die mRNA eine Nukleinsäuresequenz umfasst oder aus einer Nukleinsäuresequenz besteht, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz der SEQ ID NO: 163 ist.

[0408] Die Zusammensetzung kann mindestens eine mRNA umfassen, wobei die Nukleinsäure eine Nukleinsäuresequenz umfasst oder aus einer Nukleinsäuresequenz besteht, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz der SEQ ID NO: 149 ist.

[0409] Die Zusammensetzung kann mindestens eine mRNA umfassen, wobei die Nukleinsäure eine Nukleinsäuresequenz umfasst oder aus einer Nukleinsäuresequenz besteht, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz der SEQ ID NOs: 24837, 23311, 23531, 23310, 23530, 23313, 23533 ist. Erfindungsgemäß sind insbesondere die Nukleinsäuresequenzen, die zu mindestens 70% identisch sind mit SEQ ID NO: 23531 und 23533.

[0410] Die Zusammensetzung kann mindestens eine mRNA umfassen, wobei die Nukleinsäure eine Nukleinsäuresequenz umfasst oder aus einer Nukleinsäuresequenz besteht, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz der SEQ ID NOs: 26633, 26907 ist.

[0411] Die Zusammensetzung kann mindestens eine mRNA umfassen, wobei die Nukleinsäure eine Nukleinsäuresequenz umfasst oder aus einer Nukleinsäuresequenz besteht, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 149-151, 163-165, 24837, 23311, 23531, 24851, 23310, 23530, 23313, 23533, und mindestens einen pharmazeutisch akzeptablen Träger oder Hilfsstoff. Erfindungsgemäß sind insbesondere die Nukleinsäuresequenzen, die zu mindestens 70% identisch sind mit SEQ ID NO: 23531 und 23533.

[0412] Der Begriff „pharmazeutisch akzeptabler Träger“ oder „pharmazeutisch akzeptabler Hilfsstoff“, wie er hier verwendet wird, umfasst vorzugsweise die flüssige oder nicht flüssige Basis der Zusammensetzung zur Verabreichung. Wenn die Zusammensetzung in flüssiger Form bereitgestellt wird, kann der Träger Wasser, z.B. pyrogenfreies Wasser; isotonische Kochsalzlösung oder gepufferte (wässrige) Lösungen, z.B. Phosphat-, Citrat- usw. gepufferte Lösungen, sein. Es kann Wasser oder vorzugsweise ein Puffer, besonders bevorzugt ein wässriger Puffer, verwendet werden, der ein Natriumsalz, bevorzugt mindestens 50 mM eines Natriumsalzes, ein Calciumsalz, bevorzugt mindestens 0,01 mM eines Calciumsalzes, und optional ein Kaliumsalz, bevorzugt mindestens 3 mM eines Kaliumsalzes, enthält. Gemäß bevorzugten Ausführungsformen können die Natrium-, Calcium- und optional Kaliumsalze in Form ihrer Halogenide, z.B. Chloride, Iodide oder Bromide, in Form ihrer Hydroxide, Carbonate, Hydrogencarbonate oder Sulfate usw. vorliegen. Beispiele für Natriumsalze sind NaCl, NaI, NaBr, Na2CO_3, $NaHCO_3$, Na_2SO_4, Beispiele für die optionalen Kaliumsalze sind KCl, KI, KBr, K_2CO_3, $KHCO_3$, K_2SO_4, und Beispiele für Calciumsalze sind $CaCl_2$, CaI_2, $CaBr_2$, $CaCO_3$, $CaSO_4$, $Ca(OH)_2$.

[0413] Des Weiteren können organische Anionen der oben genannten Kationen im Puffer enthalten sein. Dementsprechend kann die Nukleinsäurezusammensetzung in Ausführungsformen pharmazeutisch akzeptable Träger oder Hilfsstoffe umfassen und einen oder mehrere pharmazeutisch akzeptable Träger oder Hilfsstoffe verwenden, um z.B. die Stabilität zu erhöhen, die Zelltransfektion zu steigern, die anhaltende oder verzögerte Freisetzung zu ermöglichen, die Translation des kodierten Coronavirus-Proteins in vivo zu erhöhen und/oder das Freisetzungsprofil des kodierten Coronavirus-Proteins in vivo zu verändern. Zusätzlich zu den traditionellen Hilfsstoffen, wie zum Beispiel allen möglichen Lösungsmitteln, Dispersionsmedien, Verdünnungsmitteln oder anderen flüssigen Vehikeln, Dispersions- oder Suspensionshilfsmitteln, oberflächenaktiven Agenzien, isotonischen Agenzien, Verdickungs- oder Emulgiermitteln, Konservierungsmitteln können Hilfsstoffe (Exzipienten) der vorliegenden Erfindung, ohne darauf beschränkt zu sein, Lipidoide, Liposomen, Lipid-Nanopartikel, Polymere, Lipoplexe, Core-Shell-Nanopartikel, Peptide, Proteine, mit Polynukleotiden transfizierte Zellen, Hyaluronidase, Nanopartikel-Mimetika und Kombinationen davon umfassen. In Ausführungsformen können auch ein oder mehrere kompatible feste oder flüssige Füllstoffe oder Verdünnungsmittel oder Einkapselungsverbindungen verwendet werden, die für die Verabreichung an ein Individuum geeignet sind. Der hier verwendete Begriff „akzeptabel“ bedeutet, dass die Bestandteile der Zusammensetzung mit der mindestens einen Nukleinsäure und optional mehreren Nukleinsäuren der Zusammensetzung so vermischt werden können, dass keine Wechselwirkungen auftreten, die die biologische Aktivität oder die pharmazeutische Wirksamkeit der Zusammensetzung unter typischen Anwendungsbedingungen (z.B. intramuskuläre oder intradermale Verabreichung) wesentlich reduzieren würden. Pharmazeutisch akzeptable Träger oder Hilfsstoffe müssen eine ausreichend hohe Reinheit und eine ausreichend geringe Toxizität aufweisen, damit sie für die Verabreichung an ein zu behandelndes Individuum geeignet sind. Verbindungen, die als pharmazeutisch akzeptable Träger oder Hilfsstoffe verwendet werden können, können Zucker sein, wie z.B. Lactose, Glucose, Trehalose, Mannose und Saccharose; Stärken, wie z.B. Maisstärke oder Kartoffelstärke; Dextrose; Zellulose und ihre Derivate, wie z.B. Natriumcarboxymethylzellulose, Ethylzellulose, Zelluloseacetat; pulvriges Tragant; Malz; Gelatine; Talg; feste Gleitmittel, wie z.B. Stearinsäure, Magnesiumstearat; Cal-

ciumsulfat; pflanzliche Öle, wie z.B. Erdnussöl, Baumwollsamenöl, Sesamöl, Olivenöl, Maisöl und Öl aus Theobroma; Polyole, wie z.B. Polypropylenglykol, Glycerin, Sorbit, Mannit und Polyethylenglykol; Alginsäure.

[0414] Der mindestens eine pharmazeutisch akzeptable Träger oder Hilfsstoff der Zusammensetzung kann vorzugsweise so ausgewählt sein, dass er für die intramuskuläre oder intradermale Abgabe/Verabreichung der Zusammensetzung geeignet ist. Dementsprechend ist die Zusammensetzung vorzugsweise eine pharmazeutische Zusammensetzung, zweckmäßigerweise eine Zusammensetzung zur intramuskulären Verabreichung.

[0415] Individuen, an die die Zusammensetzung, vorzugsweise die pharmazeutischen Zusammensetzung, verabreicht werden soll, umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, Menschen und/oder andere Primaten; Säugetiere, einschließlich kommerziell relevanter Säugetiere, wie zum Beispiel Rinder, Schweine, Pferde, Schafe, Katzen, Hunde, Mäuse und/oder Ratten; und/oder Vögel, einschließlich kommerziell relevanter Vögel, wie zum Beispiel Geflügel, Hühner, Enten, Gänse und/oder Truthähne.

[0416] Pharmazeutische Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können zweckmäßigerweise steril und/oder pyrogenfrei sein.

Multivalente Zusammensetzungen der Erfindung:

[0417] In Ausführungsformen kann die Zusammensetzung (z.B. multivalente Zusammensetzung), wie hierin definiert, eine Vielzahl oder zumindest mehr als eine der mRNA-Spezies, wie im Zusammenhang mit dem ersten Aspekt der Erfindung definiert, umfassen. Vorzugsweise kann die Zusammensetzung, wie hierin definiert, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 oder 10 verschiedene Nukleinsäuren umfassen, die jeweils im Zusammenhang mit dem ersten Aspekt definiert sind.

[0418] In Ausführungsformen kann die Zusammensetzung (z.B. multivalente Zusammensetzung) mindestens 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 oder auch mehr verschiedene Nukleinsäure-Spezies, wie im Kontext des ersten Aspekts definiert, umfassen, die jeweils mindestens ein antigenes Peptid oder Protein, das von demselben Coronavirus abgeleitet ist, oder ein Fragment oder eine Variante davon kodieren. Insbesondere exprimiert das (genetisch) gleiche Coronavirus (im Wesentlichen) das gleiche Repertoire an Proteinen oder Peptiden, wobei alle Proteine oder Peptide (im Wesentlichen) die gleiche Aminosäuresequenz aufweisen. Insbesondere exprimiert das (genetisch) gleiche Coronavirus im Wesentlichen die gleichen Proteine, Peptide oder Polyproteine, wobei sich diese Proteine, Peptide oder Polyproteine vorzugsweise nicht in ihrer Aminosäuresequenz bzw. ihren Aminosäuresequenzen unterscheiden.

[0419] In Ausführungsformen umfasst die Zusammensetzung (z.B. multivalente Zusammensetzung) mindestens 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 oder auch mehr unterschiedliche Nukleinsäurespezies, wie im Kontext des ersten Aspekts definiert, die jeweils mindestens ein Peptid oder Protein, das von einem genetisch unterschiedlichen Coronavirus (z.B. einem unterschiedlichen Coronavirus-Isolat) stammt, oder ein Fragment oder eine Variante davon kodieren. Die Begriffe „unterschiedlich“ oder „unterschiedliches Coronavirus“, wie sie in der vorliegenden Beschreibung verwendet werden, sind als der Unterschied zwischen mindestens zwei jeweiligen Coronaviren (z.B. einem unterschiedlichen Coronavirus-Isolat) zu verstehen, wobei sich der Unterschied in dem Genom des jeweiligen unterschiedlichen Coronavirus manifestiert. Insbesondere kann das (genetisch) unterschiedliche Coronavirus mindestens ein unterschiedliches Protein, Peptid oder Polyprotein exprimieren, wobei sich das mindestens eine unterschiedliche Protein, Peptid oder Polyprotein in mindestens einer Aminosäure unterscheidet.

[0420] In bevorzugten Ausführungsformen kodieren die mehreren oder zumindest mehr als eine der Nukleinsäuresequenzen der multivalenten Zusammensetzung jeweils ein unterschiedliches Spike-Protein, vorzugsweise ein präfusionsstabilisiertes Spike-Protein.

[0421] In diesem Zusammenhang ist es besonders bevorzugt, dass die verschiedenen Spike-Proteine oder präfusionsstabilisierten Spike-Proteine von verschiedenen SARS-CoV-2-Virus-Varianten/Isolaten abgeleitet sind, wobei die Spike-Proteine besonders bevorzugt von B.1.1.7, B.1.351, P.1 oder CAL.20C abgeleitet sind.

[0422] In diesem Zusammenhang ist esweiterhin bevorzugt, dass die verschiedenen Spike-Proteine oder präfusionsstabilisierten Spike-Proteine Aminosäureveränderungen im Spike-Protein aufweisen, welche umfassen:

(i) delH69, delV70, Y453F, D614G, I692V und M1229I;

(ii) delH69, delV70, delY144, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A und D1118H;

(iii) L18F, D80A, D215G, delL242, delA243, delL244, R246I, K417N, E484K, N501Y, D614G und A701V;

(iv) L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y und T1027I; und/oder

(v) S13I, W152C, L452R und D614G.

[0423] Die Zusammensetzung (z.B. die multivalente Zusammensetzung) kann 2, 3, 4 oder 5 mRNA als Nukleinsäurespezies umfassen, wobei die Nukleinsäurespezies eine Nukleinsäuresequenz umfassen oder aus einer Nukleinsäuresequenz bestehen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 116-132, 134-138, 140-143, 145-175, 11664-11813, 11815, 11817-12050, 12052, 12054-13147, 13514, 13515, 13519, 13520, 14124-14177, 22759, 22764-22786, 22791-22813, 22818-22839, 22969-23184, 23189-23404, 23409-23624, 23629-23844, 23849-24064, 24069-24284, 24289-24504, 24509-24724, 24729-24944, 24949-25164, 25169-25384, 25389-25604, 25609-25824, 25829-26044, 26049-26264, 26269-26484, 26489-26704, 26709-26937, und optional mindestens einen pharmazeutisch akzeptablen Träger oder Hilfsstoff, wobei jede der 2, 3, 4 oder 5 Nukleinsäurespezies für ein unterschiedliches antigenes Peptid oder Protein eines SARS-CoV-2-Coronavirus kodiert. Erfindungsgemäß sind insbesondere die Nukleinsäuresequenzen, die zu mindestens 70% identisch sind mit SEQ ID NOs: 22792, 23518, 23536, 23554, 23572, 23590, 23608, 23532, 23550, 23568, 23586, 23604, 23622, 22812, 23528, 23546, 23564, 23582, 23600, 23618, 23529, 23547, 23565, 23583, 23601, 23619, 23531, 23549, 23567, 23585, 23603, 23621, 23533, 23551, 23569, 23587, 23605, 23623, 23534, 23552, 23570, 23588, 23606 und 23624.

[0424] Dementsprechend kann die Zusammensetzung (z.B. multivalente Zusammensetzung) zwei mRNA-Spezies als Nukleinsäurespezies umfassen, wobei die Nukleinsäurespezies eine Nukleinsäuresequenz umfassen oder aus einer Nukleinsäuresequenz bestehen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 148-175, 12204-13147, 14142-14177, 22786-22839, 23189-23404, 23409-23624, 23629-23844, 23849-24064, 24069-24284, 24289-24504, 24509-24724, 24729-24944, 24949-25164, 25169-25384, 25389-25604, 25609-25824, 25829-26044, 26049-26264, 26269-26484, 26489-26704, 26709-26937, und optional mindestens einen pharmazeutisch akzeptablen Träger oder Hilfsstoff, wobei jede der beiden Nukleinsäurespezies für ein unterschiedliches antigenes Peptid oder Protein eines SARS-CoV-2-Coronavirus kodiert. Erfindungsgemäß sind insbesondere die Nukleinsäuresequenzen, die zu mindestens 70% identisch sind mit SEQ ID NOs: 22792, 23518, 23536, 23554, 23572, 23590, 23608, 23532, 23550, 23568, 23586, 23604, 23622, 22812, 23528, 23546, 23564, 23582, 23600, 23618, 23529, 23547, 23565, 23583, 23601, 23619, 23531, 23549, 23567, 23585, 23603, 23621, 23533, 23551, 23569, 23587, 23605, 23623, 23534, 23552, 23570, 23588, 23606 und 23624.

[0425] Die Zusammensetzung (z.B. die multivalente Zusammensetzung) kann drei mRNA-Spezies als Nukleinsäurespezies umfassen, wobei die Nukleinsäure eine Nukleinsäuresequenz umfasst oder aus einer Nukleinsäuresequenz besteht, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 148-175, 12204-13147, 14142-14177, 22786-22839, 23189-23404, 23409-23624, 23629-23844, 23849-24064, 24069-24284, 24289-24504, 24509-24724, 24729-24944, 24949-25164, 25169-25384, 25389-25604, 25609-25824, 25829-26044, 26049-26264, 26269-26484, 26489-26704, 26709-26937, und optional mindestens einen pharmazeutisch akzeptablen Träger oder Hilfsstoff, wobei jede der drei Nukleinsäurespezies für ein unterschiedliches antigenes Peptid oder Protein eines SARS-CoV-2-Coronavirus kodiert. Erfindungsgemäß sind insbesondere die Nukleinsäuresequenzen, die zu mindestens 70% identisch sind mit SEQ ID NOs: 22792, 23518, 23536, 23554, 23572, 23590, 23608, 23532, 23550, 23568, 23586, 23604, 23622, 22812, 23528, 23546, 23564, 23582, 23600, 23618, 23529, 23547, 23565, 23583, 23601, 23619, 23531, 23549, 23567, 23585, 23603, 23621, 23533, 23551, 23569, 23587, 23605, 23623, 23534, 23552, 23570, 23588, 23606 und 23624.

[0426] Im Folgenden werden besonders bevorzugte Ausführungsformen einer multivalenten Zusammensetzung dargestellt.

[0427] Vorzugsweise kodieren die mindestens 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 oder noch mehr unterschiedlichen Nukleinsäurespezies der multivalenten Zusammensetzung jeweils ein unterschiedliches präfusionsstabilisiertes Spike-Protein (wie im ersten Aspekt definiert). Vorzugsweise wird die Stabilisierung der Präfusionskonfor-

mation durch Einführen von zwei aufeinanderfolgenden Prolinsubstitutionen an den Resten K986 und V987 im Spike-Protein (Aminosäurepositionen gemäß der Bezugssequenz SEQ ID NO: 1) erreicht. Dementsprechend umfassen in bevorzugten Ausführungsformen die mindestens 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 präfusionsstabilisierten Spike-Proteine (S_stab) jeweils mindestens eine präfusionsstabilisierende Mutation, wobei die mindestens eine präfusionsstabilisierende Mutation die folgenden Aminosäuresubstitutionen umfasst: K986P und V987P (Aminosäurepositionen gemäß der Bezugssequenz SEQ ID NO: 1).

[0428] Dementsprechend kodieren die mindestens 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 oder auch mehr unterschiedlichen Nukleinsäurespezies der multivalenten Zusammensetzung jeweils ein unterschiedliches präfusionsstabilisiertes Spike-Protein, wobei die mindestens 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 oder auch mehr stabilisierten Spike-Proteine aus Aminosäuresequenzen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 10-26, 341-407, 609-1278, 13521-13587, 22738, 22740, 22742, 22744, 22746, 22748, 22750, 22752, 22754, 22756, 22758, 22947-22964 sind, oder irgendeinem immunogenen Fragment oder einer immunogenen Variante dieser Sequenzen ausgewählt sind. Erfindungsgemäß sind insbesondere die Nukleinsäuresequenzen, die zu mindestens 95% identisch sind mit SEQ ID NOs: 22738, 22758, 22959 und 22961-22964.

[0429] Die multivalente Zusammensetzung kann eine Nukleinsäurespezies, die eine kodierende Sequenz umfasst, die für eine Aminosäuresequenz kodiert, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NOs: 10 ist, insbesondere erfindungsgemäß zu mindestens 95% identisch sind mit SEQ ID NO: 10, wobei die multivalente Zusammensetzung zusätzlich mindestens 2, 3, 4 weitere RNA-Spezies umfasst, die ausgewählt sind aus:

i) einer Nukleinsäurespezies umfassend eine kodierende Sequenz, die eine Aminosäuresequenz kodiert, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 22961 ist, insbesondere erfindungsgemäß zu mindestens 95% identisch sind mit SEQ ID NO: 22961; und/oder

ii) einer Nukleinsäurespezies umfassend eine kodierende Sequenz, die eine Aminosäuresequenz kodiert, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 22960 ist; und/oder iii) einer Nukleinsäurespezies umfassend eine kodierende Sequenz, die für eine Aminosäuresequenz kodiert, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 22963 ist, insbesondere erfindungsgemäß zu mindestens 95% identisch sind mit SEQ ID NO: 22963; und/oder

iv) einer Nukleinsäurespezies umfassend eine kodierende Sequenz, die für eine Aminosäuresequenz kodiert, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 22941 ist; und/oder

v) einer Nukleinsäurespezies umfassend eine kodierende Sequenz, die für eine Aminosäuresequenz kodiert, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 22964 ist, insbesondere erfindungsgemäß zu mindestens 95% identisch sind mit SEQ ID NO: 22964.

[0430] Die multivalente Zusammensetzung kann mindestens zwei Nukleinsäurespezies umfassen, die eine kodierende Sequenz umfassen, die für eine Aminosäuresequenz kodiert, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 10, 22961; 22960, 22963, 22941, 22964 ist. Erfindungsgemäß sind insbesondere Sequenzen, die zu mindestens 95% identisch sind mit SEQ ID NOs: 10, 22961, 22963 und 22964.

[0431] Die mindestens 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 oder auch mehr unterschiedlichen Nukleinsäurespezies der multivalenten Zusammensetzung können kodierende Nukleinsäuresequenzen umfassen, die jeweils für ein unterschiedliches präfusionsstabilisiertes Spike-Protein kodieren, wobei die mindestens 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 oder auch mehr kodierenden Nukleinsäuresequenzen aus Nukleinsäuresequenzen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 136-138, 140-143, 145-175, 11731-11813, 11815, 11817-12050, 12052, 12054-12203, 13514, 13515, 13519, 13520, 14124-14141, 22759, 22764-22785, 22969-23184 sind, oder Fragmenten oder Varianten dieser Sequenzen ausgewählt sind.

[0432] Die multivalente Zusammensetzung kann eine Nukleinsäurespezies umfassen, die eine kodierende Sequenz umfasst, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 137 ist, wobei die multivalente Zusammensetzung zusätzlich mindestens 2, 3, 4 weitere RNA-Spezies umfasst, die ausgewählt sind aus:

i) einer Nukleinsäurespezies umfassend eine kodierende Sequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 23091 ist; und/oder

ii) einer Nukleinsäurespezies umfassend eine kodierende Sequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 23090 ist; und/oder

iii) einer Nukleinsäurespezies umfassend eine kodierende Sequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NOs: 23093 ist; und/oder

iv) einer Nukleinsäurespezies umfassend eine kodierende Sequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NOs: 22999 ist; und/oder

v) einer Nukleinsäure-Spezies umfassend eine kodierende Sequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NOs: 23094 ist.

[0433] Die mindestens 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 oder auch mehr unterschiedlichen Nukleinsäurespezies der multivalenten Zusammensetzung können kodierende Nukleinsäuresequenzen umfassen, die jeweils für ein unterschiedliches präfusionsstabilisiertes Spike-Protein kodieren, wobei die mindestens 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 oder auch mehr kodierenden Nukleinsäuresequenzen aus RNA-Sequenzen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 149-151, 163-165, 12338, 12541, 12810-12813, 12901, 12931, 13013, 22792, 22794, 22796, 22798, 22802, 22804, 22806, 22810, 22813, 22819, 22821, 22823, 22825, 22827, 22829, 22831, 22833, 22835, 22837, 22839, 23297-23314, 23369, 23517-23520, 23523-23525, 23527, 23529, 23530, 23589, 23737, 23957, 24397, 24837, 25057, 25277, 25717, 26925-26937 sind, oder Fragmenten oder Varianten irgendeiner dieser Sequenzen ausgewählt sind. Erfindungsgemäß sind insbesondere die Nukleinsäuresequenzen, die zu mindestens 70% identisch sind mit SEQ ID NOs: 22792,23529 und 23518.

[0434] IDie multivalente Zusammensetzung kann eine RNA-Spezies umfassen, die eine RNA-Sequenz umfasst oder aus einer RNA-Sequenz besteht, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 163 ist, wobei die multivalente Zusammensetzung zusätzlich mindestens 2, 3, 4 weitere RNA-Spezies umfasst, die ausgewählt sind aus:

i) einer RNA-Spezies, die eine RNA-Sequenz umfasst oder aus einer RNA-Sequenz besteht, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 23311 ist; und/oder

ii) einer RNA-Spezies, die eine kodierende Sequenz umfasst, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 23310 ist; und/oder

iii) einer RNA-Spezies, die eine kodierende Sequenz umfasst, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 23313 ist; und/oder

iv) einer RNA-Spezies, die eine kodierende Sequenz umfasst, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 23219 ist; und/oder

v) einer RNA-Spezies, die eine kodierende Sequenz umfasst, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 23314 ist;

wobei vorzugsweise jede der mRNA-Spezies eine Cap1-Struktur umfasst, und optional keine der mRNA-Spezies modifizierte Nukleotide umfasst.

[0435] Die multivalente Zusammensetzung kann eine RNA-Spezies umfassen, die eine RNA-Sequenz umfasst oder aus einer RNA-Sequenz besteht, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 149 oder 24837 ist, wobei die multivalente Zusammensetzung zusätzlich mindestens 2, 3, 4 weitere RNA-Spezies umfasst, die ausgewählt sind aus:

i) einer RNA-Spezies, die eine RNA-Sequenz umfasst oder aus einer RNA-Sequenz besteht, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 23531 oder 24851 ist, erfindungsgemäß insbesondere SEQ ID NO: 23531 ist; und/oder

ii) einer RNA-Spezies, die eine kodierende Sequenz umfasst, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 23530 oder 24850 ist; und/oder

iii) einer RNA-Spezies, die eine kodierende Sequenz umfasst, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 23533 oder 24853 ist, erfindungsgemäß insbesondere SEQ ID NO: 23533 ist; und/oder

iv) einer RNA-Spezies, die eine kodierende Sequenz umfasst, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 23439 oder 24759 ist; und/oder

v) einer RNA-Spezies, die eine kodierende Sequenz umfasst, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 23534 oder 24854 ist;

wobei vorzugsweise jede der mRNA-Spezies eine Cap1-Struktur umfasst, und optional keine der mRNA-Spezies modifizierte Nukleotide umfasst.

[0436] Die multivalente Zusammensetzung kann mindestens zwei RNA-Spezies umfassen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 149 oder 24837, 23531 oder 24851, 23530 oder 24850, 23533 oder 24853, 23439 oder 24759 oder 23534 oder 24854 sind.

[0437] In Ausführungsformen kann die mRNA als Nukleinsäure der multivalenten Zusammensetzung, separat formuliert sein (Formulierung wie unten spezifiziert). In bevorzugten Ausführungsformen kann die mRNA als Nukleinsäure der multivalenten Zusammensetzung, separat co-formuliert sein (Formulierung wie unten spezifiziert).

Komplexierung:

[0438] In einer bevorzugten Ausführungsform des zweiten Aspekts ist die mindestens eine mRNA mit einer weiteren Verbindung komplexiert oder assoziiert, um eine formulierte Zusammensetzung zu erhalten. Eine Formulierung in diesem Zusammenhang kann die Funktion eines Transfektionsmittels haben. Eine Formulierung in diesem Zusammenhang kann auch die Funktion haben, die Nukleinsäure vor Abbau zu schützen.

[0439] In einer bevorzugten Ausführungsform des zweiten Aspekts ist die mindestens eine mRNA und optional die mindestens eine weitere Nukleinsäure, mit einer oder mehreren kationischen oder polykationischen Verbindung(en), vorzugsweise einem kationischen oder polykationischen Polymer, einem kationischen oder polykationischen Polysaccharid, einem kationischen oder polykationischen Lipid, einem kationischen oder polykationischen Protein, einem kationischen oder polykationischen Peptid oder beliebigen Kombinationen davon, komplexiert oder assoziiert oder zumindest teilweise komplexiert oder teilweise assoziiert.

[0440] Der Begriff „kationische oder polykationische Verbindung“, wie er hier verwendet wird, wird von der fachkundigen Person erkannt und verstanden und soll sich beispielsweise auf ein geladenes Molekül beziehen, das bei einem pH-Wert im Bereich von etwa 1 bis 9, bei einem pH-Wert im Bereich von etwa 3 bis 8, bei einem pH-Wert im Bereich von etwa 4 bis 8, bei einem pH-Wert im Bereich von etwa 5 bis 8, bevorzugter bei einem pH-Wert im Bereich von etwa 6 bis 8, noch bevorzugter bei einem pH-Wert im Bereich von etwa 7

bis 8, am meisten bevorzugt bei einem physiologischen pH-Wert, z.B. im Bereich von etwa 7,2 bis etwa 7,5, positiv geladen ist. Dementsprechend kann eine kationische Komponente, z.B. ein kationisches Peptid, ein kationisches Protein, ein kationisches Polymer, ein kationisches Polysaccharid, ein kationisches Lipid, jede positiv geladene Verbindung oder jedes positiv geladene Polymer sein, das unter physiologischen Bedingungen positiv geladen ist. Ein „kationisches oder polykationisches Peptid oder Protein“ kann mindestens eine positiv geladene Aminosäure oder mehr als eine positiv geladene Aminosäure enthalten, z.B. ausgewählt aus Arg, His, Lys oder Orn. Entsprechend fallen auch „polykationische“ Komponenten darunter, die unter den gegebenen Bedingungen mehr als eine positive Ladung aufweisen.

[0441] Kationische oder polykationische Verbindungen, die in diesem Zusammenhang besonders bevorzugt sind, können aus der folgenden Liste von kationischen oder polykationischen Peptiden oder Proteinen oder Fragmenten davon ausgewählt sein: Protamin, Nucleolin, Spermin oder Spermidin oder andere kationische Peptide oder Proteine, wie zum Beispiel Poly-L-Lysin (PLL), Poly-Arginin, basische Polypeptide, zellpenetrierende Peptide (CPPs), einschließlich HIVbindende Peptide, HIV-1-Tat (HIV), von Tat abgeleitete Peptide, Penetratin, von VP22 abgeleitete oder analoge Peptide, HSV VP22 (Herpes simplex), MAP, KALA oder Protein-Transduktions-Domänen (PTDs), PpT620, Prolin-reiche Peptide, Arginin-reiche Peptide, Lysin-reiche Peptide, MPG-Peptid(e), Pep-1, L-Oligomere, Calcitonin-Peptid(e), Antennapedia-abgeleitete Peptide, pAntp, plsl, FGF, Lactoferrin, Transportan, Buforin-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, hCTabgeleitete Peptide, SAP, oder Histone. Noch bevorzugter ist die mRNA mit einem oder mehreren Polykationen, vorzugsweise mit Protamin oder Oligofectamin, am meisten bevorzugt mit Protamin, komplexiert.

[0442] In einer bevorzugten Ausführungsform ist die mindestens eine mRNA mit Protamin komplexiert.

[0443] Weitere bevorzugte kationische oder polykationische Verbindungen, die als Transfektions- oder Komplexierungsmittel verwendet werden können, sind kationische Polysaccharide, z.B. Chitosan, Polybren usw.; kationische Lipide, z.B. DOTMA, DMRIE, di-C14-Amidin, DOTIM, SAINT, DC-Chol, BGTC, CTAP, DOPC, DODAP, DOPE: Dioleylphosphatidylethanolamin, DOSPA, DODAB, DOIC, DMEPC, DOGS, DIMRI, DOTAP, DC-6-14, CLIP1, CLIP6, CLIP9, Oligofectamin; oder kationische oder polykationische Polymere, z.B. modifizierte Polyaminosäuren, wie zum Beispiel beta-Aminosäure-Polymere oder reversierte Polyamide, usw., modifizierte Polyethylene, wie zum Beispiel PVP usw., modifizierte Acrylate, wie zum Beispiel pDMAEMA usw., modifizierte Amidoamine, wie zum Beispiel pAMAM usw., modifizierte Polybetaaminoester (PBAE), wie zum Beispiel am Diaminende modifizierte 1,4-Butandioldiacrylat-co-amino-1-pentanol-Polymere usw., Dendrimere, wie zum Beispiel Polypropylamin-Dendrimere oder Dendrimere auf pAMAM-Basis, usw., Polyimin(e), wie zum Beispiel PEI, Poly(propylenimin), usw., Polyallylamin, Polymere auf Zuckerrückgratbasis, wie zum Beispiel Polymere auf Cyclodextrinbasis, Polymere auf Dextranbasis, usw., Polymere auf Silanrückgratbasis, wie zum Beispiel PMOXA-PDMS-Copolymere, usw., Blockpolymere, die aus einer Kombination von einem oder mehreren kationischen Blöcken (z.B. ausgewählt aus einem kationischen Polymer wie oben erwähnt) und einem oder mehreren hydrophilen oder hydrophoben Blöcken (z.B. Polyethylenglykol) bestehen; usw.

[0444] In diesem Zusammenhang ist besonders bevorzugt die mindestens eine mRNA mit einer kationischen oder polykationischen Verbindung und/oder einem polymeren Träger, vorzugsweise kationischen Proteinen oder Peptiden, komplexiert oder zumindest teilweise komplexiert. In diesem Zusammenhang wird die Offenbarung von WO2010/037539 und WO2012/113513 hiermit durch Bezugnahme aufgenommen. Teilweise bedeutet, dass nur ein Teil der Nukleinsäure mit einer kationischen Verbindung komplexiert ist, und dass der Rest der Nukleinsäure in unkomplexierter Form („frei“) vorliegt.

[0445] In Ausführungsformen umfasst die Zusammensetzung mindestens eine mRNA, die mit einer oder mehreren kationischen oder polykationischen Verbindungen, vorzugsweise Protamin, komplexiert ist, und mindestens eine freie (nicht-komplexierte) Nukleinsäure.

[0446] In diesem Zusammenhang ist es besonders bevorzugt, dass die mindestens eine mRNA mit Protamin komplexiert oder zumindest teilweise komplexiert ist. Vorzugsweise kann das Molverhältnis der mit Protamin komplexierten mRNA zur freien RNA aus einem Molverhältnis von etwa 0,001:1 bis etwa 1:0,001, einschließlich eines Verhältnisses von etwa 1:1, ausgewählt sein. Zweckmäßigerweise wird die komplexierte mRNA mit Protamin durch Zugabe von Protamin-Trehalose-Lösung zu der RNA-Probe in einem mRNA:Protamin-Gewichtsverhältnis (Gew./Gew.) von 2:1 komplexiert.

[0447] Weitere bevorzugte kationische oder polykationische Proteine oder Peptide, die für die Komplexierung verwendet werden können, können von der Formel (Arg)l;(Lys)m;(His)n;(Orn)o;(Xaa)x der Patentanmeldung WO2009/030481 oder WO2011/026641 abgeleitet werden, wobei die Offenbarung von

WO2009/030481 oder WO2011/026641, die sich darauf bezieht, hiermit durch Bezugnahme aufgenommen wird.

[0448] In bevorzugten Ausführungsformen ist die mindestens eine mRNA mit mindestens einem kationischen oder polykationischen Protein oder Peptid, vorzugsweise ausgewählt aus den SEQ ID NOs: 269 bis 273, oder beliebigen Kombinationen davon, komplexiert oder zumindest teilweise komplexiert.

[0449] Gemäß verschiedenen Ausführungsformen umfasst die Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung mindestens eine mRNA, wie im Zusammenhang mit dem ersten Aspekt definiert, und einen polymeren Träger.

[0450] Der Begriff „polymerer Träger“, wie er hierin verwendet wird, wird von der fachkundigen Person erkannt und verstanden und soll sich z.B. auf eine Verbindung beziehen, die den Transport und/oder die Komplexierung einer anderen Verbindung (z.B. einer Fracht(Cargo)-Nukleinsäure) erleichtert. Ein polymerer Träger ist typischerweise ein Träger, der aus einem Polymer gebildet ist. Ein polymerer Träger kann mit seiner Fracht (z.B. DNA oder RNA) durch kovalente oder nichtkovalente Wechselwirkung verbunden sein. Ein Polymer kann auf verschiedenen Untereinheiten, wie z.B. einem Copolymer, basieren.

[0451] Geeignete polymere Träger in diesem Zusammenhang sind z.B. Polyacrylate, Polyalkycyanoacrylate, Polylactid, Polylactid-Polyglycolid-Copolymere, Polycaprolactone, Dextran, Albumin, Gelatine, Alginat, Kollagen, Chitosan, Cyclodextrine, Protamin, PEGyliertes Protamin, PEGyliertes PLL und Polyethylenimin (PEI), Dithiobis(succinimidylpropionat) (DSP), Dimethyl-3,3'-dithiobispropionimidat (DTBP), Poly(ethylenimin)biscarbamat (PEIC), Poly(L-Lysin) (PLL), Histidin-modifiziertes PLL, Poly(N-vinylpyrrolidon) (PVP), Poly(propylenimin) (PPI), Poly(amidoamin) (PAMAM), Poly(amidoethylenimin) (SS-PAEI), Triehtylentetramin (TETA), Poly (β-Aminoester), Poly(4-Hydroxy-L-prolinester) (PHP), Poly(allylamin), Poly(α-[4-Aminobutyl]-L-glykolsäure (PAGA), Poly(D,L-Milch-co-glykolsäure (PLGA), Poly(N-ethyl-4-vinylpyridiniumbromid), Poly(phosphazen)e (PPZ), Poly(phosphoester) (PPE), Poly(phosphoramidat)e (PPA), Poly(N-2-hydroxypropylmethacrylamid) (pHPMA), Poly(2-(dimethylamino)ethylmethacrylat) (pDMAEMA), Poly(2-aminoethylpropylenphosphat) PPE_EA), galaktosyliertes Chitosan, N-dodecyliertes Chitosan, Histon, Kollagen und Dextran-Spermin. In einer Ausführungsform kann das Polymer ein inertes Polymer, wie z.B. (aber nicht beschränkt auf) PEG, sein. In einer Ausführungsform kann das Polymer ein kationisches Polymer, wie z.B. (aber nicht beschränkt auf) PEI, PLL, TETA, Poly(allylamin), Poly(N-ethyl-4-vinylpyridiniumbromid), pHPMA und pDMAEMA, sein. In einer Ausführungsform kann das Polymer ein biologisch abbaubares PEI sein, wie z.B. (aber nicht beschränkt auf) DSP, DTBP und PEIC. In einer Ausführungsform kann das Polymer biologisch abbaubar sein, wie z.B. histinmodifiziertes PLL, SS-PAEI, Poly(β-aminoester), PHP, PAGA, PLGA, PPZ, PPE, PPA und PPE-EA.

[0452] Ein geeigneter polymerer Träger kann ein polymerer Träger sein, der durch Disulfid-vernetzte kationische Verbindungen gebildet wird. Die Disulfid-vernetzten kationischen Verbindungen können gleich oder verschieden voneinander sein. Der polymere Träger kann auch weitere Komponenten enthalten. Der in der vorliegenden Erfindung verwendete polymere Träger kann Mischungen aus kationischen Peptiden, Proteinen oder Polymeren und optional weiteren Komponenten, wie hierin definiert, die durch Disulfidbindungen (über -SH-Gruppen) vernetzt sind, enthalten.

[0453] In diesem Zusammenhang sind polymere Träger gemäß der Formel {(Arg)l;(Lys)m;(His)n;(Orn)o;(Xaa)x(Cys)y} und der Formel Cys_1{(Arg)l;(Lys)m;(His)n;(Orn)o;(Xaa)x}Cys_2 der Patentanmeldung WO2012/013326 bevorzugt, wobei die diesbezügliche Offenbarung der WO2012/013326 hiermit durch Bezugnahme aufgenommen wird.

[0454] In Ausführungsformen kann der polymere Träger, der verwendet wird, um die mindestens eine mRNA zu komplexieren, von einem polymeren Trägermolekül gemäß der Formel (L-P^1-S-[S-P^2-S]$_n$-S-P^3-L) der Patentanmeldung WO2011/026641 abgeleitet sein, wobei die diesbezügliche Offenbarung der WO2011/026641 hiermit durch Bezugnahme aufgenommen wird.

[0455] In Ausführungsformen wird die polymere Trägerverbindung durch die Peptidelemente CysArg12Cys (SEQ ID NO: 269) oder CysArg12 (SEQ ID NO: 270) oder TrpArg12Cys (SEQ ID NO: 271) gebildet oder umfasst diese oder besteht daraus. In besonders bevorzugten Ausführungsformen besteht die polymere Trägerverbindung aus einem (R_{12}C)-(R_{12}C)-Dimer, einem (WR_{12}C)-(WR_{12}C)-Dimer oder einem (CR_{12})-(CR_{12}C)-(CR_{12})-Trimer, wobei die einzelnen Peptidelemente in dem Dimer (z.B. (WR12C)) oder dem Trimer (z.B. (CR12)) über -SH-Gruppen verbunden sind.

[0456] In einer bevorzugten Ausführungsform des zweiten Aspekts ist die mindestens eine mRNA mit einem Polyethylenglykol/Peptid-Polymer komplexiert oder assoziiert, umfassend HO-PEG5000-S-(S-CHHHHHHRRRRHHHHHHC-S-)7-S-PEG5000-OH (SEQ ID NO: 272 als Peptid-Monomer), HO-PEG5000-S-(S-CHHHHHHRRRRHHHHHHC-S-)4-S-PEG5000-OH (SEQ ID NO: 272 als Peptidmonomer), HO-PEG5000-S-(S-CGHHHHHRRRHHHHHGC-S-)7-S-PEG5000-OH (SEQ ID NO: 273 als Peptidmonomer) und/oder ein Polyethylenglykol/Peptid-Polymer, umfassend HO-PEG5000-S-(S-CGHHHHHRRRRHHHHHGC-S-)4-S-PEG5000-OH (SEQ ID NO: 273 als Peptidmonomer).

[0457] In anderen Ausführungsformen umfasst die Zusammensetzung mindestens eine mRNA, wobei die mindestens eine mRNA mit polymeren Trägern und optional mit mindestens einer Lipidkomponente komplexiert oder assoziiert ist, wie in WO2017/212008A1, WO2017/212006A1, WO2017/212007A1 und WO2017/212009A1 beschrieben. In diesem Zusammenhang werden die Offenbarungen von WO2017/212008A1, WO2017/212006A1, WO2017/212007A1 und WO2017/212009A1 hiermit durch Bezugnahme aufgenommen.

[0458] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der polymere Träger (der ersten und/oder zweiten Komponente) ein Peptidpolymer, vorzugsweise ein Polyethylenglykol/Peptid-Polymer wie oben definiert, und eine Lipidkomponente, vorzugsweise eine Lipidoidkomponente.

[0459] Ein Lipidoid (oder Lipidoit) ist eine lipidartige Verbindung, d.h. eine amphiphile Verbindung mit lipidartigen physikalischen Eigenschaften. Das Lipidoid ist vorzugsweise eine Verbindung, die zwei oder mehr kationische Stickstoffatome und mindestens zwei lipophile Schwänze umfasst. Im Gegensatz zu vielen herkömmlichen kationischen Lipiden kann das Lipidoid frei von einer hydrolysierbaren Bindungsgruppe sein, insbesondere von Bindungsgruppen, die hydrolysierbare Ester-, Amid- oder Carbamatgruppen umfassen. Die kationischen Stickstoffatome des Lipidoids können kationisierbar oder permanent kationisch sein, oder es können beide Arten von kationischen Stickstoffen in der Verbindung vorliegen. Im Kontext der vorliegenden Erfindung wird der Begriff Lipid so verstanden, dass er auch die Lipidoide umfasst.

[0460] In einigen Ausführungsformen der Erfindung kann das Lipidoid eine PEG-Einheit umfassen.

[0461] In bevorzugten Ausführungsformen ist die mindestens eine mRNA mit einem polymeren Träger, vorzugsweise mit einem Polyethylenglykol/Peptid-Polymer, wie oben definiert, und einer lipidoiden Komponente komplexiert oder assoziiert.

[0462] Zweckmäßigerweise ist das Lipidoid kationisch, d.h. es ist kationisierbar oder permanent kationisch. In einer Ausführungsform ist das Lipidoid kationisierbar, d.h. es enthält ein oder mehrere kationisierbare Stickstoffatome, aber keine permanent kationischen Stickstoffatome. In einer anderen Ausführungsform ist mindestens eines der kationischen Stickstoffatome des Lipidoids permanent kationisch. Optional umfasst das Lipidoid zwei permanent kationische Stickstoffatome, drei permanent kationische Stickstoffatome oder sogar vier oder mehr permanent kationische Stickstoffatome.

[0463] In einer bevorzugten Ausführungsform kann die Lipidoidkomponente irgendeine Lipidoidkomponente sein, die aus den Lipidoiden ausgewählt ist, die in der Tabelle auf Seite 50-54 der veröffentlichten PCT-Patentanmeldung WO2017/212009A1 angegeben sind, wobei die spezifischen, in der Tabelle angegebenen Lipidoide und die spezifische diesbezügliche Offenbarung hiermit durch Bezugnahme aufgenommen werden.

[0464] In bevorzugten Ausführungsformen kann die Lipidoidkomponente irgendeine Lipidoidkomponente sein, die ausgewählt ist aus 3-C12-OH, 3-C12-OH-cat, 3-C12-Amid, 3-C12-Amid-Monomethyl, 3-C12-Amid-Dimethyl, RevPEG(10)-3-C12-OH, RevPEG(10)-DLin-pAbenzoic, 3C12-Amid-TMA cat, 3C12-Amid-DMA, 3C12-Amid-NH2, 3C12-Amid-OH, 3C12-Ester-OH, 3C12-Ester-Amin, 3C12-Ester-DMA, 2C12Amid-DMA, 3C12-lin-Amid-DMA, 2C12-sperm-Amid-DMA oder 3C12-sperm-Amid-DMA (siehe Tabelle der veröffentlichten PCT-Patentanmeldung WO2017/212009A1 (Seiten 50-54)). Besonders bevorzugt sind 3-C12-OH oder 3-C12-OH-cat.

[0465] In bevorzugten Ausführungsformen wird das Polyethylenglykol/Peptid-Polymer, das ein Lipidoid wie oben spezifiziert umfasst (z.B. 3-C12-OH oder 3-C12-OH-cat), verwendet, um die mindestens eine Nukleinsäure zu komplexieren, um Komplexe mit einem N/P-Verhältnis von etwa 0,1 bis etwa 20 oder von etwa 0,2 bis etwa 15, oder von etwa 2 bis etwa 15, oder von etwa 2 bis etwa 12 zu bilden, wobei das N/P-Verhältnis als das Molverhältnis der Stickstoffatome der basischen Gruppen des kationischen Peptids oder Polymers zu den Phosphatgruppen der Nukleinsäure definiert ist. In diesem Zusammenhang wird die Offenbarung der

veröffentlichten PCT-Patentanmeldung WO2017/212009A1, insbesondere die Ansprüche 1 bis 10 der WO2017/212009A1, und die damit verbundene spezifische Offenbarung hiermit durch Bezugnahme aufgenommen.

[0466] Weitere geeignete Lipidoide können aus der veröffentlichten PCT-Patentanmeldung WO2010/053572 abgeleitet werden. Insbesondere können Lipidoide, die aus den Ansprüchen 1 bis 297 der veröffentlichten PCT-Patentanmeldung WO2010/053572 ableitbar sind, im Kontext der Erfindung verwendet werden, z.B. in das Peptidpolymer, wie hierin beschrieben, inkorporiert werden, oder z.B. in die Lipid-Nanopartikel (wie unten beschrieben) inkorporiert werden. Dementsprechend werden die Ansprüche 1 bis 297 der veröffentlichten PCT-Patentanmeldung WO2010/053572 und die diesbezügliche spezifische Offenbarung hiermit durch Bezugnahme aufgenommen.

Verkaose/unfflKomoplexierung in LNPs:

[0467] In bevorzugten Ausführungsformen des zweiten Aspekts ist die mindestens eine mRNA und optional die mindestens eine weitere Nukleinsäure, mit einem oder mehreren Lipiden (z.B. kationischen Lipiden und/oder neutralen Lipiden) komplexiert, verkapselt, teilweise verkapselt oder assoziiert, wodurch Lipid-basierte Träger wie zum Beispiel Liposome, Lipid-Nanopartikel (LNPs), Lipoplexe und/oder Nanoliposome, gebildet werden.

[0468] Die in die Liposomen, Lipid-Nanopartikel (LNPs), Lipoplexe und/oder Nanoliposomen inkorporierte mRNA kann vollständig oder teilweise im Innenraum der Liposomen, Lipid-Nanopartikel (LNPs), Lipoplexe und/oder Nanoliposomen, innerhalb der Lipidschicht/Membran oder in Verbindung mit der äußeren Oberfläche der Lipidschicht/Membran vorliegen. Die Inkorporation einer Nukleinsäure (mRNA) in Liposomen/LNPs wird hier auch als „Verkapselung“ bezeichnet, wobei die Nukleinsäure (mRNA) vollständig im Innenraum der Liposomen, Lipid-Nanopartikel (LNPs), Lipoplexe und/oder Nanoliposomen enthalten ist. Der Zweck der Inkorporation von Nukleinsäure (mRNA) in Liposome, Lipid-Nanopartikel (LNPs), Lipoplexe und/oder Nanoliposome besteht darin, die Nukleinsäure (mRNA) vor einer Umgebung, die Enzyme oder Chemikalien oder Bedingungen enthalten kann, die Nukleinsäure abbauen, und/oder Systemen oder Rezeptoren, die eine schnelle Ausscheidung der Nukleinsäure verursachen, zu schützen. Darüber hinaus kann die Inkorporation der Nukleinsäure (mRNA) in Liposome, Lipid-Nanopartikel (LNPs), Lipoplexe und/oder Nanoliposome die Aufnahme der Nukleinsäure fördern und somit die therapeutische Wirkung der mRNA, die für antigene SARS-CoV-2 (nCoV-2019)-Proteine kodiert, verstärken. Dementsprechend kann die Inkorporation einer mRNA in Liposome, Lipid-Nanopartikel (LNPs), Lipoplexe und/oder Nanoliposome besonders zweckmäßig sein für eine Coronavirus-Vakzine (z.B. eine SARS-CoV-2-Vakzine), z.B. zur intramuskulären und/oder intradermalen Verabreichung.

[0469] Die Begriffe „komplexiert“ oder „assoziiert“ beziehen sich in diesem Zusammenhang auf die im Wesentlichen stabile Vereinigung von Nukleinsäure mit einem oder mehreren Lipiden zu größeren Komplexen oder Assemblierungen ohne kovalente Bindung.

[0470] Der Begriff „Lipid-Nanopartikel“, auch „LNP“ genannt, ist nicht auf eine bestimmte Morphologie beschränkt und umfasst jede Morphologie, die entsteht, wenn ein kationisches Lipid und optional ein oder mehrere weitere Lipide kombiniert werden, z.B. in einer wässrigen Umgebung und/oder in Gegenwart einer Nukleinsäure, z.B. einer RNA. Zu den Lipid-Nanopartikeln (LNP) gehören z.B. ein Liposom, ein Lipidkomplex, ein Lipoplex und dergleichen.

[0471] Liposomen, Lipid-Nanopartikel (LNP), Lipoplexe und/oder Nanoliposomen können unterschiedliche Größen haben, wie z.B. ein multilamellares Vesikel (MLV), das einen Durchmesser von Hunderten von Nanometern haben kann und eine Reihe von konzentrischen Doppelschichten enthalten kann, die durch schmale wässrige Kompartimente getrennt sind, ein kleines („small“) unilamellares Vesikel (SUV), das kleiner als 50 nm im Durchmesser sein kann, und ein großes („large“) unilamellares Vesikel (LUV), das zwischen 50 nm und 500 nm im Durchmesser sein kann.

[0472] LNPs der Erfindung sind zweckmäßigerweise als mikroskopische Vesikel charakterisiert, die einen wässrigen Innenraum aufweisen, der von einem äußeren Medium durch eine Membran aus einer oder mehreren Doppelschichten abgetrennt ist. Doppelschichtige (Bilayer-) Membranen von LNPs werden typischerweise durch amphiphile Moleküle, wie zum Beispiel Lipide synthetischen oder natürlichen Ursprungs, gebildet, die räumlich getrennte hydrophile und hydrophobe Domänen umfassen. Doppelschicht-Membranen der Liposomen können auch durch amphiphile Polymere und oberflächenaktive Stoffe (Surfactants) gebildet wer-

den (z.B. Polymerosomen, Niosomen, usw.). Im Kontext der vorliegenden Erfindung dient ein LNP typischerweise dem Transport der mindestens einen mRNA zu einem Zielgewebe.

[0473] Dementsprechend ist in bevorzugten Ausführungsformen des zweiten Aspekts die mindestens eine mRNA mit einem oder mehreren Lipiden komplexiert, wodurch Lipid-Nanopartikel (LNP) gebildet werden. Vorzugsweise sind die LNPs besonders geeignet für die intramuskuläre und/oder intradermale Verabreichung. LNPs umfassen typischerweise ein kationisches Lipid und einen oder mehrere Hilfsstoffe, ausgewählt aus neutralen Lipiden, geladenen Lipiden, Steroiden und Polymer-konjugierten Lipiden (z.B. PEGyliertes Lipid). Die mRNA kann im Lipidteil des LNP oder in einem wässrigen Raum eingekapselt sein, der von einem Teil oder dem gesamten Lipidteil des LNP umhüllt ist. Die mRNA oder ein Teil davon kann auch mit dem LNP assoziiert und komplexiert sein. Ein LNP kann jedes Lipid umfassen, das in der Lage ist, ein Partikel zu bilden, an das die Nukleinsäuren gebunden sind, oder in dem die eine oder mehrere Nukleinsäuren eingekapselt sind. Vorzugsweise umfasst das Nukleinsäuren umfassende LNP ein oder mehrere kationische Lipide und ein oder mehrere stabilisierende Lipide. Stabilisierende Lipide umfassen neutrale Lipide und PEGylierte Lipide.

Vorzugsweise umfasst das LNP

(i) mindestens ein kationisches Lipid;

(ii) mindestens ein neutrales Lipid;

(iii) mindestens ein Steroid oder Steroidanalogon, vorzugsweise Cholesterol; und

(iv) mindestens ein Polymer-konjugiertes Lipid, vorzugsweise ein PEG-Lipid;

wobei (i) bis (iv) in einem Molverhältnis von etwa 20-60% kationischem Lipid, 5-25% neutralem Lipid, 25-55% Sterol und 0,5-15% Polymer-konjugiertem Lipid vorliegen.

[0474] Das kationische Lipid eines LNP kann kationisierbar sein, d.h. es wird protoniert, wenn der pH-Wert unter den pK-Wert der ionisierbaren Gruppe des Lipids gesenkt wird, ist aber bei höheren pH-Werten zunehmend neutraler. Bei pH-Werten unterhalb des pK-Werts ist das Lipid dann in der Lage, mit negativ geladenen Nukleinsäuren zu assoziieren. In bestimmten Ausführungsformen umfasst das kationische Lipid ein zwitterionisches Lipid, das bei sinkendem pH-Wert eine positive Ladung annimmt.

[0475] Solche Lipide umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, DSDMA, N,N-Dioleyl-N,N-dimethylammoniumchlorid (DODAC), N,N-Distearyl-N,N-dimethylammoniumbromid (DDAB), 1,2-Dioleoyltrimethylammoniumpropanchlorid (DOTAP) (auch bekannt als N-(2,3-Dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammoniumchlorid und 1,2-Dioleyloxy-3-trimethylaminopropan-Chloridsalz), N-(1 -(2,3-Dioleyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammoniumchlorid (DOTMA), N,N-Dimethyl-2,3-dioleyloxy)propylamin (DODMA), ckk-E12, ckk, 1,2-Dilinoleyloxy-N,N-dimethylaminopropan (DLinDMA), 1,2-Dilinolenyloxy-N,N-dimethylaminopropan (DLenDMA), 1,2-Di-y-linolenyloxy-N,N-dimethylaminopropan (γ-DLenDMA), 98N12-5, 1,2-Dilinoleylcarbamoyloxy-3-dimethylaminopropan (DLin-C-DAP), 1,2-Dilinoleyoxy-3-(dimethylamino)acetoxypropan (DLin-DAC), 1,2-Dilinoleyoxy-3-morpholinopropan (DLin-MA), 1,2-Dilinoleoyl-3-dimethylaminopropan (DLinDAP), 1,2-Dilinoleylthio-3-dimethylaminopropan (DLin-S-DMA), 1-Linoleoyl-2-linoleyloxy-3-dimethylaminopropan (DLin-2-DMAP), 1,2-Dilinoleyloxy-3-trimethylaminopropan Chloridsalz (DLin-TMA. Cl), ICE (Imidazol-basiert), HGT5000, HGT5001, DMDMA, CLinDMA, CpLinDMA, DMOBA, DOcarbDAP, DLincarbDAP, DLinCDAP, KLin-K-DMA, DLin-K-XTC2-DMA, XTC (2,2-Dilinoleyl-4-dimethylaminoethyl-[1,3]-dioxolan) HGT4003, 1,2-Dilinoleoyl-3-trimethylaminopropan-Chloridsalz (DLin-TAP.Cl), 1,2-Dilinoleyloxy-3-(N-methylpiperazino)propan (DLin-MPZ), oder 3-(N,N-Dilinoleylamino)-1,2-propandiol (DLinAP), 3-(N,N-Dioleylamino)-1,2-propandio (DOAP), 1,2-Dilinoleyloxo-3-(2-N,N-dimethylamino)ethoxypropan (DLin-EG-DM A), 2,2-Dilinoleyl-4-dimethylaminomethyl-[1,3]-dioxolan (DLin-K-DMA) oder Analoga davon, (3aR,5s,6aS)-N,N-Dimethyl-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienyl) tetrahydro-3aH-cyclopenta[d][1,3]dioxol-5-amin, (6Z,9Z,28Z,31 Z)-Heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl-4-(dimethylamino)butanoat (MC3), ALNY-100 ((3aR,5s,6aS)-N,N-dimethyl-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienyl)tetrahydro-3aH-cyclopenta[d] [1,3]dioxol-5-amin)), 1,1'-(2-(4-(2-((2-(Bis(2-hydroxydodecyl)amino)ethyl)(2-hydroxydodecyl)amino)ethyl)piperazin-1-yl)ethylazandiyl)didodecan-2-ol (C12-200), 2,2-Dilinoleyl-4-(2-dimethylaminoethyl)-[1,3]-dioxolan (DLin-K-C2-DMA), 2,2-Dilinoleyl-4-dimethylaminomethyl-[1,3]-dioxolan (DLin-K-DMA), NC98-5 (4,7,13-Tris(3-oxo-3-(undecylamino)propyl)-N1,N1 6-diundecyl-4,7,10,13-tetraazahexadecan-1,16-diamid), (6Z,9Z,28Z,31Z)-Heptatriaconta-6,9,28,31 -tetraen-19-yl-4-(dimethylamino)butanoat (DLin-M-C3-DMA), 3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yloxy)-N,N-dimethylpropan-1-amin (MC3 Ether), 4-((6Z,9Z,28Z,31Z)-Heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yloxy)-N,N-dimethylbutan-1-amin (MC4 Ether), LIPOFECTIN® (kommerziell erhältliche kationische Liposomen umfassend DOTMA und 1,2-

Dioleoyl-sn-3phosphoethanolamin (DOPE), von GIBCO/BRL, Grand Island, N. Y.); LIPOFECTAMINE® (kommerziell erhältliche kationische Liposomen, umfassend N-(1-(2,3-Dioleyloxy)propyl)-N-(2-(sperminecarboxamido)ethyl)-N,N-dimethylammoniumtrifluoracetat (DOSPA) und (DOPE), von GIBCO/BRL); und TRANSFECTAM® (kommerziell erhältliche kationische Lipide, umfassend Dioctadecylamidoglycylcarboxyspermin (DOGS) in Ethanol von Promega Corp., Madison, Wis.) oder eine beliebige Kombination aus den vorgenannten. Weitere geeignete kationische Lipide zur Verwendung in den Zusammensetzungen und Verfahren der Erfindung umfassen diejenigen, die in den internationalen Patentveröffentlichungen WO2010/053572 (und insbesondere Cl 2-200, beschrieben in Absatz [00225]) und WO2012/170930 beschrieben sind, die beide hierin durch Bezugnahme aufgenommen sind, HGT4003, HGT5000, HGTS001, HGT5001, HGT5002 (siehe US20150140070A1).

[0476] In Ausführungsformen kann das kationische Lipid ein Aminolipid sein.

[0477] Repräsentative Aminolipide umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, 1,2-Dilinoleyoxy-3-(dimethylamino)acetoxypropan (DLin-DAC), 1,2-Dilinoleyoxy-3-morpholinopropan (DLin-MA), 1,2-Dilinoleoyl-3-dimethylaminopropan (DLinDAP), 1,2-Dilinoleylthio-3-dimethylaminopropan (DLin-S-DMA), 1-Linoleoyl-2-linoleyloxy-3-dimethylaminopropan (DLin-2-DMAP), 1,2-Dilinoleyloxy-3-trimethylaminopropan-Chloridsalz (DLin-TMA.CI), 1,2-Dilinoleoyl-3-trimethylaminopropan-Chloridsalz (DLin-TAP.CI), 1,2-Dilinoleyloxy-3-(N-methylpiperazino)propan (DLin-MPZ), 3-(N,N-Dilinoleylamino)-1,2-propandiol (DLinAP), 3-(N,N-Dioleylamino)-1,2-propandiol (DOAP), 1,2-Dilinoleyloxo-3-(2-N,N-dimethylamino)ethoxypropan (DLin-EG-DMA) und 2,2-Dilinoleyl-4-dimethylaminomethyl-[1,3]-dioxolan (DLin-K-DMA), 2,2-Dilinoleyl-4-(2-dimethylaminoethyl)-[1,3]-dioxolan (DLin-KC2-DMA); Dilinoleylmethyl-4-dimethylaminobutyrat (DLin-MC3-DMA); MC3 (US20100324120).

[0478] In Ausführungsformen kann das kationische Lipid ein Aminoalkohol-Lipidoid sein.

[0479] Aminoalkohol-Lipidoide, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, können durch die Verfahren hergestellt werden, die in dem US-Patent Nr. 8,450,298 beschrieben sind, das hier durch Bezugnahme vollumfänglich aufgenommen ist. Geeignete (ionisierbare) Lipide können auch die Verbindungen sein, wie sie in den Tabellen 1, 2 und 3 offenbart und in den Ansprüchen 1-24 der WO2017/075531A1 definiert sind, die hiermit durch Bezugnahme aufgenommen wird.

[0480] In einer anderen Ausführungsform können geeignete Lipide auch die Verbindungen sein, wie sie in WO2015/074085A1 (d.h. ATX-001 bis ATX-032 oder die Verbindungen gemäß den Ansprüchen 1-26), den U.S. Anmeldungen Nr. 61/905,724 und 15/614,499 oder den U.S. Patenten Nr. 9,593,077 und 9,567,296 offenbart sind, die hiermit durch Bezugnahme vollumfänglich aufgenommen werden.

[0481] In anderen Ausführungsformen können geeignete kationische Lipide auch die Verbindungen sein, wie sie in WO2017/117530A1 offenbart sind (d.h. die Lipide 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 oder die Verbindungen, wie sie in den Ansprüchen spezifiziert sind), die hiermit durch Bezugnahme vollumfänglich aufgenommen wird.

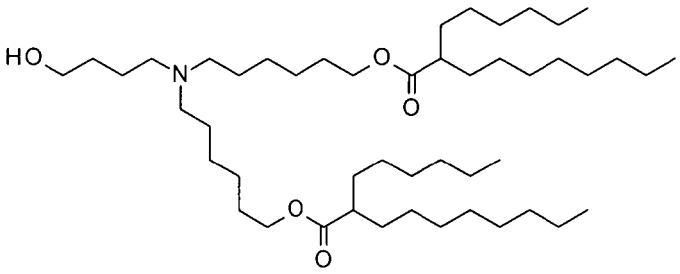
[0482] In bevorzugten Ausführungsformen können ionisierbare oder kationische Lipide auch aus den in WO2018/078053A1 offenbarten Lipiden ausgewählt sein (d.h. Lipide, die von den Formeln I, II und III von WO2018/078053A1 abgeleitet sind, oder Lipide, wie in den Ansprüchen 1 bis 12 von WO2018/078053A1 spezifiziert), wobei die Offenbarung von WO2018/078053A1 hiermit durch Bezugnahme vollumfänglich aufgenommen wird. In diesem Zusammenhang können die in Tabelle 7 von WO2018/078053A1 offenbarten Lipide (z.B. Lipide, die sich von den Formeln I-1 bis I-41 ableiten) und die in Tabelle 8 von WO2018/078053A1 offenbarten Lipide (z.B. Lipide, die sich von den Formeln II-1 bis II-36 ableiten) zweckdienlich im Kontext der Erfindung verwendet werden. Dementsprechend werden die Formeln I-1 bis 1-41 und die Formeln II-1 bis II-36 der W02018/078053A1 und die diesbezügliche spezifische Offenbarung hiermit durch Bezugnahme aufgenommen.

[0483] In bevorzugten Ausführungsformen können die kationischen Lipide von der Formel III der veröffentlichten PCT-Patentanmeldung WO2018/078053A1 abgeleitet sein. Dementsprechend werden die Formel III der WO2018/078053A1 und die spezifische diesbezügliche Offenbarung hiermit durch Bezugnahme aufgenommen.

[0484] In besonders bevorzugten Ausführungsformen ist die mindestens eine mRNA der Zusammensetzung mit einem oder mehreren Lipiden komplexiert, wodurch LNPs gebildet werden, wobei das kationische Lipid des LNPs aus den Strukturen III-1 bis III-36 der Tabelle 9 der veröffentlichten PCT-Patentanmeldung

WO2018/078053A1 ausgewählt ist. Dementsprechend werden die Strukturen III-1 bis III-36 der WO2018/078053A1 und die diesbezügliche spezifische Offenbarung hiermit durch Bezugnahme aufgenommen.

[0485] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des zweiten Aspekts ist die mindestens eine Nukleinsäure (z.B. DNA oder RNA), vorzugsweise die mindestens eine RNA, mit einem oder mehreren Lipiden komplexiert, wodurch LNPs gebildet werden, wobei die LNPs ein kationisches Lipid gemäß Formel III-3 umfassen:



(III-3)

[0486] Das Lipid der Formel 111-3, wie es hier zweckdienlich verwendet wird, hat die chemische Bezeichnung ((4-Hydroxybutyl)azandiyl)bis(hexan-6,1-diyl)bis(2-hexyldecanoat), auch als ALC-0315 bezeichnet.

[0487] In bestimmten Ausführungsformen liegt das kationische Lipid, wie hierin definiert, bevorzugter die kationische Lipidverbindung III-3, in dem LNP in einer Menge von etwa 30 bis etwa 95 Molprozent, bezogen auf den Gesamtlipidgehalt des LNP, vor. Wenn mehr als ein kationisches Lipid in das LNP inkorporiert ist, gelten diese Prozentsätze für die kombinierten kationischen Lipide.

[0488] In Ausführungsformen liegt das kationische Lipid in dem LNP in einer Menge von etwa 30 bis etwa 70 Molprozent vor. In einer Ausführungsform liegt das kationische Lipid in dem LNP in einer Menge von etwa 40 bis etwa 60 Molprozent vor, wie beispielsweise etwa 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 oder 60 Molprozent. In Ausführungsformen liegt das kationische Lipid in dem LNP in einer Menge von etwa 47 bis etwa 48 Molprozent vor, wie beispielsweise etwa 47,0, 47,1, 47,2, 47,3, 47,4, 47,5, 47,6, 47,7, 47,8, 47,9, 48,0 Molprozent, wobei 47,7 Molprozent besonders bevorzugt sind.

[0489] In einigen Ausführungsformen liegt das kationische Lipid in einem Verhältnis von etwa 20 Mol- % bis etwa 70 oder 75 Mol-% oder von etwa 45 bis etwa 65 Mol-% oder etwa 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 oder etwa 70 Mol-% des gesamten im LNP vorhandenen Lipids vor. In weiteren Ausführungsformen umfassen die LNPs etwa 25% bis etwa 75% auf einer molaren Basis an kationischem Lipid, z.B. etwa 20 bis etwa 70%, etwa 35 bis etwa 65%, etwa 45 bis etwa 65%, etwa 60%, etwa 57,5%, etwa 57,1 %, etwa 50% oder etwa 40% auf einer molaren Basis (bezogen auf 100% Gesamtmol Lipid in dem Lipid-Nanopartikel). In einigen Ausführungsformen beträgt das Verhältnis von kationischem Lipid zu mRNA etwa 3 bis etwa 15, wie beispielsweise etwa 5 bis etwa 13 oder etwa 7 bis etwa 11.

[0490] Andere geeignete (kationische oder ionisierbare) Lipide sind offenbart in WO2009/086558, WO2009/127060, WO2010/048536, WO2010/054406, WO2010/088537, WO2010/129709, WO2011/153493 , WO 2013/063468, US2011/0256175, US2012/0128760, US2012/0027803, US8158601, WO2016/118724, WO2016/118725, WO2017/070613, WO2017/070620, WO2017/099823, WO2012/040184, WO2011/153120, WO2011/149733, WO2011/090965, WO2011/043913, WO2011/022460, WO2012/061259, WO2012/054365, WO2012/044638, WO2010/080724, WO2010/21865, WO2008/103276, WO2013/086373, WO2013/086354, US-Patent Nr. 7,893,302, 7,404,969, 8,283,333, 8,466,122 und 8,569,256 und US-Patentveröffentlichung Nr. US2010/0036115, US2012/0202871, US2013/0064894, US2013/0129785, US2013/0150625, US2013/0178541, US2013/0225836, US2014/0039032 und WO2017/112865. In diesem Kontext werden die Offenbarungen von WO2009/086558, WO2009/127060, WO2010/048536, WO2010/054406, WO2010/088537, WO2010/129709, WO2011/153493, WO 2013/063468, US2011/0256175, US2012/0128760, US2012/0027803, US8158601, WO2016/118724, WO2016/118725, WO2017/070613, WO2017/070620, WO2017/099823, WO2012/040184, WO2011/153120, WO2011/149733, WO2011/090965, WO2011/043913, WO2011/022460, WO2012/061259, WO2012/054365, WO2012/044638, WO2010/080724, WO2010/21865, WO2008/103276, WO2013/086373, WO2013/086354, US-Patente Nr. 7,893,302,

7,404,969, 8,283,333, 8,466,122 und 8,569,256 und US-Patentveröffentlichung Nr. US2010/0036115, US2012/0202871, US2013/0064894, US2013/0129785, US2013/0150625, US2013/0178541, US2013/0225836 und US2014/0039032 und WO2017/112865, die sich speziell auf für LNPs geeignete (kationische) Lipide beziehen, hiermit durch Bezugnahme aufgenommen.

[0491] In Ausführungsformen besitzen Amino- oder kationische Lipide, wie hierin definiert, mindestens eine protonierbare oder deprotonierbare Gruppe, so dass das Lipid bei einem pH-Wert bei oder unter dem physiologischen pH-Wert (z.B. pH 7,4) positiv geladen ist und bei einem zweiten pH-Wert, vorzugsweise bei oder über dem physiologischen pH-Wert, neutral ist. Es versteht sich von selbst, dass die Addition oder das Entfernen von Protonen in Abhängigkeit vom pH-Wert ein Gleichgewichtsprozess ist, und dass die Bezugnahme auf ein geladenes oder ein neutrales Lipid sich auf die Natur der vorherrschenden Spezies bezieht und nicht erfordert, dass alle Lipide in der geladenen oder neutralen Form vorliegen müssen. Lipide mit mehr als einer protonierbaren oder deprotonierbaren Gruppe oder zwitterionische Lipide sind nicht ausgenommen und können im Kontext der vorliegenden Erfindung ebenfalls geeignet sein. In einigen Ausführungsformen haben die protonierbaren Lipide einen pKa-Wert der protonierbaren Gruppe im Bereich von etwa 4 bis etwa 11, z.B. einen pKa von etwa 5 bis etwa 7.

[0492] LNPs können zwei oder mehr (unterschiedliche) kationische Lipide, wie hier definiert, umfassen. Die kationischen Lipide können so ausgewählt sein, dass sie zu verschiedenen vorteilhaften Eigenschaften beitragen. Zum Beispiel können kationische Lipide, die sich in Eigenschaften, wie beispielsweise dem Amin-pKa-Wert, der chemischen Stabilität, der Halbwertszeit im Kreislauf, Halbwertszeit im Gewebe, Nettoakkumulation im Gewebe oder Toxizität, unterscheiden, im LNP verwendet werden. Insbesondere können die kationischen Lipide so gewählt werden, dass die Eigenschaften des Misch-LNP wünschenswerter sind als die Eigenschaften eines Einzel-LNP aus einzelnen Lipiden.

[0493] Die Menge des permanent kationischen Lipids oder Lipidoids kann unter Berücksichtigung der Menge der Nukleinsäurefracht ausgewählt sein. In einer Ausführungsform werden diese Mengen so gewählt, dass sich ein N/P-Verhältnis des/der Nanopartikel(s) oder der Zusammensetzung im Bereich von etwa 0,1 bis etwa 20 ergibt. In diesem Zusammenhang ist das N/P-Verhältnis definiert als das Molverhältnis der Stickstoffatome („N“) der basischen stickstoffhaltigen Gruppen des Lipids oder Lipidoids zu den Phosphatgruppen („P“) der Nukleinsäure, die als Fracht („Cargo“) verwendet wird. Das N/P-Verhältnis kann auf der Grundlage berechnet werden, dass z.B. 1 ug RNA typischerweise etwa 3 nmol Phosphatreste enthält, vorausgesetzt, die RNA weist eine statistische Verteilung der Basen auf. Der „N“-Wert des Lipids oder Lipidoids kann auf der Grundlage seines Molekulargewichts und des relativen Gehalts an permanent kationischen und - falls vorhanden - kationisierbaren Gruppen berechnet werden.

[0494] Die In-vivo-Eigenschaften und das Verhalten von LNPs können durch Aufbringen einer hydrophilen Polymerbeschichtung, z.B. Polyethylenglykol (PEG), auf die LNP-Oberfläche modifiziert werden, um eine sterische Stabilisierung zu erreichen. Darüber hinaus können LNPs für ein spezifisches Targeting verwendet werden, indem Liganden (z.B. Antikörper, Peptide und Kohlenhydrate) an ihre Oberfläche oder an das terminale Ende der angehängten PEG-Ketten (z.B. über PEGylierte Lipide oder PEGyliertes Cholesterol) gebunden werden.

[0495] In einigen Ausführungsformen umfassen die LNPs ein Polymer-konjugiertes Lipid. Der Begriff „Polymer-konjugiertes Lipid“ bezieht sich auf ein Molekül, das sowohl einen Lipidanteil als auch einen Polymeranteil umfasst. Ein Beispiel für ein Polymer-konjugiertes Lipid ist ein PEGyliertes Lipid. Der Begriff „PEGyliertes Lipid“ bezieht sich auf ein Molekül, das sowohl einen Lipidanteil als auch einen Polyethylenglykolanteil umfasst. PEGylierte Lipide sind auf dem Gebiet bekannt und umfassen 1-(Monomethoxypolyethylenglykol)-2,3-dimyristoylglycerin (PEG-s-DMG) und dergleichen.

[0496] Ein Polymer-konjugiertes Lipid, wie hier definiert, z.B. ein PEG-Lipid, kann als Aggregations-reduzierendes Lipid dienen.

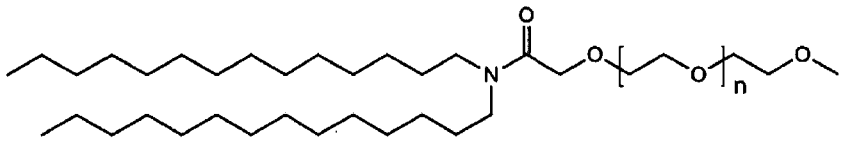
[0497] In bestimmten Ausführungsformen umfasst das LNP ein stabilisierendes Lipid, das ein Polyethylenglykol-Lipid (PEGyliertes Lipid) ist. Geeignete Polyethylenglykol-Lipide umfassen PEG-modifiziertes Phosphatidylethanolamin, PEG-modifizierte Phosphatidsäure, PEG-modifizierte Ceramide (z.B. PEG-CerC14 oder PEG-CerC20), PEG-modifizierte Dialkylamine, PEG-modifizierte Diacylglycerine und PEG-modifizierte Dialkylglycerine. Repräsentative Polyethylenglykol-Lipide umfassen PEG-c-DOMG, PEG-c-DMA und PEG-s-DMG. In einer Ausführungsform ist das Polyethylenglykol-Lipid N-[(Methoxypoly(ethylenglykol)2000)carbamyl]-1,2-dimyristyloxlpropyl-3-amin (PEG-c-DMA). In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Polyethy-

lenglykol-Lipid PEG-2000-DMG. In einer Ausführungsform ist das Polyethylenglykol-Lipid PEG-c-DOMG. In anderen Ausführungsformen umfassen die LNPs ein PEGyliertes Diacylglycerin (PEG-DAG), wie beispielsweise 1-(Monomethoxypolyethylenglycol)-2,3-dimyristoylglycerin (PEG-DMG), ein PEGyliertes Phosphatidylethanoloamin (PEG-PE), ein PEG-Succinatdiacylglycerin (PEG-S-DAG), wie beispielsweise 4-O-(2',3'-Di(tetradecanoyloxy)propyl-1-O-(ω-methoxy(polyethoxy)ethyl)butandioat (PEG-S-DMG), ein PEGyliertes Ceramid (PEG-cer) oder ein PEG-Dialkoxypropylcarbamat, wie beispielsweise ω-Methoxy(polyethoxy)ethyl-N-(2,3di (tetradecanoxy)propyl)carbamat oder 2,3-Di(tetradecanoxy)propyl-N-(ω-methoxy(polyethoxy)ethyl)carbamat.

[0498] In bevorzugten Ausführungsformen ist das PEGylierte Lipid vorzugsweise von der Formel (IV) der veröffentlichten PCT-Patentanmeldung WO2018/078053A1 abgeleitet. Dementsprechend werden PEGylierte Lipide, die von der Formel (IV) der veröffentlichten PCT-Patentanmeldung WO2018/078053A1 abgeleitet sind, und die entsprechende diesbezügliche Offenbarung hiermit durch Bezugnahme aufgenommen.

[0499] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die mindestens eine mRNA der Zusammensetzung mit mehreren Lipiden komplexiert, wodurch LNPs gebildet werden, wobei das LNP ein PEGyliertes Lipid umfasst, wobei das PEG-Lipid von der Formel (IVa) der veröffentlichten PCT-Patentanmeldung WO2018/078053A1 abgeleitet ist. Dementsprechend wird das PEGylierte Lipid, das sich von der Formel (IVa) der veröffentlichten PCT-Patentanmeldung WO2018/078053A1 ableitet, und die entsprechende diesbezügliche Offenbarung hiermit durch Bezugnahme aufgenommen.

[0500] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die mindestens eine mRNA mit mehreren Lipiden komplexiert, wodurch Lipid-Nanopartikel (LNP) gebildet werden, wobei das LNP ein PEGyliertes Lipid / PEG-Lipid umfasst. Vorzugsweise hat das PEG-Lipid die Formel (IVa):



(IVa)

wobei n einen Mittelwert im Bereich von 30 bis 60 hat, wie zum Beispiel etwa 30±2, 32±2, 34±2, 36±2, 38±2, 40±2, 42±2, 44±2, 46±2, 48±2, 50±2, 52±2, 54±2, 56±2, 58±2 oder 60±2. In einer am meisten bevorzugten Ausführungsform ist n etwa 49. In weiteren bevorzugten Aspekten besitzt das PEG-Lipid die Formel (IVa), wobei n eine ganze Zahl ist, die so gewählt ist, dass das mittlere Molekulargewicht des PEG-Lipids etwa 2000 g/mol bis etwa 3000 g/mol oder etwa 2300 g/mol bis etwa 2700 g/mol, noch bevorzugter etwa 2500 g/mol, beträgt.

[0501] Das Lipid der Formel IVa, wie es hier geigneterweise verwendet wird, besitzt die chemische Bezeichnung 2[(Polyethylenglykol)-2000)-N,N-ditetradecylacetamid, auch als ALC-0159 bezeichnet.

[0502] Weitere Beispiele für PEG-Lipide, die in diesem Zusammenhang geeignet sind, sind in US2015/0376115A1 und WO2015/199952 gegeben, die jeweils durch Bezugnahme vollumfänglich aufgenommen werden.

[0503] In einigen Ausführungsformen enthalten LNPs weniger als etwa 3, 2 oder 1 Molprozent PEG oder PEG-modifiziertes Lipid, bezogen auf die Gesamtmolzahl des Lipids im LNP. In weiteren Ausführungsformen umfassen LNPs von etwa 0,1% bis etwa 20% des PEG-modifizierten Lipids auf Molbasis, z.B. etwa 0,5 bis etwa 10%, etwa 0,5 bis etwa 5%, etwa 10%, etwa 5%, etwa 3,5%, etwa 3%, etwa 2,5%, etwa 2%, etwa 1,5%, etwa 1%, etwa 0,5% oder etwa 0,3% auf Molbasis (bezogen auf 100% Gesamtmole der Lipide im LNP). In bevorzugten Ausführungsformen umfassen die LNPs etwa 1,0% bis etwa 2,0% des PEG-modifizierten Lipids auf Molbasis, z.B, etwa 1,2 bis etwa 1,9%, etwa 1,2 bis etwa 1,8%, etwa 1,3 bis etwa 1,8%, etwa 1,4 bis etwa 1,8%, etwa 1,5 bis etwa 1,8%, etwa 1,6 bis etwa 1,8%, insbesondere etwa 1,4%, etwa 1,5%, etwa 1,6%, etwa 1,7%, etwa 1,8%, etwa 1,9%, am meisten bevorzugt 1,7% (bezogen auf 100% Gesamtmole der Lipide im LNP). In verschiedenen Ausführungsformen liegt das Molverhältnis des kationischen Lipids zu dem PEGylierten Lipid im Bereich von etwa 100:1 bis etwa 25:1.

[0504] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst das LNP ein oder mehrere zusätzliche Lipide, die die Bildung der Partikel während ihrer Bildung oder während des Herstellungsprozesses stabilisieren (z.B. neutrales Lipid und/oder ein oder mehrere Steroide oder Steroidanaloga).

[0505] In bevorzugten Ausführungsformen des zweiten Aspekts ist die mindestens eine mRNA mit einem oder mehreren Lipiden komplexiert, wodurch Lipid-Nanopartikel (LNP) gebildet werden, wobei die LNPs ein oder mehrere neutrale Lipide und ein oder mehrere Steroide oder Steroidanaloga umfassen.

[0506] Geeignete stabilisierende Lipide umfassen neutrale Lipide und anionische Lipide. Der Begriff „neutrales Lipid“ bezieht sich auf irgendein beliebiges Lipid aus einer Reihe von Lipidspezies, die bei physiologischem pH-Wert entweder in einer ungeladenen oder neutralen zwitterionischen Form vorliegen. Beispielhafte neutrale Lipide umfassen Diacylphosphatidylcholine, Diacylphosphatidylethanolamine, Ceramide, Sphingomyeline, Dihydrosphingomyeline, Cephaline und Cerebroside.

[0507] In Ausführungsformen des zweiten Aspekts umfasst das LNP ein oder mehrere neutrale Lipide, wobei das neutrale Lipid ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Distearoylphosphatidylcholin (DSPC), Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC) Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), Dioleoylphosphatidylglycerin (DOPG), Dipalmitoylphosphatidylglycerin (DPPG), Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE), Palmitoyloleoylphosphatidylcholin (POPC), Palmitoyloleoylphosphatidylethanolamin (POPE) und Dioleoylphosphatidylethanolamin-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat (DOPE-mal), Dipalmitoylphosphatidylethanolamin (DPPE), Dimyristoylphosphoethanolamin (DMPE), Distearoylphosphatidylethanolamin (DSPE), 16-O-Monomethyl-PE, 16-O-Dimethyl-PE, 18-1-trans-PE, 1-Stearioyl-2-oleoylphosphatidyethanolamin (SOPE) und 1,2-Dielaidoyl-sn-glycero-3-phophoethanolamin (transDOPE) oder Mischungen davon.

[0508] In einigen Ausführungsformen umfassen die LNPs ein neutrales Lipid, ausgewählt aus DSPC, DPPC, DMPC, DOPC, POPC, DOPE und SM. In verschiedenen Ausführungsformen liegt das Molverhältnis des kationischen Lipids zum neutralen Lipid in einem Bereich von etwa 2:1 bis etwa 8:1.

[0509] In bevorzugten Ausführungsformen ist das neutrale Lipid 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DSPC). Das Molverhältnis des kationischen Lipids zu DSPC kann im Bereich von etwa 2:1 bis etwa 8:1 liegen.

[0510] In bevorzugten Ausführungsformen ist das Steroid Cholesterol. Das Molverhältnis des kationischen Lipids zu Cholesterol kann im Bereich von etwa 2:1 bis etwa 1:1 liegen. In einigen Ausführungsformen kann das Cholesterol PEGyliert sein.

[0511] Das Sterol kann etwa 10 Mol-% bis etwa 60 Mol-% oder etwa 25 Mol-% bis etwa 40 Mol-% des Lipidpartikels ausmachen. In einer Ausführungsform beträgt das Sterol etwa 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 oder etwa 60 Mol-% des im Lipidpartikel vorhandenen Gesamtlipids. In einer anderen Ausführungsform enthalten die LNPs etwa 5% bis etwa 50%, auf Molbasis, des Sterols, z.B. etwa 15% bis etwa 45%, etwa 20% bis etwa 40%, etwa 48%, etwa 40%, etwa 38,5%, etwa 35%, etwa 34,4%, etwa 31,5% oder etwa 31%, auf Molbasis, (bezogen auf 100% Gesamtmole des Lipids im Lipid-Nanopartikel).

[0512] Vorzugsweise umfassen die Lipid-Nanopartikel (LNPs): (a) die mindestens eine mRNA, (b) ein kationisches Lipid, (c) ein Aggregations-reduzierendes Mittel (wie zum Beispiel Polyethylenglykol (PEG)-Lipid oder PEG-modifiziertes Lipid), (d) optional ein nicht-kationisches Lipid (wie zum Beispiel ein neutrales Lipid) und (e) optional ein Sterol.

[0513] In einigen Ausführungsformen können die kationischen Lipide (wie oben definiert), nichtkationischen Lipide (wie oben definiert), Cholesterol (wie oben definiert) und/oder PEG-modifizierte Lipide (wie oben definiert) in verschiedenen relativen Molverhältnissen kombiniert werden. Zum Beispiel kann das Verhältnis von kationischem Lipid zu nicht-kationischem Lipid zu Lipid auf Cholesterolbasis zu PEGyliertem Lipid etwa 30-60:20-35:20-30:1-15 betragen, oder in einem Verhältnis von etwa 40:30:25:5, 50:25:20:5, 50:27:20:3, 40:30:20:10, 40:32:20:8, 40:32:25:3 oder 40:33:25:2 oder in einem Verhältnis von etwa 50:25:20:5, 50:20:25:5, 50:27:20:3, 40:30:20:10, 40:30:25:5 oder 40:32:20:8, 40:32:25:3 bzw. 40:33:25:2 vorliegen.

[0514] In einigen Ausführungsformen umfassen die LNPs ein Lipid der Formel (III), die mindestens eine mRNA, wie hier definiert, ein neutrales Lipid, ein Steroid und ein PEGyliertes Lipid. In bevorzugten Ausführungsformen ist das Lipid der Formel (III) die Lipidverbindung III-3 (ALC-0315), das neutrale Lipid ist DSPC, das Steroid ist Cholesterol, und das PEGylierte Lipid ist die Verbindung der Formel (IVa) (ALC-0159).

[0515] In einer bevorzugten Ausführungsform des zweiten Aspekts besteht das LNP im Wesentlichen aus (i) mindestens einem kationischen Lipid; (ii) einem neutralen Lipid; (iii) einem Sterol, z.B. Cholesterol; und (iv) einem PEG-Lipid, z.B. PEG-DMG oder PEG-cDMA, in einem Molverhältnis von etwa 20-60% kationischem Lipid: 5-25% neutralem Lipid: 25-55% Sterol: 0,5-15% PEG-Lipid.

[0516] In besonders bevorzugten Ausführungsformen ist die mindestens eine mRNA mit einem oder mehreren Lipiden komplexiert, wodurch Lipid-Nanopartikel (LNP) gebildet werden, wobei das LNP umfasst:

(i) mindestens ein kationisches Lipid, wie hier definiert, vorzugsweise ein Lipid der Formel (III), besonders bevorzugt Lipid III-3 (ALC-0315);

(ii) mindestens ein neutrales Lipid, wie hierin definiert, vorzugsweise 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DSPC);

(iii) mindestens ein Steroid oder Steroidanalogon, wie hierin definiert, vorzugsweise Cholesterol; und

(iv) mindestens ein PEG-Lipid, wie hierin definiert, z.B. PEG-DMG oder PEG-cDMA, vorzugsweise ein PEGyliertes Lipid, das der Formel (IVa) (ALC-0159) entspricht oder davon abgeleitet ist.

[0517] In besonders bevorzugten Ausführungsformen ist die mindestens eine mRNA mit einem oder mehreren Lipiden komplexiert, wodurch Lipid-Nanopartikel (LNP) gebildet werden, wobei das LNP (i) bis (iv) in einem Molverhältnis von etwa 20-60% kationischem Lipid: 5-25% neutralem Lipid: 25-55% Sterol: 0,5-15% PEG-Lipid umfasst.

[0518] In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Lipid-Nanopartikel: ein kationisches Lipid mit der Formel (III) und/oder PEG-Lipid mit der Formel (IV), optional ein neutrales Lipid, vorzugsweise 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DSPC) und optional ein Steroid, vorzugsweise Cholesterol, wobei das Molverhältnis des kationischen Lipids zu DSPC optional im Bereich von etwa 2:1 bis 8:1 liegt, wobei das Molverhältnis des kationischen Lipids zu Cholesterol optional im Bereich von etwa 2:1 bis 1:1 liegt.

[0519] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst die Zusammensetzung des zweiten Aspekts, welche die mindestens eine mRNA umfasst, Lipid-Nanopartikel (LNPs), die ein Molverhältnis von etwa 50:10:38,5:1,5, bevorzugt 47,5:10:40,8:1,7 oder bevorzugter 47,4:10:40,9:1,7 (d.h. Verhältnis (Mol-%) von kationischem Lipid (vorzugsweise Lipid III-3 (ALC-0315)), DSPC, Cholesterol und PEG-Lipid (vorzugsweise PEG-Lipid der Formel (IVa) mit n = 49, noch bevorzugter PEG-Lipid der Formel (IVa) mit n = 45 (ALC-0159)); solubilisiert in Ethanol) aufweisen.

[0520] Die Zusammensetzung des zweiten Aspekts kann mindestens eine mRNA umfassen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz der SEQ ID NO: 163 ist, formuliert in Lipid-Nanopartikel (LNPs), die ein Molverhältnis von etwa 50:10:38,5:1,5, bevorzugt 47,5:10:40,8:1,7 oder bevorzugter 47,4:10:40,9:1,7, d.h. Verhältnis (Mol-%) von kationischem Lipid III-3 (ALC-0315), DSPC, Cholesterol und PEG-Lipid der Formel (IVa) (mit n = 49 oder mit n = 45 (ALC-0159)) aufweisen. Die mRNA ist nicht chemisch modifiziert.

[0521] Die Zusammensetzung des zweiten Aspekts kann mindestens eine mRNA, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz der SEQ ID NO: 149 ist, formuliert in Lipid-Nanopartikel (LNPs), die ein Molverhältnis von etwa 50:10:38,5:1,5, bevorzugt von 47,5:10:40,8:1,7 oder bevorzugter 47,4:10:40,9:1,7, d.h. Verhältnis (Mol-%) von kationischem Lipid III-3 (ALC-0315), DSPC, Cholesterol und PEG-Lipid der Formel (IVa) (mit n = 49 oder mit n = 45 (ALC-0159)), aufweisen. IDie mRNA ist nicht chemisch modifiziert.

[0522] Die Zusammensetzung des zweiten Aspekts kann mindestens eine mRNA umfassen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz der SEQ ID NO: 24837 ist, formuliert in Lipid-Nanopartikel (LNPs), die ein Molverhältnis von etwa 50:10:38,5:1,5, bevorzugt 47,5:10:40,8:1,7 oder bevorzugter 47,4:10:40,9:1,7, d.h. Verhältnis (Mol-%) von kationischem Lipid III-3 (ALC-0315), DSPC, Cholesterol und PEG-Lipid der Formel (IVa) (mit n = 49 oder mit n = 45) (ALC-0159), aufweisen. Die mRNA ist nicht chemisch modifiziert.

[0523] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst die Zusammensetzung des zweiten Aspekts mindestens eine mRNA, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz der SEQ ID NOs: 23311, 23531 oder 24851 ist, formuliert in Lipid-Nanopartikel (LNPs), die ein Molverhältnis von etwa 50:10:38,5:1,5, bevorzugt 47,5:10:40,8:1,7 oder bevorzugter 47,4:10:40,9:1,7, d.h. Verhältnis (Mol-%) von kationischem Lipid III-3 (ALC-0315), DSPC, Cholesterol und PEG-Lipid der Formel (IVa) (mit n = 49 oder mit n = 45) (ALC-0159), aufweisen. In dieser bevorzugten Ausführungsform ist die mRNA nicht chemisch modifiziert.

[0524] Die Zusammensetzung des zweiten Aspekts kann mindestens eine mRNA umfassen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz der SEQ ID NOs: 23310, 23530, 23313 oder 23533 ist, formuliert in Lipid-Nanopartikel (LNPs), die ein Molverhältnis von etwa 50:10:38,5:1,5, bevorzugt 47,5:10:40,8:1,7 oder bevorzugter 47,4:10:40,9:1,7, d.h. Verhältnis (Mol-%) von kationischem Lipid III-3 (ALC-0315), DSPC, Cholesterol und PEG-Lipid der Formel (IVa) (mit n = 49 oder mit n = 45) (ALC-0159), aufweisenDie mRNA ist nicht chemisch modifiziert.

[0525] In Ausführungsformen, in denen die Zusammensetzung eine multivalente Zusammensetzung, wie oben definiert, ist, können die RNA-Spezies der multivalenten Zusammensetzung, getrennt formuliert, vorzugsweise getrennt in Liposomen oder LNPs formuliert sein. Geeigneterweise sind die RNA-Spezies der multivalenten Zusammensetzung getrennt in LNPs formuliert, die ein Molverhältnis von etwa 50:10:38,5:1,5, bevorzugt 47,5:10:40,8:1,7 oder bevorzugter 47,4:10:40,9:1,7, d.h. Verhältnis (Mol-%) von kationischem Lipid III-3 (ALC-0315), DSPC, Cholesterol und PEG-Lipid der Formel (IVa) (mit n = 49 oder mit n = 45), aufweisen. Nukleinsäurespezies für multivalente Zusammensetzungen sind vorzugsweise wie oben definiert ausgewählt (siehe Abschnitt „Multivalente Zusammensetzungen der Erfindung“).

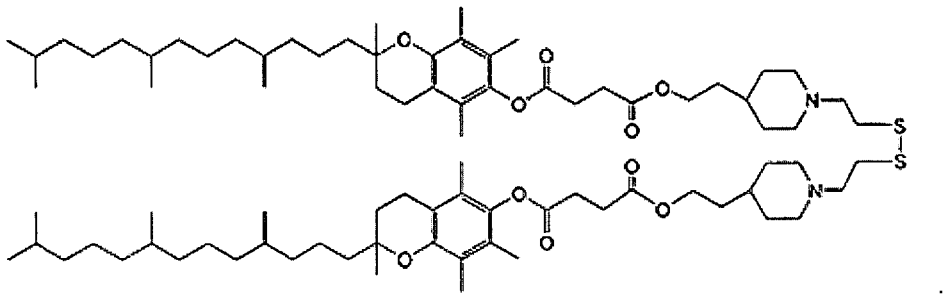
[0526] In Ausführungsformen, in denen die Zusammensetzung eine multivalente Zusammensetzung, wie oben definiert, ist, können die RNA-Spezies der multivalenten Zusammensetzung, co-formuliert, vorzugsweise co-formuliert in Liposomen oder LNPs sein. Geeigneterweise sind die RNA-Spezies der multivalenten Zusammensetzung in LNPs co-formuliert, die ein Molverhältnis von etwa 50:10:38,5:1,5, bevorzugt 47,5:10:40,8:1,7 oder bevorzugter 47,4:10:40,9:1,7, d.h. Verhältnis (Mol-%) von kationischem Lipid III-3 (ALC-0315), DSPC, Cholesterol und PEG-Lipid der Formel (IVa) (mit n = 49 oder mit n = 45), aufweisen.

[0527] Die Nukleinsäure-Spezies für multivalente Zusammensetzungen sind vorzugsweise wie oben definiert ausgewählt (siehe Abschnitt „Multivalente Zusammensetzungen der Erfindung“).

[0528] Die Gesamtmenge der Nukleinsäure in den Lipid-Nanopartikeln kann variieren und wird z.B. in Abhängigkeit vom Verhältnis der Nukleinsäure zum Gesamtlipid (Gew./Gew.) definiert. In einer Ausführungsform der Erfindung beträgt das Verhältnis der mRNA zum Gesamtlipid weniger als 0,06 Gew./Gew. und liegt vorzugsweise zwischen 0,03 Gew./Gew. und 0,04 Gew./Gew..

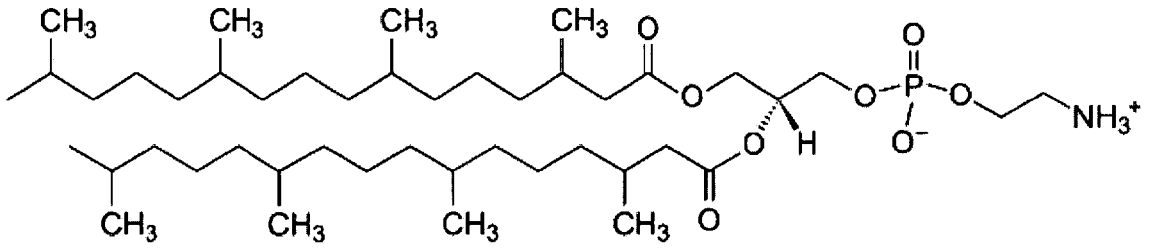
[0529] In einigen Ausführungsformen bestehen die Lipid-Nanopartikel (LNPs) aus nur drei Lipidkomponenten, nämlich Imidazol-Cholesterolester (ICE), 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin (DOPE) und 1,2-Dimyristoyl-sn-glycerol, Methoxypolyethylenglycol (DMG-PEG-2K).

[0530] In einer Ausführungsform umfasst das Lipid-Nanopartikel der Zusammensetzung ein kationisches Lipid, ein Steroid; ein neutrales Lipid; und ein Polymer-konjugiertes Lipid, vorzugsweise ein pegyliertes Lipid. Vorzugsweise ist das Polymer-konjugierte Lipid ein pegyliertes Lipid oder PEG-Lipid. In einer spezifischen Ausführungsform umfassen die Lipid-Nanopartikel ein kationisches Lipid, das dem kationischen Lipid COATSOME@ SS-EC (früherer Name: SS-33/4PE-15; NOF Corporation, Tokio, Japan) gemäß der folgenden Formel ähnelt

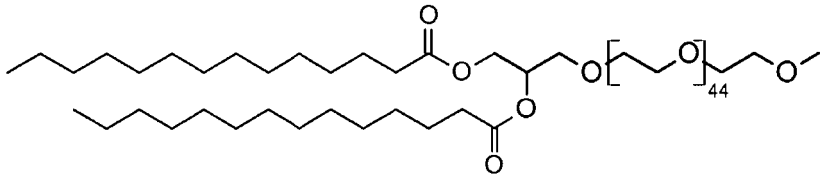


[0531] Wie weiter unten beschrieben, werden diese Lipid-Nanopartikel als „GN01“ bezeichnet.

[0532] Ferner umfassen in einer spezifischen Ausführungsform die GN01-Lipid-Nanopartikel ein neutrales Lipid, das der Struktur 1,2-Diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin (DPhyPE) ähnelt:



[0533] Ferner umfassen in einer spezifischen Ausführungsform die GN01-Lipid-Nanopartikel ein Polymer-konjugiertes Lipid, vorzugsweise ein pegyliertes Lipid, das 1,2-Dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylenglycol 2000 (DMG-PEG 2000) mit der folgenden Struktur ist:



[0534] Wie im Stand der Technik verwendet, wird „DMG-PEG 2000“ als eine Mischung aus 1,2-DMG-PEG2000 und 1,3-DMG-PEG2000 im Verhältnis -97:3 betrachtet.

[0535] Dementsprechend umfassen GN01-Lipid-Nanopartikel (GN01-LNPs) gemäß einer der bevorzugten Ausführungsformen ein kationisches SS-EC-Lipid, neutrales Lipid DPhyPE, Cholesterol und das Polymer-konjugierte Lipid (pegylierte Lipid) 1,2-Dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylenglycol (PEG-DMG).

[0536] In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die GN01-LNPs:

(a) kationisches Lipid SS-EC (früherer Name: SS-33/4PE-15; NOF Corporation, Tokyo, Japan) in einer Menge von 45-65 Mol-%;

(b) Cholesterol in einer Menge von 25-45 Mol-%;

(c) DPhyPE in einer Menge von 8-12 Mol-%; und

(d) PEG-DMG 2000 in einer Menge von 1-3 Mol-%;

wobei sich jede Menge auf die Gesamtmolmenge aller lipidischen Hilfsstoffe der GN01-Lipid-Nanopartikel bezieht.

[0537] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfassen die GN01-Lipid-Nanopartikel, wie hierin beschrieben, 59 Mol-% kationisches Lipid, 10 Mol-% neutrales Lipid, 29,3 Mol-% Steroid und 1,7 Mol-% Polymer-konjugiertes Lipid, vorzugsweise pegyliertes Lipid. In einer am meisten bevorzugten Ausführungsform

umfassen die GN01-Lipid-Nanopartikel, wie hierin beschrieben, 59 Mol-% kationisches Lipid SS-EC, 10 Mol-% DPhyPE, 29,3 Mol-% Cholesterol und 1,7 Mol-% DMG-PEG 2000.

[0538] Die Menge des kationischen Lipids im Verhältnis zu der Menge der Nukleinsäure in dem GN01-Lipid-Nanopartikel kann auch als Gewichtsverhältnis (abgekürzt z.B. „m/m“) ausgedrückt werden. Zum Beispiel umfassen die GN01-Lipid-Nanopartikel die mindestens eine Nukleinsäure, vorzugsweise die mindestens eine RNA, in einer solchen Menge, dass ein Gewichtsverhältnis von Lipid zu RNA im Bereich von etwa 20 bis etwa 60 oder etwa 10 bis etwa 50 erreicht wird. In anderen Ausführungsformen beträgt das Verhältnis von kationischem Lipid zu Nukleinsäure oder RNA etwa 3 bis etwa 15, wie beispielsweise etwa 5 bis etwa 13, etwa 4 bis etwa 8 oder etwa 7 bis etwa 11. In einer sehr bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung beträgt das Gesamtlipid/RNA-Massenverhältnis etwa 40 oder 40, d.h. 40-facher oder etwa 40-facher Massenüberschuss, um die RNA-Verkapselung zu gewährleisten. Ein weiteres bevorzugtes RNA/Lipid-Verhältnis liegt zwischen etwa 1 und etwa 10, etwa 2 und etwa 5, etwa 2 und etwa 4 oder beträgt vorzugsweise etwa 3.

[0539] Ferner kann die Menge des kationischen Lipids unter Berücksichtigung der Menge der Nukleinsäurefracht, wie z.B. der RNA-Verbindung, ausgewählt werden. In einer Ausführungsform kann das N/P-Verhältnis im Bereich von etwa 1 bis etwa 50 liegen. In einer anderen Ausführungsform liegt der Bereich bei etwa 1 bis etwa 20, etwa 1 bis etwa 10, etwa 1 bis etwa 5. In einer bevorzugten Ausführungsform sind diese Mengen so gewählt, dass sich ein N/P-Verhältnis der GN01-Lipid-Nanopartikel oder der Zusammensetzung im Bereich von etwa 10 bis etwa 20 ergibt. In einer weiteren sehr bevorzugten Ausführungsform beträgt das N/P-Verhältnis 14 (d.h. 14-facher molarer Überschuss an positiver Ladung, um die Verkapselung der Nukleinsäure zu gewährleisten).

[0540] In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die GN01-Lipid-Nanopartikel 59 Mol-% kationisches Lipid COATSOME® SS-EC (früherer Name: SS-33/4PE-15, wie aus dem Beispiel-Abschnitt ersichtlich; NOF Corporation, Tokio, Japan), 29,3 Mol-% Cholesterol als Steroid, 10 Mol-% DPhyPE als neutrales Lipid/Phospholipid und 1,7 Mol-% DMG-PEG 2000 als Polymer-konjugiertes Lipid. Ein weiterer erfindungsgemäßer Vorteil, der mit der Verwendung von DPhyPE verbunden ist, ist die hohe Fähigkeit zur Fusogenität aufgrund seiner sperrigen Schwänze, wodurch es in der Lage ist, in hohem Maße mit endosomalen Lipiden zu fusionieren. Für „GN01“ beträgt das N/P-Verhältnis (Molverhältnis Lipid zu Nukleinsäure, z.B. RNA) bevorzugt 14, und das Gesamtlipid/RNA-Massenverhältnis beträgt vorzugsweise 40 (m/m).

[0541] In anderen Ausführungsformen ist die mindestens eine Nukleinsäure (z.B. DNA oder RNA), vorzugsweise die mindestens eine RNA, mit einem oder mehreren Lipiden komplexiert, wodurch Lipid-Nanopartikel (LNP) gebildet werden, wobei die LNPs umfassen:

I mindestens ein kationisches Lipid;

Ii mindestens ein neutrales Lipid;

Iii mindestens ein Steroid oder Steroidanalogon; und

Iiii mindestens ein PEG-Lipid, wie hierin definiert,

wobei das kationische Lipid DLin-KC2-DMA (50 Mol-%) oder DLin-MC3-DMA (50 Mol-%) ist, das neutrale Lipid DSPC (10 Mol-%) ist, das PEG-Lipid PEG-DOMG (1,5 Mol-%) ist und das Strukturlipid Cholesterol (38,5 Mol-%) ist.

[0542] In anderen Ausführungsformen ist die mindestens eine mRNA, mit einem oder mehreren Lipiden komplexiert ist, wodurch Lipid-Nanopartikel (LNP) gebildet werden, wobei die LNPs SS15/Chol/DOPE (oder DOPC)/DSG-5000 im Verhältnis 50/38,5/10/1,5 in Mol-% umfassen.

[0543] In anderen Ausführungsformen kann die erfindungsgemäße Nukleinsäure in Liposomen formuliert sein, z.B. in Liposomen, wie in WO2019/222424, WO2019/226925, WO2019/232095, WO2019/232097 oder WO2019/232208 beschrieben, wobei die Offenbarung von WO2019/2224, WO2019/226925, WO2019/232095, WO2019/232097 oder WO2019/232208, die sich auf Liposomen oder lipidbasierte Trägermoleküle bezieht, hiermit durch Bezugnahme aufgenommen wird.

[0544] In verschiedenen Ausführungsformen haben LNPs, die in geeigneter Weise die mindestens eine Nukleinsäure der Erfindung verkapseln, einen mittleren Durchmesser von etwa 50 nm bis etwa 200 nm, von etwa 60 nm bis etwa 200 nm, von etwa 70 nm bis etwa 200 nm, von etwa 80 nm bis etwa 200 nm, von etwa 90 nm

bis etwa 200 nm, von etwa 90 nm bis etwa 190 nm, von etwa 90 nm bis etwa 180 nm, von etwa 90 nm bis etwa 170 nm, von etwa 90 nm bis etwa 160 nm, von etwa 90 nm bis etwa 150 nm von etwa 90 nm bis etwa 140 nm, von etwa 90 nm bis etwa 130 nm, von etwa 90 nm bis etwa 120 nm, von etwa 90 nm bis etwa 100 nm, von etwa 70 nm bis etwa 90 nm, von etwa 80 nm bis etwa 90 nm, von etwa 70 nm bis etwa 80 nm, oder etwa 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 105 nm, 110 nm, 115 nm, 120 nm, 125 nm, 130 nm, 135 nm, 140 nm, 145 nm, 150 nm, 160 nm, 170 nm, 180 nm, 190 nm oder 200 nm und sind im Wesentlichen nicht toxisch. Wie hier verwendet, kann der mittlere Durchmesser durch den z-Mittelwert dargestellt werden, wie er durch dynamische Lichtstreuung bestimmt wird, wie auf dem Gebiet allgemein bekannt.

[0545] Der Polydispersitätsindex (PDI) der Nanopartikel liegt typischerweise im Bereich von 0,1 bis 0,5. In einer besonderen Ausführungsform liegt der PDI unter 0,2. Typischerweise wird der PDI durch dynamische Lichtstreuung bestimmt.

[0546] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung haben die Lipid-Nanopartikel einen hydrodynamischen Durchmesser im Bereich von etwa 50 nm bis etwa 300 nm oder von etwa 60 nm bis etwa 250 nm, von etwa 60 nm bis etwa 150 nm bzw. von etwa 60 nm bis etwa 120 nm.

[0547] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung haben die Lipid-Nanopartikel einen hydrodynamischen Durchmesser im Bereich von etwa 50 nm bis etwa 300 nm oder von etwa 60 nm bis etwa 250 nm, von etwa 60 nm bis etwa 150 nm bzw. von etwa 60 nm bis etwa 120 nm.

[0548] In Ausführungsformen, in denen mehr als eine oder eine Vielzahl, z.B. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, der erfindungsgemäßen Nukleinsäurespezies in der Zusammensetzung enthalten sind, können die mehr als eine oder die Vielzahl, z.B. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, der erfindungsgemäßen Nukleinsäurespezies in einem oder mehreren Lipiden komplexiert sein, wodurch LNPs gebildet werden, die mehr als eine oder eine Vielzahl, z.B. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, verschiedener Nukleinsäurespezies umfassen.

[0549] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform werden die lipidbasierten Träger, die mRNA verkapseln oder umfassen, durch mindestens einen Aufreinigungsschritt, vorzugsweise durch mindestens einen TFF-Schritt und/oder mindestens einen Klärungsschritt und/oder mindestens einen Filtrationsschritt, aufgereinigt. Diese Aufreinigung führt insbesondere zu einer Verringerung der Menge an Ethanol in der Zusammensetzung, die für die Lipidformulierung verwendet wurde.

[0550] In diesem Zusammenhang ist es besonders bevorzugt, dass die Zusammensetzung nach der Reinigung weniger als etwa 500 ppM Ethanol, bevorzugt weniger als etwa 50 ppM Ethanol, bevorzugter weniger als etwa 5 ppM Ethanol enthält.

[0551] In Ausführungsformen können die hierin beschriebenen LNPs lyophilisiert sein, um die Lagerstabilität der Formulierung und/oder der mRNA, zu verbessern. In Ausführungsformen können die hierin beschriebenen LNPs sprühgetrocknet sein, um die Lagerstabilität der Formulierung und/oder der Nukleinsäure zu verbessern. Lyoprotektiva für die Lyophilisierung (Gefriertrocknung) und/oder Sprühtrocknung können ausgewählt sein aus Trehalose, Saccharose, Mannose, Dextran und Inulin. Ein bevorzugtes Lyoprotektivum ist Saccharose, die optional ein weiteres Lyoprotektivum umfasst. Ein weiteres bevorzugtes Lyoprotektivum ist Trehalose, die optional ein weiteres Lyoprotektivum umfasst.

[0552] Dementsprechend wird die Zusammensetzung, z.B. die LNPs umfassende Zusammensetzung, lyophilisiert (z.B. gemäß WO2016/165831 oder WO2011/069586), um eine temperaturstabile, getrocknete Nukleinsäure(pulver)zusammensetzung, wie hierin definiert (mRNA), zu erhalten. Die Zusammensetzung, z.B. die LNPs umfassende Zusammensetzung, kann auch durch Sprühtrocknung oder Sprühgefriertrocknung (z.B. gemäß WO2016/184575 oder WO2016/184576) getrocknet werden, um eine temperaturstabile Zusammensetzung (Pulver), wie hierin definiert, zu erhalten.

[0553] Dementsprechend ist in bevorzugten Ausführungsformen die Zusammensetzung eine getrocknete Zusammensetzung.

[0554] Der Begriff „getrocknete Zusammensetzung“, wie er hier verwendet wird, ist als Zusammensetzung zu verstehen, die wie oben definiert lyophilisiert oder sprühgetrocknet oder sprühgefriergetrocknet wurde,

um eine temperaturstabile getrocknete Zusammensetzung (Pulver) zu erhalten, die LNP-komplexierte mRNA (wie oben definiert) umfasst.

[0555] Gemäß weiteren Ausführungsformen kann die Zusammensetzung des zweiten Aspekts mindestens ein Adjuvans umfassen.

[0556] Das Adjuvans wird vorzugsweise zugegeben, um die immunstimulatorischen Eigenschaften der Zusammensetzung zu verbessern.

[0557] Der Begriff „Adjuvans“, wie er hier verwendet wird, wird von der fachkundigen Person erkannt und verstanden und soll sich beispielsweise auf ein pharmakologisches und/oder immunologisches Agens beziehen, das die Wirkung anderer Agenzien modifizieren, z.B. verstärken kann, oder das geeignet sein kann, die Verabreichung und Abgabe der Zusammensetzung zu unterstützen. Der Begriff „Adjuvans“ bezieht sich auf ein breites Spektrum von Substanzen. Typischerweise sind diese Substanzen in der Lage, die Immunogenität von Antigenen zu erhöhen. Beispielsweise können Adjuvantien vom angeborenen Immunsystem erkannt werden und z.B. eine angeborene Immunantwort (d.h. eine unspezifische Immunantwort) hervorrufen. „Adjuvantien“ lösen typischerweise keine adaptive Immunantwort aus. Im Kontext der Erfindung können Adjuvantien die Wirkung des von der Nukleinsäure bereitgestellten antigenen Peptids oder Proteins verstärken. In diesem Zusammenhang kann das mindestens eine Adjuvans aus jedem Adjuvans ausgewählt sein, das der fachkundigen Person bekannt und für den vorliegenden Fall, d.h. die Unterstützung der Induktion einer Immunantwort in einem Individuum, z.B. in einem menschlichen Individuum, geeignet ist.

[0558] Dementsprechend kann die Zusammensetzung des zweiten Aspekts mindestens ein Adjuvans umfassen, wobei das mindestens eine Adjuvans geeigneterweise aus einem irgendeinem in WO2016/203025 offenbarten Adjuvans ausgewählt sein kann. Adjuvantien, die in irgendeinem der Ansprüche 2 bis 17 der WO2016/203025 offenbart sind, vorzugsweise Adjuvantien, die in Anspruch 17 der WO2016/203025 offenbart sind, sind besonders geeignet, wobei der diesbezügliche spezifische Inhalt hiermit durch Bezugnahme aufgenommen wird. Adjuvantien können zweckmäßigerweise in der Zusammensetzung des zweiten Aspekts oder der Vakzine des drittenAspekts verwendet werden und enthalten sein, um z.B. die Menge an Nukleinsäure zu reduzieren, die für eine ausreichende Immunantwort gegen das kodierte Protein erforderlich ist, und/oder um die Wirksamkeit der Zusammensetzung/der Vakzine zur Behandlung/Vakzinierung von älteren Menschen zu verbessern. Ein geeignetes Adjuvans im Zusammenhang mit einer Coronavirus-Zusammensetzung oder Vakzine (insbesondere für Zusammensetzungen, die ein Polypeptid des dritten Aspekts umfassen) kann ein Toll-like-Rezeptor 9 (TLR9)-Agonist-Adjuvans, CpG 1018TM, sein.

[0559] Die Zusammensetzung des zweiten Aspekts kann neben den hierin spezifizierten Komponenten mindestens eine weitere Komponente umfassen, die ausgewählt sein kann aus der Gruppe bestehend aus weiteren Antigenen (z.B. in Form eines Peptids oder Proteins, vorzugsweise abgeleitet von einem Coronavirus) oder weiteren Antigen-kodierenden Nukleinsäuren (vorzugsweise kodierend für ein Peptid oder Protein, vorzugsweise abgeleitet von einem Coronavirus); einem weiteren immuntherapeutischen Agens; einer oder mehreren Hilfssubstanzen (Zytokinen, wie z.B. Monokinen, Lymphokinen, Interleukinen oder Chemokinen); oder irgendeiner weiteren Verbindung, die aufgrund ihrer Bindungsaffinität (als Ligand) zu humanen Toll-like-Rezeptoren als immunstimulierend bekannt ist; und/oder einer adjuvanten Nukleinsäure, vorzugsweise einer immunstimulierenden RNA (isRNA), z.B. CpG-RNA usw.

[0560] In Ausführungsformen ist eine Zusammensetzung, die Träger auf Lipidbasis umfasst, die eine mRNA einkapseln, nach der Lagerung als Flüssigkeit stabil, z.B. stabil für mindestens 2 Wochen nach der Lagerung als Flüssigkeit bei Temperaturen von etwa 5 °C.

[0561] In einigen Aspekten, wie hier verwendet, bezieht sich „stabil“ auf eine flüssige Zusammensetzung, die Lipid-basierte Träger umfasst, die eine mRNA einkapseln, bei der die Messwerte für verschiedene physiochemische Parameter nach der Lagerung innerhalb eines definierten Bereichs liegen. In einer Ausführungsform wird die flüssige Zusammensetzung, die Lipid-basierte Träger umfasst, die eine mRNA einkapseln, analysiert, um die Stabilität anhand verschiedener Parameter zu bewerten. Geeignete Stabilitätsparameter umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, die RNA-Integrität, die Partikelgröße (Z-Mittel), den Polydispersitätsindex (PDI), die Menge an freier mRNA in der flüssigen Zusammensetzung, die Verkapselungseffizienz der mRNA (Anteil der RNA in Prozent, der mit lipidbasierten Trägern inkorporiert ist), die Form und Morphologie der lipidbasierten Träger, die eine mRNA einkapseln, den pH-Wert, die Osmolalität oder die Trübung. Weiterhin bezieht sich „stabil“ auf eine flüssige Zusammensetzung, die Lipid-basierte Träger umfasst, die eine mRNA einkapseln, wobei die gemessenen Werte für verschiedene funktionale Parameter nach der Lagerung

innerhalb eines definierten Bereichs liegen. In einer Ausführungsform wird die flüssige Zusammensetzung, die Lipid-basierte Träger umfasst, die eine mRNA einkapseln, analysiert, um die Potenz der flüssigen Zusammensetzung zu bewerten, einschließlich beispielsweise der Expression des kodierten Peptids oder Proteins, der Induktion spezifischer Antikörpertiter, der Induktion neutralisierender Antikörpertiter, der Induktion von T-Zellen, der Reaktogenität der flüssigen Zusammensetzung, einschließlich beispielsweise der Induktion angeborener Immunantworten, usw.

[0562] In bevorzugten Ausführungsformen bezieht sich der Begriff „stabil“ auf die RNA-Integrität.

[0563] In verschiedenen Ausführungsformen ist eine Zusammensetzung der Ausführungsformen als eine temperaturstabile flüssige pharmazeutische Zusammensetzung definiert und umfasst eine bestimmte Konzentration von Trägern auf Lipidbasis, die eine mRNA einkapseln, was ein geeignetes Merkmal zum Erreichen einer Temperaturstabilität der flüssigen Zusammensetzung sein kann. Ohne an die Theorie gebunden sein zu wollen, könnte eine bestimmte Konzentration der mRNA vorteilhafte Auswirkungen auf die Temperaturstabilität der Zusammensetzung haben, wenn diese als Flüssigkeit gelagert wird.

[0564] In Ausführungsformen liegt die Konzentration der mRNA in einer Zusammensetzung in einem Bereich von etwa 10 µg/ml bis etwa 10 mg/ml. In Ausführungsformen liegt die Konzentration der mRNA in einer flüssigen Zusammensetzung in einem Bereich von etwa 100 µg/ml bis etwa 5 mg/ml. In Ausführungsformen liegt die Konzentration der mRNA in der flüssigen Zusammensetzung in einem Bereich von etwa 100 µg/ml bis etwa 2 mg/ml. In Ausführungsformen liegt die Konzentration der mRNA in einer flüssigen Zusammensetzung in einem Bereich von etwa 100 µg/ml bis etwa 1 mg/ml. In Ausführungsformen liegt die Konzentration der mRNA in einer flüssigen Zusammensetzung in einem Bereich von etwa 200 µg/ml bis etwa 1 mg/ml. In Ausführungsformen liegt die Konzentration der mRNA in einer flüssigen Zusammensetzung in einem Bereich von etwa 100 µg/ml bis etwa 500 µg/ml. In bevorzugten Ausführungsformen liegt die Konzentration der mRNA in einer flüssigen Zusammensetzung in einem Bereich von etwa 200 µg/ml bis etwa 500 µg/ml. In bevorzugten Ausführungsformen liegt die Konzentration der mRNA in der flüssigen Zusammensetzung in einem Bereich von etwa 200 µg/ml bis etwa 600 µg/ml. In bevorzugten Ausführungsformen liegt die Konzentration der mRNA in der flüssigen Zusammensetzung in einem Bereich von etwa 200 µg/ml bis etwa 700 µg/ml. In bevorzugten Ausführungsformen liegt die Konzentration der mRNA in der flüssigen Zusammensetzung in einem Bereich von etwa 200 µg/ml bis etwa 800 µg/ml. In bevorzugten Ausführungsformen liegt die Konzentration der mRNA in der flüssigen Zusammensetzung in einem Bereich von etwa 200 µg/ml bis etwa 900 µg/ml.

[0565] In Ausführungsformen beträgt die Konzentration der mRNA in der Zusammensetzung beispielsweise etwa 100 µg/ml, etwa 200 µg/ml, etwa 300 µg/ml, etwa 400 µg/ml, etwa 500 µg/ml, etwa 600 µg/ml, etwa 700 µg/ml, etwa 800 µg/ml, etwa 900 µg/ml, etwa 1 mg/ml. In bevorzugten Ausführungsformen beträgt die Konzentration der mRNA in der flüssigen Zusammensetzung mindestens 100 µg/ml, bevorzugt mindestens 200 µg/ml, bevorzugter mindestens 500 µg/ml.

[0566] In verschiedenen Ausführungsformen hat die mRNA einer pharmazeutischen Zusammensetzung eine bestimmte RNA-Integrität, die ein geeignetes Merkmal zum Erreichen einer Temperaturstabilität der flüssigen Zusammensetzung sein kann.

[0567] Der Begriff „RNA-Integrität“ beschreibt allgemein, ob die vollständige RNA-Sequenz in der flüssigen Zusammensetzung vorhanden ist. Eine geringe RNA-Integrität kann u. a. durch RNA-Abbau, RNA-Spaltung, fehlerhafte oder unvollständige chemische Synthese der RNA, fehlerhafte Basenpaarung, Integration modifizierter Nukleotide oder Modifikation bereits integrierter Nukleotide, fehlendes Capping oder unvollständiges Capping, fehlende oder unvollständige Polyadenylierung oder unvollständige RNA-in-vitro-Transkription bedingt sein. mRNA ist ein fragiles Molekül, das leicht abgebaut werden kann, was z.B. durch Temperatur, Ribonukleasen, pH-Wert oder andere Faktoren (z.B. nukleophile Angriffe, Hydrolyse usw.) verursacht werden kann, wodurch die RNA-Integrität und damit die Funktionalität der RNA reduziert werden kann.

[0568] Der fachkundigen Person stehen verschiedene chromatographische oder elektrophoretische Verfahren zur Bestimmung der RNA-Integrität zur Verfügung. Chromatographische und elektrophoretische Verfahren sind auf dem Gebiet bekannt. Wenn Chromatographie verwendet wird (z.B. RP-HPLC), kann die Analyse der Integrität der RNA auf der Bestimmung der Peakfläche (oder „Fläche unter dem Peak“) der Volllängen-RNA in einem entsprechenden Chromatogramm beruhen. Die Peakfläche kann durch jede geeignete Software bestimmt werden, die die Signale des Detektorsystems auswertet. Der Vorgang der Bestimmung der Peakfläche wird auch als Integrierung bezeichnet. Die Peakfläche, die die Volllängen-RNA repräsentiert,

wird typischerweise in Relation zur Peakfläche der Gesamt-RNA in einer entsprechenden Probe gesetzt. Die RNA-Integrität kann in % RNA-Integrität ausgedrückt werden.

[0569] Im Kontext von Aspekten der Erfindung kann die RNA-Integrität mittels analytischer (RP)HPLC bestimmt werden. Typischerweise kann eine Testprobe der flüssigen Zusammensetzung, die einen lipidbasierten Träger umfasst, der mRNA einkapselt, mit einem Detergens (z.B. etwa 2%iges Triton X100) behandelt werden, um den lipidbasierten Träger zu dissoziieren und die eingekapselte mRNA freizusetzen. Die freigesetzte mRNA kann mit geeigneten bindenden Verbindungen, z.B. Agencourt AMPure XP-Beads (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) im Wesentlichen gemäß den Anweisungen des Herstellers eingefangen werden. Nach der Präparation der mRNA-Probe kann eine analytische (RP)HPLC durchgeführt werden, um die Integrität der RNA zu bestimmen. Für die Bestimmung der RNA-Integrität können die mRNA-Proben typischerweise auf eine Konzentration von 0,1 g/l verdünnt werden, z.B. mit Wasser für Injektionszwecke (WFI). Etwa 10 µl der verdünnten mRNA-Probe können in eine HPLC-Säule (z.B. eine monolithische Poly(styrol-Divinylbenzol)-Matrix) injiziert werden. Die analytische (RP)HPLC kann unter Verwendung von Standardbedingungen durchgeführt werden, z.B: Gradient 1: Puffer A (0,1 M TEAA (pH 7,0)); Puffer B (0,1 M TEAA (pH 7,0) enthaltend 25% Acetonitril). Beginnend bei 30% Puffer B wird der Gradient in 2 Minuten auf 32% Puffer B erweitert, gefolgt von einer Erweiterung auf 55% Puffer B über 15 Minuten bei einer Flussrate von 1 ml/min. HPLC-Chromatogramme werden typischerweise bei einer Wellenlänge von 260 nm aufgezeichnet. Die erhaltenen Chromatogramme können unter Verwendung einer Software ausgewertet werden, und die relative Peakfläche in Prozent (%) kann gemäß allgemein bekannten Methoden bestimmt werden. Die relative Peakfläche gibt die Menge der RNA an, die eine 100%ige RNA-Integrität aufweist. Da die Menge der in die HPLC injizierten RNA typischerweise bekannt ist, liefert die Analyse der relativen Peakfläche Informationen über die Integrität der RNA. Wenn also z.B. insgesamt 100 ng RNA injiziert wurden und als relative Peakfläche 100 ng bestimmt werden, wäre die RNA-Integrität 100%. Wenn die relative Peakfläche z.B. 80 ng entspräche, wäre die RNA-Integrität 80%. Entsprechend wird die RNA-Integrität im Kontext der Erfindung mittels analytischer HPLC, vorzugsweise analytischer RP-HPLC, bestimmt.

[0570] In bestimmten Ausführungsformen ist ein Pharmazeutikum der Ausführungsformen nach Lagerung als Flüssigkeit bei Temperaturen von etwa 5 °C für etwa 2 Wochen bis etwa 1 Monat, 2 Monate, 3 Monate, 4 Monate, 5 Monate, 6 Monate oder 1 Jahr stabil. Beispielsweise bleiben nach Lagerung als Flüssigkeit bei mindestens etwa 5 °C mindestens etwa 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% oder 95% der RNA für etwa zwei Wochen, drei Wochen, einen Monat, 6 Wochen, 2 Monate, 3 Monate, 4 Monate, 5 Monate, 6 Monate oder 1 Jahr intakt. In einigen Aspekten umfasst ein temperaturstabiles flüssiges Pharmazeutikum der Ausführungsformen mindestens etwa 70%, 75%, 80%, 85%, 90% oder 95% intakte mRNA mindestens etwa zwei Wochen nach Lagerung als Flüssigkeit bei Temperaturen von etwa 5 °C. In weiteren Aspekten umfasst ein temperaturstabiles flüssiges Pharmazeutikum der Ausführungsformen mindestens etwa 70%, 75%, 80%, 85%, 90% oder 95% intakte mRNA mindestens 1 Monat nach Lagerung als Flüssigkeit bei Temperaturen von etwa 5 °C. In bestimmten Aspekten umfasst ein temperaturstabiles flüssiges Pharmazeutikum der Ausführungsformen mindestens etwa 70%, 75%, 80%, 85%, 90% oder 95% intakte mRNA mindestens etwa 2 Wochen bis etwa 1 Monat, 2 Monate, 3 Monate, 4 Monate, 5 Monate, 6 Monate oder 1 Jahr nach Lagerung als Flüssigkeit bei Temperaturen von etwa 5 °C. In einigen spezifischen Aspekten umfasst ein temperaturstabiles flüssiges Pharmazeutikum der Ausführungsformen mindestens etwa 80% intakte mRNA nach etwa zwei Wochen Lagerung als Flüssigkeit bei Temperaturen von etwa 5 °C.

[0571] In bestimmten Ausführungsformen hat die mRNA einer Zusammensetzung eine RNA-Integrität im Bereich von etwa 40% bis etwa 100%. In Ausführungsformen hat die mRNA eine RNA-Integrität im Bereich von etwa 50% bis etwa 100%. In Ausführungsformen hat die mRNA eine RNA-Integrität im Bereich von etwa 60% bis etwa 100%. In Ausführungsformen hat die mRNA eine RNA-Integrität im Bereich von etwa 70% bis etwa 100%. In Ausführungsformen beträgt die mRNA-Integrität z.B. etwa 50%, etwa 60%, etwa 70%, etwa 80% oder etwa 90%. Die mRNA wird zweckmäßigerweise mittels analytischer HPLC, vorzugsweise analytischer RP-HPLC, bestimmt.

[0572] In bevorzugten Ausführungsformen hat die mRNA einer Zusammensetzung eine RNA-Integrität von mindestens etwa 50%, bevorzugt von mindestens etwa 60%, bevorzugter von mindestens etwa 70%, am meisten bevorzugt von mindestens etwa 80% oder etwa 90%. Die mRNA wird zweckmäßigerweise mittels analytischer HPLC, vorzugsweise analytischer RP-HPLC, bestimmt.

[0573] In verschiedenen Ausführungsformen überschreitet die mRNA einer pharmazeutischen Zusammensetzung einen bestimmten Anteil an freier mRNA nicht, was ein geeignetes Merkmal zum Erreichen einer Temperaturstabilität der flüssigen Zusammensetzung sein kann. Ohne an die Theorie gebunden sein zu wol-

len, kann die freie mRNA in der flüssigen Zusammensetzung anfälliger für den Abbau sein als die mRNA, die in dem lipidbasierten Träger verkapselt ist.

[0574] Die Zusammensetzungen der Ausführungsformen enthalten RNA. In diesem Zusammenhang umfasst der Begriff „freie RNA“ oder „nicht-komplexierte RNA“ oder „nicht-verkapselte RNA“ die mRNA-Moleküle, die nicht in den lipidbasierten Trägern, wie hier definiert, eingekapselt sind. Während der Formulierung der flüssigen Zusammensetzung (z.B. während der Verkapselung der mRNA in die lipidbasierten Träger) kann die freie mRNA eine Kontamination oder Verunreinigung darstellen. Ein großer Anteil an nicht verkapselter oder freier mRNA kann auch ein Indikator für eine Destabilisierung der lipidbasierten Träger der Zusammensetzung sein (z.B. bei Lagerung der Zusammensetzung). Zum Beispiel kann die in der flüssigen Zusammensetzung detektierbare freie mRNA während der Lagerung zunehmen, was als Merkmal zur Bestimmung der Temperaturstabilität der Zusammensetzung verwendet werden kann.

[0575] Der fachkundigen Person stehen verschiedene Verfahren zur Bestimmung der Menge und/oder des Anteils an freier mRNA in der flüssigen Zusammensetzung zur Verfügung. Freie mRNA in der flüssigen Zusammensetzung kann durch chromatographische Verfahren (z.B. AEX, SEC) oder durch Verwendung von Sonden (z.B. Farbstoffen), die an freie mRNA in der Zusammensetzung binden, bestimmt werden. Im Kontext der Erfindung kann die Menge der freien mRNA oder der nicht verkapselten mRNA mit Hilfe eines Farbstoff-basierten Assays bestimmt werden. Geeignete Farbstoffe, die zur Bestimmung der Menge und/oder des Anteils an freier mRNA verwendet werden können, umfassen RiboGreen®, PicoGreen®-Farbstoff, OliGreen®-Farbstoff, QuantiFluor®-RNA-Farbstoff, Qubit®-RNA-Farbstoff, Quant-iT™-RNA-Farbstoff, TOTO®-1-Farbstoff, YOYO®-1-Farbstoff. Solche Farbstoffe sind geeignet, um zwischen freier mRNA und verkapselter mRNA zu unterscheiden. Referenzstandards, die aus definierten Mengen an freier mRNA oder verkapselter mRNA bestehen, können verwendet und mit dem jeweiligen Reagenz (z.B. RiboGreen®-Reagenz (Anregung 500 nm/Emission 525 nm)) gemäß den Anweisungen des Lieferanten gemischt werden. Typischerweise wird die freie mRNA der flüssigen Zusammensetzung mit dem Quant-iT-RiboGreen-RNA-Reagenz gemäß den Anweisungen des Herstellers quantifiziert. Der Anteil an freier mRNA im Kontext der Erfindung wird typischerweise mit einem RiboGreen-Assay bestimmt.

[0576] In Ausführungsformen umfasst eine Zusammensetzung freie mRNA, im Bereich von etwa 30% bis etwa 0%. In Ausführungsformen umfasst die flüssige Zusammensetzung etwa 20% freie mRNA (und etwa 80% verkapselte mRNA), etwa 15% freie mRNA (und etwa 85% verkapselte mRNA), etwa 10% freie mRNA (und etwa 90% verkapselte mRNA), oder etwa 5% freie mRNA (und etwa 95% verkapselte mRNA). In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die flüssige Zusammensetzung weniger als etwa 20% freie mRNA, bevorzugt weniger als etwa 15% freie mRNA, noch bevorzugter weniger als etwa 10% freie mRNA, am meisten bevorzugt weniger als etwa 5% freie mRNA.

[0577] Der Begriff „verkapselte mRNA“ umfasst die mRNA-Moleküle, die in den lipidbasierten Trägern, wie hier definiert, eingekapselt sind. Der Anteil der verkapselten mRNA im Kontext der Erfindung wird typischerweise mit einem RiboGreen-Assay bestimmt.

[0578] Dementsprechend sind in Ausführungsformen etwa 70% bis etwa 100% der mRNA in der flüssigen Zusammensetzung in den lipidbasierten Trägern verkapselt. In Ausführungsformen umfasst die flüssige Zusammensetzung etwa 80% verkapselte mRNA (und etwa 20% freie mRNA), etwa 85% verkapselte mRNA (und etwa 15% freie mRNA), etwa 90% verkapselte mRNA (und etwa 10% freie mRNA) oder etwa 95% verkapselte mRNA (und etwa 5% freie mRNA).

[0579] In bevorzugten Ausführungsformen sind 80% der in der flüssigen Zusammensetzung enthaltenen mRNA verkapselt, bevorzugt sind 85% der in der Zusammensetzung enthaltenen mRNA verkapselt, bevorzugter sind 90% der in der Zusammensetzung enthaltenen mRNA verkapselt, am meisten bevorzugt sind 95% der in der Zusammensetzung enthaltenen mRNA verkapselt.

[0580] In verschiedenen Ausführungsformen übersteigt eine pharmazeutische Zusammensetzung (insbesondere die mRNA der Zusammensetzung) eine bestimmte Menge an zweiwertigen Kationen nicht, was ein geeignetes Merkmal zum Erreichen der Temperaturstabilität der flüssigen Zusammensetzung sein kann. Zweiwertige Kationen, z.B. zweiwertige Metallionen (z.B. Mg^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+}, Pb^{2+}) können während der Lagerung als Flüssigkeit eine Hydrolyse der in den lipidbasierten Trägern verkapselten mRNA verursachen.

[0581] In einigen Aspekten kann die mRNA einer Zusammensetzung typischerweise durch RNA-in-vitro-Transkription (IVT) einer (linearen) DNA-Matrize (Template) hergestellt werden. Übliche RNA-in-vitro-Transkriptionspuffer enthalten große Mengen an $MgCl_2$ (z.B. 5 mM, 15 mM oder mehr), das ein Co-Faktor der RNA-Polymerase ist. Dementsprechend kann die erhaltene in vitro transkribierte mRNA Mg^{2+}-Ionen als Verunreinigung enthalten. Nach der RNA-in-vitro-Transkription wird das DNA-Template typischerweise mit Hilfe von DNAsen entfernt. Gängige Puffer für den DNAse-Verdau enthalten große Mengen an $CaCl_2$ (z.B. 1 mM, 5 mM oder mehr), das ein Co-Faktor der DNAse ist. Dementsprechend kann die erhaltene in vitro transkribierte mRNA Ca^{2+} als Verunreinigung enthalten.

[0582] Typischerweise können verschiedene RNA-Reinigungsschritte (z.B. RP-HPLC, Tangentialflussfiltration) eingesetzt werden, um verschiedene Kontaminationen einschließlich zweiwertiger Metallionen zu entfernen. Zweckmäßigerweise ist die mRNA, die zur Verkapselung in den lipidbasierten Trägern der Erfindung verwendet wird, gereinigt worden, um zweiwertige Metallionen zu entfernen.

[0583] In Ausführungsformen umfasst eine Zusammensetzung der Ausführungsformen weniger als etwa 100 nM zweiwertige Kationen pro g mRNA, bevorzugt weniger als etwa 50 nM zweiwertige Kationen pro g mRNA, noch bevorzugter weniger als etwa 10 nM zweiwertige Kationen pro g mRNA. In Ausführungsformen sind die zweiwertigen Kationen ausgewählt aus Mg^{2+} und/oder Ca^{2+}. In Ausführungsformen umfasst die flüssige Zusammensetzung weniger als etwa 100 nM Mg^{2+} pro g mRNA. In Ausführungsformen umfasst die flüssige Zusammensetzung weniger als etwa 100 nM Ca^{2+} pro g mRNA. Typischerweise kann Ionenchromatographie (IC) gekoppelt mit Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (IC-ICP-MS) zur Bestimmung von zweiwertigen Kationen verwendet werden.

[0584] In Ausführungsformen umfasst der lipidbasierte Träger, der die mRNA einer Zusammensetzung einkapselt, weniger als etwa 100 nM zweiwertige Kationen pro g mRNA, bevorzugt weniger als etwa 50 nM zweiwertige Kationen pro g mRNA, noch bevorzugter weniger als etwa 10 nM zweiwertige Kationen pro g mRNA. In Ausführungsformen sind die zweiwertigen Kationen ausgewählt aus Mg^{2+} und/oder Ca^{2+}. In Ausführungsformen umfassen die lipidbasierten Träger, die die mRNA einkapseln, weniger als etwa 100 nm Mg^{2+} pro g mRNA. In Ausführungsformen umfassen die lipidbasierten Träger, die die mRNA einkapseln, weniger als etwa 100 nm Ca^{2+} pro g mRNA. Typischerweise kann Ionenchromatographie (IC) gekoppelt mit induktiv gekoppelter Plasma-Massenspektrometrie (IC-ICP-MS) zur Bestimmung von Mg^{2+} und/oder Ca^{2+} verwendet werden.

[0585] In Ausführungsformen umfasst die mRNA einer Zusammensetzung Na^+ als Gegenion. In Ausführungsformen umfasst die mRNA Na^+ in einer Menge im Bereich von etwa 10 µg Na^+ pro g mRNA bis etwa 1 mg Na^+ pro g mRNA. In Ausführungsformen umfasst die mRNA Na^+ als Gegenion in einer Menge von mindestens etwa 100 µg Na^+ pro g mRNA, bevorzugt mindestens etwa 200 µg Na^+ pro g mRNA. Typischerweise kann Ionenchromatographie (IC) gekoppelt mit Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (IC-ICP-MS) zur Bestimmung von Na^+ verwendet werden.

[0586] In Ausführungsformen umfasst die Zusammensetzung mindestens einen Antagonisten mindestens eines RNA-erkennenden (RNA sensing) Mustererkennungsrezeptors. Ein solcher Antagonist kann vorzugsweise in lipidbasierten Trägern, wie hier definiert, co-formuliert sein.

[0587] Geeignete Antagonisten mindestens eines RNA-erkennenden Mustererkennungsrezeptors sind in der PCT-Patentanmeldung PCT/EP2020/072516 offenbart, deren vollständige Offenbarung hiermit durch Bezugnahme aufgenommen wird. Insbesondere wird die Offenbarung bezüglich geeigneter Antagonisten mindestens eines RNA-erkennenden Mustererkennungsrezeptors, wie in einem der Ansprüche 1 bis 94 von PCT/EP2020/072516 definiert, aufgenommen.

[0588] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die Zusammensetzung mindestens einen Antagonisten mindestens eines RNA-erkennenden Mustererkennungsrezeptors, ausgewählt aus einem Toll-like-Rezeptor, vorzugsweise TLR7 und/oder TLR8.

[0589] In Ausführungsformen ist der mindestens eine Antagonist mindestens eines RNA-erkennenden Mustererkennungsrezeptor ausgewählt aus einem Nukleotid, einem Nukleotidanalogon, einer Nukleinsäure, einem Peptid, einem Protein, einem kleinen Molekül, einem Lipid oder einem Fragment, einer Variante oder einem Derivat davon.

[0590] In bevorzugten Ausführungsformen ist der mindestens eine Antagonist mindestens eines RNA-erkennenden Mustererkennungsrezeptors ein einzelsträngiges Oligonukleotid, vorzugsweise ein einzelsträngiges RNA-Oligonukleotid.

[0591] In Ausführungsformen ist der Antagonist des mindestens einen RNA-erkennenden Mustererkennungsrezeptors ein einzelsträngiges Oligonukleotid, das eine Nukleinsäuresequenz umfasst oder aus einer Nukleinsäuresequenz besteht, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus den SEQ ID NOs: 85-212 der PCT/EP2020/072516, oder ein Fragment von irgendeiner dieser Sequenzen.

[0592] In bevorzugten Ausführungsformen ist der Antagonist des mindestens einen RNA-erkennenden Mustererkennungsrezeptors ein einzelsträngiges Oligonukleotid, das eine Nukleinsäuresequenz umfasst oder aus einer Nukleinsäuresequenz besteht, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus den SEQ ID NOs: 85-87, 149-212 der PCT/EP2020/072516, oder ein Fragment von irgendeiner dieser Sequenzen.

[0593] Ein besonders bevorzugter Antagonist des mindestens einen RNA-erkennenden Mustererkennungsrezeptors im Kontext der Erfindung ist 5'-GAG CGmG CCA-3' (SEQ ID NO: 85 der PCT/EP2020/072516) oder ein Fragment davon.

[0594] In Ausführungsformen liegt das Molverhältnis des mindestens einen Antagonisten mindestens eines RNA-erkennenden Mustererkennungsrezeptors, wie hierin definiert, zu der mindestens einen Nukleinsäure, vorzugsweise RNA, die für ein antigenes SARS-CoV-2-Peptid oder -Protein, wie hierin definiert, kodiert, geeigneterweise im Bereich von etwa 1:1 bis etwa 100:1 oder im Bereich von etwa 20:1 bis etwa 80:1.

[0595] In Ausführungsformen liegt das Gewichtsverhältnis des mindestens einen Antagonisten mindestens eines RNA-erkennenden Mustererkennungsrezeptor, wie hierin definiert, zu der mindestens einen Nukleinsäure, vorzugsweise RNA, die für ein antigenes SARS-CoV-2-Peptid oder -Protein, wie hierin definiert, kodiert, geeigneterweise im Bereich von etwa 1:1 bis etwa 1:30 oder im Bereich von etwa 1:2 bis etwa 1:10.

Vakzine:

[0596] In einem dritten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung eine Vakzine gegen ein Coronavirus, vorzugsweise gegen ein SARS-CoV-2 (ehemals nCoV-2019)-Coronavirus, das die COVID-19-Erkrankung verursacht, zur Verfügung.

[0597] In bevorzugten Ausführungsformen des dritten Aspekts umfasst die Vakzine mindestens eine mRNA des ersten Aspekts, oder die Zusammensetzung des zweiten Aspekts.

[0598] Offenbart ist auch, dass die Vakzine mindestens eine Plasmid-DNA oder Adenovirus-DNA, wie hierin definiert, umfasst.

[0599] Insbesondere können Ausführungsformen, die die Zusammensetzung des zweiten Aspekts betreffen, ebenfalls als geeignete Ausführungsformen der Vakzine des dritten Aspekts gelesen und aufgefasst werden. Auch Ausführungsformen, die die Vakzine des dritten Aspekts betreffen, können ebenfalls als geeignete Ausführungsformen der Zusammensetzung des zweiten Aspekts gelesen und aufgefasst werden. Des Weiteren sind Merkmale und Ausführungsformen, die im Zusammenhang mit dem ersten Aspekt (der erfindungsgemäßen mRNA beschrieben sind, als geeignete Ausführungsformen der Zusammensetzung des zweiten Aspekts zu lesen und zu verstehen.

[0600] Der Begriff „Vakzine“ wird von der fachkundigen Person erkannt und verstanden und soll beispielsweise ein prophylaktisches oder therapeutisches Material sein, das mindestens ein Epitop oder Antigen, vorzugsweise ein Immunogen, bereitstellt. Im Kontext der Erfindung wird das Antigen oder die antigene Funktion in geeigneter Weise durch die erfindungsgemäße mRNA (wobei die mRNA eine kodierende Sequenz umfasst, die für ein antigenes Peptid oder Protein kodiert, das von einem SARS-CoV-2-Coronavirus abgeleitet ist) oder die Zusammensetzung des zweiten Aspekts (die mindestens eine mRNA des ersten Aspekts umfasst) bereitgestellt.

[0601] In bevorzugten Ausführungsformen ruft die Vakzine oder die Zusammensetzung des zweiten Aspekts eine adaptive Immunantwort hervor, und zwar eine adaptive Immunantwort gegen ein Coronavirus, vorzugsweise gegen das SARS-CoV-2-Coronavirus.

[0602] In besonders bevorzugten Ausführungsformen ruft die Vakzine oder die Zusammensetzung des zweiten Aspekts funktionale Antikörper hervor, die das Virus, vorzugsweise das SARS-CoV-2-Coronavirus effektiv neutralisieren können.

[0603] In weiteren bevorzugten Ausführungsformen ruft die Vakzine oder die Zusammensetzung des zweiten Aspekts eine mukosale IgA-Immunität durch Induktion von mukosalen IgA-Antikörpern hervor.

[0604] In besonders bevorzugten Ausführungsformen ruft die Vakzine oder die Zusammensetzung des zweiten Aspekts funktionale Antikörper hervor, die das Virus, vorzugsweise das SARS-CoV-2-Coronavirus, effektiv neutralisieren können.

[0605] In weiteren besonders bevorzugten Ausführungsformen induziert die Vakzine oder die Zusammensetzung des zweiten Aspekts breite, funktionale zelluläre T-Zell-Antworten gegen das Coronavirus, vorzugsweise gegen das SARS-CoV-2-Coronavirus.

[0606] In weiteren besonders bevorzugten Ausführungsformen induziert die Vakzine oder die Zusammensetzung des zweiten Aspekts eine ausgewogene B-Zell- und T-Zell-Antwort gegen das Coronavirus, vorzugsweise gegen das SARS-CoV-2-Coronavirus.

[0607] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform kann die hierin definierte Vakzine ferner einen pharmazeutisch akzeptablen Träger und optional mindestens ein Adjuvans, wie im Zusammenhang mit dem zweiten Aspekt spezifiziert, umfassen.

[0608] Geeignete Adjuvantien in diesem Zusammenhang können aus Adjuvantien ausgewählt sein, die in Anspruch 1 7 der WO2016/203025 offenbart sind.

[0609] In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Vakzine eine monovalente Vakzine.

[0610] Die Begriffe „monovalente Vakzine“, „monovalente Zusammensetzung“, „univalente Vakzine“ oder „univalente Zusammensetzung“ werden von der fachkundigen Person erkannt und verstanden und sollen sich z.B. auf eine Zusammensetzung oder eine Vakzine beziehen, die nur ein Antigen oder Antigenkonstrukt von einem Pathogen umfasst. Dementsprechend umfasst die Vakzine oder Zusammensetzung nur eine Nukleinsäurespezies, die für ein einziges Antigen oder Antigenkonstrukt eines einzigen Organismus kodiert. Der Begriff „monovalente Vakzine“ umfasst die Immunisierung gegen eine einzige Valenz. Im Kontext der Erfindung würde eine monovalente SARS-CoV-2-Coronavirus-Vakzine oder monovalente SARS-CoV-2-Coronavirus-Zusammensetzung mindestens eine mRNA umfassen, die für ein einziges antigenes Peptid oder Protein kodiert, das von einem spezifischen SARS-CoV-2-Coronavirus abgeleitet ist.

[0611] In Ausführungsformen ist die Vakzine eine polyvalente Vakzine, die eine Vielzahl oder mindestens mehr als eine der im Zusammenhang mit dem ersten Aspekt definierten Nukleinsäurespezies umfasst. Ausführungsformen, die sich auf eine polyvalente Zusammensetzung beziehen, wie sie im Zusammenhang mit dem zweiten Aspekt offenbart sind, können ebenfalls als geeignete Ausführungsformen der polyvalenten Vakzine gelesen und aufgefasst werden.

[0612] Die Begriffe „polyvalente Vakzine“, „polyvalente Zusammensetzung“, „multivalente Vakzine“ oder „multivalente Zusammensetzung“ werden von der fachkundigen Person erkannt und verstanden und sollen sich z.B. auf eine Zusammensetzung oder eine Vakzine beziehen, die Antigene von mehr als einem Virus (z.B. verschiedene SARS-CoV-2-Coronavirus-Isolate) oder verschiedene Antigene oder Antigenkonstrukte desselben SARS-CoV-2-Coronavirus oder eine beliebige Kombination davon umfasst. Die Begriffe beschreiben, dass die Vakzine oder die Zusammensetzung mehr als eine Valenz hat. Im Kontext der Erfindung würde eine polyvalente SARS-CoV-2-Coronavirus-Vakzine Nukleinsäuresequenzen umfassen, die für antigene Peptide oder Proteine kodieren, die von mehreren verschiedenen SARS-CoV-2-Coronaviren (z.B. verschiedenen SARS-CoV-2-Coronavirus-Isolaten) stammen, oder Nukleinsäuresequenzen umfassen, die für verschiedene Antigene oder Antigenkonstrukte desselben SARS-CoV-2-Coronavirus kodieren, oder eine Kombination davon.

[0613] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die polyvalente oder multivalente Vakzine mindestens eine polyvalente Zusammensetzung, wie im zweiten Aspekt definiert. Besonders bevorzugt sind polyvalente Zusammensetzungen, wie sie im Abschnitt „Multivalente Zusammensetzungen der Erfindung“ definiert sind.

[0614] In Ausführungsformen umfasst die Vakzine mindestens einen Antagonisten mindestens eines RNA-erkennenden Mustererkennungsrezeptors, wie er im zweiten Aspekt definiert.

[0615] Die Coronavirus-Vakzine umfasst typischerweise eine sichere und effektive Menge an mRNA des ersten Aspekts oder die Zusammensetzung des zweiten Aspekts. Wie hierin verwendet, bedeutet „sichere und effektive Menge“ eine Menge an Nukleinsäure oder Zusammensetzung, die ausreicht, um eine signifikante positive Veränderung einer Krankheit oder Störung, die mit einer Infektion mit dem Coronavirus, vorzugsweise dem SARS-CoV-2-Coronavirus, zusammenhängt, zu induzieren. Gleichzeitig ist eine „sichere und effektive Menge“ klein genug, um schwerwiegende Nebenwirkungen zu vermeiden. In Bezug auf die Nukleinsäure, Zusammensetzung oder Vakzine der vorliegenden Erfindung bedeutet der Ausdruck „sichere und effektive Menge“ vorzugsweise eine Menge der Nukleinsäure, der Zusammensetzung oder der Vakzine, die geeignet ist, das adaptive Immunsystem gegen das Coronavirus so zu stimulieren, dass keine übermäßigen oder schädlichen Immunreaktionen (z.B. angeborene Immunantworten) erzielt werden.

[0616] Eine „sichere und effektive Menge“ der Nukleinsäure, Zusammensetzung oder Vakzine, wie oben definiert, variiert in Verbindung mit dem jeweiligen zu behandelnden Zustand und auch mit dem Alter und der körperlichen Verfassung des zu behandelnden Patienten, der Schwere des Zustands, der Dauer der Behandlung, der Art der begleitenden Therapie, des jeweiligen verwendeten pharmazeutisch akzeptablen Trägers und ähnlichen Faktoren, die im Bereich der Kenntnisse und Erfahrungen der fachkundigen Person liegen. Darüber hinaus kann die „sichere und effektive Menge“ der Nukleinsäure, Zusammensetzung oder Vakzine von dem Applikations-/Abgabeweg (intradermal, intramuskulär, intranasal), der Abgabevorrichtung (Jet-Injektion, Nadelinjektion, Mikronadel-Patch, Elektroporationsvorrichtung) und/oder der Komplexierung/Formulierung (Protamin-Komplexierung oder LNP-Verkapselung, mRNA) abhängen. Zudem kann die „sichere und effektive Menge“ der Nukleinsäure, der Zusammensetzung oder der Vakzine vom körperlichen Zustand des behandelten Individuums (Säugling, Schwangere, immungeschwächter Mensch usw.) abhängen.

[0617] Die Coronavirus-Vakzine kann erfindungsgemäß sowohl für humanmedizinische Zwecke als auch für veterinärmedizinische Zwecke (Säugetiere, Wirbeltiere oder Vögel) verwendet werden.

[0618] Der pharmazeutisch akzeptable Träger, wie er hier verwendet wird, umfasst vorzugsweise die flüssige oder nicht flüssige Basis der erfindungsgemäßen Coronavirus-Vakzine. Wenn die erfindungsgemäße Vakzine in flüssiger Form bereitgestellt wird, ist der Träger Wasser, typischerweise pyrogenfreies Wasser; isotonische Kochsalzlösung oder gepufferte (wässrige) Lösungen, z.B. Phosphat-, Citrat- usw. gepufferte Lösungen. Vorzugsweise wird Ringer-Lactat-Lösung als flüssige Basis für die erfindungsgemäße Vakzine oder Zusammensetzung verwendet, wie in WO2006/122828 beschrieben, deren Offenbarung in Bezug auf geeignete gepufferte Lösungen hiermit durch Bezugnahme aufgenommen wird. Andere bevorzugte Lösungen, die als flüssige Basis für die Vakzine oder die Zusammensetzung verwendet werden, insbesondere für Zusammensetzungen/Vakzine, die LNPs umfassen, umfassen Saccharose und/oder Trehalose.

[0619] Die Wahl eines pharmazeutisch akzeptablen Trägers, wie hierin definiert, wird grundsätzlich durch die Art und Weise bestimmt, in der die erfindungsgemäße(n) pharmazeutische(n) Zusammensetzung(en) oder Vakzine verabreicht werden. Die Coronavirus-Vakzine wird vorzugsweise lokal verabreicht. Zu den Wegen der lokalen Verabreichung gehören im Allgemeinen beispielsweise topische Verabreichungswege, aber auch intradermale, transdermale, subkutane oder intramuskuläre Injektionen oder intraläsionale, intrakranielle, intrapulmonale, intrakardiale, intraartikuläre und sublinguale Injektionen. Bevorzugter können die Zusammensetzungen oder Vakzine gemäß der vorliegenden Erfindung auf intradermalem, subkutanem oder intramuskulärem Weg verabreicht werden, vorzugsweise durch Injektion, die nadelfrei und/oder als Nadelinjektion erfolgen kann. Bevorzugt ist im Kontext der Erfindung die intramuskuläre Injektion. Die Zusammensetzungen/Vakzine werden daher vorzugsweise in flüssiger oder fester Form formuliert. Die geeignete zu verabreichende Menge der erfindungsgemäßen Vakzine oder Zusammensetzung kann durch Routineexperimente, z.B. unter Verwendung von Tiermodellen, ermittelt werden. Solche Modelle umfassen, ohne dass damit eine Einschränkung verbunden ist, Kaninchen-, Schaf-, Maus-, Ratten-, Hunde- und nichtmenschliche Primatenmodelle. Bevorzugte Einzeldosisformen zur Injektion sind sterile Lösungen von Wasser, physiologischer Kochsalzlösung oder Mischungen davon. Der pH-Wert solcher Lösungen sollte auf etwa 7,4 eingestellt sein.

[0620] Die erfindungsgemäße Coronavirus-Vakzine oder Zusammensetzung, wie hierin definiert, kann eine oder mehrere Hilfssubstanzen oder Adjuvantien, wie oben definiert, umfassen, um die Immunogenität weiter zu erhöhen. Dabei wird vorzugsweise eine synergistische Wirkung der in der erfindungsgemäßen Zusammensetzung/Vakzine enthaltenen mRNA und einer Hilfssubstanz, die optional mit der erfindungsgemäßen Vakzine oder Zusammensetzung, wie oben beschrieben, co-formuliert (oder separat formuliert) sein kann, erreicht. Solche immunogenitätssteigernden Agenzien oder Verbindungen können separat (nicht co-formuliert mit der erfindungsgemäßen Vakzine oder Zusammensetzung) bereitgestellt und gesondert verabreicht werden.

[0621] Die Coronavirus-Vakzine wird vorzugsweise in lyophilisierter oder sprühgetrockneter Form (wie im Zusammenhang mit dem zweiten Aspekt beschrieben) bereitgestellt. Eine solche lyophilisierte oder sprühgetrocknete Vakzine enthält typischerweise Trehalose und/oder Saccharose und wird vor der Verabreichung an ein Individuum in einem geeigneten flüssigen Puffer rekonstituiert. In einigen Aspekten umfasst eine lyophilisierte Vakzine der Ausführungsformen mRNA der Ausführungsformen komplexiert mit LNPs. In einigen Aspekten besitzt eine lyophilisierte Zusammensetzung einen Wassergehalt von weniger als etwa 10%. Zum Beispiel kann eine lyophilisierte Zusammensetzung einen Wassergehalt von etwa 0,1% bis 10%, 0,1% bis 7,5% oder 0,5% bis 7,5% aufweisen, vorzugsweise hat die lyophilisierte Zusammensetzung einen Wassergehalt von etwa 0,5% bis etwa 5,0%.

[0622] In bevorzugten Ausführungsformen induziert die Verabreichung einer therapeutisch effektiven Menge der mRNA, Zusammensetzung oder der Vakzine an ein Individuum einen neutralisierenden Antikörpertiter gegen das SARS-CoV-2-Coronavirus in dem Individuum.

[0623] In einigen Ausführungsformen beträgt der neutralisierende Antikörpertiter mindestens 100 neutralisierende Einheiten pro Milliliter (NU/ml), mindestens 500 NU/ml, oder mindestens 1000 NU/ml.

[0624] In einigen Ausführungsformen werden nachweisbare Mengen des Coronavirus-Antigens in dem Individuum etwa 1 bis etwa 72 Stunden nach Verabreichung der mRNA, Zusammensetzung oder der Vakzine produziert.

[0625] In einigen Ausführungsformen wird ein neutralisierender Antikörpertiter (gegen das Coronavirus) von mindestens 100 NU/ml, mindestens 500 NU/ml oder mindestens 1000 NU/ml im Serum des Individuums etwa 1 Tag bis etwa 72 Tage nach der Verabreichung der mRNA, der Zusammensetzung oder der Vakzine erzeugt.

[0626] In einigen Ausführungsformen ist der neutralisierende Antikörpertiter ausreichend, um die Coronavirus-Infektion um mindestens 50% im Vergleich zu einem neutralisierenden Antikörpertiter eines nicht vakzinierten Kontrollindividuums oder im Vergleich zu einem neutralisierenden Antikörpertiter eines Individuums, das mit einem abgeschwächten viralen Lebendimpfstoff, einem inaktivierten viralen Impfstoff oder einem viralen Protein-Untereinheiten-Impfstoff vakziniert wurde, zu reduzieren.

[0627] In einigen Ausführungsformen ist der neutralisierende Antikörpertiter und/oder eine T-Zell-Immunantwort ausreichend, um die Rate der asymptomatischen viralen Infektion im Vergleich zum neutralisierenden Antikörpertiter nicht vakzinierter Kontrollindividuen zu reduzieren.

[0628] In einigen Ausführungsformen ist der neutralisierende Antikörpertiter und/oder eine T-Zell-Immunantwort ausreichend, um eine virale Latenz in dem Individuum zu verhindern.

[0629] In einigen Ausführungsformen ist der neutralisierende Antikörpertiter ausreichend, um die Fusion des Virus mit Epithelzellen des Individuums zu blockieren.

[0630] In einigen Ausführungsformen wird der neutralisierende Antikörpertiter innerhalb von 20 Tagen nach einer einzelnen 1-ug- bis 1 00-ug-Dosis der mRNA, der Zusammensetzung oder der Vakzine oder innerhalb von 40 Tagen nach einer zweiten 1-ug- bis 100-µg-Dosis der mRNA, Zusammensetzung oder der Vakzine induziert.

[0631] In bevorzugten Ausführungsformen induziert die Verabreichung einer therapeutisch effektiven Menge der mRNA, Zusammensetzung oder der Vakzine an ein Individuum eine T-Zell-Immunantwort gegen das Coronavirus in dem Individuum. In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die T-Zell-Immunantwort eine $CD4^+$-T-Zell-Immunantwort und/oder eine $CD8^+$-T-Zell-Immunantwort.

Kit oder Kit von Teilen, Anwendung, medizinische Verwendung, Behandlungsverfahren:

[0632] In einem vierten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Kit oder ein Kit von Teilen bereit, das zur Behandlung oder Vorbeugung einer Coronavirus-Infektion geeignet ist. Vorzugsweise ist das Kit oder das Kit von Teilen ist geeignet zur Behandlung oder Vorbeugung einer Coronavirus-Infektion, vorzugsweise einer SARS-CoV-2 (früher nCoV-2019)-Coronavirus-Infektion.

[0633] Insbesondere können Ausführungsformen, die sich auf die mRNA des ersten Aspekts, die Zusammensetzung des zweiten Aspekts und die Vakzine des dritten Aspekts beziehen, ebenfalls als geeignete Ausführungsformen des Kits oder des Kits von Teilen des vierten Aspekts der Erfindung gelesen und aufgefasst werden.

[0634] In Ausführungsformen umfasst das Kit oder Kit von Teilen mindestens eine mRNA des ersten Aspekts, mindestens eine Zusammensetzung des zweiten Aspekts und/oder mindestens eine Vakzine des dritten Aspekts.

[0635] Außerdem kann das Kit oder Kit von Teilen ein flüssiges Vehikel zur Solubilisierung und/oder technische Instruktionen mit Informationen zur Verabreichung und Dosierung der Komponenten umfassen.

[0636] Das Kit kann ferner zusätzliche Komponenten umfassen, wie im Zusammenhang mit der Zusammensetzung des zweiten Aspekts und/oder der Vakzine des dritten Aspekts beschrieben.

[0637] Die technischen Instruktionen des Kits können Informationen zur Verabreichung und Dosierung sowie zu Patientengruppen enthalten. Solche Kits, vorzugsweise Kits von Teilen, können z.B. für jede der hierin erwähnten Applikationen oder Verwendungen eingesetzt werden, vorzugsweise für die Verwendung der mRNA des ersten Aspekts, der Zusammensetzung des zweiten Aspekts oder der Vakzine des dritten Aspekts, zur Behandlung oder Vorbeugung einer Infektion oder von Krankheiten, die durch ein Coronavirus, bevorzugt das SARS-CoV-2-Coronavirus, verursacht werden, oder von damit zusammenhängenden Störungen.

[0638] Vorzugsweise wird die mRNA, die Zusammensetzung oder die Vakzine in einem separaten Teil des Kits bereitgestellt, wobei die mRNA, die Zusammensetzung oder die Vakzine vorzugsweise lyophilisiert ist.

[0639] Das Kit kann ferner als einen Teil ein Vehikel (z.B. eine Pufferlösung) zur Solubilisierung der mRNA, der Zusammensetzung oder der Vakzine enthalten.

[0640] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst das Kit oder Kit von Teilen, wie hierin definiert, Ringer-Lactat-Lösung.

[0641] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst das Kit oder Kitvon Teilen, wie hierin definiert, einen Multidose-Behälter für die Verabreichung der Zusammensetzung/der Vakzine.

[0642] Jedes der obigen Kits kann bei einer Behandlung oder Vorbeugung, wie hierin definiert, verwendet werden. Noch bevorzugter kann jedes der obigen Kits als Vakzine verwendet werden, vorzugsweise als Vakzine gegen Infektionen, die durch ein Coronavirus, vorzugsweise durch das SARS-CoV-2-Coronavirus, verursacht werden.

[0643] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst das Kit oder Kit von Teilen die folgenden Komponenten:

a) mindestens einen Behälter oder ein Fläschchen, umfassend eine Zusammensetzung oder eine SARS-CoV-2-Vakzine, wie hierin definiert, wobei die Zusammensetzung oder SARS-CoV-2-Vakzine eine mRNA-Konzentration, in einem Bereich von etwa 100 µg/ml bis etwa 1 mg/ml, bevorzugt in einem Bereich von etwa 100 µg/ml bis etwa 500 µg/ml, z.B. etwa 270 µg/ml, aufweist.

b) mindestens einen Verdünnungsbehälter oder ein Fläschchen umfassend einen sterilen Verdünnungspuffer, geeigneterweise einen NaCl-haltigen Puffer, der optional ein Konservierungsmittel enthält;

c) mindestens ein Mittel zum Überführen der Zusammensetzung oder Vakzine aus dem Lagerbehälter in den Verdünnungsbehälter; und

d) mindestens eine Spritze zum Verabreichen der endgültigen verdünnten Zusammensetzung oder Vakzine an ein Individuum, vorzugsweise konfiguriert für eine intramuskuläre Verabreichung an einen Men-

schen, wobei die endgültige verdünnte Zusammensetzung oder Vakzine eine Nukleinsäurekonzentration, vorzugsweise eine RNA-Konzentration, in einem Bereich von etwa 10 µg/ml bis etwa 100 µg/ml, bevorzugt in einem Bereich von etwa 10 µg/ml bis etwa 50 µg/ml, z.B. etwa 24 µg/ml, aufweist.

[0644] Das Kit oder Kit von Teilen kann mehr als eine mRNA-basierte SARS-CoV-2-Zusammensetzung/Vakzine umfassen, vorzugsweise

- mindestens eine Vakzine, wie hierin definiert, die in einem ersten Fläschchen oder Behälter bereitgestellt wird, wobei die Vakzine mindestens eine mRNA umfasst, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz der SEQ ID NOs: 163, 149 oder 24837 ist, vorzugsweise formuliert in Lipid-Nanopartikeln (LNPs), die ein Molverhältnis von etwa 50:10:38,5:1,5, bevorzugt 47,5:10:40,8:1,7 oder bevorzugter 47,4:10:40,9:1,7, d.h. Verhältnis (Mol-%) von kationischem Lipid III-3 (ALC-0315), DSPC, Cholesterol und PEG-Lipid der Formel (IVa) (mit n = 49 oder mit n = 45 (ALC-0159)) aufweisen, wobei die mRNA bevorzugt nicht chemisch modifiziert ist.

- mindestens eine weitere Vakzine, wie hierin definiert, die in einem ersten Fläschchen oder Behälter bereitgestellt wird, wobei die Zusammensetzung/Vakzine mindestens eine mRNA umfasst, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz der SEQ ID NOs: 23311, 23531, 24851, 23310, 23530, 24850, 23313, 23533, 24853, 23314, 23534 oder 24854 ist, vorzugsweise formuliert in Lipid-Nanopartikeln (LNPs), die ein Molverhältnis von etwa 50:10:38,5:1,5, bevorzugt 47,5:10:40,8:1,7 oder bevorzugter 47,4:10:40,9:1,7, d.h. Verhältnis (Mol-%) von kationischem Lipid III-3 (ALC-0315), DSPC, Cholesterol und PEG-Lipid der Formel (IVa) (mit n = 49 oder mit n = 45 (ALC-0159)) aufweisen, wobei die mRNA vorzugsweise nicht chemisch modifiziert ist.

[0645] In einer Ausführungsform umfasst das Kit oder Kit von Teilen zwei verschiedene SARS-CoV-2-Vakzine für die Prime-Vakzinierung und die Boost-Vakzinierung:

- mindestens eine Prime-Vakzine, wie hierin definiert, die in einem ersten Fläschchen oder Behälter bereitgestellt wird, wobei die Vakzine eine mRNA-basierte SARS-CoV-2-Vakzine, wie hierin definiert, ist; und

- mindestens eine Boost-Vakzine, wie hierin definiert, die in einem ersten Fläschchen oder Behälter bereitgestellt wird, wobei die Zusammensetzung/Vakzine eine Adenovirusbasierte SARS-CoV-2-Vakzine ist, wie hierin definiert.

[0646] In einer Ausführungsform umfasst das Kit oder Kit von Teilen zwei verschiedene SARS-CoV-2-Vakzine für die Erstimpfung (Prime-Vakzinierung) und die Zweitimpfung (Boost-Vakzinierung):

- mindestens eine Boost-Vakzine, wie hierin definiert, die in einem ersten Fläschchen oder Behälter bereitgestellt wird, wobei die Vakzine eine mRNA-basierte SARS-CoV-2-Vakzine ist, wie hierin definiert; und

- mindestens eine Prime-Vakzine, wie hierin definiert, die in einem ersten Fläschchen oder Behälter bereitgestellt wird, wobei die Zusammensetzung/Vakzine eine Adenovirusbasierte SARS-CoV-2-Vakzine ist, wie hierin definiert.

Kombination:

[0647] Auch offenbart wird eine Kombination von mindestens zwei Nukleinsäuresequenzen, wie hierin definiert, mindestens zwei Zusammensetzungen, wie im Kontext des zweiten Aspekts definiert, mindestens zwei Vakzinen, wie im Kontext des dritten Aspekts definiert, oder mindestens zwei Kits, wie im Kontext des vierten Aspekts definiert.

[0648] Der Begriff „Kombination“ bedeutet insbesondere ein kombiniertes Vorliegen von mindestens zwei Komponenten, insbesondere von mindestens zwei Nukleinsäuresequenzen, wie im ersten Aspekt definiert, mindestens zwei Zusammensetzungen, wie im Kontext des zweiten Aspekts definiert, mindestens zwei Vakzinen, wie im Kontext des dritten Aspekts definiert, oder mindestens zwei Kits, wie im Kontext des vierten Aspekts definiert. Die Komponenten einer solchen Kombination können als separate Einheiten vorliegen. So kann die Verabreichung der Komponenten der Kombination entweder gleichzeitig oder zeitlich versetzt erfolgen, entweder an derselben Verabreichungsstelle oder an verschiedenen Verabreichungsstellen.

[0649] Die Kombination kann eine Vielzahl oder zumindest mehr als eine der Nukleinsäurespezies, z.B. RNA-Spezies, wie im Zusammenhang mit dem ersten Aspekt der Erfindung definiert, umfassen, wobei die Nukleinsäurespezies als separate Komponenten bereitgestellt werden.

[0650] Die hierin definierte Kombination kann 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 oder 10 verschiedene Nukleinsäuren, z.B. RNA-Spezies, wie im Zusammenhang mit dem ersten Aspekt der Erfindung definiert; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 oder 10 verschiedene Zusammensetzungen, wie im Zusammenhang mit dem zweiten Aspekt definiert; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 oder 10 verschiedene Vakzine, wie im Zusammenhang mit dem dritten Aspekt der Erfindung definiert, umfassen, wobei die Nukleinsäurespezies, Zusammensetzungen, Vakzine als separate Komponenten bereitgestellt werden.

[0651] Die Kombination kann 2, 3, 4 oder 5 Nukleinsäurespezies (z.B. DNA oder RNA) umfassen, die von separaten Komponenten umfasst werden, vorzugsweise RNA-Spezies, wobei die Nukleinsäurespezies eine Nukleinsäuresequenz umfassen oder aus einer Nukleinsäuresequenz bestehen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den SEQ ID NOs: 116-132, 134-138, 140-143, 145-175, 11664-11813, 11815, 11817-12050, 12052, 12054-13147, 13514, 13515, 13519, 13520, 14124-14177, 22759, 22764-22786, 22791-22813, 22818-22839, 22969-23184, 23189-23404, 23409-23624, 23629-23844, 23849-24064, 24069-24284, 24289-24504, 24509-24724, 24729-24944, 24949-25164, 25169-25384, 25389-25604, 25609-25824, 25829-26044, 26049-26264, 26269-26484, 26489-26704, 26709-26937, ist, und optional mindestens einen pharmazeutisch akzeptablen Träger oder Hilfsstoff, wobei jede der 2, 3, 4 oder 5 Nukleinsäurespezies für ein unterschiedliches antigenes Peptid oder Protein eines SARS-CoV-2-Coronavirus kodiert.

[0652] Dementsprechend kann die Kombination zwei Nukleinsäurespezies (z.B. DNA oder RNA) umfassen, die von getrennten Komponenten umfasst werden, vorzugsweise RNA-Spezies, wobei die Nukleinsäurespezies eine Nukleinsäuresequenz umfassen oder aus einer Nukleinsäuresequenz bestehen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz, ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 148-175, 12204-13147, 14142-14177, 22786-22839, 23189-23404, 23409-23624, 23629-23844, 23849-24064, 24069-24284, 24289-24504, 24509-24724, 24729-24944, 24949-25164, 25169-25384, 25389-25604, 25609-25824, 25829-26044, 26049-26264, 26269-26484, 26489-26704, 26709-26937148, ist, und optional mindestens einen pharmazeutisch akzeptablen Träger oder Hilfsstoff, wobei jede der beiden Nukleinsäurespezies für ein unterschiedliches antigenes Peptid oder Protein eines SARS-CoV-2-Coronavirus kodiert.

[0653] Die Kombination kann drei Nukleinsäurespezies (z.B. DNA oder RNA), die von getrennten Komponenten umfasst werden, vorzugsweise RNA-Spezies umfassen, wobei die Nukleinsäure eine Nukleinsäuresequenz umfasst oder aus einer Nukleinsäuresequenz besteht, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz, ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 148-175, 12204-13147, 14142-14177, 22786-22839, 23189-23404, 23409-23624, 23629-23844, 23849-24064, 24069-24284, 24289-24504, 24509-24724, 24729-24944, 24949-25164, 25169-25384, 25389-25604, 25609-25824, 25829-26044, 26049-26264, 26269-26484, 26489-26704, 26709-26937, ist, und optional mindestens einen pharmazeutisch akzeptablen Träger oder Hilfsstoff, wobei jede der 3 Nukleinsäurespezies für ein unterschiedliches antigenes Peptid oder Protein eines SARS-CoV-2-Coronavirus kodiert.

[0654] Im Folgenden werden insbesondere Kombinationen bereitgestellt, wobei jede Komponente der Kombination als separate Einheit bereitgestellt wird.

[0655] So können die mindestens 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 oder noch mehr verschiedenen Nukleinsäurespezies, Zusammensetzungen, Vakzine der Kombination insbesondere jeweils für ein anderes präfusionsstabilisiertes Spike-Protein (wie im ersten Aspekt definiert) kodieren. Insbesondere wird die Stabilisierung der Perfusionskonformation durch die Einführung von zwei aufeinanderfolgenden Prolinsubstitutionen an den Resten K986 und V987 im Spike-Protein (Aminosäurepositionen gemäß Bezugssequenz SEQ ID NO: 1) erreicht. Dementsprechend umfassen die mindestens 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 präfusionsstabilisierten Spike-Proteine (S_stab) insbesondere jeweils mindestens eine präfusionsstabilisierende Mutation, wobei die mindestens eine präfusionsstabilisierende Mutation die Aminosäuresubstitutionen K986P und V987P umfasst (Aminosäurepositionen gemäß der Bezugssequenz SEQ ID NO: 1).

[0656] Dementsprechend kodieren die mindestens 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 oder noch mehr verschiedenen Nukleinsäurespezies, Zusammensetzungen, Vakzine der Kombination jeweils ein anderes präfusionsstabilisiertes Spike-Protein, wobei die mindestens 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 oder noch mehr stabilisierten Spike-Proteine aus Aminosäuresequenzen ausgewählt sind, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 10-26, 341-407, 609-1278, 13521-13587, 22738, 22740, 22742, 22744, 22746, 22748, 22750, 22752, 22754, 22756, 22758, 22947-2296410 sind, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante irgendeiner dieser Sequenzen.

[0657] Die Kombination kann insbesondere eine Nukleinsäurespezies, eine Zusammensetzung, eine Vakzine umfassend eine kodierende Sequenz, die eine Aminosäuresequenz kodiert, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 10 ist, umfassen, wobei die multivalente Zusammensetzung zusätzlich mindestens 2, 3, 4 weitere RNA-Spezies umfasst, die ausgewählt sind aus:

i) einer Nukleinsäurespezies umfassend eine kodierende Sequenz, die eine Aminosäuresequenz kodiert, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 22961 ist; und/oder

ii) einer Nukleinsäurespezies umfassend eine kodierende Sequenz, die eine Aminosäuresequenz kodiert, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 22960 ist; und/oder

iii) einer Nukleinsäurespezies umfassend eine kodierende Sequenz, die eine Aminosäuresequenz kodiert, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 22963 ist; und/oder

iv) einer Nukleinsäurespezies umfassend eine kodierende Sequenz, die eine Aminosäuresequenz kodiert, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 22941 ist; und/oder

v) einer Nukleinsäurespezies umfassend eine kodierende Sequenz, die eine Aminosäuresequenz kodiert, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 22964 ist.

[0658] Insbesondere können die mindestens 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 oder noch mehr verschiedenen Nukleinsäurespezies, Zusammensetzungen, Vakzine der Kombination Nukleinsäure-kodierende Sequenzen, die jeweils für ein anderes präfusionsstabilisiertes Spike-Protein kodieren, umfassen, wobei die mindestens 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 oder noch mehr kodierenden Nukleinsäuresequenzen ausgewählt sind aus Nukleinsäuresequenzen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 136-138, 140-143, 145-175, 11731-11813, 11815, 11817-12050, 12052, 12054-12203, 13514, 13515, 13519, 13520, 14124-14141, 22759, 22764-22785, 22969-23184 sind, oder Fragmente oder Varianten irgendeiner dieser Sequenzen.

[0659] Insbesondere kann die Kombination eine Nukleinsäure-Spezies, Zusammensetzung, Vakzine, umfassend eine kodierende Sequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 137 ist, umfassen wobei die multivalente Zusammensetzung zusätzlich mindestens 2, 3, 4 weitere RNA-Spezies umfasst, die ausgewählt sind aus:

i) einer Nukleinsäurespezies umfassend eine kodierende Sequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 23091 ist; und/oder

ii) einer Nukleinsäurespezies umfassend eine kodierende Sequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 23090 ist; und/oder

iii) einer Nukleinsäurespezies umfassend eine kodierende Sequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 23093 ist; und/oder

iv) einer Nukleinsäurespezies umfassend eine kodierende Sequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NOs: 22999 ist; und/oder

v) einer Nukleinsäurespezies umfassend eine kodierende Sequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 23094 ist.

[0660] Insbesondere können die mindestens 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 oder noch mehr verschiedenen Nukleinsäurespezies, Zusammensetzungen, Vakzine der Kombination kodierende Nukleinsäuresequenzen, die jeweils für ein anderes präfusionsstabilisiertes Spike-Protein kodieren, umfassen, wobei die mindestens 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 oder noch mehr kodierende Nukleinsäuresequenzen ausgewählt sind aus RNA-Sequenzen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 149-151, 163-165, 12338, 12541, 12810-12813, 12901, 12931, 13013, 22792, 22794, 22796, 22798, 22802, 22804, 22806, 22810, 22813, 22819, 22821, 22823, 22825, 22827, 22829, 22831, 22833, 22835, 22837, 22839, 23297-23314, 23369, 23517-23520, 23523-23525, 23527, 23529, 23530, 23589, 23737, 23957, 24397, 24837, 25057, 25277, 25717, 26925-26937149 sind, oder Fragmente oder Varianten irgendeiner dieser Sequenzen.

[0661] Die Kombination kann eine RNA-Spezies, Zusammensetzung, Vakzine, die eine RNA-Sequenz umfasst oder aus einer RNA-Sequenz besteht, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 163 ist, umfassen, wobei die Kombination zusätzlich mindestens 2, 3, 4 weitere RNA-Spezies umfasst, die ausgewählt sind aus:

i) einer RNA-Spezies umfassend eine kodierende Sequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 23311 ist; und/oder

ii) einer RNA-Spezies umfassend eine kodierende Sequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 23310 ist; und/oder

iii) einer RNA-Spezies umfassend eine kodierende Sequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 23313 ist; und/oder

iv) einer RNA-Spezies umfassend eine kodierende Sequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 23219 ist; und/oder

v) einer RNA-Spezies umfassend eine kodierende Sequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit SEQ ID NO: 23314 ist;

wobei vorzugsweise jede der mRNA-Spezies eine Cap1-Struktur umfasst, und optional keine der mRNA-Spezies modifizierte Nukleotide umfasst.

[0662] Die Kombination kann eine RNA-Spezies, Zusammensetzung, Vakzine, die eine RNA-Sequenz umfasst oder aus einer RNA-Sequenz besteht, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 149 oder 24837 ist, umfassen, wobei die Kombination zusätzlich mindestens 2, 3, 4 weitere RNA-Spezies umfasst, die ausgewählt sind aus:

i) einer RNA-Spezies, die eine RNA-Sequenz umfasst oder aus einer RNA-Sequenz besteht, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 23531 oder 24851 ist; und/oder

ii) einer RNA-Spezies umfassend eine kodierende Sequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 23530 oder 24850 ist; und/oder

iii) einer RNA-Spezies umfassend eine kodierende Sequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 23533 oder 24853B ist; und/oder

iv) einer RNA-Spezies umfassend eine kodierende Sequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 23439 oder 24759 ist; und/oder

v) einer RNA-Spezies umfassend eine kodierende Sequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 23534 oder 24854 ist;

wobei vorzugsweise jede der mRNA-Spezies eine Cap1-Struktur umfasst, und optional keine der mRNA-Spezies modifizierte Nukleotide umfasst.

[0663] Eine erste Komponente der Kombination kann insbesondere eine Virusvektor-Vakzine/Virusvektor-Zusammensetzung, wie z.B. eine Vakzine auf Adenovirus-Vektor-Basis, z.B. ADZ1222 oder Ad26.COV-2.S, umfassen und eine zweite Komponente kann eine Vakzine/Zusammensetzung auf Nukleinsäure-Basis, insbesondere eine Vakzine auf RNA-Basis, wie hier definiert, umfassen.

Erste und zweite/weitere medizinische Verwendung:

[0664] Ein weiterer Aspekt bezieht sich auf die erste medizinische Verwendung der bereitgestellten mRNA, Zusammensetzung, der Vakzine, oder des Kits.

[0665] Insbesondere können Ausführungsformen, die sich auf die mRNA des ersten AspektsZusammensetzung des zweiten Aspekts und die Vakzine des dritten Aspekts oder das Kit oder Kit von Teilen des vierten Aspekts beziehen, ebenfalls als geeignete Ausführungsformen medizinischer Verwendungen der Erfindung gelesen und aufgefasst werden.

[0666] Dementsprechend stellt die Erfindung mindestens eine mRNA gemäß dem ersten Aspekt zur Verwendung als Medikament,die Zusammensetzung gemäß dem zweiten Aspekt zur Verwendung als Medikament, die Vakzine gemäß dem dritten Aspekt zur Verwendung als Medikament und das Kit oder das Kit von Teilen gemäß dem vierten Aspekt zur Verwendung als Medikament zur Verfügung.

[0667] Die vorliegende Erfindung stellt ferner mehrere Applikationen und Verwendungen der mRNA der Zusammensetzung, der Vakzine oder des Kits zur Verfügung.

[0668] Insbesondere können die mRNA, die Zusammensetzung, die Vakzine oder das Kit für humanmedizinische Zwecke und auch für veterinärmedizinische Zwecke, vorzugsweise für humanmedizinische Zwecke, verwendet werden.

[0669] Insbesondere ist die mRNA, die Zusammensetzung, die Vakzine oder das Kit oder das Kit von Teilen zur Verwendung als Medikament für humanmedizinische Zwecke bestimmt, wobei die mRNA, die Zusammensetzung, die Vakzine oder das Kit oder Kit von Teilen für Kleinkinder, Neugeborene, immungeschwächte Empfänger sowie schwangere und stillende Frauen und ältere Menschen geeignet sein kann. Insbesondere ist die mRNA, die Zusammensetzung, die Vakzine oder das Kit oder das Kit von Teilen zur Verwendung als Medikament für humanmedizinische Zwecke bestimmt, wobei die mRNA, die Zusammensetzung, die Vakzine oder das Kit oder das Kit von Teilen besonders für ältere Menschen geeignet ist.

[0670] Die mRNA, die Zusammensetzung, die Vakzine oder das Kit ist zur Verwendung als Medikament für humanmedizinische Zwecke bestimmt, wobei die mRNA, die Zusammensetzung, die Vakzine oder das Kit oder das Kit von Teilen besonders für die intramuskuläre Injektion oder die intradermale Injektion geeignet sein kann.

[0671] In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung die zweite medizinische Verwendung der mRNA, der Zusammensetzung, der Vakzine oder des Kits.

[0672] Dementsprechend stellt die Erfindung mindestens eine mRNA, wie im ersten Aspekt definiert, zur Behandlung oder Vorbeugung (Prophylaxe) einer Infektion mit einem Coronavirus, vorzugsweise SARS-CoV-2-Coronavirus, oder einer mit einer solchen Infektion zusammenhängenden Störung oder Krankheit, wie zum Beispiel COVID-19; eine Zusammensetzung, wie im zweiten Aspekt definiert, zur Behandlung oder Prophylaxe einer Infektion mit einem Coronavirus, vorzugsweise SARS-CoV-2-Coronavirus, oder einer mit einer solchen Infektion zusammenhängenden Störung oder Krankheit, wie beispielsweise COVID-19; eine Vakzine, wie im dritten Aspekt definiert, zur Behandlung oder Prophylaxe einer Infektion mit einem Coronavi-

rus, vorzugsweise SARS-CoV-2-Coronavirus, oder einer mit einer solchen Infektion zusammenhängenden Störung oder Krankheit, wie beispielsweise COVID-19; ein Kit oder Kit von Teilen, wie im vierten Aspekt definiert, zur Behandlung oder Prophylaxe einer Infektion mit einem Coronavirus, vorzugsweise SARS-CoV-2-Coronavirus, oder einer mit einer solchen Infektion zusammenhängenden Störung oder Krankheit, wie beispielsweise COVID-19 zur Verfügung.

[0673] In Ausführungsformen ist die mRNA des ersten Aspekts, die Zusammensetzung des zweiten Aspekts, die Vakzine des dritten Aspekts oder das Kit oder Kit von Teilen des vierten Aspekts zur Verwendung bei der Behandlung oder Prophylaxe einer Infektion mit einem Coronavirus, vorzugsweise mit dem SARS-CoV-2-Coronavirus, bestimmt.

[0674] Insbesondere kann die mRNA, des ersten Aspekts, die Zusammensetzung des zweiten Aspekts, die Vakzine des dritten Aspekts oder das Kit oder Kit von Teilen des vierten Aspekts in einem Verfahren zur prophylaktischen (Präexpositionsprophylaxe oder Postexpositionsprophylaxe) und/oder therapeutischen Behandlung von Infektionen, die durch ein Coronavirus, vorzugsweise SARS-CoV-2-Coronavirus, verursacht werden, verwendet werden.

[0675] Insbesondere kann die mRNA, des ersten Aspekts, die Zusammensetzung des zweiten Aspekts, die Vakzine des dritten Aspekts oder das Kit oder Kit von Teilen des vierten Aspekts in einem Verfahren zur prophylaktischen (Präexpositionsprophylaxe oder Postexpositionsprophylaxe) und/oder therapeutischen Behandlung der COVID-19-Erkrankung, die durch eine SARS-CoV-2-Coronavirus-Infektion verursacht wird, verwendet werden.

[0676] Die mRNA, die Zusammensetzung oder die Vakzine kann vorzugsweise lokal verabreicht werden. Insbesondere können die Zusammensetzung oder Vakzine auf intradermalem, subkutanem, intranasalem oder intramuskulärem Weg verabreicht werden. In Ausführungsformen kann die erfindungsgemäße mRNA, die erfindungsgemäße Zusammensetzung oder die erfindungsgemäße Vakzine durch eine herkömmliche Nadelinjektion oder eine nadelfreie Jet-Injektion verabreicht werden. Bevorzugt ist in diesem Zusammenhang die intramuskuläre Injektion.

[0677] Offenbart wird auch, dass, wenn Plasmid-DNA verwendet wird und in der Zusammensetzung oder Vakzine oder Kombination enthalten ist, die Zusammensetzung/Vakzine/Kombination durch Elektroporation unter Verwendung einer Elektroporationsvorrichtung, z.B. einer Elektroporationsvorrichtung zur intradermalen oder intramuskulären Verabreichung, verabreicht werden kann. Zweckmäßigerweise kann eine Vorrichtung, wie in US 7,245,963 B2 beschrieben, verwendet werden, insbesondere eine Vorrichtung, wie in den Ansprüchen 1 bis 68 von US 7,245,963 B2 definiert.

[0678] Offenbart wird auch, sofern Adenovirus-DNA verwendet wird und in der Zusammensetzung oder der Vakzine enthalten ist, die Zusammensetzung/Vakzine durch intranasale Verabreichung verabreicht werden kann.

[0679] In Ausführungsformen wird die mRNA, die in einer Zusammensetzung oder in einer Vakzine enthalten ist, in einer Menge von etwa 100 ng bis etwa 500 ug, in einer Menge von etwa 1 ug bis etwa 200 ug, in einer Menge von etwa 1ug bis etwa 100 ug, in einer Menge von etwa 5 ug bis etwa 100 ug, bevorzugt in einer Menge von etwa 10 ug bis etwa 50 ug, insbesondere in einer Menge von etwa 1 ug, 2 ug, 3 ug, 4 ug, 5 ug, 8 ug, 9 ug, 10 ug, 11 ug, 12 ug, 13 ug, 14 ug, 15 ug, 16 ug, 20 ug, 25 ug, 30 ug, 35 ug, 40 ug, 45 ug, 50 ug, 55 ug, 60 ug, 65 ug, 70 ug, 75 ug, 80 ug, 85 ug, 90 ug, 95 ug oder 100 ug enthalten sein.

[0680] In einigen Ausführungsformen wird die Vakzine, die die mRNA umfasst, oder die Zusammensetzung, die die mRNA umfasst, in einer effektiven Menge formuliert, um eine antigenspezifische Immunantwort in einem Individuum zu erzeugen. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge an mRNA eine Gesamtdosis von 1 ug bis 200 ug, 1 ug bis 100 ug oder 5 ug bis 100 ug, bereitgestellt.

[0681] In Ausführungsformen, in denen die mRNA in einem Träger auf Lipidbasis, z.B. einem LNP, bereitgestellt wird, ist die Menge an PEG-Lipid, wie hier definiert, die in einer Dosis enthalten ist, geringer als etwa 50 µg PEG-Lipid, bevorzugt geringer als etwa 45 µg PEG-Lipid, bevorzugter geringer als etwa 40 µg PEG-Lipid.

[0682] Eine geringe Menge an PEG-Lipid in einer Dosis kann das Risiko von Nebenwirkungen (z.B. Allergien) verringern.

[0683] In besonders bevorzugten Ausführungsformen liegt die Menge an PEG-Lipid, die in einer Dosis enthalten ist, in einem Bereich von etwa 3,5 µg PEG-Lipid bis etwa 35 µg PEG-Lipid.

[0684] In Ausführungsformen, in denen die mRNA in einem Träger auf Lipidbasis, z.B. einem LNP, bereitgestellt wird, ist die Menge an kationischem Lipid, wie hierin definiert, die in einer Dosis enthalten ist, geringer als etwa 400 µg kationisches Lipid, bevorzugt geringer als etwa 350 µg kationisches Lipid, bevorzugter geringer als etwa 300 µg kationisches Lipid.

[0685] Eine geringe Menge an kationischem Lipid in einer Dosis kann das Risiko von Nebenwirkungen (z.B. Fieber) verringern.

[0686] In besonders bevorzugten Ausführungsformen liegt die Menge an kationischem Lipid, die in einer Dosis enthalten ist, in einem Bereich von etwa 30 µg PEG-Lipid bis etwa 300 µg PEG-Lipid. In einer Ausführungsform umfasst das Immunisierungsprotokoll zur Behandlung oder Prophylaxe eines Individuums gegen Coronavirus, vorzugsweise SARS-CoV-2-Coronavirus, eine Einzeldosis der Zusammensetzung oder Vakzine.

[0687] In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 1 ug, die dem Individuum in einer Vakzinierung verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 2 ug, die dem Individuum in einer Vakzinierung verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 3 ug, die dem Individuum in einer Vakzinierung verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 4 ug, die dem Individuum in einer Vakzinierung verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 5 ug, die dem Individuum in einer Vakzinierung verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 6 ug, die dem Individuum in einer Vakzinierung verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 7 ug, die dem Individuum in einer Vakzinierung verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 8 ug, die dem Individuum in einer Vakzinierung verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 9 ug, die dem Individuum in einer Vakzinierung verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 10 ug, die dem Individuum in einer Vakzinierung verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 11 ug, die dem Individuum in einer Vakzinierung verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 12 ug, die dem Individuum in einer Vakzinierung verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 13 ug, die dem Individuum in einer Vakzinierung verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 14 ug, die dem Individuum in einer Vakzinierung verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 16 ug, die dem Individuum in einer Vakzinierung verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 20 ug, die dem Individuum in einer Vakzinierung verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 25 ug, die dem Individuum in einer Vakzinierung verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 30 ug, die dem Individuum in einer Vakzinierung verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 40 ug, die dem Individuum in einer Vakzinierung verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 50 ug, die dem Individuum in einer Vakzinierung verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 100 ug, die dem Individuum in einer Vakzinierung verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 200 ug, die dem Individuum in einer Vakzinierung verabreicht wird. Eine „Dosis“ bezieht sich in diesem Zusammenhang auf die effektive Menge an mRNA, wie hier definiert.

[0688] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst das Immunisierungsprotokoll zur Behandlung oder Prophylaxe einer Coronavirus-Infektion, vorzugsweise einer SARS-CoV-2-Coronavirus-Infektion, eine Reihe von Einzeldosen oder -dosierungen der Zusammensetzung oder der Vakzine. Eine Einzeldosis, wie hierin verwendet, bezieht sich auf die initiale/erste Dosis, eine zweite Dosis bzw. etwaige weitere Dosen, die vorzugsweise verabreicht werden, um die Immunantwort zu verstärken („boosten“).

[0689] In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 1 ug, die dem Individuum insgesamt zweimal verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 2 ug, die dem Individuum insgesamt zweimal verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 3 ug, die dem Individuum insgesamt zweimal verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 4 ug, die dem Individuum insgesamt zweimal verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 5 ug, die dem Individuum insgesamt zweimal verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 6 ug, die dem Indivi-

duum insgesamt zweimal verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 7 ug, die dem Individuum insgesamt zweimal verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 8 ug, die dem Individuum insgesamt zweimal verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 9 ug, die dem Individuum insgesamt zweimal verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 10 ug, die dem Individuum insgesamt zweimal verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 11 ug, die dem Individuum insgesamt zweimal verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 12 ug, die dem Individuum insgesamt zweimal verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 13 ug, die dem Individuum insgesamt zweimal verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 14 ug, die dem Individuum insgesamt zweimal verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 16 ug, die dem Individuum insgesamt zweimal verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 20 ug, die dem Individuum insgesamt zweimal verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 25 ug, die dem Individuum insgesamt zweimal verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 30 ug, die dem Individuum insgesamt zweimal verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 40 ug, die dem Individuum insgesamt zweimal verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 50 ug, die dem Individuum insgesamt zweimal verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 100 ug, die dem Individuum insgesamt zweimal verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die effektive Menge eine Dosis von 200 ug, die dem Individuum insgesamt zweimal verabreicht wird. Eine „Dosis“ bezieht sich in diesem Zusammenhang auf die effektive Menge an mRNA, wie hier definiert.

[0690] In bevorzugten Ausführungsformen immunisiert die Vakzine/Zusammensetzung das Individuum gegen eine Coronavirus-Infektion, vorzugsweise gegen eine SARS-CoV-2-Coronavirus-Infektion, (nach Verabreichung wie hierin definiert) für mindestens 1 Jahr, bevorzugt mindestens 2 Jahre. In bevorzugten Ausführungsformen immunisiert die Vakzine/Zusammensetzung/Kombination das Individuum gegen ein Coronavirus, vorzugsweise gegen ein SARS-CoV-2-Coronavirus, für mehr als 2 Jahre, bevorzugter für mehr als 3 Jahre, noch bevorzugter für mehr als 4 Jahre, noch bevorzugter für mehr als 5-10 Jahre.

[0691] VerwendungDas Verhindern (Inhibieren) oder Behandeln einer Krankheit, insbesondere einer Coronavirus-Infektion, bezieht sich auf das Verhindern der vollständigen Entwicklung einer Krankheit oder eines Zustands, beispielsweise bei einem Individuum, bei dem ein Risiko für eine Krankheit, wie beispielsweise eine Coronavirus-Infektion, besteht. Der Begriff „Behandlung“ bezieht sich auf eine therapeutische Intervention, die ein Anzeichen oder Symptom einer Krankheit oder eines pathologischen Zustands bessert, nachdem diese(r) begonnen hat, sich zu entwickeln. Der Begriff „verbessernd“ bezieht sich in Bezug auf eine Krankheit oder einen pathologischen Zustand auf jeden beobachtbaren positiven Effekt der Behandlung. Die Inhibierung einer Krankheit kann die Verhinderung oder Verringerung des Risikos der Krankheit einschließen, wie z.B. die Verhinderung oder Verringerung des Risikos einer Virusinfektion. Die vorteilhafte Wirkung kann z.B. durch ein verzögertes Auftreten klinischer Symptome der Krankheit bei einem empfänglichen Individuum, eine Verringerung des Schweregrads einiger oder aller klinischen Symptome der Krankheit, eine Verlangsamung des Fortschreitens der Krankheit, eine Reduzierung der Viruslast, eine Verbesserung der allgemeinen Gesundheit oder des Wohlbefindens des Individuum oder durch andere Parameter, die für die jeweilige Krankheit spezifisch sind, nachgewiesen werden. Eine „prophylaktische“ Behandlung ist eine Behandlung, die einem Individuum verabreicht wird, das keine Anzeichen einer Krankheit oder nur frühe Anzeichen aufweist, um das Risiko der Entwicklung einer Pathologie zu verringern.

[0692] In bevorzugten Ausführungsformen bezieht sich die vorliegende Erfindung auf die Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung oder Vorbeugung einer Störung, wobei die Verwendung in dem Verfahren die Applikation oder Verabreichung mindestens einer mRNA des ersten Aspekts, der Zusammensetzung des zweiten Aspekts, der Vakzine des dritten Aspekts oder des Kits oder Kits von Teilen des vierten Aspekts an ein Individuum, das dies benötigt, umfasst.

[0693] Die Störung ist eine Infektion mit einem Coronavirus oder eine mit derartigen Infektionen zusammenhängende Störung, insbesondere eine Infektion mit dem SARS-CoV-2-Coronavirus oder eine mit derartigen Infektionen in Zusammenhang stehende Störung, z.B. COVID-19.

[0694] In bevorzugten Ausführungsformen bezieht sich die vorliegende Erfindung auf die Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung oder Vorbeugung einer Erkrankung, wie oben definiert, wobei die Verwendung in dem Verfahren die Applikation oder Verabreichung mindestens einer mRNA des ersten Aspekts, der

Zusammensetzung des zweiten Aspekts, der Vakzine des dritten Aspekts oder des Kits oder Kits von Teilen des vierten Aspekts an ein Individuum, das dies benötigt, umfasst, wobei das Individuum vorzugsweise ein Säugetier ist.

[0695] In bestimmten Ausführungsformen erfolgt die Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung oder Vorbeugung von Krankheiten durch Applikation oder Verabreichung mindestens einer mRNA des ersten Aspekts, der Zusammensetzung des zweiten Aspekts, der Vakzine des dritten Aspekts oder des Kits oder Kits von Teilen des vierten Aspekts an ein Individuum, das dies benötigt; Eine solche Verwendung in einem Vefahren ist ferner definiert als die Verwendung in einem Verfahren zur Verringerung der Krankheitslast bei dem Individuum. Zum Beispiel reduziert die Verwendung in einem solchen Verfahren vorzugsweise den Schweregrad und/oder die Dauer eines oder mehrerer Symptome der COVID-19-Erkrankung. In einigen Aspekten reduziert die Verwendung in einem Verfahren die Wahrscheinlichkeit, dass ein Individuum eine Hospitalisierung, eine Aufnahme auf der Intensivstation, eine Behandlung mit zusätzlichem Sauerstoff und/oder eine Behandlung mit einem Beatmungsgerät benötigt. In weiteren Aspekten reduziert die Verwendung in einem Verfahren die Wahrscheinlichkeit, dass ein Individuum Fieber, Atembeschwerden, Geruchsverlust und/oder Geschmacksverlust entwickelt. In bevorzugten Aspekten reduziert die Verwendung in einem Verfahren die Wahrscheinlichkeit, dass ein Individuum eine schwere oder moderate COVID-19-Erkrankung entwickelt. In bestimmten Aspekten verhindert die Verwendung in einem Verfahren der Ausführungsformen eine schwere oder moderate COVID-19-Erkrankung bei dem Individuum zwischen etwa 2 Wochen und 1 Monat, 2 Monaten, 3 Monaten, 4 Monaten, 5 Monaten, 6 Monaten, 1 Jahr oder 2 Jahren, nachdem dem Individuum eine Zusammensetzung der Ausführungsformen verabreicht wurde. In bevorzugten Aspekten verhindert die Verwendung in einem Verfahren der Ausführungsformen eine symptomatische COVID-19-Erkrankung. In weiteren Aspekten verhindert die Verwendung in einem Verfahren der Ausführungsformen nachweisbare Mengen an SARS-CoV-2-Nukleinsäure in dem Individuum zwischen etwa 2 Wochen und 1 Monat, 2 Monaten, 3 Monaten, 4 Monaten, 5 Monaten, 6 Monaten, 1 Jahr oder 2 Jahren, nachdem dem Individuum eine Zusammensetzung der Ausführungsformen verabreicht wurde. In weiteren Aspekten ist die Verwendung in einem Verfahren der Ausführungsformen definiert als die Verwendung in einem Verfahren zum Bereitstellen einer schützenden Immunität gegen eine Coronavirus-Infektion (z.B. SARS-Cov-2-Infektion) in dem Individuum. In noch weiteren Aspekten verhindert die Verwendung in einem Verfahren der Ausführungsformen eine moderate und schwere COVID-19-Erkrankung bei mindestens 80%, 85%, 90% oder 95% der behandelten Individuen. In noch weiteren Aspekten verhindert die Verwendung in einem Verfahren der Ausführungsformen eine moderate und schwere COVID-19-Erkrankung bei mindestens 80%, 85%, 90% oder 95% der behandelten Individuen in einem Zeitraum von etwa 2 Wochen bis etwa 1 Jahr nach Verabreichung der zweiten oder nachfolgenden immunogenen Zusammensetzung (z.B. einer Booster-Verabreichung). In noch weiteren Aspekten verhindert die Verwendung in einem Verfahren der Ausführungsformen eine moderate und schwere COVID-19-Erkrankung bei mindestens 80%, 85%, 90% oder 95% der behandelten Individuen von etwa 2 Wochen bis etwa 3 Monate, 6 Monate, 9 Monate, 1 Jahr, 1,5 Jahre, 2 Jahre oder 3 Jahre nach Verabreichung der zweiten oder nachfolgenden Zusammensetzung.

[0696] In weiteren Aspekten umfasst die Verwendung in einem Verfahren der Ausführungsformen das Verabreichen einer Vakzinzusammensetzung, die eine mRNA umfasst, die zu mindestens etwa 95% identisch mit SEQ ID NO: 149, 24837, 23311, 23531, 23310, 23530, 23313 oder 23533 ist, (z.B. im Komplex mit einem LNP) an ein Individuum. In einigen Aspekten liefert die Verwendung in einem solchen Verfahren eine ausreichende Immunantwort in dem Individuum, um das Individuum für mindestens etwa 6 Monate vor einer schweren COVID-19-Erkrankung zu schützen. In einigen Aspekten ist das Individuum beispielsweise für etwa 6 Monate bis etwa 1 Jahr, 1,5 Jahre, 2 Jahre, 2,5 Jahre, 3 Jahre, 4 Jahre oder 5 Jahre vor einer schweren COVID-19-Erkrankung geschützt. Somit stellt in einigen Aspekten die Verwendung in einem Verfahren der Ausführungsformen eine Einzeldosis-Vakzinzusammensetzung bereit, die einem Individuum einen verlängerten (z.B. mehr als 6 Monate dauernden) Schutz vor einer schweren Erkrankung bieten kann.

[0697] Wie hierin verwendet, ist eine schwere COVID-19-Erkrankung so definiert, dass ein Individuum eines oder mehrere der folgenden Symptome aufweist:

- Klinische Anzeichen im Ruhezustand, die auf eine schwere systemische Erkrankung hinweisen (Atemfrequenz ≥ 30 Atemzüge pro Minute, Herzfrequenz ≥ 125 pro Minute, SpO2 ≤ 93% bei Raumluft auf Meereshöhe oder PaO2/FIO2 < 300 mm Hg (angepasst an die Höhe))
- Respiratorische Insuffizienz (definiert als Bedarf an High-Flow-Sauerstoff, nicht-invasiver Beatmung, mechanischer Beatmung oder ECMO)
- Anzeichen eines Schocks (SBP < 90 mm Hg, DBP < 60 mm Hg, oder Vasopressoren erfordert ich)

- Signifikante Nieren-, Leber- oder neurologische Funktionsstörung
- Verlegung auf die Intensivstation
- Tod

[0698] Wie hier verwendet, ist eine moderate COVID-19-Erkrankung definiert so definiert, dass ein Individuum eines oder mehrere der folgenden Symptome aufweist:

- Kurzatmigkeit oder Atemnot
- Atemfrequenz ≥ 20 Atemzüge pro Minute
- Abnormaler SpO2, aber immer noch > 93% bei Raumluft auf Meereshöhe (angepasst an die Höhe)
- Klinische oder radiologische Hinweise auf eine Erkrankung der unteren Atemwege
- Radiologischer Nachweis einer tiefen Venenthrombose (DVT)

[0699] Wie hier verwendet, ist eine milde COVID-19-Erkrankung so definiert, dass auf ein Individuum alle folgenden Punkte zutreffen:

- Symptomatisch UND
- Keine Kurzatmigkeit oder Atemnot UND
- Keine Hypoxämie (angepasst an die Höhe) UND
- Erfüllt nicht die Falldefinition einer moderaten oder schweren COVID-19-Erkrankung

[0700] In besonders bevorzugten Ausführungsformen ist das zu behandelnde Individuum ein Säugetier, vorzugsweise ein menschliches Individuum, z.B. ein Neugeborenes, eine Schwangere, ein immungeschwächtes und/oder ein älteres Individuum. In einigen Ausführungsformen hat das Individuum ein Alter zwischen 6 Monaten und 100 Jahren, 6 Monaten und 80 Jahren, 1 Jahr und 80 Jahren, 1 Jahr und 70 Jahren, 2 Jahren und 80 Jahren oder 2 Jahren und 60 Jahren. In anderen Ausführungsformen ist das Individuum ein Neugeborenes oder ein Kleinkind mit einem Alter von nicht mehr als 3 Jahren, von nicht mehr als 2 Jahren, von nicht mehr als 1,5 Jahren, von nicht mehr als 1 Jahr (12 Monaten), von nicht mehr als 9 Monaten, 6 Monaten oder 3 Monaten. In einigen anderen Ausführungsformen ist das Individuum ein älteres Individuum mit einem Alter von mindestens 50, 60, 65 oder 70 Jahren. In weiteren Aspekten ist ein Individuum zur Behandlung gemäß den Ausführungsformen 61 Jahre oder älter. In noch weiteren Aspekten ist das Individuum 18 Jahre bis 60 Jahre alt.

[0701] In bestimmten Ausführungsformen ist ein Individuum zur Behandlung gemäß den Ausführungsformen ein schwangeres Individuum, wie zum Beispiel ein schwangerer Mensch. In einigen Aspekten ist das Individuum seit mehr als etwa einem Monat, zwei Monaten, drei Monaten, vier Monaten, fünf Monaten, sechs Monaten, sieben Monaten oder acht Monaten schwanger.

[0702] In besonders bevorzugten Ausführungsformen ist das menschliche Individuum ein älteres menschliches Individuum.

[0703] In bestimmten Aspekten ist ein Individuum für die Behandlung gemäß den Ausführungsformen indianischer, afrikanischer, asiatischer oder europäischer Abstammung. In einigen Aspekten ist das Individuum zu mindestens etwa 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% oder 90% indianischer, afrikanischer, asiatischer oder europäischer Abstammung. In bestimmten Aspekten ist das Individuum indianischer Abstammung, wie z.B. mindestens 10%, 25% oder 50% indianischer Abstammung. In weiteren Aspekten ist das Individuum ein älteres Individuum mit indianischer Abstammung, z.B. ein Individuum, das mindestens 55, 60, 65 oder 70 Jahre alt ist.

[0704] In weiteren Aspekten hat ein Individuum zur Behandlung gemäß den Ausführungsformen eine Krankheit oder ist immungeschwächt. In einigen Aspekten hat das Individuum eine Lebererkrankung, eine Nierenerkrankung, Diabetes, Bluthochdruck, eine Herzerkrankung oder eine Lungenerkrankung. In weiteren Aspekten ist ein Individuum für die Behandlung gemäß den Ausführungsformen ein Individuum mit einer Vorgeschichte von allergischen Reaktionen, wie zum Beispiel ein Individuum mit Nahrungsmittelallergien. In einigen Aspekten hat das Individuum eine frühere allergische Reaktion auf eine Vakzine gehabt, wie z.B.

eine anaphylaktische Reaktion. In noch weiteren Aspekten ist ein Individuum zur Behandlung ein Individuum mit nachweisbaren Anti-PEG-Antikörpern, wie zum Beispiel nachweisbarem Anti-PEG-IgE im Serum.

[0705] In weiteren Aspekten hat ein Individuum zur Behandlung gemäß den Ausführungsformen mindestens eine Begleiterkrankung (Komorbidität), ausgewählt aus:

(i) Chronischer Nierenerkrankung: Die Nierenfunktion wird aus der Messung des Serumkreatinins innerhalb der letzten 3-6 Monate ermittelt und in die geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (eGFR) unter Verwendung der CKD-EPI-Gleichung (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) umgerechnet, wobei eine eingeschränkte Nierenfunktion als eGFR <60 ml/min/1,73 m^2 definiert ist.

- Milde chronische Nierenerkrankung ist definiert als eine eGFR zwischen 60-89 ml/min/1,73 m^2.

- Moderate chronische Nierenerkrankung ist definiert als eine eGFR zwischen 31-59 ml/min/1,73 m^2 bei stabiler Therapie und guter Maintenance über mindestens 6 Monate (modifiziert aus Clinical Practice Clinical Guidelines for Chronic Kidney Disease: Am J Kidney Dis, 2002).

(ii) COPD (einschließlich Emphysem und chronischer Bronchitis).

- Milde COPD mit oder ohne Husten oder Sputumproduktion ist definiert als forciertes exspiratorisches Volumen in 1 Sekunde/forcierte Vitalkapazität (FEV1/FVC) <0,7 und FEV1 ≥80% prognostiziert.

- Moderate COPD mit oder ohne Husten oder Sputumproduktion ist definiert als FEV1/FVC <0,7 und FEV1 ≥50%, aber <80% prognostiziert bei stabiler Behandlung (GOLD-Kriterien für den Schweregrad der COPD).

(iii) Adipositas mit einem Body-Mass-Index (BMI) von >32 kg/m^2 - jede extreme morbide Adipositas ist ebenfalls eingeschlossen.

(iv) Chronischen kardiovaskulären Zuständen (Herzinsuffizienz, koronare Herzkrankheit, Kardiomyopathien, arterielle Hypertonie), einschließlich der folgenden:

- Herzinsuffizienz der Klasse I: Individuum mit potenziell hohem Risiko für die Entwicklung einer zukünftigen Herzinsuffizienz ohne funktionale oder strukturelle Herzstörung.

- Herzinsuffizienz der Klasse II: Patienten mit einer Herzerkrankung, die zu einer leichten Einschränkung der körperlichen Aktivität führt. Entspannt in Ruhe.

- Gewöhnliche körperliche Aktivität führt zu Müdigkeit, Herzklopfen, Dyspnoe oder Angina pectoris-Schmerzen.

- Herzinsuffizienz der Klasse III mit deutlicher Einschränkung der körperlichen Aktivität, aber entspannt in Ruhe, aber weniger als gewöhnliche Aktivität führt zu Symptomen.

- Strukturelle Herzstörung ohne Symptome in irgendeinem Stadium.

- Milde linksventrikuläre systolische oder diastolische Dysfunktion, die in der Regel kaum klinische Anzeichen hervorruft.

- Moderate linksventrikuläre Insuffizienz mit Belastungsdyspnoe oder Orthopnoe oder paroxysmaler nächtlicher Dyspnoe gemäß New York Heart Association (NYHA), stabil mit Medikamenten (Klasse II-III).

- Koronararterienerkrankung von 2 und über der metabolischen Äquivalenzschwelle (MET) bis zu moderat, stabil mit Medikation. (MET ist definiert als die Menge an Sauerstoff, die im Sitzen in Ruhe verbraucht wird, und entspricht 3,5 ml O_2 pro kg Körpergewicht x min; 4 normal, kann eine Treppe steigen oder einen Hügel hinaufgehen und kann an anderen anstrengenden Aktivitäten teilnehmen; 1 kann sich selbst versorgen, kann sich nicht selbst unterhalten und ist bei Anstrengung eingeschränkt).

- Kardiomyopathien nicht-infektiösen und metabolischen Ursprungs von 2-3 MET mit Medikation.

- Hypertonie im Stadium 1 oder Stadium 2, stabil und mit Medikationen kontrolliert.

(v) Chronischer HIV-Infektion mit stabiler Aviraemie (<50 Kopien/ml) und CD4-Zahl >350/ml, dokumentiert durch Blutproben, die innerhalb von 12 Monaten vor der Aufnahme entnommen wurden. (Viruslast <50 Kopien/ml mit vorübergehenden Veränderungen von 50-350 Kopien/ml ist erlaubt).

(vi) Typ-2-Diabetes mellitus, entweder medikamentös kontrolliert [Hämoglobin A1c (HbA1c) <58 mmol/-mol (7,45%)] oder unkontrolliert mit aktuellem HbA1c von >58 mmol/mol (7,45%); [(HbA1c in% - 2,15) x 10. 929 = HbA1c in mmol/mol]; bei unkontrolliertem DM sollte das HbA1c innerhalb einer Schwankungs-

breite von <10% liegen und es sollte keine Vorgeschichte einer diabetischen Ketoazidose oder einer Episode einer schweren symptomatischen Hypoglykämie innerhalb der letzten 3 Monate vorliegen.

(vii) Individuen, die vor mindestens einem Jahr einer Nierentransplantation unterzogen wurden , für mindestens 6 Monate unter Medikationen in stabilem Zustand sind, und die als geringes Abstoßungsrisiko kategorisiert werden.

[0706] In noch weiteren Aspekten ist ein Individuum für die Behandlung gemäß den Ausführungsformen in den letzten 6 Monaten nicht länger als 14 Tage mit einem Immunsuppressivum behandelt worden. In einigen Aspekten hat ein zu behandelndes Individuum gemäß den Ausführungsformen seit mindestens 28 Tagen vor der Verabreichung keinen Lebendimpfstoff und/oder seit mindestens 14 Tagen vor der Verabreichung keine inaktivierte Vakzine erhalten. In weiteren Aspekten hat/ist ein Individuum zur Behandlung gemäß den Ausführungsformen NICHT:

- eine virologisch bestätigte COVID-19-Erkrankung gehabt;

- innerhalb eines Monats vor der Verabreichung der Zusammensetzung der Ausführungsformen eine Schwangerschaft oder Stillzeit erlebt (bei Frauen);

- innerhalb von 28 Tagen vor der Verabreichung der Zusammensetzung der Ausführungsformen eine Behandlung mit einem Prüfpräparat oder einem nicht zugelassenen Produkt (z.B. Vakzine oder Arzneimittel) gehabt;

- innerhalb von 28 Tagen (bei Lebendvakzinen) oder 14 Tagen (bei inaktivierten Vakzinen) vor der Verabreichung der Zusammensetzung der Ausführungsformen eine zugelassene Vakzine erhalten;

- vorher oder gleichzeitig mit einer Vakzine gegen SARS-CoV-2 oder einer anderen Vakzine gegen Coronaviren (SARS-CoV, MERS-CoV) behandelt worden;

- mit Immunsuppressiva oder anderen immunmodifizierenden Arzneimitteln (z.B. Kortikosteroiden, Biologika und Methotrexat) für insgesamt > 14 Tage innerhalb von 6 Monaten vor der Verabreichung der Zusammensetzung der Ausführungsformen behandelt worden;

- irgendeine medizinisch diagnostizierte oder vermutete immunsuppressive oder immundefiziente Erkrankung basierend auf der Anamnese und der körperlichen Untersuchung, einschließlich einer bekannten Infektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV), Hepatitis-B-Virus (HBV) oder Hepatitis-C-Virus (HCV); eine aktuelle Diagnose oder Behandlung von Krebs, einschließlich Leukämie, Lymphom, Hodgkin-Lymphom, multiples Myelom oder generalisiertes Malignom; chronisches Nierenversagen oder nephrotisches Syndrom; und Erhalt einer Organ- oder Knochenmarktransplantation;

- eine Vorgeschichte von Angioödemen (erblich oder idiopathisch) oder eine Vorgeschichte von anaphylaktischen Reaktionen oder pIMD;

- eine Vorgeschichte mit einer Allergie gegen einen Bestandteil der CVnCoV-Vakzine;

- eine Verabreichung von Immunglobulinen oder irgendwelchen Blutprodukten innerhalb von 3 Monaten vor der Verabreichung der Zusammensetzung der Ausführungsformen erhalten;

- eine signifikante akute oder chronische medizinische oder psychiatrische Erkrankung erlitten; und/oder

- eine schwere und/oder unkontrollierte kardiovaskuläre Erkrankung, eine gastrointestinale Erkrankung, eine Lebererkrankung, eine Nierenerkrankung, eine Atemwegserkrankung, eine endokrine Störung sowie neurologische und psychiatrische Erkrankungen erlitten.

[0707] In bestimmten Aspekten hat ein Individuum zur Behandlung gemäß der Verwendung in den Verfahren der Ausführungsformen keine potenzielle immunvermittelte Krankheit (pIMD). In weiteren Aspekten induziert die Verwendung gemäß den Ausführungsformen keine pIMD in einem behandelten Individuum. Wie hierin verwendet, sind pIMDs definiert als Zöliakie; Morbus Crohn; Colitis ulcerosa; Proktitis ulcerosa; Autoimmun-Cholangitis; Autoimmun-Hepatitis; primär biliäre Zirrhose; primär sklerosierende Cholangitis; Morbus Addison; Autoimmun-Thyreoiditis (einschließlich Hashimoto-Thyreoiditis; Diabetes mellitus Typ I; Morbus Basedow; Antisynthetase-Syndrom; Dermatomyositis; Juvenile chronische Arthritis (einschließlich Morbus Still); Gemischte Bindegewebserkrankung; Polymyalgia rheumatica; Polymyositis; Psoriasis-Arthropathie; Relapsierende Polychondritis; Rheumatoide Arthritis; Sklerodermie, (z.B. einschließlich diffuser systemischer Form und CREST-Syndrom); Spondyloarthritis, (z.B. einschließlich ankylosierender Spondylitis, reaktiver Arthritis (Reiter-Syndrom) und undifferenzierter Spondyloarthritis); Systemischer Lupus erythematodes; Systemische Sklerose; Akute disseminierte Enzephalomyelitis, (einschließlich ortsspezifischer Varianten (z.B. nichtinfekti-

öse Enzephalitis, Enzephalomyelitis, Myelitis, Myeloradiculomyelitis)); Hirnnervenerkrankungen, (z.B. einschließlich Lähmungen/Parese (z.B. Bell-Lähmung)); Guillain-Barre-Syndrom, (z.B. einschließlich Miller-Fisher-Syndrom und andere Varianten); immunvermittelte periphere Neuropathien, Parsonage-Turner-Syndrom und Plexopathien, (z.B. einschließlich chronisch entzündlicher demyelinisierender Polyneuropathie, multifokaler motorischer Neuropathie und Polyneuropathien in Verbindung mit monoklonaler Gammopathie); Multiple Sklerose; Narkolepsie; Sehnervenentzündung; Transversale Myelitis; Alopecia areata; Autoimmune bullöse Hauterkrankungen, einschließlich Pemphigus, Pemphigoid und Dermatitis herpetiformis; Kutaner Lupus erythematosus; Erythema nodosum; Morphoea; Lichen planus; Psoriasis; Sweet-Syndrom; Vitiligo; Vaskulitis der großen Gefäße (z.B. einschließlich: Riesenzellarteriitis wie Takayasu-Arteriitis und temporale Arteriitis); Vaskulitis der mittleren und/oder kleinen Gefäße (z.B. einschließlich: Polyarteritis nodosa, Morbus Kawasaki, mikroskopische Polyangiitis, Wegener-Granulomatose, Churg-Strauss-Syndrom (allergische granulomatöse Angiitis), Morbus Buerger Thromboangiitis obliterans, nekrotisierende Vaskulitis und anti-neutrophile zytoplasmatische Antikörper (ANCA) positive Vaskulitis (Typ nicht spezifiziert), Henoch-Schonlein-Purpura, Behcet-Syndrom, leukozytoklastische Vaskulitis); Antiphospholipid-Syndrom; Autoimmunhämolytische Anämie; Autoimmun-Glomerulonephritis (einschließlich IgA-Nephropathie, Glomerulonephritis schnell fortschreitend, membranöse Glomerulonephritis, membranoproliferative Glomerulonephritis und mesangioproliferative Glomerulonephritis); Autoimmun-Myokarditis/Kardiomyopathie; Autoimmun-Thrombozytopenie; Goodpasture-Syndrom; idiopathische pulmonale Fibrose; perniziöse Anämie; Raynaud-Phänomen; Sarkoidose; Sjögren-Syndrom; Stevens-Johnson-Syndrom; Uveitis).

[0708] In bestimmten Aspekten führt eine Verwendung in Vakzinierungsverfahren der Ausführungsformen nicht dazu, dass ein Individuum unerwünschte Ereignisse von besonderem Interesse (Adverse Events of Special Interest; AESIs) erfährt. Wie hierin verwendet, sind AESIs definiert als eine der oben aufgeführten pIMDs; Anaphylaxie; Vaskulitiden; verstärkte Erkrankung nach der Immunisierung; Multisystem-Entzündungssyndrom bei Kindern; akutes Atemnotsyndrom; COVID-19-Erkrankung; akute Herzbeeinträchtigung; Mikroangiopathie; Herzversagen und kardiogener Schock; Stresskardiomyopathie; koronare Herzkrankheit; Arrhythmie; Myokarditis, Perikarditis; Thrombozytopenie; tiefe Venenthrombose; Lungenembolie; zerebrovaskulärer Schlaganfall; Extremitätenischämie; hämorrhagische Erkrankung; akute Nierenschädigung; Leberschädigung; generalisierte Konvulsion; Guillain-Barre-Syndrom; akute disseminierte Enzephalomyelitis; Anosmie, Ageusie; Meningoenzephalitis; Chilblain-ähnliche Läsionen; kutane Vaskulitis eines einzelnen Organs; Erythema multiforme; schwere lokale/systemische AR nach Immunisierung

[0709] Insbesondere kann die Verwendung zur Behandlung die folgenden Schritte umfassen:

a) Bereitstellen mindestens einer mRNA des ersten Aspekts, mindestens einer Zusammensetzung des zweiten Aspekts, mindestens einer Vakzine des dritten Aspekts, oder des Kits oder Kits von Teilen des vierten Aspekts;

b) Applizieren oder Verabreichen der mRNA, der Zusammensetzung, der Vakzine oder des Kits oder Kits von Teilen an ein Individuum als eine erste Dosis;

c) optional, Applizieren oder Verabreichen der mRNA, der Zusammensetzung, der Vakzine oder des Kits oder Kits von Teilen an ein Individuum als eine zweite Dosis oder eine weitere Dosis, bevorzugt mindestens 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 Monate nach der ersten Dosis.

[0710] Die erste Dosis, wie hier verwendet, bezieht sich auf die anfängliche/erste Dosis, eine zweite Dosis bzw. irgendwelche weitere Dosen, die vorzugsweise verabreicht werden, um die Immunantwort zu verstärken („boosten“). In bestimmten Aspekten wird die Vakzine/Zusammensetzung einem Individuum einmal, zweimal, dreimal, viermal oder häufiger verabreicht. In einigen Aspekten wird die Vakzine/die Zusammensetzung dem Individuum mindestens ein erstes und ein zweites Mal verabreicht (z.B. ein Prime und Boost). In einigen Aspekten erfolgt die zweite Verabreichung mindestens 10 Tage, 14 Tage, 21 Tage, 28 Tage, 35 Tage, 42 Tage, 49 Tage oder 56 Tage nach der ersten Verabreichung. In einigen Aspekten liegt die Zeit zwischen der ersten Verabreichung und der zweiten Verabreichung zwischen etwa 7 Tagen und etwa 56 Tagen; etwa 14 Tagen und etwa 56 Tagen; etwa 21 Tagen und etwa 56 Tagen; oder etwa 28 Tagen und etwa 56 Tagen. In weiteren Aspekten wird die Vakzine/Zusammensetzung einem Individuum drei oder mehr als drei Mal verabreicht. In bestimmten Aspekten liegen zwischen jeder Verabreichung der Vakzine/Zusammensetzung mindestens 10 Tage, 14 Tage, 21 Tage, 28 Tage, 35 Tage, 42 Tage, 49 Tage oder 56 Tage.

[0711] In einigen Aspekten war ein Individuum zur Behandlung gemäß den Ausführungsformen zuvor mit SARS-Cov-2 infiziert oder wurde zuvor mit mindestens einer ersten SARS-Cov-2-Vakzinzusammensetzung behandelt. In einigen Aspekten wurde das Individuum mit einer, zwei, drei oder mehr Dosen einer ersten SARS-Cov-2-Vakzinzusammensetzung behandelt. In einigen Aspekten ist die Zusammensetzung der Aus-

führungsformen, die zur Behandlung eines Individuums verwendet wird, ein anderer Typ von Vakzinzusammensetzung als die Zusammensetzung, die zuvor zur Behandlung des Individuums verwendet wurde. In einigen Aspekten wurde das Individuum zuvor mit einer mRNA-Vakzine, wie zum Beispiel BNT162 oder mRNA-1273, behandelt. In weiteren Aspekten wurde das Individuum zuvor mit einer Proteinuntereinheiten-Vakzine behandelt, wie z.B. einer Vakzine auf Spike-Protein-Basis, z.B. NVX-CoV2373 oder COVAX. In bestimmten bevorzugten Aspekten umfassen die Proteinuntereinheit-Vakzinzusammensetzungen ein Adjuvans. In weiteren Aspekten wurde das Individuum zuvor mit einer Virus-Vektorvakzine behandelt, wie zum Beispiel einer Vakzine auf Basis eines Adenovirus-Vektors, z.B. ADZ1222 oder Ad26.COV-2.S. In noch weiteren Aspekten wurde das Individuum zuvor mit einer inaktivierten Virus-Vakzine gegen SARS-Cov-2 behandelt, wie zum Beispiel CoronaVac, BBIBP-CorV oder BBV152. In weiteren Aspekten hat ein zuvor mit einer Vakzinzusammensetzung behandeltes Individuum nachweisbare SARS-Cov-2-bindende Antikörper, wie zum Beispiel SARS-Cov-2-S-Protein-bindende Antikörper oder SARS-Cov-2-N-Protein-bindende Antikörper. In weiteren Aspekten wurde ein Individuum zur Behandlung gemäß den Ausführungsformen mit einer ersten SARS-Cov-2-Vakzinzusammensetzung mindestens etwa 3 Monate, 6 Monate, 9 Monate, 1 Jahr, 1,5 Jahre, 2 Jahre oder 3 Jahre vorher behandelt. In noch weiteren Aspekten wurde ein Individuum zur Behandlung gemäß den Ausführungsformen mit einer ersten SARS-Cov-2-Vakzinzusammensetzung etwa 3 Monate bis 2 Jahre vorher oder etwa 6 Monate bis 2 Jahre vorher behandelt. In einigen Aspekten sind mit einer weiteren Vakzinzusammensetzung gemäß den Ausführungsformen behandelte Individuen in mindestens 80%, 85%, 90% oder 95% der Fälle vor moderater und schwerer COVID-19-Erkrankung geschützt. Beispielsweise können die behandelten Individuen in mindestens 80%, 85%, 90% oder 95% der Fälle etwa 2 Wochen bis etwa 1 Jahr nach Verabreichung der weiteren Zusammensetzung vor einer moderaten und schweren COVID-19-Erkrankung geschützt sein. In noch weiteren Aspekten verhindert die Verabreichung der weiteren Vakzinzusammensetzung der Ausführungsformen eine moderate und schwere COVID-19-Erkrankung bei mindestens 80%, 85%, 90% oder 95% der behandelten Individuen etwa 2 Wochen bis etwa 3 Monate, 6 Monate, 9 Monate, 1 Jahr, 1,5 Jahre, 2 Jahre oder 3 Jahre nach dieser Verabreichung. Beispiele für solche Kombinationsimpfstrategien sind im Folgenden dargestellt:

Dosis 1 mRNA-Vakzine - T1 - Dosis 2 mRNA-Vakzine - T2 - Dosis 3 mRNA-Vakzine

Dosis 1 mRNA-Vakzine - T1 - Dosis 2 mRNA-Vakzine - T2 - Dosis 3 Protein-Untereinheit-Vakzine

Dosis 1 mRNA-Vakzine - T1 - Dosis 2 mRNA-Vakzine - T2 - Dosis 3 Virus-Vektor-Vakzine

Dosis 1 mRNA-Vakzine - T1 - Dosis 2 mRNA-Vakzine - T2 - Dosis 3 inaktivierte Virus-Vakzine

Dosis 1 Protein-Untereinheit-Vakzine - T1 - Dosis 2 Protein-Untereinheit-Vakzine - T2 - Dosis 3 mRNA-Vakzine

Dosis 1 inaktivierte Virus-Vakzine - T1 - Dosis 2 inaktivierte Virus-Vakzine - T2 - Dosis 3 mRNA-Vakzine

Dosis 1 Virus-Vektor-Vakzine-T1 - Dosis 2 Virus-Vektor-Vakzine-T2 - Dosis 3 mRNA-Vakzine

Dosis 1 Virus-Vektor-Vakzine - T2 - Dosis 2 mRNA-Vakzine

Dosis 1 Protein-Untereinheit-Vakzine - T2 - Dosis 2 mRNA-Vakzine

Dosis 1 inaktivierte Virus-Vakzine - T2 - Dosis 2 mRNA-Vakzine

Dosis 1 mRNA-Vakzine - T2 - Dosis 2 mRNA-Vakzine

[0712] In den obigen Beispielen beträgt der Zeitraum 1 (T1) typischerweise 2 bis 6 Wochen, vorzugsweise 3 bis 4 Wochen. Der Zeitraum 2 (T2) beträgt in einigen Fällen etwa 3 Monate, 6 Monate, 9 Monate, 1 Jahr, 1,5 Jahre, 2 Jahre oder drei Jahre.

[0713] In einigen Aspekten umfasst die Verwendung in Verfahren der Ausführungsformen die Verabreichung von mehreren Dosen einer Vakzinzusammensetzung an ein Individuum . In einigen Aspekten wird einem Individuum, das ein hohes Maß an Reaktogenität aufweist, nach einer Erstvakzinierung eine Booster-Vakzine verabreicht, die sich von der ersten Vakzinzusammensetzung unterscheidet. Zum Beispiel ist in einigen Aspekten die Erstvakzine BNT162 oder mRNA-1273, und die Booster-Vakzine ist eine mRNA-Vakzinzusammensetzung der Ausführungsformen. In einigen Aspekten wird für ein Individuum mit hoher Reaktogenität eine Booster-Vakzinzusammensetzung ausgewählt, die eine niedrigere Konzentration von PEG oder PEG-Konjugat im Vergleich zu der zuvor verabreichten Vakzinzusammensetzung aufweist. In einigen Aspekten wird für ein Individuum mit hoher Reaktogenität eine Booster-Vakzinzusammensetzung mit einer niedrigeren Konzentration von mRNA oder LNP im Vergleich zu der zuvor verabreichten Vakzinzusammensetzung ausgewählt.

[0714] In bestimmten Aspekten wird einem zu behandelnden Individuum gemäß den Ausführungsformen eine Vakzinzusammensetzung als Booster-Vakzine verabreicht, wobei das Individuum zuvor mit einer oder mehreren Verabreichungen einer Coronavirus-Vakzinzusammensetzung behandelt wurde. In bestimmten Aspekten wurde das Individuum, das mit einer Booster-Vakzine behandelt wird, zuvor mit einer Vakzinzusammensetzung behandelt, die ein Spike-Protein-Antigen oder ein Nukleinsäuremolekül, das für ein Spike-Protein-Antigen kodiert, enthält. In einigen Aspekten wurde dem Individuum, das für die Behandlung mit der Booster-Vakzine ausgewählt wurde, zuvor eine Vakzinzusammensetzung verabreicht, die ein Spike-Protein mit einer anderen Aminosäuresequenz als das Spike-Protein der Booster-Vakzine enthält oder kodiert. In bestimmten Aspekten umfasste oder kodierte die zuvor verabreichte Vakzinzusammensetzung ein Spike-Protein (z.B. ein SARS-Cov-2-Spike-Protein) mit mindestens 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 oder 10 Aminosäureunterschieden gegenüber der Booster-Vakzinzusammensetzung. In bestimmten Aspekten umfasst die Booster-Vakzinzusammensetzung eine RNA, die für ein Spike-Protein kodiert, das etwa 1 bis 50; etwa 3 bis 30; etwa 5 bis 30 oder etwa 10 bis 25 Aminosäureunterschiede gegenüber der zuvor verabreichten Vakzinzusammensetzung aufweist. In noch weiteren Aspekten umfasst die Booster-Vakzinzusammensetzung RNA, die für 2, 3, 4 oder mehr verschiedene Spike-Proteine mit unterschiedlichen Aminosäuresequenzen kodiert.

[0715] In weiteren Aspekten umfasst die Verwendung in Verfahren der Ausführungsformen die Verabreichung von 2 oder mehr Booster-Vakzinzusammensetzungen an ein Individuum, wobei jede Booster-Vakzinzusammensetzung RNA umfasst, die für ein bestimmtes Spike-Protein mit unterschiedlichen Aminosäuresequenzen kodiert. In einigen Aspekten werden solche unterschiedlichen Booster-Vakzinzusammensetzungen im Wesentlichen gleichzeitig oder in einem Abstand von weniger als etwa 10 Minuten, 20 Minuten, 30 Minuten, 1 Stunde oder 2 Stunden verabreicht. In einigen Aspekten werden unterschiedliche Booster-Vakzinzusammensetzungen an der gleichen Stelle verabreicht, wie beispielsweise als intramuskuläre Injektionen in den gleichen Arm des Patienten. In weiteren Aspekten werden unterschiedliche Booster-Vakzinzusammensetzungen an verschiedenen Stellen verabreicht, wie z.B. als intramuskuläre Injektionen in verschiedene Arme oder in einen oder beide Arme und einen weiteren Beinmuskel.

[0716] In bestimmten Aspekten ist die Verwendung in Verfahren der Ausführungsformen weiter definiert zur Stimulierung einer Antikörper- oder $CD8^+$-T-Zell-Antwort in einem Individuum. In einigen Aspekten ist die Verwendung in einem Verfahren zur Stimulierung einer neutralisierenden Antikörperantwort in einem Individuum definiert. In weiteren Aspekten ist die Verwendung in Verfahren zur Stimulierung einer schützenden Immunantwort in einem Individuum definiert. In noch weiteren Aspekten ist die Verwendung in Verfahren zur Stimulierung einer TH2-gerichteten Immunantwort in einem Individuum definiert.

[0717] In weiteren Aspekten stimuliert die Verabreichung einer Vakzine/Zusammensetzung der Ausführungsformen eine Antikörperantwort, die zwischen etwa 10 und etwa 500 Coronavirus-Spike-Protein-bindende Antikörper auf jeden Coronavirus-neutralisierenden Antikörper in dem Individuum produziert. Zum Beispiel kann die Verabreichung eine Antikörperantwort stimulieren, die nicht mehr als etwa 200 Spike-Protein-bindende Antikörper auf jeden Coronavirus-neutralisierenden Antikörper produziert. In weiteren Aspekten stimuliert die Verabreichung eine Antikörperantwort, die zwischen etwa 10 und etwa 300; etwa 20 und etwa 300; etwa 20 und etwa 200; etwa 30 und etwa 100; oder etwa 30 und etwa 80 Coronavirus-Spike-Protein-bindende Antikörper auf jeden Coronavirus-neutralisierenden Antikörper produziert. In noch weiteren Aspekten stimuliert die Verabreichung einer Zusammensetzung der Ausführungsformen eine Antikörperantwort in einem Individuum, die ein Verhältnis von Spike-Protein-bindenden Antikörpern zu Coronavirus-neutralisierenden Antikörpern einschließt, das bei 20%, 15%, 10% oder 5% des Verhältnisses von Spike-Protein-bindenden Antikörpern zu Coronavirus-neutralisierenden Antikörpern liegt, das in einem durchschnittlichen Serum eines rekonvaleszenten Patienten (von einem Individuum, das sich von einer Coronavirus-Infektion erholt hat) gefunden wird.

[0718] In noch weiteren Aspekten stimuliert die Verabreichung einer Vakzine/Zusammensetzung der Ausführungsformen eine Antikörperantwort, die zwischen etwa 1 und etwa 500 an die Rezeptor-Bindungsdomäne (RBD) des Coronavirus-Spike-Proteins bindende Antikörper auf jeden Coronavirus-neutralisierenden Antikörper in dem Individuum produziert. In weiteren Aspekten stimuliert die Verabreichung eine Antikörperantwort, die nicht mehr als etwa 50 Spike-Protein-RBD-bindende Antikörper auf jeden Coronavirus-neutralisierenden Antikörper produziert. In noch weiteren Aspekten stimuliert die Verabreichung eine Antikörperantwort, die zwischen etwa 1 und etwa 200; etwa 2 und etwa 100; etwa 3 und etwa 200; etwa 5 und etwa 100; etwa 5 und etwa 50; oder etwa 5 und etwa 20 Spike-Protein-RBD-bindende Antikörper auf jeden Coronavirus-neutralisierenden Antikörper produziert. In noch weiteren Aspekten stimuliert die Verabreichung der Zusammensetzung der Ausführungsformen eine Antikörperantwort in einem Individuum, die ein Verhältnis von Spike-Protein-RBD-bindenden Antikörpern zu Coronavirus-neutralisierenden Antikörpern einschließt, das bei 20%,

15%, 10% oder 5% des Verhältnisses von Spike-Protein-RBD-bindenden Antikörpern zu neutralisierenden Coronavirus-Antikörpern liegt, das in einem durchschnittlichen Serum eines rekonvaleszenten Patienten (von einem Individuum, das sich von einer Coronavirus-Infektion erholt hat) gefunden wird.

[0719] In noch weiteren Aspekten induziert die Verabreichung einer Vakzine/Zusammensetzung der Ausführungsformen im Wesentlichen keinen Anstieg von IL-4, IL-13, TNF und/oder IL-1 β bei dem Individuum. In weiteren Aspekten induziert die Verabreichung einer Vakzine/Zusammensetzung der Ausführungsformen im Wesentlichen keinen Anstieg von IL-4, IL-13, TNF und/oder IL-1β im Serum des Individuums. In einigen Aspekten induziert die Verabreichung einer Vakzine/Zusammensetzung der Ausführungsformen im Wesentlichen keinen Anstieg von IL-4, IL-13, TNF und/oder IL-1β an der Injektionsstelle (z.B. einer intramuskulären Injektionsstelle) in dem Individuum.

[0720] In noch weiteren Aspekten umfasst die Verwendung in einem Verfahren der Ausführungsformen die Verabreichung einer Vakzine/Zusammensetzung der Ausführungsformen an ein menschliches Individuum, das eine Krankheit hat. In bestimmten Aspekten hat das Individuum eine kardiovaskuläre Erkrankung, eine Nierenerkrankung, eine Lungenerkrankung oder eine Autoimmunerkrankung. In einigen Aspekten wird eine Vakzine/Zusammensetzung der Ausführungsformen an ein Individuum verabreicht, das eine Antikoagulationstherapie erhält.

[0721] In noch weiteren Aspekten führt die Verabreichung einer Vakzine/Zusammensetzung der Ausführungsformen an menschliche Individuen dazu, dass nicht mehr als 20%, 15%, 10%, 7,5% oder 5% der Individuen ein lokales unerwünschtes Ereignis des Grades 3 erfahren (siehe Tabelle A unten). In einigen Aspekten erfahren beispielsweise nicht mehr als 10% der Individuen ein lokales unerwünschtes Ereignis des Grades 3 nach einer ersten oder einer zweiten Dosis der Zusammensetzung. In bevorzugten Aspekten führt die Verabreichung einer Zusammensetzung der Ausführungsformen an menschliche Individuen dazu, dass nicht mehr als 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 7,5% oder 5% der Individuen ein lokales unerwünschtes Ereignis des Grades 2 oder höher erfahren. Beispielsweise erfahren in einigen Aspekten nicht mehr als 30% der Individuen ein lokales unerwünschtes Ereignis des Grades 2 oder höher nach einer ersten oder einer zweiten Dosis der Zusammensetzung. In einigen Aspekten führt die Verabreichung einer Zusammensetzung der Ausführungsformen an menschliche Individuen dazu, dass nicht mehr als 10% der Individuen an der Injektionsstelle Schmerzen, Rötung, Schwellung und/oder Juckreiz des Grades 3 erfahren.

[0722] In weiteren Aspekten führt die Verabreichung einer Vakzine/Zusammensetzung der Ausführungsformen an menschliche Individuen dazu, dass nicht mehr als 30%, 25%, 20%, 15%, 10% oder 5% der Individuen ein systemisches unerwünschtes Ereignis des Grades 3 (siehe Tabelle B unten) erleiden. Zum Beispiel erfahren in einigen Aspekten nicht mehr als 25% der Individuen ein systemisches unerwünschtes Ereignis des Grades 3 nach einer ersten Dosis der Zusammensetzung. In einigen Aspekten erfahren nicht mehr als 40% der Individuen ein systemisches unerwünschtes Ereignis des Grades 3 nach einer zweiten Dosis der Zusammensetzung, In einigen Aspekten führt die Verabreichung einer Zusammensetzung der Ausführungsformen an menschliche Individuen dazu, dass nicht mehr als 30%, 25%, 20%, 15%, 10% oder 5% der Individuen Fieber, Kopfschmerzen, Müdigkeit, Schüttelfrost, Myalgie, Arthralgie, Übelkeit und/oder Diarrhö des Grades 3 erfahren.

Tabelle A: Intensitätseinstufung* für abgefragte lokale unerwünschte Ereignisse

AE	**Grad**	**Definition**
Schmerz an der Injektionsstelle	0	Tritt nicht auf
	1	Beeinträchtigt nicht die Aktivität
	2	Beeinträchtigt die Aktivität und/oder wiederholte Anwendung nicht-narkotischer Schmerzmittel > 24 Stunden
	3	Verhindert die tägliche Aktivität und/oder wiederholte Anwendung narkotischer Schmerzmittel
Rötung	0	< 2,5 cm
	1	2,5 - 5 cm
	2	5,1 - 10 cm
	3	> 10 cm

AE	Grad	Definition
Schwellung	0	< 2,5 cm
	1	2,5 - 5 cm und beeinträchtigt nicht die Aktivität
	2	5,1 - 10 cm oder beeinträchtigt die Aktivität
	3	> 10 cm oder verhindert die tägliche Aktivität
Jucken	0	Tritt nicht auf
	1	Mild, keine Beeinträchtigung der normalen Aktivität
	2	Moderat, geringe Beeinträchtigung der normalen Aktivität
	3	Signifikant, verhindert normale Aktivität

Tabelle B: Intensitätseinstufung* für abgefragte systemische unerwünschte Ereignisse

Unerwünschtes Ereignis	Grad	Definition
Fieber	0	< 38 °C
	1	≥ 38,0 - 38,4 °C
	2	≥ 38,5 - 38,9 °C
	3	≥ 39 °C
Kopfschmerz	0	Tritt nicht auf
	1	Mild, keine Beeinträchtigung der normalen Aktivität
	2	Moderat, leichte Beeinträchtigung der normalen Aktivität und/oder wiederholte Anwendung nicht-narkotischer Schmerzmittel > 24 Stunden
	3	Signifikant; Verwendung narkotischer Schmerzmittel und/oder Verhinderung der täglichen Aktivität
Müdigkeit	0	Tritt nicht auf
	1	Mild, keine Beeinträchtigung der normalen Aktivität
	2	Moderat, leichte Beeinträchtigung der normalen Aktivität
	3	Signifikant, Verhinderung der normalen Aktivität
Schüttelfrost	0	Tritt nicht auf
	1	Mild, keine Beeinträchtigung der normalen Aktivität
	2	Moderat, leichte Beeinträchtigung der normalen Aktivität
	3	Signifikant, Verhinderung der normalen Aktivität
Myalgie	0	Tritt nicht auf
	1	Mild, keine Beeinträchtigung der normalen Aktivität
	2	Moderat, leichte Beeinträchtigung der normalen Aktivität
	3	Signifikant, Verhinderung der normalen Aktivität
Arthralgie	0	Tritt nicht auf
	1	Mild, keine Beeinträchtigung der normalen Aktivität
	2	Moderat, leichte Beeinträchtigung der normalen Aktivität
	3	Signifikant, Verhinderung der normalen Aktivität

Unerwünschtes Ereignis	Grad	Definition
Überlkeit/ Erbrechen	0	Tritt nicht auf
	1	Mild, keine Beeinträchtigung der Aktivität und/oder 1 - 2 Episoden/ 24 Stunden
	2	Moderat, leichte Beeinträchtigung der normalen Aktivität und/oder >2 Episoden/ 24 Stunden
	3	Signifikant, Verhinderung der täglichen Aktivität, ambulante IV Flüssigkeitszufuhr erforderlich
Diarrhö	0	Tritt nicht auf
	1	2 - 3 lose Stühle über 24 Stunden
	2	4 - 5 Stühle über 24 Stunden
	3	6 oder mehr wässrige Stühle über 24 Stunden oder ambulante IV Flüssigkeitszufuhr erforderlich

*FDA-Toxizitätsbewertungsskala (US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration (FDA). Leitfaden für die Industrie. Toxicity Grading Scale for Healthy Adult and Adolescent Volunteers Enrolled in Preventive Vaccine Clinical Trials. 2007. Im World Wide Web unter fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guida nces/Vaccines/ucm091977.pdf; Zugriff am: März 2019, hiermit aufgenommen durch Bezugnahme); IV = Intravenös.

[0723] Ebenso stellt die vorliegende Erfindung gemäß einem anderen Aspekt auch die Verwendung der mRNA, der Zusammensetzung, der Vakzine oder des Kits oder Kits von Teilen vorzugsweise für diagnostische oder therapeutische Zwecke, z.B. zur Expression eines kodierten antigenen Coronavirus-Peptids oder-Proteins, zur Verfügung.

[0724] In spezifischen Ausführungsformen kann auf die Applikation oder Verabreichung der mRNA, der Zusammensetzung oder der Vakzine an ein Gewebe oder einen Organismus z.B. ein Schritt zur Gewinnung induzierter Coronavirus-Antikörper, z.B. SARS-CoV-2-Coronavirus-spezifischer (monoklonaler) Antikörper, oder ein Schritt zur Gewinnung generierter SARS-CoV-2-Coronavirus-Proteinkonstrukte (S-Protein) folgen.

[0725] Die Verwendung kann für ein (diagnostisches) Labor, für die Forschung, für die Diagnostik, für die kommerzielle Herstellung von Peptiden, Proteinen oder SARS-CoV-2-Coronavirus-Antikörpern und/oder für therapeutische Zwecke erfolgen. Die Verwendung kann in vitro, in vivo oder ex vivo erfolgen. Die Verwendung kann ferner im Rahmen der Behandlung einer bestimmten Krankheit erfolgen, insbesondere bei der Behandlung einer Coronavirus-Infektion (z.B. COVID-19) oder einer verwandten Störung.

Liste der Gegenstände

[0726] Im Folgenden werden Gegenstände 1-275 der Offenbarung angegeben.

Liste der Gegenstände:

Gegenstand 1. Nukleinsäure, umfassend mindestens eine kodierende Sequenz, die für mindestens ein antigenes Peptid oder Protein kodiert, das von einem SARS-CoV-2-Coronavirus stammt oder von diesem abgeleitet ist, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante davon, wobei die Nukleinsäure mindestens eine heterologe untranslatierte Region (UTR) umfasst.

Gegenstand 2. Nukleinsäure gemäß Gegenstand 1, wobei die Nukleinsäure für eine Vakzine geeignet ist.

Gegenstand 3. Nukleinsäure gemäß Gegenstand 1 oder 2, wobei das mindestens eine antigene Peptid oder Protein mindestens ein Peptid oder Protein, das ein Strukturprotein, ein akzessorisches Protein oder ein Replikaseprotein ist oder davon abgeleitet ist, oder ein immunogenens Fragment oder eine immunogene Variante von einem dieser Proteine umfasst oder daraus besteht.

Gegenstand 4. Nukleinsäure gemäß Gegenstand 3, wobei das Strukturprotein ein Spike-Protein (S), ein Hüllprotein (E), ein Membranprotein (M) oder ein Nukleokapsidprotein (N) oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante von einem dieser Proteine ist oder davon abgeleitet ist.

Gegenstand 5. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der Gegenstände 1 bis 4, wobei das mindestens eine antigene Peptid oder Protein ein Spike-Protein (S) oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante davon ist oder davon abgeleitet ist.

Gegenstand 6. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei das mindestens eine antigene Peptid oder Protein mindestens eine der Aminosäuresequenzen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 1-111, 274-11663, 13176-13510, 13521-14123, 22732-22758, 22917, 22923, 22929-22964, 26938, 26939 sind, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante irgendeiner dieser Sequenzen umfasst oder daraus besteht.

Gegenstand 7. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der Gegenstände 4 bis 6, wobei das Spike-Protein (S) das Spike-Protein-Fragment S1 oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante davon umfasst oder daraus besteht.

Gegenstand 8. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei das mindestens eine antigene Peptid oder Protein mindestens eine der Aminosäuresequenzen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 1-27, 29, 31-48, 58-111, 274-1345, 1480-1546, 1614-11663, 13377-13510, 13521-14123, 22732, 22737-22758, 22929-22964 sind, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante irgendeiner dieser Sequenzen umfasst oder daraus besteht.

Gegenstand 9. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei das mindestens eine antigene Peptid oder Protein mindestens eine der Aminosäuresequenzen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 27, 1279-1345, 29, 1480-1546, 13243-13309, 22733-22736, 26938, 26939 sind, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante irgendeiner dieser Sequenzen umfasst oder daraus besteht.

Gegenstand 10. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der Gegenstände 4 bis 9, wobei das Spike-Protein (S) ein Spike-Protein-Fragment S1 oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante davon und ein Spike-Protein-Fragment S2 oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante davon umfasst oder daraus besteht.

Gegenstand 11. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei das mindestens eine antigene Peptid oder Protein mindestens eine der Aminosäuresequenzen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 1-26, 31-48, 58-111, 274-1278, 1614-11663, 13377-13510, 13521-14177, 22732, 22737-22758, 22929-22964 sind, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante irgendeiner dieser Sequenzen umfasst oder daraus besteht.

Gegenstand 12. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der Gegenstände 4 bis 11, wobei das Spike-Protein (S) ein präfusionsstabilisiertes Spike-Protein (S_stab) ist, das mindestens eine präfusionsstabilisierende Mutation aufweist.

Gegenstand 13. Nukleinsäure gemäß Gegenstand 12, wobei die mindestens eine präfusionsstabilisierende Mutation die folgenden Aminosäuresubstitutionen umfasst: K986P und V987P.

Gegenstand 14. Nukleinsäure gemäß Gegenstand 12 oder 13, wobei die mindestens eine präfusionsstabilisierende Mutation eine hohlraumfüllende Mutation umfasst.

Gegenstand 15. Nukleinsäure gemäß Gegenstand 14, wobei die mindestens eine hohlraumfüllende Mutation ausgewählt ist aus der Liste umfassend T887W; A1020W; T887W und A1020W; oder P1069F.

Gegenstand 16. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der Gegenstände 12 bis 15, wobei die mindestens eine präfusionsstabilisierende Mutation eine mutierte Protonierungsstelle umfasst.

Gegenstand 17. Nukleinsäure gemäß Gegenstand 16, wobei die mindestens eine mutierte Protonierungsstelle ausgewählt ist aus der Liste umfassend H1048Q und H1064N; H1083N und H1101N; oder H1048Q und H1064N und H1083N und H1101N.

Gegenstand 18. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der Gegenstände 12 bis 17, wobei die mindestens eine präfusionsstabilisierende Mutation mindestens eine artifizielle intramolekulare Disulfidbindung erzeugt.

Gegenstand 19. Nukleinsäure gemäß Gegenstand 18, wobei die mindestens eine artifizielle intramolekulare Disulfidbindung durch die folgenden Aminosäuresubstitutionen erzeugt wird: 1712C und T1 077C; I714C und Y1110C; P715C und P1069C; G889C und L1034C; I909C und Y1047C; Q965C und S1003C; F970C und G999C; A972C und R995C; A890C und V1040C; T874C und S1055C, oder N914C und S1123C.

Gegenstand 20. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei das mindestens eine antigene Peptid oder Protein mindestens eine der Aminosäuresequenzen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 10-26, 40-48, 85-111, 341-1278, 1681-2618, 2686-3623, 3691-4628, 4696-5633, 5701-6638, 6706-7643, 7711-8648, 8716-9653, 9721-10658, 10726-11663, 13377-13510, 13521-14123, 22732, 22738, 22740, 22742, 22744, 22746, 22748, 22750, 22752, 22754, 22756, 22758, 22947-22964 sind, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante irgendeiner dieser Sequenzen umfasst oder daraus besteht.

Gegenstand 21. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei das mindestens eine antigene Peptid oder Protein mindestens eine der Aminosäuresequenzen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 10-26, 341-407, 609-1278, 13521-13587, 22738, 22740, 22742, 22744, 22746, 22748, 22750, 22752, 22754, 22756, 22758, 22947-22964 sind, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante irgendeiner dieser Sequenzen umfasst oder daraus besteht.

Gegenstand 22. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei die mindestens eine kodierende Sequenz zusätzlich für ein oder mehrere heterologe Peptid- oder Proteinelemente kodiert, die ausgewählt sind aus einem Signalpeptid, einem Linker, einem Helferepitop, einem Antigen-Clustering-Element, einem Trimerisierungselement, einem Transmembranelement und/oder einer VLPbildenden Sequenz.

Gegenstand 23. Nukleinsäure gemäß Gegenstand 22, wobei das mindestens eine heterologe Peptid- oder Proteinelement ein heterologes Antigen-Clustering-Element, ein heterologes Trimerisierungselement und/oder eine VLP-bildende Sequenz ist.

Gegenstand 24. Nukleinsäure gemäß Gegenstand 22 oder 23, wobei das mindestens eine heterologe Antigen-Clustering-Element ausgewählt ist aus einem Ferritin-Element, einem Lumazin-Synthase-Element, einem Oberflächenantigen des Hepatitis-B-Virus (HBsAg) oder Encapsulin.

Gegenstand 25. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei das mindestens eine antigene Peptid oder Protein mindestens eine der Aminosäuresequenzen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 58-75, 85-102, 3624-5633, 7644-9653, 13588-13721, 13856-13989, 22733, 22735, 22736 sind, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante irgendeiner dieser Sequenzen umfasst oder daraus besteht.

Gegenstand 26. Nukleinsäure gemäß Gegenstand 22 oder 23, wobei das mindestens eine heterologe Trimerisierungselement ein Foldon-Element, vorzugsweise ein Fibritin-Foldon-Element ist.

Gegenstand 27. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei das mindestens eine antigene Peptid oder Protein mindestens eine der Aminosäuresequenzen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 76-84, 103-111, 5634-6638, 9654-10658, 13722-13788, 13990-14056, 22734, 26938, 26939 sind, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante irgendeiner dieser Sequenzen umfasst oder daraus besteht.

Gegenstand 28. Nukleinsäure gemäß Gegenstand 22 oder 23, wobei die mindestens eine VLP-bildende Sequenz ein Woodchuck-Hepatitis-Kernantigen-Element (WhcAg) ist.

Gegenstand 29. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei das mindestens eine antigene Peptid oder Protein mindestens eine der Aminosäuresequenzen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 6639-7643, 10659-11663,

13789-13855, 14057-14123 sind, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante irgendeiner dieser Sequenzen umfasst oder daraus besteht.

Gegenstand 30. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei das mindestens eine antigene Peptid oder Protein mindestens eine der Aminosäuresequenzen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 1, 10, 21, 22, 25, 27, 274, 341, 408, 475, 542, 743, 810, 1011, 1145, 1212, 1279, 8716, 10726, 22732-22758, 22929-22942, 22947-22964 sind, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante irgendeiner dieser Sequenzen umfasst oder daraus besteht.

Gegenstand 31. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei das mindestens eine antigene Peptid oder Protein mindestens eine der Aminosäuresequenzen, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 10, 22960, 22961 oder 22963 ist, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante irgendeiner dieser Sequenzen umfasst oder daraus besteht.

Gegenstand 32. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei die mindestens eine kodierende Sequenz mindestens eine Nukleinsäuresequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 116-132, 134-138, 140-143, 145-175, 11664-11813, 11815, 11817-12050, 12052, 12054-13147, 13514, 13515, 13519, 13520, 14124-14177, 22759, 22764-22786, 22791-22813, 22818-22839, 22969-23184, 23189-23404, 23409-23624, 23629-23844, 23849-24064, 24069-24284, 24289-24504, 24509-24724, 24729-24944, 24949-25164, 25169-25384, 25389-25604, 25609-25824, 25829-26044, 26049-26264, 26269-26484, 26489-26704, 26709-26937 sind, oder ein Fragment oder eine Variante irgendeiner dieser Sequenzen umfasst oder daraus besteht.

Gegenstand 33. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei das mindestens eine antigene Peptid oder Protein ein S-Protein ist, das eine präfusionsstabilisierende K986P- und V987P-Mutation umfasst und die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 10 oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante davon umfasst oder daraus besteht.

Gegenstand 34. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei die mindestens eine kodierende Sequenz eine Codon-modifizierte kodierende Sequenz ist, wobei die Aminosäuresequenz, die von der mindestens einen Codon-modifizierten kodierenden Sequenz kodiert wird, vorzugsweise gegenüber der Aminosäuresequenz, die von der entsprechenden kodierenden Wildtyp- oder Referenzsequenz kodiert wird, nicht verändert ist.

Gegenstand 35. Nukleinsäure gemäß Gegenstand 34, wobei die mindestens eine Codon-modifizierte kodierende Sequenz aus der C-maximierten kodierenden Sequenz, der CAI-maximierten kodierenden Sequenz, der an die humane Codon-Verwendung angepassten kodierenden Sequenz, der G/C-Gehalt-modifizierten kodierenden Sequenz und der G/C-optimierten kodierenden Sequenz oder einer beliebigen Kombination davon ausgewählt ist.

Gegenstand 36. Nukleinsäure gemäß Gegenstand 34 oder 35, wobei die mindestens eine Codon-modifizierte kodierende Sequenz eine G/C-optimierte kodierende Sequenz, eine an die humane Codonverwendung angepasste kodierende Sequenz oder eine G/C-Gehalt-modifizierte kodierende Sequenz ist.

Gegenstand 37. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei die mindestens eine kodierende Sequenz eine G/C-optimierte kodierende Sequenz umfasst oder aus einer solchen besteht, die eine Nukleinsäuresequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: SEQ ID NOs: 136-138, 140, 141, 148, 149, 152, 155, 156, 159, 162, 163, 166, 169, 170, 173, 11731-11813, 11815, 11817-1 1966, 12271-12472, 12743-12944, 13514, 13515, 14124-14132, 14142-14150, 14160-14168, 22759, 22764-22786, 22791-22813, 22818-22839, 22969-23040, 23077-23148, 23189-23260, 23297-23368, 23409-23480, 23517-23588, 23629-23700, 23737-23808, 23849-23920, 23957-24028, 24069-24140, 24177-24248, 24289-24360, 24397-24468, 24509-24580, 24617-24688, 24729-24800, 24837-24908, 24949-25020, 25057-25128, 25169-25240, 25277-25348, 25389-25460, 25497-25568, 25609-25680, 25717-25788, 25829-25900, 25937-26008, 26049-26120, 26157-26228, 26269-26340, 26377-26448, 26489-26560, 26597-26668, 26709-26780, 26817-26888, 26925-26937 ist, oder ein Fragment oder eine Variante irgendeiner dieser Sequenzen umfasst.

Gegenstand 38. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei die mindestens eine kodierende Sequenz eine an die humane Codon-Verwendung angepasste kodierende Sequenz umfasst oder daraus besteht, die eine Nukleinsäuresequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 142, 143, 145, 150, 153, 157, 160, 164, 167, 171, 174, 11967-12033, 12473-12539, 12945-13011 ist, oder ein Fragment oder eine Variante irgendeiner dieser Sequenzen umfasst.

Gegenstand 39. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei die mindestens eine kodierende Sequenz eine G/C-Gehalt-modifizierte kodierende Sequenz umfasst oder daraus besteht, die eine Nukleinsäuresequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 146, 147, 151, 154, 158, 161, 165, 168, 172, 175, 12034-12050, 12052, 12054-12203, 12540-12675, 13012-13147, 13519, 13520, 14133-14141, 14151-14159, 14169-14177, 23041-23076, 23149-23184, 23261-23296, 23369-23404, 23481-23516, 23589-23624, 23701-23736, 23809-23844, 23921-23956, 24029-24064, 24141-24176, 24249-24284, 24361-24396, 24469-24504, 24581-24616, 24689-24724, 24801-24836, 24909-24944, 25021-25056, 25129-25164, 25241-25276, 25349-25384, 25461-25496, 25569-25604, 25681-25716, 25789-25824, 25901-25936, 26009-26044, 26121-26156, 26229-26264, 26341-26376, 26449-26484, 26561-26596, 26669-26704, 26781-26816, 26889-26924 ist, oder ein Fragment oder eine Variante irgendeiner dieser Sequenzen umfasst.

Gegenstand 40. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei die mindestens eine kodierende Sequenz einen G/C-Gehalt von mindestens etwa 50%, 55% oder 60%, bevorzugt von etwa 63,9%, aufweist.

Gegenstand 41. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei die mindestens eine kodierende Sequenz für ein S-Protein kodiert, das eine präfusionsstabilisierende K986P- und V987P-Mutation umfasst, wobei die kodierende Sequenz eine G/C-optimierte kodierende Sequenz umfasst oder daraus besteht, die eine Nukleinsäuresequenz, die identisch mit SEQ ID NOs: 137, 23090, 23091, 23093, 23094 ist, oder ein Fragment oder eine Variante davon umfasst.

Gegenstand 42. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei die mindestens eine heterologe untranslatierte Region aus mindestens einer heterologen 5'-UTR und/oder mindestens einer heterologen 3'-UTR ausgewählt ist.

Gegenstand 43 Nukleinsäure gemäß Gegenstand 42, wobei die mindestens eine heterologe 3'-UTR eine Nukleinsäuresequenz umfasst oder daraus besteht, die von einer 3'-UTR eines Gens, ausgewählt aus PSMB3, ALB7, alpha-Globin, CASP1, COX6B1, GNAS, NDUFA1 und RPS9, oder von einem Homolog, einem Fragment oder einer Variante irgendeines dieser Gene abgeleitet ist.

Gegenstand 44. Nukleinsäure gemäß Gegenstand 42, wobei die mindestens eine heterologe 5'-UTR eine Nukleinsäuresequenz umfasst oder daraus besteht, die von einer 5'-UTR eines Gens, ausgewählt aus HSD17B4, RPL32, ASAH1, ATP5A1, MP68, NDUFA4, NOSIP, RPL31, SLC7A3, TUBB4B und UBQLN2, oder von einem Homolog, einem Fragment oder einer Variante irgendeines dieser Gene abgeleitet ist.

Gegenstand 45. Nukleinsäure gemäß Gegenstand 42, wobei die mindestens eine heterologe 5'-UTR und die mindestens eine heterologe 3'-UTR ausgewählt ist aus UTR-Design a-1 (HSD17B4/PSMB3), a-3 (SLC7A3/PSMB3), e-2 (RPL31/RPS9), und i-3 (/muag), wobei UTR-Design a-1 (HSD1 7B4/PSMB3) und i-3 (-/muag) besonders bevorzugt sind.

Gegenstand 46. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei die Nukleinsäure mindestens eine Poly(A)-Sequenz, vorzugsweise umfassend 30 bis 200 Adenosin-Nukleotide, und/oder mindestens eine Poly(C)-Sequenz, vorzugsweise umfassend 10 bis 40 Cytosin-Nukleotide, umfasst.

Gegenstand 47. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei die Nukleinsäure mindestens einen Histon-Stem-Loop umfasst.

Gegenstand 48. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei die Nukleinsäure eine DNA oder eine RNA ist.

Gegenstand 49. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei die Nukleinsäure eine kodierende RNA ist.

Gegenstand 50. Nukleinsäure gemäß Gegenstand 49, wobei die kodierende RNA eine mRNA, eine selbstreplizierende RNA, eine zirkuläre RNA oder eine Replikon-RNA ist.

Gegenstand 51. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei die Nukleinsäure, vorzugsweise die kodierende RNA, eine mRNA ist.

Gegenstand 52. Nukleinsäure gemäß Gegenstand 51, wobei die mRNA keine Replikon-RNA oder selbstreplizierende RNA ist.

Gegenstand 53. Nukleinsäure gemäß Gegenstand 51, wobei die mRNA mindestens eine 30 bis 200 Adenosin-Nukleotide umfassende Poly(A)-Sequenz umfasst und das 3'-terminale Nukleotid ein Adenosin ist.

Gegenstand 54. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der Gegenstände 48 bis 51, wobei die RNA, vorzugsweise die kodierende RNA, eine 5'-Cap-Struktur, bevorzugt m7G, cap0, cap1, cap2, eine modifizierte cap0- oder eine modifizierte cap1-Struktur, bevorzugt eine 5'-cap1-Struktur, umfasst.

Gegenstand 55. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der Gegenstände 48 bis 54, wobei die Nukleinsäure, vorzugsweise die mRNA, die folgenden Elemente in 5'-3'-Richtung umfasst:

A) 5'-cap1-Struktur;

B) kodierende Sequenz gemäß SEQ ID NO: 137, oder ein Fragment oder eine Variante davon;

C) 3'-UTR, abgeleitet von einer 3'-UTR eines alpha-Globin-Gens, vorzugsweise gemäß SEQ ID NOs: 267 oder 268;

D) Poly(A)-Sequenz umfassend etwa 64 A-Nukleotide;

E) Poly(C)-Sequenz umfassend etwa 30 C-Nukleotide;

F) Histon-Stem-Loop gemäß SEQ ID NOs: 178 oder 179.

Gegenstand 56. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der Gegenstände 48 bis 54, wobei die Nukleinsäure, vorzugsweise die mRNA, die folgenden Elemente in 5'-3'-Richtung umfasst:

A) 5'-cap1 -Struktur;

B) 5'-UTR abgeleitet von einer 5'-UTR eines HSD17B4-Gens, vorzugsweise gemäß SEQ ID NO: 231 oder 232;

C) kodierende Sequenz gemäß SEQ ID NO: 137, oder ein Fragment oder eine Variante davon;

D) 3'-UTR abgeleitet von einer 3'-UTR eines PSMB3-Gens, vorzugsweise gemäß SEQ ID NO: 253 oder 254;

E) einen Histon-Stem-Loop, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 178 oder 179;

F) eine Poly(A)-Sequenz umfassend etwa 100 A-Nukleotide.

Gegenstand 57. Nukleinsäure gemäß Gegenstand 56, wobei das 3'-terminale Nukleotid ein Adenosin ist.

Gegenstand 58. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der Gegenstände 48 bis 54, wobei die Nukleinsäure, vorzugsweise die mRNA, die folgenden Elemente in 5'-3'-Richtung umfasst:

A) 5'-c\ap1-Struktur;

B) kodierende Sequenz gemäß SEQ ID NO: 23090 oder 23091, oder ein Fragment oder eine Variante davon;

C) 3'-UTR, abgeleitet von einer 3'-UTR eines alpha-Globin-Gens, vorzugsweise gemäß SEQ ID NO: 267 oder 268;

D) Poly(A)-Sequenz umfassend etwa 64 A-Nukleotide;

E) Poly(C)-Sequenz umassend etwa 30 C-Nukleotide;

F) Histon-Stem-Loop gemäß SEQ ID NOs: 178 oder 179.

Gegenstand 59. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der Gegenstände 48 bis 54, wobei die Nukleinsäure, vorzugsweise die mRNA, die folgenden Elemente in 5'-3'-Richtung umfasst:

A) 5'-cap1-Struktur;

B) 5'-UTR, abgeleitet von einer 5'-UTR eines HSD17B4-Gens, vorzugsweise gemäß SEQ ID NO: 231 oder 232;

C) kodierende Sequenz gemäß SEQ ID NO: 23090 oder 23091, oder ein Fragment oder eine Variante davon;

D) 3'-UTR, abgeleitet von einer 3'-UTR eines PSMB3-Gens, vorzugsweise gemäß SEQ ID NO: 253 oder 254;

E) einen Histon-Stem-Loop, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 178 oder 179;

F) eine Poly(A)-Sequenz umfassend etwa 100 A-Nukleotide.

Gegenstand 60. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei die Nukleinsäure eine Nukleinsäuresequenz, vorzugsweise eine RNA-Sequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den SEQ ID NOs: 148-175, 12204-13147, 14142-14177, 22786-22839, 23189-23404, 23409-23624, 23629-23844, 23849-24064, 24069-24284, 24289-24504, 24509-24724, 24729-24944, 24949-25164, 25169-25384, 25389-25604, 25609-25824, 25829-26044, 26049-26264, 26269-26484, 26489-26704, 26709-26937148 ist, oder ein Fragment oder eine Variante von irgendeiner dieser Sequenzen umfasst oder daraus besteht.

Gegenstand 61. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei die Nukleinsäure eine Nukleinsäuresequenz, vorzugsweise eine RNA-Sequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den SEQ ID NOs: 149, 156, 12338, 150, 157, 151, 158, 12541, 163, 170, 12810, 164, 171, 165, 172, 13013, 12342-12351, 12545-12554, 12814-12823, 13017-13026, 14133 ist, oder ein Fragment oder eine Variante irgendeiner dieser Sequenzen, vorzugsweise ausgewählt aus SEQ ID NOs: 149, 150, 151, 163, 164, 165, oder ein Fragment oder eine Variante irgendeiner dieser Sequenzen umfasst oder daraus besteht.

Gegenstand 62. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei die Nukleinsäure eine Nukleinsäuresequenz, vorzugsweise eine RNA-Sequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz, ausgewählt aus SEQ ID NO: 163, ist, oder ein Fragment oder eine Variante davon umfasst oder daraus besteht.

Gegenstand 63. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei die Nukleinsäure eine Nukleinsäuresequenz, vorzugsweise eine RNA-Sequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz, ausgewählt aus SEQ ID NO: 149, ist, oder ein Fragment oder eine Variante davon umfasst oder daraus besteht.

Gegenstand 64. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei die Nukleinsäure eine Nukleinsäuresequenz, vorzugsweise eine RNA-Sequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz, ausgewählt aus SEQ ID NOs: 24837, ist, oder ein Fragment oder eine Variante davon umfasst oder daraus besteht.

Gegenstand 65. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei die Nukleinsäure eine Nukleinsäuresequenz, vorzugsweise eine RNA-Sequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 23311, 23531, 24851, ist, oder ein Fragment oder eine Variante davon umfasst oder daraus besteht.

Gegenstand 66. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei die Nukleinsäure eine Nukleinsäuresequenz, vorzugsweise eine RNA-Sequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 23310, 23530, 24850, ist, oder ein Fragment oder eine Variante davon umfasst oder daraus besteht.

Gegenstand 67. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei die Nukleinsäure eine Nukleinsäuresequenz, vorzugsweise eine RNA-Sequenz, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs:

23313, 23533, 24853, 23314, 23534, 24854, ist, oder ein Fragment oder eine Variante davon umfasst oder daraus besteht.

Gegenstand 68. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei die Nukleinsäure eine RNA ist, die keine 1-Methylpseudouridin-Substitution umfasst.

Gegenstand 69. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei die Nukleinsäure eine RNA ist, die keine chemisch modifizierten Nukleotide umfasst.

Gegenstand 70. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei die Nukleinsäure eine in vitro transkribierte RNA ist, wobei die Invitro-Transkription der RNA in Gegenwart einer sequenzoptimierten Nukleotidmischung und eines Cap-Analogons durchgeführt wurde, wobei die sequenzoptimierte Nukleotidmischung vorzugsweise keine chemisch modifizierten Nukleotide umfasst.

Gegenstand 71. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei die Nukleinsäure eine gereinigte RNA, vorzugsweise eine RNA, die durch RP-HPLC und/oder TFF aufgereinigt wurde, ist.

Gegenstand 72. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei die Nukleinsäure eine gereinigte RNA ist, die durch RP-HPLC und/oder TFF aufgereinigt wurde und etwa 5%, 10% oder 20% weniger doppelsträngige RNA-Nebenprodukte umfasst als eine RNA, die nicht mit RP-HPLC und/oder TFF aufgereinigt wurde.

Gegenstand 73. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der vorhergehenden Gegenstände, wobei die Nukleinsäure eine gereinigte RNA ist, die durch RP-HPLC und/oder TFF aufgereinigt wurde und etwa 5%, 10% oder 20% weniger doppelsträngige RNA-Nebenprodukte umfasst als eine RNA, die mit Oligo-dT-Reinigung, Präzipitation, Filtration und/oder Anionenaustauschchromatographie gereinigt wurde.

Gegenstand 74. Zusammensetzung, umfassend mindestens eine Nukleinsäure, wie in einem der Gegenstände 1 bis 73 definiert, wobei die Zusammensetzung optional mindestens einen pharmazeutisch akzeptablen Träger umfasst.

Gegenstand 75. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 74, wobei die Zusammensetzung eine mRNA gemäß SEQ ID NOs: 149, 163, 24837, 23311, 23531, 23310, 23530, 23313 oder 23533 oder ein Fragment oder eine Variante irgendeiner dieser Sequenzen umfasst.

Gegenstand 76. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 74, wobei die Zusammensetzung eine multivalente Zusammensetzung ist, die eine Vielzahl oder zumindest mehr als eine der Nukleinsäuren, wie in einem der Gegenstände 1 bis 73 definiert, umfasst.

Gegenstand 77. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 76, wobei die mehreren oder zumindest mehr als eine der Nukleinsäuresequenzen der multivalenten Zusammensetzung jeweils für ein unterschiedliches Spike-Protein, vorzugsweise ein präfusionsstabilisiertes Spike-Protein, kodieren.

Gegenstand 78. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 77, wobei die unterschiedlichen Spike-Proteine oder präfusionsstabilisierten Spike-Proteine von verschiedenen SARS-CoV-2-Virusvarianten/Isolaten stammen.

Gegenstand 79. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 78, wobei die unterschiedlichen Spike-Proteine oder präfusionsstabilisierten Spike-Proteine von mindestens B.1.1.7, B.1.351, P.1 oder CAL.20C abgeleitet sind.

Gegenstand 80. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 78, wobei die unterschiedlichen Spike-Proteine oder präfusionsstabilisierten Spike-Proteine aufweisen:

Aminosäureveränderungen im S-Protein, umfassend:

(i) delH69, delV70, Y453F, D614G, I692V und M1229I;

(ii) delH69, delV70, delY144, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A und D1118H;

(iii) L18F, D80A, D215G, delL242, delA243, delL244, R246I, K417N, E484K, N501Y, D614G und A701V;

(iv) L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y und T10271; und/oder

(v) S13I, W152C, L452R, und D614G.

Gegenstand 81. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 76 bis 78, wobei die multivalente Zusammensetzung mindestens zwei Nukleinsäurespezies umfasst, die eine kodierende Sequenz umfassen, die für eine Aminosäuresequenz kodiert, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%,

86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 10, 22961; 22960, 22963, 22941, 22964 ist.

Gegenstand 82. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 76 bis 78, wobei die multivalente Zusammensetzung mindestens zwei RNA-Spezies umfasst, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der SEQ ID NOs: 149 oder 24837, 23531 oder 24851, 23530 oder 24850, 23533 oder 24853, 23439 oder 24759 oder 23534 oder 24854 ist.

Gegenstand 83. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 74 bis 80, wobei die Zusammensetzung mRNA mit einer RNA-Integrität von 70% oder mehr umfasst.

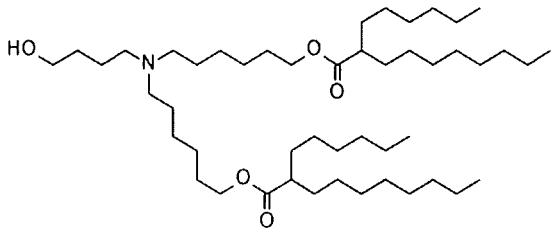
Gegenstand 84. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 74 bis 83, wobei die Zusammensetzung mRNA mit einem Capping-Grad von 70% oder mehr umfasst, wobei bevorzugt mindestens 70%, 80% oder 90% der mRNA-Spezies eine Cap1-Struktur umfassen.

Gegenstand 85. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 74 bis 84, wobei die mindestens eine Nukleinsäure mit einer oder mehreren kationischen oder polykationischen Verbindung(en), vorzugsweise kationischem oder polykationischem Polymer, kationischem oder polykationischem Polysaccharid, kationischem oder polykationischem Lipid, kationischem oder polykationischem Protein, kationischem oder polykationischem Peptid oder beliebigen Kombinationen davon, komplexiert oder assoziiert ist oder zumindest zum Teil komplexiert oder zum Teil assoziiert ist.

Gegenstand 86. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 85, wobei die mindestens eine Nukleinsäure mit einem oder mehreren Lipiden oder lipidbasierten Trägern komplexiert oder assoziiert ist, wodurch Liposome, Lipid-Nanopartikel (LNP), Lipoplexe und/oder Nanoliposome gebildet werden, die vorzugsweise die mindestens eine Nukleinsäure einkapseln.

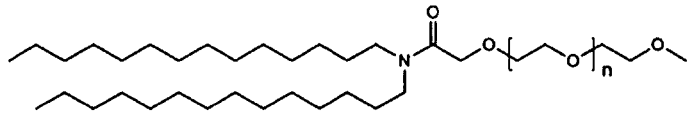
Gegenstand 87. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 85 oder 86, wobei die mindestens eine Nukleinsäure mit einem oder mehreren Lipiden komplexiert ist, wodurch Lipid-Nanopartikel gebildet werden.

Gegenstand 88. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 86 oder 87, wobei das LNP ein kationisches Lipid gemäß Formel III-3 umfasst:



(III-3).

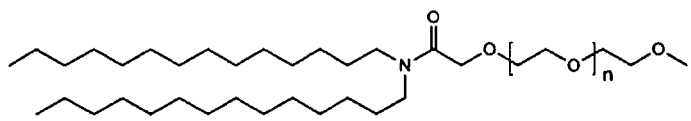
Gegenstand 89. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86-88, wobei das LNP ein PEG-Lipid der Formel (IVa) umfasst:



(IVa),

wobei n einen Mittelwert in einem Bereich von 30 bis 60 hat, wobei n bevorzugt einen Mittelwert von etwa 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 hat, wobei n am meisten bevorzugt einen Mittelwert von 49 oder 45 hat.

Gegenstand 90. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86-88, wobei das LNP ein PEG-Lipid der Formel (IVa) umfasst:



(IVa),

wobei n eine ganze Zahl ist, die so gewählt ist, dass das mittlere Molekulargewicht des PEG-Lipids etwa 2500 g/mol beträgt.

Gegenstand 91. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86-90, wobei das LNP ein oder mehrere neutrale Lipide und/oder ein oder mehrere Steroide oder Steroidanaloga umfasst.

Gegenstand 92. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 91, wobei das neutrale Lipid 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DSPC) ist, wobei vorzugsweise das Molverhältnis des kationischen Lipids zu DSPC im Bereich von etwa 2:1 bis etwa 8:1 liegt.

Gegenstand 93. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 91, wobei das Steroid Cholesterol ist, wobei vorzugsweise das Molverhältnis des kationischen Lipids zu Cholesterol im Bereich von etwa 2:1 bis etwa 1:1 liegt.

Gegenstand 94. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86-93, wobei das LNP umfasst:

(i) mindestens ein kationisches Lipid, bevorzugt ein Lipid der Formel (III), bevorzugter Lipid III-3;

(ii) mindestens ein neutrales Lipid, vorzugsweise 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DSPC);

(iii) mindestens ein Steroid oder Steroidanalogon, vorzugsweise Cholesterol; und

(iv) mindestens ein Polymer-konjugiertes Lipid, vorzugsweise ein PEG-Lipid, abgeleitet von Formel IVa (mit n = 49),

wobei (i) bis (iv) in einem Molverhältnis von etwa 20-60% kationisches Lipid, 5-25% neutrales Lipid, 25-55% Sterol und 0,5-15% PEG-Lipid vorliegen.

Gegenstand 95. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86-93, wobei das LNP umfasst:

(i) mindestens ein kationisches Lipid, bevorzugt ein Lipid der Formel (III), bevorzugter Lipid III-3;

(ii) mindestens ein neutrales Lipid, vorzugsweise 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DSPC);

(iii) mindestens ein Steroid oder Steroidanalogon, vorzugsweise Cholesterol; und

(iv) mindestens ein Polymer-konjugiertes Lipid, vorzugsweise ein PEG-Lipid, abgeleitet von Formel IVa (mit n = 45),

wobei (i) bis (iv) in einem Molverhältnis von etwa 20-60% kationisches Lipid, 5-25% neutrales Lipid, 25-55% Sterol und 0,5-15% PEG-Lipid vorliegen.

Gegenstand 96. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 94 oder 95, wobei (i) bis (iv) in einem Molverhältnis von etwa 50:10:38,5:1,5, bevorzugt 47,5:10:40,8:1,7 oder bevorzugter 47,4:10:40,9:1,7 vorliegen.

Gegenstand 97. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 87 bis 96, wobei die Nukleinsäure RNA ist und die Zusammensetzung weniger als etwa 20% freie (nicht komplexierte oder nicht vergekapselte) RNA, bevorzugt weniger als etwa 15% freie RNA, bevorzugter weniger als etwa 10% freie RNA umfasst.

Gegenstand 98. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 87 bis 97, wobei das Gew./Gew.-Verhältnis von Lipid zu Nukleinsäure etwa 10:1 bis etwa 60:1, bevorzugt etwa 20:1 bis etwa 30:1, beispielsweise etwa 25:1, beträgt.

Gegenstand 99: Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 87 bis 98, wobei das n/p-Verhältnis der die Nukleinsäure einkapselnden LNPs in einem Bereich von etwa 1 bis etwa 10, bevorzugt in einem Bereich von etwa 5 bis etwa 7, bevorzugter bei etwa 6, liegt.

Gegenstand 100. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 87 bis 99, wobei die Zusammensetzung einen Polydispersitätsindex (PDI)-Wert von weniger als etwa 0,4, bevorzugt von weniger als etwa 0,3, bevorzugter von weniger als etwa 0,2, am meisten bevorzugt von weniger als etwa 0,1 aufweist.

Gegenstand 101. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 100, wobei die LNPs eine Partikelgröße (Z-Mittel) in einem Bereich von etwa 60 nm bis etwa 120 nm, bevorzugt von weniger als etwa 120 nm, bevorzugter von weniger als etwa 100 nm, am meisten bevorzugt von weniger als etwa 80 nm aufweisen.

Gegenstand 102. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 101, wobei die LNPs weniger als etwa 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% LNPs umfassen, die eine Partikelgröße von mehr als etwa 500 nm aufweisen.

Gegenstand 103. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 102, wobei die LNPs weniger als etwa 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% LNPs umfassen, die eine Partikelgröße von weniger als etwa 20 nm aufweisen.

Gegenstand 104. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 103, wobei mindestens etwa 80%, 85%, 90%, 95% der Träger auf Lipidbasis eine sphärische Morphologie aufweisen, die vorzugsweise einen festen Kern oder einen teilweise festen Kern umfasst.

Gegenstand 105. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 104, wobei die Zusammensetzung eine Trübung im Bereich von etwa 150 FNU bis etwa 0,0 FNU, bevorzugt von etwa 50 FNU oder weniger, bevorzugter von etwa 25 FNU oder weniger, aufweist.

Gegenstand 106. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 74 bis 105, welche ferner einen Zucker in einer Konzentration von etwa 50 bis etwa 300 mM, vorzugsweise Saccharose in einer Konzentration von etwa 150 mM, umfasst.

Gegenstand 107. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 74 bis 106, welche ferner ein Salz in einer Konzentration von etwa 10 mM bis etwa 200 mM, vorzugsweise NaCL in einer Konzentration von etwa 75 mM, umfasst.

Gegenstand 108. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 74 bis 107, welche ferner ein Puffermittel in einer Konzentration von 1 mM bis etwa 100 mM, vorzugsweise Na_3PO_4 in einer Konzentration von etwa 10 mM, umfasst.

Gegenstand 109. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 74 bis 108, wobei die Zusammensetzung einen pH-Wert in einem Bereich von etwa pH 7,0 bis etwa pH 8,0, bevorzugt von etwa pH 7,4, aufweist.

Gegenstand 110. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 109, umfassend Lipid-Nanopartikel, die eine RNA einkapseln, die ein SARS-CoV-2-S-Protein kodiert, das eine präfusionsstabilisierende K986P- und V987P-Mutation umfasst,
wobei die LNPs umfassen:

(i) kationisches Lipid der Formel III-3,

(ii) 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DSPC),

(iii) Cholesterol; und

(iv) PEG-Lipid der Formel IVa (n=49),

wobei (i) bis (iv) in einem Molverhältnis von etwa 47,4% kationischem Lipid, 10% DSPC, 40,9 Cholesterol, 1,7% PEG-Lipid vorliegen;
wobei die RNA identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz der SEQ ID NO: 163 oder 149 ist;
wobei die RNA nicht chemisch modifiziert ist;
wobei die RNA eine 5'-Cap1-Struktur umfasst;
wobei die Integrität der RNA mindestens etwa 70% beträgt;
wobei das n/p-Verhältnis der LNPs, die die RNA einkapseln, etwa 6 beträgt;
wobei die LNPs, die die RNA einkapseln, eine Partikelgröße (Z-Mittel) von etwa 60 nm bis etwa 120 nm aufweisen;
wobei die Zusammensetzung weniger als etwa 20% freie (nicht komplexierte; nicht eingekapselte) RNA umfasst;
optional, wobei die Zusammensetzung ferner Saccharose in einer Konzentration von etwa 150 mM, NaCl in einer Konzentration von etwa 75 mM, Na_3PO_4 in einer Konzentration von etwa 10 mM umfasst;
optional, wobei die Zusammensetzung einen pH-Wert von etwa pH 7,4 aufweist.

Gegenstand 111. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 109, umfassend Lipid-Nanopartikel, die eine RNA einkapseln, die ein SARS-CoV-2-S-Protein kodiert, das eine präfusionsstabilisierende K986P- und V987P-Mutation umfasst,
wobei die LNPs umfassen:

(i) kationisches Lipid der Formel III-3;

(ii) 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DSPC);

(iii) Cholesterol; und

(iv) PEG-Lipid der Formel IVa (n=45)),

wobei (i) bis (iv) in einem Molverhältnis von etwa 47,4% kationischem Lipid, 10% DSPC, 40,9 Cholesterol, 1,7% PEG-Lipid vorliegen;
wobei die RNA identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz der SEQ ID NO: 163 oder 149 ist;
wobei die RNA nicht chemisch modifiziert ist;
wobei die RNA eine 5'-Cap1-Struktur umfasst;
wobei die Integrität der RNA mindestens etwa 70% beträgt;
wobei das n/p-Verhältnis der LNPs, die die RNA einkapseln, etwa 6 beträgt;
wobei die LNPs, die die RNA einkapseln, eine Partikelgröße (Z-Mittel) von etwa 60 nm bis etwa 120 nm haben;
wobei die Zusammensetzung weniger als etwa 20% freie (nicht komplexierte) RNA umfasst;
optional, wobei die Zusammensetzung ferner Saccharose in einer Konzentration von etwa 150 mM, NaCl in einer Konzentration von etwa 75 mM, Na_3PO_4 in einer Konzentration von etwa 10 mM umfasst;
optional, wobei die Zusammensetzung einen pH-Wert von etwa pH 7,4 aufweist.

Gegenstand 112. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 110, umfassend eine nicht chemisch modifizierte RNA, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz der SEQ ID NO: 163 ist und in Lipid-Nanopartikeln (LNPs) formuliert ist, die ein Molverhältnis von etwa 50:10:38,5:1,5, bevorzugt 47,5:10:40,8:1,7 oder bevorzugter 47,4:10:40,9:1,7 Anteil (Mol-%) an kationischem Lipid III-3, DSPC, Cholesterol und PEG-Lipid der Formel (IVa) aufweisen.

Gegenstand 113. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 110, umfassend eine nicht chemisch modifizierte RNA, die identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit einer Nukleinsäuresequenz der SEQ ID NO: 149 ist und in Lipid-Nanopartikeln (LNPs) formuliert ist, die ein Molverhältnis von etwa 50:10:38,5:1,5, bevorzugt 47,5:10:40,8:1,7 oder bevorzugter 47,4:10:40,9:1,7 Anteil (Mol-%) an kationischem Lipid III-3, DSPC, Cholesterol und PEG-Lipid der Formel (IVa) aufweisen.

Gegenstand 114. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 74 bis 112, wobei die Zusammensetzung eine mRNA umfasst, die ein SARS-CoV-2-Spike-Protein (S) kodiert, das ein präfusionsstabilisiertes Spike-Protein (S_stab) ist, das mindestens eine präfusionsstabilisierende Mutation umfasst.

Gegenstand 115. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 114, wobei die mRNA für ein SARS-CoV-2-Spike-Protein kodiert, das zu mindestens 95% mit SEQ ID NO: 163 identisch ist, oder für ein Coronavirus-Spike-Protein kodiert, das mit SEQ ID NO: 163 identisch ist.

Gegenstand 116. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 114, wobei das LNP umfasst:

(i) mindestens ein kationisches Lipid;

(ii) mindestens ein neutrales Lipid;

(iii) mindestens ein Steroid oder Steroidanalogon; und

(iv) mindestens ein PEG-Lipid,

wobei (i) bis (iv) in einem Molverhältnis von etwa 20-60% kationischem Lipid, 5-25% neutralem Lipid, 25-55% Sterol und 0,5-15% PEG-Lipid vorliegen.

Gegenstand 117. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 114, wobei das LNP umfasst:

(i) mindestens ein kationisches Lipid gemäß Formel III-3;

(ii) DSPC;

(iii) Cholesterol; und

(iv) ein PEG-Lipid gemäß der Formel IVa,

wobei (i) bis (iv) in einem Molverhältnis von etwa 20-60% kationischem Lipid, 5-25% neutralem Lipid, 25-55% Sterol und 0,5-15% PEG-Lipid vorliegen.

Gegenstand 118. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 114, wobei das LNP umfasst:

(i) mindestens ein kationisches Lipid gemäß Formel III-3;

(ii) DSPC;

(iii) Cholesterol; und

(iv) ein PEG-Lipid gemäß der Formel IVa,

wobei (i) bis (iv) in einem Molverhältnis von etwa 47,5:10:40,8:1,7 vorliegen.

Gegenstand 119. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 114, wobei das LNP umfasst:

(i) mindestens ein kationisches Lipid gemäß Formel III-3;

(ii) DSPC;

(iii) Cholesterol; und

(iv) ein PEG-Lipid gemäß der Formel IVa,

wobei (i) bis (iv) in einem Molverhältnis von 47,4:10:40,9:1,7 vorliegen.

Gegenstand 120. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 107-118, wobei das Verhältnis von mRNA zu Gesamtlipid etwa 0,03-0,04 Gew./Gew. beträgt.

Gegenstand 121. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 120, wobei die mRNA mit einem oder mehreren Lipiden komplexiert ist, wodurch Lipid-Nanopartikel (LNP) gebildet werden, wobei das LNP umfasst:

(i) mindestens ein kationisches Lipid gemäß Formel III-3;

(ii) DSPC;

(iii) Cholesterol; und

(iv) ein PEG-Lipid gemäß der Formel IVa,

wobei (i) bis (iv) in einem Molverhältnis von etwa 47,5:10:40,8:1,7 vorliegen, und wobei das Verhältnis von mRNA zu Gesamtlipid etwa 0,03-0,04 Gew./Gew. beträgt.

Gegenstand 122. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 120, wobei die mRNA mit einem oder mehreren Lipiden komplexiert ist, wodurch Lipid-Nanopartikel (LNP) gebildet werden, wobei das LNP umfasst:

(i) mindestens ein kationisches Lipid gemäß Formel III-3;

(ii) DSPC;

(iii) Cholesterol; und

(iv) ein PEG-Lipid gemäß der Formel IVa,

wobei (i) bis (iv) in einem Molverhältnis von 47,4:10:40,9:1,7 vorliegen, und
wobei das Verhältnis von mRNA zu Gesamtlipid etwa 0,03-0,04 Gew./Gew. beträgt.

Gegenstand 123. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 74-99 oder 110-122, wobei die Zusammensetzung eine lyophilisierte Zusammensetzung ist.

Gegenstand 124. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 123, wobei die lyophilisierte Zusammensetzung einen Wassergehalt von weniger als etwa 10% aufweist.

Gegenstand 125. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 124, wobei die lyophilisierte Zusammensetzung einen Wassergehalt zwischen etwa 0,5% und 5% aufweist.

Gegenstand 126. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 122, wobei die Nukleinsäure RNA ist und wobei die Zusammensetzung für mindestens etwa zwei Wochen nach der Lagerung als Flüssigkeit bei Temperaturen von etwa 5 °C stabil ist.

Gegenstand 127. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 126, wobei die Nukleinsäure RNA ist und wobei die Zusammensetzung für mindestens 1 Monat nach Lagerung als Flüssigkeit bei Temperaturen von etwa 5 °C stabil ist.

Gegenstand 128. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 126, wobei die Nukleinsäure RNA ist und wobei die Zusammensetzung für etwa 2 Wochen bis etwa 1 Monat, 2 Monate, 3 Monate, 4 Monate, 5 Monate, 6 Monate oder 1 Jahr nach Lagerung als Flüssigkeit bei Temperaturen von etwa 5 °C stabil ist.

Gegenstand 129. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 126, wobei die Nukleinsäure RNA ist und wobei mindestens 70%, 75%, 80%, 85%, 90% oder 95% der RNA mindestens etwa zwei Wochen nach Lagerung als Flüssigkeit bei Temperaturen von etwa 5 °C intakt ist.

Gegenstand 130. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 129, wobei die Nukleinsäure RNA ist und wobei mindestens 70%, 75%, 80%, 85%, 90% oder 95% der RNA mindestens 1 Monat nach Lagerung als Flüssigkeit bei Temperaturen von etwa 5 °C intakt ist.

Gegenstand 131. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 126, wobei die Nukleinsäure RNA ist und wobei mindestens 70%, 75%, 80%, 85%, 90% oder 95% der RNA etwa 2 Wochen bis etwa 1 Monat, 2 Monate, 3 Monate, 4 Monate, 5 Monate, 6 Monate oder 1 Jahr nach Lagerung als Flüssigkeit bei Temperaturen von etwa 5 °C intakt ist.

Gegenstand 132. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 126, wobei die Nukleinsäure RNA ist und wobei mindestens 80% der RNA nach etwa zwei Wochen Lagerung als Flüssigkeit bei Temperaturen von etwa 5 °C intakt ist.

Gegenstand 133. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 132, wobei die Zusammensetzung ein Aggregations-reduzierendes Lipid umfasst.

Gegenstand 134. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 133, wobei die Nukleinsäure RNA ist und wobei die Konzentration der RNA in einem Bereich von etwa 10 µg/ml bis etwa 10 mg/ml, vorzugsweise in einem Bereich von etwa 100 µg/ml bis etwa 1 mg/ml, liegt.

Gegenstand 135. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 133, wobei die Nukleinsäure RNA ist und wobei die Konzentration der RNA mindestens 100 µg/ml, bevorzugter mindestens 200 µg/ml, am meisten bevorzugt mindestens 500 µg/ml beträgt.

Gegenstand 136. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 135, wobei die Nukleinsäure RNA ist und wobei die RNA eine RNA-Integrität von mindestens etwa 50%, bevorzugt von mindestens etwa 60%, bevorzugter von mindestens etwa 70%, am meisten bevorzugt von mindestens etwa 80% aufweist.

Gegenstand 137. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 136, wobei die Nukleinsäure RNA ist und wobei die Zusammensetzung weniger als etwa 20% freie RNA, bevorzugt weniger als etwa 15% freie RNA, bevorzugter weniger als etwa 10% freie RNA umfasst.

Gegenstand 138. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 137, wobei die Nukleinsäure RNA ist und wobei die Zusammensetzung weniger als etwa 100 nM zweiwertige Kationen pro g RNA, bevorzugt weniger als etwa 50 nM zweiwertige Kationen pro g RNA, bevorzugter weniger als etwa 10 nM zweiwertige Kationen pro g RNA umfasst.

Gegenstand 139. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 138, wobei die zweiwertigen Kationen aus Mg^{2+} und/oder Ca^{2+} ausgewählt sind.

Gegenstand 140. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 139, wobei die Konzentration an Lipid in einem Bereich von etwa 250 µg/ml bis etwa 250 mg/ml, vorzugsweise in einem Bereich von etwa 2,5 mg/ml bis etwa 25 mg/ml liegt.

Gegenstand 141. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 140, wobei die Konzentration an Lipid mindestens etwa 2,5 mg/ml, bevorzugt mindestens 5 mg/ml, bevorzugter mindestens 12,5 mg/ml beträgt.

Gegenstand 142. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 133 bis 142, wobei die Konzentration an Aggregations-reduzierendem Lipid in einem Bereich von etwa 1 7,5 µg/ml bis etwa 17,5 mg/ml, vorzugsweise in einem Bereich von etwa 175 µg/ml bis etwa 1,75 mg/ml, liegt.

Gegenstand 143. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 133 bis 142, wobei die Konzentration an Aggregations-reduzierendem Lipid mindestens etwa 175 µg/ml, bevorzugt mindestens etwa 350 µg/ml, bevorzugter mindestens 875 µg/ml beträgt.

Gegenstand 144. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 143, wobei die Nukleinsäure RNA ist und wobei das Gew./Gew.-Verhältnis von Lipid zu RNA von etwa 10:1 bis etwa 60:1, bevorzugt von etwa 20:1 bis etwa 30:1, bevorzugter etwa 25:1, beträgt.

Gegenstand 145. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 144, wobei die Nukleinsäure RNA ist und wobei das N/P-Verhältnis der Träger auf Lipidbasis zu der RNA in einem Bereich von etwa 1 bis etwa 10, bevorzugt in einem Bereich von etwa 5 bis etwa 7, bevorzugter bei etwa 6, liegt.

Gegenstand 146. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 143, wobei die Nukleinsäure RNA ist und wobei die Träger auf Lipidbasis, die die RNA einkapseln, ein Aggregations-reduzierendes Lipid in einem Molverhältnis von etwa 0,5% bis 15%, bevorzugt in einem Molverhältnis von etwa 1,0% bis etwa 2,5%, bevorzugter in einem Molverhältnis von etwa 1,7% umfassen.

Gegenstand 147. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 133 bis 143, wobei das Aggregations-reduzierende Lipid ein Polymer-konjugiertes Lipid, z.B. ein PEGkonjugiertes Lipid, ist.

Gegenstand 148. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 147, wobei die Nukleinsäure RNA ist und wobei die RNA und der Lipid-basierte Träger, der die RNA einkapselt, durch mindestens einen Reinigungsschritt gereinigt wurden, vorzugsweise durch mindestens einen TFF-Schritt und/oder mindestens einen Klärungsschritt und/oder mindestens einen Filtrationsschritt.

Gegenstand 149. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 148, wobei die Zusammensetzung weniger als etwa 500 ppM Ethanol, bevorzugt weniger als etwa 50 ppM Ethanol, bevorzugter weniger als etwa 5 ppM Ethanol, umfasst.

Gegenstand 150. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 154, wobei die Zusammensetzung eine Osmolarität von etwa 250 mOsmol/kg bis etwa 450 mOsmol/kg, bevorzugt von etwa 335 mOsmol/kg, aufweist.

Gegenstand 151. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 150, wobei die Zusammensetzung für mindestens 1 Woche, bevorzugt für mindestens 2 Wochen, bevorzugter für mindestens 3 Wochen, am meisten bevorzugt für mindestens 4 Wochen nach Lagerung als Flüssigkeit bei etwa 25 °C stabil ist.

Gegenstand 152. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 151, wobei die Zusammensetzung für mindestens 1 Tag, bevorzugt für mindestens 2 Tage, bevorzugter für mindestens 3 Tage, am meisten bevorzugt für mindestens 4 Tage nach Lagerung als Flüssigkeit bei etwa 40 °C stabil ist.

Gegenstand 153. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 152, wobei bei Lagerung als Flüssigkeit die Integrität der RNA um weniger als etwa 30%, bevorzugt weniger als etwa 20%, bevorzugter weniger als etwa 10% abnimmt.

Gegenstand 154. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 153, wobei bei Lagerung als Flüssigkeit die Menge an freier RNA um nicht mehr als 10%, bevorzugt um nicht mehr als 5%, zunimmt.

Gegenstand 155. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 154, wobei die Nukleinsäure RNA ist und wobei bei Lagerung als Flüssigkeit der PDI-Wert der Träger auf Lipidbasis, die die RNA einkapseln, um nicht mehr als einen Wert von etwa 0,2, bevorzugt um nicht mehr als einen Wert von etwa 0,1 ansteigt.

Gegenstand 156. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 155, wobei die Nukleinsäure RNA ist und wobei bei Lagerung als Flüssigkeit die Partikelgröße (Z-Mittel) der Träger auf Lipidbasis, die die RNA einkapseln, um nicht mehr als 20%, bevorzugt um nicht mehr als 10%, zunimmt.

Gegenstand 157. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 156, wobei bei Lagerung als Flüssigkeit die Trübung der Zusammensetzung um nicht mehr als 20%, bevorzugt um nicht mehr als 10%, zunimmt.

Gegenstand 158. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 157, wobei bei Lagerung als Flüssigkeit der pH-Wert und/oder die Osmolalität um nicht mehr als 20%, bevorzugt um nicht mehr als 10%, ansteigt oder abnimmt.

Gegenstand 159. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 158, wobei bei Lagerung als Flüssigkeit die Potenz der Zusammensetzung um weniger als etwa 30%, bevorzugt um weniger als etwa 20%, bevorzugter um weniger als etwa 10% abnimmt.

Gegenstand 160. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 86 bis 133, wobei die Nukleinsäure RNA ist und wobei die RNA eine gereinigte RNA, bevorzugt eine durch RP-HPLC gereinigte RNA und/oder eine durch Tangentialflussfiltration (TFF) gereinigte RNA, ist.

Gegenstand 161. Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 74 bis 160, welche zusätzlich mindestens einen Antagonisten mindestens eines RNA-erkennenden Mustererkennungsrezeptors, bevorzugt mindestens einen Antagonisten eines TLR7-Rezeptors und/oder eines TLR8-Rezeptors, umfasst.

Gegenstand 162. Zusammensetzung gemäß Gegenstand 161, wobei der mindestens eine Antagonist eines TLR7-Rezeptors und/oder eines TLR8-Rezeptors ein einzelsträngiges Oligonukleotid, vorzugsweise p5'-GAG CGmG CCA-3', ist.

Gegenstand 163. Polypeptid für eine Vakzine, umfassend mindestens ein antigenes Peptid oder Protein, das von einem SARS-CoV-2-Coronavirus stammt oder abgeleitet ist, oder ein immunogenes Fragment oder eine immunogene Variante davon, wobei die Aminosäuresequenz des antigenen Peptids oder Proteins vorzugsweise identisch oder zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% identisch mit irgendeiner der Aminosäuresequenzen SEQ ID NOs: 1-111, 274-11663, 13176-13510, 13521-14123, 22732-22758, 22917, 22923, 22929-22964, 26938, 26939 oder einem immunogenen Fragment oder einer immunogenen Variante irgendeiner dieser Sequenzen ist.

Gegenstand 164. Vakzine, umfassend die Nukleinsäure gemäß irgendeinem der Gegenstände 1 bis 73 und/oder die Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 74 bis 162 und/oder das Polypeptid gemäß Gegenstand 163.

Gegenstand 165. Vakzine gemäß Gegenstand 164, wobei die Vakzine eine adaptive Immunantwort, vorzugsweise eine protektive adaptive Immunantwort gegen ein Coronavirus, vorzugsweise gegen das Coronavirus SARS-CoV-2, hervorruft.

Gegenstand 166. Vakzine gemäß Gegenstand 164 oder 165, wobei die Vakzine eine multivalente Vakzine ist, die eine Vielzahl oder zumindest mehr als eine der Nukleinsäuren, wie in einem der Gegenstände 1 bis 73 definiert, oder eine Vielzahl oder zumindest mehr als eine der Zusammensetzungen, wie in einem der Gegenstände 74 bis 162 definiert, umfasst.

Gegenstand 167. Kit oder Kit von Teilen, umfassend die Nukleinsäure gemäß irgendeinem der Gegenstände 1 bis 73 und/oder die Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 74 bis 162 und/oder das Polypeptid gemäß Gegenstand 163 und/oder die Vakzine gemäß Gegenstand 164 bis 166, optional umfassend ein flüssiges Vehikel zur Solubilisierung und, optional, technische Instruktionen, die Informationen zur Verabreichung und Dosierung der Komponenten liefern.

Gegenstand 168. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der Gegenstände 1 bis 73, die Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 74 bis 162, das Polypeptid gemäß Gegenstand 163, die Vakzine gemäß Gegenstand 164 bis 166, das Kit oder Kit von Teilen gemäß Gegenstand 167 zur Verwendung als Medikament.

Gegenstand 169. Nukleinsäure gemäß irgendeinem der Gegenstände 1 bis 73, die Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 74 bis 162, das Polypeptid gemäß Gegenstand 163, die Vakzine gemäß Gegenstand 164 bis 166, das Kit oder Kit von Teilen gemäß Gegenstand 167 zur Verwendung bei der Behandlung oder Prophylaxe einer Infektion mit einem Coronavirus, vorzugsweise einem SARS-CoV-2-Coronavirus, oder einer mit einer solchen Infektion verbundenen Störung, vorzugsweise COVID-19.

Gegenstand 170. Verfahren zur Behandlung oder Vorbeugung einer Störung, wobei das Verfahren die Applikation oder Verabreichung der Nukleinsäure gemäß irgendeinem der Gegenstände 1 bis 73, der Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 74 bis 162, des Polypeptids gemäß Gegenstand 163, der Vakzine gemäß den Gegenständen 164 bis 166 und/oder des Kits oder Kits von Teilen gemäß Gegenstand 167 an ein Individuum, bei dem ein entsprechender Bedarf besteht, umfasst.

Gegenstand 171. Verfahren zur Behandlung oder Vorbeugung einer Störung gemäß Gegenstand 170, wobei die Störung eine Infektion mit einem Coronavirus, vorzugsweise einem SARS-CoV-2-Coronavirus, oder eine mit einer solchen Infektion verbundene Störung, vorzugsweise COVID-19, ist.

Gegenstand 172. Verfahren zur Behandlung oder Vorbeugung einer Störung gemäß Gegenstand 170 oder 171, wobei das bedürftige Individuum ein Säugetier, vorzugsweise ein menschliches Individuum, ist.

Gegenstand 173. Verfahren zur Behandlung oder Vorbeugung einer Störung gemäß irgendeinem der Gegenstände 170 bis 172, wobei das menschliche Individuum ein älteres menschliches Individuum ist, vorzugsweise mit einem Alter von mindestens 50, 60, 65 oder 70 Jahren.

Gegenstand 174. Verfahren zur Behandlung oder Vorbeugung einer Störung gemäß Gegenstand 173, wobei das menschliche Individuum 61 Jahre alt oder älter ist.

Gegenstand 175. Verfahren zur Behandlung oder Vorbeugung einer Störung gemäß irgendeinem der Gegenstände 170 bis 172, wobei das menschliche Individuum 18 bis 60 Jahre alt ist.

Gegenstand 176. Verfahren zur Behandlung oder Vorbeugung einer Störung gemäß irgendeinem der Gegenstände 170 bis 172, wobei das Individuum schwanger ist.

Gegenstand 177. Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 170 bis 175, wobei bei nicht mehr als 25% der Individuen ein systemisches unerwünschtes Ereignis des Grades 3 nach einer ersten Dosis der Zusammensetzung auftritt, oder wobei bei nicht mehr als 30% der Individuen ein lokales unerwünschtes Ereignis des Grades 2 oder höher nach einer ersten Dosis der Zusammensetzung auftritt.

Gegenstand 178. Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 170 bis 175, wobei bei nicht mehr als 40% der Individuen ein systemisches unerwünschtes Ereignis des Grades 3 nach einer zweiten Dosis der Zusammensetzung auftritt.

Gegenstand 179. Verfahren zur Behandlung oder Vorbeugung einer Störung gemäß irgendeinem der Gegenstände 170 bis 172, wobei das menschliche Individuum ein Neugeborenes oder ein Kleinkind ist, vorzugsweise mit einem Alter von nicht mehr als 3 Jahren, von nicht mehr als 2 Jahren, von nicht mehr als 1,5 Jahren, von nicht mehr als 1 Jahr (12 Monaten), von nicht mehr als 9 Monaten, 6 Monaten oder 3 Monaten oder mit einem Alter zwischen 6 Monaten und 2 Jahren.

Gegenstand 180. Verfahren gemäß Gegenstand 170, ferner definiert als ein Verfahren zur Verringerung der Krankheitslast in dem Individuum.

Gegenstand 181. Verfahren gemäß Gegenstand 180, wobei das Verfahren den Schweregrad eines oder mehrerer Symptome der COVID-19-Erkrankung reduziert.

Gegenstand 182. Verfahren gemäß Gegenstand 181, wobei das Verfahren die Wahrscheinlichkeit verringert, dass das Individuum eine Hospitalisierung, eine Aufnahme in eine Intensivstation, eine Behandlung mit zusätzlichem Sauerstoff und/oder eine Behandlung mit einem Beatmungsgerät benötigt.

Gegenstand 183. Verfahren gemäß Gegenstand 181, wobei das Verfahren die Wahrscheinlichkeit verringert, dass das Individuum eine schwere oder moderate COVID-19-Erkrankung entwickelt.

Gegenstand 184. Verfahren gemäß Gegenstand 181, wobei das Verfahren eine schwere COVID-19-Erkrankung bei dem Individuum für mindestens etwa 6 Monate verhindert.

Gegenstand 185. Verfahren gemäß Gegenstand 184, wobei das Verfahren eine schwere COVID-19-Erkrankung bei dem Individuum verhindert, wenn das Individuum einer SARS-CoV-2-Variante ausgesetzt wird, die mindestens eine erste Aminosäureveränderung im S-Protein im Vergleich zu SEQ ID NO: 1 aufweist.

Gegenstand 186. Verfahren gemäß Gegenstand 185, wobei die SARS-CoV-2-Variante Aminosäureveränderungen im S-Protein aufweist, umfassend:

(i) delH69, delV70, Y453F, D614G, I692V und M1229I;

(ii) delH69, delV70, delY144, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A und D1118H;

(iii) L18F, D80A, D215G, delL242, delA243, delL244, R246I, K417N, E484K, N501Y, D614G und A701V;

(iv) L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y and T1027I; und/oder

(v) S13I, W152C, L452R und D614G.

Gegenstand 187. Verfahren gemäß Gegenstand 181, wobei das Verfahren die Wahrscheinlichkeit verringert, dass das Individuum Fieber, Atembeschwerden, Geruchsverlust und/oder Geschmacksverlust entwickelt.

Gegenstand 188. Verfahren gemäß Gegenstand 181, wobei das Verfahren die Wahrscheinlichkeit verringert, dass das Individuum Fieber, Atembeschwerden, Geruchsverlust und/oder Geschmacksverlust entwickelt.

Gegenstand 189. Verfahren gemäß Gegenstand 170, wobei das Individuum eine Krankheit hat oder immungeschwächt ist.

Gegenstand 190. Verfahren gemäß Gegenstand 189, wobei das Individuum eine Lebererkrankung, eine Nierenerkrankung, Diabetes, Bluthochdruck, eine Herzerkrankung, eine Lungenerkrankung oder Krebs hat oder HIV-positiv ist.

Gegenstand 191. Verfahren gemäß Gegenstand 170, wobei das Individuum in den vorangegangenen 6 Monaten nicht länger als 14 Tage mit einem immunsuppressiven Medikament behandelt wurde.

Gegenstand 192. Verfahren gemäß Gegenstand 170, wobei das Individuum mindestens 28 Tage vor der Verabreichung keine Lebendvakzine erhalten hat und/oder mindestens 14 Tage vor der Verabreichung keine inaktivierte Vakzine erhalten hat.

Gegenstand 193. Verfahren zur Stimulierung einer Immunantwort in einem Individuum, wobei das Verfahren die Verabreichung mindestens einer ersten Zusammensetzung, die die Nukleinsäure, vorzugsweise mRNA, gemäß irgendeinem der Gegenstände 1 bis 73, die Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 74 bis 162, das Polypeptid gemäß Gegenstand 163, die Vakzine gemäß Gegenstand 164 bis 166 und/oder das Kit oder Kit von Teilen gemäß Gegenstand 167 umfasst, an das Individuum umfasst.

Gegenstand 194. Verfahren gemäß Gegenstand 193, wobei das Individuum zuvor mit SARS-Cov-2 infiziert war.

Gegenstand 195. Verfahren gemäß Gegenstand 193, wobei das Individuum zuvor mit mindestens einer ersten SARS-Cov-2-Vakzinzusammensetzung behandelt wurde.

Gegenstand 196. Verfahren gemäß Gegenstand 195, wobei die erste SARS-CoV-2-Vakzinzusammensetzung eine mRNA-Vakzine war.

Gegenstand 197. Verfahren gemäß Gegenstand 196, wobei die erste SARS-CoV-2-Vakzinzusammensetzung BNT162 oder mRNA-1273 war.

Gegenstand 198. Verfahren gemäß Gegenstand 195, wobei die erste SARS-CoV-2-Vakzinzusammensetzung ein Protein-Untereinheiten-Vakzine war.

Gegenstand 199. Verfahren gemäß Gegenstand 198, wobei die erste SARS-CoV-2-Vakzinzusammensetzung NVX-CoV2373 oder COVAX war.

Gegenstand 200. Verfahren gemäß Gegenstand 195, wobei die erste SARS-CoV-2-Vakzinzusammensetzung eine Adenovirus-Vektor-Vakzine war.

Gegenstand 201. Verfahren gemäß Gegenstand 200, wobei die erste SARS-CoV-2-Vakzinzusammensetzung ADZ1222 oder Ad26.COV-2.S war.

Gegenstand 202. Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 193-201, wobei das Individuum nachweisbare SARS-CoV-2-bindende Antikörper hat.

Gegenstand 203. Verfahren gemäß Gegenstand 202, wobei das Individuum nachweisbare SARS-CoV-2-S-Protein-bindende Antikörper hat.

Gegenstand 204. Verfahren gemäß Gegenstand 202, wobei das Individuum nachweisbare SARS-CoV-2-N-Protein-bindende Antikörper hat.

Gegenstand 205. Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 195-201, wobei die erste SARS-CoV-2-Vakzinzusammensetzung dem Patienten mindestens etwa 3 Monate, 6 Monate, 9 Monate, 1 Jahr, 1,5 Jahre, 2 Jahre oder 3 Jahre zuvor verabreicht wurde.

Gegenstand 206. Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 195-201, wobei die erste SARS-CoV-2-Vakzinzusammensetzung dem Patienten etwa 3 Monate bis 2 Jahre oder etwa 6 Monate bis 2 Jahre zuvor verabreicht wurde.

Gegenstand 207. Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 193-206, wobei das Verfahren eine moderate und schwere COVID-19-Erkrankung bei mindestens 80%, 85%, 90% oder 95% der behandelten Individuen verhindert.

Gegenstand 208. Verfahren gemäß Gegenstand 207, wobei das Verfahren eine moderate und schwere COVID-19-Erkrankung bei mindestens 80%, 85%, 90% oder 95% der behandelten Individuen von etwa 2 Wochen bis etwa 1 Jahr nach der Verabreichung verhindert.

Gegenstand 209. Verfahren gemäß Gegenstand 207, wobei das Verfahren eine moderate und schwere COVID-19-Erkrankung bei mindestens 80%, 85%, 90% oder 95% der behandelten Individuen von etwa 2 Wochen bis etwa 3 Monate, 6 Monate, 9 Monate, 1 Jahr, 1,5 Jahre, 2 Jahre oder 3 Jahre nach der Verabreichung verhindert.

Gegenstand 210. Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 193 bis 209, wobei das Verfahren eine SARS-CoV-2-Infektion des Individuums und/oder eine SARS-Cov-2-Übertragung von dem Individuum bei mindestens 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% oder 95% der behandelten Individuen verhindert.

Gegenstand 211. Verfahren gemäß Gegenstand 210, wobei das Verfahren eine SARS-CoV-2-Infektion des Individuums und/oder eine SARS-CoV-2-Übertragung von dem Individuum bei mindestens 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% oder 95% der behandelten Individuen von etwa 2 Wochen bis etwa 1 Jahr nach der Verabreichung verhindert.

Gegenstand 212. Verfahren gemäß Gegenstand 211, wobei das Verfahren eine SARS-CoV-2-Infektion des Individuums und/oder eine SARS-CoV-2-Übertragung von dem Individuum bei mindestens 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% oder 95% der behandelten Individuen von etwa 2 Wochen bis etwa 3 Monate, 6 Monate, 9 Monate, 1 Jahr, 1,5 Jahre, 2 Jahre oder 3 Jahre nach der Verabreichung verhindert.

Gegenstand 213. Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 193 bis 212, welches ferner die Verabreichung mindestens einer zweiten Zusammensetzung an das Individuum umfasst, wobei die zweite Zusammensetzung die Nukleinsäure, vorzugsweise mRNA, gemäß irgendeinem der Gegenstände 1 bis 61, die Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 74 bis 128, das Polypeptid gemäß Gegenstand 163, die Vakzine gemäß Gegenstand 164 bis 166 und/oder das Kit oder Kit von Teilen gemäß Gegenstand 167 umfasst.

Gegenstand 214. Verfahren gemäß Gegenstand 213, wobei die zweite Zusammensetzung mindestens etwa 7 Tage nach der ersten Zusammensetzung verabreicht wird.

Gegenstand 215. Verfahren gemäß Gegenstand 214, wobei die zweite Zusammensetzung mindestens etwa 10 Tage, 14 Tage, 21 Tage, 28 Tage, 35 Tage, 42 Tage, 49 Tage oder 56 Tage nach der ersten Zusammensetzung verabreicht wird.

Gegenstand 216. Verfahren gemäß Gegenstand 213, wobei die zweite Zusammensetzung zwischen etwa 7 Tagen und etwa 56 Tagen nach der ersten Zusammensetzung verabreicht wird.

Gegenstand 217. Verfahren gemäß Gegenstand 216, wobei die zweite Zusammensetzung verabreicht wird zwischen: etwa 14 Tagen und etwa 56 Tagen; etwa 21 Tagen und etwa 56 Tagen; oder etwa 28 Tagen und etwa 56 Tagen nach der ersten Zusammensetzung.

Gegenstand 218. Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 193 bis 212, welches ferner die Verabreichung mindestens einer dritten Zusammensetzung an das Individuum umfasst, wobei die dritte Zusammensetzung die Nukleinsäure gemäß irgendeinem der Gegenstände 1 bis 61, die Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 74 bis 162, das Polypeptid gemäß Gegenstand 163, die Vakzine gemäß Gegenstand 164 bis 166 und/oder das Kit oder Kit von Teilen gemäß Gegenstand 167 umfasst.

Gegenstand 219. Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 213 bis 218, wobei das Verfahren eine moderate und schwere COVID-19-Erkrankung bei mindestens 80%, 85%, 90% oder 95% der behandelten Individuen verhindert.

Gegenstand 220. Verfahren gemäß Gegenstand 219, wobei das Verfahren eine moderate und schwere COVID-19-Erkrankung bei mindestens 80%, 85%, 90% oder 95% der behandelten Individuen von etwa 2 Wochen bis etwa 1 Jahr nach Verabreichung der zweiten oder nachfolgenden Zusammensetzung verhindert.

Gegenstand 221. Verfahren gemäß Gegenstand 219, wobei das Verfahren eine moderate und schwere COVID-19-Erkrankung bei mindestens 80%, 85%, 90% oder 95% der behandelten Individuen von etwa 2 Wochen bis etwa 3 Monate, 6 Monate, 9 Monate, 1 Jahr, 1,5 Jahre, 2 Jahre oder 3 Jahre nach Verabreichung der zweiten oder nachfolgenden Zusammensetzung verhindert.

Gegenstand 222. Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 193-221, welches ferner als ein Verfahren zur Stimulierung eines Antikörpers, einer $CD4^+$-T-Zell-Antwort oder einer $CD8^+$-T-Zell-Antwort in dem Individuum definiert ist.

Gegenstand 223. Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 193-221, welches ferner als ein Verfahren zur Stimulierung einer neutralisierenden Antikörperantwort in dem Individuum definiert ist.

Gegenstand 224. Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 193-221, wobei das Verfahren eine Antikörperantwort stimuliert, die zwischen etwa 10 und etwa 500 Coronavirus-Spike-Protein-bindende Antikörper für jeden Coronavirus-neutralisierenden Antikörper in dem Individuum produziert.

Gegenstand 225. Verfahren gemäß Gegenstand 224, wobei das Verfahren eine Antikörperantwort stimuliert, die nicht mehr als etwa 200 Spike-Protein-bindende Antikörper für jeden Coronavirus-neutralisierenden Antikörper produziert.

Gegenstand 226. Verfahren gemäß Gegenstand 224, wobei das Verfahren eine Antikörperantwort stimuliert, die zwischen etwa 10 und etwa 300; etwa 20 und etwa 300; etwa 20 und etwa 200; oder etwa 30 und etwa 100 Coronavirus-Spike-Protein-bindende Antikörper für jeden Coronavirus-neutralisierenden Antikörper produziert.

Gegenstand 227. Verfahren gemäß Gegenstand 226, wobei das Verfahren eine Antikörperantwort stimuliert, die zwischen etwa 30 und etwa 80 Coronavirus-Spike-Protein-bindende Antikörper für jeden Coronavirus-neutralisierenden Antikörper produziert.

Gegenstand 228. Verfahren gemäß Gegenstand 223, wobei das Verfahren eine Antikörperantwort stimuliert, die zwischen etwa 1 und etwa 500 Coronavirus-Spike-Protein-Rezeptorbindungsdomänen (RBD)-bindende Antikörper für jeden Coronavirus-neutralisierenden Antikörper in dem Individuum produziert.

Gegenstand 229. Verfahren gemäß Gegenstand 228, wobei das Verfahren eine Antikörperantwort stimuliert, die nicht mehr als etwa 50 Spike-Protein-RBD-bindende Antikörper für jeden Coronavirus-neutralisierenden Antikörper produziert.

Gegenstand 230. Verfahren gemäß Gegenstand 228, wobei das Verfahren eine Antikörperantwort stimuliert, die zwischen etwa 1 und etwa 200; etwa 2 und etwa 100; etwa 3 und etwa 200; etwa 5 und etwa 100; oder etwa 5 und etwa 50 Spike-Protein-RBD-bindende Antikörper für jeden Coronavirus-neutralisierenden Antikörper produziert.

Gegenstand 231. Verfahren gemäß Gegenstand 230, wobei das Verfahren eine Antikörperantwort stimuliert, die zwischen etwa 5 und etwa 20 Coronavirus-Spike-Protein-RBD-bindende Antikörper für jeden Coronavirus-neutralisierenden Antikörper produziert.

Gegenstand 232. Verfahren gemäß Gegenstand 222, wobei das Individuum zuvor mit SARS-CoV-2 infiziert war.

Gegenstand 233. Verfahren gemäß Gegenstand 222, welches ferner als ein Verfahren zur Stimulierung einer protektiven Immunantwort in dem Individuum definiert ist.

Gegenstand 234. Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 193-233, wobei das Individuum ein menschliches Individuum ist.

Gegenstand 235. Verfahren gemäß Gegenstand 234, wobei das Individuum zwischen 6 Monate und 100 Jahre, 6 Monate und 80 Jahre, 1 Jahr und 80 Jahre, 1 Jahr und 70 Jahre, 2 Jahre und 80 Jahre oder 2 Jahre und 60 Jahre alt ist.

Gegenstand 236. Verfahren gemäß Gegenstand 234, wobei das Individuum ein Neugeborenes oder ein Kleinkind mit einem Alter von nicht mehr als 3 Jahren, von nicht mehr als 2 Jahren, von nicht mehr als 1,5 Jahren, von nicht mehr als 1 Jahr (12 Monaten), von nicht mehr als 9 Monaten, 6 Monaten oder 3 Monaten ist oder zwischen 6 Monate und 2 Jahre alt ist.

Gegenstand 237. Verfahren gemäß Gegenstand 234, wobei das Individuum ein älteres Individuum mit einem Alter von mindestens 50, 60, 65 oder 70 Jahren ist.

Gegenstand 238. Verfahren gemäß Gegenstand 237, wobei das Individuum ein älteres Individuum mit einem Alter von mindestens 60 Jahren ist.

Gegenstand 239. Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 234 bis 238, wobei das Individuum indianischer, afrikanischer, asiatischer oder europäischer Abstammung ist.

Gegenstand 240. Verfahren gemäß Gegenstand 238, wobei das Individuum zu mindestens etwa 10%, 25% oder 50% indianischer, afrikanischer, asiatischer oder europäischer Abstammung ist.

Gegenstand 241. Verfahren gemäß Gegenstand 238, wobei das Individuum indianischer Abstammung ist.

Gegenstand 242. Verfahren gemäß Gegenstand 238, wobei das Individuum zu mindestens etwa 10%, 25% oder 50% indianischer Abstammung ist.

Gegenstand 243. Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 193 bis 242, wobei das Verfahren im Wesentlichen keinen Anstieg von Th2-Zytokinen, vorzugsweise IL-4, IL-13, TNF und/oder IL-1β, in dem Individuum induziert.

Gegenstand 244. Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 193-242, welches ferner als ein Verfahren zur Induktion einer Th1-gerichteten Immunantwort in dem Individuum definiert ist.

Gegenstand 245. Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 193-244, wobei das Individuum eine Antikoagulationstherapie erhält.

Gegenstand 246. Verfahren gemäß einem der Gegenstände 193-245, wobei die Zusammensetzung durch intramuskuläre Injektion verabreicht wird.

Gegenstand 247. Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 193-246, wobei die Zusammensetzung eine mRNA umfasst, die für ein Coronavirus-Spike-Protein (S) kodiert, das ein präfusionsstabilisiertes Spike-Protein (S_stab) ist, das mindestens eine präfusionsstabilisierende Mutation umfasst.

Gegenstand 248. Verfahren gemäß Gegenstand 247, wobei die mRNA für ein Coronavirus-Spike-Protein kodiert, das zu mindestens 95% identisch mit SEQ ID NO: 163 ist.

Gegenstand 249. Verfahren gemäß Gegenstand 248, wobei die mRNA für ein Coronavirus-Spike-Protein kodiert, das mit SEQ ID NO: 163 identisch ist.

Gegenstand 250. Verfahren gemäß Gegenstand 247, wobei die mRNA für ein Coronavirus-Spike-Protein kodiert, das zu mindestens 95% mit SEQ ID NO: 149 identisch ist.

Gegenstand 251. Verfahren gemäß Gegenstand 248, wobei die mRNA für ein Coronavirus-Spike-Protein kodiert, das mit SEQ ID NO: 149 identisch ist.

Gegenstand 252. Verfahren gemäß Gegenstand 250 oder 251, wobei eine Einzeldosis der Zusammensetzung eine ausreichende Immunantwort liefert, um das Individuum für mindestens etwa 6 Monate vor einer schweren COVID-19-Erkrankung zu schützen.

Gegenstand 253. Verfahren gemäß Gegenstand 252, wobei eine Einzeldosis der Zusammensetzung eine ausreichende Immunantwort liefert, um das Individuum für etwa 6 Monate bis etwa 1 Jahr, 1,5 Jahre, 2 Jahre, 2,5 Jahre, 3 Jahre, 4 Jahre oder 5 Jahre vor einer schweren COVID-19-Erkrankung zu schützen.

Gegenstand 254. Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 247-249, wobei die mRNA mit einem oder mehreren Lipid(en) komplexiert ist und dadurch LNP bildet.

Gegenstand 255. Verfahren gemäß Gegenstand 254, wobei das LNP umfasst:

(i) mindestens ein kationisches Lipid;

(ii) mindestens ein neutrales Lipid;

(iii) mindestens ein Steroid oder Steroidanalogon; und

(iv) mindestens ein PEG-Lipid,

wobei (i) bis (iv) in einem Molverhältnis von etwa 20-60% kationischem Lipid, 5-25% neutralem Lipid, 25-55% Sterol und 0,5-15% PEG-Lipid vorliegen.

Gegenstand 256. Verfahren gemäß Gegenstand 255, wobei das LNP umfasst:

(i) mindestens ein kationisches Lipid gemäß Formel III-3;

(ii) DSPC;

(iii) Cholesterol; und

(iv) ein PEG-Lipid gemäß Formel IVa,

wobei (i) bis (iv) in einem Molverhältnis von etwa 20-60% kationischem Lipid, 5-25% neutralem Lipid, 25-55% Sterol und 0,5-15% PEG-Lipid vorliegen.

Gegenstand 257. Verfahren gemäß Gegenstand 256, wobei das LNP umfasst:

(i) mindestens ein kationisches Lipid gemäß Formel III-3;

(ii) DSPC;

(iii) Cholesterol; und

(iv) ein PEG-Lipid gemäß Formel IVa,

wobei (i) bis (iv) in einem Molverhältnis von etwa 47,5:10:40,8:1,7 vorliegen.

Gegenstand 258. Verfahren gemäß Gegenstand 256, wobei das LNP umfasst:

(i) mindestens ein kationisches Lipid gemäß Formel III-3;

(ii) DSPC;

(iii) Cholesterol; und

(iv) ein PEG-Lipid gemäß Formel IVa,

wobei (i) bis (iv) in einem Molverhältnis von 47,4:10:40,9:1,7 vorliegen.

Gegenstand 259. Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 254-258, wobei das Verhältnis von mRNA zu Gesamtlipid etwa 0,03-0,04 Gew./Gew. beträgt.

Gegenstand 260. Verfahren gemäß Gegenstand 249, wobei die mRNA mit einem oder mehreren Lipiden komplexiert ist, wodurch Lipid-Nanopartikel (LNP) gebildet werden, wobei das LNP umfasst:

(i) mindestens ein kationisches Lipid gemäß Formel III-3;

(ii) DSPC;

(iii) Cholesterol; und

(iv) ein PEG-Lipid gemäß Formel IVa,

wobei (i) bis (iv) in einem Molverhältnis von etwa 47,5:10:40,8:1,7 vorliegen, und
wobei das Verhältnis von mRNA zu Gesamtlipid etwa 0,03-0,04 Gew./Gew. beträgt.

Gegenstand 261. Verfahren gemäß Gegenstand 249, wobei die mRNA mit einem oder mehreren Lipiden komplexiert ist, wodurch Lipid-Nanopartikel (LNP) gebildet werden, wobei das LNP umfasst:

(i) mindestens ein kationisches Lipid gemäß Formel III-3;

(ii) DSPC;

(iii) Cholesterol; und

(iv) ein PEG-Lipid gemäß Formel IVa,

wobei (i) bis (iv) in einem Molverhältnis von 47,4:10:40,9:1,7 vorliegen, und
wobei das Verhältnis von mRNA zu Gesamtlipid etwa 0,03-0,04 Gew./Gew. beträgt.

Gegenstand 262. Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 247-261, wobei dem Individuum eine Zusammensetzung verabreicht wird, die zwischen etwa 2 µg und etwa 50 µg mRNA umfasst.

Gegenstand 263. Verfahren gemäß Gegenstand 262, wobei dem Individuum eine Zusammensetzung verabreicht wird, die zwischen etwa 10 µg und etwa 50 µg mRNA umfasst.

Gegenstand 264. Verfahren gemäß Gegenstand 263, wobei dem Individuum eine Zusammensetzung verabreicht wird, die zwischen etwa 10 µg und etwa 30 µg mRNA umfasst.

Gegenstand 265. Verfahren gemäß Gegenstand 264, wobei dem Individuum eine Zusammensetzung verabreicht wird, die etwa 12 µg mRNA umfasst.

Gegenstand 266. Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 264 bis 265, wobei die Verabreichung bei 100% der Individuen, denen die Zusammensetzung verabreicht wird, eine Serokonversion bewirkt.

Gegenstand 267. Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 193 bis 266, wobei das menschliche Individuum 61 Jahre alt oder älter ist.

Gegenstand 268. Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 193 bis 266, wobei das menschliche Individuum 18 bis 60 Jahre alt ist.

Gegenstand 269. Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 193 bis 268, wobei das menschliche Individuum eine vorherige Impfstoffallergie hatte.

Gegenstand 270. Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 193 bis 269, wobei das Individuum nachweisbare Anti-PEG-Antikörper hat.

Gegenstand 271. Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 193 bis 270, umfassend:

(i) Gewinnen einer Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 74 bis 162, wobei die Zusammensetzung lyophilisiert ist;

(ii) Solubilisieren der lyophilisierten Zusammensetzung in einem pharmazeutisch akzeptablen flüssigen Träger, um eine flüssige Zusammensetzung herzustellen; und

(iii) Verabreichen einer effektiven Menge der flüssigen Zusammensetzung an das Individuum.

Gegenstand 272. Verfahren zur Stabilisierung einer Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Gegenstände 74 bis 162, umfassend die Lyophilisierung der Zusammensetzung zur Herstellung einer stabilisierten Zusammensetzung.

Gegenstand 273. Verfahren gemäß Gegenstand 272, wobei die stabilisierte Zusammensetzung einen Wassergehalt von weniger als etwa 10% aufweist.

Gegenstand 274. Verfahren gemäß Gegenstand 273, wobei die stabilisierte Zusammensetzung einen Wassergehalt zwischen etwa 0,5% und 5,0% aufweist.

Gegenstand 275. Stabilisierte, lyophilisierte Zusammensetzung, hergestellt durch ein Verfahren gemäß irgendeinem der Gegenstände 272-274.

Kurze Beschreibung der Listen und Tabellen

Liste A:	Beispielhafte SARS-CoV-2-Coronavirus-Isolate
Liste B:	GenBank-Zugangsnummern der verschiedenen SARS-CoV-2-Isolate
Liste 1:	Beispielhafte geeignete Proteindesigns der Erfindung
Tabelle A:	Intensitätseinstufung für lokale unerwünschte Ereignisse
Tabelle B:	Intensitätseinstufung für systemische unerwünschte Ereignisse
Tabelle 1:	Bevorzugte Coronavirus-Konstrukte (Aminosäuresequenzen und kodierende Nukleinsäuresequenzen)
Tabelle 2:	Tabelle der humanen Codonverwendung mit Angabe der Häufigkeiten für jede Aminosäure
Tabelle 3a:	Nukleinsäure-Konstrukte, vorzugsweise mRNA-Konstrukte, die für eine Coronavirus-Vakzine geeignet sind
Tabelle 3b:	Nukleinsäure-KOnstrukte, vorzugsweise mRNA-Konstrukte, die für eine Coronavirus-Vakzine geeignet sind
Tabelle 4:	RNA-Konstrukte, die für verschiedene SARS-CoV-2 S-Antigen-Designs kodieren (in den Beispielen verwendet)
Tabelle A:	Zusammensetzung mit lipidbasiertem Träger der Beispiele
Tabelle 5:	Übersicht über die in Beispiel 2a verwendeten mRNA-Konstrukte
Tabelle 6:	Übersicht über die in Beispiel 2b verwendeten mRNA-Konstrukte
Tabelle 7:	Übersicht über die in Beispiel 2c verwendeten mRNA-Konstrukte
Tabelle 8:	Vakzinierungsschema (Beispiel 3)
Tabelle 9:	Vakzinierungsschema (Beispiel 4)
Tabelle 10:	Vakzinierungsschema (Beispiel 5)
Tabelle 11:	Vakzinierungsschema (Beispiel 6)
Tabelle 12:	Vakzinierungsschema (Beispiel 7)

Tabelle 13: Vakzinierungsschema (Beispiel 8)

Tabelle 14: Vakzinierungsschema (Beispiel 9)

Tabelle 15: Liste der in **Fig. 12F** angegebenen histopathologischen Analysen

Tabelle 16: Vakzinierungsschema (Beispiel 11)

Tabelle 17: Vakzinierungsschema (Beispiel 12)

Tabelle 18: Primäre und unterstützende Populationen für die Analyse der einzelnen Endpunkte

Tabelle 19: Zweistufiges gruppensequentielles Design mit Interimanalysen bei 56 und 111 Fällen und Endanalyse bei 185 Fällen

Tabelle 20: Vakzinierungsschema (Beispiel 14)

Tabelle 21: Vakzinierungsschema (Beispiel 15)

Tabelle 22: Vakzinierungsschema (Beispiel 16)

Tabelle 23: Vakzinierungsschema (Beispiel 17)

Tabelle 24: Vakzinierungsschema (Beispiel 18)

Tabelle 25: Liste der neu auftretenden SARS-CoV-2-Isolate/Varianten (Beispiel 19)

Figurenliste

Fig. 1 zeigt, dass mRNA-Konstrukte, die für verschiedene SARS-CoV-2 S-Protein-Designs kodieren, zu einer nachweisbaren Proteinexpression unter Verwendung eines In-vitro-Translationssystems führten. Weitere Details sind in Beispiel 2a und Tabelle 5 dargestellt.

Fig. 2 zeigt, dass mRNA-Konstrukte, die für unterschiedliche SARS-CoV-2-S-Protein-Designs kodieren, auf der Zelloberfläche von Säugetierzellen exprimiert werden, wobei eine FACS-Analyse durchgeführt wurde. Weitere Details sind in Beispiel 2b und Tabelle 6 dargestellt.

Fig. 3 zeigt, dass mRNA-Konstrukte, die für verschiedene SARS-CoV-2-S-Proteine kodieren, in Säugetierzellen exprimiert werden, wobei eine Western-Blot-Analyse durchgeführt wurde. Weitere Einzelheiten sind in Beispiel 2c und Tabelle 7 dargestellt.

Fig. 4 zeigt signifikante IgG1- und IgG2a-Antworten für die Gruppe, die mit der mRNA-Vakzine, der für das stabilisierte Volllängen-S-Protein kodiert, vakziniert wurde. **Fig. 4** zeigt eine vergleichbare IgG1-Antwort für die mRNA-Vakzine und das rekombinante SARS-CoV-S-Protein und höhere IgG2a-Titer für die mRNA-Vakzine im Vergleich zum rekombinanten SARS-CoV-S-Protein. Die IgG1 - und IgG2a-Antikörper-Titer wurden mittels ELISA unter Verwendung des rekombinanten SARS-CoV-2-S-Proteins als Beschichtungsreagenz bestimmt. Das Experiment wurde wie in Beispiel 5 beschrieben durchgeführt. Weitere Details zum Konstrukt sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Fig. 5 zeigt signifikante IgG1 - und IgG2a-Antworten für die Gruppe, die mit der mRNA-Vakzine vakziniert wurde, die für das stabilisierte Volllängen-S-Protein und das Volllängen-Wildtyp-S-Protein kodiert. **Fig. 5 A** zeigt eine vergleichbare IgG1-Antwort für beide Volllängen-S-Protein-Designs, und **Fig. 5 B** zeigt vergleichbare IgG2a-Titer für beide Volllängen-S-Protein-Designs. **Fig. 5 C** zeigt hohe und vergleichbare Virus-neutralisierende Titer für beide Volllängen-S-Protein-Designs an Tag 42. Die Experimente wurden wie in Beispiel 6 beschrieben durchgeführt. Weitere Details des Konstrukts sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Fig. 6 zeigt, dass LNP-formulierte mRNA, die für stabilisiertes Volllängen-S-Protein und für Vollängen-S-Protein kodiert, zelluläre Immunantworten in Mäusen ($CD8^+$- und/oder $CD4^+$-T-Zellantworten) induziert, unter Verwendung eines intrazellulären Zytokin-Färbeassays. Gruppen A-C: LNP-formulierte mRNA, die für verschiedene Volllängen-S-Protein-Designs kodiert; Gruppe D: Negativkontrolle. Vakzinierungsschema siehe Tabelle 11. Weitere Details sind in Beispiel 6 dargestellt.

Fig. 7 zeigt die angeborene Immunantwort nach Vakzinierung mit LNP-formulierter mRNA, die für Volllängen-S-Protein (S_stab) kodiert (Gruppe A). Die gestrichelten Linien zeigen die untere Nachweisgrenze an. Das Experiment wurde wie in Beispiel 7 beschrieben durchgeführt. Weitere Details des Konstrukts sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Fig. 8A zeigt signifikante IgG1- und IgG2a-Antworten für Gruppen, die mit der mRNA-Vakzine vakziniert wurden, die für das stabilisierte Volllängen-S-Protein kodiert. **Fig. 8A** zeigt hohe IgG1-Antworten und

hohe IgG2a-Antworten nach der ersten Vakzinierung. Gruppen A-D: eine Vakzinierung mit LNP-formulierter mRNA, die für das Volllängen-S-Protein kodiert (S_stab); Gruppe I: adjuvantiertes rekombinantes Spike-Protein, Gruppe J: Negativkontrolle. Die Experimente wurden wie in Beispiel 7 beschrieben durchgeführt. Weitere Details des Konstrukts sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Fig. 8B zeigt signifikante IgG1- und IgG2a-Antworten für alle Gruppen, die mit der mRNA-Vakzine vakziniert wurden, die für das stabilisierte Volllängen-S-Protein (s_stab) kodiert. **Fig. 8B (A)** zeigt die IgG1-Antwort an Tag 28 (nach der ersten Vakzinierung) und an Tag 35 (nach der zweiten Vakzinierung), und **Fig. 8B (B)** zeigt die IgG2a-Antwort an Tag 28 (nach der ersten Vakzinierung) und an Tag 35 (nach der zweiten Vakzinierung). Gruppen A-H: LNP-formulierte Volllängen-S-Protein-mRNA mit unterschiedlichen Vakzinierungsintervallen; Gruppe I: adjuvantiertes rekombinantes Spike-Protein, Gruppe J: Negativkontrolle. Die Experimente wurden wie in Beispiel 7 beschrieben durchgeführt. Weitere Details des Konstrukts sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Fig. 9 zeigt eine signifikante Induktion von Virus-neutralisierenden Titern (VNT) für alle Gruppen, die mit der mRNA-Vakzine vakziniert wurden, die für das stabilisierte Volllängen-S-Protein (S_stab) kodiert. **Fig. 9A** zeigt VNT an Tag 28 (nach der ersten Vakzinierung) und an Tag 35 und an Tag 49 (**Fig. 9B**) (nach der zweiten Vakzinierung), Gruppen A-H: LNP-formulierte Volllängen-S-Protein-mRNA mit unterschiedlichen Vakzinierungsintervallen; Gruppe I: adjuvantiertes rekombinantes Spike-Protein, Gruppe J: Negativkontrolle. Die Experimente wurden wie in Beispiel 7 beschrieben durchgeführt. Weitere Details des Konstrukts sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Fig. 10 zeigt, dass LNP-formulierte mRNA, die für stabilisiertes Volllängen-S-Protein (S_stab) kodiert, zelluläre Immunantworten in Mäusen ($CD8^+$- und/oder $CD4^+$-T-Zell-Antworten) nach einer zweiten Vakzinierung mit unterschiedlichen Zeitintervallen zwischen Prime- und Boost-Vakzinierung induziert, wobei ein intrazellulärer Zytokin-Färbeassay verwendet wurde. Gruppen A-H: LNP-formulierte Volllängen-S-Protein-mRNA mit unterschiedlichen Impfintervallen; Gruppe I: adjuvantiertes rekombinantes Spike-Protein, Gruppe J: Negativkontrolle. Die Experimente wurden wie in Beispiel 7 beschrieben durchgeführt. Weitere Details des Konstrukts sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Fig. 11 zeigt signifikante Antikörperantworten bei Ratten für Gruppen, die mit verschiedenen Dosen der mRNA-Vakzine vakziniert wurden, die für das stabilisierte Volllängen-S-Protein (S_stab) kodiert. **Fig. 11 A** zeigt hohe IgG1-Antworten für die Gruppen C-F, **Fig. 11 B** zeigt hohe IgG2a-Antworten für die Gruppen D-F, und **Fig. 11 C** zeigt hohe Gesamt-IgG-Antworten für die Gruppen C-E. Gruppen B-F: verschiedene Dosen LNP-formulierter Volllängen-S-Protein-mRNA, Gruppe A: Negativkontrolle. **Fig. 11 D** zeigt weiter erhöhte IgG1-Antikörperantworten, und **Fig. 11 E** zeigt weiter erhöhte IgG2a-Antikörper-Titer für alle Gruppen nach der zweiten Vakzinierung an Tag 42. **Fig. 11 F** und G zeigen, dass die Vakzinierung mit der in LNPs formulierten stabilisierten Volllängen-S-Protein-mRNA bei Ratten dosisabhängig VNTs induzierte. Die Experimente wurden wie in Beispiel 8 beschrieben durchgeführt. Weitere Details des Konstrukts sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Fig. 12 zeigt den Schutz von Hamstern vor einer SARS-CoV-2-Challenge, die mit verschiedenen erfindungsgemäßen mRNA-Vakzinen vakziniert wurden, die für das stabilisierte Volllängen-S-Protein (S_stab) kodieren. **Fig. 12 A** zeigt die Induktion von hohen Gesamt-IgG-Antikörpern für die vakzinierten Gruppen E und F, und **Fig. 12 B** zeigt die dosisabhängige Induktion von VNTs nach einer (Tag 28) oder zwei Vakzinierungen (Tag 42 und Tag 56). Die **Fig. 12 C-E** zeigen nachweisbare Mengen replikationskompetenter Viren in Rachenabstrichen an den Tagen 56 bis 60 (**Fig. 12 C**), in der Nasenmuschel an Tag 60 (**Fig. 12 D**) und im Lungengewebe an Tag 60 (**Fig. 12 F**). Jeder Punkt repräsentiert ein einzelnes Tier, die Balken stellen den Median dar. Die statistische Analyse wurde mittels Mann-Whitney-Test durchgeführt. **Fig. 12 F** zeigt den Schutz des Respirationstraktes von vakzinierten Hamstern vor einer Challenge-Infektion bei Abwesenheit von Anzeichen einer durch die Vakzine verstärkten Erkrankung. Die histopathologische Analyse wurde am Tag 60, vier Tage nach der Challenge-Infektion, an formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten durchgeführt. Die histopathologische Beurteilung und Einstufung wurde nach dem Schweregrad der untersuchten Parameter durchgeführt. Jeder Punkt repräsentiert ein einzelnes Tier, die Balken stellen den Median dar. Die statistische Analyse wurde mittels Mann-Whitney-Test durchgeführt. Die Experimente wurden wie in Beispiel 9 beschrieben durchgeführt. Weitere Details sind in Tabelle 14 und Tabelle 15 aufgeführt.

Fig. 13 zeigt die Ergebnisse einer klinischen Studie der Phase I an gesunden menschlichen Individuen. In **Fig. 13 A** sind systemische unerwünschte Ereignisse in den verschiedenen Dosiskohorten nach der ersten Dosis und nach der zweiten Dosis dargestellt. In **Fig. 13 B** sind die lokalen unerwünschten Ereignisse in den verschiedenen Dosis-Kohorten nach der ersten Dosis und nach der zweiten Dosis dargestellt. In **Fig. 13 C** sind die spezifischen systemischen unerwünschten Ereignisse, wie zum Beispiel

Müdigkeit, Kopfschmerzen, Myalgie, Schüttelfrost, Arthralgie, Fieber, Übelkeit und Diarrhö, dargestellt. In **Fig. 13 D** sind die spezifischen lokalen unerwünschten Ereignisse, wie zum Beispiel Schmerzen, Juckreiz, Schwellung und Rötung, dargestellt. In **Fig. 13 E** ist die Induktion von Spike-Protein-spezifischen IgG-Antikörpern an Tag 1, 29, 36, 43 und 57 für die verschiedenen Dosis-Kohorten dargestellt. In der Tabelle von **Fig. 13 E** ist der Prozentsatz der Serokonversion der vakzinierten Individuen dargestellt. In **Fig. 13 F** ist die Induktion von RBD-spezifischen IgG-Antikörpern an den Tagen 1, 36 und 43 für die verschiedenen Dosis-Kohorten dargestellt. In der Tabelle von **Fig. 13 F** ist der Prozentsatz der Serokonversion der vakzinierten Individuen dargestellt. In **Fig. 13 G** ist die Induktion von Virus-neutralisierenden Antikörpern dargestellt. In der Tabelle von **Fig. 13 G** ist die prozentuale Serokonversion der vakzinierten Individuen dargestellt. In **Fig. 13 H** sind die Verhältnisse der Menge an Spike-Protein- oder RBD-bindenden Antikörpern zur Menge der neutralisierenden Antikörper dargestellt. **Fig. 13 I** zeigt die Induktion von $CD4^+$-T-Zellen gegen Spike-Protein S1 nach der ersten Dosis (Tag 29) und nach der zweiten Dosis (Tag 36). **Fig. 13 J** zeigt die Induktion von $CD4^+$-T-Zellen gegen Spike-Protein S2 nach der ersten Dosis (Tag 29) und der zweiten Dosis (Tag 36). In **Fig. 13 K** ist die Induktion Virus-neutralisierender Titer und RBDspezifischer Antikörper bei SARS-CoV-2 seropositiven Individuen nach Vakzinierung mit 2 µg und 4 µg CvnCoV dargestellt.

Fig. 14 zeigt signifikante IgG1- und IgG2a-Antworten nach der Vakzinierung mit mRNA, die für das stabilisierte Volllängen-S-Protein (S_stab) kodiert, nach einer einzigen Vakzinierung (d 21) und erhöht nach einer zweiten Vakzinierung (d42) (**Fig. 14 A**). Die Vakzinzusammensetzung, die SARS-CoV-2 S_stab kodierende mRNA umfassend hSL-A100 und die UTR-Kombination a-1 (HSD17B4/PSMB3) umfasst (Gruppe C), zeigt eine verbesserte und stärkere Induktion von bindenden Antikörpern (gezeigt durch IgG1- und IgG2a-Endpunkttiter). Die Induktion von VNT ist in **Fig. 14 B** dargestellt. Mäuse der Gruppe C zeigten bereits an Tag 21 nach der ersten Vakzinierung ein frühes erhöhtes Niveau an VNTs im Vergleich zu Gruppe B. Die Induktion der T-Zell-Immunität ist in **Fig. 14 C** dargestellt. Die Vakzinzusammensetzung, die SARS-CoV-2 S_stab kodierende mRNA, umfassend hSL-A100 und die UTR-Kombination a-1 (HSD1 7B4/PSMB3), umfasst (Gruppe C), zeigt überraschenderweise eine deutlich stärkere Induktion von $CD8^+$-IFNγ/TNF doppelt positiven T-Zellen.

Fig. 15 zeigt signifikante Antikörperantworten bei Ratten für Gruppen, die mit verschiedenen Dosen der mRNA-Vakzine vakziniert wurden, die für das stabilisierte Volllängen-S-Protein (S_stab) kodiert, umfassend die alternative nicht-kodierende Region mit dem 3'-Ende hSL-A100 und die UTR-Kombination a-1 (HSD17B4/PSMB3), formuliert in LNPs. **Fig. 15 A** zeigt eine robuste Induktion von bindenden IgG1- und IgG2a-Antikörpern, und **Fig. 15 B** zeigt die Induktion von VNTs in einer dosisabhängigen Weise. Die Experimente wurden wie in Beispiel 12 beschrieben durchgeführt. Weitere Details zum Konstrukt sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Fig. 16 zeigt signifikante Antikörperantworten bei Ratten für Gruppen, die mit verschiedenen Dosen der mRNA-Vakzine vakziniert wurden, die für das stabilisierte Volllängen-S-Protein (S_stab) kodiert, umfassend verschiedene nicht-kodierende Regionen, formuliert in LNPs. **Fig. 16 A** zeigt eine robuste und dosisabhängige Induktion von bindenden IgG1- und IgG2a-Antikörpern, und **Fig. 16 B** zeigt die frühe Induktion von VNTs nach nur einer Impfdosis in einer dosisabhängigen Weise für die mRNA-Vakzine, die für das stabilisierte Volllängen-S-Protein (S_stab) kodiert, umfassend die nicht-kodierende Region mit dem 3'-Ende hSL-A100 und die UTR-Kombination a-1 (HSD17B4/PSMB3), formuliert in LNPs. **Fig. 16 C** zeigt die Induktion von VNTs nach zwei Impfdosen an Tag 42. Die Experimente wurden wie in Beispiel 14 beschrieben durchgeführt. Weitere Details des Konstrukts sind in Tabelle 20 aufgeführt.

Fig. 17 zeigt, dass CVnCoV (mRNA-Vakzine, die für das stabilisierte Volllängen-S-Protein (S_stab) kodiert, formuliert in LNPs) eine humorale Antwort in nicht-humanen Primaten induziert. (**Fig. 17 A**) Schematische Darstellung des Studienaufbaus. Rhesusmakaken (n=6; 3 Männchen, 3 Weibchen/-Gruppe) wurden an Tag 0 und Tag 28 mit 0,5 µg oder 8 µg CVnCoV intramuskulär vakziniert oder blieben nicht vakziniert. Alle Tiere wurden an Tag 56 mit $5{,}0 \times 10^6$ PFU von SARS-CoV-2 herausgefordert. Jeweils zwei Tiere jeder Gruppe wurden an Tag 62, Tag 63 und Tag 64 terminiert. (**Fig. 17 B**) Trimeres Spike-Protein oder (**Fig. 17 C**) RBDspezifisch bindende IgG-Antikörper, dargestellt als Endpunkttiter zu verschiedenen Zeitpunkten, wie angegeben (C) Virus-neutralisierende Antikörper, bestimmt mittels Fokusreduktionsneutralisationstest zu verschiedenen Zeitpunkten, wie angegeben. Alle Werte sind als Median mit Bereich dargestellt. Die gestrichelten Linien stellen die Vakzinierungen bzw. die Challenge-Infektion dar. RBD Rezeptorbindungsdomäne; VNT Virus-neutralisierender Titer. Das Experiment wurde wie in Beispiel 15 beschrieben durchgeführt. Weitere Details des Konstrukts sind in Tabelle 21 aufgeführt.

Fig. 18 zeigt, dass CVnCoV (mRNA-Vakzine, die für das stabilisierte Volllängen-S-Protein (S_stab) kodiert, formuliert in LNPs) zelluläre Antworten in nicht-humanen Primaten induziert. PBMCs von mit 0,5

µg oder 8 µg CVnCoV vakzinierten oder von unbehandelten Tieren, die zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert wurden, wurden ex vivo mit S-spezifischen Peptidpools restimuliert, gefolgt von einer IFNγ-ELISpot-Analyse. (**Fig. 18 A**) IFNγ-ELISpot vor der Challenge-Infektion an Tag 56. Feld 1 stellt die Ergebnisse der Stimulation mit einem einzigen Peptidpool dar, der das gesamte S-Protein abdeckt, die Felder 2-4 zeigen die Stimulationsergebnisse von zehn individuellen Pools, die das gesamte S-Protein in jeder Gruppe abdecken. (**Fig. 18 B**) IFNγ-ELISpot bis zur Terminierung an Tag 62 bis Tag 64. Feld 1 stellt die Ergebnisse der Stimulation mit drei Megapools dar und zeigt die vermummte Antwort, die das gesamte S-Protein abdeckt; die Felder 2-4 zeigen die Stimulationsergebnisse von zehn individuellen Pools, die das gesamte S-Protein in jeder Gruppe abdecken. SFU = Spot-bildende Einheit (spot forming unit); PP = Peptidpool. Das Experiment wurde wie in Beispiel 15 beschrieben durchgeführt. Weitere Details des Konstrukts sind in Tabelle 21 aufgeführt.

Fig. 19 zeigt, dass CVnCoV (mRNA-Vakzine, die für das stabilisierte Volllängen-S-Protein (S_stab) kodiert und in LNPs formuliert ist) nicht-humane Primaten vor einer Challenge-Infektion schützt. (**Fig. 19 A**) Nasenabstriche, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Challenge entnommen wurden, (**Fig. 19 B**) am lebenden Tier gewonnene BAL-Proben, entnommen an Tag 59 und nach Beendigung an Tag 62-64, und (**Fig. 19 C**) Lungengewebehomogenate von Tag 62-64 wurden mittels RT-qPCR auf Kopien von viraler Gesamt-RNA analysiert. (**Fig. 19 D**) Nasenabstriche, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Challenge entnommen wurden, (**Fig. 19 E**) am lebenden Tier gewonnene BAL-Proben, die an Tag 59 und bei Beendigung an Tag 62-64 entnommen wurden, und (**Fig. 19 F**) Lungengewebehomogenate von Tag 62-64 wurden mittels RT-qPCR auf Kopien subgenomischer viraler RNA analysiert. Die Werte sind als Mediane mit Bereich dargestellt. Die unteren und oberen gestrichelten Linien stellen die LLOD bzw. LLOQ dar. Für den Vergleich der Gruppen wurde die Kruskall-Wallis-ANOVA mit anschließendem Dunn-Test verwendet, und die P-Werte sind angegeben. LLOD untere Nachweisgrenze, LLOQ untere Quantifizierungsgrenze, RT-qPCR quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion. Das Experiment wurde wie in Beispiel 15 beschrieben durchgeführt. Weitere Details zum Konstrukt sind in Tabelle 21 aufgeführt.

Fig. 20 zeigt, dass CVnCoV (mRNA-Vakzine, kodierend für das stabilisierte Volllängen-S-Protein (S_stab) und formuliert in LNPs) nicht-humane Primaten vor einer Challenge-Infektion schützt. (**Fig. 20 A**) Rachenabstriche, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Konfrontation entnommen wurden, wurden mittels RT-qPCR auf Kopien der viralen Gesamt-RNA analysiert. (**Fig. 20 B**) Rachenabstriche, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Konfrontation entnommen wurden, wurden mittels RT-qPCR auf Kopien der subgenomischen RNA analysiert. Homogenisiertes Gewebe gewonnen aus (**Fig. 20 C**) den Tonsillen, (**Fig. 20 D**) der Luftröhre, (**Fig. 20 E**) der Milz, (**Fig. 20 F**) dem Zwölffingerdarm (G) dem Dickdarm (H) der Leber (I) der Niere wurde mittels RT-qPCR auf Kopien der viralen Gesamt-RNA untersucht (RT-qPCR Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion, sg subgenomisch). Das Experiment wurde wie in Beispiel 15 beschrieben durchgeführt. Weitere Details zum Konstrukt sind in Tabelle 21 aufgeführt.

Fig. 21 Exemplarische Schnitte, welche die Histopathologie (H&E) und SARS-CoV-2 in situ Hybridisierung (ISH) zeigen. **Fig. 21 A**: Alveolarnekrose und inflammatorischee Exsudate (*) in den Alveolarräumen und Typ-II-Pneumozytenhyperplasie (Pfeile). **Fig. 21 B**: Milde perivaskuläre Entzündung (Pfeil). **Fig. 21 C**: Infiltration inflammatorischer Zellen in die Alveolarräume und die interalveolären Septen (*) und Typ-II-Pneumozytenhyperplasie (Pfeile). **Fig. 21 D**: SARS-CoV-2 ISH-Färbung in den reichlich vorhandenen Zellen innerhalb der inflammatorischen Foki (Pfeile). **Fig. 21 E**: SARS-CoV-2 ISH-Färbung in einer einzelnen Zelle innerhalb eines Interalveolarseptums (Pfeil). **Fig. 21 F**: Reichlich vorhandene Foki von SARS-CoV-2 ISH-gefärbten Zellen innerhalb der Alveolarauskleidung und der interalveolären Septen (Pfeile) (Balken = 100µm. ISH in situ Hybridisierungen). Das Experiment wurde wie in Beispiel 15 beschrieben durchgeführt. Weitere Details zum Konstrukt sind in Tabelle 21 aufgeführt.

Fig. 22 zeigt, dass die Vakzinierung mit 8 µg CVnCoV (mRNA-Vakzine, kodierend für das stabilisierte Volllängen-S-Protein (S_stab) und formuliert in LNPs) die Lunge vor pathologischen Veränderungen bei viraler Challenge schützt. (**Fig. 22 A**) Heatmap, welche die Scores für jeden Lungenpathologie-Parameter und den Durchschnittsscore für jedes Tier aus allen Gruppen zeigt, wie angegeben. Der Schweregrad reicht von 0 bis 4: 0=kein; 1=minimal; 2=mild; 3=moderat und 4=ausgeprägt/schwer. (**Fig. 22 B**) Grafik, die den kumulativen Score für alle Parameter der Lungenhistopathologie von jedem Tier darstellt. (**Fig. 22 C**) Vorhandensein von viraler RNA in Lungengewebeschnitten aller Tiere, ausgedrückt als Prozentsatz der ISH (RNAScope, in situ Hybridisierung) positiven Färbefläche des Lungenschnitts. (**Fig. 22 D**) Kumulativer Score der Lungenpathologie, detektiert mittels CT-Radiologie. Die Box-Whisker-Plots zeigen den Median mit Bereich an. Kruskall-Wallis ANOVA gefolgt von Dunn's-Test wurde zum Vergleich

der Gruppen verwendet, und die P-Werte sind gezeigt. Das Experiment wurde wie in Beispiel 15 beschrieben durchgeführt. Weitere Details zum Konstrukt sind in Tabelle 21 aufgeführt.

Fig. 23 zeigt die Induktion von IFNa in humanen PBMCs (**Fig. 23 A**), die mit mRNA-Vakzinzusammensetzungen stimuliert wurden. Die Induktion von VNTs nach nur einer Vakzinierung (an Tag 21) und nach zwei Vakzinierungen (an Tag 42) ist in **Fig. 23 B** und **Fig. 23 C** dargestellt. Alle mRNA-Vakzinzusammensetzungen mitmRNAs, die ein „hSL-A100“ oder „A-100“ 3'-Ende enthalten (Gruppen C-G, I-M), zeigten eine verbesserte, frühe und starke Induktion von VNTs. Bei diesen Konstrukten befindet sich die Poly (A)-Sequenz direkt am 3'-Terminus der RNA.

Fig. 24 Fig. 24 A zeigt die Induktion von VNTs nach nur einer Vakzinierung. mRNA-Vakzinzusammensetzungen mit mRNAs, die ein „hSL-A100“ oder „A-100“ 3'-Ende enthalten, zeigten eine verbesserte, frühe und starke Induktion von VNTs. Bei diesen Konstrukten befindet sich die Poly(A)-Sequenz direkt am 3'-Terminus der RNA. **Fig. 24 B** zeigt die Induktion von VNTs nach nur einer Vakzinierung (Gruppe A-E) bzw. nach zwei Vakzinierungen (Gruppe F-J) zu einem späteren Zeitpunkt an Tag 42. Die R9709 umfassende mRNA-Vakzinzusammensetzung (Gruppe B) induzierte von den Gruppen, die nur eine Vakzinierung erhielten, die deutlichsten Titer von VNTs.

Beispiele

[0727] Im Folgenden werden besondere Beispiele, die verschiedene Ausführungsformen und Aspekte der Erfindung veranschaulichen, vorgestellt. Die vorliegende Erfindung soll jedoch nicht durch die hier beschriebenen spezifischen Ausführungsformen in ihrem Umfang eingeschränkt werden. Die folgenden Präparationen und Beispiele werden gegeben, um der fachkundigen Person ein besseres Verständnis und die Ausführung der vorliegenden Erfindung zu ermöglichen. Die vorliegende Erfindung ist jedoch nicht im Umfang durch die beispielhaften Ausführungsformen beschränkt, die nur als Veranschaulichung einzelner Aspekte der Erfindung gedacht sind, und Verfahren, die funktional äquivalent sind, fallen in den Bereich der Erfindung. In der Tat werden verschiedene Modifikationen der Erfindung zusätzlich zu den hierin beschriebenen für die fachkundige Person aus der vorangehenden Beschreibung, den begleitenden Figuren und den nachfolgenden Beispielen leicht ersichtlich. Alle diese Modifikationen fallen in den Schutzbereich der anhängenden Ansprüche.

Beispiel 1: Herstellung von DNA- und RNA-Konstrukten, Zusammensetzungen und Vakzinen

[0728] Das vorliegende Beispiel stellt Verfahren zum Erhalt der erfindungsgemäßen RNA sowie Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Zusammensetzung oder Vakzine bereit.

1.1. Herstellung von DNA- und RNA-Konstrukten:

[0729] DNA-Sequenzen, die für verschiedene SARS-CoV-2-S-Protein-Designs kodieren, wurden hergestellt und für nachfolgende RNA-in-vitro-Transkriptionsreaktionen verwendet. Diese DNA-Sequenzen wurden durch Modifikation der kodierenden Wildtyp- oder Referenz-DNA-Sequenzen durch Einführung einer G/C-optimierten oder modifizierten kodierenden Sequenz (z.B. „cds optl“) zur Stabilisierung und Expressionsoptimierung hergestellt. Die Sequenzen wurden in einen von pUC abgeleiteten DNA-Vektor eingeführt, um stabilisierende 3'-UTR-Sequenzen und 5'-UTR-Sequenzen zu erhalten, die zusätzlich einen Abschnitt von Adenosinen (z.B. A64 oder A100) und optional eine Histon-Stem-Loop (hSL)-Struktur sowie optional einen Abschnitt von 30 Cytosinen (z.B. C30) umfassen (siehe Tabelle 4, für eine Übersicht der Coronavirus-Antigen-Designs siehe Liste 1 oder Tabelle 1).

[0730] Die erhaltenen Plasmid-DNA-Konstrukte wurden in Bakterien transformiert und vermehrt, wobei übliche, auf dem Gebiet bekannte Protokolle verwendet wurden. Schließlich wurden die Plasmid-DNA-Konstrukte extrahiert, gereinigt und für die anschließende RNA-in-vitro-Transkription verwendet (siehe Abschnitt 1.2.).

[0731] Alternativ können die DNA-Plasmide auch als Template für die PCR-Amplifikation verwendet werden (siehe Abschnitt 1.3.).

1.2. RNA-in-vitro-Transkription aus Plasmid-DNA-Templates:

[0732] Die gemäß Abschnitt 1.1 hergestellten DNA-Plasmide wurden enzymatisch mit einem Restriktionsenzym linearisiert und zur DNA-abhängigen RNA-in-vitro-Transkription unter Verwendung von T7-RNA-Polyme-

rase in Gegenwart eines Nukleotidgemisches (ATP/GTP/CTP/UTP) und eines Cap-Analogons (z.B. m7GpppG, m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG, m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG) oder 3'OMe-m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG) unter geeigneten Pufferbedingungen verwendet. Die erhaltenen RNA-Konstrukte wurden mittels RP-HPLC aufgereinigt (PureMessenger®, CureVac AG, Tübingen, Deutschland; WO2008/077592) und für In-vitro- und In-vivo-Experimente verwendet. DNA-Templates können auch mittels PCR erzeugt werden. Solche PCR-Templates können für die DNA-abhängige RNA-in-vitro-Transkription unter Verwendung einer RNA-Polymerase, wie hier beschrieben, verwendet werden.

[0733] Um chemisch modifizierte mRNA zu erhalten, wurde die RNA-in-vitro-Transkription in Gegenwart einer modifizierten Nukleotidmischung durchgeführt, die Pseudouridin-N(1)-Methylpseudouridin (m1Ψ) anstelle von Uracil enthielt. Die erhaltene m1Ψ chemisch modifizierte RNA wurde mittels RP-HPLC aufgereinigt (PureMessenger®, CureVac AG, Tübingen, Deutschland; WO2008/077592) und für weitere Experimente verwendet (siehe z.B. Beispiel 16 oder 17).

Erzeugung von gecappter RNA mittels enzymatischem Capping (prophetisch):

[0734] Einige RNA-Konstrukte werden in vitro in Abwesenheit eines Cap-Analogons transkribiert. Die Cap-Struktur (cap0 oder cap1) wird dann enzymatisch mit Hilfe von Capping-Enzymen, wie sie auf dem Gebiet allgemein bekannt sind, hinzugefügt. Kurz gesagt, in vitro transkribierte RNA wird mit einem Capping-Kit gekappt, um cap0-RNA zu erhalten. Cap0-RNA wird zusätzlich mit cap-spezifischer 2'-O-Methyltransferase modifiziert, um cap1-RNA zu erhalten. Cap1-RNA wird, z.B. wie oben beschrieben, gereinigt und für weitere Experimente verwendet.

[0735] Die RNA für die klinische Entwicklung wird unter Anwendung der gängigen guten Herstellungspraxis, z.B. gemäß WO2016/180430, hergestellt, wobei verschiedene Qualitätskontrollschritte auf DNA- und RNA-Ebene durchgeführt werden.

Die RNA-Konstrukte der Beispiele:

[0736] Die generierten RNA-Sequenzen/Konstrukte sind in Tabelle 4 mit dem kodierten antigenen Protein und den jeweiligen UTR-Elementen angegeben. Wenn nicht anders angegeben, wurden die RNA-Sequenzen/Konstrukte der Tabelle 4 mittels RNA-in-vitro-Transkription in Gegenwart von m7GpppG, m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG hergestellt; dementsprechend umfassen die RNA-Sequenzen/Konstrukte eine 5'-cap1-Struktur. Wenn nicht anders angegeben, wurden die RNA-Sequenzen/Konstrukte der Tabelle 4 in Abwesenheit von chemisch modifizierten Nukleotiden (z.B. Pseudouridin (Ψ) oder N(1)-Methylpseudouridin (η1Ψ)) hergestellt.

1.3. RNA-in-vitro-Transkription von PCR-amplifizierten DNA-Templates (prophetisch):

[0737] Gereinigte PCR-amplifizierte DNA-Templates, die gemäß Abschnitt 1.1 hergestellt wurden, werden in vitro unter Verwendung von DNA-abhängiger T7-RNA-Polymerase in Gegenwart eines Nukleotidgemischs (ATP/GTP/CTP/UTP) und eines Cap-Analogons (m7GpppG oder 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G)) unter geeigneten Pufferbedingungen transkribiert. Alternativ wird PCR-amplifizierte DNA in vitro unter Verwendung von DNA-abhängiger T7-RNA-Polymerase in Gegenwart eines modifizierten Nukleotidgemisches (ATP, GTP, CTP, N1-Methylpseudouridin (m1Ψ) oder Pseudouridin (Ψ) und eines Cap-Analogons (m7GpppG, m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG oder m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG) unter geeigneten Pufferbedingungen transkribiert. Einige RNA-Konstrukte werden in vitro in Abwesenheit eines Cap-Analogons transkribiert, und die Cap-Struktur (cap0 oder cap1) wird enzymatisch mit Hilfe von auf dem Gebiet bekannten Capping-Enzymen hinzugefügt. Die erhaltene RNA wird z.B. wie oben beschrieben aufgereinigt und für weitere Experimente verwendet. Die erhaltenen mRNAs werden z.B. mittels RP-HPLC aufgereinigt (PureMessenger®, CureVac AG, Tübingen, Deutschland; WO2008/077592) und für In-vitro- und In-vivo-Experimente verwendet.

Tabelle 4: RNA-Konstrukte, die für verschiedene SARS-Co V-2 S-Antigen-Desiens kodieren

RNA ID	**Name**	**Abkürzung**	**CDS opt.**	**5'-UTR/ 3'-UTR; UTR-Design**	**3'-Ende**	**SEQ ID NO: Protein**	**SEQ ID NO: CDS**	**SEQ ID NO: RNA**
R9488, R9492, R10161 *	Spike-Protein	S	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A100	1	136	148

RNA ID	Name	Abkürzung	CDS opt.	5'-UTR/ 3'-UTR; UTR-Design	3'-Ende	SEQ ID NO: Protein	SEQ ID NO: CDS	SEQ ID NO: RNA
R9514	Spike-Protein	S	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	1	136	162
R9487, R9491, R9709, R10159 ** R10160 *	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P)	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A100	10	137	149
R9515, R10157 **	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	10	137	163
R9486, R9490	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P)	opt3 (human)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A100	10	142	150
R9517	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P)	opt3 (human)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	10	142	164
R9519	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P)	opt1 0 (gc mod)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	10	146	165
R9489, R9493	S-Fragment (1-681) Spike-Protein	S1	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A100	27	138	152
R9506, R9513	S-Fragment (1-681) Spike-Protein	S1	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	27	138	166
R9516	S-Fragment (1-681) Spike-Protein	S1	opt3 (human)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	27	143	167
R9518	S-Fragment (1-681) Spike-Protein	S1	opt1 0 (gc mod)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	27	147	168

RNA ID	Name	Abkürzung	CDS opt.	5'-UTR/ 3'-UTR; UTR-Design	3'-Ende	SEQ ID NO: Protein	SEQ ID NO: CDS	SEQ ID NO: RNA
R9561	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_disul (P715C_P1069C)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	21	11804	12816
R9564	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_disul (G889C_L1034C)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22	11805	12817
R9562	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_disul (F970C_G999C)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	25	11808	12820
R9560	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_disul (A890C_V1040C)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	1145	11810	12822
R9563	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_disul (T874C_S1055C)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	1212	11811	12823
R9641	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP_cav (K986P_V987P T887W_A1020W)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	408	11799	12811
R9660	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP_cav (K986P_V987P _P1069F)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	475	11800	12812
R9661	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP_prot (K986P_V987P H1048Q_H1064N_ H1083N_H1101N)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	542	11801	12813
R9663	Präfusionsstabilisiertes Spike- Protein	S_stab_PP_ delTMflex_WhcAg (K986P_V987P)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	10726	11953	12931
R9664	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP_ delTMflex_Ferritin (K986P_V987P)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	8716	11923	12901

RNA ID	Name	Abkürzung	CDS opt.	5'-UTR/ 3'-UTR; UTR-Design	3'-Ende	SEQ ID NO: Protein	SEQ ID NO: CDS	SEQ ID NO: RNA
R9848	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP_hex (K986P_V987P _F817P_A892P _A899P_A942 P)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22732	22759	22813
R9926	RBD-Fragment (334-528) Spike-Protein	RBD_Foldon	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22734	22761	22815
R9927	RBD-Fragment (334-528) Spike-Protein	RBD_Foldon	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A100	22734	22761	22788
R10335	RBD-Fragment (334-528) Spike-Protein	RBD_LumSynt h	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22735	22762	22816
R10338	RBD-Fragment (334-528) Spike- Protein	RBD_LumSynt h	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A100	22735	22762	22789
R10336	RBD-Fragment (334-528) Spike-Protein	LumSynth_RB D	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22736	22763	22817
R10339	RBD-Fragment (334-528) Spike-Protein	LumSynth_RB D	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A100	22736	22763	22790
R10337	RBD-Fragment (334-528) Spike-Protein	RBD_Ferritin	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22733	22760	22814
R10340	RBD-Fragment (334-528) Spike-Protein	RBD_Ferritin	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A100	22733	22760	22787
R10182	S(D614G)	S(D614G)	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A100	22737	22764	22791

RNA ID	Name	Abkürzung	CDS opt.	5'-UTR/ 3'-UTR; UTR-Design	3'-Ende	SEQ ID NO: Protein	SEQ ID NO: CDS	SEQ ID NO: RNA
R10165	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P_D614G)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22738	22765	22819
R10166	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P_D614G)	opt1 (gc)	HSD17B 4/PSMB3; a-1	hSL-A100	22738	22765	22792
R10276	Spike-Protein	S (A222V_D614G)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22739	22766	22820
R10278	Spike-Protein	S (A222V_D614G)	opt1 (gc)	HSD17B 4/PSMB3; a-1	hSL-A100	22739	22766	22793
R10277	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P_A222V_D614G)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22740	22767	22821
R10279	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P_-A222V_D614 G)	opt1 (gc)	HSD17B 4/PSMB3; a-1	hSL-A100	22740	22767	22794
R10296	Spike-Protein	S (N439K_D614G)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22741	22768	22822
R10298	Spike-Protein	S (N439K_D614G)	opt1 (gc)	HSD17B 4/PSMB3; a-1	hSL-A100	22741	22768	22795
R10297	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P_N439K_D614G)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22742	22769	22823
R10299	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P_N439K_D614G)	opt1 (gc)	HSD17B 4/PSMB3; a-1	hSL-A100	22742	22769	22796
R10284	Spike-Protein	S (S477N_D614G)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22743	22770	22824
R10287	Spike-Protein	S (S477N_D614G)	opt1 (gc)	HSD17B 4/PSMB3; a-1	hSL-A100	22743	22770	22797

RNA ID	Name	Abkürzung	CDS opt.	5'-UTR/ 3'-UTR; UTR-Design	3'-Ende	SEQ ID NO: Protein	SEQ ID NO: CDS	SEQ ID NO: RNA
R10285	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P_S477N_D614G)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22 744	22771	22825
R10286	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P_S477N_D614G)	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A100	22744	22771	22798
R10350	Spike-Protein	S (N501Y_D614G)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22745	22772	22826
R10351	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P_N501Y_D614G)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22746	22773	22827
R10272	Spike-Protein	S (H69del_V70del_D614G)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22747	22774	22828
R10274	Spike-Protein	S (H69del_V70del_D614G)	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A100	22747	22774	22801
R10273	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P_H69del_V70del_D614G)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22748	22775	22829
R10275	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P_H69del_V70del_D614G)	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A100	22748	22775	22802
R10280	Spike-Protein	S (Y453F_D614G)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22749	22776	22830
R10282	Spike-Protein	S (Y453F_D614G)	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A100	22749	22776	22803
R10281	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P_Y453F_D614 G)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22750	22777	22831
R10283	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P_Y453F_D614 G)	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A100	22750	22777	22804

RNA ID	Name	Abkürzung	CDS opt.	5'-UTR/ 3'-UTR; UTR-Design	3'-Ende	SEQ ID NO: Protein	SEQ ID NO: CDS	SEQ ID NO: RNA
R10288	Spike-Protein	S (D614G_1692V)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22751	22778	22832
R10290	Spike-Protein	S (D614G_I692V)	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A100	22751	22778	22805
R10289	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P _D614G_I692 V)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22752	22779	22833
R10291	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P _D614G_I692 V)	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A100	22752	22779	22806
R10344	Spike-Protein	S (D614G_M12291)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22753	22780	22834
R10345	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P _D614G_M1229I)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22754	22781	22835
R10292	Spike-Protein	S (H69del_V70del _A222V_Y453F _S477N_D614G_I692V)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22755	22782	22836
R10294	Spike-Protein	S (H69del_V70del _A222V_Y453F _S477N_D614G_1692V)	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A100	22755	22782	22809
R10293	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P _H69del_V70del _A222V_Y453 F _S477N_ D614G_I692V)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22756	22783	22837
R10295	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P _H69del_V70del _A222V_Y453 F _S477N_D614G_1692V)	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A100	22756	22783	22810
R10346	Spike-Protein	S (H69del_V70del _Y453F_D614G _I692V_M1229I)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22757	22784	22838

RNA ID	Name	Abkürzung	CDS opt.	5'-UTR/ 3'-UTR; UTR-Design	3'-Ende	SEQ ID NO: Protein	SEQ ID NO: CDS	SEQ ID NO: RNA
R10347	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P _H69del_V70d el _Y453F_D614 G _I692V_M1229 I)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22758	22785	22839
R10136 R10158 **	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	hSL-A100	10	137	24397
R10154	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A100	10	137	25717
R10153	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P)	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	A100	10	137	24837
R10155	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P)	opt1 (gc)	Rpl31/ RPS9; e-2	hSL-A100	10	137	23957
R10156	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P)	opt1 (gc)	Rpl31/ RPS9; e-2	A100	10	137	25277
R10183	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P)	opt1 (gc)	Slc7a3/ PSMB3; a-3	hSL-A100	10	137	23737
R10184	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P)	opt1 (gc)	Slc7a3/ PSMB3; a-3	A100	10	137	25057
R10300	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P)	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A25	10	137	26925
R10301	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P)	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A60	10	137	26926

RNA ID	Name	Abkürzung	CDS opt.	5'-UTR/ 3'-UTR; UTR-Design	3'-Ende	SEQ ID NO: Protein	SEQ ID NO: CDS	SEQ ID NO: RNA
R10302	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P)	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A80	10	137	26927
R10303	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P)	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A90	10	137	26928
R10304	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P)	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A110	10	137	26929
R10305	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P)	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A120	10	137	26930
R10306	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P)	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A140	10	137	26931
R10307	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P)	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL	10	137	26932
R10308	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A50-N5-C30-hSL-N5	10	137	26933
R10309	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A35-N5-C30-hSL-N5	10	137	26934
R10310	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A25-N5-C30-hSL-N5	10	137	26935
R10311	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A73-N5-C30-hSL-N5	10	137	26936

RNA ID	Name	Abkürzung	CDS opt.	5'-UTR/ 3'-UTR; UTR-Design	3'-Ende	SEQ ID NO: Protein	SEQ ID NO: CDS	SEQ ID NO: RNA
R10312	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	hSL-N5	10	137	26937
R10162**	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P)	opt1 0 (gc mod)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A100	10	146	151
R10352	Spike-Protein	S (H69del_V70del_Y144del_N501Y_A570D_D614G_P681H_T716I_S982A_D1118H)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22941	22981	23201
R10356	Spike-Protein	S (H69del_V70del_Y144del_N501Y_A570D_D614G_P681_H_T716I_S982A_D1118H)	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A100	22941	22981	23421
R10353	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P_H69del_ V70del_Y144del_N501Y_A570D_D614G_P681_H_-T7161_S982A_D1118H)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22959	23089	23309
R10357	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P_H69del_V70del_Y144del_N501Y_A570D_D614G_P681H_T716I_S982A_D1118H)	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A100	22959	23089	23529
R10358	Spike-Protein	S (K417N_E484K_N501Y_D614G)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22942	22982	23202
R10359	Spike-Protein	S (K417N_E484K_N501Y_D614G)	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A100	22942	22982	23422
R10360	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P_K417N_E484K_N501Y_D614G)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22960	23090	23310

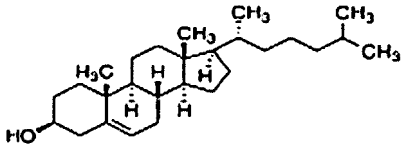
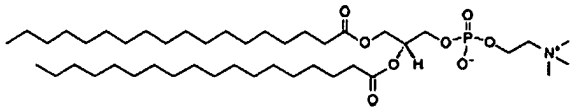
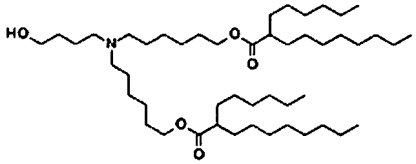
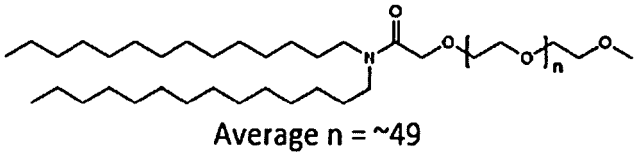
RNA ID	Name	Abkürzung	CDS opt.	5'-UTR/ 3'-UTR; UTR-Design	3'-Ende	SEQ ID NO: Protein	SEQ ID NO: CDS	SEQ ID NO: RNA
R10361	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P_K417N_E484K_N501Y_D614G)	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A100	22960	23090	23530
R10379	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P_L18F_D80A_D215G_L242del_A243del_L244del_R246I_K417N_E484K_N501Y_D614G_A701V)	optl (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22961	23091	23311
R10384	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P_L18F_D80A_D215G_L242del_A243del_L244del_R246I_K417N_E484K_N501Y_D614G_A701V)	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A100	22961	23091	23531
R10378	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P_E484K_D614G)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22962	23092	23312
R10380	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P_L18F_T20N_P26S_D138Y_R190S_K41 7T_E484K_N501Y_D614G_H655Y_T1027I)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22963	23093	23313
R10385	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P_L18F_T20N_P26S_D138Y_R190S_K417T_E484K_N501Y_D614G_H655Y_T1027I)	opt1 (gc)	HSD17B 4/ PSMB3; a-1	hSL-A100	22963	23093	23533
R10381	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab_PP (K986P_V987P_S13I_W152C_L452R_D614G)	opt1 (gc)	-/muag; i-3	A64-N5-C30-hSL-N5	22964	23094	23314

*mRNA R10160 und R10161 wurden mit 3'OME Clean Cap hergestellt.
**mRNA R10157, R10158, R10159, R10162 wurden mit N(1)-Methylpseudouridin (m1ψ) hergestellt

1.4. Herstellung einer LNP-formulierten mRNA-Zusammensetzung:

[0738] LNPs wurden unter Verwendung von kationischen Lipiden, Strukturlipiden, eines PEG-Lipids und Cholesterol hergestellt. Die Lipidlösung (in Ethanol) wurde mit der RNA-Lösung (wässriger Puffer) unter Verwendung einer mikrofluidischen Mischvorrichtung gemischt. Die erhaltenen LNPs wurden in einem Kohlenhydratpuffer über Dialyse erneut gepuffert und mit Hilfe von Ultrazentrifugationsröhrchen auf eine Zielkonzentration hochkonzentriert. LNP-formulierte mRNA wurde vor der Verwendung in In-vitro- oder In-vivo-Experimenten bei -80 °C gelagert. Bevorzugt wurden die Lipid-Nanopartikel gemäß den allgemeinen Verfahren hergestellt und getestet, die in den PCT-Veröffentlichungen WO 2015/199952, WO 2017/004143 und WO 2017/075531 beschrieben sind, deren sämtliche Offenbarungen hierin durch Bezugnahme aufgenommen werden. Lipid-Nanopartikel (LNP)-formulierte mRNA wurde unter Verwendung eines ionisierbaren Aminolipids (kationisches Lipid), eines Phospholipids, eines Cholesterols und eines PEGylierten Lipids hergestellt. Die LNPs wurden wie folgt hergestellt. Kationisches Lipid gemäß Formel III-3 (ALC-0315), DSPC, Cholesterol und PEG-Lipid gemäß Formel IVa (ALC-0159) wurden in Ethanol in einem Molverhältnis von etwa 47,5:10:40,8:1,7 (siehe Tabelle A) gelöst. Lipid-Nanopartikel (LNP) umfassend die Verbindung III-3 wurden in einem Verhältnis von mRNA (Sequenzen siehe Tabelle 4) zu Gesamtlipid von 0,03-0,04 Gew./Gew. hergestellt. Kurz gesagt wurde die mRNA in 10 bis 50 mM Citratpuffer, pH 4, auf 0,05 bis 0,2 mg/ml verdünnt. Spritzenpumpen wurden verwendet, um die ethanolische Lipidlösung mit der wässrigen mRNA-Lösung in einem Verhältnis von etwa 1:5 bis 1:3 (vol/vol) mit Gesamtflussraten über 15 ml/min zu mischen. Anschließend wurde das Ethanol entfernt und der externe Puffer mittels Dialyse durch PBS ersetzt. Schließlich wurden die Lipid-Nanopartikel durch einen Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert. Der Partikeldurchmesser der Lipid-Nanopartikel betrug 60-90 nm, wie durch quasi-elastische Lichtstreuung mit einem Malvern Zetasizer Nano (Malvern, UK) bestimmt wurde.

Tabelle A: Lipidbasierte Trägerzusammensetzung der Beispiele

	Verbindungen	Verhält-nis (Mol %)	Struktur	Masse
1	Cholesterol	40,9		386,4
2	1,2-Distea-roylsn-gly-cero-3-phos-phocholin (DSPC)	10		789,6
3	Kationisches Lipid	47,4		765,7
4	PEG-Lipid	1,7	 Average n = ~49	2010,1

1.5. Herstellung einer mit Protamin komplexierten mRNA-Zusammensetzung (prophetisch):

[0739] RNA-Konstrukte werden vor der Verwendung in In-vivo-Immunisierungsexperimenten mit Protamin komplexiert. Die RNA-Formulierung besteht aus einem Gemisch aus 50% freier RNA und 50% mit Protamin komplexierter RNA in einem Gewichtsverhältnis von 2:1. Zunächst wird die mRNA durch Zugabe von Protamin-Ringer-Lactat-Lösung zur mRNA mit Protamin komplexiert. Nach 10-minütiger Inkubation, wenn die

Komplexe stabil gebildet sind, wird freie mRNA zugegeben, und die Endkonzentration wird mit Ringer-Lactat-Lösung eingestellt.

1.6. Expressionsanalyse der designten mRNA-Konstrukte:

[0740] Die mRNA-Konstrukte gemäß Tabelle 4 wurden mittels In-vitro-Translation unter Verwendung des Kaninchen-Retikulozyten-Lysat-Systems sowie in Zellkultur mit anschließender Detektion mittels Western Blot oder FACS-Analyse, wie auf dem Gebiet allgemein bekannt, auf ihre Expression getestet (siehe für weitere Details und beispielhafte Ergebnisse Beispiel 2).

Beispiel 2a: Expressionsanalyse von mRNA-Konstrukten, die für SARS-CoV-2-Proteine kodieren (S. S stab, S1)

[0741] Zur Bestimmung der In-vitro-Proteinexpression der mRNA-Konstrukte wurden die Konstrukte, die für SARS-CoV-2-Spike-Proteine oder -Fragmente (S, S_stab, S1) kodieren, mit Komponenten des Promega Kaninchen-Retikulozyten-Lysat-Systems gemäß Herstellerprotokoll gemischt. Das Lysat enthält die für die Proteinsynthese notwendigen zellulären Komponenten (tRNA, Ribosomen, Aminosäuren, Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren). Als Positivkontrolle wurde die Luciferase-RNA aus dem Lysat-System-Kit verwendet. Das Translationsergebnis wurde mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse (IRDye 800CW Streptavidin-Antikörper (1:2000)) analysiert. Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die getesteten RNA-Konstrukte.

Tabelle 5: Übersicht der in Beispiel 2a verwendeten mRNA-Konstrukte

Spur	**Name**	**Kurz-bez.**	**CDS opt.**	**mRNA ID**	**SEQ ID NO: RNA**
1	Spike-Protein	S	opt1	R9514	162, 12743
2	präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab	opt1 0	R9519	165, 13013
3	präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab	opt1	R9515	163, 12810
4	S-Fragment (1-681) Spike-Protein	S1	opt1 0	R9518	168, 13027
5	S-Fragment (1-681) Spike-Protein	S1	opt1	R9513	166, 12824
6	RNAse-freies Wasser				
7	Positivkontrolle, Kontroll-RNA aus dem Lysat-System-Kit				

Ergebnisse:

[0742] Wie in **Fig. 1** gezeigt, führten die verwendeten mRNA-Konstrukte zu einer nachweisbaren Proteinexpression in der erwarteten Größe (S oder S_stab: 140 kDa, S1: 75 kDa), was eine Voraussetzung für eine mRNA-basierte SARS-CoV-2-Vakzine ist.

Beispiel 2b: Expression von SARS-CoV-2-Proteinen (S, S stab, S1) in HeLa-Zellen und Analyse mittels FACS

[0743] Um die In-vitro-Proteinexpression der mRNA-Konstrukte zu bestimmen, wurden HeLa-Zellen transient mit mRNA, die für SARS-CoV-2-Proteine (S, S_stab, S1) kodiert, transfiziert und mittels geeigneter Anti-Spike-Protein-Antikörper (erzeugt in der Maus) angefärbt; es wurde mit einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper gegengefärbt. HeLa-Zellen wurden 24 Stunden vor der Transfektion in einer 6-Well-Platte in einer Dichte von 400.000 Zellen/Well in Zellkulturmedium (RPMI, 10% FCS, 1% L-Glutamin, 1% Pen/Strep) ausgesät. HeLa-Zellen wurden mit 2 µg unformulierter mRNA unter Verwendung von Lipofectamin 2000 (Invitrogen) transfiziert. Die gemäß Beispiel 1 hergestellten und in Tabelle 6 aufgeführten mRNA-Konstrukte wurden im Experiment verwendet, einschließlich einer Negativkontrolle (Wasser zur Injektion). 24 Stunden nach der Transfektion wurden HeLa-Zellen mit geeigneten Anti-Spike-Protein-Antikörpern (S-spezifische Antikörper, die gegen SARS S erzeugt wurden, kreuzreaktiv gegen SARS-Cov-2 S) (erzeugt in der Maus; 1:250) und FITC-markierten sekundären Anti-Maus-Antikörpern (1:500) angefärbt und anschließend mittels Durchflusszytometrie (FACS) auf einem BD FACS-Canto II unter Verwendung der FACS-Diva-Software analysiert. Die quantitative Analyse des fluoreszierenden FITC-Signals wurde mit dem Softwarepaket FlowJo (Tree Star, Inc.) durchgeführt.

Tabelle 6: Übersicht der in Beispiel 2b verwendeten mRNA-Konstrukte

Spur	**Name**	**Kurzbez.**	**CDS opt.**	**mRNA ID**	**SEQ ID NO: RNA**
1	Spike-Protein	S	opt1	R9514	162, 12743
2	präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab	opt1	R9515	163, 12810
3	präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab	opt10	R9519	165, 13013
4	S-Fragment (1-681)-Spike-Protein	S1	opt1	R9513	166, 12824
5	S-Fragment (1-681)-Spike-Protein	S1	opt10	R9518	168, 13027
6	RNAse-freies Wasser				

Ergebnisse:

[0744] Wie in **Fig. 2** gezeigt, führten die verwendeten mRNA-Konstrukte zu einer nachweisbaren Zelloberflächenexpression für Volllängen-S (S und S_stab). Da den S1-Fragmenten eine Transmembrandomäne fehlt, ist deren Expression auf der Zelloberfläche nicht nachweisbar (**Fig. 2**).

Beispiel 2c: Expressionsanalyse von SARS-CoV-2-Proteinen (S, S stab, S1) mittels Western Blot

[0745] Für die Analyse der SARS-CoV-2-S-Expression wurden HeLa-Zellen mit unformulierter mRNA unter Verwendung von Lipofectamin als Transfektionsmittel transfiziert. HeLa-Zellen wurden in einer 6-Well-Platte mit einer Dichte von 300.000 Zellen/Well ausgesät. HeLa-Zellen wurden mit 2 µg unformulierter mRNA unter Verwendung von Lipofectamin 2000 (Invitrogen) transfiziert. Die gemäß Beispiel 1 hergestellten und in Tabelle 7 aufgeführten mRNA-Konstrukte wurden im Experiment verwendet, einschließlich einer Negativkontrolle (Wasser zur Injektion). 24 Stunden nach der Transfektion wurden die HeLa-Zellen mit Trypsin-freiem/EDTA-Puffer abgelöst, geerntet und Zelllysate hergestellt. Die Zelllysate wurden einer SDS-PAGE unterzogen, gefolgt von einem Western-Blot-Nachweis. Die Western-Blot-Analyse wurde mit einem Anti-Spike-Protein- (SARS-S, kreuzreaktiv gegen SARS-CoV-2-S) Antikörper in Kombination mit einem geeigneten sekundären Antikörper durchgeführt.

Tabelle 7: Übersicht der in Beispiel 2c verwendeten mRNA-Konstrukte

Spur	**Name**	**Kurzbezeichn.**	**CDS opt.**	**mRNA ID**	**SEQ ID NO: RNA**
1	S-Fragment (1-681) Spike-Protein	S1	opt1	R9513	166, 12824
2	Spike-Protein	S	opt1	R9514	162, 12743
3	S-Fragment (1-681) Spike-Protein	S1	opt10	R9518	168,13027
4	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab	opt10	R9519	165, 13013
5	Präfusionsstabilisiertes Spike-Protein	S_stab	opt1	R9515	163, 12810
6	RNAse-freies Wasser				

Ergebnisse:

[0746] Expression war für alle analysierten mRNAs in Zelllysaten nachweisbar (**Fig. 3**), Volllängen-S: erwartete Größe 140 kDa, zwei Hauptbanden von etwa 90 kDA und 180 kDa, die wahrscheinlich glykosylierte Formen des unprozessierten S-Proteins (S0) und der gespaltenen S2-Untereinheit widerspiegeln (S1: 70 kDa, vermutlich glykosyliert).

Beispiel 3: Vakzinierung von Mäusen mit mRNA, die für designte SARS-CoV-2-Protein-Antigene (S, S stab) kodiert

Herstellung der LNP-formulierten mRNA-Vakzine:

[0747] SARS-CoV-2mRNA-Konstrukte werden wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt (RNA-in-vitro-Transkription). HPLC-gereinigte mRNA wird mit LNPs gemäß Beispiel 1.4 formuliert, bevor sie in In-vivo-Vakzinierungsexperimenten verwendet wird.

Immunisierung:

[0748] Weiblichen BALB/c-Mäusen (6-8 Wochen alt) werden intramuskulär (i.m.) mRNA-Vakzinzusammensetzungen und Dosen, wie in Tabelle 8 angegeben, injiziert. Als Negativkontrolle wird eine Gruppe von Mäusen mit Puffer vakziniert. Alle Tiere werden an Tag 0 und 21 vakziniert. Blutproben werden an Tag 21 („post prime“) und 42 („post boost“) für die Bestimmung der Antikörpertiter entnommen.

Tabelle 8: Vakzinierungsschema (Beispiel 3):

Gruppe	**SARS-CoV-2 Spike-Protein SEQ ID NO**:	**CDS Optimierung**	**Formulierung**	**Dosis**
1	S SEQ ID NO: 148, 155, 162, oder 169	opt1	LNP	5 µg
2	S SEQ ID NO: 148, 155, 162, oder 169	opt1	LNP	2,5 µg
3	S SEQ ID NO: 148, 155, 162, oder 169	opt1	LNP	1,25 µg
4	S stabilisiert (S_stab) SEQ ID NO: 149, 156, 163, oder 170	opt1	LNP	5 µg
5	S stabilisiert (S_stab) SEQ ID NO: 149, 156, 163, oder 170	opt1	LNP	2,5 µg
6	S stabilisiert (S_stab) SEQ ID NO: 149, 156, 163, oder 170	opt1	LNP	1,25 µg
7	S stabilisiert (S_stab) SEQ ID NO: 150, 157, 164, oder 171	opt3	LNP	5 µg
8	S stabilisiert (S_stab) SEQ ID NO: 150, 157, 164, oder 171	opt3	LNP	2,5 µg
9	S stabilisiert (S_stab) SEQ ID NO: 150, 157, 164, oder 171	opt3	LNP	1,25 µg
7	S stabilisiert (S_stab) SEQ ID NO: 151, 158, 165, oder 172	opt1 0	LNP	5 µg
8	S stabilisiert (S_stab) SEQ ID NO: 151, 158, 165, oder 172	opt10	LNP	2,5 µg
9	S stabilisiert (S_stab) SEQ ID NO: 151, 158, 165, oder 172	opt10	LNP	1,25 µg
10	Puffer			

Bestimmung von IgG1-und IgG2-Antikörpertitern mittels ELISA:

[0749] Der ELISA wird mit rekombinantem SARS-CoV-2-S-Protein (extrazelluläre Domäne) zur Beschichtung durchgeführt. Die beschichteten Platten werden mit den entsprechenden Serumverdünnungen inkubiert, und die Bindung spezifischer Antikörper an SARS-CoV-2-S wird mit biotinylierten Isotyp-spezifischen Anti-Maus-Antikörpern, gefolgt von Streptavidin-HRP (Meerrettich-Peroxidase) mit Amplex als Substrat, nachgewiesen. Die Endpunkttiter der Antikörper (IgG1, IgG2a) werden mittels ELISA an Tag 21 und 42 nach der Vakzinierung bestimmt.

Nachweis von Spike-Protein-spezifischen Immunantworten:

[0750] Hela-Zellen werden mit 2 µg Spike-Protein-kodierender mRNA unter Verwendung von Lipofectamin transfiziert. Die Zellen werden 20 Stunden nach der Transfektion geerntet und mit 1×10^5 pro Well in eine 96-Well-Platte ausgesät. Die Zellen werden mit Serumproben von vakzinierten Mäusen (1:50 verdünnt) und anschließend mit einem FITC-konjugierten Anti-Maus-IgG-Antikörper inkubiert. Die Zellen wurden auf dem BD FACS-Canto II mit der DIVA-Software erfasst und mit FlowJo analysiert.

Intrazelluläre Zytokin-Färbung:

[0751] Splenozyten von vakzinierten Mäusen werden nach einem auf dem Gebiet bekannten Standardprotokoll isoliert. Kurz gesagt, isolierte Milzen werden durch ein Zellsieb zermahlen und in PBS/1% FBS gewaschen, gefolgt von einer Lyse der roten Blutkörperchen. Nach einem ausgiebigen Waschschritt mit PBS/1% FBS werden die Splenozyten in 96-Well-Platten ausgesät (2×10^6 Zellen pro Well). Die Zellen werden mit einer Mischung aus SARS-CoV-2-S-Protein-spezifischen Peptidepitopen (5 µg/ml jedes Peptids) in Gegenwart von 2,5 µg/ml eines Anti-CTAG-28-Antikörpers (BD Biosciences) für 6 Stunden bei 37 °C in Gegenwart eines Proteintransportinhibitors stimuliert. Nach der Stimulation werden die Zellen gewaschen und mit dem Cytofix/Cytoperm-Reagenz (BD Biosciences) gemäß den Anweisungen des Herstellers auf intrazelluläre Zytokine gefärbt. Die folgenden Antikörper werden für die Färbung verwendet: Thy1.2-FITC (1:200), CD8-APC-H7 (1:100), TNF-PE (1:100), IFNγ-APC (1:100) (eBioscience), CD4-BD Horizon V450 (1:200) (BD Biosciences) und mit 1:100 verdünntem Fcγ-Block inkubiert. Aqua Dye wird zur Unterscheidung von lebenden/-toten Zellen verwendet (Invitrogen). Die Zellen werden mit einem Canto II-Durchflusszytometer (Beckton Dickinson) erfasst. Die Durchflusszytometrie-Daten werden mit dem Softwarepaket Flowjo (Tree Star, Inc.) ausgewertet.

Bestimmung der Virus-neutralisierenden Titer:

[0752] Serum wird für die Bestimmung von SARS-CoV-2-Neutralisationstitern (VNTs) gesammelt, die über CPE (zytopathischer Effekt)-Assay oder über einen pseudotypisierten Partikel-basierten Assay nachgewiesen werden.

Beispiel 4: Vakzinierung von Mäusen mit mRNA, die für das SARS-CoV-2-Antigen S1 kodiert

Herstellung der LNP-formulierten mRNA-Vakzine:

[0753] SARS-CoV-2 mRNA-Konstrukte werden wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt (RNA-in-vitro-Transkription). HPLC-gereinigte mRNA wird mit LNPs gemäß Beispiel 1.4 formuliert, bevor sie in In-vivo-Vakzinierungsexperimenten verwendet wird.

Immunisierung:

[0754] Weiblichen BALB/c-Mäusen (6-8 Wochen alt) werden intramuskulär (i.m.) mRNA-Vakzinzusammensetzungen und Dosen, wie in Tabelle 9 angegeben, injiziert. Als Negativkontrolle wird eine Gruppe von Mäusen mit Puffer vakziniert. Alle Tiere werden an Tag 0 und 21 vakziniert. Blutproben werden an Tag 21 („post prime“) und 42 („post boost“) für die Bestimmung der Antikörpertiter genommen.

Tabelle 9: Vakzinierungsschema (Beispiel 4)

Gruppe	**SARS-CoV-2-Spike-Protein SEQ ID NO**:	**CDS-Optimierung**	**Formulierung**	**Dosis**
1	Spike S1 SEQ ID NO: 152, 159, 166, oder 173	opt1	LNP	5 µg
2	Spike S1 SEQ ID NO: 152, 159, 166, oder 173	opt1	LNP	2,5 µg
3	Spike S1 SEQ ID NO: 152, 159, 166, oder 173	opt1	LNP	1,25 µg
1	Spike S1 SEQ ID NO: 153, 160, 167, oder 161	opt3	LNP	5 µg

Gruppe	SARS-CoV-2-Spike-Protein SEQ ID NO:	CDS-Optimierung	Formulierung	Dosis
2	Spike S1 SEQ ID NO: 153, 160, 167, oder 161	opt3	LNP	2,5 µg
3	Spike S1 SEQ ID NO: 153, 160, 167, oder 161	opt3	LNP	1,25 µg
1	Spike S1 SEQ ID NO: 154, 161, 168, oder 175	opt10	LNP	5 µg
2	Spike S1 SEQ ID NO: 154, 161, 168, oder 175	opt1 0	LNP	2,5 µg
3	Spike S1 SEQ ID NO: 154, 161, 168, oder 175	opt10	LNP	1,25 µg
4	Puffer			

[0755] Die Induktion spezifischer Immunantworten über ELISA, ICS und VNTs werden wie zuvor beschrieben bestimmt (siehe Beispiel 3).

Beispiel 5: Vakzinierung von Mäusen mit mRNA, die für das SARS-CoV-2-Antigen-Design (S stab) kodiert

Herstellung der LNP-formulierten mRNA-Vakzine:

[0756] SARS-CoV-2-S-mRNA-Konstrukte wurden wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt (RNA-in-vitro-Transkription). HPLC-gereinigte mRNA wurde mit LNPs gemäß Beispiel 1.4 formuliert.

Immunisierung:

[0757] Weiblichen BALB/c-Mäusen (6-8 Wochen alt) wurden intramuskulär (i.m.) mRNA-Vakzinzusammensetzungen und Dosen wie in Tabelle 10 angegeben injiziert. Als Negativkontrolle wurde eine Gruppe von Mäusen mit Puffer vakziniert. Alle Tiere wurden an Tag 0 vakziniert. Am Tag 21 wurden Blutproben für die Bestimmung der Antikörper-Titer genommen.

Tabelle 10: Vakzinierungsschema (Beispiel 5):

Gruppe	Vakzinzusammensetzung	mRNA ID	CDS opt.	SEQ ID NO: Protein	SEQ ID NO: RNA	Dosis
A	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9519	opt1 0	10, 341	165, 13013	2 µg
B	Rek. Protein SARS-CoV-2-S-ECD (extrazelluläre Domäne) + Alaun	- -	- -			1,5 µg
C	Puffer	- -	- -			- -

Bestimmung der IgG1- und IgG2-Antikörper-Titer mittels ELISA:

[0758] Der ELISA wurde mit rekombinantem SARS-CoV-2-S-Protein zur Beschichtung durchgeführt. Die beschichteten Platten wurden mit den jeweiligen Serumverdünnungen inkubiert, und die Bindung spezifischer Antikörper gegen SARS-CoV-2-S wurde mit biotinylierten Isotyp-spezifischen Anti-Maus-Antikörpern, gefolgt von Streptavidin-HRP (Meerrettich-Peroxidase) mit Amplex als Substrat nachgewiesen. Die Endpunkttiter der Antikörper (IgG1, IgG2a) wurden mittels ELISA am Tag 21, nach einer einmaligen Prime-Vakzinierung, gemessen.

Ergebnisse:

[0759] Wie in **Fig. 4** gezeigt, induzierte die Vakzinierung mit der mRNA, die für das stabilisierte Volllängen-S-Protein kodiert, hohe Titer S-spezifischer bindender Antikörper nach einer einzigen Vakzinierung (Tag 21). Im

Vergleich zu dem adjuvantierten rekombinanten S-Protein induzierte die mRNA-Vakzine vergleichbare IgG1-Titer und höhere IgG2a-Titer.

Beispiel 6: Vakzinierung von Mäusen mit mRNA, die für SARS-CoV-2-Antigen-Designs kodiert

Herstellung der LNP-formulierten mRNA-Vakzine:

[0760] SARS-CoV-2 S mRNA-Konstrukte wurden wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt (RNA-in-vitro-Transkription). HPLC-gereinigte mRNA wurde mit LNPs gemäß Beispiel 1.4 formuliert.

Immunisierung:

[0761] Weiblichen BALB/c-Mäusen (6-8 Wochen alt) wurden intramuskulär (i.m.) mRNA-Vakzinzusammensetzungen und Dosen, wie in Tabelle 11 angegeben, injiziert. Als Negativkontrolle wurde eine Gruppe von Mäusen mit Puffer vakziniert. Alle Tiere wurden an Tag 0 und 21 vakziniert. Blutproben wurden an Tag 21 („post prime“) und 42 („post boost“) für die Bestimmung der Antikörpertiter genommen.

Tabelle 11: Vakzinierungsschema (Beispiel 6):

Gruppe	**Vakzinzusammensetzung**	**mRNA ID**	**CDS opt.**	**SEQ ID NO: Protein**	**SEQ ID NO: RNA**	**Dosis**
A	mRNA kodierend S_Volllängen formuliert in LNPs	R9514	opt1	1	162	2 µg
B	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9515	opt1	10	163	2 µg
C	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9519	opt10	10	165	2 µg
D	Puffer	- -	- -			- -

Bestimmung von IgG1- und IgG2-Antikörpertitern mittels ELISA:

[0762] Der ELISA wurde mit rekombinantem SARS-CoV-2-S (extrazelluläre Domäne) Protein zur Beschichtung durchgeführt. Die beschichteten Platten wurden mit den jeweiligen Serumverdünnungen inkubiert, und die Bindung spezifischer Antikörper gegen SARS-CoV-2-S wurde mit biotinylierten, isotypspezifischen Anti-Maus-Antikörpern, gefolgt von Streptavidin-HRP (Meerrettich-Peroxidase) mit Amplex als Substrat, nachgewiesen. Die Endpunkttiter der Antikörper (IgG1, IgG2a) wurden mittels ELISA an Tag 21 und 42 nach der Erstvakzinierung gemessen.

Bestimmung der Virus-neutralisierenden Titer:

[0763] Serum wurde für die Bestimmung der SARS-CoV-2-Neutralisationstiter (VNTs) gesammelt, die über den CPE (zytopathischen Effekt) nachgewiesen wurden. Serielle Verdünnungen von hitzeinaktivierten Seren (56 °C für 30min), die in zweifacher Ausführung mit einer Startverdünnung von 1:10, gefolgt von 1:2 seriellen Verdünnungen, getestet wurden, wurden mit 100 $TCID_{50}$ von Wildtyp-SARS-CoV-2 (Stamm 2019-nCov/Italy-INMI1) für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Jede Platte enthielt eine bestimmte Reihe (8 Wells) für die Zellkontrolle, die nur Zellen und Medium enthält, und eine bestimmte Reihe für die Viruskontrolle, die nur Zellen und Virus enthält. Die Quantifizierung des infektiösen Virus erfolgte nach Inkubation von 100 µl der Virus-Serum-Mischung mit einer konfluenten Schicht von Vero-E6-Zellen (ATCC, Kat.1586), gefolgt von einer 3-tägigen Inkubation bei 37 °C und einer mikroskopischen Auswertung der CPE-Bildung. Für jeden Lauf wurde eine Rücktitration durchgeführt, um den korrekten Bereich von TCID50 der Arbeitsviruslösung zu überprüfen. VN-Titer wurden nach dem von Reed & Muench beschriebenen Verfahren berechnet. Wenn keine Neutralisation beobachtet wurde (MNt <10), wurde ein willkürlicher Wert von 5 angegeben. Die Analysen wurden bei VisMederi srl (Siena, Italien) durchgeführt.

Intrazelluläre Zytokinfärbung:

[0764] Splenozyten von vakzinierten Mäusen wurden nach einem auf dem Gebiet bekannten Standardprotokoll isoliert. Kurz gesagt, isolierte Milzen wurden durch ein Zellsieb gemahlen und in PBS/1% FBS gewa-

schen, gefolgt von einer Lyse der roten Blutkörperchen. Nach einem ausgiebigen Waschschritt mit PBS/1% FBS wurden die Splenozyten in 96-Well-Platten ausgesät (2 × 10^6 Zellen pro Well). Die Zellen wurden mit einer Mischung aus SARS-CoV-2-S-Protein-spezifischen Peptidepitopen (5 µg/ml jedes Peptids) in Gegenwart von 2,5 µg/ml eines Anti-CTAG-28-Antikörpers (BD Biosciences) für 6 Stunden bei 37 °C in Gegenwart eines Proteintransportinhibitors stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Zellen gewaschen und mit dem Cytofix/Cytoperm-Reagenz (BD Biosciences) gemäß den Anweisungen des Herstellers auf intrazelluläre Zytokine gefärbt. Die folgenden Antikörper wurden für die Färbung verwendet: Thy1.2-FITC (1:200), CD8-APC-H7 (1:100), TNF-PE (1:100), IFNγ-APC (1:100) (eBioscience), CD4-BD Horizon V450 (1:200) (BD Biosciences) und mit einem 1:100 verdünnten Fcγ-Block inkubiert. Aqua Dye wurde zur Unterscheidung von lebenden/toten Zellen verwendet (Invitrogen). Die Zellen wurden mit einem Canto II-Durchflusszytometer (Beckton Dickinson) erfasst. Die Durchflusszytometrie-Daten wurden mit dem Flowjo-Softwarepaket (Tree Star, Inc.) analysiert.

Ergebnisse:

[0765] Wie in **Fig. 5 A** und **Fig. 5 B** gezeigt, induzierte die Vakzinierung mit mRNA, die für das Volllängen-S-Protein und für das stabilisierte Volllängen-S-Protein (S_stab) kodiert, hohe Titer von S-spezifischen bindenden Antikörpern nach einer einzigen Vakzinierung (Tag 21=d21) (**Fig. 5 A**: IgG1, **Fig. 5 B**: IgG2a). Die Titer stiegen nach einer zweiten Vakzinierung (Tag 42=d42) an. Alle mRNA-Designs induzierten mehr oder weniger vergleichbare Antikörpertiter, wobei die Mäuse der Gruppe C im Vergleich zu den anderen Gruppen an Tag 21 einen geringeren Gehalt an IgG2a-Antikörpern aufwiesen. Wie in **Fig. 5 C** gezeigt, induzierte die Vakzinierung mit mRNA, die für das Volllängen-S-Protein und für das stabilisierte Volllängen-S-Protein kodiert, nach zwei Vakzinierungen robuste Mengen an Virus-neutralisierenden Antikörpern.

[0766] Wie in **Fig. 6** gezeigt, induzierte die Vakzinierung mit mRNA, die für das Volllängen-S-Protein und für das stabilisierte Volllängen-S-Protein (S_stab) kodiert, sowohl $CD4^+$- als auch $CD8^+$-IFNγ/TNFα doppelt-positive T-Zellen.

Beispiel 7: In vivo-Immunogenität der SARS-CoV-2-Vakzinzusammensetzung nach verschiedenen Vakzinierungsschemata

Herstellung der LNP-formulierten mRNA-Vakzine:

[0767] SARS-CoV-2 S mRNA-Konstrukte wurden wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt (RNA-in-vitro-Transkription). HPLC-gereinigte mRNA wurde mit LNPs gemäß Beispiel 1.4 formuliert.

Immunisierung:

[0768] Weiblichen BALB/c-Mäusen (6-8 Wochen alt) wurden intramuskulär (i.m.) mRNA-Vakzinzusammensetzungen und Dosen wie in Tabelle 12 angegeben injiziert. Gruppe I wurde mit dem mit Alaun adjuvantierten SARS-CoV2-Spike-Protein (S extrazelluläre Domäne) vakziniert (1,5 µg in 5,6 µl Alhydrogel gepuffert in phosphatgepufferter Kochsalzlösung [PBS]). Als Negativkontrolle wurde eine Gruppe von Mäusen mit Puffer (0,9% NaCl) vakziniert.

[0769] Die Tiere erhielten die erste Vakzinierung an Tag 0, Tag 7, Tag 14 oder Tag 21. Alle Tiere erhielten am Tag 28 eine zweite Vakzinierung. Das Vorhandensein von SARS-CoV-2-S-bindenden Antikörpern wurde an Tag 28 und Tag 35 analysiert, das Vorhandensein von Virus-neutralisierenden Titern (VNTs) wurde an Tag 28, 35 und 49 analysiert. Die Induktion von T-Zell-Antworten nach der Vakzinierung wurde am Tag 49 des Experiments bewertet. Dieser Versuchsaufbau wurde gewählt, um das Einsetzen der spezifischen Immunantworten zu bestimmen und um festzustellen, welches Vakzinierungsintervall von der ersten bis zur zweiten Immunisierung die höchsten Immunantworten bei Mäusen ergibt.

Tabelle 12: Vakzinierungsschema (Beispiel 7).

Gruppe	Vakzinzusammensetzung	mRNA ID	Vakzinierung	CDS opt.	SEQ ID NO: Protein	SEQ ID NO: RNA	Dosis
A	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs (CVnCoV)	R9515	Tag 21, Tag 28	opt1	10	163	2 µg
B	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs (CVnCoV)	R9515	Tag 14, Tag 28	opt1	10	163	2 µg

Gruppe	Vakzinzusammensetzung	mRNA ID	Vakzinierung	CDS opt.	SEQ ID NO: Protein	SEQ ID NO: RNA	Dosis
C	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs (CVnCoV)	R9515	Tag 7, Tag 28	opt1	10	163	2 µg
D	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs (CVnCoV)	R9515	Tag 0, Tag 28	opt1	10	163	2 µg
E	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9519	Tag 21, Tag 28	opt1 0	10	165	2 µg
F	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9519	Tag 14, Tag 28	opt1 0	10	165	2 µg
G	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9519	Tag 7, Tag 28	opt1 0	10	165	2 µg
H	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9519	Tag 0, Tag 28	opt1 0	10	165	2 µg
I	Positivkontrolle (Alaunadjuvantiertes S-Protein)	- -	Tag 0, Tag 28	- -	- -	- -	- -
J	Puffer	- -	Tag 0, Tag 28	- -	- -	- -	- -

Charakterisierung der RNA-induzierten angeborenen Immunantworten:

[0770] 14 Stunden nach Verabreichung von in LNPs formulierter, für S_stab kodierender mRNA (exemplarisch dargestellt für Gruppe A), Positivkontrolle oder Puffer wurden Blutproben über retro-orbitales Ausbluten entnommen. Die Serumzytokine (IFNα,γ, IL-1β, TNF, IL-6, IL-4, IL-5 und IL-13) wurden mittels zytometrischem Bead-Array (CBA) unter Verwendung von BD FACS CANTO II bestimmt. Das Serum wurde im Verhältnis 1:4 verdünnt, und die BD Bioscience Maus-Zytokin-Flex-Sets wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll zur Bestimmung der Serum-Zytokinspiegel verwendet.

[0771] Die folgenden Flex-Sets wurden verwendet: Maus IFN-γ Flex Set RUO (A4) (BD Bioscience, Kat. 558296); Maus Il-13 Flex Set RUO (B8) (BD Bioscience, Kat. 558349); Maus IL-1β Flex Set RUO (E5) (BD Bioscience, Kat. 560232); Maus Il-4 Flex Set RUO (A7) (BD Bioscience, Kat. 558298); Maus Il-5 Flex Set RUO (A6) (BD Bioscience, Kat. 558302); Maus IL-6 Flex Set RUO (B4) (BD Bioscience, Kat. 558301); Maus TNF Flex Set RUO (C8) (BD Bioscience, Kat. 558299).

[0772] IFN-a wurde mit dem VeriKine-HS Maus IFN-a Serum ELISA-Kit (pbl, Kat. 42115-1) gemäß den Anweisungen des Herstellers quantifiziert. Die Seren wurden 1:100 verdünnt und 50 µl der Verdünnung wurden getestet.

Bestimmung der IgG1- und IgG2-Antikörper-Titer mittels ELISA:

[0773] Der ELISA wurde mit rekombinantem SARS-CoV-2-S (extrazelluläre Domäne)-Protein zur Beschichtung durchgeführt. Die beschichteten Platten wurden mit den entsprechenden Serumverdünnungen inkubiert, und die Bindung spezifischer Antikörper gegen SARS-CoV-2-S wurde mit biotinylierten, Isotyp-spezifischen Anti-Maus-Antikörpern, gefolgt von Streptavidin-HRP (Meerrettich-Peroxidase) mit Amplex als Substrat, nachgewiesen.

Bestimmung der Virus-neutralisierenden Titer:

[0774] Serum wurde für die Bestimmung SARS-CoV-2-neutralisierender Titer (VNTs) gesammelt, die über den CPE (zytopathischer Effekt) unter Verwendung von Wildtyp-SARS-CoV-2-Virus nachgewiesen wurden. Für die Analyse der Virus-neutralisierenden Titer von Mausseren wurden serielle Verdünnungen von hitzeinaktivierten Seren (56 °C für 30 Minuten) in zweifacher Ausführung mit einer Anfangsverdünnung von 1:10, gefolgt von seriellen Verdünnungen von 1:2, mit 100 $TCID_{50}$ von Wildtyp-SARS-CoV-2 (Stamm 2019-nCov/Italy-INMI1) für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Jede Platte enthielt eine bestimmte Reihe (8 Wells) für die Zellkontrolle, die nur Zellen und Medium enthielt, und eine bestimmte Reihe für die Viruskontrolle, die nur Zellen und Virus enthielt. Die Quantifizierung des infektiösen Virus erfolgte nach Inkubation von 100 µl der Virus-

Serum-Mischung mit einer konfluenten Schicht von Vero-E6-Zellen (ATCC, Kat.1586), gefolgt von einer Inkubation für 3 Tage bei 37 °C und einer mikroskopischen Auswertung der CPE-Bildung. Für jeden Lauf wurde eine Rücktitration durchgeführt, um den korrekten Bereich von $TCID_{50}$ der Arbeitsviruslösung zu überprüfen. VN-Titer wurden nach dem von Reed & Muench beschriebenen Verfahren berechnet. Wenn keine Neutralisation beobachtet wurde (MNt <10), wurde ein willkürlicher Wert von 5 angegeben. Die Analysen wurden bei VisMederi srl (Siena, Italien) durchgeführt.

Intrazelluläre Zytokinfärbung:

[0775] Splenozyten wurden isoliert und mit einer SARS-CoV-2-Spike-spezifischen Peptidbibliothek für 24 Stunden stimuliert. Anschließend wurden die Zellen auf CD8- („Cluster of differentiation 8“) und CD4-T-Zellen (Oberfläche) und auf INF-γ und TNF (intrazellulär) angefärbt, um die Induktion von multifunktionalen T-Zellen zu bewerten, die spezifisch durch Vakzin-spezifische Peptide aktiviert werden. Zellen, die mit Dimethylsulfoxid (DMSO) inkubiert wurden, dienten als Negativkontrollen. Die Zellen wurden mit einem Canto II-Durchflusszytometer (Beckton Dickinson) erfasst. Die Durchflusszytometrie-Daten wurden mit dem Softwarepaket Flowjo (Tree Star, Inc.) ausgewertet.

Ergebnisse

[0776] Wie in **Fig. 7 A- Fig. 7 D** dargestellt, zeigten die Zytokin-Analysen die Induktion einer ausgewogenen Immunantwort nach Injektion von mRNA, die für S_stab kodiert und in LNPs (CVnCoV) formuliert wurde, die keine Tendenz zu IFNγ oder IL4, IL-5 und IL-13 zeigte, was auf eine T_H1- bzw. TH2-Antwort hindeutet. Niedrige Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, IFNay waren im Serum nachweisbar, während TNF und IL1β nicht nachweisbar waren.

[0777] Wie in **Fig. 8A** gezeigt, führte die Vakzinierung mit der mRNA R9515, die für das stabilisierte Volllängen-S-Protein (S_stab) kodiert, zu einem schnellen Einsetzen der Immunantwort nach der ersten Vakzinierung. Eine einzige intramuskuläre Verabreichung der Vakzinzusammensetzung war ausreichend, um sieben Tage nach der Injektion bindende Antikörper zu induzieren.

[0778] Wie in **Fig. 8B** gezeigt, induzierte die Vakzinierung mit mRNA, die für das stabilisierte Volllängen-S-Protein kodiert (S_stab), unabhängig von der CDS-Optimierung vergleichbare Antikörpertiter. Die Mengen an bindenden Antikörpern stiegen mit längeren Intervallen zwischen Vakzinierung und Serumentnahme an (**Fig. 8A+B**). Eine zweite Immunisierung konnte die Gesamttiter der bindenden Antikörper eine Woche nach der Injektion (Tag 35) erhöhen. Höhere Titer bindender Antikörper wurden am Tag 35 in Gruppen mit längeren Intervallen zwischen der ersten und zweiten Immunisierung beobachtet. Die adjuvantierte rekombinante Spike-ProteinVakzine (Gruppe I) induzierte vergleichbare Mengen an bindenden IgG1-Antikörpern, aber die IgG2a-Titer waren im Vergleich zu allen mRNA-Gruppen statistisch signifikant niedriger.

[0779] Wie in **Fig. 9A+B** gezeigt, waren 28 Tage nach der ersten Vakzinierung geringe, aber nachweisbare Mengen an VNT vorhanden (Gruppe D und H). Die VNT-Spiegel stiegen nach der zweiten Immunisierung in allen analysierten Gruppen an Tag 35 und Tag 49 der Studie an. Im Einklang mit den erhöhten bindenden Antikörpern stiegen die VNTs im Laufe der Zeit und für Gruppen mit längeren Intervallen zwischen erster und zweiter Vakzinierung an.

[0780] Wie in **Fig. 10** dargestellt, wurde bei den vakzinierten Tieren ein starker Anstieg multifunktionaler $CD8^+$- und $CD4^+$-T-Zellen beobachtet.

[0781] Die starke Induktion multifunktionaler T-Zellen sowie die Bindung und, was noch wichtiger ist, von funktionalen Antikörpern deuten darauf hin, dass die mRNA-Vakzine, die für das SARS-CoV-2-Spike-Protein kodiert, potente Immunantworten in Mäusen auslöst.

[0782] Die Vakzine rief ein ausgewogenes Th1ATh2-Profil hervor, was durch die Induktion vergleichbarer Mengen an IgG1- und IgG2a-Antikörpern sowie ein Zytokinprofil, das keinen Hinweis auf eine TH2-Tendenz gibt, d.h. Induktion von IL4, IL5 und IL13, angezeigt wird.

Beispiel 8: Vakzinierung von Ratten mit mRNA, die für das SARS-CoV-2-Antigen kodiert

Herstellung von LNP-formulierten mRNA-Vakzinen:

[0783] SARS-CoV-2 S mRNA-Konstrukte wurden wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt (RNA-In-vitro-Transkription). HPLC-gereinigte mRNA wurde mit LNPs gemäß Beispiel 1.4 formuliert, bevor sie in In-vivo-Vakzinierungsexperimenten verwendet wurde.

Immunisierung:

[0784] Ratten wurden intramuskulär (i.m.) mRNA-Vakzinzusammensetzungen und Dosen wie in Tabelle 13 angegeben injiziert. Als Negativkontrolle wurde eine Gruppe von Ratten mit Puffer vakziniert (Gruppe A). Alle Tiere wurden an Tag 0 und Tag 21 vakziniert. Blutproben wurden an Tag 21 („post prime“) und 42 („post boost“) für die Bestimmung der Antikörpertiter entnommen.

Tabelle 13: Vakzinierungsschema (Beispiel 8):

Gruppe	**Vakzinzusammensetzung**	**mRNA ID**	**CDS opt.**	**SEQ ID NO: Protein**	**SEQ ID NO: RNA**	**Dosis**
A	Puffer	- -	- -	- -	- -	- -
B	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9515	opt1	10	163	0,5 µg
C	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9515	opt1	10	163	2 µg
D	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9515	opt1	10	163	10 µg
E	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9515	opt1	10	163	40 Ng
F	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9515	opt1	10	163	80 µg

Bestimmung der IgG1- und IgG2-Antikörpertiter mittels ELISA:

[0785] Der ELISA wurde mit rekombinantem SARS-CoV-2-S- (extrazelluläre Domäne) Protein zur Beschichtung durchgeführt. Die beschichteten Platten wurden mit den entsprechenden Serumverdünnungen inkubiert, und die Bindung der spezifischen Antikörper an SARS-CoV-2-S wurde direkt mit einem markierten HRP-Antikörper anstelle eines sekundären HRP-Antikörpers, der für den Maus-ELISA verwendet wurde, nachgewiesen. Die fehlende Signalverstärkung im Ratten-ELISA könnte für niedrigere Titer verantwortlich sein, daher sind die ELISA-Titer zwischen Ratten- und Mausstudien derzeit nicht vergleichbar.

Bestimmung von Virus-neutralisierenden Antikörpertitern (VNT)

[0786] Die Virus-neutralisierenden Antikörpertiter (VNT) von Ratten-Serumproben wurden, wie zuvor in Beispiel 6 mit Mausserum beschrieben, analysiert.

Ergebnisse:

[0787] Wie in **Fig. 11 A-C** gezeigt, induzierte die Vakzinierung mit stabilisierter Volllängen-S-Protein-mRNA, formuliert in LNPs, bei Ratten dosisabhängige Mengen von bindenden Antikörpertitern an Tag 21 unter Verwendung von Dosen von 0,5 µg, 2 µg und 10 µg und erreichte eine Sättigung in Gruppen, die mit 40 µg und 80 µg vakziniert worden waren. Die **Fig. 11 D** und **Fig. 11 E** zeigen die Niveaus der bindenden Antikörpertiter an Tag 42 nach der ersten Vakzinierung. Die zweite Vakzinierung führte zu einem weiteren Anstieg der Antikörpertiter.

[0788] Wie in den **Fig. 11 F** und **Fig. 11 G** gezeigt, induzierte die Vakzinierung mit in LNPs formulierter stabilisierter Volllängen-S-Protein-mRNA bei Ratten dosisabhängige Niveaus an VNT.

Beispiel 9: Challenge-Studie an Hamstern mit SARS-CoV-2

[0789] Die protektive Effizienz von in LNPs formulierter S_stab kodierender mRNA (CVnCoV), wurde in syrischen Hamstern untersucht. Dieses Modell repräsentiert die milde bis moderate Pathologie der humanen Lungenerkrankung und ist eines der anerkannten und akzeptierten Modelle zur Untersuchung der für den

Menschen relevanten Immunogenität und Pathogenese (Muñoz-Fontela et al, PMID 32967005). Hamster sind empfänglich für eine Wildtyp-SARS-CoV-2-Infektion, was zu einer hohen Virusreplikation und histopathologischen Veränderungen in den Zielorganen des Virus führt.

Herstellung der LNP-formulierten mRNA-Vakzine:

[0790] Das SARS-CoV-2-S-mRNA-Konstrukt wurde wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt (RNA-in-vitro-Transkription). HPLC-gereinigte mRNA wurde mit LNPs gemäß Beispiel 1.4 formuliert, bevor sie in In-vivo-Vakzinierungsexperimenten verwendet wurde.

Immunisierung und Challenge:

[0791] Syrische Goldhamster (n=5/Gruppe, 11 bis 13 Wochen alt) wurden intramuskulär (i.m.) mit mRNA-Vakzinzusammensetzungen und -dosen, wie in Tabelle 14 angegeben, vakziniert (siehe z.B. Gruppe E und F). Als Negativkontrollen wurde eine Gruppe von Hamstern nicht behandelt und mock-infiziert (mit Puffer) (Gruppe A); einer anderen Gruppe wurde NaCl als Pufferkontrolle injiziert. Als Positivkontrolle wurde Gruppe C am Tag 0 intranasal mit 10^2 TCID50/Dosis des SARS-Cov-2-Isolats BetaCoV/Munich/BavPat1/2020 (enthaltend eine D614G-Substitution) in 0,1 ml infiziert. Als zusätzliche Positivkontrolle wurde der Gruppe D intramuskulär 5 µg rekombinantes SARS-CoV-2-Spike-Protein (S1+S2 ECD, His-Tag; Sino Biological, Kat. 40589-V08B1), adjuvantiert in Alhydrogel (Brenntag) 2%, injiziert. Blutproben wurden an Tag 28 („post prime“) sowie an Tag 42 und 56 („post boost“) für die Bestimmung der Antikörpertiter entnommen. Die Tiere wurden am Tag 56 intranasal mit 10^2 TCID50/Dosis SARS-Cov-2 in einem Gesamtdosisvolumen von 0,1 ml herausgefordert. Die Tiere wurden vier Tage lang nach der Challenge („post challenge“, p.c.) beobachtet und am Tag 60 des Experiments euthanasiert.

Tabelle 14: Vakzinierungsschema (Beispiel 9):

Gruppe	**Vakzinzusammensetzung**	**mRNA ID**	**Dosis**	**Vakzinierung d=Tag**	**CDS opt.**	**SEQ ID NO: Protein**	**SEQ ID NO: RNA**
A	Unbehandelt/mock-infiziert						
B	NaCl			d0, d28	- -	- -	- -
C	SARS-CoV-2-infiziert		10^2 $TCID_{50}$	d0	- -	- -	- -
D	Positivkontrolle (Alaunadjuvantiertes S-Protein)		1,5 µg	d0, d28	- -	- -	- -
E	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs (CVnCoV)	R9515	2 µg	d0, d28	opt1	10	163
F	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs (CVnCoV)	R9515	10 µg	d0, d28	opt1	10	163

Antikörper-Analyse

[0792] Blutproben wurden an Tag 28, 42 und 56 für die Bestimmung der gesamten IgG-Antikörper mittels ELISA entnommen. Die Platten wurden mit 1 µg/ml SARS-CoV-2-Spike-S- (extrazelluläre Domäne) Protein für 4-5 Stunden bei 37 °C beschichtet. Die Platten wurden über Nacht in 10%iger Milch geblockt, gewaschen und mit Serum für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Detektion wurden Hamsterseren mit Biotin-Ziegen-Anti-(syrischer)Hamster-IgG-Antikörper (BioLegend, Kat: 405601) inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit HRP-Streptavidin (BD, Kat: 554066). Die Detektion der spezifischen Signale erfolgte in einem BioTek SynergyHTX-Plattenlesegerät mit einer Anregung von 530/25, einer Emission von 590/35 und einer Empfindlichkeit von 45. IgG-Antikörpertiter via ELISA für infizierte Tiere (Gruppe C) wurden nicht analysiert.

[0793] Virus-neutralisierende Antikörpertiter (VNT) von Hamsterserumproben wurden nach Hitzeinaktivierung der Proben für 30 Minuten bei 56 °C analysiert. Dreifache, serielle Zweifachverdünnungen wurden mit 10^2 TCID50/Well SARS-CoV-2 Virus (mit der Mutation D614G) für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, was zu einer Probenausgangsverdünnung von 1:10 führte. Die Virus-Serum-Gemische wurden in 96-Well-Platten mit Vero E6-Zellkultur-Monolayern überführt und für fünf Tage bei 37 °C inkubiert. Die Platten wurden dann

mit dem Vitalitätsmarker WST8 ausgewertet und die (100% Endpunkt-) VN-Titer wurden nach dem von Reed & Muench beschriebenen Verfahren berechnet.

Viruslast im Respirationstrakt

[0794] Es wurden nachweisbare Mengen replikationskompetenter Viren in Rachenabstrichen, Lungen- und Nasenmuschelgeweben nach der Challenge analysiert. 10-fache serielle Verdünnungen in vierfacher Ausführung wurden auf 96-Well-Platten mit Vero E6-Zellkulturmonolayern überführt und eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Die Zellmonolayer wurden gewaschen und danach für fünf Tage bei 37 °C inkubiert. Die Platten wurden dann mit dem Vitalitätsmarker WST8 ausgewertet, und die viralen Titer (Log10 TCID50/ml oder /g) wurden mit dem Verfahren von Spearman-Karber berechnet.

Histopathologie nach Challenge bei Hamstern

[0795] Die histopathologische Analyse wurde an Geweben durchgeführt, die am Tag 4 nach der Challenge entnommen wurden. Nach der Fixierung mit 10% Formalin wurden die Schnitte in Paraffin eingebettet, und die Gewebeschnitte für die histologische Untersuchung wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Die histopathologische Beurteilung wird wie folgt bewertet: Alveolitis-Schweregrad, Bronchitis/Bronchiolitis-Schweregrad: 0 = keine inflammatorischen Zellen, 1 = wenige inflammatorische Zellen, 2 = moderate Anzahl inflammatorischer Zellen, 3 = viele inflammatorische Zellen. Ausmaß der Alveolitis, 0 = 0%, 1 = <25%, 2 = 25-50%, 3 = >50%. Vorhandensein eines alveolären Ödems, einer alveolären Blutung, einer Typ-II-Pneumozytenhyperplasie, 0 = nein, 1 = ja. Ausmaß der peribronchialen/perivaskulären Manschette, 0 = keine, 1 = 1-2 Zellen dick, 2 = 3-10 Zellen dick, 3 = >10 Zellen dick.

Ergebnisse

[0796] Wie in **Fig. 12A** gezeigt, entwickelten Hamster, die mit zwei CVnCoV-Dosen von 2 µg oder 10 µg im Abstand von 4 Wochen vakziniert worden waren, nach der ersten Vakzinierung dosisabhängige S-bindende IgG-Antikörper, die nach der zweiten Vakzinierung anstiegen. Die mittleren Endpunkttiter der mit 10 µg CVnCoV vakzinierten Tiere lagen nach einer Dosis bei $1{,}6 \times 10^5$ und erreichten am Tag 42 einen Spitzenwert von $7{,}8 \times 10^5$. Die IgG-Antikörpertiter via ELISA für infizierte Tiere (Gruppe C) wurden nicht analysiert.

[0797] Wie in **Fig. 12B** gezeigt, waren nachweisbare VNT-Niveaus 28 Tage nach der ersten Vakzinierung vorhanden. Die VNT-Niveaus stiegen nach der zweiten Immunisierung in beiden Dosisgruppen (Gruppe E und F), die an Tag 42 und Tag 56 der Studie analysiert wurden, an. Das für diesen Test verwendete Virus wies die D614D-Mutation auf, während CVnCoV-kodiertes S_stab diese Mutation nicht enthält. Bemerkenswert ist, dass eine Kontrollgruppe, die Alaunadjuviertes SECD-Protein erhielt, IgG-Antikörper entwickelte, ohne nachweisbare Mengen an VNTs zu induzieren.

[0798] Am Tag 56, vier Wochen nach der zweiten Vakzinierung, wurden alle Tiere mit SARS-CoV-2 in der Variante D614G (10^2 TCID50/Dosis) herausgefordert. Bei Puffer-Kontrolltieren zeigten die Konzentrationen replikationskompetenter Viren aus Rachenabstrichen, die täglich von Tag 56 bis zur Beendigung am Tag 60 entnommen wurden, zwei Tage nach der Challenge Spitzentiter von etwa 10^3 TCID50/ml, die am Tag 60 auf nahezu nicht nachweisbare Werte zurückgingen. Tiere, die zuvor mit SARS-CoV-2 infiziert waren, blieben während des gesamten Experiments negativ. In den Rachenabstrichen beider CVnCoV-vakzinierter Gruppen waren die Virusmengen signifikant reduziert. Die Vakzinierung mit 10 µg CVnCoV führte zu signifikant verminderten und verzögerten viralen Spitzenwerten bei $10^{1,5}$TCID50/ml drei Tage nach der Challenge. Mindestens 2 von 5 Tieren in dieser Gruppe blieben während des gesamten Testzeitraums negativ (siehe **Fig. 12C**).

[0799] Die Virusmengen in den Nasenmuscheln zeigten eine weniger ausgeprägte, aber nachweisbare dosisabhängige Reduktion der viralen Replikation (**Fig. 12D**). Wichtig ist, dass Tiere, die mit 10 µg CVnCoV vakziniert wurden, keine nachweisbaren Virusmengen in der Lunge aufwiesen, was die Fähigkeit von CVnCoV beweist, Tiere vor der Virusreplikation in den unteren Atemwegen zu schützen (**Fig. 12E**).

[0800] Histopathologische Analysen zeigten das Auftreten von Alveolarschäden und Entzündungen der Alveolen, Bronchien und Trachea in der Puffer-Kontrollgruppe nach einer SARS-CoV-2-Infektion. In Übereinstimmung mit dem Schutz vor der viralen Replikation in der Lunge reduzierte CVnCoV die histopathologischen Veränderungen nach zwei Vakzinierungen mit 10 µg signifikant. Wichtig ist, dass eine Dosis von 2 µg, die zwar zur Induktion von bindenden Antikörpern führte, aber nur geringe Niveaus an VNTs auslöste, keine erhöhten histopathologischen Werte induzierte. Gruppenvergleiche bezüglich differentieller Genexpression

in Lungenhomogenaten zeigten keine signifikante Veränderung in der Induktion von IL-4 oder IL-5 in den mRNA-Gruppen im Vergleich zu Puffer- oder Mock-Infektionsgruppen (Daten nicht gezeigt). Daher schlussfolgern die Erfinder, dass auch unter Bedingungen, bei denen eine durchschlagende Virusreplikation stattfindet, CVnCoV keine verstärkte Erkrankung im Hamster induziert (z.B. durch Antikörperabhängige Verstärkung). Die vorgelegten Daten zeigen, dass die Vakzinierung mit einer Alaunadjuvantierten Proteinvakzine, die keine nachweisbaren Niveaus an VNT, aber hohe Konzentrationen bindender Antikörper hervorruft, erhöhte Histopathologie-Scores in Hamstern verursacht (**Fig. 12F**, Tabelle 14).

Tabelle 15: Liste der histopathologischen Analysen, die in Figur 12F angegeben sind.-

	Histopathologische Analyse
1	Ausmaß der Alveolitis/alveolären Schädigung
2	Schweregrad der Alveolitis
3	Summe aus Ausdehnung + Schweregrad Alveolitis
4	Vorliegen eines alveolären Ödems
5	Vorliegen einer alveolären Blutung
6	Vorliegen einer Typ-II-Pneumozytenhyperplasie
7	Schweregrad der Bronchitis
8	Schweregrad der Bronchiolitis
9	Grad der peribronchialen/perivaskulären Manschettenbildung
10	Schweregrad der Tracheitis
11	Schweregrad der Rhinitis

[0801] In Übereinstimmung mit robusten Immunantworten schützte CVnCoV Hamster vor einer SARS-CoV-2-Virus-Challenge mit der D614G-Mutation in S, was die Fähigkeit von CVnCoV beweist, gegen die am weitesten verbreitete Form des Virus zu schützen. Diese Experimente zeigten eine signifikante Reduktion der replizierenden Virusmengen in den oberen Atemwegen und die Abwesenheit von nachweisbarem Lebendvirus in der Lunge der Tiere nach zwei Vakzinierungen mit 10 µg CVnCoV.

Beispiel 10: Klinische Entwicklung einer SARS-CoV-2 mRNA-Vakzinzusammensetzung

[0802] Um die Sicherheit und Immunogenität der mRNA-Vakzinzusammensetzung(en) nachzuweisen, wurden klinische Studien (Phase 1, 2a) initiiert. In der klinischen Studie der Phase 1 wurde Kohorten von Freiwilligen (18-60 Jahre) mindestens zweimal (z.B. an Tag 1 und Tag 29) intramuskulär eine Dosis von 2 µg, 4 µg, 8 µg, 12 µg, 16 µg oder 20 µg mRNA, die für das SARS-CoV-2-Spike-Protein (R9515, SEQ ID NO: 163) kodiert und in LNPs (wie in Beispiel 1.4 beschrieben) gemäß der Erfindung formuliert ist (CVnCoV), injiziert. Um das Sicherheitsprofil der erfindungsgemäßen Vakzinzusammensetzungen zu beurteilen, werden die Probanden nach der Verabreichung überwacht (Vitalparameter, Bewertungen der Impfstelle und der systemischen Reaktogenität, hämatologische Analysen). Die Immunogenität der Immunisierung wird durch die Bestimmung von Antikörpern gegen SARS-CoV-2, Virus-neutralisierenden Titern (VNT) und SARS-CoV-2 spezifischen T-Zellen in Seren von vakzinierten Probanden analysiert. Die Blutproben werden an Tag 1 als Ausgangswert (Baseline), nach jeder Vakzinierung und während der langfristigen Verlaufskontrolle entnommen.

Kohorten:

		2 µg	**4 µg**	**6 µg**	**8 µg**	**12 µg**	**16 µg**	**20 µg**	**gesamt**
N	Seronegativ	46	46	46	46	24	12	12	232
N	Seropositiv	10	10	10	6	4	1		41
gesamt N	CVnCoV + Placebo	56	56	56	52	28	13	12	273

[0803] An Tag 8, Tag 15, Tag 29, Tag 36, Tag 43, Tag 57, Tag 120, Tag 211 und Tag 393 wurde folgendes bestimmt:

a.) Der Anteil der Probanden, die bezüglich SARS-CoV-2-Spike-Protein-Antikörper serokonvertieren, gemessen mittels ELISA.

[0804] Bei Probanden, die vor der Studie oder während der Studie, bevor die entsprechende Probe entnommen wurde, nicht SARS-CoV-2 exponiert waren, gemessen mittels ELISA auf SARS-CoV-2 N-Antigen, wird Serokonversion definiert als Anstieg des Titers der Antikörper gegen SARS-CoV-2-Spike-Protein gegenüber dem Ausgangswert (Baseline).

[0805] Bei Probanden, die zu Studienbeginn seropositiv für SARS-CoV-2 waren, ist die Serokonversion definiert als ein 2-facher Anstieg des Titers der Antikörper gegen das SARS-CoV-2-Spike-Protein gegenüber dem Ausgangswert.

b.) Individuelle SARS-CoV-2-Spike-Protein-spezifische Antikörperspiegel im Serum, gemessen mittels ELISA.

c.) Geometrische mittlere Titer (GMTs) von SARS-CoV-2-Spike-Protein-Antikörpern im Serum, gemessen mittels ELISA, bei Probanden, die vor der Studie oder während der Studie nicht SARS-CoV-2 exponiert wurden, bevor die entsprechende Probe entnommen wurde, gemessen mittels ELISA auf SARS-CoV-2-N-Antigen.

d.) Der Anteil der Probanden, die bezüglich SARS-CoV-2 neutralisierender Antikörper serokonvertieren, gemessen durch einen Aktivitätsassay.

[0806] Bei Probanden, die vor der Studie oder während der Studie nicht SARS-CoV-2 exponiert waren, gemessen mittels ELISA auf SARS-CoV-2 N-Antigen, wird die Serokonversion als Anstieg des Titers der neutralisierenden SARS-CoV-2-Antikörper gegenüber dem Ausgangswert (Baseline) definiert.

[0807] Bei Probanden, die zu Studienbeginn seropositiv für SARS-CoV-2 waren, ist die Serokonversion definiert als ein 2-facher Anstieg des Titers der neutralisierenden SARS-CoV-2-Antikörper gegenüber dem Ausgangswert.

e.) Individuelle SARS-CoV-2 neutralisierende Antikörperspiegel im Serum.

f.) GMTs der neutralisierenden SARS-CoV-2-Antikörper im Serum, gemessen mit einem Aktivitätsassay, bei Probanden, die vor der Studie oder während der Studie vor der Entnahme der entsprechenden Probe nicht SARS-CoV-2 exponiert waren, gemessen mittels ELISA auf SARS-CoV-2-N-Antigen.

Zellvermittelte Immunantwort

[0808] An Tag 29, Tag 36 und Tag 211 wurde in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) aller Probanden an den zugewiesenen Standorten Folgendes bestimmt:

a.) Die Häufigkeit und Funktionalität der SARS-CoV-2-Spike-spezifischen T-Zell-Antwort nach Antigenstimulation.

b.) Intrazelluläre Zytokinfärbung (ICS) zur Untersuchung der Th1-Antwort und der Produktion von Th2-Markern

c.) Der Anteil der Probanden mit einem nachweisbaren Anstieg der SARS-CoV-2-Spike-spezifischen T-Zell-Antwort.

Angeborene Immunantwort

[0809] An Tag 2, Tag 8, Tag 29, Tag 30 und Tag 36 wurde bei allen Open-Label-Sentinel-Probanden Folgendes bestimmt:

a.) Zytokin-Konzentrationen im Serum, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Interferon (IFN)-α, IFN-γ, Interleukin (IL)-6, Chemokin-Ligand (CCL) 2 und IFN-γ-induziertes Protein 10 (IP 10).

b.) Genexpressionsprofiling

Auswertung der Infektion

a.) Bestimmung der Anzahl der Probanden mit virologisch bestätigter SARS-CoV-2-Infektion, gemessen durch Reverse-Transkriptase (RT)-PCR zu klinischen Zeitpunkten während der Studie.

b.) Bestimmung der Anzahl der Probanden mit asymptomatischer SARS-CoV-2-Infektion, gemessen durch retrospektive Serologie zu vordefinierten Zeitpunkten.

Virus-Neutralisation:

[0810] Die neutralisierende Aktivität der induzierten Antikörper wurde mit einem auf dem zytopathischen Effekt (CPE) basierenden Mikro-Neutralisierungs-Assay bestimmt, bei dem 50% CPE bei einer viralen infektiösen Dosis 25 (MN 25 TCID50/Well) unter Verwendung eines Wildtyp-Virusstammes (SARS-CoV-2 2019 nCOV ITALY/INMI1) auf einer VERO E6-Zelllinie betrachtet wurde. Die Assays wurden in einem 96-Well-Plattenformat durchgeführt, Humanserum wurde in einer 1 :2-Verdünnungsreihe verdünnt. Der Mikro-Neutralisationstiter ist der Kehrwert der höchsten Probenverdünnung, die mindestens 50% der Zellen vor CPE schützt und wird als geometrisches Mittel von doppelten Ausführungen angegeben.

ELISA:

[0811] Antikörpertiter wurden mit ELISA-Assays gemessen, wobei als Zielantigen entweder die extrazelluläre Domäne (ECD) von Spike oder die Rezeptorbindungsdomäne (RBD) verwendet wurde. Die für die Beschichtung verwendeten rekombinanten Antigenproteine wurden in eukaryotischen Zellen exprimiert. Humanes Serum wurde in einer seriellen Verdünnung 1:2 verdünnt, der Titer ist der Kehrwert der höchsten Probenverdünnung über einem als Blank-plus-Matrix-Effekt definierten Cut-Point. Die Titer werden als geometrisches Mittel von doppelten Ausführungen angegeben.

T-Zell-Antworten:

[0812] Als explorativer Endpunkt dieser klinischen Studie wurden die zellvermittelten Immunantworten durch Bewertung der Häufigkeit und Funktionalität von SARS-CoV-2-Spike-spezifischen $CD4^+$-Th1- und zytotoxischen $CD8^+$-T-Zell-Antworten nach Antigenstimulation bewertet. Außerdem wurde der Anteil der Probanden mit einem nachweisbaren Anstieg der SARS-CoV-2-Spike-spezifischen T-Zell-Antworten nach der Vakzinierung bestimmt.

[0813] Funktionale T-Zell-Antworten wurden ex vivo mittels auf Durchflusszytometrie basierender intrazellulärer Zytokinfärbung (ICS) von T-Zell-Aktivierungsmarkern und Effektorzytokinen (CD40L, IFN-gamma, IL-2 und TNF-alpha) nach Stimulation von SARS-CoV-2-Spike-spezifischen $CD4^+$-Th1- und zytotoxischen $CD8^+$-T-Zellen mit überlappenden Spike-Peptidpools bestimmt und quantifiziert.

Ergebnisse:

[0814] In **Fig. 13A** sind systemische unerwünschte Ereignisse in den verschiedenen Dosis-Kohorten nach der ersten Dosis und nach der zweiten Dosis dargestellt.

[0815] In **Fig. 13B** sind lokale unerwünschte Ereignisse in den verschiedenen Dosis-Kohorten nach der ersten Dosis und nach der zweiten Dosis dargestellt.

[0816] In **Fig. 13C** sind die spezifischen systemischen unerwünschten Ereignisse, wie zum Beispiel Müdigkeit, Kopfschmerzen, Myalgie, Schüttelfrost, Arthralgie, Fieber, Übelkeit und Diarrhö, dargestellt.

[0817] In **Fig. 13D** sind die spezifischen lokalen unerwünschten Ereignisse, wie zum Beispiel Schmerz, Juckreiz, Schwellung und Rötung, dargestellt.

[0818] Zusammenfassend zeigte die CvnCoV-Vakzine gute Sicherheitseigenschaften und eine akzeptable Reaktogenität.

[0819] In **Fig. 13E** ist die Induktion von Spike-Protein-spezifischen IgG-Antikörpern an Tag 1, 29, 36, 43 und 57 für die verschiedenen Dosis-Kohorten dargestellt. Alle vakzinierten Probanden zeigten eine gute Induktion von Spike-spezifischen Antikörpern, wobei die 12-µg-Kohorte die gleiche Menge an Antikörpern zeigte wie serokonvertierte Patienten (HCS). In der Tabelle von **Fig. 13E** ist der Prozentsatz der Serokonversion der

vakzinierten Probanden dargestellt. In den meisten Fällen zeigten mehr als 90% der vakzinierten Probanden an Tag 43 einen mehr als 2-fachen Anstieg der Spike-Protein-spezifischen Antikörper im Vergleich zum Ausgangswert (Baseline). In allen Dosis-Gruppen zeigten mindestens 70% der vakzinierten Probanden einen mehr als 4-fachen Anstieg der Spike-Protein-spezifischen Antikörper im Vergleich zur Baseline. In der 12-µg-Dosis-Gruppe zeigten sogar mehr als 90% der Probanden einen mehr als 4-fachen Anstieg der Antikörper.

[0820] In **Fig. 13F** ist die Induktion von RBD-spezifischen IgG-Antikörpern an Tag 1, 36 und 43 für die verschiedenen Dosis-Kohorten dargestellt. Alle vakzinierten Probanden zeigten eine gute Induktion von RBD-spezifischen Antikörpern, wobei die 12-µg-Kohorte die gleiche Menge an Antikörpern aufwies wie serokonvertierte Patienten (HCS). In der Tabelle von **Fig. 13F** ist der Prozentsatz der Serokonversion der vakzinierten Probanden dargestellt. In den meisten Fällen zeigten mehr als 80% der vakzinierten Probanden an Tag 43 einen mehr als 2-fachen Anstieg der RBD-spezifischen Antikörper im Vergleich zur Baseline. In der 8-µg- und der 12-µg-Gruppe zeigten mehr als 80% der Probanden einen mehr als 4-fachen Anstieg der Antikörper.

[0821] In **Fig. 13G** ist die Induktion von Virus-neutralisierenden Antikörpern dargestellt. Alle Dosisgruppen zeigten eine gute Induktion von Virus-neutralisierenden Titern, wobei die höchste Dosis von 12 µg das gleiche Niveau an neutralisierenden Antikörpern induzierte, wie es bei serokonvertierten Patienten (HCS) vorliegt. In der Tabelle von **Fig. 13G** ist der Prozentsatz der Serokonversion der vakzinierten Probanden dargestellt. In allen Dosisgruppen zeigten mehr als 70% der vakzinierten Probanden am Tag 43 einen mehr als 2-fachen Anstieg der Virus-neutralisierenden Antikörper im Vergleich zur Baseline. In den 8-µg- und 12-µg-Dosis-Gruppen zeigten mindestens 70% der vakzinierten Probanden einen mehr als 4-fachen Anstieg der Virus-neutralisierenden Antikörper im Vergleich zur Baseline. In der 12-µg-Gruppe zeigten sogar 100% der Probanden einen mehr als 4-fachen Anstieg der Virus-neutralisierenden Antikörper.

[0822] In **Fig. 13H** sind die Verhältnisse der Mengen der Spike-Protein- bzw. RBD-bindenden Antikörper zur Menge der neutralisierenden Antikörper dargestellt. Wichtig ist, dass das Verhältnis der induzierten CVnCoV-Antikörper in etwa dem von rekonvaleszenten Probanden entspricht, was bedeutet, dass die induzierte Menge an Antikörpern ausreicht, um SARS-CoV-2 zu neutralisieren.

[0823] **Fig. 13I** zeigt die Induktion von $CD4^+$-T-Zellen gegen Spike-Protein S1 nach der ersten Dosis (Tag 29) und der zweiten Dosis (Tag 36). Beide Dosisgruppen (4 µg und 8 pg) zeigen eine gute Induktion von $CD4^+$-T-Zellen gegen Spike-Protein S1.

[0824] **Fig. 13J** zeigt die Induktion von $CD4^+$-T-Zellen gegen Spike-Protein S2 nach der ersten Dosis (Tag 29) und der zweiten Dosis (Tag 36). Beide Dosisgruppen (4 µg und 8 µg) zeigen eine gute Induktion von $CD4^+$-T-Zellen gegen Spike-Protein S, vergleichbar mit rekonvaleszenten Patienten.

[0825] In **Fig. 13K** ist die Induktion von Virus-neutralisierenden Titern bei SARS-CoV-2 seropositiven Probanden (oberer Teil) nach Vakzinierung mit 2 µg (links) und 4 µg (rechts) CvnCoV dargestellt. Bemerkenswerterweise konnten in beiden Dosisgruppen Virus-neutralisierende Antikörper bei seropositiven Patienten, die bereits Virus-neutralisierende Antikörper exprimieren, erhöht (geboostet) werden konnten.

[0826] Im unteren Teil ist die Induktion von RBD-spezifischen Antikörpern bei SARS-CoV-2 seropositiven Probanden nach Vakzinierung mit 2 µg (links) und 4 µg (rechts) CvnCoV dargestellt. Bemerkenswert ist, dass die RBD-spezifischen Antikörper in beiden Dosisgruppen bei seropositiven Patienten, die bereits RBD-spezifische Antikörper exprimieren, erhöht werden.

Beispiel 11: Vakzinierung von Mäusen mit mRNA kodierend für das SARS-CoV-2-Antigen S_stab, formuliert in LNPs

[0827] Das vorliegende Beispiel zeigt, dass SARS-CoV-2-S-mRNA-Vakzine mit mRNA, die alternative Formen des 3'-Endes (A64-N5-C30-hSL-N5 oder hSL-A100) und UTR-Kombinationen (i-3 (-/muag) oder a-1 (HSD17B4/PSMB3)) umfassen, eine starke humorale wie auch zelluläre Immunantwort in Mäusen induzieren. Die für SARS-CoV-2-S_stab kodierende mRNA umfassend hSL-A100 und die UTR-Kombination a-1 (HSD17B4/PSMB3) zeigt eine stärkere Induktion von Immunantworten, die sich in einer stärkeren Induktion von bindenden und neutralisierenden Antikörpern sowie einer stärkeren Induktion von $CD8^+$-T-Zellen zeigt.

Herstellung der LNP-formulierten mRNA-Vakzine:

[0828] SARS-CoV-2-S-mRNA-Konstrukte wurden wie in Beispiel 1 (RNA-in-vitro-Transkription) beschrieben hergestellt. HPLC-gereinigte mRNA wurde mit LNPs gemäß Beispiel 1.4 formuliert.

Immunisierung:

[0829] Weiblichen BALB/c-Mäusen (6-8 Wochen alt, n = 8) wurden intramuskulär (i.m.) mRNA-Vakzinzusammensetzungen in den in Tabelle 16 angegebenen Dosierungen injiziert. Als Negativkontrolle wurde eine Gruppe von Mäusen mit Puffer vakziniert. Alle Tiere wurden an Tag 0 und 21 vakziniert. Blutproben wurden an Tag 21 („post prime“) und 42 („post boost“) zur Bestimmung der Antikörpertiter entnommen, Splenozyten wurden an Tag 42 zur T-Zell-Analyse isoliert.

Tabelle 16: Vakzinierunssschema (Beispiel 11):

Group	**Vakzinzusammensetzung**	**mRNA ID**	**CDS opt.**	**5'-UTR/ 3'-UTR; UTR-Design**	**3'-Ende**	**SEQ ID NO: Protein**	**SEQ ID NO: RNA**	**Dosis**
A	Puffer	-	-			-	-	-
B	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9515	opt1	-/muag;	A64-N5-C30-hSL-N5	10	163	1 µg
C	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9709	opt1	HSD17B4/ PSMB3	hSL-A100	10	149	1 µg

[0830] Die Bestimmung der IgG1- und IgG2-Antikörpertiter mittels ELISA, die Bestimmung der Virus-neutralisierenden Titer mittels CPE (cytopathischer Effekt) und die T-Zell-Analyse mittels Intrazellulärer Zytokinfärbung (ICS) wurden wie in Beispiel 6 beschrieben durchgeführt.

Ergebnisse:

[0831] Wie in **Fig. 14A** gezeigt, induzierte die Vakzinierung mit mRNA, die für das stabilisierte Volllängen-S-Protein (S_stab) kodiert, hohe Titer von S-spezifisch bindenden Antikörpern (IgG1 und IgG2a) nach einer einzigen Vakzinierung (Tag 21). Die Titer stiegen nach einer zweiten Vakzinierung (d42) an. Eine Vakzinzusammensetzung umfassend mRNA, die für SARS-CoV-2 S_stab, umfassend hSL-A100 und die UTR-Kombination a-1 (HSD17B4/PSMB3) (Gruppe C), kodiert, zeigte eine verbesserte und stärkere Induktion von bindenden Antikörpern (gezeigt durch IgG1- und IgG2a-Endpunkttiter).

[0832] Beide mRNA-Designs induzierten nach der zweiten Vakzinierung (Tag 42) mehr oder weniger vergleichbare Virus-neutralisierende Antikörpertiter, wobei die Mäuse der Gruppe C im Vergleich zur Gruppe B bereits an Tag 21 nach der ersten Vakzinierung einen erhöhten VNT-Spiegel aufwiesen (dargestellt in **Fig. 14B**).

[0833] Wie in **Fig. 14C** gezeigt, induzierte die Vakzinierung mit mRNA, die für das stabilisierte Volllängen-S-Protein mit beiden alternativen Formen des 3'-Endes (A64-N5-C30-hSL-N5 oder hSL-A100) und UTR-Kombinationen (i-3 (-/muag) oder a-1 (HSD17B4/PSMB3)) kodiert, nach zwei Vakzinierungen robuste Konzentrationen von Antigen-spezifischenCD4$^+$-und CD8$^+$-IFNγ/TNF-doppelt-positiven T-Zellen. Die Vakzinzusammensetzung, die mRNA kodierend für SARS-CoV-2 S_stab mit hSL-A100 und der UTR-Kombination a-1 (HSD17B4/PSMB3) umfasst (Gruppe C), zeigte überraschenderweise eine deutlich stärkere Induktion von CD8$^+$-IFNγ/TNFdoppelt-positiven T-Zellen.

Beispiel 12: Vakzinierung von Ratten mit mRNA kodierend das SARS-CoV-2-Antigen S stab formuliert in LNPs

[0834] Das vorliegende Beispiel zeigt, dass SARS-CoV-2-S-mRNA-Vakzine mit mRNA, die die erfindungsgemäße alternative Form des 3'-Endes (hSL-A100) und die UTR-Kombination (a-1 (HSD1 7B4/PSMB3)) umfasst, eine starke humorale Immunantwort in Ratten induzieren.

Herstellung einer LNP-formulierten mRNA-Vakzine:

[0835] SARS-CoV-2-S-mRNA-Konstrukte wurden wie in Beispiel 1 beschrieben (RNA-in-vitro-Transkription) hergestellt. HPLC-gereinigte mRNA wurde mit LNPs gemäß Beispiel 1.4 formuliert, bevor sie in In-vivo-Vakzinierungexperimenten verwendet wurde.

Immunisierung:

[0836] Ratten wurden intramuskulär (i.m.) mRNA-Vakzinzusammensetzungen und Dosen wie in Tabelle 17 angegeben injiziert. Als Negativkontrolle wurde eine Gruppe von Ratten mit Puffer vakziniert (Gruppe A). Alle Tiere wurden an Tag 0 und Tag 21 vakziniert. Blutproben wurden an Tag 21 („post prime“) und 42 („post boost“) für die Bestimmung der Antikörpertiter entnommen.

Tabelle 17: Vakzinierungsschema (Beispiel 12):

Gruppe	**Vakzinzusammensetzung**	**mRNA ID**	**CDS opt.**	**5'-UTR/ 3'-UTR; UTR-Design**	**3'-Ende**	**SEQ ID NO: Protein**	**SEQ ID NO: RNA**	**Dosis**
A	Puffer	-	-			-	-	-
B	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9709	opt1	HSD17B4/ PSMB3	hSL-A100	10	149	0,5 µg
C	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9709	opt1	HSD17B4/ PSMB3	hSL-A100	10	149	2 µg
C	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9709	opt1	HSD17B4/ PSMB3	hSL-A100	10	149	8 µg

Bestimmung von IgG1- und IgG2-Antikörpertitern mittels ELISA:

[0837] Der ELISA wurde unter Verwendung von rekombinantem SARS-CoV-2-S- (Rezeptor-bindende Domänen, RBD) Protein zur Beschichtung durchgeführt. Die beschichteten Platten wurden mit den entsprechenden Serumverdünnungen inkubiert, und die Bindung der spezifischen Antikörper an SARS-CoV-2-S wurde direkt mit markierten HRP-Antikörpern anstelle eines sekundären HRP-Antikörpers, der für den Maus-ELISA verwendet wurde, nachgewiesen. Die fehlende Signalverstärkung im Ratten-ELISA könnte für niedrigere Titer verantwortlich sein, daher sind die ELISA-Titer zwischen Ratten- und Mausstudien derzeit nicht vergleichbar.

Bestimmung von Virus-neutralisierenden Antikörpertitern (VNT)

[0838] Die Virus-neutralisierenden Antikörpertiter (VNT) von Ratten-Serumproben wurden wie zuvor in Beispiel 6 beschrieben mit Mausserum analysiert.

Ergebnisse:

[0839] Wie in **Fig. 15A** gezeigt, induzierte die Vakzinierung mit stabilisierter Vollängen-S-Protein-mRNA umfassend die alternative nicht-kodierende Region mit dem 3'-Ende hSL-A100 und die UTR-Kombination a-1 (HSD17B4/PSMB3), formuliert in LNPs, bei Ratten robuste und dosisabhängige Werte der bindenden Antikörpertiter am Tag 21 nach der ersten Vakzinierung und am Tag 42 nach der zweiten Vakzinierung unter Verwendung von Dosen von 0,5 µg, 2 µg und 8 µg. Die zweite Vakzinierung führte zu einem weiteren Anstieg der Antikörper-Titer.

[0840] Wie in **Fig. 15B** gezeigt, induzierte die Vakzinierung mit mRNA, umfassend die alternative und erfindungsgemäße nicht-kodierende Region mit dem 3'-Ende hSL-A100 und die UTR-Kombination a-1 (HSD17B4/PSMB3), die für das stabilisierte Volllängen-S-Protein kodiert und in LNPs formuliert ist, bei Ratten dosisabhängige und sehr hohe VNT-Niveaus. Die humoralen Immunantworten, die durch ELISA (bindende Antikörper IgG1 und IgG2a) und VNTS gezeigt wurden, sind bemerkenswert erhöht im Vergleich zu den Immunantworten, die mit mRNA hervorgerufen wurden, die die nicht-kodierende Region mit dem 3'-Ende A64-N5-C30-hSL-N5 und die UTR-Kombination i-3 (-/muag) umfasst (siehe zum Vergleich Beispiel 8 **Fig. 11A-F**).

Beispiel 13: Klinische Entwicklung der SARS-CoV-2- (CVnCoV-) Vakzine

1 VERSUCHSPROTOKOLL FÜR DIE HUMANVAKZINIERUNG

2 ÜBERBLICK

[0841] Die Studie ist als pivotale Phase 2b/3- Wirksamkeits- und Sicherheits-Pivotstudie zur bei Erwachsenen ab 18 Jahren konzipiert. Die Studie hat ein randomisiertes, Beobachterverblindetes, placebokontrolliertes Design. Die Probanden werden an mehreren Standorten weltweit rekrutiert und in einem Verhältnis von 1:1 randomisiert, um in einem 2-Dosis-Schema entweder CVnCoV in einer Dosierung von 12 µg mRNA oder Placebo (normale Kochsalzlösung (0,9% NaCl)) als Kontrolle zu erhalten.

3 VERLÄNGERUNG

[0842] Nach Beendigung der Studie CV-NCOV-004 am Tag 393 nehmen die Probanden weiterhin an einer einjährigen Verlängerung der Studie teil. Zum Zeitpunkt der Einwilligung in die Studie CV-NCOV-004 willigen die Probanden auch in die Teilnahme an der 1-Jahres-Verlängerung ein. In der Verlängerungsstudie werden zusätzliche Daten zur Bewertung der Langzeitsicherheit (schwerwiegende unerwünschte Ereignisse (SAEs)), der Persistenz von Antikörpern gegen SARS-CoV-2 und des Auftretens von COVID-19-Fällen gesammelt, um die Dauer der Vakzineffizienz (VE) zu bewerten.

4 STUDIENZIELE, ENDPUNKTE UND SCHÄTZUNGEN

4.1 Zielsetzungen

4.1.1 Primäre Zielsetzungen

[0843] Co-Primäre Wirksamkeitsziele

• Nachweis der Wirksamkeit eines 2-Dosis-Schemas von CVnCoV bei der Prävention erster Episoden virologisch bestätigter Fälle von COVID-19 jeglichen Schweregrades bei SARS-CoV-2-naiven Probanden.

• Nachweis der Wirksamkeit eines 2-Dosis-Schemas von CVnCoV bei der Prävention erster Episoden von virologisch bestätigten moderaten bis schweren Fällen von COVID-19 bei SARS-Cov-2-naiven Probanden.

[0844] Primäre Sicherheitsziele

• Bewertung der Sicherheit von CVnCoV, verabreicht als 2-Dosen-Schema, an Probanden ab 18 Jahren.

4.1.2 Sekundäre Zielsetzungen

[0845] Wesentliche sekundäre Wirksamkeitsziele

• Nachweis der Wirksamkeit eines 2-Dosis-Schemas von CVnCoV bei der Prävention erster Episoden von virologisch bestätigten schweren Fällen von COVID-19 bei SARS-CoV-2-naiven Probanden.

• Nachweis der Wirksamkeit eines 2-Dosis-Schemas von CVnCoV bei der Prävention oder Reduktion einer asymptomatischen Infektion mit SARS-CoV-2 bei seronegativen Probanden, gemessen an der Serokonversion gegen das N-Protein des Virus.

Andere sekundäre Wirksamkeitsziele

[0846] Untersuchung bei SARS-CoV-2-naiven Probanden:

• der Wirksamkeit eines 2-Dosis-Schemas von CVnCoV bei der Prävention der ersten Episoden von virologisch bestätigten Fällen von COVID-19 jeglichen Schweregrades bei Probanden ≥ 61 Jahre alt.

• der Wirksamkeit eines 2-Dosis-Schemas von CVnCoV bei der Prävention erster Episoden von virologisch bestätigten Fällen einer SARS-CoV-2-Infektion, mit oder ohne Symptome.

• der Wirksamkeit eines 2-Dosis-Schemas von CVnCoV bei der Reduzierung der Krankheitslast (Bürden of disease, BoD) von COVID-19.

• der Wirksamkeit von CVnCoV nach der ersten Dosis bei der Prävention von ersten Episoden von virologisch bestätigten Fällen von COVID-19 jeglichen Schweregrades.

[0847] Sekundäre Immunogenitäts-Ziele

• Bewertung der Antikörperantworten gegen die RBD des S-Proteins von SARS-CoV-2 nach einer und zwei Dosen von CVnCoV bei einer Untergruppe von Probanden, die an Phase 2b der Studie teilnehmen.

• Bewertung der SARS-CoV-2-Virus-neutralisierenden Antikörperantworten nach einer und zwei Dosen von CVnCoV bei einer Untergruppe von Probanden, die an der Phase 2b der Studie teilnehmen.

[0848] Sekundäres Sicherheitsziel

• Bewertung der Reaktogenität und Verträglichkeit von CVnCoV, verabreicht als 2-Dosen-Schema an Probanden ab 18 Jahren, die an Phase 2b der Studie teilnehmen.

4.1.3 Explorative Ziele

Explorative Wirksamkeitsziele

[0849] Zur Untersuchung bei SARS-CoV-2-naiven Probanden:

• ob Fälle von COVID-19 bei Probanden, die ein 2-Dosis-Schema von CVnCoV erhalten, milder verlaufen als bei Probanden, die Placebo erhalten.

• ob der Bedarf an zusätzlicher Sauerstoffzufuhr aufgrund von COVID-19 bei Probanden, die ein 2-Dosis-Schema von CVnCoV erhalten, im Vergleich zu denjenigen, die Placebo erhalten, reduziert ist.

• ob der Bedarf an zusätzlicher Sauerstoffzufuhr aufgrund von COVID-19 bei Probanden, die ein 2-Dosis-Schema von CVnCoV erhalten, im Vergleich zu Probanden, denen Placebo verabreicht wurde, reduziert ist.

• ob die Hospitalisierung aufgrund von COVID-19 bei Probanden, die ein 2-Dosis-Schema von CVnCoV erhalten, im Vergleich zu denen, die Placebo erhalten, reduziert ist.

• ob die Motilität aufgrund von COVID-19 bei Probanden, die ein 2-Dosis-Schema von CVnCoV erhalten, im Vergleich zu denen, denen Placebo verabreicht wurde, reduziert ist.

• ob die Gesamtmortalität bei Probanden, die ein 2-Dosis-Schema von CVnCoV erhalten, im Vergleich zu denen, denen Placebo verabreicht wurde, reduziert ist.

• um die zellvermittelte Immunantwort (CMI) auf ein 2-Dosis-Schema von CVnCoV bei bis zu 400 Probanden an ausgewählten Standorten zu untersuchen.

[0850] Zur Untersuchung an SARS-CoV-2-naiven und nicht-naiven Probanden:

• der Wirksamkeit eines 2-Dosis-Schemas von CVnCoV bei der Prävention erster Episoden von virologisch bestätigten Fällen von COVID-19 jeglichen Schweregrades bei allen Probanden, unabhängig vom serologischen SARS-CoV-2-Status bei Studienbeginn.

• der Wirksamkeit von CVnCoV nach der ersten Dosis bei der Prävention erster Episoden virologisch bestätigter Fälle von COVID-19 jeglichen Schweregrades bei allen Probanden, unabhängig vom serologischen SARS-CoV-2-Status bei Studienbeginn.

[0851] Zur Untersuchung bei Probanden mit ersten Episoden von virologisch bestätigtem COVID-19 während der Studie:

• des Auftretens zweiter Episoden von COVID-19 bei Probanden, die ein 2-Dosis-Schema von CVnCoV erhalten, im Vergleich zu denen, die Placebo erhalten.

4.2 Endpunkte

4.2.1 Primäre Endpunkte

[0852] Co-Primäre Wirksamkeitsendpunkte

• Auftreten erster Episoden von virologisch bestätigten (Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)-positiven) Fällen von COVID-19 jeglichen Schweregrades, die die Falldefinition für die primäre Wirksamkeitsanalyse erfüllen.

• Auftreten erster Episoden virologisch bestätigter (RT-PCR-positiver) Fälle von moderater bis schwerer COVID-19-Erkrankung, die der Falldefinition für die primäre Wirksamkeitsanalyse entsprechen (moderate und schwere COVID-19-Erkrankung hier definiert).

[0853] Primäre Sicherheitsendpunkte

• Auftreten, Intensität und Verhältnis von medizinisch betreuten AEs, die bis 6 Monate nach der zweiten Studienvakzinierung bei allen Probanden erfasst wurden.

• Auftreten, Intensität und Verhältnis von SAEs und AESIs, die bei allen Probanden bis zu 1 Jahr nach der zweiten Studienvakzinierung erfasst wurden.

• Auftreten von tödlichen SAEs bis 1 Jahr nach der zweiten Studienvakzinierung bei allen Probanden.

4.2.2 Sekundäre Endpunkte

[0854] Wichtige sekundäre Wirksamkeitsendpunkte

• Auftreten von ersten Episoden virologisch bestätigter (RT-PCR-positiver) schwerer COVID-19-Fälle, die der Falldefinition für die primäre Wirksamkeitsanalyse entsprechen (schwere COVID-19-Erkrankung hierin definiert).

• Auftreten einer Serokonversion gegen das N-Protein von SARS-CoV-2 ≥ 15 Tage nach der zweiten Studienvakzinierung bei asymptomatischen seronegativen Probanden. Serokonversion ist definiert als nachweisbare SARS-CoV-2 N-Protein-Antikörper im Serum von Probanden an Tag 211 und/oder Tag 393 der Studie, die an Tag 1 (Studienbeginn) und Tag 43 (d.h. an den beiden Testzeitpunkten früher als 15 Tage nach der zweiten Studienvakzinierung) seronegativ getestet wurden.

[0855] Andere sekundäre Wirksamkeitsendpunkte

• Bei Probanden ≥ 61 Jahre, Auftreten von ersten Episoden virologisch bestätigter (RT-PCR-positiver) Fälle von COVID-19 jeglichen Schweregrades, die der Falldefinition für die primäre Wirksamkeitsanalyse entsprechen.

• Auftreten einer virologisch bestätigten (RT-PCR-positiven) SARS-CoV-2-Infektion, mit oder ohne Symptome.
Wenn der Proband symptomatisch war, muss das Auftreten der Symptome ≥ 15 Tage nach der zweiten Studienvakzinierung erfolgt sein; wenn der Proband asymptomatisch war, muss der positive RT-PCR-Test ≥ 15 Tage nach der zweiten Studienvakzinierung erfolgt sein.

• BoD-Scores berechnet auf Basis der ersten Episoden virologisch bestätigter (RT-PCR-positiver) Fälle von COVID-19 jeglichen Schweregrades, die die Falldefinition für die primäre Wirksamkeitsanalyse erfüllen.

○ BoD #1 - keine Erkrankung (nicht infiziert oder asymptomatische Infektion) = 0; leichte oder moderate Erkrankung = 1; schwere Erkrankung = 2.

○ BoD #2 - keine Erkrankung (nicht infiziert oder asymptomatische Infektion) = 0; Erkrankung ohne Hospitalisierung = 1; Erkrankung mit Hospitalisierung = 2; Tod = 3.

• Auftreten erster Episoden virologisch bestätigter (RT-PCR-positiver) Fälle von COVID-19 jeglichen Schweregrades mit Symptombeginn zu einem beliebigen Zeitpunkt nach der ersten Studienvakzinierung.

[0856] Sekundäre Immunogenitäts-Endpunkte (Phase 2b Immunogenitäts-Untergruppe) Antikörperantworten gegen die RBD des S-Proteins von SARS-CoV-2 An den Tagen 1, 29, 43, 57, 120, 211 und 393:

• Serum-Antikörper gegen die RBD des S-Proteins von SARS-CoV-2.

• Auftreten einer Serokonversion gegen die RBD des S-Proteins von SARS-CoV-2. Serokonversion ist definiert als nachweisbare Antikörper gegen die RBD des S-Proteins von SARS-CoV-2 im Serum von Probanden, die zu Beginn der Studie seronegativ getestet wurden.

Virus-neutralisierende Antikörperantworten gegen SARS-CoV-2

[0857] An den Tagen 1, 29, 43, 57, 120, 211 und 393:

• Virus-neutralisierende Antikörper gegen das SARS-CoV-2-Virus im Serum, gemessen mit einem Virus-neutralisierenden Antikörper-Assay.

• Auftreten einer Serokonversion gegen das SARS-CoV-2-Virus, gemessen mit einem Virus-neutralisierenden Antikörper-Assay.
Serokonversion ist definiert als nachweisbare Virus-neutralisierende Antikörper gegen SARS-CoV-2 im Serum von Probanden, die zu Beginn der Studie seronegativ waren.

[0858] Sekundäre Sicherheitsendpunkte

• Auftreten, Intensität und Dauer jedes abgefragten lokalen AE innerhalb von 7 Tagen nach jeder Studienvakzinierung bei Probanden der Phase 2b.

• Auftreten, Intensität und Dauer jedes abgefragten systemischen AE innerhalb von 7 Tagen nach jeder Studienvakzinierung bei Probanden der Phase 2b.

• Auftreten, Intensität und Verhältnis von nicht abgefragten AEs, die innerhalb von 28 Tagen nach jeder Studienvakzinierung bei Probanden der Phase 2b auftraten.

• Auftreten von AEs, die zum Absetzen der Vakzine oder zum Abbruch der Studie führen, bis 1 Jahr nach der zweiten Studienvakzinierung bei allen Probanden.

4.2.3 Explorative Endpunkte

[0859] Explorative Wirksamkeitsendpunkte

• Bewertung des Schweregrads der ersten Episoden virologisch bestätigter (RT-PCR-positiver) Fälle von COVID-19, die die Falldefinition für die primäre Wirksamkeitsanalyse erfüllen.

[0860] Die folgenden Endpunkte werden analysiert, wenn sie ≥ 15 Tage nach der zweiten Studienvakzinierung (volle VE) und zu einem beliebigen Zeitpunkt nach der ersten Studienvakzinierung auftreten.

[0861] Bei SARS-CoV-2-naiven Probanden:

• Vorliegen von zusätzlicher Sauerstoffzufuhr aufgrund einer COVID-19-Erkrankung.

• Vorliegen einer mechanischen Beatmung aufgrund der COVID-19-Erkrankung.

• Auftreten von Hospitalisierung aufgrund einer COVID-19-Erkrankung.

• Auftreten von Todesfällen aufgrund der COVID-19-Erkrankung.

• Auftreten von Todesfällen aufgrund jeglicher Ursache.

[0862] Bei SARS-CoV-2-naiven und nicht-naiven Probanden:

• Bei allen Probanden, unabhängig von ihrem Ausgangs-Serostatus, Auftreten von ersten Episoden virologisch bestätigter (RT-PCR-positiver) COVID-19-Fälle jeglichen Schweregrades.

[0863] Der folgende Endpunkt wird bei Probanden analysiert, die eine erste Episode eines virologisch bestätigten (RT-PCR-positiven) Falles von COVID-19 jeglichen Schweregrades hatten, der die Falldefinition für die primäre Wirksamkeitsanalyse erfüllt.

• Auftreten von zweiten Episoden virologisch bestätigter (RT-PCR-positiver) Fälle von COVID-19 jeglichen Schweregrades.

Explorative Immunogenitäts-Endpunkte (Phase 2b Immunogenitäts-Untergruppe)

[0864] An den Tagen 1, 29, 43, 120** und 211** in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) von bis zu 400 Probanden an ausgewählten Standorten:

• Häufigkeit und Funktionalität der spezifischen T-Zell-Antwort auf die SARS-CoV-2-S-RBD nach Antigenstimulation durch intrazelluläre Zytokinfärbung (ICS) zur Untersuchung der Th1-Antwort und der Expression von Th2-Markern.

• Anteil der Probanden mit einem nachweisbaren Anstieg der spezifischen T-Zell-Antwort auf SARS-CoV-2-S-RBD.

** Die Untersuchung der an Tag 120 und Tag 211 entnommenen Proben wird nur bei Probanden durchgeführt, die an Tag 29 und/oder Tag 43 als T-Zell-Responder kategorisiert wurden.

4.3 Schätzungen

<table>
<tr><th>ENDPUNKTE (Probandenebene)</th><th>ESTIMANDS (Populationsebene)</th></tr>
<tr><td colspan="2">Co-Primäre Wirksamkeit</td></tr>
<tr><td>• Auftreten von ersten Episoden von virologisch bestätigten (RT-PCR-positiven) Fällen von COVID-19 jeglichen Schweregrades, die der Falldefinition für die primäre Wirksamkeitanalyse entsprechen.</td><td rowspan="2">Bei naiven evaluierbaren Probanden (die der Definition des Wirksamkeitsanalyse-Sets entsprechen) mindestens 15 Tage nach der zweiten Vakzinierung:
VE = 1- RR mit exaktem 97,5%-CI
wobei RR (relatives Risiko) das Verhältnis der Auftrittsraten von COVID-19-Fällen pro 100 Personenmonate in der CVnCoV-Vakzingruppe gegenüber der Placebogruppe ist.</td></tr>
<tr><td>• Auftreten der ersten Episoden von virologisch bestätigten (RT-PCR-positiven) Fällen von moderater bis schwerer COVID-19, die der Falldefinition für die primäre Wirksamkeitanalyse entsprechen.</td></tr>
<tr><td colspan="2">Primäre Sicherheit</td></tr>
<tr><td>• Auftreten, Intensität und Verhältnis von medizinisch betreuten AEs, die bis 6 Monate nach der zweiten Studienvakzinierung bei allen Probanden erhoben wurden.</td><td rowspan="3">Bei Probanden, die mindestens eine Dosis der CVnCoV- oder Placebo-Vakzine erhalten haben, die Anzahl und der Prozentsatz der Probanden nach Gruppen, die mindestens 1 und jede Art (nach SOC/PT) von:
• Medizinisch betreuten AEs in den 6 Monaten nach der letzten Vakzinierung insgesamt, nach Intensität und nach kausalem Zusammenhang mit der Studienvakzine.
• SAE im Jahr nach der letzten Vakzinierung insgesamt und nach kausalem Zusammenhang mit der Studienvakzine.
• AESI im Jahr nach der letzten Vakzinierung insgesamt, nach Intensität und nach kausalem Zusammenhang mit der Studienvakzine.
• Tödliche SAE im Jahr nach der letzten Vakzinierung.</td></tr>
<tr><td>• Auftreten, Intensität und Verhältnis von SAEs und AESIs, die bis 1 Jahr nach der zweiten Studienvakzinierung bei allen Probanden erhoben wurden.</td></tr>
<tr><td>• Auftreten von tödlichen SAEs bis 1 Jahr nach der zweiten Studienvakzinierung bei allen Probanden.</td></tr>
<tr><td colspan="2">Wichtige sekundäre Wirksamkeit</td></tr>
<tr><td>• Auftreten von ersten Episoden von virologisch bestätigten (RT-PCR-positiven) schweren Fällen von COVID-19, die der Falldefinition für die primäre Wirksamkeitsanalyse entsprechen.</td><td>Bei naiven evaluierbaren Probanden (die der Definition des Wirksamkeitsanalyse-Sets entsprechen) mindestens 15 Tage nach der zweiten Vakzinierung:
VE = 1 - RR mit exaktem 95%-CI
wobei RR (relatives Risiko) das Verhältnis der Auftrittsraten von schweren COVID-19-Fällen pro 100 Personenmonate in der CVnCoV-Vakzingruppe gegenüber der Placebogruppe ist.</td></tr>
</table>

ENDPUNKTE (Probandenebene)	ESTIMANDS (Populationsebene)
• Auftreten von Serokonversion gegen das N-Protein von SARS-CoV-2 ≥ 15 Tage nach der zweiten Studienvakzinierung bei asymptomatischen seronegativen Probanden. Serokonversion ist definiert als nachweisbare SARS-CoV-2-N-Protein-Antikörper im Serum von Probanden an Tag 211 und/oder Tag 393 der Studie, die an Tag 1 (Baseline) und Tag 43 (d.h. an den beiden Testzeitpunkten vor 15 Tagen nach der zweiten Studienvakzinierung) seronegativ getestet wurden.	Bei naiven evaluierbaren Probanden (entsprechend der Definition des Wirksamkeitsanalyse-Sets), die an Tag 1 (Baseline) und Tag 43 seronegativ auf das N-Protein von SARS-COV-2 getestet wurden und mit mindestens einer der an Tag 211 oder Tag 393 durchgeführten Serologien: VE = 1 - RR mit exaktem 95%-CI wobei RR (relatives Risiko) das Verhältnis der Auftrittsraten der asymptomatischen Infektionen (Serokonversion gegen das N-Protein an Tag 211 und dann Serokonversion gegen das N-Protein entweder an Tag 211 oder an Tag 393) in der CVnCoV-Vakzingruppe gegenüber der Placebogruppe ist.
Andere sekundäre Wirksamkeit	
• Bei Probanden ≥ 61 Jahre, Auftreten von ersten Episoden von virologisch bestätigten (RT-PCR-positiven) Fällen von COVID-19 jeglichen Schweregrades, die der Falldefinition für die primäre Wirksamkeitsanalyse entsprechen.	Bei naiven evaluierbaren Probanden ≥ 61 Jahre bei Randomisierung (entsprechend der Definition des Wirksamkeitsanalyse-Sets), mindestens 15 Tage nach der zweiten Vakzinierung: VE = 1 - RR mit exaktem 95%-CI wobei RR (relatives Risiko) das Verhältnis der Auftrittsraten von COVID-19-Fällen pro 100 Personenmonate in der CVnCoV-Vakzingruppe gegenüber der Placebogruppe ist.
• Auftreten einer virologisch bestätigten (RT PCR-positiven) SARS-CoV-2-Infektion, mit oder ohne Symptome. Wenn der Proband symptomatisch ist, muss das Auftreten der Symptome ≥ 15 Tage nach der zweiten Studienvakzinierung erfolgt sein; wenn der Proband asymptomatisch ist, muss der positive RT-PCR-Test ≥ 15 Tage nach der zweiten Studienvakzinierung erfolgt sein.	Bei naiven evaluierbaren Probanden (entsprechend der Definition des Wirksamkeitsanalyse-Sets) mindestens 15 Tage nach der zweiten Studienvakzinierung: VE = 1 - RR mit exaktem 95%-CI wobei RR (relatives Risiko) das Verhältnis der Auftrittsraten von virologisch bestätigten (RT PCR-positiven) SARS-CoV-2-Infektionen pro 100 Personenmonate in der CVnCoV-Vakzingruppe gegenüber der Placebogruppe ist.
• BoD-Scores berechnet auf Basis der ersten Episoden von virologisch bestätigten (RT PCR-positiven) Fällen von COVID-19 jeglichen Schweregrades, die der Falldefinition für die primäre Wirksamkeitsanalyse entsprechen. ○ BoD #1 - keine Erkrankung (nicht infiziert oder asymptomatische Infektion) = 0; leichte oder moderate Erkrankung = 1; schwere Erkrankung = 2. ○ BoD #2 - keine Erkrankung (nicht infiziert oder asymptomatische Infektion) = 0; Erkrankung ohne Hospitalisierung = 1; Erkrankung mit Hospitalisierung = 2; Tod = 3.	Bei naiven evaluierbaren Probanden (die der Definition des Wirksamkeitsanalyse-Sets entsprechen) mindestens 15 Tage nach der zweiten Studienvakzinierung: VE = 1 - RR mit exaktem 95%-CI wobei RR (relatives Risiko) das Verhältnis der Auftrittsraten von virologisch bestätigten (RT PCR-positiven) SARS-CoV-2-Infektionen pro 100 Personenmonate in der CVnCoV-Vakzingruppe gegenüber der Placebogruppe ist
• Auftreten von ersten Episoden virologisch bestätigter (RT-PCR-positiver) Fälle von COVID-19 jeglichen Schweregrades mit Symptombeginn zu einem beliebigen Zeitpunkt nach der ersten Studienvakzinierung.	Bei naiven Probanden, die mindestens eine Dosis der CVnCoV- oder Placebo-Vakzine zu einem beliebigen Zeitpunkt nach der ersten Vakzinierung erhielten: VE = 1- RR mit exaktem 95%-CI wobei RR (relatives Risiko) das Verhältnis der Auftrittsraten von COVID-19-Fällen pro 100 Personenmonate in der CVnCoV-Vakzingruppe gegenüber der Placebogruppe ist.
Sekundäre Immunogenität	

ENDPUNKTE (Probandenebene)	ESTIMANDS (Populationsebene)
Antikörperantworten gegen die RBD des S-Proteins von SARS-CoV-2 An den Tagen 1, 29, 43, 57, 120, 211 und 393: • Serum-Antikörper gegen die RBD des Spike (S)-Proteins von SARS-CoV-2, gemessen mittels Enzym-gekoppelten Immunabsorptions-Assay (ELISA).	Bei Phase-2b-Probanden, die zur Immunogenitäts-Untergruppe gehören und evaluierbar sind (entsprechend der Definition des Immunogenitäts-Sets laut Protokoll): An den Tagen 1, 29, 43, 57, 120, 211 und 393: • Geometrisches Mittel der Titer (GMT) mit 95%-CI der Antikörperantworten gegen die RBD des Spike (S)-Proteins von SARS-CoV-2 nach Gruppen und nach Baseline-Serostatus und Gruppe An den Tagen 29, 43, 57, 120, 211 und 393 für Probanden, die zu Studienbeginn seropositiv waren: Geometrisches Mittel der -fachen Veränderung vom Ausgangswert (GMFC) mit 95%-CI der Antikörperantworten gegen die RBD des Spike (S)-Proteins von SARS-Cov-2 nach Gruppen. An den Tagen 29, 43, 57, 120, 211 und 393 für Probanden, die zu Studienbeginn seronegativ waren: • Anzahl und Prozentsatz mit exaktem 95%-CI von Probanden nach Gruppen, bei denen eine Serokonversion beobachtet wird (nachweisbare Antikörper gegen die RBD des S-Proteins von SARS-CoV-2 im Serum).
Antikörperantworten gegen die RBD des S-Proteins von SARS-CoV-2 An den Tagen 1, 29, 43, 57, 120, 211 und 393: • Auftreten von Serokonversion gegen die RBD des Spike (S)-Proteins von SARS-CoV-2, gemessen durch ELISA. Serokonversion ist definiert als detektierbare Antikörper gegen die RBD des Spike (S)-Proteins von SARS-CoV-2 im Serum von Probanden, die zu Studienbeginn seronegativ getestet wurden.	
SARS-CoV-2- Virus-neutralisierende Antikörperantworten (Untergruppe der analysierten Probanden) An den Tagen 1, 29, 43, 57, 120, 211 und 393: • Virusneutralisierende Antikörperantworten gegen das SARS-CoV-2-Virus, gemessen durch einen Virusneutralisierenden Antikörper-Assay.	Bei Phase-2b-Probanden, die zu der Immunogenitäts-Untergruppe gehören und evaluierbar sind (entsprechend der Definition des Immunogenitäts-Sets laut Protokoll): An den Tagen 1, 29, 43, 57, 120, 211 und 393: • Geometrisches Mittel der Titer (GMT) mit 95%-CI der neutralisierenden Antikörper gegen das SARS-CoV-2-Virus nach Gruppen und nach Baseline-Serostatus und Gruppe An den Tagen 29, 43, 57, 120, 211 und 393 für Probanden, die zu Studienbeginn seropositiv waren: Geometrisches Mittel der-fachen Änderung vom Ausgangswert (GMFC) mit 95%-CI der neutralisierenden Antikörper gegen das SARS-CoV-2-Virus nach Gruppen. An den Tagen 29, 43, 57, 120, 211 und 393 bei Probanden, die zu Studienbeginn seronegativ waren: • Anzahl und Prozentsatz mit exaktem 95%-CI von Probanden nach Gruppen, bei denen eine Serokonversion beobachtet wird (nachweisbare neutralisierende Antikörper gegen das SARS-CoV-2-Virus im Serum).
SARS-CoV-2-Virus-neutralisierende Antikörperantworten (Untergruppe der analysierten Probanden) An den Tagen 1, 29, 43, 57, 120, 211 und 393: • Auftreten von Serokonversion gegen das SARS-CoV-2-Virus, gemessen durch einen Assay zum Nachweis neutralisierender Antikörper. Serokonversion ist definiert als nachweisbare SARS-CoV-2-Virusneutralisierende Antikörper im Serum der Probanden, die zu Studienbeginn seronegativ getestet wurden.	
Sekundäre Sicherheit	

ENDPUNKTE (Probandenebene)	ESTIMANDS (Populationsebene)
• Auftreten, Intensität und Dauer jedes abgefragten lokalen AE innerhalb von 7 Tagen nach jeder Studienvakzinierung bei Probanden der Phase 2b.	Bei Phase-2b-Probanden, die mindestens eine Dosis der CVnCoV- oder Placebo-Vakzine erhielten: Die Anzahl und der Prozentsatz der Probanden nach Gruppen, die berichten: Jedes abgefragte lokale AE innerhalb von 7 Tagen nach jeder Studienvakzinierung nach Intensität und insgesamt • Jedes abgefragte systemische AE innerhalb von 7 Tagen nach jeder Studienvakzinierung nach Intensität, nach Beziehung zur Studienvakzine und insgesamt • Mindestens 1 nicht abgefragtes AE, mindestens 1 nicht abgefragtes AE des Grades 3 und jedes nicht abgefragte AE nach SOC/PT innerhalb von 28 Tagen nach jeder Studienvakzinierung und insgesamt durch kausalen Zusammenhang mit der Studienvakzine und insgesamt • Mindestens 1 AE, das zum Absetzen der Vakzine oder zum Abbruch der Studie im Jahr nach der letzten Studienvakzinierung führte Mittlere Dauer in Tagen nach Gruppen mit Standardabweichung der abgefragten AEs (innerhalb des abgefragten Zeitraums, Gesamtdauer).
• Auftreten, Intensität, Dauer jedes abgefragten systemischen AE innerhalb von 7 Tagen nach jeder Studienvakzinierung bei Probanden der Phase 2b.	
• Auftreten, Intensität und Verhältnis der nicht abgefragten AEs innerhalb von 28 Tagen nach jeder Studienvakzinierung bei Phase-2b-Probanden.	
• Auftreten von AEs, die zum Absetzen der Vakzine oder zum Abbruch der Studie führen, bis 1 Jahr nach der zweiten Studienvakzinierung bei allen Probanden.	
Explorative Wirksamkeit	
• Bewertung des Schweregrads der ersten Episoden von virologisch bestätigten (RT-PCR-positiven) Fällen von COVID-19, die die Falldefinition für die primäre Wirksamkeitsanalyse erfüllen	Bei naiven evaluierbaren Probanden (entsprechend der Definition des Wirksamkeitsanalyse-Sets), die eine erste Episode eines virologisch bestätigten (RT-PCR-positiven) Falles von COVID-19 jeglichen Schweregrades aufwiesen, der die Falldefinition für die primäre Wirksamkeitsanalyse erfüllt: • Die Anteile der leichten und schweren COVID-19-Fälle unter allen Fällen nach Gruppen
Die folgenden Endpunkte werden analysiert, wenn sie ≥ 15 Tage nach der zweiten Studienvakzinierung (volle Wirksamkeit der Vakzine) und zu einem beliebigen Zeitpunkt nach der ersten Studienvakzinierung auftreten. • Auftreten von zusätzlicher Sauerstoffzufuhr aufgrund einer COVID-19-Erkrankung. • Auftreten einer mechanischen Beatmung aufgrund einer COVID-19-Erkrankung. • Auftreten einer Hospitalisierung aufgrund der COVID-19-Erkrankung. • Auftreten eines Todesfalls aufgrund der COVID-19-Erkrankung. • Auftreten von Tod aufgrund jeglicher Ursache.	Bei naiven evaluierbaren Probanden (entsprechend der Definition des Wirksamkeitsanalyse-Sets) mindestens 15 Tage nach der zweiten Vakzinierung UND bei Probanden, die mindestens eine Dosis der CVnCoV- oder Placebo-Vakzine zu einem beliebigen Zeitpunkt nach der ersten Studienvakzinierung erhalten haben: Anzahl und Prozentsätze nach Gruppen der Probanden, die: Bedarf an einer zusätzlichen Sauerstoffzufuhr aufgrund von COVID-19 haben. • eine mechanische Beatmung aufgrund von COVID-19 benötigen. • aufgrund von COVID-19 hospitalisiert sind. • aufgrund von COVID-19 gestorben sind. • aufgrund irgendwelcher anderen Ursachen gestorben sind.

ENDPUNKTE (Probandenebene)	ESTIMANDS (Populationsebene)
• Bei allen Probanden, unabhängig von ihrem Baseline-Serostatus, Auftreten von ersten virologisch bestätigten (RT-PCR-positiven) Fällen von COVID-19 jeglichen Schweregrades.	Bei Probanden, die mindestens eine Dosis der CVnCoV- oder Placebo-Vakzine erhielten, zu einem beliebigen Zeitpunkt nach der ersten Studienvakzinierung: VE = 1- RR mit exaktem 95%-CI wobei RR (relatives Risiko) das Verhältnis der Auftrittsraten von COVID-19-Fällen pro 100 Personenmonate in der CVnCoV-Vakzingruppe gegenüber der Placebogruppe ist
Der folgende Endpunkt wird bei Probanden analysiert, die eine erste Episode eines virologisch bestätigten (RT-PCR-positiven) Falles von COVID-19 jeglichen Schweregrades hatten, der die Falldefinition für die primäre Wirksamkeitsanalyse erfüllt. • Auftreten von zweiten Episoden von virologisch bestätigten (RT-PCR-positiven) Fällen von COVID-19 jeglichen Schweregrades.	Bei naiven evaluierbaren Probanden (die der Definition des Wirksamkeitsanalyse-Sets entsprechen), die eine erste Episode eines virologisch bestätigten (RT-PCR-positiven) Falles von COVID-1 9 jeglichen Schweregrades, der der Falldefinition für die primäre Wirksamkeitsanalyse entspricht, mindestens 15 Tage nach der zweiten Vakzinierung hatten:
	• Die Anzahl und der Prozentsatz der Probanden, die eine zweite Episode von COVID-19 entwickelten.
Explorative Immunogenität	
An den Tagen 1, 29, 43, 120** und 211** in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) von bis zu 400 Probanden an ausgewählten Standorten: • Die Häufigkeit und Funktionalität einer spezifischen T-Zell-Antwort gegen die SARS-Cov-2-S-RBD nach Antigenstimulation durch intrazelluläre Zytokinfärbung (ICS) zur Untersuchung der Th1-Antwort und Expression von Th2-Markern. • Der Anteil der Probanden mit einem nachweisbaren Anstieg der spezifischen T-Zell-Antwort gegen die SARS-CoV-2-S-RBD. ** *Eine Untersuchung der an Tag 120 und Tag 211 entnommenen Proben wird nur bei Probanden durchgeführt, die an Tag 29 und/oder Tag 43 als T-Zell-Responder kategorisiert wurden*.	Explorative Immunogenitätsschätzungen werden gegebenenfalls im statistischen Analyseplan beschrieben.

5 VERSUCHSAUFBAU

5.1 Allgemeiner Aufbau

[0865] Die Studie CV-NCOV-004 wird in zwei Teilen durchgeführt: eine anfängliche Phase-2b-Studie, gefolgt vom Übergang zu einer großen Phase-3-Wirksamkeitsstudie. Sowohl Phase 2b als auch Phase 3 werden als randomisierte, Beobachter-verblindete, placebokontrollierte Studien durchgeführt. Probanden im Alter von 18 Jahren oder älter werden an mehreren Standrten weltweit rekrutiert und erhalten entweder CVnCoV in einer Dosierung von 12 µg mRNA oder Placebo (normale Kochsalzlösung (0,9% NaCl)) in einem Verhältnis von 1:1 in einem 2-Dosis-Schema. Beide Teile der Studie, Phase 2b und Phase 3, haben ein einheitliches Design (z.B. für die Erfassung von COVID-19-Fällen und die Falldefinition), so dass die in Phase 2b auftretenden COVID-19-Fälle mit denen in Phase 3 für die primäre Analyse der VE gepoolt werden können.

[0866] Die Probanden werden auch an einer 1-Jahres-Verlängerung der Phase-2b- und Phase-3-Teile der Studie teilnehmen.

Phase 2b Design und Zielsetzung

[0867] Das Ziel der Phase 2b ist es, die Sicherheit, Reaktogenität und Immunogenität von CVnCoV weiter zu charakterisieren, bevor die Phase 3 eingeleitet wird. CVnCoV wird in der für die Phase-3-Untersuchung ausgewählten 12-µg-Dosis verabreicht, die auf den Sicherheits- und Immunogenitätsdaten der anfänglichen Phase-1- und Phase-2a-Studien basiert. Die Phase 2b wird in 2 Altersgruppen von Erwachsenen durchgeführt: 18 bis 60 und ≥ 61 Jahre, die den Altersbereich der vorgesehenen Phase-3-Studienpopulation repräsentieren.

[0868] Etwa 4.000 Probanden werden rekrutiert und im Verhältnis 1:1 randomisiert, um entweder 2 Dosen CVnCoV in einer Dosierung von 12 µg mRNA oder Placebo zu erhalten, die im Abstand von 28 Tagen verabreicht werden. Von den 4.000 aufgenommenen Probanden werden etwa 800 bis 1.000 (20% bis 25%) ≥ 61 Jahre alt sein. Die Phase 2b wird Beobachter-verblindet durchgeführt, um mögliche Voreingenommenheiten bei der Sicherheitsbewertung zu reduzieren. Die Stichprobengröße von 4.000 Probanden basiert auf der Generierung eines robusten und detaillierten Datensatzes, der die Sicherheit, Reaktogenität und Immunogenität von CVnCoV charakterisiert, bevor der Eintritt in die Phase 3 erfolgt. Darüber hinaus werden die in Phase 2b generierten Daten der Hauptdatensatz sein, der zur Unterstützung einer frühen bedingten Zulassung von CVnCoV eingereicht wird.

[0869] In Phase 2b wird die Sicherheit und Reaktogenität eines 2-Dosis-Schemas von CVnCoV detailliert untersucht, indem die Häufigkeit und der Schweregrad der folgenden AEs gemessen werden: abgefragte lokale und systemische Reaktionen für 7 Tage nach jeder Vakzinierung; nicht abgefragte AEs für 28 Tage nach jeder Vakzinierung; medizinisch betreute AEs bis 6 Monate nach der zweiten Studienvakzinierung; und AESIs und SAEs bis 1 Jahr nach der zweiten Studienvakzinierung. Die Immunogenität von CVnCoV wird nach einer und zwei Dosen in einer Untergruppe von Probanden (die ersten 600 Individuum, die in jede der beiden Altersgruppen aufgenommen wurden; insgesamt 1.200 Probanden in der Immunogenitäts-Untergruppe) durch Messung der an die RBD des S-Proteins von SARS-CoV-2 bindenden Antikörper und der Virus-neutralisierenden Antikörper bewertet. Die Antikörperpersistenz wird sowohl in dieser Studie als auch in der Verlängerungsstudie untersucht.

[0870] Fälle von COVID-19, die bei Phase-2b-Probanden auftreten, werden gesammelt und mit denen der Phase 3 gepoolt, und die Gesamtzahl der Fälle wird für die primäre Wirksamkeitsanalyse verwendet. Darüber hinaus wird das DSMB die COVID-19-Fälle regelmäßig auf Anzeichen von VDE überwachen.

[0871] Probanden, die an Phase 2b teilnehmen, werden während der Studie auch auf asymptomatische SARS-CoV-2-Infektionen untersucht, gemessen an der Entwicklung von Antikörpern gegen das N-Protein von SARS-CoV-2 (d.h. Serokonversion). Diese Daten werden mit denen der Phase 3 kombiniert, um festzustellen, ob die Vakzinierung mit CVnCoV die Rate asymptomatischer Infektionen mit SARS-CoV-2 verhindern oder reduzieren kann (eines der wichtigsten sekundären Wirksamkeitsziele).

[0872] Der Beginn der Aufnahme der Probanden der beiden Zielaltersgruppen in Phase 2b wird flexibel sein. Abhängig vom Zeitpunkt der Daten aus den Phase-1- und Phase-2a-Studien kann die Aufnahme der beiden Altersgruppen in Phase 2b gestaffelt erfolgen, wobei zunächst mit Probanden im Alter von 18 bis 60 Jahren begonnen wird, gefolgt von Probanden im Alter von ≥ 61 Jahren. Da die ältere Altersgruppe 20% bis 25% der Gesamtzahl der Probanden in Phase 2b ausmachen wird, wird nicht erwartet, dass dieser gestaffelte Beginn einen Einfluss auf die Gesamtaufnahme der Phase-2b-Kohorte haben wird.

[0873] Eine frühe Sicherheitsüberprüfung der Phase-2b-Daten wird durch das DSMB durchgeführt (siehe Abschnitt 9.3.9.1). Die Sicherheitsüberprüfung wird durchgeführt, wenn etwa 1.000 Probanden in die Phase 2b aufgenommen wurden (25% der aufgenommenen Probanden; 500 Empfänger von CVnCoV und 500 Empfänger von Placebo) und mindestens eine Woche Sicherheitsnachbeobachtung nach der ersten Studienvakzinierung vorliegen. Wenn das Sicherheitsprofil als akzeptabel beurteilt wird und keine Bedenken hinsichtlich der Sicherheit oder Verträglichkeit bestehen, wird erwartet, dass die Aufnahme von Probanden in Phase 3 ohne Unterbrechung von Phase 2b beginnen kann. Eine weitere Sicherheitsüberprüfung durch das DSMB wird durchgeführt, wenn etwa 1.000 Probanden der Phase 2b ihre zweite Studienvakzinierung erhalten haben und eine mindestens einwöchige Sicherheitsbeobachtung erfolgt ist. Zu diesem Zeitpunkt werden auch alle verfügbaren Sicherheitsdaten der ersten Dosis der Phase-2b-Probanden überprüft.

Phase 3 Design und Zielsetzung

[0874] Die co-primären Ziele der kombinierten Phase 2b/3-Studie sind der Nachweis der Wirksamkeit eines 2-Dosis-Schemas von CVnCoV bei der Prävention von COVID-19-Fällen jeglichen Schweregrads oder COVID-19-Fällen mittleren oder höheren Schweregrads. Ähnlich wie die Phase 2b wird die Phase 3 als randomisierte, Beobachter-verblindete, placebokontrollierte Studie durchgeführt. Etwa 32.500 Probanden im Alter von 18 Jahren oder älter werden in Phase 3 an mehreren Standorten weltweit rekrutiert und erhalten entweder in einem 2-Dosis-Schema CVnCoV in der Dosierung von 12 µg oder Placebo in einem Verhältnis von 1:1 (siehe **Fig. 2**). Ähnlich wie in Phase 2b wird die Aufnahme auf Probanden ≥ 61 Jahre abzielen, die etwa 20% bis 25% der Studienpopulation der Phase 3 ausmachen (6.500 bis 8.125 Probanden). Die Gesamtaufnahme in die kombinierten Phase-2b- und Phase-3-Teile der Studie wird 36.500 Probanden betragen.

[0875] Die Probanden werden aktiv auf COVID-19 überwacht. Bei allen Besuchen in der Prüfstelle und bei Telefonaten werden die Probanden daran erinnert, sich zu melden, wenn sie eine akute Erkrankung mit irgendwelchen Symptomen haben, die klinisch mit COVID-19 übereinstimmen. Zusätzlich werden die Probanden bis zu zweimal pro Woche angeschrieben und sollen mit „ja“ oder „nein“ antworten, ob sie Symptome von COVID-19 haben. Diejenigen, die mit „ja“ antworten, werden vom Studienpersonal für ein Folgegespräch und eine Beurteilung kontaktiert. Besteht der Verdacht auf eine COVID-19-Erkrankung, wird ein Test auf eine SARS-CoV-2-Infektion durchgeführt, wobei Proben in der Prüfstelle oder bei einem Hausbesuch entnommen werden. Wird bestätigt, dass der Proband COVID-19 hat, werden alle Probanden bis zum Abklingen ihrer Erkrankung weiter beobachtet. Wenn der Proband hospitalisiert wird, muss der Prüfer (Investigator) den Verlauf des Individuums weiter verfolgen und am Ende der Hospitalisierung einen Entlassungsbericht erhalten. Informationen über klinische Symptome und Anzeichen, deren Dauer und Schweregrad sowie die Behandlung und das Ergebnis der COVID-19-Episode werden vom Studienpersonal dokumentiert und im elektronischen Fallberichtsformular (eCRF) festgehalten. Nach Abklingen der COVID-19-Episode werden die Probanden bis zum Ende der Studie auf die gleiche Weise weiterverfolgt wie diejenigen, bei denen keine COVID-19-Episode aufgetreten ist. Eine zweite Episode von COVID-19 bei einem Individuum mit vorheriger Erkrankung wird nicht als primärer Wirksamkeitsfall gezählt, aber für das explorative Ziel, das Wiederauftreten von COVID-19 bei vakzinierten Probanden zu bewerten, gezählt.

[0876] Aufgrund der unsicheren Inzidenzrate von COVID-19-Fällen in einer Pandemiesituation wird die Studie als fallgesteuerte Studie auf Grundlage des COVID-19-Endpunkts jeglichen Schweregrads durchgeführt, die zwei Interimanalysen und eine Abschlussanalyse umfasst, die beide durch das Erreichen einer vordefinierten Anzahl von Fällen für jede Analyse ausgelöst werden. Wie oben beschrieben, werden die in Phase 2b auftretenden COVID-19-Fälle mit denen in Phase 3 für die primäre Analyse der VE gepoolt. Somit tragen die an Phase 2b teilnehmenden Probanden zur Gesamtstichprobengröße für die primäre Analyse der VE bei (N=36.500).

[0877] Für die primäre Analyse der Wirksamkeit muss der Fall die folgenden Kriterien erfüllen (moderate und schwere COVID-19-Erkrankung ist hier definiert):

- Es muss sich um einen virologisch bestätigten Fall von COVID-19 handeln, definiert als positiver SARS-CoV-2-spezifischer RT-PCR-Test bei einer Person mit klinisch symptomatischem COVID-19 (siehe Abschnitt 9.2).
- Das Auftreten der Symptome muss ≥ 15 Tage nach der zweiten Studienvakzinierung erfolgt sein.
- Der Proband darf bei Aufnahme in die Studie keine virologisch bestätigte COVID-19-Anamnese haben (basierend auf Ausschlusskriterium 1) oder vor 15 Tagen nach der zweiten Studienvakzinierung keinen Fall von virologisch bestätigter COVID-19 entwickelt haben.
- Der Proband muss sich bei Studienbeginn und an Tag 43 als SARS-CoV-2-naiv erwiesen haben (seronegativ gegen das N-Protein).

[0878] Primäre Wirksamkeitsfälle müssen durch das Auswertungskomitee bestätigt werden.

[0879] Diese Studie wird ein gruppensequentielles Design mit 2 Interimanalysen für hohe Wirksamkeit oder Futilität unter Verwendung der O'Brien- und Fleming-Fehlerausgabefunktion für den co-primären Endpunkt der virologisch bestätigten COVID-19-Fälle jeglichen Schweregrades verwenden. Mit einem allgemeinen zweiseitigen Alpha von 2,5% und einer Gesamtzahl von 185 COVID-19-Fällen jeglichen Schweregrades, die die primäre Wirksamkeitsfalldefinition bei der abschließenden Analyse erfüllen, wird die Studie eine Gesamtpower von 90% haben, um eine VE von mehr als 30% nachzuweisen (basierend auf einer Marge von 30% für

die untere Grenze des 97,5%-Konfidenzintervalls (CI) für Verbindungselement), wenn die VE 60% beträgt. Zwei Interimanalysen zur Wirksamkeit oder Futilität werden durchgeführt, sobald 56/111 Fälle, die die primäre Falldefinition erfüllen, akkumuliert wurden (30%/60% der endgültigen Fallzahl). Diese Punkte wurden anhand von 2 Kriterien ausgewählt: i) die Robustheit von 56/111 Fällen, um die Entscheidung über hohe Wirksamkeit oder Futilität zu unterstützen und ii) im Falle einer hohen Wirksamkeit würde dies die Dauer der Studie verkürzen und möglicherweise eine frühere Verfügbarkeit der Vakzine ermöglichen.

[0880] Für den co-primären Endpunkt der virologisch bestätigten moderaten bis schweren COVID-19-Fälle, mit einem zweiseitigen Gesamt-Alpha von 2,5% und insgesamt 60 schweren bis moderaten COVID-19-Fällen, die die primäre Wirksamkeits-Falldefinition bei der abschließenden Analyse erfüllen, wird die Studie eine Gesamtpower von 90% haben, um eine VE von mehr als 20% zu zeigen (basierend auf einer Marge von 20% für die untere Grenze des 97,5%-Konfidenzintervalls (CI) für Verbindungselement), wenn die VE 70% beträgt. Unter der Annahme, dass 1/3 der COVID-19-Fälle moderat bis schwer sind, werden 60 moderate bis schwere Fälle erhalten, wenn die Gesamtzahl der COVID-19-Fälle 180 beträgt. Für diesen co-primären Endpunkt wird es keine Interimanalyse geben.

[0881] Unter der Annahme einer COVID-19-Inzidenzrate von 0,15% pro Monat (1,5 Fälle/1000/Monat) bei den Placebo-Probanden, einer VE von 60% und einer nicht-evaluierbaren Rate von 20% während der Studie, die eine Seropositivität von etwa 5% der Teilnehmer zu Studienbeginn (d.h. der nicht-naiven Teilnehmer) einschließt, wird eine Verlaufskontrolle von 36.500 aufgenommenen Probanden über 3 Monate (18.250 pro Vakzingruppe) die angestrebten 185 COVID-19-Fälle jeglichen Schweregrades etwa 9 Monate nach der ersten Vakzinierung ergeben. Bei oder kurz vor Abschluss der Aufnahme wird eine unverblindete Überprüfung der Inzidenzrate der Fälle durch das DSMB durchgeführt. Wenn die Fallwachstumsrate niedriger ist als erwartet, kann das DSMB eine Erhöhung der Stichprobengröße empfehlen. Gegebenenfalls kann eine weitere unverblindete Überprüfung durch das DSMB zu einem späteren Zeitpunkt der Studie durchgeführt werden, um die Stichprobengröße weiter anzupassen. Die Studienereignisse sind in der Zeitleiste unten dargestellt (die 1-Jahres-Verlängerungsstudie wird weiter unten besprochen).

[0882] Bei einer gleichen Nachbeobachtungszeit der evaluierbaren Probanden in beiden Gruppen würde die Wirksamkeit bei der abschließenden Analyse nachgewiesen werden, wenn 60 Fälle oder weniger der insgesamt 185 Fälle in der CVnCoV-Gruppe sind (geschätzte VE ≥ 52,0%). Zwei Interimanalysen auf hohe Wirksamkeit oder Futilität werden durchgeführt, wenn 56/111 Fälle, die die primäre Falldefinition erfüllen, angefallen sind (ca. 5/6,5 Monate nach Studienbeginn). Wenn die Nachbeobachtungszeit der evaluierbaren Probanden in beiden Gruppen gleich ist, würde eine frühe hohe Wirksamkeit gezeigt werden, wenn 7/29 Fälle oder weniger der 56/111 Fälle in der CVnCoV-Gruppe sind (geschätzte VE zum Zwischenzeitpunkt ≥ 85,7% / 64,6%); umgekehrt wäre Futilität erreicht, wenn 26/41 Fälle oder mehr in der CVnCoV-Gruppe sind (geschätzte VE zum Zwischenzeitpunkt ≤ 13,3%/41,4%). Die Bewertung der Interimanalysen erfolgt durch das DSMB, und das Ergebnis wird ohne Entblindung des Studienteams oder des Sponsors kommuniziert.

[0883] Ähnlich wie in Phase 2b werden die Probanden, die an Phase 3 teilnehmen, während der Studie auf eine SARS-CoV-2-Infektion untersucht, gemessen an der Entwicklung von Antikörpern gegen das N-Protein von SARS-CoV-2 bei seronegativen Probanden.

[0884] Das Sicherheitsziel der Phase 3 ist es, eine groß angelegte Sicherheitsdatenbank zu erstellen, die die Sicherheit von CVnCoV nachweisen soll. Bei allen Probanden, die an den Phase-2b- und Phase-3-Teilen der Studie teilnehmen, werden bis zu 6 Monate nach der zweiten Vakzinierung medizinisch relevante AEs und bis zu 1 Jahr nach der zweiten Vakzinierung AESIs und SAEs gesammelt.

[0885] Unabhängig vom Nachweis der Wirksamkeit von CVnCoV bei einer der Interimanalysen oder bei der abschließenden Analyse wird die HERALD-Studie CV-NCOV-004 fortgesetzt und bleibt bis zum Ende der Studie (wenn der letzte Proband die letzte Visite am Tag 393 absolviert hat (siehe Abschnitt 5.4)) Beobachter-verblindet. Während dieses Zeitraums werden die Sammlung von placebokontrollierten Sicherheitsdaten und das Hinzukommen von COVID-19-Fällen fortgesetzt.

Verlängerungsstudie

[0886] Nach Beendigung der Studie an Tag 393 nehmen die Probanden weiterhin an der einjährigen (12-monatigen) Verlängerung der HERALD-Studie CV-NCOV-004 teil. Während der Verlängerungsstudie wird die Verblindung auf Standortebene aufrechterhalten, um zusätzliche placebokontrollierte Daten zur Sicherheit (SAEs), zur Persistenz von Antikörpern gegen SARS-CoV-2 und zum Auftreten von COVID-19-Fällen zur

Beurteilung der Dauer der Wirksamkeit zu erheben. Die Verlängerungsstudie kann nach der Zulassung von CVnCoV beendet werden. Zu diesem Zeitpunkt kann den Kontroll Probanden eine Vakzinierung mit CVnCoV angeboten werden, sobald dies möglich ist. Die Verlängerungsstudie kann auch beendet werden, wenn eine wirksame Vakzine lokal zur Verfügung steht. Vor der Beendigung der Verlängerungsstudie wird dies mit dem DSMB und den Prüfärzten sowie mit den zuständigen Behörden besprochen.

5.2 Wissenschaftliche Begründung für das Studiendesign

[0887] Die HERALD-Studie CV-NCOV-004 wird in zwei Teilen durchgeführt: eine anfängliche Phase 2b-Studie, gefolgt vom Übergang zu einer großen Phase 3-Wirksamkeitsstudie. Beide Teile der Studie, Phase 2 und Phase 3, haben ein einheitliches Design, so dass die in Phase 2 aufgetretenen Fälle von COVID-19 mit denen in Phase 3 für die primäre Analyse der VE gepoolt werden können. Die Kombination von COVID-19-Fällen in Phase 2 und 3 zur Beschleunigung eines Wirksamkeitsergebnisses wurde in einer Pandemie-Situation als gerechtfertigt erachtet.

[0888] Sowohl Phase 2b als auch Phase 3 werden randomisiert, Beobachter-verblindet und placebokontrolliert sein. Aufgrund des unterschiedlichen Aussehens und der Darreichung der CVnCoV-Vakzine und des Placebos muss die Studie Beobachter-verblindet durchgeführt werden, was eine übliche und anerkannte Methode zur Verblindung von Studien darstellt. Das randomisierte, Beobachter-verblindete und placebokontrollierte Design wird das Risiko einer Voreingenommenheit bei den Sicherheits- und Wirksamkeitsergebnissen der Studie reduzieren (siehe auch Abschnitt 7.3).

[0889] Da ältere Menschen am stärksten von SARS-CoV-2 betroffen sind und ein hohes Risiko für schwere Erkrankungen und Sterblichkeit haben, ist es entscheidend, CVnCoV in dieser Population zu untersuchen, weshalb Probanden ≥ 61 Jahre eingeschlossen werden.

[0890] Die Stichprobengröße von 4.000 Individuum in Phase 2b basiert auf der Generierung eines robusten und detaillierten Datensatzes, der die Sicherheit, Reaktogenität und Immunogenität von CVnCoV charakterisiert, bevor die Phase 3 beginnt. Darüber hinaus werden die in Phase 2b generierten Daten der Hauptdatensatz sein, der zur Unterstützung einer frühen bedingten Zulassung von CVnCoV eingereicht wird.

[0891] Die Gesamtstichprobengröße von 36.500 Probanden für die kombinierte Phase 2b/3-Studie basiert auf dem Nachweis einer VE von über 30% (basierend auf einer Marge von 30% für die untere Grenze des 97,5%-CI für VE) bei Betrachtung einer VE von 60%. Mit einem zweiseitigen Alpha von 2,5% und insgesamt 185 COVID-19-Fällen hat die Studie eine Power von 90% für den Nachweis einer VE über 30%. Unter der Annahme einer COVID-19-Inzidenzrate von 0,15% pro Monat bei den Kontroll-Probanden und einer nicht-evaluierbaren Rate von 20% während der Studie, die 5% Seropositivität der Teilnehmer zu Studienbeginn (d.h. nicht-naive Probanden) einschließt, werden bei einer Verlaufskontrolle von 36.500 Probanden über 3 Monate (18.250 pro Vakzingruppe) die angestrebten 185 COVID-19-Fälle etwa 9 Monate nach der ersten Vakzinierung auftreten.

[0892] Für die co-primären Analysen der Wirksamkeit beginnt die Erfassung der COVID-19-Fälle ≥ 15 Tage nach der zweiten Vakzinierung mit CVnCoV. Dieser Zeitpunkt erlaubt es der Immunantwort, zu reifen und ihren vollen Umfang nach der zweiten Dosis zu erreichen. Somit stellt die Fallerfassung ab diesem Zeitpunkt die Bewertung der vollen VE von CVnCoV gegen COVID 19 dar.

[0893] Das Sicherheitsziel der Phase 3 ist die Generierung einer groß angelegten Sicherheitsdatenbank, die die Sicherheit von CVnCoV nachweisen soll. Bei allen Probanden, die an den Phase-2b- und Phase-3-Teilen der Studie teilnehmen, werden bis zu 6 Monate nach der zweiten Vakzinierung medizinisch betreute AEs gesammelt; AESIs und SAEs werden bis zu 1 Jahr nach der zweiten Vakzinierung gesammelt. Somit wird jeder Proband für ca. 13,5 Monate an der Studie teilnehmen, um die Sicherheit zu überwachen.

[0894] Personen mit einer virologisch bestätigten COVID-19-Erkrankung in der Vorgeschichte werden von der Teilnahme an dieser Studie ausgeschlossen. Allerdings werden in dieser Studie Teilnehmer mit einer Vorgeschichte oder einem Labornachweis einer früheren SARS-CoV-2-Infektion, von denen viele asymptomatisch gewesen sein könnten, nicht untersucht oder ausgeschlossen. Da ein Screening vor der Vakzinierung auf eine frühere Infektion in der Praxis wahrscheinlich nicht vorkommt, ist es wichtig, die Sicherheit der Vakzine und die Auswirkung von COVID-19 bei Personen mit früherer Infektion mit dem SARS-CoV-2-Virus zu verstehen.

5.3 Begründung der Dosis

[0895] Die Auswahl der 12-µg-mRNA-Dosis von CVnCOV für die Studie CV-NCOV-004 basierte auf den Ergebnissen zur Sicherheit, Verträglichkeit und Immunogenität aus den Studien CV-NCOV-001 und CV-NCOV-002.

5.4 Definition des Studienendes

[0896] Ein Proband gilt als am Ende der Studie angelangt, wenn er/sie alle Visiten sowie alle Verfahren und Tests abgeschlossen hat, die für die Gruppe, in die er/sie randomisiert wurde, gelten.

[0897] Das Ende der Studie CV-NCOV-004 ist definiert, wenn der letzte Proband die letzte Visite am Tag 393 absolviert hat oder die Studie vorzeitig beendet hat.

[0898] Es wird erwartet, dass alle Probanden die 1-Jahres-Verlängerungsstudie fortsetzen, in der das Ende der Studie definiert ist, wenn der letzte Proband die letzte Visite am Tag 757 absolviert hat.

5.5 Regeln für das Absetzen/Pausieren zur Sicherheit

5.5.1 Regeln zum Abbruch bei einzelnen Probanden

[0899] Die Regeln zum Abbruch der Studie bei einzelnen Probanden gelten für den Fall, dass eines der folgenden Ereignisse nach der ersten Vakzinierung der Studie eintritt:

- Eine allergische/anaphylaktische Reaktion, die als mit der Studienvakzine in Zusammenhang stehend angesehen wird.
- Jedes SAE, das als mit der Studienvakzine in Zusammenhang stehend betrachtet wird.

[0900] Wenn eine dieser Regeln erfüllt ist, darf der Proband die zweite Vakzindosis nicht erhalten. Der Proband wird ermutigt, die Teilnahme bis zum Ende der Studie zur Sicherheit fortzusetzen.

5.5.2 Unterbrechung der Studie

[0901] Die Entscheidung, die Studie aufgrund eines Sicherheitssignals zu unterbrechen (d.h. vorübergehende Unterbrechung der Aufnahme und der Vakzinierungen), basiert auf einer Empfehlung des DSMB in Absprache mit dem Sponsor (siehe Abschnitt 9.3.9.1). Das DSMB kann die Unterbrechung der Studie aufgrund von Sicherheitsbedenken empfehlen, nachdem es die akkumulierten Sicherheitsdaten überprüft hat, die bei den regelmäßig stattfindenden DSMB-Sitzungen präsentiert wurden, oder aufgrund einer laufenden Überprüfung der AEs, zu denen unter anderem vermutete unerwartete schwerwiegende Nebenwirkungen (SUSARs), alle SAEs, die als mit der Studienvakzine in Zusammenhang stehend beurteilt wurden, relevante SAEs (z.B. AESIs) und alle lebensbedrohlichen AEs und Todesfälle gehören. Diese Ereignisse werden während der Studie regelmäßig durch das DSMB überwacht. Die ausgewählten AEs und die Verfahren für die Sicherheitsüberprüfung sind in der DSMB-Charta detailliert beschrieben.

[0902] Um die Sicherheit des Probanden fortlaufend zu gewährleisten, wird eine verblindete Auflistung der oben beschriebenen AEs routinemäßig in regelmäßigen Abständen durch den Vorsitzenden des DSMB (oder einen Beauftragten) überprüft. Bei jeder Überprüfung wird der Vorsitzende (oder der/die Beauftragte(n)) feststellen, ob ein einzelnes Ereignis oder eine Gruppe von Ereignissen ein neues Sicherheitssignal darstellt. Wenn nicht, informiert der Vorsitzende das Studienteam, dass keine Sicherheitsbedenken bestehen. Wenn hingegen Sicherheitsbedenken bestehen, kann der Vorsitzende die AE oder die AEs entblinden und gegebenenfalls eine Ad-hoc-Sitzung des DSMB zur weiteren Bewertung des Ereignisses/der Ereignisse einberufen.

[0903] Basierend auf der Bewertung des Nutzen-Risiko-Verhältnisses und der biologischen Plausibilität eines kausalen Zusammenhangs der AE(s) mit der Studienvakzine gibt das DSMB eine Empfehlung an den Sponsor ab, entweder die Studie wie geplant fortzusetzen, die Durchführung zu modifizieren oder die Studie zu unterbrechen, um eine weitere Bewertung der AE zu ermöglichen. Im letzteren Fall trifft der Sponsor in Absprache mit dem DSMB die Entscheidung zur Unterbrechung der Studie.

[0904] Weitere Informationen zu den Aufgaben und Verantwortlichkeiten des DSMB sind in der DSMB-Charta zu finden.

6 STUDIENPOPULATION

[0905] Die Kriterien für die Aufnahme sind explizit zu befolgen. Wenn festgestellt wird, dass ein Proband, der/die eines oder mehrere der Einschlusskriterien nicht erfüllt und/oder eines oder mehrere der Ausschlusskriterien erfüllt, versehentlich eingeschlossen und ihm/ihr eine Dosis verabreicht wurde, muss der Sponsor sofort kontaktiert werden.

[0906] In dieser Studie werden Personen mit einer Vorgeschichte einer virologisch bestätigten COVID-19-Erkrankung von der Studie ausgeschlossen. In dieser Studie werden jedoch keine Personen mit einer Vorgeschichte oder einem Labornachweis einer früheren SARS-CoV-2-Infektion untersucht oder ausgeschlossen. Außerdem wird beim Screening kein routinemäßiger RT-PCR-Test durchgeführt, um Personen mit einer SARS-CoV-2-Infektion zum Zeitpunkt der Aufnahme auszuschließen. Etwaige länderspezifische Bestimmungen werden zusätzlich beachtet.

6.1 Einschlusskriterien für alle Probanden

[0907] Personen werden nur dann in diese Studie aufgenommen, wenn sie alle folgenden Kriterien erfüllen:

1. Männliche oder weibliche Probanden im Alter von 18 Jahren oder älter.

2. Schriftliche Einwilligung nach Aufklärung vor Beginn jeglicher Studienprozeduren.

3. Erwartete Compliance mit Protokollverfahren und Verfügbarkeit für die klinische Verlaufskontrolle bis zur letzten geplanten Visite.

4. Frauen im nicht-gebärfähigen Alter, die wie folgt definiert sind: chirurgisch steril (Vorgeschichte einer bilateralen Tubenligatur, bilateralen Oophorektomie oder Hysterektomie) oder postmenopausal (definiert als Amenorrhoe für ≥ 12 aufeinanderfolgende Monate vor dem Screening (Tag 1) ohne alternative medizinische Ursache). Ein Spiegel des Follikelstimulierenden Hormons (FSH) kann nach Ermessen des Prüfers gemessen werden, um den postmenopausalen Status zu bestätigen.

5. Frauen im gebärfähigen Alter: negativer Urin-Schwangerschaftstest (humanes Choriongonatropin; hCG) innerhalb von 24 Stunden vor jeder Studienvakzinierung an Tag 1 und Tag 29.

6. Frauen im gebärfähigen Alter müssen ab 2 Wochen vor der ersten Verabreichung der Studienvakzine bis 3 Monate nach der letzten Verabreichung hochwirksame Methoden der Geburtenkontrolle anwenden. Die folgenden Methoden der Geburtenkontrolle gelten als hochwirksam, wenn sie konsequent und korrekt angewendet werden:

• Kombinierte (östrogen- und gestagenhaltige) hormonelle Verhütung in Verbindung mit einer Ovulationshemmung (oral, intravaginal oder transdermal);

• Ausschließlich gestagenhaltige hormonelle Verhütungsmittel in Verbindung mit einer Ovulationshemmung (oral, injizierbar oder implantierbar);

• Intrauterinpessare (IUPs);

• Intrauterine hormonfreisetzende Systeme (IUSs);

• Beidseitiger Eileiter-Verschluss;

• Vasektomierter Partner oder unfruchtbarer Partner;

• Sexuelle Abstinenz (periodische Abstinenz, z.B. Kalender-, Ovulations-, symptothermale und Post-Ovulations-Methoden, und Entzug sind nicht akzeptabel).

6.2 Ausschlusskriterien

[0908] Personen werden nicht in diese Studie aufgenommen, wenn sie eines der folgenden Kriterien erfüllen:

1. Vorgeschichte einer virologisch bestätigten COVID-19-Erkrankung.

2. Bei weiblichen Probanden: Schwangerschaft oder Stillzeit.

3. Verwendung irgendeines Prüfpräparats oder eines nicht registrierten Produkts (Vakzine oder Arzneimittel) innerhalb von 28 Tagen vor der Verabreichung der ersten Studienvakzine oder geplante Verwendung während der Studie.

4. Erhalt von zugelassenen Vakzinen innerhalb von 28 Tagen (bei Lebendvakzinen) oder 14 Tagen (bei inaktivierten Vakzinen) vor der Verabreichung der ersten Studienvakzine.

5. Vorherige Verabreichung irgendeiner SARS-CoV-2-Vakzine oder einer anderen Coronavirus-Vakzine (SARS-CoV, MERS-CoV) oder geplante Anwendung während der Studie.

6. Jegliche Behandlung mit Immunsuppressiva oder anderen immunmodifizierenden Medikamenten (einschließlich, aber nicht beschränkt auf Kortikosteroide, Biologika und Methotrexat) für insgesamt > 14 Tage innerhalb von 6 Monaten vor der Verabreichung der Studienvakzine oder geplante Anwendung während der Studie. Für die Verwendung von Kortikosteroiden bedeutet dies Prednison oder Äquivalent, 0,5 mg/kg/Tag für 14 Tage oder mehr. Die Verwendung von inhalierten, topischen oder lokalisierten Injektionen von Kortikosteroiden (z.B. bei Gelenkschmerzen/-entzündungen) ist erlaubt.

7. Jedweder medizinisch diagnostizierte oder vermutete immunsuppressive oder immundefiziente Zustand basierend auf medizinischer Vorgeschichte und körperlicher Untersuchung, einschließlich bekannter Infektionen mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV), Hepatitis-B-Virus (HBV) oder Hepatitis-C-Virus (HCV); aktuelle Diagnose oder Behandlung von Krebs, einschließlich Leukämie, Lymphom, Hodgkin-Krankheit, multiplem Myelom oder allgemeiner Malignität; chronisches Nierenversagen oder nephrotisches Syndrom; und Erhalt einer Organ- oder Knochenmarktransplantation.

8. Angioödem in der Vorgeschichte (erblich oder idiopathisch), anaphylaktische Reaktion oder pIMD in der Vorgeschichte.

9. Allergie gegen einen Bestandteil der CVnCoV-Vakzine in der Vorgeschichte.

10. Verabreichung von Immunglobulinen oder irgendwelchen Blutprodukten innerhalb von 3 Monaten vor der Verabreichung der Studienvakzine oder geplante Verabreichung während der Studie.

11. Probanden mit einer signifikanten akuten oder chronischen medizinischen oder psychiatrischen Erkrankung, die nach Meinung des Prüferes eine Teilnahme an der Studie ausschließt (z.B. das Risiko der Studienteilnahme erhöhen kann, die Person unfähig macht, die Anforderungen der Studie zu erfüllen, oder die Studienauswertung bei der Person beeinträchtigen kann). Dazu gehören schwere und/oder unkontrollierte kardiovaskuläre Erkrankungen, gastrointestinale Erkrankungen, Lebererkrankungen, Nierenerkrankungen, Erkrankungen der Atemwege, endokrine Störungen sowie neurologische und psychiatrische Erkrankungen. Personen mit kontrollierten und stabilen Verläufen können jedoch in die Studie aufgenommen werden.

12. Probanden mit gestörter Gerinnung oder einer Blutungsstörung, bei denen eine intramuskuläre Injektion oder eine Blutentnahme kontraindiziert ist.

13. Vorhersehbare Nichteinhaltung der Studienabläufe nach Einschätzung des Prüferes.

6.3 Empfehlungen zur Verzögerung der Vakzinierung

[0909] Nach der Aufnahme können bei den Probanden klinische Umstände auftreten, die eine Verzögerung der Verabreichung der Studienvakzine rechtfertigen könnten, wie im Folgenden beschrieben.

• Probanden mit einer klinisch signifikanten (≥ Grad 2) aktiven Infektion oder einer anderen akuten Erkrankung (nach Einschätzung des Prüferes) oder einer Temperatur ≥ 38,0 °C (≥ 100,4 °F), innerhalb von 3 Tagen vor der geplanten Studienvakzinierung an Tag 1 oder Tag 29. Dies schließt Symptome ein, die eine COVID-19-Erkrankung darstellen könnten.

○ Die Studienvakzinierung sollte verschoben werden, bis die aktive Infektion oder andere akute Erkrankung auf ≤ Grad 1 abgeklungen ist oder die Temperatur des Probanden auf < 38,0 °C (< 100,4 °F) gesunken ist. Nach Abklingen der Erkrankung kann der Proband nach dem Ermessen des Prüferes erneut für die Studienvakzinierung vorgesehen werden.

○ Afebrile Probanden mit einer leichten Erkrankung können nach Ermessen des Prüferes vakziniert werden.

• Erhalt einer zugelassenen Vakzine innerhalb von 28 Tagen (für Lebendvakzine) oder 14 Tagen (für inaktivierte Vakzine) vor oder nach der geplanten Verabreichung der Studienvakzine. Da es sich hierbei

um empfohlene Zeitfenster handelt, sollte eine Umplanung der Studienvakzinierung zur Einhaltung dieser Zeitfenster nur vorgenommen werden, wenn dies praktikabel ist.

6.4 Nichterfüllung der Eignungskriterien

[0910] Der Prüfer muss für alle Probanden, die eine Einverständniserklärung unterzeichnet haben, Rechenschaft ablegen. Wenn sich herausstellt, dass der Proband nicht geeignet ist (d.h. nicht alle Einschlusskriterien erfüllt oder ein oder mehrere Ausschlusskriterien erfüllt), sollte der Prüfer dies in den Unterlagen des Probanden dokumentieren.

7 STUDIENVAKZINE

7.1 Verabreichung der Studienvakzine

7.1.1 Beschreibung der Studienvakzine

[0911] CVnCoV ist eine LNP-formulierte RNActive® SARS-CoV-2-Vakzine in der Erprobung. Das IMP besteht aus dem aktiven pharmazeutischen Wirkstoff, einer mRNA, die für Wsmpv-SP kodiert, und 4 Lipidkomponenten: Cholesterol, 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DSPC), PEGyliertem Lipid und einem kationischen Lipid. Das Ganze wird als Konzentrat mit 1 mg/ml der mRNA-Wirkstoffsubstanz geliefert.

[0912] Die Placebo-Vakzine ist eine sterile normale Kochsalzlösung (0,9% NaCl) zur Injektion.

7.1.2 Dosierung und Verabreichung

7.1.2.1 CVnCoV

[0913] Probanden, die auf CVnCoV randomisiert wurden, erhalten 2 Injektionen von CVnCoV mit einer Dosis von 12 µg mRNA, die im Abstand von 28 Tagen verabreicht werden.

[0914] Die Verabreichung von CVnCoV muss durch intramuskuläre (IM) Injektion in den Deltamuskelbereich, vorzugsweise in den nicht-dominanten Arm, erfolgen. CVnCoV ist ausschließlich für die IM-Injektion vorgesehen und darf nicht subkutan, intradermal oder intravenös injiziert werden. Die Anweisungen zur Injektion, wie sie im Pharmaziehandbuch beschrieben sind, müssen befolgt werden.

7.1.2.2 Placebo-Kontrolle (normale Kochsalzlösung)

[0915] Probanden, die in den Kontrollzweig der Studie randomisiert wurden, erhalten 2 Dosen Kochsalz-Placebo (normale Kochsalzlösung (0,9% NaCl) zur Injektion), die im Abstand von 28 Tagen verabreicht werden.

[0916] Die Verabreichung des Kochsalz-Placebos muss durch IM-Injektion in den Deltamuskelbereich erfolgen, vorzugsweise in den nicht dominanten Arm. Die im Pharmaziehandbuch beschriebenen Anweisungen zur Injektion müssen befolgt werden.

7.1.2.3 Überempfindlichkeitsreaktionen auf die Vakzinierung

[0917] CVnCoV sollte nicht an Personen verabreicht werden, die eine bekannte Überempfindlichkeit gegen einen der Bestandteile der Vakzine haben.

[0918] Da ein theoretisches Risiko für anaphylaktische Reaktionen besteht, darf die Studienvakzine nur verabreicht werden, wenn eine Notfallausrüstung zur Behandlung anaphylaktischer Reaktionen (intravenöse Flüssigkeiten, Kortikosteroide, H1- und H2-Blocker, Epinephrin, Ausrüstung zur kardiopulmonalen Reanimation) unmittelbar zur Verfügung steht. Alle Probanden müssen nach der Verabreichung der Studienvakzine mindestens 30 Minuten lang unter direkter Aufsicht von Personal bleiben, das in der Behandlung dieser Reaktionen geschult ist.

[0919] Wenn nach der Verabreichung der Studienvakzine Anaphylaxie oder schwere Überempfindlichkeitsreaktionen auftreten, sollten keine weiteren Dosen verabreicht werden (siehe Abschnitte 5.5.1 und 8.1).

7.2 Präparation/Handhabung/LagerungNerantwortlichkeit

[0920] Detaillierte Informationen zur Zubereitung, Handhabung, Lagerung und Verblindung von CVnCoV und Kochsalz-Placebo sind im Pharmaziehandbuch zu finden.

7.2.1 CVnCoV-Präparation

[0921] Das konzentrierte CVnCoV muss in der mitgelieferten sterilen normalen Kochsalzlösung (0,9% NaCl), welche ein Konservierungsmittel enthält, verdünnt werden, um die Dosislösung für die IM-Injektion herzustellen. Diese wird von einem nicht verblindeten qualifizierten Pharmazeuten gemäß der von der CureVac AG zur Verfügung gestellten Gebrauchsanweisung für das IMP zubereitet. Der Pharmazeut hat nach der Vakzinierung keine weitere Funktion in der Studie und wird die Behandlungszuweisungen streng vertraulich behandeln.

7.2.2 Lagerung und Stabilität des CVnCoV-Produkts

[0922] Konzentriertes CVnCoV wird gefroren bei unter -60 °C zum Verabreichungsort geliefert.

[0923] Nach dem Eintreffen am Verabreichungsort sollte das konzentrierte CVnCoV bei Temperaturen unter -60 °C eingefroren gelagert werden.

7.2.3 Placebo-Kontrolle (normale Kochsalzlösung)

[0924] Die normale Kochsalzlösung umfassende Placebo-Kontrollvakzine sollte entsprechend der Zusammenfassung der Produktmerkmale gelagert werden.

7.2.4 Verantwortlichkeit

[0925] Es liegt in der Verantwortung des Prüfers, sicherzustellen, dass aktuelle und genaue Aufzeichnungen über die in der Prüfstelle erhaltenen, gelagerten und abgegebenen Prüfpräparate unter Verwendung geeigneter Formulare gemäß den geltenden Bestimmungen und Richtlinien geführt werden. Die Prüfpräparate müssen unter den empfohlenen Lagerbedingungen, verschlossen und mit eingeschränktem Zugang gelagert werden (siehe Pharmaziehandbuch). Autorisiertes Personal muss die Vakzine in der Prüfstelle und in Übereinstimmung mit dem Protokoll und den geltenden Vorschriften und Richtlinien abgeben.

[0926] In der Prüfstelle müssen die IMP-Verwaltungs- und Bestandsprotokolle mit den folgenden Informationen auf dem neuesten Stand gehalten werden:

- Datum und Menge des von CureVac erhaltenen CVnCoV.
- Eindeutiger Probanden-Identifikator.
- Datum und Menge der an jeden Probanden abgegebenen Studienvakzine.
- Initialen der Person, die die Dosis vorbereitet.
- Initialen der Person, die die Vakzine verabreicht.

[0927] Diese Protokolle müssen für Inspektionen leicht zugänglich sein und können jederzeit von den Behörden eingesehen werden.

7.3 Randomisierung und Verblindung

[0928] Sowohl Phase 2b als auch Phase 3 werden randomisiert, Beobachter-verblindet und placebokontrolliert sein. Aufgrund des unterschiedlichen Erscheinungsbildes der zu prüfenden CVnCoV-Vakzine und des Placebos muss die Studie Beobachter-verblindet durchgeführt werden, was eine anerkannte Methode zur Verblindung darstellt.

7.3.1 Randomisierung

[0929] Probanden im Alter von 18 Jahren oder älter werden an mehreren Standorten weltweit in die Studie aufgenommen und in einem Verhältnis von 1:1 randomisiert, um entweder CVnCoV oder Placebo zu erhalten. Die Randomisierung wird zentral durchgeführt und nach Land und Altersgruppe (18 bis 60 und ≥ 61

Jahre) stratifiziert. Das Randomisierungsschema wird von einer unabhängigen Statistikgruppe des Auftragsforschungsinstituts („Contract Research Organization“; CRO), PRA, erstellt und gepflegt. Die Probanden werden online in die Studie aufgenommen und mit Hilfe eines interaktiven Web-Response-Systems (IWRS) randomisiert. Nach Eingabe der demographischen Daten und der Eignungskriterien in das System wird jedem in die Studie aufgenommenen Probanden seine Behandlungszuordnung zugewiesen.

7.3.2 Verblindung

[0930] Die Probanden werden randomisiert und mit CVnCoV oder Placebo vakziniert, wobei dies (aufgrund des unterschiedlichen Aussehens und der Darreichung der CVnCoV-Vakzine und des Placebos) in einer Beobachter-verblindeten Art und Weise geschieht. Der Pharmazeut an der Prüfstelle wird nicht verblindet sein, was die Identität der dem Probanden verabreichten Studienvakzine betrifft. Der Impfarzt, der Prüfer und alle an der Durchführung der Studie beteiligten Personen (einschließlich der Nachverfolgung der Sicherheit und der Erfassung der COVID-19-Fälle) werden jedoch hinsichtlich der Zuweisung der Studienvakzine und der Behandlung der Probanden verblindet sein. Um die Verblindung des Impfarztes aufrechtzuerhalten, wird der Pharmazeut dem Impfarzt die Dosis der Studienvakzine in einer vorgefüllten Spritze mit einem Etikett aushändigen, das den flüssigen Inhalt verdeckt, so dass er nicht sichtbar ist. Alle Mitarbeiter des CRO und des Sponsors, die direkt an der Durchführung der Studie beteiligt sind, werden ebenfalls verblindet sein. Es wird bestimmte Personen bei der CRO und dem Sponsor geben, deren Funktion es erfordert, dass sie während der klinischen Prüfung nicht verblindet sind (z.B. unverblindete Überwachung der Verantwortlichkeit für die Studienvakzine in der Apotheke; unverblindeter unabhängiger Statistiker, der das DSMB unterstützt; Überprüfung der Immunogenitätsdaten (siehe nächster Absatz)). Diese unverblindeten Personen werden identifiziert und ihre Verantwortlichkeiten werden dokumentiert.

[0931] Da die Immunogenitätsergebnisse die Behandlungszuordnung des Probanden offenlegen würden, wird das unabhängige Labor, das die Tests durchführt, die Ergebnisse streng vertraulich behandeln. Eine nichtverblindete Person, die zu Beginn der Studie benannt wird und unabhängig von der Durchführung der Studie ist, hat die Aufgabe, die Qualität der Immunogenitätsdaten zu überprüfen, während sie generiert werden. Diese Person wird die Ergebnisse streng vertraulich behandeln. Um die Verblindung aufrechtzuerhalten, werden die Immunogenitätsdaten erst nach der Entblindung der Studie mit der klinischen Datenbank zusammengeführt.

[0932] Es liegt im Ermessen der DSMB-Mitglieder, ob Sicherheitsdaten, die in den DSMB-Sitzungen überprüft werden, entblindet werden oder nicht. Falls irgendwelche Sicherheitsbedenken bestehen, kann das DSMB jederzeit die Entblindung eines einzelnen Probanden oder eines bestimmten Datensatzes verlangen. Zusätzlich wird das DSMB in regelmäßigen Abständen die COVID-19-Fälle nach Vakzingruppen auf VDE-Signale überprüfen. Bei den Interimanalysen wird das DSMB die COVID-19-Fälle nach Vakzingruppen auf Wirksamkeit oder Futilität überprüfen und das Ergebnis dem Sponsor verblindet mitteilen.

[0933] Für die Einreichung von Dokumenten für die behördliche Genehmigung während der laufenden Durchführung der Studie CV-NCOV-004 (z.B. wenn die Wirksamkeit in einer der Interimanalysen nachgewiesen wird) wird ein unverblindetes Submission-Team gebildet, das völlig unabhängig von dem Team ist, das die Studie durchführt. Das Submission-Team setzt sich aus Personen des Sponsors und der CRO zusammen, und ihre Rollen und Verantwortlichkeiten im nicht verblindeten Team werden klar definiert.

7.3.3 Notfall-Entblindung

[0934] Eine individuelle Entblindung sollte nur in Notfallsituationen aus Gründen der Probandensicherheit erfolgen, wenn die Kenntnis der Studienvakzine für das klinische Management oder das Wohlergehen des Probanden unerlässlich ist. Die Entblindung in dieser Situation erfolgt nach dem Ermessen des Prüfers, idealerweise in Absprache mit dem Sponsor.

[0935] Im Allgemeinen sollte die Identität der Studienvakzine keinen Einfluss auf die klinische Behandlung irgendwelcher SAEs/AE haben. Wann immer möglich, sollte der Prüfer versuchen, den Sponsor zu kontaktieren, bevor er die Verblindung aufhebt, um die Notwendigkeit einer Notfallentblindung zu besprechen. Sobald dies vereinbart wurde, wird das Code-Breaking über das IWRS durchgeführt.

[0936] Wenn die Verblindung aufgehoben wird, müssen das Datum, der genaue Zeitpunkt und der Grund dafür in den Quelldokumenten vollständig dokumentiert werden. Der Prüfer sollte andere verblindete Studienmitarbeiter nicht über die Identität des IMP informieren.

[0937] Wenn der Code gebrochen wurde und keine medizinischen Gründe für einen Abbruch vorliegen, kann der Proband an der Studie weiter teilnehmen. Wenn der Proband mindestens eine Dosis der Studienvakzine erhalten hat, liegt es im Ermessen des Prüfers, in Absprache mit dem Sponsor, ob der Proband mit der zweiten Dosis vakziniert wird. Wenn der Proband aus der Studie ausscheidet, sollten alle Anstrengungen unternommen werden, um die Sicherheitsbeobachtung des Probanden bis zum Ende der Studie fortzusetzen.

7.4 Vakzin-Compliance

[0938] Der Prüfer muss alle verabreichten Studienvakzinierungen in der eCRF-Seite des Probanden aufzeichnen.

7.5 Fehlgebrauch und Überdosierung

[0939] Definition von Fehlgebrauch: Situationen, in denen die Studienvakzine absichtlich und unsachgemäß nicht in Übereinstimmung mit den Dosierungsanweisungen des Protokolls oder der autorisierten Produktinformation verwendet wird.

[0940] Definition von Überdosierung: Verabreichung einer Menge der Studienvakzine pro Verabreichung oder kumulativ, die über der maximalen empfohlenen Dosis gemäß den Dosierungsanweisungen des Protokolls oder der autorisierten Produktinformation liegt.

[0941] Nach den derzeitigen klinischen und nicht-klinischen Erfahrungen sind keine toxischen Wirkungen zu erwarten. Mögliche lokale Reaktionen (Schmerzen) oder systemische AEs (Fieber, Kopfschmerzen, Müdigkeit, Schüttelfrost, Myalgie, Arthralgie, Übelkeit/Erbrechen und Diarrhö) können symptomatisch mit physikalischen Maßnahmen, Paracetamol oder nicht-steroidalen entzündungshemmenden Arzneimitteln behandelt werden.

7.6 Begleittherapie und Vakzine

[0942] Begleitmedikation und Vakzine einschließlich des Grundes für die Verabreichung müssen im eCRF des Probanden erfasst werden.

7.6.1 Erlaubte Medikamente/Vakzine während der Studie

[0943] Den Probanden ist es gestattet, fiebersenkende Mittel und andere Schmerzmedikamente zur Behandlung von laufenden Erkrankung(en) des Probanden einzunehmen. Fiebersenkende Mittel (z.B. Paracetamol) oder andere Schmerzmittel dürfen zur Behandlung lokaler und/oder systemischer Reaktionen im Zusammenhang mit der Studienvakzinierung verwendet werden. Die prophylaktische Einnahme von Paracetamol zur Vorbeugung möglicher Vakzin-assoziierter Reaktionen ist in dieser Studie ebenfalls erlaubt. Wenn zum Beispiel bei einem Individuum nach der ersten Studienvakzinierung unerwünschte Reaktionen auftreten, kann Paracetamol prophylaktisch für diese Reaktionen bei der zweiten Studienvakzinierung eingenommen werden. In diesem Fall kann Paracetamol (bis zu einer Dosis von 1 Gramm) nach der Studienvakzinierung und vor dem Schlafengehen sowie am nächsten Tag morgens und vor dem Schlafengehen eingenommen werden. Alternativ kann eine 500-mg-Dosis Paracetamol alle 6 Stunden nach der Studienvakzinierung für bis zu 36 Stunden eingenommen werden. Die Dosis und das Dosierungsschema von Paracetamol sollten mit dem Prüfer besprochen werden.

[0944] Paracetamol, das zur Behandlung von Vakzin-assoziierten Reaktionen oder zur Prophylaxe verabreicht wird, muss zusammen mit dem Zeitpunkt der Verabreichung in Bezug auf die Studienvakzinierung im eCRF dokumentiert werden.

[0945] Abgesehen von den verbotenen Medikamenten und Vakzinen, die in Abschnitt 6.2 beschrieben und unten in Abschnitt 7.6.2 aufgeführt sind, sind Medikamente erlaubt, die für die Behandlung der vorbestehenden medizinischen Zustände des Probanden erforderlich sind.

7.6.2 Verbotene Arzneimittel/Vakzine während der klinischen Prüfung

- Die Verwendung jeglicher in der Prüfung befindlicher oder nicht zugelassener Produkte (Vakzine oder Arzneimittel) ist während der klinischen Prüfung verboten.

• Zugelassene Vakzine dürfen während der Studie nicht innerhalb von 28 Tagen (bei Lebendvakzinen) bzw. 14 Tagen (bei inaktivierten Vakzinen) nach Verabreichung der Studienvakzine verabreicht werden.

• Die Verabreichung irgendeiner anderen Studienvakzine gegen SARS-CoV-2 oder einer anderen Coronavirus-Vakzine ist während der Studie verboten.

• Jegliche Behandlung mit Immunsuppressiva oder anderen immunmodifizierenden Medikamenten (einschließlich, aber nicht beschränkt auf Kortikosteroide, Biologika und Methotrexat) ist während der Studie verboten. Für die Verwendung von Kortikosteroiden bedeutet dies Prednison oder Äquivalent, 0,5 mg/kg/Tag für 14 Tage oder mehr. Die Verwendung von inhalativen, topischen oder lokalisierten Injektionen von Kortikosteroiden (z.B. bei Gelenkschmerzen/Entzündungen) ist erlaubt.

• Die Verabreichung von Immunglobulinen oder jeglichen Blutprodukten ist während der Studie verboten.

7.7 Therapie, die zum Abbruch führt

[0946] Wenn ein Proband eine Therapie benötigt, die als Ausschlusskriterium in Abschnitt 6.2 aufgeführt ist und die nicht aufgeschoben werden kann, sollte nach Einzelfallprüfung ein Abbruch erwogen werden, um die Integrität der Studiendaten zu gewährleisten. Es sollten alle Anstrengungen unternommen werden, um die Sicherheit des Probanden bis zum Ende der Studie weiter zu verfolgen.

7.8 Behandlung nach dem Ende der Studie

[0947] Es wird keine Behandlung nach Studienende angeboten.

8 ABBRUCH-/AUSSTIEGSKRITERIEN

[0948] Die Teilnahme an der Studie ist streng freiwillig. Ein Proband hat das Recht, jederzeit und aus beliebigen Gründen aus der Studie auszusteigen. Der Prüfer hat das Recht, einen Probanden von der weiteren Verabreichung der Vakzine und/oder der Studie auszuschließen, wenn dies im besten Interesse des Probanden oder als Folge einer Protokollabweichung erwogen wird.

[0949] Bei Abbrüchen aufgrund eines AE sollte jede Anstrengung unternommen werden, den Ausgang des Ereignisses zu dokumentieren.

[0950] Probanden, die mindestens eine Dosis der Studienvakzine erhalten haben, werden ermutigt, die Teilnahme bis zum Ende der Studie fortzusetzen, um die Sicherheit zu bewerten.

8.1 Abbruch der Verabreichung der Studienvakzine

[0951] Der primäre Grund für den Abbruch der weiteren Verabreichung der Studienvakzine wird im eCRF des Probanden nach den folgenden Kategorien erfasst:

• Rücknahme der Einwilligung durch den Probanden.

[0952] Der Grund für den Rücktritt, falls angegeben, sollte im eCRF aufgezeichnet werden.

[0953] Hinweis: Es sollten alle Versuche unternommen werden, den Grund für den Rücktritt zu ermitteln, und, wenn möglich, sollte der primäre Grund erfasst werden (d.h. ein Rücktritt aufgrund eines AE sollte nicht in der Kategorie „freiwilliger Rücktritt“ erfasst werden).

• AE (einschließlich bekannter Nebenwirkungen der Studienvakzine).

[0954] Wenn der Abbruch aufgrund eines AE erfolgt, das möglicherweise mit der Studienvakzine oder den Prüfverfahren zusammenhängt, muss der Proband durch zusätzliche Untersuchungen nach dem medizinischen Ermessen des Prüferes weiter beobachtet werden, bis der Zustand abgeklungen ist oder der Prüfer weitere Beobachtungen oder Untersuchungen für medizinisch nicht mehr angezeigt hält.

• Änderung des allgemeinen Gesundheitszustandes des Probanden, die eine weitere Teilnahme verbietet.

• Schwangerschaft (siehe Abschnitt 9.3.5).

[0955] Jede Probandin, die trotz des Erfordernisses einer adäquaten Empfängnisverhütung während der Studie schwanger wird, erhält keine weiteren Vakzindosen aus der Studie. Die Prüfstelle sollte mit der schwangeren Probandin in Kontakt bleiben und so bald wie möglich ein „Clinical Trial Pregnancy Form“ ausfüllen. Darüber hinaus sollte die Probandin bis zur Geburt des Kindes oder bis zum spontanen oder freiwilligen Abbruch der Schwangerschaft weiter beobachtet werden. Wenn Informationen über den Ausgang der Schwangerschaft vorliegen, sollten diese Informationen mit demselben Formular erfasst werden. Die Probandin sollte als IMP-Abbrecherin gemeldet werden und der Grund (d.h. Schwangerschaft) sollte angegeben werden.

- Studienabbruch durch den Sponsor (in diesem Fall würde die minimale Sicherheitsnachuntersuchung am Ende der Studie an Tag 393 durchgeführt).
- Wesentliche Protokollabweichung.
- Sonstiges.

[0956] Hinweis: Die spezifischen Gründe sollten im Feld „Spezifizierung“ des eCRF eingetragen werden.

8.2 Ausscheiden aus der Studie

[0957] Probanden sollten aus der Studie ausgeschlossen werden, wenn eine der folgenden Situationen eintritt:

- Die fortgesetzte Teilnahme gefährdet die Gesundheit, Sicherheit oder Rechte des Probanden.
- Der Proband hat ein AE erlitten, das eine vorzeitige Beendigung erfordert, weil die weitere Teilnahme ein inakzeptables Risiko für die Gesundheit des Probanden darstellt oder der Proband aufgrund des AE nicht bereit ist, weiterzumachen. Die Gründe für die Nichtdurchführung weiterer Sicherheits- oder Immunogenitätsuntersuchungen sollten dokumentiert werden.
- Der Proband ist nicht in die Prüfstelle zurückgekehrt und mehrere Versuche (mindestens 3 Versuche), den Probanden zu kontaktieren, waren erfolglos („lost to follow-up“).
- Der Proband möchte von der Studie zurücktreten. Der Grund für den Rücktritt, falls angegeben, sollte dokumentiert werden.

[0958] Es sollten alle Versuche unternommen werden, um den zugrundeliegenden Grund für den Rücktritt zu ermitteln, und, wenn möglich, sollte der primäre zugrundeliegende Grund aufgezeichnet werden (d.h. ein Rücktritt aufgrund eines AE sollte nicht in der Kategorie „freiwilliger Rücktritt“ erfasst werden).

[0959] Jeder Proband, der seine Teilnahme vorzeitig beendet und mindestens eine Vakzindosis aus der Studie erhalten hat, wird denselben Verfahren unterzogen wie beim Studienende, es sei denn, diese Verfahren werden als inakzeptables Risiko für den Probanden angesehen. Ausgeschiedene oder zurückgetretene Probanden werden nicht ersetzt.

8.3 Beendigung der Studie

[0960] Der Sponsor behält sich das Recht vor, die klinische Prüfung zu jedem Zeitpunkt zu beenden. Mögliche Gründe für einen Abbruch der klinischen Prüfung sind:

- Das Ergebnis der Interimanalyse zeigt hohe VE oder Futilität.
- Sicherheitsgründe: Das Auftreten von AEs in dieser oder einer anderen Studie mit einer verwandten Vakzine deutet auf ein potentielles Gesundheitsrisiko für die Probanden hin.
- Neue wissenschaftliche Erkenntnisse werden bekannt, die die Ziele der Studie nicht mehr durchführbar/valide machen.
- Es ist unwahrscheinlich, dass die Prüfstelle in der Lage ist, innerhalb des vereinbarten Zeitrahmens genügend Probanden zu rekrutieren.
- Die Prüfstelle reagiert nicht auf Anfragen der Prüfleitung.
- Wiederholte Protokollabweichungen.
- Unsichere oder unethische Praktiken.

• Administrative Entscheidung.

[0961] Nach einer Entscheidung über den Abbruch der Studie muss der Prüfer alle Probanden innerhalb eines vom Sponsor festgelegten Zeitraums kontaktieren. Alle Studienmaterialien müssen eingesammelt und die relevante Dokumentation so weit wie möglich vervollständigt werden. Die Studie kann auch von der zuständigen Behörde aus beliebigen Gründen oder auf Empfehlung des DSMB oder auf Ebene der Prüfstelle von der unabhängigen Ethik-Kommission oder dem Institutional Review Board (IEC/IRB) beendet werden. Der Sponsor kann eine einzelne Prüfstelle aus Gründen, wie z.B. mangelhafte Einhaltung des Protokolls oder unbefriedigender Rekrutierung von Probanden, vorzeitig schließen.

8.4 Ohne Verlaufskontrolle (Lost to Follow-up)

[0962] Es sollten alle Anstrengungen unternommen werden, um Probanden zu kontaktieren, die nicht zur geplanten Studienvisite zurückgekehrt sind oder die für einen geplanten Telefonanruf nicht erreicht werden können. Es sollten mindestens 3 Versuche unternommen und dokumentiert werden. Wenn ein Proband zur Verlaufskontrolle nicht mehr erreichbar ist, bevor die damit verbundenen SAEs oder AEs aufgeklärt sind, kann der Sponsor weitere Versuche in Betracht ziehen, den Probanden zu kontaktieren, um weitere Sicherheitsinformationen bezüglich der Verlaufskontrolle zu sammeln.

9 BEWERTUNGEN UND VERFAHREN DER STUDIE

[0963] Die Bewertungen und Verfahren der Studie werden in diesem Abschnitt beschrieben.

[0964] Bei Probanden, die nicht in der Lage sind, zu den im Studienprotokoll vorgesehenen Visiten zur Prüfstelle zu kommen (z.B. aufgrund des öffentlichen Gesundheitsnotstands im Zusammenhang mit COVID-19), können Sicherheitsbewertungen mit alternativen Methoden durchgeführt werden (z.B. telefonischer Kontakt, virtuelle Visite, alternativer Ort für die Bewertung).

[0965] Zur weiteren Flexibilität bei der Durchführung der Studie im Pandemiefall sind Hausbesuche zur Durchführung von Sicherheitsbewertungen und Verfahren einschließlich der Entnahme von Blutproben und anderen Bioproben zulässig. Wenn Visiten in der Prüfstelle, telefonische Kontakte oder Probenentnahmen nicht innerhalb der im Protokoll definierten Zeitfenster durchgeführt werden können, ist es unter besonderen Umständen, wie z.B. einem öffentlichen Gesundheitsnotfall, akzeptabel, diese Aufgaben außerhalb dieser Zeitfenster durchzuführen. Im Pandemiefall dienen die im Protokoll definierten Zeitfenster für Visiten in der Prüfstelle und telefonische Kontakte als Orientierungshilfe und werden nicht als Abweichung betrachtet, wenn sie nicht strikt eingehalten werden.

[0966] Während der Studie wird ein elektronisches Tagebuch (eDiary) zur effizienten Erfassung von sicherheitsrelevanten Informationen verwendet. Für einige Probanden können jedoch während der Studie auch Papiertagebücher verwendet werden.

[0967] Der Beginn der Aufnahme der Probanden der 2 Zielaltersgruppen in Phase 2b wird flexibel sein. Abhängig vom Zeitpunkt der Daten aus den Phase-1- und Phase-2a-Studien kann die Aufnahme der beiden Altersgruppen in Phase 2b gestaffelt erfolgen, wobei zunächst mit Probanden im Alter von 18 bis 60 Jahren begonnen wird, gefolgt von Probanden im Alter von ≥ 61 Jahren. Da die ältere Altersgruppe 20% bis 25% der Gesamtzahl der Probanden in Phase 2b ausmachen wird, ist nicht zu erwarten, dass dieser gestaffelte Beginn die Gesamtaufnahme der Probanden der Phase 2b-Kohorte beeinflusst.

9.1 Zeitplan für Bewertungen und Verfahren der Studie

[0968] Mit der Unterzeichnung der Einwilligungserklärung erklären sich die Probanden bereit, sowohl an der Studie CV-NCOV-004 als auch an der einjährigen Verlängerungsstudie teilzunehmen, was einer Gesamtteilnahmedauer von ca. 2,1 Jahren entspricht.

[0969] Die Beurteilungen und Verfahren der Studie gelten für alle Probanden, unabhängig davon, ob sie vor der Studie eine positive SARS-CoV-2-Serologie aufwiesen oder unabhängig vom Serologiestatus bei Studienbeginn gemäß der retrospektiven Analyse.

[0970] Probanden, die an Phase 2b teilnehmen, erhalten ein Thermometer zur oralen Messung der Körpertemperatur und ein Maßband zur Bestimmung der Größe der lokalen Reaktionen an der Injektionsstelle. Die Probanden werden instruiert, wie sie die abgefragten AEs täglich für 7 Tage in das eDiary eintragen.

[0971] Während der Durchführung der Studie und der Interaktion mit den Probanden sollte jede Person, die frühe Warnzeichen von COVID-19 aufweist, sofort an eine medizinische Notfallversorgung verwiesen werden. Zu diesen Anzeichen gehören unter anderem: Atembeschwerden, anhaltende Schmerzen oder Druck in der Brust, neu auftretende Verwirrtheit, Unfähigkeit, wach zu werden oder wach zu bleiben, oder bläuliche Lippen oder bläuliches Gesicht.

9.1.1 Phase 2b: Immunogenitäts-Untergruppe

[0972] Die Immunogenitäts-Untergruppe der Phase 2b wird die ersten 600 Probanden umfassen, die in jeder der beiden Altersgruppen, 18-60 und ≥ 61 Jahre, in die Phase 2b aufgenommen werden. Somit wird die angestrebte Gesamtzahl an aufgenommenen Probanden etwa 1.200 betragen.

9.1.1.1 Klinikvisite 1: Tag 1 - Erste Studienvakzinierung

[0973] Die Verfahren zur Feststellung der Eignung der Probanden, der Erfassung der demographischen Daten und der Krankengeschichte können innerhalb von 21 Tagen vor der Verabreichung der Studienvakzine durchgeführt werden, d.h. über mehr als einen Tag verteilt. Wenn jedoch alle Informationen verfügbar sind und die Beurteilungen und Verfahren durchgeführt werden können, kann die Eignung am selben Tag der Verabreichung der Studienvakzine festgestellt werden. Alle Eignungskriterien müssen vor der Verabreichung der Studienvakzine an Tag 1 überprüft werden. Verfahren vor der Vakzinierung

• Einholung der unterschriebenen Einverständniserklärung.

- Die unterschriebene Einverständniserklärung muss eingeholt werden, bevor der Proband an der Studie teilnimmt und bevor irgendwelche vom Protokoll vorgesehenen Verfahren durchgeführt werden.

- Mit der Unterzeichnung der Einverständniserklärung erklärt sich der Proband freiwillig bereit, an der HERALD-Studie CV-NCOV-004 und deren 1-jähriger Verlängerungsstudie für insgesamt ca. 2 Jahre teilzunehmen.

• Überprüfen der Einschluss-/Ausschlusskriterien (siehe Abschnitt 6.1 und 6.2) und überprüfen verbotene Medikationen, die als Ausschlusskriterium aufgeführt sind (siehe Abschnitt 6.2).

• Erfassen der demographischen Informationen.

• Erfassen der medizinischen Vorgeschichte.

• Erfassen der begleitenden Medikationen und Vakzinierungen, einschließlich wiederkehrender Medikationen für intermittierende Zustände, wenn diese innerhalb von 6 Monaten vor der Aufnahme in diese Studie eingenommen wurden.

• Durchführen einer vollständigen körperlichen Untersuchung, einschließlich Größe und Gewicht (siehe Abschnitt 9.3.7). Wenn die vollständige körperliche Untersuchung zur Feststellung der Eignung innerhalb von 21 Tagen vor der Verabreichung der Studienvakzine durchgeführt wurde, sollte am Tag der Vakzinierung vor der Verabreichung der Studienvakzine eine symptomorientierte körperliche Untersuchung durchgeführt werden.

• Messen der Vitalparameter (Körpertemperatur, Puls, Blutdruck; siehe Abschnitt 9.3.7).

• Durchführen eines Urin-Schwangerschaftstests bei Frauen im gebärfähigen Alter.

• Entnahme von Blutproben vor der Vakzinierung für den Test auf an die RBD des S-Proteins von SARS-CoV-2 bindende Antikörper (~6 ml Blut), für den Test auf SARS-CoV-2-Virus-neutralisierende Aktivität (~6 ml Blut) und für den Test auf an das N-Protein von SARS-CoV-2 bindende Antikörper (~6 ml Blut).

• Entnehmen von Blutproben vor der Vakzinierung für genomische Biomarker (~6 ml Blut) von Probanden an ausgewählten Standorten.

• Entnehmen von Blutproben vor der Vakzinierung für CMI (~32 ml Blut) von Probanden an ausgewählten Standorten.

[0974] Ablauf der Vakzinierung

• Überprüfen der Kriterien für die Verzögerung oder den Abbruch der Vakzinierung. Siehe Abschnitte 6.3 und 8.1 für einen Überblick über die Kriterien, die zu einer Verzögerung oder einem Abbruch der Vakzinverabreichung führen. Im Falle einer Verzögerung sollte die Vakzinierung innerhalb der erlaubten Zeitfenster stattfinden. Die Gründe für die Verzögerung oder den Abbruch sollten in der Akte des Probanden dokumentiert werden.

• Verabreichen der Studienvakzindosis entsprechend der Zuweisung des Probanden. Verfahren nach der Vakzinierung

• Beobachten des Probanden nach der Vakzinierung für mindestens 30 Minuten zur Sicherheitsüberwachung vor Ort. Am Ende der Beobachtungszeit:

- Messen der Vitalparameter (Körpertemperatur, Puls, Blutdruck; siehe Abschnitt 9.3.7).

- Der Proband darf erst entlassen werden, wenn die Vitalparameter im Normalbereich liegen oder auf das Niveau vor der Vakzinierung zurückgegangen sind.

- Erfassen des Auftretens von AEs nach der Studienvakzinierung.

• Anweisungen für den Probanden:

- Anweisen des Probanden, wie er abgefragte AEs messen und in das eDiary eintragen soll. Der Proband sollte abgefragte lokale und systemische AEs, die am Tag der Vakzinierung und in den folgenden 7 Tagen auftreten, sowie nicht abgefragte AEs (d.h. das Auftreten aller anderen AEs), die am Tag der Vakzinierung und in den folgenden 28 Tagen auftreten, aufzeichnen.

- Erinnern des Probanden daran, die Prüfstelle sofort anzurufen, um Folgendes zu melden:

○ Wenn er/sie irgendwelche besorgniserregenden lokalen oder systemischen Reaktionen oder andere medizinische Ereignisse verspürt.

○ Alle medizinischen Visiten, die keine Routinevisiten für eine körperliche Untersuchung oder Vakzinierung sind, wie z.B. Visiten für eine Hospitalisierung, eine Visite in der Notaufnahme oder eine anderweitig ungeplante Visite bei oder von medizinischem Personal (Arzt) aus irgendeinem Grund.

○ Ein schwerwiegendes medizinisches Ereignis, eine Veränderung des allgemeinen Gesundheitszustands oder die Diagnose eines neuen Krankheitszustands durch einen Arzt. Diese sollten unabhängig von dem wahrgenommenen Zusammenhang zwischen dem Ereignis und der Studienvakzine gemeldet werden.

- Erinnern des Probanden daran, sich sofort mit der Prüfstelle in Verbindung zu setzen, wenn er/sie irgendeines der Symptome aufweist, die auf COVID-19 hindeuten. Zusätzlich werden die Probanden bis zu zweimal pro Woche angeschrieben, um mit „Ja“ oder „Nein“ zu antworten, ob sie Symptome von COVID-19 haben. Diejenigen, die mit „ja“ antworten, werden vom Studienpersonal bezüglich weiterer Informationen kontaktiert (siehe Abschnitt 9.2.1 und Abschnitt 9.5).

- Der Proband sollte auch daran erinnert werden, die Prüfstelle sofort zu kontaktieren, wenn er/sie einen positiven SARS-CoV-2-Test außerhalb der Prüfstelle durchgeführt hat, unabhängig davon, ob er/sie zum Zeitpunkt des Tests symptomatisch (COVID-19 Erkrankung) oder asymptomatisch war.

[0975] Hinweis: Probanden ohne Symptome können aus verschiedenen Gründen getestet worden sein, z.B. bei engem Kontakt mit einer Person mit bekannter SARS-CoV-2-Infektion oder als Teil ihrer Routineuntersuchung als Gesundheitsdienstleister.

9.1.1.2 Telefonanruf: Tag 2 (-0/+0 Tag)

[0976] Der Zweck dieses Telefonkontakts ist es, sich nach dem allgemeinen Wohlbefinden des Probanden zu erkundigen und die Sicherheit 1 Tag nach der ersten Studienvakzinierung zu beurteilen.

• Während des Telefonats:

- Überprüfen und Erfassen aller neu gemeldeten Sicherheitsdaten, einschließlich abgefragter und nicht abgefragter AEs oder anderer AEs (medizinisch betreute AEs, SAEs).

- Erfassen begleitender Medikationen und Vakzinierungen, einschließlich wiederkehrender Medikationen bei intermittierenden Zuständen.

- Wenn der Proband über besorgniserregende lokale oder systemische Reaktionen oder andere AEs (z.B. medizinisch betreute AEs, SAEs) berichtet, sollten diese nach dem Ermessen des Prüfers entweder durch (einen) Anruf(e) oder durch eine außerplanmäßige Visite in der Prüfstelle weiterverfolgt werden.

• Anweisungen für den Probanden:

- Erinnern des Probanden daran, weiterhin abgefragte und nicht abgefragte AEs (d.h. das Auftreten aller anderen AEs) im eDiary zu notieren.

- Erinnern des Probanden daran, sofort die Prüfstelle anzurufen, um Folgendes zu melden:

○ Wenn er/sie irgendwelche besorgniserregenden lokalen oder systemischen Reaktionen oder andere medizinische Ereignisse durchmacht.

○ Alle medizinischen Visiten, die keine Routinevisiten zur körperlichen Untersuchung oder Vakzinierung sind, wie z.B. Visiten zur Hospitalisierung, eine Visite in der Notaufnahme oder eine anderweitig ungeplante Visite bei oder von medizinischem Personal (Arzt) aus irgendeinem Grund.

○ Auftreten eines schwerwiegenden medizinischen Ereignisses, Auftreten einer Veränderung des allgemeinen Gesundheitszustands oder die Diagnose eines neuen Krankheitszustands durch einen Arzt. Diese sollten unabhängig vom vermuteten Zusammenhang zwischen dem Ereignis und der Studienvakzine gemeldet werden.

- Erinnern des Probanden daran, sich sofort mit der Prüfstelle in Verbindung zu setzen, wenn er/sie eines der Symptome aufweist, die auf COVID-19 hindeuten. Zusätzlich werden die Probanden bis zu zweimal pro Woche angeschrieben, um mit „Ja“ oder „Nein“ zu antworten, ob sie Symptome von COVID-19 haben. Diejenigen, die mit „ja“ antworten, werden vom Studienpersonal bezüglich weiterer Informationen kontaktiert (siehe Abschnitt 9.2.1 und Abschnitt 9.5).

- Der Proband sollte auch daran erinnert werden, die Prüfstelle sofort zu kontaktieren, wenn er/sie einen positiven außerhalb der Prüfstelle durchgeführten SARS-CoV-2-Test hatte, unabhängig davon, ob er/sie zum Zeitpunkt des Tests symptomatisch (COVID-19-Erkrankung) oder asymptomatisch war.

9.1.1.3 Klinikvisite 2: Tag 29 - Zweite Studienvakzinierung (-3/+7 Tage)

[0977] Verfahrensweise vor der Vakzinierung

• Überprüfen und Erfassen aller neu gemeldeten Sicherheitsdaten, einschließlich abgefragter und nicht abgefragter AEs oder anderer AEs (medizinisch betreute AEs, SAEs).

• Erfassen begleitender Medikationen und Vakzinierungen, einschließlich wiederkehrender Medikationen bei intermittierenden Zuständen.

• Durchführen einer symptomorientierten körperlichen Untersuchung (siehe Abschnitt 9.3.7).

• Messen von Vitalparametern (Körpertemperatur, Puls, Blutdruck, siehe Abschnitt 9.3.7).

• Durchführen eines Urin-Schwangerschaftstests bei Frauen im gebärfähigen Alter.

• Entnahme von Blutproben vor der Vakzinierung für den Test auf an die RBD des S-Proteins von SARS-CoV-2 bindende Antikörper (~6 ml Blut) und die SARS-CoV-2-Virus-neutralisierende Ativität (~6 ml Blut). Zu diesem Zeitpunkt wird kein Test auf Antikörper gegen das N-Protein von SARS-CoV-2 durchgeführt.

• Entnahme von Blutproben vor der Vakzinierung für genomische Biomarker (~6 ml Blut) von den Probanden an ausgewählten Standorten.

• Entnahme von Blutproben vor der Vakzinierung für CMI (~32 ml Blut) von Probanden an ausgewählten Standorten.

[0978] Verfahren bei der Vakzinierung

• Überprüfen der Kriterien für die Verzögerung oder den Abbruch der Vakzinierung. Siehe Abschnitte 6.3 und 8.1 für einen Überblick über die Kriterien, die zu einer Verzögerung oder einem Abbruch der Vakzinierung führen. Im Falle einer Verzögerung sollte die Vakzinierung innerhalb der erlaubten Zeitfenster stattfinden. Die Gründe für die Verzögerung oder den Abbruch sollten in der Akte des Probanden dokumentiert werden.

• Verabreichen der Studienvakzindosis entsprechend der Zuweisung des Probanden. Verfahren nach der Vakzinierung

• Beobachten des Probanden nach der Vakzinierung mindestens 30 Minuten lang zur Sicherheitsüberwachung vor Ort. Am Ende der Beobachtungszeit:

- Messen der Vitalparameter (Körpertemperatur, Puls, Blutdruck; siehe Abschnitt 9.3.7).

- Der Proband darf erst entlassen werden, wenn die Vitalparameter im Normalbereich liegen oder auf das Niveau vor der Vakzinierung zurückgegangen sind.

- Erfassen des Auftretens jeglicher AEs nach der Studienvakzinierung.

• Anweisungen für den Probanden:

- Erneutes Einweisen des Probanden in die Messung der abgefragten AEs und in das Ausfüllen des eDiary. Der Proband sollte abgefragte lokale und systemische AEs, die am Tag der Vakzinierung und in den folgenden 7 Tagen auftreten, sowie nicht abgefragte AEs (d.h. das Auftreten aller anderen AEs), die am Tag der Vakzinierung und in den folgenden 28 Tagen auftreten, aufzeichnen.

- Erinnern des Probanden daran, die Prüfstelle sofort anzurufen, um Folgendes zu melden:

○ Wenn er/sie irgendwelche besorgniserregenden lokalen oder systemischen Reaktionen oder andere medizinische Ereignisse durchmacht.

○ Alle medizinischen Visiten, die keine Routinevisiten für eine körperliche Untersuchung oder Vakzinierung sind, wie z.B. Visiten zur Hospitalisierung, eine Visite in der Notaufnahme oder eine anderweitig ungeplante Visite bei oder von medizinischem Personal (Arzt) aus irgendeinem Grund.

○ Durchmachen eines schwerwiegenden medizinischen Ereignisses, Auftreten einer Veränderung des allgemeinen Gesundheitszustands oder die Diagnose einer neuen Erkrankung durch einen Arzt. Diese sollten unabhängig vom vermuteten Zusammenhang zwischen dem Ereignis und der Studienvakzine gemeldet werden.

- Erinnern des Probanden daran, sich sofort mit der Prüfstelle in Verbindung zu setzen, wenn er/sie irgendeines der Symptome aufweist, die auf COVID-19 hindeuten. Zusätzlich werden die Probanden bis zu zweimal pro Woche angeschrieben, um mit „Ja“ oder „Nein“ zu antworten, ob sie Symptome von COVID-19 haben. Diejenigen, die mit „ja“ antworten, werden vom Studienpersonal bezüglich weiterer Informationen kontaktiert (siehe Abschnitt 9.2.1 und Abschnitt 9.5).

- Der Proband sollte auch daran erinnert werden, die Prüfstelle sofort zu kontaktieren, wenn er/sie einen außerhalb der Prüfstelle durchgeführten positiven SARS-CoV-2-Test hat, unabhängig davon, ob er/sie zum Zeitpunkt des Tests symptomatisch (COVID-19-Erkrankung) oder asymptomatisch war.

9.1.1.4 Telefonanruf: Tag 30 (-0/+0 Tag)

[0979] Der Zweck dieses telefonischen Kontakts ist es, sich nach dem allgemeinen Wohlbefinden des Probanden zu erkundigen und die Sicherheit 1 Tag nach der zweiten Studienvakzinierung zu bewerten.

[0980] Die Bewertungen und Verfahren sind identisch mit denen, die während des Telefonats an Tag 2 durchgeführt werden.

9.1.1.5 Klinikvisite 3: Tag 43 (-3/+3 Tage)

• Überprüfen und Erfassen aller neu gemeldeten Sicherheitsdaten, einschließlich abgefragter und nicht abgefragter AEs oder anderer AEs (medizinisch betreute AEs, SAEs).

• Erfassen begleitender Medikationen und Vakzinierungen, einschließlich wiederkehrender Medikationen bei intermittierenden Zuständen.

• Durchführen einer symptomorientierten körperlichen Untersuchung (siehe Abschnitt 9.3.7).

• Messen der Vitalparameter (Körpertemperatur, Puls, Blutdruck, siehe Abschnitt 9.3.7).

• Entnahme von Blutproben für den Test auf an die RBD des S-Proteins von SARS-CoV-2 bindende Antikörper (~6 ml Blut); SARS-CoV-2-Virus-neutralisierende Aktivität (~6 ml Blut); und den Test auf an das N-Protein von SARS-CoV-2 bindende Antikörper (~6 ml Blut).

• Entnahme von Blutproben für genomische Biomarker (~6 ml Blut) von Probanden an ausgewählten Standorten.

• Entnahme von Blutproben für CMI (~32 ml Blut) von Probanden an ausgewählten Standorten.

• Anweisungen für den Probanden:

• Informieren des Probanden, dass die Aufzeichnung der abgefragten lokalen und systemischen Reaktionen im eDiary abgeschlossen ist. Erinnern des Probanden daran, weiterhin nicht abgefragte AEs (alle AEs) aufzuzeichnen.

• Erinnern des Probanden daran, sofort die Prüfstelle anzurufen, um Folgendes zu melden:

○ Wenn er/sie ein besorgniserregendes medizinisches Ereignis durchmacht.

○ Alle medizinischen Visiten, die keine Routinevisiten zur körperlichen Untersuchung oder Vakzinierung sind, wie z.B. Visiten zur Hospitalisierung, eine Visite in der Notaufnahme oder eine anderweitig ungeplante Visite bei oder von medizinischem Personal (Arzt) aus irgendeinem Grund.

○ Erleiden eines schwerwiegenden medizinischen Ereignisses, Auftreten einer Veränderung des allgemeinen Gesundheitszustands oder die Diagnose eines neuen Krankheitszustands durch einen Arzt. Diese sollten gemeldet werden, unabhängig davon, ob ein Zusammenhang zwischen dem Ereignis und der Studienvakzine gesehen wird.

- Erinnern des Probanden daran, sich sofort mit der Prüfstelle in Verbindung zu setzen, wenn er/sie eines der Symptome aufweist, die auf COVID-19 hindeuten. Zusätzlich werden die Probanden bis zu zweimal pro Woche angeschrieben, um mit „Ja“ oder „Nein“ zu antworten, ob sie Symptome von COVID-19 haben. Diejenigen, die mit „ja“ antworten, werden vom Studienpersonal bezüglich weiterer Informationen kontaktiert (siehe Abschnitt 9.2.1 und Abschnitt 9.5).

- Der Proband sollte auch daran erinnert werden, die Prüfstelle sofort zu kontaktieren, wenn er/sie einen außerhalb der Prüfstelle durchgeführten positiven SARS-CoV-2-Test hat, unabhängig davon, ob er/sie zum Zeitpunkt des Tests symptomatisch (COVID-19-Erkrankung) oder asymptomatisch war.

9.1.1.6 Klinikvisite 4: Tag 57 (-3/+7 Tage)

• Überprüfen und Erfassen aller neu gemeldeten Sicherheitsdaten, einschließlich nicht abgefragter AEs oder anderer AEs (medizinisch betreute AEs, SAEs).

• Erfassen begleitender Medikationen und Vakzinierungen, einschließlich wiederkehrender Medikationen für intermittierende Zustände.

• Durchführen einer symptomorientierten körperlichen Untersuchung (siehe Abschnitt 9.3.7).

• Messen der Vitalparameter (Körpertemperatur, Puls, Blutdruck, siehe Abschnitt 9.3.7).

• Entnehmen von Blutproben zur Beurteilung der Immunogenität für den Test auf an die RBD des S-Proteins von SARS-CoV-2 bindende Antikörper (~6 ml Blut) und die SARS-CoV-2-Virus-neutralisierende Aktivität (~6 ml Blut). (Zu diesem Zeitpunkt wird kein Test der an das N-Protein von SARS-CoV-2 bindenden Antikörper durchgeführt).

• Anweisungen an den Probanden:

- Informieren des Probanden, dass die Meldung von nicht abgefragten AEs abgeschlossen ist.

- Erinnern des Probanden daran, sofort die Prüfstelle anzurufen, um Folgendes zu melden:

○ Wenn er/sie irgendein medizinisch relevantes Ereignis erlebt.

○ Alle medizinischen Visiten, die keine Routinevisiten zur körperlichen Untersuchung oder Vakzinierung sind, wie z.B. Visiten zur Hospitalisierung, eine Visite in der Notaufnahme oder eine anderweitig ungeplante Visite bei oder von medizinischem Personal (Arzt) aus irgendeinem Grund.

○ Erleiden eines schwerwiegenden medizinischen Ereignisses, Auftreten einer Veränderung des allgemeinen Gesundheitszustands oder die Diagnose eines neuen Krankheitszustands durch einen Arzt. Diese sollten gemeldet werden, unabhängig davon, ob ein Zusammenhang zwischen dem Ereignis und der Studienvakzine gesehen wird.

- Erinnern des Probanden daran, sich sofort mit der Prüfstelle in Verbindung zu setzen, wenn er/sie eines der Symptome aufweist, die auf COVID-19 hindeuten. Zusätzlich werden die Probanden bis zu

zweimal pro Woche angeschrieben, um mit „Ja“ oder „Nein“ zu antworten, ob sie Symptome von COVID-19 haben. Diejenigen, die mit „ja“ antworten, werden vom Studienpersonal bezüglich weiterer Informationen kontaktiert (siehe Abschnitt 9.2.1 und Abschnitt 9.5).

- Der Proband sollte auch daran erinnert werden, die Prüfstelle sofort zu kontaktieren, wenn er/sie einen außerhalb der Prüfstelle durchgeführten positiven SARS-CoV-2-Test hat, unabhängig davon, ob er/sie zum Zeitpunkt des Tests symptomatisch (COVID-19-Erkrankung) oder asymptomatisch war.

9.1.1.7 Klinikvisite 5: Tag 120 (-7/+7 Tage)

• Überprüfen und Erfassen aller neu gemeldeten AEs seit der Visite an Tag 57 (medizinisch betreute AEs, SAEs).

• Erfassen begleitender Medikationen und Vakzinierungen, einschließlich wiederkehrender Medikationen für intermittierende Zustände.

• Durchführen einer symptomorientierten körperlichen Untersuchung (siehe Abschnitt 9.3.7).

• Messen der Vitalparameter (Körpertemperatur, Puls, Blutdruck, siehe Abschnitt 9.3.7).

• Entnehmen von Blutproben für den Test auf an die RBD des S-Proteins von SARS-CoV-2 bindende Antikörper (~6 ml Blut) und die SARS-CoV-2-Virus-neutralisierende Aktivität (~6 ml Blut). (Zu diesem Zeitpunkt wird kein Test der an das N-Protein von SARS-CoV-2 bindenden Antikörper durchgeführt).

• Entnehmen von Blutproben für genomische Biomarker (~6 ml Blut) von Probanden an ausgewählten Standorten.

• Entnehmen von Blutproben für CMI (~32 ml Blut) von Probanden an ausgewählten Standorten.

• Anweisungen an den Probanden:

- Erinnern des Probanden daran, sofort die Prüfstelle anzurufen, um Folgendes zu melden:

○ Wenn er/sie irgendein medizinisch relevantes Ereignis erlebt.

○ Alle medizinischen Visiten, die keine Routinevisiten zur körperlichen Untersuchung oder Vakzinierung sind, wie z.B. Visiten zur Hospitalisierung, eine Visite in der Notaufnahme oder eine anderweitig ungeplante Visite bei oder von medizinischem Personal (Arzt) aus irgendeinem Grund.

○ Erleiden eines schwerwiegenden medizinischen Ereignisses, Auftreten einer Veränderung des allgemeinen Gesundheitszustands oder die Diagnose eines neuen Krankheitszustands durch einen Arzt. Diese sollten gemeldet werden, unabhängig davon, ob ein Zusammenhang zwischen dem Ereignis und der Studienvakzine gesehen wird.

- Erinnern des Probanden daran, sich sofort mit der Prüfstelle in Verbindung zu setzen, wenn er/sie eines der Symptome aufweist, die auf COVID-19 hindeuten. Zusätzlich werden die Probanden bis zu zweimal pro Woche angeschrieben, um mit „Ja“ oder „Nein“ zu antworten, ob sie Symptome von COVID-19 haben. Diejenigen, die mit „ja“ antworten, werden vom Studienpersonal bezüglich weiterer Informationen kontaktiert (siehe Abschnitt 9.2.1 und Abschnitt 9.5).

- Der Proband sollte auch daran erinnert werden, die Prüfstelle sofort zu kontaktieren, wenn er/sie einen außerhalb der Prüfstelle durchgeführten positiven SARS-CoV-2-Test hat, unabhängig davon, ob er/sie zum Zeitpunkt des Tests symptomatisch (COVID-19-Erkrankung) oder asymptomatisch war.

9.1.1.8 Klinikvisite 6: Tag 211 (-7/+7 Tage)

[0981] Die Beurteilungen und Verfahren sind identisch mit denen, die während der Klinikvisite 5 an Tag 120 durchgeführt wurden, mit folgenden Ausnahmen.

• Entnahme von Blutproben für den Test auf an die RBD des S-Proteins von SARS-CoV-2 bindende Antikörper (~6 ml Blut); SARS-CoV-2-Virus-neutralisierende Aktivität (~6 ml Blut); und Test auf an das N (Nukleokapsid)-Protein von SARS-CoV-2 bindende Antikörper (~6 ml Blut).

• Entnahme von Blutproben für genomische Biomarker (~6 ml Blut) von Probanden an ausgewählten Standorten.

9.1.1.9 Telefonanruf: Tag 302 (-7/+7 Tage)

[0982] Der Zweck dieses Telefonkontakts ist es, sich nach dem allgemeinen Wohlbefinden des Probanden zu erkundigen und die Sicherheit seit der Visite an der Prüfstelle an Tag 211 zu beurteilen.

• Während des Telefonats:

○ Überprüfen und Erfassen aller neu gemeldeten AEs seit der Visite an Tag 211 (SAEs).

○ Erfassen begleitender Medikationen und Vakzinierungen, einschließlich wiederkehrender Medikationen bei intermittierenden Zuständen.

○ Wenn der Proband beim Telefonat über irgendwelche besorgniserregende AEs berichtet, sollten diese nach dem Ermessen des Prüfers entweder durch (einen) Telefonanruf(e) oder durch eine außerplanmäßige Visite in der Prüfstelle weiterverfolgt werden.

• Anweisungen für den Probanden:

- Erinnern des Probanden daran, sofort die Prüfstelle anzurufen, um Folgendes zu melden:

○ Wenn er/sie irgendwelche besorgniserregenden medizinischen Ereignisse durchmacht.

○ Alle medizinischen Visiten, die keine Routinevisiten zur körperlichen Untersuchung oder Vakzinierung sind, wie z.B. Visiten zur Hospitalisierung, eine Visite in der Notaufnahme oder eine anderweitig ungeplante Visite bei oder von medizinischem Personal (Arzt) aus irgendeinem Grund.

○ Auftreten eines schwerwiegenden medizinischen Ereignisses, Auftreten einer Veränderung des allgemeinen Gesundheitszustands oder die Diagnose eines neuen Krankheitszustands durch einen Arzt. Diese sollten unabhängig vom vermuteten Zusammenhang zwischen dem Ereignis und der Studienvakzine gemeldet werden.

- Erinnern des Probanden daran, sich sofort mit der Prüfstelle in Verbindung zu setzen, wenn er/sie eines der Symptome aufweist, die auf COVID-19 hindeuten. Zusätzlich werden die Probanden bis zu zweimal pro Woche angeschrieben, um mit „Ja“ oder „Nein“ zu antworten, ob sie Symptome von COVID-19 haben. Diejenigen, die mit „ja“ antworten, werden vom Studienpersonal bezüglich weiterer Informationen kontaktiert (siehe Abschnitt 9.2.1 und Abschnitt 9.5).

- Der Proband sollte auch daran erinnert werden, die Prüfstelle sofort zu kontaktieren, wenn er/sie einen außerhalb der Prüfstelle durchgeführten positiven SARS-CoV-2-Test hatte, unabhängig davon, ob er/sie zum Zeitpunkt des Tests symptomatisch (COVID-19-Erkrankung) oder asymptomatisch war.

9.1.1.10 Visite am Ende der Studie: Tag 393 (-0/+21 Tage)

[0983] Die Visite zum Ende der Studie wird am Tag 393, 1 Jahr nach der letzten Verabreichung der Studienvakzine, durchgeführt. Wenn möglich, sollte diese Visite auch Probanden einschließen, die die Vakzinierung während der Studie vorzeitig abgebrochen haben. Die folgenden Untersuchungen sollten durchgeführt werden:

• Überprüfung und Aufzeichnung aller neu gemeldeten AEs seit dem Telefonkontakt an Tag 302 (SAEs).

• Erfassung von Begleitmedikationen und Vakzinierungen, einschließlich wiederkehrender Medikationen bei intermittierenden Zuständen.

• Durchführen einer vollständigen körperlichen Untersuchung, einschließlich Größe und Gewicht (siehe Abschnitt 9.3.7).

• Messen der Vitalparameter (Körpertemperatur, Puls, Blutdruck, siehe Abschnitt 9.3.7).

• Entnahme von Blutproben für den Test auf an die RBD des S-Proteins von SARS-CoV-2 bindende Antikörper (~6 ml Blut); SARS-CoV-2-Virus-neutralisierende Aktivität (~6 ml Blut); und den Test auf an das N-Protein von SARS-CoV-2 bindende Antikörper (~6 ml Blut).

[0984] Der Proband wird darüber informiert, dass er/sie den Hauptteil der Studie abgeschlossen hat und dass nun der Verlängerungsteil der Studie beginnt (siehe Abschnitt 9.1.4).

9.1.2 Phase 2b: Nicht-Immunogenitäts-Probanden

[0985] Nach der Aufnahme der Probanden in die Immunogenitäts-Untergruppe der Phase 2b(n=1.200) werden die verbleibenden 2.800 Probanden, die 18 Jahre und älter sind, in die Phase 2b aufgenommen.

9.1.2.1 Klinikvisite 1: Tag 1 - Erste Studienvakzinierung

[0986] Die Verfahren zur Feststellung der Eignung der Probanden sowie die Erfassung der demographischen Daten und der Krankengeschichte können innerhalb von 21 Tagen vor der Verabreichung der Studienvakzine, d.h. über mehr als einen Tag verteilt, durchgeführt werden. Wenn jedoch alle Informationen verfügbar sind und die Beurteilungen und Verfahren durchgeführt werden können, kann die Eignung am selben Tag der Verabreichung der Studienvakzine festgestellt werden. Alle Eignungskriterien müssen vor der Verabreichung der Studienvakzine an Tag 1 überprüft werden.

Prä-Vakzinierungs-Verfahren

• Einholung der unterschriebenen Einverständniserklärung.

- Die unterschriebene Einverständniserklärung muss eingeholt werden, bevor der Proband in die Studie eintritt und bevor irgendwelche vom Protokoll vorgesehenen Verfahren durchgeführt werden.

- Mit der Unterzeichnung der Einverständniserklärung erklärt sich der Proband freiwillig bereit, an der HERALD-Studie CV-NCOV-004 und deren 1-jähriger Verlängerungsstudie für insgesamt ca. 2 Jahre teilzunehmen.

• Überprüfen der Einschluss-/Ausschlusskriterien (siehe Abschnitt 6.1 und 6.2) und Überprüfen verbotener Medikationen, die als Ausschlusskriterium aufgeführt sind (siehe Abschnitt 6.2).

• Erfassen der demographischen Informationen

• Erfassen der medizinischen Vorgeschichte.

• Erfassen der begleitenden Medikationen und Vakzinierungen, einschließlich wiederkehrender Medikationen für intermittierende Zustände, wenn diese innerhalb von 6 Monaten vor der Aufnahme in diese Studie eingenommen wurden.

• Durchführen einer vollständigen körperlichen Untersuchung, einschließlich Größe und Gewicht (siehe Abschnitt 9.3.7). Wenn die vollständige körperliche Untersuchung zur Feststellung der Eignung innerhalb von 21 Tagen vor der Verabreichung der Studienvakzine durchgeführt wurde, sollte am Tag der Vakzinierung vor der Verabreichung der Studienvakzine eine symptomorientierte körperliche Untersuchung durchgeführt werden.

• Messen der Vitalparameter (Körpertemperatur, Puls, Blutdruck; siehe Abschnitt 9.3.7).

• Durchführen eines Urin-Schwangerschaftstests bei Frauen im gebärfähigen Alter.

• Entnehmen von Blutproben vor der Vakzinierung für den Test auf an das N-Protein von SARS-CoV-2 bindende Antikörper (~6 ml Blut).

[0987] Vakzinierungs-Verfahren

• Überprüfen der Kriterien für die Verzögerung oder den Abbruch der Vakzinierung. Siehe Abschnitte 6.3 und 8.1 für einen Überblick über die Kriterien, die zu einer Verzögerung oder einem Abbruch der Vakzinverabreichung führen. Im Falle einer Verzögerung sollte die Vakzinierung innerhalb der erlaubten Zeitfenster stattfinden. Die Gründe für die Verzögerung oder den Abbruch sollten in der Akte des Probanden dokumentiert werden.

• Verabreichen der Studienvakzindosis entsprechend der Zuweisung des Probanden.

[0988] Post-Vakzinierungs-Verfahren

• Beobachten des Probanden nach der Vakzinierung für mindestens 30 Minuten zur Sicherheitsüberwachung vor Ort. Am Ende der Beobachtungszeit:

- Messen der Vitalparameter (Körpertemperatur, Puls, Blutdruck; siehe Abschnitt 9.3.7).

- Der Proband darf erst entlassen werden, wenn die Vitalparameter im Normalbereich liegen oder auf das Niveau vor der Vakzinierung zurückgegangen sind.

- Erfassen des Auftretens von AEs nach der Studienvakzinierung.

• Anweisungen für den Probanden:

- Anweisen des Probanden, wie er abgefragte AEs messen und das eDiary ausfüllen soll. Der Proband sollte abgefragte lokale und systemische AEs, die am Tag der Vakzinierung und in den folgenden 7 Tagen auftreten, sowie nicht abgefragte AEs (d.h. das Auftreten aller anderen AEs), die am Tag der Vakzinierung und in den folgenden 28 Tagen auftreten, aufzeichnen.

- Erinnern des Probanden daran, die Prüfstelle sofort anzurufen, um Folgendes zu melden:

○ Wenn er/sie irgendwelche besorgniserregenden lokalen oder systemischen Reaktionen oder andere medizinische Ereignisse durchmacht.

○ Alle medizinisch betreuten Visiten, die keine Routinevisiten für eine körperliche Untersuchung oder Vakzinierung sind, wie z.B. Visiten für eine Hospitalisierung, eine Visite in der Notaufnahme oder eine anderweitig ungeplante Visite bei oder von medizinischem Personal (Arzt) aus irgendeinem Grund.

○ Das Durchmachen eines schwerwiegenden medizinischen Ereignisses, das Auftreten einer Veränderung des allgemeinen Gesundheitszustands oder die Diagnose eines neuen Krankheitszustands durch einen Arzt. Diese sollten unabhängig von dem wahrgenommenen Zusammenhang zwischen dem Ereignis und der Studienvakzine gemeldet werden.

- Erinnern des Probanden daran, sich sofort mit der Prüfstelle in Verbindung zu setzen, wenn er/sie irgendeines der Symptome aufweist, die auf COVID-19 hindeuten. Zusätzlich werden die Probanden bis zu zweimal pro Woche angeschrieben, um mit „Ja“ oder „Nein“ zu antworten, ob sie Symptome von COVID-19 haben. Diejenigen, die mit „ja“ antworten, werden vom Studienpersonal bezüglich weiterer Informationen kontaktiert (siehe Abschnitt 9.2.1 und Abschnitt 9.5).

- Der Proband sollte auch daran erinnert werden, die Prüfstelle sofort zu kontaktieren, wenn er/sie einen außerhalb der Prüfstelle durchgeführten positiven SARS-CoV-2-Test hat, unabhängig davon, ob er/sie zum Zeitpunkt des Tests symptomatisch (COVID-19 Erkrankung) oder asymptomatisch war.

[0989] Hinweis: Probanden ohne Symptome können aus verschiedenen Gründen getestet worden sein, z.B. bei engem Kontakt mit einer Person mit bekannter SARS-CoV-2-Infektion oder als Teil ihrer Routineuntersuchung als Gesundheitsdienstleister.

9.1.2.2 Telefonanruf: Tag 2 (-0/+0 Tag)

[0990] Der Zweck dieses Telefonkontakts ist es, sich nach dem allgemeinen Wohlbefinden des Probanden zu erkundigen und die Sicherheit 1 Tag nach der ersten Studienvakzinierung zu beurteilen.

• Während des Telefonats:

- Überprüfen und Erfassen aller neu gemeldeten Sicherheitsdaten, einschließlich abgefragter und nicht abgefragter AEs oder anderer AEs (medizinisch betreute AEs, SAEs).

- Erfassen begleitender Medikationen und Vakzinierungen, einschließlich wiederkehrender Medikationen bei intermittierenden Zuständen.

- Wenn der Proband über besorgniserregende lokale oder systemische Reaktionen oder andere AEs (z.B. medizinisch betreute AEs, SAEs) berichtet, sollten diese nach dem Ermessen des Prüfers entweder durch (einen) Anruf(e) oder durch eine außerplanmäßige Visite in der Prüfstelle weiterverfolgt werden.

• Anweisungen für den Probanden:

- Erinnern des Probanden daran, weiterhin abgefragte und nicht abgefragte AEs (d.h. das Auftreten aller anderen AEs) im eDiary zu notieren.

- Erinnern des Probanden daran, sofort die Prüfstelle anzurufen, um Folgendes zu melden:

○ Wenn er/sie irgendwelche besorgniserregenden lokalen oder systemischen Reaktionen oder andere medizinische Ereignisse durchmacht.

○ Alle medizinisch betreuten Visiten, die keine Routinevisiten zur körperlichen Untersuchung oder Vakzinierung sind, wie z.B. Visiten zur Hospitalisierung, eine Visite in der Notaufnahme oder eine anderweitig ungeplante Visite bei oder von medizinischem Personal (Arzt) aus irgendeinem Grund.

○ Auftreten eines schwerwiegenden medizinischen Ereignisses, Auftreten einer Veränderung des allgemeinen Gesundheitszustands oder die Diagnose eines neuen Krankheitszustands durch einen Arzt. Diese sollten unabhängig vom vermuteten Zusammenhang zwischen dem Ereignis und der Studienvakzine gemeldet werden.

- Erinnern des Probanden daran, sich sofort mit der Prüfstelle in Verbindung zu setzen, wenn er/sie eines der Symptome aufweist, die auf COVID-19 hindeuten. Zusätzlich werden die Probanden bis zu zweimal pro Woche angeschrieben, um mit „Ja“ oder „Nein“ zu antworten, ob sie Symptome von COVID-19 haben. Diejenigen, die mit „ja“ antworten, werden vom Studienpersonal bezüglich weiterer Informationen kontaktiert (siehe Abschnitt 9.2.1 und Abschnitt 9.5).

- Der Proband sollte auch daran erinnert werden, die Prüfstelle sofort zu kontaktieren, wenn er/sie einen außerhalb der Prüfstelle durchgeführten positiven SARS-CoV-2-Test hatte, unabhängig davon, ob er/sie zum Zeitpunkt des Tests symptomatisch (COVID-19-Erkrankung) oder asymptomatisch war.

9.1.2.3 Klinikvisite 2: Tag 29 - Zweite Studienvakzinierung (-3/+7 Tage)

[0991] Prä-Vakzinierungs-Verfahren

• Überprüfen und Erfassen aller neu gemeldeten Sicherheitsdaten, einschließlich abgefragter und nicht abgefragter AEs oder anderer AEs (medizinisch betreute AEs, SAEs).

• Erfassen begleitender Medikationen und Vakzinierungen, einschließlich wiederkehrender Medikationen bei intermittierenden Zuständen.

• Durchführen einer symptomorientierten körperlichen Untersuchung (siehe Abschnitt 9.3.7).

• Messen von Vitalparametern (Körpertemperatur, Puls, Blutdruck, siehe Abschnitt 9.3.7).

• Durchführen eines Urin-Schwangerschaftstests bei Frauen im gebärfähigen Alter. Vakzinierungs-Verfahren

• Überprüfen der Kriterien für die Verzögerung oder den Abbruch der Vakzinierung. Siehe Abschnitte 6.3 und 8.1 für einen Überblick über die Kriterien, die zu einer Verzögerung oder einem Abbruch der Vakzinierung führen. Im Falle einer Verzögerung sollte die Vakzinierung innerhalb der erlaubten Zeitfenster stattfinden. Die Gründe für die Verzögerung oder den Abbruch sollten in der Akte des Probanden dokumentiert werden.

• Verabreichen der Studienvakzindosis entsprechend der Zuweisung des Probanden. Post-Vakzinierungs-Verfahren

• Beobachten des Probanden nach der Vakzinierung mindestens 30 Minuten lang zur Sicherheitsüberwachung vor Ort. Am Ende der Beobachtungszeit:

- Messen der Vitalparameter (Körpertemperatur, Puls, Blutdruck; siehe Abschnitt 9.3.7).

- Der Proband darf erst entlassen werden, wenn die Vitalparameter im Normalbereich liegen oder auf das Niveau vor der Vakzinierung zurückgegangen sind.

- Erfassen des Auftretens jeglicher AEs nach der Studienvakzinierung.

• Anweisungen für den Probanden:

- Erneutes Einweisen des Probanden in die Messung der abgefragten AEs und in das Ausfüllen des eDiary. Der Proband sollte abgefragte lokale und systemische AEs, die am Tag der Vakzinierung und in den folgenden 7 Tagen auftreten, sowie nicht abgefragte AEs (d.h. das Auftreten aller anderen AEs), die am Tag der Vakzinierung und in den folgenden 28 Tagen auftreten, aufzeichnen.

- Erinnern des Probanden daran, die Prüfstelle sofort anzurufen, um Folgendes zu melden:

○ Wenn er/sie irgendwelche besorgniserregenden lokalen oder systemischen Reaktionen oder andere medizinische Ereignisse durchmacht.

○ Alle medizinischen Visiten, die keine Routinebesuche für eine körperliche Untersuchung oder Vakzinierung sind, wie z.B. Visiten zur Hospitalisierung, eine Visite in der Notaufnahme oder eine anderweitig ungeplante Visite bei oder von medizinischem Personal (Arzt) aus irgendeinem Grund.

○ Durchmachen eines schwerwiegenden medizinischen Ereignisses, Auftreten einer Veränderung des allgemeinen Gesundheitszustands oder die Diagnose einer neuen Erkrankung durch einen Arzt. Diese

sollten unabhängig vom vermuteten Zusammenhang zwischen dem Ereignis und der Studienvakzine gemeldet werden.

- Erinnern des Probanden daran, sich sofort mit der Prüfstelle in Verbindung zu setzen, wenn er/sie irgendeines der Symptome aufweist, die auf COVID-19 hindeuten. Zusätzlich werden die Probanden bis zu zweimal pro Woche angeschrieben, um mit „Ja“ oder „Nein“ zu antworten, ob sie Symptome von COVID-19 haben. Diejenigen, die mit „ja“ antworten, werden vom Studienpersonal bezüglich weiterer Informationen kontaktiert (siehe Abschnitt 9.2.1 und Abschnitt 9.5).

- Der Proband sollte auch daran erinnert werden, die Prüfstelle sofort zu kontaktieren, wenn er/sie einen außerhalb der Prüfstelle durchgeführten positiven SARS-CoV-2-Test hat, unabhängig davon, ob er/sie zum Zeitpunkt des Tests symptomatisch (COVID-19-Erkrankung) oder asymptomatisch war.

9.1.2.4 Telefonanruf: Tag 30 (-0/+0 Tag)

[0992] Der Zweck dieses telefonischen Kontakts ist es, sich nach dem allgemeinen Wohlbefinden des Probanden zu erkundigen und die Sicherheit 1 Tag nach der zweiten Studienvakzinierung zu bewerten.

[0993] Die Bewertungen und Verfahren sind identisch mit denen, die während des Telefonats an Tag 2 durchgeführt werden.

9.1.2.5 Klinikvisite 3: Tag 43 (-3/+3 Tage)

• Überprüfen und Erfassen aller neu gemeldeten Sicherheitsdaten, einschließlich abgefragter und nicht abgefragter AEs oder anderer AEs (medizinisch betreute AEs, SAEs).

• Erfassen begleitender Medikationen und Vakzinierungen, einschließlich wiederkehrender Medikationen bei intermittierenden Zuständen.

• Durchführen einer symptomorientierten körperlichen Untersuchung (siehe Abschnitt 9.3.7).

• Messen der Vitalparameter (Körpertemperatur, Puls, Blutdruck, siehe Abschnitt 9.3.7).

• Entnahme von Blutproben für den Test auf an das N-Protein von SARS-CoV-2 bindende Antikörper (~6 ml Blut).

• Anweisungen für den Probanden:

- Informieren des Probanden, dass die Aufzeichnung der abgefragten lokalen und systemischen Reaktionen im eDiary abgeschlossen ist. Erinnern des Probanden daran, weiterhin nicht abgefragte AEs (alle AEs) aufzuzeichnen.

- Erinnern des Probanden daran, sofort die Prüfstelle anzurufen, um Folgendes zu melden:

○ Wenn er/sie irgendein besorgniserregendes medizinisches Ereignis durchmacht.

○ Alle medizinischen Visiten, die keine Routinevisiten zur körperlichen Untersuchung oder Vakzinierung sind, wie z.B. Visiten zur Hospitalisierung, eine Visite in der Notaufnahme oder eine anderweitig ungeplante Visite bei oder von medizinischem Personal (Arzt) aus irgendeinem Grund.

○ Erleiden eines schwerwiegenden medizinischen Ereignisses, Auftreten einer Veränderung des allgemeinen Gesundheitszustands oder die Diagnose eines neuen Krankheitszustands durch einen Arzt. Diese sollten gemeldet werden, unabhängig davon, ob ein Zusammenhang zwischen dem Ereignis und der Studienvakzine gesehen wird.

- Erinnern des Probanden daran, sich sofort mit der Prüfstelle in Verbindung zu setzen, wenn er/sie eines der Symptome aufweist, die auf COVID-19 hindeuten. Zusätzlich werden die Probanden bis zu zweimal pro Woche angeschrieben, um mit „Ja“ oder „Nein“ zu antworten, ob sie Symptome von COVID-19 haben. Diejenigen, die mit „ja“ antworten, werden vom Studienpersonal bezüglich weiterer Informationen kontaktiert (siehe Abschnitt 9.2.1 und Abschnitt 9.5).

- Der Proband sollte auch daran erinnert werden, die Prüfstelle sofort zu kontaktieren, wenn er/sie einen außerhalb der Prüfstelle durchgeführten positiven SARS-CoV-2-Test hat, unabhängig davon, ob er/sie zum Zeitpunkt des Tests symptomatisch (COVID-19-Erkrankung) oder asymptomatisch war.

9.1.2.6 Telefonanruf: Tag 57 (-3/+7)

[0994] Der Zweck dieses Telefonanrufs ist es, sich nach dem allgemeinen Wohlbefinden des Probanden zu erkundigen und die Sicherheit seit der Visite der Prüfstelle an Tag 43 zu beurteilen.

• Während des Telefonats:

- Überprüfen und Erfassen aller neu gemeldeten Sicherheitsdaten, einschließlich abgefragter und nicht abgefragter AEs oder anderer AEs (medizinisch betreute AEs, SAEs).

- Erfassen begleitender Medikationen und Vakzinierungen, einschließlich wiederkehrender Medikationen bei intermittierenden Zuständen.

- Wenn der Proband über irgendwelche besorgniserregenden lokalen oder systemischen Reaktionen oder andere AEs (z.B. medizinisch betreute AEs, SAEs) berichtet, sollten diese nach dem Ermessen des Prüfers entweder durch (einen) Anruf(e) oder durch eine außerplanmäßige Visite in der Prüfstelle weiterverfolgt werden.

• Anweisungen für den Probanden:

- Informieren des Probanden darüber, dass das Erfassen nicht abgefragter AEs beendet ist.

- Erinnern des Probanden daran, sofort die Prüfstelle anzurufen, um Folgendes zu melden:

○ Wenn er/sie irgendwelche besorgniserregenden medizinischen Ereignisse durchmacht.

○ Alle medizinisch betreuten Visiten, die keine Routinevisiten zur körperlichen Untersuchung oder Vakzinierung sind, wie z.B. Visiten zur Hospitalisierung, eine Visite in der Notaufnahme oder eine anderweitig ungeplante Visite bei oder von medizinischem Personal (Arzt) aus irgendeinem Grund.

○ Erleiden eines schwerwiegenden medizinischen Ereignisses, Auftreten einer Veränderung des allgemeinen Gesundheitszustands oder die Diagnose eines neuen Krankheitszustands durch einen Arzt. Diese sollten unabhängig vom vermuteten Zusammenhang zwischen dem Ereignis und der Studienvakzine gemeldet werden.

- Erinnern des Probanden daran, sich sofort mit der Prüfstelle in Verbindung zu setzen, wenn er/sie eines der Symptome aufweist, die auf COVID-19 hindeuten. Zusätzlich werden die Probanden bis zu zweimal pro Woche angeschrieben, um mit „Ja“ oder „Nein“ zu antworten, ob sie Symptome von COVID-19 haben. Diejenigen, die mit „ja“ antworten, werden vom Studienpersonal bezüglich weiterer Informationen kontaktiert (siehe Abschnitt 9.2.1 und Abschnitt 9.5).

- Der Proband sollte auch daran erinnert werden, die Prüfstelle sofort zu kontaktieren, wenn er/sie einen außerhalb der Prüfstelle durchgeführten positiven SARS-CoV-2-Test hatte, unabhängig davon, ob er/sie zum Zeitpunkt des Tests symptomatisch (COVID-19-Erkrankung) oder asymptomatisch war.

9.1.2.7 Klinikvisite 4: Tag 120 (-7/+7)

• Überprüfen und Erfassen aller neu gemeldeten AEs seit dem Telefonanruf an Tag 57 (medizinisch betreute AEs, SAEs)

• Erfassen begleitender Medikationen und Vakzinierungen, einschließlich wiederkehrender Medikationen für intermittierende Zustände.

• Durchführen einer symptomorientierten körperlichen Untersuchung (siehe Abschnitt 9.3.7).

• Messen der Vitalparameter (Körpertemperatur, Puls, Blutdruck, siehe Abschnitt 9.3.7).

• Anweisungen an den Probanden:

- Erinnern des Probanden daran, sofort die Prüfstelle anzurufen, um Folgendes zu melden:

○ Wenn er/sie irgendein medizinisch relevantes Ereignis durchmacht.

○ Alle medizinisch betreuten Visiten, die keine Routinevisiten zur körperlichen Untersuchung oder Vakzinierung sind, wie z.B. Visiten zur Hospitalisierung, eine Visite in der Notaufnahme oder eine anderweitig ungeplante Visite bei oder von medizinischem Personal (Arzt) aus irgendeinem Grund.

○ Erleiden eines schwerwiegenden medizinischen Ereignisses, Auftreten einer Veränderung des allgemeinen Gesundheitszustands oder die Diagnose eines neuen Krankheitszustands durch einen Arzt.

Diese sollten gemeldet werden, unabhängig davon, ob ein Zusammenhang zwischen dem Ereignis und der Studienvakzine gesehen wird.

- Erinnern des Probanden daran, sich sofort mit der Prüfstelle in Verbindung zu setzen, wenn er/sie eines der Symptome aufweist, die auf COVID-19 hindeuten. Zusätzlich werden die Probanden bis zu zweimal pro Woche angeschrieben, um mit „Ja“ oder „Nein“ zu antworten, ob sie Symptome von COVID-19 haben. Diejenigen, die mit „ja“ antworten, werden vom Studienpersonal bezüglich weiterer Informationen kontaktiert (siehe Abschnitt 9.2.1 und Abschnitt 9.5).

- Der Proband sollte auch daran erinnert werden, die Prüfstelle sofort zu kontaktieren, wenn er/sie einen außerhalb der Prüfstelle durchgeführten positiven SARS-CoV-2-Test hat, unabhängig davon, ob er/sie zum Zeitpunkt des Tests symptomatisch (COVID-19-Erkrankung) oder asymptomatisch war.

9.1.2.8 Klinikvisite 5: Tag 211 (-7/+7)

[0995] Die Untersuchungen und Verfahren sind identisch mit denen, die während der Klinikvisite 4 an Tag 120 durchgeführt wurden, mit folgenden Ausnahmen.

• Entnahme einer Blutprobe für den Test auf an das N-Protein von SARS-Cov-2 bindende Antikörper (~6 ml Blut).

9.1.2.9 Telefonanruf: Tag 302 (-7/+7)

[0996] Der Zweck dieses Telefonkontakts ist es, sich nach dem allgemeinen Wohlbefinden des Probanden zu erkundigen und die Sicherheit seit der Visite an Tag 211 zu beurteilen.

• Während des Telefonats:

○ Überprüfen und Erfassen aller neu gemeldeten AEs seit der Visite an Tag 211 (SAEs).

○ Erfassen begleitender Medikationen und Vakzinierungen, einschließlich wiederkehrender Medikationen bei intermittierenden Zuständen.

○ Wenn der Proband während des Telefonats über irgendwelche besorgniserregenden AEs berichtet, sollten diese nach dem Ermessen des Prüfers entweder durch (einen) Anruf(e) oder durch eine außerplanmäßige Visite in der Prüfstelle weiterverfolgt werden.

• Anweisungen für den Probanden:

- Erinnern des Probanden daran, sofort die Prüfstelle anzurufen, um Folgendes zu melden:

○ Wenn er/sie irgendein besorgniserregendes medizinisches Ereignis durchmacht.

○ Alle medizinisch betreuten Visiten, die keine Routinevisiten zur körperlichen Untersuchung oder Vakzinierung sind, wie z.B. Visiten zur Hospitalisierung, eine Visite in der Notaufnahme oder eine anderweitig ungeplante Visite bei oder von medizinischem Personal (Arzt) aus irgendeinem Grund.

○ Auftreten eines schwerwiegenden medizinischen Ereignisses, Auftreten einer Veränderung des allgemeinen Gesundheitszustands oder die Diagnose eines neuen Krankheitszustands durch einen Arzt. Diese sollten unabhängig vom vermuteten Zusammenhang zwischen dem Ereignis und der Studienvakzine gemeldet werden.

- Erinnern des Probanden daran, sich sofort mit der Prüfstelle in Verbindung zu setzen, wenn er/sie eines der Symptome aufweist, die auf COVID-19 hindeuten. Zusätzlich werden die Probanden bis zu zweimal pro Woche angeschrieben, um mit „Ja“ oder „Nein“ zu antworten, ob sie Symptome von COVID-19 haben. Diejenigen, die mit „ja“ antworten, werden vom Studienpersonal bezüglich weiterer Informationen kontaktiert (siehe Abschnitt 9.2.1 und Abschnitt 9.5).

- Der Proband sollte auch daran erinnert werden, die Prüfstelle sofort zu kontaktieren, wenn er/sie einen außerhalb der Prüfstelle durchgeführten positiven SARS-CoV-2-Test hatte, unabhängig davon, ob er/sie zum Zeitpunkt des Tests symptomatisch (COVID-19-Erkrankung) oder asymptomatisch war.

9.1.2.10 Klinikvisite am Ende der Studie: Tag 393 (-0/+21 Tage)

[0997] Die Visite zum Ende der Studie wird am Tag 393, 1 Jahr nach der letzten Verabreichung der Studienvakzine, durchgeführt. Wenn möglich, sollte diese Visite auch Probanden einschließen, die die Vakzinierung

während der Studie vorzeitig abgebrochen haben. Die folgenden Untersuchungen sollten durchgeführt werden:

• Überprüfung und Aufzeichnung aller neu gemeldeten AEs seit dem Telefonkontakt an Tag 302 (SAEs).

• Erfassung von Begleitmedikationen und Vakzinierungen, einschließlich wiederkehrender Medikationen bei intermittierenden Zuständen.

• Durchführen einer vollständigen körperlichen Untersuchung, einschließlich Größe und Gewicht (siehe Abschnitt 9.3.7).

• Messen der Vitalparameter (Körpertemperatur, Puls, Blutdruck, siehe Abschnitt 9.3.7).

• Entnahme von Blutproben für den Test auf an das N-Protein von SARS-CoV-2 bindende Antikörper (~6 ml Blut).

[0998] Der Proband wird darüber informiert, dass er/sie den Hauptteil der Studie abgeschlossen hat und dass nun der Verlängerungsteil der Studie beginnt (siehe Abschnitt 9.1.4).

9.1.3 Phase-3-Probanden

[0999] Etwa 32.500 Probanden im Alter von 18 Jahren und älter werden in die Phase 3 aufgenommen.

9.1.3.1 Klinikvisite 1: Tag 1 - Erste Studienvakzinierung

[1000] Die Verfahren zur Feststellung der Eignung der Probanden sowie die Erfassung der demographischen Daten und der Krankengeschichte können innerhalb von 21 Tagen vor der Verabreichung der Studienvakzine, d.h. über mehr als einen Tag verteilt, durchgeführt werden. Wenn jedoch alle Informationen verfügbar sind und die Beurteilungen und Verfahren durchgeführt werden können, kann die Eignung am selben Tag der Verabreichung der Studienvakzine festgestellt werden. Alle Eignungskriterien müssen vor der Verabreichung der Studienvakzine an Tag 1 überprüft werden.

Prä-Vakzinierungs-Verfahren

• Einholung der unterschriebenen Einverständniserklärung.

- Die unterschriebene Einverständniserklärung muss eingeholt werden, bevor der Proband in die Studie eintritt und bevor irgendwelche vom Protokoll vorgesehenen Verfahren durchgeführt werden (siehe Abschnitt 12.4).

- Mit der Unterzeichnung der Einverständniserklärung erklärt sich der Proband freiwillig bereit, an der HERALD-Studie CV-NCOV-004 und deren 1-jähriger Verlängerungsstudie für insgesamt ca. 2 Jahre teilzunehmen.

• Überprüfen der Einschluss-/Ausschlusskriterien (siehe Abschnitt 6.1 und 6.2) und Überprüfen verbotener Medikationen, die als Ausschlusskriterium aufgeführt sind (siehe Abschnitt 6.2).

• Erfassen der demographischen Informationen.

• Erfassen der medizinischen Vorgeschichte.

• Erfassen der begleitenden Medikationen und Vakzinierungen, einschließlich wiederkehrender Medikationen für intermittierende Zustände, wenn diese innerhalb von 6 Monaten vor der Aufnahme in diese Studie eingenommen wurden.

• Durchführen einer vollständigen körperlichen Untersuchung, einschließlich Größe und Gewicht (siehe Abschnitt 9.3.7). Wenn die vollständige körperliche Untersuchung zur Feststellung der Eignung innerhalb von 21 Tagen vor der Verabreichung der Studienvakzine durchgeführt wurde, sollte am Tag der Vakzinierung vor der Verabreichung der Studienvakzine eine symptomorientierte körperliche Untersuchung durchgeführt werden.

• Messen der Vitalparameter (Körpertemperatur, Puls, Blutdruck; siehe Abschnitt 9.3.7).

• Durchführen eines Urin-Schwangerschaftstests bei Frauen im gebärfähigen Alter.

• Entnehmen von Blutproben vor der Vakzinierung für den Test auf an das N-Protein von SARS-CoV-2 bindende Antikörper (~6 ml Blut).

[1001] Vakzinierungs-Verfahren

• Überprüfen der Kriterien für die Verzögerung oder den Abbruch der Vakzinierung. Siehe Abschnitte 6.3 und 8.1 für einen Überblick über die Kriterien, die zu einer Verzögerung oder einem Abbruch der Vakzinverabreichung führen. Im Falle einer Verzögerung sollte die Vakzinierung innerhalb der erlaubten Zeitfenster stattfinden. Die Gründe für die Verzögerung oder den Abbruch sollten in der Akte des Probanden dokumentiert werden.

• Verabreichen der Studienvakzindosis entsprechend der Zuweisung des Probanden. Post-Vakzinierungs-Verfahren

• Beobachten des Probanden nach der Vakzinierung für mindestens 30 Minuten zur Sicherheitsüberwachung vor Ort. Am Ende der Beobachtungszeit:

- Messen der Vitalparameter (Körpertemperatur, Puls, Blutdruck; siehe Abschnitt 9.3.7).

- Der Proband darf erst entlassen werden, wenn die Vitalparameter im Normalbereich liegen oder auf das Niveau vor der Vakzinierung zurückgegangen sind.

- Erfassen des Auftretens von AEs nach der Studienvakzinierung.

• Anweisungen für den Probanden:

- Erinnern des Probanden daran, die Prüfstelle sofort anzurufen, um Folgendes zu melden:

○ Wenn er/sie irgendwelche besorgniserregenden lokalen oder systemischen Reaktionen oder andere medizinische Ereignisse durchmacht.

○ Alle medizinisch betreuten Visiten, die keine Routinevisiten für eine körperliche Untersuchung oder Vakzinierung sind, wie z.B. Visiten für eine Hospitalisierung, eine Visite in der Notaufnahme oder eine anderweitig ungeplante Visite bei oder von medizinischem Personal (Arzt) aus irgendeinem Grund.

○ Das Durchmachen eines schwerwiegenden medizinischen Ereignisses, das Auftreten einer Veränderung des allgemeinen Gesundheitszustands oder die Diagnose eines neuen Krankheitszustands durch einen Arzt. Diese sollten unabhängig von dem wahrgenommenen Zusammenhang zwischen dem Ereignis und der Studienvakzine gemeldet werden.

- Erinnern des Probanden daran, sich sofort mit der Prüfstelle in Verbindung zu setzen, wenn er/sie irgendeines der Symptome aufweist, die auf COVID-19 hindeuten. Zusätzlich werden die Probanden bis zu zweimal pro Woche angeschrieben, um mit „Ja“ oder „Nein“ zu antworten, ob sie Symptome von COVID-19 haben. Diejenigen, die mit „ja“ antworten, werden vom Studienpersonal bezüglich weiterer Informationen kontaktiert (siehe Abschnitt 9.2.1 und Abschnitt 9.5).

- Der Proband sollte auch daran erinnert werden, die Prüfstelle sofort zu kontaktieren, wenn er/sie einen außerhalb der Prüfstelle durchgeführten positiven SARS-CoV-2-Test hatte, unabhängig davon, ob er/sie zum Zeitpunkt des Tests symptomatisch (COVID-19 Erkrankung) oder asymptomatisch war.

[1002] Hinweis: Probanden ohne Symptome können aus verschiedenen Gründen getestet worden sein, z.B. bei engem Kontakt mit einer Person mit bekannter SARS-CoV-2-Infektion oder als Teil ihrer Routineuntersuchung als Gesundheitsdienstleister.

9.1.3.2 Klinikvisite 2: Tag 29 - Zweite Studienvakzinierung (-3/+7 Tage) Prä-Vakzinierungs-Verfahren

• Überprüfen und Erfassen aller neu gesammelten Sicherheitsdaten, einschließlich medizinisch betreuter AEs und SAEs.

• Erfassen begleitender Medikationen und Vakzinierungen, einschließlich wiederkehrender Medikationen bei intermittierenden Zuständen.

• Durchführen einer symptomorientierten körperlichen Untersuchung (siehe Abschnitt 9.3.7).

• Messen von Vitalparametern (Körpertemperatur, Puls, Blutdruck, siehe Abschnitt 9.3.7).

• Durchführen eines Urin-Schwangerschaftstests bei Frauen im gebärfähigen Alter. Vakzinierungs-Verfahren

• Überprüfen der Kriterien für die Verzögerung oder den Abbruch der Vakzinierung. Siehe Abschnitte 6.3 und 8.1 für einen Überblick über die Kriterien, die zu einer Verzögerung oder einem Abbruch der Vakzinierung führen. Im Falle einer Verzögerung sollte die Vakzinierung innerhalb der erlaubten Zeitfenster

stattfinden. Die Gründe für die Verzögerung oder den Abbruch sollten in der Akte des Probanden dokumentiert werden.

• Verabreichen der Studienvakzindosis entsprechend der Zuweisung des Probanden. Post-Vakzinierungs-Verfahren

• Beobachten des Probanden nach der Vakzinierung mindestens 30 Minuten lang zur Sicherheitsüberwachung vor Ort. Am Ende der Beobachtungszeit:

- Messen der Vitalparameter (Körpertemperatur, Puls, Blutdruck; siehe Abschnitt 9.3.7).

- Der Proband darf erst entlassen werden, wenn die Vitalparameter im Normalbereich liegen oder auf das Niveau vor der Vakzinierung zurückgegangen sind.

- Erfassen des Auftretens jeglicher AEs nach der Studienvakzinierung.

• Anweisungen für den Probanden:

- Erinnern des Probanden daran, die Prüfstelle sofort anzurufen, um Folgendes zu melden:

○ Wenn er/sie irgendwelche besorgniserregenden lokalen oder systemischen Reaktionen oder andere medizinische Ereignisse durchmacht.

○ Alle medizinisch betreuten Visiten, die keine Routinevisiten für eine körperliche Untersuchung oder Vakzinierung sind, wie z.B. Visiten zur Hospitalisierung, eine Visite in der Notaufnahme oder eine anderweitig ungeplante Visite bei oder von medizinischem Personal (Arzt) aus irgendeinem Grund.

○ Durchmachen eines schwerwiegenden medizinischen Ereignisses, Auftreten einer Veränderung des allgemeinen Gesundheitszustands oder die Diagnose einer neuen Erkrankung durch einen Arzt. Diese sollten unabhängig vom vermuteten Zusammenhang zwischen dem Ereignis und der Studienvakzine gemeldet werden.

- Erinnern des Probanden daran, sich sofort mit der Prüfstelle in Verbindung zu setzen, wenn er/sie irgendeines der Symptome aufweist, die auf COVID-19 hindeuten. Zusätzlich werden die Probanden bis zu zweimal pro Woche angeschrieben, um mit „Ja“ oder „Nein“ zu antworten, ob sie Symptome von COVID-19 haben. Diejenigen, die mit „ja“ antworten, werden vom Studienpersonal bezüglich weiterer Informationen kontaktiert (siehe Abschnitt 9.2.1 und Abschnitt 9.5).

- Der Proband sollte auch daran erinnert werden, die Prüfstelle sofort zu kontaktieren, wenn er/sie einen außerhalb der Prüfstelle durchgeführten positiven SARS-CoV-2-Test hatte, unabhängig davon, ob er/sie zum Zeitpunkt des Tests symptomatisch (COVID-19-Erkrankung) oder asymptomatisch war.

9.1.3.3 Klinikvisite 3: Tag 43 (-3/+3 Tage)

• Überprüfen und Erfassen aller neu gemeldeten Sicherheitsdaten, einschließlich medizinisch betreuter AEs und SAEs.

• Erfassen begleitender Medikationen und Vakzinierungen, einschließlich wiederkehrender Medikationen bei intermittierenden Zuständen.

• Durchführen einer symptomorientierten körperlichen Untersuchung (siehe Abschnitt 9.3.7).

• Messen der Vitalparameter (Körpertemperatur, Puls, Blutdruck, siehe Abschnitt 9.3.7).

• Entnahme von Blutproben für den Test auf an das N-Protein von SARS-CoV-2 bindende Antikörper (~6 ml Blut).

• Anweisungen für den Probanden:

- Erinnern des Probanden daran, sofort die Prüfstelle anzurufen, um Folgendes zu melden:

○ Wenn er/sie irgendein besorgniserregendes medizinisches Ereignis durchmacht.

○ Alle medizinischen Visiten, die keine Routinevisiten zur körperlichen Untersuchung oder Vakzinierung sind, wie z.B. Visiten zur Hospitalisierung, eine Visite in der Notaufnahme oder eine anderweitig ungeplante Visite bei oder von medizinischem Personal (Arzt) aus irgendeinem Grund.

○ Erleiden eines schwerwiegenden medizinischen Ereignisses, Auftreten einer Veränderung des allgemeinen Gesundheitszustands oder die Diagnose eines neuen Krankheitszustands durch einen Arzt.

Diese sollten gemeldet werden, unabhängig davon, ob ein Zusammenhang zwischen dem Ereignis und der Studienvakzine gesehen wird.

- Erinnern des Probanden daran, sich sofort mit der Prüfstelle in Verbindung zu setzen, wenn er/sie eines der Symptome aufweist, die auf COVID-19 hindeuten. Zusätzlich werden die Probanden bis zu zweimal pro Woche angeschrieben, um mit „Ja“ oder „Nein“ zu antworten, ob sie Symptome von COVID-19 haben. Diejenigen, die mit „ja“ antworten, werden vom Studienpersonal bezüglich weiterer Informationen kontaktiert (siehe Abschnitt 9.2.1 und Abschnitt 9.5).

- Der Proband sollte auch daran erinnert werden, die Prüfstelle sofort zu kontaktieren, wenn er/sie einen außerhalb der Prüfstelle durchgeführten positiven SARS-CoV-2-Test hatte, unabhängig davon, ob er/sie zum Zeitpunkt des Tests symptomatisch (COVID-19-Erkrankung) oder asymptomatisch war.

9.1.3.4 Telefonanruf: Tag 57 (-3/+7 Tage)

[1003] Der Zweck dieses Telefonanrufs ist es, sich nach dem allgemeinen Wohlbefinden des Probanden zu erkundigen und die Sicherheit seit des letzten Telefonkontakts oder der letzten Visite der Prüfstelle zu beurteilen.

• Während des Telefonats:

- Überprüfen und Erfassen aller neu gemeldeten AEs seit des letzten Telefonkontakts oder der letzten Visite in der Prüfstelle (medizinisch betreute AEs, SAEs).

- Erfassen begleitender Medikationen und Vakzinierungen, einschließlich wiederkehrender Medikationen bei intermittierenden Zuständen.

- Wenn der Proband über irgendwelche besorgniserregenden AEs berichtet, sollten diese nach dem Ermessen des Prüfers entweder durch (einen) Anruf(e) oder durch eine außerplanmäßige Visite in der Prüfstelle weiterverfolgt werden.

• Anweisungen für den Probanden:

- Erinnern des Probanden daran, sofort die Prüfstelle anzurufen, um Folgendes zu melden:

○ Wenn er/sie irgendwelche besorgniserregenden medizinischen Ereignisse durchmacht.

○ Alle medizinisch betreuten Visiten, die keine Routinevisiten zur körperlichen Untersuchung oder Vakzinierung sind, wie z.B. Visiten zur Hospitalisierung, eine Visite in der Notaufnahme oder eine anderweitig ungeplante Visite bei oder von medizinischem Personal (Arzt) aus irgendeinem Grund.

○ Erleiden eines schwerwiegenden medizinischen Ereignisses, Auftreten einer Veränderung des allgemeinen Gesundheitszustands oder die Diagnose eines neuen Krankheitszustands durch einen Arzt. Diese sollten unabhängig vom vermuteten Zusammenhang zwischen dem Ereignis und der Studienvakzine gemeldet werden.

- Erinnern des Probanden daran, sich sofort mit der Prüfstelle in Verbindung zu setzen, wenn er/sie eines der Symptome aufweist, die auf COVID-19 hindeuten. Zusätzlich werden die Probanden bis zu zweimal pro Woche angeschrieben, um mit „Ja“ oder „Nein“ zu antworten, ob sie Symptome von COVID-19 haben. Diejenigen, die mit „ja“ antworten, werden vom Studienpersonal bezüglich weiterer Informationen kontaktiert (siehe Abschnitt 9.2.1 und Abschnitt 9.5).

- Der Proband sollte auch daran erinnert werden, die Prüfstelle sofort zu kontaktieren, wenn er/sie einen außerhalb der Prüfstelle durchgeführten positiven SARS-CoV-2-Test hatte, unabhängig davon, ob er/sie zum Zeitpunkt des Tests symptomatisch (COVID-19-Erkrankung) oder asymptomatisch war.

9.1.3.5 Klinikvisite 4: Tag 211 (-7/+7 Tage)

[1004] Die Beurteilungen und Verfahren sind identisch mit denen, die während der Klinikvisite an Tag 43 durchgeführt wurden.

9.1.3.6 Telefonanruf: Tag 302 (-7/+7 Tage)

[1005] Der Zweck dieses Telefonkontakts ist es, sich nach dem allgemeinen Wohlbefinden des Probanden zu erkundigen und die Sicherheit seit der letzten Visite in der Prüfstelle an Tag 211 zu beurteilen.

[1006] Die Beurteilungen und Verfahren sind identisch mit denen, die während des Telefonats an Tag 57 und Tag 120 durchgeführt wurden.

9.1.3.7 Klinikvisite am Ende der Studie: Tag 393 (-0/+21 Tage)

[1007] Die Visite zum Ende der Studie wird am Tag 393, 1 Jahr nach der letzten Verabreichung der Studienvakzine, durchgeführt. Wenn möglich, sollte diese Visite auch Probanden einschließen, die die Vakzinierung während der Studie vorzeitig abgebrochen haben. Die folgenden Untersuchungen sollten durchgeführt werden:

• Überprüfung und Aufzeichnung aller neu gemeldeten AEs seit dem Telefonkontakt an Tag 302 (SAEs).

• Erfassung von Begleitmedikationen und Vakzinierungen, einschließlich wiederkehrender Medikationen bei intermittierenden Zuständen.

• Durchführen einer vollständigen körperlichen Untersuchung, einschließlich Größe und Gewicht (siehe Abschnitt 9.3.7).

• Messen der Vitalparameter (Körpertemperatur, Puls, Blutdruck, siehe Abschnitt 9.3.7).

• Entnahme von Blutproben für den Test auf an das N-Protein von SARS-CoV-2 bindende Antikörper (~6 ml Blut).

[1008] Der Proband wird darüber informiert, dass er/sie den Hauptteil der Studie abgeschlossen hat und dass nun der Verlängerungsteil der Studie beginnt (siehe Abschnitt 9.1.4).

9.1.4 Verlängerungsstudie (Dauer bis zu 1 Jahr)

• Allgemeine Anweisungen für alle Probanden:

- Informieren des Probanden, dass die Verlängerungsstudie am letzten Tag (Tag 393) der Hauptstudie beginnt. Erklären, dass die Dauer der Studie für 1 Jahr geplant ist, aber vorzeitig beendet werden kann, wenn CVnCoV die behördliche Zulassung erhält und den Probanden in der Placebogruppe die Vakzinierung mit CVnCoV angeboten wird. Die Studie kann auch vorzeitig beendet werden, wenn eine andere wirksame Vakzine lokal eingesetzt wird.

• Anweisungen für Phase-2b-Probanden, die an der Immunogenitäts-Untergruppe teilgenommen haben:

- Informieren der Probanden, dass die folgenden Untersuchungen und Verfahren durchgeführt werden:

○ Rückkehr zur Prüfstelle alle 3 Monate (Tag 484, Tag 575, Tag 665 und Tag 757) zur Entnahme von Blutproben für die Bewertung der Langzeitpersistenz von bindenden Antikörpern gegen die RBD des S-Proteins von SARS-CoV-2 und von SARS-CoV-2-Virus-neutralisierenden Antikörpern.

○ Erfassung von COVID-19-Fällen zur Beurteilung der Langzeitwirksamkeit.

○ Erfassung von AESIs und SAEs zur Beurteilung der Langzeitsicherheit.

• Anweisungen für Phase-2b-Nicht-Immunogenitäts-Probanden und Phase-3-Probanden

- Informieren der Probanden darüber, dass die folgenden Untersuchungen und Verfahren durchgeführt werden:

○ Telefonischer Kontakt alle 3 Monate (Tag 484, Tag 575, Tag 665 und Tag 757), um die Erfassung von AESIs und SAEs zur Beurteilung der Langzeitsicherheit sicherzustellen.

○ Erfassung von COVID-19-Fällen zur Beurteilung der Langzeitwirksamkeit.

- Erinnern des Probanden daran, die Prüfstelle sofort anzurufen, um Folgendes zu melden:

○ Wenn er/sie irgendwelche besorgniserregenden medizinischen Ereignisse durchmacht.

○ Alle medizinisch betreuten Visiten, die keine Routinevisiten zur körperlichen Untersuchung oder Vakzinierung sind, wie z.B. Visiten zur Hospitalisierung, eine Visite in der Notaufnahme oder eine anderweitig ungeplante Visite bei oder von medizinischem Personal (Arzt) aus irgendeinem Grund.

○ Erleiden eines schwerwiegenden medizinischen Ereignisses, Auftreten einer Veränderung des allgemeinen Gesundheitszustands oder die Diagnose eines neuen Krankheitszustands durch einen Arzt.

Diese sollten unabhängig vom vermuteten Zusammenhang zwischen dem Ereignis und der Studienvakzine gemeldet werden.

- Erinnern des Probanden daran, sich sofort mit der Prüfstelle in Verbindung zu setzen, wenn er/sie eines der Symptome aufweist, die auf COVID-19 hindeuten. Zusätzlich werden die Probanden bis zu zweimal pro Woche angeschrieben, um mit „Ja“ oder „Nein“ zu antworten, ob sie Symptome von COVID-19 haben. Diejenigen, die mit „ja“ antworten, werden vom Studienpersonal bezüglich weiterer Informationen kontaktiert.

- Der Proband sollte auch daran erinnert werden, die Prüfstelle sofort zu kontaktieren, wenn er/sie einen außerhalb der Prüfstelle durchgeführten positiven SARS-CoV-2-Test hatte, unabhängig davon, ob er/sie zum Zeitpunkt des Tests symptomatisch (COVID-19-Erkrankung) oder asymptomatisch war.

9.2 Beurteilungen der Wirksamkeit

9.2.1 COVID-19-Fälle

[1009] Die Erfassung von COVID-19-Fällen wird in identischer Weise sowohl im Phase-2b- als auch im Phase-3-Teil der Studie erfolgen. Der Fallnachweis beginnt mit der Identifizierung von Probanden, die mindestens ein Symptom aus einer standardisierten Liste von Symptomen angeben, die mit einer COVID-19-Erkrankung konsistent sind. Basierend auf einer telefonischen Befragung durch das Studienpersonal werden Probanden mit Verdacht auf eine COVID-19-Erkrankung auf eine SARS-CoV-2-Infektion getestet, bestehend aus einem Antigen-Schnelltest, der in der Prüfstelle vom Studienpersonal durchgeführt wird, und einem molekularbasierten RT-PCR-Test, der in einem ausgewiesenen Zentrallabor durchgeführt wird. Die Teststrategie ist in Abschnitt 9.5 beschrieben. Wenn bei einem Probanden eine COVID-19-Infektion bestätigt wird, werden die Probanden bis zum Abklingen ihrer Erkrankung weiterverfolgt, auch wenn die anfängliche Präsentation als mild eingestuft wird. Wenn der Proband hospitalisiert wird, muss der Fortschritt des Probanden weiterhin vom Prüfer verfolgt werden, und am Ende der Hospitalisierung muss ein medizinischer Bericht/Entlassungsbericht erstellt werden.

9.2.1.1 Fallnachweis

9.2.1.1.1 Routine-Überwachung auf COVID-19

[1010] Bei allen Visiten in der Prüfstelle und Telefonaten werden die Probanden daran erinnert, die Prüfstelle zu kontaktieren, wenn sie eines der folgenden Symptome* haben:

○ Fieber oder Schüttelfrost; Kurzatmigkeit oder Atembeschwerden; neuer Geschmacks- oder Geruchsverlust; Husten; Müdigkeit; Muskel- oder Körperschmerzen; Kopfschmerzen; Halsschmerzen; Verstopfung oder laufende Nase; Übelkeit oder Erbrechen; Diarrhö

* FDA Entwicklung und Zulassung von Vakzinen zur Verhinderung von COVID-19 Leitfaden (US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration (FDA). Leitfaden für die Industrie. Entwicklung und Zulassung von Vakzinen zur Verhinderung von COVID 19. 2020. Verfügbar im World Wide Web unter fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidancedocuments/development-and-licensure-vaccines-prevent-covid-19; Zugriff im Oktober 2020, hierin durch Verweis aufgenommen).

[1011] Die Probanden werden außerdem bis zu zweimal pro Woche angeschrieben, um mit Ja oder Nein zu antworten, ob sie Symptome von COVID-19 haben. Für beide Studienvakzinierungen wird die Benachrichtigung erst 4 Tage nach der Vakzinierung beginnen, um eine Verwechslung von Vakzin-assoziierten Reaktionen, die in diesem Zeitraum auftreten (z.B. Fieber, Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Müdigkeit, Myalgie), mit möglichen COVID-19-Symptomen zu vermeiden.

[1012] Diejenigen, die entweder bei der Visite in der Prüfstelle oder per Telefon über Symptome berichten oder in ihrer Antwort mit „ja“ antworten, dass sie Symptome haben, werden vom Studienpersonal für ein telefonisches Folgegespräch kontaktiert. Das Studienpersonal wird ein geskriptetes Interview (in dem es geschult wurde) verwenden, um Informationen über den Gesundheitszustand des Probanden zu sammeln, die verwendet werden, um die Wahrscheinlichkeit zu bestimmen, dass der Proband COVID-19 hat. Besteht bei dem Probanden der Verdacht auf eine COVID-19-Erkrankung, wird er/sie auf eine SARS-CoV-2-Infektion getestet (siehe nächster Abschnitt). Wenn der Verdacht gering ist, werden ein oder mehrere nachfolgende Telefonate geführt, um zu beurteilen, ob die Krankheit und die Symptome des Probanden fortgeschritten sind und ob der Verdacht auf COVID-19 ein ausreichendes Niveau erreicht hat, um den Probanden zu testen.

Basierend auf der klinischen Beurteilung kann der telefonische Kontakt so häufig wie täglich erfolgen. Alle symptomatischen Probanden erhalten ein Thermometer und einen Sauerstoffsättigungsmonitor für den Heimgebrauch. Das Studienpersonal wird die Probanden anweisen, ihre orale Körpertemperatur und die Sauerstoffsättigung mindestens 3 bis 4 Mal pro Tag zu messen, oder immer dann, wenn sie sich symptomatisch fühlen.

[1013] Die Teststrategie für eine SARS-CoV-2-Infektion wird in Abschnitt 9.5 vorgestellt. Die Testung besteht aus zwei Tests: einem Antigen-Schnelltest, der in der Prüfstelle vom Studienpersonal durchgeführt wird, und einem molekularbasierten RT-PCR-Test, der in einem ausgewiesenen Zentrallabor durchgeführt wird. Abhängig vom Prüfer, seiner/ihrer Einrichtung und dem Studienpersonal werden nasopharyngeale Abstrichproben für den Test entweder in der Prüfstelle oder bei einem Hausbesuch entnommen. Die Visite in der Prüfstelle oder der Hausbesuch durch das Studienpersonal wird als „Krankheitsbesuch“ betrachtet und als solcher im eCRF dokumentiert.

[1014] Wird bei einem Probanden durch einen positiven RT-PCR-Test virologisch bestätigt, dass er an COVID-19 erkrankt ist, werden die Probanden bis zum Abklingen ihrer Erkrankung weiter beobachtet, auch wenn der anfängliche Krankheitsverlauf als mild eingestuft wird. Wenn der Proband stationär behandelt wird, muss die Entwicklung des Probanden weiterhin vom Prüfer verfolgt werden und am Ende der Hospitalisierung muss ein Entlassungsbericht erstellt werden. Informationen über klinische Symptome und Anzeichen, deren Dauer und Schweregrad sowie die Behandlung und das Ergebnis der COVID-19-Episode werden vom Studienpersonal dokumentiert und im eCRF festgehalten.

[1015] Nach Abklingen der Erkrankung werden die Probanden auf die gleiche Weise weiterverfolgt wie diejenigen, die nicht an COVID-19 erkrankt sind (d.h. sie werden wieder in die routinemäßige Fallüberwachung aufgenommen). Eine zweite COVID-19-Episode bei einem Probanden mit vorheriger Erkrankung wird nicht als primärer Wirksamkeitsfall gezählt, sondern wird in die explorative Zielsetzung zur Bewertung des Auftretens von zweiten COVID-19-Episoden bei vakzinierten Probanden aufgenommen.

[1016] Wenn der Proband nicht durch einen RT-PCR-Test virologisch bestätigt wird, wird er/sie in die Routineüberwachung für eine COVID-19-Erkrankung als Proband, der naiv für eine SARS-CoV-2-Infektion ist, zurückgeführt (es sei denn, es wird durch einen seropositiven Test gegen das N-Protein etwas anderes festgestellt).

9.2.1.1.2 Nicht-routinemäßige Überwachung auf COVID-19 (positiver Test außerhalb der Prüfstelle)

[1017] Die Probanden werden daran erinnert, die Prüfstelle sofort zu kontaktieren, wenn sie einen positiven SARS-Cov-2 Test hatten, der außerhalb der Prüfstelle durchgeführt wurde, unabhängig davon, ob sie zum Zeitpunkt des Tests symptomatisch (COVID-19-Erkrankung) oder asymptomatisch waren.

[1018] Wenn der Proband symptomatisch war, wird das Studienpersonal das geskriptete Interview verwenden, um Informationen über die COVID-19-Symptome und den medizinischen Zustand des Probanden zu sammeln. Der Proband sollte so bald wie möglich erneut getestet werden, um das Ergebnis zu bestätigen. Eine nasopharyngeale Abstrichprobe sollte zur RT-PCR-Untersuchung an das vom Sponsor benannte Zentrallabor geschickt werden; das RT-PCR-Testergebnis gilt definitiv als virologisch bestätigter Fall von COVID-19. Wenn bestätigt wird, dass der Proband an COVID-19 erkrankt ist, werden die Probanden bis zum Abklingen ihrer Erkrankung weiterverfolgt, wie oben für Probanden beschrieben, die durch die Routineüberwachung entdeckt wurden.

[1019] Wenn der Proband nicht virologisch durch RT-PCR-Tests bestätigt wird, kehrt er/sie zur Routineüberwachung für die COVID-19-Erkrankung als Proband zurück, der naiv für eine SARS-CoV-2-Infektion ist (sofern nicht durch einen seropositiven Test gegen das N-Protein etwas anderes festgestellt wird).

9.2.1.2 Definition eines virologisch bestätigten COVID-19-Falls

[1020] Ein virologisch bestätigter Fall von COVID-19 ist definiert als ein positiver SARS-CoV-2-spezifischer RT-PCR-Test bei einer Person mit einer klinisch symptomatischen Erkrankung, die aus einem oder mehreren der folgenden Symptome besteht (basierend auf den gleichen Screening-Symptomen wie oben):

- Fieber oder Schüttelfrost; Kurzatmigkeit oder Atembeschwerden; neuer Geschmacks- oder Geruchsverlust; Husten; Müdigkeit; Muskel- oder Körperschmerzen; Kopfschmerzen; Halsschmerzen; verstopfte oder laufende Nase; Übelkeit oder Erbrechen; Diarrhö

[1021] Diese Definition soll alle Schweregrade von virologisch bestätigten, klinisch symptomatischen Fällen von COVID-19 erfassen. Daher sind COVID-19-Fälle, die nach Schweregrad (z.B. leicht oder schwer) klassifiziert sind, eine Untergruppe dieser Fälle.

9.2.1.3 COVID-19-Falldefinition für die co-primäre Wirksamkeitsanalyse Für die primäre Analyse der Wirksamkeit muss der Fall die folgenden Kriterien erfüllen:

• Es muss sich um einen virologisch bestätigten Fall von COVID-19 handeln, definiert als ein positiver SARS-CoV-2-spezifischer RT-PCR-Test bei einer Person mit klinisch symptomatischem COVID-19, wie oben in Abschnitt 9.2.1.2 definiert.

○ Für die primären Wirksamkeitsanalysen werden COVID-19-Fälle als „beliebiger Schweregrad“ oder „moderater bis schwerer“ Schweregrad kategorisiert.

• Das Auftreten der Symptome muss ≥ 15 Tage nach der zweiten Studienvakzinierung erfolgt sein.

• Der Proband darf zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie keine virologisch bestätigte COVID-19-Erkrankung aufweisen oder vor 15 Tagen nach der zweiten Studienvakzinierung einen Fall von virologisch bestätigtem COVID-19 entwickelt haben (siehe Abschnitt 10.2.3, Wirksamkeitsanalyse-Set (EAS) für weitere Details).

• Der Proband muss zu Studienbeginn (Baseline) und an Tag 43 SARS-CoV-2-naiv gewesen sein (definiert als seronegativ gegen das N-Protein in den zu Studienbeginn und an Tag 43 entnommenen Blutproben).

[1022] Die primären Wirksamkeitsfälle müssen durch das Adjudikationskomitee bestätigt werden.

[1023] Tag 43 ist 14 Tage nach der zweiten Dosis, was es der Immunantwort auf CVnCoV erlaubt, zu reifen und ihren Höhepunkt nach der zweiten Dosis zu erreichen. Daher stellt die Feststellung von COVID-19-Fällen ab dem nächsten Tag ≥ 15 Tage die Bewertung der vollen VE von CVnCoV gegen COVID-19-Erkrankung dar.

9.2.1.4 Beurteilung von COVID-19-Fällen

[1024] Ein unabhängiges Komitee aus Klinikern wird gebildet, um die COVID-19-Fälle zu beurteilen. Das Komitee wird gegenüber der Behandlungszuweisung des Probanden verblindet. Die Mitglieder des Komitees beurteilen die Fälle im Hinblick auf die folgenden Fragen in Übereinstimmung mit den Endpunkten der Studie.

• Handelt es sich bei dem Fall um einen virologisch bestätigten Fall von COVID-19, definiert als positiver SARS-Cov-2-spezifischer RT-PCR Test bei einer Person mit klinisch symptomatischem COVID-19 mit einem oder mehreren der oben in Abschnitt 9.2.1.2 aufgeführten Symptome.

○ Wurde der RT-PCR-Test in dem von CureVac benannten Zentrallabor durchgeführt?

• War der Symptombeginn des Falles ≥ 15 Tage nach der zweiten Vakzinierung? Oder trat er vor 15 Tagen nach der zweiten Studienvakzinierung auf?

• War der Proband zu Studienbeginn und an Tag 43 naiv oder nicht-naiv gegenüber SARS-CoV-2? (definiert als seronegativ oder seropositiv gegen das N-Protein von SARS-CoV-2).

• War der Proband 18 bis 60 Jahre alt oder ≥ 61 Jahre alt?

• War der Proband asymptomatisch? Wenn asymptomatisch, war der RT-PCR-Test positiv ≥ 15 Tage nach der zweiten Vakzinierung oder davor?

• Handelte es sich um einen milden oder schweren Fall von COVID-19 basierend auf den angegebenen klinischen Definitionen?

• Benötigte der Proband eine zusätzliche Sauerstoffzufuhr? Welche Art der Sauerstoffunterstützung erhielt der Proband?

• Wurde der Patient hospitalisiert? Wurde der Patient auf der Intensivstation aufgenommen?

• Ist der Patient verstorben? Aufgrund von COVID-19 oder aus einem anderen Grund? 9.2.2 Asymptomatische Fälle von SARS-CoV-2-Infektion

[1025] In dieser Studie wird es keine aktive Überwachung auf asymptomatische SARS-CoV-2-Infektionen geben. Die Probanden werden daran erinnert, sich sofort mit der Prüfstelle in Verbindung zu setzen, wenn bei ihnen ein positiver SARS-CoV-2-Test außerhalb der Prüfstelle durchgeführt wurde, unabhängig davon, ob sie zum Zeitpunkt des Tests symptomatisch (COVID 19 Erkrankung) oder asymptomatisch waren. Probanden ohne Symptome können aus verschiedenen Gründen getestet worden sein, z.B. bei engem Kontakt mit einer bekannten Person mit einer SARS-CoV-2-Infektion oder als Teil ihrer Routineuntersuchung als Gesundheitsdienstleister.

[1026] Wenn der Proband asymptomatisch war, wird das Studienpersonal den Probanden sofort kontaktieren, um Informationen über den positiven SARS-CoV-2-Test, den der Proband gemeldet hat, zu sammeln. Der Proband sollte so bald wie möglich erneut getestet werden, um das Ergebnis zu bestätigen. Eine nasopharyngeale Abstrichprobe sollte an das vom Sponsor benannte Zentrallabor für RT-PCR-Tests geschickt werden; ein positives RT-PCR-Testergebnis gilt definitiv als virologisch bestätigter Fall einer SARS-CoV-2-Infektion.

[1027] Wenn bei dem Probanden eine SARS-CoV-2-Infektion bestätigt wird, wird der Proband vom Studienpersonal mindestens 2 Wochen lang auf die Entwicklung von COVID-19-Symptomen beobachtet, um sicherzustellen, dass es sich um eine asymptomatische Infektion handelt. Wenn der Proband COVID-19 entwickelt, wird er/sie als COVID-19-Fall weiterverfolgt. Wenn bestätigt wird, dass der Proband asymptomatisch ist, werden die Informationen vom Studienpersonal gesammelt und auf der entsprechenden eCRF-Seite dokumentiert.

[1028] Wenn der Proband nicht durch einen RT-PCR-Test virologisch bestätigt wird, wird er/sie als Proband, der naiv bezüglich einer SARS-CoV-2-Infektion ist, in die routinemäßige Überwachung auf eine COVID-19-Erkrankung zurückkehren (es sei denn, ein seropositiver Test gegen das N-Protein ergibt etwas anderes).

9.3 Sicherheitsbeurteilungen

[1029] Die Sicherheit, Reaktogenität und Verträglichkeit eines 2-Dosis-Schemas von CVnCoV wird wie unten beschrieben bewertet.

9.3.1 Spezifische Sicherheitsbeurteilungen für Probanden in Phase 2b

- Die Reaktogenität wird täglich an jedem Vakzinierungstag und an den folgenden 7 Tagen durch die Erfassung von abgefragten lokalen AEs (Schmerzen, Rötung, Schwellung und Juckreiz an der Injektionsstelle) und systemische AEs (Fieber, Kopfschmerzen, Müdigkeit, Schüttelfrost, Myalgie, Arthralgie, Übelkeit/Erbrechen und Diarrhö) mittels eDiaries beurteilt. Zusätzlich werden weitere Sicherheitsindikatoren erfasst (z.B. Körpertemperatur).
- Das eDiary wird auch als Gedächtnisstütze für den Probanden für die Erfassung von nicht abgefragten AEs an jedem Vakzinierungstag und den folgenden 28 Tagen verwendet.

9.3.2 Sicherheitsprüfungen für alle Probanden in Phase 2b und Phase 3

- Medizinisch betreute AEs werden bis 6 Monate nach der zweiten Studienvakzinierung gesammelt.
- AESIs werden bis zu 1 Jahr nach der zweiten Studienvakzinierung erfasst. Zu den zu überwachenden AESIs gehören pIMDs, AESIs für SARS-CoV-2-Vakzine und nicht schwerwiegende interkurrente medizinische Erkrankungen, die die Immunantwort auf die Vakzinierung beeinflussen können.
- SAEs werden bis 1 Jahr nach der zweiten Studienvakzinierung gesammelt.
- AEs, die zum Absetzen der Vakzine oder zum Abbruch der Studie führen, werden bis zu 1 Jahr nach der zweiten Studienvakzinierung erfasst.

(Wenn der Proband seine zweite Studienvakzinierung nicht erhält, wird die AE-Nachbeobachtungszeit (6 Monate oder 1 Jahr) auf der Grundlage des für die zweite Vakzinierung an Tag 29 vorgesehenen Datums bestimmt).

- Das eDiary wird als Gedächtnisstütze für den Probanden für die Erfassung von medizinisch betreuten AEs, AESIs und SAEs verwendet.

9.3.3 Sicherheitsbeurteilungen für Probanden in der 1-Jahres-Verlängerungsstudie

- AESIs und SAEs werden für bis zu 1 weiteres Jahr in der Verlängerungsstudie gesammelt.
- Das eDiary wird als Gedächtnisstütze für den Probanden für die Erfassung von AESIs und SAEs verwendet.

9.3.4 Unerwünschte Ereignisse

[1030] Definitionen von AEs/SAEs, Verfahren zur Erfassung, Bewertung, Nachverfolgung und Meldung von AEs/SAEs/Schwangerschaft/Überdosierung sowie die Bewertungen der Intensität und Kausalität von AEs.

[1031] Es ist wichtig zu beachten, dass COVID-19-Erkrankungen und deren Komplikationen/Folgen mit den Wirksamkeitsendpunkten der Studie übereinstimmen und als solche nicht als AEs erfasst werden sollten. Diese Daten werden auf den entsprechenden eCRF-Seiten für Fälle von COVID-19-Erkrankungen erfasst, die im Rahmen der Studie auftreten und die erwartete Ergebnisse der Studie sind. Daher werden COVID-19-Erkrankungen und deren Komplikationen/Folgen nicht gemäß dem standardmäßigen beschleunigten Verfahren für SAEs gemeldet, auch wenn das Ereignis die Kriterien für ein SAE erfüllen könnte.

9.3.4.1 Abgefragte unerwünschte Ereignisse

[1032] Ein eDiary wird an alle Probanden in Phase 2b verteilt, um abgefragte lokale AEs (Schmerzen, Rötung, Schwellung und Juckreiz an der Injektionsstelle) und abgefragte systemische AEs (Fieber, Kopfschmerzen, Müdigkeit, Schüttelfrost, Myalgie, Arthralgie, Übelkeit/Erbrechen und Diarrhö) am Tag der Vakzinierung und an den folgenden 7 Tagen zu erfassen. Die Probanden erhalten ein Thermometer zur oralen Messung der Körpertemperatur und ein Maßband zur Bestimmung des Ausmaßes der lokalen Reaktionen an der Injektionsstelle. Die Probanden werden instruiert, wie sie die abgefragten AEs täglich für 7 Tage in das eDiary eintragen.

[1033] Abgefragte AEs werden auf einer Intensitätsskala von abwesend, leicht, moderat und schwer bewertet (Tabelle A und Tabelle B, oben). Definitionsgemäß werden alle lokalen AEs als mit der Studienvakzinierung zusammenhängend betrachtet. Bei systemischen AEs bewertet der Prüfer den Zusammenhang zwischen der Studienvakzine und dem Auftreten der einzelnen AEs und nimmt eine Bewertung der Intensität für jedes AE vor (Tabelle B).

[1034] Wenn sie den Probanden beunruhigen oder von längerer Dauer sind, sollten abgefragte AEs vom Grad 3 dem Prüfer sofort gemeldet werden. Im Falle von zusammenhängenden, abgefragten AEs vom Grad 3, die für mehr als einen Tag im eDiary gemeldet werden, wird der Proband befragt, um die Gesamtdauer des AE so genau wie möglich zu bestimmen.

9.3.4.2 Nicht abgefragte unerwünschte Ereignisse und schwerwiegende unerwünschte Ereignisse

[1035] Nicht abgefragte AEs, die am Tag der Vakzinierung und in den folgenden 28 Tagen auftreten, werden von Phase-2b-Probanden für jede der beiden Studienvakzinierungen erfasst.

[1036] Für alle Probanden in Phase 2b und Phase 3 werden medizinisch betreute AEs bis 6 Monate nach der zweiten Studienvakzinierung erfasst. AESIs werden bis zu 1 Jahr nach der zweiten Studienvakzinierung erfasst (siehe Abschnitt 9.3.4.3). SAEs werden bis zu 1 Jahr nach der zweiten Studienvakzinierung erfasst. In der Verlängerungsstudie werden AESIs und SAEs weiterhin für ein weiteres Jahr gesammelt.

[1037] Medizinisch betreute AEs sind definiert als AEs mit medizinisch betreuten Visiten, bei denen es sich nicht um Routinevisiten zur körperlichen Untersuchung oder Vakzinierung handelt, wie z.B. Visiten für eine Hospitalisierung, eine Visite in der Notaufnahme oder eine anderweitig ungeplante Visite bei oder von medizinischem Personal (Arzt) aus irgendeinem Grund.

[1038] Das Auftreten von AEs (schwerwiegende und nicht schwerwiegende) wird durch nicht-direktive Befragung des Probanden bei jeder Visite erfasst. AEs, die vom Probanden während oder zwischen den Visiten freiwillig als eDiary-Einträge angegeben oder durch Beobachtung, körperliche Untersuchung, Labortest oder andere Beurteilungen während der gesamten Studie festgestellt werden, werden im eCRF aufgezeichnet. Die Probanden sollten angewiesen werden, alle AEs mit schwerwiegenden Symptomen, subjektive Beschwerden oder objektive Veränderungen ihres Wohlbefindens sofort dem Prüfer oder dem Personal in

der Prüfstelle zu melden, unabhängig davon, ob ein Zusammenhang zwischen dem Ereignis und der Studienvakzine gesehen wird.

[1039] Der Prüfer wird den Zusammenhang zwischen der Studienvakzine und dem Auftreten der einzelnen AE/SAE beurteilen.

[1040] Nicht schwerwiegende interkurrente Krankheitszustände, die die Immunantwort auf die Vakzinierung beeinflussen können, werden ebenfalls während der Studie erfasst.

9.3.4.3 Unerwünschte Ereignisse von besonderem Interesse

[1041] AESIs werden in der HERALD-Studie CV NCOV 004 bis 1 Jahr nach der zweiten Studienvakzinierung und in der Verlängerungsstudie bis zu einem weiteren Jahr gesammelt. Die folgenden Ereignisse werden während dieser Studie als AESI betrachtet:

• AEs mit einer vermuteten immunvermittelten Ätiologie potenzieller immunvermittelter Erkrankungen (pIMDs), die oben definiert sind.

[1042] Zöliakie; Morbus Crohn; Colitis ulcerosa; Proktitis ulcerosa; Autoimmun-Cholangitis; Autoimmun-Hepatitis; Primär biliäre Zirrhose; Primär sklerosierende Cholangitis; Morbus Addison; Autoimmun-Thyreoiditis (einschließlich Hashimoto-Thyreoiditis; Diabetes mellitus Typ I; Morbus Basedow; Antisynthetase-Syndrom; Dermatomyositis; Juvenile chronische Arthritis (einschließlich Morbus Still); Gemischte Bindegewebserkrankung; Polymyalgia rheumatica; Polymyositis; Psoriasis-Arthropathie; Relapsierende Polychondritis; Rheumatoide Arthritis; Sklerodermie, (z.B. einschließlich diffuser systemischer Form und CREST-Syndrom); Spondyloarthritis, (z.B. einschließlich ankylosierende Spondylitis, reaktive Arthritis (Reiter-Syndrom) und undifferenzierte Spondyloarthritis); Systemischer Lupus erythematodes; Systemische Sklerose; Akute disseminierte Enzephalomyelitis, (einschließlich ortsspezifischer Varianten (z.B. nicht-infektiöse Enzephalitis, Enzephalomyelitis, Myelitis, Myeloradiculomyelitis)); Hirnnervenerkrankungen, (z.B. einschließlich Lähmungen/Parese (z.B. Bell-Lähmung)); Guillain-Barre-Syndrom, (z.B. einschließlich Miller-Fisher-Syndrom und andere Varianten); immunvermittelte periphere Neuropathien, Parsonage-Turner-Syndrom und Plexopathien, (z.B. einschließlich chronisch entzündlicher demyelinisierender Polyneuropathie, multifokaler motorischer Neuropathie und Polyneuropathien in Verbindung mit monoklonaler Gammopathie); Multiple Sklerose; Narkolepsie; Sehnervenentzündung; Transversale Myelitis; Alopecia areata; Autoimmune bullöse Hauterkrankungen, einschließlich Pemphigus, Pemphigoid und Dermatitis herpetiformis; Kutaner Lupus erythematosus; Erythema nodosum; Morphoea; Lichen planus; Psoriasis; Sweet-Syndrom; Vitiligo; Vaskulitis der großen Gefäße (z.B. einschließlich Riesenzellarteriitis, wie zum Beispiel Takayasu-Arteriitis und temporale Arteriitis); Vaskulitis der mittleren und/oder kleinen Gefäße (z.B. einschließlich: Polyarthritis nodosa, Morbus Kawasaki, mikroskopische Polyangiitis, Wegener-Granulomatose, Churg-Strauss-Syndrom (allergische granulomatöse Angiitis), Morbus Buerger Thromboangiitis obliterans, nekrotisierende Vaskulitis und anti-neutrophile zytoplasmatische Antikörper (ANCA) positive Vaskulitis (Typ nicht spezifiziert), Henoch-Schonlein-Purpura, Behcet-Syndrom, leukozytoklastische Vaskulitis); Antiphospholipid-Syndrom; Autoimmunhämolytische Anämie; Autoimmun-Glomerulonephritis (einschließlich IgA-Nephropathie, Glomerulonephritis rasch progressiv, membranöse Glomerulonephritis, membranoproliferative Glomerulonephritis und mesangioproliferative Glomerulonephritis); Autoimmun-Myokarditis/Kardiomyopathie; Autoimmun-Thrombozytopenie; Goodpasture-Syndrom; idiopathische pulmonale Fibrose; perniziöse Anämie; Raynaud-Phänomen; Sarkoidose; Sjögren-Syndrom; Stevens-Johnson-Syndrom; Uveitis).

• Andere AEs, die für die Entwicklung der SARS-CoV-2-Vakzine oder die Zielkrankheit relevant sind, umfassen:

Anaphylaxie; Vaskulitiden; Verstärkte Erkrankung nach Immunisierung; Multisystem-Entzündungssyndrom bei Kindern; Akutes Atemnotsyndrom; COVID-19-Erkrankung; Akute Herzschädigung; Mikroangiopathie; Herzinsuffizienz und kardiogener Schock; Stress-Kardiomyopathie; Koronare Herzkrankheit; Arrhythmie; Myokarditis, Perikarditis; Thrombozytopenie; Tiefe Venenthrombose; Lungenembolie; zerebrovaskulärer Schlaganfall; Extremitätenischämie; hämorrhagische Erkrankung; akute Nierenschädigung; Leberschädigung; generalisierter Krampfanfall; Guillain-Barre-Syndrom; akute disseminierte Enzephalomyelitis; Anosmie, Ageusie; Meningoenzephalitis; Chilblain-ähnliche Läsionen; kutane Vaskulitis eines einzelnen Organs; Erythema multiforme; schwere lokale/systemische AR nach Immunisierung

• Nicht schwerwiegende interkurrente medizinische Zustände, die die Immunantwort auf die Vakzinierung beeinflussen können, werden ebenfalls während der Studie erfasst.

9.3.5 Schwangerschaften

[1043] Eine Schwangerschaft ist ein Ausschlusskriterium für die Teilnahme an dieser Studie, aber die Probandinnen könnten während ihrer aktiven Teilnahme an dieser Studie potentiell schwanger werden.

9.3.6 Sicherheitslaboruntersuchungen

[1044] Frauen im gebärfähigen Alter wird am Tag 1 vor der Studienvakzinierung eine Urinprobe für einen Schwangerschaftstest entnommen, um die Eignung festzustellen. Ein Urin-Schwangerschaftstest wird auch vor der zweiten Studienvakzinierung an Tag 29 durchgeführt, um weiterhin die Eignung zu bestimmen.

9.3.7 Vitalparameter und körperliche Untersuchung

[1045] Bei allen Studienvisiten für Phase 2b und Phase 3 werden die Vitalparameter (Körpertemperatur, systolischer/diastolischer Blutdruck und Puls) in standardisierter Weise aufgezeichnet, nachdem der Proband 5 Minuten im Sitzen geruht hat.

[1046] Bei der ersten Studienvisite an Tag 1 und der Visite am Studienende an Tag 393 wird bei allen Probanden der HERALD-Studie CV NCOV-004 eine vollständige körperliche Untersuchung durchgeführt, einschließlich der Untersuchung des allgemeinen Erscheinungsbildes, von Augen/Ohren/Nase/Rachen, von Kopf/Hals/Schilddrüse, der Lymphknotenbereiche, des kardiovaskulären Systems, der Lunge/Brust, des Abdomens und des Urogenitalsystems, der Extremitäten und der neurologischen Untersuchung, der Hautuntersuchung sowie der Messung von Gewicht und Größe. Bei allen anderen Studienvisiten wird eine symptomorientierte körperliche Untersuchung durchgeführt.

9.3.8 Medizinische und chirurgische Vorgeschichte

[1047] Alle signifikanten Befunde und Vorerkrankungen, die bei einem Probanden vor der Aufnahme in die Studie bereits vorhanden waren, müssen auf dem Bildschirm „Relevante medizinische Vorgeschichte/aktuelle medizinische Zustände“ des eCRF angegeben werden.

[1048] Es sollten Informationen zur medizinischen und chirurgischen Vorgeschichte und zu Begleiterkrankungen angegeben werden, wobei die an Tag 1 bestehenden Erkrankungen zu spezifizieren sind.

9.3.9 Monitoring-Komitees

9.3.9.1 Daten- und Sicherheitsmonitoring-Gremium (DSMB)

[1049] Ein unabhängiges DSMB wird einberufen, um i) die Sicherheit der Probanden, die an dieser Studie HERALD: CV-NCOV-004 teilnehmen, zu überwachen; ii) den Fortschritt und die Durchführung der Studie zu bewerten; iii) die kumulativen Sicherheitsdaten der Studie zu überprüfen; iv) eine fortlaufende Überprüfung von AEs durchzuführen, die möglicherweise sicherheitsrelevant sind (siehe Abschnitt 5.5.2); und v) Empfehlungen an den Sponsor zu geben, ob die Studie fortgesetzt, modifiziert oder unterbrochen werden soll (siehe Abschnitt 5.5.2). Das DSMB wird regelmäßig geplante Sitzungen abhalten, um diese Aufgaben zu erfüllen. Während dieser Sitzungen wird das DSMB auch über die Sicherheitsdaten informiert, die in anderen laufenden klinischen Studien mit CVnCoV gewonnen werden. Wie in Abschnitt 5.5.2 beschrieben, wird der Vorsitzende des DSMB (oder ein von ihm Beauftragter) routinemäßig und in regelmäßigen Abständen eine Liste von AEs mit potenziellen Sicherheitsbedenken erstellen, um die Sicherheit der Probanden fortlaufend zu gewährleisten. Wie in Abschnitt 7.3.2 beschrieben, kann das DSMB zu jedem Zeitpunkt der klinischen Studie die Entblindung eines einzelnen Probanden oder eines bestimmten Datensatzes verlangen.

[1050] Zusätzlich zu den Sicherheitsdaten wird das DSMB gebeten, Wirksamkeitsdaten bei den Interimanalysen oder möglicherweise zu anderen Zeitpunkten während der Studie zu überprüfen, um eine fortlaufende Bewertung des Risiko-Nutzen-Verhältnisses der Studie vorzunehmen. Als Teil der Risiko-Nutzen-Analyse wird das DSMB die COVID-19-Fälle periodisch auf Signale von VDE überwachen. Das DSMB wird auch gebeten, (eine) unverblindete Überprüfung(en) der Inzidenzrate der COVID-19-Fälle durchzuführen, um gegebenenfalls eine Erhöhung der Probengröße zu empfehlen.

[1051] Die DSMB-Satzung beschreibt detailliert die Zusammensetzung und die Ziele des DSMB, die Verantwortlichkeiten des DSMB, von CureVac und des CRO, den Plan und die Durchführung der DSMB-Sitzungen

sowie die zu überprüfenden Datensätze. Die Satzung wird den statistischen Analyseplan (SAP) für das DSMB enthalten.

9.3.9.2 Adjudikationskomitee

[1052] Ein unabhängiges Komitee aus Klinikern wird gebildet, um die COVID-19-Fälle für die Bewertung des primären Endpunkts zu beurteilen. Das Komitee wird bezüglich der Behandlungszuweisung des Probanden verblindet sein. Die Fälle werden von den Mitgliedern im Hinblick auf die in Abschnitt 9.2.1.4 dargestellten Fragen beurteilt. Der Plan der Sitzungen und die Vorgehensweise bei der Beurteilung der Fälle werden in der Satzung festgelegt. Der Ausschussvorsitzende nimmt an den DSMB-Sitzungen als Ad-hoc-Mitglied teil.

9.4 Beurteilung der Immunogenität

[1053] Da die Immunogenitätsergebnisse die Behandlungszuordnung des Probanden offenlegen würden, wird das Labor, das die Tests durchführt, die Ergebnisse streng vertraulich behandeln. Eine unverblindete Person, die zu Beginn der Studie benannt wird und unabhängig von der Durchführung der Studie ist, wird regelmäßig die Qualität der Immunogenitätsdaten überprüfen. Diese Person wird die Ergebnisse streng vertraulich behandeln.

9.4.1 Antikörperantworten auf die CVnCoV-Vakzinierung (RBD des S-Proteins und Virus-neutralisierende Antikörper)

[1054] Die Antikörperantworten auf die CVnCoV-Vakzinierung werden nur im Phase-2b-Teil der Studie und nur bei Probanden in der Immunogenitätsuntergruppe zu den jeweiligen Zeitpunkten ausgewertet. In der Verlängerungsstudie wird die Antikörperpersistenz alle 3 Monate im zweiten Jahr nach der Vakzinierung bewertet.

[1055] Die durch die Vakzinierung mit CVnCoV induzierte Immunantwort wird mit 2 Assays bewertet:

- An die RBD des S-Proteins von SARS-CoV-2 bindende Antikörper, gemessen im Serum mittels Immunoassay.
- Virus-neutralisierende Antikörper, die gegen SARS-CoV-2 gerichtet sind, gemessen im Serum durch einen funktionalen Aktivitätsassay.

9.4.2 Antikörperantworten auf SARS-CoV-2 (N-Protein)

[1056] Antikörperantworten auf SARS-CoV-2 werden in allen Teilen der Studie und bei allen Probanden durch Messung der an das N-Protein (Virusantigen, das nicht im Vakzinkonstrukt enthalten ist) von SARS-CoV-2 bindenden Antikörper zu den oben angegebenen Zeitpunkten mittels Immunoassay ermittelt.

[1057] Als Maß für eine vorangegangene Infektion mit SARS-CoV-2 wird der serologische Status gegen das N-Protein für Folgendes verwendet:

1. Retrospektive Bestimmung, ob die Probanden bei Studienbeginn und an Tag 43 naiv oder nicht-naiv für eine SARS-CoV-2-Infektion waren.

a. Für die Bewertung der Wirksamkeit eines 2-Dosis-Schemas von CVnCoV bei naiven Probanden müssten die Probanden zu Studienbeginn und an Tag 43 seronegativ für Antikörper gegen das N-Protein sein.

b. Für die Bewertung der Wirksamkeit nach der ersten Dosis von CVnCoV bei naiven Probanden müssten die Probanden nur zu Beginn der Studie seronegativ für Antikörper gegen das N-Protein sein.

2. Bestimmung, ob die Vakzinierung mit einem 2-Dosen-Schema von CVnCoV die Infektion mit SARS-CoV-2 reduzieren kann, durch Messung der Serokonversion gegen das N-Protein bei seronegativen Probanden während des Versuchszeitraums. Wie oben in 1a beschrieben, müssten diese Probanden zu Studienbeginn und an Tag 43 seronegativ für Antikörper gegen das N-Protein sein.

9.4.3 Antikörperantworten auf die CVnCoV-Vakzinierung bei Probanden, die einen Fall von COVID-19 entwickeln

[1058] Bei allen Fällen von COVID-19, die im Rahmen der Studie auftreten, wird die Antikörperantwort auf die Studienvakzinierung in den Blutproben des Probanden bestimmt, die an Tag 1 (Prä-Vakzinierungs-Baseline), Tag 43, Tag 211 und Tag 393 der Studie entnommen wurden. Diese Assays müssen nur bei Probanden im Phase-2b-Teil, die nicht zur Immunogenitäts-Untergruppe gehören, und bei Phase-3-Probanden durchgeführt werden. Bei Probanden in der Phase-2b-Immunogenitäts-Untergruppe werden diese bereits als Teil der Kohorte durchgeführt. Diese Ergebnisse werden verwendet, um Korrelate der durch die CvnCoV-Vakzinierung induzierten schützenden Immunität zu untersuchen.

9.4.4 Zellvermittelte Immunität

[1059] Die zellvermittelte Immunität (CMI) wird bei 400 Probanden untersucht: 200, die CVnCoV erhalten und 200, die Placebo erhalten. In jeder CVnCoV- und Placebogruppe werden 100 Probanden im Alter von 18 bis 60 Jahren und 100 Probanden ≥ 61 Jahren sein. Dies soll an einem klinischen Standort in Europa und einer weiteren in einem lateinamerikanischen Land durchgeführt werden (ca. 100 CVnCoV-Probanden + 100 Placebo-Probanden an jedem Standort).

[1060] Die Häufigkeit und Funktionalität der spezifischen T-Zell-Antwort auf die RBD des S-Proteins von SARS-CoV-2 nach Antigenstimulation soll in PBMC im Vergleich zum Ausgangswert (Baseline) bestimmt werden. Zum Beispiel werden ICS zur Untersuchung der Th1-Antwort und die Produktion von Th2-Markern verwendet, um zu untersuchen, ob die Vakzinierung eine Th1-Verschiebung gegenüber der Baseline induziert. Weitere hochprofilierende T-Zell-Immunantworten können mit anderen Technologien, wie zum Beispiel ELISpot oder CyTOF, Analyse von genomischen Biomarkern oder anderen etablierten Assays untersucht werden. Die CMI-Bewertung wird an Tag 1 (Baseline), Tag 29, Tag 43, Tag 120 und Tag 211 durchgeführt. Dabei werden die Tests an Tag 120 und Tag 211 nur bei Probanden durchgeführt, die an Tag 29 und/oder Tag 43 als T-Zell-Responder bestimmt wurden.

9.5 Testung auf SARS-CoV-2-Infektion

9.5.1 Virologische Bestätigung einer COVID-19-Erkrankung

[1061] Während der Studie werden Probanden, bei denen ein klinischer Verdacht auf eine COVID-19-Erkrankung besteht, wie unten beschrieben auf das SARS-CoV-2-Virus getestet. Die Probenentnahme für die Tests kann in der Prüfstelle oder bei einem Hausbesuch durch das Studienpersonal durchgeführt werden. Idealerweise sollten die Proben innerhalb von 5 Tagen nach Auftreten der Symptome entnommen werden. Die Testergebnisse werden auf der entsprechenden eCRF-Seite dokumentiert.

- Probanden mit einem klinischen Verdacht auf COVID-19 werden mit einem Antigen-Schnelltest, der in der Prüfstelle durchgeführt wird, auf eine SARS-CoV-2-Infektion getestet und die Ergebnisse werden dem Probanden mitgeteilt. Die Proben für den Antigen-Schnelltest werden mit nasopharyngea!en Abstrichen entnommen.

- Unabhängig vom Ergebnis des Antigen-Schnelltests wird eine zur gleichen Zeit entnommene nasopharyngeale Abstrichprobe an ein Zentrallabor geschickt, um einen SARS-Cov-2 spezifischen RT-PCR-Test durchzuführen. Das Ergebnis des RT-PCR-Tests gilt als definitiver Nachweis einer SARS-CoV-2-Infektion. In dem unwahrscheinlichen Fall, dass nur eine Probe von der Person entnommen werden kann, sollte die Probe mittels RT-PCR im Zentrallabor getestet werden.

  ○ Wenn der RT-PCR-Test negativ ist, aber aufgrund der Expositionsvorgeschichte und des klinischen Bildes des Probanden immer noch der Verdacht auf COVID-19 besteht, sollte so bald wie möglich eine weitere nasopharyngeale Abstrichprobe entnommen und zum RT-PCR-Test an das Zentrallabor geschickt werden. Das Ergebnis des RT-PCR-Wiederholungstests gilt als definitiver Nachweis einer SARS-Cov-2-Infektion.

- Probanden, die bei allen Tests negativ sind, werden als naiv für eine SARS-CoV-2-Infektion betrachtet. In dem unwahrscheinlichen Fall, dass ein Probanden positiv im Antigen-Schnelltest, aber negativ in der RT-PCR getestet wird, wird der Proband auch ohne positive virologische Bestätigung durch die RT-PCR als naiv betrachtet (es sei denn, ein seropositiver Test gegen das N-Protein ergibt etwas anderes).

9.5.2 Bestätigung eines positiven Tests bezüglich einer SARS-CoV-2-Infektion, der außerhalb der Prüfstelle durchgeführt wurde

[1062] Siehe Abschnitt 9.2.1.1.2 und Abschnitt 9.2.2 zur Weiterverfolgung von Probanden, die einen positiven Test bezüglich einer SARS-CoV-2-Infektion melden, der außerhalb der Prüfstelle durchgeführt wurde.

[1063] Bei Probanden (symptomatisch oder asymptomatisch), die einen positiven Test bezüglich einer SARS-CoV-2-Infektion melden, der außerhalb der Prüfstelle durchgeführt wurde, sollte der Proband unabhängig von der Art des Tests so bald wie möglich erneut getestet werden, um das Ergebnis zu bestätigen. Eine nasopharyngeale Abstrichprobe sollte zur Bestätigung an das Zentrallabor für RT-PCR-Tests geschickt werden. Das Ergebnis des Wiederholungstests im Zentrallabor wird als endgültig angesehen.

10 STATISTISCHE ÜBERLEGUNGEN

10.1 Festlegung der Stichprobengröße

10.1.1 Co-Primäre Wirksamkeitsziele

[1064] Dies ist eine ereignisgesteuerte Studie. Überlegungen zur Stichprobengröße und Power basieren auf den co-primären Zielen für den Nachweis der Wirksamkeit von CVnCoV bei der Prävention von virologisch bestätigten COVID-19-Fällen jeglichen Schweregrads oder COVID-19-Fällen mittleren oder höheren Schweregrads, die die co-primären Falldefinitionen erfüllen. Ein gruppensequentielles Design mit 2 Interimanalysen für Fälle von COVID-19 jeglichen Schweregrades, die einen hohen Grad an Wirksamkeit zeigen oder Futilität erreichen, wird unter Anwendung der „Error-Spending-Funktion“ vom O'Brien-Fleming-Typ (Lan et al. 1983) geplant, und die Stichprobengröße basiert auf dem „Test for one single proportion“ (d.h. den Anteil der Fälle in der CVnCoV-Gruppe, unter allen Fällen). Das gruppensequentielle Design basiert auf dem COVID-19-Endpunkt mit beliebigem Schweregrad, aufgrund der höheren Fallzahl, die erforderlich ist, um diesen Endpunkt zu erreichen.

[1065] Zur Kontrolle des Typ-1-Fehlers für die beiden co-primären Ziele wurde das zweiseitige Alpha von insgesamt 5% gleichmäßig auf die beiden co-primären Ziele aufgeteilt. Bei einem zweiseitigen Alpha von insgesamt 2,5% werden bei der abschließenden Analyse insgesamt 185 COVID-19-Fälle jeglichen Schweregrads (die der Falldefinition der co-primären Wirksamkeit für COVID-19 jeglichen Schweregrads entsprechen) benötigt, um eine Power von 90% zu haben, um zu zeigen, dass die VE über 30% liegt, basierend auf der unteren Grenze des CI für die VE, bei Annahme einer VE unter der Alternativhypothese von 60% (d.h. äquivalent dazu zu zeigen, dass der Anteil der Fälle in der CVnCoV-Gruppe unter 0,4118 liegt, basierend auf der oberen Grenze des CI für den Anteilswert, unter der Annahme, dass der Anteilswert unter der Alternativhypothese 0,2857 beträgt).

[1066] Bei einem zweiseitigen Alpha von insgesamt 2,5% werden bei der Endanalyse insgesamt 60 moderate bis schwere Fälle von COVID-19 (die der Falldefinition der co-primären Wirksamkeit von moderater oder schwerer COVID-19 entsprechen) benötigt, um eine Power von 90% zu haben, um zu zeigen, dass die VE über 20% liegt, basierend auf der unteren Grenze des CI für die VE, bei Annahme einer VE unter der Alternativhypothese von 70% (d.h. äquivalent dazu zu zeigen, dass der Anteil der Fälle in der CVnCoV-Gruppe unter 0,4444 liegt, basierend auf der oberen Grenze des CI für den Anteilswert, unter der Annahme, dass der Anteilswert unter der Alternativhypothese 0,2308 beträgt). Wenn 1/3 der COVID-19-Fälle jeglichen Schweregrades moderat bis schwer sind, dann erhält man 60 moderate bis schwere Fälle, wenn die Gesamtzahl der COVID-19-Fälle 180 beträgt. Es ist keine Interimanalyse für diesen Endpunkt geplant.

[1067] Die beiden Interimanalysen für hohe Wirksamkeit oder Futilität des co-primären Ziels von COVID-19-Fällen jeglichen Schweregrads werden durchgeführt, sobald 56/111 Fälle akkumuliert wurden (ca. 30%/60% an Fällen).

[1068] Unter der Annahme einer Inzidenzrate von COVID-19 von 0,15% pro Monat bei den Placebo-Probanden, eines Anteils der nicht evaluierbaren Fälle von insgesamt 20% (entsprechend den von der EAS ausgeschlossenen Probanden und den Drop-outs) und einer VE von 60% werden bei 36.500 Probanden, die über einen Zeitraum von ca. 3 Monaten rekrutiert werden (18.250 pro Vakzingruppe), 185 COVID-19-Fälle jeglichen Schweregrades ca. 9 Monate nach der ersten Vakzinierung auftreten. Eine niedrigere Inzidenzrate, eine längere Rekrutierungsdauer oder eine höhere nicht evaluierbare Rate oder VE verzögern die Erfassung der 185 Fälle und den Zeitpunkt der Endanalyse. Die Probanden werden randomisiert, um entweder CVnCoV

oder Placebo in einem Verhältnis von 1:1 zu erhalten, unterteilt nach Land und Altersgruppe (18 bis 60 und ≥ 61 Jahre).

10.1.2 Wichtige sekundäre Wirksamkeitsziele

[1069] Für das wichtigste sekundäre Wirksamkeitsziel, das die Prävention von virologisch bestätigten schweren Fällen von COVID-19 bewertet, wird zum Zeitpunkt der Endanalyse eine geringere Anzahl von Fällen erfasst als beim primären Endpunkt. Basierend auf einer Analyse einer großen Datenbank von Verity et al. 2019 können etwa 20% der COVID-19-Fälle klinisch als schwer oder kritisch definiert werden, wobei letztere eine Intensivbehandlung erfordern.

[1070] Mit 37 Fällen von schwerer COVID-19 (20% von 185 Fällen) wird die Studie eine Power von 88% haben, um eine untere Grenze des 95%-CI der VE über 10% zu detektieren, wenn man annimmt, dass die VE 70% beträgt. Die Power steigt auf 90%, wenn die VE bei schweren Fällen 75% beträgt. Bei einer vollständigen Verlaufskontrolle aller evaluierbaren Probanden für 1 Jahr in der HERALD-Studie CV-NCOV-004 wird erwartet, dass die zusätzliche Anzahl von COVID-19-Fällen, die nach der zweiten Vakzinierung auftritt, eine robustere Evaluierung der CVnCoV-Wirksamkeit bei schweren Krankheitsverläufen ermöglicht. Diese Analyse wird im SAP vorgestellt werden.

[1071] Unter der Annahme, dass 45% der SARS-COV-2-Infektionen asymptomatisch verlaufen (Daniel et al. 2020), werden für das nächste wichtige sekundäre Wirksamkeitsziel etwa 300 asymptomatische Infektionen nach einem kompletten Jahr der Nachbeobachtung nach der zweiten Vakzinierung für alle evaluierbaren Probanden erwartet. Bei dieser Fallzahl hat die Studie eine Power von 80%, um eine untere Grenze des 95%-CI der VE über 0% zu detektieren, unter der Annahme, dass die VE bei asymptomatischen Infektionen 28% beträgt.

10.2 Populationen für die Analysen

[1072] In dem Sicherheitesanalyse-Set (SAS), dem Sicherheitesanalyse-Set 2 (SAS 2) und dem Sicherheitesanalyse-Set mit abgefragten AEs (SASsol) werden die Probanden in der Gruppe analysiert, in die sie tatsächlich aufgenommen wurden (als „behandelt“).

[1073] Gemäß dem „intent to treat“-Prinzip in den Wirksamkeits-Sets und Per-Protokoll-Sets werden die Probanden in der Gruppe analysiert, in die sie randomisiert wurden (als „randomisiert“).

10.2.1 Sicherheitesanalyse-Set (SAS)

[1074] Das SAS umfasst alle Probanden, die in Phase 2b oder 3 randomisiert wurden und mindestens eine Dosis von CVnCoV oder Placebo erhalten haben.

[1075] Das SAS wird die primäre Population für Sicherheitsendpunkte sein, die bei allen Probanden erhoben werden (d.h. medizinisch betreute AEs, AESI, AEs, die zum Ausschluss oder Studienabbruch führen, und SAEs) sowie für Wirksamkeitsziele, die die Wirksamkeit nach der ersten Dosis bewerten.

10.2.2 Sicherheitesanalyse-Sets 2 (SAS 2, SASsol)

[1076] Da abgefragte und nicht abgefragte AEs nur für Phase-2b-Probanden gesammelt werden, werden diese Analysen auf die Phase-2b-Probanden beschränkt.

[1077] Die SAS 2-Population wird alle Phase-2b-Probanden der SAS umfassen und für die Analyse der nicht abgefragten AEs verwendet werden.

[1078] Die-SASsol-Population umfasst alle Phase-2b-Probanden des SAS mit mindestens einer Tagebucherfassung, die das Auftreten oder Nichtauftreten von abgefragten AEs anzeigt, und wird für die Analyse der abgefragten AEs verwendet.

10.2.3 Wirksamkeitsanalyse-Set (EAS)

[1079] Das EAS wird alle Probanden umfassen, die in Phase 2b oder Phase 3 randomisiert wurden und

• beide Dosen der Studienvakzine entsprechend ihrer Randomisierung erhalten haben (2 Dosen CVnCoV oder 2 Dosen Placebo).

• vor Studienbeginn (basierend auf Ausschlusskriterium 1) oder vor 15 Tagen nach der zweiten Vakzinierung keinen virologisch bestätigten Fall von COVID-19 entwickelt haben.

• die Studie nicht vor 15 Tagen nach der zweiten Vakzinierung abgebrochen haben.

• zu Studienbeginn SARS-CoV-2-naiv waren (basierend auf Seronegativität gegen das N-Protein in der zu Studienbeginn entnommenen Blutprobe).

[1080] Das EAS wird die primäre Analysepopulation für alle Wirksamkeitsendpunkte sein (außer für den wichtigen sekundären Wirksamkeitsendpunkt in Bezug auf die Serokonversion und für die Wirksamkeitsendpunkte, die die Wirksamkeit ab der ersten Dosis bewerten).

10.2.4 Wirksamkeitsanalyse-Set für Serokonversion (EASS)

[1081] Die EASS-Population umfasst alle Probanden des EAS, die zu Studienbeginn und an Tag 43 seronegativ in Bezug auf das N-Protein von SARS-CoV-2 getestet wurden (d.h. zu allen Testzeitpunkten vor 15 Tagen nach der zweiten Vakzinierung) und für die mindestens ein serologisches Testergebnis in Bezug auf das N-Protein ≥ 15 Tage nach der zweiten Vakzinierung (Tag 211 oder 393) zur Analyse verfügbar ist.

[1082] Die primäre Analyse des wichtigsten sekundären Wirksamkeitsendpunkts in Bezug auf die Serokonversion gegen das N-Protein von SARS-CoV-2 (asymptomatische Infektionen) wird an dieser Population durchgeführt werden.

10.2.5 Per-Protokoll-Wirksamkeits-Set (PPE)

[1083] Das Per-Protokoll-Wirksamkeits-Set umfasst EAS-Probanden, die bei Studieneintritt alle Eignungskriterien erfüllen und bei denen keine wesentlichen Protokollabweichungen vorliegen, die sich auf die im SAP spezifizierten Wirksamkeitsergebnisse auswirken würden.

[1084] Die PPE wird eine unterstützende Population für die Wirksamkeitsendpunkte sein (mit Ausnahme des wichtigen sekundären Wirksamkeitsendpunkts in Bezug auf die Serokonversion und des sekundären Wirksamkeitsendpunkts, der die Wirksamkeit ab der ersten Dosis bewertet).

10.2.6 Per-Protokoll-Immunogenitäts-Set (PPI)

[1085] Das PPI-Set umfasst alle Phase-2b-Probanden, die zur Immunogenitäts-Untergruppe (IS) gehören (d.h. ~die ersten 600 Probanden, die in jede der beiden Altersgruppen in Phase 2b (18-60 und ≥ 61 Jahre) aufgenommen wurden) und die/bei denen:

• beide Dosen, wie randomisiert, und innerhalb der im Protokoll definierten Zeitfenster erhalten haben.

• keine wesentlichen Protokollabweichungen vorliegen, von denen zu erwarten ist, dass sie die Immunogenitätsergebnisse, wie im SAP spezifiziert, beeinflussen.

• keine medizinischen Behandlungen erhalten haben (wie zum Beispiel Blutprodukte, Immunglobulintherapie), die eine oder beide der vorgeschlagenen Immunogenitätsmessungen beeinträchtigen könnten.

• mindestens eine Blutprobe, die ab 14 Tagen (Tag 43) nach der zweiten Vakzinierung entnommen wurde, für die Analyse zur Verfügung steht.

[1086] Die PPI wird die primäre Analysepopulation für Antikörperantworten auf die RBD des S-Proteins von SARS-CoV-2 und SARS-CoV-2-Virus-neutralisierende Antikörper sein.

[1087] Probanden, die von der PPE/PPI ausgeschlossen werden sollen, werden identifiziert und bei dem vor der Entblindung der Studie abgehaltenen „Blinded Data Review Meeting“ überprüft. Wesentliche Protokollabweichungen werden aufgelistet und zusammengefasst.

[1088] Tabelle 18 enthält eine Zusammenfassung der primären und supportiven Populationen, die für die Analyse der einzelnen Endpunkte geplant sind. Andere Analysepopulationen können im SAP definiert werden.

Tabelle 18: Primäre und supportive Populationen für die Analyse der einzelnen Endpunkte

Endpunkte	Primäre Population	Supportive Population
Primäre Wirksamkeits-Endpunkte	EAS	PPE
Primäre Sicherheits-Endpunkte		
• SAEs, AESI, medizinisch betreute AEs	SAS	-
Sekundäre Wirksamkeits-Endpunkte:		
• Schwere COVID-19	EAS	PPE
• Asymptomatische Infektionen (Serokonversion gegen das N-Protein)	EASS	
• COVID-19 bei Probanden ≥ 61 Lebensjahre	EAS (Probanden ≥ 61 Lebensjahre)	PPE (Probanden ≥ 61 Lebensjahre)
• Alle SARS-CoV-2-Infektionen (RT-PCR positiv)	EAS	PPE
• COVID-19 nach der ersten Dosis	SAS (naïve Probanden)	-
Sekundäre Immunogenitäts-Endpunkte:		
• Antikörperantworten auf die RBD des Spike (S) -Proteins von SARS-CoV-2	PPI	-
• SARS-CoV-2-Virus-neutralisierende Antikörper	PPI	-
Sicherheits-Endpunkte:		
• Abgefragte AEs	SASsol	-
• Nicht abgefragte AEs	SAS 2	-
• AE, das zum Absetzen der Vakzine führt	SAS	-
Explorative Wirksamkeits-Endpunkte:		
• Schweregrad von COVID-19	EAS	-
• Zusätzliche Sauerstoffzufuhr, Hospitalisierung, maschinelle Beatmung, Tod	EAS	SAS
• COVID-19 nach der ersten Dosis	SAS	-
• Zweite Episode von COVID-19	EAS	-
Explorative Immunogenitäts-Endpunkte:		
• spezifische T-Zell-Antwort auf die RBD des S- Proteins nach Antigenstimulation mittels intrazellulärer Zytokinfärbung (ICS) zur Untersuchung der Th1-Antwort und Expression von Th2	PPI	-
• der Anteil der Probanden mit einem detektierbaren Anstieg der spezifischen T-Zell-Antwort auf die RBD des S-Proteins von SARS-CoV-2	PPI	-

10.3 Statistische Analysen

10.3.1 Allgemeine Überlegungen

[1089] Es sind fünf Analysen geplant: 2 Interimanalysen (bei Erreichen von 56/111 Fällen); die Endanalyse (bei Erreichen von 185 Fällen); die 1-Jahres-Follow-up-Analyse (an allen Daten bis zur Visite an Tag 393); und die 2-Jahres-Follow-up-Analyse (an allen Daten bis zum Ende der Verlängerungsstudie). Ein SAP für die Interim- und Endanalysen wird spätestens vor dem Schließen der Datenbank erstellt und fertiggestellt. Dieses Dokument wird weitere Details bezüglich der Definition der Analysevariablen und der Analysemethodik enthalten, um alle Studienziele und den Umgang mit fehlenden Daten zu berücksichtigen. Alle Analysen, die für die Endanalyse geplant sind, werden für die 1-Jahres-Follow-up- und 2-Jahres-Follow-up-Analysen neu erstellt.

10.3.2 Demografische Merkmale, medizinische Vorgeschichte und andere Ausgangsmerkmale

[1090] Die Daten werden im Hinblick auf demografische und Baseline-Merkmale (z.B. Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht), medizinische Vorgeschichte, Baseline-Immunstatus und alle Sicherheitsmessungen unter Verwendung von deskriptiven Statistiken (quantitative Daten) und Kontingenztabellen (qualitative Daten) insgesamt, nach Vakzingruppe und nach Altersgruppe und Vakzingruppe zusammengefasst.

10.3.3 Verabreichung der Studienvakzine

[1091] Die Verabreichungen von CVnCoV oder der Kontrolle werden aufgelistet, und die Anzahl der Probanden, die die Vakzinierungsdosen tatsächlich erhalten haben, wird nach Vakzingruppen zusammengefasst.

10.3.4 Begleitende Medikation und Vakzinierungen

[1092] Begleitende Medikation/Vakzinierungen nach Beginn der Studie werden aufgelistet und nach anatomischen, therapeutischen, chemischem Begriffen, insgesamt und nach Vakzingruppe, zusammengefasst.

10.3.5 Wirksamkeitsanalysen

10.3.5.1 Co-Primäre Wirksamkeitsendpunkt-Analyse

Primäre Wirksamkeitsanalyse

[1093] In der primären Wirksamkeitsanalyse wird die VE, definiert als die prozentuale Reduktion der Häufigkeit von irgendwelchen und moderaten bis schweren COVID-19-Fällen (gemäß der primären Falldefinition) bei vakzinierten Probanden im Vergleich zu Probanden, die Placebo erhielten, mit exaktem 95%*-CI wie folgt berechnet:

$$VE = 1 - RR = 1 - (ARV/ARP) = 1 - \{p/r(1-p)\}$$

wobei
ARV = Attack-Rate in der vakzinierten Gruppe = nv/Nv = Anzahl der Probanden, die mindestens eine COVID-19-Episode in der CVnCoV-Gruppe berichten / gesamte Nachbeobachtungszeit der evaluierbaren Probanden in der CVnCoV-Gruppe (Anzahl der Personenmonate).
ARP = Attack-Rate in der Placebogruppe = np/Np = Anzahl der Probanden, die mindestens eine COVID-19-Episode in der Placebogruppe berichten / gesamte Nachbeobachtungszeit der evaluierbaren Probanden in der Placebogruppe (Anzahl Personenmonate).
RR = relatives Risiko = ARV/ARP
p = Anteil der COVID-19-Fälle (gemäß primärer Falldefinition) aus der CVnCoV-Gruppe an allen Fällen = nv/(nv+np).
r = Verhältnis der gesamten Nachbeobachtungszeit der evaluierbaren Probanden in der CVnCoV-Gruppe zur gesamten Nachbeobachtungszeit der evaluierbaren Probanden in der Placebogruppe = Nv/Np.
*Der CI-Wert kann aufgrund des sequenziellen Designs leicht angepasst sein (siehe Abschnitt 10.3.8).

[1094] Die statistischen Hypothesen für die co-primären Wirksamkeitsendpunkte sind:

$H0A: VE \leq 30\%$ versus $H1A: VE > 30\%$

und

$H0S: VE \leq 20\%$ versus $H1S: VE > 20\%$

A bezieht sich auf COVID-19-Fälle jeglichen Schweregrades;
S bezieht sich auf moderate bis schwere Fälle von COVID-19;

[1095] Die Studie ist erfolgreich, wenn entweder die untere Grenze (LL) des exakten 2-seitigen 97,5%-CI (leicht anzupassen, um das sequenzielle Design zu berücksichtigen) des VE-Endpunkts > 30% für alle COVID-1 9-Fälle jeglichen Schweregrads ist oder wenn die untere Grenze (LL) des exakten 2-seitigen 97,5%-CI des VE-Endpunkts > 20% für schwere bis moderate COVID-19-Fälle ist. Wenn die 2 Interimanalysen und die Endanalyse für COVID-19-Fälle jeglichen Schweregrades durchgeführt werden, nachdem 56/111 bzw. 185 Fälle berichtet wurden, wird das 1-seitige α-Risiko, das zum Zeitpunkt der Endanalyse

gemäß der Error-Spending-Funktion vom O'Brien-Fleming-Typ zu berücksichtigen ist, 0,01209 sein, und die Wirksamkeit wird bei der Endanalyse nachgewiesen, wenn 60 Fälle oder weniger von 185 in der CVnCoV-Gruppe vorliegen (beobachtete VE ≥ 52,0%); und 0,025 für die Endanalyse für Fälle von moderater bis schwerer COVID-19, und die Wirksamkeit wird nachgewiesen, wenn 17 Fälle oder weniger von 60 in der CVnCoV-Gruppe vorliegen (beobachtete VE ≥ 60,5%). Zu beachten ist, dass die Regel hinsichtlich der Aufteilung der Fälle zum Nachweis der Wirksamkeit leicht abweichen kann, wenn r ≠ 1 (Gesamtnachbeobachtungszeit in beiden Gruppen unterschiedlich).

Sensitivitätsanalyse

[1096] Als zentrale Sensitivitätsanalyse wird die Zeit bis zum ersten Auftreten von virologisch bestätigten COVID 19-Fällen (entsprechend der primären Falldefinition) analysiert.

[1097] Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen die geschätzten Wahrscheinlichkeiten, nicht an COVID 19 zu erkranken, und es wird ein Log-Rank-Test durchgeführt.

[1098] Die Zeit bis zum ersten Auftreten von virologisch bestätigtem COVID-19 (Datum des Auftretens der Symptome) wird 15 Tage nach der zweiten Vakzinierung beginnen.

[1099] Probanden, die keine COVID-19 entwickeln, werden zum Zeitpunkt der Beendigung der Studie oder des Stichtags für die Analyse, je nachdem, was zuerst eintritt, begutachtet.

[1100] Eine zusätzliche Sensitivitätsanalyse kann ein Coxsches Regressionsmodell beinhalten, das für relevante, im SAP spezifizierte Baseline-Kovariaten angepasst wird.

[1101] Weitere Details zu den Analysemethoden werden im SAP beschrieben.

10.3.5.2 Sekundäre Wirksamkeitsendpunkt-Analysen

[1102] Die statistische Prüfung der 2 wichtigsten sekundären Wirksamkeitsendpunkte wird nach dem Verfahren der bedingten hierarchischen Prüfung unter Verwendung der in den Abschnitten zu den Zielen/Endpunkten festgelegten Reihenfolge durchgeführt. Daraus folgt:

- Die Wirksamkeit von CVnCoV in Bezug auf schwere Fälle wird nur dann nachgewiesen, wenn das primäre Wirksamkeitsziel erfolgreich nachgewiesen ist.
- Die Wirksamkeit von CVnCoV in Bezug auf asymptomatische Infektionen wird nur dann nachgewiesen, wenn das primäre Wirksamkeitsziel und das sekundäre Ziel an schweren Fällen erfolgreich nachgewiesen ist.

[1103] Andernfalls werden diese Endpunkte als explorative Endpunkte ohne Prüfung der Erfolgskriterien analysiert.

[1104] Zur Beurteilung der Wirksamkeit bei der Prävention von schweren Erkrankungen und asymptomatischen Infektionen werden ähnliche Analysen wie beim primären Wirksamkeitsendpunkt durchgeführt. Die Wirksamkeit wird nachgewiesen, wenn die LL des exakten 2-seitigen 95%-CI der VE über 10% für schwere Erkrankungen und über 0% für asymptomatische Infektionen liegt.

[1105] Andere sekundäre Wirksamkeitsendpunkte werden ähnlich wie der primäre Wirksamkeitsendpunkt analysiert, aber es wird keine formale Untersuchung für diese Endpunkte durchgeführt. Für die Wirksamkeit nach der ersten Dosis wird die Zeit bis zum ersten Auftreten von virologisch bestätigtem COVID-19 (Datum des Symptombeginns) nach der ersten Vakzinierung angesetzt. Die BoD wird mit 2 verschiedenen Scoring-Systemen ausgewertet. Beide BoD-Scoring-Systeme legen mehr Gewicht auf die Wirksamkeit gegen eine schwere COVID-19-Erkrankung oder eine schwere Erkrankung, die sich in einer Hospitalisierung oder Tod widerspiegelt. Zusätzlich werden VE und zugehöriges CI für jede der BoD-Kategorien berechnet.

10.3.5.3 Explorative Wirksamkeitsendpunkt-Analysen

[1106] Die Anteile der leichten und schweren COVID-19-Fälle (gemäß der primären Falldefinition) unter allen Fällen werden nach Gruppen zusammengefasst.

[1107] Die Beschreibung von Häufigkeiten und Prozentsätzen wird nach Gruppen für Probanden erfolgen, die:

- zusätzliche Sauerstoffzufuhr aufgrund von COVID-19 benötigen.
- aufgrund von COVID-19 mechanisch beatmet werden müssen.
- aufgrund von COVID-19 hospitalisiert sind.
- aufgrund von COVID-19 gestorben sind.
- aus irgendeinem Grund sterben.

[1108] Dies erfolgt für Ereignisse, die ≥ 15 Tage nach der zweiten Studienvakzinierung auftreten (volle VE) und dann für Ereignisse, die zu irgendeinem Zeitpunkt nach der ersten Studienvakzinierung auftreten.

[1109] Die VE bei der Prävention von ersten Episoden virologisch bestätigter Fälle von COVID-19 jeglichen Schweregrades wird bei allen Probanden, unabhängig von ihrem serologischen Status zu Studienbeginn, für Fälle, die ≥ 15 Tage nach der zweiten Studienvakzinierung auftreten, und dann für alle Fälle, die nach der ersten Dosis auftreten, neu bewertet.

[1110] Schließlich werden die Anzahl und der Prozentsatz der Probanden, die eine zweite Episode von COVID-19 entwickelten, nach Gruppen dargestellt.

10.3.6 Sekundäre und explorative Immunogenitätsanalyse

[1111] Es werden keine formalen Hypothesen zur Immunogenität getestet. Deskriptive Statistiken für die Immunogenitätsendpunkte werden für jede Vakzingruppe und insgesamt, sowie nach Vakzingruppe und Altersgruppen dargestellt. Die Daten werden nach jeder Vakzindosis dargestellt.

[1112] Die folgenden Analysen werden für die Antikörperspiegel gegen die RBD des S-Proteins von SARS-CoV-2 und für die neutralisierenden Antikörper insgesamt und separat bei Probanden, die zu Beginn der Studie seronegativ waren, und bei Probanden, die zu Beginn der Studie seropositiv waren, durchgeführt:

- Geometrische mittlere Titer (GMTs) werden mit ihrem 95%-CI zu jedem Blutentnahmezeitpunkt zusammengefasst.
- Die -fache Änderung (Fold Change, FC) vom Ausgangswert (Baseline) wird für jeden Probanden berechnet und der geometrische Mittelwert der FC (GMFC) wird mit dem jeweiligen 95%-CI zu jedem Blutentnahmezeitpunkt nach Studienbeginn präsentiert.

[1113] Nicht nachweisbare Antikörper werden für die GMT- und GMFC-Berechnungen willkürlich durch die Hälfte der Nachweisgrenze (Cut-off) ersetzt.

[1114] Für jeden Messwert werden die Anzahl und der Prozentsatz von Probanden, die zu Studienbeginn SARS-Cov-2-seronegativ waren und bei denen eine Serokonversion beobachtet wurde, zusammengefasst und zu jedem Blutentnahmezeitpunkt nach Studienbeginn mit exaktem 95%-CI dargestellt. Serokonversion ist definiert als nachweisbare Antikörper im Serum.

[1115] Der Prozentsatz der Probanden, die eine Serokonversion für Antikörper gegen die RBD des S-Proteins von SARS-Cov-2 und SARS-Cov-2 neutralisierende Antikörper aufweisen, wird zusammengefasst. Die Häufigkeit der durch die Vakzine induzierten Immunzellpopulationen wird zusammenfassend dargestellt. Eine weitere Charakterisierung der T-Zell-Immunantwort kann mit anderen Technologien, wie zum Beispiel ELISpot, CyTOF und/oder der Analyse von genomischen Biomarkern, durchgeführt werden.

[1116] Zusätzliche Immunogenitätsanalysen, einschließlich Grafiken, werden im SAP beschrieben, falls geeignet.

10.3.7 Sicherheitsanalyse

[1117] Es ist keine formale statistische Prüfung der Sicherheitsdaten geplant.

[1118] Die deskriptiven Sicherheitsanalysen werden insgesamt, nach Vakzingruppe und nach Altersgruppe und Vakzingruppe durchgeführt.

[1119] Die folgenden Analysen werden insgesamt und separat bei Probanden, die zu Studienbeginn seronegativ waren, und bei Probanden, die zu Studienbeginn seropositiv waren, für SARS-CoV-2-N-Protein-Antikörperspiegel durchgeführt:

Abgefragte AEs: Die Häufigkeit und der Prozentsatz der Probanden, die innerhalb von 7 Tagen nach jeder Vakzinierung jedes lokale und systemische AE aufwiesen, werden nach Intensität und insgesamt dargestellt. Bei Probanden mit mehr als einer Episode des gleichen AE innerhalb von 7 Tagen nach einer Vakzinierung wird die maximale Intensität für die Tabellierung verwendet. Ähnliche Tabellierungen werden für abgefragte systemische AEs nach Beziehung zur Studienvakzinierung durchgeführt. Abgefragte lokale AEs werden per Definition als im Zusammenhang mit der Studienvakzine stehend betrachtet. Die Zeit bis zum Auftreten (in Tagen) und die Dauer (in Tagen) werden ebenfalls für jedes abgefragte lokale und systemische AE zusammengefasst. Zusammenfassende Tabellen, die das Auftreten von mindestens einem lokalen oder systemischen AE innerhalb von 7 Tagen nach jeder Vakzinierung zeigen, werden ebenfalls dargestellt.

[1120] Nicht abgefragte AEs: Nicht abgefragte AEs, einschließlich SAEs und AESIs, werden unter Verwendung des Medizinischen Wörterbuchs für Aktivitäten im Rahmen der Arzneimittelzulassung („Medical Dictionary for Regulatory Activities“; MedDRA) nach Systemorganklasse (SOC) und bevorzugter Bezeichnung („Preferred Term“, PT) kodiert.

[1121] Die Häufigkeit und der Prozentsatz der Probanden, die jedes nicht abgefragte AE innerhalb von 28 Tagen nach jeder Vakzinierung und insgesamt melden, werden auf SOC- und PT-Ebene tabellarisch dargestellt.

[1122] Ähnliche Tabellen werden erstellt für: damit zusammenhängende nicht abgefragte AEs, nicht abgefragte AEs vom Grad 3 oder höher, medizinisch betreute AEs, die innerhalb von 6 Monaten nach der zweiten Studienvakzinierung auftreten, SAEs, damit zusammenhängende SAEs, AESIs, damit zusammenhängende AESIs, AEs, die zum Ausscluss oder Abbruch der Studie führen und SAEs, die zum Tod führen, innerhalb eines Jahres nach der zweiten Studienvakzinierung.

[1123] Wenn ein AE mehr als einmal bei einem Probanden innerhalb von 28 Tagen nach der ersten Vakzinierung auftritt, wird der maximale Schweregrad und der stärkste Zusammenhang mit der Vakzingruppe gezählt.

[1124] Nur AEs nach der ersten Vakzinierung werden in den Übersichtstabellen berücksichtigt. AEs, die vor der ersten Vakzinierung begannen, werden als medizinische Vorgeschichte erfasst. Datenauflistungen von Todesfällen und SAEs werden pro Proband zur Verfügung gestellt.

[1125] Die Vitalparameter werden bei jeder Visite mittels deskriptiver Statistik zusammengefasst, einschließlich der Veränderung gegenüber dem Ausgangswert, und es wird eine Auflistung erstellt.

10.3.8 Interimanalyse

[1126] Für diese Studie werden zwei Interimanalysen von einem unverblindeten, unabhängigen Statistiker durchgeführt und vom DSMB überprüft, wenn 56/111 Fälle von COVID-19 jeglichen Schweregrades (die die co-primäre Wirksamkeitsfalldefinition erfüllen) beobachtet werden. Diese Analyse wird darauf abzielen, eine frühe hohe Wirksamkeit oder Futilität am primären Wirksamkeitsendpunkt zu bewerten, und wird nur an der EAS-Population durchgeführt. Die Sicherheitsdaten, die zu diesem Zeitpunkt verfügbar sind, werden ebenfalls beschrieben.

[1127] Für die Analyse des frühen Nachweises von hoher Wirksamkeit oder Futilität wird die kumulative Error-Spending-Funktion vom O'Brien-Fleming-Typ (Lan et al. 1983) verwendet, um statistische Stoppregeln für hohe Wirksamkeit (α-Grenzen) und Futilität (β-Grenzen) für die Interimanalyse bereitzustellen, basierend auf den bis zu dieser spezifischen Interimsphase angesammelten Informationen.

[1128] Wenn in der Interimsphase der p-Wert für den Test des primären Ziels kleiner als die α-Grenze ist, wird eine hohe Wirksamkeit für CVnCoV erklärt. Umgekehrt wird der Nachweis der Futilität erfolgen, wenn der p-Wert höher als die β-Grenze ist.

[1129] Die Interimanalysen sind geplant, wenn 56/11 Fälle von COVID-19 jeglichen Schweregrades beobachtet wurden. Die folgende Tabelle 19 zeigt die Grenzen für den Nachweis einer hohen Wirksamkeit oder

Futilität, berechnet auf einer 1-seitigen p-Wert-Skala unter Verwendung der kumulativen Error-Spending-Funktion.

Tabelle 19: Zweistufiges gruppensequentiellesDesign mit Interimanalvsenbei 56 und 111 Fällen und Endanalyse bei 185 Fällen

	Interimanalyse 1	**Interimanalyse 2**	**Interimanalyse**
Anzahl der Fälle	56	111	185
Wirksamkeit α-Grenze auf der p-Wert-Skala (1-seitig)	0,00001	0,00126	0,01209
Futilität β-Grenze auf der p-Wert-Skala (1-seitig)	0,73596	0,15716	NA
Wirksamkeits-Erfolgskriterien*	Erfolg, wenn ≤ 7 Fälle in der CVnCoV-Gruppe von 56 Fällen (beobachtete VE ≥ 85,7%)	Erfolg, wenn ≤ 29 Fälle in der CVnCoV-Gruppe von 111 Fälle (beobachtete VnE > 64,6%)	Erfolg, wenn ≤ 60 Fälle in der CVnCoV-Gruppe von 185 Fällen (beobachtete VE ≥ 52, 0%)
Futilität*	Futilität, wenn ≥ 26 Fälle in der CVnCoV-Gruppe von 56 Fällen (beobachtete VE ≤ 13,3%)	Futilität wenn ≥ 41 Fälle in der CVnCoV-Gruppe von 111 Fällen (beobachtete VE ≤ 41,4%)	NA

*Die Regeln in Bezug auf die Aufteilung der Fälle zum Nachweis der Wirksamkeit/Futilität können leicht abweichen, wenn die Gesamtzahl der evaluierbaren Probanden in beiden Gruppen ungleich ist (r ≠ 1).

[1130] Wenn die Interimanalyse durchgeführt wird, nachdem genau 56/111 Fälle berichtet wurden, führt ein 1-seitiger p-Wert kleiner als 0,00001/0,00126 (d.h. untere Grenze des 2-seitigen 99,99%/99,99%-CI > 30%) zum Ergebnis einer hohen Wirksamkeit, während ein 1-seitiger p-Wert größer als 0,73596/0,15716 zum Ergebnis der Futilität führt. Andernfalls wird die Endanalyse bei 185 Fällen durchgeführt. Wenn die Anzahl der evaluierbaren Probanden in beiden Gruppen gleich ist, bedeutet dies, dass die Studie mit dem Ergebnis einer frühen hohen Wirksamkeit abgeschlossen wird, wenn 7/29 Fälle oder weniger von 56/111 aus der CVnCoV-Gruppe stammen, während die Futilität der Studie nachgewiesen wird, wenn 26/41 Fälle oder mehr aus der CVnCoV-Gruppe stammen.

[1131] Zu beachten ist, dass die tatsächlichen Grenzen, die für die Entscheidungsfindung verwendet werden, von der genauen Anzahl der Fälle abhängen, die bei jeder Analyse (Interim- und Abschlussanalyse) auftreten und berichtet werden.

[1132] Die Grenzen werden unverbindlich angewandt, da es viele andere Faktoren gibt, die Teil des Entscheidungsprozesses sein können.

10.3.9 Fehlende Daten und Abbruch

[1133] Die Analyse der Vakzinierungsvariablen wird auf der Basis valider Fälle durchgeführt, d.h. für fehlende Beobachtungen wird keine Imputation für fehlende Daten, wie z.B. die letzte fortgesetzte Beobachtung, angewendet.

[1134] Für Antikörper gegen die RBD des S-Proteins von SARS-CoV-2 werden Konzentrationswerte, die als unterhalb der unteren Quantifizierungsgrenze (LLOQ) gekennzeichnet sind, auf 0,5*LLOQ gesetzt.

[1135] Für alle Analysen wird keine Imputation fehlender Werte durchgeführt (außer der Imputation für fehlende Teildaten von AEs und Begleitmedikation, wie im SAP angegeben).

[1136] Derzeit ist kein Ersetzen von ausgeschiedenen Probanden vorgesehen.

Beispiel 14: Vakzinierung von Ratten mit mRNA, die für das SARS-CoV-2-Antigen S stab kodiert, formuliert in LNPs

[1137] Das vorliegende Beispiel zeigt, dass SARS-CoV-2-S-mRNA-Vakzine mit mRNA, die alternative Formen des 3'-Endes (A64-N5-C30-hSL-N5 oder hSL-A100) und UTR-Kombinationen (i-3 (/muag) oder a-1 (HSD17B4/PSMB3)) umfassen, eine starke humorale wie auch zelluläre Immunantwort bei Ratten induzieren. Die mRNA, die für SARS-CoV-2 S_stab kodiert, umfassend hSL-A100 und die UTR-Kombination a-1 (HSD17B4/PSMB3), zeigt eine stärkere und sehr frühe Induktion von Immunantworten, was sich durch eine stärkere Induktion von bindenden und neutralisierenden Antikörpern bereits nach einer ersten Vakzinierung zeigt.

Herstellung der LNP-formulierten mRNA-Vakzine:

[1138] SARS-CoV-2-S-mRNA-Konstrukte wurden wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt (RNA-invitro-Transkription). HPLC-gereinigte mRNA wurde mit LNPs gemäß Beispiel 1.4 formuliert, bevor sie in In-vivo-Vakzinierungsexperimenten eingesetzt wurde.

Immunisierung:

[1139] Ratten wurden intramuskulär (i.m.) mRNA-Vakzinzusammensetzungen und Dosen wie in Tabelle 20 angegeben injiziert. Als Negativkontrolle wurde eine Gruppe von Ratten mit Puffer vakziniert (Gruppe A). Alle Tiere wurden an Tag 0 und Tag 21 vakziniert. Blutproben wurden an Tag 14, Tag 21 (post prime) und 42 (post boost) für die Bestimmung der Antikörpertiter entnommen.

Tabelle 20: Vakzinierungsschema (Beispiel 14):

Gruppe	**VakzinZusammensetzung**	**mRNA ID**	**CDS opt.**	**5'-UTR/ 3'-UTR; UTR-Design**	**3'-Ende**	**SEQ ID NO: Protein**	**SEQ ID NO: RNA**	**Dosis**
	Puffer	-	-			-	-	-
A	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9515	optl	-/muag;	A64-N5-C30-hSL-N5	10	163	0,5 µg
B	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9515	optl	-/muag;	A64-N5-C30-hSL-N5	10	163	2 µg
C	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9515	opt1	-/muag;	A64-N5-C30-hSL-N5	10	163	8 µg
D	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9515	opt1	-/muag;	A64-N5-C30-hSL-N5	10	163	20 µg
E	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9515	opt1	-/muag;	A64-N5-C30-hSL-N5	10	163	40 µg
F	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9709	opt1	HSD17B 4/ PSMB3	hSL-A100	10	149	0,5 µg
G	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9709	opt1	HSD17B 4/ PSMB3	hSL-A100	10	149	2 µg
H	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9709	opt1	HSD17B 4/ PSMB3	hSL-A100	10	149	8 µg

Gruppe	VakzinZusammen-setzung	mRNA ID	CDS opt.	5'-UTR/ 3'-UTR; UTR-Design	3'-Ende	SEQ ID NO: Protein	SEQ ID NO: RNA	Dosis
I	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9709	opt1	HSD17B 4/ PSMB3	hSL-A100	10	149	20 µg
J	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9709	opt1	HSD17B 4/ PSMB3	hSL-A100	10	149	40 µg

Bestimmung der IgG1- und IgG2-Antikörpertiter mittels ELISA:

[1140] Der ELISA wurde wie zuvor in Beispiel 12 beschrieben durchgeführt.

Bestimmung der Virus-neutralisierenden Antikörpertiter (VNT)

[1141] Die Virus-neutralisierenden Antikörpertiter (VNT) der Ratten-Serumproben wurden wie zuvor in Beispiel 6 mit Mausserum beschrieben analysiert.

Ergebnisse:

[1142] Wie in **Fig. 16 A** gezeigt, induzierte die Vakzinierung mit Volllängen-mRNA des stabilisierten S-Proteins, umfassend die nicht-kodierende Region mit dem 3'-Ende hSL-A100 und die UTR-Kombination a-1 (HSD17B4/PSMB3), formuliert in LNPs (R9709), bei Ratten robuste und dosisabhängige Niveaus von bindenden Antikörpertitern (dargestellt durch IgG1- und IgG2a-Endpunkttiter) an Tag 14 und Tag 21 bereits nach einer ersten Vakzinierung mit Dosen von 0,5 µg, 2 µg, 8 µg, 20 µg und 40 µg. Die Vakzinierung mit Volllängen-mRNA des stabilisierten S-Proteins, umfassend die nicht-kodierende Region mit dem 3'-Ende A64-N5-C30-hSL-N5 und die UTR-Kombination i-3 (-/muag;), formuliert in LNPs (R9515, CVnCov), induzierte bei den Ratten dosisabhängige Niveaus bindender Antikörpertiter (dargestellt durch IgG1 - und IgG2a-Endpunkttiter) an Tag 14 und Tag 21 bereits nach einer ersten Vakzinierung unter Verwendung der höheren Dosen (8 µg, 20 µg und 40 µg).

[1143] Wie in **Fig. 16 B** gezeigt, induzierte die Vakzinierung mit mRNA, umfassend die nicht-kodierende Region mit dem 3'-Ende hSL-A100 und die UTR-Kombination a-1 (HSD17B4/PSMB3), die für ein stabilisiertes Volllängen-S-Protein kodiert, formuliert in LNPs (R9709), bei Ratten dosisabhängige und sehr hohe VNT-Titer bereits nach 14 Tagen nach einer ersten Vakzinierung mit einer Dosis von mindestens 2 µg.

[1144] Wie in **Fig. 16 C** gezeigt, induziert die Vakzinierung mit beiden mRNA-Vakzinformaten, die für das stabilisierte Volllängen-S-Protein kodieren, formuliert in LNPs, dosisabhängig starke VNTs. Die Induktion von VNTs mit mRNA, die für SARS-CoV-2-S_stab, umfassend hSL-A100 und die UTR-Kombination a-1 (HSD1 7B4/PSMB3), kodiert, zeigt eine stärkere und sehr robuste Induktion von sehr hohen neutralisierenden Antikörpertitern selbst bei einer Dosis von nur 2 µg, verglichen mit mRNA, die für SARS-CoV-2-S_stab, umfassend A64-N5-C30-hSL-N5 und die UTR-Kombination i-3 (-/muag), kodiert. Der Titer der neutralisierenden Antikörper, die durch die mRNA R9709 umfassende Vakzinzusammensetzung hervorgerufen wurden, konnte durch die zweite Vakzinierung weiter deutlich erhöht werden.

[1145] Die Stärke der R9709 umfassenden Vakzinzusammensetzung kann ein Immunisierungsprotokoll für die Behandlung oder Prophylaxe eines Individuums gegen ein Coronavirus, vorzugsweise SARS-CoV-2-Coronavirus, unterstützen, das nur eine einzige Dosis der Zusammensetzung oder der Vakzine umfasst.

Beispiel 15: Vakzinierung von NHP mit mRNA kodierend für das SARS-CoV-2-Antigen S stab, formuliert in LNPs und Challenge

[1146] Die schützende Wirksamkeit von mRNA kodierend für S_stab formuliert in LNPs (CVnCoV) wurde in einem Rhesusaffen-SARS-CoV-2-Challenge-Modell untersucht. Nicht-humane Primaten entwickeln nach einer Infektion mit SARS-CoV-2 eine milde klinische Erkrankung mit hoher Virusreplikation sowohl in den oberen als auch in den unteren Atemwegen und pathologischen Veränderungen, die auf eine virale Pneumo-

nie hinweisen (Munoz-Fontela et al., 2020). Die Ergebnisse zeigten, dass CVnCoV eine protektive Wirkung gegen eine Challenge mit 5 × 10^6 PFU über die intra-nasalen (IN) und intra-trachealen (IT) Wege in einem NHP-in-vivo-Modell von COVID-19 hatte. Zu den protektiven Endpunkten gehören neben dem Schutz vor Lungenpathologie auch eine signifikant reduzierte Viruslast.

Herstellung einer LNP-formulierten mRNA-Vakzine:

[1147] Das SARS-CoV-2 S mRNA-Konstrukt wurde wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt (RNA-invitro-Transkription). HPLC-gereinigte mRNA wurde mit LNPs gemäß Beispiel 1.4 formuliert, bevor sie in ln-vivo-Vakzinierungsexperimenten verwendet wurde.

Immunisierung und Challenge:

[1148] Achtzehn Rhesusmakaken (Macaca mulatta) indischer Herkunft wurden in drei Sechser-Gruppen aufgeteilt, die jeweils drei männliche und drei weibliche Tiere umfassten (mit einem Gewicht von > 4,5 kg und einem Alter von 3-6 Jahren). Die Tiere wurden zweimal mit entweder 0,5 µg oder 8 µg LNP-formulierter mRNA kodierend für das SARS-CoV-2-Antigen S_stab (SARS-CoV-2 S-2P (CVnCoV)) vakziniert oder blieben nicht vakziniert, bevor sie vier Wochen nach der zweiten Vakzinierung mit SARS-CoV-2 vom Wildtyp herausgefordert wurden (siehe **Fig. 17 A**). Den Tieren wurde die mRNA-Vakzinzusammensetzung intramuskulär (i.m.) in den Bizepsmuskel des Oberarms injiziert, in einem Volumen von 0,5 ml und in den in Tabelle 21 angegebenen Dosierungen. Als Negativkontrolle wurde eine Gruppe von NHPs vor der Challenge nicht behandelt/nicht vakziniert (Gruppe A). Blutproben wurden am Tag 0, 14, 28 (nach der ersten Vakzinierung), am Tag 42 und 56 (nach der zweiten Vakzinierung) und am Tag 1, 3, 5, 7 nach der Challenge zur Bestimmung der Antikörpertiter entnommen. Die Tiere wurden am Tag 56 intranasal mit einer Dosis von 5,0 × 10^6 PFU SARS-CoV-2 herausgefordert, indem 2 ml der Viruspräparation mit Hilfe eines Bronchoskops in den präkarinalen Abschnitt der Luftröhre appliziert wurden und anschließend 1 ml intranasal appliziert wurde (0,5 ml/Nasenöffnung). Zwei Tiere jeder Gruppe wurden für 6, 7 oder 8 Tage nach der Challenge (p.c.) beobachtet und am Tag 62, 63 oder 63 des Experiments euthanasiert.

Tabelle 21: Vakzinierungsschema (Beispiel 15):

Gruppe	**VakzinZusammensetzung**	**mRNA ID**	**Dosis**	**Vakzinierung**	**CDS opt.**	**SEQ ID NO: Protein**	**SEQ ID NO: RNA**
A	mRNA kodierend S_stab, formuliert in LNPs (CVnCoV)	R9515	0,5 µg	d0, d28	optl	10	163
B	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs (CVnCoV)	R9515	8 µg	d0, d28	opt1	10	163
C	nicht vakziniert						

IgG ELISA

[1149] Einetrimere und stabilisierte Version des Volllängen-SARS-CoV-2-Spike-Proteins wurde von Lake Pharma geliefert (#46328). Rekombinante SARS-CoV-2-Rezeptor-Bindungs-Domäne (319-541) Myc-His wurde von MassBiologics entwickelt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Spezifische IgG-Antworten auf rekombinantes SARS-CoV-2-Spike und RBD wurden mittels ELISA bestimmt. High-Binding-96-Well-Platten (Nunc Maxisorp, 442404) wurden mit 50 µl pro Well von 2 µg/ml Spike-Trimer oder Spike-RBD in 1 × PBS (Gibco) beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die ELISA-Platten wurden gewaschen und mit 5% Fötalem Rinderserum (FBS, Sigma, F9665) in 1 × PBS/0,1% Tween 20 für 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Das von den Tieren nach der Vakzinierung gesammelte Serum hatte eine Anfangsverdünnung von 1/50, gefolgt von 8 zweifachen seriellen Verdünnungen. Die Post-Challenge-Proben wurden in 0,5% Triton inaktiviert und hatten eine Anfangsverdünnung von 1/100, gefolgt von 8 dreifachen seriellen Verdünnungen. Die seriellen Verdünnungen wurden in 10% FBS in 1 × PBS/0,1 % Tween 20 durchgeführt. Nach dem Waschen der Platten wurden 50 µl/Well jeder Serumverdünnung in zweifacher Ausführung auf die mit Antigen beschichtete Platte gegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen wurde Anti-Affen-IgG konjugiert mit HRP (Invitrogen, PA1-84631) in 10% FBS in 1X PBS/0,1% Tween 20 verdünnt (1: 10.000), und es wurden 100 µl/Well zu der Platte gegeben. Die Platten wurden dann für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen wurde 1 mg/ml O-Phenylendiamin-Dihydrochlorid-Lösung

(Sigma P9187) hergestellt, und es wurden100 µl pro Well zugegeben. Die Entwicklung wurde mit 50 µl pro Well 1M Salzsäure (Fisher Chemical, J/4320/15) gestoppt, und die Absorption bei 490 nm wurde auf einem Molecular Devices Versamax-Plattenlesegerät mit Softmax (Version 7.0) abgelesen. Alle Dosis-Wirkungs-Kurven der Testproben wurden in Softmax Pro (Version 7.0) an ein 4PL-Modell angepasst, und der Endpunkttiter bei einer OD von 0,5 (definiert als Kehrwert der Serumverdünnung, die erforderlich ist, um eine Absorptionsantwort von 0,5 zu erhalten) wurde aus jeder Kurve interpoliert. Wenn die Ergebnisse unter der Nachweisgrenze lagen, wurde ihnen ein Wert von 25 für die Post-Immunisierungs-Proben und 50 für die Post-Challenge-Proben zugewiesen. Für niedrige Proben, bei denen die Absorbanz nie einen Wert von 0,5 erreichte, wurde der Titer aus dem extrapolierten Teil der Kurve geschätzt. Der Cut-off-Wert wurde als durchschnittlicher Titer des Serums von naiven Tieren (Tag 0) + 1 Standardabweichung festgelegt. Der Cut-Off-Wert wurde für jedes Antigen separat berechnet.

SARS-CoV-2-Fokusreduktions-Neutralisationstest

[1150] Die Virus-neutralisierenden Titer wurden in hitzeinaktivierten Serumproben (56 °C für 30 min) gemessen. SARS-CoV-2 (Victoria/01/2020, Doherty Institute) in einer Konzentration, die 100 bis 250 Foci pro Well in den Nur-Virus-Kontroll-Wells ergab, wurde 50:50 in 1% FCS MEM mit 1 x Antibiotikum/Antimykotikum (Gibco, 15240-062) mit Serum-Verdoppelungsverdünnungen von 1:20 bis 1:640 (oder höher, abhängig vom Antikörperniveau) in einer 96-Well-V-Bodenplatte gemischt. Die Platte wurde bei 37 °C in einer befeuchteten Box für 1 Stunde inkubiert, damit die Antikörper in der Serumprobe an das Virus binden können. Hundert Mikroliter des Serum/Virus-Gemischs wurden dann auf virusempfängliche Vero/E6-Monolayer in 96-Well-Platten übertragen und für 1 weitere Stunde bei 37 °C in einer verschlossenen, befeuchteten Box inkubiert. Nach der Adsorption wurde das Virus/Antikörper-Gemisch entfernt, und es wurden 100 µl 1% w/v CMC in Komplettmedien als Deckschicht hinzugefügt. Die Box wurde wieder verschlossen und 24 Stunden bei 37 °C inkubiert, bevor die Platte mit 100 µl 20%iger Formalin/PBS-Lösung fixiert und vor der Immunfärbung über Nacht begast wurde. Nach dem Waschen mit Wasser in einem ELISA-Waschgerät (BioTek 405 TSUS) wurde die restliche endogene Peroxidase-Aktivität durch 20-minütige Zugabe von 0,3% Wasserstoffperoxid entfernt. Die Platten wurden dann für 1 Stunde mit primärem/polyklonalem Detektions-SARS-CoV-2-Anti-RBD-Kaninchen-Antikörper (SinoBiologicals; 40592-T62), verdünnt 1: 2.000 in PBS, inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Platten für 1 Stunde mit sekundärem Anti-Kaninchen-HRP-Konjugat-Antikörper (Invitrogen; G-21234), verdünnt 1: 4.000 in PBS, inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Foci mit TrueBlue™ Peroxidase-Substrat (KPL seracare; 5510-0030) visualisiert, danach wurden die Platten mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die Foci wurden mit einem ImmunoSpot S6 Ultra-V-Analysegerät (CTL) unter Verwendung der BioSpot-Software (7.0.28.4 Professional; CTL) gezählt und die Ergebnisse in SoftMax Pro (Molecular Devices; v7.0.3 GxP) ausgewertet. Kurz gesagt wurden die Zähldaten als Prozentsatz der VOC für jede Serumverdünnung ausgedrückt, d.h. als prozentuale Foci-Reduktion, und auf einer logistischen 4-Parameter-Kurve (4PL) aufgetragen. Der Virus-neutralisierende Titer (VNT) wird als Serumverdünnung angegeben, die 50% der Virus-Foci neutralisierte.

[1151] Alternativ wurden die Virus-neutralisierenden Titer wie zuvor in Beispiel 9 beschrieben mit einem SARS-CoV-2-Virus mit der Mutation D614G gemessen.

ELISpot

[1152] Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) wurden aus heparinisiertem Vollblut durch Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, USA) isoliert. Zur Abschätzung der Häufigkeit und der IFNγ-Produktionskapazität von SARS-CoV-2-spezifischen T-Zellen in PBMCs wurde ein IFNγ-ELISpot-Assay unter Verwendung eines human/simian IFNγ-Kits (MabTech, Nacka, Schweden) verwendet. Die Zellen wurden mit 2×10^5 Zellen pro Well untersucht. Die Zellen wurden über Nacht mit SARS-CoV-2-Peptidpools und „Megapools“ des Spike-Proteins (Mimotopes, Australien) stimuliert. Die Peptidsequenz basierte auf GenBank: MN908947.3. Es wurden zehn Peptidpools verwendet, die 15-mer-Peptide umfassten, die sich um 11 Aminosäuren überlappten. Die drei Megapools waren wie folgt zusammengesetzt: Megapool 1 (MP1) umfasste die Peptidpools 1-3, Megapool 2 (MP2) umfasste die Peptidpools 4-6, und Megapool 3 (MP3) umfasste die Peptidpools 7-10. Alle Peptide wurden in einer Endkonzentration von 1,7 µg/ml pro Peptid verwendet. Phorbol-12-Myristat (Sigma-Aldrich Dorset, UK) (100 ng/ml) und Ionomycin (CN Biosciences, Nottingham, UK) (1 mg/ml) wurden als positive Kontrolle verwendet. Die Ergebnisse wurden in Form von Spot-bildenden Einheiten (SFU) pro Million Zellen berechnet. Alle SARS-CoV-2-Peptide und Megapools wurden in doppelter Ausführung getestet, und die nur Medien enthaltenden Wells wurden subtrahiert, um die antigenspezifische SFU zu erhalten. Die ELISpot-Platten wurden mit dem CTL-Scanner und der Software (CTL,

Deutschland) analysiert, und die weitere Analyse wurde mit GraphPad Prism (Version 8.0.1) (GraphPad Software, USA) durchgeführt.

Bronchioalveoläre Lavage (BAL)

[1153] BAL-Waschungen am lebenden Individuum wurden mit 6 ml oder 10 ml PBS unter Verwendung eines Bronchioskops durchgeführt, das in die rechte Seite der Lunge oberhalb der zweiten Bifurkation eingeführt wurde. Postmortale BAL-Waschungen wurden an den rechten Lungenflügeln nach Ligatur des linken Primärbronchus unter Verwendung von 20 ml PBS durchgeführt.

Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

[1154] RNA wurde aus Nasenabstrichen, Rachenabstrichen, EDTA-behandeltem Vollblut, BAL und Gewebeproben (Milz, Niere, Leber, Dickdarm, Zwölffingerdarm, Tonsillen, Luftröhre und Lunge) isoliert. Gewebeproben wurden in RNAprotect (Qiagen) in einem Precellys 24-Homogenisator mit 2,0-ml-CK28-Hard-Tissue-Homogenisierungsröhrchen (Bertin) und 1 ml RLT-Puffer (Qiagen), ergänzt mit 1%(v/v) Beta-Mercaptoethanol, homogenisiert. Das Gewebehomogenat wurde durch einen QIAshredder-Homogenisator (Qiagen) geleitet, und ein Volumen, das 17,5 mg Gewebe entsprach, wurde mit dem BioSprint™96 One-For-All-Vet-Kit (Qiagen) und der Kingfisher Flex-Plattform gemäß den Anweisungen des Herstellers extrahiert. Nicht-Gewebeproben wurden inaktiviert, indem die Proben in AVL-Puffer (Qiagen) gegeben und mit 100% Ethanol versetzt wurden. Die Extraktion dieser Proben wurde mit dem BioSprint™96 One-For-All-Vet-Kit (Qiagen) und der Kingfisher Flex-Plattform gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

[1155] Die quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) wurde mit dem TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG (Applied Biosystems™), dem 2019-nCoV CDC RUO Kit (Integrated DNA Technologies) und dem QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) durchgeführt. Die PCR-Amplikons wurden gegen den in vitro transkribierten RNA-N-Genfragment-Standard quantifiziert. Positiven Proben, die unterhalb der unteren Quantifizierungsgrenze (LLOQ) von 10 Kopien/µl detektiert wurden, wurde der Wert von 5 Kopien/µl zugewiesen, nicht detektierten Proben wurde der Wert von 2,3 Kopien/µl zugewiesen, was der LLOD des Assays entspricht. Für Nasenabstrich-, Rachenabstrich-, BAL- und Blutproben extrahierte Proben entspricht dies einem LLOQ von $1{,}29 \times 10^4$ Kopien/ml und einem LLOD von $2{,}96 \times 10^3$ Kopien/ml. Für Gewebeproben entspricht dies einer LLOQ von $5{,}71 \times 10^4$ Kopien/g und einer LLOD von $1{,}31 \times 10^4$ Kopien/g.

[1156] Subgenomische RT-qPCR wurde auf dem QuantStudio™ 7 Flex Real-Time-PCR-System unter Verwendung des TaqMan™ Fast-Virus-1-Step-Master-Mix (Thermo Fisher Scientific) mit Vorwärtsprimer, Sonde und Rückwärtsprimer in einer Endkonzentration von 250 nM, 125 nM bzw. 500 nM durchgeführt. Die Sequenzen der sgE-Primer und der Sonde waren: 2019-nCoV_sgE-forward 5' CGATCTCTTGTAGATCTGTTCTC 3' (SEQ ID NO: 22729); 2019-nCoV_sgE-revers, 5' ATATTGCAGCAGTACGCACACA 3' (SEQ ID NO: 22730); 2019-nCoV_sgE-Sonde, 5' FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BHQ1 3' (SEQ ID NO: 22731). Die Zyklusbedingungen waren 50 °C für 10 Minuten, 95 °C für 2 Minuten, gefolgt von 45 Zyklen von 95 °C für 10 Sekunden und 60 °C für 30 Sekunden. RT-qPCR-Amplikons wurden gegen einen invitro-transkribierten RNA-Standard des Volllängen-SARS-CoV-2-E-ORF (Zugangsnummer NC_045512.2) quantifiziert, dem die UTR-Leader-Sequenz und die putative E-Gen-Transkriptionsregulationssequenz vorangestellt waren. Positiven Proben, die unterhalb der unteren Quantifizierungsgrenze (LLOQ) detektiert wurden, wurde der Wert von 5 Kopien/µl zugewiesen, während nicht detektierten Proben der Wert von ≤0,9 Kopien/µl zugewiesen wurde, was der unteren Nachweisgrenze (LLOD) des Assays entspricht. Für Nasenabstrich-, Rachenabstrich-, BAL- und Blutproben entnommene Proben entspricht dies einer LLOQ von $1{,}29 \times 10^4$ Kopien/ml und einer LLOD von $1{,}16 \times 10^3$ Kopien/ml. Für Gewebeproben entspricht dies einer LLOQ von $5{,}71 \times 10^4$ Kopien/g und einer LLOD von $5{,}14 \times 10^3$ Kopien/g.

Histopathologie

[1157] Die Gewebeproben aus dem linken kranialen und kaudalen Lungenflügel, der Luftröhre, dem Kehlkopf, den mediastinalen Lymphknoten, den Tonsillen, dem Herz, der Thymusdrüse, der Bauchspeicheldrüse, der Milz, der Leber, der Niere, dem Zwölffingerdarm, dem Dickdarm, dem Gehirn, der Vakzinierungsstelle (Haut einschließlich Subkutis und darunter liegendem Muskel) und den drainierenden Lymphknoten (links und rechts) wurden in 10% neutralgepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. 4 µm dicke Schnitte wurden geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Die Gewebeschnitte wurden unab-

hängig voneinander von zwei Veterinärpathologen, die gegenüber den Behandlungs- und Gruppendetails verblindet waren, gescannt und untersucht.

[1158] Für die Lunge wurden drei Schnitte von jedem linken Lungenlappen an verschiedenen Stellen entnommen: proximal, medial und distal zum primären Lappenbronchus. Ein Scoring-System (Salguero et al., 2020) wurde verwendet, um die in den Lungengewebeschnitten beobachteten histopathologischen Läsionen objektiv zu bewerten. Die Scores für jeden histopathologischen Parameter wurden als Durchschnitt der Scores berechnet, die in den sechs ausgewerteten Lungengewebeschnitten pro Tier beobachtet wurden.

[1159] Zusätzlich wurde RNAscope-in-situ-Hybridisierungstechnik (ISH) verwendet, um das SARS-CoV-2-Virus in beiden Lungenlappen zu identifizieren. Kurz gesagt wurden die Gewebe für 10 Minuten mit Wasserstoffperoxid (RT), für 15 Minuten mit Target Retrieval (98-101°C) und für 30 Minuten mit Protease plus (40 °C) (alle Advanced Cell Diagnostics) vorbehandelt. Eine V-nCoV2019-S-Sonde (Advanced Cell Diagnostics), die auf das S-Protein-Gen abzielt, wurde auf den Geweben für 2 Stunden bei 40 °C inkubiert. Die Amplifikation des Signals erfolgte nach dem RNAscope-Protokoll (RNAscope 2.5 HD Detection Reagent - Red) unter Verwendung des RNAscope 2.5 HD red-Kits (Advanced Cell Diagnostics). Geeignete Kontrollen waren in jedem ISH-Lauf enthalten. Die digitale Bildanalyse wurde mit der Nikon NIS-Ar-Software durchgeführt, um die Gesamtfläche des für virale RNA positiven Lungenabschnitts zu berechnen.

Computertomographie (CT) Radiologie

[1160] CT-Scans wurden von sedierten Tieren mit einem 16-Slice-Lightspeed-CT-Scanner (General Electric Healthcare, Milwaukee, WI, USA) in Bauch- und Rückenlage erstellt. Alle axialen Scans wurden bei 120KVp, mit Auto mA (zwischen 10 und 120) durchgeführt und mit einem kleinen Scan-Sichtfeld erfasst. Die Rotationsgeschwindigkeit betrug 0,8s. Die Bilder wurden als 11-cm-Sichtfeld dargestellt.

[1161] Um eine vollständige Untersuchung des kardialen / pulmonalen Gefäßsystems, der Lymphknoten und des extrapulmonalen Gewebes nach der Challenge zu ermöglichen, wurde Niopam 300 (Bracco, Mailand, Italien), ein nicht-ionisches, iodhaltiges Kontrastmittel, intravenös (IV) in einer Menge von 2 ml/kg Körpergewicht verabreicht, und Scans wurden unmittelbar nach der Injektion und neunzig Sekunden vom Mittelpunkt der Injektion aufgenommen.

[1162] Die Scans wurden auf das Vorhandensein von COVID-Krankheitsmerkmalen: Grundglastrübung (GGO), Konsolidierung, Crazy Paving, Knötchen, perilobuläre Konsolidierung; Verteilung (oberer, mittlerer, unterer, zentraler 2/3, peripherer, bronchiozentrischer Bereich) und auf Lungenembolie ausgewertet. Das Ausmaß der Lungenbeteiligung wurde geschätzt (<25%, 25-50%, 51-75%, 76-100%) und anhand eines für die COVID-Krankheit entwickelten Scoring-Systems quantifiziert.

Ergebnisse

[1163] Die Analyse der Bindungstiter an entweder eine trimere Form des S-Proteins oder die isolierte Rezeptorbindungsdomäne (RBD) zeigte einen geringen Anstieg der Spike- (**Fig. 17B**) und RBD-spezifischen IgG-Titer (**Fig. 17C**) bei den mit 8 µg vakzinierten Tieren nach einer einzigen Vakzinierung. Ein größerer Anstieg wurde bei den IgG-Titern nach der zweiten Vakzinierung am Studientag 42 beobachtet, wo die Tiere signifikante Anstiege mit mittleren Endpunkttitern von $1,6 \times 10^3$ und $3,2 \times 10^3$ für S- bzw. RBD-reaktive Antikörper aufwiesen (**Fig. 17 B** und **Fig. 17 C**). Ein Anstieg der Spike- und RBD-spezifischen IgG-Titer wurde nach der Challenge in dieser Gruppe beobachtet, insbesondere im Serum, das zum Zeitpunkt der Beendigung der Studie gesammelt wurde (Studientage 62, 63 und 64).

[1164] Wie erwartet, wurde in der mit 0,5 µg CVnCoV (gewollt suboptimale Dosis) oder der nicht vakzinierten Kontrollgruppe während der Impfphase kein signifikanter Anstieg der Spike- oder RBD-spezifischen IgG-Antikörper beobachtet. Jedoch wurde bei den mit 0,5 µg CVnCoV vakzinierten Tieren nach der Challenge ein allmählicher Anstieg der Spike- und RBD-spezifischen IgG-Titer zu jedem der Probenahmezeitpunkte beobachtet (**Fig. 17 B** und **Fig. 17 C**). Bei den nicht vakzinierten Kontrollen wurde kein Anstieg der Spike- oder RBD-spezifischen IgG-Titer beobachtet (**Fig. 17 B** und **Fig. 17 C**).

[1165] In Übereinstimmung mit der Induktion von bindenden Antikörpern waren nach der zweiten Vakzinierung in der 8-µg-Gruppe robuste Werte von Virus-neutralisierenden Titern (VNTs) nachweisbar (**Fig. 17 D**). Die VNTs erreichten am Tag 42 mit mittleren Titern von $2,7 \times 10^4$ ihren Höhepunkt. Die Titer der neutralisierenden Antikörper blieben nach der Challenge bis zum Tag 62, 63 und 64 des Experiments relativ unverän-

dert. Tiere in der 0,5-µg-Gruppe und der nicht vakzinierten Kontrollgruppe blieben vor der Challenge negativ, während die SARS-CoV-2-Infektion bei 4/6 bzw. 5/6 Tieren in der 0,5-µg-Gruppe bzw. nicht vakzinierten Gruppe einen geringen Anstieg der Antikörpertiter induzierte. Ähnliche Ergebnisse wurden mit einem SARS-CoV-2-Virus erzielt, das die Mutation D614G aufweist.

[1166] Um die CVnCoV-induzierten zellulären Antworten zu beurteilen, wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs), die zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Vakzinierung und der Challenge isoliert wurden, mit Peptidpools stimuliert, die das SARS-CoV-2-Spike-Protein umfassen. Die IFNγ-Freisetzung der stimulierten Zellen wurde mittels ELISpot gemessen. Die Analyse der Antworten auf die summierten Pools in der Vakzinierungsphase zeigte einen Anstieg an Spike-spezifischem IFN-γ bei mit 8 µg CVnCoV vakzinierten Tieren, zwei Wochen nach der ersten und, ausgeprägter, zwei Wochen nach der zweiten Vakzinierung (**Fig. 18 A** Feld 1). Die Stimulation mit zehn individuellen Pools, die jeweils ca. 140 Aminosäuren des S-Proteins abdecken, zeigte die Induktion von Zellen, die auf Peptide über die gesamte Länge von S reagieren, nach der Vakzinierung mit 8 µg CVnCoV (**Fig. 18 A** Feld 3).

[1167] Bei 0,5 µg CVnCoV oder nicht vakzinierten Tieren gab es in der Vakzinierungsphase keine eindeutigen Antworten (**Fig. 18A** Felder 1, 2 und 4). Eines der weiblichen Tiere in der negativen Kontrollgruppe zeigte eine besonders hohe IFNy-Sekretion nach Stimulation mit Peptidpool 2 (der einen Teil der N-terminalen Domäne (NTD) abdeckt) während des gesamten Experiments und Peptidpool 3 (der einen Teil der NTD und RBD abdeckt) an Tag 56 (d56) (**Fig. 18A** Panel 1 und 4).

[1168] Die Daten zeigen die starke Induktion von S-spezifischen zellulären Antworten in CVnCoV-vakzinierten Tieren. Bei Tieren, die mit 8 µg CVnCoV vakziniert wurden, wurden nach der ersten und zweiten Vakzinierung zunehmend Antworten auf Peptide hervorgerufen, die die gesamte Länge des S-Proteins abdecken. Diese Daten stehen im Einklang mit früheren Daten in Mäusen, die die Fähigkeit von CVnCoV zeigten, hohe S-spezifische $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Zell-Antworten zu induzieren (z.B. Beispiel 6 und 7). Die Erzeugung von robusten T-Zell-Antworten unterstützt vermutlich die Wirksamkeit der Vakzine gegen SARS-CoV-2. Neuere Daten haben gezeigt, dass $CD8^+$-T-Zellen zur Viruskontrolle in einem Rhesusaffenmodell beitragen (McMahan et al., 2020). T-Zell-Antworten auf SARS-CoV-2 sind beim Menschen leicht nachweisbar und könnten eine Rolle beim Langzeitschutz spielen (Grifoni et al., 2020) (Sekine et al., 2020) (Ni et al., 2020).

[1169] Erhöhte Spike-spezifische IFNγ-Antworten waren bei allen Tieren am Tag 62-64 nach der Challenge nachweisbar (**Fig. 18 B** Felder 1-4). Bemerkenswert ist, dass der Anstieg der zellulären Antworten bei Tieren, die mit 8 µg CVnCoV vakziniert wurden, weniger ausgeprägt war als in den anderen Gruppen, was wahrscheinlich auf eine geringere Virusreplikation bei diesen Tieren hinweist (**Fig. 18 B** Feld 3).

[1170] Die Quantifizierung der viralen RNA-Kopien nach einer Challenge-Infektion zeigte eine Verringerung der viralen Replikation im oberen Respirationstrakt bei mit 8 µg CVnCoV vakzinierten Tieren. Wichtig ist, dass diese Vakzindosis in der Lage war, die Lungen der herausgeforderten Tiere zu schützen. Der Schutz zeigte sich sowohl durch nicht nachweisbare Mengen viraler RNA als auch durch reduzierte pathologische Veränderungen nach der Challenge-Infektion im Vergleich zu nicht vakzinierten Tieren. Der bessere Schutz der unteren als der oberen Atemwege in Anwesenheit robuster Immunantworten steht im Einklang mit den Ergebnissen in Hamstern (Beispiel 9) und mit Ergebnissen anderer mRNA-basierter SARS-CoV-2-Vakzine in NHP-Challenge-Modellen (Corbett et al., 2020) (Vogel et al., 2020).

[1171] Das Vorhandensein von SARS-CoV-2-Gesamt-RNA in den oberen und unteren Atemwegen nach der Challenge wurde mittels qRT-PCR überwacht (**Fig. 19**). Die Virusreplikation in den oberen Atemwegen erreichte an Tag 59 bei den nicht vakzinierten Tieren einen Höhepunkt, der im Nasenabstrich mittlere Werte von $2{,}7 \times 10^7$ cp/ml erreichte (**Fig. 19 A**) und bis zum Ende an Tag 62-64 nachweisbar blieb. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen der Virusreplikation bei mit 0,5 µg CVnCoV vakzinierten Tieren und nicht vakzinierten Kontrolltieren in Nasenabstrichen gemessen. Insgesamt induzierte die Vakzinierung mit 8 µg CVnCoV die geringste Anzahl an Virus-RNA-Kopien in den oberen Atemwegen, wo an Tag 59 mittlere Werte von $2{,}9 \times 10^6$ cp/ml in nasalen Abstrichen nachweisbar waren. Der Unterschied zwischen den Studiengruppen war jedoch statistisch nicht signifikant. Vergleichbare Ergebnisse wurden in Rachenabstrichen erzielt (**Fig. 20 A**).

[1172] Zusätzliche Analysen zur Bestimmung der subgenomischen (sg) RNA mittels qRT-PCR, die auf die Virusreplikation hinweist, ergaben insgesamt niedrige sgRNA-Werte in den oberen Atemwegen. Die Werte erreichten ihren Höhepunkt an Tag 59 und kehrten an Tag 62 bei allen Tieren auf den Ausgangswert zurück. In Nasenabstrichen waren die sgRNA-Konzentrationen bei CVnCoV-vakzinierten Tieren mit Werten von 0,4 ×

10^4 im Vergleich zu $3,7 \times 10^4$ cp/ml bei nicht vakzinierten Kontrolltieren am niedrigsten. 3 von 6 Tieren in der mit 8 µg CVnCoV vakzinierten Gruppe blieben zu allen Zeitpunkten negativ, während 5/6 Tiere in der nicht vakzinierten Gruppe nachweisbare Mengen an subgenomischer viraler RNA aufwiesen (**Fig. 19 D**). Analysen von Rachenabstrichen zeigten keinen signifikanten Unterschied der subgenomischen RNA zwischen den Gruppen und die Medianwerte blieben bei allen Tieren unter der unteren Quantifizierungsgrenze (**Fig. 20 B**).

[1173] Parallele Analysen der unteren Atemwege von am lebenden Tier (d59) und post-mortal (d62-d64) gewonnenen bronchoalveolären Lavage (BAL)-Proben zeigten zu beiden Zeitpunkten signifikant reduzierte Werte der Virus-Gesamt-RNA nach Vakzinierung mit 8 µg CVnCoV (**Fig. 19 B**). Die mittleren Werte der Gesamt-RNA an Tag 59 und Tag 62-64 lagen bei $4,3 \times 10^6$ und $1,1 \times 10^5$ cp/ml in der Kontrollgruppe, während die mit 8 µg CVnCoV vakzinierten Tiere mittlere Titer von $0,6 \times 10^4$ bzw. $0,3 \times 10^4$ aufwiesen. Die RNA-Mengen in der BAL lagen am Tag 59 bei allen Tieren bis auf ein Tier in der 8-µg-CVnCoV-Gruppe, welches niedrige RNA-Zahlen aufwies, unter der unteren Quantifizierungsgrenze. Die Gesamt-Virus-RNA-Mengen in den mit 0,5 µg CVnCoV vakzinierten Tieren waren vergleichbar mit der Kontrollgruppe. Bemerkenswert ist, dass die BAL-Analysen an Tag 59 nur weibliche Tiere und ein männliches Tier der nicht vakzinierten Gruppe darstellen. Die übrigen Tiere wurden von dieser Analyse ausgeschlossen, da suboptimale BAL-Probenahmebedingungen gewählt worden waren, die eine weitere Auswertung verhinderten.

[1174] Die Analyse des bei der Nekropsie entnommenen Lungengewebes bestätigte die in den BAL-Proben gewonnenen Ergebnisse. In der nicht vakzinierten Gruppe waren mittlere Titer von $2,9 \times 10^8$ cp/g nachweisbar, während alle Tiere in den mit 8 µg CVnCoV vakzinierten Gruppen unterhalb der unteren Quantifizierungsgrenze blieben (**Fig. 19 C**). Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Tieren in der 0,5-µg-CVnCoV-Gruppe und der nicht vakzinierten Gruppe.

[1175] In Bezug auf die Vakzinsicherheit löste die Injektion von 0,5 µg oder 8 µg CVnCoV keine unerwünschten Reaktionen auf die Vakzinierung aus, und während der Vakzinierungsphase der Studie wurden keine Gewichts- oder Temperaturunterschiede zwischen den Gruppen beobachtet (Daten nicht gezeigt), was ein günstiges Sicherheitsprofil der Vakzine bei Rhesusaffen in den verwendeten Dosen unterstützt. Außerdem waren in dieser Studie keine Anzeichen einer durch die Vakzine verstärkten Erkrankung zu beobachten.

[1176] Die Analyse der subgenomischen Virus-RNA in BAL- und Lungengewebeproben ergab vergleichbare Ergebnisse: RNA, die auf replizierendes Virus hinweist, war in BAL- und Lungenproben von nicht vakzinierten und mit 0,5 µg CVnCoV vakzinierten Tieren an Tag 59 bzw. Tag 62-64 nachweisbar. Alle Tiere in der 8-µg-CVnCoV-Gruppe waren in diesen Analysen negativ (**Fig. 19 E** und **Fig. 19 F**).

[1177] Die Auswertung weiterer Gewebeproben, die bei der Nekropsie entnommen wurden, ergab geringe, aber detektierbare Signale von SARS-CoV-2-Gesamt-RNA in Trachea und Tonsillen von mit 0,5 µg CVnCoV und nicht vakzinierten Tieren, während mit 8 µg CVnCoV vakzinierte Tiere negativ blieben (**Fig. 20 C** und **Fig. 20 D**). In Milz, Zwölffingerdarm, Dickdarm, Leber oder Niere war in keiner Gruppe virale RNA nachweisbar (**Fig. 20 E-I**).

[1178] Histopathologische Analysen von Lungenproben, die bei der Nekropsie entnommen wurden, zeigten Läsionen, die mit einer Infektion mit SARS-CoV-2 in den Lungen der herausgeforderten Tiere übereinstimmen (**Fig. 21**). Kurz gesagt, das Lungenparenchym zeigte multifokale bis verschmelzende Bereiche der Pneumonie, umgeben von nicht befallenem Parenchym. Alveolarschäden mit Nekrosen von Pneumozyten waren ein auffälliges Merkmal in den betroffenen Bereichen. Die Alveolarräume innerhalb dieser Bereiche waren oft verdickt, und die geschädigten Alveolarwände enthielten gemischte inflammatorische Zellen (einschließlich Makrophagen, Lymphozyten, lebensfähige und degenerierte Neutrophile und vereinzelt Eosinophile). Alveolarödeme und alveoläre Pneumozytenhyperplasie vom Typ-II wurden ebenfalls beobachtet. In den distalen Bronchiolen und den bronchiolo-alveolären Übergängen war eine Degeneration und Ablösung von Epithelzellen vorhanden. In den größeren Atemwegen wurde eine gelegentliche, fokale, epitheliale Degeneration und Ablösung im respiratorischen Epithel beobachtet. Eine geringe Anzahl gemischter inflammatorischer Zellen, bestehend aus Neutrophilen, lymphatischen Zellen und gelegentlich Eosinophilen, infiltrierten die bronchialen und bronchiolären Wände. Im Lumen einiger Atemwege war Schleim vermischt mit degenerierten Zellen, hauptsächlich Neutrophilen und Epithelzellen, zu sehen. Innerhalb des Parenchyms wurden auch perivaskuläre und peribronchioläre Manschetten beobachtet, wobei die Infiltrate hauptsächlich aus lymphoiden Zellen bestanden. In nicht-pulmonalen Geweben wurden keine bemerkenswerten Veränderungen beobachtet.

[1179] In Übereinstimmung mit den verringerten Mengen an viraler RNA zeigte die Auswertung der Lungenproben mit einem histopathologischen Scoring-System eine signifikante Verringerung des Schweregrades der Lungenläsionen bei den mit CVnCoV vakzinierten Tieren im Vergleich zu den mit 0,5 µg CVnCoV vakzinierten und nicht vakzinierten Gruppen (**Fig. 22 A** und **Fig. 22 B**).

[1180] Virale RNA wurde in Alveolarepithelzellen und innerhalb der inflammatorischen Zellinfiltrate beobachtet (**Fig. 21**). Die Menge an Virus-RNA, die durch In-situ-Hybridisierung (ISH) beobachtet wurde, war in den mit 8 µg CVnCoV vakzinierten Tieren im Vergleich zu den mit 0,5 µg CVnCoV und nicht vakzinierten Tieren ebenfalls signifikant reduziert (**Fig. 22 C**).

[1181] Um einen Einblick in die pathologischen Veränderungen, die durch eine SARS-CoV-2-Infektion in der gesamten Lunge hervorgerufen werden, am lebenden Tier zu erhalten, wurde ein CT-Scan vor der Challenge und nach der Challenge am Untersuchungstag 61 durchgeführt. Insgesamt war der offensichtliche Grad der Erkrankung relativ mild und betraf nur weniger als 25% der Lunge. Nach der Challenge wurden bei 6 von 6 Tieren in der 0,5-µg-CVnCoV-Gruppe und bei 5 von 6 Tieren in der nicht vakzinierten Kontrollgruppe Anomalien in der Lunge festgestellt, während nur 3/6 Tiere, die mit 8 µg CVnCoV vakziniert wurden, nachweisbare Veränderungen aufwiesen. Die niedrigsten Werte im Gesamt-Scoring in den CT-Scans wurde in den mit 8 µg CVnCoV vakzinierten Tieren festgestellt (**Fig. 22 D**). Bemerkenswert ist, dass die höchsten Werte in dieser Analyse in der 0,5-µg-CVnCoV-Gruppe zu finden waren. Die Werte unterschieden sich jedoch nicht statistisch von denen der Kontrollgruppe.

[1182] Bei der Bewertung der klinischen Anzeichen nach der Challenge waren keine Anzeichen für eine verstärkte Erkrankung feststellbar, und die Zusammensetzungen erwiesen sich bei Rhesusaffen als hoch immunogen. Es gab keine deutlichen Unterschiede im Körpergewicht oder in der Temperatur zwischen den Gruppen nach der Challenge und keine Anzeichen von Fieber. Eine durch die Vakzine verstärkte Erkrankung kann durch Antikörper verursacht werden (antibodydependent enhanced disease, ADE (siehe Lee et al., 2020)), wie zuvor für ein felines Coronavirus beschrieben (Olsen et al., 1992). Solche Antikörper besitzen höchstwahrscheinlich eine nichtneutralisierende Aktivität und verstärken das Eindringen des Virus, was zu einer erhöhten Virus-Replikation und einer Verschlimmerung der Krankheit führt. Die hier vorgestellten Ergebnisse geben keinen Hinweis auf eine erhöhte Virus-Replikation bei mit CVnCoV vakzinierten Tieren. Wichtig ist, dass auch in der 0,5 µg-Gruppe der Studie keine erhöhte Replikation im Respirationstrakt oder in distalen Organen, wie zum Beispiel Milz, Zwölffingerdarm, Dickdarm, Leber oder Niere, nachweisbar war. Diese Tiere wiesen eine geringe S-Bindung, aber nicht nachweisbare VNTs nach der Challenge-Infektion auf, was Bedingungen schafft, unter denen hypothetisch eine ADE auftreten könnte.

[1183] Eine weitere Ursache für die Krankheitsverstärkung könnte die Vakzin-assoziierte verstärkte Atemwegserkrankung (VAERD) sein, die durch eine erhöhte Entzündung aufgrund von TH2-beeinflussten Immunantworten und einem hohen Verhältnis von nicht-neutralisierenden zu neutralisierenden Antikörpern gekennzeichnet ist (siehe Graham, 2020; Lee et al., 2020; Smatti et al., 2018). Die Analyse der Lungenpathologie bei mit CVnCoV vakzinierten Tieren zeigte eine Protektivität von 8 µg CVnCoV und gab keinen Hinweis auf erhöhte Entzündungen und pathologische Veränderungen bei suboptimal dosierten Tieren.

[1184] Die Ergebnisse erweitern unser Wissen über die Sicherheit, Immunogenität und protektive Wirksamkeit von CVnCoV in einem hoch relevanten Modellsystem für SARS-CoV-2. Das Gesamtergebnis der Studie in nicht-humanen Primaten in Bezug auf Immunogenität, protektive Wirksamkeit und Pathologie ist vergleichbar mit den Ergebnissen im Hamstermodell (siehe Beispiel 9), was den Hamster als Modellsystem für SARS-CoV unterstützt. Daher ist CVnCoV bei einer niedrigen Dosis von 8 µg in einem COVID-19-NHP-Challenge-Modell hochwirksam, während es bei beiden getesteten Dosen sicher ist und keine Anzeichen einer Krankheitsverstärkung aufweist.

[1185] In einer weiteren ähnlichen NHP-Studie wurde eine Vakzinzusammensetzung, die in LNPs formulierte, für S_stab kodierende mRNA, die die erfindungsgemäße Form des 3'-Endes (hSL-A100) und die UTR-Kombination (a-1 (HSD17B4/PSMB3)) (R9709) umfasst, analysiert und mit CVnCoV (R9515) verglichen.

Beispiel 16: Vakzinierung von Mäusen mit mRNA kodierend das SARS-CoV-2-Antigen S stab, formuliert in LNPs

[1186] Das vorliegende Beispiel zeigt, dass SARS-CoV-2-S-mRNA-Vakzine mit mRNA, die verbesserte nicht-kodierende Regionen umfasst, starke Immunantworten induzieren. Einige weitere Gruppen von Mäusen

erhielten eine mRNA-Vakzinzusammensetzung mit chemisch modifizierten Nukleotiden (N(1)-Methylpseudouridin, m1ψ). Eine Gruppe von Mäusen erhielt eine mRNA-Vakzinzusammensetzung, die mRNA umfasst, die mit einem alternativen Cap (3'OME Clean Cap) hergestellt wurde. Weitere Details sind in Tabelle 22 angegeben.

Herstellung der LNP-formulierten mRNA-Vakzine:

[1187] SARS-CoV-2-S-mRNA-Konstrukte wurden wie in Beispiel 1 beschrieben (RNA-in-vitro-Transkription) hergestellt. HPLC-gereinigte mRNA wurde mit LNPs gemäß Beispiel 1.4 formuliert.

Immunstimulation von humanen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) Präparation von humanen PBMCs

[1188] Humane periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) wurden aus Gesamtblut von anonymen Spendern durch Standard-Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll 1,078 g/ml) isoliert. Die PBMCs wurden mit PBS gewaschen und in RPMI 1640, ergänzt mit 20% hitzeinaktiviertem FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% L-Glutamin, resuspendiert. Nach dem Zählen werden die Zellen mit 50 Millionen Zellen pro ml in fötalem Kälberserum und 10% DMSO resuspendiert und eingefroren. Vor der Verwendung werden die Zellen aufgetaut.

PBMC-Stimulation

[1189] PBMC wurden mit 10 µg/ml LNP-formulierter mRNA (Tabelle 22, Reihe B-M) in einer Dichte von 4×10^5 Zellen in einem Gesamtvolumen von 200 µl in einer humidifizierten 5% CO_2-Atmosphäre bei 37 °C stimuliert. Um die Hintergrundstimulation zu quantifizieren, wurden die PBMC nur mit Medium inkubiert (Tabelle 22, Zeile A). 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Überstände gesammelt.

Quantifizierung der Zytokinspiegel

[1190] Humanes IFNa wurde mit einem IFNa-ELISA von PBL gemäß den Anweisungen des Herstellers quantifiziert. PBMC-Überstände wurden in einer 1:20- oder 1:40-Verdünnung verwendet, und 50 µl der Verdünnung wurden zu 50 µl vorgefülltem Puffer hinzugefügt.

Immunisierung:

[1191] Weiblichen BALB/c-Mäusen (6-8 Wochen alt, n = 8) wurden intramuskulär (i.m.) die in Tabelle 22 angegebenen mRNA-Vakzinzusammensetzungen injiziert. Als Negativkontrolle wurde eine Gruppe von Mäusen mit Puffer vakziniert (Gruppe A). Alle Tiere wurden an Tag 0 und 21 vakziniert. Blutproben wurden an Tag 21 (post prime) und 42 (post boost) zur Bestimmung der Antikörpertiter entnommen, Splenozyten wurden an Tag 42 zur T-Zell-Analyse isoliert.

Tabelle 22: Vakzinierungsschema (Beispiel 16):

Gruppe	**Vakzin-Zusammensetzung**	**mRNA Identität**	**CDS opt.**	**5'-UTR/ 3'-UTR; UTR Design**	**3'-Ende**	**SEQ ID NO: Protein**	**SEQ ID NO: RNA**	**Dosis**	**Mod. Nukleotide**
A	Puffer	-	-			-	-		-
B	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9515	opt1	-/muag	A64-N5-C30-hSL-N5	10	163	1 µg	-
C	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9709	opt1	HSD17B 4/ PSMB3	hSL-A100	10	149	1 µg	-

Gruppe	Vakzin-Zusammensetzung	mRNA Identität	CDS opt.	5'-UTR/ 3'-UTR; UTR Design	3'-Ende	SEQ ID NO: Protein	SEQ ID NO: RNA	Dosis	Mod. Nukleotide
D	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R10153	opt1	HSD17B 4/ PSMB3	A100	10	24837	1 µg	-
E	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R10154	opt1	-/muag	A100	10	25717	1 µg	-
F	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R10155	opt1	Rpl31/RPS9	hSL-A100	10	23957	1 µg	-
G	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R10156	opt1	Rpl31/RPS9	A100	10	25277	1 µg	-
H	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R10157	opt1	-/muag	A64-N5-C30-hSL-N5	10	163	1 µg	m1ψ
I	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R10158	opt1	-/muag	hSL-A100	10	24397	1 µg	m1ψ
J	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R10159	opt1	HSD17B 4/ PSMB3	hSL-A100	10	149	1 µg	m1ψ
K	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R10160 *	opt1	HSD17B 4/ PSMB3	hSL-A100	10	149	1 µg	-
L	mRNA kodierend S formuliert in LNPs	R10161 *	opt1	HSD17B 4/ PSMB3	hSL-A100	1	148	1 µg	-
M	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R10162	opt10	HSD17B 4/ PSMB3	hSL-A100	10	151	1 µg	m1ψ

*mRNA R1 0160 (Gruppe K) und R10161 (GruppeL) wurden mit 3'OME Clean Cap hergestellt.

[1192] Die Bestimmung der IgG1 - und IgG2-Antikörpertiter mittels ELISA und der Virus-neutralisierenden Titer über CPE (zytopathischer Effekt) wurden wie in Beispiel 6 beschrieben durchgeführt. Die T-Zell-Analyse mittels intrazellulärer Zytokinfärbung (ICS) wurde wie in Beispiel 6 beschrieben durchgeführt.

Ergebnisse:

[1193] Wie in **Fig. 23** gezeigt, induzierte eine mRNA, die für das stabilisierte Volllängen-S-Protein (S_stab) kodiert, unterschiedliche Mengen an IFNa in humanen PBMCs. Bei den meisten Konstrukten wurden mode-

rate IFNa-Spiegel induziert, während LNP-formulierte mRNA, die chemisch modifizierte Nukleotide enthielt, kein IFNa induzierte.

[1194] Die Vakzinierung mit mRNA, die für das stabilisierte Volllängen-S-Protein (S_stab) kodiert und verbesserte nicht-kodierende Regionen umfasst, induzierte bereits am Tag 21 nach der ersten Vakzinierung starke Niveaus Virus-neutralisierender Antikörpertiter (VNTs) (dargestellt in **Fig. 23 B**). Alle mRNA-Vakzinzusammensetzungen mit mRNAs, die ein 3'-Ende „SL-A100“ oder „A-100“ umfassen (Gruppen C-G, I-M), zeigten diese verbesserte, frühe und starke Induktion von VNTs. In diesen Konstrukten befindet sich die Poly(A)-Sequenz direkt am 3'-Terminus der RNA. Die Einführung von chemisch modifizierten Nukleotiden (Gruppen H, I, J, M) führte zu vergleichbaren VNTs.

[1195] Nach der zweiten Vakzinierung an Tag 42 (dargestellt in **Fig. 23 C**) zeigen die meisten mRNA-Vakzine eine robuste Induktion hoher Titer von VNTs. Auch CVnCoV, eine Vakzinzusammensetzung, die mRNA mit dem 3'-Ende A64-N5-C30-hSL-N5 (Gruppe B) umfasst, induzierte sehr hohe VNTs. Die Einführung von chemisch modifizierten Nukleotiden (m1ψ, Gruppe H) führte zu verminderten Niveaus. Alle mRNA-Vakzinkonstrukte mit mRNAs, die ein 3'-Ende „hSL-A100“ oder „A-100“ umfassen (Gruppen C-G, I-M), zeigten diese verbesserte, frühe und starke Induktion von VNTs, unabhängig davon, ob m1ψ verwendet wurde oder nicht. In diesen Konstrukten befindet sich die Poly(A)-Sequenz direkt am 3'-Terminus der RNA.

Beispiel 17: Vakzinierung von Mäusen mit mRNA, die für das SARS-CoV-2-Antigen S stab kodiert, formuliert in LNPs

[1196] Das vorliegende Beispiel zeigt, dass SARS-CoV-2-S-mRNA-Vakzine mit mRNA, die verbesserte nicht-kodierende Regionen umfasst, starke Immunantworten induzieren. Diese Studie vergleicht ein „Only-Prime-“ mit einem „Prime-Boost-“Vakzinierungsschema. Einige Gruppen von Mäusen erhielten eine mRNA-Vakzinzusammensetzung, die chemisch modifizierte Nukleotide (N(1)-Methylpseudouridin, m1ψ) umfasst. Weitere Einzelheiten sind in Tabelle 23 angegeben.

Herstellung der LNP-formulierten mRNA-Vakzine:

[1197] SARS-CoV-2-S-mRNA-Konstrukte wurden wie in Beispiel 1 beschrieben (RNA-in-vitro-Transkription) hergestellt. HPLC-gereinigte mRNA wurde mit LNPs gemäß Beispiel 1.4 formuliert.

Immunisierung:

[1198] Weiblichen BALB/c-Mäusen (6-8 Wochen alt, n = 8) wurden intramuskulär (i.m.) die in Tabelle 23 angegebenen mRNA-Vakzinzusammensetzungen injiziert. Als Negativkontrolle wurde eine Gruppe von Mäusen mit Puffer vakziniert (Gruppe K). Die Tiere wurden nur einmal an Tag 0 (Gruppe A-E) bzw. zweimal an Tag 0 und 21 (Gruppe F-J) vakziniert. Blutproben wurden an Tag 21 und 42 für die Bestimmung der Antikörpertiter entnommen, Splenozyten wurden an Tag 42 für die T-Zell-Analyse isoliert.

Tabelle 23: Vakzinierunssschema (Beispiel 17):

Gruppe	**Vakzin-Zusammen-setzung**	**mRNA ID**	**CDS opt.**	**5'-UTR/ 3'-UTR; UTR-Design**	**3'-Ende**	**SEQ ID NO: Protei n**	**SEQ ID NO: RNA**	**Dosis**	**Mod. Nukleotide**
A	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9515	opt1	-/muag	A64-N5-C30-hSL-N5	10	163	1 µg Tag0	-
B	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9709	opt1	HSD17B 4/ PSMB3	hSL-A100	10	149	1 µg Tag0	-

Gruppe	Vakzin-Zusammen-setzung	mRNA ID	CDS opt.	5'-UTR/ 3'-UTR; UTR-Design	3'-Ende	SEQ ID NO: Protei n	SEQ ID NO: RNA	Dosis	Mod. Nukleo-tide
C	mRNA kodierend S_stab for-muliert in LNPs	R10157	opt1	-/muag	A64-N5-C30-hSL-N5	10	163	1 µg Tag0	m1ψ
D	mRNA kodierend S_stab for-muliert in LNPs	R10159	opt1	HSD17B 4/ PSMB3	hSL-A100	10	149	1 µg Tag0	m1ψ
E	mRNA kodierend S_stab for-muliert in LNPs	R10162	opt1 0	HSD17B 4/ PSMB3	hSL-A100	10	151	1 µg Tag0	m1ψ
F	mRNA kodierend S_stab for-muliert in LNPs	R9515	opt1	-/muag	A64-N5-C30-hSL-N5	10	163	1 µg Tag0 Tag2 1	-
G	mRNA kodierend S_stab for-muliert in LNPs	R9709	opt1	HSD17B 4/ PSMB3	hSL-A100	10	149	1 µg Tag0 Tag2 1	-
H	mRNA kodierend S_stab for-muliert in LNPs	R10157	opt1	-/muag	A64-N5-C30-hSL-N5	10	163	1 µg Tag0 Tag2 1	m1ψ
I	mRNA kodierend S_stab for-muliert in LNPs	R10159	opt1	HSD17B 4/ PSMB3	hSL-A100	10	149	1 µg Tag0 Tag2 1	m1ψ
J	mRNA kodierend S_stab for-muliert in LNPs	R10162	opt1 0	HSD17B 4/ PSMB3	hSL-A100	10	151	1 µg Tag0 Tag2 1	m1ψ
K	Puffer	-	-			-	-	Tag0 Tag2 1	-

[1199] Die Bestimmung der Virus-neutralisierenden Titer mittels CPE (cytopathischer Effekt) wurde wie in Beispiel 6 beschrieben durchgeführt. Die T-Zell-Analyse mittels intrazellulärer Zytokinfärbung (ICS) wurden wie in Beispiel 6 beschrieben durchgeführt.

Ergebnisse:

[1200] Fig. 24 A zeigt die Induktion von VNTs nach nur einer Vakzinierung. Wie bereits in Beispiel 17 gezeigt, zeigten mRNA-Vakzinzusammensetzungen mit mRNAs, die ein 3'-Ende „hSL-A100“ oder „A-100“

umfassen (Gruppen A, D, E, G, I und J), eine verbesserte, frühe und starke Induktion von VNTs. Bei diesen Konstrukten befindet sich die Poly(A)-Sequenz direkt am 3'-Terminus der RNA.

[1201] Fig. 24 B zeigt die Induktion von VNTs nach nur einer Vakzinierung (Gruppe A-E) bzw. nach zwei Vakzinierungen (Gruppe F-J) am Tag 42. Die R9709 umfassende mRNA-Vakzinzusammensetzung (Gruppe B) induzierte von den Gruppen, die nur eine Vakzinierung erhielten, die stärksten Titer von VNTs. Die Stärke der R9709 umfassenden Vakzinzusammensetzung kann ein Immunisierungsprotokoll für die Behandlung oder Prophylaxe eines Individuums gegen Coronavirus, vorzugsweise SARS-CoV-2-Coronavirus, unterstützen, das nur eine einzige Dosis der Zusammensetzung oder der Vakzine vorsieht.

[1202] Die mRNA-Vakzinzusammensetzungen mit mRNAs, die ein 3'-Ende „hSL-A100“ oder „A-100“ umfassen (Gruppen A, D, E, G, I und J), zeigten eine verbesserte, frühe und starke Induktion von VNTs. In diesen Konstrukten befindet sich die Poly(A)-Sequenz direkt am 3'-Terminus der RNA.

Beispiel 18: Wirksamkeit von mRNA-Vakzinen im K18-hACE2-Mausmodell für SARS-CoV-2-Infektion

[1203] Mäuse sind nicht empfänglich für eine Infektion mit SARS-CoV-2, aber es wurde ein gentechnisch verändertes Mausmodell entwickelt, das den humanen Rezeptor ACE2 (hACE2), der für den Eintritt des Virus in die Wirtszelle erforderlich ist, unter der Kontrolle des K18-Promotors exprimiert. Das Modell wurde ursprünglich entwickelt, um den Erreger von SARS (SARS-CoV) zu untersuchen (MCCRAY, Paul B., et al. Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. Journal of Virology, 2007, 81. Jg., Nr. 2, S. 813-821), wird nun aber auch als geeignetes Kleintiermodell für COVID-19 verwendet. Bisher wurde gezeigt, dass hACE2-Mäuse empfänglich für SARS-CoV-2 sind und einen Krankheitsverlauf mit Gewichtsverlust, Lungenpathologie und ähnlichen Symptomen wie die beim Menschen zeigen (z.B. BAO, Linlin, et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. Nature, 2020, 583. Jg., Nr. 7818, S. 830-833, oder YINDA, Claude Kwe, et al. K18-hACE2 mice develop respiratory disease resembling severe COVID-19. PLoS Pathogens, 2021, 17. Jg., Nr. 1, S. e1009195; DE ALWIS, Ruklanthi M., et al. A Single Dose of Self-Transcribing and Replicating RNA Based SARS-CoV-2 Vaccine Produces Protective Adaptive Immunity In Mice. BioRxiv, 2020.). Grundsätzlich ist die K18-hACE2-Maus für Vakzinstudien geeignet, um die Prävention einer Infektion mit SARS-CoV-2 bzw. die Reduktion der Viruslast zu untersuchen und gleichzeitig die Korrelate und Ursachen einer protektiven Wirkung einer mRNA-Vakzine gegen COVID-19 mit gut etablierten immunologischen Methoden, die für Mausmodelle allgemein verfügbar sind, zu erforschen.

[1204] Das vorliegende Beispiel zeigt, dass SARS-CoV-2-S-mRNA-Vakzine sowohl eine starke humorale als auch eine zelluläre Immunantwort in K18-hACE2-Mäusen induzieren. SARS-CoV-2-S-mRNA-Vakzine schützen K18-hACE2-Mäuse vor einer SARS-CoV-2-Virus-Challenge, was z.B. durch Messung der Viruslasten infizierter Tiere, durch Überwachung des Krankheitsverlaufs mit Gewichtsverlust, pulmonaler Pathologie und anderen Symptomen oder durch Histopathologie und Überleben gezeigt werden kann.

Herstellung der LNP-formulierten mRNA-Vakzine:

[1205] SARS-CoV-2-S-mRNA-Konstrukte wurden wie in Beispiel 1 beschrieben (RNA-in-vitro-Transkription) hergestellt. HPLC-gereinigte mRNA wurde mit LNPs gemäß Beispiel 1.4 formuliert, bevor sie in In-vivo-Vakzinierungsexperimenten eingesetzt wurde.

Immunisierung und Challenge:

[1206] K18-hACE2-Mäusen wurden intramuskulär (i.m.) mRNA-Vakzinzusammensetzungen und Dosen wie in Tabelle 24 angegeben injiziert. Als Negativkontrolle wurde eine Gruppe mit Puffer vakziniert. Als Kontrolle wurde eine Gruppe intramuskulär mit 20 µl Formalin-inaktiviertem SARS-CoV-2-Virus (10^6 PFU), adjuvantiert mit Alaun, vakziniert. Alle Tiere wurden an Tag 0 und Tag 28 vakziniert. Blutproben wurden an Tag 0, Tag 28 (post prime) und 56 (post boost, vor der Challenge) für die Bestimmung der Antikörpertiter entnommen. Die Tiere wurden an Tag 56 intranasal mit z.B. 10^5 PFU SARS-CoV-2 (Bavaria 1) herausgefordert. Die Tiere wurden vier bis zehn Tage nach der Challenge beobachtet.

Tabelle 24: vakzinierungsschema (Beispiel 18):

Gruppe	VakzinZusammensetzung	mRNA ID	CDS opt.	5'-UTR/ 3'-UTR; UTR Design	3'-Ende	SEQ ID NO: Protein	SEQ ID NO: RNA	Dosis
A	Puffer	-	-			-	-	20 µl
B	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9515	opt1	-/muag;	A64-N5-C30-hSL-N5	10	163	8 µg
C	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9709	opt1	HSD17B 4/ PSMB3	hSL-A100	10	149	8 µg
D	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9709	opt1	HSD17B 4/ PSMB3	hSL-A100	10	149	2 µg
E	mRNA kodierend S_stab formuliert in LNPs	R9709	optl	HSD17B 4/ PSMB3	hSL-A100	10	149	0,5 µg
F	Formalininaktiviertes Virus +Alaun	-	-	-	-	-	-	10^6 PFU, 20µl,

[1207] Die Bestimmung der IgG1- und IgG2-Antikörpertiter mittels ELISA, die Bestimmung der Virus-neutralisierenden Titer mittels CPE (zytopathischer Effekt)-basiertem Mikroneutralisations-Assay und die T-Zell-Analyse mittels intrazellulärer Zytokinfärbung (ICS) werden wie in Beispiel 6 beschrieben durchgeführt.

[1208] Die Immunisierung und Challenge von K18-hACE2-Mäusen, wie im vorliegenden Beispiel beschrieben, kann verwendet werden, um die protektive Wirksamkeit weiterer erfindungsgemäßer mRNA-Konstrukte und Zusammensetzungen zu bestimmen. Weiterhin kann durch die Verwendung von mutierten Virusvarianten oder Isolaten von SARS-CoV-2 (z.B. B.1 .351, siehe auch Tabelle 25) gezeigt werden, dass die erfindungsgemäßen mRNA-Vakzinzusammensetzungen zusätzlich gegen diese mutierten Virusvarianten oder Isolate wirksam sind.

Beispiel 19: Neutralisierende Aktivität von mRNA-Vakzinen gegen neue SARS-CoV-2-Varianten

[1209] Die neutralisierende Aktivität von Seren von 20 Teilnehmern der klinischen Phase-1-Studie (im Alter von 18-60 Jahren, männlich und weiblich), die zwei Dosen von 2 µg, 4 µg, 8 µg oder 12 µg CVnCoV erhalten hatten (siehe Beispiel 10 bezüglich des Ablaufs der klinischen Studie), wurde gegen neu auftretende SARS-CoV-2-Varianten oder -Isolate getestet. Die Serumproben wurden an den Tagen 36, 43 oder 57 der klinischen Studie gewonnen und weisen Virus-neutralisierende Antikörpertiter (VNTs) in einem Bereich von 10-1280 (MN 25TCID50) auf und repräsentieren somit Proben mit niedrigen (10-20) und mit hohen (452-1280) VNTs.

[1210] Die VNTs werden wie z.B. für die Analyse von Hamsterseren in Beispiel 9 beschrieben analysiert, wobei die Serumproben mit neuen Virusvarianten inkubiert werden. Als Referenz kann der Stamm SARS-CoV-2/human/ITA/INMI1/2020 oder UVE/SARS-CoV-2/2020/FR/702 („Wildtyp-Stamm“) verwendet werden. Neu auftretende SARS-CoV-2-Varianten oder Isolate zur Analyse sind in Tabelle 25 aufgeführt. Weitere Varianten können auftreten und können ebenfalls getestet werden.

Tabelle 25: Liste der neu auftretenden SARS-CoV-2-Varianten (Beispiel 19):

Variante	Aminosäureveränderungen im Spike-Protein
Mink Cluster 5 Variante GISAID: EPI_ISL_616802 (hCoV-19/Dänemark/DCGC-3024/2020)	delH69, delV70, Y453F, D614G, I692V, M1229I

Variante	Aminosäureveränderungen im Spike-Protein
B.1.1.7 (a.k.a., 20B/501Y.V1, 501Y.V1, besorgniserregende Virusvariante, „Variant of Concern“-202012/01, VOC-202012/01, VUI-202012/01, B117, „UK-Variante“)	delH69, delV70, delY144, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H
B.1.351 (a.k.a., 20C/501Y.V2, 501Y.V2, N501Y.V2, „SA-Variante“, „Südafrikanische-Variante“)	L18F, D80A, D215G, delL242, delA243, delL244, R246I, K417N, E484K, N501Y, D614G, A701V
P.1 (a.k.a., „Brasilianische Variante“ = „Japanische Variante“)	L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y, T1027I
CAL.20C (a.k.a., „Kalifornische Variante“) NCBI: QQN00429.1 (CAL.20.C Beispiel: SARS-CoV-2/human/USA/CA-LACPHL-AF00114/2021)	S13I, W152C, L452R, D614G

[1211] Die Neutralisierung kann auch mit einem rekombinanten VSV- oder Lentiviral-basierten Pseudovirus-Neutralisierungs-Assay (PsVN) gemessen werden, der die im SARS-CoV-2-Variantenstamm vorhandenen Spike-Mutationen aufweist.

[1212] Die Kapazität von bindenden Antikörpern kann in ELISA-Assays, wie z.B. oben in Beispiel 10 beschrieben, mit rekombinanten Spike-Proteinen zur Beschichtung, welche die Mutationen der neuen Virusvariante aufweisen, getestet werden.

[1213] Die Wirksamkeit der mRNA-Vakzine kann auch in Challenge-Modellen, wie z.B. in Beispiel 17 für hACE-Mäuse, in Beispiel 15 für NHPs und in Beispiel 9 für Hamster beschrieben, unter Verwendung einer neu auftretenden SARS-Cov-2-Variante für die Challenge-Infektion getestet werden.

Es folgt ein Sequenzprotokoll als elektronisches Dokument. Dieses kann sowohl in DEPATISnet als auch im DPMAregister aufgerufen werden.

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Patentliteratur

- WO 2017081082 A [0139, 0157, 0165, 0174, 0176, 0252]
- WO 2017081082 [0139]
- WO 2015062738 A [0203]
- WO 2002098443 A [0204]
- US 20050261218 A [0224]
- US 20050059005 A [0224]
- WO 2019077001 A1 [0226, 0236]
- WO 2016107877 A [0231, 0241]
- WO 2017036580 A [0231, 0241]
- WO 2016022914 A [0231, 0241]
- WO 2013143700 A [0241]
- WO 2016174271 A [0267]
- WO 2016091391 A [0269]
- WO 2012019780 A [0275]
- WO 2009150222 A2 [0286]
- WO 2005071093 A [0288]
- WO 2006048215 A [0288]
- WO 2008016473 A [0307]
- WO 2008157688 A [0307]
- WO 2009149253 A [0307]
- WO 2011015347 A [0307]
- WO 2013059475 A [0307]
- WO 2017066793 A [0307, 0308]
- WO 2017066781 A [0307, 0308]
- WO 2017066791 A [0307, 0308]
- WO 2017066789 A [0307, 0308]
- WO 2017053297 A [0307, 0308]
- WO 2017066782 A [0307, 0308]
- WO 2018075827 A [0307, 0308, 0309]
- WO 2017066797 A [0307, 0308]
- WO 2016193226 A [0315]
- WO 2015101416 A [0318, 0393]
- WO 2014152673 A [0318]
- WO 2014152659 A [0318]
- WO 2017109161 A [0367, 0380]
- WO 2015188933 A [0373, 0380]
- WO 2017109134 A [0375]
- WO 2016180430 A [0376, 0377, 0380, 0735]
- WO 2008077592 A [0377, 0380, 0732, 0733, 0737]
- WO 2016193206 A [0377, 0380]
- WO 2016165831 A [0380, 0552]
- WO 2011069586 A [0380, 0552]
- WO 2016184575 A [0380, 0552]
- WO 2016184576 A [0380, 0552]
- WO 2020002598 A [0394]
- WO 2010037539 A [0444]
- WO 2012113513 A [0444]
- WO 2009030481 A [0447]
- WO 2011026641 A [0447, 0454]
- WO 2012013326 A [0453]
- WO 2017212008 A1 [0457]
- WO 2017212006 A1 [0457]
- WO 2017212007 A1 [0457]
- WO 2017212009 A1 [0457, 0463, 0464, 0465]
- WO 2010053572 A [0466, 0475]
- WO 2012170930 A [0475]
- US 20150140070 A1 [0475]
- US 8450298 B [0479]
- WO 2017075531 A1 [0479]
- WO 2015074085 A1 [0480]
- US 61905724 B [0480]
- US 15614499 B [0480]
- US 9593077 B [0480]
- US 9567296 B [0480]
- WO 2017117530 A1 [0481]
- WO 2018078053 A1 [0482, 0483, 0484, 0498, 0499]
- WO 2009086558 A [0490]
- WO 2009127060 A [0490]
- WO 2010048536 A [0490]
- WO 2010054406 A [0490]
- WO 2010088537 A [0490]
- WO 2010129709 A [0490]
- WO 2011153493 A [0490]
- WO 2013063468 A [0490]
- US 20110256175 A [0490]
- US 20120128760 A [0490]
- US 20120027803 A [0490]
- US 8158601 B [0490]
- WO 2016118724 A [0490]
- WO 2016118725 A [0490]
- WO 2017070613 A [0490]
- WO 2017070620 A [0490]
- WO 2017099823 A [0490]
- WO 2012040184 A [0490]
- WO 2011153120 A [0490]
- WO 2011149733 A [0490]
- WO 2011090965 A [0490]
- WO 2011043913 A [0490]
- WO 2011022460 A [0490]
- WO 2012061259 A [0490]
- WO 2012054365 A [0490]
- WO 2012044638 A [0490]
- WO 2010080724 A [0490]
- WO 201021865 A [0490]
- WO 2008103276 A [0490]
- WO 2013086373 A [0490]
- WO 2013086354 A [0490]
- US 7893302 B [0490]
- US 7404969 B [0490]
- US 8283333 B [0490]
- US 8466122 B [0490]
- US 8569256 B [0490]
- US 20100036115 A [0490]

- US 20120202871 A [0490]
- US 20130064894 A [0490]
- US 20130129785 A [0490]
- US 20130150625 A [0490]
- US 20130178541 A [0490]
- US 20130225836 A [0490]
- US 20140039032 A [0490]
- WO 2017112865 A [0490]
- US 2016118724 A [0490]
- US 20150376115 A1 [0502]
- WO 2015199952 A [0502, 0738]
- JP 293 A [0540]
- WO 2019222424 A [0543]
- WO 2019226925 A [0543]
- WO 2019232095 A [0543]
- WO 2019232097 A [0543]
- WO 2019232208 A [0543]
- WO 20192224 A [0543]
- WO 2016203025 A [0558, 0608]
- WO 2006122828 A [0618]
- US 7245963 B2 [0677]
- WO 2017004143 A [0738]
- WO 2017075531 A [0738]
- FR 702 [1210]

Schutzansprüche

1. Eine mRNA, umfassend
• mindestens eine kodierende Sequenz, die für ein Spike-Protein (S), das zu mindestens 95% mit SEQ ID NO: 10 identisch ist, kodiert,
wobei das kodierte Spike-Protein (S) eine präfusionsstabilisierende K986P und V987P Mutation und weiterhin die Mutation D614G umfasst,
und
• mindestens eine heterologe untranslatierte Region (UTR).

2. mRNA gemäß Anspruch 1, wobei die mindestens eine mRNA eine kodierende Sequenz aufweist, die zu mindestens 80% oder zu mindestens 85% identisch mit SEQ ID NO: 137 ist.

3. mRNA gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei das kodierte Spike-Protein (S) weiterhin die Mutation E484K umfasst.

4. mRNA gemäß irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Spike-Protein eine Aminosäuresequenz umfasst oder aus dieser besteht, welche zu mindestens 95% identisch mit SEQ ID No. 22738, 22758, 22959, 22961, 22962, 22963 und 22964 ist.

5. mRNA gemäß irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die mRNA mindestens eine Poly (A)-Sequenz, umfassend 30 bis 200 Adenosin-Nukleotide, und optional ein Adenosin am 3'-Terminus umfasst.

6. mRNA gemäß irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die mRNA eine 5'-Cap-Struktur umfasst.

7. mRNA gemäß Anspruch 6, wobei die 5'-Cap-Struktur m7G, cap0, cap1, cap2, eine modifizierte cap0- oder eine modifizierte cap1 -Struktur, bevorzugt eine 5'-cap1-Struktur, umfasst.

8. mRNA gemäß irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die mindestens eine kodierende Sequenz eine Codon-modifizierte kodierende Sequenz ist, wobei die Aminosäuresequenz, die von der mindestens einen Codon-modifizierten kodierenden Sequenz kodiert wird, vorzugsweise gegenüber der Aminosäuresequenz, die von der entsprechenden kodierenden Wildtyp- oder Referenzsequenz kodiert wird, nicht verändert ist.

9. mRNA gemäß Anspruch 8, wobei die mindestens eine Codon-modifizierte kodierende Sequenz aus der C-maximierten kodierenden Sequenz, der CAI-maximierten kodierenden Sequenz, der an die humane Codon-Verwendung angepassten kodierenden Sequenz, der G/C-Gehalt-modifizierten kodierenden Sequenz und der G/C-optimierten kodierenden Sequenz oder einer beliebigen Kombination davon ausgewählt ist.

10. mRNA gemäß Anspruch 8 oder 9, wobei die mindestens eine kodierende Sequenz der mRNA einen G/C-Gehalt aufweist, der um mindestens 10%, 20% oder 30% erhöht ist gegenüber dem G/C-Gehalt der kodierenden Sequenz der entsprechenden Wild-Typ- oder Referenz-Nukleinsäuresequenz.

11. mRNA gemäß Anspruch 8, 9 oder 10, wobei die mindestens eine kodierende Sequenz einen G/C-Gehalt von mindestens ungefähr 50%, 55%, oder 60% aufweist.

12. mRNA gemäß irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche 8 bis 11, wobei die mindestens eine kodierende Sequenz eine G/C-optimierte kodierende Sequenz umfasst oder aus dieser besteht, die eine Nukleinsäuresequenz, die identisch oder zu mindestens 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, oder 99% identisch ist mit irgendeiner der Sequenzen gemäß SEQ ID : 22765, 23096, 23114, 23132, 23150, 23168, 23092, 23110, 23128, 23146, 23164, 23182, 22785, 23106, 23124, 23142, 23160, 23178, 23089, 23092, 23107, 23125, 23143, 23161, 23179, 23091, 23109, 23127, 23145, 23163, 23181, 23093, 23111, 23129, 23147, 23165, 23183, 23094, 23112, 23130, 23148, 23166 und 23184.

13. mRNA gemäß irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die mindestens eine heterologe untranslatierte Region aus mindestens einer heterologen 5'-UTR und/oder mindestens einer heterologen 3'-UTR ausgewählt ist.

14. mRNA gemäß Anspruch 13, wobei die mindestens eine heterologe 3'-UTR eine Nukleinsäuresequenz umfasst oder daraus besteht, die von einer 3'-UTR eines Gens aus der Gruppe, bestehend aus PSMB3, ALB7, alpha-Globin, CASP1, COX6B1, GNAS, NDUFA1 und RPS9 ausgewählt ist.

15. mRNA gemäß Anspruch 13, wobei die mindestens eine heterologe 5'-UTR eine Nukleinsäuresequenz umfasst oder daraus besteht, die von einer 5'-UTR eines Gens aus der Gruppe, bestehend aus HSD17B4, RPL32, ASAH1, ATP5A1, MP68, NDUFA4, NOSIP, RPL31, SLC7A3, TUBB4B und UBQLN2 ausgewählt ist.

16. mRNA gemäß Anspruch 13, wobei die mindestens eine heterologe 5'-UTR und die mindestens eine heterologe 3' UTR aus einer UTR-Kombination von a-1 (HSD17B4/PSMB3) oder i-3 (-/muag) ausgewählt ist.

17. mRNA gemäß Anspruch 16, wobei die mRNA eine RNA-Sequenz umfasst oder aus einer RNA-Sequenz besteht, welche zu mindestens 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, oder 99% identisch ist mit einer Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 22792, 23518, 23536, 23554, 23572, 23590, 23608, 23532, 23550, 23568, 23586, 23604, 23622, 22812, 23528, 23546, 23564, 23582, 23600, 23618, 23529, 23547, 23565, 23583, 23601, 23619, 23531, 23549, 23567, 23585, 23603, 23621, 23533, 23551, 23569, 23587, 23605, 23623, 23534, 23552, 23570, 23588, 23606 und 23624.

18. mRNA gemäß irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die mRNA mindestens einen Histon-Stem-Loop umfasst.

19. mRNA gemäß irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die mRNA mindestens ein modifiziertes Nukleotid, ausgewählt aus Pseudouridin (Ψ) und N1-Methylpseudouridin (m1Ψ), umfasst.

20. mRNA gemäß Anspruch 19, wobei das mindestens eine modifizierte Nukleotid N1-Methylpseudouridin (m1ψ) ist.

21. mRNA gemäß Anspruch 19 oder 20, wobei alle Uracil-Nukleotide durch Pseudouridin (Ψ) und/oder N1-Methylpseudouridin (m1Ψ)-Nukleotide ersetzt sind.

22. mRNA gemäß Anspruch 21, wobei alle Uracil-Nukleotide durch N1-Methylpseudouridin (m1 Ψ)-Nukleotide ersetzt sind.

23. mRNA gemäß irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die mRNA eine gereinigte mRNA ist, die durch RP-HPLC und/oder TFF aufgereinigt wurde und vorzugsweise etwa 5%, 10% oder 20% weniger doppelsträngige RNA-Nebenprodukte umfasst als eine mRNA, die nicht mit RP-HPLC und/oder TFF aufgereinigt wurde.

24. Zusammensetzung, umfassend eine mRNA nach einem der Ansprüche 1 bis 23.

25. Zusammensetzung nach Anspruch 24, wobei die Zusammensetzung eine multivalente Zusammensetzung ist, umfassend eine Mehrzahl oder mindestens mehr als eine der mRNA wie durch irgendeinen der Ansprüche 1 bis 23 definiert, wobei jede mRNA ein unterschiedliches präfusionsstabilisiertes Spike-Protein (S) kodiert, das aus unterschiedlichen SARS-CoV-2-Virus-Varianten/Isolaten abgeleitet ist, wobei die unterschiedlichen präfusionsstabilisierten Spike-Proteine Aminosäure-Modifikationen in dem S-Protein aufweisen, umfassend:
(i) delH69, delV70, Y453F, D614G, I692V und M12291;
(ii) delH69, delV70, delY144, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A und D1118H;
(iii) L18F, D80A, D215G, delL242, delA243, delL244, R246I, K417N, E484K, N501Y, D614G und A701V;
(iv) L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y und T1027I; und/oder
(v) S13I, W152C, L452R, und D614G.

26. Vakzine, umfassend eine mRNA gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 23.

27. Vakzine gemäß Anspruch 26, wobei die Vakzine eine adaptive Immunantwort, vorzugsweise eine protektive adaptive Immunantwort gegen ein Coronavirus, vorzugsweise gegen das Coronavirus SARS-CoV-2, hervorruft.

28. Kit oder Kit von Teilen, umfassend die mRNA gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 23, die Zusammensetzung gemäß Anspruch 24 oder 25, und/oder die Vakzine gemäß Anspruch 26 oder 27, optional umfassend ein flüssiges Vehikel zur Solubilisierung und, optional, technische Instruktionen, die Informationen zur Verabreichung und Dosierung der Komponenten liefern.

29. mRNA gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 23, die Zusammensetzung gemäß Anspruch 24 oder 25, die Vakzine gemäß Anspruch 26 oder 27, oder das Kit oder Kit von Teilen gemäß Anspruch 28 zur Verwendung als Medikament.

30. mRNA gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 23, die Zusammensetzung gemäß Anspruch 24 oder 25, die Vakzine gemäß Anspruch 26 oder 27, und/oder das Kit oder Kit von Teilen gemäß Anspruch 28 zur Verwendung bei der Behandlung oder Prophylaxe einer Infektion mit einem Coronavirus oder einer mit einer solchen Infektion verbundenen Störung.

31. mRNA gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 23, die Zusammensetzung gemäß Anspruch 24 oder 25, die Vakzine gemäß Anspruch 26 oder 27, und/oder das Kit oder Kit von Teilen gemäß Anspruch 28 zur Verwendung bei der Behandlung oder Prophylaxe einer Infektion mit einem SARS-CoV-2-Coronavirus, oder einer mit einer solchen Infektion verbundenen Störung.

32. mRNA gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 23, die Zusammensetzung gemäß Anspruch 24 oder 25, die Vakzine gemäß Anspruch 26 oder 27, und/oder das Kit oder Kit von Teilen gemäß Anspruch 28 zur Verwendung bei der Behandlung oder Prophylaxe einer Infektion mit COVID-19 oder einer mit einer solchen Infektion verbundenen Störung.

33. mRNA gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 23, die Zusammensetzung gemäß Anspruch 24 oder 25, die Vakzine gemäß Anspruch 26 oder 27, und/oder das Kit oder Kit von Teilen gemäß Anspruch 28 zur Prophylaxe einer Infektion mit COVID-19 oder einer mit einer solchen Infektion verbundenen Störung.

34. mRNA gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 23, die Zusammensetzung gemäß Anspruch 24 oder 25, die Vakzine gemäß Anspruch 26 oder 27, und/oder das Kit oder Kit von Teilen gemäß Anspruch 28 zur Verwendung gemäß Anspruch 31 oder 32, wobei eine schwere COVID-19-Erkrankung in dem Subjekt für einen Zeitraum von mindestens ungefähr sechs Monaten verhindert wird.

35. mRNA gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 23, die Zusammensetzung gemäß Anspruch 24 oder 25, die Vakzine gemäß Anspruch 26 oder 27, und/oder das Kit oder Kit von Teilen gemäß Anspruch 28 zur Verwendung bei der Stimulation einer Immunantwort, wobei die mRNA neutralisierende Antikörper gegen SARS-CoV-2 in dem Subjekt stimuliert.

Es folgen 69 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

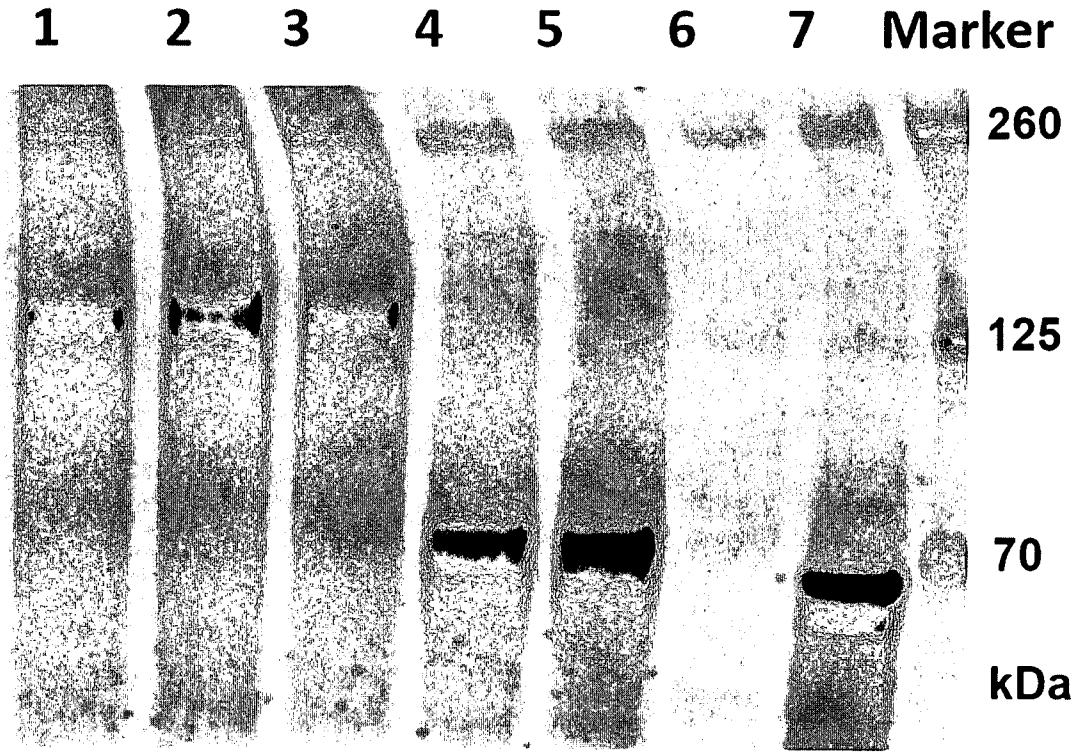


FIG 1

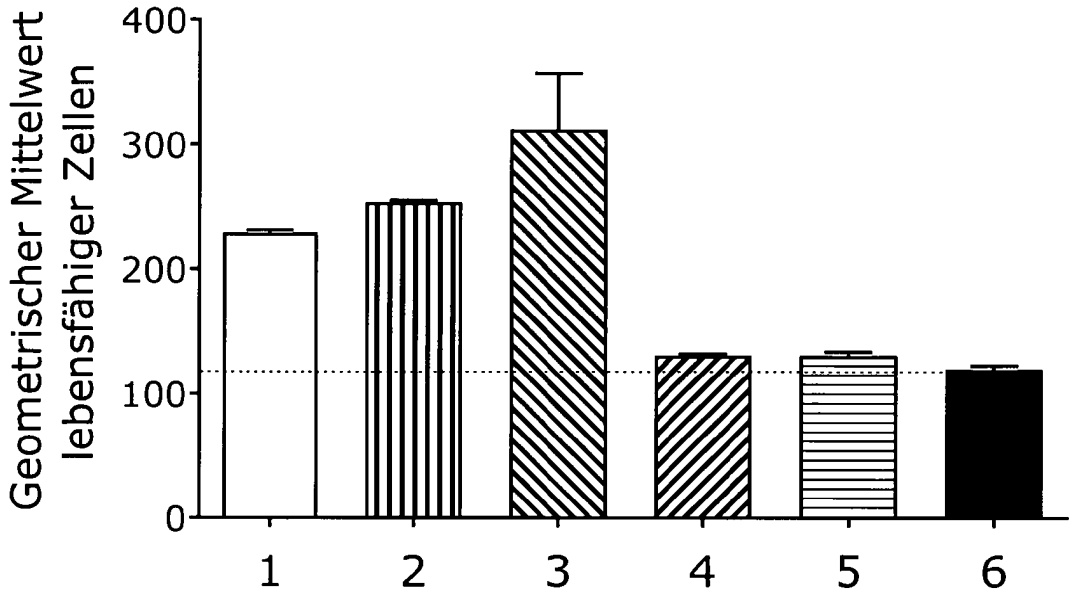

Geometrischer Mittelwert lebensfähiger Zellen
400
300
200
100
0
1
2
3
4
5
6

FIG 2

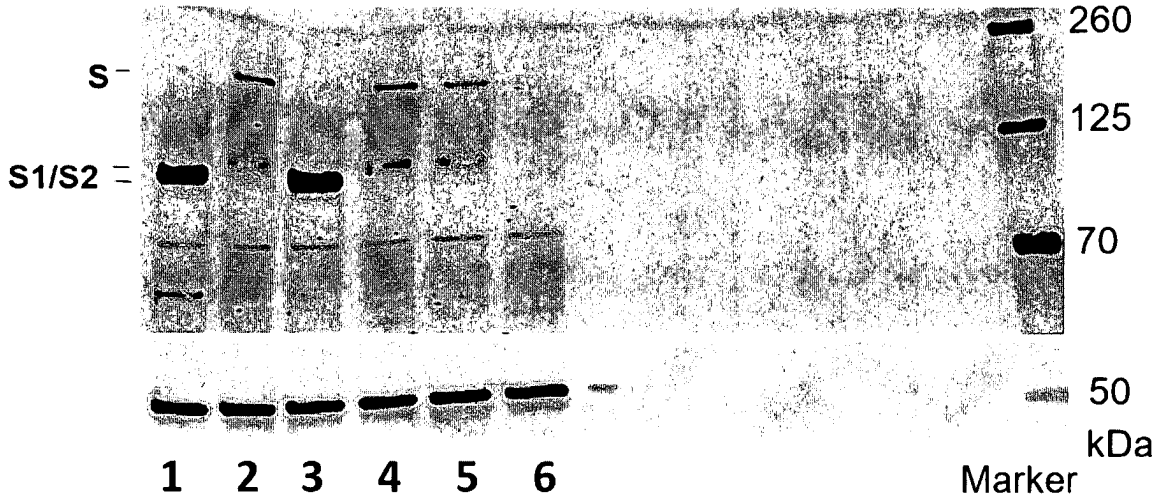


FIG 3

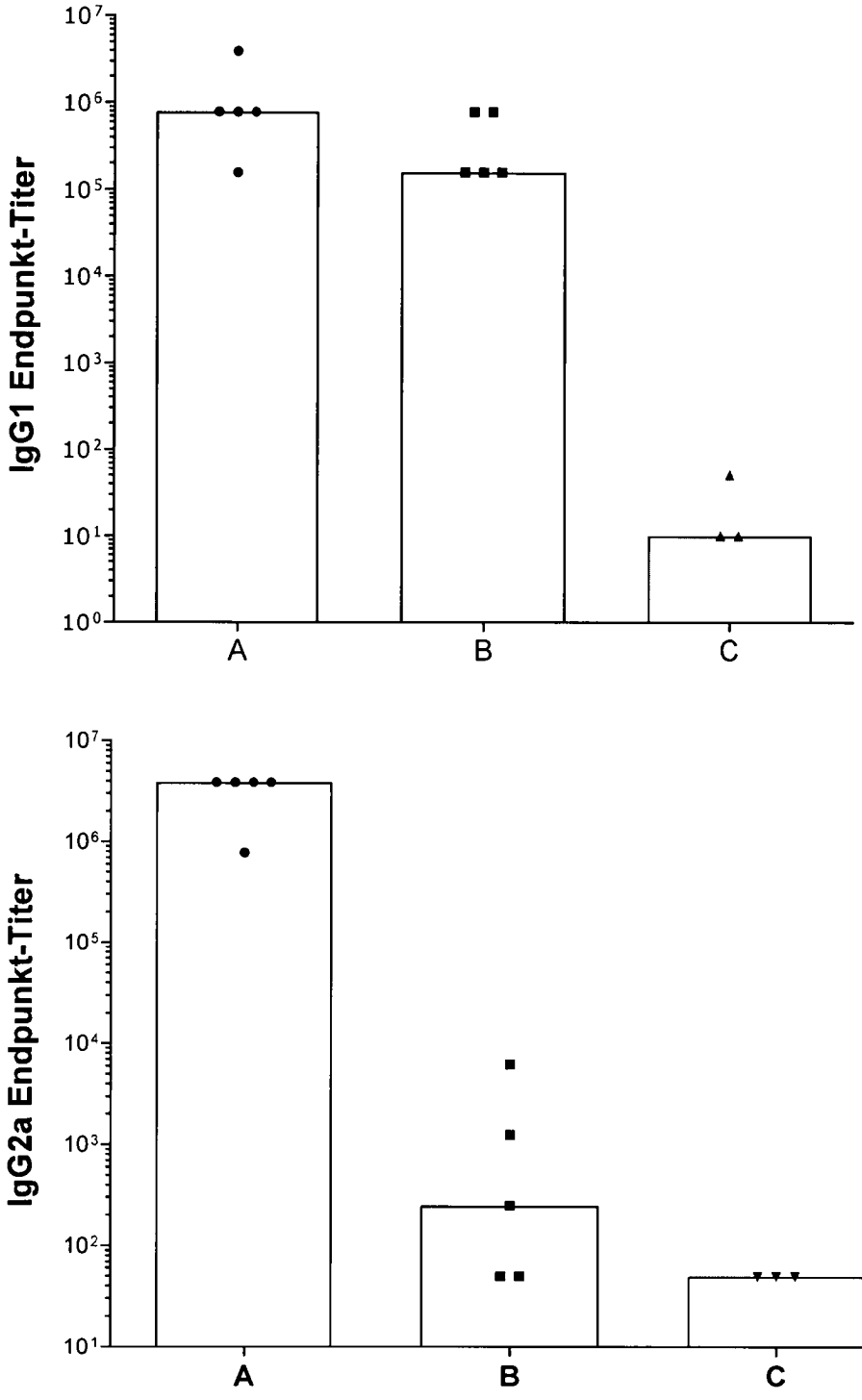

IgG1 Endpunkt-Titer
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
A
B
C
IgG2a Endpunkt-Titer
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
A
B
C

FIG 4

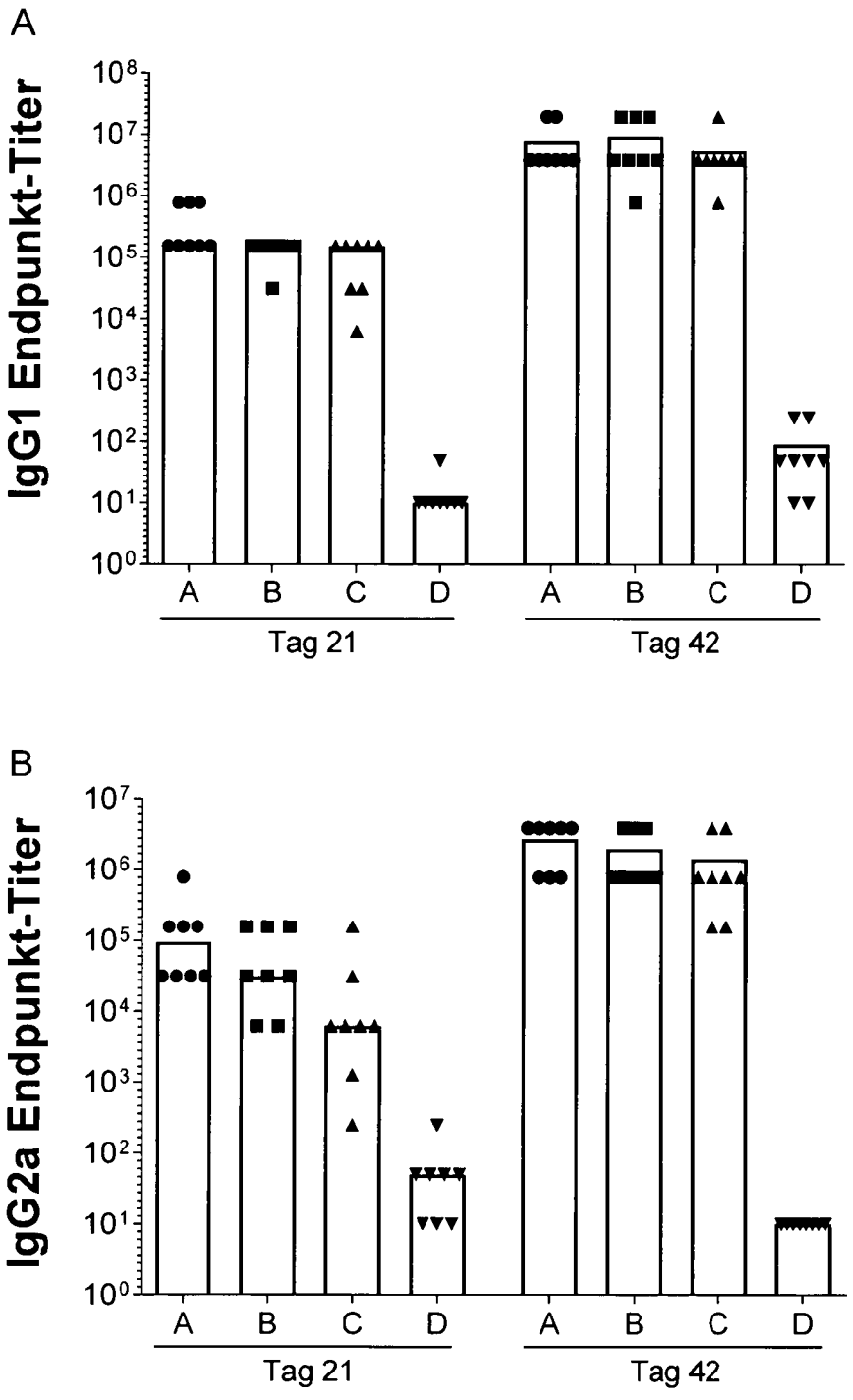

A
IgG1 Endpunkt-Titer
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
A B C D A B C D
Tag 21
Tag 42
B
IgG2a Endpunkt-Titer
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
A B C D A B C D
Tag 21
Tag 42

FIG 5

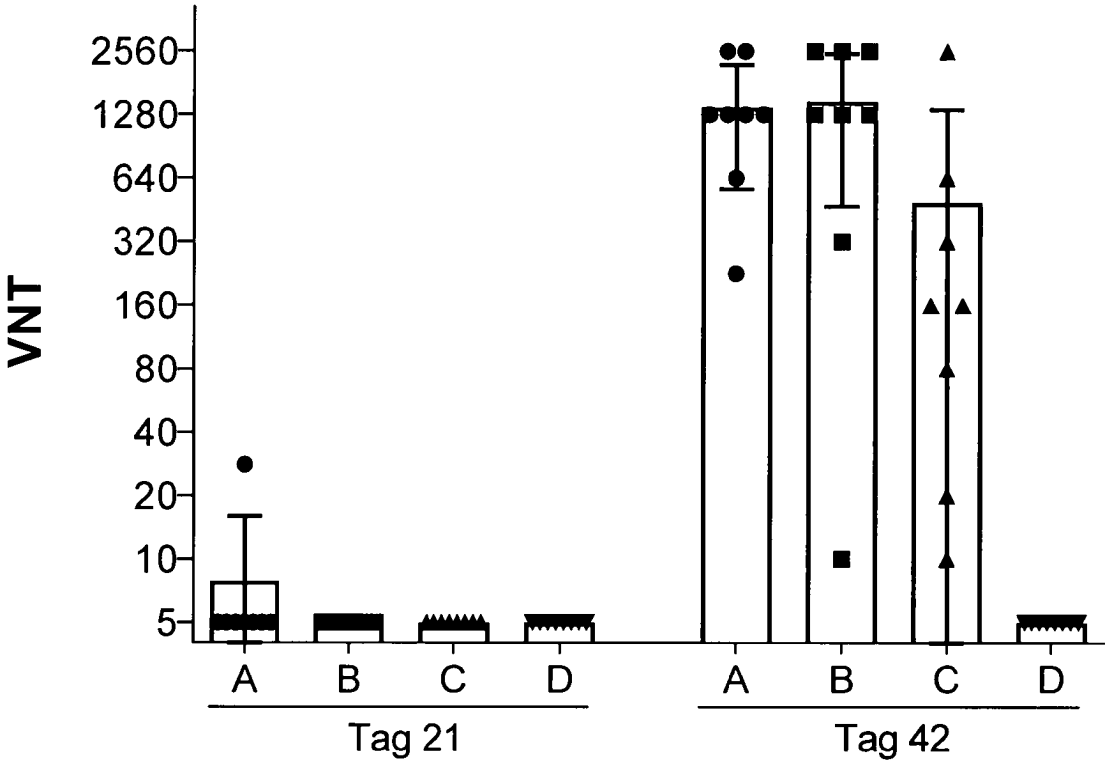


FIG 5 Fortsetzung

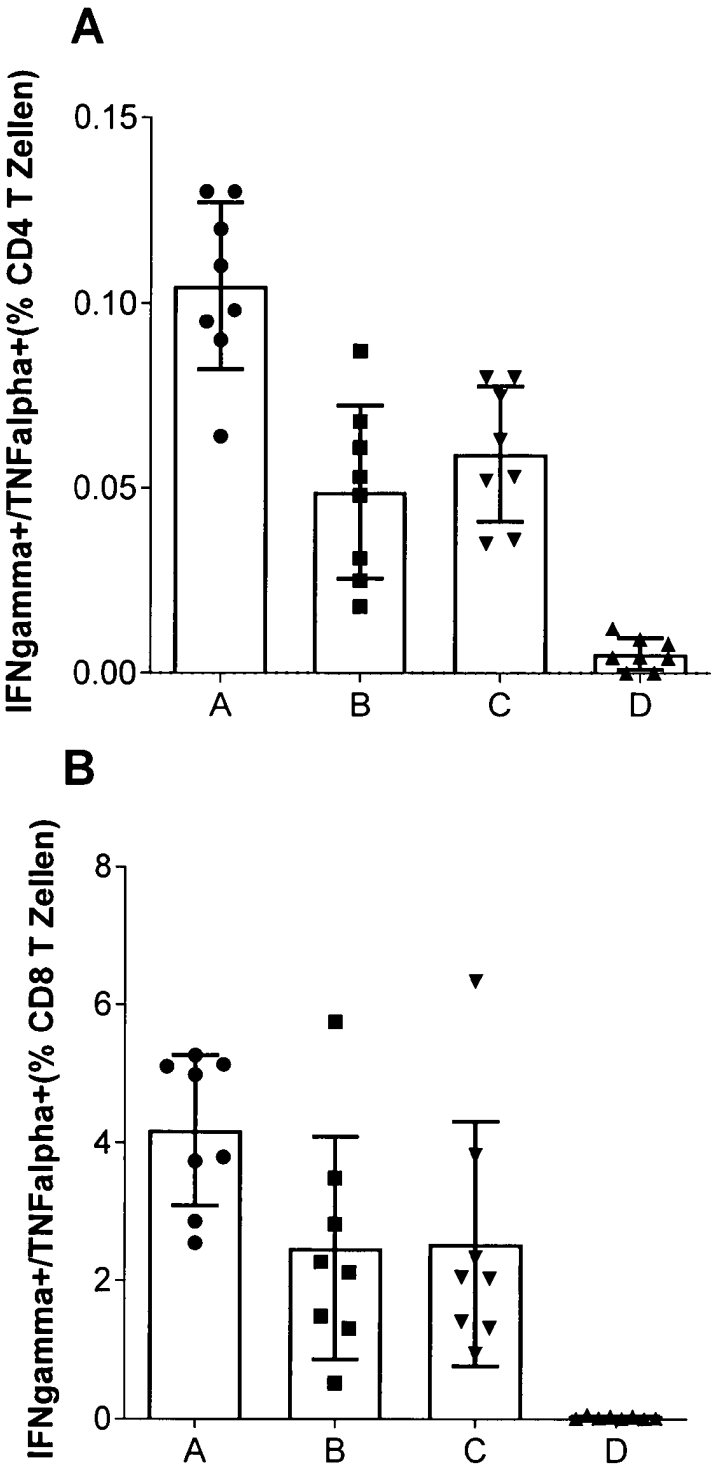

A
IFNgamma+/TNFalpha+(% CD4 T Zellen)
0.15
0.10
0.05
0.00
A
B
C
D
B
IFNgamma+/TNFalpha+(% CD8 T Zellen)
8
6
4
2
0
A
B
C
D

FIG 6

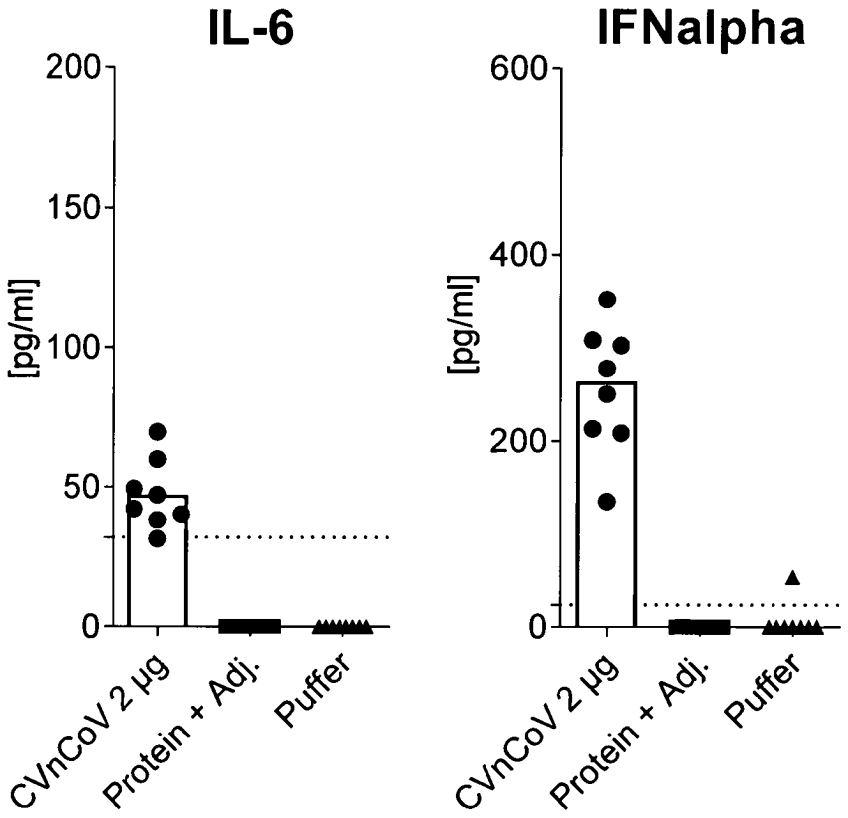

IL-6
IFNalpha
[pg/ml]
200
150
100
50
0
600
400
200
CVnCoV 2 µg
Protein + Adj.
Puffer

FIG 7 A

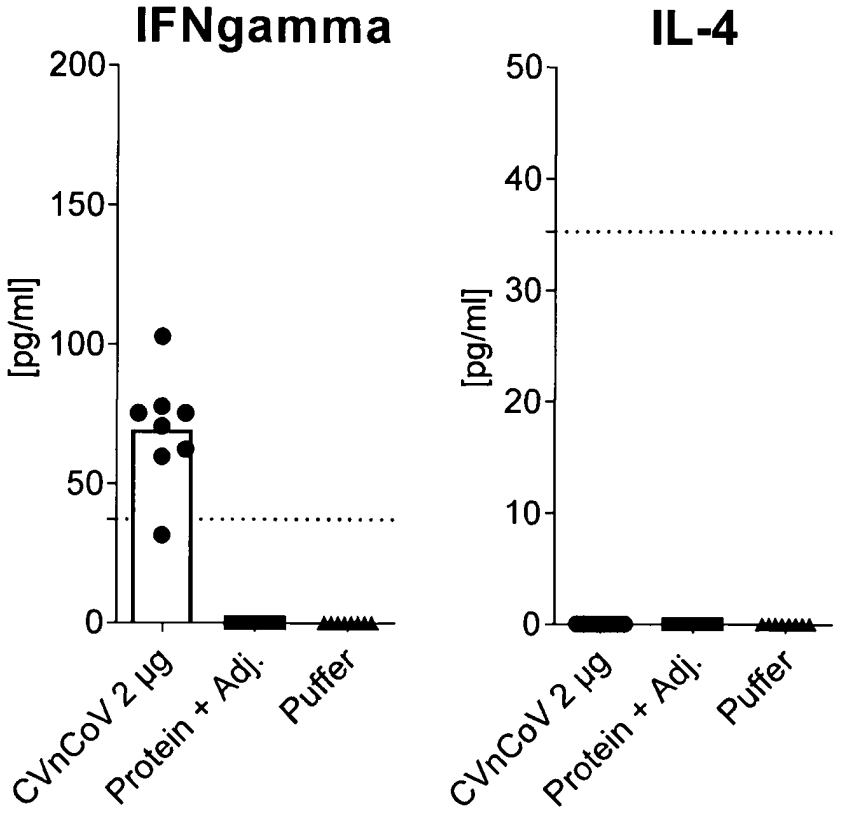

IFNgamma
[pg/ml]
200
150
100
50
0
CVnCoV 2 µg
Protein + Adj.
Puffer
IL-4
[pg/ml]
50
40
30
20
10
0
CVnCoV 2 µg
Protein + Adj.
Puffer

FIG 7 B

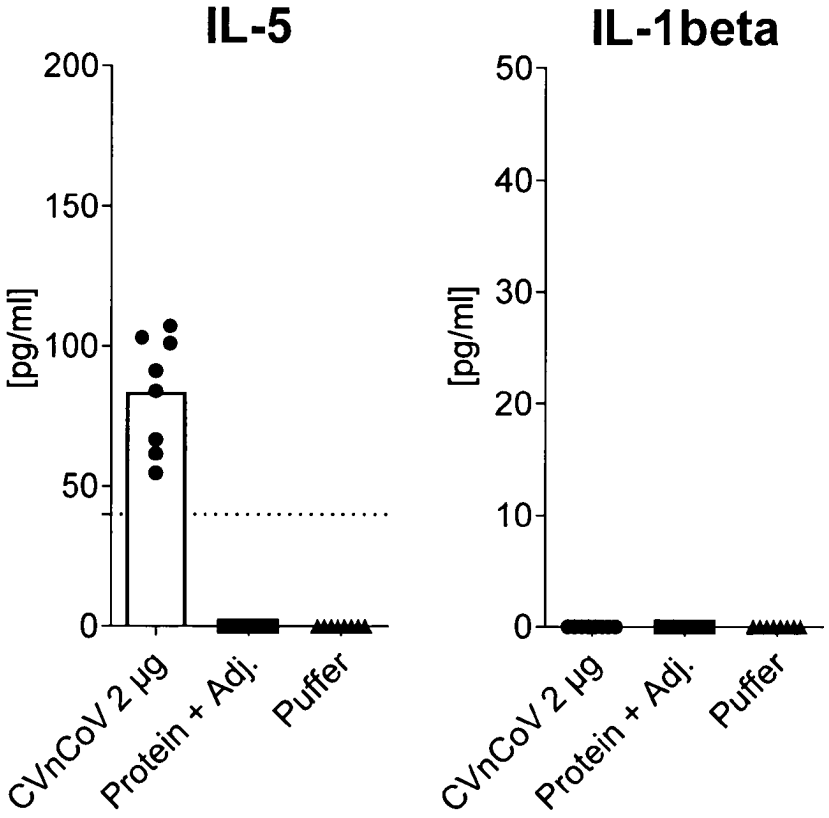

IL-5
200
150
100
50
0
[pg/ml]
CVnCoV 2 µg
Protein + Adj.
Puffer
IL-1beta
50
40
30
20
10
0
[pg/ml]
CVnCoV 2 µg
Protein + Adj.
Puffer

FIG 7 I C

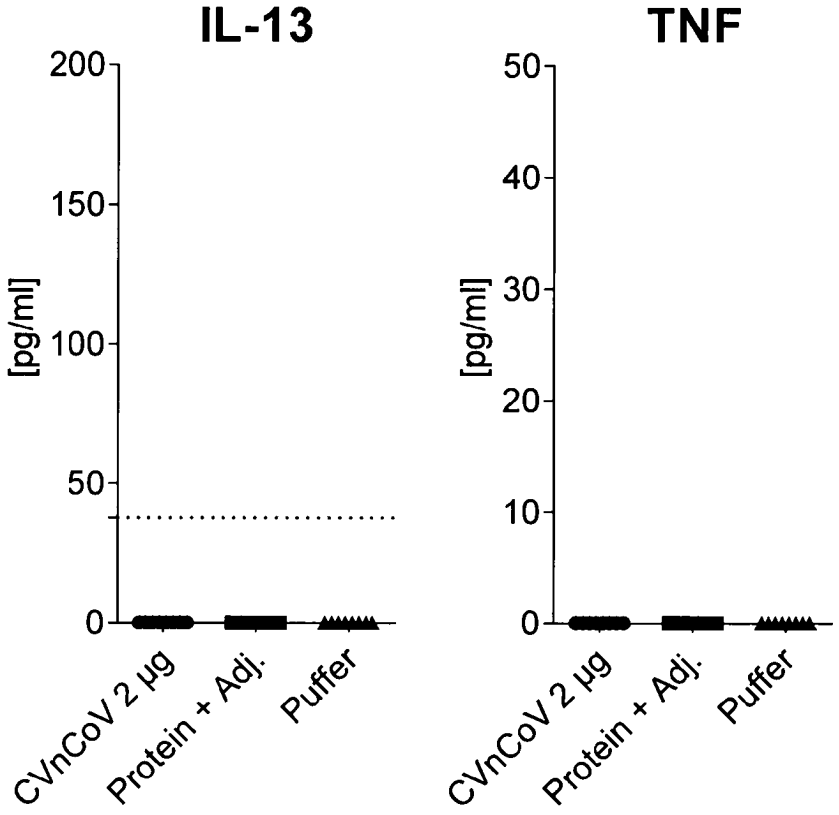
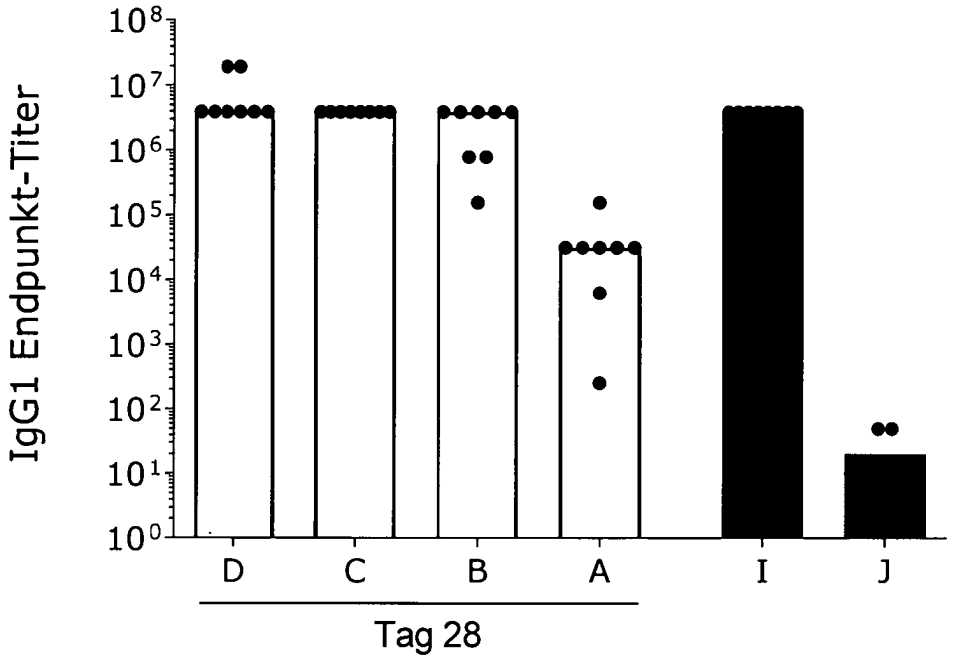

IL-13
200
150
100
50
0
[pg/ml]
CVnCoV 2 µg
Protein + Adj.
Puffer
TNF
50
40
30
20
10
0
[pg/ml]
CVnCoV 2 µg
Protein + Adj.
Puffer

FIG 7 D


IgG1 Endpunkt-Titer
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
D
C
B
A
I
J
Tag 28

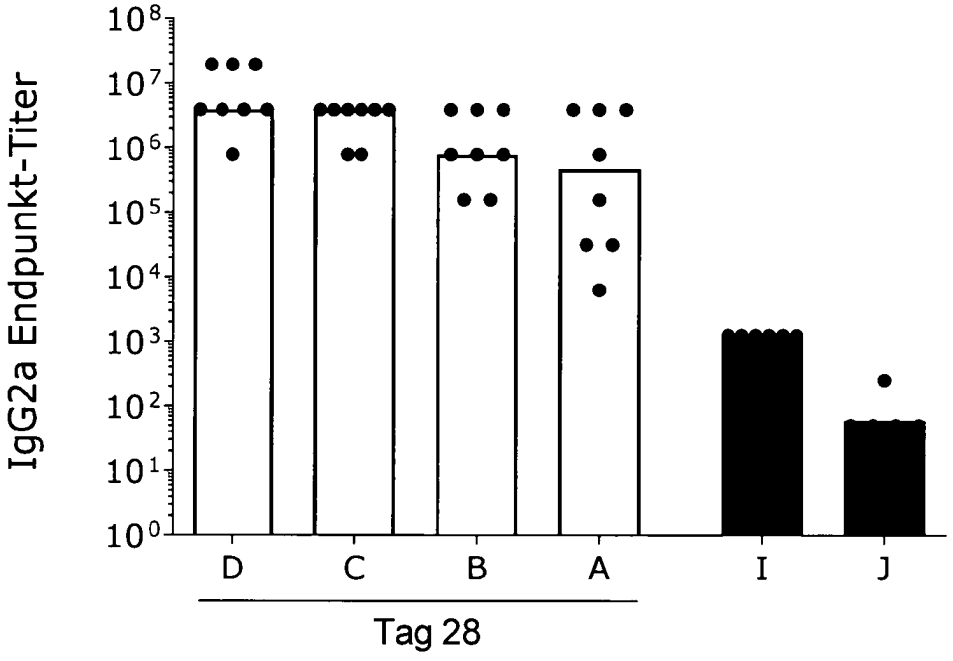

IgG2a Endpunkt-Titer
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
D
C
B
A
I
J
Tag 28

FIG 8 A

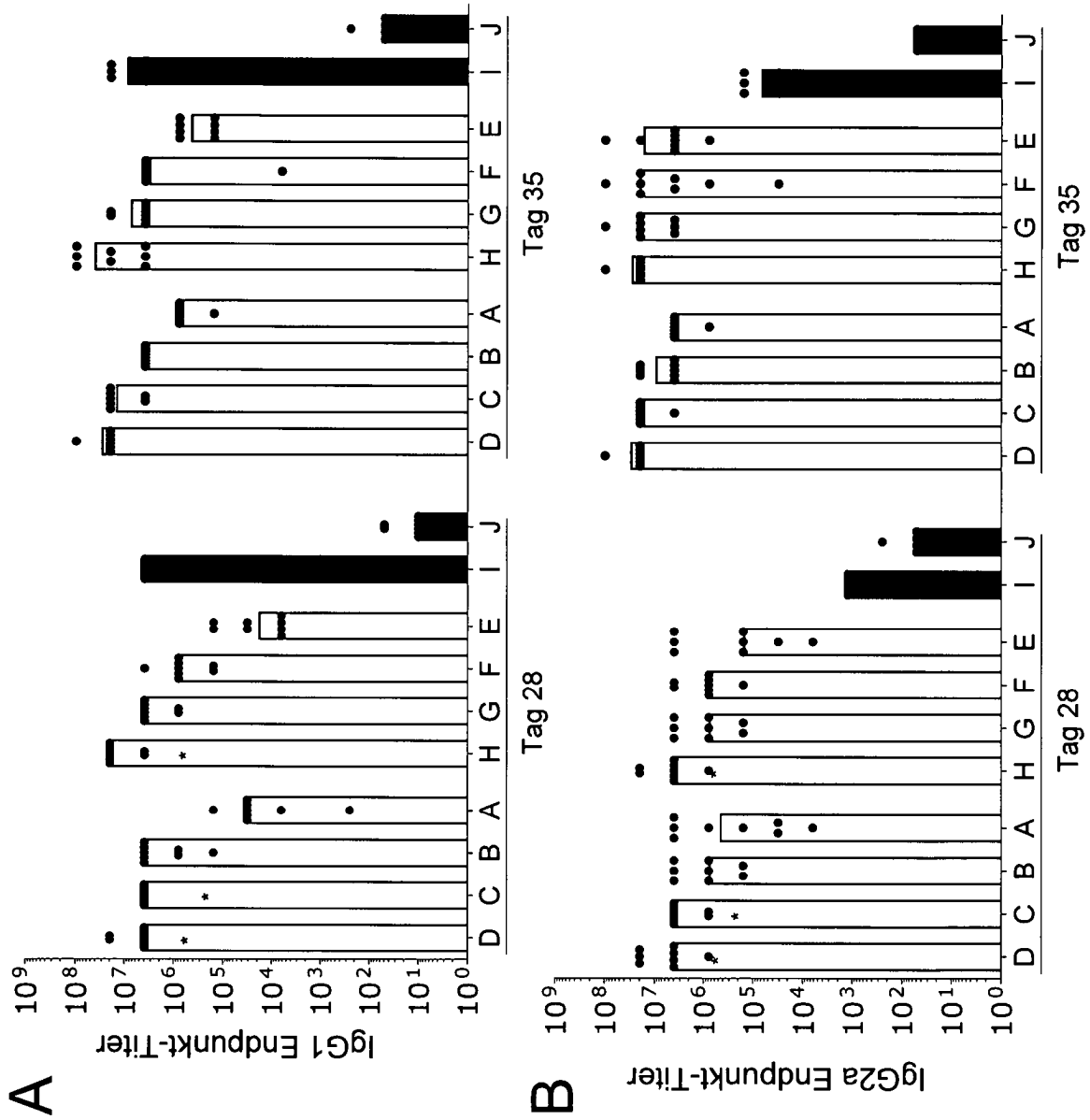

A
IgG1 Endpunkt-Titer
Tag 28
Tag 35
B
IgG2a Endpunkt-Titer
Tag 28
Tag 35
D C B A H G F E I J

FIG 8B

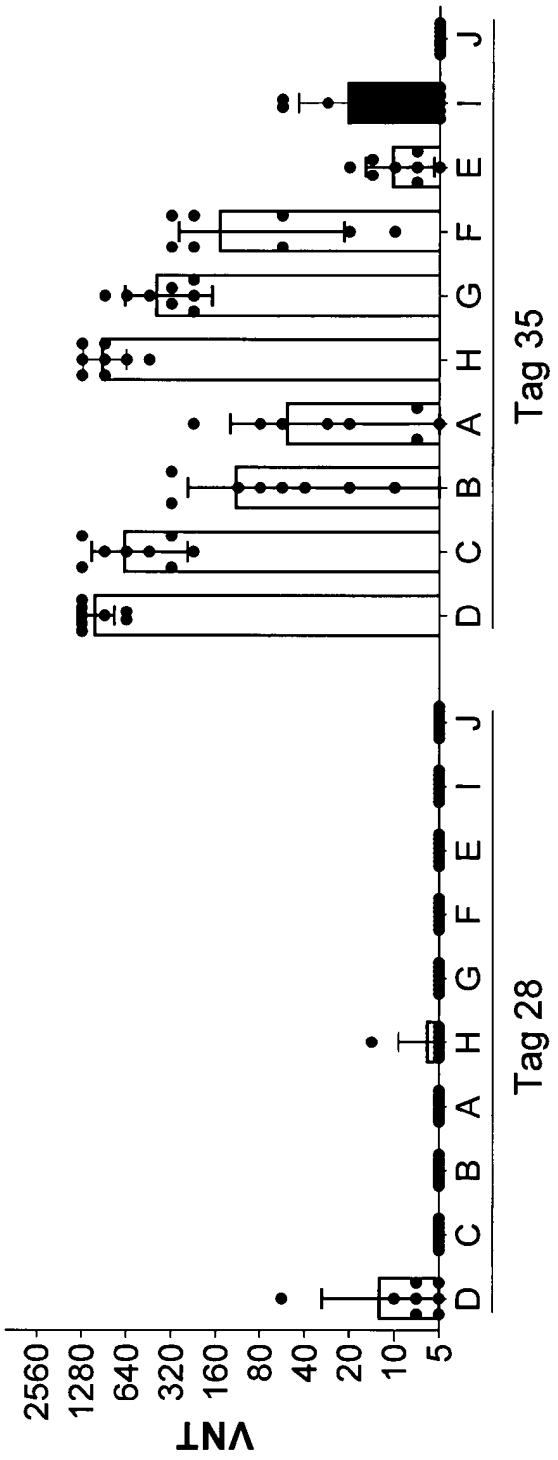

VNT
2560
1280
640
320
160
80
40
20
10
5
D C B A H G F E I J
Tag 28
D C B A H G F E I J
Tag 35

FIG 9A

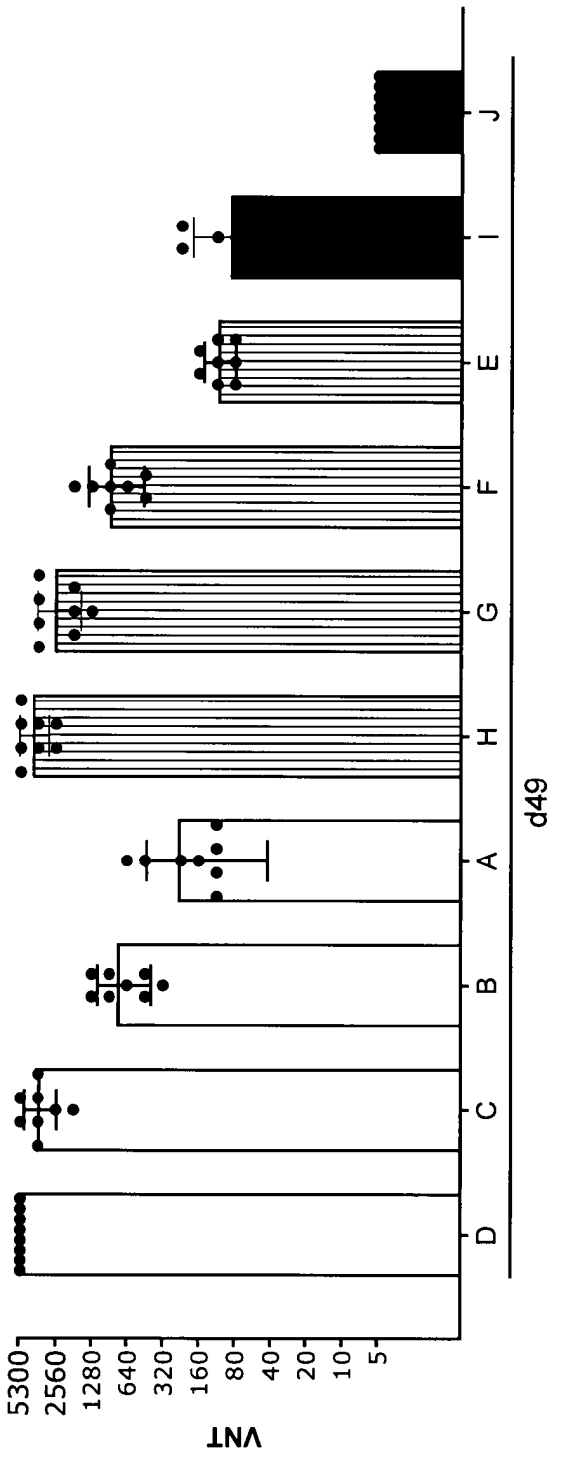


FIG 9B

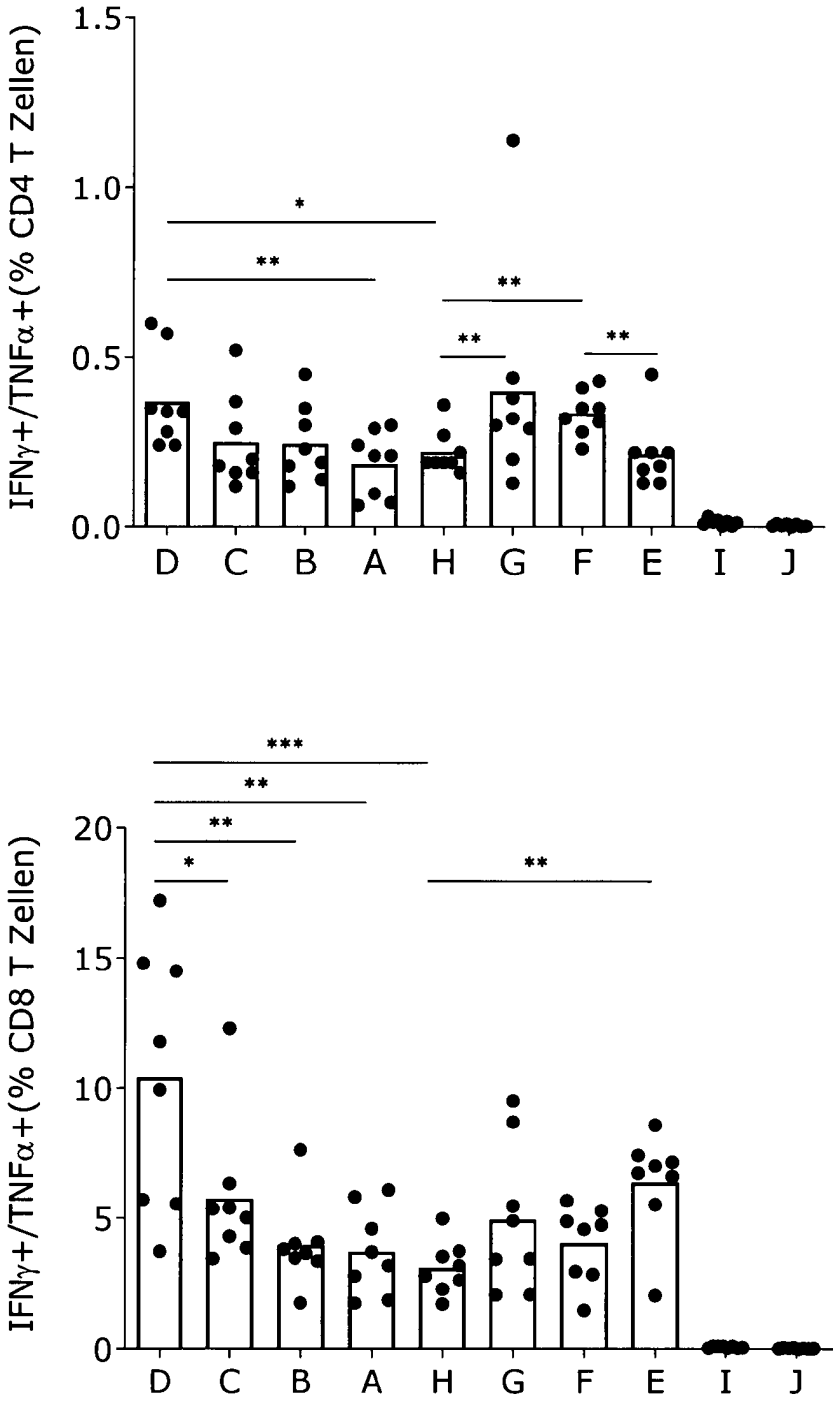

IFNγ+/TNFα+(% CD4 T Zellen)
1.5
1.0
0.5
0.0
*
**
**
**
**
D C B A H G F E I J
IFNγ+/TNFα+(% CD8 T Zellen)
***
**
**
*
**
20
15
10
5
0
D C B A H G F E I J

FIG 10

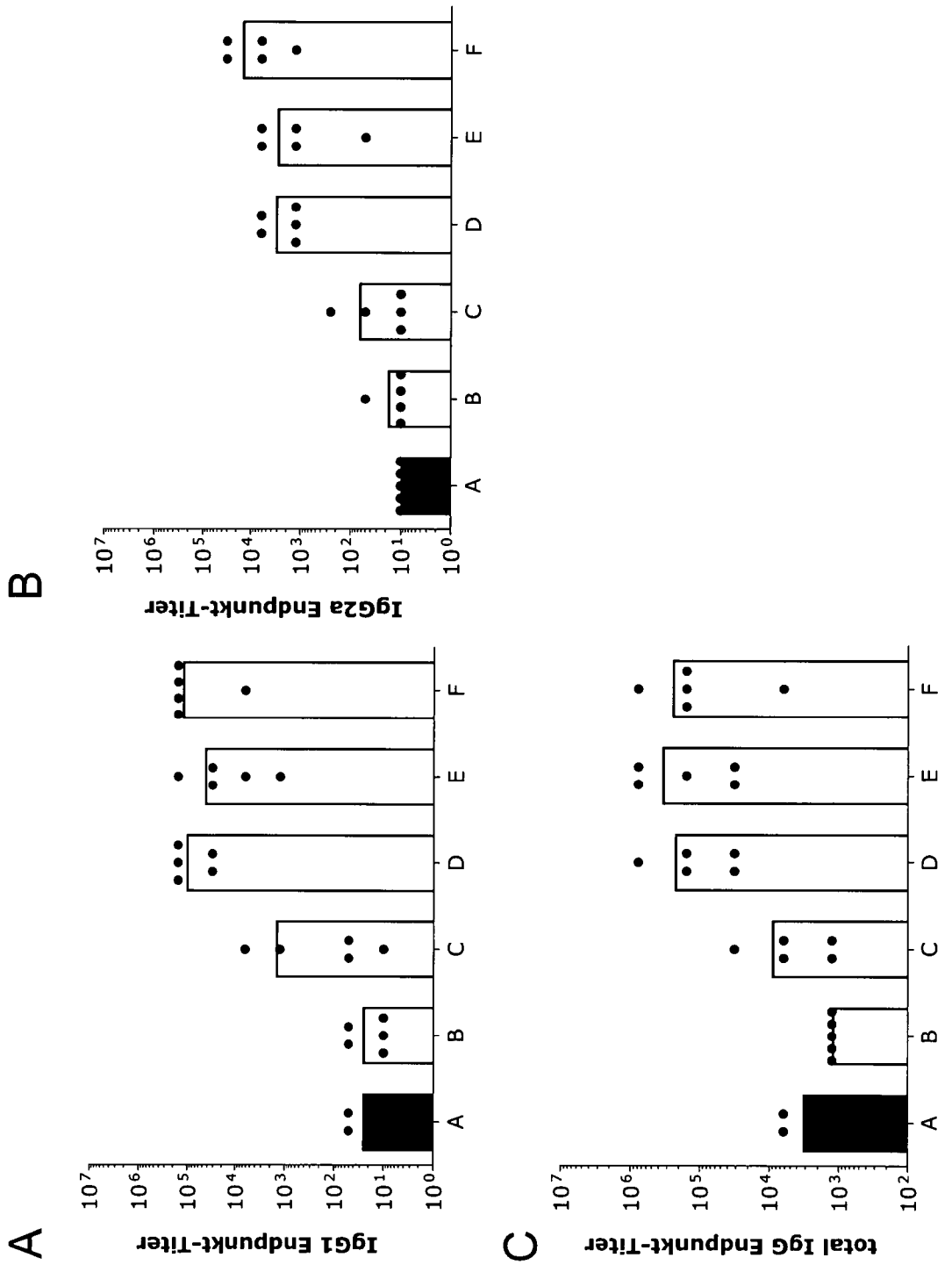

A
IgG1 Endpunkt-Titer
B
IgG2a Endpunkt-Titer
C
total IgG Endpunkt-Titer
A
B
C
D
E
F

FIG 11

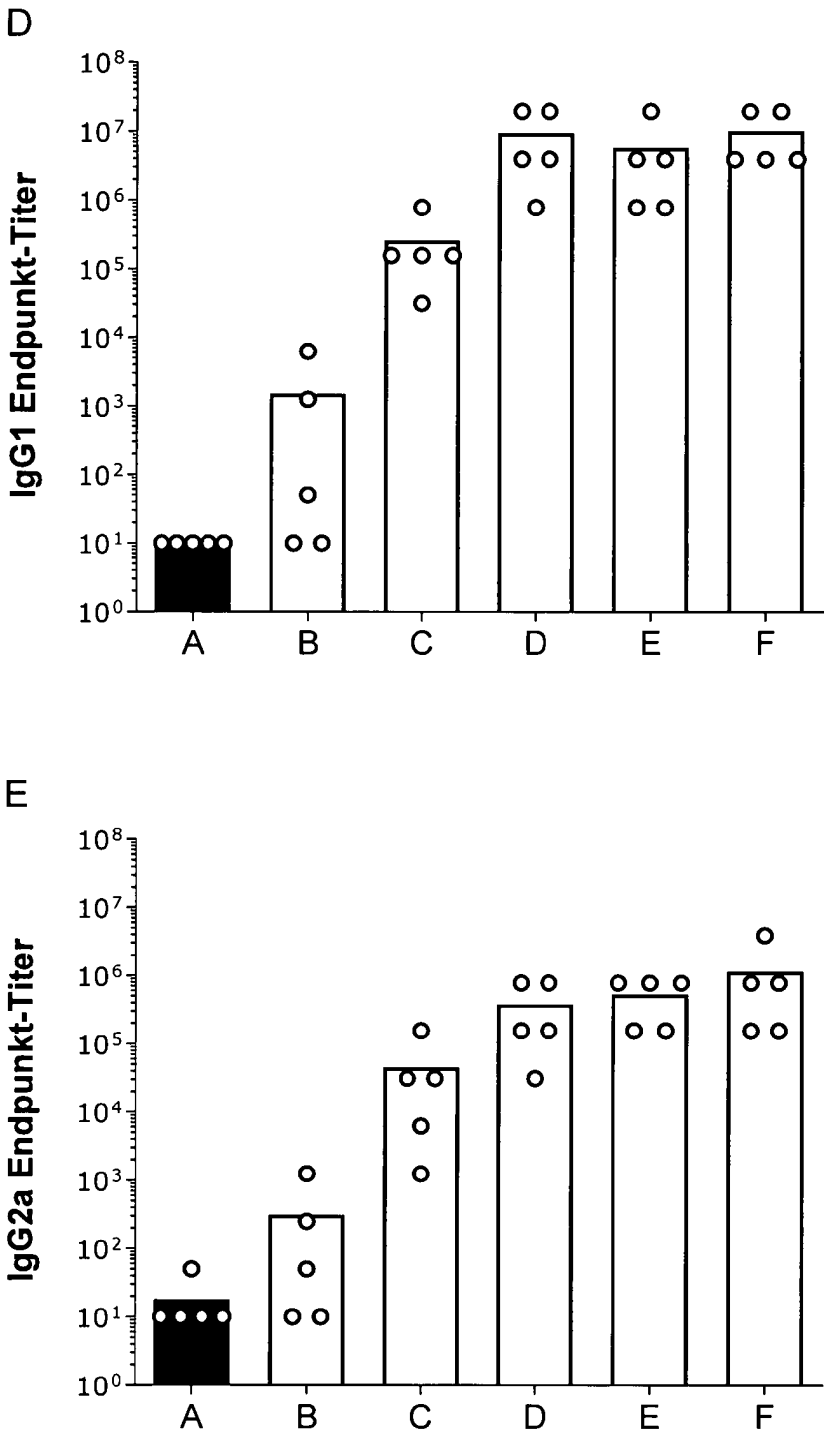


FIG 11 Fortsetzung

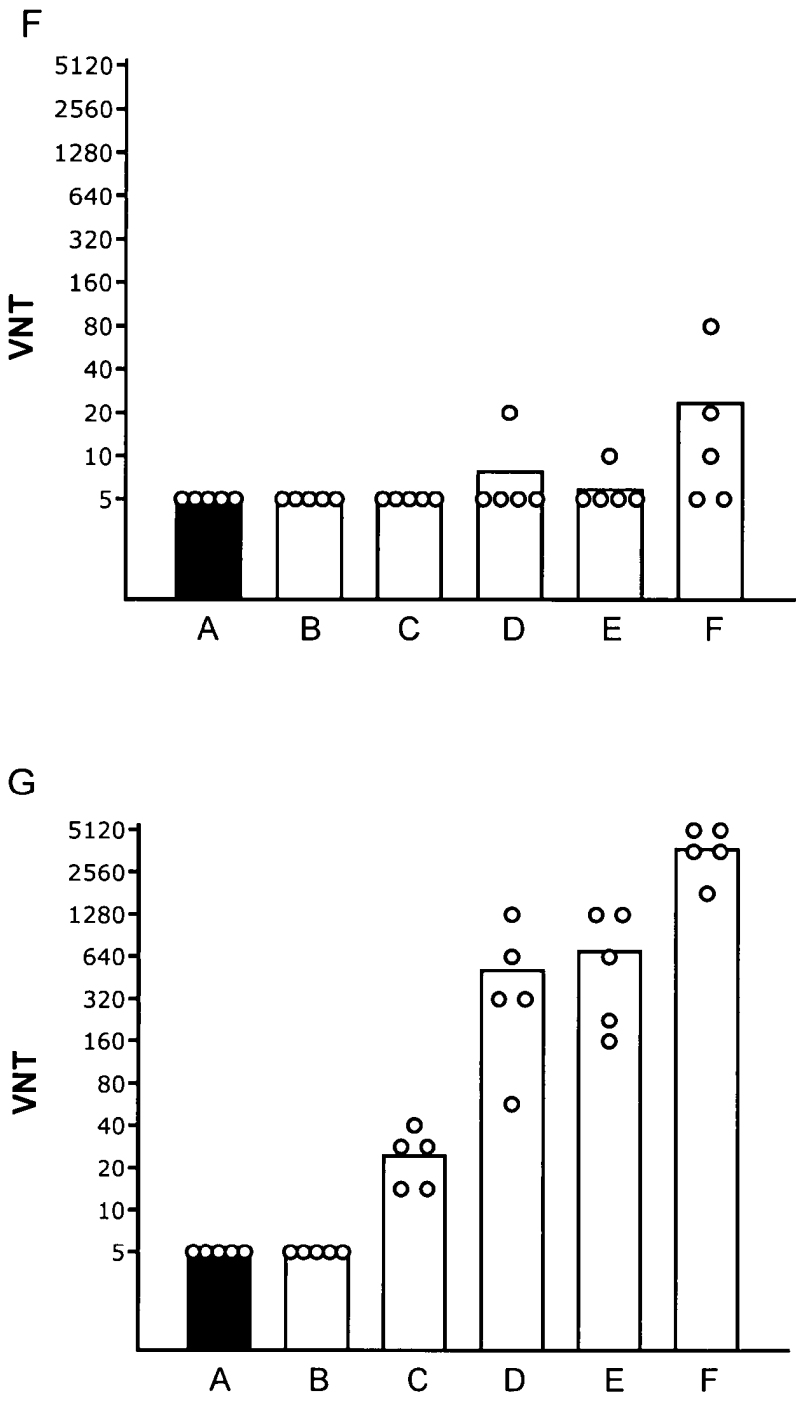


FIG 11 Fortsetzung

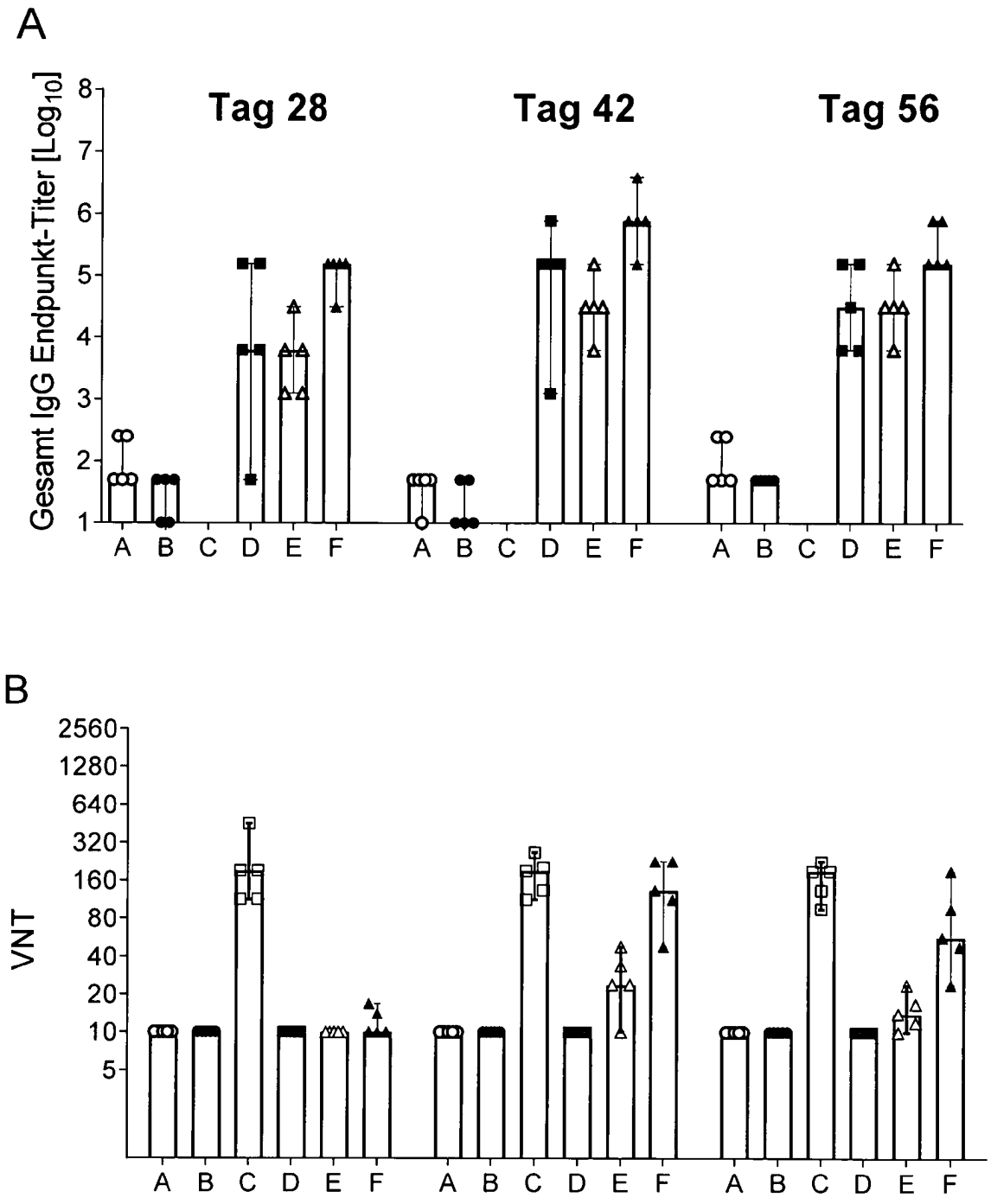

A
Gesamt IgG Endpunkt-Titer [Log10]
Tag 28
Tag 42
Tag 56
1
2
3
4
5
6
7
8
A B C D E F A B C D E F A B C D E F
B
VNT
2560
1280
640
320
160
80
40
20
10
5
A B C D E F A B C D E F A B C D E F

FIG 12

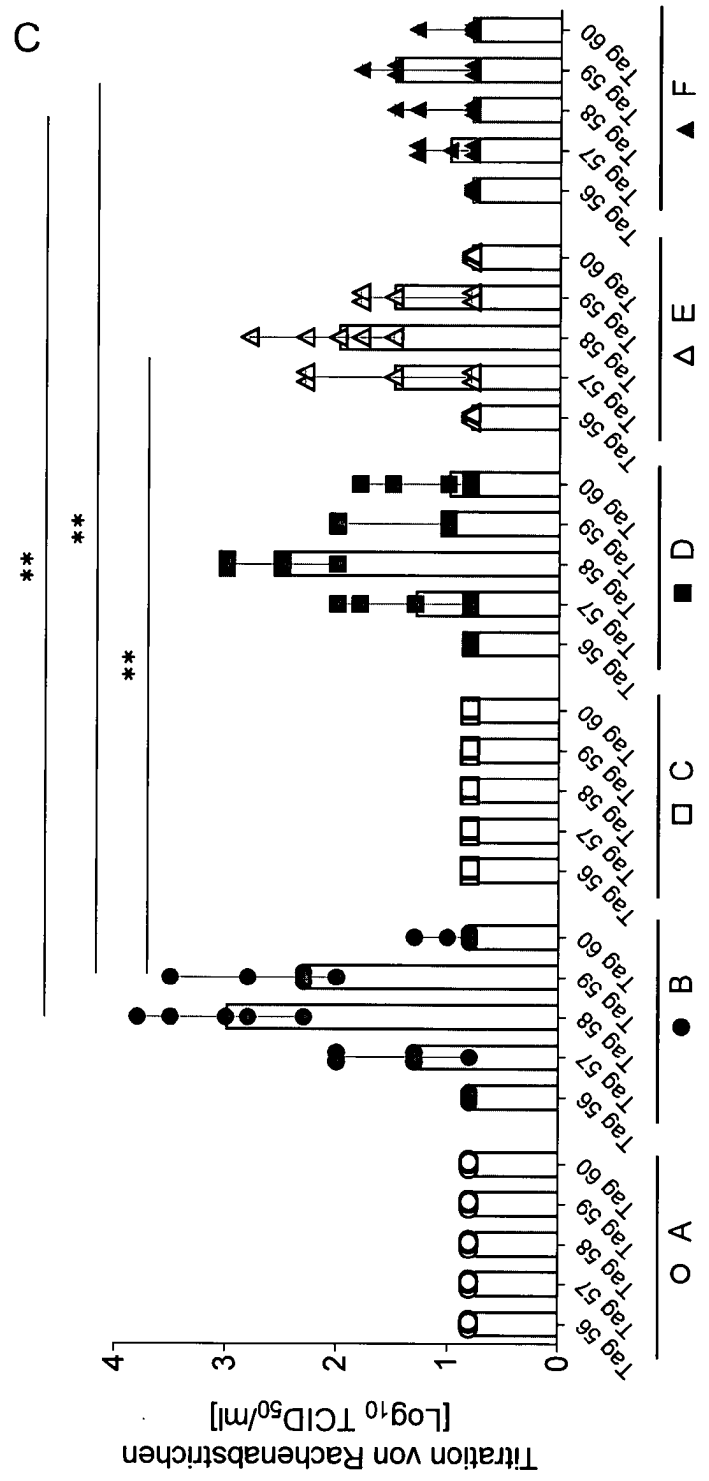


FIG 12 Fortsetzung

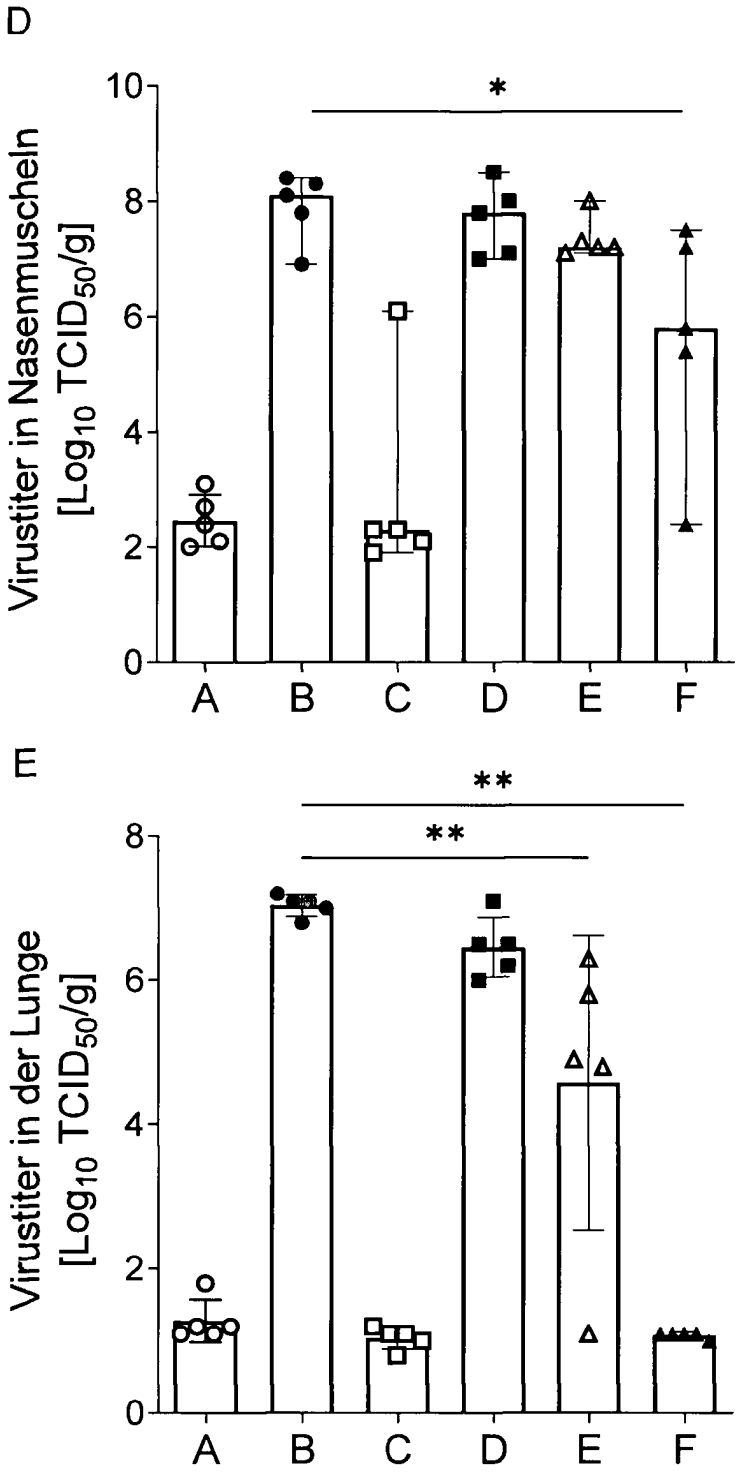


FIG 12 Fortsetzung

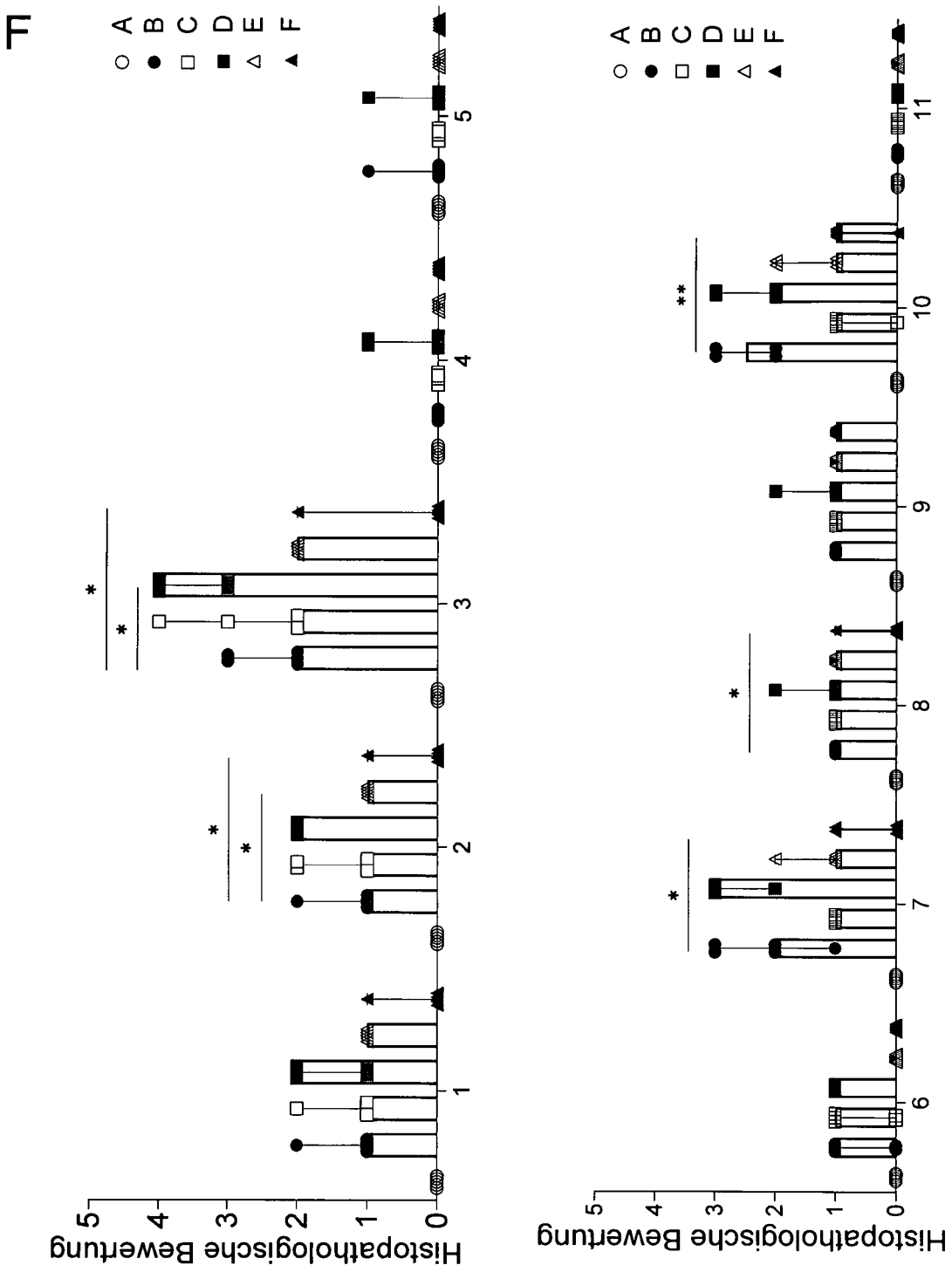
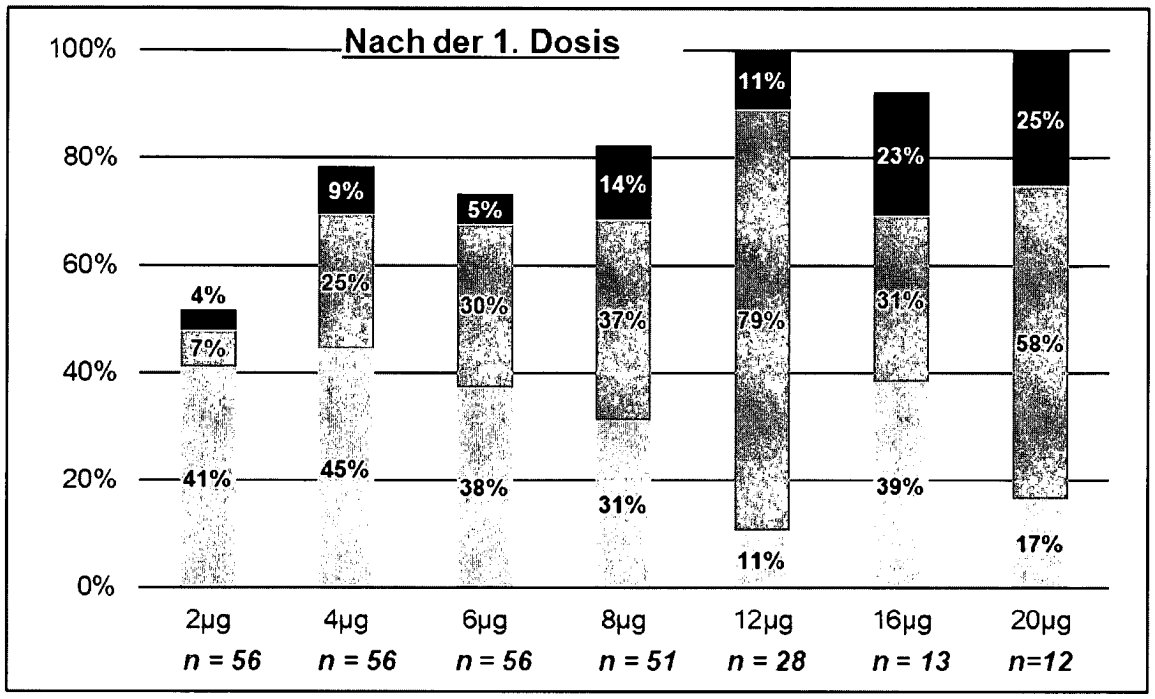


FIG 12 Fortsetzung


Nach der 1. Dosis
100%
80%
60%
40%
20%
0%
4%
7%
41%
9%
25%
45%
5%
30%
38%
14%
37%
31%
11%
79%
11%
23%
31%
39%
25%
58%
17%
2µg
n = 56
4µg
n = 56
6µg
n = 56
8µg
n = 51
12µg
n = 28
16µg
n = 13
20µg
n=12

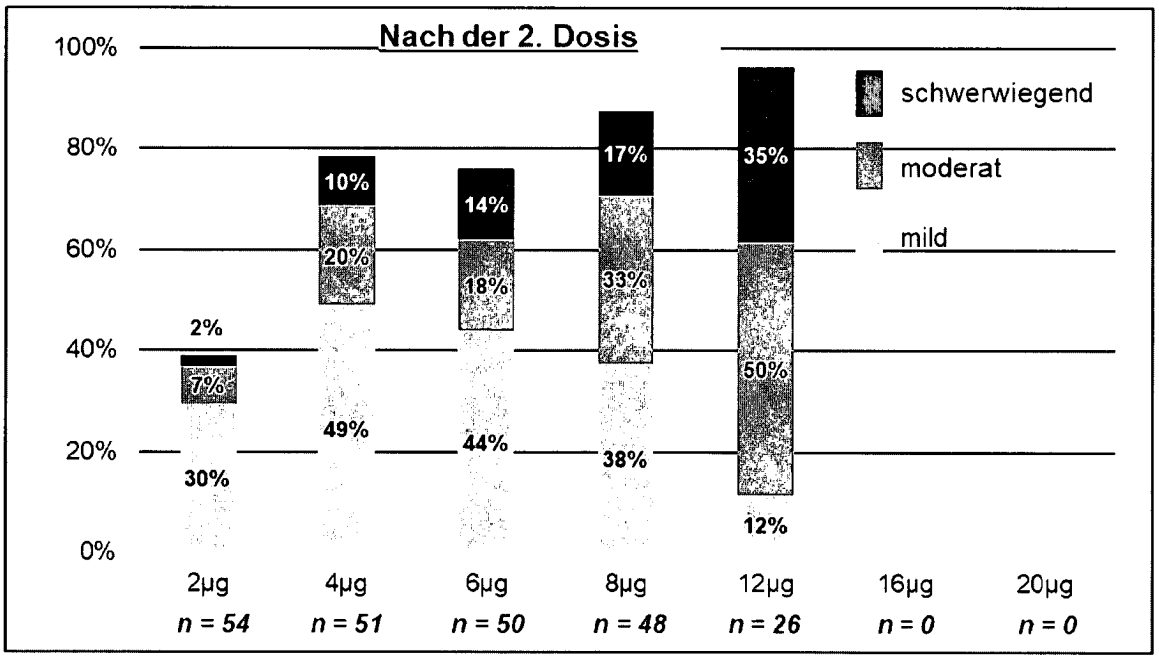
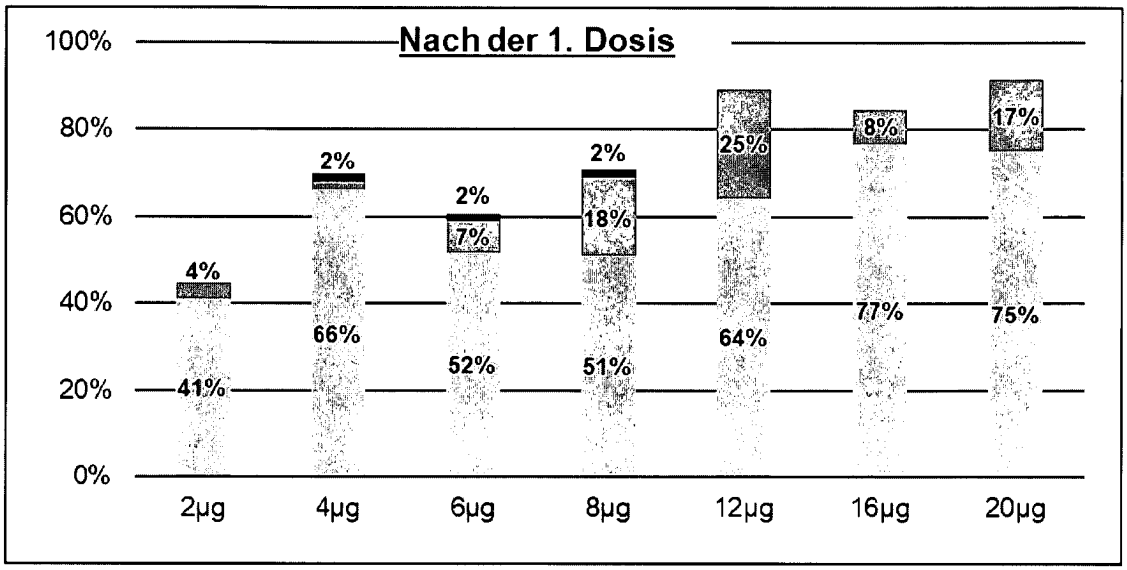

Nach der 2. Dosis
100%
80%
60%
40%
20%
0%
2%
7%
30%
10%
20%
49%
14%
18%
44%
17%
33%
38%
35%
50%
12%
schwerwiegend
moderat
mild
2µg
n = 54
4µg
n = 51
6µg
n = 50
8µg
n = 48
12µg
n = 26
16µg
n = 0
20µg
n = 0

FIG 13 A


Nach der 1. Dosis
100%
80%
60%
40%
20%
0%
4%
41%
2%
66%
2%
7%
52%
2%
18%
51%
25%
64%
8%
77%
17%
75%
2µg
4µg
6µg
8µg
12µg
16µg
20µg

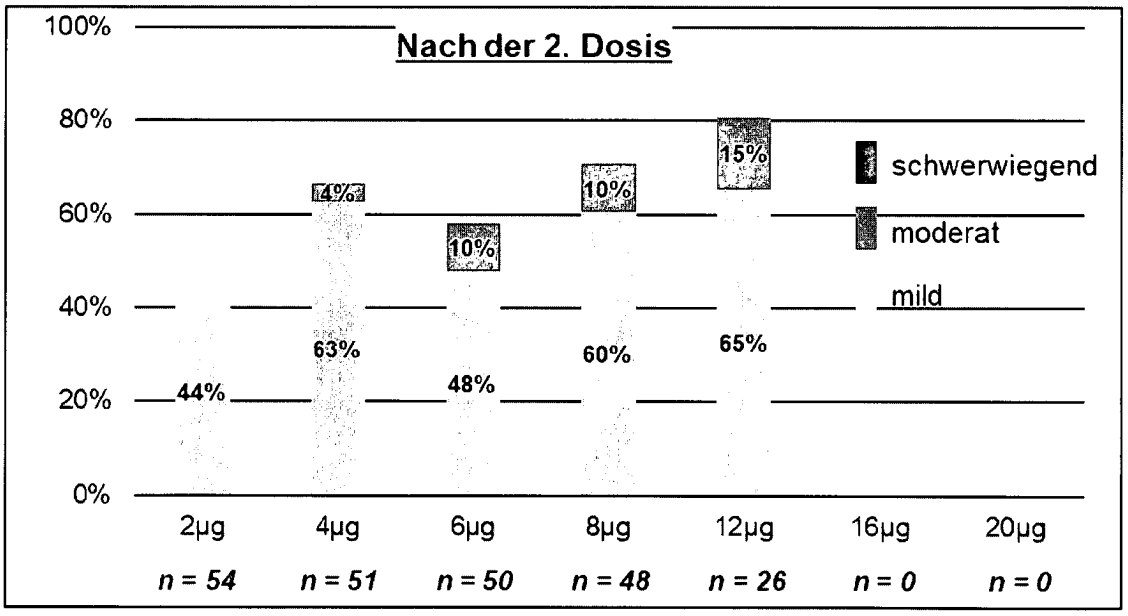

Nach der 2. Dosis
100%
80%
60%
40%
20%
0%
4%
44%
4%
63%
10%
48%
10%
60%
15%
65%
schwerwiegend
moderat
mild
2µg
4µg
6µg
8µg
12µg
16µg
20µg
n = 54
n = 51
n = 50
n = 48
n = 26
n = 0
n = 0

FIG 13 B

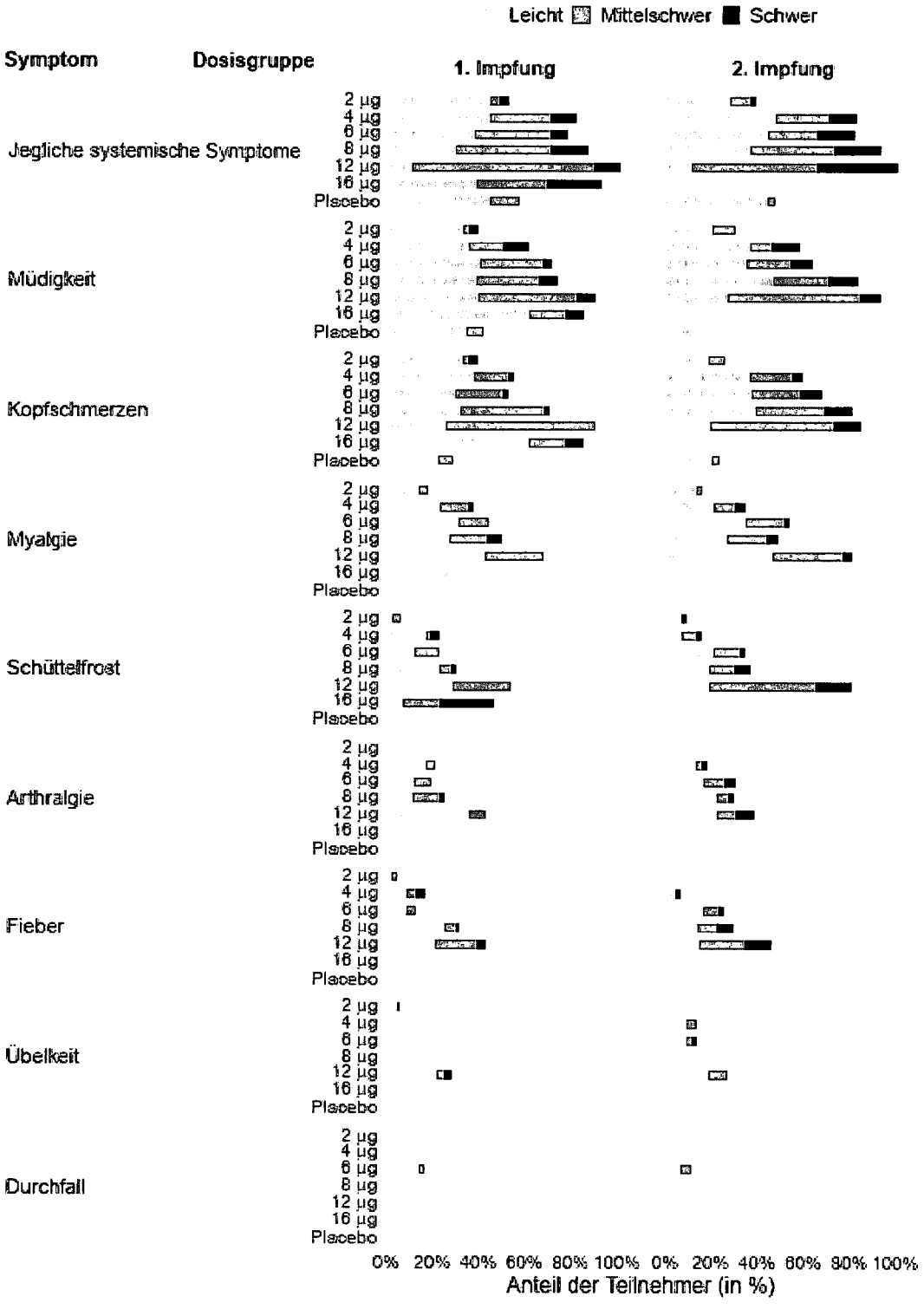

Leicht
Mittelschwer
Schwer
Symptom
Dosisgruppe
1. Impfung
2. Impfung
Jegliche systemische Symptome
Müdigkeit
Kopfschmerzen
Myalgie
Schüttelfrost
Arthralgie
Fieber
Übelkeit
Durchfall
2 µg
4 µg
6 µg
8 µg
12 µg
16 µg
Placebo
0% 20% 40% 60% 80% 100% 0% 20% 40% 60% 80% 100%
Anteil der Teilnehmer (in %)

FIG 13 C

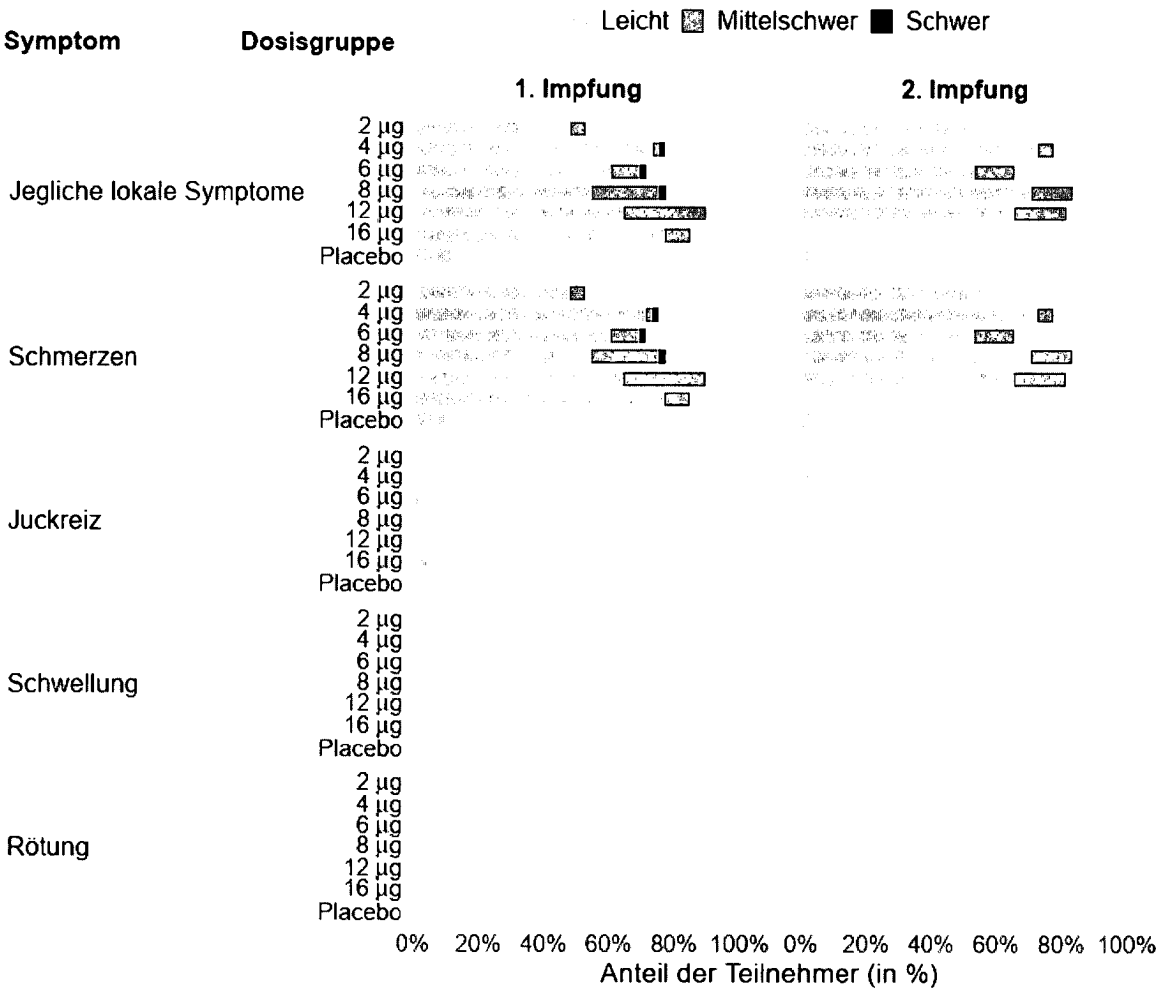

Symptom
Dosisgruppe
Leicht
Mittelschwer
Schwer
1. Impfung
2. Impfung
Jegliche lokale Symptome
Schmerzen
Juckreiz
Schwellung
Rötung
2 µg
4 µg
6 µg
8 µg
12 µg
16 µg
Placebo
0% 20% 40% 60% 80% 100% 0% 20% 40% 60% 80% 100%
Anteil der Teilnehmer (in %)

FIG 13 D

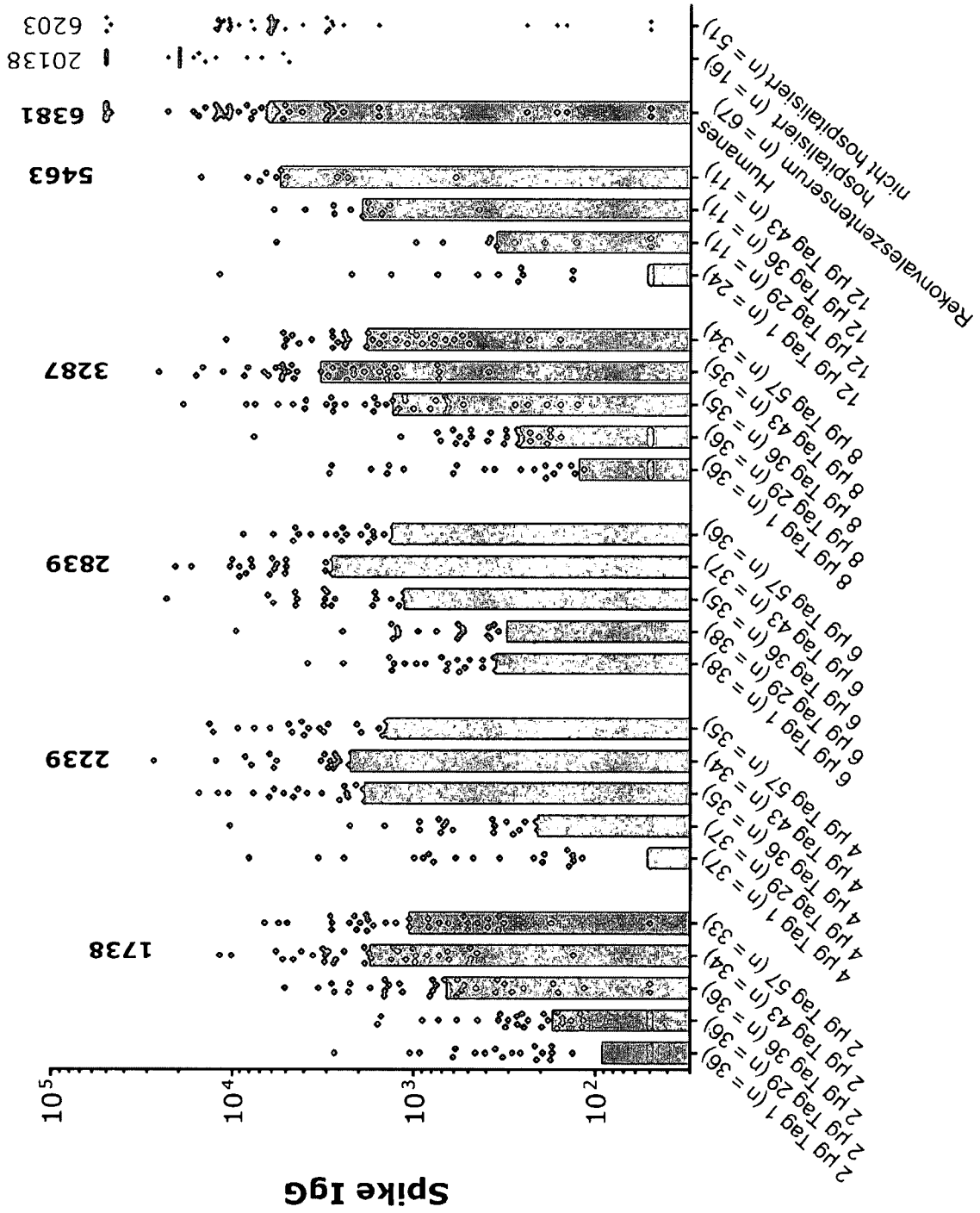

Spike IgG
10^5
10^4
10^3
10^2
1738
2239
2839
3287
5463
6381
20138
6203
2 µg Tag 1 (n = 36)
2 µg Tag 29 (n = 36)
2 µg Tag 36 (n = 36)
2 µg Tag 43 (n = 36)
2 µg Tag 57 (n = 34)
4 µg Tag 1 (n = 33)
4 µg Tag 29 (n = 37)
4 µg Tag 36 (n = 37)
4 µg Tag 43 (n = 35)
4 µg Tag 57 (n = 34)
6 µg Tag 1 (n = 35)
6 µg Tag 29 (n = 38)
6 µg Tag 36 (n = 38)
6 µg Tag 43 (n = 35)
6 µg Tag 57 (n = 37)
8 µg Tag 1 (n = 36)
8 µg Tag 29 (n = 36)
8 µg Tag 36 (n = 36)
8 µg Tag 43 (n = 35)
8 µg Tag 57 (n = 35)
12 µg Tag 1 (n = 24)
12 µg Tag 29 (n = 11)
12 µg Tag 36 (n = 11)
12 µg Tag 43 (n = 11)
Humanes
Rekonvaleszentenserum (n = 67)
hospitalisiert (n = 16)
nicht hospitalisiert (n = 51)

FIG 13 E

Serokonversion*			
Dosis (µg)	Vervielfachung gegenüber dem Ausgangswert	Tag 36	Tag 43
2	≥ 2	28 of 36 (78%)	32 of 34 (94%)
2	≥ 4	18 of 36 (50%)	27 of 34 (79%)
4	≥ 2	32 of 35 (91%)	31 of 34 (91%)
4	≥ 4	25 of 35 (71%)	27 of 34 (79%)
6	≥ 2	23 of 35 (66%)	31 of 37 (84%)
6	≥ 4	18 of 35 (51%)	26 of 37 (70%)
8	≥ 2	26 of 35 (74%)	33 of 35 (94%)
8	≥ 4	24 of 35 (69%)	28 of 35 (80%)
12	≥ 2	10 of 11 (91%)	10 of 11 (91%)
12	≥ 4	9 of 11 (82%)	10 of 11 (91%)

FIG 13 E Fortsetzung

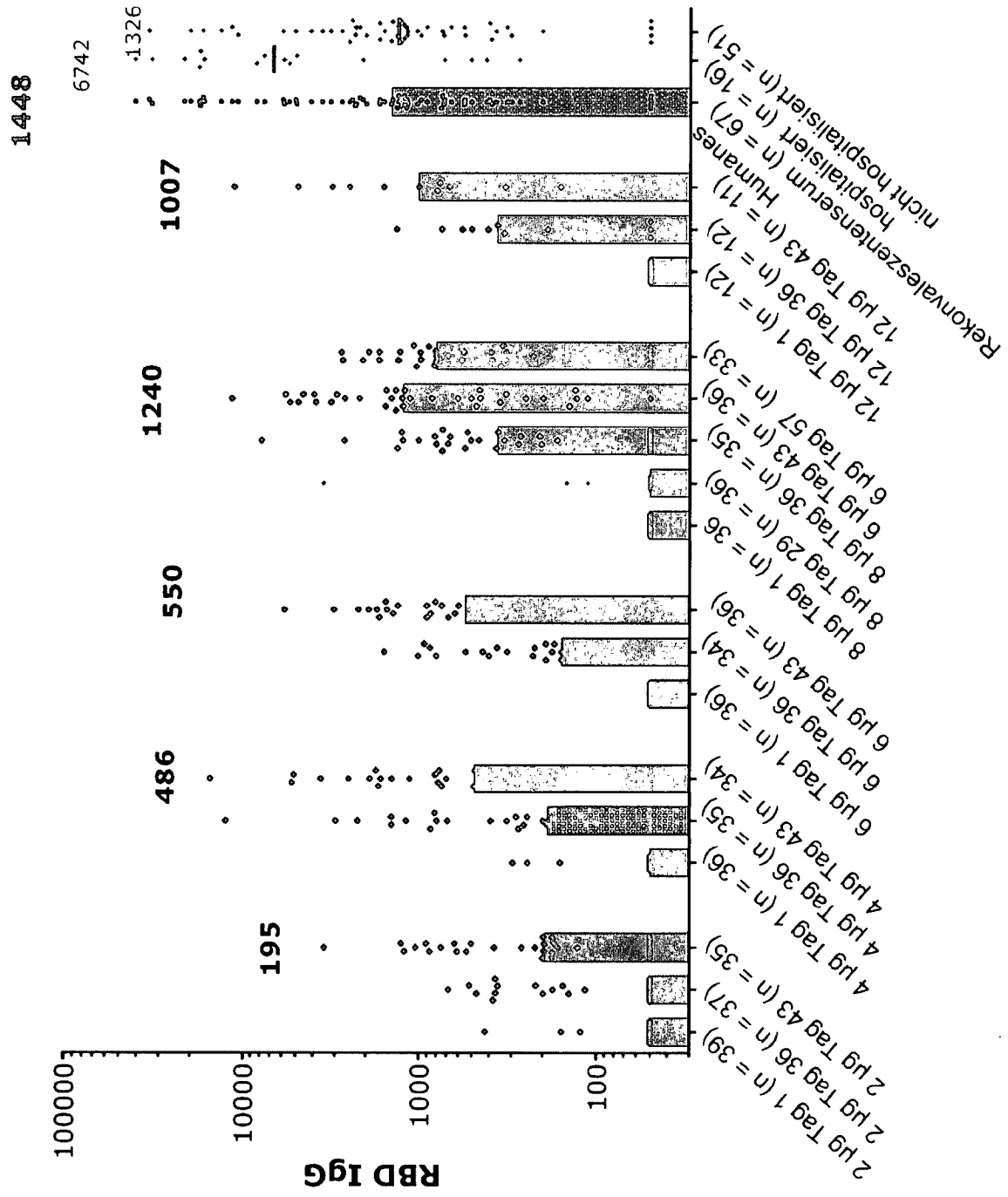

RBD IgG
100000
10000
1000
100
1448
6742
1326
1007
1240
550
486
195
2 µg Tag 1 (n = 39)
2 µg Tag 36 (n = 37)
2 µg Tag 43 (n = 35)
4 µg Tag 1 (n = 36)
4 µg Tag 36 (n = 35)
4 µg Tag 43 (n = 34)
6 µg Tag 1 (n = 36)
6 µg Tag 36 (n = 34)
6 µg Tag 43 (n = 36)
8 µg Tag 1 (n = 36)
8 µg Tag 29 (n = 36)
8 µg Tag 36 (n = 35)
6 µg Tag 43 (n = 36)
6 µg Tag 57 (n = 33)
12 µg Tag 1 (n = 12)
12 µg Tag 36 (n = 12)
12 µg Tag 43 (n = 11)
Rekonvaleszenten (n = 67)
Humanes
hospitalisiert (n = 16)
nicht hospitalisiert (n = 51)

FIG 13 F

Serokonversion			
Dosis (µg)	Vervielfachung gegenüber dem Ausgangswert	Tag 36	Tag 43
2	≥ 2	11 of 36 (31%)	22 of 34 (65%)
2	≥ 4	6 of 36 (17%)	13 of 34 (38%)
4	≥ 2	22 of 35 (63%)	29 of 34 (85%)
4	≥ 4	15 of 35 (43%)	27 of 34 (79%)
6	≥ 2	18 of 34 (53%)	29 of 36 (81%)
6	≥ 4	12 of 34 (35%)	25 of 36 (69%)
8	≥ 2	24 of 35 (69%)	34 of 35 (97%)
8	≥ 4	23 of 35 (66%)	29 of 35 (83%)
12	≥ 2	8 of 11 (73%)	11 of 11 (100%)
12	≥ 4	7 of 11 (64%)	10 of 11 (91%)

FIG 13 F Fortsetzung

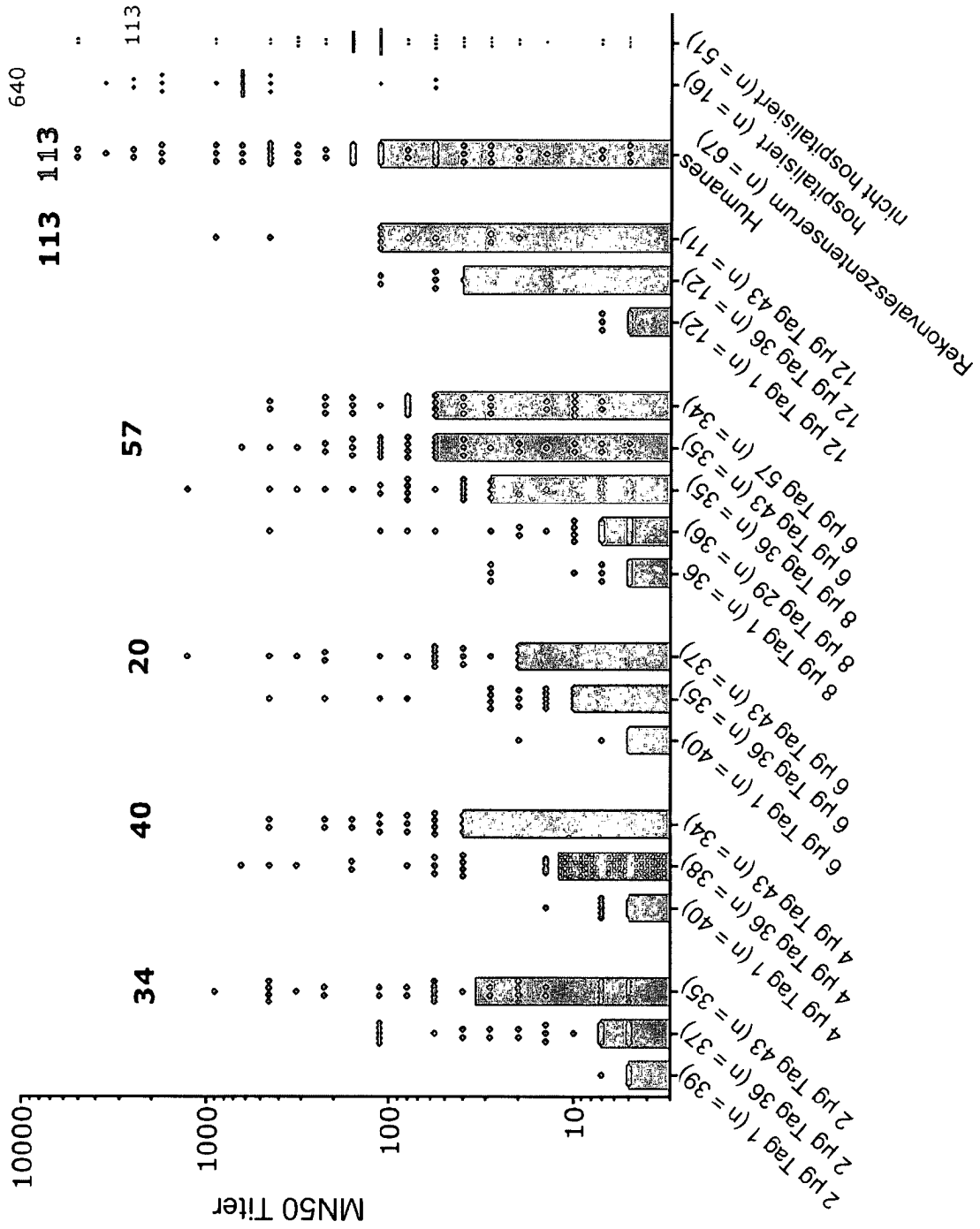

MN50 Titer
10000
1000
100
10
640
113
113
113
57
20
40
34
2 µg Tag 1 (n = 39)
2 µg Tag 36 (n = 37)
2 µg Tag 43 (n = 35)
4 µg Tag 1 (n = 40)
4 µg Tag 36 (n = 38)
4 µg Tag 43 (n = 34)
6 µg Tag 1 (n = 40)
6 µg Tag 36 (n = 35)
6 µg Tag 43 (n = 37)
8 µg Tag 1 (n = 36
8 µg Tag 29 (n = 36)
8 µg Tag 43 (n = 35)
6 µg Tag 57 (n = 35)
12 µg Tag 1 (n = 34)
12 µg Tag 36 (n = 12)
12 µg Tag 43 (n = 12)
Humanes
Rekonvaleszentenserum (n = 67)
hospitalisiert (n = 16)
nicht hospitalisiert (n = 51)

FIG 13 G

Serokonversion			
Dosis (µg)	Vervielfachung gegenüber dem Ausgangswert	Tag 36	Tag 43
2	≥ 2	16 of 36 (44%)	26 of 34 (76%)
2	≥ 4	12 of 36 (33%)	24 of 34 (71%)
4	≥ 2	21 of 36 (58%)	25 of 33 (76%)
4	≥ 4	13 of 36 (36%)	22 of 33 (67%)
6	≥ 2	21 of 34 (62%)	28 of 36 (78%)
6	≥ 4	11 of 34 (32%)	20 of 36 (56%)
8	≥ 2	25 of 35 (71%)	31 of 35 (89%)
8	≥ 4	21 of 35 (60%)	27 of 35 (77%)
12	≥ 2	11 of 11 (100%)	11 of 11 (100%)
12	≥ 4	7 of 11 (64%)	11 of 11 (100%)

FIG 13 G Fortsetzung

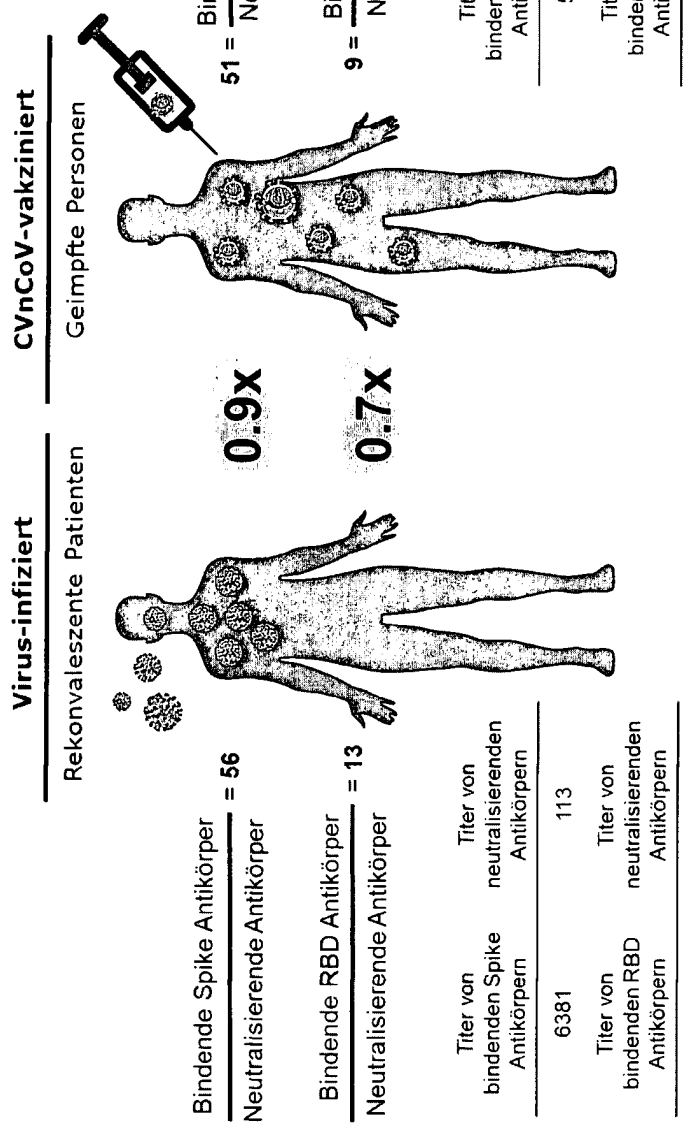

Virus-infiziert
CVnCoV-vakziniert
Rekonvaleszente Patienten
Geimpfte Personen
Bindende Spike Antikörper
Neutralisierende Antikörper = 56
Bindende RBD Antikörper
Neutralisierende Antikörper = 13
0.9x
0.7x
Bindende Spike Antikörper
Neutralisierende Antikörper = 51
Bindende RBD Antikörper
Neutralisierende Antikörper = 9
Titer von bindenden Spike Antikörpern
Titer von neutralisierenden Antikörpern
6381
113
Titer von bindenden RBD Antikörpern
Titer von neutralisierenden Antikörpern
1448
113
Titer von bindenden Spike Antikörpern
Titer von neutralisierenden Antikörpern
5463
113
Titer von bindenden RBD Antikörpern
Titer von neutralisierenden Antikörpern
1007
113

FIG 13 H

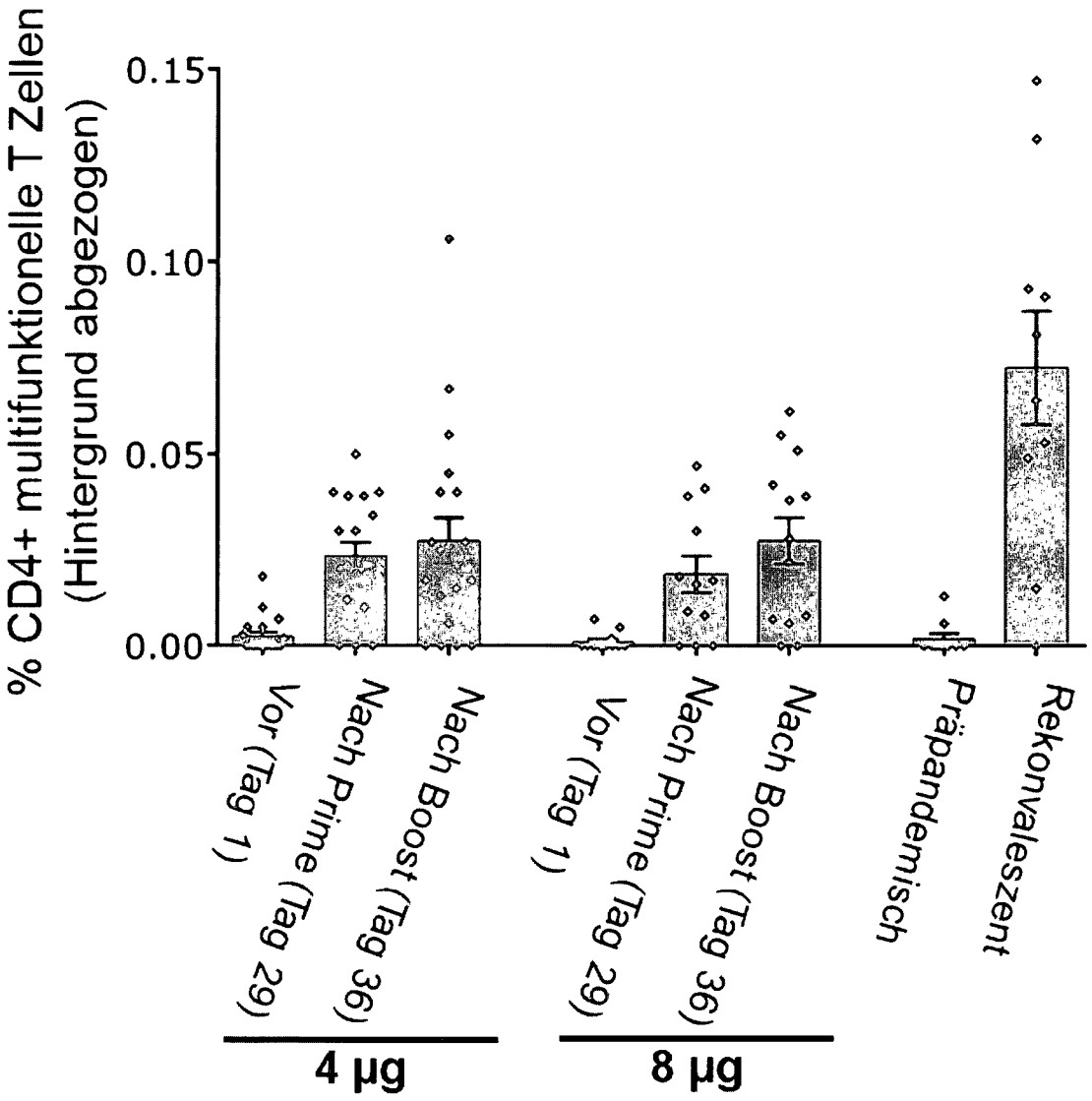

% CD4+ multifunktionelle T Zellen
(Hintergrund abgezogen)
0.15
0.10
0.05
0.00
Vor (Tag 1)
Nach Prime (Tag 29)
Nach Boost (Tag 36)
Vor (Tag 1)
Nach Prime (Tag 29)
Nach Boost (Tag 36)
Präpandemisch
Rekonvaleszent
4 µg
8 µg

FIG 13 I

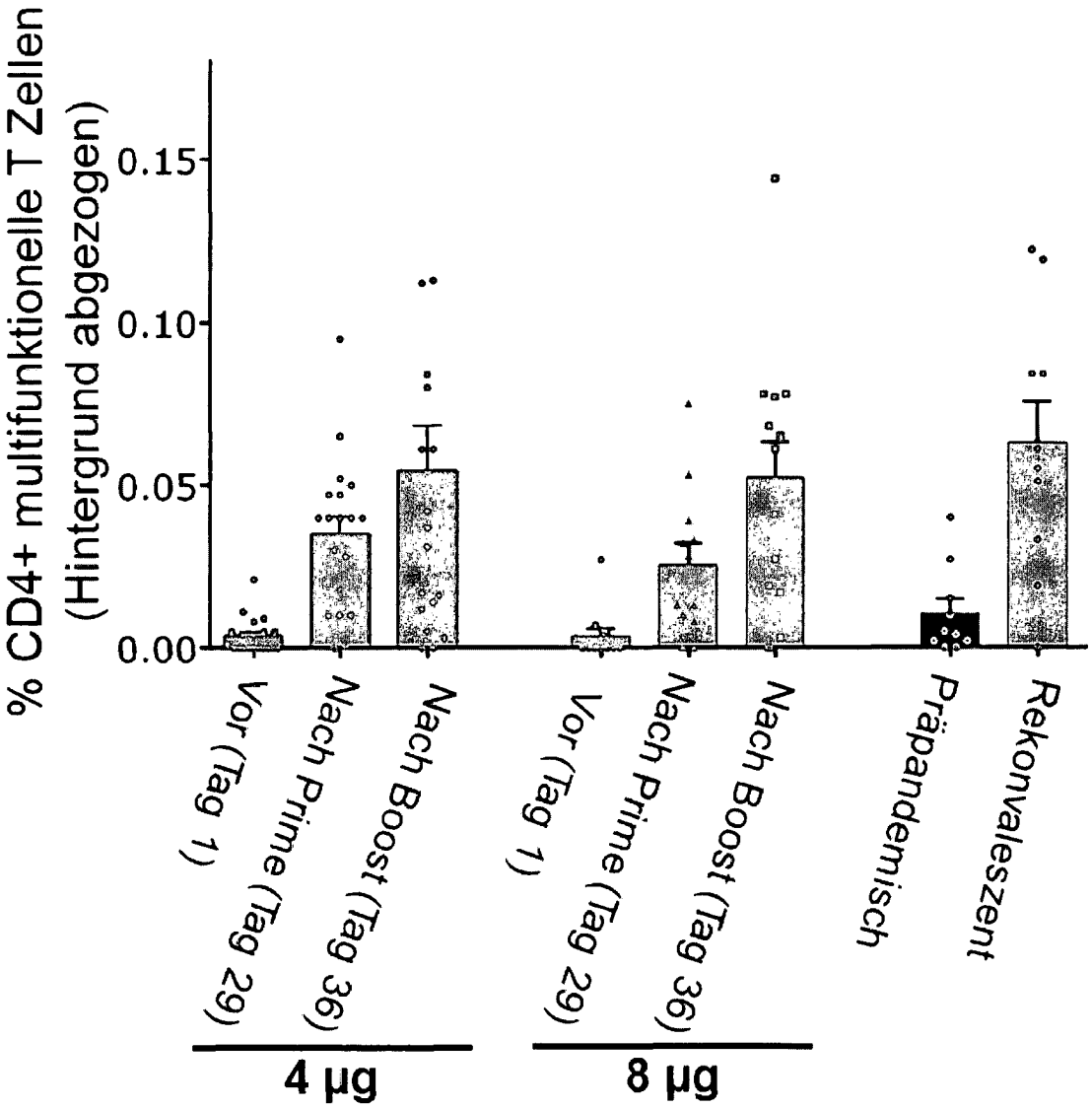
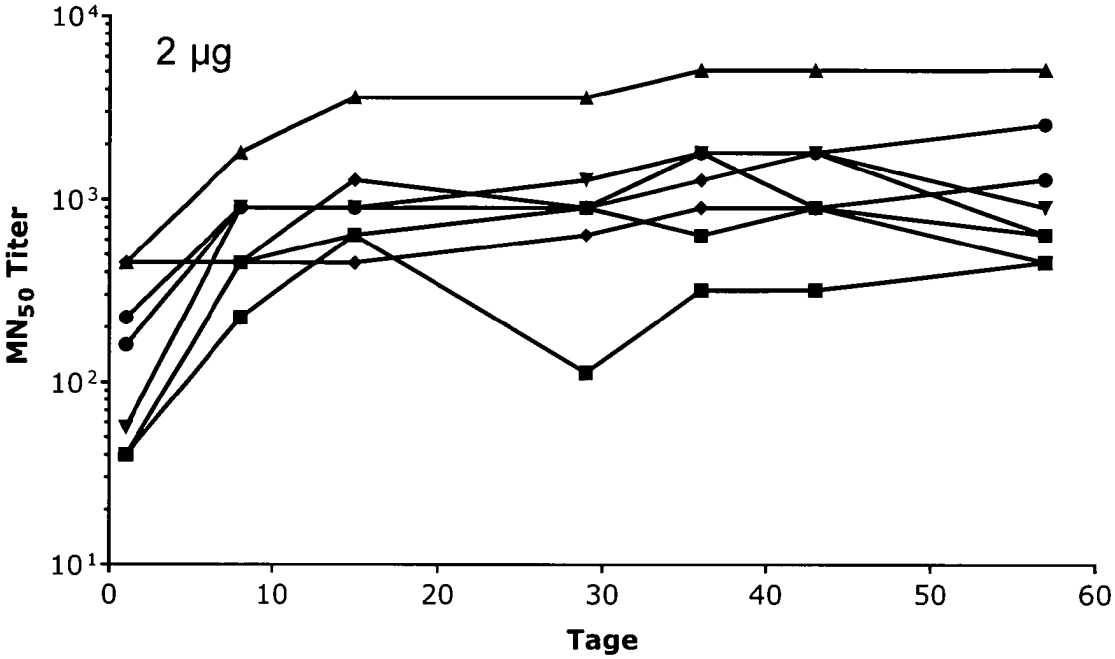

% CD4+ multifunktionelle T Zellen
(Hintergrund abgezogen)
0.15
0.10
0.05
0.00
Vor (Tag 1)
Nach Prime (Tag 29)
Nach Boost (Tag 36)
Vor (Tag 1)
Nach Prime (Tag 29)
Nach Boost (Tag 36)
Präpandemisch
Rekonvaleszent
4 µg
8 µg

FIG 13 J


2 µg
MN_{50} Titer
10^4
10^3
10^2
10^1
0
10
20
30
40
50
60
Tage

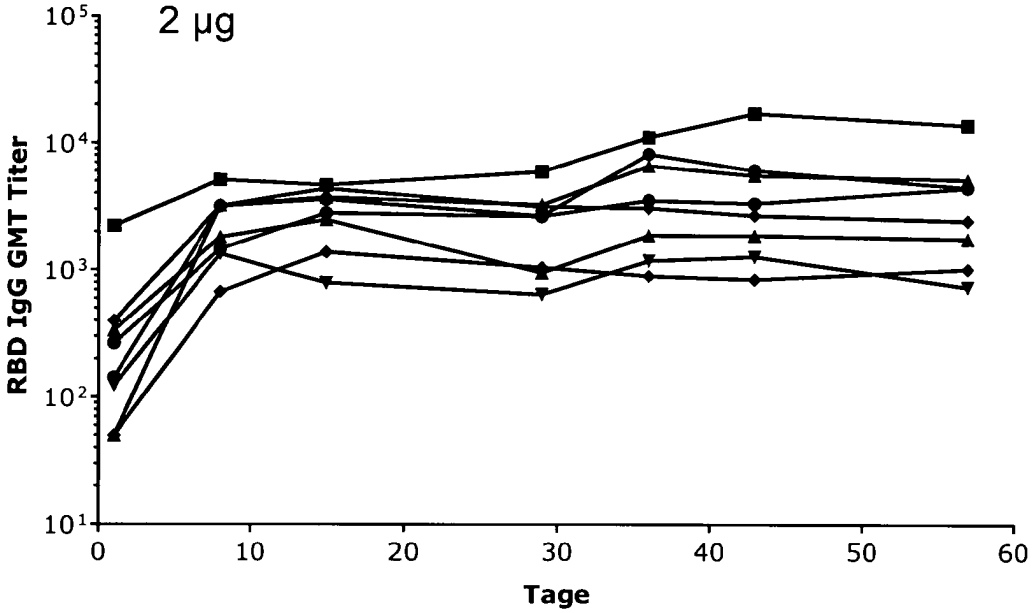
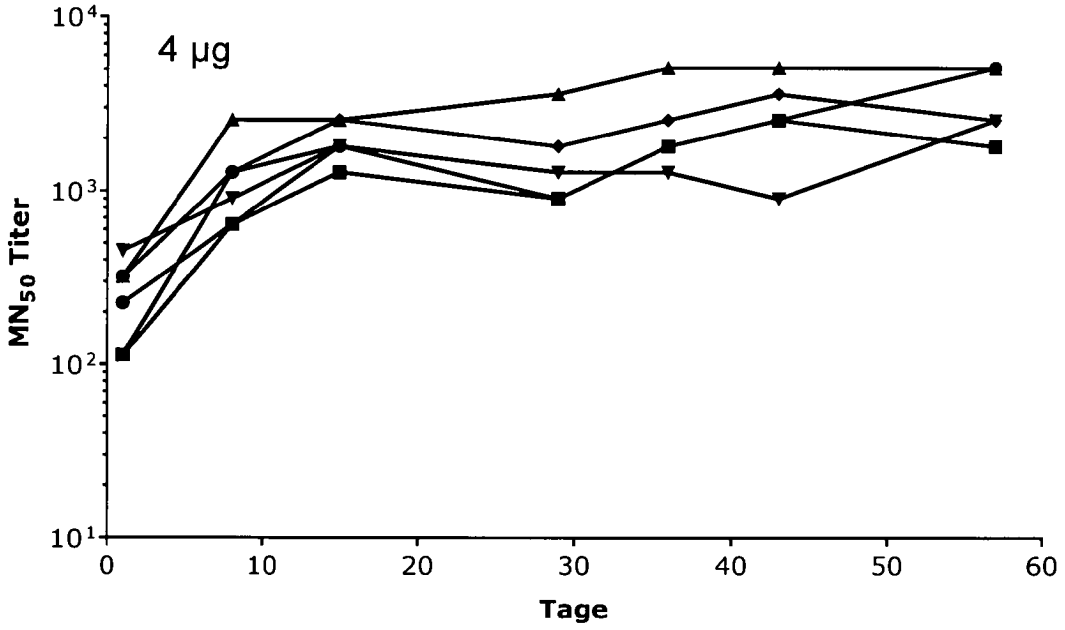

2 µg
RBD IgG GMT Titer
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
0
10
20
30
40
50
60
Tage

FIG 13 K



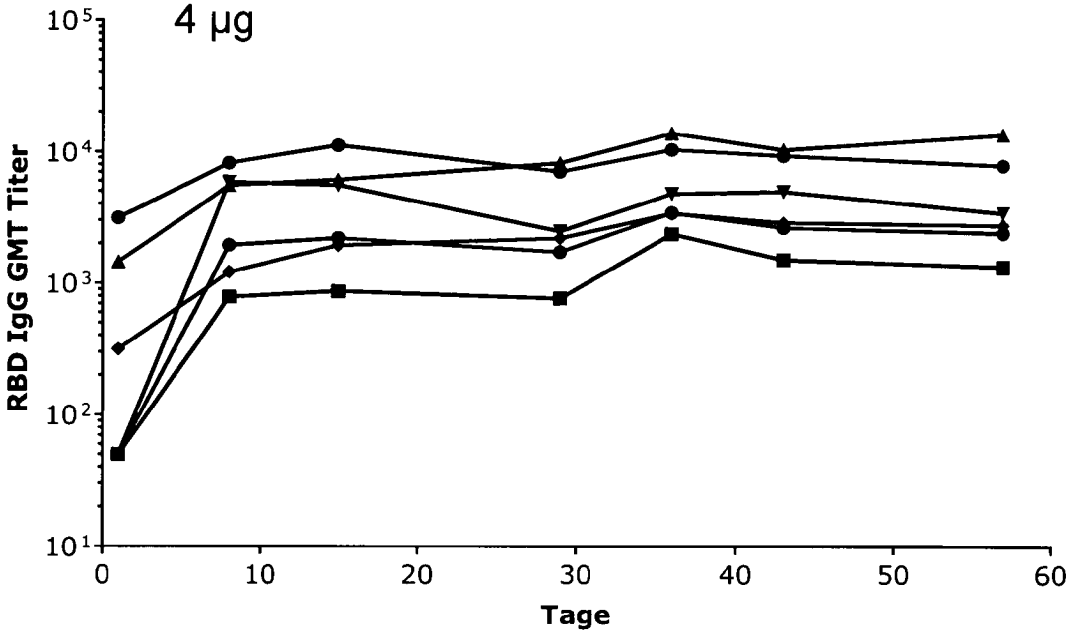


FIG 13 K Fortsetzung

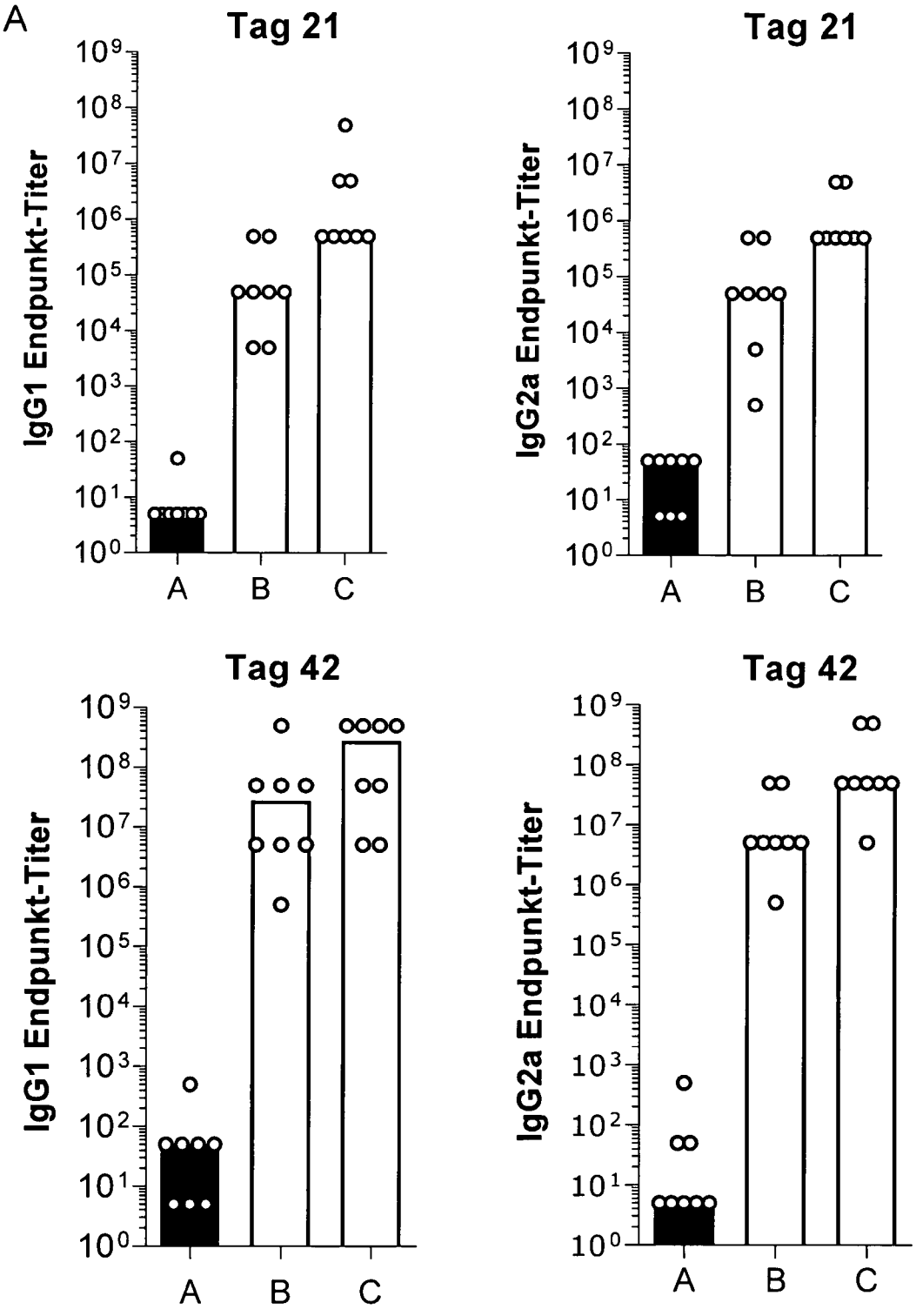

A
Tag 21
IgG1 Endpunkt-Titer
IgG2a Endpunkt-Titer
Tag 42
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
10^7
10^8
10^9
A
B
C

FIG 14 A

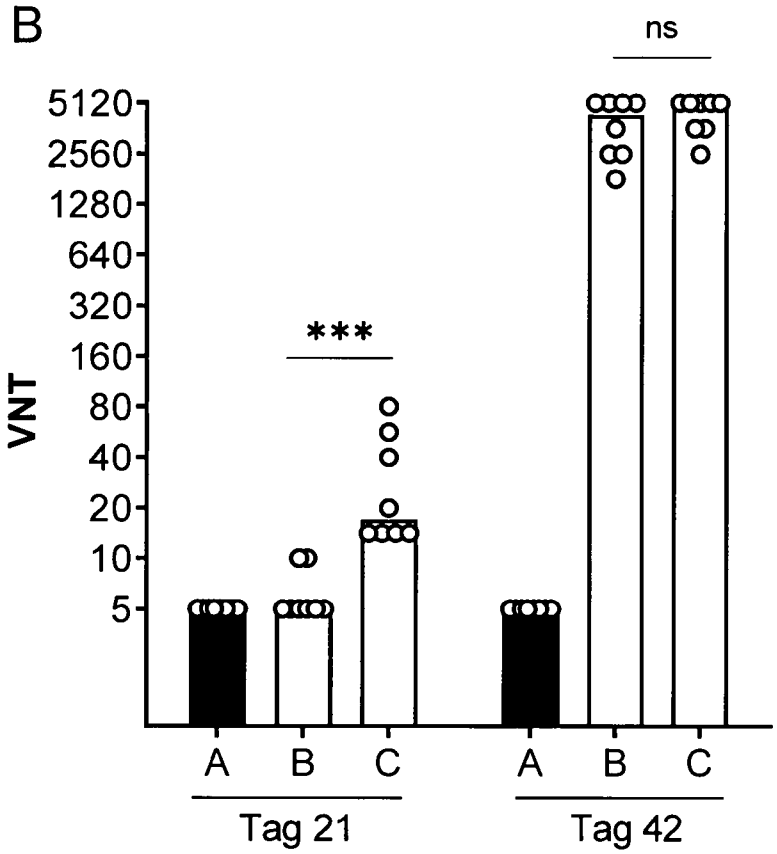

B
ns
5120
2560
1280
640
320
160
80
40
20
10
5
VNT
***
A
B
C
A
B
C
Tag 21
Tag 42

FIG 14 B

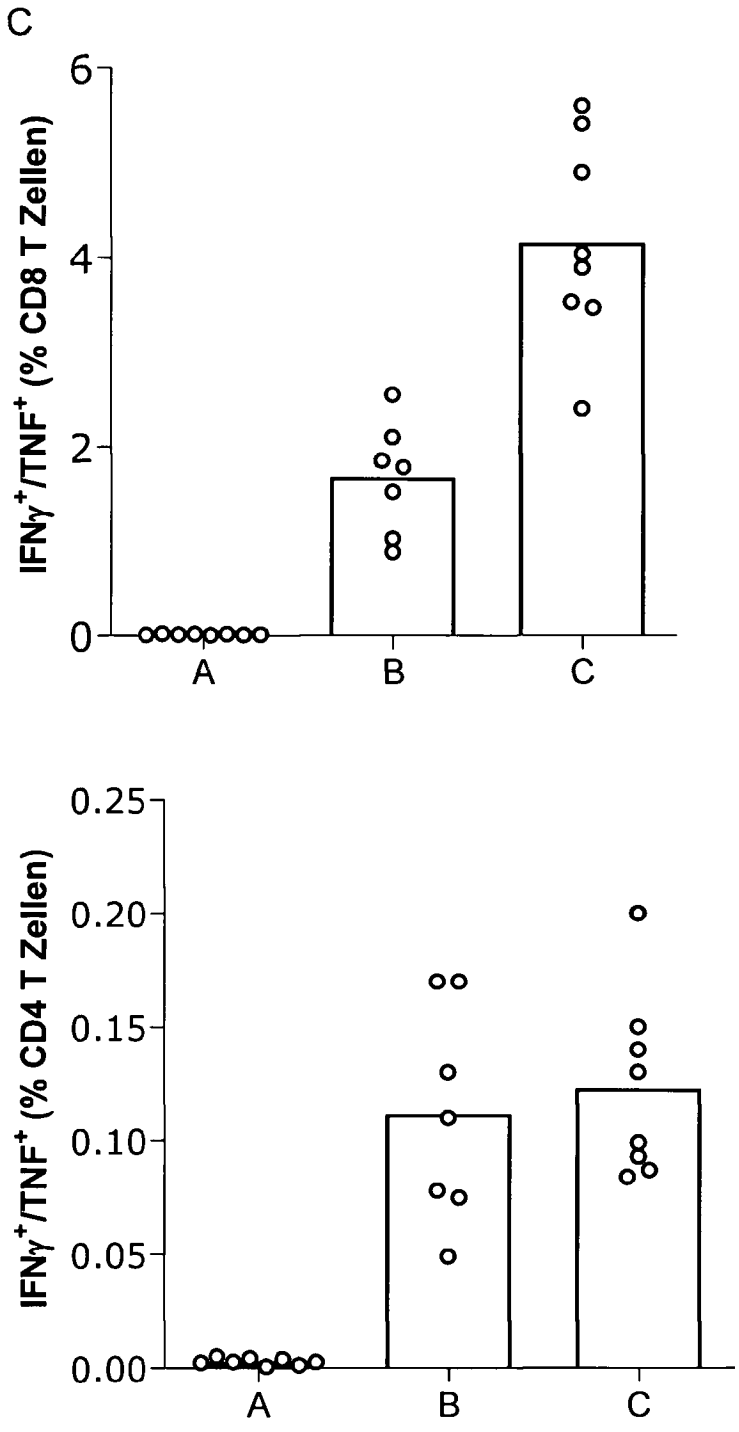

C
IFNγ+/TNF+ (% CD8 T Zellen)
6
4
2
0
A
B
C
IFNγ+/TNF+ (% CD4 T Zellen)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
A
B
C

FIG 14 C

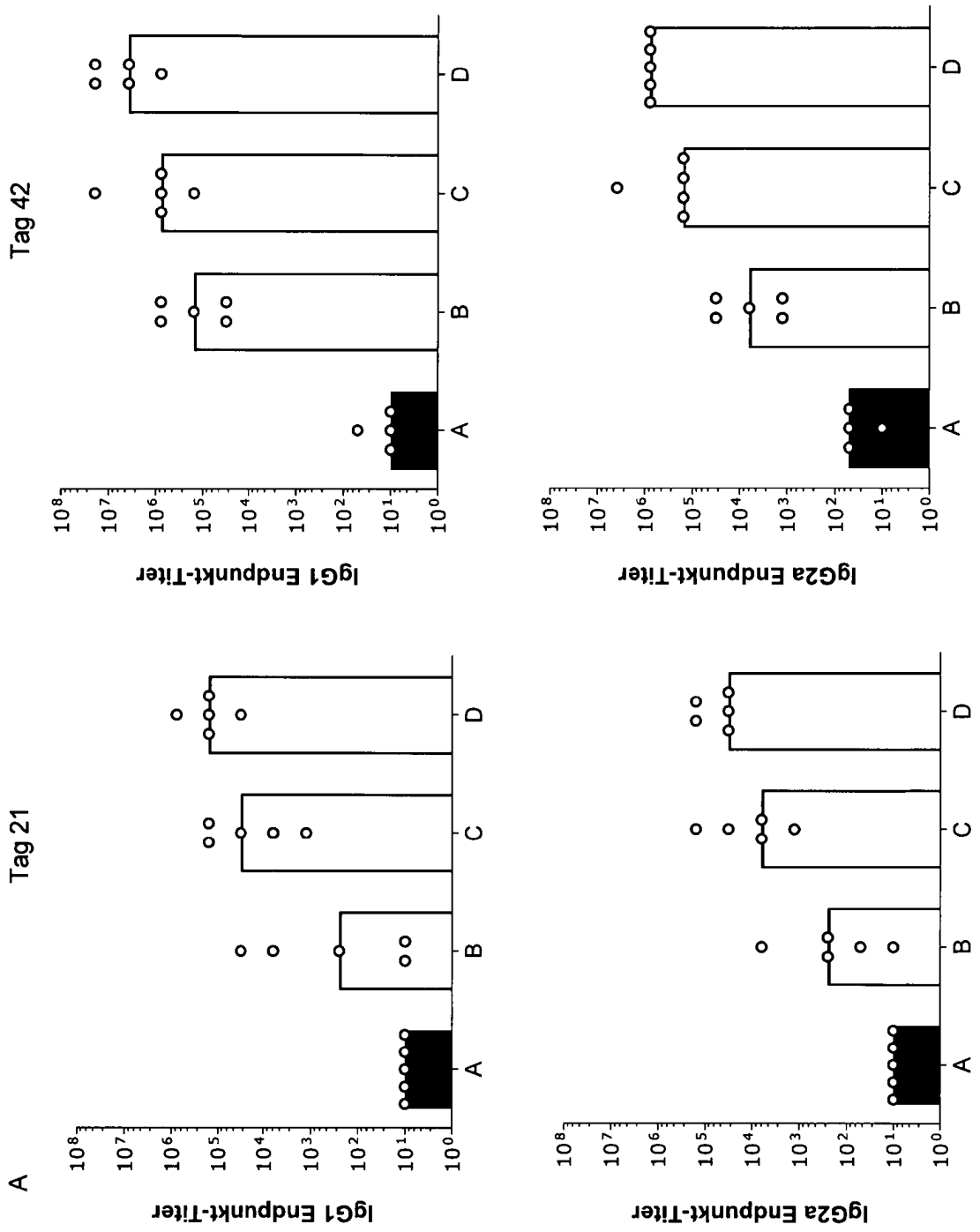

A
Tag 21
IgG1 Endpunkt-Titer
IgG2a Endpunkt-Titer
Tag 42
IgG1 Endpunkt-Titer
IgG2a Endpunkt-Titer
A
B
C
D

FIG 15 A

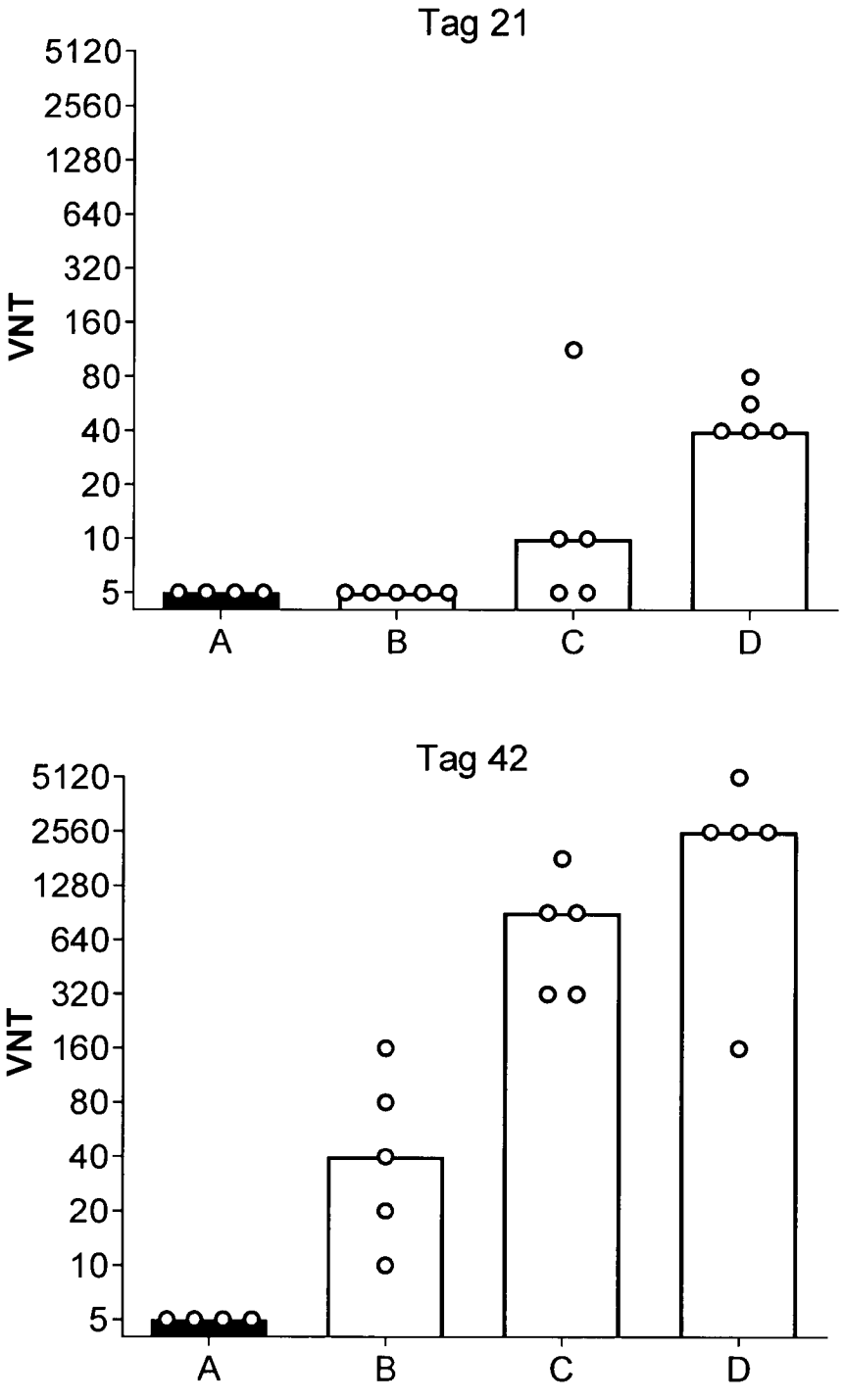

Tag 21
VNT
5120
2560
1280
640
320
160
80
40
20
10
5
A
B
C
D
Tag 42
VNT
5120
2560
1280
640
320
160
80
40
20
10
5
A
B
C
D

FIG 15 B

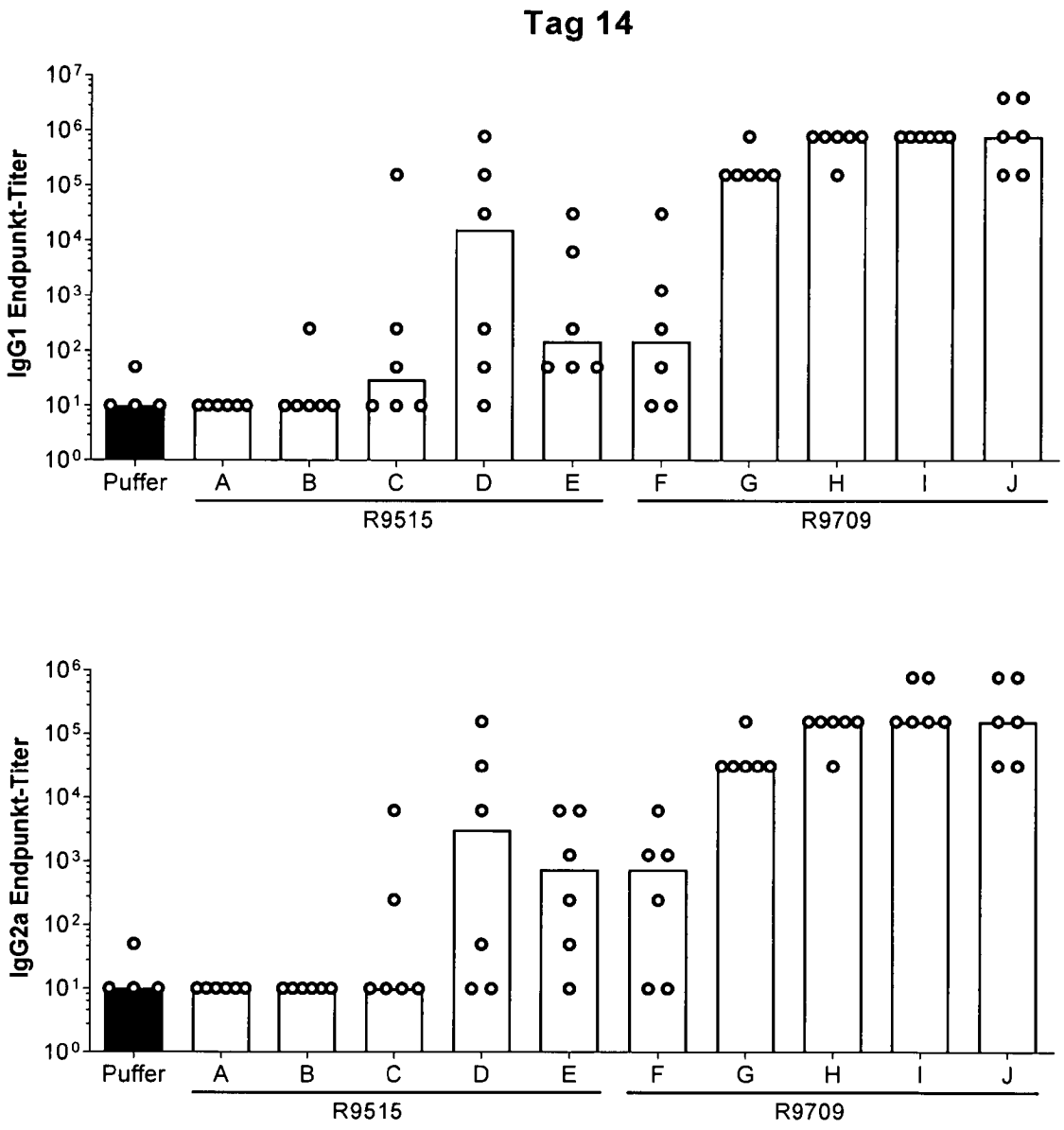

Tag 14
IgG1 Endpunkt-Titer
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
Puffer
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
R9515
R9709
IgG2a Endpunkt-Titer
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
Puffer
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
R9515
R9709

FIG 16 A

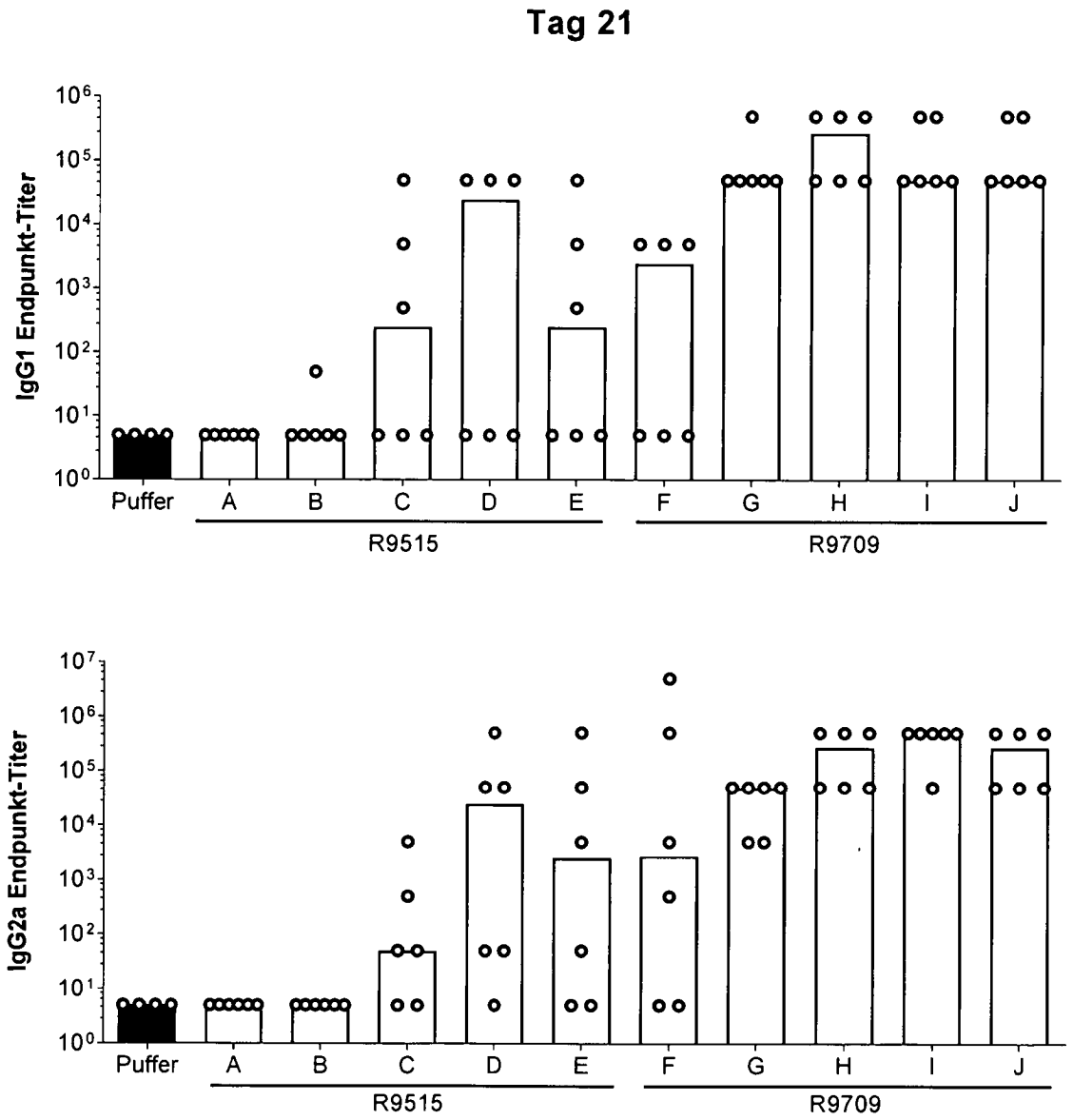


FIG 16 A Fortsetzung

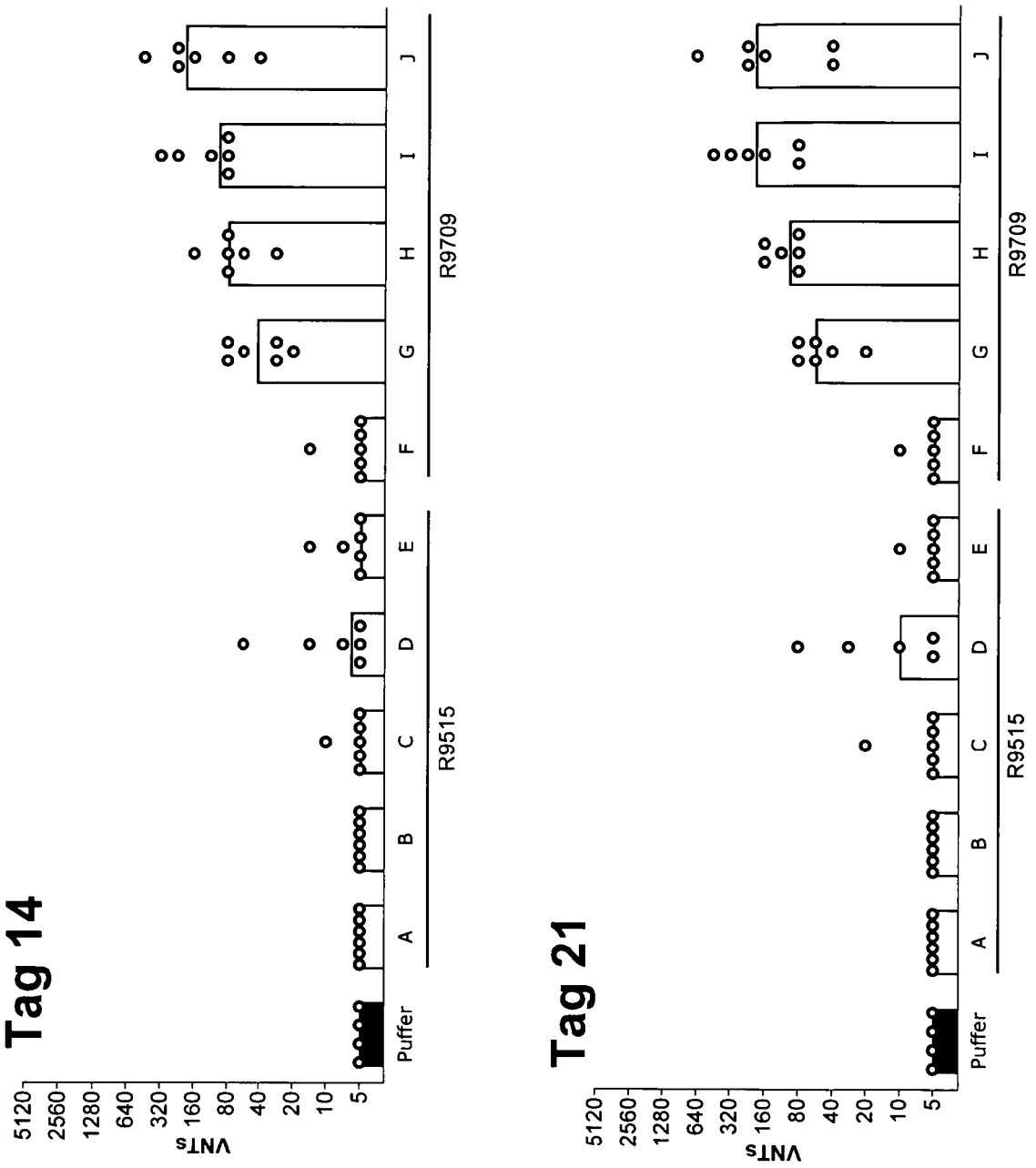

Tag 14
VNTs
5120
2560
1280
640
320
160
80
40
20
10
5
Puffer
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
R9515
R9709
Tag 21
VNTs
5120
2560
1280
640
320
160
80
40
20
10
5
Puffer
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
R9515
R9709

FIG 16 B

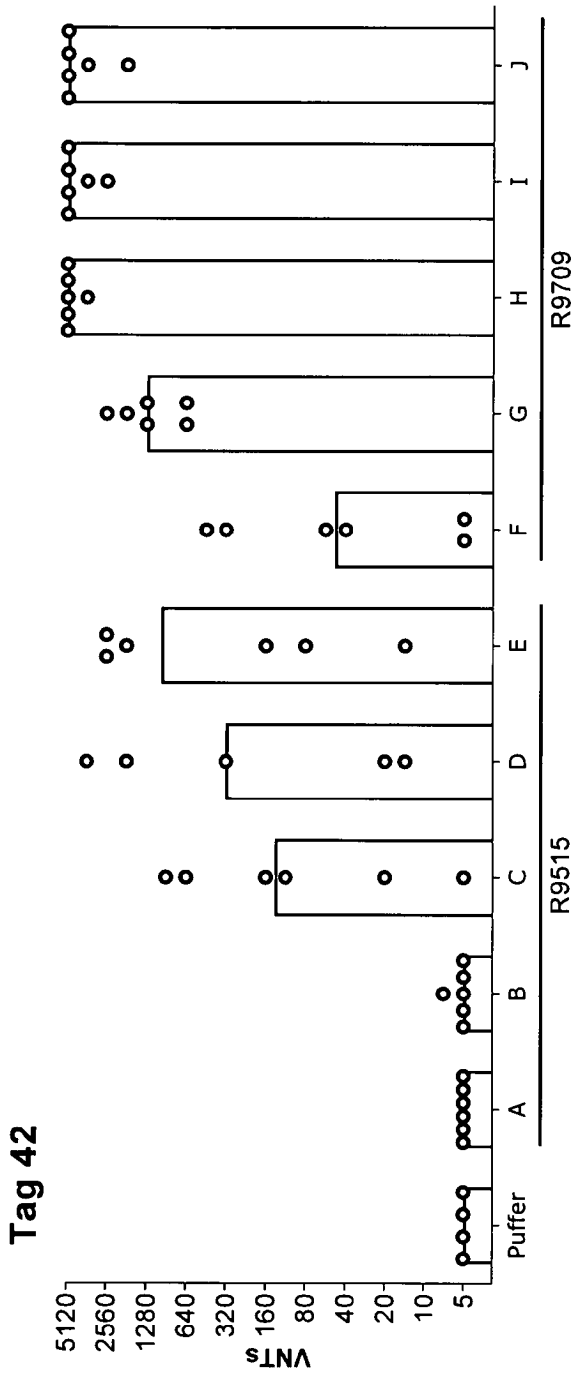

Tag 42
VNTs
5120
2560
1280
640
320
160
80
40
20
10
5
Puffer
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
R9515
R9709

FIG 16 C

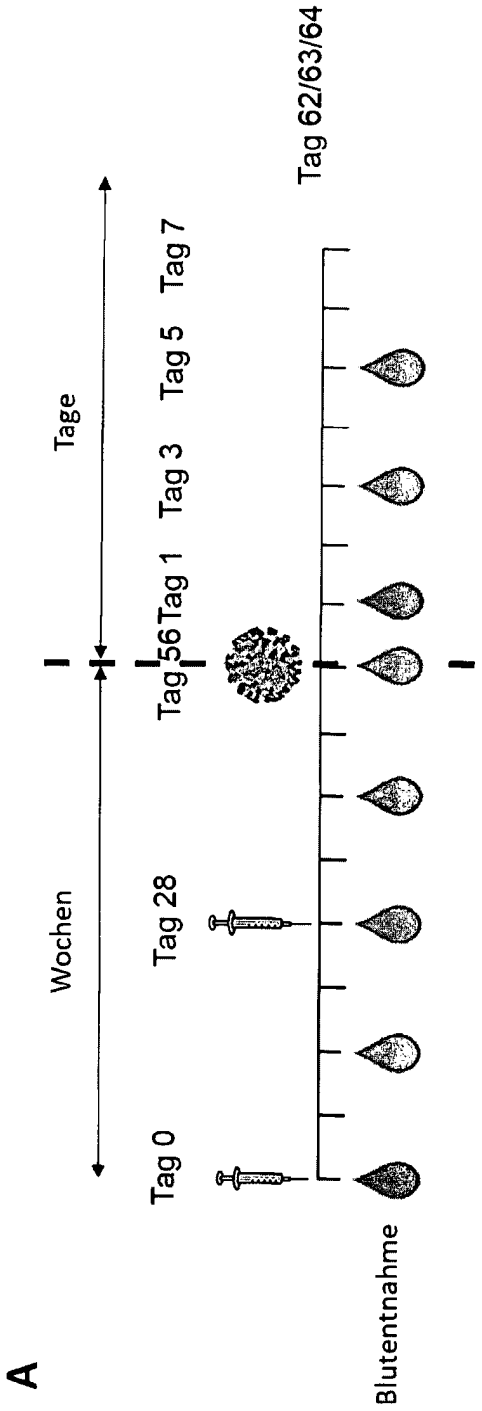

A
Wochen
Tage
Tag 0
Tag 28
Tag 56
Tag 1
Tag 3
Tag 5
Tag 7
Tag 62/63/64
Blutentnahme

FIG 17 A

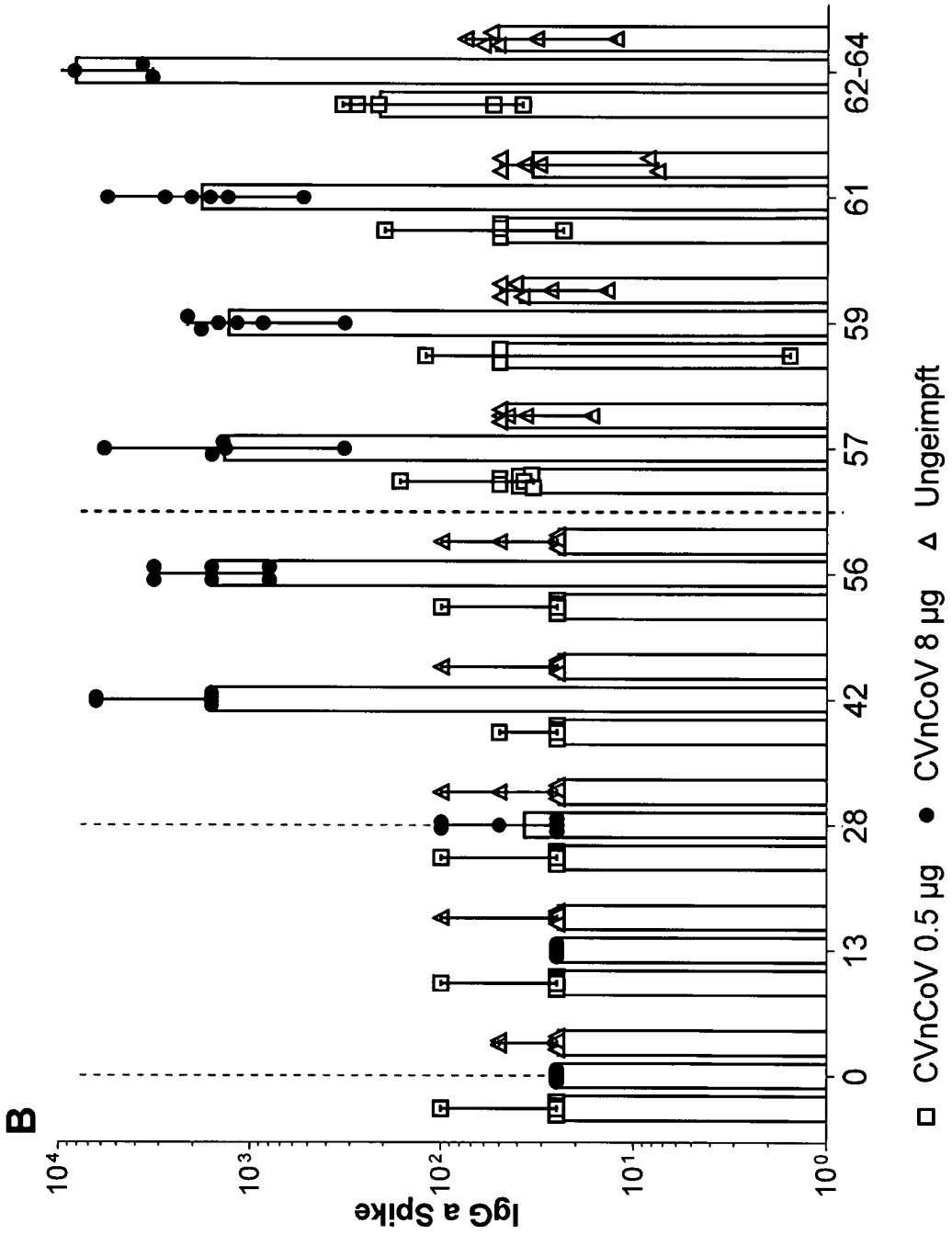

B
IgG a Spike
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
0
13
28
42
56
57
59
61
62-64
CVnCoV 0.5 µg
CVnCoV 8 µg
Ungeimpft

FIG 17 B

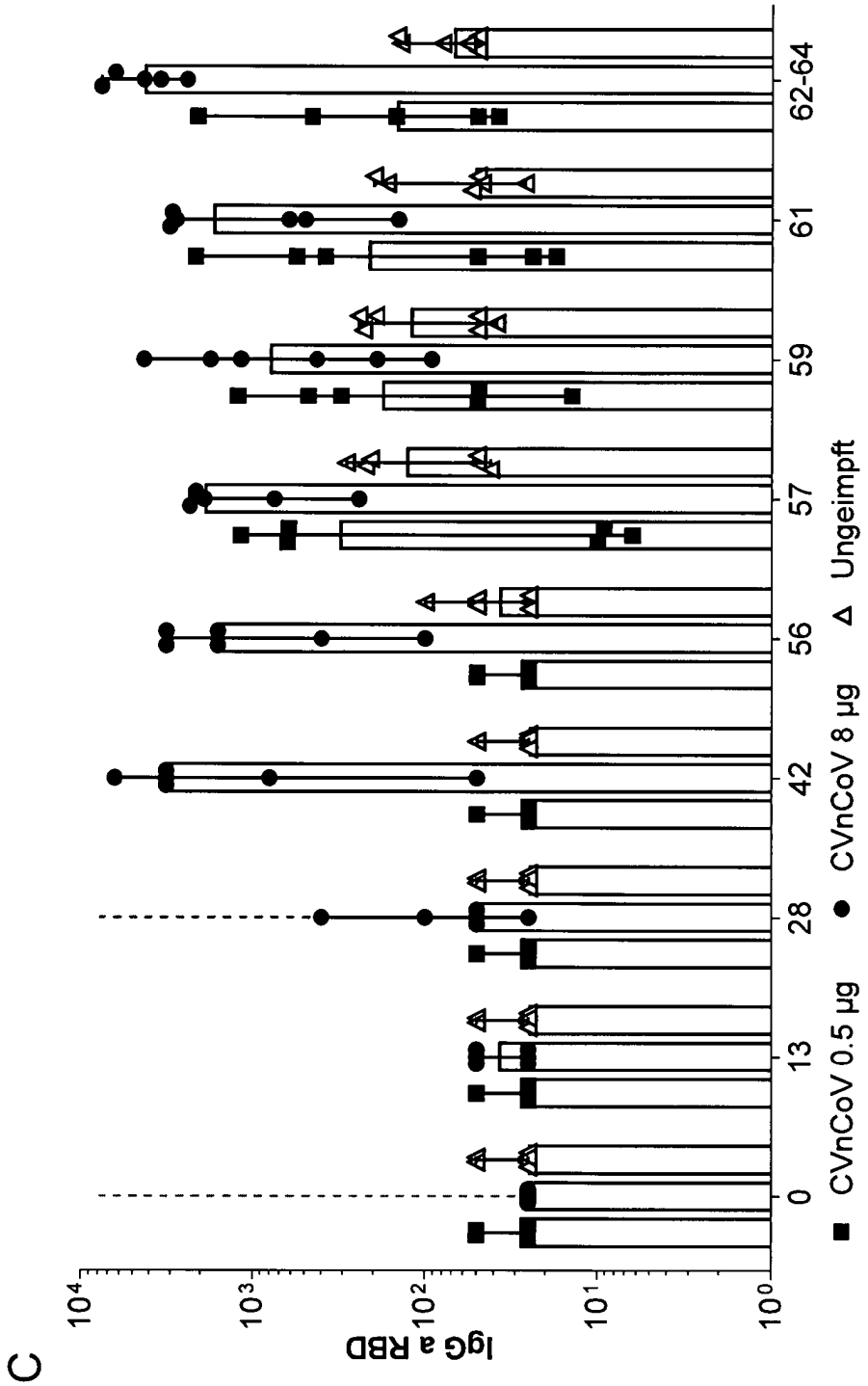

C
IgG a RBD
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
0
13
28
42
56
57
59
61
62-64
CVnCoV 0.5 µg
CVnCoV 8 µg
Ungeimpft

FIG 17 C

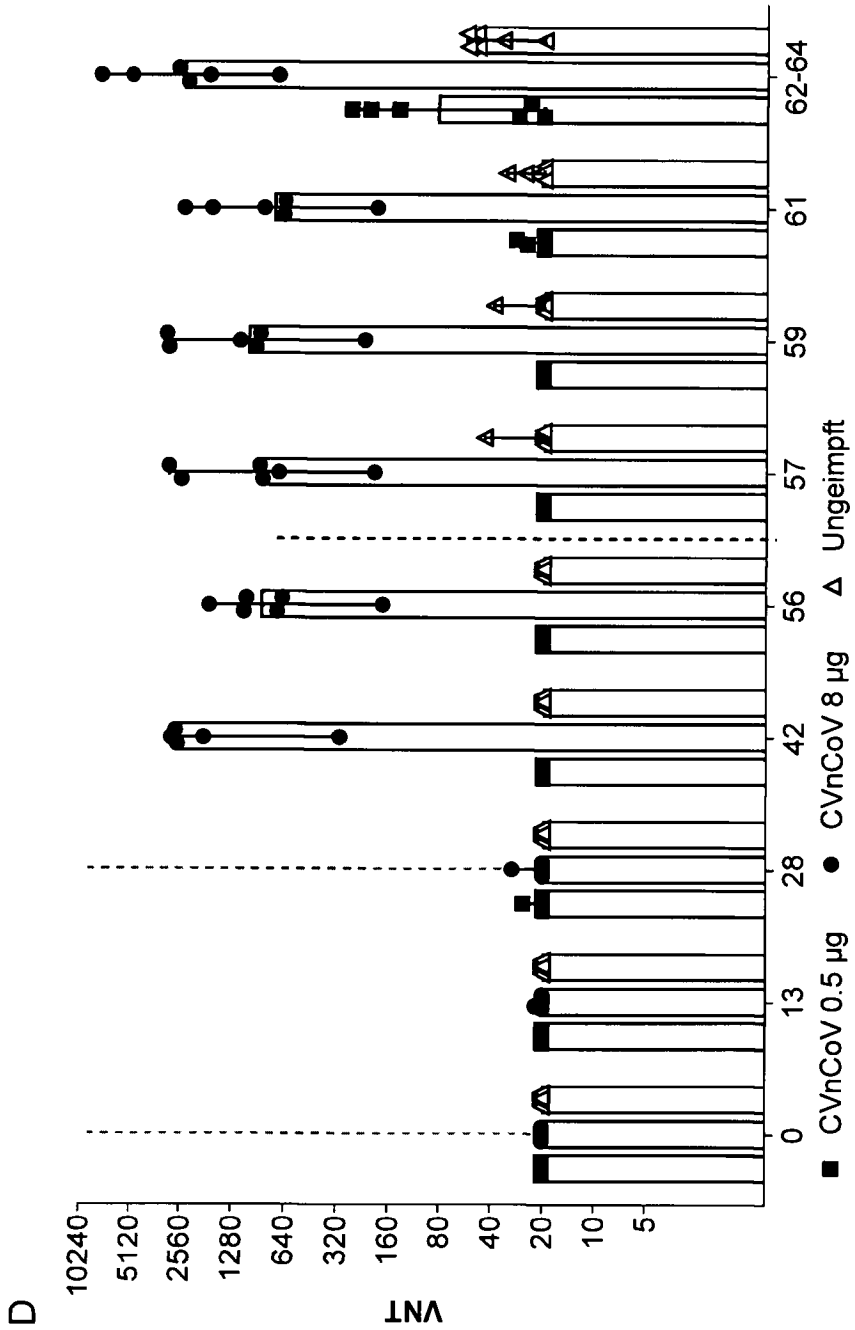

D
VNT
10240
5120
2560
1280
640
320
160
80
40
20
10
5
0
13
28
42
56
57
59
61
62-64
■ CVnCoV 0.5 µg
● CVnCoV 8 µg
△ Ungeimpft

FIG 17 D

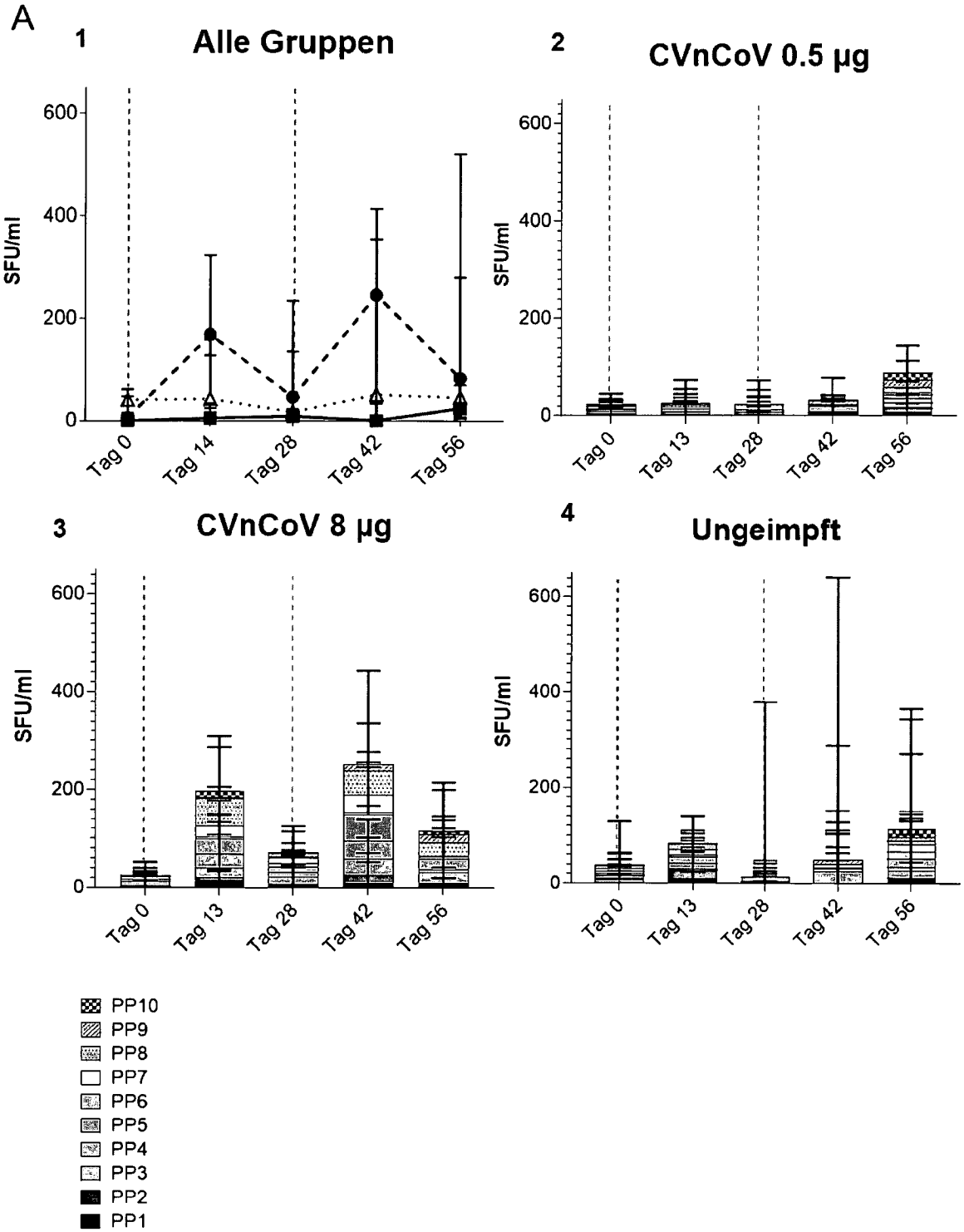

A
1
Alle Gruppen
2
CVnCoV 0.5 µg
3
CVnCoV 8 µg
4
Ungeimpft
SFU/ml
600
400
200
0
Tag 0
Tag 13
Tag 14
Tag 28
Tag 42
Tag 56
PP10
PP9
PP8
PP7
PP6
PP5
PP4
PP3
PP2
PP1

FIG 18 A

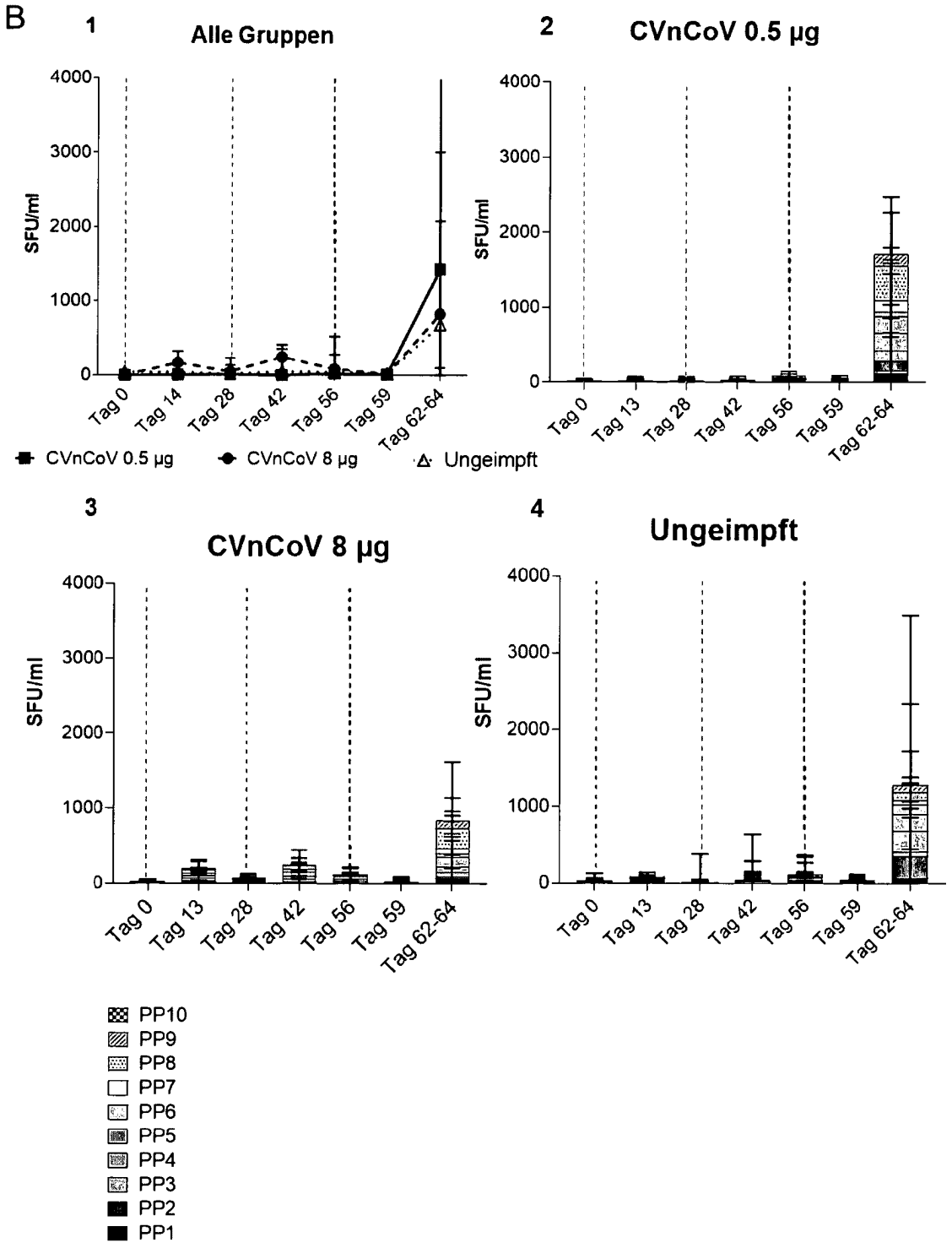

B
1
Alle Gruppen
2
CVnCoV 0.5 µg
SFU/ml
4000
3000
2000
1000
0
Tag 0
Tag 14
Tag 28
Tag 42
Tag 56
Tag 59
Tag 62-64
Tag 13
CVnCoV 0.5 µg
CVnCoV 8 µg
Ungeimpft
3
CVnCoV 8 µg
4
Ungeimpft
PP10
PP9
PP8
PP7
PP6
PP5
PP4
PP3
PP2
PP1

FIG 18 B

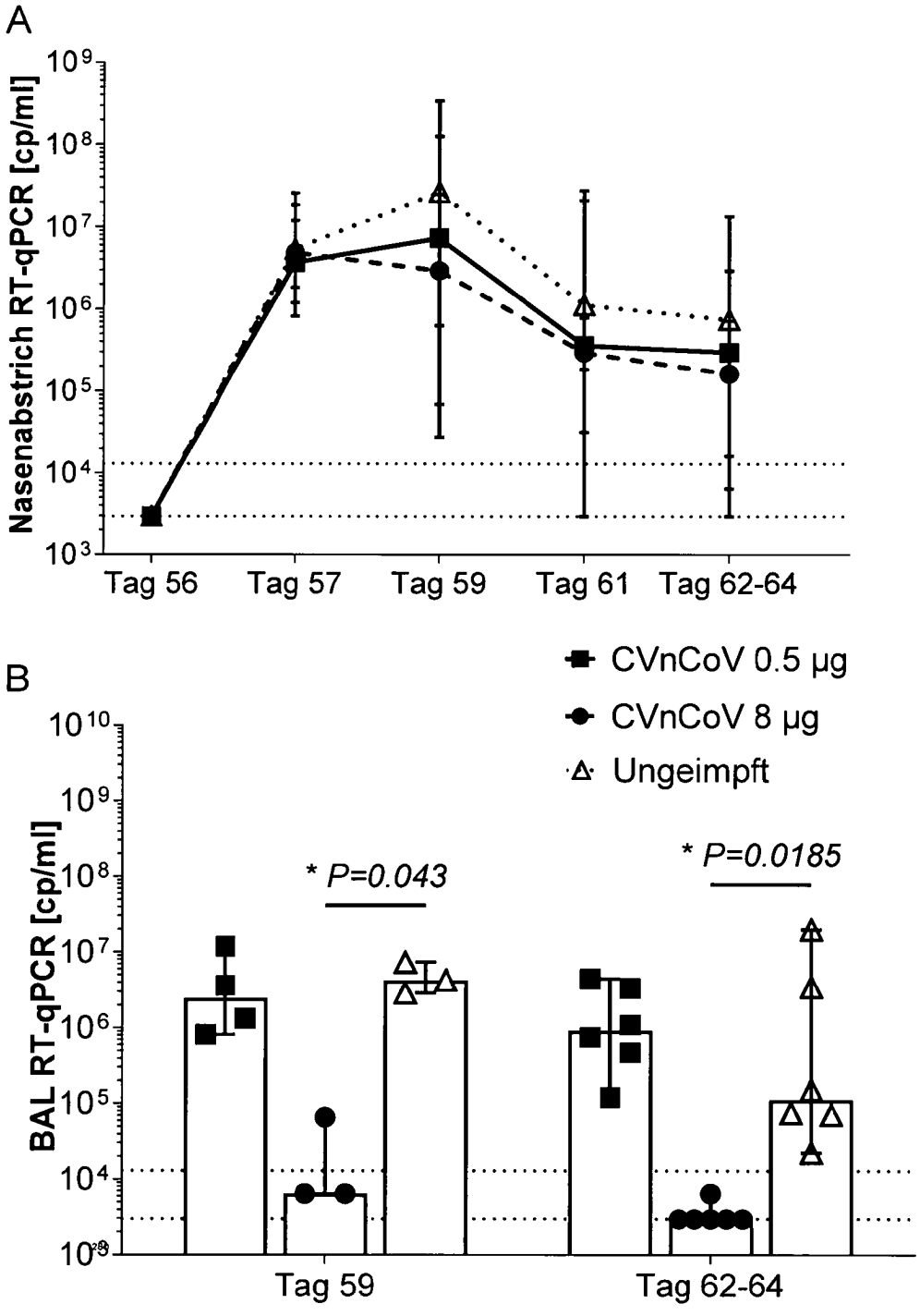

A
Nasenabstrich RT-qPCR [cp/ml]
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
Tag 56
Tag 57
Tag 59
Tag 61
Tag 62-64
B
CVnCoV 0.5 µg
CVnCoV 8 µg
Ungeimpft
BAL RT-qPCR [cp/ml]
10^{10}
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
* P=0.043
* P=0.0185
Tag 59
Tag 62-64

FIG 19 A B

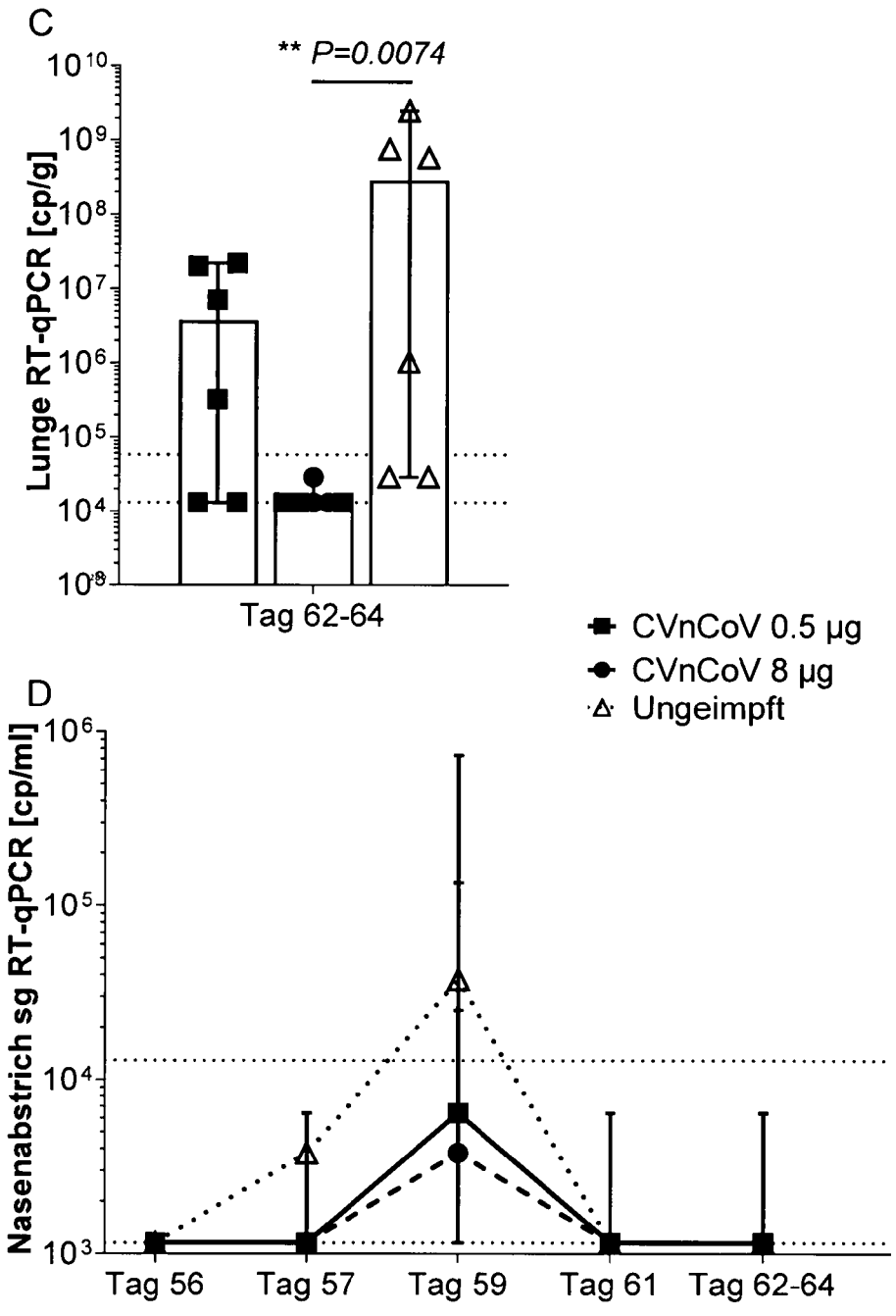

C
** P=0.0074
Lunge RT-qPCR [cp/g]
Tag 62-64
CVnCoV 0.5 µg
CVnCoV 8 µg
Ungeimpft
D
Nasenabstrich sg RT-qPCR [cp/ml]
Tag 56
Tag 57
Tag 59
Tag 61
Tag 62-64

FIG 19 C D

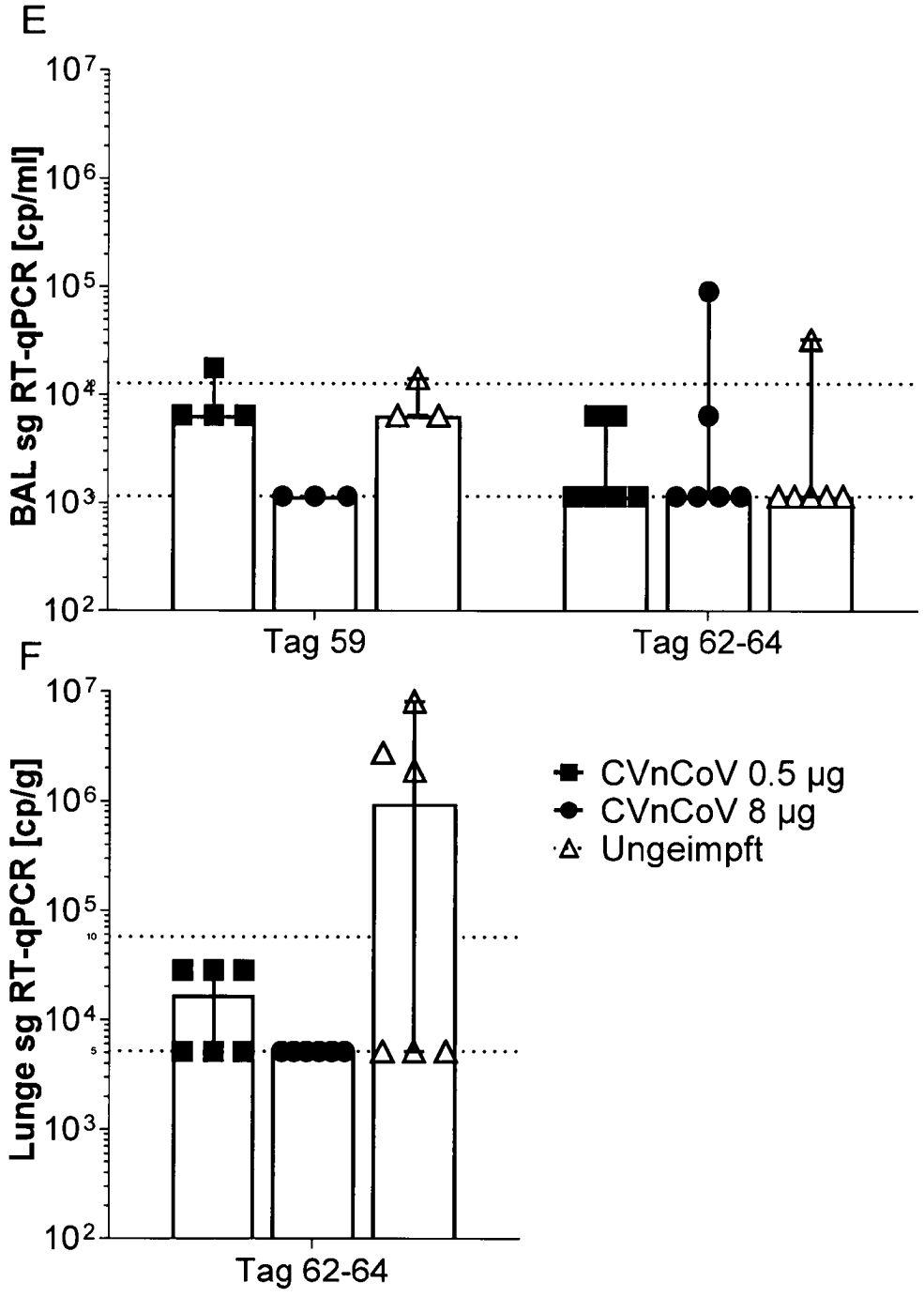

E
BAL sg RT-qPCR [cp/ml]
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
Tag 59
Tag 62-64
F
Lunge sg RT-qPCR [cp/g]
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
Tag 62-64
CVnCoV 0.5 µg
CVnCoV 8 µg
Ungeimpft

FIG 19 E F

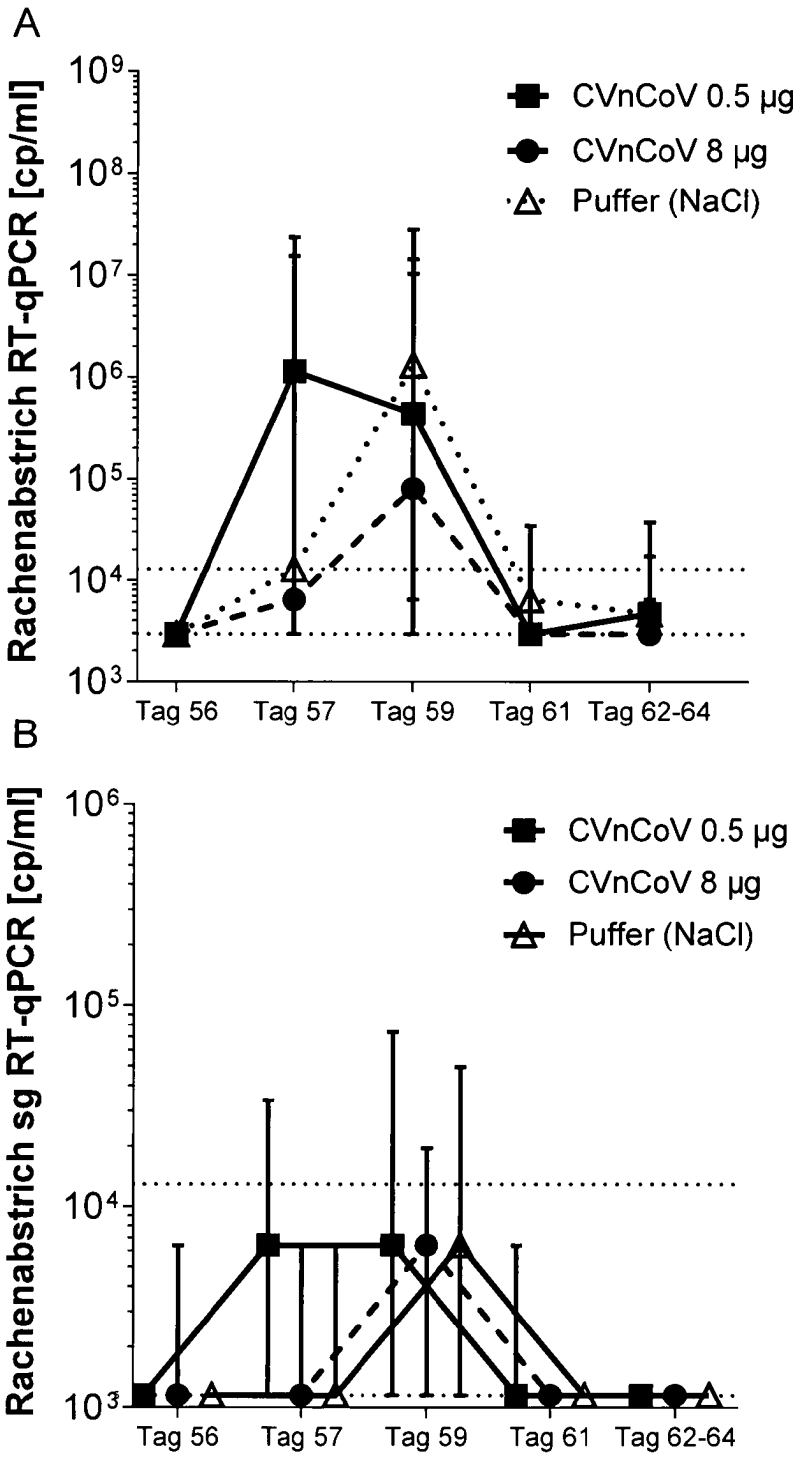

A
Rachenabstrich RT-qPCR [cp/ml]
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
CVnCoV 0.5 µg
CVnCoV 8 µg
Puffer (NaCl)
Tag 56
Tag 57
Tag 59
Tag 61
Tag 62-64
B
Rachenabstrich sg RT-qPCR [cp/ml]
10^6
10^5
10^4
10^3
CVnCoV 0.5 µg
CVnCoV 8 µg
Puffer (NaCl)
Tag 56
Tag 57
Tag 59
Tag 61
Tag 62-64

FIG 20 A B

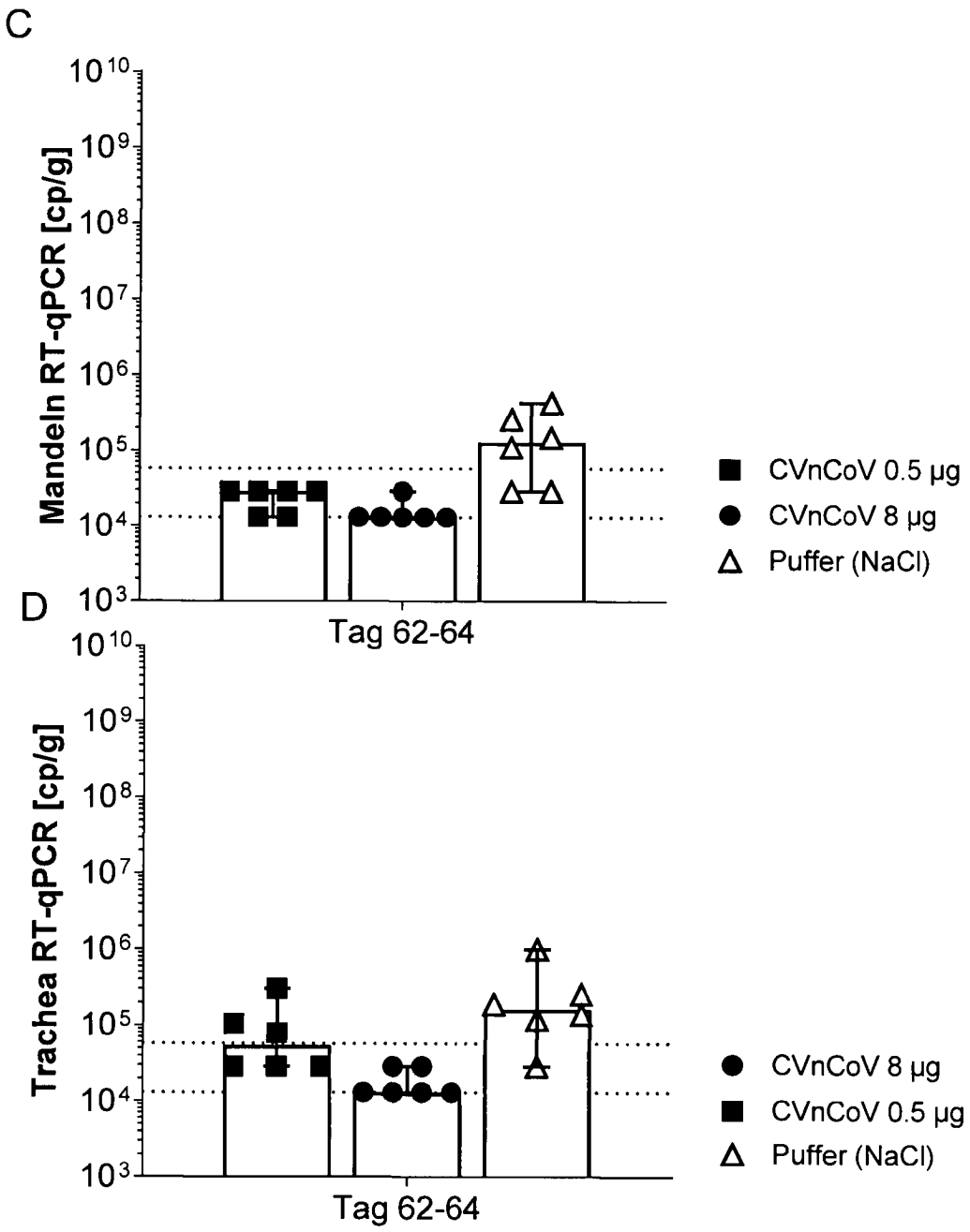
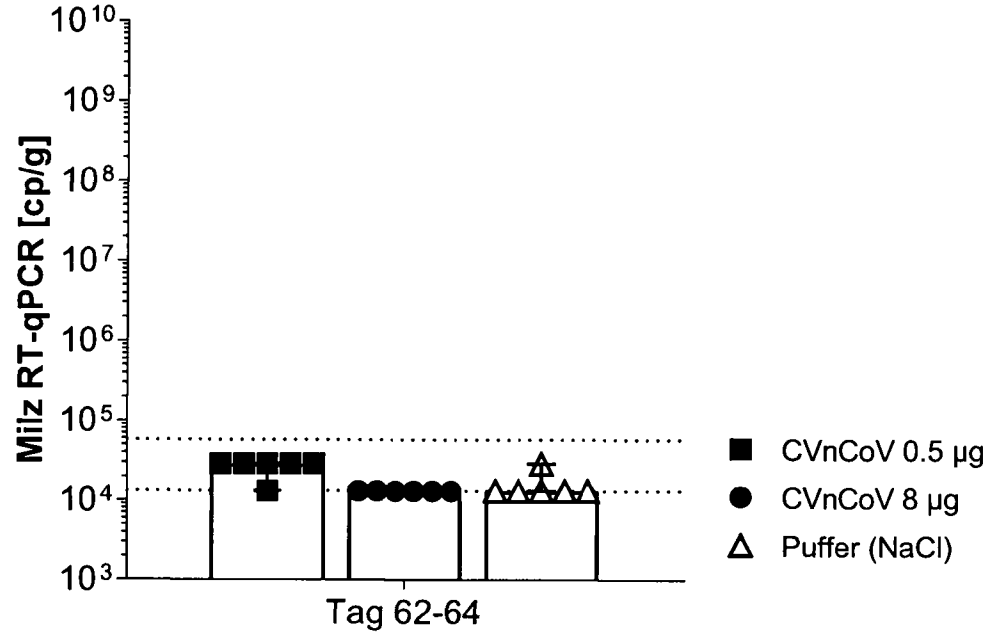

C
Mandeln RT-qPCR [cp/g]
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
10^{4}
10^{3}
Tag 62-64
CVnCoV 0.5 µg
CVnCoV 8 µg
Puffer (NaCl)
D
Trachea RT-qPCR [cp/g]
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
10^{4}
10^{3}
Tag 62-64
CVnCoV 8 µg
CVnCoV 0.5 µg
Puffer (NaCl)

FIG 20 C D

E


Milz RT-qPCR [cp/g]
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
10^{4}
10^{3}
Tag 62-64
CVnCoV 0.5 µg
CVnCoV 8 µg
Puffer (NaCl)

F

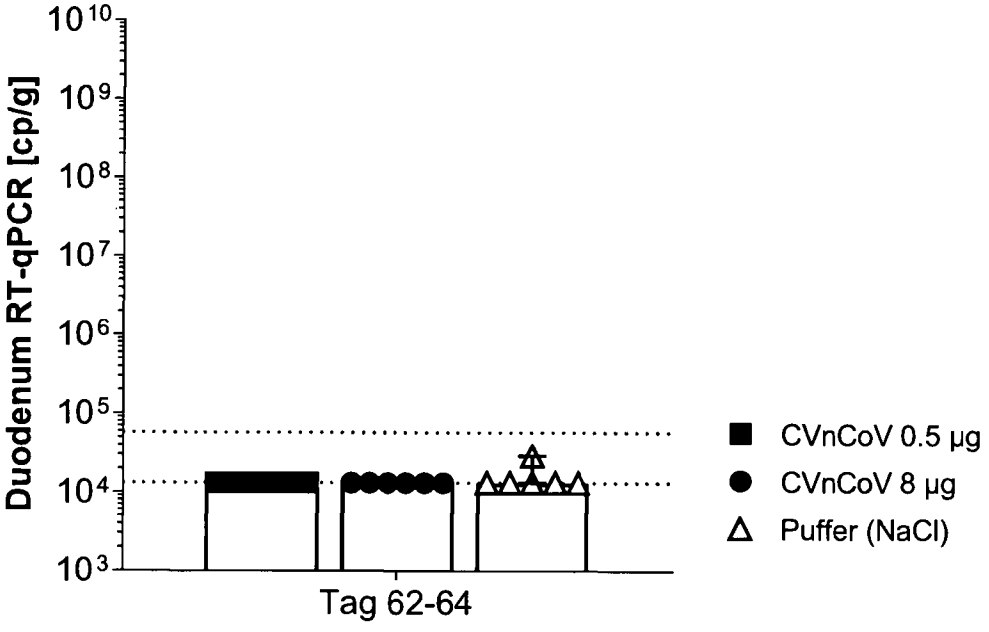

Duodenum RT-qPCR [cp/g]
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
10^{4}
10^{3}
Tag 62-64
CVnCoV 0.5 µg
CVnCoV 8 µg
Puffer (NaCl)

FIG 20 E F

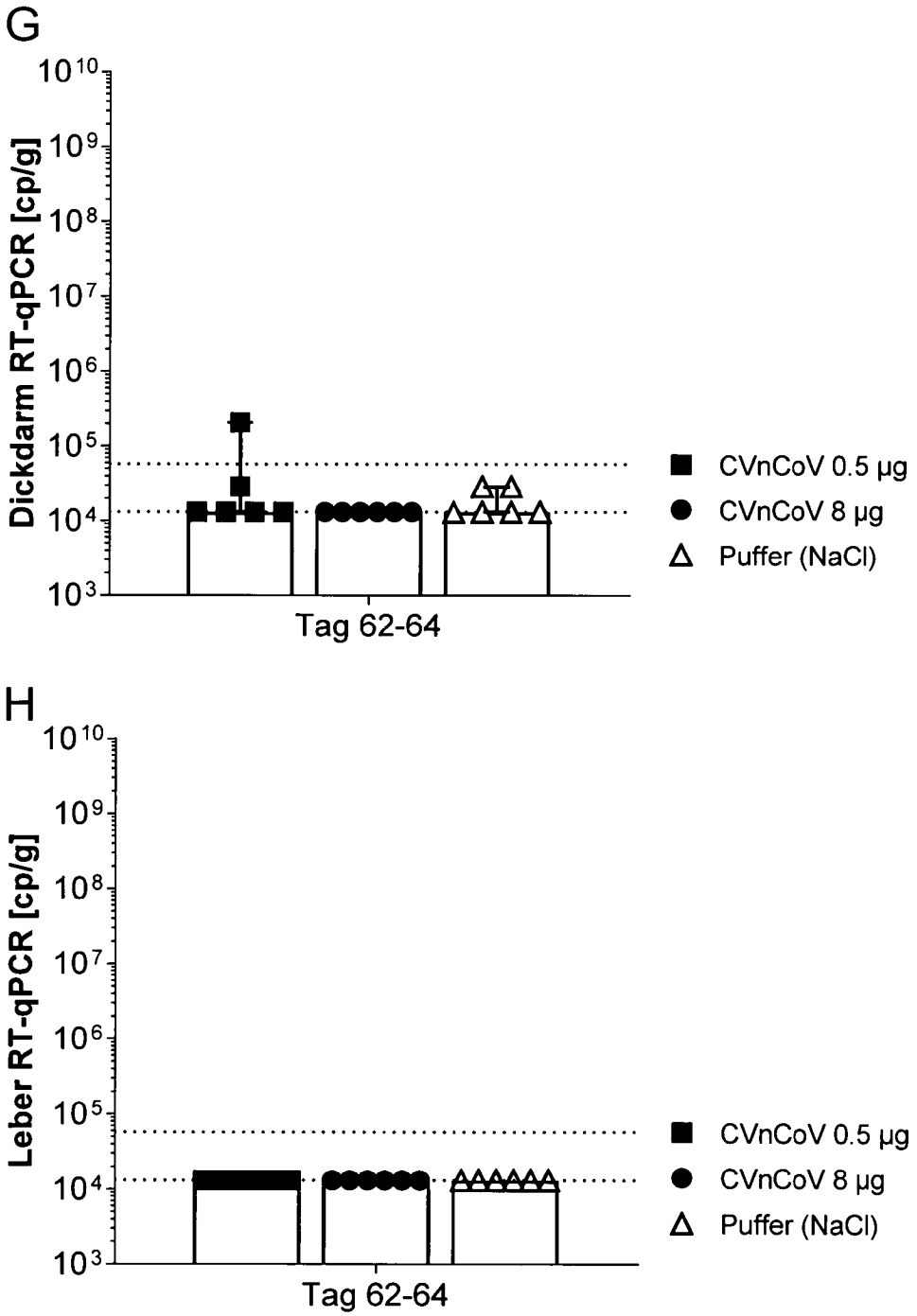

G
Dickdarm RT-qPCR [cp/g]
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
10^{4}
10^{3}
Tag 62-64
CVnCoV 0.5 µg
CVnCoV 8 µg
Puffer (NaCl)
H
Leber RT-qPCR [cp/g]
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
10^{4}
10^{3}
Tag 62-64
CVnCoV 0.5 µg
CVnCoV 8 µg
Puffer (NaCl)

FIG 20 G H

I

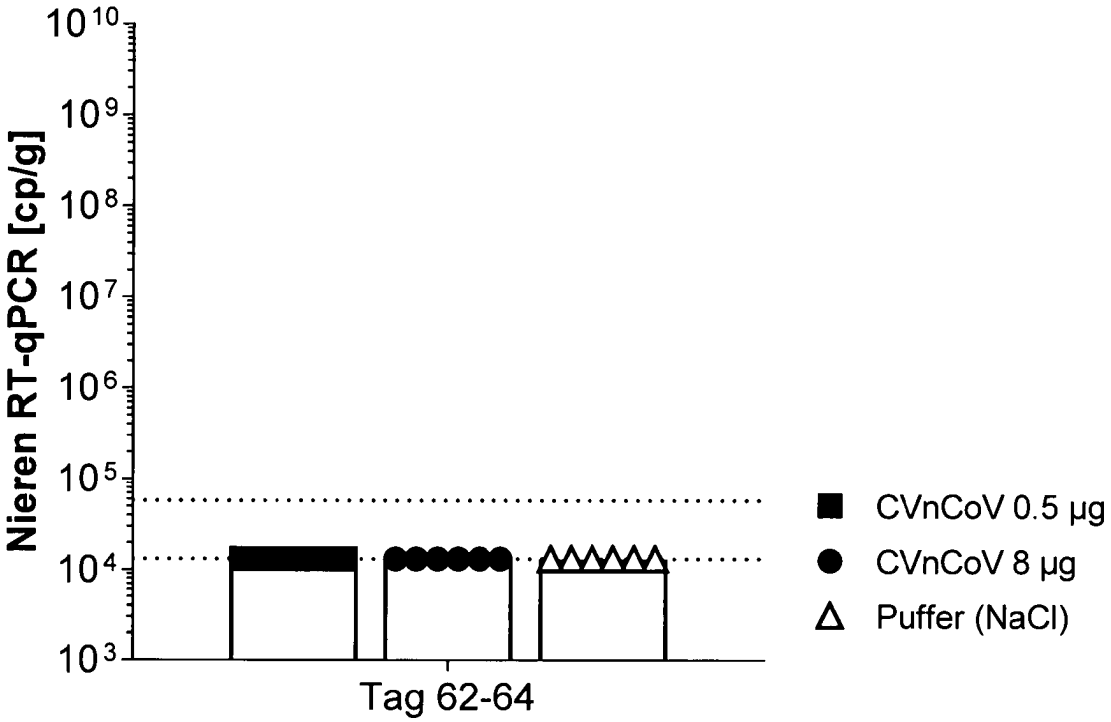

Nieren RT-qPCR [cp/g]
10^10
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
Tag 62-64
CVnCoV 0.5 µg
CVnCoV 8 µg
Puffer (NaCl)

FIG 20 I

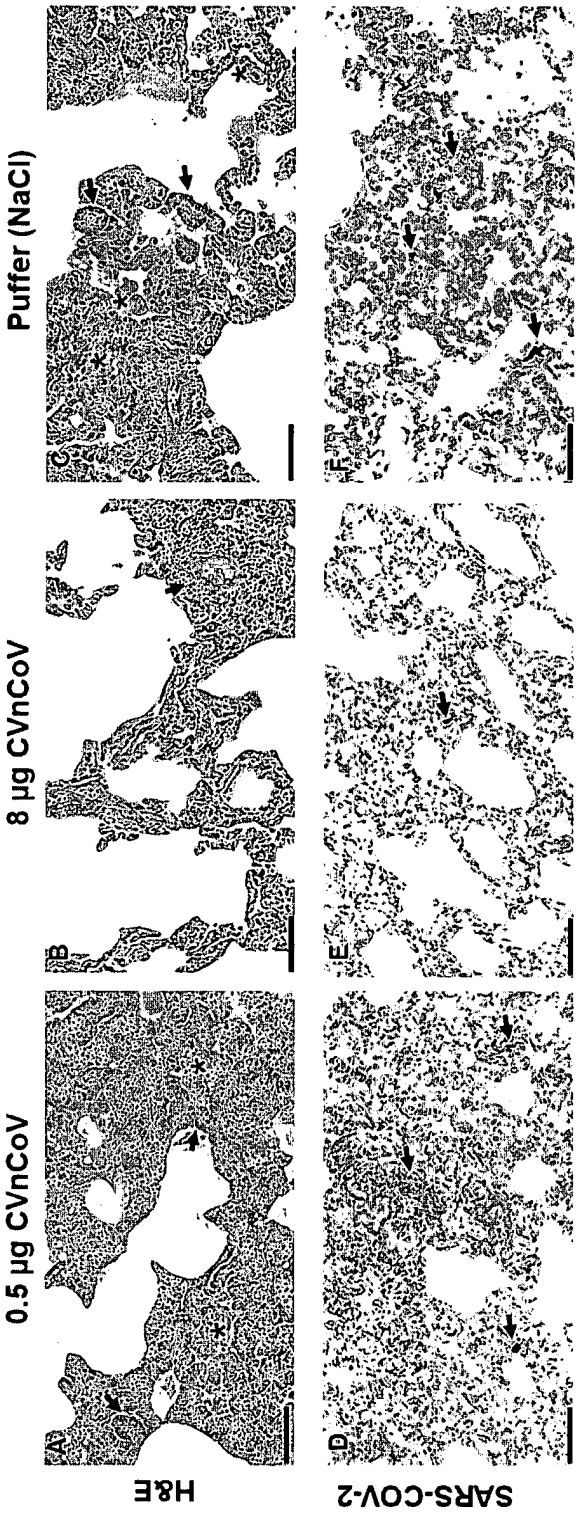


FIG 21

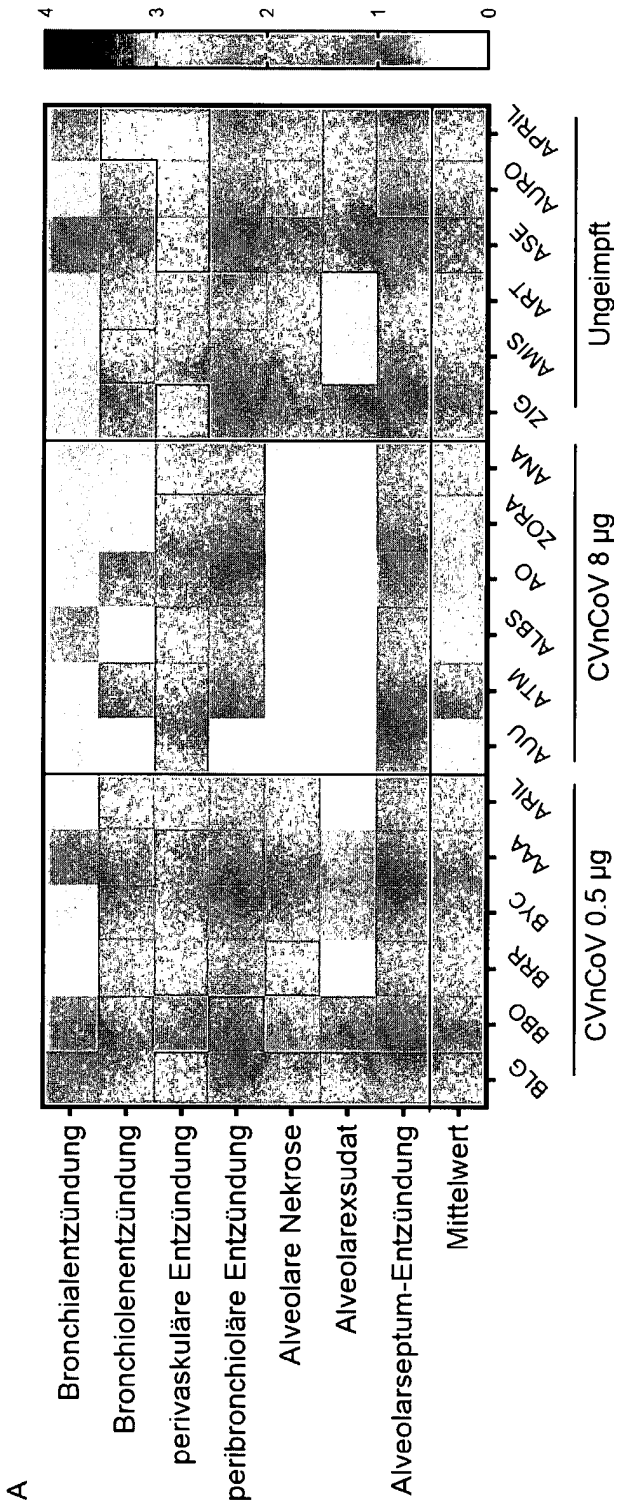

A
Bronchialentzündung
Bronchiolenentzündung
perivaskuläre Entzündung
peribronchioläre Entzündung
Alveolare Nekrose
Alveolarexsudat
Alveolarseptum-Entzündung
Mittelwert
BLG
BBO
BRR
BYC
AAA
ARIL
AUU
ATM
ALBS
AO
ZORA
ANA
ZIG
AMIS
ART
ASE
AURO
APRIL
CVnCoV 0.5 µg
CVnCoV 8 µg
Ungeimpft
4
3
2
1
0

FIG 22 A

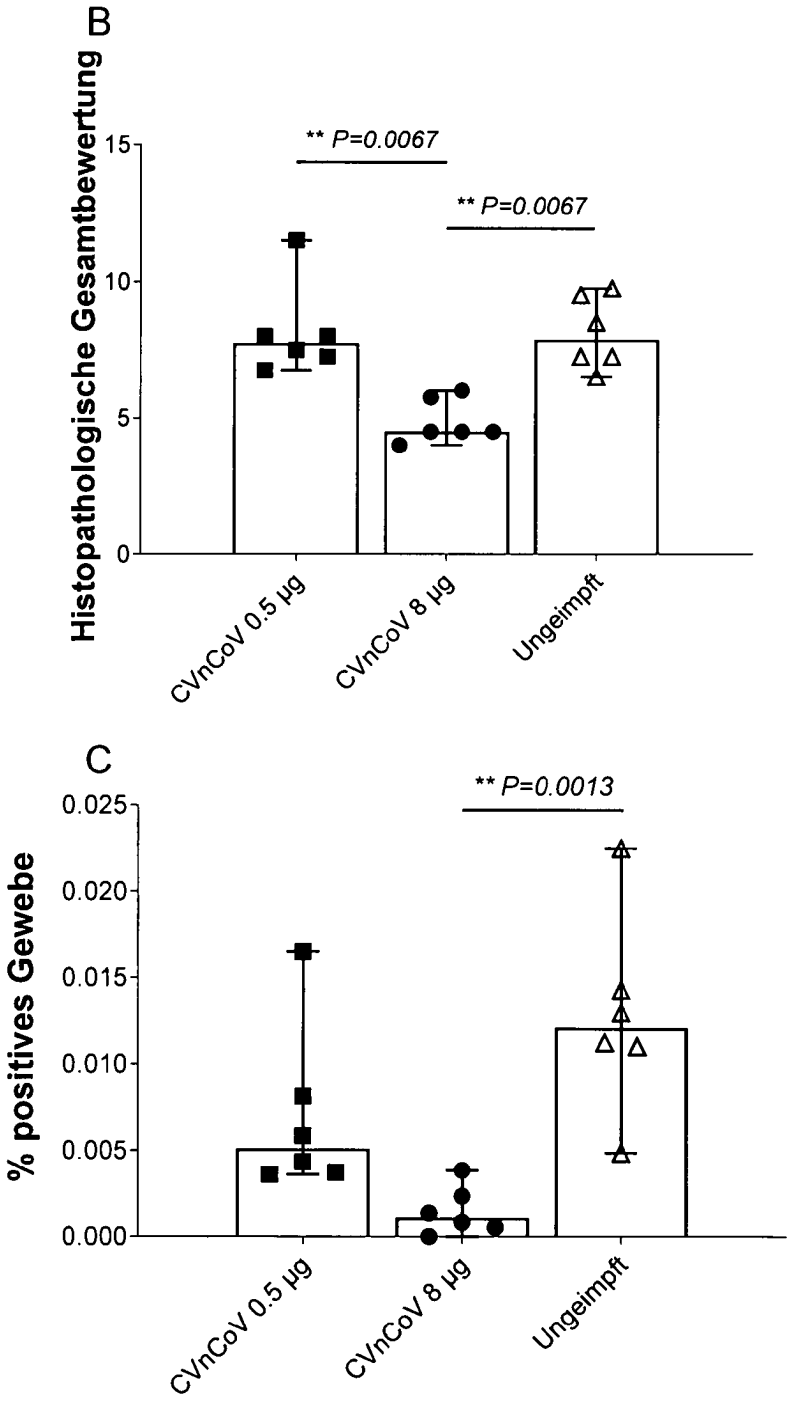

B
Histopathologische Gesamtbewertung
15
10
5
0
** P=0.0067
** P=0.0067
CVnCoV 0.5 µg
CVnCoV 8 µg
Ungeimpft
C
% positives Gewebe
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
** P=0.0013
CVnCoV 0.5 µg
CVnCoV 8 µg
Ungeimpft

FIG 22 B C

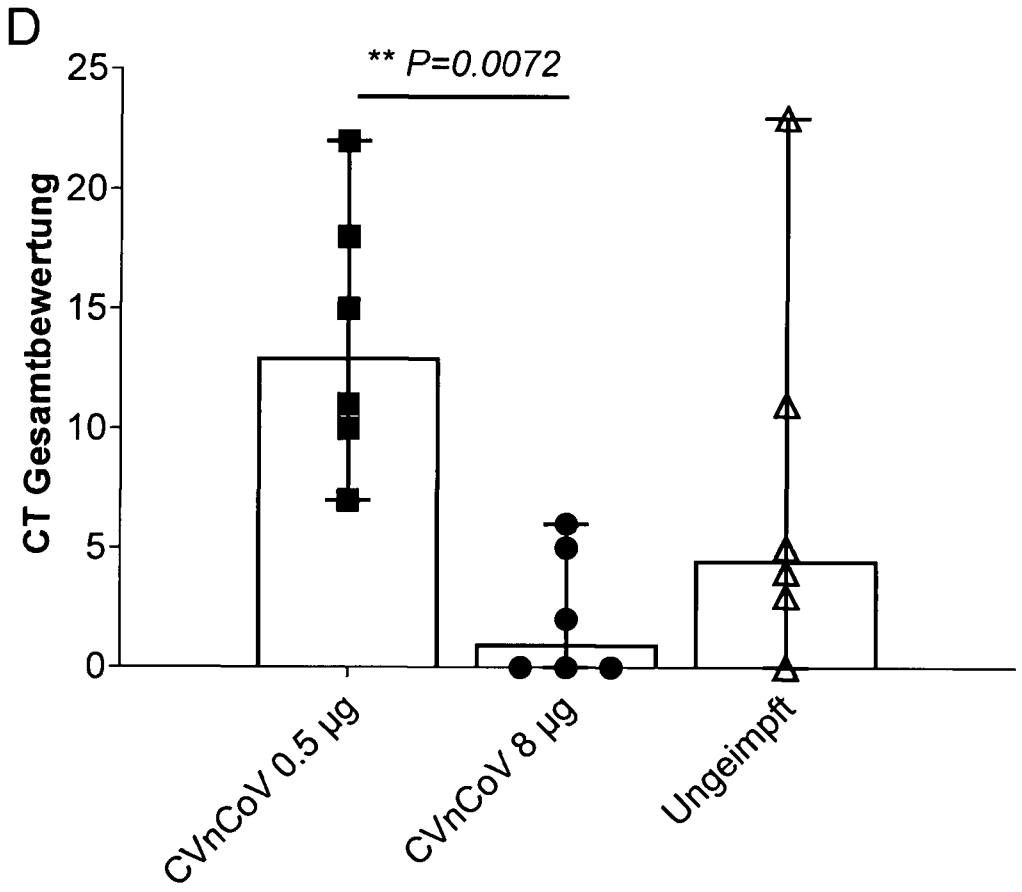

D
** P=0.0072
CT Gesamtbewertung
25
20
15
10
5
0
CVnCoV 0.5 µg
CVnCoV 8 µg
Ungeimpft

FIG 22 D

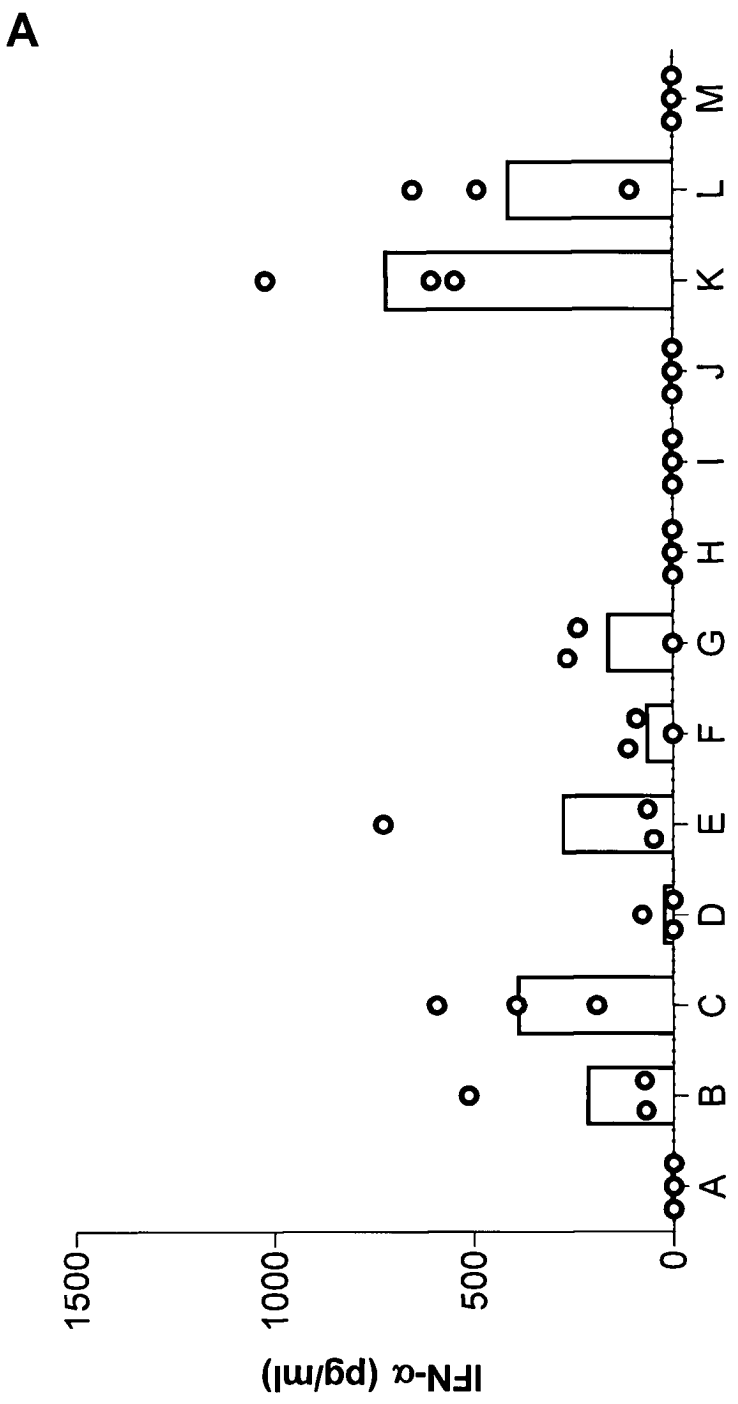


FIG 23 A

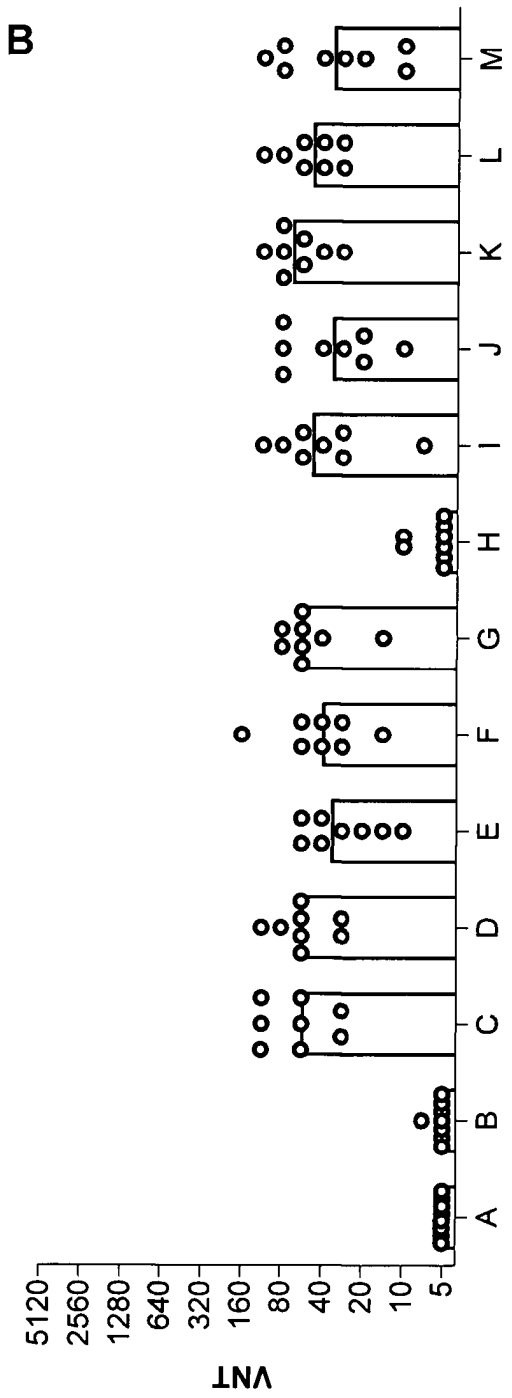


FIG 23 B

C

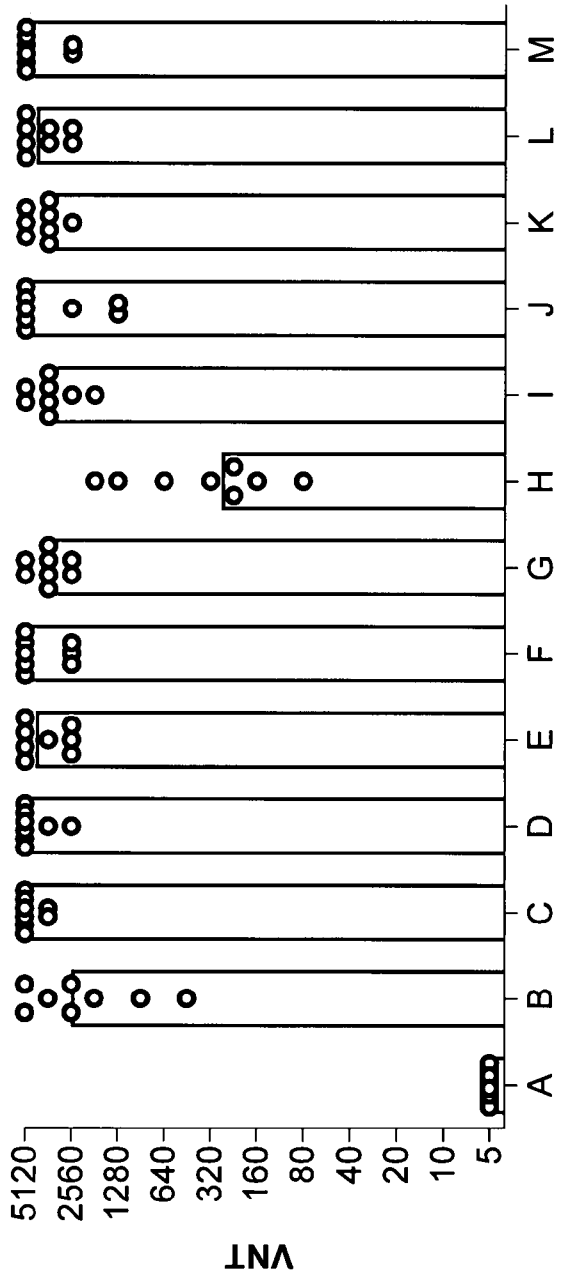


FIG 23 C

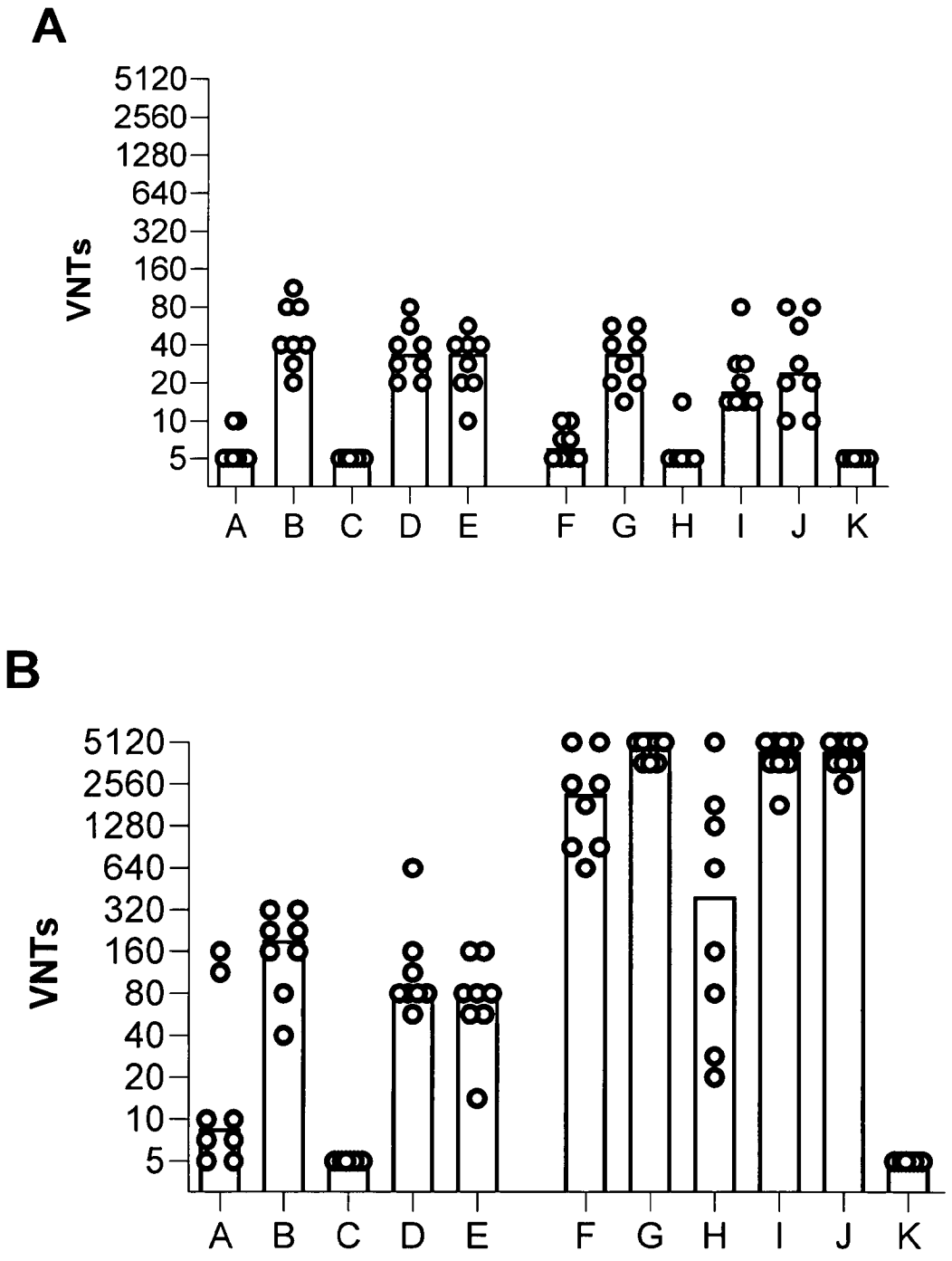


FIG 24

 Das Dokument wurde durch die Firma Luminess hergestellt.