



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0044404
(43) 공개일자 2023년04월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/215 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/215 (2013.01)
A61P 31/14 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-7002322
(22) 출원일자(국제) 2021년06월25일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년01월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/039134
(87) 국제공개번호 WO 2021/263131
국제공개일자 2021년12월30일
(30) 우선권주장
63/145,200 2021년02월03일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
엘리시오 테라퓨틱스, 인크.
미국 매사추세츠 02139 캠프리지 스위트 14303 빌딩 1400 웨스트 원 켄달 스퀘어
(72) 발명자
스틴빅, 마틴 피.
미국 매사추세츠 02139 캠프리지 스위트 14303 빌딩 1400 웨스트 원 켄달 스퀘어 엘리시오 테라퓨틱스, 인크. 내
시나파, 로차나 엠.
미국 매사추세츠 02139 캠프리지 스위트 14303 빌딩 1400 웨스트 원 켄달 스퀘어 엘리시오 테라퓨틱스, 인크. 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김정훈

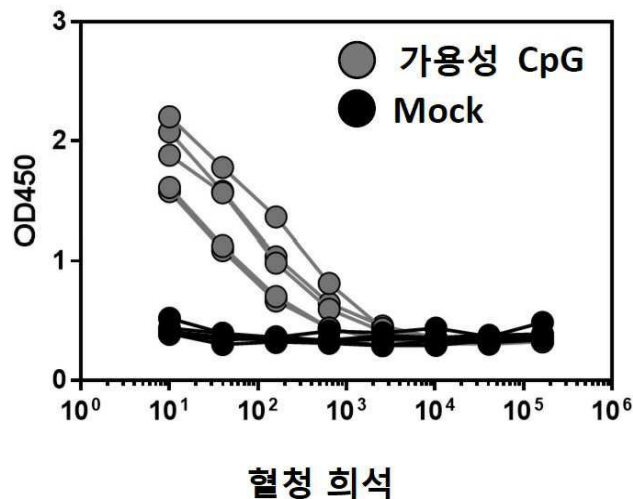
전체 청구항 수 : 총 57 항

(54) 발명의 명칭 코로나바이러스에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

대상체에서 면역 반응을 유도하는 데 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질, 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열), 및 대상체에서 면역 반응을 유도하기 위해 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질, 그의 펩티드, 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질, 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)을 투여하는 방법이 본원에 개시된다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 2039/53 (2013.01)
A61K 2039/55561 (2013.01)
A61K 2039/572 (2013.01)
A61K 2039/575 (2013.01)
C12N 2770/20034 (2013.01)

(72) 발명자

데무스, 피터 씨.

미국 매사추세츠 02139 캠브리지 스위트 14303 빌딩 1400 웨스트 원 켄달 스퀘어 엘리시오 테라퓨틱스, 인크. 내

하크, 크리스토퍼 엠.

미국 매사추세츠 02139 캠브리지 스위트 14303 빌딩 1400 웨스트 원 켄달 스퀘어 엘리시오 테라퓨틱스, 인크. 내

맥네일, 리사

미국 매사추세츠 02139 캠브리지 스위트 14303 빌딩 1400 웨스트 원 켄달 스퀘어 엘리시오 테라퓨틱스, 인크. 내

(30) 우선권주장

63/044,773	2020년06월26일	미국(US)
63/124,200	2020년12월11일	미국(US)
63/064,836	2020년08월12일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

대상체에서 코로나바이러스 항원에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 방법으로서, 대상체에 (1) CpG-양친매성 물질 및 (2) 코로나바이러스 항원 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 코로나바이러스 항원은 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드 또는 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 펩티드를 인코딩하는 핵산 서열인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, CpG-양친매성 물질은 지질에 결합된 CpG 서열을 포함하는 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, CpG-양친매성 물질은 링커에 의해 지질에 연결된 CpG 서열을 포함하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 링커는 중합체, 아미노산의 가닥, 핵산의 가닥, 다당류, 또는 이들의 조합을 포함하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 링커는 핵산의 가닥을 포함하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 핵산의 가닥은 1 내지 50개의 핵산 잔기를 포함하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 핵산의 가닥은 5 내지 30개의 핵산 잔기를 포함하는 방법.

청구항 9

제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산의 잔기는 "N"개의 구아닌을 포함하고, 여기서 N은 1-10인 방법.

청구항 10

제5항에 있어서, 링커는 연속적인 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 링커는 "N"개의 연속적인 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함하고, 여기서 N은 20 내지 80인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 링커는 "N"개의 연속적인 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함하고, 여기서 N은 30 내지 70인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 링커는 "N"개의 연속적인 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함하고, 여기서 N은 40 내지 60인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 링커는 "N"개의 연속적인 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함하고, 여기서 N은 45 내지 55인 방법.

청구항 15

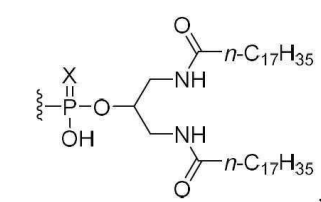
제14항에 있어서, 링커는 48개의 연속적인 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함하는 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 지질은 디아실 지질인 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 디아실 지질은 하기 구조 또는 그의 염을 갖는 것인 방법:



여기서 X는 O 또는 S이다.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, CpG 서열은 뉴클레오타이드 서열 **5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3' (서열 번호 1)** 을 포함하는 방법.

청구항 19

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, CpG 서열은 **5'-TCCATGACGTTTCCTGACGTT-3' (서열 번호 2)** 의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 방법.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, CpG 서열에서 뉴클레오사이드를 연결하는 모든 뉴클레오사이드내 기는 포스포로 티오에이트인 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드인 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 코로나바이러스 스파이크 단백질의 펩티드는 안지오텐신-전환 효소 2 (ACE2)에 특이적으로 결합하는 수용체 결합 도메인인 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 코로나바이러스 스파이크 단백질의 펩티드는 하기 서열에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함하는 방법:

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRRKRISNCVADYSVLVNSASFSTFKCYGVSPTKLN
DLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRK
SNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPK
KSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCS (서열 번호
3).

청구항 24

제23항에 있어서, 코로나바이러스 스파이크 단백질의 펩티드는 하기의 폴리펩티드 서열을 포함하는 방법:

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRRKRISNCVADYSVLVNSASFSTFKCYGVSPTKLN
DLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRK
SNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPK
KSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCS (서열 번호
3).

청구항 25

제1항 및 제3항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 코로나바이러스 항원은 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질 또는 그의 펩티드인 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질 항원은 하기 서열에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함하는 방법:

MSDNGPQNQRNAPRITFGGSPDSTGSNQNNGERSGARSKQRRPQGLPNNTASWFTALTQHGKEDLKFP
RGQGVPIINTNSSPDDQIGYYRRATRRIRGGDGKMKDLSRWYFYLLGTGPEAGLPYGANKDGIWVATE
GALNTPKDHIGTRNPANNAIVLQLPQGTTLPKGFYAEGSRGGSQASSRSSRSRNSSRNSTPGSSRG
SPARMAGNGGDAALALLLLDRLNQLESKMSGKGQQQQGQTVTKSAAEASKKPRQKRTATKAYNVTQA
FGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTQDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTGAIKLDDK
DPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPPTPEPKDKKKKKADETQALPQRQKKQQTVTLLPAADLDDFSKQLQQSMS
SADSTQA (서열 번호 68).

청구항 27

제25항에 있어서, 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질 항원은 하기의 폴리펩티드 서열을 포함하는 방법:

MSDNGPQNQRNAPRITFGGSPDSTGSNQNNGERSGARSKQRRPQGLPNNTASWFTALTQHGKEDLKFP
RGQGVPIINTNSSPDDQIGYYRRATRRIRGGDGKMKDLSRWYFYLLGTGPEAGLPYGANKDGIWVATE
GALNTPKDHIGTRNPANNAIVLQLPQGTTLPKGFYAEGSRGGSQASSRSSRSRNSSRNSTPGSSRG
SPARMAGNGGDAALALLLLDRLNQLESKMSGKGQQQQGQTVTKSAAEASKKPRQKRTATKAYNVTQA
FGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTQDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTGAIKLDDK
DPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPPTPEPKDKKKKKADETQALPQRQKKQQTVTLLPAADLDDFSKQLQQSMS
SADSTQAENLYFQGHHHHHH (서열 번호 63).

청구항 28

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 코로나바이러스 항원은 하나 이상의 태그를 포함하는 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 태그는 Avi 태그인 방법.

청구항 30

제28항에 있어서, 태그는 히스티딘 태그인 방법.

청구항 31

제28항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 코로나바이러스 항원은 Avi 태그 및 히스티딘 태그를 포함하는 방법.

청구항 32

제28항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 코로나바이러스 항원은 폴리펩티드 서열과 하나 이상의 태그 사이에 링커를 포함하는 방법.

청구항 33

제1항 내지 제24항 및 제28항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 코로나바이러스 스파이크 단백질이 투여되는 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 코로나바이러스 스파이크 단백질의 삼량체가 투여되는 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 삼량체는 하기 서열을 포함하는 단백질 작제물의 삼량체인 방법:

VNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFAIHVSGTNGTKRFDNPVLP
FNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSTQSLIVNNATNVVIVKCEFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESE
FRVYSSANNCTFEYVSQPFMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLV
DLPIGINITRFQTLALHRSYLTGPDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSET
KCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLN
SASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLDDFTGCVIAWNSNN
LDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFRDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYR
VVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQGFGRDIADTTDAVRDP
QTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCL
IGAHEVNNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRAAASVASQSIAYTMSLGAENSVAYSNNNSIAIPTNFTISVT
TEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIK
DFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTADAGFIKQYGDCLGDIAARDLCAQKFNGLTVLPPLD
EMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSL
SSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVT
QQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLSFPQSAPHGVVFLHVTVYVPAQEKNFSTA
PAICHDGKAHFPREGVFSNGTHWFVTQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVIGIVNNTVYDPLQPELDSFK
EELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVUNIKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPGGSGGG
SHHHHHHHHHH (서열 번호 66).

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 코로나바이러스 스파이크 단백질, 또는 그의 펩티드, 및 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질, 또는 그의 펩티드가 투여되는 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 하기 서열:

VNLTTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLP
FNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSTQSLIVNNATNVVIVKCEFCNDPFLGVYYHKNNKSWMSE
FRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLV
DLPIGINITRFQTLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSET
KCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLN
SASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQGTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNN
LDSKVGNNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYR

VVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNENGLTGTGVLTESNKKFLPFQFGRDIADTTDAVRDP
QTLEILDITPCSFGGVSITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCL
IGAHEVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRAASVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNIAIPTNFTISVT
TEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIK
DFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLCAQKFNGLTVPPLTLD
EMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNQSAIGKIQDSL
SSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVT
QQLIRAAEIRASANLAATKMSSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTA
PAICHGDKAHFREGVVFVSNGTHWFTQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVIGIVNNTVYDPLQPELDSFK
EELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPGGGSGGG
SHHHHHHHHHH (서열번호 66)

을 포함하는 코로나바이러스 스파이크 단백질 작제물의 삼량체; 및

MSDNGPQNQRNAPRITFGGSPDSTGSNQNGERSGARSQRRPQGLPNNTASWFTALTQHGKEDLKFP
RGQGVPIINTSSPDDQIGYYRRATRRIRGGDGKMKDLSPRWYFYLLGTGPEAGLPYGANKDGIWWATE
GALNTPKDHIGTRNPANNAIIVLQLPQGTTLPKGFYAEGSRGGSQASSRSSRSRNSSRNSTPGSSRG
SPARMAGNGGDAALALLLDRLNQLESKMSGKGQQQQGQTVTKSAAEASKKPRQKRTATKAYNVTQA
FGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTQYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTGAIKLDDK
DPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPTEPKDKKKKKADETQALPQRQKKQQTVTLLPAADLDDFSKQLQSSMS
SADSTQAENLYFQGHHHHHH (서열 번호 63)

의 폴리펩티드 서열을 갖는 코로나바이러스 뉴클레오펜사이드 단백질 작제물이 투여되는 방법.

청구항 38

제1항 내지 제25항, 제28항 내지 제31항 및 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 mRNA가 투여되는 방법.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열이 동시에 투여되는 방법.

청구항 40

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 이를 둘러싼 핵산 서열이 순차적으로 투여되는 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, CpG-양친매성 물질이 첫 번째로 투여되고 이후 코로나바이러스 항원 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열의 투여가 후속되는 방법.

청구항 42

제40항에 있어서, 상기 코로나바이러스 항원 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열이 첫 번째로 투여되고, 이후 CpG-양친매성 물질의 투여가 후속되는 방법.

청구항 43

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 아쥬반트를 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 코로나바이러스 백신을 대상체에 프라임 또는 부스트로서 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, CpG-양친매성 물질은 피하, 비강내, 기관내로, 또는 기계 환기 동안 흡입에 의해 투여되는 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, CpG-양친매성 물질은 피하로 투여되는 방법.

청구항 47

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 코로나바이러스 항원은 피하, 비강내, 기관내로, 또는 기계 환기 동안 흡입에 의해 투여되는 방법.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 포유동물인 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 대상체는 인간인 방법.

청구항 50

CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 51

제50항에 있어서, 코로나바이러스 항원은 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드인 약학적 조성물.

청구항 52

제50항에 있어서, 코로나바이러스 항원은 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드인 약학적 조성물.

청구항 53

제50항에 있어서, 코로나바이러스 항원은 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드 및 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 54

CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 키트.

청구항 55

제54항에 있어서, 코로나바이러스 항원은 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드인 키트.

청구항 56

제54항에 있어서, 코로나바이러스 항원은 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드인 키트.

청구항 57

제54항에 있어서, 코로나바이러스 항원은 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드 및 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드를 포함하는 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 우선권 주장

[0002] 본 출원은 2020년 6월 26일에 출원된 미국 가특허 출원 제63/044,773호, 2020년 8월 12일에 출원된 미국 가특허 출원 제63/064,836호, 2020년 12월 11일에 출원된 미국 가특허 출원 제63/124,200호, 및 2021년 2월 3일에 출원된 미국 가특허 출원 제63/145,200호의 출원일의 이익을 주장하며, 이의 각각은 그 전문이 본원에 참조로 편입된다.

배경 기술

[0003] 코로나바이러스는 포유동물 및 조류를 감염시킬 수 있는 큰 부류의 바이러스이다. 코로나바이러스 부류는 하기 4개의 속을 포함한다: 알파-, 베타-, 감마- 및 델타코로나바이러스. 인간에서의 코로나바이러스 감염은 보통 경증 내지 중증증의 상기도 감염병, 예컨대 일반 감기를 유발한다. 최근, 인수공통감염 확산(zoonotic spillover)으로부터 발생한 코로나바이러스 발병은 심각한 질환과 전세계적 전염 우려를 일으키고 있다.

[0004] 2019년까지, 알파코로나바이러스 (예를 들어, 인간 코로나바이러스 229E (HCoV-229E) 및 인간 코로나바이러스 NL63 (HCoV-NL63)) 및 베타코로나바이러스 (예를 들어, 인간 코로나바이러스 OC43 (HCoV-OC43), 인간 코로나바이러스-HKU1 (HCoV-HKU1), 코로나바이러스 (SARS-CoV)와 관련된 중증 급성 호흡기 증후군 (SARS), 및 중증 호흡기 증후군 (MERS-CoV))을 포함하는 6종의 인간 코로나바이러스가 알려져 있다. COVID-19로 알려진 고전염성 질환의 원인인 2019년 신종 베타코로나바이러스 (SARS-CoV-2)는 최근 중국에서 출현하여 전세계적으로 빠르게 확산되어 2020년 6월 14일 기준 >7,690,708건의 확인된 사례 및 >427,630건의 사망을 야기하였다.

[0005] 입원 환자 데이터 기준으로, COVID-19 사례의 대부분 (약 80%)는 무증상 또는 경증 증상을 나타내고, 한편 나머지는 중증이거나 위중하다 (Huang et al., Lancet 395:497 (2020); Chan et al., Lancet 395:514 (2020)). 대다수의 환자가 경증 형태의 질병만을 겪지만, 환자의 대략 15%는 종종 보조 환기 및 산소공급이 필요한 심각한 질병을 겪는다. 현재, COVID-19의 중증도 및 치명률은 SARS-CoV-1 및 MERS의 것보다 더 경증이지만 감염성과 관련하여 큰 효능을 나타낸다. SARS-CoV-1 및 MERS와 유사한 임상 양상을 보이는 COVID-19의 가장 일반적인 증상은 열, 피로, 및 기침, 인후염, 호흡 곤란을 포함하는 호흡기 증상이다. 41명의 입원 환자의 연구는 높은 수준의 전염증성 사이토카인이 COVID-19 중증 사례에서 관찰된 것을 나타내었다 (Huang et al., Lancet 395:497 (2020)). 이러한 발견은 림프구 감소증 및 "사이토카인 폭풍"의 존재가 COVID-19의 발병에 있어서 중요한 역할을 할 가능성이 있다는 점에서 SARS 및 MERS와 일치한다 (예를 들어, 문헌 [Nicholls et al., Lancet 361(9371):1773 (2003)]; [Mahallawi et al., Cytokine 104:8 (2018)]; 및 [Wong et al., Clin Exp Immunol. 136(1):95 (2004)]를 참조한다). 이는 소위 "사이토카인 폭풍"은 폐렴, 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 호흡 부전, 패혈성 쇼크, 장기 부전 및 사망을 포함하는 다른 합병증을 야기할 수 있는 바이러스성 패혈증 및 염증-유발 폐 손상을 일으킬 수 있다. 그 결과, SARS-CoV-2 및 관련 바이러스와 같은 코로나바이러스 감염에 대한 면역 반응을 일으키는 안전하고 효과적인 방법에 대한 시급한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0006] 발명의 요약

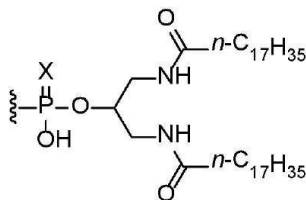
[0007] 대상체에서 면역 반응을 유도하는 데 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩

티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)이 본원에 개시되어 있다. 또한, 대상체에서 면역 반응을 유도하기 위해 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및 /또는 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)을 투여하는 방법이 개시되어 있다.

[0008] 일 양태에서, 본 개시내용은 대상체에 (1) CpG-양친매성 물질 및 (2) 코로나바이러스 항원 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열을 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 코로나바이러스 항원에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 또한, 상응하는 조성물 및 키트가 제공된다.

[0009] 일부 구현예에서, 코로나바이러스 항원은 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드 또는 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 펩티드를 인코딩하는 핵산 서열이다. 일부 구현예에서, CpG-양친매성 물질은 지질에 결합된 CpG 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, CpG-양친매성 물질은 링커에 의해 지질에 연결된 CpG 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 중합체, 아미노산의 가닥, 핵산의 가닥, 다당류 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 핵산의 가닥을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산의 가닥은 1 내지 50개 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50개)의 핵산 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산의 가닥은 5 내지 30개 (예를 들어, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개)의 핵산 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산의 가닥은 "N"개의 구아닌을 포함하고, 여기서 N은 1-10 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9)이다. 일부 구현예에서, 링커는 연속적인 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 "N"개의 연속적인 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함하고, 여기서 N은 20 내지 80 (예를 들어, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 또는 80)이다. 일부 구현예에서, 링커는 "N"개의 연속적인 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함하고, 여기서 N은 30 내지 70 (예를 들어, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 또는 70)이다. 일부 구현예에서, 링커는 "N"개의 연속적인 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함하고, 여기서 N은 40 내지 60 (예를 들어, 41, 42, 43, 44, 45, 50, 55, 또는 60)이다. 일부 구현예에서, 링커는 "N"개의 연속적인 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함하고, 여기서 N은 45 내지 55 (예를 들어, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 또는 55)이다. 일부 구현예에서, 링커는 48개의 연속적인 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함한다.

[0010] 일부 구현예에서, 지질은 디아실 지질이다. 일부 구현예에서, 디아실 지질은 하기 구조 또는 그의 염을 갖는다:



[0011]

[0012] 여기서 X는 O 또는 S이다. 일부 구현예에서, CpG 서열은 뉴클레오티드 서열 5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3' (서열 번호 1)을 포함한다. 일부 구현예에서, CpG 서열은 5'-TCCATGACGTTCTGACGTT-3' (서열 번호 2)의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, CpG 서열에서 뉴클레오사이드를 연결하는 모든 뉴클레오사이드내 기들은 포스포로티오에이트이다. 일부 구현예에서, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드이다. 일부 구현예에서, 코로나바이러스 스파이크 단백질의 펩티드는 안지오텐신-전환 효소 2 (ACE2)에 특이적으로 결합하는 수용체 결합 도메인이다. 일부 구현예에서, 코로나바이러스 스파이크 단백질의 펩티드는 하기 서열에 대해 적어도 90% (예를 들어, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함한다:

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSP
 LNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLY
 RLFRKSNLKPFFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVWLSFELLHA
 PATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITP
 CS (서열 번호 3).

[0013]

[0014] 일부 구현예에서, 코로나바이러스 스파이크 단백질의 펩티드는 하기의 폴리펩티드 서열을 포함한다:

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRRKRISNCVADYSVLVNSASFSTFKCYGVSPTK
LNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLY
RLFRKSNLKPFRDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHA
PATVCGPKKSTNLVKNCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITP

[0015] CS (서열 번호 3).

[0016] 일부 구현예에서, 코로나바이러스 항원은 코로나바이러스 뉴클레오펜시드 단백질 또는 그 펩티드이다.

[0017] 일부 구현예에서, 코로나바이러스 뉴클레오펜시드 단백질은 하기 서열에 대해 적어도 90% (예를 들어, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 서열을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함한다:

MSDNGPQNQRNAPRITFGGSPDSTGSNQNGERSGARSKQRRPQGLPNNTASWFTALTQHGKEDL
KFPRGQGVPIINTNSSPDDQIGYYRRATRRIRGGDGKMKDLSRWYFYLLGTGPEAGLPYGANKDGI
WVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAIVLQLPQGTTLPKGFYAEGSRGGSQASSRSSRSRNSRNS
TPGSSRGTSARMAGNGGDAALALLLDRLNQLESKMSGKGQQQQGQTVTKKSAAEASKKPRQKR
TATKAYNVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSG
TWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPTEPKDKKKKKADETQALPQRQKKQQTVTLLP
AADLDDFSKQLQQSMSSADSTQA (서열 번호 68).

[0018] AADLDDFSKQLQQSMSSADSTQA (서열 번호 68).

[0019] 일부 구현예에서, 코로나바이러스 뉴클레오펜시드 단백질은 서열 번호 68의 서열을 포함한다.

[0020] 일부 구현예에서, 코로나바이러스 뉴클레오펜시드 단백질은 하기의 폴리펩티드 서열을 포함한다:

MSDNGPQNQRNAPRITFGGSPDSTGSNQNGERSGARSKQRRPQGLPNNTASWFTALTQHGKEDL
KFPRGQGVPIINTNSSPDDQIGYYRRATRRIRGGDGKMKDLSRWYFYLLGTGPEAGLPYGANKDGI
WVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAIVLQLPQGTTLPKGFYAEGSRGGSQASSRSSRSRNSRNS
TPGSSRGTSARMAGNGGDAALALLLDRLNQLESKMSGKGQQQQGQTVTKKSAAEASKKPRQKR
TATKAYNVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSG
TWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPTEPKDKKKKKADETQALPQRQKKQQTVTLLP
AADLDDFSKQLQQSMSSADSTQAENLYFQGHHHHHH (서열 번호 63).

[0021] AADLDDFSKQLQQSMSSADSTQAENLYFQGHHHHHH (서열 번호 63).

[0022] 일부 구현예에서, 코로나바이러스 항원은 하나 이상의 태그를 포함한다. 일부 구현예에서, 태그는 Avi 태그이다. 일부 구현예에서, 태그는 히스티딘 태그이다. 일부 구현예에서, 코로나바이러스 항원은 Avi 태그 및 히스티딘 태그를 포함한다. 일부 구현예에서, 코로나바이러스 항원은 폴리펩티드 서열과 하나 이상의 태그 사이에 링커를 포함한다. 일부 구현예에서, 코로나바이러스 항원은 폴리펩티드 서열과 하나 이상의 태그 사이에 프로테아제 절단 부위를 포함한다. 일부 구현예에서, 프로테아제 절단 부위는 담배 식각 바이러스 (TEV) 프로테아제 (예를 들어, ENLYFQG)의 서열; 서열 번호 64를 갖는 것)에 대한 절단 부위이다.

[0023] 일부 구현예에서, 코로나바이러스 스파이크 단백질이 투여된다. 일부 구현예에서, 코로나바이러스 스파이크 단백질의 삼량체가 투여된다. 일부 구현예에서, 삼량체는 하기 서열에 대해 적어도 90% (예를 들어, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함하는 단백질 작체물의 삼량체이다:

VNLTTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNP
VLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSTQSLIVNATNVVIVKVEFCQFCNDPFLGVYYHKNNKS
WMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPO
GFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTGDSGSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGITD
AVDCALDPLSETKCTLSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNR
KRISNCVADYSVLVNSASFSTFKCYGVSPKTLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNY
KLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYF
PLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNGLTGTGVLTESNK
KFLPFQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSIVPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVIAHA
DQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRAAASVASQSIIA
YTMSLGAENSVAYSNNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMKTSTVDCTMYICGDSTECNNLLQYGSFCTQLN
RALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTADAGFI
KQYGDCLGDIAARDLCAQKFNGLTVLPLLTDEMAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMA
YRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFG
AISSVLNDILSRDLKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVD
FCGKGYHLSFPPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHGDKAHFPREGVVFVSNGTHWFVTQR
NFYEPQIITDNTFVSGNCDVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVV
NIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPGGGSGGGSHHHHHHHHHH (서열 번호 66).

[0024]

[0025]

일부 구현예에서, 삼량체는 서열 번호 66의 서열을 포함한다.

[0026]

일부 구현예에서, 코로나바이러스 스파이크 단백질, 또는 그의 펩티드, 및 코로나바이러스 뉴클레오펜시드 단백
질, 또는 그의 펩티드가 투여된다. 일부 구현예에서, 하기 서열에 대해 적어도 90% (예를 들어, 91%, 92%, 93%,
94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함하는 코로나바이러스 스파이크
단백질 작제물의 삼량체:

VNLTTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNP
VLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSTQSLIVNATNVVIVKVEFCQFCNDPFLGVYYHKNNKS
WMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPO
GFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTGDSGSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGITD
AVDCALDPLSETKCTLSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNR
KRISNCVADYSVLVNSASFSTFKCYGVSPKTLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNY
KLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYF
PLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNGLTGTGVLTESNK
KFLPFQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSIVPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVIAHA
DQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRAAASVASQSIIA
YTMSLGAENSVAYSNNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMKTSTVDCTMYICGDSTECNNLLQYGSFCTQLN
RALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTADAGFI
KQYGDCLGDIAARDLCAQKFNGLTVLPLLTDEMAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMA
YRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFG
AISSVLNDILSRDLKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVD
FCGKGYHLSFPPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHGDKAHFPREGVVFVSNGTHWFVTQR
NFYEPQIITDNTFVSGNCDVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVV
NIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPGGGSGGGSHHHHHHHHHH (서열 번호 66)

[0027]

[0028]

및 하기 서열에 대해 적어도 90% (예를 들어, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 서열 동일
성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함하는 코로나바이러스 뉴클레오펜시드 단백질 작제물이 투여된다:

MSDNGPQNQRNAPRITFGGSPDSTGSNQNGERSGARSKQRRPQGLPNNTASWFTALTQHGKEDL
KFPRGQGVPIINTNSSPDDQIGYYRRATRRIRGGDGKMKDLSRWYFYLLGTGPEAGLPYGANKDGI
WVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAIVLQLPQGTTLPGKFYAEGSRGGSQASSRSSRSRNSRNS
TPGSSRGTSARMAGNGGDAALALLLLDRLNQLESKMSGKGQQQQGQTVTKKSAAEASKKPRQKR
TATKAYNVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTQDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSG
TWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPTEPKKDKKKKADETQALPQRQKKQQTVTLTP
AADLDDFSKQLQQSMSSADSTQAENLYFQGHHHHHH (서열 번호 63).

[0029]

[0030]

일부 구현예에서, 서열 번호 66의 폴리펩티드 서열을 포함하는 코로나바이러스 스파이크 단백질 작제물의 삼량체 및 서열 번호 63의 폴리펩티드 서열을 포함하는 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 작제물이 투여된다.

[0031]

일부 구현예에서, 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 mRNA가 투여된다. 일부 구현예에서, CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 또는 이를 인코딩하는 핵산이 동시에 투여된다. 일부 구현예에서, CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 또는 이를 인코딩하는 핵산이 순차적으로 투여된다. 일부 구현예에서, CpG-양친매성 물질이 우선 투여되고 이후 코로나바이러스 항원 또는 이를 인코딩하는 핵산의 투여가 후속된다. 일부 구현예에서, 코로나바이러스 항원 또는 이를 인코딩하는 핵산이 우선 투여되고, 이후 CpG-양친매성 물질의 투여가 후속된다.

[0032]

일부 구현예에서, 상기 방법은 대상체에 제2 아췌반트를 투여하는 단계를 포함한다.

[0033]

일부 구현예에서, 상기 방법은 프라임 또는 부스트로서 대상체에 코로나바이러스 백신을 투여하는 단계를 포함한다.

[0034]

일부 구현예에서, CpG-양친매성 물질은 피하로, 비강내로, 기관내로, 또는 기계 환기 동안 흡입에 의해 투여된다. 일부 구현예에서, CpG-양친매성 물질은 피하로 투여된다. 일부 구현예에서, 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 스파이크 단백질, 그의 펩티드, 뉴클레오캡시드 단백질, 또는 이를 인코딩하는 핵산)은 피하로, 비강내로, 기관내로, 또는 기계 환기 동안 흡입에 의해 투여된다. 일부 구현예에서, 대상체는 포유동물이다. 일부 구현예에서, 대상체는 인간이다.

[0035]

다른 양태에서, 본 개시내용은 상기 방법에 대해 기술된 성분들을 이용하는 조성물 및 키트를 제공한다.

[0036]

다른 양태에서, 본 개시내용은 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 코로나바이러스 항원은 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드이다. 일부 구현예에서, 코로나바이러스 항원은 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드이다. 일부 구현예에서, 코로나바이러스 항원은 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드의 조합이다. 일부 구현예에서, CpG-양친매성 물질은 상기에 그리고 본원에 임의의 곳에서 제공된 구현예에 보다 구체적으로 기술된 바와 같고 및/또는 코로나바이러스 항원은 상기에 그리고 본원에 임의의 곳에서 제공된 구현예에 보다 구체적으로 기술된 바와 같다.

[0037]

일부 구현예에서, 대상체는 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)의 약 10 µg 내지 약 1.0 mg의 투여량을 투여받는다. 다른 구현예에서, 투여되는 코로나바이러스 항원의 투여량은 약 10 µg 내지 1 mg, 40 µg 내지 60 µg이거나, 약 50 µg 내지 70 µg이거나, 약 50 µg 내지 150 µg이거나, 약 70 µg 내지 150 µg이거나, 약 100 µg 내지 150 µg이거나, 약 100 µg 내지 200 µg이거나, 약 140 µg 내지 250 µg이거나, 약 200 µg 내지 300 µg이거나, 약 250 µg 내지 500 µg이거나, 약 300 µg 내지 600 µg이거나, 또는 약 500 µg 내지 1.0 mg이다. 다른 구현예에서, 대상체에 투여되는 코로나바이러스 항원의 투여량은 약 10 µg, 20 µg, 30 µg, 40 µg, 50 µg, 60 µg, 70 µg, 80 µg, 90 µg, 100 µg, 110 µg, 120 µg, 130 µg, 140 µg, 150 µg, 200 µg, 250 µg, 300 µg, 400 µg, 500 µg, 600 µg, 700 µg, 800 µg, 900 µg, 또는 1.0 mg이다.

[0038]

일부 구현예에서, 대상체는 약 0.1 mg 내지 20 mg의 CpG 양친매성 물질의 투여량을 투여받는다. 다른 구현예에서, 투여되는 CpG 양친매성 물질의 투여량은 약 0.1 mg 내지 1.0 mg이거나, 약 0.5 mg 내지 3.0 mg이거나, 약 1.0 mg 내지 약 5.0 mg이거나, 약 2.0 내지 5.0 mg이거나, 약 3.0 내지 5.0 mg이거나, 약 3.0 mg 내지 약 10.0 mg이거나, 약 4.0 mg 내지 12.0 mg이거나, 약 5.0 mg 내지 15.0 mg이거나, 약 50 mg 내지 20.0 mg이다. 다른 구현예에서, 대상체에 투여되는 CpG 양친매성 물질의 투여량은 약 0.1 mg, 0.2 mg, 0.3 mg, 0.4 mg, 0.5 mg,

1.0 mg, 2.0 mg, 3.0 mg, 4.0 mg, 5.0 mg, 6.0 mg, 7.0 mg, 8.0 mg, 9.0 mg, 10.0 mg, 11.0 mg, 12.0 mg, 13.0 mg, 14.0 mg, 15.0 mg, 16.0 mg, 17.0 mg, 18.0 mg, 19.0 mg, 또는 20.0 mg이다.

[0039]

다른 양태에서, 본 개시내용은 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 키트를 제공한다. 일부 구현예에서, 코로나바이러스 항원은 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드이다. 일부 구현예에서, 코로나바이러스 항원은 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드이다. 일부 구현예에서, 코로나바이러스 항원은 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드의 조합이다.

도면의 간단한 설명

[0040]

도 1a-도 1c는 PBS (Mock), 가용성 CpG (Soluble CpG)와 함께의 코로나바이러스 스파이크 단백질, 또는 AMP-CpG (AMP-CpG)와 함께의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (도 1c)을 투여받은 (좌측으로부터 우측까지의) 마우스에 대한 일정 범위의 희석에 걸쳐 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3) 및 8 μ g의 가용성 CpG (도 1a) 또는 CpG-양친매성 물질 (도 1b)의 2회 용량을 투여받은 C57B16 마우스에 대한 효소-결합 면역흡착 검정 (ELISA) 검정에 의해 측정되는 혈청 IgG/IgM 항체의 양을 나타내는 그래프이다.

도 2a-도 2c는 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3) 및 8 μ g의 가용성 CpG 또는 CpG-양친매성 물질이 3회 용량을 투여받은 C57B16 마우스에 대한 ELISA 검정에 의해 측정된 혈청 IgG/IgM 항체의 양을 나타내는 그래프이다. 도 2a는 가용성 CpG를 투여받은 마우스로부터의 혈청에 대한 OD450을 나타내는 그래프이고; 도 2b는 CpG-양친매성 물질을 투여받은 마우스로부터의 혈청에 대한 OD450을 나타내는 그래프이고; 도 2c는 대조군 (Mock)으로서의 PBS, 가용성 CpG (Soluble CpG)와 함께의 코로나바이러스 스파이크 단백질, 또는 AMP-CpG (AMP-CpG)와 함께의 코로나바이러스 스파이크 단백질을 투여받은 (좌측으로부터 우측까지의) 마우스에 대한 IgG/M 역가의 양을 나타내는 그래프이다.

도 3a-도 3d는 인간 회복기 혈청 (도 3c)과 비교되는 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3) 및 8 μ g의 가용성 CpG (도 3a) 또는 CpG-양친매성 물질 (도 3b)의 3회 용량을 투여받은 C57B16 마우스에 대한 안지오텐신-전환 효소 2 (ACE2) 수용체와 상호작용하는 코로나바이러스 스파이크 단백질의 능력을 차단하는 생성된 중화 항체의 농도를 나타내는 그래프이다. 도 3d는 인간 회복기 혈청과 비교되는 대조군 (Mock)으로서의 PBS, 가용성 CpG (Soluble CpG)와 함께의 코로나바이러스 스파이크 단백질, 또는 AMP-CpG (AMP-CpG)와 함께의 코로나바이러스 스파이크 단백질을 투여받은 (좌측으로부터 우측까지의) 마우스에 대한 생성된 중화 항체의 양을 나타낸다.

도 4a-도 4c는 대조군 (Mock)으로서의 PBS, 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3) 및 8 μ g의 가용성 CpG (Soluble CpG), 또는 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3) 및 8 μ g의 CpG-양친매성 물질 (AMP-CpG)의 3회 용량을 투여받은 C57B16 마우스에 의해 생성된 IFN γ (또한 IFN γ 로 지칭됨) (도 4a), TNF α (또한 TNF α 로 지칭됨) (도 4b), 및 IL6 (도 4c)의 양을 나타내는 그래프이다.

도 5a-도 5b는 대조군 (Mock)으로서의 PBS, 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3) 및 8 μ g의 가용성 CpG (Soluble CpG), 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3) 및 8 μ g의 CpG-양친매성 물질 (AMP-CpG)의 3회 용량을 투여받은 (좌측으로부터 우측까지의) C57B16 마우스 (도 5a) 및 Balb/C 마우스 (도 5b)에서 생성된 IFN γ 의 농도를 나타내는 그래프이다.

도 6a-도 6c는 PBS 대조군 (Mock), 가용성 CpG (Soluble CpG)와 함께의 코로나바이러스 스파이크 단백질, 또는 AMP-CpG (AMP-CpG)와 함께의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (도 6c)이 투여된 (좌측으로부터 우측까지의) 마우스에 대한 일정 범위의 희석에 걸쳐 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3) 및 8 μ g의 가용성 CpG (도 6a) 또는 CpG-양친매성 물질 (도 6b)의 2회 용량을 투여받은 Balb/C 마우스에 대한 ELISA 검정에 의해 측정된 혈청 IgG/IgM 항체의 양을 나타내는 그래프이다.

도 7a-도 7c는 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3) 및 8 μ g의 가용성 CpG 또는 CpG-양친매성 물질의 3회 용량을 투여받은 Balb/C 마우스에 대한 ELISA 검정에 의해 측정된 혈청 IgG/IgM 항체의 양을 나타내는 그래프이다. 도 7a는 가용성 CpG를 투여받은 마우스로부터의 혈청에 대한 OD450을 나타내는 그래프이고; 도 7b는 CpG-양친매성 물질을 투여받은 마우스로부터의 혈청에 대한 OD450을 나타내는 그래프이고; 도 7c는 PBS 대조군 (Mock), 가용성 CpG (Soluble CpG)와 함께의 코로나바이러스 스파이크 단백질, 또는 AMP-CpG (AMP-CpG)와 함께의 코로나바이러스 스파이크 단백질을 투여받은 (좌측으로부터 우측까지의) 마우스에 대한 IgG/M 역

가의 양을 나타내는 그래프이다.

도 8a-도 8d는 인간 회복기 혈청 (도 8c)과 비교되는 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3) 및 8 μ g의 가용성 CpG (도 8a) 또는 CpG-양친매성 물질 (도 8b)의 3회 용량을 투여받은 Balb/C 마우스에 대한 ACE2 수용체와 상호작용하는 코로나바이러스 스파이크 단백질의 능력을 차단하는 생성된 중화 항체의 농도를 나타내는 그래프이다. 도 8d는 인간 회복기 혈청과 비교되는 PBS 대조군 (Mock), 가용성 CpG (Soluble CpG)와 함께 코로나바이러스 스파이크 단백질, 또는 AMP-CpG (AMP-CpG)와 함께 코로나바이러스 스파이크 단백질을 투여받은 (좌측으로부터 우측까지의) 마우스에 대한 생성된 중화 항체의 양을 나타낸다.

도 9a-도 9c는 PBS 대조군 (Mock), 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3) 및 8 μ g의 가용성 CpG (Soluble CpG), 또는 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3) 및 8 μ g의 CpG-양친매성 물질 (AMP-CpG)의 3회 용량을 투여받은 (좌측으로부터 우측까지의) Balb/C 마우스에 의해 생성된 IFN γ (도 9a), TNF α (도 9b), 및 IL6 (도 9c)의 양을 나타내는 그래프이다.

도 10는 명반, IFA, 또는 대조군이 투여된 마우스와 비교되는 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3) 및 8 μ g의 가용성 CpG 또는 CpG-양친매성 물질의 2회 용량을 투여받은 마우스에서 생성된 (각 컬럼에 대해 좌측으로부터 우측까지의) TNF α , IFN γ , IL-6, IL-2, 및 IL-4의 양을 나타내는 그래프이다.

도 11는 양성 또는 음성 대조군과 비교되는 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3) 및 8 μ g의 CpG-양친매성 물질, 가용성 CpG, 또는 Mock Tx의 4회 용량을 투여받은 C57B16 마우스 및 Balb/C 마우스의 비장세포 IFN γ 공동-배양 ELISpot 반응을 나타내는 그래프이다.

도 12a-도 12d는 PBS 대조군 (Mock), 명반, IFA, 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3) 및 8 μ g 가용성 CpG (Soluble CpG), 또는 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3) 및 8 μ g CpG-양친매성 물질 (AMP-CpG)의 3회 용량을 투여받은 (좌측으로부터 우측까지의) C57B16 마우스에 대한 IgG1 (도 12a), IgG2bc (도 12b), IgG3 (도 12c), 및 IgG2bc:IgG1 비 (도 12d)의 양을 나타내는 그래프이다. 도 12d에서의 IgG2bc:IgG1의 비는 Amp-CpG의 경우 면역 반응이 Th2가 아닌 Th1로 강하게 편향되는 것을 나타낸다. Th2 반응은 SARS-CoV-2에 대해 불리할 수 있다.

도 13a-도 13d는 양성 또는 음성 대조군과 비교되는 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3) 및 8 μ g의 CpG-양친매성 물질, 가용성 CpG, 알하이드로겔(Alhydrogel), IFA, 또는 Mock Tx의 2회 용량을 투여받은 마우스에 의해 생성된 IFN γ (도 13a), TNF α (도 13b), IL-2 (도 13c), 및 IL-6 (도 13d)의 양을 나타내는 그래프이다.

도 14a-도 14d는 양성 또는 음성 대조군과 비교되는 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3) 및 8 μ g의 CpG-양친매성 물질, 가용성 CpG, 알하이드로겔, IFA, 또는 Mock Tx의 3회 용량을 투여받은 마우스에 의해 생성된 IFN γ (도 14a), TNF α (도 14b), IL-2 (도 14c), 및 IL-6 (도 14d)의 양을 나타내는 그래프이다.

도 15는 양성 또는 음성 대조군과 비교되는 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3) 및 8 μ g의 CpG-양친매성 물질, 가용성 CpG, 알하이드로겔, IFA, 또는 Mock Tx의 3회 용량을 투여받은 마우스의 CD8 T-세포에서의 (각 컬럼에서 상부로부터 하부까지의) IFN γ 및 TNF α 둘 모두, TNF α 단독, 및 IFN γ 단독의 백분율을 나타내는 그래프이다.

도 16a-도 16b는 회복기 혈청과 비교되는 1 nmol 가용성 CpG 또는 AMP-CpG와 조합되는 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3)의 4회 용량을 투여받은 C57BI/6J 마우스 (도 16a) 및 BALB/c 마우스 (도 16b) (그룹당 n = 5)에서 반수 최대 억제 희석(half maximal inhibitory dilution) (pVNT₅₀)에서의 유사바이러스 중화 역가의 양을 나타내는 그래프이다. 도시된 값은 평균 $\pm$ 표준 편차이다. 검출되지 않은 값은 기준선 상에 나타나고; * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; **** P < 0.0001이고, ns는 양측 맨-휘트니(Mann-Whitney) 시험에 의해 유의미하지 않은 것이다. 유사바이러스 LOD (파선으로 표시됨)는 mock 처리에 대해 계산된 평균 + 90% CI로서 결정되었다.

도 16c-도 16d는 1 nmol 가용성 CpG 또는 AMP-CpG와 조합되는 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3)의 4회 용량을 투여받은 C57BI/6J 마우스 (도 16c) 또는 BALB/c 마우스 (도 16d) (그룹당 n = 5)에서 생성된 IFN γ 의 양을 나타내는 그래프이다. 도시된 값은 평균 $\pm$ 표준 편차이다. 검출되지 않은 값은 기준선 상에 나타나고; * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; **** P < 0.0001이고; ns는 양측 맨-휘트니 시험에 의해 유의미하지 않은 것이다. 유사바이러스 LOD (파선으로 표시됨)는 mock 처리에 대해 계산된 평균 + 90% CI로

서 결정되었다.

도 17a: 100 μ g 명반, 1 nmol 가용성 CpG, 또는 1 nmol AMP-CpG와 조합되는 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3)의 3회 용량을 받은 C57BL/6J 마우스 (그룹당 n=10)에서의 중첩하는 코로나바이러스 스파이크 펩티드로 재자극되는 1×10^6 개의 비장세포당 IFN γ 스팟 형성 세포의 수를 나타내는 그래프이다. 도시된 값은 평균 $\pm$ 표준 편차이다. 사이토카인⁺ T 세포 수에 대해 적용된 양측 맨-휘트니 시험에 의해 *** P < 0.001; **** P < 0.0001이다.

도 17b-도 17c는 100 μ g 명반, 1 nmol 가용성 CpG, 또는 1 nmol AMP-CpG와 조합되는 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3)의 3회 용량을 투여받은 C57BL/6J 마우스 (그룹당 n=10)에서 중첩하는 코로나바이러스 스파이크 펩티드로 재자극된 말초 혈액 세포로부터 분리된 CD8⁺ T 세포 (도 17b) 또는 CD4⁺ T 세포 (도 17c)에서 각 컬럼에서 상부로부터 하부까지의 IFN γ 및 TNF α , TNF α 단독, 및 IFN γ 단독을 포함하는 세포내 사이토카인 생성의 빈도를 나타내는 그래프이다. 도시된 값은 평균 $\pm$ 표준 편차이다. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; **** P < 0.0001이고; ns는 사이토카인⁺ T 세포 수에 적용되는 양측 맨-휘트니 시험에 의해 유의미하지 않은 것이다.

도 18a-도 18b는 100 μ g 명반, 1 nmol 가용성 CpG, 또는 1 nmol AMP-CpG와 조합되는 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3)의 3회 용량을 투여받은 C57BL/6J 마우스 (그룹당 n = 10)에서 중첩하는 코로나바이러스 스파이크 펩티드로 재자극된 폐관류 조직으로부터 분리된 CD8⁺ T 세포 (도 18a) 또는 CD4⁺ T 세포 (도 18b)에서 각 컬럼에서 상부로부터 하부까지의 IFN γ 및 TNF α , TNF α 단독 및 IFN γ 단독을 포함하는 세포내 사이토카인 생성의 빈도를 나타내는 그래프이다. 도시된 값은 평균 $\pm$ 표준 편차이다. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; **** P < 0.0001이고, ns는 사이토카인⁺ T 세포 수 또는 사이토카인 농도에 적용되는 양측 맨-휘트니 시험에 의해 유의미하지 않은 것이다.

도 18c-도 18d는 100 μ g 명반, 1 nmol 가용성 CpG, 또는 1 nmol AMP-CpG와 조합되는 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3)의 3회 용량을 투여받은 C57BL/6J 마우스 (그룹당 n= 10)에서 중첩하는 코로나바이러스 스파이크 펩티드로 재자극된 폐관류 조직의 상청액에서 발견되는 IFN γ (도 18c), TNF α , IL-6, IL-4, IL-10, 및 IL17 (도 18d)를 포함하는 사이토카인 농도를 나타내는 그래프이다. 도시된 값은 평균 $\pm$ 표준 편차이다. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; **** P < 0.0001이고, ns는 사이토카인⁺ T 세포 수 또는 사이토카인 농도에 적용되는 양측 맨-휘트니 시험에 의해 유의미하지 않은 것이다.

도 19a-도 19f (좌측으로부터 우측까지의) 100 μ g 명반, 1 nmol 가용성 CpG, 또는 1 nmol AMP-CpG와 조합되는 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3)의 3회 용량을 투여받은 C57BL/6J 마우스 (그룹당 n= 10)에서 기관지폐포 세척액으로부터 수집된 세포에서의 CD8⁺ (도 19a) 및 CD4⁺ (도 19d) T 세포 계수, 나이트 CD8⁺ (도 19b) 및 나이트 CD4⁺ (도 19e) T-세포의 백분율, 및 효과기 기억 CD8⁺ (도 19c) 및 CD4⁺ (도 19f) T-세포의 백분율을 나타내는 그래프이다. 도시된 값은 평균 $\pm$ 표준 편차이다. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; **** P < 0.0001이고; ns는 T 세포 수에 적용된 양측 맨-휘트니 시험에 의해 유의미하지 않은 것이다.

도 20a-도 20g는 100 μ g 명반, 1 nmol 가용성 CpG, 또는 1 nmol AMP-CpG와 조합되는 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3)의 3회 용량을 투여받은 C57BL/6J 마우스 (그룹당 n= 10)의 체액성 반응을 나타내는 그래프이다. 체액성 반응은 유사바이러스 중화 검정 또는 ELISA 검정을 사용하여 회복기 혈청 (도 20a), IgM (도 20b), IgG (도 20c), IgG1 (도 20d), IgG2b (도 20e), IgG19에 대한 IgG2b의 비 (도 20f), 및 IgG3 (도 20g)와 비교하여 중화 역가에 대해 혈청에서 평가되었다. 도시된 값은 평균 $\pm$ 표준 편차이다. 검출되지 않은 값은 기준선 상에 나타나고; * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; **** P < 0.0001이고, ns는 양측 맨-휘트니 시험에 의해 유의미하지 않은 것이다.

도 21a는 100 μ g 명반 단독, 1 nmol 가용성 CpG 단독, 1 nmol AMP-CpG 단독, 100 μ g 명반과 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol 가용성 CpG와 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol AMP-CpG와 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol AMP-CpG와 5 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 및 1 nmol AMP-CpG와 1 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3)의 3회 용량을 투여받은 C57BL/6J 마우스 (그룹당 n= 10)로부터의 중첩하는 코로나바이러

스 스파이크 펩티드로 재자극된 비장세포에서의 1×10^6 개의 비장세포당 IFN γ 스팟 형성 세포의 수를 나타내는 그래프이다. 도시된 값은 평균 $\pm$ 표준 편차이다. 검출되지 않은 값은 기준선 상에 나타나고; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ 이고; ns는 사이토카인 $^+$ T 세포 수에 적용되는 양측 맨-휘트니 시험에 의해 유의미하지 않은 것이다.

도 21b-도 21c는 100 μ g 명반 단독, 1 nmol 가용성 CpG 단독, 1 nmol AMP-CpG 단독, 100 μ g 명반과 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol 가용성 CpG와 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol AMP-CpG와 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol AMP-CpG와 5 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 및 1 nmol AMP-CpG와 1 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3)의 3회 용량을 투여받은 C57BL/6J 마우스 (그룹당 n=10)로부터 수집된 말초 혈액 세포에서 발견된 CD8 $^+$ T-세포 (도 21b) 및 CD4 $^+$ T-세포 (도 21c)의 (각 컬럼에서 상부로부터 하부까지의) IFN γ 및 TNF α , TNF α 단독, 및 IFN γ 단독을 포함하는 사이토카인의 수를 나타내는 그래프이다. 도시된 값은 평균 $\pm$ 표준 편차이다. 검출되지 않은 값은 기준선 상에 나타나고; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ 이고; ns는 사이토카인 $^+$ T 세포 수에 적용되는 양측 맨-휘트니 시험에 의해 유의미하지 않은 것이다.

도 21d-도 21e는 100 μ g 명반 단독, 1 nmol 가용성 CpG 단독, 1 nmol AMP-CpG 단독, 100 μ g 명반과 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol 가용성 CpG와 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol AMP-CpG와 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol AMP-CpG와 5 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 및 1 nmol AMP-CpG와 1 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3)의 3회 용량을 투여받은 C57BL/6J 마우스 (그룹당 n= 10)로부터 수집된 중첩하는 코로나바이러스 스파이크 펩티드로 재자극된 관류된 폐 조직 세포에서 발견된 CD8 $^+$ T-세포 (도 21d) 및 CD4 $^+$ (도 21e)의 (각 컬럼에서 상부로부터 하부까지의) IFN γ 및 TNF α , TNF α 단독, 및 IFN γ 단독을 포함하는 사이토카인의 수를 나타내는 그래프이다. 도시된 값은 평균 $\pm$ 표준 편차이다. 검출되지 않은 값은 기준선 상에 나타나고; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ 이고; ns는 사이토카인 $^+$ T 세포 수에 적용되는 양측 맨-휘트니 시험에 의해 유의미하지 않은 것이다.

도 22a-도 22g는 100 μ g 명반 단독, 1 nmol 가용성 CpG 단독, 1 nmol AMP-CpG 단독, 100 μ g 명반과 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol 가용성 CpG와 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol AMP-CpG와 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol AMP-CpG와 5 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 및 1 nmol AMP-CpG와 1 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3)과 조합되는 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3) 단독의 3회 용량을 투여받은 C57BL/6J 마우스 (그룹당 n= 10)에 대해 유사바이러스 중화 검정 또는 ELISA 검정을 사용하여 회복기 혈청 (도 22a), IgM (도 22b), IgG (도 22c), IgG1 (도 22d), IgG2bc (도 22e), IgG19에 대한 IgG2bc의 비 (도 22f), 및 IgG3 (도 22g)와 비교되는 중화 역가에 대해 혈청에서 평가된 체액성 반응을 나타내는 그래프이다. 도시된 값은 평균 $\pm$ 표준 편차이다. 검출되지 않은 값은 기준선 상에 나타나고; 양측 맨-휘트니 시험에 의해 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ 이다.

도 23a-도 23b는 100 μ g 명반 단독, 1 nmol 가용성 CpG 단독, 1 nmol AMP-CpG 단독, 100 μ g 명반과 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol 가용성 CpG와 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 및 1 nmol AMP-CpG와 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3) (도 23a)의 3회 용량을 투여받은 37주령의 C57BL/6J 마우스 (그룹당 n= 10); 및 (좌측으로부터 우측까지의) 100 μ g 명반과 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol 가용성 CpG와 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol AMP-CpG와 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol AMP-CpG와 5 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 및 1 nmol AMP-CpG와 1 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3) (도 23b)의 3회 용량을 투여받은 C57BL/6J 마우스로부터 수집된 말초 혈액 세포에서 발견된 (각 컬럼에서 상부로부터 하부까지의) IFN γ 및 TNF α , TNF α 단독, 및 IFN γ 단독을 포함하는 사이토카인의 수를 나타내는 그래프이다. 도시된 값은 평균 $\pm$ 표준 편차이다. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ 이고; ns는 사이토카인 $^+$ T 세포 수에 적용되는 양측 맨-휘트니 시험에 의해 유의미하지 않은 것이다.

도 23c-도 23d는 (좌측으로부터 우측까지의) 100 μ g 명반 단독, 1 nmol 가용성 CpG 단독, 1 nmol AMP-CpG 단독, 100 μ g 명반과 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol 가용성 CpG와 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 및 1 nmol AMP-CpG와 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3) (도 23c)의 3회 용량을 투여받은 37주령의 C57BL/6J 마우스 (그룹당 n= 10); 및 (좌측으로부터 우측까지의) 100 μ g 명반과 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol 가용성 CpG와 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol AMP-CpG와 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol AMP-CpG와 5 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 및 1 nmol AMP-CpG와 1 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3) (도 23d)의 3회 용량을 투여받은 C57BL/6J 마우스로부터 수집된 관류된 폐 조직 세포에서 발견된 (각 컬럼에서 상부로부터 하부까지의) IFN γ 및 TNF α , TNF α 단독, 및 IFN γ 단독을 포함하는 사이토카인의 수를 나타내는 그래프이다. 도시된 값은 평균 $\pm$ 표준 편차이다. ** P < 0.01; **** P < 0.0001이고; ns는 사이토카인⁺ T 세포 수에 적용되는 양측 맨-휘트니 시험에 의해 유의미하지 않은 것이다.

도 23e-도 23f는 (좌측으로부터 우측까지의) 100 μ g 명반 단독, 1 nmol 가용성 CpG 단독, 1 nmol AMP-CpG 단독, 100 μ g 명반과 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol 가용성 CpG와 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 및 1 nmol AMP-CpG와 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3) (도 23a)의 3회 용량을 투여받은 37주령의 C57BL/6J 마우스 (그룹당 n= 10); 및 (좌측으로부터 우측까지의) 100 μ g 명반과 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol 가용성 CpG와 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol AMP-CpG와 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol AMP-CpG와 5 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 및 1 nmol AMP-CpG와 1 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3) (도 23f)의 3회 용량을 투여받은 C57BL/6J 마우스로부터 수집된 중첩하는 코로나바이러스 스파이크 펩티드로 재자극된 관류된 폐 조직 세포에서 발견된 (상부로부터의 하부까지의) IFN γ 및 TNF α , TNF α 단독, 및 IFN γ 단독을 포함하는 사이토카인의 수를 나타내는 그래프이다. 도시된 값은 평균 $\pm$ 표준 편차이다. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; **** P < 0.0001이고; ns는 사이토카인⁺ T 세포 수에 적용되는 양측 맨-휘트니 시험에 의해 유의미하지 않은 것이다.

도 24a는 회복기 혈청과 비교되는, 100 μ g 명반 단독, 1 nmol 가용성 CpG 단독, 1 nmol AMP-CpG 단독, 100 μ g 명반과 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol 가용성 CpG와 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 및 1 nmol AMP-CpG와 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3)의 3회 용량을 투여받은 37주령의 C57BI/6J 마우스 (그룹당 n= 10)에서 반수 최대 억제 회색 (pVNT₅₀)에서의 유사바이러스 중화 역가의 양을 나타내는 그래프이다. 도시된 값은 평균 $\pm$ 표준 편차이다. 검출되지 않은 값은 기준선 상에 나타나고; 양측 맨-휘트니 시험에 의해 * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001이다.

도 24b는 회복기 혈청과 비교되는, 100 μ g 명반과 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol 가용성 CpG와 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 및 1 nmol AMP-CpG와 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol AMP-CpG와 5 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 및 1 nmol AMP-CpG와 1 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3)의 3회 용량을 투여받은 37주령의 C57BI/6J 마우스 (그룹당 n= 10)에서 반수 최대 억제 회색 (pVNT₅₀)에서의 유사바이러스 중화 역가의 양을 나타내는 그래프이다. 도시된 값은 평균 $\pm$ 표준 편차이다. 검출되지 않은 값은 기준선 상에 나타나고; * P < 0.05; ** P < 0.01이고; ns는 양측 맨-휘트니 시험에 의해 유의미하지 않은 것이다.

도 24c-24g는 100 μ g 명반 단독, 1 nmol 가용성 CpG 단독, 1 nmol AMP-CpG 단독, 100 μ g 명반과 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol 가용성 CpG와 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 및 1 nmol AMP-CpG와 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol AMP-CpG와 5 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 및 1 nmol AMP-CpG와 1 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3)의 3회 용량을 투여받은 37주령의 C57BI/6J 마우스 (그룹당 n= 10)의 체액성 반응을 나타내는 그래프이다. 체액성 반응은 유사바이러스 중화 검정 또는 ELISA 검정을 사용하는 IgG (도 24c), IgG1 (도 24d), IgG2bc (도 24e), IgG19에 대한 IgG2bc의 비 (도 24f), 및 IgG3 (도 24g)에 대해 혈청에서 평가되었다. 도시된 값은 평균 $\pm$ 표준 편차이다. 검출되지 않은 값은 기준선 상에 나타나고; * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; **** P < 0.0001이고, ns는 양측 맨-휘트니 시험에 의해 유의미하지 않은 것이다.

도 25a-도 25d는 고령의 마우스에서 AMP-CpG를 사용한 백신접종이 혈액, 비장, 및 폐 조직에서 지속적인 Spike

RBD-특이적 T 세포를 가능하게 하는 것을 나타내는 일련의 그래프이다. 37주령의 C57Bl/6 마우스 (그룹당 n = 5-10)는 100 ug 명반 또는 1 nmol 가용성 CpG, 또는 AMP-CpG와 혼합된 10 ug Spike RBD 단백질로 0, 14 및 28 일차에 면역화되었다. 아쥘반트 대조군 동물은 AMP-CpG 아쥘반트만을 투여받았다. Spike RBD에 대해 특이적인 체액성 반응은 35, 49, 및 70일차에 ELISA에 의해 면역화된 동물로부터의 혈청에서 평가되었다. IgG에 대해 결정된 평가변수 역가가 나타나 있다 (도 25a). T 세포 반응은 21, 35, 49, 및 70일차에 평가되었다. 세포는 21, 35, 49, 및 70일차 (도 25b)에 말초 혈액으로부터 수집되었고, 중첩하는 Spike RBD 펩티드로 재자극되었고, 세포내 사이토카인 생성에 대해 분석하여 항원-특이적 T 세포 반응을 검출하였다. 말초 혈액 CD8⁺ T 세포 중의 IFN γ -양성 세포의 수가 나타나 있고 (도 25a), 세포는 비장 (도 25c) 및 폐 (도 25d)로부터 수집되었고, 중첩하는 Spike RBD 펩티드로 재자극되었고, ELISPOT 검정에 의해 IFN γ 생성에 대해 분석되었다. 1×10^6 개의 세포당 IFN γ 스팟 형성 세포 (SFC)의 수가 나타나 있다 (그룹당 n = 5 마리의 마우스). 도시된 값은 평균 $\pm$ 표준 편차이다. 사이토카인+ T 세포 수에 적용되는 양측 맨-휘트니 시험에 의해 * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; **** P < 0.0001이다. 도 25a에서, 35, 49, 및 70일에 대한 데이터는 좌측으로부터 우측까지 (1) 명반, (2) 가용성 CpG, 및 (3) AMP-CpG에 대해 나타나 있다. 도 25b에서, 그래프에서의 데이터는 하부로부터 상부까지 (1) 명반, (2) 가용성 CpG, 및 (3) AMP-CpG를 나타낸다. 도 25c 및 도 25d에서, 데이터는 좌측으로부터 우측까지 (1) 아쥘반트 대조군, (2) 명반, (3) 가용성 CpG, 및 (4) AMP-CpG에 대해 나타나 있다.

도 26a- 도 26e는 AMP-CpG-7909를 사용한 2회 용량 백신접종이 혈액 및 폐에서 강한 Spike RBD-특이적 세포 면역 및 혈액에서의 체액성 면역을 유도하는 것을 나타내는 일련의 그래프이다. C57Bl/6 마우스 (그룹당 n=5)는 0 및 14일차에 1.0, 2.5, 또는 5.0 nmol AMP-CpG와 혼합된 0.5, 1.0, 또는 5.0 ug Spike RBD 단백질로 면역화되었고, T 세포 및 IgG 반응을 21일차에 분석하였다. 말초 혈액 세포 (도 26a 및 도 26b) 또는 관류된 폐로부터 수집된 세포 (도 26c 및 도 26d)는 중첩하는 Spike RBD 펩티드로 재자극되었고, 세포내 사이토카인 생성에 대해 유세포 분석법에 의해 분석하여 항원-특이적 T 세포 반응을 검출하였다. CD8⁺ (도 26a 및 도 26c) 및 CD4⁺ (도 26b 및 도 26d) T 세포 중에서의 IFN γ , TNF α , 및 이중-양성 T 세포의 수를 나타낸다. Spike RBD에 대해 특이적인 체액성 반응은 면역화된 동물로부터의 혈청에서 ELISA에 의해 평가되었다. 35일차에 IgG에 대한 평가변수 역가를 나타낸다 (그룹당 n = 5마리 마우스; 도 26e). 도시된 값은 평균 $\pm$ 표준 편차이다. **도 26a- 도 26d**에서, 각각의 막대에 대해, INF γ ⁺ 및 TNF α ⁺는 막대의 상부에 있고, TNF α ⁺는 막대의 중간에 있고, INF γ ⁺는 막대의 하부에 있다.

도 27은 AMP-CpG가 SARS CoV-2 스파이크 단백질을 표적화하는 강한 다작용성 CD8 T 세포 반응을 유도하는 것을 나타내는 일련의 그래프이다. mock 백신, 또는 10 μ g 코로나바이러스 스파이크 단백질, 10 μ g 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질 및 (1) 100 μ g 명반, (2) 6 μ g 가용성 CpG, 또는 (3) 6 μ g AMP-CpG를 함유하는 백신을 투여하였다. 관찰된 사이토카인 양성 세포 백분율은 하기와 같았다: mock (0%), 명반 (0%), 가용성 CpG (5%), 및 AMP-CpG (34%). CD8⁺ T 세포의 사이토카인 양성 백분율을 나타내는 막대 그래프에서, 각 막대의 상부는 INF γ ⁺ 및 TNF α ⁺를 나타내고, 막대의 중간은 TNF α ⁺를 나타내고, 막대의 하부는 INF γ ⁺ 세포를 나타낸다.

도 28은 AMP-CpG가 SARS CoV-2 스파이크 단백질을 표적화하는 강한 다작용성 CD4 T 세포 반응을 유도하는 것을 나타내는 일련의 그래프이다. mock 백신, 또는 10 μ g 코로나바이러스 스파이크 단백질, 10 μ g 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질 및 (1) 100 μ g 명반, (2) 6 μ g 가용성 CpG, 또는 (3) 6 μ g AMP-CpG를 함유하는 백신을 투여하였다. 관찰된 사이토카인 양성 세포 백분율은 하기와 같았다: mock (0.2%), 명반 (0.5%), 가용성 CpG (0.5%), 및 AMP-CpG (12%). CD4⁺ T 세포의 사이토카인 양성 백분율을 나타내는 막대 그래프에서, 각 막대의 상부는 INF γ ⁺ 및 TNF α ⁺를 나타내고, 막대의 중간은 TNF α ⁺를 나타내고, 막대의 하부는 INF γ ⁺ 세포를 나타낸다.

도 29는 mock 백신 또는 10 μ g의 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질 작제물 (서열 번호 63) 및 (1) 100 μ g 명반, (2) 6 μ g 가용성 CpG, 또는 (3) 6 μ g AMP-CpG와 조합되는 10 μ g의 전장 코로나바이러스 스파이크 단백질 작제물 (서열 번호 66)을 받은 C57BL/6J 마우스 (그룹당 n=10)에서 중첩하는 코로나바이러스 스파이크 펩티드로 재자극된 1×10^6 개의 비장세포당 IFN γ 스팟 형성 세포의 수를 나타내는 그래프이다. 도시된 값은 평균 $\pm$ 표준 편차이다. 이 그래프는 AMP-CpG가 SARS CoV-2 스파이크 단백질을 표적화하는 강한 T 세포 반응을 유도하는 것을 나타낸다.

도 30은 AMP-CpG가 SARS CoV-2 스파이크 단백질을 표적화하는 강한 폐-상주 다작용성 CD8⁺ T 세포 반응을 유도

하는 것을 나타내는 일련의 그래프이다. mock 백신, 또는 10 μ g 코로나바이러스 스파이크 단백질, 10 μ g 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질 및 (1) 100 μ g 명반, (2) 6 μ g 가용성 CpG, 또는 (3) 6 μ g AMP-CpG를 함유하는 백신을 투여하였다. 관찰된 사이토카인 양성 세포 백분율은 하기와 같았다: mock (0%), 명반 (0%), 가용성 CpG (3%), 및 AMP-CpG (26%). CD8⁺ T 세포의 사이토카인 양성 백분율을 나타내는 막대 그래프에서, 각 막대의 상부는 IFN γ ⁺ 및 TNF α ⁺를 나타내고, 막대의 중간은 TNF α ⁺를 나타내고, 막대의 하부는 IFN γ ⁺ 세포를 나타낸다.

도 31은 AMP-CpG가 SARS CoV-2 스파이크 단백질을 표적화하는 강한 폐-상주 다작용성 CD4⁺ T 세포 반응을 유도하는 것을 나타내는 일련의 그래프이다. mock 백신, 또는 10 μ g 코로나바이러스 스파이크 단백질, 10 μ g 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질 및 (1) 100 μ g 명반, (2) 6 μ g 가용성 CpG, 또는 (3) 6 μ g AMP-CpG를 함유하는 백신을 투여하였다. 관찰된 사이토카인 양성 세포 백분율은 하기와 같았다: mock (0.2%), 명반 (0.2%), 가용성 CpG (1%), 및 AMP-CpG (7%). CD4⁺ T 세포의 사이토카인 양성 백분율을 나타내는 막대 그래프에서, 각 막대의 상부는 IFN γ ⁺ 및 TNF α ⁺를 나타내고, 막대의 중간은 TNF α ⁺를 나타내고, 막대의 하부는 IFN γ ⁺ 세포를 나타낸다.

도 32는 AMP-CpG가 SARS CoV-2 뉴클레오펙시드 단백질을 표적화하는 강한 말초 혈액 다작용성 CD8⁺ 및 CD4⁺ T 세포 반응을 유도하는 것을 나타내는 일련의 그래프이다. mock 백신, 또는 10 μ g 코로나바이러스 스파이크 단백질, 10 μ g 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질 및 (1) 100 μ g 명반, (2) 6 μ g 가용성 CpG, 또는 (3) 6 μ g AMP-CpG를 함유하는 백신을 투여하였다. CD8⁺ T 세포의 사이토카인 양성 백분율 또는 CD4⁺ T 세포의 사이토카인 양성 백분율을 나타내는 막대 그래프에서, 각 막대의 상부는 IFN γ ⁺ 및 TNF α ⁺를 나타내고, 막대의 중간은 TNF α ⁺를 나타내고, 막대의 하부는 IFN γ ⁺ 세포를 나타낸다.

도 33은 mock 백신 또는 10 μ g의 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질 작제물 (서열 번호 63) 및 (1) 100 μ g 명반, (2) 6 μ g 가용성 CpG, 또는 (3) 6 μ g AMP-CpG와 조합되는 10 μ g의 전장 코로나바이러스 스파이크 단백질 작제물 (서열 번호 66)을 받은 C57BL/6J 마우스 (그룹당 n=10)에서 중첩하는 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 펩티드로 재자극된 1x10⁶개의 비장세포당 IFN γ 스팟 형성 세포의 수를 나타내는 그래프이다. 도시된 값은 평균 $\pm$ 표준 편차이다. 이 그래프는 AMP-CpG가 SARS CoV-2 뉴클레오펙시드 단백질을 표적화하는 강한 T 세포 반응을 유도하는 것을 나타낸다.

도 34는 재제제화된 AMP-CpG 백신이 비인간 영장류에서 Genscript RBD에 대한 강력한 항체 반응을 유도하였음을 나타내는 그래프이다. 파선은 검정 검출 한계 (LOD)를 나타낸다.

도 35는 재제제화된 AMP-CpG 백신이 UK SARS-CoV-2 변이체 (우측 컬럼)에 IgG 항체를 유도하는 것을 나타내는 그래프이다. 야생형 SARS-CoV-2는 좌측 컬럼에 나타낸다. 파선은 검정 LOD를 표시한다.

도 36a 및 도 36b는 재제제화된 AMP-CpG 백신이 Spike RBD에 대한 CD8⁺ T-세포 반응을 유도하는 것을 나타내는 그래프이다.

도 37a 및 도 37b는 재제제화된 AMP-CpG 백신이 Spike RBD에 대한 CD4⁺ 및 CD8⁺ T-세포 반응을 유도하는 것을 나타내는 그래프이다. 각 컬럼에서, %TNF α 는 상부에 나타나고, %IL2는 중간에 나타나고, %IFN γ 는 하부에 나타난다.

도 38은 아쥬반트 대조군 (Adj 단독), 재제제화된 AMP-CpG 이중 WT RBD 및 B.1.351 RBD 백신(100 μ L 주사당 5 mg의 각각의 WT RBD 및 B.1.351 RBD 항원 (Dual Vax)을 가짐), 또는 재제제화된 AMP-CpG B.1.351 RBD 백신(100 μ L 주사당 5 mg의 B.1.351 RBD 항원 (Amp Vax)을 가짐)의 2회 용량을 투여받은 C57BL/6J 마우스에 대한 사량체 분석의 결과를 나타내는 그래프이다.

도 39a, 도 39b, 및 도 39c는 아쥬반트 대조군 (Adj 단독), 재제제화된 AMP-CpG 이중 WT RBD 및 B.1.351 RBD 백신 (100 μ L 주사당 5 mg의 각각의 WT RBD 및 B.1.351 RBD 항원 (Dual Vax)을 가짐), 또는 재제제화된 AMP-CpG B.1.351 백신 (100 μ L 주사당 5 mg의 B.1.351 항원 (B.1.351)을 가짐)의 2회 용량을 투여받은 C57BL/6J 마우스에 대한 세포내 염색 (ICS) 분석의 결과를 나타내는 그래프이다. 도 39a는 재제제화된 AMP-CpG 이중 WT RBD 및 B.1.351 RBD 백신 및 재제제화된 AMP-CpG B.1.351 백신이 2회 투여 이후의 아쥬반트 단독 백신과 비교하

여 $CD8^+$ 페 세포가 더 많은 사이토카인 $IFN\gamma$ 및 $TNF\alpha$ 를 분비하도록 유도하는 것을 나타낸다. 도 39b는 재제제화된 AMP-CPG 이중 WT RBD 및 B.1.351 RBD 백신 및 재제제화된 AMP-CPG B.1.351 백신이 2회 투여 이후의 아췌반트 단독 백신과 비교하여 $CD4^+$ 페 세포가 더 많은 사이토카인 $IFN\gamma$ 및 $TNF\alpha$ 를 분비하도록 유도하는 것을 나타낸다. 도 39c는 재제제화된 AMP-CPG 이중 WT RBD 및 B.1.351 RBD 백신 및 재제제화된 AMP-CPG B.1.351 백신이 2회 투여 이후의 아췌반트 단독 백신과 비교하여 $CD8^+$ 혈액 세포가 더 많은 사이토카인 $IFN\gamma$ 및 $TNF\alpha$ 를 분비하도록 유도하는 것을 나타낸다. 각 컬럼에서 $\%IFN\gamma + TNF\alpha$ 는 상부에 나타나고, $\%TNF\alpha$ 는 중간에 나타나고, $\%IFN\gamma$ 는 하부에 나타난다.

도 40은 아췌반트 대조군 (Adj 단독), 재제제화된 AMP-CPG 이중 WT RBD 및 B.1.351 RBD 백신 (100 μ L 주사당 5 mg의 각각의 WT RBD 및 B.1.351 RBD 항원 (Dual Vax)을 가짐), 또는 재제제화된 AMP-CPG B.1.351 백신 (100 μ L 주사당 5 mg의 B.1.351 RBD 항원 (B.1.351)을 가짐)의 2회 용량을 투여받은 C57BL/6J 마우스에 대한 ELISpot 분석의 결과를 나타내는 그래프이다.

도 41은 아췌반트 대조군 (Adj 단독), 재제제화된 AMP-CPG 이중 WT RBD 및 B.1.351 RBD 백신 (100 μ L 주사당 5 mg의 각각의 WT RBD 및 B.1.351 RBD 항원 (Dual Vax)을 가짐), 또는 재제제화된 AMP-CPG B.1.351 백신 (100 μ L 주사당 5 mg의 B.1.351 RBD 항원 (B.1.351)을 가짐)의 2회 용량을 투여받은 C57BL/6J 마우스에 대한 ELISA 분석에 의해 측정된 항체 혈청의 양을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

청구항 및 상세한 설명에서 사용되는 용어는 달리 특정되지 않는 한 하기 제시된 바와 같이 정의된다.

상세한 설명 및 첨부된 청구항에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태("a," "an," 및 "the")는 문맥에서 명백하게 달리 나타내지 않는 한 복수 대상을 포함하는 것임은 유의해야 한다.

본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "약"은 기재된 값의 10% 초과 또는 미만 내에 있는 값과 관련된다.

본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "아췌반트"는 특정 면역원 또는 항원과 함께 발생된 면역 반응을 증가시키거나 또는 그렇지 않으면 변경하거나 변형시킬 것인 화합물을 지칭한다. 면역 반응의 변형은 항체 및 세포 면역 반응 중 하나 또는 둘 모두의 특이성의 강화 또는 확장을 포함한다. 면역 반응의 변형은 또한 특정 항원-특이적 면역 반응을 감소시키거나 억제하는 것을 의미할 수 있다. 특정 구현예에서, 아췌반트는 시클릭 디뉴클레오타이드이다.

본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "아미노산"은 자연 발생 및 합성 아미노산뿐만 아니라 자연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 작용하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모사체를 지칭한다. 자연 발생 아미노산은 유전자 코드에 의해 인코딩된 것뿐만 아니라 이후 변형되는 아미노산, 예를 들어, 하이드록시프롤린, γ -카르복시글루타메이트 및 O-포스포세린이다. 용어 "아미노산 유사체"는 자연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조, 즉, 수소, 카르복실기, 아미노기, 및 R 기에 결합되는 α 탄소를 갖는 화합물, 예를 들어, 호모세린, 노르류신, 메티오닌 설펍사이드, 메티오닌 메틸 설펍소를 지칭한다. 이러한 유사체는 변형된 R 기 (예를 들어, 노르류신) 또는 변형된 펩티드 골격을 갖지만, 자연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조를 보유한다. 용어 "아미노산 모사체"는 아미노산의 일반 화학 구조와 상이한 구조를 갖지만, 자연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 작용하는 화학적 화합물을 지칭한다. 아미노산은 일반적으로 알려진 3개의 문자 기호 또는 IUPAC-IUB 생화학 명명법 위원회에서 권장하는 1개 문자 기호로 본원에 지칭될 수 있다. 뉴클레오타이드는 마찬가지로 그의 일반적으로 허용되는 단일-문자 코드에 의해 지칭될 수 있다.

본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "양친매성 물질" 및 "양친매성"은 친수성 헤드 기와 소수성 테일을 포함하여 이에 의해 양친매성 접합체를 형성하는 접합체를 지칭한다. 일부 구현예에서, 양친매성 물질 접합체는 CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드 (ODN) 및 하나 이상의 소수성 지질 테일을 포함하며 본원에서 "CpG-양친매성 물질"로 지칭된다.

본원에 사용되는 바와 같이, "접합된"은 지질에 대한 CpG-양친매성 물질의 공유 결합 또는 가교결합과 관련된다. CpG-양친매성 물질은 CpG-양친매성 물질 및 지질 상의 상보적 반응기의 반응에 의한 공유 결합을 통해 지질에 결합될 수 있다.

- [0049] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드" 및 "CpG 모티프"는 포스포디에스테르 뉴클레오타이드내 연결 또는 포스포디에스테르 유도체 뉴클레오타이드내 연결을 통한 3' G 뉴클레오타이드에 연결되는 5' C 뉴클레오타이드를 포함하는 짧은 단일 가닥 DNA 분자를 지칭한다. 일부 구현예에서, CpG 모티프는 포스포디에스테르 뉴클레오타이드내 연결을 포함한다. 일부 구현예에서, CpG 모티프는 포스포디에스테르 유도체 뉴클레오타이드내 연결을 포함한다.
- [0050] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "코로나바이러스 스파이크 단백질" 및 "코로나바이러스 스파이크 펩티드"는 S1 및 S2 도메인을 포함하는 "S 단백질"로 때때로 지칭되는 큰 1형 막관통 단백질의 전장 또는 단편을 지칭한다. 코로나바이러스 스파이크 단백질은 고도로 글리코실화되어, SAR-CoV-2 비리온의 표면과 같이 비리온 표면 상에 삼량체로 조립된다. SARS-CoV-2의 경우, 스파이크 단백질은 인간 안지오텐신-전환 효소 2 (ACE2) 수용체와 결합하여 인간 세포, 예를 들어, 호흡기 상피 세포 (예를 들어, II형 폐포 세포)뿐만 아니라 예를 들어, 심장, 혈관, 신장, 간, 위장관, 및 신경계 (예를 들어, 뇌 및 말초 신경계)를 포함하는 많은 다른 조직 및 기관에서의 세포 (예를 들어, 상피 세포, 내피 세포, 뉴런, 신경아교 세포, 평활근 세포, 및 장세포를 감염시킨다. 일부 구현예에서, 스파이크 단백질 펩티드는 서열 번호 3에 대해 적어도 적어도 90% (예를 들어, 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 코로나바이러스 스파이크 단백질 펩티드는 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0051] 본원에 사용되는 바와 같이, "면역 반응"은 이에 제한되지 않지만 외래 또는 자가 단백질을 포함하는 물질에 대한 유기체의 면역계에 의해 이루어진 반응을 지칭한다. "면역 반응"의 3가지 일반 유형은 점막, 체액, 및 세포 면역 반응을 포함한다. 면역 반응은 하기 중 적어도 하나를 포함할 수 있다: 항체 생성, 염증, 발달되는 면역력, 항원에 대한 발달되는 과민증, 항원에 대한 항원-특이적 림프구의 반응, 및 이식 또는 이식편 거부 반응.
- [0052] 본원에 사용되는 바와 같이, "면역원성"은 예를 들어 항체 역가에 의해 측정되는 바와 같은 면역 반응을 유발하는 제제 (예를 들어, CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 펩티드)의 능력을 지칭한다.
- [0053] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "면역원성 양"은 (예를 들어, 종래의 기술, 예컨대 효소-결합 면역흡착 검정 (ELISA)에 의해 결정되는 바와 같은 대상체에서의 항체 역가의 증가가 반영되는) 대상체에서의 면역 반응을 유도하는 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 펩티드의 양을 지칭한다.
- [0054] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "감염원"은 감염 및/또는 질환을 야기하는 제제를 지칭한다. 감염원은 바이러스, 박테리아, 진균, 및 기생충을 포함한다. 일부 구현예에서, 감염원은 바이러스 (예를 들어, 코로나바이러스, 예를 들어, SARS-CoV-2)이다.
- [0055] "핵산"은 단일-가닥 또는 이중-가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 및 이의 중합체를 지칭한다. 구체적으로 제한하지 않는 한, 상기 용어는 참조 핵산과 유사한 결합 특성을 갖고 자연 발생 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 대사 작용하는 천연 뉴클레오타이드의 알려진 유사체를 함유하는 핵산을 포괄한다. 달리 나타내지 않는 한, 특정 핵산 서열은 또한 그의 보존적으로 변형된 변이체 (예를 들어, 축퇴성 코돈 치환) 및 상보적 서열뿐만 아니라 명시적으로 표시된 서열을 함축적으로 포괄한다. 구체적으로, 축퇴성 코돈 치환은 하나 이상의 선택된 (또는 모든) 코돈의 제3 위치가 혼합된-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환되는 서열을 발생시킴으로써 달성될 수 있다 (Batzner *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 19:5081, 1991; Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608, 1985); 및 Cassol *et al.*, 1992; Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98, 1994). 아르기닌 및 류신의 경우, 제2 염기에서의 변형은 또한 보존적일 수 있다. 용어 핵산은 유전자, cDNA, 및 mRNA (유전자에 의해 인코딩됨)와 상호교환적으로 사용된다.
- [0056] 참조 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드 서열과 관련된 "서열 동일성 백분율(%)은 최대 서열 동일성 백분율을 달성하기 위해 필요한 경우 서열을 정렬시키고 갭을 도입한 후 참조 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드 서열에서의 핵산 또는 아미노산과 동일한 후보 서열에서의 핵산 또는 아미노산의 백분율로 정의된다. 핵산 또는 아미노산 서열 동일성 백분율을 결정하기 위한 목적을 위한 정렬은 당업자의 능력 내에 있는 다양한 방식으로, 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어 예컨대 BLAST, BLAST-2 또는 Megalign 소프트웨어를 사용하여 달성될 수 있다. 당업자는 비교되는 서열의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하는 서열을 정렬하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 예를 들어, 서열 동일성 백분율 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 BLAST를 사용하여 발생될 수 있다. 예시로서, 주어진 핵산 또는 아미노산 서열 B에 대한, 이와와 또는 이에 관한 주어진 핵산 또는 아미노산 서열 A의 서열 동일성 백분율 (이는 주어진 핵산 또는 아미노산 서열 B에 대한, 이와와 또는 이에 관한 특정 서열 동일성 백분율을 갖는 주어진 핵산 또는 아미노산 서열 A로서 대안적으

로 표현될 수 있음)은 하기와 같이 계산된다:

- [0057] $100 \times (\text{분율 } X/Y)$
- [0058] 여기서 X는 A 및 B의 프로그램의 정렬에서 서열 정렬 프로그램 (예를 들어, BLAST)에 의해 동일한 일치로 평점이 매겨지는 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 수이고, Y는 B에서의 핵산의 총수이다. 핵산 또는 아미노산 서열 A의 길이가 핵산 또는 아미노산의 길이와 동일하지 않은 것으로 이해될 것이다.
- [0059] 본원에 일반적으로 사용되는 바와 같이, "약학적으로 허용가능한"은 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 합리적인 이익/위험 비율에 상응하는 다른 문제 또는 합병증 없이 건전한 의학적 판단의 범위 내에서 인간 및 동물의 조직, 기관 및/또는 체액과 접촉하여 사용하기에 적합한 화합물, 물질, 조성물 및/또는 제형과 관련된다.
- [0060] 본원에 사용되는 바와 같은 "약학적으로 허용가능한 담체"는 활성 화합물을 현탁시키거나 용해시킬 수 있고, 환자에서 비독성 및 비-염증성인 특성을 갖는 비히클을 지칭한다. 또한, 약학적으로 허용가능한 담체는 약학적으로 허용가능한 첨가제, 예컨대 활성제의 생물학적 활성의 치료적 효과를 상당하게 방해하지 않고 환자에 대해 무독성인 약물 제제의 분야에 알려지거나 이에 사용되는 방부제, 항산화제, 향료, 유화제, 염료, 또는 부형제를 포함할 수 있다.
- [0061] 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "약학적으로 허용가능한 부형제"는 대상체에서 비독성이고 비-염증성인 특성을 갖는 임의의 불활성 성분을 지칭한다. 통상적인 부형제는 예를 들어 하기를 포함한다: 담체, 결합제, 충전제, 윤활제, 유화제, 현탁제, 감미료, 향료, 방부제, 완충액, 습윤제, 봉해제, 발포제, 및 안정성, 전달성, 흡수성, 반감기, 효능, 약동학, 및/또는 약력학을 향상시키거나, 부작용을 감소시키거나, 또는 약학 용도에 대해 다른 장점을 제공할 수 있는 기타 종래의 부형제 및 첨가제 및/또는 기타 첨가제.
- [0062] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 변형된 RNA 또는 DNA 또는 변형된 RNA 또는 DNA일 수 있는 임의의 폴리리보뉴클레오타이드 또는 폴리데옥시리보뉴클레오타이드로 구성될 수 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드는 단일-가닥 및 이중-가닥 DNA, 단일-가닥 및 이중-가닥 영역의 혼합물인 DNA, 단일-가닥 및 이중-가닥 RNA, 및 단일-가닥 및 이중-가닥 영역A, 단일-가닥일 수 있거나, 보다 통상적으로 이중-가닥일 수 있는 DNA 및 RNA를 포함하는 하이브리드 분자의 혼합물 또는 단일-가닥 및 이중-가닥 영역의 혼합물인 RNA로 구성될 수 있다. 또한, 폴리뉴클레오타이드는 RNA 또는 DNA 또는 RNA와 DNA 둘 모두를 포함하는 삼중-가닥 영역으로 구성될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 또한 하나 이상의 변형된 염기 또는 안정성을 위해 또는 다른 이유로 변형된 DNA 또는 RNA 골격을 함유할 수 있다. "변형된" 염기는 예를 들어 트리틸화된 염기 및 특이 염기 예컨대 이노신을 포함한다. 다양한 변형은 DNA 및 RNA에 대해 이루어질 수 있고; 이에 따라 "폴리뉴클레오타이드"는 화학적으로, 효소적으로, 또는 대사적으로 변형된 형태를 포함한다.
- [0063] 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "약학적으로 허용가능한 염"은 본원에 개시된 접합체, 올리고뉴클레오타이드, 또는 펩티드의 임의의 약학적으로 허용가능한 염을 의미한다. 본원에 기재된 임의의 화합물의 약학적으로 허용가능한 염은 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 없이 합리적인 이익/위험 비율에 상응하는 건전한 의학적 판단의 범위 내에서 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한 것을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 염은 본 기술분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 약학적으로 허용가능한 염은 하기에 기재되어 있다: 문헌 [Berge et al., J. Pharmaceutical Sciences 66:1-19, 1977] 및 [Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use (Eds. P.H. Stahl and C.G. Wermuth), Wiley-VCH, 2008]. 상기 염은 본원에 기재된 화합물의 최종 단위 및 정제 동안에 현장에서 제조되거나 유리 염기 기를 적합한 산과 반응시키는 것에 의해 별도로 제조될 수 있다. 대표적인 산 부가염은 아세테이트, 아디페이트, 알기네이트, 아스코르베이트, 아스파르테이트, 벤젠설포네이트, 벤조에이트, 바이설포네이트, 보레이트, 부티레이트, 캄포레이트, 캄포르설포네이트, 시트레이트, 사이클로펜탄프로피오네이트, 디글루코네이트, 도데실설포네이트, 에탄설포네이트, 푸마레이트, 글루코헵토네이트, 글리세로포스페이트, 헤미설포네이트, 헵토네이트, 핵산오에이트, 하이드로브로마이드, 하이드로클로라이드, 하이드로아이오다이드, 2-하이드록시-에탄설포네이트, 락토비오네이트, 락테이트, 라우레이트, 라우릴 설포네이트, 말레이트, 말리에이트, 말로네이트, 메탄설포네이트, 2-나프탈렌설포네이트, 니코티네이트, 니트레이트, 올리에이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 펙티네이트, 퍼설포네이트, 3-페닐프로피오네이트, 포스페이트, 피크레이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 스테아레이트, 숙시네이트, 설포네이트, 타르트레이트, 티오시아네이트, 톨루엔설포네이트, 운데카노에이트, 발레레이트 염 등을 포함한다. 대표적인 알칼리 또는 알칼리토 금속염은 나트륨, 리튬, 칼륨, 칼슘, 마그네슘 등뿐만 아니라 비독성 암모늄, 4차 암모늄, 및 아민 양이온 (비제한적으로 암모늄, 테트라메틸암모늄, 테트라에틸암모늄, 메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민, 트리에틸아민, 에틸아민 등을 포함함)을 포함한다. 접합체, 올리고뉴클레오타이드 또는 펩티드에 대한 언급은 달리 나타내거나

적용할 수 없는 경우가 아니면 그의 약학적으로 허용가능한 염을 포함한다.

[0064] "폴리펩티드," "펩티드," 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 상기 용어는 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 자연 발생 아미노산의 인공 화학적 모사체인 아미노산 중합체뿐만 아니라 자연 발생 아미노산 중합체 및 비-자연 발생 아미노산 중합체에 적용된다.

[0065] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "예방하는" 또는 "언은 위험의 감소"는 감염병, 예를 들어 바이러스 감염, 예를 들어, 베타-코로나바이러스 예컨대 SARS-CoV-2, 또는 관련 바이러스에 의한 감염에 이환될 위험을 (예를 들어 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 약 100%까지) 감소시키는 것을 의미한다. 예방이 효과적인지 여부를 결정하기 위해, 본 발명의 조성물을 받은 대상체와 조성물을 받지 않은 유사한 상황에 처한 대상체 (예를 들어, 바이러스 감염, 예컨대 SARS-CoV-2 감염, 또는 관련 바이러스에 의한 감염의 위험이 있는 대상체) 간을 비교할 수 있다. 또한 조성물을 받은 대상체와 대조군, 기준선, 또는 알려진 수준의 측정 간을 비교할 수 있다.

[0066] 본원에 사용되는 바와 같은, 본원에 사용되는 용어 "대상체" 또는 "포유동물" 또는 "환자"는 인간 및 비-인간 둘 모두를 포함하고, 비제한적으로 인간, 비인간 영장류, 개, 고양이, 쥐, 소, 말, 및 돼지를 포함한다.

[0067] 본원에 사용되는 바와 같은, 용어 "치료적 유효량"은 질환의 증상을 완화시키는 데 효과적인 양이다. 치료적 유효량은 예방이 치료로 간주될 수 있으므로 "예방적 유효량"일 수 있다.

[0068] 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 질환 또는 장애, 예를 들어, COVID-19와 관련된 병태의 진행 또는 중증도를 역전, 완화, 개선, 억제, 지연, 또는 중지시키기 위한 것을 목적으로 하는 치료적 방법을 지칭한다. 이러한 용어들은 병태, 질환, 또는 장애의 적어도 하나의 부정적 영향 또는 증상을 감소시키거나 완화시키는 것을 포함한다. 치료는 일반적으로 하나 이상의 증상 또는 임상적 지표가 감소되는 경우, 또는 요망되는 반응 (예를 들어, 특정 면역 반응)이 유도되는 경우 "효과적이다". 대안적으로, 치료는 질환의 진행이 감소되거나 중지되는 경우 "효과적이다".

[0069] 본원에 사용되는 바와 같은, 용어 "백신" 또는 "면역원성 조성물"은 감염 또는 질환을 예방 및/또는 개선하기 위해 및/또는 감염 또는 질환의 적어도 하나의 증상을 감소시키기 위해 면역력을 유도하는 데 충분한 예방적 또는 치료적 면역 반응을 유도하는, 척추동물에 투여될 수 있는 형태인 아쥬반트와 선택적으로 조합되는, 본원에 기재된 CpG-양친매성 물질 및/또는 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질, 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)을 함유하는 제제를 지칭한다. 통상적으로, 백신 또는 면역원성 조성물은 본원에 기재된 조성물이 현탁되거나 용해되는 통상적인 염수 또는 완충 수용액 매질을 포함한다. 이러한 형태에서, 본원에 기재된 조성물은 감염 또는 질환을 예방하거나, 개선하거나, 또는 그렇지 않으면 치료하기 위해 사용된다. 숙주로의 도입시, 백신 또는 면역원성 조성물은 비제한적으로 항체 및/또는 사이토카인의 생성 및/또는 세포독성 T 세포, 항원 제시 세포, 헬퍼 T 세포, 수지상 세포 및/또는 다른 세포 반응의 활성화를 포함하는 면역 반응을 유발한다.

[0070] 본 발명의 다른 특징 및 장점은 하기 상세한 설명, 도면, 및 청구범위로부터 자명할 것이다.

[0071] 발명의 상세한 설명

[0072] 본 발명은 대상체에서 면역 반응을 유도하는 데 사용될 수 있는 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 CpG-양친매성 물질, 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오키프 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)을 형성하는 링커에 의해 또는 링커를 사용하지 않고 (즉, 직접 결합에 의해) 지질에 연결되는 CpG 올리고데옥시뉴클레오티드 (ODN)를 포함한다. 본원에 기재된 화합물은 함께 동시에 또는 별도로 투여될 때 대상체, 예컨대 인간 대상체에서 면역 반응을 유도한다. CpG-양친매성 물질은 대상체에서 면역 반응, 예컨대 코로나바이러스 항원 (예를 들어, SARS-CoV-2 항원, 예를 들어, SARS-CoV-2 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드 또는 SARS-CoV-2 뉴클레오키프 단백질 또는 그의 펩티드)에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 아쥬반트로서 역할을 할 수 있다.

[0073] CpG

[0074] CpG 올리고데옥시뉴클레오티드 (ODN)는 특정 서열 맥락에서 메틸화되지 않은 CpG 디뉴클레오티드를 함유하는 짧은 합성 단일-가닥 DNA 분자이다. CpG ODN은 DNA 분자에서 천연 포스포디에스테르 (PO) 골격과 반대로 부분적으로 또는 전체적으로 포스포로티오에이트화된 (PS) 골격을 갖는다. 자극 CpG ODN의 3가지 주요 부류는 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 특히 B 세포 및 형질세포양 수지상 세포 (pDC)에 대한 구조 특성 및 활성화에 기초하여

식별되었다. 이러한 3가지 부류는 부류 A (유형 D), 부류 B (유형 K), 및 부류 C이다.

[0075] 일부 구현예에서, CpG ODN은 부류 A ODN일 수 있다. 예를 들어, 부류 A ODN은 GGGGTCAACGTTGAGGGGGG (서열 번호 5)의 아미노산 서열을 갖는 CpG 1585; GGGGGACGATCGTCGGGGGG (서열 번호 6)의 아미노산 서열을 갖는 CpG 2216; 및 GGGGACGACGTCGTGGGGGGG (서열 번호 7)의 아미노산 서열을 갖는 CpG 2336을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0076] 일부 구현예에서, CpG ODN은 부류 B ODN일 수 있다. 부류 B CpG ODN은 하나 이상의 CpG 디뉴클레오타이드를 갖는 전체 PS 골격을 함유한다. 이는 강력하게 B 세포 및 TLR9-의존적 NF- κ B 신호전달을 활성화하지만 IFN- α 분비를 약하게 자극한다. 예를 들어, 부류 B ODN은 TCCATGACGTTCTGATGCT (서열 번호 71)의 아미노산 서열을 갖는 CpG 1668; TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (서열 번호 1)의 아미노산 서열을 갖는 CpG 2006으로도 알려진 CpG 7909; TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTT (서열 번호 8)의 아미노산 서열을 갖는 CpG 2007; TCGACGTTTCGTCGTTTCGTCGTTTC (서열 번호 9)의 아미노산 서열을 갖는 CpG BW006; TCGCGACGTTTCGCCCCGACGTTTCGGTA (서열 번호 10)의 아미노산 서열을 갖는 CpG D-SL01; TGA CTGTGAACGTTTCGAGATGA (서열 번호 15)의 아미노산 서열을 갖는 CpG 1018, 및 TCCATGACGTTCTGACGTT (서열 번호 2)의 아미노산 서열을 갖는 CpG 1826을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, CpG ODN은 CpG 7909 (서열 번호 1)이다. 일부 구현예에서, CpG ODN은 CpG 1826 (서열 번호 2)이다.

[0077] 일부 구현예에서, CpG ODN은 부류 C ODN일 수 있다. 예를 들어, 부류 C ODN은 TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCCG (서열 번호 11)의 아미노산 서열을 갖는 CpG 2395; TCGTCGTCGTTTCGAACGACGTTGAT (서열 번호 12)의 아미노산 서열을 갖는 CpG M362; 및 TCGCGAACGTTTCGCGCGTTTCGAACGCGG (서열 번호 13)의 아미노산 서열을 갖는 CpG D-SL03을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0078] 일부 구현예에서, CpG 서열에서 뉴클레오타이드를 연결하는 모든 뉴클레오타이드내 기는 포스포로티오네이트이다.

[0079] 일부 구현예에서, 면역원성 조성물은 양친매성 접합체를 포함한다. 양친매성 접합체는 알부민-결합 도메인 (예를 들어, 지질)에 공유적으로 연결되는 CpG ODN을 포함하는 접합체를 지칭한다. 일부 구현예에서, 양친매성 접합체는 직접적으로 알부민-결합 도메인 (예를 들어, 지질)에 공유적으로 연결되는 CpG ODN을 포함한다. 일부 구현예에서, 양친매성 접합체는 링커를 통해 알부민-결합 도메인 (예를 들어, 지질)에 공유적으로 연결되는 CpG ODN을 포함한다. 알부민-결합 도메인에 직접적으로 또는 링커를 통해 접합되는 CpG ODN을 포함하는 양친매성 접합체의 경우, 알부민 결합 도메인은 내인성 알부민에 결합되고, 이는 CpG-양친매성 물질이 혈류로 빠르게 흘러가는 것을 방지하고 대신 항원 제시 세포에 의한 알부민의 여과로 인하여 그것이 축적되는 림프관 및 배액 림프절로 그것을 재-표적화한다.

[0080] CpG ODN은 지질에 직접적으로 결합하거나 링커에 의해 연결되어 CpG 양친매성 물질을 형성할 수 있다. 이러한 화합물은 본 기술분야에 알려진 통상의 포스포아미다이트 화합물질을 사용하여 생성될 수 있다. 일부 예에서, CpG ODN 또는 CpG ODN-GG는 하기 화합물과 반응되어 중간체를 생성할 수 있고, 이는 (예를 들어, 본 기술분야에 알려진 포스파이트 산화 방법, 예를 들어 황화제, 예컨대 3-((N,N-디메틸아미노메틸리덴)아미노)-3H-1,2,4-디티아졸-5-티온)을 사용한 산화시 그리고 시아노에틸기의 가수분해시 본 발명의 화합물을 생성할 수 있다.

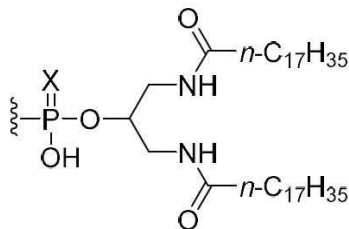
[0081] 본원의 CpG 분자뿐만 아니라 CpG 분자를 포함하는 양친매성 물질에 대한 언급은 그의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0082] 지질

[0083] 본원에 개시된 CpG-양친매성 물질은 소수성 지질을 포함하고, 이는 알부민 결합 도메인일 수 있다. 지질은 선형, 분지형, 또는 환형일 수 있다. 지질의 길이는 바람직하게는 적어도 17 내지 18개의 탄소이지만 그것이 림프절에 대한 양호한 알부민 결합과 적합한 표적화를 나타내는 경우에 더 짧을 수 있다. 일부 구현예에서, 활성은 부분적으로 대상체의 혈액에서 알부민과 회합되는 CpG-양친매성 물질의 능력에 좌우된다. 이에 따라, 림프절-표적화된 CpG-양친매성 물질은 통상적으로 생리학적 조건하에 알부민에 결합될 수 있는 지질을 포함한다. 림프절을 표적화하는 데 적합한 지질은 지질 또는 CpG ODN에 접합되는 지질이 알부민에 결합되는 능력에 기초하여 선택될 수 있다. 지질 또는 CpG ODN에 접합되는 지질이 알부민에 결합되는 능력을 시험하기 위한 적합한 방법은 본 기술분야에 알려져 있다.

[0084] CpG-양친매성 물질로 표적화되는 림프절에 사용하기 위한 바람직한 지질의 예는 비제한적으로 선형 및 불포화 포화 지방산, 분지형 포화 및 불포화 지방산, 및 지방산 유도체, 예컨대 지방산 에스테르, 지방산 아마이드, 및 지방산 티오에스테르, 디아실 지질, 콜레스테롤, 콜레스테롤 유도체, 및 스테로이드 산 예컨대 담즙산; 지질 A 및 이들의 조합을 포함하는 8-30개의 탄소의 지방족 테일을 갖는 지방산을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0085] 일부 구현예에서, 지질은 디아실 지질 또는 2개-테일형 지질이다. 일부 구현예에서, 디아실 지질에서의 테일은 약 8 내지 약 30개의 탄소를 함유하고, 포화되거나 불포화되거나, 이의 조합일 수 있다. 일부 구현예에서, 디아실 지질은 하기 구조 또는 그의 염을 갖는다:



[0086] 여기서 X는 O 또는 S이다. 지질의 테일은 에스테르 결합 연결, 아마이드 결합 연결, 티오에스테르 결합 연결, 또는 이들의 조합을 통해 헤드 기에 결합될 수 있다. 특정 구현예에서, 디아실 지질은 포스페이트 지질, 당지질, 스펅고지질, 또는 이들의 조합이다.

[0088] 림프절-표적화 접합체는 통상적으로 길이가 8개 이상의 탄소 단위인 지질을 포함한다. 지질 단위의 수를 증가시키는 것은 세포의 원형질막으로 지질의 삽입을 감소시킬 수 있고, 이는 지질 접합체가 유리되어 유지되어 알부민에 결합하여 림프절로 이동되게 한다. 예를 들어, 지질은 2개의 C18 탄화수소 테일로 구성된 디아실 지질일 수 있다. 일부 구현예에서, 림프절 표적화 지질 접합체를 제조하는 데 사용하기 위한 지질은 단쇄 탄화-수소 (예를 들어, C18), 또는 콜레스테롤이 아니다. 콜레스테롤 접합은 분자 아췌반트 예컨대 CpG의 번역조절 및 펩티드의 번역원성을 향상시키기 위해 연구되고 있다.

[0089] 본원의 지질뿐만 아니라 지질을 포함하는 양친매성 물질에 대한 언급은 그의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0090] 링커

[0091] CpG-양친매성 물질이 림프절로 효율적으로 이동되게 하기 위해, CpG ODN은 가용성으로 유지되어야 한다. 이에 따라, 극성 블록 링커는 CpG ODN과 CpG ODN의 가용성을 증가시키기 위해 접합되는 지질 사이에 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, CpG-양친매성 물질은 링커에 의해 지질에 연결되는 CpG 서열을 포함한다. 링커는 주입 부위에 인접한 조직에서의 세포와 같은 세포의 원형질막으로 삽입하기 위한 지질의 능력을 감소시키거나 저지할 수 있다. 링커는 또한 투여 부위에서 CpG ODN이 세포의 기질 단백질과 비-특이적으로 회합하는 능력을 감소시키거나 저지할 수 있다. 링커는 알부민에 결합하는 그것의 능력을 저지하지 않고 CpG ODN의 가용성을 증가시킬 수 있다. 이러한 특성의 조합은 CpG ODN이 혈청 또는 간질액에 존재하는 알부민에 결합할 수 있게 하고 알부민이 림프절로 이동하여 유지될 때까지 순환계에서 유지될 수 있다.

[0092] 링커의 길이 및 조성은 선택되는 지질 및 CpG ODN에 기초하여 조정될 수 있다. 예를 들어, 일부 CpG ODN의 경우, 올리고뉴클레오타이드 그 자체는 가용성을 보장하기에 충분하도록 극성일 수 있고; 예를 들어 길이가 10, 15, 20 또는 그 초과인 뉴클레오타이드인 올리고뉴클레오타이드이다. 이에 따라, 일부 구현예에서, 추가적인 링커가 필요하지 않다. 그러나, 아마노산 서열에 따라, 일부 지질화된 펩티드는 본질적으로 불용성일 수 있다. 이러한 경우, 극성 올리고뉴클레오타이드의 효과를 모방하는 링커를 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 링커는, 예를

들어, 지질-올리고뉴클레오타이드 접합체 및 지질-펩티드 접합체와 같은 본원에 기재된 지질 접합체 중의 임의의 것의 일부로서 사용될 수 있고, 이는 세포막 삽입/알부민에 대한 우선적 분배를 감소시킨다.

[0093] 적합한 링커는 비제한적으로 폴리(에틸렌 글리콜) (MW: 500 Da 내지 20,000 Da), 폴리아크릴아미드 (MW: 500 Da 내지 20,000 Da), 폴리아크릴산을 포함하는 핵산의 가닥, 친수성 중합체; 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴, 글루타민, 아스파르트산, 글루탐산, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 또는 이들의 조합과 같은 친수성 아미노산의 가닥; 비제한적으로 덱스트란 (MW: 1,000 Da 내지 2,000,000 Da), 또는 이들의 조합을 포함하는 다당류를 포함하는 상기 논의된 것과 같은 올리고뉴클레오타이드를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 소수성 지질 및 링커/CpG ODN은 공유적으로 연결된다. 공유 결합은 비-절단가능한 연결 또는 절단가능한 연결일 수 있다. 비-절단가능한 연결은 아미드 결합 또는 포스페이트 결합을 포함할 수 있고, 절단가능한 연결은 이황화 결합, 산-절단가능한 연결, 에스테르 결합, 무수물 결합, 생분해성 결합, 또는 효소-절단가능한 연결을 포함할 수 있다.

[0094] 일부 구현예에서, 링커는 하나 이상의 에틸렌 글리콜 (EG) 단위, 보다 바람직하게는 2개 이상의 EG 단위 (즉, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG))이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, CpG-양친매성 물질은 CpG 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 분자 또는 그의 유도체 또는 유사체에 의해 연결된 소수성 지질을 포함한다.

[0095] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 CpG-양친매성 물질은 공유적으로 또는 올리고 미셀에 혼성화되는 단백질-올리고 접합체의 형성을 통해 소수성 지질, 또는 지질-Gn-ON 접합체에 최종적으로 연결되는 PEG에 연결되는 CpG ODN을 함유한다. PEG 단위의 정확한 수는 지질 및 카고에 좌우되고, 그러나, 통상적으로, 링커는 약 1 내지 약 100, 약 20 내지 약 80, 약 30 내지 약 70, 또는 약 40 내지 약 60개의 PEG 단위를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 링커는 약 45 내지 55개의 PEG 단위를 갖는다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 링커는 48개의 PEG 단위를 갖는다.

[0096] 상기 논의된 바와 같이, 일부 구현예에서, 링커는 핵산의 가닥을 포함하는 올리고뉴클레오타이드이다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 CpG 양친매성 물질은 소수성 지질에 최종적으로 연결되는 핵산의 가닥에 연결되는 CpG ODN을 포함한다. 링커는 임의의 서열을 가질 수 있고, 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드의 서열은 무작위 서열, 또는 그것의 분자 또는 생화학 특성 (예를 들어 고도의 극성)을 위해 특이적으로 선택되는 서열일 수 있다. 일부 구현예에서, 링커는 20개의 하나 이상의 일련의 연속적인 아데닌 (A), 시토신 (C), 구아닌 (G), 티민 (T), 우라실 (U), 또는 이들의 유사체를 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 일련의 연속적인 아데닌 (A), 시토신 (C), 구아닌 (G), 티민 (T), 우라실 (U), 또는 이들의 유사체로 이루어진다.

[0097] 일부 구현예에서, 핵산의 가닥은 1 내지 50개의 핵산 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산의 가닥은 5 내지 30개의 핵산 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 하나 이상의 구아닌, 예를 들어 1-10개의 구아닌을 포함한다. CpG ODN과 지질 테일 사이의 구아닌의 수를 변경하는 것은 혈청 단백질의 존재하는 경우에 미셀 안정성을 조절하는 것으로 밝혀졌다. 이에 따라, 링커에서의 구아닌의 수는 혈청 단백질 예컨대 알부민에 대한 CpG ODN의 요망되는 친화성에 기초하여 선택될 수 있다.

[0098] 일부 구현예에서, 링커는 아미노산의 가닥을 포함하는 올리고뉴클레오타이드이다. 일부 구현예에서, CpG 양친매성 물질은 소수성 지질에 최종적으로 연결되는 아미노산의 가닥에 연결되는 CpG ODN을 포함한다. 링커는 임의의 아미노산 서열을 가질 수 있고, 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드의 서열은 무작위 서열, 또는 그것의 분자 또는 생화학적 특성 (예를 들어, 높은 가요성)을 위해 선택된 서열일 수 있다. 일부 구현예에서, 링커는 폴리글리신 링커를 형성하기 위한 일련의 글리신 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 (Gly)_n의 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 n은 2 내지 20개의 잔기일 수 있다. 폴리글리신 링커의 예는 비제한적으로 GGG, GGGA (서열 번호 18), GGGG (서열 번호 19), GGGAG (서열 번호 20), GGGAGG (서열 번호 21), GGGAGGG (서열 번호 22), GGAG (서열 번호 23), GGSG (서열 번호 24), AGGG (서열 번호 25), SGGG (서열 번호 26), GGAGGA (서열 번호 27), GGSGGS (서열 번호 28), GGAGGAGGA (서열 번호 29), GGSGGSGGS (서열 번호 30), GGAGGAGGAGGA (서열 번호 31), GGSGGSGGSGGS (서열 번호 32), GGAGGGAG (서열 번호 33), GGSGGGSG (서열 번호 34), GGAGGGAGGGAG (서열 번호 35), GGSGGGSGGGSG (서열 번호 36), GGGGAGGGGAGGGGA (서열 번호 37), GGGGSGGGGSGGGGS (서열 번호 38), 및 GGSGGGGS (서열 번호 62)를 포함한다.

[0099] 본원에 기재된 링커 (예를 들어, 폴리글리신 링커)는 또한 폴리펩티드 서열 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드 또는 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드)를 태그 (예를 들어, 히스티딘 태그 및/또는 Avi 태그)에 연결하기 위해 사용될 수 있다.

[0100] **코로나바이러스 항원**

[0101] 일 양태에서, 본 개시내용은 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질의 전장 또는 단편을 제공하고, 이는 이 스파이크 단백질의 면역원성 또는 다량체 (예를 들어, 삼량체)로서 식별되었다 (Grifoni et al. *Cell Host Microbe*. 2020; 27(4): 671-80; Ou et al. *Nat Commun*. 2020, 11(1): 1620; Walls et al. *Cell*. 2020; 181(2): 281-92). 또한, 항원은 SARS-CoV-2 뉴클레오캡시드 단백질, 막 단백질 등, 또는 그의 펩티드에 해당할 수 있다. 항원은 또한 코로나바이러스 스파이크 단백질의 특정 기능 영역 (즉, 단백질 서브유닛)에 해당할 수 있다. 예를 들어, 항원은 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질, 또는 S 단백질의 S1, S2, 또는 수용체-결합 도메인 (RBD) 영역에 해당하거나 이를 포함할 수 있다.

[0102] 항원(들)은 또한 관심대상의 감염원에서의 면역원성 서열에 해당하는 펩티드 (또는 다수의 펩티드들)일 수 있다. 펩티드는 다양한 면역 반응을 유도할 수 있는 에피토프로서 거동한다. 예를 들어, 펩티드는 세포 및 체액 면역원성 둘 모두에서 예측되는 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질의 다양한 위치를 나타낼 수 있다 (Fast et al. *bioRxiv*. 2020: 2020.02.19.955484). 다수의 펩티드로 이루어진 항원과 관련하여, 항원(들)은 전체 단백질 또는 그의 기능 영역을 포괄하는 중첩하는 펩티드의 각테일일 수 있거나, 또는 이는 상이한 단백질의 면역원성 영역에 해당하는 펩티드의 혼합물일 수 있다. 예를 들어, 항원(들)은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질, 뉴클레오캡시드 단백질, 및 막 단백질을 포함하는 펩티드의 혼합물일 수 있다. SARS-CoV-2 스파이크 단백질은 하기의 아미노산 서열을 가질 수 있다:

```
MFIFLLFLTSTSGSDLDRCCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVYYPDEIFRSDTLYLTQDLFLPFYSNVTGFF
HTINHTFGNPVIPFKDGIYFAATEKSNVVRGWVFGSTMNNKSQSVIIINNSTNVIRACNFELCDNPFF
AVSKPMGTQHTMIFDNAFNCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFVFNKNDGFLYVYKGYQPIDVV
RDLPSGFNTLKPIFKLPLGINITNFRILTAFAQDIWGTSAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGITITDAV
DCSQNPLAELKCSVKSFEIDKGIYQTSNFRVPSGDVVRFPNITNLCPFGEVFNATKFPSVYAWERKK
ISNCVADYSVLYNSTFFSTFKCYGVSATKLNDLCFSNVYADSFVVKGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKL
PDDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNVNYKYRYLRHGKLRPFERDISNVFPSPDGKPTPPALNCYWPL
NDYGFYTTTGIGYQPYRVVLSFELLNAPATVCGPKLSTDLIKNQCVNFNFNGLTGTGVLTTPSSKRFFQ
PFQQFGRDVSDFDTSVRDPKTSEILDSPCSFGGVSVITPGTNASSEVAVLYQDVNCTDVSTAIHADQ
LTPAWRIYSTGNNVFQTAQAGCLIGAEHVDTSECDIPIGAGICASYHTVSLRSTSQKSIVAYTMSLGA
DSSIAYSNTTIAIPTNFSISITTEVMPVSMAKTSVDCNMYICGDSTECANLLLQYGSFCTQLNRALSGIA
AEQDRNTREVFQAVKQMYKTPTLKYFGGFNFSQILPDLPKPTKRSFIEDLLFNKVTLADAGFMKQYGE
CLGDINARDLCAQKFNGLTVLPLLLTDDMIAAYTAALVSGTATAGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFN
GIGVTQNVLYENQKQIANQFNKAISQIQESLTTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAIVSV
LNDILSRDLKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGK
GYHLMSFPQAAPHGVVFLHVTYVPSQERNFTTAPAICHEGKAYFPREGVVFVNGTSWFITQRNFFSP
QIITTDNTFVSGNCDVVGIIINNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVVNIQKEI
DRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYVWLGFIAGLIAIMVTILLCCMTSCCSCCLKGACSCGS
CCKFDEDDSEPVKGVKLHYT (서열 번호 14).
```

[0103]

[0104] 일부 구현예에서, 코로나바이러스 스파이크 단백질은 하기의 아미노산 서열을 가질 수 있다:

```
MFIFLLFLTSTSGSDLDRCCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVYYPDEIFRSDTLYLTQDLFLPFYSNVTGFF
HTINHTFGNPVIPFKDGIYFAATEKSNVVRGWVFGSTMNNKSQSVIIINNSTNVIRACNFELCDNPFF
AVSKPMGTQHTMIFDNAFNCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFVFNKNDGFLYVYKGYQPIDVV
RDLPSGFNTLKPIFKLPLGINITNFRILTAFAQDIWGTSAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGITITDAV
DCSQNPLAELKCSVKSFEIDKGIYQTSNFRVPSGDVVRFPNITNLCPFGEVFNATKFPSVYAWERKK
ISNCVADYSVLYNSTFFSTFKCYGVSATKLNDLCFSNVYADSFVVKGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKL
PDDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNVNYKYRYLRHGKLRPFERDISNVFPSPDGKPTPPALNCYWPL
NDYGFYTTTGIGYQPYRVVLSFELLNAPATVCGPKLSTDLIKNQCVNFNFNGLTGTGVLTTPSSKRFFQ
PFQQFGRDVSDFDTSVRDPKTSEILDSPCSFGGVSVITPGTNASSEVAVLYQDVNCTDVSTAIHAGQ
LTPAWRIYSTGNNVFQTAQAGCLIGAEHVDTSECDIPIGAGICASYHTVSLRSTSQKSIVAYTMSLGA
```

[0105]

DSSIAYSNNTIAIPTNFSISITTEVMPVSMAKTSVDCNMYICGDSTECANLLLQYGSFCTQLNRALSGIA
AEQDRNTREVFAQVKQMYKTPTLKYFGGFNFSQILPDPLKPTKRSFIEDLLFNKVTADAGFMKQYGE
CLGDINARDLICAQKFNGTLVLPPLTDDMIAAYTAALVSGTATAGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFN
GIGVTQNVLYENQKQIANQFNKAISQIQESLTTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSV
LNDILSRDLKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGK
GYHLMSFPQAAPHGVVFLHVTYVPSQERNFTTAPAICHEGKAYFPREGVVFVNGTSWFITQRNFFSP
QIITTDNTFVSGNCDVVIGIINNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVNIQKEI
DRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYVWLGFIAGLIAVMVTILLCCMTSCCSCCLKGACSCGS
CCKFDEDDSEPVLKGVLHYT (서열 번호 16).

[0106]

[0107]

일부 구현예에서, 코로나바이러스 스파이크 단백질 작제물은 하기 서열에 대해 적어도 90% (예를 들어, 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 동일한 서열을 포함한다:

VNLTTTRTQLPPAYTNSFTRGVVYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFAIHVSGTNGTKRFDNP
VLFPNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSTQSLIVNNATNVVIVKCEFCNDPFLGVYHKNKNS
WMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPO
GFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTGPDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTITD
AVDCALDPLSETKCTLSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNR
KRISNCVADYSVLNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNY
KLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYF
PLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNK
KFLPFQFGFRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVIAHA
DQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSECDIPGAGICASYQTQTNSPRAAASVASQSIIA
YTMSLGAENSVAYSNNIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECNLLLQYGSFCTQLN
RALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTADAGFI
KQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGTLVLPPLTDEMAIYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMA
YRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFG
AISSVLNDILSRDLKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVD
FCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNTTAPAICHDGKAHFPREGVVFVSNGTHWFVTQR
NFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIINNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASV
NIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPGGGSGGGSHHHHHHHHHH (서열 번호 66).

[0108]

[0109]

일부 구현예에서, 코로나바이러스 스파이크 단백질 작제물은 하기 서열을 포함한다:

VNLTTTRTQLPPAYTNSFTRGVVYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFAIHVSGTNGTKRFDNP
VLFPNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSTQSLIVNNATNVVIVKCEFCNDPFLGVYHKNKNS
WMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPO
GFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTGPDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTITD
AVDCALDPLSETKCTLSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNR
KRISNCVADYSVLNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNY
KLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYF

[0110]

PLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNGLTGTGVLTESNK
KFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFSGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHA
DQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRAAASVASQSIIA
YTMSLGAENSVAYSNNIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECNLLLQYGSFCTQLN
RALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSPKPSKRSFIEDLLFNKVTLDAGFI
KQYGDCLGDIAARDLCAQKFNGTLVLPPLLTDEMIQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMA
YRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNNSAIGKIQDLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFG
AISSVLNDILSRDLKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVD
FCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHGDKAHFPREGVFLVSNNGTHWFTVQR
NFYEPQIITDNTFVSGNCDVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVV
NIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPGGGSGGGSHHHHHHHHHH (서열 번호 66).

[0111]

[0112] 이 단백질 작제물은 **GGGSGGGS (서열 번호 62)** 링커로 스파이크 단백질 서열에 연결된 10개-히스티딘 태그 (HHHHHHHHHH; 서열 번호 67) 를 포함한다. 스파이크 단백질은 삼량체를 안정화시키기 위해 하기 돌연변이를 갖는다: R683A, R685A. 이 작제물은 제품 번호 SPN-C52H2 하에서 ACROBiosystems으로부터 이용가능하다.

[0113] 일부 구현예에서, 코로나바이러스 스파이크 단백질의 펩티드는 안지오텐신-전환 효소 2 (ACE2)에 특이적으로 결합하는 코로나바이러스 스파이크 단백질의 수용체 결합 도메인에 해당한다. ACE2 수용체와 상호작용하는 것으로 알려진 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 영역은 하기 서열의 아미노산 서열을 갖는 1255 아미노산 단백질 (서열 번호 14)에 대한 아미노산 323-502에 해당하고, 이에 따라 영역-결합 도메인 (RBD)으로서 역할을 한다:

CPFGEVFNATKFPSVYAWERKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFKCYGVSATKLNLCFSNVYADSFV
KGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKLPPDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNYNKYRYLRHGLRPFERDIS
NVPFSPDGKPCPPALNCYWPLNDYGFYTTTGIGYQPYRVVLSFE (서열 번호 17).

[0114]

[0115] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 본 발명의 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 펩티드는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 RBD의 단편에 대해 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 본 발명의 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 펩티드는 하기 서열에 대해 적어도 90% (예를 들어, 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 동일한 아미노산 서열을 갖는다:

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRRKRISNCVADYSVLNYSASFSTFK
CYGVSPTKLNLCFTNVYADSFVIRGDEVRIAPGQTGKIADYNYKLPPDFTGCVIAWNSNNLDSKVG
GNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVL
SFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQ
TLEILDITPCS (서열 번호 3).

[0116]

[0117] 일부 구현예에서, 코로나바이러스 스파이크 단백질 펩티드는 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는다.

[0118] 일부 구현예에서, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 Spike RBD는 하나 이상의 돌연변이를 함유한다. 돌연변이는 영국 (202012/01)에서의 변이체에서 검출된 N501Y 돌연변이, 영국 및 나이지리아에서의 변이체 (20A/S:484K 변이체)에서 검출된 A67V, 69del, 70del, 144del, E484K, D614G, Q677H, 및 F888L 돌연변이, 영국에서의 변이체 (알파 변이체로도 알려진 B.1.1.7 변이체 또는 20I/501Y.V1 변이체)에서 검출된 69del, 70del, 144del, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, 및 D1118H 돌연변이, 미국에서의 변이체에서 검출된 T95I, D253G 및 D614G 돌연변이, 미국에서의 변이체 (20C 변이체)에서 검출된 D80G, 144del, F157S, L452R, D614G, 및 D950H 돌연변이, 미국에서의 변이체 (20C/S:452R 변이체로도 알려진 B.1.472 변이체)에서 발견된 L452R 및 D614G 돌연변이, 미국 (20C/S:452R 변이체로도 알려진 B.1.429 변이체)에서 검출된 S13I, W152C, L452R, D614G 돌연변이, 브라질에서의 변이체 (감마 변이체로도 알려진 P.1 변이체 또는 20J/501Y.V3 변이체)에서 검출된 L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y, 및 T1027I 돌연변이, 브라질에서의 변이체 (20J 변이체)에서 검출된 E484K, D614G, 및 V1176F 돌연변이, 인도에서의 변이체 (20A 변이체)에서 발견된 L18F, L452R, E484Q, 및 D614G 돌연변이, 인도에서의 변이체 (20A/S:154K 변이체)에서 발견된

G142D, E154K, L452R, E484Q, D614G, P681R, 및 Q1071H 돌연변이, 인도에서의 변이체 (델타 변이체로도 알려진 B.1.617.2 변이체, 20A/S:478K 변이체, 또는 20J 변이체)에서 발견된 T19R, G142D, L452R, E484Q, D614G, P681R, 및 D950N 돌연변이, 또는 남아프리카에서의 변이체 (베타 변이체로도 알려진 B.1.351 변이체, 501.V2 변이체, 또는 501.V2, 20H/501Y.V2)에서 검출된 (D80A, D215G, 241del, 242del, 243del, D614G, 및 A701V 돌연변이가 있거나 없는) N501I, K417N, 및 E484K 돌연변이의 조합일 수 있다. 변이체 돌연변이의 번호매김은 전장 스파이크 단백질에 상대적이다.

[0119] Spike RBD는 SARS-CoV2 변이체 돌연변이 중 임의의 것을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, Spike RBD는 상술한 SARS-CoV2 변이체 중 임의의 서열에 대해 적어도 90% (예를 들어, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 서열 동일성을 갖는다. 일 구현예에서, Spike RBD는 B.1.351 변이체의 서열에 대해 적어도 90% (예를 들어, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 서열 동일성을 갖는다.

[0120] 일부 구현예에서, Spike RBD는 N501Y 돌연변이를 함유하고, 하기 나타낸 서열을 포함한다:

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLVNSASFSTFKCYGVSPTK
LNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNNYNYLY
RLFRKSNLKPFRDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPYRVVLSFELLHAP

[0121] ATVCGPCKSTNLVKNKCVNF (서열 번호 69).

[0122] 일부 구현예에서, 히스티딘-태그는 서열 번호 69의 서열의 C-말단에 첨가된다. 일부 구현예에서, 히스티딘-태그 서열은 하기와 같다: AHHHHHHHHHHH (서열 번호 70).

[0123] 일부 구현예에서, 코로나바이러스 항원은 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드이다. 일부 구현예에서, 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질은 하기 아미노산 서열에 대해 적어도 90% (예를 들어, 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 동일한 서열을 포함한다:

MSDNGPQNQRNAPRITFGGSPDSTGSNQNNGERSGARSQRRPQGLPNNTASWFTALTQHGKEDL
KFPRGQGVPIINTNSSPDDQIGYYRRATRRIRGGDGKMKDLSPRWYFYLLGTGPEAGLPYGANKDGLI
WVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAIVLQLPQGTTLPKGFYAEGSRGGSQASSRSSRSRNSRNS
TPGSSRGTSPTARMAGNGGDAALALLLDRLNQLESKMSGKGQQQGGQTVTKSAEASKKPRQKR
TATKAYNVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTQDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSG
TWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPPTPKDKKKKADETQALPQRQKKQQTVTLLP
AADLDDFSKQLQQSMSSADSTQA (서열 번호 68).

[0124] 일부 구현예에서, 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질은 서열 번호 68의 아미노산 서열을 포함한다.

[0126] 일부 구현예에서, 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 작제물은 하기 서열을 포함한다:

MSDNGPQNQRNAPRITFGGSPDSTGSNQNNGERSGARSQRRPQGLPNNTASWFTALTQHGKEDL
KFPRGQGVPIINTNSSPDDQIGYYRRATRRIRGGDGKMKDLSPRWYFYLLGTGPEAGLPYGANKDGLI
WVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAIVLQLPQGTTLPKGFYAEGSRGGSQASSRSSRSRNSRNS
TPGSSRGTSPTARMAGNGGDAALALLLDRLNQLESKMSGKGQQQGGQTVTKSAEASKKPRQKR
TATKAYNVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTQDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSG
TWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPPTPKDKKKKADETQALPQRQKKQQTVTLLP
AADLDDFSKQLQQSMSSADSTQAENLYFQGHHHHHH (서열 번호 63).

[0127] HHHHHH;

[0128] 이 작제물은 뉴클레오캡시드 단백질 서열과 6개-히스티딘 태그 (ENLYFQG; 서열 번호 64) 사이에 담배 식각 바이러스 (TEV) 프로테아제 (서열 번호 64)에 대한 절단 부위를 포함하고, 이는 제품 번호 NUN-C5227 하에서 ACROBiosystems으로부터 이용가능하다.

[0129] 일부 구현예에서, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드 또는 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드는 하나 이상의 태그 (예를 들어, 히스티딘 태그 또는 Avi 태그)를 포함한다.

- [0130] 태그는 예를 들어 단백질 정제 (예를 들어, 친화성 태그)를 위하거나, 단백질의 가용성을 증가시키거나, 크로마토그래피 특성을 변경하거나, 형광을 관독하거나, 또는 다른 목적을 위해 사용될 수 있다. 단백질 태그는 키틴 결합 단백질 (CBP) 태그, 말토오스 결합 단백질 (MBP) 태그, Strep-태그, 글루타티온-S-트랜스퍼라아제 (GST) 태그, 히스티딘 태그, AviTag, C-태그, 칼모둘린 태그, E-태그, FLAG 태그, 인간 인플루엔자 헤마글루티닌 (HA) 태그, Myc, S-태그 및 NE-태그를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 펩티드는 히스티딘 태그를 갖는다. 일부 구현예에서, 코로나바이러스 스파이크 단백질은 Avi 태그를 갖는다. 다른 구현예에서, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 펩티드는 히스티딘 및 Avi 태그 둘 모두를 갖는다.
- [0131] 일부 구현예에서, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드 또는 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질 또는 그의 펩티드는 프로테아제 절단 부위를 포함한다. 일부 구현예에서, 프로테아제 절단 부위는 코로나바이러스 스파이크 단백질, 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질, 또는 펩티드 서열과 태그 사이에 존재한다. 일부 구현예에서, 프로테아제 절단 부위는 TEV를 위한 것이다. 일부 구현예에서, TEV 절단 부위는 아미노산 서열 **ENLYFQG (서열 번호 64)**를 갖는다.
- [0132] 면역 반응을 일으킬 수 있는 예측된 면역원성 에피토프에 대한 다른 예는 문헌 (Grifoni et al. *Cell Host Microbe*. 2020; 27(4): 671-80; Prachar et al. *bioRxiv*. 2020: 2020.03.20.000794; Chour et al. *medRxiv*. 2020; 2020.05.04.20085779) 및 SARS-CoV-2 항원 공급업체의 웹사이트 (예를 들어, Sino Biological, Creative Diagnostics, Sengenics, ABclonal Technology)에서 찾을 수 있다. MHC 결합능에 기초하여 면역원성 영역을 식별하기 위한 예측 장비는 또한 널리 이용가능하다.
- [0133] 대안적으로, 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드 또는 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질 또는 그의 펩티드)를 인코딩하는 핵산, 예컨대 메신저 RNA (mRNA)가 투여될 수 있다. 주입시, mRNA는 세포의 세포질로 유입되고 여기서 이는 궁극적으로 세포 및 체액성 면역 반응을 활성화시킬 수 있는 요망되는 단백질 또는 펩티드로 번역된다. 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 펩티드의 효과적인 발현을 위해, mRNA는 하기를 포함하도록 합성될 것이다: 5' 캡 - 5' 비번역된 영역 (UTR) - 항원-인코딩된 서열 - 3' 비번역된 영역 (UTR) - 폴리 A 테일. 5' UTR 및 3' UTR의 설계는 mRNA 안정성, 번역, 단백질 생성, 및 구조를 위해 중요하며; 관심대상의 mRNA에 기초한 5' UTR 및 3' UTR의 설계를 최적화하는 여러 온라인 도구가 존재한다. 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 펩티드-인코딩 서열은 특정 단백질 또는 단백질 서브유닛을 위해 코딩하는 임의의 mRNA 서열; 예를 들어, SARS-CoV-2 스파이크 단백질, Spike RBD 도메인, 스파이크 S1 도메인 등을 인코딩하는 mRNA일 수 있다. 또한 mRNA는 비변형되거나, 뉴클레오사이드-변형되거나, 또는 자가-증폭될 수 있다. 효능, 안정성, 및 단백질 수율을 증가시키기 위해, mRNA는 코돈 최적화 및 변형된 뉴클레오사이드의 사용으로 처리될 수 있다. 예를 들어, 본래 면역 분자에 의한 조기 인지를 회피하고 번역의 효율을 개선하기 위해 변형된 우리딘 또는 변형된 시티딘의 혼입이 실행될 수 있다.
- [0134] 일부 구현예에서, 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드 또는 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질 또는 그의 펩티드)를 인코딩하는 mRNA는 지질 나노입자 (LNP)로 체제화된다. 지질 나노입자는 통상적으로 관심대상의 mRNA (예를 들어, 코로나바이러스 항원 예컨대 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드를 인코딩하는 mRNA)와 함께 이온화가능한 양이온성 지질, 비-양이온성 지질, 스테롤 및 PEG 지질 성분을 포함한다. 지질 나노입자는 본 기술분야에 일반적으로 알려진 성분, 조성물, 및 방법을 사용하여 생성될 수 있고, 예를 들어 PCT/US2016/052352; PCT/US2016/068300; PCT/US2017/037551; PCT/US2015/027400; PCT/US2016/047406; PCT/US2016000129; PCT/US2016/014280; PCT/US2016/014280; PCT/US2017/038426; PCT/US2014/027077; PCT/US2014/055394; PCT/US2016/52117; PCT/US2012/069610; PCT/US2017/027492; PCT/US2016/059575; 및 PCT/US2016/069491을 참조하고; 이들 모두는 그 전문이 본원에 참조로 편입된다. 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 mRNA는 지질 나노입자로 체제화될 수 있다. 일부 구현예에서, 지질 나노입자는 적어도 하나의 이온화가능한 양이온성 지질, 적어도 하나의 비-양이온성 지질, 적어도 하나의 스테롤, 및/또는 적어도 하나의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)-변형된 지질을 포함한다.
- [0135] 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 mRNA가 배합된 지질 나노입자 조성물의 지질 조성물은 하나 이상의 인지질, 예를 들어, 하나 이상의 포화된 또는 (다중)불포화된 인지질 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 일반적으로, 인지질은 인지질 모이어티 및 하나 이상의 지방산 모이어티를 포함한다.
- [0136] 인지질 모이어티는 예를 들어 포스파티딜 콜린, 포스파티딜 에탄올아민, 포스파티딜 글리세롤, 포스파티딜

세린, 포스파티딘산, 2-리소포스파티딜 콜린 및 스펅고미엘린으로 이루어진 비제한적 군으로부터 선택될 수 있다.

- [0137] 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 mRNA가 배합된 지질 조성물은 하나 이상의 구조적 지질을 포함할 수 있다. 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 구조적 지질은 스테롤 및 또한 스테롤 모이어티를 함유하는 지질을 지칭한다.
- [0138] 지질 나노입자로의 구조적 지질의 혼입은 입자에서의 다른 지질의 응집을 완화하는 데 도움이 될 수 있다. 구조적 지질은 비제한적으로 콜레스테롤, 페코스테롤, 시토스테롤, 에르고스테롤, 캄페스테롤, 스티그마스테롤, 브라시카스테롤, 토마티딘, 토마틴, 우르솔산, 알파-토코페롤, 호파노이드, 피토스테롤, 스테로이드 및 이들의 혼합물을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 구조적 지질은 스테롤이다.
- [0139] 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 mRNA가 배합된 지질 조성물은 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 지질을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, PEG-지질은 비제한적으로 1,2-디미리스토일-sn-글리세롤 메톡시폴리에틸렌 글리콜 (PEG-DMG), 1,2-디스테아로일-sn-글리세롤-3-포스포에탄올아민-N-[아미노(폴리에틸렌 글리콜)] (PEG-DSPE), PEG-디스테릴 글리세롤 (PEG-DSG), PEG-디팔메톨레일, PEG-디올레일, PEG-디스테아릴, PEG-디아실글리 카미드 (PEG-DAG), PEG-디팔미토일 포스파티딜에탄올아민 (PEG-DPPE), 또는 PEG-1,2-디미리스틸록슬프로필-3-아 민 (PEG-c-DMA)을 포함한다.
- [0140] 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 mRNA는 재조합 벡터 내에 인코딩될 수 있다. 벡터는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 mRNA를 전달하기 위해 사용될 수 있다. 벡터는 포유동물, 바이러스, 또는 박테리아 발현 벡터일 수 있다.
- [0141] 벡터는 예를 들어, 플라스미드, 인공 염색체 (예를 들어, BAG, PAC 또는 YAC), 또는 바이러스 또는 파지 벡터일 수 있고, 선택적으로 폴리뉴클레오티드의 발현을 위한 프로모터, 인핸서 또는 조절자를 포함할 수 있다. 벡터는 또한 하나 이상의 선별가능한 마커 유전자, 예를 들어, 박테리아 플라스미드의 경우에 암피실린, 네오마이신 및 /또는 카나마이신 내성 유전자 또는 진균 벡터에 대한 내성 유전자를 함유할 수 있다. 벡터는 예를 들어 DNA 또는 RNA를 생성하기 위해 시험관내에서 사용될 수 있거나 또는 예를 들어 벡터에 의해 인코딩한 단백질의 생성을 위해 숙주 세포, 예를 들어, 포유동물 숙주 세포를 형질감염시키거나 형질전환시키기 위해 사용될 수 있다. 벡터는 또한 예를 들어 DNA 백신접종, RNA 백신접종, 또는 유전자 요법의 방법에서 생체내에서 사용되도록 조정될 수 있다.
- [0142] 바이러스 계통은 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 mRNA를 세포 (예를 들어, 진핵 또는 원핵 세포)의 계통으로 효율적으로 전달하는 데 사용할 수 있는 벡터의 풍부한 공급원을 제공한다. 바이러스 계통은 이러한 계통 내에 함유된 폴리뉴클레오티드가 일반화되거나 특성화된 형질도입에 의해 표적 세포의 계통으로 통상적으로 혼입되기 때문에 유전자 전달을 위해 특히 유용한 벡터이다. 이러한 과정은 자연 바이러스 복제 주기의 일부로서 일어나 고, 유전자 통합을 유도하기 위해 첨가되는 단백질 또는 시약을 필요로 하지 않는다. 코로나바이러스 항원을 인 코딩하는 mRNA를 전달하기 위해 사용될 수 있는 바이러스 벡터의 예는 레트로바이러스, 아데노바이러스 (예를 들어, Ad2, Ad5, Ad11, Ad12, Ad24, Ad26, Ad34, Ad35, Ad40, Ad48, Ad49, Ad50, Ad52 (예를 들어, RhAd52), Ad59 (예를 들어, RhAd59), 및 Pan9 (AdC68로도 알려짐)), 파코바이러스 (예를 들어, 아데노-관련 바이러스), 코로나바이러스, 음성 가닥 RNA 바이러스 예컨대 오르토믹소바이러스 (예를 들어, 인플루엔자 바이러스), 람도 바이러스 (예를 들어, 광견병 및 수포성 구내염 바이러스), 파라믹소바이러스 (예를 들어, 홍역 및 센다이 (Sendai)), 양성 가닥 RNA 바이러스, 예컨대 피코르나바이러스 및 알파바이러스 및 아데노바이러스, 헤르페스바 이러스 (예를 들어, 단순 헤르페스바이러스 1형 및 2형, 엡스타인-바 바이러스, 사이토메갈로바이러스), 및 폭 스바이러스 (예를 들어, 백시니아, 변형된 백시니아 양카라 (MVA), 포우폭스(fowlpox) 및 카나리폭스 (canarypox))를 포함하는 이중 가닥 DNA 바이러스를 포함한다. 면역원 (예를 들어, 폴리펩티드)을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 전달하기 위해 유용한 다른 바이러스는 예를 들어 노르워크(Norwalk) 바이러스, 토가바이러 스, 코로나바이러스, 레오바이러스, 파코바이러스, 헤파드나바이러스 및 간염 바이러스를 포함한다. 레트로바 이러스의 예는 하기를 포함한다: 조류 백혈병-육종, 포유동물 C-형, B-형 바이러스, D-형 바이러스, HTLV-BLV 그룹, 렌티바이러스, 스푸마바이러스 (Coffin, J. M., *Retroviridae: The viruses and their replication*, In *Fundamental Virology*, Third Edition, B. N. Fields, et al., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996). 이러한 아데노바이러스 벡터는 예를 들어, 인간, 침팬지, 또는 레서스 아데노바이러스로 부터 유래될 수 있다. 다른 예는 마우스 백혈병 바이러스, 마우스 육종 바이러스, 마우스 유선 종양 바이러스, 소 백혈병 바이러스, 고양이 백혈병 바이러스, 고양이 육종 바이러스, 조류 백혈병 바이러스, 인간 T-세포 백혈 병 바이러스, 비비원숭이 내생 바이러스, 긴팔 원숭이 백혈병 바이러스, 메이슨 화이자(Mason Pfizer) 원숭이

바이러스, 유인원 면역결핍 바이러스, 유인원 육종 바이러스, 라우스 육종 바이러스 및 렌티바이러스를 포함한다. 벡터의 다른 예는 예를 들어 McVey 등 (미국특허 제5,801,030호)에 기재되어 있고; 이는 그 전문이 본원에 참조로 편입된다. 바이러스 벡터의 핵산 물질 (예를 들어, 핵산 분자 포함)은 예를 들어 지질막 내에 또는 하나 이상의 바이러스 폴리펩티드 (예를 들어, 당단백질)을 포함할 수 있는 구조 단백질 (예를 들어, 캡시드 단백질)에 의해 캡슐화될 수 있다. 바이러스 벡터는 대상체의 세포를 감염시키는 데 사용될 수 있고, 이는 최종적으로 면역원으로 바이러스 벡터의 이중 유전자(들)의 번역을 촉진한다.

[0143] 각각 본원에 참조로 편입된 국제특허출원 공개 WO 2006/040330 및 WO 2007/104792에 개시된 아데노바이러스 벡터는 벡터로서 특히 유용하다. 이러한 아데노바이러스 벡터는 바이러스 감염 (예를 들어, SARS-CoV-2 감염)과 관련된 병리학적 병태를 갖는 대상체를 치료하기 위한 면역원 (예를 들어, SARS-CoV-2 폴리펩티드) 중 하나 이상을 인코딩 및/또는 전달할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 재조합 아데노바이러스 벡터는 하나 초과의 유형의 면역원 (예를 들어, SARS-CoV-2 폴리펩티드)을 발현시키기 위해 대상체에 투여될 수 있다. 아데노바이러스 벡터 이외에, 대상체 (예를 들어, 인간)에서의 면역원 중 하나 이상의 전달 및/또는 발현을 촉진하기 위해 사용될 수 있는 다른 바이러스 벡터 및 기술이 본 기술분야에 알려져 있다. 이러한 바이러스는 폭스바이러스 (예를 들어, 백시니아 바이러스 및 변형된 백시니아 바이러스 양카라 (MVA); 예를 들어 각각 본원에 참조로 편입된 미국특허 제4,603,112호 및 제5,762,938호 참조), 헤르페스바이러스, 토가바이러스 (예를 들어, 베네수엘라 말 너염 바이러스; 예를 들어 본원에 참조로 편입된 미국특허 제5,643,576호 참조), 피코르나바이러스 (예를 들어, 폴리오바이러스; 예를 들어 본원에 참조로 편입된 미국특허 제5,639,649호 참조), 배클로바이러스, 및 Wattanapitayakul 및 Bauer에 의해 기술된 다른 것들 (본원에 참조로 편입된 문헌[Biomed. Pharmacother. 54:487 (2000)])를 포함한다.

[0144] 일부 구현예에서, 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 mRNA는 세포로의 그의 도입을 촉진하기 위해 재조합 AAV (rAAV) 벡터 및/또는 비리온에 혼입된다. 본원에 기재된 조성물 및 방법에 유용한 rAAV 벡터는 (1) 발현되는 이중 서열 (예를 들어, 발현되는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드) 및 (2) 이중 유전자의 안정성 및 발현을 촉진하는 바이러스 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 작제물이다. 바이러스 서열은 DNA의 비리온으로의 복제 및 패키징 (예를 들어, 기능성 ITR)을 위해 시스인 것으로 요구되는 AAV의 서열을 포함할 수 있다. 이러한 rAAV 벡터는 또한 마커 또는 리포터 유전자를 함유할 수 있다. 유용한 rAAV 벡터는 전체적으로 또는 부분적으로 결실된 AAV WT 유전자 중 하나 이상을 갖지만 기능적 플랭킹 ITR 서열(functional flanking ITR sequence)을 보유한다. AAV ITR은 특정 응용분야에 적합한 임의의 혈청형의 것일 수 있다. rAAV 벡터를 사용하기 위한 방법은 예를 들어 문헌 [Tal et al., J. Biomed. Sci. 7:279 (2000)], 및 [Monahan and Samulski, Gene Delivery 7:24 (2000)]에 기재되어 있고, 이의 각각의 개시내용은 이것이 유전자 전달을 위한 AAV 벡터에 관한 것으로 본원에 참조로 편입된다.

[0145] 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 mRNA는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 mRNA를 세포로 도입하는 것을 촉진하기 위해 rAAV 비리온으로 혼입될 수 있다. AAV의 캡시드 단백질은 비리온의 외부 비-핵산 부분을 구성하며 AAV 캡 유전자에 의해 인코딩된다. 캡 유전자는 3개의 바이러스 코트 단백질, VP1, VP2 및 VP3를 인코딩하며, 이는 비리온 조립체를 위해 요구된다. rAAV 비리온의 작제는 예로서 US 5,173,414; US 5,139,941; US 5,863,541; US 5,869,305; US 6,057,152; 및 US 6,376,237; 뿐만 아니라 문헌 [Rabinowitz et al., J. Virol. 76:791 (2002)] 및 문헌 [Bowles et al., J. Virol. 77:423 (2003)]에 기재되어 있고, 이의 각각의 개시내용은 이것이 유전자 전달을 위한 AAV 벡터에 관한 것으로 본원에 참조로 편입된다.

[0146] 유용한 rAAV 비리온은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 rh10, rh39, rh43, rh74, 및 Anc80을 포함하는 다양한 AAV 혈청형으로부터 유래된 것을 포함한다. 상이한 혈청형의 AAV 벡터 및 AAV 단백질의 작제 및 사용은 예로서 문헌 [Chao et al., Mol. Ther. 2:619 (2000)]; [Davidson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:3428 (2000)]; [Xiao et al., J. Virol. 72:2224 (1998)]; [Halbert et al., J. Virol. 74:1524 (2000)]; [Halbert et al., J. Virol. 75:6615 (2001)] 및 [Auricchio et al., Hum. Molec. Genet. 10:3075 (2001)]에 기재되어 있고, 이의 각각의 개시내용은 이것이 유전자 전달을 위한 AAV 벡터에 관한 것으로 본원에 참조로 편입된다.

[0147] AAV 벡터는 유사형 벡터일 수 있다. 유사형 벡터는 주어진 혈청형 (예를 들어, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 등) 이외의 혈청형으로부터 유래된 캡시드 유전자와 유사형인 주어진 혈청형 (예를 들어, AAV9)의 AAV 벡터를 포함한다. 유사형 rAAV 비리온의 작제 및 사용과 관련된 기술은 본 기술분야에 알려져 있고, 예로서 문헌 [Duan et al., J. Virol. 75:7662 (2001)]; [Halbert et al., J. Virol. 74:1524 (2000)]; [Zolotukhin et al., Methods, 28:158 (2002)]; 및 [Auricchio et al., Hum. Molec. Genet. 10:3075 (2001)]

에 기재되어 있다.

[0148] 비리온 캡시드 내에 돌연변이를 갖는 AAV 비리온은 비-돌연변이된 캡시드 비리온보다 더 효과적으로 특정 세포 유형을 감염시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 적합한 AAV 돌연변이체는 특정 세포 유형에 대해 AAV를 표적화하는 것을 촉진하기 위해 리간드 삽입 돌연변이를 가질 수 있다. 삽입 돌연변이체, 알라닌 스크리닝 돌연변이체, 및 에피토프 태그 돌연변이체를 포함하는 AAV 캡시드 돌연변이체의 작제 및 특성화는 문헌 [Wu et al., J. Virol. 74:8635 (2000)]에 기재되어 있다. 본원에 기재된 방법에서 사용될 수 있는 다른 rAAV 비리온은 바이러스의 분자 육성(molecular breeding)뿐만 아니라 엑손 셔플링(exon shuffling)에 의해 생성되는 캡시드 하이브리드의 것을 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Soong et al., Nat. Genet., 25:436 (2000)] 및 [Kolman 및 Stemmer, Nat. Biotechnol. 19:423 (2001)]을 참조한다.

[0149] 이러한 바이러스를 사용하는 유전자 전달 기술은 당업자에게 알려져 있다. 레트로바이러스 벡터는 예를 들어 폴리뉴클레오티드를 숙주 게놈에 안정적으로 통합하는 데 사용될 수 있지만, 이러한 재조합은 바람직하지 않다. 대조적으로 복제-결핍 아데노바이러스 벡터는 에피솜을 유지하고 이에 따라 일시적 발현을 가능하게 한다.

[0150] 곤충 세포 (예를 들어 배칼로바이러스 벡터), 인간 세포, 효모 또는 박테리아에서 발현을 유도할 수 있는 벡터는, 예를 들어, 서브유닛 백신 또는 면역점정으로서 사용하기 위한 mRNA에 의해 인코딩되는 다량의 코로나바이러스 항원을 생성하기 위해 이용될 수 있다.

[0151] **아주반트**

[0152] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 면역원성 조성물은 하나 이상의 아주반트를 포함할 수 있다. 아주반트는 면역계의 자극을 야기하는 물질을 지칭한다. 이러한 맥락에서, 아주반트는 하나 이상의 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열))에 대한 면역 반응을 향상시키기 위해 사용된다. 아주반트는 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열))의 투여 전에, 이와 조합하여, 또는 그 후에 대상체에 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 추가적인 아주반트는 본원에 기재된 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)와 조합하여 대상체에 투여된다. 일부 구현예에서, 아주반트는 지질에 접합될 수 있다. 아주반트는 비제한적으로 지질 (예를 들어, 모노포스포릴 지질 A (MPLA)), 명반 (예를 들어, 수산화알루미늄, 인산알루미늄); 프로인드 아주반트; Q. 사포나리아 나무의 껍질로부터 정제된 사포닌 예컨대 QS21 (HPLC 분획으로 21번째 피크에서 용출되는 당지질; Antigenics, Inc., 매사추세츠주 우스터 소재); 폴리[디(카르복실라토페녹시)포스파젠 (PCPP 중합체; Virus Research Institute, 미국 소재), Flt3 리간드, 리슈마니아 신장 인자 (정제된 리슈마니아 단백질; Corixa Corporation, 워싱턴주 시애틀 소재), ISCOMS (혼합된 사포닌, 지질을 함유하고 항원을 보유할 수 있는 기공을 갖는 바이러스-크기 입자를 형성하는 면역자극 복합체; CSL, 호주 멜버른 소재), Pam3Cys, SB-AS4 (명반 및 MPL을 함유하는 SmithKline Beecham 아주반트 시스템 #4; 벨기에 SBB 소재), 미셀 예컨대 CRL 1005 (이는 폴리옥시에틸렌의 사슬에 의해 플레킹된 소수성 폴리옥시프로필렌의 선형 사슬을 함유함, Vaxcel, Inc., 조지아주 노르크로스 소재)를 형성하는 비-이온성 블록 공중합체 및 Montanide IMS (예를 들어, IMS1312, 가용성 면역자극제와 조합되는 수계 나노입자, Seppic), 및 CDN (시클릭 디-뉴클레오티드)일 수 있다.

[0153] 아주반트는 톨-유사 수용체 (TLR) 리간드일 수 있다. TLR3을 통해 작용하는 아주반트는 비제한적으로 이중-가닥 RNA를 포함한다. TLR4를 통해 작용하는 아주반트는 비제한적으로 지질다당류의 유도체 예컨대 모노포스포릴 지질 A (MPLA; Ribi ImmunoChem Research, Inc., 몬태나주 헤일턴 소재) 및 무라밀 디펩티드 MDP; Ribi) 및 트레오닐-무라밀 디펩티드 (t-MDP; Ribi); OM-174 (지질 A와 관련된 글루코사민 이당류; OM Pharma SA, 스위스 메이린 소재)를 포함한다. TLR5를 통해 작용하는 아주반트는 비제한적으로 플라젤린을 포함한다. TLR7 및/또는 TLR8을 통해 작용하는 아주반트는 단일-가닥 RNA, 올리고리보뉴클레오티드 (ORN), 합성 저분자량 화합물 예컨대 이미다조퀴놀린아민 (예를 들어, 이미퀴모드 (R-837), 레시퀴모드 (R-848))를 포함한다. TLR9를 통해 작용하는 아주반트 5는 바이러스 또는 박테리아 유래의 DNA, 또는 합성 올리고데옥시뉴클레오티드 (ODN), 예컨대 CpG ODN을 포함한다. 다른 아주반트 부류는 포스포로티오에이트 뉴클레오티드 유사체와 같은 분자를 함유하는 포스포로티오에이트 및 포스포로티오에이트 골격 연결을 함유하는 핵산이다.

[0154] **약학적 조성물 및 제조**

[0155] CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)을 포함하는 본 발명의 약학적 조성물이 본원에 기재되어 있다. 치료량의 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열) 이외에, 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 함유할 수 있고, 이는 당업자에게 알려진 방법에 의해 제제화될 수 있다. 다른 구현예에서, 본 발명의 약학적 조성물은 (예를 들어, 벡터, 예컨대 바이러스 벡터 내에) 본원에 기재된 하나 이상의 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드)를 인코딩한 핵산 분자를 함유할 수 있다. 본원에 기재된 그의 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드)를 인코딩하는 핵산 분자는 적절한 발현 벡터로 클로닝될 수 있고, 이는 유전자 요법에서 잘 알려진 방법을 통해 전달될 수 있다.

[0156] CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)의 약학적 조성물에서의 허용가능한 담체 및 부형제는 이용되는 투여량 및 농도에서 수령체에 대해 비독성이다. 특정 구현예에서, 제제 물질(들)은 피하 (s.c.) 및/또는 정맥내 (i.v.) 투여를 위한 것이다. 일부 구현예에서, 투여는 흡입 또는 비강내 투여에 의한 것이다. 일부 구현예에서, 제제 물질(들)은 기관내 투여를 위한 것이다. 일부 구현예에서, 제제 물질(들)은 기계 환기 동안 흡입에 의한 투여를 위한 것이다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 예를 들어 pH, 삼투압, 점도, 투명도, 색상, 등장성, 냄새, 무균, 안정성, 용해 속도 또는 방출 속도, 흡착, 또는 조성물의 침투를 변형, 유지 또는 보존하기 위한 제제 물질을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 적합한 제제 물질은 비제한적으로 아미노산 (예컨대, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 라이신); 항균제; 항산화제 (예컨대, 아스코르브산, 메티오닌, 아황산나트륨 또는 아황산수소나트륨); 완충제 (예컨대, 붕산염, 중탄산염, Tris-HCl, 구연산염, HEPES, TAE, 인산염 또는 기타 유기산); 증량제 (예컨대, 만니톨 또는 글리신); 킬레이트제 (예컨대, 에틸렌디아민 테트라아세트산 (EDTA)); 착화제 (예컨대, 카페인, 폴리비닐피롤리돈, 베타-시클로덱스트린 또는 하이드록시프로필-베타-시클로덱스트린); 충전제; 당류; 이당류; 및 기타 탄수화물 (예컨대, 글루코스, 수크로스만노스 또는 텍스트란); 단백질 (예컨대, 인간 혈청 알부민, 젤라틴, 텍스트란 및 면역글로불린); 착색제, 향료 및 희석제; 유화제; 친수성 중합체 (폴리비닐피롤리돈 등); 저분자량 폴리펩티드; 염 형성 반대이온 (예컨대, 나트륨); 방부제 (예컨대, 헥사메트늄 클로라이드, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드, 레조르시놀 및 벤즈알코늄 클로라이드, 벤조산, 살리실산, 티메로살, 페네틸 알코올, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 클로르헥시딘, 소르브산 또는 과산화수소 등); 용제 (예컨대, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜); 당 알코올 (예컨대, 만니톨 또는 소르비톨); 현탁제; 계면활성제 또는 습윤제 (예컨대, 플루로닉, PEG, 소르비탄 에스테르, 폴리소르베이트, 예컨대 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80, 트리톤, 트로메타민, 레시틴, 콜레스테롤, 킬록사팰); 안정성 향상제 (예컨대, 수크로스 또는 소르비톨); 강장성 강화제 (tonicity enhancing agent) (예컨대 알칼리 금속 할로겐화물, 바람직하게는 염화나트륨 또는 염화칼륨, 만니톨 소르비톨); 전달 비히클; 희석제; 부형제 및/또는 약학적 아유반트를 포함한다. (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1995)). 일부 구현예에서, 최적 약학적 조성물은 예를 들어 의도되는 투여 경로, 전달 형태 및 요망되는 투여량에 따라 당업자에 의해 결정될 것이다. 예를 들어 상기 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences]을 참조한다. 일부 구현예에서, 이러한 조성물은 양친매성 접합체의 물리적 상태, 안정성, 생체내 방출 속도 및 생체내 제거 속도에 영향을 미칠 수 있다.

[0157] 일부 구현예에서, CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)을 포함하는 약학적 조성물에서의 1차 비히클 또는 담체는 본질적으로 수성 또는 비수성일 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 적합한 비히클 또는 담체는 주사용수, 생리 식염수, 또는 인공 뇌척수액일 수 있고, 이는 비경구 투여용 조성물에 일반적인 다른 물질로 보충될 수 있다. 일부 구현예에서, 식염수는 등장성 인산염-완충 식염수를 포함한다. 특정 구현예에서, 중성 완충 식염수 또는 혈청 알부민과 혼합된 식염수는 추가의 예시적인 비히클이다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 약 pH 7.0-8.5의 Tris 완충액, 또는 약 pH 4.0-5.5의 아세트이트 완충액을 포함하고, 이는 추가로 소르비톨 또는 이에 대한 적합한 대체제를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, CpG-양친매성 물질 또는 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)을

포함하는 조성물은 동결건조된 케이크 또는 수용액의 형태로 선택적인 제제화 작용제(formulation agent) (Remington's Pharmaceutical Sciences, 상기와 같음)와 요망되는 순도를 갖는 선택된 조성물을 혼합하여 저장 용으로 제조될 수 있다. 추가로, 일부 구현예에서, CpG-양친매성 물질 또는 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오키프 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)을 포함하는 조성물은 적절한 부형제 예컨대 수크로스를 사용하여 동결건조물로서 제제화될 수 있다.

[0158] 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 비경구적 전달을 위해 선택될 수 있다. 이러한 약학적으로 허용가능한 조성물의 제조는 당업자의 능력 범위 내에 있다.

[0159] 일부 구현예에서, 제제화 성분은 투여 부위에 허용가능한 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, 완충액은 생리학적 pH 또는 약간 더 낮은 pH로, 통상적으로 약 5 내지 약 8의 pH 범위 내로 조성물을 유지하기 위해 사용된다.

[0160] 일부 구현예에서, 비경구적 투여가 고려될 때, 치료 조성물은 약학적으로 허용가능한 비히클 중의 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오키프 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)을 포함하는 발열원이 없는 비경구적으로 허용가능한 수용액의 형태일 수 있다. 일부 구현예에서, 비경구적 주사용 비히클은 CpG-양친매성 물질 또는 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오키프 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)을 적절하게 보존된 멸균 등장액으로 제제화하는 멸균 증류수이다. 일부 구현예에서, 제조는 이후 데포 주사를 통해 전달될 수 있는 제품의 제어 또는 지속 방출을 위해 제공될 수 있는 주사가 가능한 미소구체, 생분해성 입자, 중합체성 화합물 (예컨대 폴리락트산 또는 폴리글리콜산), 비드 또는 리포솜과 같은 제제를 사용한 요망되는 분자의 제제화를 수반할 수 있다. 일부 구현예에서, 히알루론산이 또한 사용할 수 있고, 순환계에서 지속 시간을 촉진하는 효과를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 이식가능한 약물 전달 장치는 요망되는 분자를 도입하기 위해 사용될 수 있다.

[0161] 약학적 조성물은 예컨대 면역 반응을 유도하기 위한 치료적 유효량으로 투여될 수 있다. 약학적 제제에 포함되는 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 단백질 또는 펩티드의 치료적 유효량은 투여량 (예를 들어, 0.01-100 mg/체중 kg의 범위 내의 용량)이 대상체에서 면역 반응을 유도하도록 당업자에 의해 결정될 수 있다.

[0162] 벡터는 생체내 핵산 전달 비히클로서 사용될 수 있고, 비제한적으로 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터 (예를 들어, 백시니아 바이러스 벡터, 예컨대 변형된 백시니아 앙카라 (MVA)), 아데노-관련 바이러스 벡터, 및 알파바이러스 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, 벡터는 본원에 기재된 복수의 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질, 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)의 발현을 가능하게 하는 내부 리보솜 진입 부위 (IRES)를 포함할 수 있다. 핵산 전달을 위한 다른 비히클 및 방법은 미국특허 제5,972,707호, 제5,697,901호, 및 제6,261,554호 기재되어 있고, 이의 각각은 그 전문이 본원에 참조로 편입된다. 약학적 조성물을 제조하는 다른 방법은 예를 들어 미국특허 제5,478,925호, 제8,603,778호, 제7,662,367호, 및 제7,892,558호에 기재되어 있고, 이들 모두는 그 전문이 본원에 참조로 편입된다.

[0163] **투여의 경로, 투여량 및 시기**

[0164] 치료제로서 본원에 기재된 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오키프 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)을 함유하는 본 발명의 약학적 조성물은 비경구적 투여, 피하 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 비강내 투여, 흡입, 기관내 투여, 또는 기계 환기 동안 흡입에 의한 투여를 위해 제제화될 수 있다. 치료 단백질을 투여하는 방법은 본 기술분야에 알려져 있다. 예를 들어 미국특허 제6,174,529호, 제6,613,332호, 제8,518,869호, 제7,402,155호, 및 제6,591,129호 및 미국특허출원 공개번호 US20140051634, WO1993000077, 및 US20110184145를 참조하며, 이의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 편입된다.

[0165] 이러한 방법 중 하나 이상은 본원에 기재된 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오키프 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)을 함유하는 본 발명의 약학적 조성물을 투여하기 위해 사용될 수 있다. 주사용 제제를 위해, 다양한 효과적인 약학적 담체는 본 기술분야에 알려져 있다. 예를 들어 문헌 [Pharmaceutics and Pharmacy Practice, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, Pa., Banker and Chalmers, eds., pages 238-250 (1982)], 및 [ASHP Handbook on Injectable Drugs, Toissel, 4th ed., pages 622-630 (1986)]을

참조한다. 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 투여 경로 및 물리적 특성, 예를 들어 대상체의 연령, 체중, 일반 건강을 포함하는 요인에 좌우된다. 통상적으로, 단일 용량에 함유되는 본원에 기재된 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오키프 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)의 양은 유의미한 독성을 유도하지 않고 대상체에서 면역 반응을 효과적으로 유도하는 양일 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 0.001 내지 500 mg (예를 들어, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.7, 0.8, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 30 mg, 50 mg, 100 mg, 250 mg, 또는 500 mg), 보다 특정한 구현예에서 약 0.1 내지 약 100 mg의 범위의 본원에 기재된 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오키프 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)의 투여량을 포함할 수 있다. 투여량은 대상체의 상이한 파라미터에 따라 임상예에 의해 조정될 수 있다.

[0166] 특정 구현예에서, 대상체는 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오키프 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)의 약 10 µg 내지 약 1.0 mg의 투여량을 받는다. 특히, 투여되는 코로나바이러스 항원의 투여량은 약 40 µg 내지 60 µg이거나, 약 50 µg 내지 70 µg이거나, 약 50 µg 내지 150 µg이거나, 약 70 µg 내지 150 µg이거나, 약 100 µg 내지 150 µg이거나, 약 100 µg 내지 200 µg이거나, 약 140 µg 내지 250 µg이거나, 약 200 µg 내지 300 µg이거나, 약 250 µg 내지 500 µg이거나, 약 300 µg 내지 600 µg이거나, 또는 약 500 µg 내지 1.0 mg이다. 특히, 대상체에 투여되는 코로나바이러스 항원의 투여량은 약 10 µg, 20 µg, 30 µg, 40 µg, 50 µg, 60 µg, 70 µg, 80 µg, 90 µg, 100 µg, 110 µg, 120 µg, 130 µg, 140 µg, 150 µg, 200 µg, 250 µg, 300 µg, 400 µg, 500 µg, 600 µg, 700 µg, 800 µg, 900 µg, 또는 1 mg일 수 있다. 대상체는 또한 코로나바이러스 항원의 이러한 특정 투여량 중 임의의 두개 사이의 범위의 투여량을 받을 수 있다.

[0167] 특정 구현예에서, CpG 양친매성 물질의 투여량은 약 0.1 mg 내지 20 mg이다. 특히, 투여되는 CpG 양친매성 물질의 투여량은 약 0.1 mg 내지 1.0 mg이거나, 약 0.5 mg 내지 3.0 mg이거나, 약 1.0 mg 내지 5.0 mg이거나, 약 2.0 내지 5.0 mg이거나, 약 3.0 내지 5.0 mg이거나, 약 3.0 mg 내지 10.0 mg이거나, 약 4.0 mg 내지 12.0 mg이거나, 약 5.0 mg 내지 15.0 mg이거나 또는 약 5.0 mg 내지 20 mg이다. 대상체에 투여되는 CpG 양친매성 물질의 특정 투여량은 약 0.1 mg, 0.2 mg, 0.3 mg, 0.4 mg, 0.5 mg, 1.0 mg, 2.0 mg, 3.0 mg, 4.0 mg, 5.0 mg, 6.0 mg, 7.0 mg, 8.0 mg, 9.0 mg, 10.0 mg, 11.0 mg, 12.0 mg, 13.0 mg, 14.0 mg, 15.0 mg, 16.0 mg, 17.0 mg, 18.0 mg, 19.0 mg, 또는 20.0 mg일 수 있다. 대상체는 또한 CpG 양친매성 물질의 이러한 특정 투여량 중 임의의 2개 사이의 범위의 투여량을 받을 수 있다.

[0168] 본원에 기재된 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오키프 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)을 함유하는 본 발명의 약학적 조성물은 예를 들어, 매일, 매주, 매월, 2년마다, 매년, 또는 의학적 필요에 따라 1회 이상 (예를 들어 1-10회 또는 그 초과)로 이를 필요로 하는 대상체에 투여될 수 있다.

[0169] 일부 구현예에서, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 펩티드의 삼량체는 대상체에 투여된다. 일부 구현예에서, 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오키프 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)을 인코딩하는 mRNA는 대상체에 투여된다. 일부 구현예에서, 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오키프 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열) 및 CpG-양친매성 물질은 동시적으로 또는 본질적으로 동시에 대상체에 투여된다. CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오키프 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)은 공동-제제화되거나, 또는 이는 2개의 별개의 제제로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오키프 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)는 순차적으로 투여된다. 예를 들어, CpG-양친매성 물질이 첫 번째로 투여될 수 있고, 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오키프 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)이 두 번째로 투여될 수 있거나, 또는 일부 구현예에서, 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오키프 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)이 첫 번째로 투여될 수 있고, CpG-양친매성 물질이 두 번째로 투여된다. 일부 구현예에서, CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나

바이러스 뉴클레오패시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)은 제2 아쥬반트와 함께 투여된다.

[0170] 면역 반응의 유도 방법

[0171] 본 발명은 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오패시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)을 대상체에 투여함으로써 대상체에서 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 대상체는 포유동물 (예를 들어, 인간, 개, 또는 고양이)일 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 인간 대상체이다. 면역 반응은 본원에 기재된 치료적 유효량의 면역원성 조성물 또는 약학적 조성물을 대상체에 투여함으로써 대상체에서 유도된다. 면역원성 조성물 또는 약학적 조성물은 본원에 기재된 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오패시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)을 포함한다. 일부 구현예에서, CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오패시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)은 하나 이상의 추가적인 아쥬반트와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오패시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)은 하나 이상의 추가적인 아쥬반트 없이 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 대상체에 1) 본원에 기재된 치료적 유효량의 CpG-양친매성 물질, 및 2) 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오패시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오패시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)은 실질적으로 동시에 투여된다. 일부 구현예에서, CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오패시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)은 별개로 투여된다. 일부 구현예에서, CpG-양친매성 물질이 첫 번째로 투여되고, 이후 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 펩티드의 투여가 후속된다. 일부 구현예에서, 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오패시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)이 첫 번째로 투여되고 이후 CpG-양친매성 물질의 투여가 후속된다.

[0172] 일부 구현예에서, 면역 반응은 SARS-CoV-2 감염에 대해 예방적이다.

[0173] 일부 구현예에서, 면역 반응은 Covid-19 질환에 대해 예방적이다.

[0174] 일부 구현예에서, 면역 반응은 보조 환기 및 산소공급을 필요로 하는 중증 Covid-19 질환에 대해 예방적이다. 이러한 환자는 급성 호흡 곤란 증후군을 앓는다. 일부 환자는 중증 심혈관 손상이 발생한다. 다른 합병증은 예를 들어, 급성 심장 손상, 급성 신장 손상, 폐혈성 쇼크, 다기관 부전, 및 사망 위험 증가를 포함한다.

[0175] 일부 구현예에서, 면역 반응은 발열, 인후통, 콧물, 재채기, 코막힘, 코골이, 기침, 마른 기침, 숨가쁨, 호흡 곤란, 흉부의 지속적인 통증 또는 압박, 호흡장애, 폐렴, 급성 호흡기 증후군, 청색증, 근육통, 두통, 뇌병증, 심근 손상, 심부전, 부정맥, 응고 기능 장애, 급성 신장 손상, 혼란 또는 각성 불능, 피로, 및 위장 증상으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 COVID-19 병증의 발달에 대해 예방적이다.

[0176] 일부 구현예에서, 면역 반응은 발열, 인후통, 콧물, 재채기, 코막힘, 코골이, 기침, 마른 기침, 숨가쁨, 호흡 곤란, 흉부의 지속적인 통증 또는 압박, 호흡장애, 폐렴, 급성 호흡기 증후군, 청색증, 근육통, 두통, 뇌병증, 심근 손상, 심부전, 부정맥, 응고 기능 장애, 급성 신장 손상, 혼란 또는 각성 불능, 피로, 및 위장 증상으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 COVID-19 병증의 발생률을 감소시킨다.

[0177] 일부 구현예에서, 면역 반응은 발열, 인후통, 콧물, 재채기, 코막힘, 코골이, 기침, 마른 기침, 숨가쁨, 호흡 곤란, 흉부의 지속적인 통증 또는 압박, 호흡장애, 폐렴, 급성 호흡기 증후군, 청색증, 근육통, 두통, 뇌병증, 심근 손상, 심부전, 부정맥, 응고 기능 장애, 급성 신장 손상, 혼란 또는 각성 불능, 피로, 및 위장 증상으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 COVID-19 병증에 대해 치료적이다. 면역 반응은 그것이 COVID-19 병증의 진행 또는 중증도를 역전, 완화, 개선, 억제, 지연, 또는 중지시키기는 경우 치료적이다.

[0178] 일부 구현예에서, 면역 반응은 COVID-19 재발 또는 SARS-CoV-2 재감염의 가능성을 감소시킨다.

- [0179] 일부 구현예에서, 면역 반응은 SARS-CoV-2의 전파 가능성을 감소시킨다.
- [0180] 일부 구현예에서, 대상체는 SARS-CoV-2의 무증상 보균자이다.
- [0181] 일부 구현예에서, 대상체는 발열, 인후통, 콧물, 재채기, 코막힘, 코골이, 기침, 마른 기침, 숨가쁨, 호흡 곤란, 흉부의 지속적인 통증 또는 압박, 호흡장애, 폐렴, 급성 호흡기 증후군, 청색증, 근육통, 두통, 뇌병증, 심근 손상, 심부전, 부정맥, 응고 기능 장애, 급성 신장 손상, 혼란 또는 각성 불능, 피로, 및 위장 증상으로 이루어진 군으로부터 선택되는 COVID-19의 하나 이상의 증상을 갖는다.
- [0182] 일부 구현예에서, 대상체는 SARS-CoV-2 감염된 것으로 진단되었다.
- [0183] 일부 구현예에서, 대상체는 SARS-CoV-2 감염의 고위험을 갖는다 (예를 들어, 의료진 및/또는 최초 대응자).
- [0184] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 면역원성 조성물 또는 약학적 조성물은 코로나바이러스 감염 (예를 들어, COVID-19)된 것으로 진단을 받았던 개체와 접촉하였거나 또는 COVID-19 또는 다른 코로나바이러스 감염의 발병이 일어난 지역으로 최근 여행하였거나 또는 이로 여행할 것을 계획하고 있는 대상체에 투여된다.
- [0185] 일부 구현예에서, 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드는 불활성화된 또는 사멸된 바이러스 백신의 제제 내에 포함된다.
- [0186] 일부 구현예에서, 스파이크 단백질 또는 그의 단편은 서브유닛 형태로 존재한다.
- [0187] 일부 구현예에서, 코로나바이러스 스파이크 단백질을 인코딩하는 핵산은 스파이크 단백질의 융합전 안정화된 형태로 인코딩된다.
- [0188] 일부 구현예에서, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드를 인코딩하는 핵산은 아데노바이러스 벡터 내에 포함된다.
- [0189] **병용 요법**
- [0190] 본원에 기재된 본 발명은 또한 하나 이상의 추가적인 치료제와 조합하여 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원을 투여함으로써 대상체에서 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 병용 요법에서 이용될 수 있는 치료제의 특정 조합은 요망되는 치료제의 상용성 및/또는 요망되는 치료 효과가 달성되는 절차가 고려될 것이다. 이는 또한 이용되는 요법은 동일한 장애에 대한 요망되는 효과를 달성할 수 있거나, 또는 이는 상이한 효과 (예를 들어 하나 이상의 부작용의 제어)를 달성할 수 있다는 것이 이해될 것이다. CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원은 항바이러스제 (예를 들어, 렘데시비르), 항바이러스 백신 (예를 들어, 코로나바이러스 백신 예컨대 SARS-CoV-2에 대한 백신), 항생제, 항진균제, 항염증제, 구충제 및 면역요법제와 조합하여 투여될 수 있다.
- [0191] 일부 구현예에서, 항바이러스제는 렘데시비르, 클로로퀸, 하이드록시클로로퀸, 바리시티닙, 로피나비르/리토나비르, 인터페론 베타, 우미페노비르, 파비피라비르, 토실리주맙, 리바비린 또는 기타 약물일 수 있다. 일부 구현예에서, 항바이러스제는 렘데시비르이다.
- [0192] 일부 구현예에서, 항바이러스 백신은 HCoV-NL3 백신, SARS-CoV-1 백신, SARS-CoV-2 백신 또는 MERS 백신과 같이 코로나바이러스에 노출된 대상체에서의 면역 반응을 유도하는 임의의 조성물을 포함한다. 일부 구현예에서, 항바이러스 백신은 불활성화된 또는 사멸된 바이러스, 예컨대 HCoV-NL3 바이러스, SARS-CoV-1 바이러스, SARS-CoV-2 바이러스, 또는 MERS 바이러스를 포함한다. 일부 구현예에서, 항바이러스 백신은 이중 프라임 또는 부스터로서 투입되거나 본원에 기재된 CpG-양친매성 물질을 포함하는 면역원성 조성물과 조합하여 투여된다.
- [0193] 일부 구현예에서, 항생제는 아미카신, 겐타마이신, 카나마이신, 네오마이신, 네틸마이신, 토브라마이신, 파로모마이신, 스트렙토마이신, 스펙티노마이신, 겐다나마이신, 허비마이신, 리팍시민, 로라카르베프, 에르타페넴, 도리페넴, 이미페넴/실라스타틴, 메로페넴, 세파드록실, 세파졸린, 세팔로틴, 세팔렉신, 세파클러, 세파만돌, 세폭시틴, 세프프로질, 세프록심, 세픽심, 세프디니르, 세프티도젠, 세포페라존, 세포타심, 세프포독심, 세프트지딘, 세프트리부텐, 세프트리독심, 세프트리악손, 세페픽, 세프트라롤린 포사밀, 세프트비프롤, 테이코플라닌, 반코마이신, 텔라반신, 달바반신, 오리타반신, 클린다마이신, 린코마이신, 답토마이신, 아지스로마이신, 클래리트로마이신, 디리트로마이신, 에리스로마이신, 록시트로마이신, 트롤레안도마이신, 텔리트로마이신, 스피라마이신, 아즈트레오남, 푸라졸리돈, 니트로푸란토인, 리네졸리드, 포시졸리드, 라데졸리드, 토레졸리드, 아목시실린, 암피실린, 아스로실린, 카베니실린, 클록사실린, 디클록사실린, 플루클록사실린, 메즐로실린, 메티실린, 나프실린, 옥사실린, 페니실린 g, 페니실린 v, 피페라실린, 테모실린, 티카르실린, 아목시실린 클라불라네이트, 암피실린/술박탐, 피페라실린/타조박탐, 티카르실린/클라불라네이트, 바시트라신, 콜리스틴, 폴리믹신 b,

시프로플록사신, 에녹사신, 가티플록사신, 게미플록사신, 레보플록사신, 로메플록사신, 목시플록사신, 날리딕산, 노르플록사신, 오픈플록사신, 트로바플록사신, 그레파플록사신, 스파플록사신, 테마플록사신, 마페니드, 설파세타미드, 설파디아진, 설버 설파디아진, 설파디메톡신, 설파메티졸, 설파메톡사졸, 설파닐이미드, 설파살라진, 설피속사졸, 트리메토프림-설파메톡사졸 (tmp-smx), 설폰아미도크리소이딘, 테메클로사이클린, 독시사이클린, 미노사이클린, 옥시테트라사이클린, 테트라사이클린, 클로파지민, 답손, 카프레오마이신, 사이클로세린, 에탐부톨(bs), 에티온아미드, 이소니아지드, 피라진아미드, 리팜피신, 리파부틴, 리파퀼린, 스트렙토마이신, 아르스펜아민, 클로람페니콜, 포스포마이신, 푸시딘산, 메트로니다졸, 무피로신, 플라텐시마이신, 퀴누프리스틴/달포프리스틴, 티아페니콜, 티게사이클린, 티니다졸 및 트리메토프림으로부터 선택될 수 있다.

[0194] 일부 구현예에서, 항진균제는 암포테리신 B, 칸디시딘, 필리핀, 하마이신, 나타마이신, 니스타틴, 리모시딘, 비포나졸, 부토코나졸, 클로트리마졸, 에코나졸, 펜티코나졸, 이소코나졸, 케토코나졸, 루리코나졸, 미코나졸, 오모코나졸, 옥시코나졸, 세르타코나졸, 술코나졸, 티오코나졸, 트리아졸, 알바코나졸, 에피코나졸, 에폭시코나졸, 플루코나졸, 이사부코나졸, 이트라코나졸, 포사코나졸, 프로피코나졸, 라부코나졸, 테르코나졸, 보리코나졸, 티아졸, 아바핀진, 아모롤핀, 부테나핀, 나프티핀, 테르비나핀, 아니둘라핀진, 카스포핀진, 미카핀진, 시클로피록스, 플루시토신, 그리세오폴빈, 톨나프테이트, 및 운데실렌산으로부터 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 구충제는 클로로퀸 또는 하이드록시클로로퀸일 수 있다.

[0195] 일부 구현예에서, 항염증제는 텍사메타손일 수 있다. 일부 구현예에서, 항염증제는 셀레콕싯, 디클로페낙, 디푸니살, 에토돌락, 이부프로펜, 인도메타신, 케토프로펜, 케톨락, 나부메톤, 나프록센, 옥사프로진, 프레드니손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 메토프로민 및 텍사메타손으로부터 선택될 수 있다.

[0196] 일부 구현예에서, 면역요법제는 타르그레틴, 인터페론-알파, 인터페론-베타, 클로베스타솔, 페그 인터페론(Peg Interferon) (예를 들어, PEGASYS®), 프레드니손, 로미렙신, 백사로텐, 메토티렉세이트, 트림시놀론 크림, 항-케모카인, 보리노스타트, 가바펜틴, 림프계 세포 막 수용체 및/또는 림포카인에 대한 항체, 표면 암 단백질에 대한 항체, 및/또는 소분자 치료제 예컨대 보리노스타트로부터 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 면역요법제는 인터페론-베타, 토실리주맙, 또는 바리시티닙이다. 일부 구현예에서, 면역요법제는 항체를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 면역요법제는 회복기 혈장 (예를 들어, 인간 회복기 혈장)일 수 있다.

[0197] CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 및 하나 이상의 추가적인 치료제는 순차적으로 (예를 들어, 1일 간격, 2일 간격, 3일 간격, 1주 간격, 1개월 간격, 6개월 간격 또는 그 초과로) 또는 실질적으로 동시에 (예를 들어 1일 이내에) 투여될 수 있다. CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 및 하나 이상의 추가적인 치료제는 단일 약학적 조성물로 제제화될 수 있거나 또는 별개의 약학적 조성물로서 투여될 수 있다. CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 및 하나 이상의 추가적인 치료제는 동일한 투여 경로 또는 상이한 투여 경로에 의해 투여될 수 있다. 2개 이상의 제제는 동일한 빈도 또는 상이한 빈도로 투여될 수 있다.

[0198] 추가적인 치료제는 경구, 국소, 정맥내, 근육내, 경피, 피내, 동맥내, 두개내, 피하, 안와내, 뇌실내, 척수내, 복강내, 비강내, 기관내로 투여되거나 또는 기계 환기 동안 흡입에 의해 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, 추가적인 치료제는 정맥내로 투여되거나 또는 추가적인 치료제는 그것의 규제 승인 형태로 투여될 수 있다. 추가적인 치료제, 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물에 투여될 수 있다. 적합한 담체, 부형제, 또는 희석제의 예는 예를 들어 식염수, 멸균수, 폴리알킬렌 글리콜, 식물 유래의 오일, 수소화된 나프탈렌, 적합한 완충액, 1,3-부탄디올, 링거액 및/또는 염화나트륨 용액을 포함한다. 비경구적 투여를 위한 예시적인 제제는 계면활성제, 예를 들어 하이드록시프로필셀룰로오스와 적절하게 혼합되어 수중에서 제조된 용액을 포함할 수 있다. 분산액은 또한 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜, DMSO 및 알코올이 있거나 없는 이의 혼합물에서 그리고 오일 중에서 제조될 수 있다. 저장 및 사용의 통상적인 조건하에서, 이러한 제제는 미생물의 성장을 방지하기 위한 방부제를 함유할 수 있다. 다른 예시적인 담체, 부형제, 또는 희석제는 문헌 [Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th Edition, Rowe et al., Eds., Pharmaceutical Press (2009)]에 기재되어 있고, 이는 그 전문이 참조로 편입된다. 추가적인 치료제는 본 발명의 방법에 유용한 약제학적 조성물로 투여될 수 있고, 정제, 젤캡, 캡슐, 알약, 분말, 과립, 현탁액, 에멀전, 멸균 용액 또는 현탁액, 및/또는 지속-방출 제제의 형태를 가질 수 있다.

[0199] **키트**

[0200] 키트는 본원에 개시된 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열), 및 사용을 위한 지침서를 포함할 수 있다. 키트는 하나 이상의 적절한 용기에 CpG-양친매성 물질 및

코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열), 하나 이상의 대조군, 및 다양한 완충액, 시약, 효소 및 본 기술분야에 잘 알려진 다른 표준 성분을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 키트는 추가로 아주반트를 포함한다.

[0201] 용기는 하나 이상의 바이알, 웰, 시험 튜브, 플라스크, 병, 주사기, 또는 다른 용기 수단을 포함할 수 있고, 이 안에 CpG-양친매성 물질 또는 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)이 배치될 수 있고 일부 경우에 적절하게 분취될 수 있다. 추가적인 성분이 제공될 때, 키트는 이 화합물이 그 안에 배치될 수 있는 추가적인 용기를 포함할 수 있다. 키트는 또한 상업적으로 시판하기 위한 밀폐된 구획 내에 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)을 함유하기 위한 수단, 및 임의의 다른 시약 용기를 포함할 수 있다. 이러한 용기는 요망되는 바이알을 그 안에 보유하는 사출 또는 블로우 성형된 플라스틱 용기를 포함할 수 있다. 용기 및/또는 키트는 사용 및/또는 경고를 위한 지침서를 가진 라벨링을 포함할 수 있다.

[0202] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 CpG-양친매성 물질을 포함하는 조성물 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열), 선택적인 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 포함하는 하나 이상의 용기, 및 면역 반응을 유도하기 위한 조성물의 투여에 대한 지침서를 포함하는 패키지 삽입물을 포함하는 키트를 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 키트는 추가적인 아주반트 및 아주반트의 투여에 대한 지침서를 추가로 포함한다.

[0203] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열), 선택적인 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 의약, 및 면역 반응을 유도하기 위해 의약을 단독으로 또는 추가적인 아주반트 및 선택적인 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물과 조합하여 투여하기 위한 지침서를 포함하는 패키지 삽입물을 포함하는 키트를 제공한다.

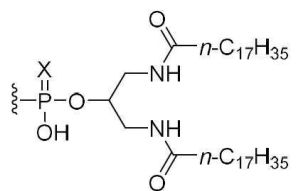
[0204] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 CpG-양친매성 물질을 포함하는 조성물 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열), 선택적인 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 포함하는 용기, 및 대상체에서 면역 반응을 유도하기 위한 조성물 백신의 투여를 위한 지침서를 포함하는 패키지 삽입물을 포함하는 키트를 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 키트는 대상체에서 면역 반응을 유도하기 위한 추가적인 아주반트 및 아주반트의 투여를 위한 지침서를 추가로 포함한다.

[0205] 본원에 기재된 조성물 이외에, 상기 키트는 용매 또는 완충액, 안정제, 방부제, 향미제 (예를 들어, 쓴맛 대항제(bitter antagonist) 또는 감미제), 향료, 예를 들어 키트에서 하나 이상의 성분을 염색시키거나 착색시키기 위한 염료 또는 착색제의 용기(들)와 같은 다른 부품 또는 구성요소를 포함할 수 있다. 상기 키트는 또한 본원에 기재된 병태 또는 장애 (예를 들어, 코로나바이러스 감염)을 치료하기 위한 제2 제제를 포함할 수 있다. 대안적으로, 다른 성분(들)이 키트에 포함될 수 있으나, CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)의 조성물과 구분되는 상이한 조성물 또는 용기에 포함될 수 있다. 이러한 구현예에서, 상기 키트는 본원에 기재된 화합물과 다른 성분(들)을 혼화하거나, 또는 본원에 기재된 화합물 (예를 들어, CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열))을 다른 성분(들)과 함께 사용하기 위한 지침서를 포함할 수 있다.

[0206] 본원에 기재된 조성물은 임의의 형태, 예를 들어, 액체, 건조된 또는 동결건조된 형태로 제공될 수 있다. 본원에 기재된 화합물은 실질적으로 순수하고 및/또는 멸균된 것이 바람직하다. 본원에 기재된 화합물이 액체 용액으로 제공될 때, 액체 용액은 바람직하게는 수용액이고, 멸균 수용액이 바람직하다. 본원에 기재된 화합물이 건조된 형태로 제공될 때, 재구성은 일반적으로 적절한 용매를 첨가하는 것에 의한다. 용매, 예를 들어, 멸균수 또는 완충액은 선택적으로 키트에 제공될 수 있다.

[0207] 키트의 용기는 밀폐, 방수 (예를 들어, 습기 또는 증발의 변화에 대한 불침투성), 및/또는 차광될 수 있다.

- [0208] 상기 키트는 선택적으로 조성물의 전달에 적합한 장치, 예를 들어, 주사기를 포함한다.
- [0209] **번호가 매겨진 구현예**
- [0210] 본원에 기재된 기술의 일부 구현예는 하기 번호가 매겨진 구현예 중 임의의 것에 따라 정의될 수 있다. 또한, 본원에 기재된 방법에 사용되는 성분들을 포함하는 조성물 및 키트가 포함된다.
- [0211] 1. 대상체에서 코로나바이러스 항원에 대한 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 대상체에 (1) CpG-양친매성 물질 및 (2) 코로나바이러스 항원 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열을 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0212] 2. 대상체에서 코로나바이러스 항원에 대한 면역 반응을 유도하는 데 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열로서, 대상체에 투여하기 위해 제제화되는 것인 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.
- [0213] 3. 구현예 1에 있어서, 코로나바이러스 항원은 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드 또는 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 펩티드를 인코딩하는 핵산 서열인 방법.
- [0214] 4. 구현예 1 또는 3에 있어서, CpG-양친매성 물질은 지질에 결합된 CpG 서열을 포함하는 방법.
- [0215] 5. 구현예 1 또는 3에 있어서, CpG-양친매성 물질은 링커에 의해 지질에 연결된 CpG 서열을 포함하는 방법.
- [0216] 6. 구현예 5에 있어서, 링커는 중합체, 아미노산의 가닥, 핵산의 가닥, 다당류, 또는 이들의 조합을 포함하는 방법.
- [0217] 7. 구현예 6에 있어서, 링커는 핵산의 가닥을 포함하는 방법.
- [0218] 8. 구현예 7에 있어서, 핵산의 가닥은 1 내지 50개의 핵산 잔기를 포함하는 방법.
- [0219] 9. 구현예 8에 있어서, 핵산의 가닥은 5 내지 30개의 핵산 잔기를 포함하는 방법.
- [0220] 10. 구현예 5-9 중 어느 하나에 있어서, 핵산의 가닥은 "N"개의 구아닌을 포함하고, 여기서 N은 1-10인 방법.
- [0221] 11. 구현예 6에 있어서, 링커는 연속적인 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함하는 방법.
- [0222] 12. 구현예 11에 있어서, 링커는 "N"개의 연속적인 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함하고, 여기서 N은 20 내지 80인 방법.
- [0223] 13. 구현예 12에 있어서, 링커는 "N"개의 연속적인 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함하고, 여기서 N은 30 내지 70인 방법.
- [0224] 14. 구현예 13에 있어서, 링커는 "N"개의 연속적인 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함하고, 여기서 N은 40 내지 60인 방법.
- [0225] 15. 구현예 14에 있어서, 링커는 "N"개의 연속적인 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함하고, 여기서 N은 45 내지 55인 방법.
- [0226] 16. 구현예 15에 있어서, 링커는 48개의 연속적인 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함하는 방법.
- [0227] 17. 구현예 1 및 3-16 중 어느 하나에 있어서, 지질은 디아실 지질인 방법.
- [0228] 18. 구현예 17에 있어서, 디아실 지질은 하기 구조 또는 그의 염을 갖는 것인 방법:



- [0229] ,
- [0230] 여기서 X는 O 또는 S이다.
- [0231] 19. 구현예 1 및 3-18 중 어느 하나에 있어서, CpG 서열은 뉴클레오타이드 서열

5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3' (서열 번호 1) 을 포함하는 방법.

[0232] 20. 구현예 1 및 3-18 중 어느 하나에 있어서, CpG 서열은 5'-TCCATGACGTTCTGACGTT-3' (서열 번호 2) 의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 방법.

[0233] 21. 구현예 19 또는 구현예 20에 있어서, CpG 서열에서 뉴클레오사이드를 연결하는 모든 뉴클레오사이드내 기는 포스포로티오에이트인 방법.

[0234] 22. 구현예 1 및 3-21 중 어느 하나에 있어서, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드인 방법.

[0235] 23. 구현예 1 및 3-22 중 어느 하나에 있어서, 코로나바이러스 스파이크 단백질의 펩티드는 안지오텐신-전환 효소 2 (ACE2)에 특이적으로 결합하는 수용체 결합 도메인인 방법.

[0236] 24. 구현예 1 및 3-23 중 어느 하나에 있어서, 코로나바이러스 스파이크 단백질의 펩티드는 하기 서열에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함하는 방법:

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSP
TKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQAPGQTGKIADYNYKLPPDFTGCVIAWNSNNLDSKVG
GNYNLYRLFRKSNLKPFRDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVG
YQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFGLTGTGVLTESNKKFLPFQ
QFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITP

[0237] CS (서열 번호 3).

[0238] 25. 구현예 24에 있어서, 코로나바이러스 스파이크 단백질의 펩티드는 하기의 폴리펩티드 서열을 포함하는 방법:

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSP
TKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQAPGQTGKIADYNYKLPPDFTGCVIAWNSNNLDSKVG
GNYNLYRLFRKSNLKPFRDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVG
YQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFGLTGTGVLTESNKKFLPFQ
QFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITP

[0239] CS (서열 번호 3).

[0240] 26. 구현예 1 및 4-22 중 어느 하나에 있어서, 코로나바이러스 항원은 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드인 방법.

[0241] 27. 구현예 26에 있어서, 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 항원은 하기 서열에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함하는 방법:

MSDNGPQNQRNAPRITFGGPSDSTGSNQNGERSGARSKQRRPQGLPNNTASWFTALTQHGKEDL
KFPRGQGVPIINTSSPDDQIGYYRRATRRIRGGDGKMKDLSRWYFYLLGTGPEAGLPYGANKDGII
WVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAIVLQLPQGTTLPGFYAEGSRGGSQASSRSSRSRNS
SRNSTPGSSRGTSARMAGNGGDAALALLLDRLNQLESKMSGKGQQQGGQTVTKSAEASKKPRQKR
TATKAYNVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTQDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSG
TWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPPTPKKDKKKKADETQALPQRQKKQQT
VTLTPAADLDDFSKQLQQSMSSADSTQA (서열 번호 68).

[0242]

[0243] 28. 구현예 26에 있어서, 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 항원은 하기의 폴리펩티드 서열을 포함하는 방법:

MSDNGPQNQRNAPRITFGGSPDSTGSNQNGERSGARSQRRPQGLPNNTASWFTALTQHGKEDL
KFPRGQGVPIINTNSSPDDQIGYYRRATRIRGGDGKMKDLSRWYFYLLGTGPEAGLPYGANKDGII
WVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAIVLQLPQGTTLPGKFYAEGSRGGSQASSRSSRSRNSRNS
TPGSSRGTSARMAGNGGDAALALLLDRLNQLESKMSGKGQQQGGQTVTKKSAAEASKKPRQKR
TATKAYNVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSG
TWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPPTPKKDKKKKADETQALPQRQKKQQTVTLLP
AADLDDFSKQLQQSMSSADSTQAENLYFQGHHHHHH (서열 번호 63).

[0244]

[0245]

[0246]

[0247]

[0248]

[0249]

[0250]

[0251]

[0252]

29. 구현예 1 및 3-28 중 어느 하나에 있어서, 코로나바이러스 항원은 하나 이상의 태그를 포함하는 방법.

30. 구현예 29에 있어서, 태그는 Avi 태그인 방법.

31. 구현예 29에 있어서, 태그는 히스티딘 태그인 방법.

32. 구현예 29-31 중 어느 하나에 있어서, 코로나바이러스 항원은 Avi 태그 및 히스티딘 태그를 포함하는 방법.

33. 구현예 29-32 중 어느 하나에 있어서, 코로나바이러스 항원은 폴리펩티드 서열과 하나 이상의 태그 사이에 링커를 포함하는 방법.

34. 구현예 1, 3-25, 및 29-32 중 어느 하나에 있어서, 코로나바이러스 스파이크 단백질이 투여되는 방법.

35. 구현예 34에 있어서, 코로나바이러스 스파이크 단백질의 삼량체가 투여되는 방법.

36. 구현예 35에 있어서, 삼량체는 하기 서열을 포함하는 단백질 작제물의 삼량체인 방법:

VNLTTRTLPPAYTNSFTRGVVYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFAIHVSGTNGTKRFDNP
VLPFNDGVYFASTKSNIRGWIFGTTLDSTQSLIVNNATNVVIVKCEFCNDPFLGVVYHKNNKS
WMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPG
GFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTGPDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGITID
AVDCALDPLSETKCTLKSTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNR
KRISNCVADYSVLNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNY
KLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYF
PLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGLTESNK
KFLPFQGFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFSGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHA
DQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSECDIPGAGICASYQTQTNSPRAAASVASQSIIA
YTMSLGAENSVAYSNNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECNLLLQYGSFCTQLN
RALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLDAGFI
KQYGDCLGDIAARDLCAQKFNGLTVLPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMA
YRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFG
AISSVLNDILSRDLKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVD
FCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNTTAPAICHGDKAHFPREGVFSNGTHWFVTQR
NRYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGVNNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVV
NIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPGGGSGGGSHHHHHHHHHH (서열 번호 66).

[0253]

[0254]

37. 구현예 1 및 3-36 중 어느 하나에 있어서, 코로나바이러스 스파이크 단백질, 또는 그의 펩티드, 및 코로나 바이러스 뉴클레오펙시드 단백질, 또는 그의 펩티드가 투여되는 방법.

[0255] 38. 구현예 37에 있어서, 하기 서열:

VNLTTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNP
VLPFNDGVYFASTSKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLIVNATNVVIKVEFQFCNDPFLGVYYHKNNKS
WMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYKHTPINLVRDLPQ
GFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTGPDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITD
AVDCALDPLSETKCTLSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNR
KRISNCVADYSVLNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNY
KLPPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYF
PLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNGLTGTGVLTESNK
KFLPFQFQGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHA
DQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSECDIPGAGICASYQTQTNSPRAAASVASQSIIA
YTMSLGAENSVAYSNNIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECNLLLQYGSFCTQLN
RALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTADAGFI
KQYGDCLGDIAARDLICAKFNGLTVLPLLTDEMIQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMA
YRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNQSAIGKIQDLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFG
AISSVLNDILSRDLKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVD
FCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHGDKAHFPREGVFSNGTHWFTQR
NFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVV
NIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEYIKWPGGGSGGGSHHHHHHHHHH (서열 번호 66)

[0256]

[0257] 을 포함하는 코로나바이러스 스파이크 단백질 작제물의 삼량체; 및

MSDNGPQNQRNAPRITFGGSDSTGSNQNGERSGARSQRRPQGLPNNTASWFTALTQHGKEDL
KFPRGQGVPIINTSSPDDQIGYYRRATRRIRGGDGKMKDLSRWYFYLLGTGPEAGLPYGANKDGI
WVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAIVLQLPQGTTLPGKFYAEGSRGGSQASSRSSRSRNSRNS
TPGSSRGTSAPARMAGNGGDAALALLLDRLNQLESKMSGKQQQQGGQTVTKSAEASKKPRQKR
TATKAYNVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTQDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSG
TWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPTEPKKDKKKKADETQALPQRQKKQQTVLLP
AADLDDFSKQLQQSMSSADSTQAENLYFQGHHHHHH (서열 번호 63)

[0258]

[0259] 의 폴리펩티드 서열을 갖는 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 작제물이 투여되는 방법.

[0260] 39. 구현예 1, 3-26, 29-32, 및 37 중 어느 하나에 있어서, 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 mRNA가 투여되는 방법.

[0261] 40. 구현예 1 및 3-39 중 어느 하나에 있어서, CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열이 동시에 투여되는 방법.

[0262] 41. 구현예 1 및 3-39 중 어느 하나에 있어서, CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 이를 둘러싼 핵산 서열이 순차적으로 투여되는 방법.

[0263] 42. 구현예 41에 있어서, CpG-양친매성 물질이 첫 번째로 투여되고 이후 코로나바이러스 항원 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열의 투여가 후속되는 방법.

[0264] 43. 구현예 41에 있어서, 상기 코로나바이러스 항원 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열이 첫 번째로 투여되고, 이후 CpG-양친매성 물질의 투여가 후속되는 방법

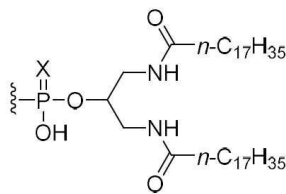
[0265] 44. 구현예 1 및 3-43 중 어느 하나에 있어서, 제2 아주반트를 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

[0266] 45. 구현예 1 및 3-44 중 어느 하나에 있어서, 코로나바이러스 백신을 대상체에 프라임 또는 부스트로서 투여하는 단계를 포함하는 방법.

[0267] 46. 구현예 1 및 3-45 중 어느 하나에 있어서, CpG-양친매성 물질은 피하, 비강내, 기관내로, 또는 기계 환기 동안 흡입에 의해 투여되는 방법.

- [0268] 47. 구현예 46에 있어서, CpG-양친매성 물질은 피하로 투여되는 방법.
- [0269] 48. 구현예 1 및 3-47 중 어느 하나에 있어서, 코로나바이러스 항원은 피하, 비강내, 기관내로, 또는 기계 환기 동안 흡입에 의해 투여되는 방법.
- [0270] 49. 구현예 1 및 3-48 중 어느 하나에 있어서, 대상체는 포유동물인 방법.
- [0271] 50. 구현예 49에 있어서, 대상체는 인간인 방법.
- [0272] 51. CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물.
- [0273] 52. 구현예 51에 있어서, 코로나바이러스 항원은 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드인 약학적 조성물.
- [0274] 53. 구현예 51에 있어서, 코로나바이러스 항원은 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드인 약학적 조성물.
- [0275] 54. 구현예 51에 있어서, 코로나바이러스 항원은 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드 및 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드를 포함하는 약학적 조성물.
- [0276] 55. CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 키트.
- [0277] 56. 구현예 55에 있어서, 코로나바이러스 항원은 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드인 키트.
- [0278] 57. 구현예 55에 있어서, 코로나바이러스 항원은 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드인 키트.
- [0279] 58. 구현예 55에 있어서, 코로나바이러스 항원은 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드 및 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드를 포함하는 키트.
- [0280] 59. 코로나바이러스 항원은 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드 또는 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 펩티드를 인코딩하는 핵산 서열인, 구현예 2에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.
- [0281] 60. CpG-양친매성 물질은 지질에 결합된 CpG 서열을 포함하는 구현예 2 또는 59에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.
- [0282] 61. CpG-양친매성 물질은 링커에 의해 지질에 연결된 CpG 서열을 포함하는 구현예 2 또는 59에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.
- [0283] 62. 링커는 중합체, 아미노산의 가닥, 핵산의 가닥, 다당류, 또는 이들의 조합을 포함하는 구현예 61에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.
- [0284] 63. 링커는 핵산의 가닥을 포함하는 구현예 62에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.
- [0285] 64. 핵산의 가닥은 1 내지 50개의 핵산 잔기를 포함하는 구현예 63에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.
- [0286] 65. 핵산의 가닥은 5 내지 30개의 핵산 잔기를 포함하는 구현예 64에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.
- [0287] 66. 핵산의 가닥은 "N"개의 구아닐을 포함하고, 여기서 N은 1-10인 구현예 61-65 중 어느 하나에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.
- [0288] 67. 링커는 연속적인 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함하는 구현예 63에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.
- [0289] 68. 링커는 "N"개의 연속적인 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함하고, 여기서 N은 20 내지 80인 구현예 67에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.

- [0290] 69. 링커는 "N"개의 연속적인 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함하고, 여기서 N은 30 내지 70인 구현예 68에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.
- [0291] 70. 링커는 "N"개의 연속적인 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함하고, 여기서 N은 40 내지 60인 구현예 69에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.
- [0292] 71. 링커는 "N"개의 연속적인 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함하고, 여기서 N은 45 내지 55인 구현예 70에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.
- [0293] 72. 링커는 48개의 연속적인 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함하는 구현예 71에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.
- [0294] 73. 지질은 디아실 지질인 구현예 2 또는 59-72 중 어느 하나에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.
- [0295] 74. 디아실 지질은 하기 구조 또는 그의 염을 갖는 구현예 73에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열:



[0296]

[0297] 여기서 X는 O 또는 S이다.

[0298] 75. CpG 서열은 뉴클레오타이드 서열 **5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3'** (서열 번호 1)을 포함하는 구현예 2 또는 59-74 중 어느 하나에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.

[0299] 76. CpG 서열은 **5'-TCCATGACGTTCCCTGACGTT-3'** (서열 번호 2)의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 구현예 2 또는 59-75 중 어느 하나에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.

[0300] 77. CpG 서열에서 뉴클레오사이드를 연결하는 모든 뉴클레오사이드내 기는 포스포로티오에이트인 구현예 75 또는 구현예 76에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.

[0301] 78. 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드인 구현예 2 또는 59-77 중 어느 하나에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.

[0302] 79. 코로나바이러스 스파이크 단백질의 펩티드는 안지오텐신-전환 효소 2 (ACE2)에 특이적으로 결합되는 수용체 결합 도메인인 구현예 2 또는 59-78 중 어느 하나에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.

[0303] 80. 코로나바이러스 스파이크 단백질의 펩티드는 하기 서열에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함하는 구현예 2 또는 59-79 중 어느 하나에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열:

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSP
LNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPPDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLY
RLFRKSNLKPFFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHA
PATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFGLTGTGVLTESNKKFLPFQGFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITP

[0304] CS (서열 번호 3).

[0305] 81. 코로나바이러스 스파이크 단백질의 펩티드는 하기의 폴리펩티드 서열을 포함하는 구현예 80에 따라 사용하

기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열:

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLVNSASFSTFKCYGVSP
TKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVG
GNYNLYRLFRKSNLKPFRDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRV
VLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDA
VRDPQTLEILDITP

CS (서열 번호 3).

[0306]

[0307]

82. 코로나바이러스 항원은 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질 또는 그의 펩티드인 구현예 2 또는 61-79 중 어느 하나에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.

[0308]

83. 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질 항원은 하기 서열에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함하는 구현예 82에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열:

MSDNGPQNQRNAPRITFGGPSDSTGSNQNGERSGARSKQRRPQGLPNNTASWFTALTQHGKEDL
KFPRGQGVPIINTSSPDDQIGYYRRATRRIRGGDGKMKDLSPRWYFYLLGTGPEAGLPYGANKDGII
WVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAIVLQLPQGTTLPKGFYAEGSRGGSQASSRSSSRNSSRNS
TPGSSRGTSARMAGNGGDAALALLLDRLNQLESKMSGKGQQQQGQTVTKKSAAEASKKPRQKR
TATKAYNVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSG
TWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPTEPKKDKKKKADETQALPQRQKKQQTVTLLP

[0309]

AADLDDFSKQLQQSMSSADSTQA (서열 번호 68).

[0310]

84. 코로나바이러스 뉴클레오펙시드 단백질 항원은 하기의 폴리펩티드 서열을 포함하는 구현예 82에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열:

MSDNGPQNQRNAPRITFGGPSDSTGSNQNGERSGARSKQRRPQGLPNNTASWFTALTQHGKEDL
KFPRGQGVPIINTSSPDDQIGYYRRATRRIRGGDGKMKDLSPRWYFYLLGTGPEAGLPYGANKDGII
WVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAIVLQLPQGTTLPKGFYAEGSRGGSQASSRSSSRNSSRNS
TPGSSRGTSARMAGNGGDAALALLLDRLNQLESKMSGKGQQQQGQTVTKKSAAEASKKPRQKR
TATKAYNVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSG
TWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPTEPKKDKKKKADETQALPQRQKKQQTVTLLP

[0311]

AADLDDFSKQLQQSMSSADSTQAENLYFQGHHHHHH (서열 번호 63).

[0312]

85. 코로나바이러스 항원은 하나 이상의 태그를 포함하는 구현예 2 또는 59-83 중 어느 하나에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.

[0313]

86. 태그는 Avi 태그인 구현예 85에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.

[0314]

87. 태그는 히스티딘 태그인 구현예 85에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.

[0315]

88. 코로나바이러스 항원은 Avi 태그 및 히스티딘 태그를 포함하는 구현예 85-86 중 어느 하나에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.

[0316]

89. 코로나바이러스 항원은 폴리펩티드 서열과 하나 이상의 태그 사이에 링커를 포함하는 구현예 85-88 중 어느 하나에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.

[0317]

90. 코로나바이러스 스파이크 단백질이 투여되는 구현예 2 및 59-89 중 어느 하나에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.

[0318]

91. 코로나바이러스 스파이크 단백질의 삼량체가 투여되는 구현예 90에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.

[0319]

92. 삼량체는 하기 서열을 포함하는 단백질 작제물의 삼량체인 구현에 91에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열:

VNLTTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNP
VLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSTQSLIVNNATNVVIVKCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKS
WMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQ
GFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTGDSSSSGWTAGAAAYVGYLQPRFTLLKYNENGTITD
AVDCALDPLSETKCTLSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNR
KRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPKLNLDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNY
KLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYF
PLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNK
KFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHA
DQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSEYCDIPGAGICASYQTQTNSPRAAASVASQSIIA
YTMSLGAENSVAYSNNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECNNLLQYGSFCTQLN
RALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTADAGFI
KQYGDCLGDIAARDLCAQKFNGLTVPPLLTDEMIAYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMA
YRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFG
AISSVLNDILSRDLKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVD
FCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNTTAPAICHGDKAHFPREGVFSNGTHWVFTQR
NFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGVNNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDIGINASVV
NIQKEIDRLNEVAKNLSLIDLQELGKYEQYIKWPGGGSGGGSHHHHHHHHHH (서열 번호 66).

[0320]

[0321]

93. 코로나바이러스 스파이크 단백질, 또는 그의 펩티드, 및 코로나바이러스 뉴클레오펜시드 단백질, 또는 그의 펩티드가 투여되는 구현에 2 및 59-92 중 어느 하나에 따라 사용되는 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.

[0322]

94. 하기 서열:

VNLTTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNP
VLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSTQSLIVNNATNVVIVKCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKS
WMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQ
GFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTGDSSSSGWTAGAAAYVGYLQPRFTLLKYNENGTITD
AVDCALDPLSETKCTLSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNR
KRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPKLNLDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNY
KLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYF
PLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNK
KFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHA
DQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSEYCDIPGAGICASYQTQTNSPRAAASVASQSIIA
YTMSLGAENSVAYSNNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECNNLLQYGSFCTQLN
RALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTADAGFI
KQYGDCLGDIAARDLCAQKFNGLTVPPLLTDEMIAYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMA
YRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFG
AISSVLNDILSRDLKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVD
FCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNTTAPAICHGDKAHFPREGVFSNGTHWVFTQR
NFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGVNNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDIGINASVV
NIQKEIDRLNEVAKNLSLIDLQELGKYEQYIKWPGGGSGGGSHHHHHHHHHH (서열 번호 66)

[0323]

[0324] 을 포함하는 코로나바이러스 스파이크 단백질 작제물의 삼량체; 및

MSDNGPQNQRNAPRITFGGSPDSTGSNQNGERSGARSQRRPQGLPNNTASWFTALTQHGKEDL
KFPRGQGVPIINTSSPDDQIGYYRRATRRIRGGDGKMKDLSRWYFYLLGTGPEAGLPYGANKDGI
WVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAIVLQLPQGTTLPGKFYAEGSRGGSQASSRSSRSRNSRNS
TPGSSRGTSAPARMAGNGGDAALALLLDRLNQLESKMSGKGQQQGGQTVTKSAEASKKPRQKR
TATKAYNVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTQDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSG
TWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFFPTEPKKDKKKKADETQALPQRQKKQQTVTLLP
AADLDDFSKQLQQSMSSADSTQAENLYFQGHHHHHH (서열 번호 63)

[0325]

[0326] 의 폴리펩티드 서열을 갖는 코로나바이러스 뉴클레오펜시드 단백질 작제물이 투여되는 구현예 93에 따라 사용하
기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.

[0327] 95. 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 mRNA가 투여되는 구현예 2 및 59-94 중 어느 하나에 따라 사용하기 위한
CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.

[0328] 96. CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열이 동시에 투여되는 구현예 2
및 59-95 중 어느 하나에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스
항원을 인코딩하는 핵산 서열.

[0329] 97. CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 이를 둘러싼 핵산 서열이 순차적으로 투여되는 구현예 2
및 59-96 중 어느 하나에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스
항원을 인코딩하는 핵산 서열.

[0330] 98. CpG-양친매성 물질이 첫 번째로 투여되고 이후 코로나바이러스 항원 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열의 투
여가 후속되는 구현예 97에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러
스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.

[0331] 98. 상기 코로나바이러스 항원 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열이 첫 번째로 투여되고, 이후 CpG-양친매성 물질
의 투여가 후속되는 구현예 97에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나
바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.

[0332] 99. 제2 아류반트가 대상체에 투여되는 구현예 2 및 59-99 중 어느 하나에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물
질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.

[0333] 100. 코로나바이러스 백신이 대상체에 프라임 또는 부스트로서 투여되는 구현예 2 및 59-99 중 어느 하나에 따
라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서
열.

[0334] 101. CpG-양친매성 물질이 피하, 비강내, 기관내로, 또는 기계 환기 동안 흡입에 의해 투여되는 구현예 2 및
59-100 중 어느 하나에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스
항원을 인코딩하는 핵산 서열.

[0335] 102. CpG-양친매성 물질이 피하로 투여되는 구현예 101에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이
러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.

[0336] 103. 코로나바이러스 항원이 피하, 비강내, 기관내로, 또는 기계 환기 동안 흡입에 의해 투여되는 구현예 2 및
59-102 중 어느 하나에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스
항원을 인코딩하는 핵산 서열.

[0337] 104. 대상체는 포유동물인 구현예 2 및 59-103 중 어느 하나에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로
나바이러스 항원, 또는 코로나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.

[0338] 105. 대상체는 인간인 구현예 104에 따라 사용하기 위한 CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원, 또는 코로
나바이러스 항원을 인코딩하는 핵산 서열.

[0339] 실시예

[0340] 개시내용을 제한하는 것이 아니라 설명하기 위한 것으로 의도된 하기 실시예는 본원에 기재된 조성물 및 방법의

사용되고, 제조되고 평가될 수 있는 방식의 설명을 당업자에게 제공하기 위해 제시된다. 실시예는 개시내용의 순전하게 예시하기 위한 것으로 의도되고 발명자가 이의 발명으로 간주하려는 것의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0341] 실시예 1: 마우스에서의 면역 반응의 유도

[0342] 유리 CpG (CpG 1826), CpG-양친매성 물질 (aCpG 1826)의 저장 용액을 리물루스 아메보사이트 용해물 (limulus amoebocyte lysate, LAL) H₂O에 CpG-양친매성 물질을 재현탁시킴으로써 제조하였다. CpG의 최종 농도가 1 nmol/100 μ L 주사액이 되도록 최종 주사액을 1x 인산염 완충 식염수 (PBS)로 희석시켰다. SARS-CoV2 스파이크 S1 RBD 단백질 (서열 번호 3) (표 1) 저장 용액을 1.2 mg/ml의 농도로 PBS에 용해시켰다. 최종 주사액을 10 μ g/100 μ L 주사액으로 1x PBS로 희석시켰다.

[0343] IFA (Incomplete Freund's Adjuvant) 용액을 PBS에 현탁된 50 μ L 항원 및 50 μ L IFA의 1:1 혼합물을 사용하고 30초 동안 상하로 강하게 피펫팅하여 제조하였다. 알하이드로겔 2% (10mg/ml) 용액을 PBS에 현탁된 10 μ g 항원 및 10 μ L에 해당하는 100 μ g 명반의 1:9 혼합물을 사용하여 제조하였다. 이 용액에 항원을 첨가하였고 PBS로 100 μ L로 만들었다. 용액을 5분 동안 강하게 피펫팅함으로써 혼합하였다.

[0344] 측면당 50 μ L로 양측으로 암컷 C57B16 마우스의 꼬리 기저에 피하로 (SC) 면역접종을 투여하였다. 부스터 용량은 대략 2-주 간격으로 주어졌다.

[0345] SC 주사는 백신이 자연 림프 배출을 통해 림프절로 백신이 최적화되어 전달되는 것을 보장하였다. 격주 주사는 종래 마우스 연구에서 면역 반응 생성에 최적인 것으로 결정되었다.

[표 1] 백신 성분

백신 성분	서열 또는 Cat#	공급처	로트 #
SARS-CoV2 RBD, His	40592-V08H	SinoBio	MA14MA1904
CpG 1826	5'-ggg cca tga cgt tcc tga cgt t-3' (서열 번호 2)	InvivoGen	4103-24T
aCpG 1826	5'-(C)아실 지질)ggg cca tga cgt tcc tga cgt t-3' (서열 번호 2)	Avecia	S17-048-S3-B1
알하이드로겔	vac-alu-250	InvivoGen	1614532
IFA	vac-ifa-10	InvivoGen	IFA-41-01

[0347] TNF α 및 IFN γ 에 대한 세포내 염색 (ICS) 검정은, 투여하고 7일 후에 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)에 대해 수행되었다. 세포는 CD4 및 CD8 및 몇몇 CD3에 대해 표면 염색되었다. 제1 투여 이후 ICS#1의 경우, 그리고 제2 투여 이후 ICS#2의 경우, PBMC는 1 μ g/웰의 펩티드로 5 시간 (브레펠딘 A(Brefeldin A)의 존재 하에 4시간) 동안 활성화시켰다 (표 2). C57B16 세포를 Db/Kb로 계산된 친화도를 갖는 펩티드로 재자극시켰다. Balb/c 세포를 Dd/Kd로 계산된 친화도를 갖는 펩티드로 재자극시켰다.

[표 2] 재자극 펩티드

재자극 펩티드	서열	공급처	로트 #
H-2-Db1	YSVLYNSASF (서열 번호 39)	GenScript	U956FFC260-1-PE8358
H-2-Db4/Dd4	YQPYRVVVL (서열 번호 40)	GenScript	U956FFC260-10-PE8364
H-2-Db5/Kb8/Dd5/Kd5	VRFPNITNL (서열 번호 41)	GenScript	U956FFC260-13-PE8366
H-2-Kb2	FNATRFASV (서열 번호 42)	GenScript	U956FFC260-19-PE8370
H-2-Kb3	KIADYNYKL (서열 번호 43)	GenScript	U956FFC260-22-PE8372
H-2-Kb7/Dd7	VSPTKLNDL (서열 번호 44)	GenScript	U956FFC260-34-PE8380
H-2-Dd1	VCGPKKSTNL (서열 번호 45)	GenScript	U956FFC260-37-PE8382
H-2-Kd2	SYGFQPTNGV (서열 번호 46)	GenScript	U956FFC260-49-PE8390
H-2-Kd3	VYAWNKRRI (서열 번호 47)	GenScript	U956FFC260-52-PE8392
H-2-Kd4	SFVIRGDEV (서열 번호 48)	GenScript	U956FFC260-55-PE8394

[0351] IL2, IL4, IL6, IL10, IL17, TNF α 및 IFN γ 에 대해 세포측정 비드 어레이 (Cytometric Bead Array, CBA) 분석을 수행하였고, 용량 투여하고 7일 후에 비장세포에 대해 수행하였다. CBA#1의 경우, 1차 투여 후, PBMC를 5 μ g/웰의 펩티드로 밤새 활성화시켰다 (표 2). CBA#2의 경우, 2회 투여 후, PBMC를 0.42 μ g/웰의 PepMixTM SARS-

CoV-2 스파이크 당단백질 (각각 0.42 μg /웰로 315 펩티드)을 사용하여 발새 활성화시켰다 (표 3). CBA#3의 경우, 3회 투여 후, PBMC를 1 μg /웰의 PepMix™ SARS-CoV-2 스파이크 당단백질 (각각 1 μg /웰로 315 펩티드)을 사용하여 발새 활성화시켰다 (표 3).

[표 3] 재자극 PepMix

재자극 펩티드	서열	공급처	로트 #
PepMix™ SARS-CoV-2 스파이크	315 15 랑체 스파닝 스파이크		42669FRa-1 (158 펩티드)
당단백질	단백질 서열, 11aa 중첩	JPT	42669FRa-2 (157 펩티드)

SARS-CoV2 특이적 혈청 항체 효소-결합 면역흡착 검정 (ELISA)을 각 투여 후 7일차에 마우스 혈청에 대해 수행하여 임의의 RBD-특이적 항체 반응을 검출하였다. Ser-gel 튜브 (NC9436363, Fisher Scientific)를 사용하여 전혈을 스핀 다운시켰다. 혈청을 신선하게 사용하거나 사용시까지 -80°C 에서 저장하였다. 96-웰 플레이트를 발새 4°C 에서 200 ng/100 μl (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 CoV2 RBD 단백질 (Z03483, GenScript)로 코팅하였다. 이후 플레이트를 실온에서 2시간 동안 PBS+ 2% BSA로 사전 차단하였다. 마우스 혈청을 1:10로 희석시켰고 이후 더미 플레이트에서 연속 희석시켰다 (1:4→8 농도). 샘플을 ELISA 플레이트로 이송하고 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 양성 대조군으로서, 하기 2개의 항체를 사용하였다: Creative Diagnostics (CABT-CS035; 클론 211184): 마우스 αRBD Mab 및 MyBioSource (MBS434247): 마우스 αRBD Mab. 플레이트를 세척 완충액 (BioLegend 421160 1)으로 4회 세척하였다. 2차 검출 Ab로서 PBS+에서 1:2000로 하기를 사용하여 실온 (RT)에서 1시간 동안 인큐베이션하였다: 초기 실험에서, AffiniPure Rabbit Anti-Mouse IgG + IgM (H+L) HRP (315-035-048, Jackson ImmunoResearch)를 사용하였고, 그러나 이후 실험에서, AffiniPure Rabbit Anti-Mouse IgM (μ 사슬) HRP (315-035-049, Jackson ImmunoResearch) 및 AffiniPure Rabbit Anti-Mouse IgG (Fc γ) HRP (315-035-046, Jackson ImmunoResearch)를 사용하였다. 플레이트를 세척 완충액으로 4회 세척하였다. 반응을 실온에서 10분 동안 기질 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (TMB)의 첨가에 의해 반응을 시각화하고 H_2SO_4 (1 N)로 중지시켰다. 450 nm에서의 흡광도를 ELISA 플레이트 리더(ELISA plate reader)로 측정하였다.

Anti-His 태그 ELISA 검정을 수행하여 RBD-His 단백질 작제물로의 백신접종시 발생하는 일부 면역 반응이 Spike RBD 자체보다 His-태그에 대해 유도되는지 여부를 결정하였다. 플레이트를 His-태그 (PDL1-His)를 가진 무관한 단백질로 코팅하였다. 혈청은 희석되지 않은 농도에서만 시험되었다. 2차 항체로서 Rabbit Anti-Mouse IgG (Fc γ) HRP (315-035-046)를 사용하였다. 양성 대조군으로서 His 태그 항체 [HRP] (A00612, GenScript)를 사용하였다. 그렇지 않으면 ELISA를 상기 기재된 바와 같이 수행하였다.

중화 항체 검정을 GenScript로부터의 SARS-CoV-2 대체 바이러스 중화 시험 키트(SARS-CoV-2 Surrogate Virus Neutralization Test Kit)(Cat# L00847)를 사용하여 수행하였다. 1 대 100으로 RBD에 HRP 희석 완충액을 접합하여 겨자무 과산화효소 (HRP)-RBD를 제조하였다. 전체 플레이트를 준비하기 위해 5994 μl 완충액 + 6 μl HRP-접합된 RBD를 사용하였다. 55 μl 의 희석된 HRP-RBD를 새로운 플레이트 ("혈청 인큐베이션 플레이트"로 지칭됨)로 이송시켰다. 연속 희석된 샘플 혈청을 별도의 V-바닥 플레이트 ("연속 희석 플레이트"로 지칭됨)에 배치하였다. 첫 번째 열에 20 μl 의 희석되지 않은 혈청을 첨가하였다. 8 μl 의 희석되지 않은 혈청을 이후 24 μl 의 PBS (1 대 4로 연속 희석)를 함유하는 후속 웰로 이송시켰다. 희석 샘플 혈청 (뿐만 아니라 양성 및 음성 대조군)을 샘플 희석 완충액을 사용하여 1 대 10으로 희석시켰다. 이를 새로운 플레이트 ("최종 혈청 희석 플레이트"로 지칭됨)에 54 μl 완충액을 첨가하고, 6 μl 의 연속 희석된 혈청을 이 플레이트로 이송시켜 실시하였다. 55 μl 의 최종 희석된 혈청 (및 대조군)을 이미 55 μl 의 HRP-접합된 RBD를 함유한 혈청 인큐베이션 플레이트로 이송하여 1 대 20의 최종 희석과 이후의 1:4 연속 희석을 위해 RBD와 혈청의 1:1 혼합물을 생성하였다.

혈청 인큐베이션 플레이트를 30분 동안 37°C 에서 인큐베이션하였다. 100 μL 의 인큐베이션된 혈청-RBD 혼합물을 ACE2-예비코팅된 검정 플레이트로 이송하였다. 상기 플레이트를 제공된 실리로 피복하였고 15분 동안 37°C 에서 인큐베이션하였다. 상기 플레이트를 이후 200 μl 의 1x 세척액으로 4회 세척하였고, 이는 탈이온수로 희석된 20x 세척 완충액으로 이루어졌다. 100 μl 의 TMB 용액을 각 웰에 첨가하였고 10분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 반응을 중지시키기 위해, 50 μl 의 정지 용액을 각 웰에 첨가하였다. 흡광도를 450 nm에서 즉시 판독하였다.

IFN γ 에 대한 ELI-spot 분석을 4차 투여 이후 9일차에 비장세포에 대해 수행하였다. 비장세포 (0.5×10^6

세포/웰)를 5 μ g/웰 펩티드 (표 2 또는 표 4) 또는 0.84 μ g/웰 PepMix (표 3)로 활성화시켰다. IFN γ 플레이트를 밤새 자극시켰다.

[표 4] 재자극 펩티드 (2차 배치)

재자극 펩티드	서열	공급처	로트 #
CoV2 #1	VNFNFNGL (서열 번호 49)	GenScript	U842NFE140-0/PE2815
CoV2 #2	KCYGVSP TKL (서열 번호 50)	GenScript	U842NFE140-4/PE2818
CoV2 #3	CYGVSP TKL (서열 번호 51)	GenScript	U842NFE140-7/PE2821
CoV2 #4	CYGV SATKL (서열 번호 52)	GenScript	U842NFE140-10/PE2824
CoV2 #5	YGVSP TKL (서열 번호 53)	GenScript	U842NFE140-13/PE2827
CoV-Db2	SKVGGNYNYL (서열 번호 54)	GenScript	U842NFE140-16/PE4296
CoV-Db3	VIAWNSNNL (서열 번호 55)	GenScript	U842NFE140-37/PE4338
CoV-Kb1	ESIVRF PNI (서열 번호 56)	GenScript	U842NFE140-22/PE4323
CoV-Kb4	VVLSFELL (서열 번호 57)	GenScript	U842NFE140-25/PE4326
CoV-Kb5	GNVNYLYRL (서열 번호 58)	GenScript	U842NFE140-28/PE4329
CoV-Kb6/CoV-Dd6	VGYPYRVV (서열 번호 59)	GenScript	U842NFE140-31/PE4332
CoV-Dd2	YNSASFSTF (서열 번호 60)	GenScript	U842NFE140-34/PE4335
CoV-Dd3	IAPGQTGKI (서열 번호 61)	GenScript	U842NFE140-19/PE4320

유사바이러스 중화 검정을 GenScript에 의해 그의 절차 및 프로토콜 (SC1993-8)에 따라 수행하였다. 4차 투여 후 혈청의 60마리 마우스 샘플 모두를 22개의 인간 샘플과 함께 드라이 아이스 상의 GenScript로 이송시켰다.

면역 반응을 유도하기 위해, C57B16 또는 Balb/C 마우스에 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 펩티드 (서열 번호 3) 및 8 μ g 당량의 가용성 CpG 또는 CpG-양친매성 물질을 포함하는 백신을 위해 제제화된 약학적 조성물을 투여하였다. 마우스에 0일차에 1차 용량을 그리고 14일차에 2차 용량을 투여하였다. 21일차에, 혈청 IgG/IgM 항체의 양을 혈청 ELISA 검정을 사용하여 측정하였다 (도 1a-도 1c 및 도 6a-도 6c). CpG-양친매성 물질 및 코로나바이러스 스파이크 단백질 펩티드의 다른 용량을 28일차에 투여하였다. 가용성 CpG 또는 CpG-양친매성 물질을 투여받은 마우스에 대한 IgG/IgM 항체의 양을 대조군과 비교하여 혈청 ELISA 검정을 사용하여 35일 후에 측정하였다 (도 2a-도 2c 및 도 7a-도 7c). 또한, 35일 및 3회 투여 후, 말초 혈액 단백질 세포 사이토카인 검정을 수행하여 COVID-19 감염을 가진 환자로부터의 인간 회복기 혈청에서 중화 항체의 농도에 대해 비교하여 C57B16 마우스 (도 3a 및 도 3b) 및 Balb/C 마우스 (도 8a 및 도 8b)에 대한 ACE2 수용체와 코로나바이러스 스파이크 단백질 사이의 상호작용을 차단하는 존재하는 중화 항체의 양을 확인하였다 (도 3c 및 도 3d 및 도 8c 및 도 8d). 추가적으로, 35일차에, 다작용성 사이토카인 분비 T-세포 반응을 C57B16 마우스 (도 4a-도 4c) 및 Balb/C 마우스 (도 9a-도 9c)의 IFN γ , TNF α , 및 IL6에 대해 측정하였다. 또한, 35일차에 C57B16 및 Balb/C 마우스를 코로나바이러스 스파이크 단백질 및 CpG의 3회 용량을 받은 후 존재하는 IFN γ 양에 대해 평가하였다 (도 5a 및 도 5b). 21일 후 그리고 2회 용량을 받은 후 존재하는 TNF α , IFN γ , IL-6, IL-2, 및 IL-4의 농도는 도 10에 요약되어 있다. 도 11에 나타난 바와 같이 CpG-양친매성 물질이 투여받은 것에서의 최고 양과 함께 비장세포 IFN γ 의 양을 평가하기 위해 ELISpot 검정을 4회 용량을 투여 받은 후 C57B16 및 Balb/C 마우스에 대해 수행하였다. 3개의 용량을 투여받은 C57B16 마우스에 대한 IgG1 (도 12a), IgG2bc (도 12b), IgG3 (도 12c)의 양 및 IgG2bc:IgG1 비 (도 12d)를 Th1 및 Th2 반응의 양을 이해하기 위해 분석하였다. 도 12d에서의 IgG2bc:IgG1의 비는 CpG-양친매성 물질을 투여받은 마우스의 경우 면역 반응이 Th2가 아닌 Th1로 강하게 편향되는 것을 나타낸다. 이는 Th2 반응이 SARS-CoV-2에 대해 유해할 수 있기 때문에 유리하다.

CpG-양친매성 물질을 다른 아류반트와 비교하는 방식을 비교하기 위해, 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 및 8 μ g의 CpG-양친매성 물질, 가용성 CpG, 알하이드로겔, IFA, 또는 Mock Tx의 2회 용량 (도 13a-도 13d) 또는 3회 용량 (도 14a-도 14d)을 투여받은 마우스에 의해 생성된 IFN γ , TNF α , IL-2, 및 IL-6의 양을 양성 또는 음성 대조군에 대해 비교하였다. 결과는 CpG-양친매성 물질이 다른 시험된 아류반트에 비해 우수한 면역 반응을 일으키는 것을 나타내었다 (도 15).

추가로, Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME)로부터 구입한 암컷의 6 내지 8주령 C57BL/6J 및 BALB/c 마우스에 1 nmol CpG (가용성 CpG), 1 nmol 지질-접합된 CpG (AMP-CpG), 또는 100 μ g 명반 (인산염 완충 식염수 (PBS) 단독 (아류반트 대조군)과 혼합됨), 또는 1-10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3)

(Sino Biological, Cat: 40592-V08H 또는 GenScript, Cat: Z03483)을 주사하였다. "Mock" 그룹은 PBS만을 받았다. 주사 (100 μ L)를 실험의 0, 14 및 28일차에 꼬리 기저 (양측 50 μ L)에 피하로 투여하였다. 혈액 샘플을 7, 21, 및 35일차에 수집하였다. 폐 수확 및 기관지폐포 세척액 (BAL) 유체의 수집을 위해 마우스를 35일차에 희생시켰다. 유일하게 마우스 세트 (도 16a-도 16d)만이 42일차에 4차 용량을 받았고, 샘플을 49일차에 수집하였다.

[0365] 유사바이러스 중화 검정을 ACE2-HEK293 재조합 세포주 (BPS Bioscience, Cat: 79951) 또는 대조군 HEK293 세포주 (ATCC) 및 루시페라아제 리포터 유전자 및 SARS-CoV2 스파이크 엔벨로프 당단백질을 함유하는 SARS-CoV2 스파이크 유사형 렌티바이러스 (BPS Bioscience, Cat: 79942)를 사용하여 수행하였고, 이에 따라 ACE2-발현 세포를 특이적으로 형질도입하였다. 마우스 또는 인간 혈청 희석을 96-웰 백색 투명-바닥 발광 플레이트 (Corning, Cat: 3610)에서의 해동 배지 1 (BPS Bioscience, Cat: 60187)에서 수행하였고, 이후 실온에서 30분 동안 10 μ L의 바이러스와 함께 예비-인큐베이션하였다. ACE2-HEK293 또는 대조군 HEK293 세포 (40 μ L) (10,000개의 세포 함유)를 이후 웰에 첨가하였고 48시간 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 대조군 웰은 ACE2-HEK293 세포 또는 대조군 HEK293 세포를 바이러스와 함께 포함하였고, 그러나 혈청은 포함하지 않았고, 각각 최대 형질도입 수준 및 백그라운드를 제공하였다. 실온에서 15분 동안 70 μ L의 새롭게 제조된 ONE-Step 루시페라아제 시약 (BPS Bioscience, Cat: 60690)을 첨가하여 루시페라아제 활성을 검출하였고, 발광을 Synergy H1 Hybrid 리더 (BioTek)로 측정하였다. 실험에 대한 유사바이러스 중화 데이터는 동일한 프로토콜에 따라 그러나 사내 ACE2-HEK293 세포 및 Spike RBD-HRP 재조합 단백질을 사용하여 GenScript (중국 난징 소재)에 의해 수행되었다. 반수-최대 억제 희석 ($pVNT_{50}$)에서의 유사바이러스 중화 역가는 회복기 혈청과 비교되는 1 nmol 가용성 CpG 또는 AMP-CpG와 조합하여 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3)의 4회 용량을 투여받은 C57BL/6J 마우스 (도 16a) 및 BALB/c 마우스 (도 16c)에 대한 바이러스 대조군 웰에서의 RLU와 비교하여 RLU이 50%까지 감소된 혈청 희석으로서 계산되었다. 회복기 혈청 샘플 (n=7) 및 혈장 샘플 (n=15)은 SARS-CoV-2 감염 (COVID-19)으로부터 회복된 환자로부터 얻었고, 각각 US Biolab (메릴랜드주 록빌 소재) 및 ALLCELLS (캘리포니아주 아라메다 소재)로부터 얻었다.

[0366] 추가적으로, C57BL/6J 마우스 (도 16c) 또는 BALB/c 마우스 (도 16d)에 의해 생성된 IFN γ 의 양은 10% FBS 및 페니실린, 스트렙토마이신, 비필수 아미노산, 피루브산나트륨 및 베타-메르캅토에탄올 (완전 배지)이 보충된 RPMI 1640 배지에서 마우스 비장을 개별적으로 수집하고 이후 단일 세포 현탁액에서 처리하고 70 μ m 나일론 필터에 통과시켜 분석되었다. 세포 펠릿을 얼음 위에서 5분 동안 3 mL의 ACK 용해 완충액 (Quality Biological, Inc., Cat: 118156101)에 재현탁시켰고; 이후 PBS를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 샘플을 4°C에서 5분 동안 400 $\times$ g으로 원심분리하였고, 세포 펠릿을 완전 배지에 재현탁시켰다. ELISpot 검정을 Mouse IFN- γ ELISpot Set (BD, Cat: BD551083)를 사용하여 수행하였다. 4°C에서 밤새 포집 항체로 예비코팅된 96-웰 ELISpot 플레이트를 실온에서 2시간 동안 완전 배지로 차단하였다. 500,000개의 마우스 비장세포를 각 웰에 플레이팅하였고, 스파이크 유래 중첩 펩티드의 웰당 1 μ g/펩티드로 밤새 자극하였다. 제조사의 지침에 기초하여 스팟을 발달시켰다. PMA (50 ng/mL) 및 이오노마이신 (1 μ M)을 양성 대조군으로서 사용하였고 완전 배지 단독을 음성 대조군으로서 사용하였다. 스팟을 스캐닝하여 ImmunoSpot CTL 리더로 정량화하였다. AMP-CpG를 함유하는 면역화를 받은 C57BL/6J 및 BALB/C 마우스에서의 초기 평가는 인간 회복기 혈청 (회복된 COVID-19 환자로부터 얻음; 도 16a 및 도 16c)에서 존재하는 천연 항체 반응보다 10 내지 30배 더 높은 유사바이러스 중화 역가를 생성하였고, 이는 자연 면역보다 더 강력한 중화 항체 반응을 생성하는 AMP-CpG의 가능성을 나타낸다. 비교에 의해, 변형되지 않은 (가용성) CpG를 함유하는 용량-일치된 요법으로 면역화된 동물은 인간 회복기 환자에서 관찰된 것과 비슷한 중화 역가를 생성하였다. 비장세포 ELISpot 검정의 결과는 가용성 CpG와 비교하여 AMP-CpG와 혼합하여 코로나바이러스 스파이크 단백질로 면역화된 마우스가 대략 4배 더 많은 항원-특이적 기능성 T 세포의 수를 유도하였고, 이는 코로나바이러스 스파이크 단백질 유래 중첩 펩티드로 재자극시 IFN γ 를 생성하였음을 나타낸다 (도 16b 및 도 16d).

[0367] 동일 방식으로, C57BL/6J 마우스로부터의 말초 혈액 및 비장 세포에서의 사이토카인-생성 세포를 결정하였다. 중첩하는 코로나바이러스 스파이크 펩티드로 재자극된 1×10^6 개의 비장세포당 IFN γ 스팟 형성 세포의 수를 100 μ g 명반, 1 nmol 가용성 CpG, 또는 1 nmol AMP-CpG와 조합하여 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3)의 3회 용량을 받은 C57BL/6J 마우스 (그룹당 n=10)로부터 분석하였다 (도 17a). AMP-CpG와 조합하여 코로나바이러스 스파이크 단백질로 면역화된 마우스는 가용성 CpG, 명반, 또는 mock (PBS)와 조합하여 코로나바이러스 스파이크 단백질을 투여받은 마우스보다 상당히 더 많은 IFN γ 스팟 형성 세포를 가졌다.

[0368] 실시예 2: 마우스에서의 체액성 면역 반응의 유도

[0369] 마우스에서 유도된 체액성 면역 반응을 100 µg 명반, 1 nmol 가용성 CpG, 또는 1 nmol AMP-CpG와 조합하여 10 µg의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3)의 3회 용량을 투여받은 C57B1/6J 마우스에 대해 결정하였다. 유사바이러스 중화 검정 또는 ELISA 검정을 사용하여 회복기 혈청 (도 20a), IgM (도 20b), IgG (도 20c), IgG1 (도 20d), IgG2bc (도 20e), IgG19에 대한 IgG2bc의 비 (도 20f), 및 IgG3 (도 20g)과 비교하여 중화 역가의 관점에서 체액성 반응을 평가하였다.

[0370] 코로나바이러스 스파이크 단백질에 대한 중화 항체 반응을 ELISA-기반 대체 검정에서 코로나바이러스 스파이크 단백질-ACE2 상호작용의 억제를 통해 측정하였다. 면역화된 C57BL/6J 마우스의 코호트에 대해 35일차에 수집된 혈청에 대한 결과는 도 20a에 나타나 있다. 비슷한 수준의 중화 활성은 AMP-CpG, 가용성 CpG, 및 명반으로 면역화된 동물에서 유도되었다. 회복기 인간의 코호트로부터 얻은 샘플과의 비교는 백신-유도된 반응이 자연 감염에 대한 반응을 통해 발생된 것보다 상당히 더 높은 것을 나타내었다.

[0371] 초기 면역화 후 7일차에, mock 면역화를 받은 대조군을 제외하고 모든 코호트가 강력한 코로나바이러스 스파이크 단백질 특이적 IgM 반응 (도 20b)을 나타내었고; 이는 아이소타입 전환이 진행되어 후속 증강 면역화 이후 유사한 역가를 갖는 IgG 반응들이 발생시켰다 (도 20c).

[0372] 면역화를 통해 유도되는 코로나바이러스 스파이크 단백질 특이적 IgG 반응에서의 Th1/Th2-편향을 평가하기 위해, 존재하는 IgG 서브클래스를 평가하였고, AMP-CpG 또는 가용성 CpG로 면역화된 마우스가 명반으로 면역화된 마우스보다 상당히 더 낮은 Th2 관련 IgG1 역가 (대략 10배)를 가지는 것을 나타내었다 (도 20d). 그 반대가 Th1 관련 IgG2bc에 대해 적용되었고: 역가는 AMP-CpG 또는 가용성 CpG로 면역화된 마우스에 대해 상당히 더 높았다 (대략 50배) (도 20e). IgG2bc:IgG1 역가의 비는 AMP-CpG로 면역화된 동물에 대한 Th1을 향한 강한 편향을 나타내었고, 한편 가용성 CpG 및 명반은 각각 균형화된 Th1/Th2 프로파일 또는 Th2-우세 반응을 생성하였다 (도 20f). 추가 분석은 AMP-CpG로 면역화된 동물이 가용성 CpG (대략 3배) 또는 명반 (>800배) 처리 그룹보다 상당히 더 높은 IgG3 역가를 생성하였고, 이는 AMP-CpG 면역화로부터 생성된 관찰된 Th1-편향과 일치하였다 (도 20g).

[0373] 추가적으로, 체액성 반응은 100 µg 명반 단독, 1 nmol 가용성 CpG 단독, 1 nmol AMP-CpG 단독, 100 µg 명반과 10 µg의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol 가용성 CpG와 10 µg의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol AMP-CpG와 10 µg의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol AMP-CpG와 5 µg의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 및 1 nmol AMP-CpG와 1 µg의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3)과 조합되는 10 µg의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3) 단독의 3회 용량을 투여받은 C57B1/6J 마우스에 대해 유사바이러스 중화 검정 또는 ELISA 검정을 사용하여 회복기 혈청 (도 22a), IgM (도 22b), IgG (도 22c), IgG1 (도 22d), IgG2bc (도 22e), IgG19에 대한 IgG2bc의 비 (도 22f), 및 IgG3 (도 22g)와 비교하여 중화 역가에 대해 혈청에서 평가되었다. 반복 용량 면역화 후 35일차에, 각각의 특이적 코로나바이러스 스파이크 단백질 용량 수준에서 AMP-CpG로 면역화된 동물 중의 코로나바이러스-특이적 항체 반응의 유도를 평가하였고 10 µg 용량으로 가용성 CpG 또는 명반으로의 면역화에 의해 발생된 반응과 비교하였다. 중화 활성은 실시예 1에 기재된 바와 같은 반수-최대 억제 회석 (pVNT₅₀)에서 유사바이러스 중화 역가의 측정을 통해 평가되었다. 유사바이러스 중화 역가의 유사한 수준은 각각 AMP-CpG, 가용성 CpG, 및 명반으로 면역화된 마우스에 대해 회복기 인간 샘플에서 관찰된 것보다 265, 230, 또는 94배 더 큰 수준에서 모든 처리 그룹에 대해 관찰되었다 (도 22a). 이 수준은 회복되는 COVID-19 환자에서 측정된 것보다 적어도 115배 더 큰 평균 pVNT₅₀으로 더 낮은 코로나바이러스 스파이크 단백질 용량 수준에서 AMP-CpG로 면역화된 동물에서 유지되었다 (도 22b).

[0374] 총 IgG 역가는 AMP-CpG가 투여된 그룹 사이에서 유사하였고, 이는 가용성 CpG 또는 명반 아췌반트를 가진 백신을 투여받은 그룹들 사이에서 측정된 역가와 비교하여 대략 2배 감소하였다 (도 22c). 아이소타입 분석은 10 µg 용량 수준에서 비교하여 초기에 관찰된 것과 유사한 경향을 입증하였다 (도 22c). 명반 및 가용성 CpG 면역화는 AMP-CpG와 혼합된 모든 코로나바이러스 스파이크 단백질 용량 수준과 비교하여 상당히 더 높은 Th2-관련 IgG1 역가 (대략 100배)를 생성하였다 (도 22d). Th1-관련 IgG2bc 수준은 가용성 CpG 및 명반으로 면역화된 그룹과 비교하여 모든 AMP-CpG로 면역화된 동물에서 대략 20배 상승되었고, 감소된 코로나바이러스 스파이크 단백질 용량 수준과 상당한 차이가 관측되지 않았다. 이러한 경향은 IgG2bc:IgG1 역가비와 비교하여 더 명백하였고 (도 22f), 여기서 AMP-CpG 함유 요법은 각각 가용성 CpG (IgG2bc:IgG1 대략 2) 및 명반 (IgG2bc:IgG1 <1)으로 백신접종된 동물에서의 보다 균형화된 Th2-편향 반응과 비교하여 더 높은 Th1-우세 아이소타입 프로파일

(IgG2b:IgG1 >10)을 유도하였다. 최종적으로, 유일하게 AMP-CpG로 면역화된 동물은 코로나바이러스 스파이크 단백질 특이적 IgG3 역가의 증거를 나타내었고, 모든 코로나바이러스 스파이크 단백질 용량 수준 (백그라운드에 대해 대략 500배) 중에 비슷한 수준이 검출되었다. 추가 분석은 AMP-CpG로 면역화된 동물이 AMP-CpG 면역화로부터 생성된 관찰된 Th1-편향과 일치되는 가용성 CpG (대략 40배) 또는 명반 (>20배) 처리 그룹보다 상당히 더 높은 IgG3 역가를 생성하였음을 나타내었다 (도 22g). 이러한 데이터와 함께 AMP-CpG가 - 중화 유도, 높은 역가, 및 코로나바이러스 스파이크 단백질에 대한 최적의 Th1 프로파일 항체 반응을 위해 코로나바이러스 스파이크 단백질 항원의 적어도 10배 용량 절약을 가능하게 한다는 것을 지지한다. 가용성 CpG 및 명반이 약간 더 높은 총 IgG 반응을 유도하는 한편, 이는 AMP-CpG 면역화와 비교하여 중화 활성에서 상당한 차이를 일으키지 않았다. 명반 및 더 적은 정도로 가용성 CpG 반응은 SARS 및 MERS 백신 개발의 이전 결과에 기초하여 인간 번역에서 독성 위험의 가능성을 높이는 Th2-관련 IgG1 아이소타입에 의해 우세하였다.

[0375] **실시예 3: 마우스에서의 세포 면역 반응의 유도**

[0376] 세포내 사이토카인 염색 실험을 수행하여 명반, 가용성 CpG, 및 AMP-CpG를 포함하는 아쥘반트와 조합하여 코로나바이러스 스파이크 단백질을 투여받은 마우스에서 세포 면역 반응을 평가하였다. 각각의 부스터 투여 후 7일 차에 수집된 말초 혈액 세포 및 최종 부스터 투여 후 수집된 폐-상주 백혈구를 실시예 1에 기재된 바와 같이 브레펠딘 A (Invitrogen, Cat: 00-4506-15) 및 모네신 (BioLegend, Cat: 420701)의 존재하에 37°C, 5% CO₂에서 웰당 1 µg의 중첩하는 코로나바이러스 스파이크 펩티드로 자극시켰다. 하기 항체로 세포를 염색하였다: PE anti-mouse IFN γ (BD, Cat: 554412), FITC anti-mouse TNF α (BD, Cat: 554418), APC-Cy7TM anti-mouse CD3 (BD, Cat: 560590), PE-Cy7 anti-mouse CD4⁺ (Invitrogen, Cat: 25-0041-82), 및 APC anti-mouse CD8a (eBioscience, Cat: 17-0081-83). PMA (50 ng/mL) 및 이오노마이신 (1 µM)을 양성 대조군으로서 사용하였고, 완전 배지 단독을 음성 대조군으로 사용하였다. 세포를 투과시키고 고정시켰다 (Invitrogen, Cat: 00-5523-00). LIVE/DEAD 고정가능한 (수성) 사멸 세포 염색 키트 (Invitrogen, Cat: L34966)를 사용하여 유세포 분석 동안 세포의 생존력을 평가하였다. 샘플 수집을 FACSCanto II (BD) 상에서 수행하였고 데이터를 FlowJo V10 소프트웨어 (TreeStar)로 분석하였다.

[0377] 100 µg 명반, 1 nmol 가용성 CpG, 또는 1 nmol AMP-CpG와 조합하여 10 µg의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3)의 3회 용량을 투여받은 C57BL/6J 마우스로부터의 말초 혈액 세포에서 CD8⁺ T 세포 (도 17b) 또는 CD4⁺ T 세포 (도 17c)에서의 IFN γ 및 TNF α 둘 모두 (이중-양성 T-세포), TNF α 단독 및 IFN γ 단독의 수를 분석하였다. AMP-CpG로 면역화된 마우스에서의 말초 혈액으로부터 유래된 CD8⁺ T 세포의 대략 43%는 사이토카인을 생성하였고 (IFN γ , TNF α , 또는 이중-양성 T 세포); 비교하면, CD8⁺ T 세포의 대략 13% 및 <2%는 각각 가용성 CpG-면역화된 마우스 및 명반-면역화된 마우스에 대해 사이토카인을 생성하였다 (도 17b). 유사한 경향이 CD4⁺ T 세포에 대해 관찰되었고, 한편 백분율은 상대적으로 더 적었다: CpG-면역화된 마우스에서의 <1% 및 명반-면역화된 마우스 및 mock-면역화된 마우스에 대해 <0.5%와 비교하여 AMP-CpG로 면역화된 마우스로부터의 말초 혈액에서의 T 세포의 대략 1.5%가 사이토카인을 생성하였다 (도 17c).

[0378] 유사하게는, 면역화가 SARS-CoV-2 노출이 가능한 부위에서 조직 상주 T 세포 반응을 유도할 수 있는지 여부를 결정하기 위해, 100 µg 명반, 1 nmol 가용성 CpG, 또는 1 nmol AMP-CpG와 조합하여 10 µg의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3)의 3회 용량을 투여받은 C57BL/6J 마우스에서의 중첩하는 코로나바이러스 스파이크 펩티드로 재자극된 CD8⁺ T 세포 (도 18a) 또는 CD4⁺ T 세포 (도 18b) 폐관류 조직에서 발견되는 IFN γ 및 TNF α , TNF α 단독 및 IFN γ 단독의 수를 분석하였다. 폐 조직에서의 T 세포는 말초 혈액에서 관찰된 것보다 더 높은 비율의 사이토카인-생성 세포를 가졌다. AMP-CpG로 면역화된 마우스에서의 관찰은 관류된 폐 조직으로부터의 CD8⁺ T 세포의 대략 73%가 사이토카인을 생성하였고, 대략 40%가 Th1 사이토카인 IFN γ 및 TNF α 둘 모두의 다작용성 분비를 나타내었다. 이에 비해, 가용성 CpG 또는 명반으로의 면역화는 각각 >5배 및 >25배 더 낮은 반응을 유도하였다. CD4⁺ T 세포의 유사한 평가는 AMP-CpG만으로 면역화된 동물은 백그라운드 초과 반응을 발생시켰고, IFN γ 및/또는 TNF α 를 생성하는 CD4⁺ T 세포의 대략 6%가 다시 강한 다작용성 효과기 기능성을 나타내었고, 이러한 세포의 대부분은 항원 재자극시 IFN γ 및 TNF α 둘 모두를 생성할 수 있음을 나타내었다. 이러한 결과는 AMP-CpG의 더 강한 림프절 작용이 잠재적으로 유리한 조직 회귀 특성을 갖는 항원-특이적 T 세포의 향상된 확장을 유도하여 초기 바이러스 노출의 주요 부위에 보호 조직 상주 세포를 확립한다는 것을 지지한다.

[0379] 유도된 T 세포 반응의 Th1/Th2/Th17 프로파일을 보다 완전하게 이해하기 위해, 다중 사이토카인 분석을 사용하여 코로나바이러스 스파이크 중첩 펩티드로 재자극한 후 관류된 폐에서 수집한 세포의 상층액으로부터 다양한 사이토카인 농도를 평가하였다. 구체적으로, 세포측정 비드 어레이 유세포 분석법을 수행하여 100 μ g 명반, 1 nmol 가용성 CpG, 또는 1 nmol AMP-CpG와 조합하여 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3)의 3회 용량을 투여받은 C57BL/6J 마우스에 대해 IFN γ (도 18c), TNF α , IL-6, IL-4, IL-10, 및 IL-17 (도 18d)을 포함하는 사이토카인 생성을 결정하였다. 폐-상주 백혈구 (최종 부스터 투여 후 수집됨)를 웰당 1 μ g/펩티드 (315 펩티드로 이루어짐, 11 아미노산 중첩을 갖는 15량체를 생성하는 펩티드 스캔으로부터 유래됨) (JPT, Cat: PM-WCPV-5 또는 GenScript, Cat: RP30020)로 중첩하는 코로나바이러스 스파이크 펩티드를 사용하여 발새 활성화시켰다. 포르볼 미리스테이트 아세테이트 (PMA, 50 ng/mL) 및 이오노마이신 (1 μ M)을 양성 대조군으로서 사용하였고, 완전 배지 단독을 음성 대조군으로서 사용하였다. 배양 상층액을 수확하고 Th1/Th2 사이토카인 생성을 측정하였다 (CBA Mouse Th1/Th2/Th17 사이토카인 키트: BD, Cat: BDB560485). 간략하게는, IFN γ , TNF α , IL-4, IL-6, IL-10, 및 IL-17을 포함하는 다양한 사이토카인에 대해 특이적인 포집 항체로 코팅된 뚜렷한 형광 강도를 갖는 비드 집단을 배양 상층액과 함께 인큐베이션하였다. 샘플에서의 상이한 사이토카인을 그의 상응하는 비드로 포집하였다. 사이토카인-포집 비드를 이후 피코에리트린 (PE)-접합된 검출 항체와 혼합하였다. 인큐베이션 후, 샘플을 세척하였고, 비드 상의 PE의 형광 강도를 측정하고 유세포 분석 (BD FACSCanto II)에 의해 분석하였다. 평균 형광 강도 (MFI)를 FACSDiva 소프트웨어 (BD)를 사용하여 계산하였고, 단백질 농도를 Microsoft Excel을 사용하여 추정하였다. AMP-CpG로 면역화된 마우스는 다른 아류반트 예컨대 가용성 CpG 및 명반 또는 mock로 면역화된 코호트보다 상당히 더 높은 IFN γ 및 TNF α 농도를 가지는 유세포 분석법에 의한 선행 평가와 일치되는 Th1 효과기 프로파일을 나타내었다. IFN γ 농도는 다른 아류반트 또는 mock로 관찰된 것보다 적어도 200배 더 높았고, TNF α 농도는 다른 아류반트 또는 mock보다 적어도 7배 더 높았다 (도 18c). 일반적인 Th2 또는 Th17 관련 사이토카인 IL-4, IL-6, IL-10, 및 IL-17의 농도는 모든 코호트에 대해 검출가능하지 않았다 (도 18d). 이러한 결과는 가용성 CpG 또는 명반과 비교되는 AMP-CpG 면역화를 사용한 면역화를 통해 유도된 T 세포에서의 크게 향상된 효능 및 Th1-편향을 추가로 입증한다.

[0380] 면역화에 의해 유도된 폐-상주 T 세포 반응이 폐 분비물에 국소화될 수 있는지 여부를 추가로 평가하기 위해, 100 μ g 명반, 1 nmol 가용성 CpG, 또는 1 nmol AMP-CpG와 조합되는 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3)의 3회 용량을 투여받은 C57BL/6J 마우스로부터 기관지폐포 세척액 (BAL) 유체를 수집하였다. 나이브 CD8⁺ (도 19b) 및 나이브 CD4⁺ (도 19e) T-세포의 백분율, 및 효과기 기억 CD8⁺ (도 19c) 및 CD4⁺ (도 19f) T-세포의 백분율과 함께 CD8⁺ (도 19a) 및 CD4⁺ (도 19d) T 세포 계수를 결정하였다. 상당히 더 많은 CD8⁺ T 세포는 다른 처리 그룹보다 AMP-CpG로 면역화된 마우스의 BAL 유체에서 발견되었다 (도 19a). 또한, AMP-CpG로 면역화된 동물로부터 수집된 BAL에서 검출된 세포의 상당히 더 낮은 비율이 효과기 기억 표현형 (T_{EM}; CD44⁺, CD62L⁻; 도 19c)의 수에 있어서의 상응하는 증가를 가진 나이브 표현형 (CD44⁻, CD62L⁺; 도 19b)을 나타내었다. CD4⁺ T 세포 계수는 mock 처리에 비해 향상되었고 모든 처리 그룹 (도 19d)에 걸쳐 일반적으로 유사하였고, 그러나 AMP-CpG 코호트는 BAL-상주 CD4⁺ T 세포의 상당히 더 큰 비율이 다른 처리 그룹 (도 19f)보다 더 나이브로부터 T_{EM} 표현형으로 분화되었다는 증거를 나타내었다. AMP-CpG로 면역화된 동물에 존재하는 BAL-상주 T 세포의 개선된 수 및 표현형은 바이러스 노출 시점에 조기 면역학적 검출 및 제어에 대한 더 큰 잠재력을 입증한다.

[0381] 비장, 말초 혈액, 및 폐 조직에서 35일차에서의 T 세포 반응을 평가하였다. 결과는 AMP-CpG로 면역화된 C57BL/6J 마우스로부터 수집된 비장세포에서의 IFN γ -생성 세포의 수는 항원 농도와 함께 증가하는 경향이 있고, 그러나, AMP-CpG와 혼합된 심지어 가장 낮은 항원 용량에서, IFN γ -생성 세포의 수는 가용성 CpG (대략 4배) 또는 명반 (>30배)과 함께 가장 높은 항원 용량 (10 μ g)을 받는 코호트에서 관찰되는 것보다 상당히 더 높았다는 것을 나타내었다 (도 21a). 추가적으로, (좌측으로부터 우측까지의) 100 μ g 명반 단독, 1 nmol 가용성 CpG 단독, 1 nmol AMP-CpG 단독, 100 μ g 명반과 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol 가용성 CpG와 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol AMP-CpG와 10 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol AMP-CpG와 5 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 및 1 nmol AMP-CpG와 1 μ g의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3)의 3회 용량을 투여받은 C57BL/6J 마우스로부터 수집된 말초 혈액 세포에서 발견된 CD8⁺ T-세포 (도 21b) 및 CD4⁺ T-세포 (도 21c)로부터 IFN γ 및 TNF α , TNF α 단독, 및 IFN γ 단독을 포함하는 사이토카인의 수를 결정하였다. 유사하게는, (좌측으로부터 우측까지의) 100 μ g 명반 단독, 1 nmol 가용성 CpG 단독, 1 nmol AMP-CpG 단독, 100 μ g 명반

과 10 μg 의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol 가용성 CpG와 10 μg 의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol AMP-CpG와 10 μg 의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol AMP-CpG와 5 μg 의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 및 1 nmol AMP-CpG와 1 μg 의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3)의 3회 용량을 투여받은 C57BL/6J 마우스로부터 수집된 증첩하는 코로나바이러스 스파이크 펩티드로 재자극된 관류된 폐 조직 세포에서 발견된 CD8^+ T-세포 (도 21d) 및 CD4^+ T-세포 (도 21e)의 $\text{IFN}\gamma$ 및 $\text{TNF}\alpha$, $\text{TNF}\alpha$ 단독, 및 $\text{IFN}\gamma$ 단독의 수를 결정하였다. 말초 혈액 (도 21b 및 도 21c) 및 폐 조직 (도 21d 및 도 21e) 둘 모두에서, 사이토카인을 생성하는 CD8^+ 및 CD4^+ T 세포의 백분율은 시험되는 다른 아류반트와 비교하여 항원의 임의의 농도에서 AMP-CpG로 처리된 마우스에 비해 상당히 더 높았다. 특히, 사이토카인-생성 CD8^+ 또는 CD4^+ T 세포의 수의 상당한 감소는 10, 5, 또는 1 μg 용량 수준으로 항원과 혼화되는 AMP-CpG로 면역화된 동물의 말초 혈액에서 관찰되지 않았고, 그 이유는 이는 CD8^+ 의 대략 40-50% 및 CD4^+ T 세포의 2-4%에서 유지되었기 때문이다. 감소 경향은 AMP-CpG로 면역화된 동물에서 폐-상주 사이토카인-생성 CD8^+ T 세포의 수에서 관찰되었고, 심지어 1 μg 용량 수준은 각각 가용성 CpG 또는 명반으로 면역화된 동물보다 >3배 또는 >18배 더 많은 수를 생성하였다. 이는 AMP-CpG가 코로나바이러스 스파이크 단백질의 적어도 10배 용량 절약을 가능하게 하는 것을 지지한다.

[0382] AMP-CpG-7909로의 2회 용량 백신접종은 혈액 및 폐에서의 강력한 Spike RBD-특이적 세포 면역, 및 혈액에서의 체액성 면역을 유도한다. C57Bl/6 마우스 (그룹당 $n = 5$)를 1.0, 2.5, 또는 5.0 nmol AMP-CpG와 혼화되는 0.5, 1.0, 또는 5.0 μg Spike RBD 단백질로 0 및 14일차에 면역화시켰고, T 세포 및 IgG 반응을 21일차에 분석하였다. 말초 혈액 세포 (도 26a 및 도 26b) 또는 관류된 폐로부터 수집된 세포 (도 26c 및 도 26d)를 증첩하는 Spike RBD 펩티드로 재자극시켰고 세포내 사이토카인 생성에 대해 유세포 분석법으로 분석하여 항원-특이적 T 세포 반응을 검출하였다. CD8^+ (도 26a 및 도 26c) 및 CD4^+ (도 26b 및 도 26d) T 세포 중에서 $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, 및 이중-양성 T 세포의 수를 나타낸다. Spike RBD에 대해 특이적인 체액성 반응을 ELISA에 의해 면역화된 동물로부터의 혈청에서 평가하였다. 35일차에 IgG에 대한 평가변수 역가를 나타낸다 (도 26e; 그룹당 $n = 5$ 마리 마우스). 검출된 값은 평균 $\pm$ 표준 편차이다.

[0383] 이러한 결과는 AMP-CpG로의 2회-용량 요법은 혈액에서 그리고 폐에서 강력한 다작용성 CD8 및 CD4 T 세포 반응을 유도하는 것을 나타낸다.

[0384] 실시예 4: 노화된 마우스에서의 면역 반응의 유도

[0385] 100 μg 명반 단독, 1 nmol 가용성 CpG 단독, 1 nmol AMP-CpG 단독, 100 μg 명반과 10 μg 의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol 가용성 CpG와 10 μg 의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol AMP-CpG와 10 μg 의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 1 nmol AMP-CpG와 5 μg 의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3), 또는 1 nmol AMP-CpG와 1 μg 의 코로나바이러스 스파이크 단백질 (서열 번호 3)의 3회 용량을 투여받은 마우스인 37주령의 C57BL/6J 노화된 마우스에서의 T 세포 반응을 21일 및 35일차에 평가하였다. Spike-유래의 증첩하는 펩티드 자극 후 말초 혈액에서의 사이토카인-생성 CD8^+ T 세포의 21일차 평가는 AMP-CpG가 가용성 CpG (CD8^+ T 세포의 대략 2.5%), 및 명반 (CD8^+ T 세포의 <0.5%)을 훨씬 능가하는 강력한 반응 (CD8^+ T 세포의 대략 15%)을 유도하였음을 나타내었다 (도 23a). 이러한 반응은 어리고 건강한 마우스에서 관찰된 것과 비교하여 대략 2배 감소되었지만, 이는 그림에도 불구하고 가용성 CpG 및 명반 비교 대상에 의해 발상된 것보다 각각 7배 및 30배까지 초과하였다. AMP-CpG 면역화는 추가로 10 μg 및 5 μg 코로나바이러스 스파이크 단백질 용량에서 비슷한 반응을 가능하게 하였고, 1 μg 에서의 반응이 감소되었지만 이는 여전히 명반에 대해 관찰된 반응을 (20배) 초과하였고, 10 μg 용량 수준에서 가용성 CpG로의 면역화를 통해 발생된 것과 유사하였다 (도 23b).

[0386] 노화된 마우스의 폐 조직에서의 CD8^+ 및 CD4^+ T 세포의 35일 차의 분석은 유사한 경향을 나타내었고, AMP-CpG로 면역화된 동물은 사이토카인을 생성하는 CD8^+ 및 CD4^+ T 세포의 많은 수를 생성하였다. 구체적으로, AMP-CpG 면역화는 가용성 CpG 및 명반 면역화보다 대략 7배 및 >120배 더 높게 폐 상주 CD8^+ T 세포의 대략 60%에서 사이토카인 생성을 유도하였다 (도 23c). 선행 연구에서 관찰되는 바와 같이, 유도된 T 세포는 $\text{IFN}\gamma$ 및 $\text{TNF}\alpha$ 의 동시 생성을 나타내는 유도된 세포의 절반보다 더 많게 매우 다작용성이었다. 말초 혈액에서의 반응과 달리, 폐-

상주 사이토카인 생성 $CD8^+$ T 세포 수는 어리고 건강한 동물에서의 반응에 비해 AMP-CpG 면역화 후에 노화된 마우스에서 줄어들지 않았고, 5 μ g 및 1 μ g 코로나바이러스 스파이크 단백질이 투여된 그룹에서 통계적으로 비슷한 수준을 유지하였다 (도 23d). 폐 상주 $CD4^+$ T 세포 반응은 가용성 CpG ($CD4^+$ T 세포의 대략 0.6%) 및 명반 ($CD4^+$ T 세포의 <0.5%)과 비교하여 Th1 사이토카인 생성 세포의 더 많은 수 ($CD4^+$ T 세포의 대략 10%)를 유도하는 AMP-CpG와 유사한 패턴을 나타내었다 (도 23e). 마찬가지로, 이러한 반응 수준은 AMP-CpG 면역화가 어리고 건강한 마우스에서 관찰된 것과 비슷하였고 이는 어린 마우스 및 노화된 마우스에서 비슷한 폐-상주 T 세포 반응을 일으킬 수 있는 것을 나타낸다. 마지막으로, 폐-상주 $CD4^+$ T 세포 반응은 시험되는 모든 코로나바이러스 스파이크 단백질 용량 중에서 비슷한 수준으로 유지되었고, 코로나바이러스 스파이크 단백질의 최저 농도 (1 μ g)에서의 AMP-CpG 면역화는 10배 더 높은 항원 용량 (10 μ g)에서 가용성 CpG 및 명반 둘 모두를 능가하였다 (도 23f).

[0387] 코로나바이러스 스파이크 단백질-특이적 항체 반응을 노화된 마우스에서 비교대상 백신으로의 반복 용량 면역화 후 35일차에 평가하였다. 유사바이러스 중화는 10 μ g 항원 용량 수준에서의 AMP-CpG 면역화가 가용성 CpG 및 명반 비교대상에 대해 관찰된 것보다 적어도 5배 크게 그리고 인간 회복기 혈청/혈장에서 관찰된 것보다 >50배 더 크게 향상된 중화 역가를 유도하였다 (도 24a). AMP-CpG와 함께의 코로나바이러스 스파이크 단백질의 감소된 용량은 가용성 CpG 및 명반과 비슷한 더 낮은 중화 역가를 생성하였다 (도 24b). 특히 관심대상은 AMP-CpG와 함께 더 낮은 1 μ g 코로나바이러스 스파이크 단백질 용량을 받은 것과 가용성 CpG 또는 명반과 함께 10 μ g 코로나바이러스 스파이크 단백질로 면역화된 동물로부터의 역가가 동등하다는 것이었다. 총 IgG의 평가는 AMP-CpG 및 명반이 가용성 CpG로 면역화된 동물에서 생성된 것을 초과하여 둘 모두 비슷한 코로나바이러스 스파이크 단백질-특이적 IgG 역가를 생성하였음을 나타내었다 (도 24c). AMP-CpG로 면역화된 동물에서 코로나바이러스 스파이크 단백질 용량이 감소함에 따라 IgG 역가의 상당한 감소가 관찰되었지만, 10 μ g 코로나바이러스 스파이크 단백질이 주어진 명반과 AMP-CpG 사이에는 통계적 차이가 없었다. 아이소타입 분석은 어리고 건강한 마우스에서 이루어진 것과 유사한 관측을 나타내었고, AMP-CpG는 가용성 CpG 또는 명반과 비교하여 더 많은 Th1, IgG2b-c-유세 반응을 유도하고, 이는 보다 균형화된 또는 Th1, IgG1-편향 프로파일을 나타내었다 (도 24d-도 24g). 코로나바이러스 스파이크 단백질의 다양한 용량 수준에서 AMP-CpG로 면역화된 동물 사이에서 유의미한 차이는 관찰되지 않았고 (도 24f), 한편 AMP-CpG로 면역화된 마우스에 대해 관찰된 Th1-편향의 강도는 어리고 건강한 마우스에 비해 노화된 마우스에서 감소되었다. 어리고 건강한 마우스에서 앞서 관찰된 바와 같이, 가용성 CpG 또는 명반과 비교하여 AMP-CpG로 면역화된 동물에서 IgG3 역가가 향상되었다 (도 24g). 이와 함께, 이러한 결과는 AMP-CpG가 최적의 Th1-편향 아이소타입 프로파일을 생성하고 항원의 적어도 10배의 용량 절약을 가능하게 하면서도, 가용성 CpG 또는 명반 백신 비교대상에 대해 관찰된 것을 능가하는 노화된 마우스에서 강한 작용성 코로나바이러스 스파이크 단백질-특이적 체액성 면역을 유도할 수 있다는 것을 지지한다.

[0388] 노화된 마우스에서의 AMP-CpG로의 백신접종은 혈액, 비장, 및 폐 조직에서의 지속적인 Spike RBD-특이적 T 세포를 가능하게 한다. 37주령의 C57Bl/6 마우스 (그룹당 n = 5-10)를 100 μ g 명반 또는 1 nmol 가용성-, 또는 AMP-CpG와 혼화되는 10 μ g Spike RBD 단백질로 0, 14, 및 28차에 면역화하였다. 아췌반트 대조군 동물에 AMP-CpG 아췌반트만을 투여하였다. Spike RBD에 특이적인 체액성 반응을 35, 49, 및 70일차에 ELISA에 의해 면역화된 동물로부터의 혈청에서 평가하였다. IgG에 대해 결정된 평가변수 역가를 나타낸다 (도 25a). T 세포 반응을 21, 35, 49, 및 70일 차에 분석하였다. 세포를 21, 35, 49, 및 70일차에 말초 혈액으로부터 수집하였고 (도 25b), 중첩하는 Spike RBD 펩티드로 재자극하여 세포내 사이토카인 생성에 대해 분석하여 항원-특이적 T 세포 반응을 검출하였다. 말초 혈액 $CD8^+$ T 세포 중에서 IFN γ -양성 세포의 수를 나타내고 (도 25a), 세포를 비장 (도 25c) 및 폐 (도 25d)로부터 수집하였고, 중첩하는 Spike RBD 펩티드로 재자극하여 ELISPOT 검정에 의해 IFN γ 생성에 대해 분석하였다. 1×10^6 개의 세포당 IFN γ 스팟 형성 세포 (SFC)의 수를 나타낸다 (그룹당 n = 5마리 마우스). 검출된 값은 평균 $\pm$ 표준 편차이다. 사이토카인+ T 세포 수에 적용된 양측 맨-휘트니 시험에 의해 * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; **** P < 0.0001.

[0389] 이 결과는 노화된 마우스에서 AMP-CpG가 투여 후 수개월 동안 지속되는 높은 빈도의 T 세포 반응을 유도하는 것을 나타낸다.

[0390] **실시예 5: 전장 스파이크 단백질 항원 및 뉴클레오펙시드 단백질을 사용한 면역 반응의 유도**

[0391] SARS-CoV-2 스파이크 단백질은 대략 138 kDa의 분자량을 갖고, SARS-CoV-2 뉴클레오펙시드 단백질은 대략 50 kDa의 분자량을 갖는다. 이 크기에 기초하여, 스파이크 단백질 및 뉴클레오펙시드 단백질 둘 모두는 림프절 표

적화에 적합한 것으로 예측된다.

[0392] 하기 뉴클레오타이드 단백질 작제물을 사용하여 도 27 - 도 33에 나타난 데이터를 생성하였다:

MSDNGPQNQRNAPRITFGGSDSTGSNQNGERSGARSKQRRPQGLPNNTASWFTALTQHGKEDL
KFPRGQGVPIINTSSPDDQIGYYRRATRRIRGGDGKMKDLSRWYFYLLGTGPEAGLPYGANKDGI
WVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAIVLQLPQGTTLPGKFYAEGSRGGSQASSRSSRSRNRSSRNS
TPGSSRGTSARMAGNGGDAALALLLDRLNQLESKMSGKGQQQGGQTVTKSAAEASKKPRQKR
TATKAYNVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSG
TWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPPTPKKDKKKKADETQALPQRQKKQQTVTLLP
AADLDDFSKQLQQSMSSADSTQAENLYFQGHHHHHH (서열 번호 63).

[0393]

[0394] 이 단백질은 제품 번호 NUN-C5227하에 ACROBiosystems로부터 이용가능하다. 이는 뉴클레오타이드 단백질 서열과 6개-히스티딘 태그 (HHHHHH; 서열 번호 65) 사이에 담배 식각 바이러스 (TEV) 프로테아제 (ENLYFQG; 서열 번호 64)에 대한 절단 부위를 포함한다.

[0395] 하기 전장 스파이크 단백질 작제물을 사용하여 도 27- 도 33에 나타난 데이터를 생성하였다:

VNLTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNP
VLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSTQSLNINATNVVIVKCEFCNDPFLGVYHKNKNS
WMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLLMDLEGKQGNFKNLREFVFNIDGYFKIYKHTPINLVRDLPQ
GFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTGDSGGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGITID
AVDCALDPLSETKCTLSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNR
KRISNCVADYSVLNSASFSTFKCYGVSPKTLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRIAPGQTGKIADYNY
KLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNNYNYRLFRKSNLKPFERDISTEYQAGSTPCNGVEGFNCYF
PLQSYGFGPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNK

[0396]

KFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHA
DQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRAAASVASQSI
YTMSLGAENSVAYSNNIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECNLLLQYGSFCTQLN
RALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTADAGFI
KQYGDCLGDIAARDLCAQKFNGLTVLPLLTDEMAIQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMA
YRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFG
AIVSLNDILSRDLKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVD
FCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHGDKAHFPREGVFSNGTHWFVTQR
NFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVV
NIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPGGGSGGGSHHHHHHHHHH (서열 번호 66).

[0397]

[0398] 이 단백질은 제품 번호 SPN-C52H2하에 ACROBiosystems으로부터 이용가능하다. 10개-히스티딘 태그 (HHHHHHHHHH; 서열 번호 67)은 GGGSGGGS (서열 번호 62) 링커를 갖는 스파이크 단백질 서열에 연결된다. 스파이크 단백질은 삼량체를 안정화시키기 위해 하기 돌연변이를 갖는다: R683A, R685A.

[0399] 도 27에 나타난 바와 같이, AMP-CpG는 SARS CoV-2 스파이크 단백질을 표적화하는 강한 다작용성 CD8 T 세포 반응을 유도한다. mock 백신, 또는 10 µg 코로나바이러스 스파이크 단백질, 10 µg 코로나바이러스 뉴클레오타이드 단백질 및 (1) 100 µg 명반, (2) 6 µg 가용성 CpG, 또는 (3) 6 µg AMP-CpG를 함유하는 백신을 투여하였다. 관찰된 사이토카인 양성 세포 백분율은 하기와 같았다: mock (0%), 명반 (0%), 가용성 CpG (5%), 및 AMP-CpG (34%).

[0400] 도 28에 나타난 바와 같이, AMP-CpG는 또한 SARS CoV-2 스파이크 단백질을 표적화하는 강한 다작용성 CD4 T 세포 반응을 유도한다. mock 백신, 또는 10 µg 코로나바이러스 스파이크 단백질, 10 µg 코로나바이러스 뉴클레오타이드 단백질 및 (1) 100 µg 명반, (2) 6 µg 가용성 CpG, 또는 (3) 6 µg AMP-CpG를 함유하는 백신을 투여하였다. 관찰된 사이토카인 양성 세포 백분율은 하기와 같았다: mock (0.2%), 명반 (0.5%), 가용성 CpG

(0.5%), 및 AMP-CpG (12%).

- [0401] 중첩하는 코로나바이러스 스파이크 펩티드와 함께 10 μ g의 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 작제물 (서열 번호 63) 및 (1) 100 μ g 명반, (2) 6 μ g 가용성 CpG, 또는 (3) 6 μ g AMP-CpG와 조합하여 10 μ g의 전장 코로나바이러스 스파이크 단백질 작제물 (서열 번호 66)을 받은 재자극 마우스 (C57BL/6J 마우스; 그룹당 n=10)는 SARS CoV-2 스파이크 단백질에 대해 강한 T 세포 반응을 생성하였다 (도 29).
- [0402] AMP-CpG는 SARS CoV-2 스파이크 단백질을 표적화하는 강한 폐-상주 다작용성 CD8⁺ T 세포 반응을 유도한다 (도 30). mock 백신, 또는 10 μ g 코로나바이러스 스파이크 단백질, 10 μ g 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 및 (1) 100 μ g 명반, (2) 6 μ g 가용성 CpG, 또는 (3) 6 μ g AMP-CpG를 함유하는 백신을 투여하였다. 관찰된 사이토카인 양성 세포 백분율은 하기와 같았다: mock (0%), 명반 (0%), 가용성 CpG (3%), 및 AMP-CpG (26%).
- [0403] AMP-CpG는 또한 SARS CoV-2 스파이크 단백질을 표적화하는 강한 폐-상주 다작용성 CD4⁺ T 세포 반응을 유도한다 (도 31). mock 백신, 또는 10 μ g 코로나바이러스 스파이크 단백질, 10 μ g 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 및 (1) 100 μ g 명반, (2) 6 μ g 가용성 CpG, 또는 (3) 6 μ g AMP-CpG를 함유하는 백신을 투여하였다. 관찰된 사이토카인 양성 세포 백분율은 하기와 같았다: mock (0.2%), 명반 (0.2%), 가용성 CpG (1%), 및 AMP-CpG (7%).
- [0404] AMP-CpG는 SARS CoV-2 뉴클레오캡시드 단백질을 표적화하는 강한 말초 혈액 다작용성 CD8⁺ 및 CD4⁺ T 세포 반응을 유도한다 (도 32). mock 백신, 또는 10 μ g 코로나바이러스 스파이크 단백질, 10 μ g 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 및 (1) 100 μ g 명반, (2) 6 μ g 가용성 CpG, 또는 (3) 6 μ g AMP-CpG를 함유하는 백신을 투여하였다.
- [0405] 중첩하는 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 펩티드와 함께 10 μ g의 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 작제물 (서열 번호 63) 및 (1) 100 μ g 명반, (2) 6 μ g 가용성 CpG, 또는 (3) 6 μ g AMP-CpG와 조합하여 10 μ g의 전장 코로나바이러스 스파이크 단백질 작제물 (서열 번호 66)을 받은 재자극 마우스 (C57BL/6J 마우스; 그룹당 n=10)는 SARS CoV-2 뉴클레오캡시드 단백질을 표적화하는 강한 T 세포 반응을 유도하였다 (도 33).
- [0406] **실시예 6: 비-인간 영장류에서의 면역 반응의 유도**
- [0407] 백신에서의 Spike RBD 및 AMP-CpG를 시험하기 위해 비-인간 영장류 (NHP)에서 연구를 시작하였다. 백신에서의 RBD + 명반의 사용은 RBD + AMP-CpG와 비교되었다. 500 μ g의 AMP-CpG의 초기 용량을 피하로 면역화되는 2회-용량 스케줄 (0주 및 4주)로 시험하였다. 평가에는 각 투여 후 주간 임상 검사, CBC (전혈구수) 패널, 및 면역원성에 대한 혈액 및 혈청의 수집이 포함되었다. 이 시험에서, AMP-CpG는 BioE Spike RBD에 대한 항체 또는 T-세포 반응을 유도하지 않았다. 2회 투여 후 AMP-CpG에 어떠한 반응도 보여지지 않았고, 동일한 동물을 신규 백신 제제로 면역화시켰다. 여기서, 3,000 μ g의 AMP-CpG를 사용하였고, 140 μ g Genscript RBD를 사용하였다. (상이한 로트 및 더 높은 농도의 AMP-CpG 및 신규 공급원 및 더 높은 농도의 RBD). 비교 그룹은 동일하게 유지되었다 (1.5 mg 명반 + 70 μ g BioE RBD).
- [0408] 재제제화된 AMP-CpG 백신은 Genscript RBD에 대해 강한 항체 반응을 유도하였다 (도 34). 재제제화된 AMP-CpG 백신은 또한 N501Y 돌연변이 (서열 번호 69)를 갖는 UK SARS-CoV-2 변이체에 대해 IgG 항체를 유도한다 (도 35). 추가로, 재제제화된 AMP-CpG 백신은 Spike RBD에 대한 CD8⁺ T-세포 반응 (도 36a 및 도 36b), 및 Spike RBD에 대한 CD4⁺ 및 CD8⁺ T-세포 반응 (도 37a 및 도 37b)을 유도한다.
- [0409] 재제제화된 RBD 및 AMP-CpG 백신에 대해 부작용 안전성 신호 (온도, 반응원성, 화학 및 혈액학)를 관찰되지 않았다.
- [0410] **실시예 7: B.1.351 변이체에 대한 면역 반응의 유도**
- [0411] B.1.351, 또는 COVID의 남아프리카 변이체는 SARS-CoV2의 균주이다. 항원이 B.1.351 RBD 변이체로 변화되거나 WT RBD 항원과 결합하여 사용되는 경우 백신에서 Spike RBD 및 AMP-CpG의 면역원성을 결정하기 위해 마우스에서 연구를 시작하였다. 상이한 변이체에 대한 면역 반응의 교차-반응성은 또한 재제제화된 AMP-CpG 이중 RBG 및 B.1.351 백신 및 재제제화된 AMP-CpG B.1.351 백신에 대해 결정되었다.
- [0412] 대조군, WT RBG, B.1.351 RBG, 및 이중 WT RBG 및 B.1.351 저장 용액을 제조하였다. 대조군 아류반트 저장 용액을 리몰루스 아메보사이트 용해물 (LAL) 수에 재현탁시켰다. 최종 주사액을 1x 인산염-완충 식염수 (PBS)로

희석시켰다. WT 및 B.1.351 항원을 포함하는 SARS-CoV2 스파이크 S1 RBD 단백질을 저장 용액을 100 μ l 주사액당 5 μ g를 갖는 각각 0.88 및 0.95 mg/ml의 농도로 PBS에서 용해시켰다. 최종 주사액을 1x PBS로 희석시켰다. 이중 WT 및 B.1.351 SARS-CoV2 스파이크 S1 RBD 단백질을 저장 용액을 또한 100 μ l 주사액당 5 μ g의 각각의 항원으로 제조하였다.

[표 5] 실험 설계

그룹	처리 명칭	백신 성분		투여 및 샘플 수집			
		항원 (5 μ g)	아주반트 (1nmol)	1일차 용량 1	13일차 판독	14일차 용량 2	21일차 판독
1	AMP Vax (B.1.351)	B.1.351 RBD	DSPE-PEG-CpG7909	x	PBMCs ICS ----- 혈청 Ab ELISA	x	PBMC/ 페 ICS ----- 혈청 ----- 비장 ELISpot
2	AMP Dual Vax	B.1.351 RBD + WT RBD	DSPE-PEG-CpG7909	x		x	
3	AMP Vax (WT)	WT RBD	DSPE-PEG-CpG7909	x		x	
4	Sol Vax (B.1.351)	---	CpG7909	x		x	
4	Adj Ctrl	---	DSPE-PEG-CpG7909	x		x	

각각 5마리의 C57BL/6J 마우스의 5개 그룹을 사용하였다. 암컷 B6 마우스의 꼬리 기저에 양측으로 측면당 50 μ l로 피하 (SC)로 면역접종을 투여하였다. 부스터 용량은 대략 2주 간격에서 주어졌다. SC 주사는 자연 림프 배출을 통해 림프절로 백신을 전달하는 것에 도움이 될 수 있다. 격주 주사는 이전 마우스 연구에 기초하여 마우스에서의 최적 반응 생성에 도움이 될 수 있다.

[표 6] 백신 성분

백신 성분	서열 또는 Cat#	공급처	로트 #
SARS-CoV2 RBD, His (WT)	Z03483	GenScript	P50142007
SARS-CoV2 RBD, His (B.1.351)	Z03537	GenScript	B2101019
aCpG 7909	5'-(디아실 지질)tcg tcg ttt tgt cgt ttt gtc gtt-3' (서열 번호 1)	Avecia	S18-079-S3-B1

사랑채 분석을 수행하였고, 결과는 도 38에 나타나 있다. TNF α 및 IFN γ 에 대한 세포내 염색 (ICS) 검정을 투여 후 7일차에 PBMC에 대해 수행하였다. ICS를 또한 2회 투여 후 7일차에 페 샘플에 대해 수행하였다. CD4, CD8, 및 CD3에 대해 세포를 표면 염색시켰다. 항체 정보에 대해 표 7을 참조한다. SARS-CoV-2 스파이크 당단백질 펩티드 집단 혼합물(SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Peptide Pool Mix) (웰당 각각 1 mg으로의 315 펩티드)의 웰당 1 mg으로 밤새 (브레펠딘 A 및 모네신의 존재하에) ICS 샘플을 활성화시켰다. 결과는 2회 투여 후 각각 CD8⁺ 페 세포, CD4⁺ 페 세포, 및 CD8⁺ 페 세포에 대해 도 39a, 도 39b, 및 도 39c에 대해 나타나 있다. 펩티드 정보에 대해 표 8을 참조한다.

[0419] [표 7] ICS에 대해 사용되는 항체

항원	색상	공급처	제품 #	로트 #
TNF α	FITC	BD	554418	9123915
IFN γ	PE	BD	554412	9154769
CD8a	APC	eBioscience	17-0081-83	4321418
CD4	PE-Cy7	Invitrogen	25-0041-82	2123767
CD3	APC-Cy7	BD	560590	9179637
LiveDead	Aqua	Invitrogen	L34966	1832692
브레펠딘 A	---	Invitrogen	00-4506-51	1915300
모넨신	---	BioLegend	420701	B297750

[0420]

[0421] [표 8] 재자극 펩티드

재자극 펩티드	서열	공급처	로트 #
SARS-CoV-2 스파이크 당단백질 펩티드 집단 혼합물	315 15 랑체 스페닝 스파이크 단백질 서열, 11aa 중첩	GenScript	custom

[0422]

[0423] IFN γ 에 대한 ELISpot 분석을 3차 용량 투여 후 비장세포에 대해 수행하였다. 비장세포 (0.2x10⁶ 세포/웰)를 웰 PepMix당 1 μ g로 활성화시켰다. 펩티드 정보에 대해 표 8을 참조한다. IFN γ 플레이트를 밤새 자극시켰다. 결과는 도 40에 나타나 있다.

[0424] SARS-CoV2 특이적 혈청 ELISA (효소-결합 면역흡착 검정)를 각 투여 후 7일차에 마우스 혈청에 대해 수행하여 임의의 RBD-특이적 항체 반응을 검출하였다. 전혈은 Ser-gel 튜브 (NC9436363, Fisher Scientific)를 사용하여 원심분리되었다. 혈청을 신선하게 사용하거나 사용시까지 -80℃에서 저장하였다. 96-웰 플레이트를 밤새 4℃에서 200 ng/100 μ l (2 μ g/ml)의 CoV2 RBD 단백질 (WT, B.1.351 및 B.1.1.7)로 코팅하였다. 이후 플레이트를 실온에서 2시간 동안 2% BSA로 사전-차단하였다. 마우스 혈청을 1:20로 희석하고 더미 플레이트에서 (1:5 내지 8 농도로) 연속 희석하였다. ELISA 플레이트를 ELISA 세척 완충액 (BioLegend 4211601)으로 1회 세척하였다. 샘플을 ELISA 플레이트로 이송시켰고 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척 완충액으로 4회 세척하였다. 혈청 항체 검출을 위해 표 9에서의 2차 HRP-접합된 항체를 PBS+에서 1:2000로 사용하였고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척 완충액으로 4회 세척하였다. 반응을 실온에서 10분 동안 기질 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (TMB)의 첨가에 의해 반응을 시각화하고 H₂SO₄ (1 N)로 중지시켰다. 450 nm에서의 흡광도를 ELISA 플레이트 리더로 측정하였다. 결과는 도 41에 나타난다.

[0425] [표 9] 2차 HRP-접합된 항체

항원	공급처	제품#	로트#
IgG	Jackson ImmunoResearch	315-035-046	147406

[0426]

[0427] 재제제화된 AMP-CPG 이중 WT RBD 및 B.1.351 RBD 백신 및 재제제화된 AMP-CPG B.1.351 RBD 백신은 이전 실험에서 보여지는 WT RBD 항원을 유일하게 사용하는 백신에 대해 유사한 면역학적 반응을 유도한다. T-세포뿐만 아니라 항체 반응은 SARS-CoV2 RBD의 모든 시험된 변이체에 대해 동등하게 교차-반응성이다.

[0428] 실시예 8: 인간 대상체에서의 면역 반응의 유도

[0429] 본원에 개시된 방법에 따라, 대상체, 예컨대 인간 대상체는 CpG 양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 예를 들어, RBD 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오키프 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)을 투여받아 대상체에서 면역 반응을 유도할 수 있다. 이를 위해, 환자에 CpG 양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 예를 들어, RBD 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오키프 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)이 투여된다. CpG 양친매성 물질 또는 이의 약학적 조성물은 백신의 형태로 대상체에 피하로 투여된다. CpG 양친매성 물질 또는 이의 약학적 조성물은 또한 비강내, 기관내로, 또는 기계 환기 동안 흡입에 의해 투여될 수 있다. 대상체에는 또한 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바

이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 예를 들어, RBD 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열) 또는 이의 약학적 조성물이 백신의 형태로 피하로 투여된다. 코로나바이러스 항원 또는 이의 약학적 조성물은 또한 비강내, 기관내로, 또는 기계 환기 동안 흡입에 의해 투여될 수 있다. CpG 양친매성 물질 및 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 예를 들어, RBD 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열) 둘 모두는 내부 넓적다리에 양측으로 투여될 수 있다. CpG 양친매성 물질 및 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 예를 들어, RBD 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)은 대상체에 별도로 또는 동시에 투여될 수 있다. 대상체는 0주, 4주, 및 10주 또는 0주 및 4주에 CpG 양친매성 물질 및 (예를 들어, 코로나바이러스 스파이크 단백질 또는 그의 펩티드, 예를 들어, RBD 펩티드, 및/또는 코로나바이러스 뉴클레오캡시드 단백질 또는 그의 펩티드, 또는 이를 인코딩하는 핵산 서열)의 투여량을 받을 수 있다. 대상체는 약 0.1 mg 내지 20.0 mg의 투여량을 받을 수 있다. 특히, 투여되는 투여량은 CpG 양친매성 물질 약 0.1 mg 내지 1.0 mg, 약 0.5 mg 내지 3.0 mg, 약 1.0 mg 내지 5.0 mg, 약 2.0 내지 5.0 mg, 약 3.0 내지 5.0 mg, 약 3.0 mg 내지 10.0 mg, 약 4.0 mg 내지 12.0 mg, 약 5.0 mg 내지 15.0 mg, 또는 약 5.0 내지 20.0 mg의 범위일 수 있다. 대상체에 투여되는 특정 투여량은 약 0.1 mg, 0.2 mg, 0.3 mg, 0.4 mg, 0.5 mg, 1.0 mg, 2.0 mg, 3.0 mg, 4.0 mg, 5.0 mg, 6.0 mg, 7.0 mg, 8.0 mg, 9.0 mg, 10.0 mg, 11.0 mg, 12.0 mg, 13.0 mg, 14.0 mg, 15.0 mg, 16.0 mg, 17.0 mg, 18.0 mg, 19.0 mg, 또는 20.0 mg일 수 있다. 대상체는 또한 CpG 양친매성 물질의 이러한 특정 투여량 중 임의의 2개 간의 범위의 투여량을 받을 수 있다. 대상체는 코로나바이러스 항원의 약 10 µg 내지 약 1.0 mg의 투여량을 받을 수 있다. 특히, 대상체는 코로나 바이러스 항원의 약 40 µg 내지 60 µg, 약 50 µg 내지 70 µg, 약 50 µg 내지 150 µg, 약 70 µg 내지 150 µg, 약 100 µg 내지 150 µg, 약 100 µg 내지 200 µg, 약 140 µg 내지 250 µg, 약 200 µg 내지 300 µg, 약 250 µg 내지 500 µg, 약 300 µg 내지 600 µg, 또는 약 500 µg 내지 1.0 mg의 투여량을 받을 수 있다. 특히, 대상체에 투여되는 투여량은 코로나바이러스 항원 (예를 들어, 스파이크 단백질 또는 스파이크 단백질 RBD)의 약 10 µg, 20 µg, 30 µg, 40 µg, 50 µg, 60, µg, 70 µg, 80 µg, 90 µg, 100 µg, 110 µg, 120 µg, 130 µg, 140 µg, 150 µg, 200 µg, 250 µg, 300 µg, 400 µg, 500 µg, 600 µg, 700 µg, 800 µg, 900 µg, 또는 1.0 mg일 수 있다. 대상체는 또한 코로나바이러스 항원의 이러한 특정 투여량 중 임의의 2개 간의 범위의 투여량을 받을 수 있다.

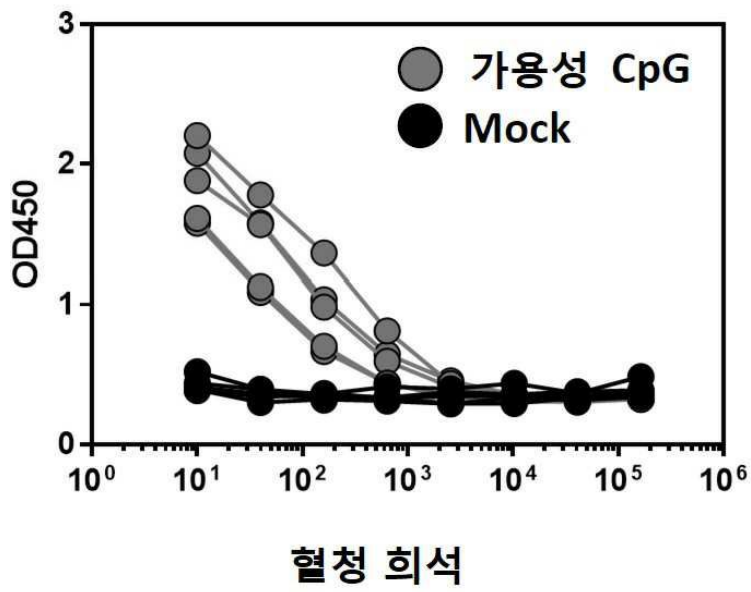
[0430] 기타 구현예

[0431] 본 발명의 기재된 조성물, 방법, 및 용도의 다양한 수정예 및 변형예는 본 발명의 범위 및 사상을 벗어남 없이 당업자에게 자명할 것이다. 본 발명은 특정 구현예와 결합하여 기재되지만, 청구되는 본 발명은 이러한 특정 구현예로 과도하게 제한되지 않아야 함을 이해하여야 한다. 사실상, 당업자에게 자명한 본 발명을 실시하기 위한 기재된 방식의 다양한 수정예는 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 의도된다.

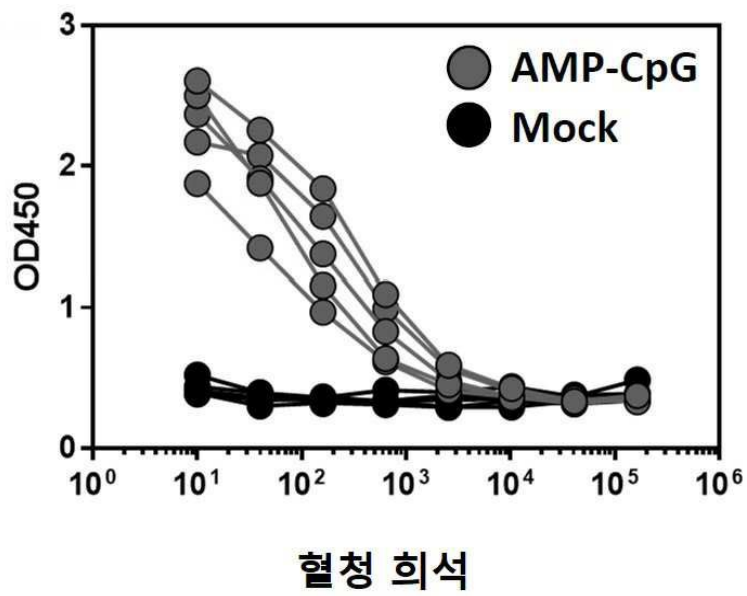
[0432] 모든 공보, 특허, 및 특허 출원은 각 개별적인 공보, 특허, 또는 특허 출원이 구체적으로 그리고 개별적으로 그 전문이 참조로 편입되는 것을 나타내는 것과 같은 동일한 범위로 그 전문이 참조로 본원에 편입된다.

도면

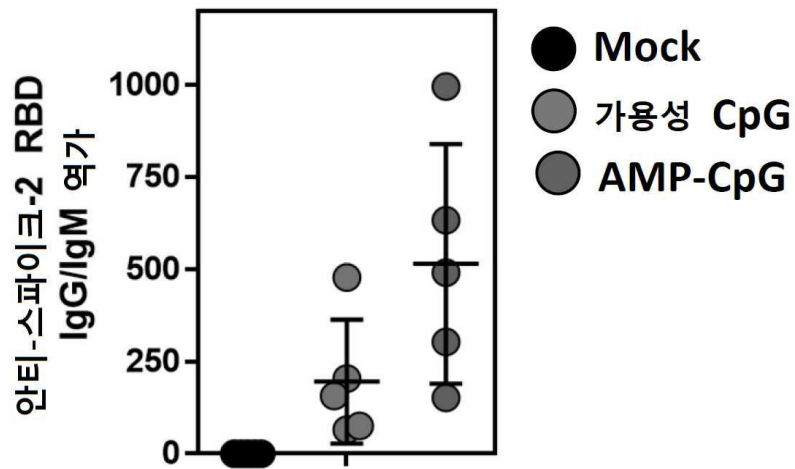
도면1a



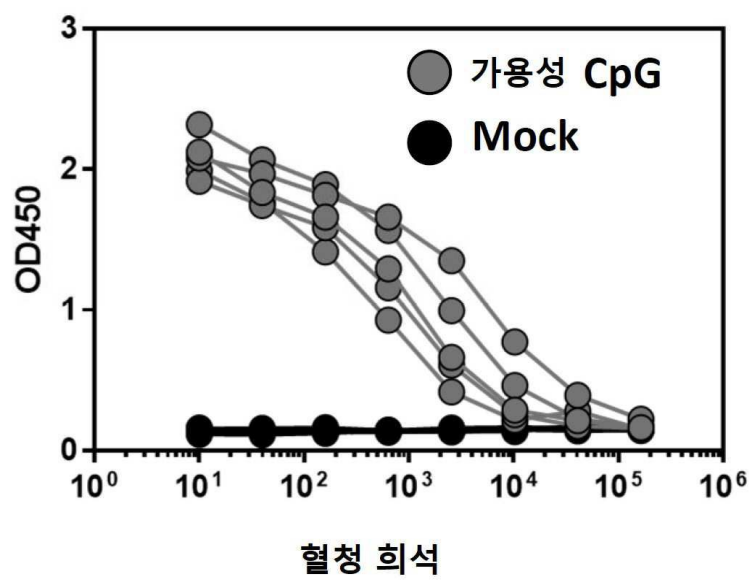
도면1b



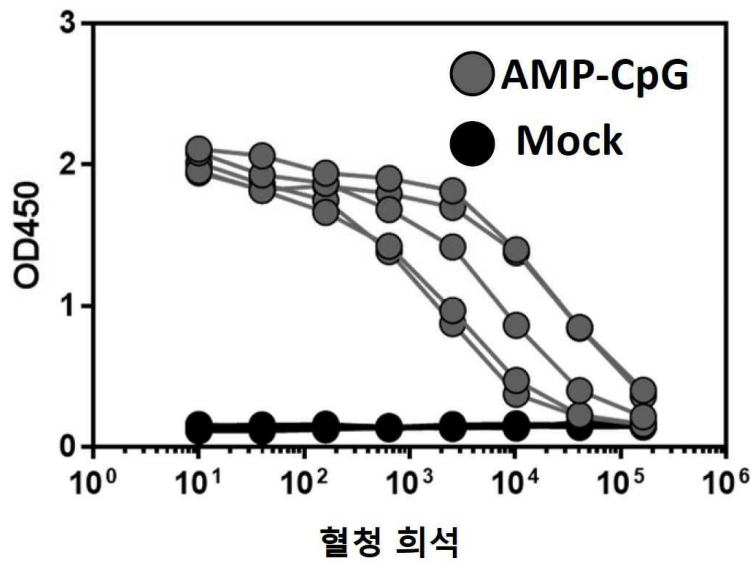
도면1c



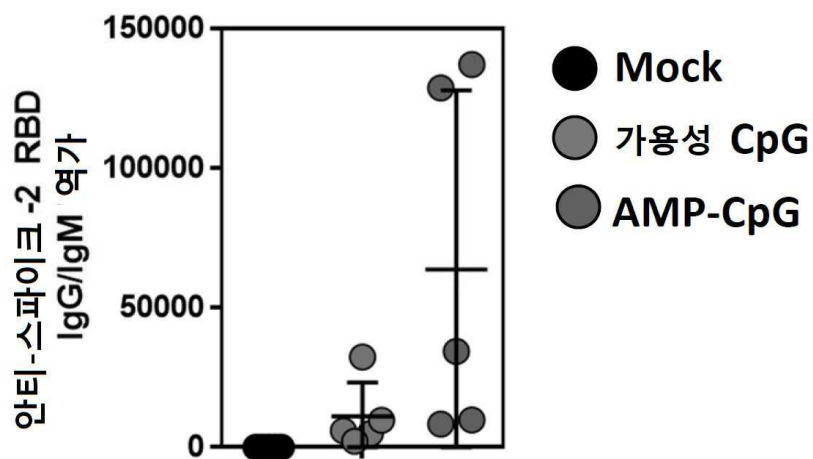
도면2a



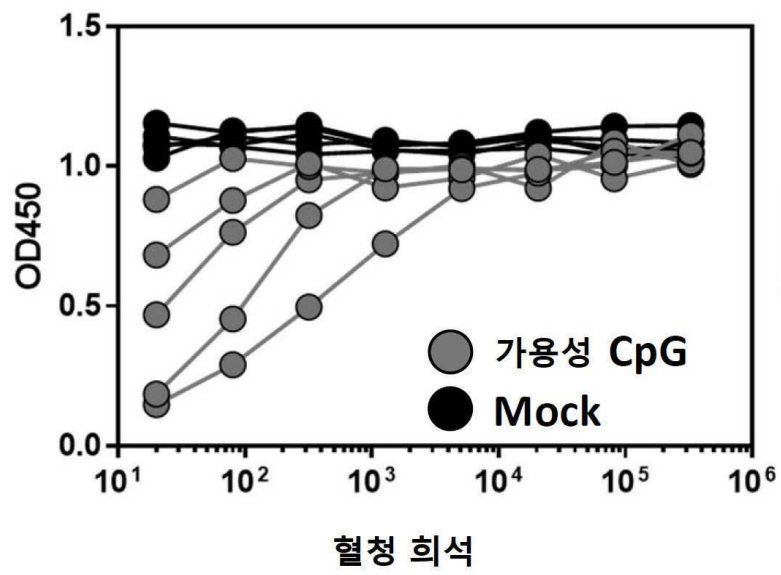
도면2b



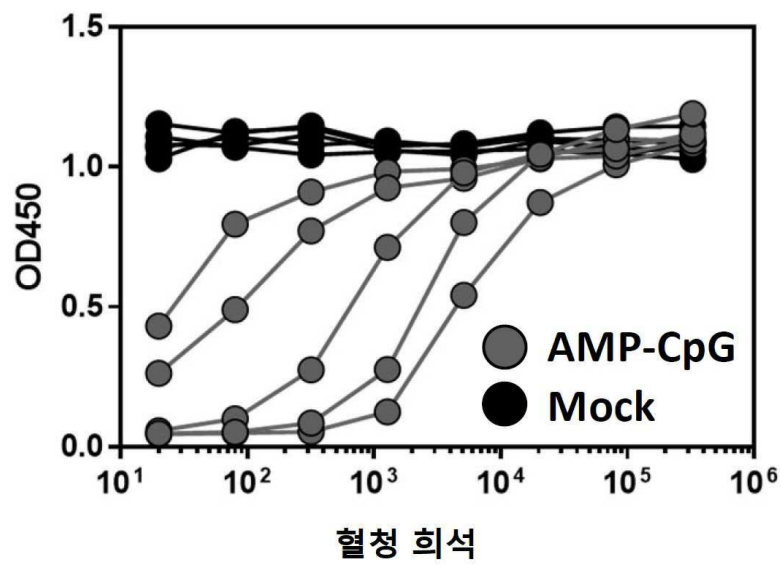
도면2c



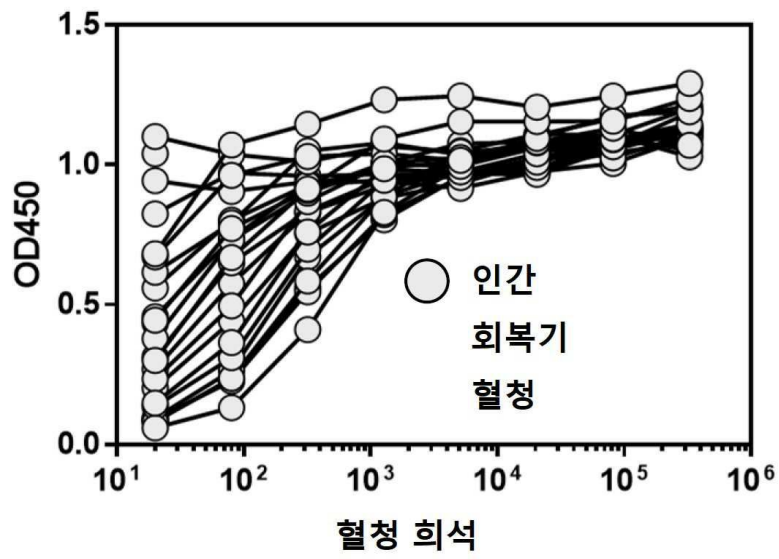
도면3a



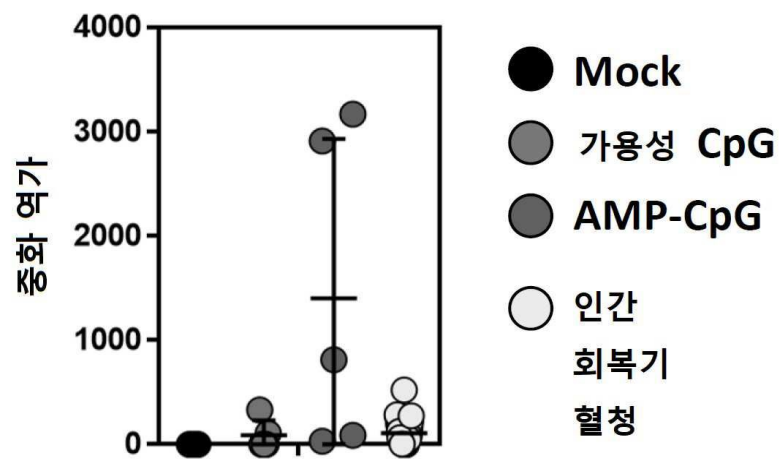
도면3b



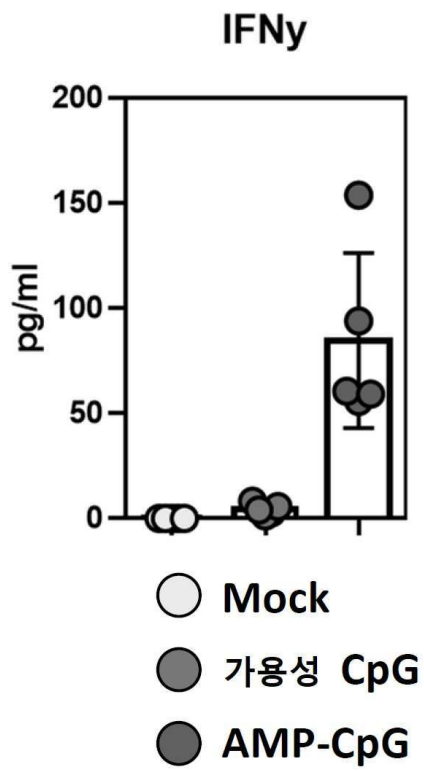
도면3c



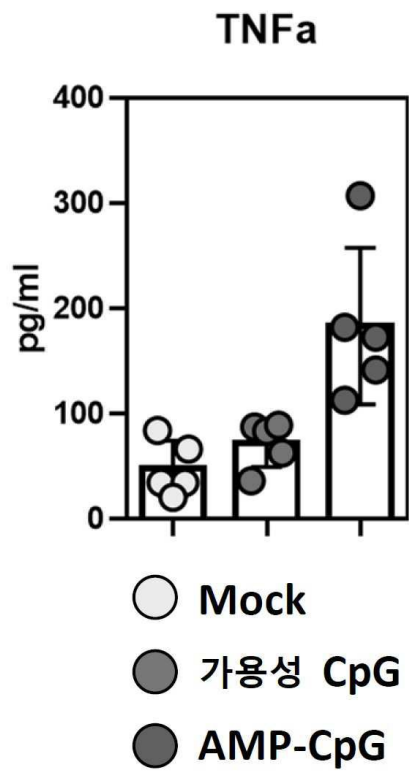
도면3d



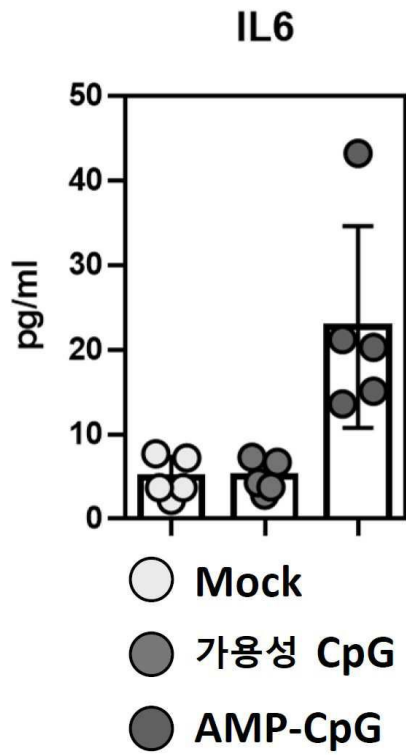
도면4a



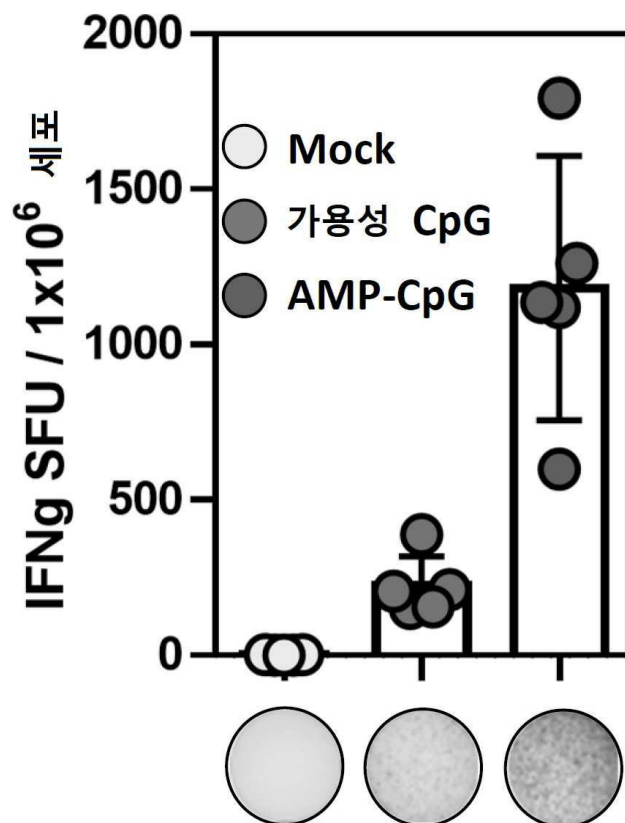
도면4b



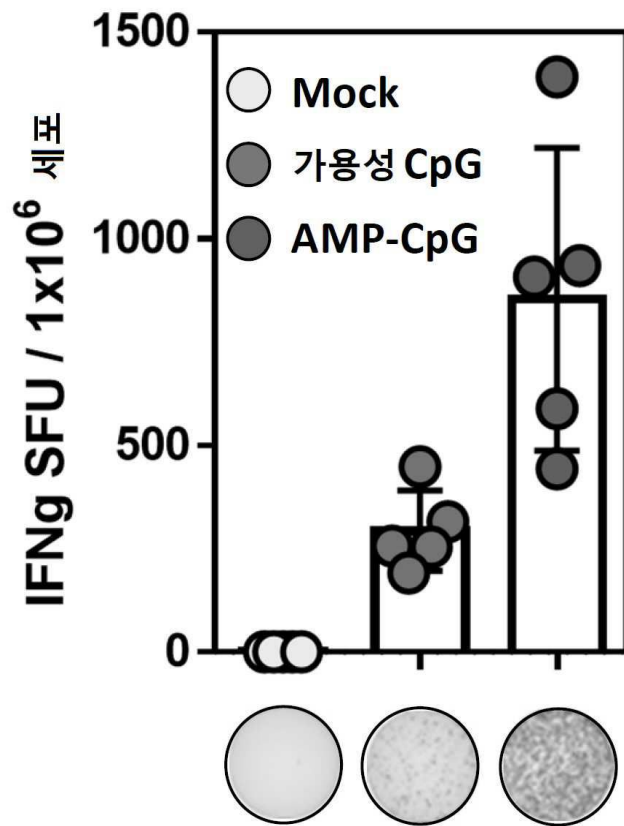
도면4c



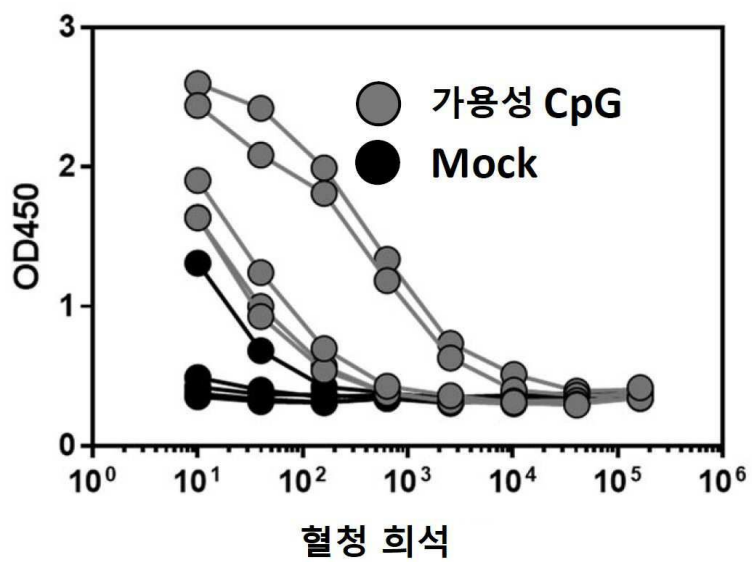
도면5a



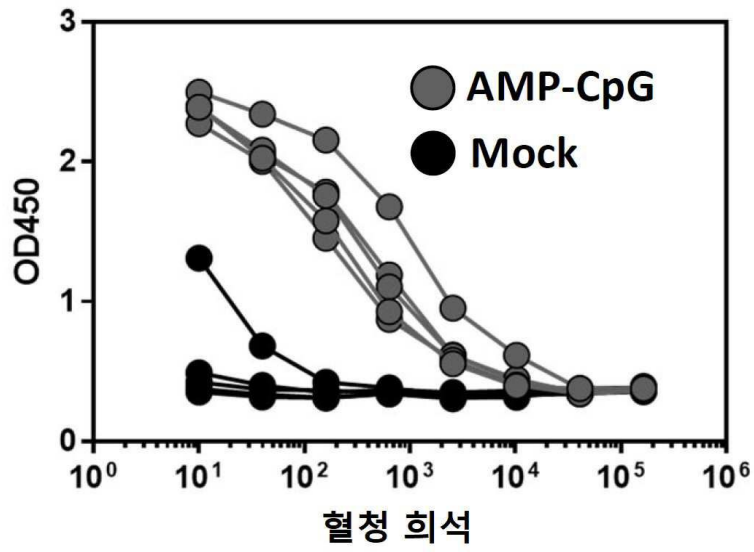
도면5b



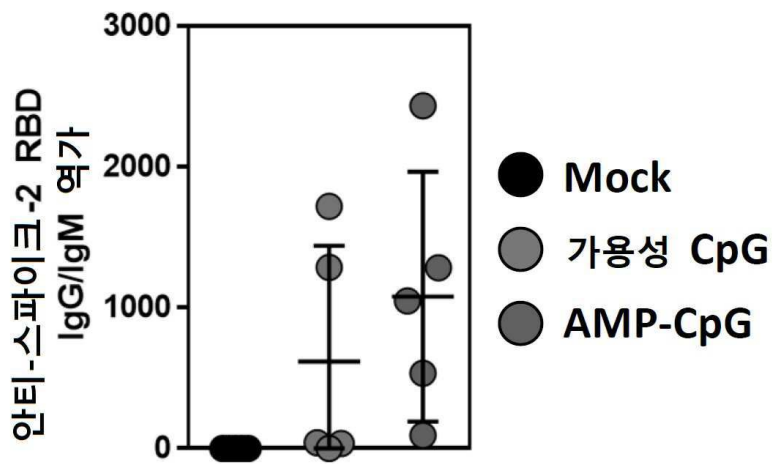
도면6a



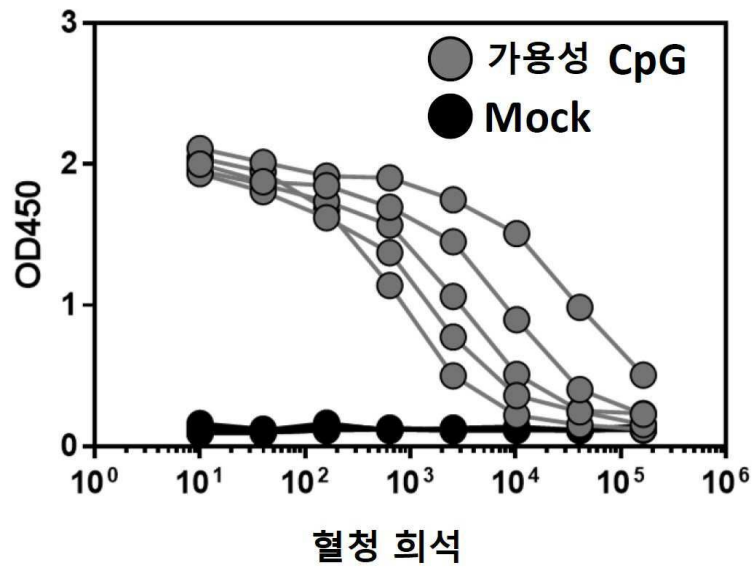
도면6b



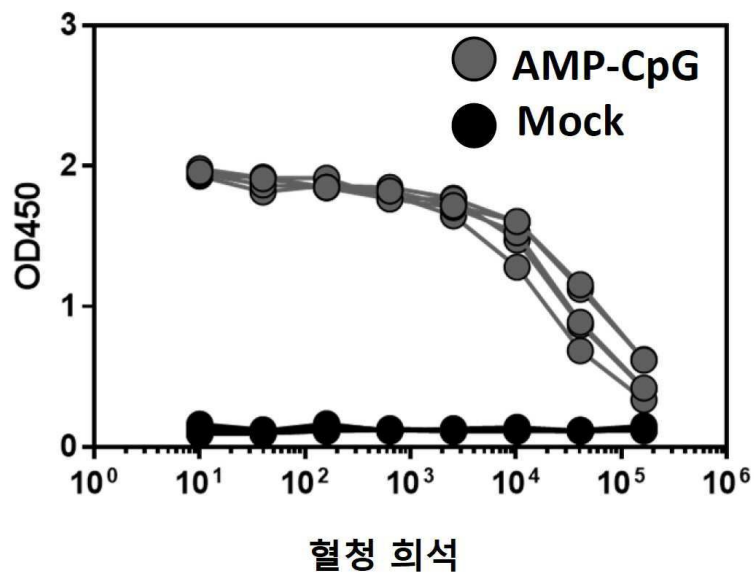
도면6c



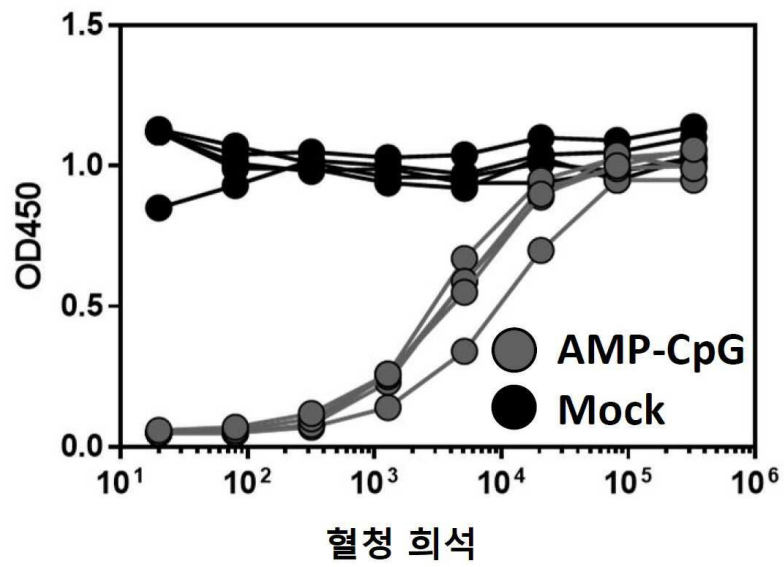
도면7a



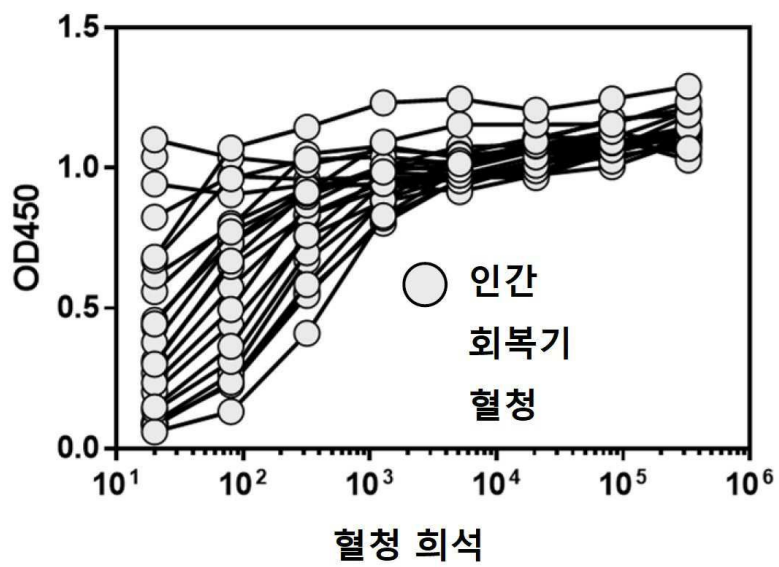
도면7b



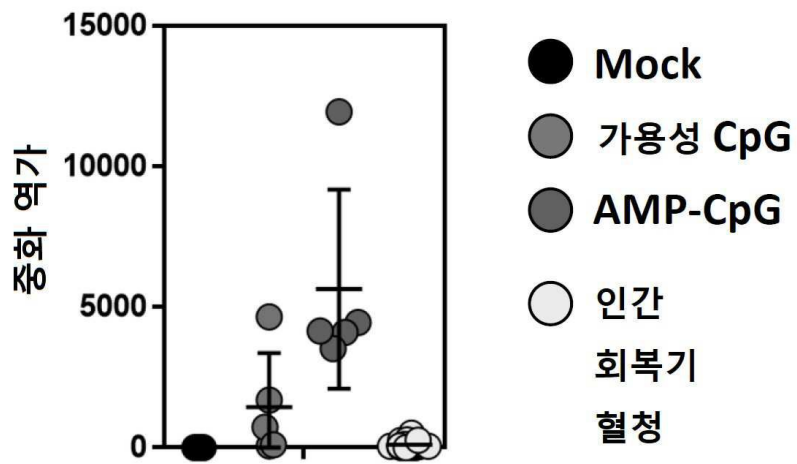
도면8b



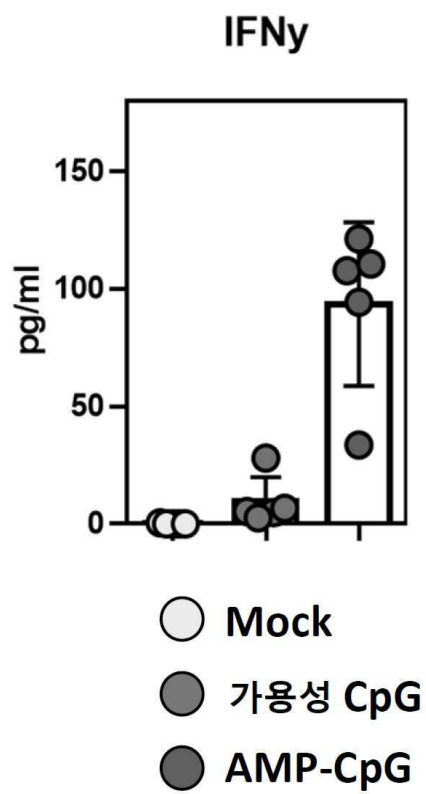
도면8c



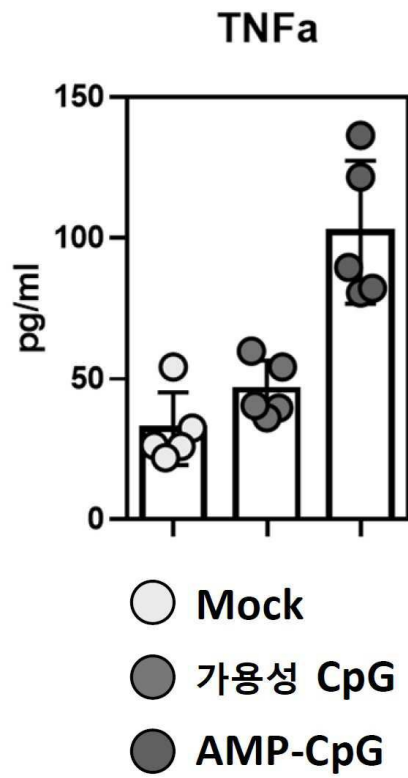
도면8d



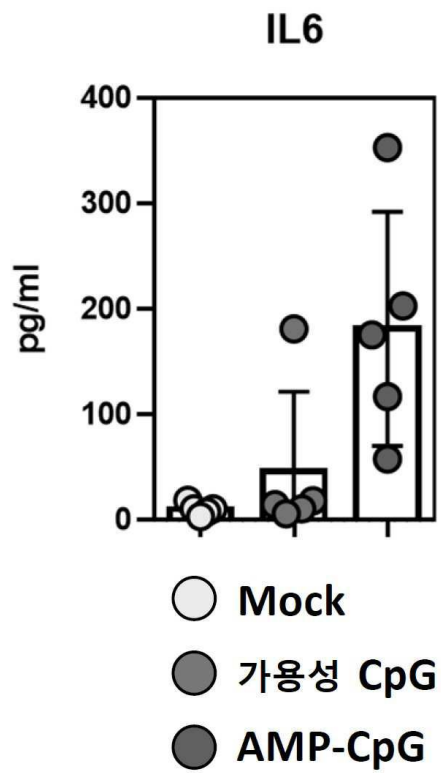
도면9a



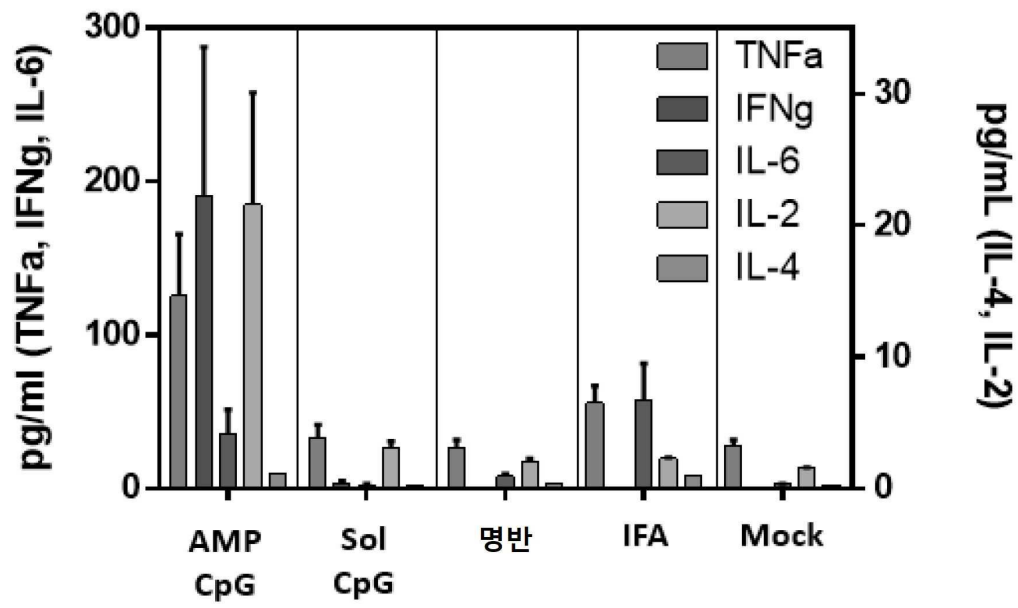
도면9b



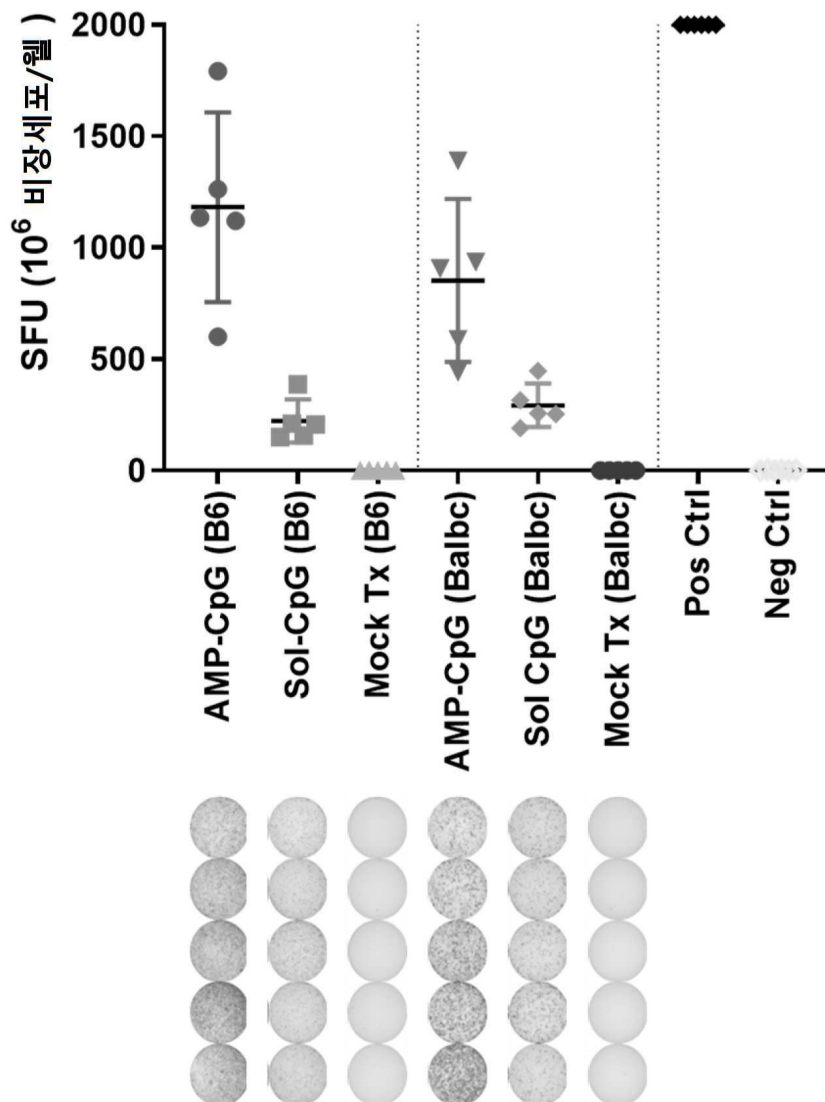
도면9c



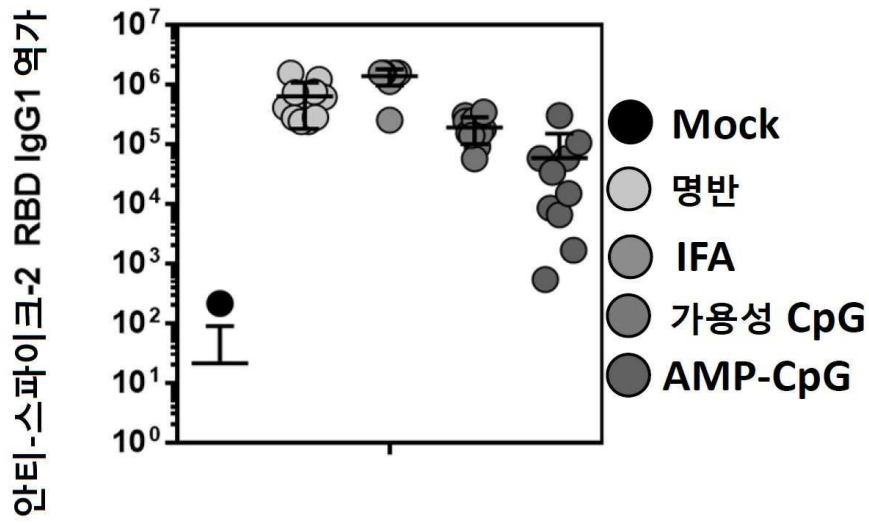
도면10



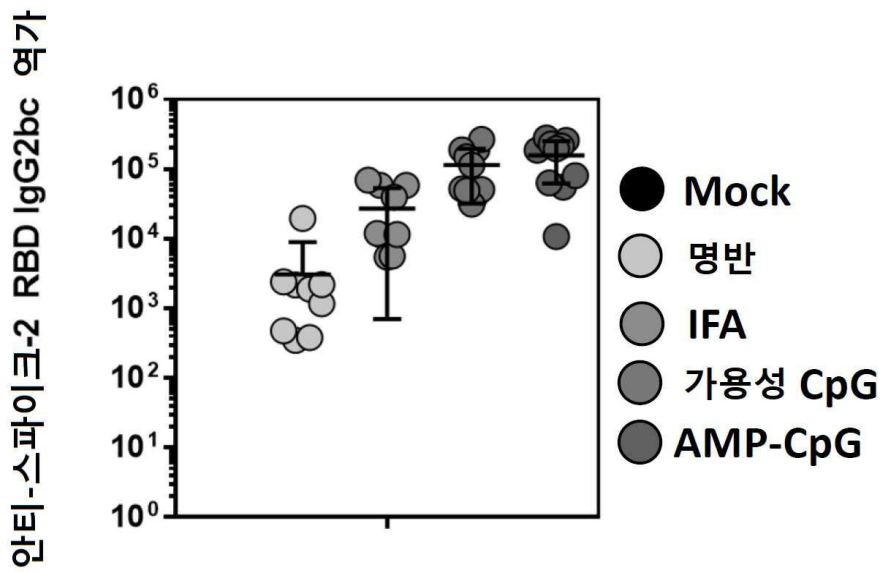
도면11



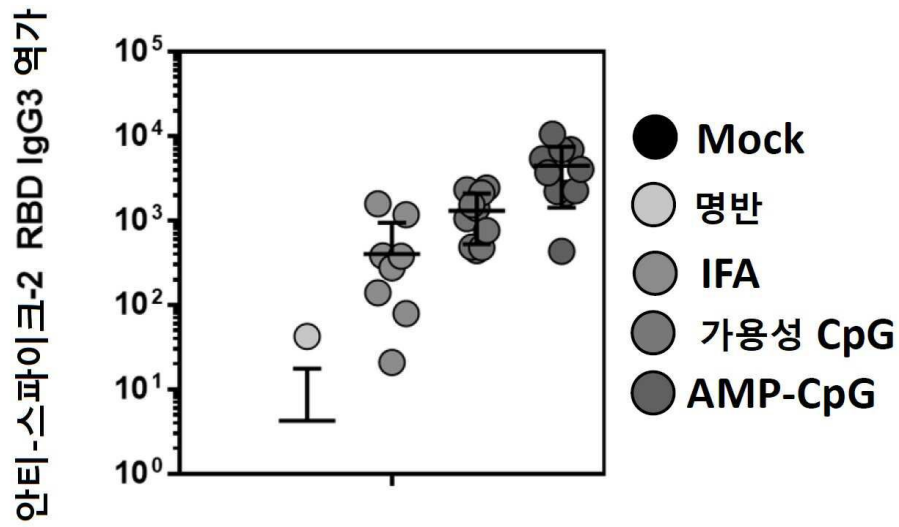
도면12a



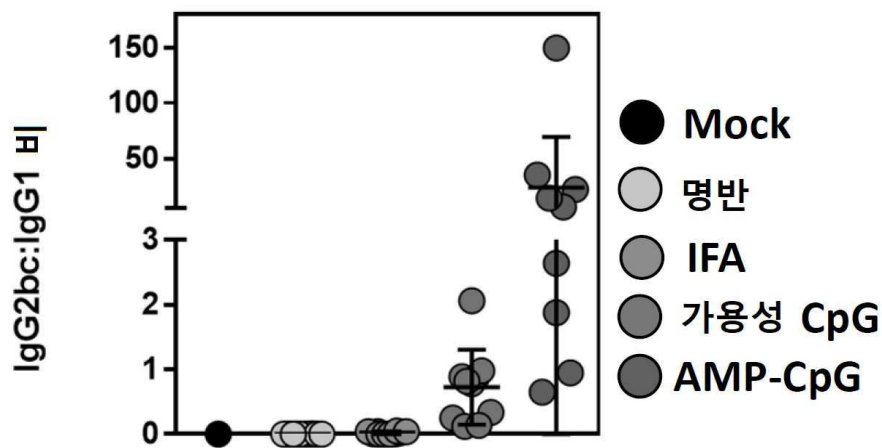
도면12b



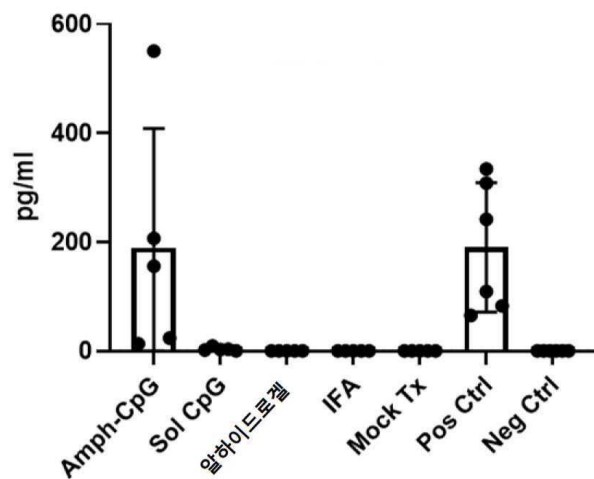
도면12c



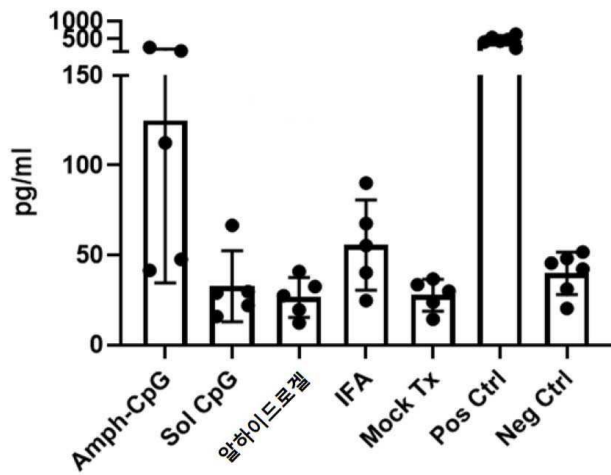
도면12d



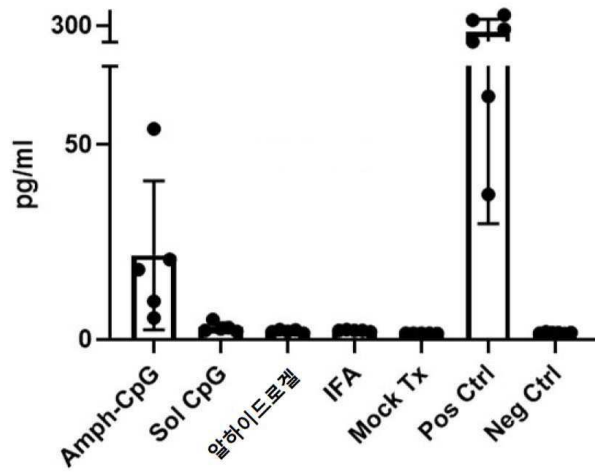
도면13a



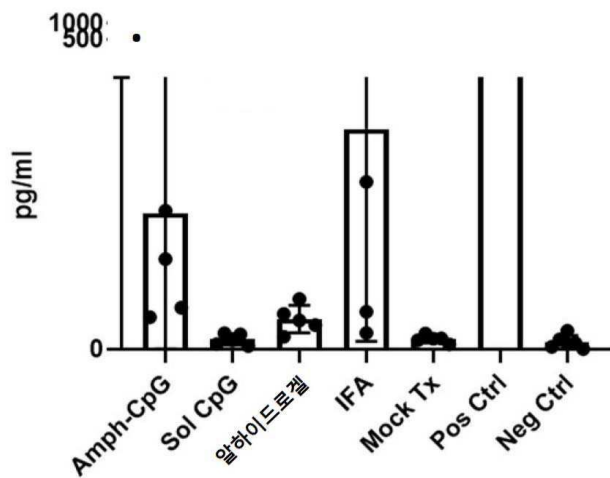
도면13b



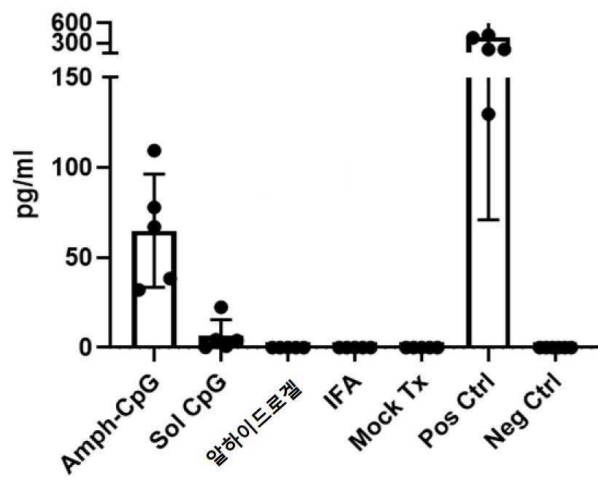
도면13c



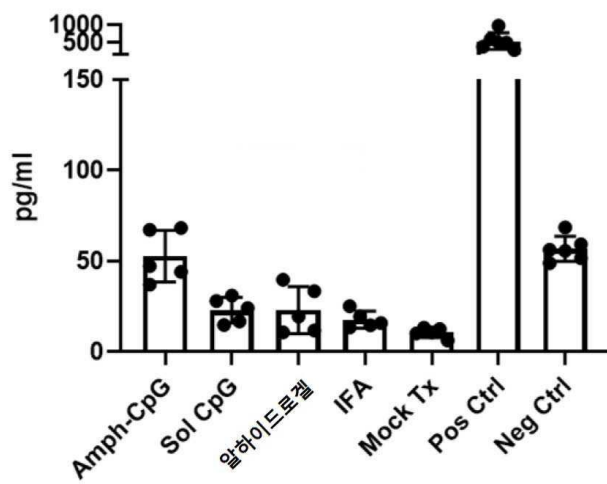
도면13d



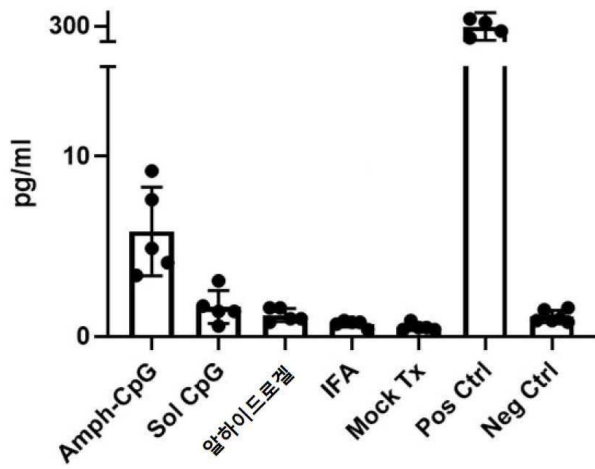
도면14a



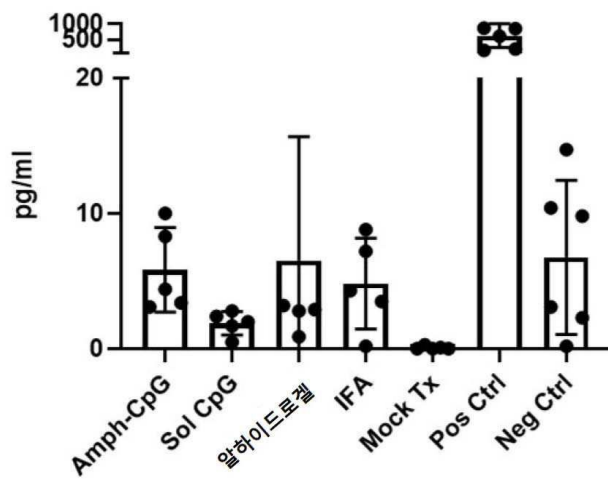
도면14b



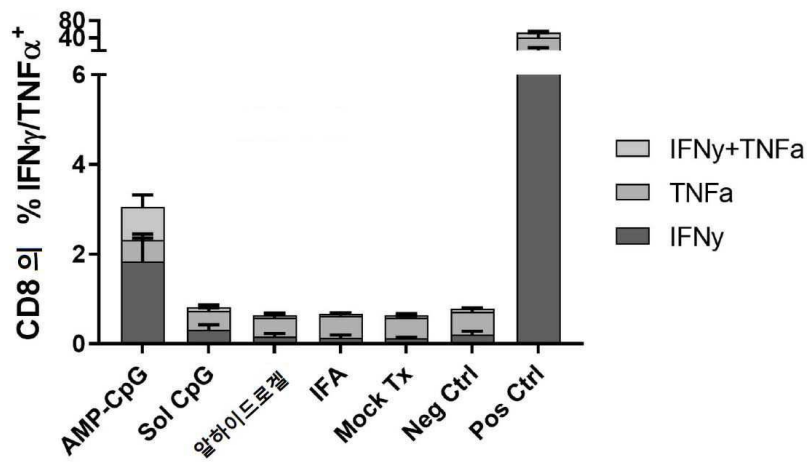
도면14c



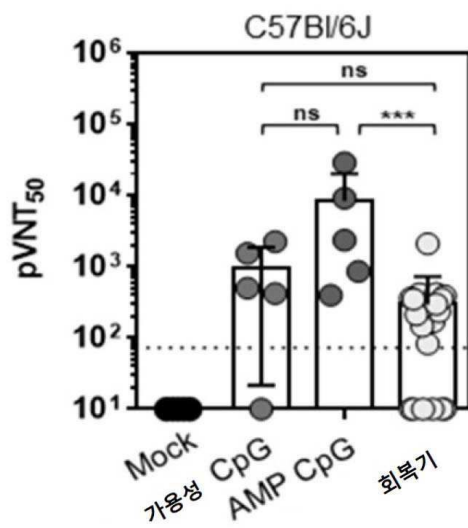
도면14d



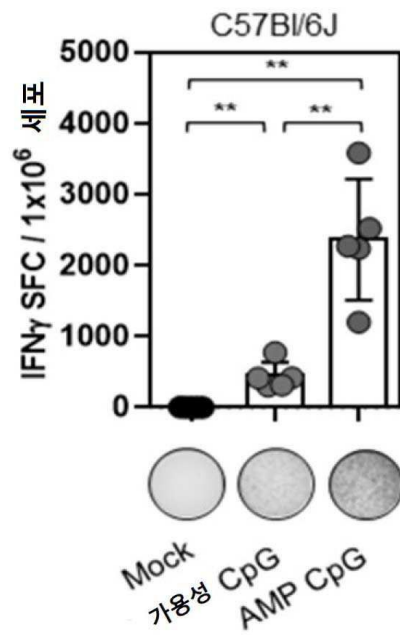
도면15



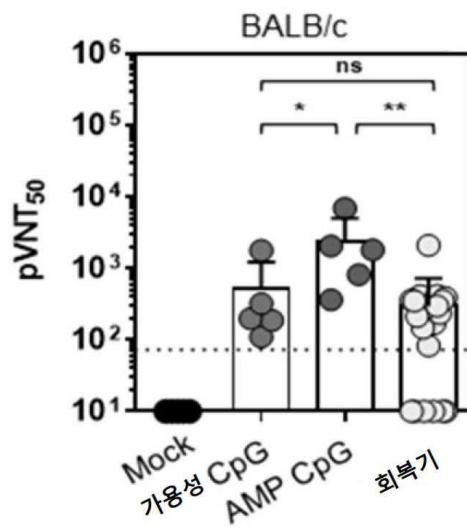
도면16a



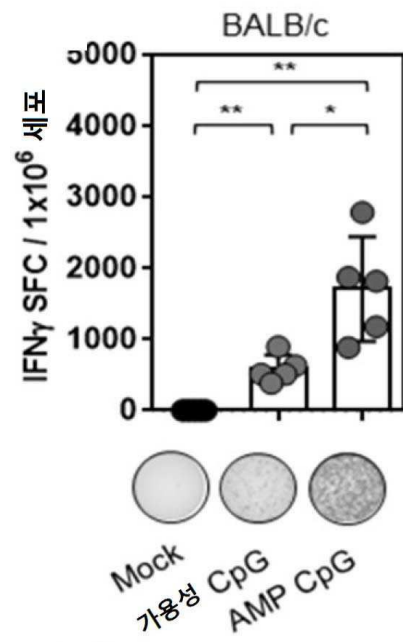
도면16b



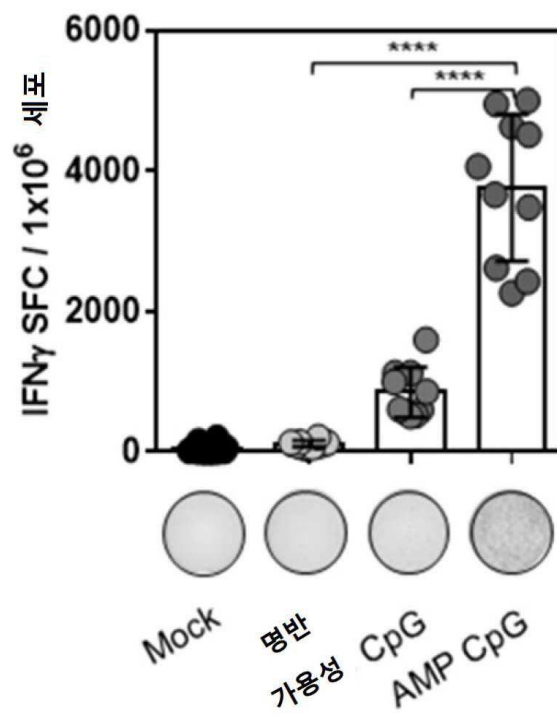
도면16c



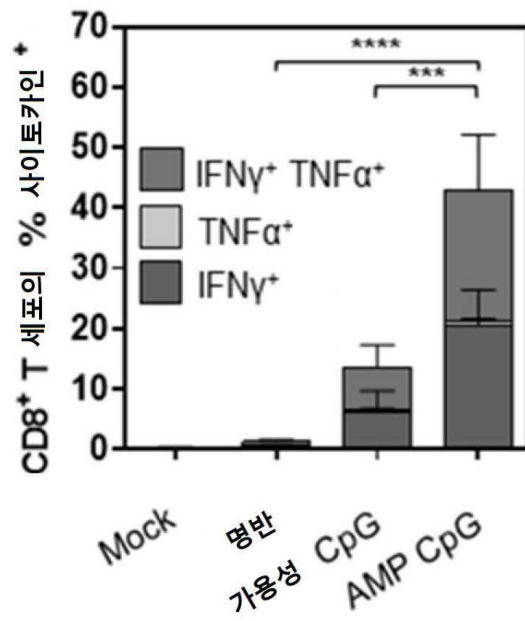
도면16d



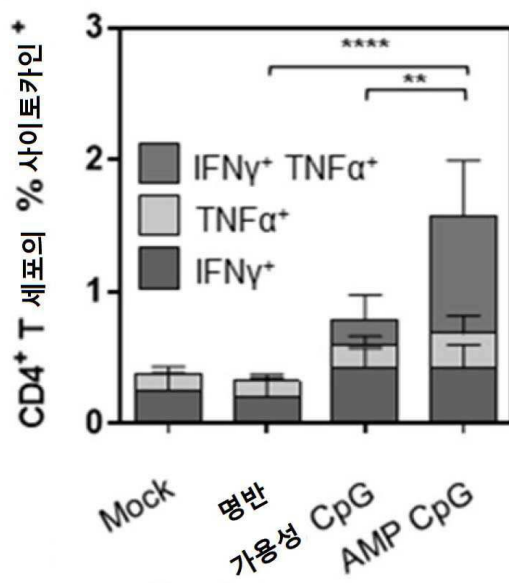
도면17a



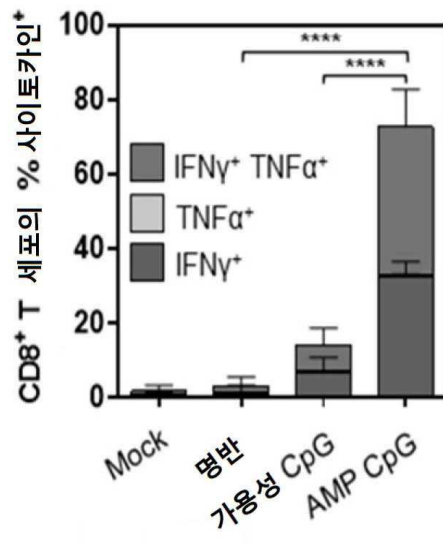
도면17b



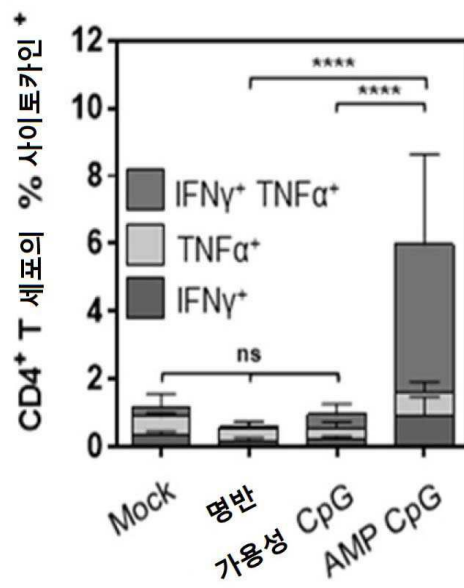
도면17c



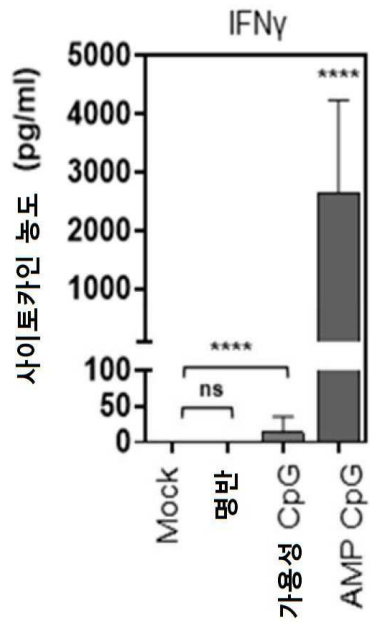
도면18a



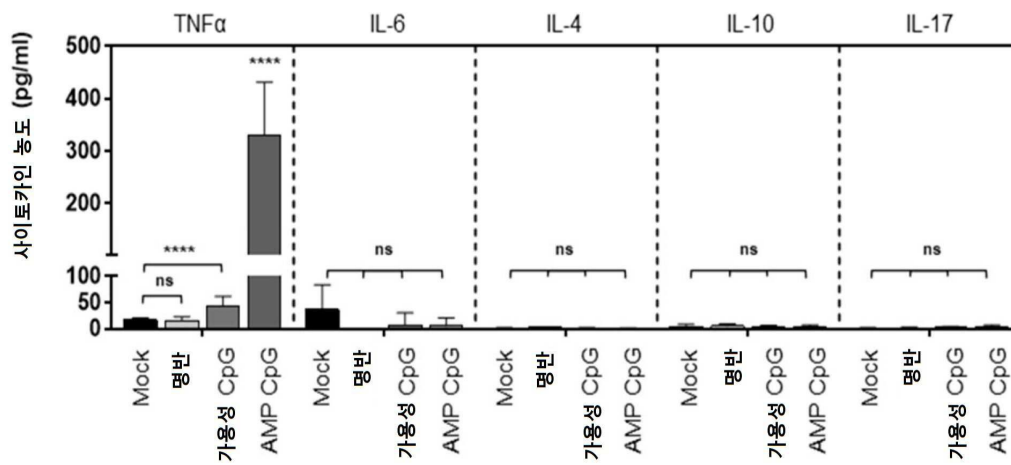
도면18b



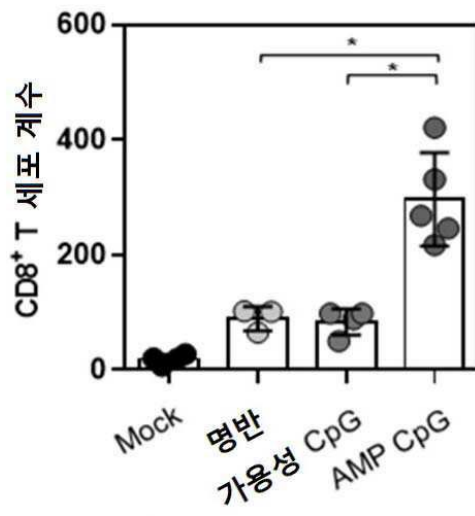
도면18c



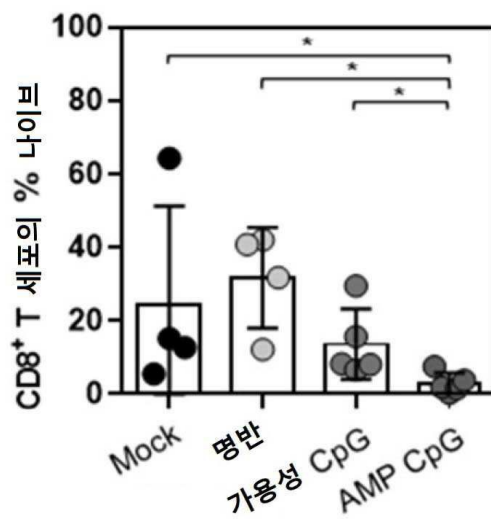
도면18d



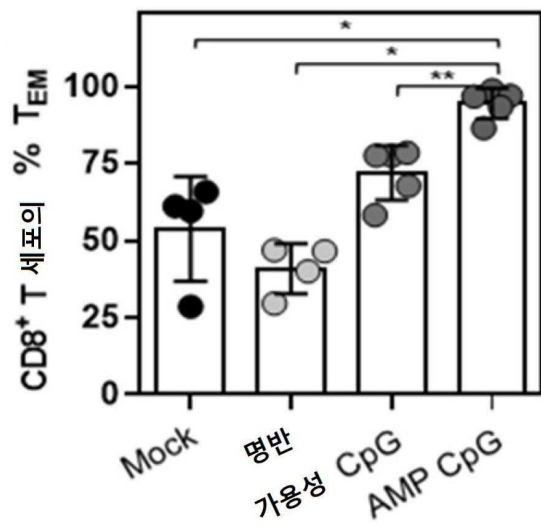
도면19a



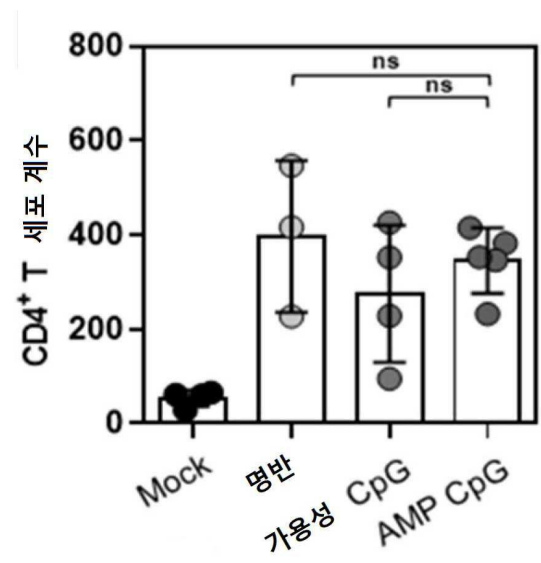
도면19b



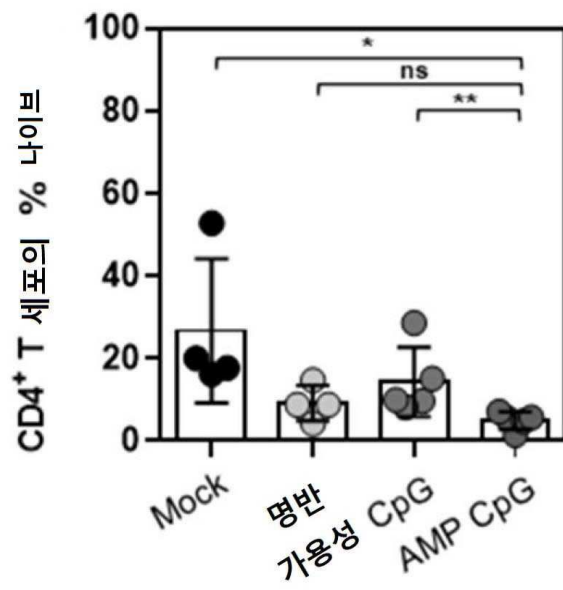
도면19c



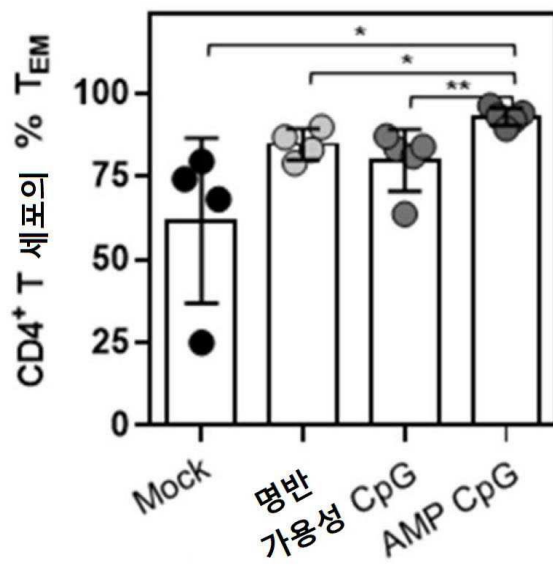
도면19d



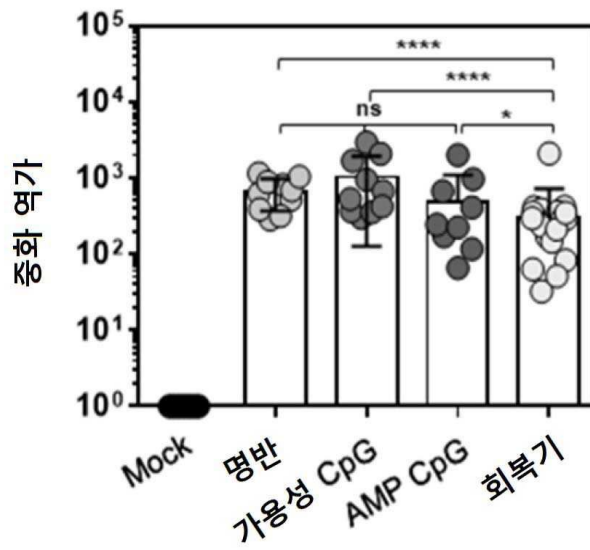
도면19e



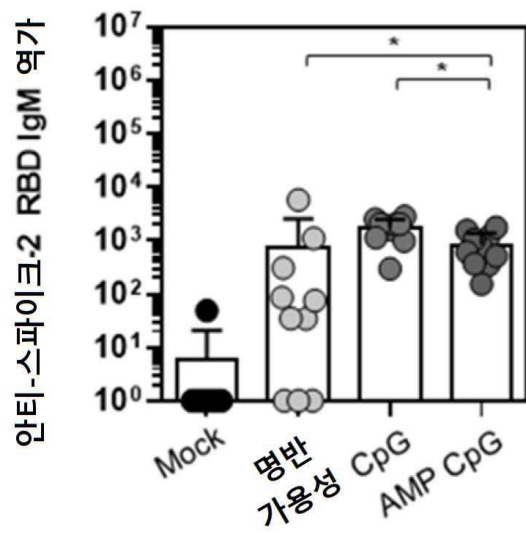
도면19f



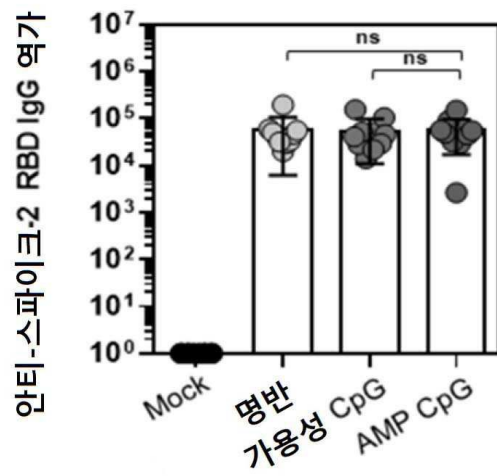
도면20a



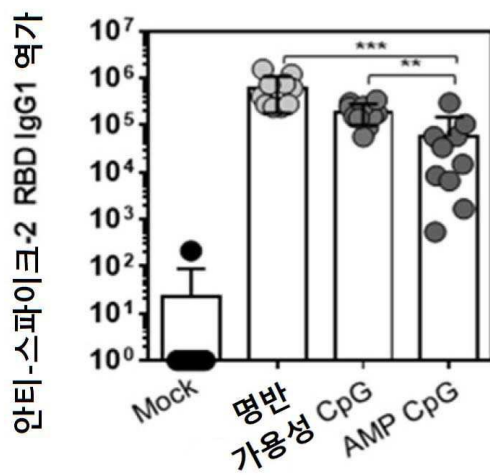
도면20b



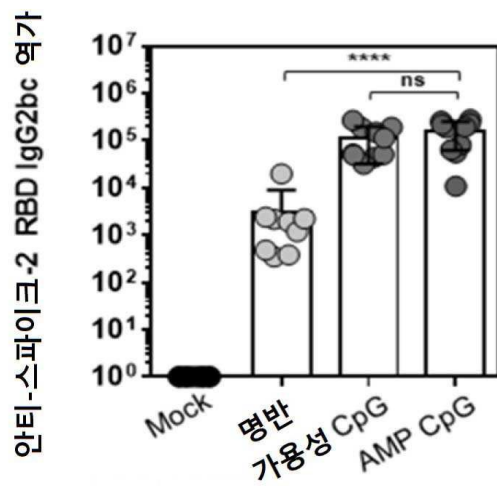
도면20c



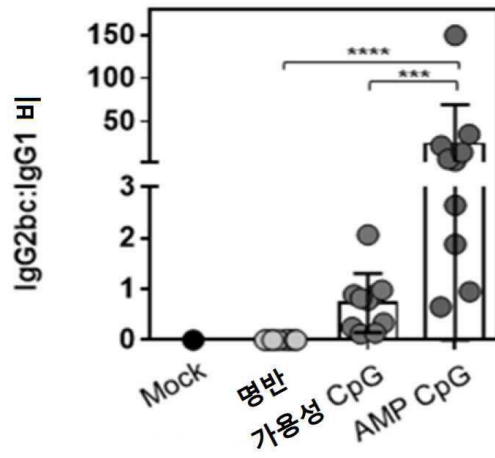
도면20d



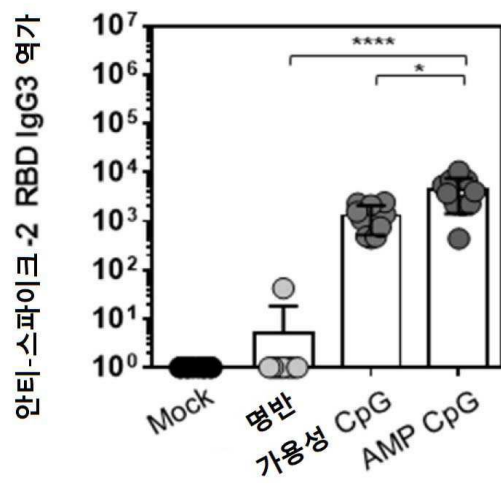
도면20e



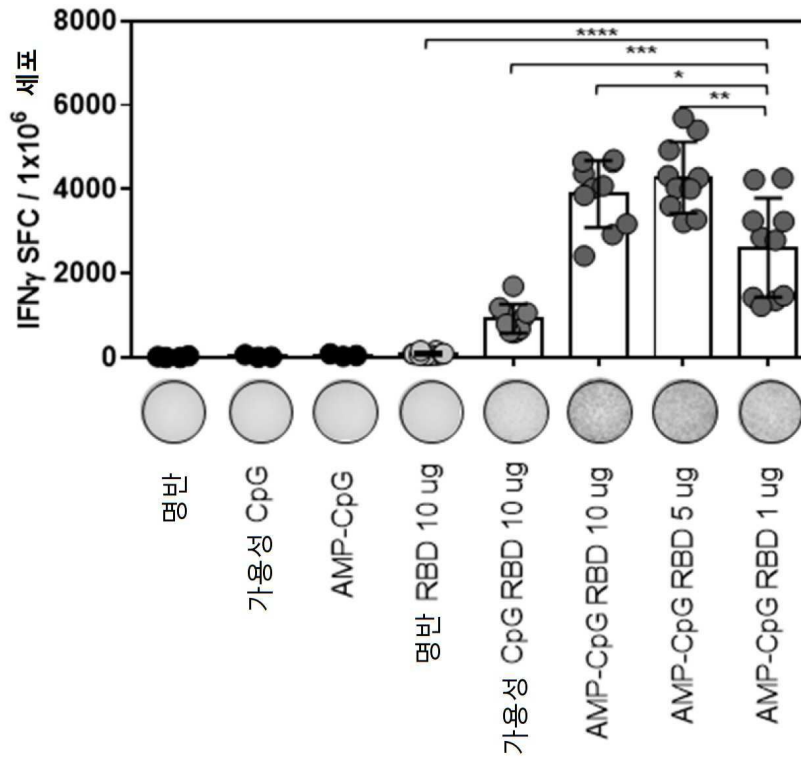
도면20f



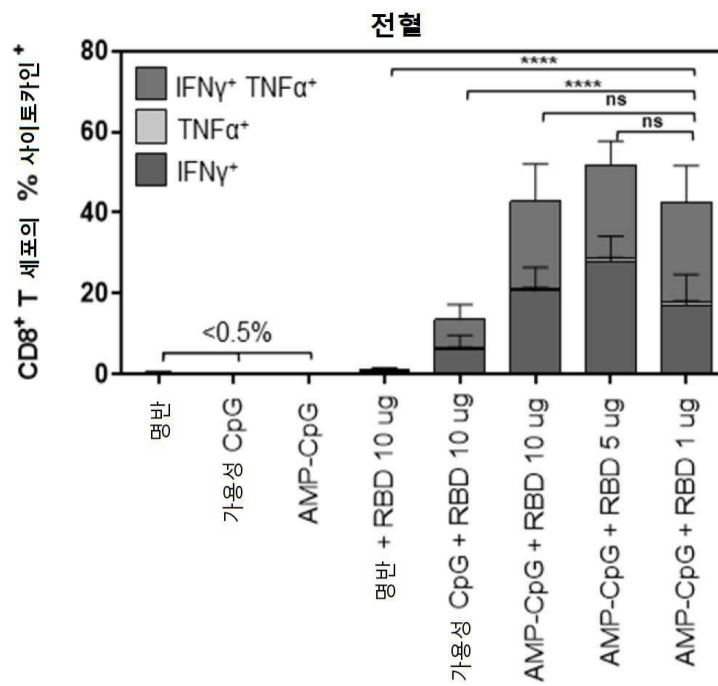
도면20g



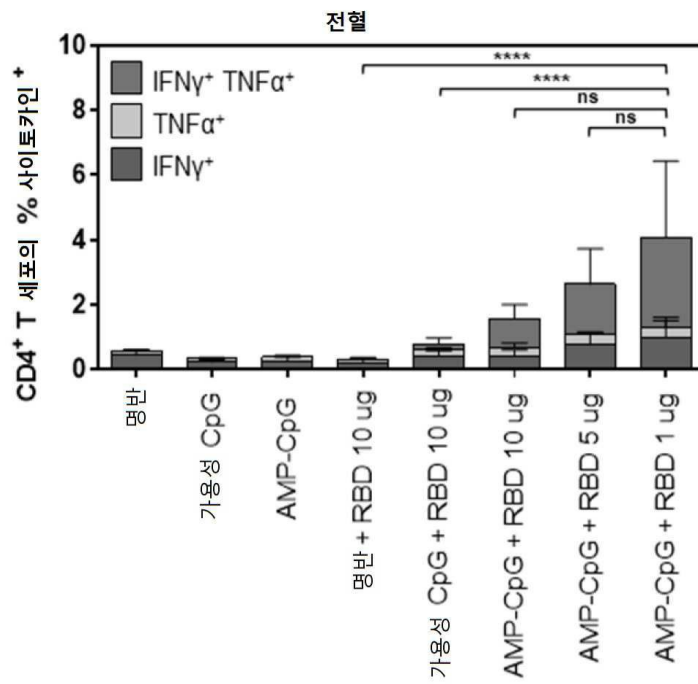
도면21a



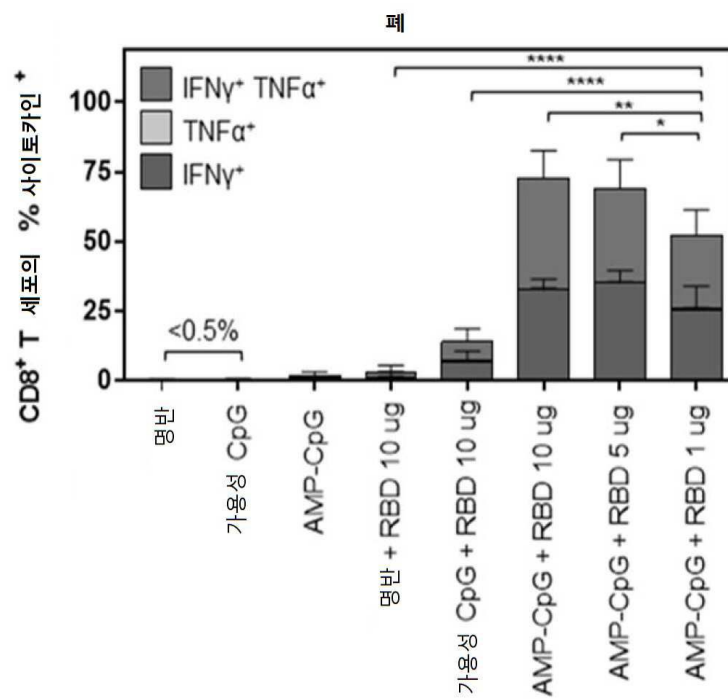
도면21b



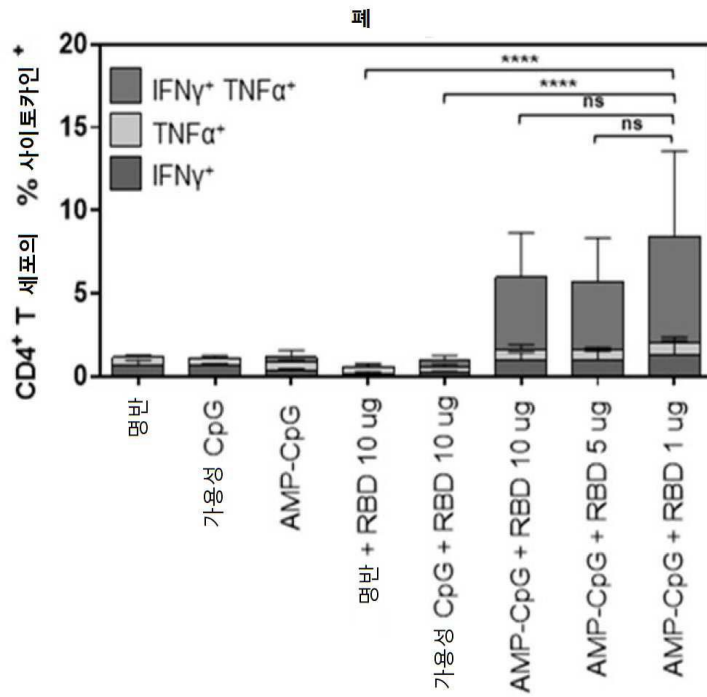
도면21c



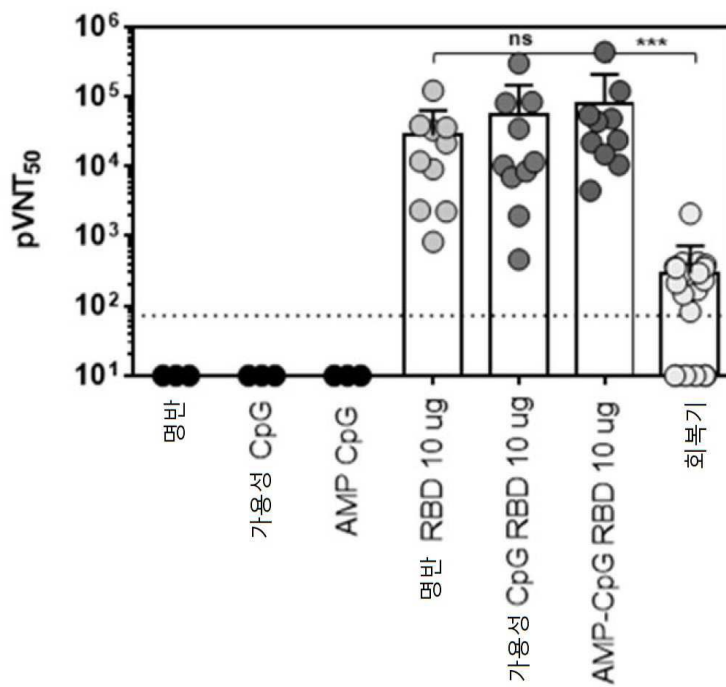
도면21d



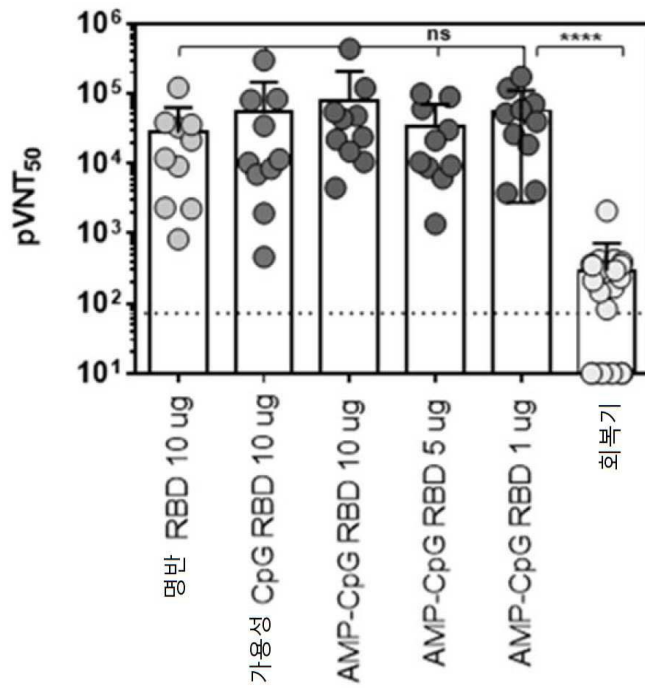
도면21e



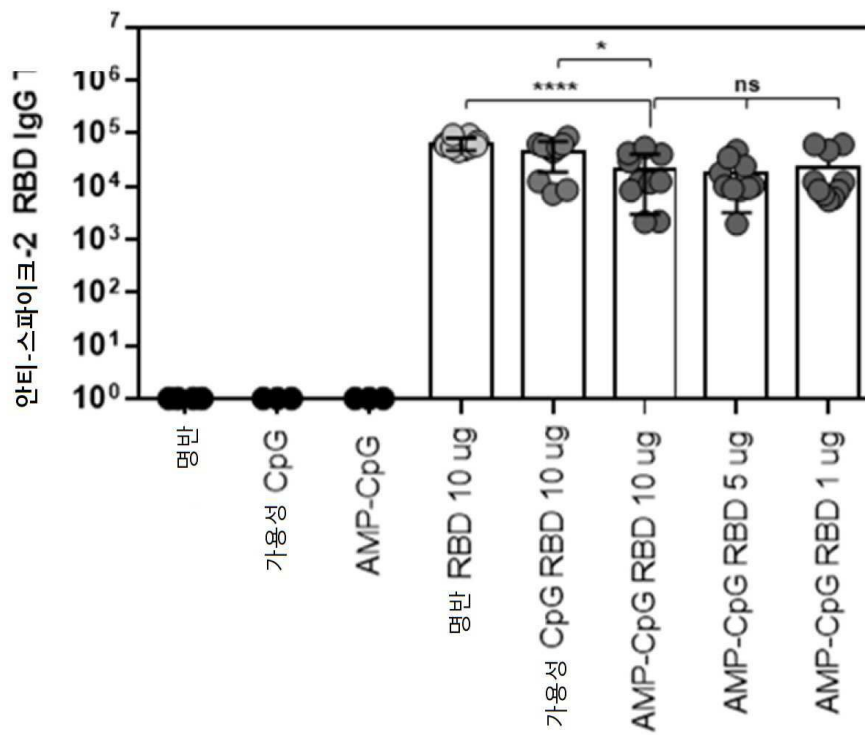
도면22a



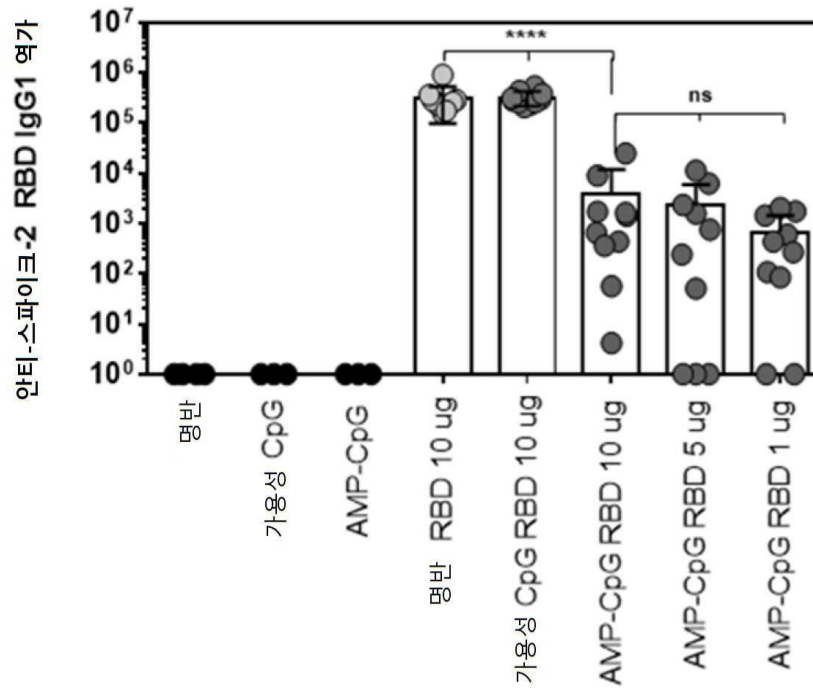
도면22b



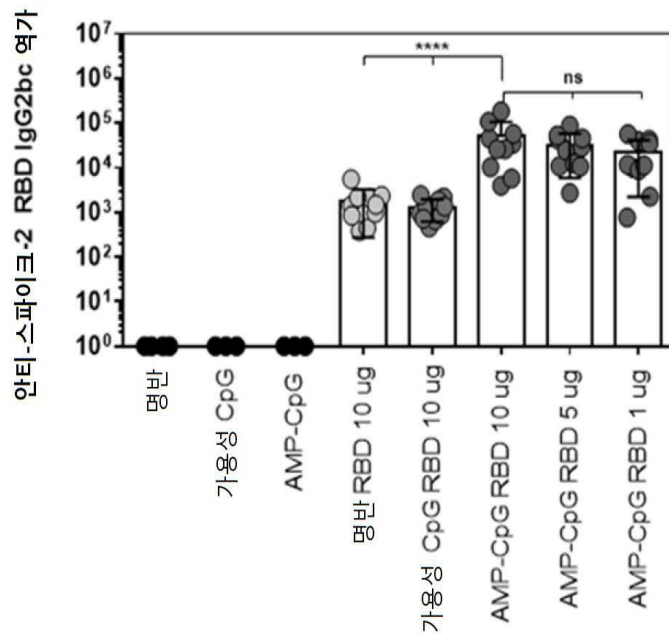
도면22c



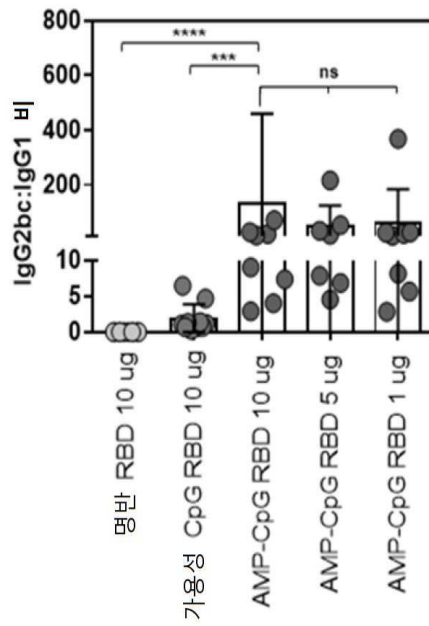
도면22d



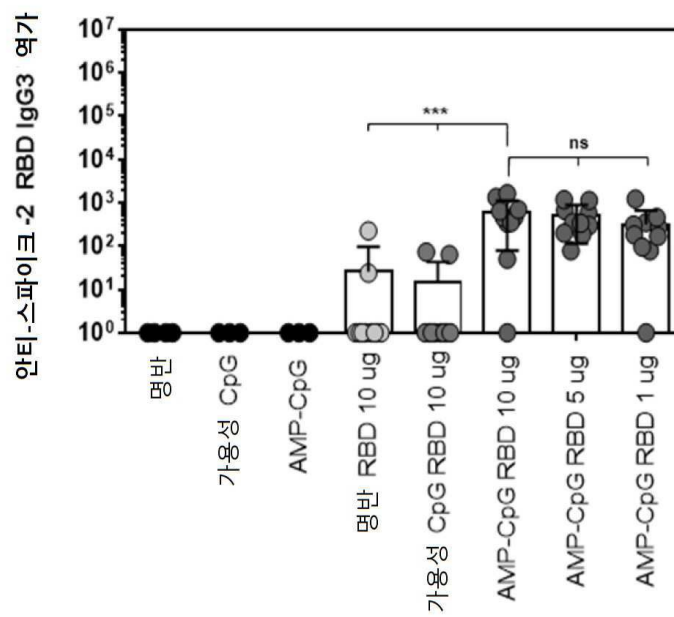
도면22e



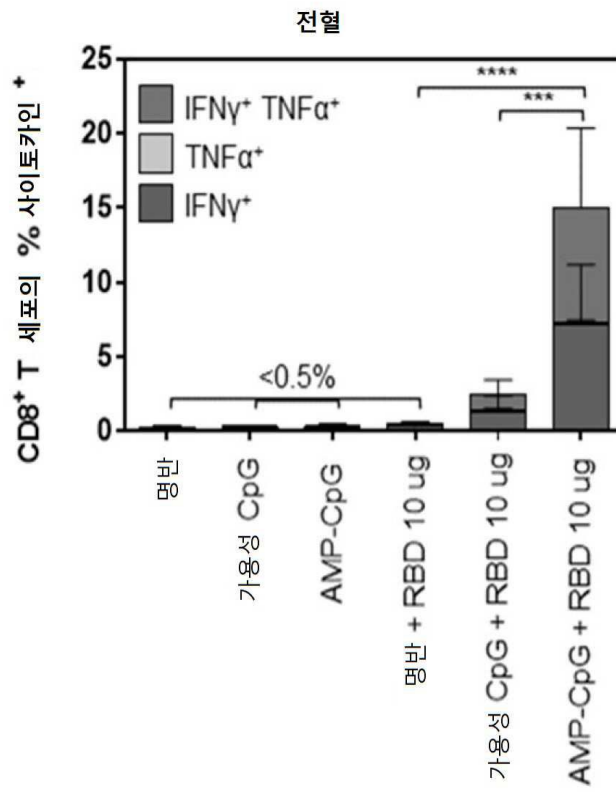
도면22f



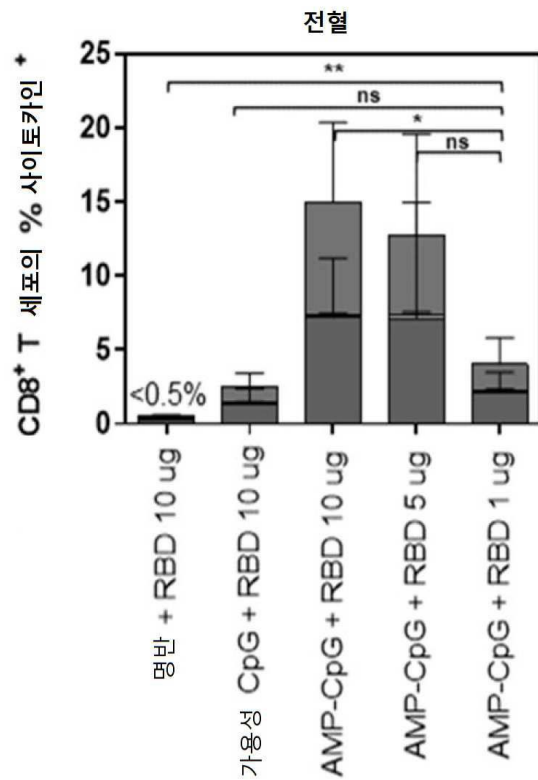
도면22g



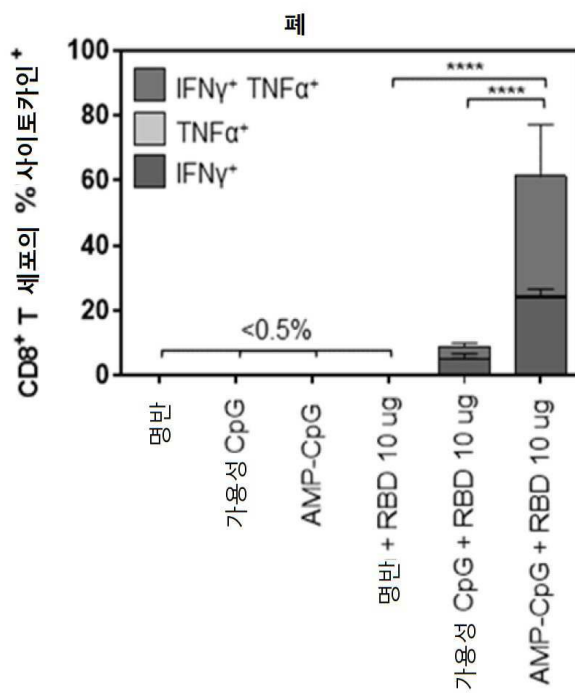
도면23a



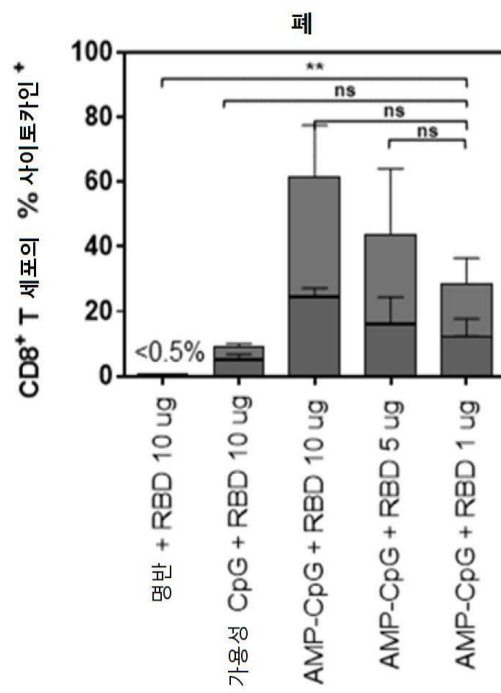
도면23b



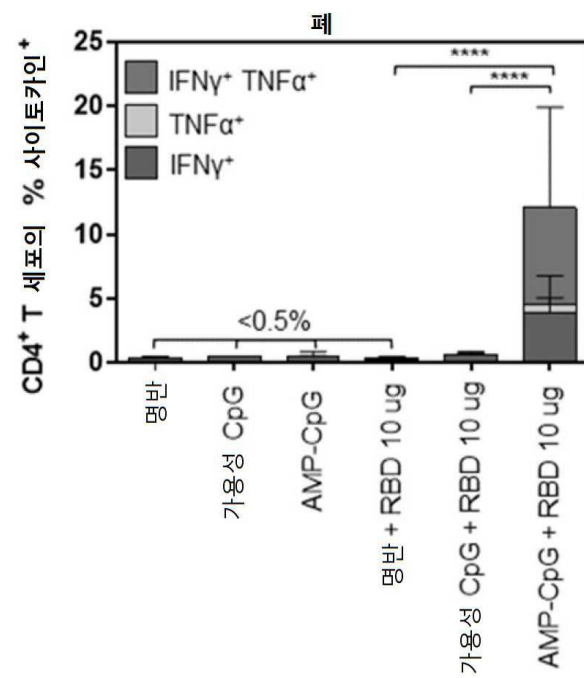
도면23c



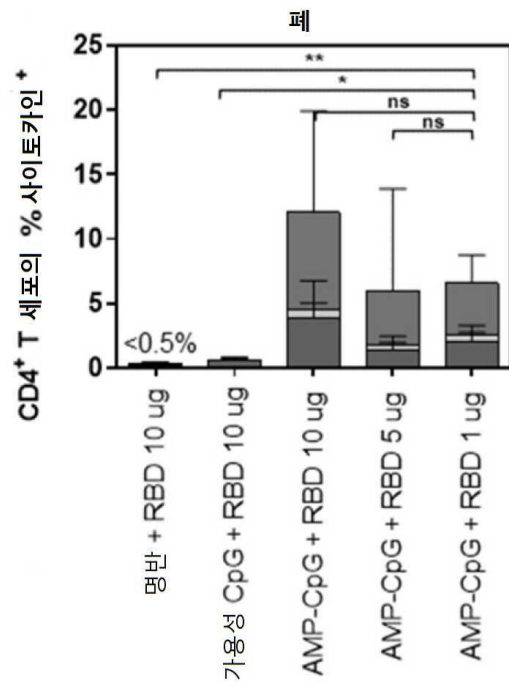
도면23d



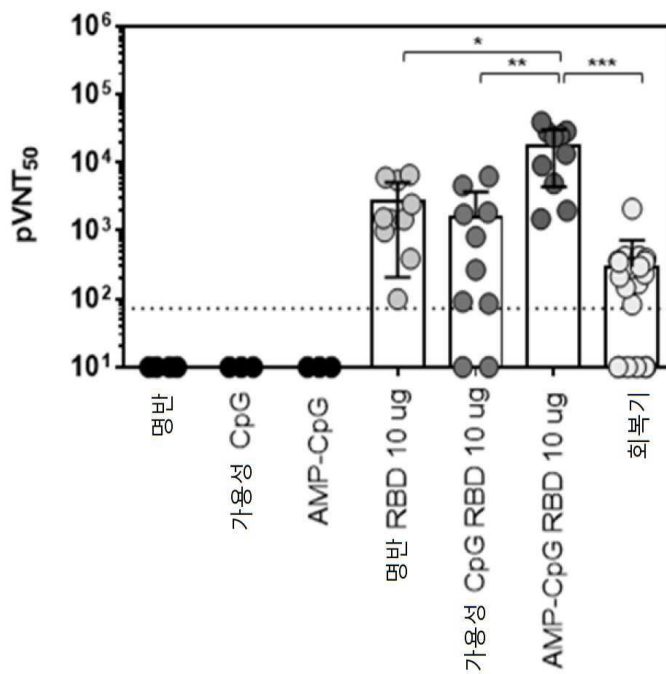
도면23e



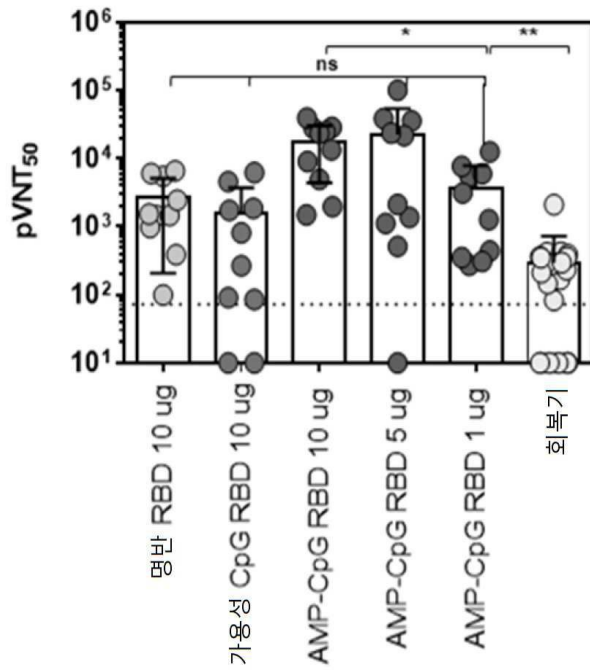
도면23f



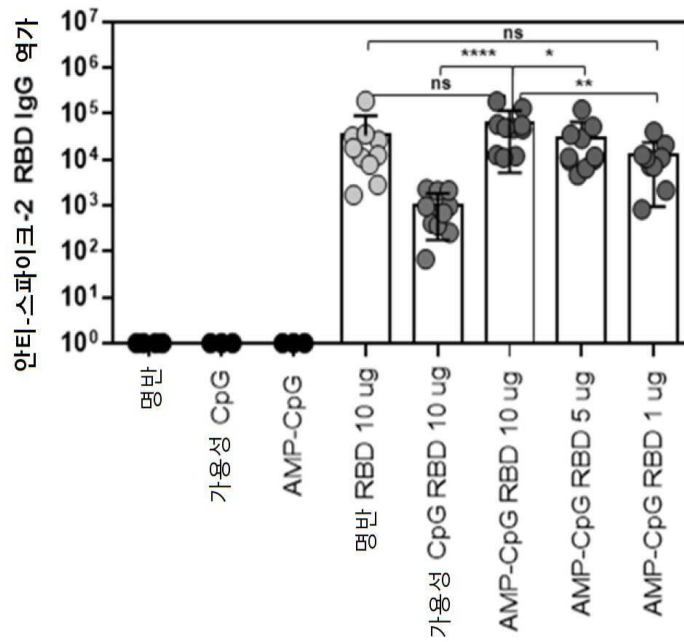
도면24a



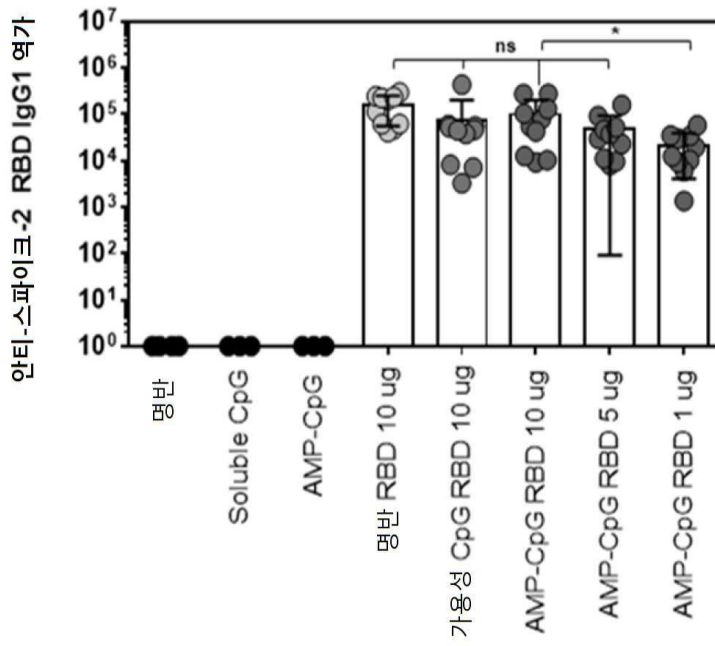
도면24b



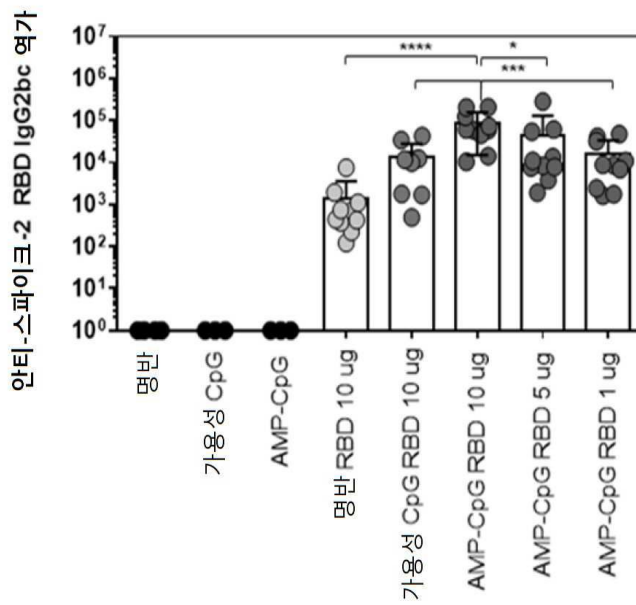
도면24c



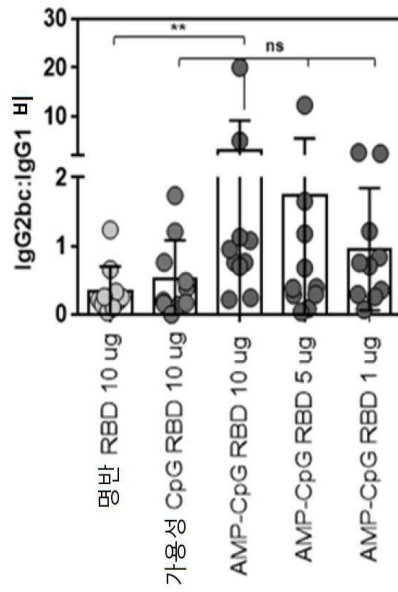
도면24d



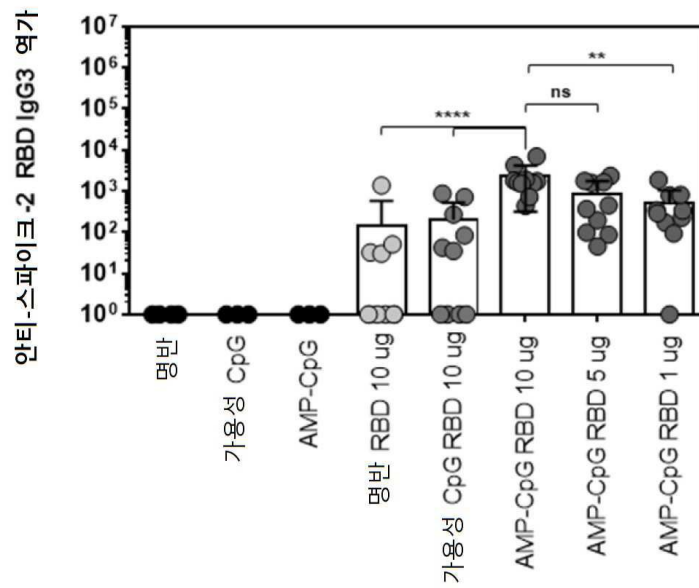
도면24e



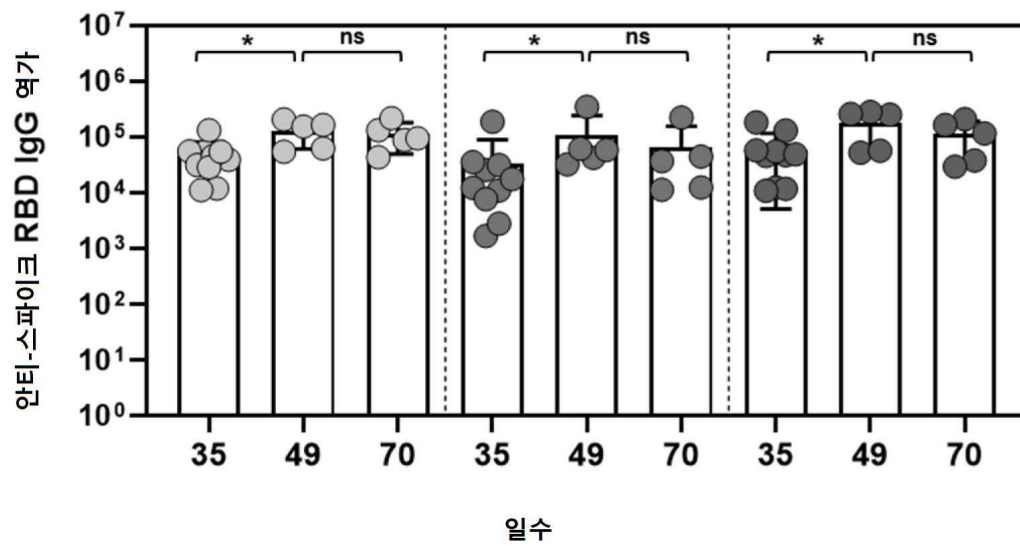
도면24f



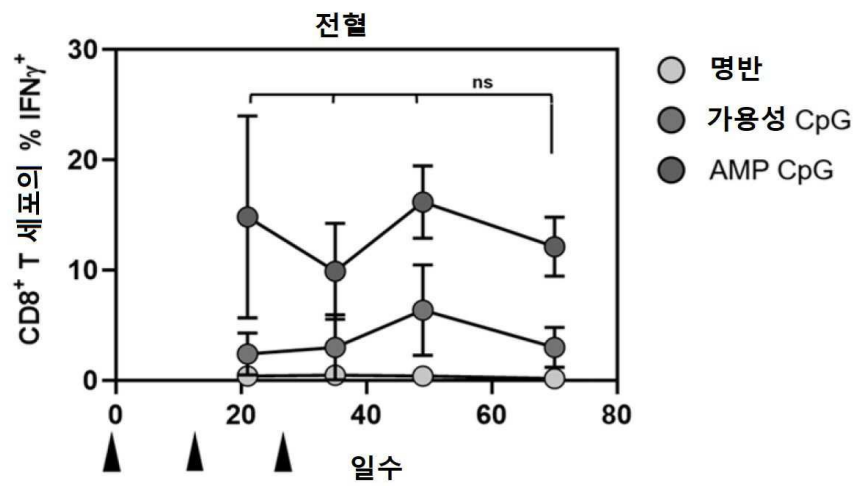
도면24g



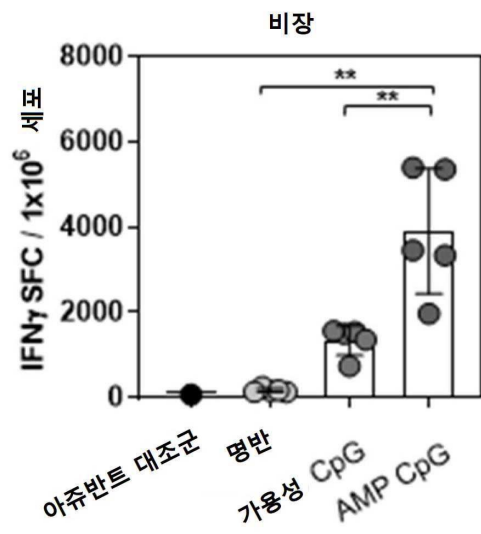
도면25a



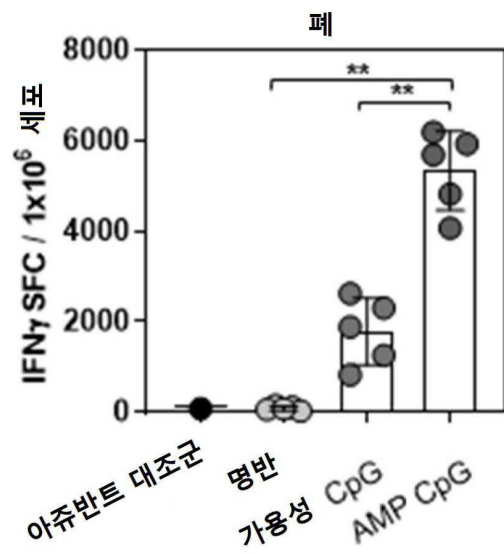
도면25b



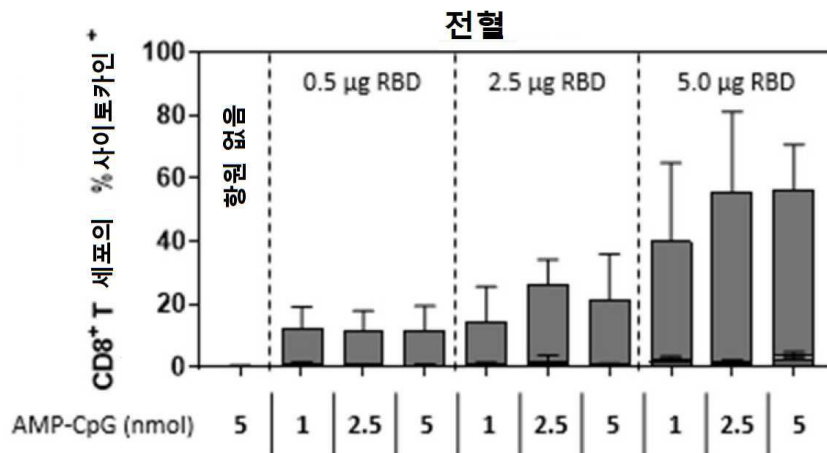
도면25c



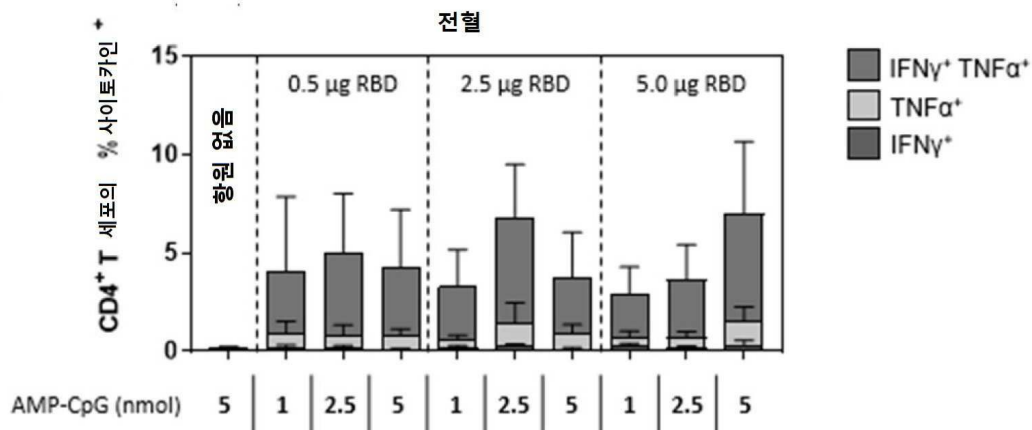
도면25d



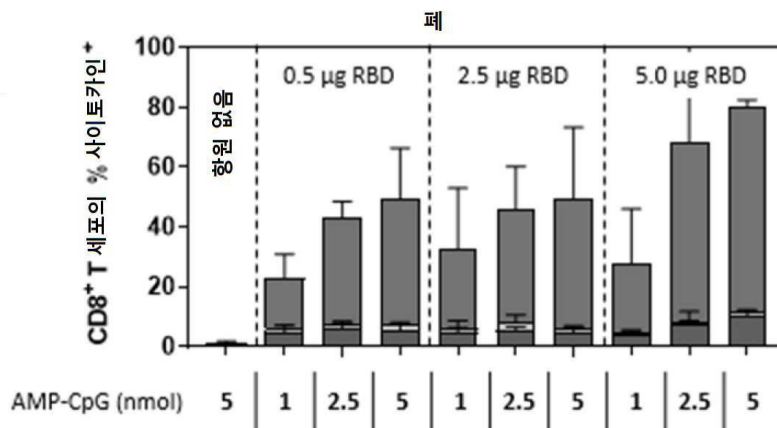
도면26a



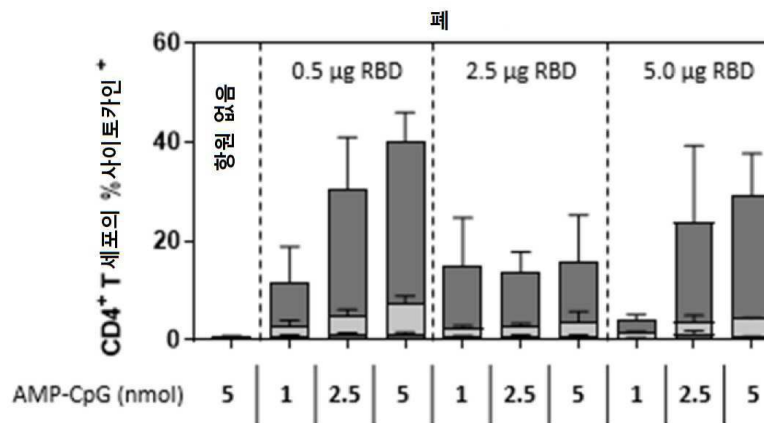
도면26b



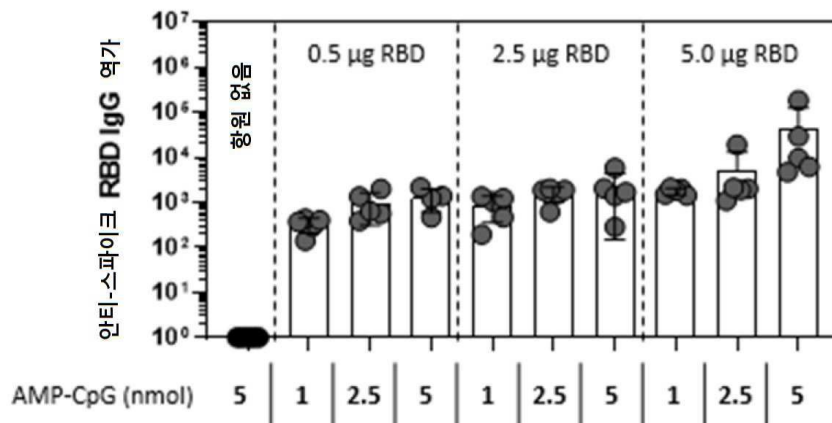
도면26c



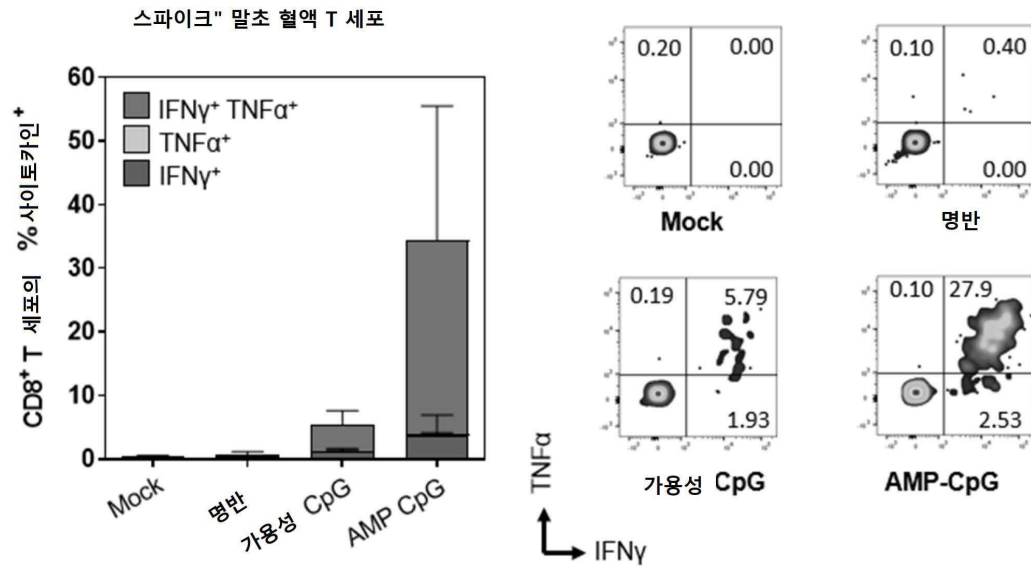
도면26d



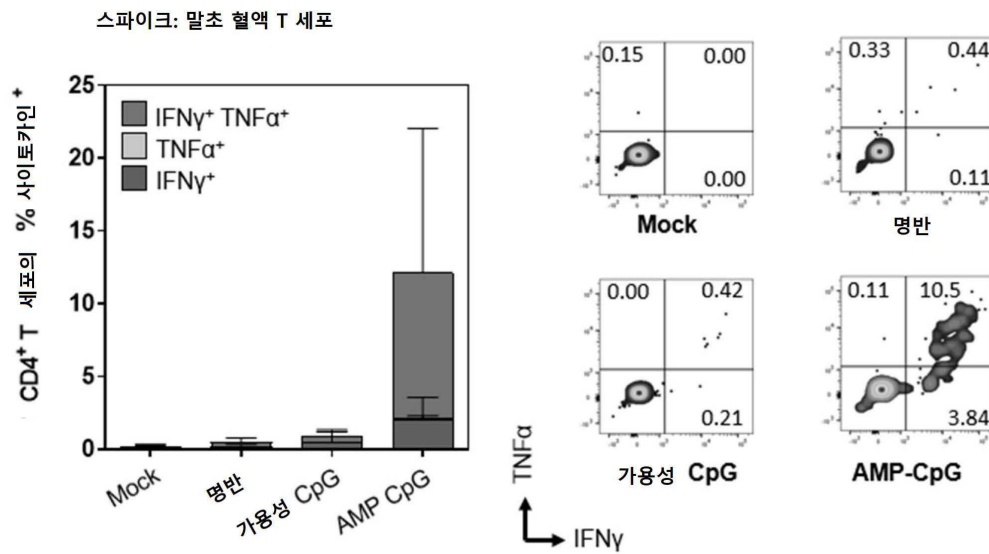
도면26e



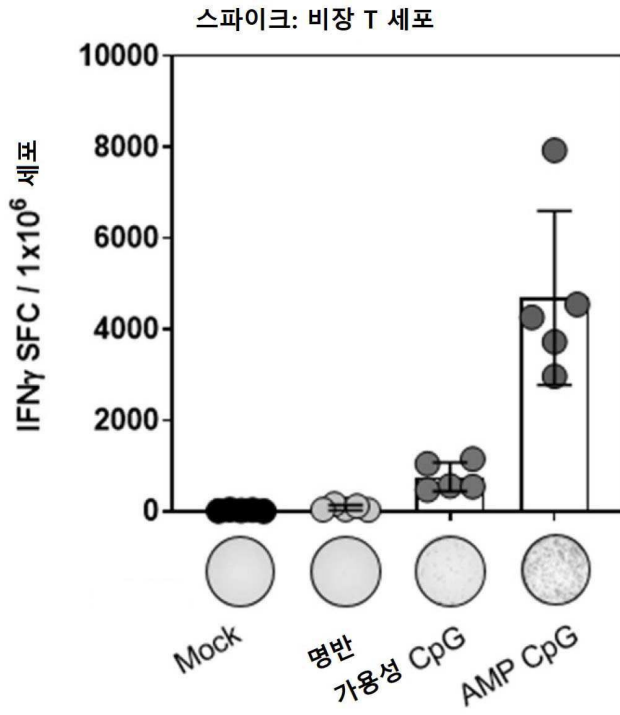
도면27



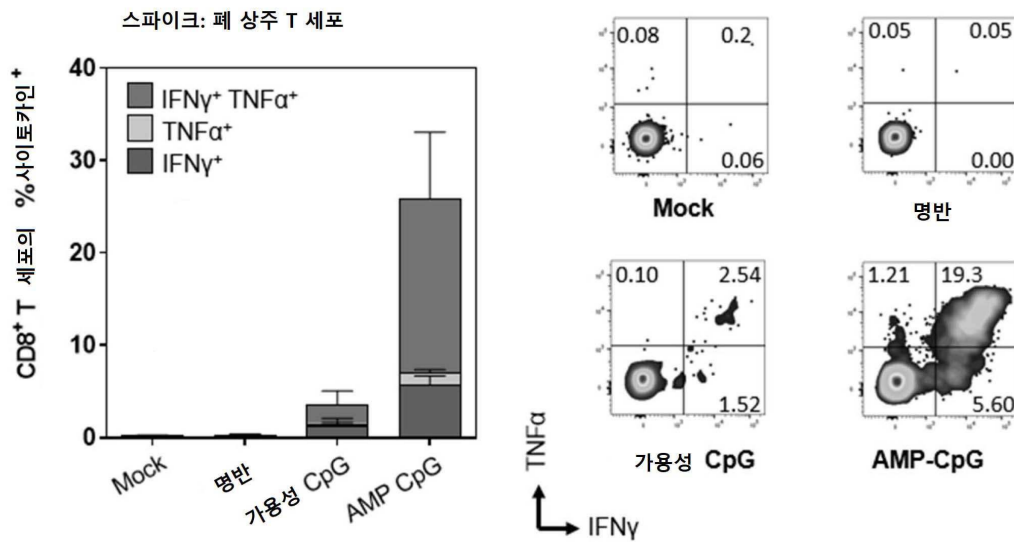
도면28



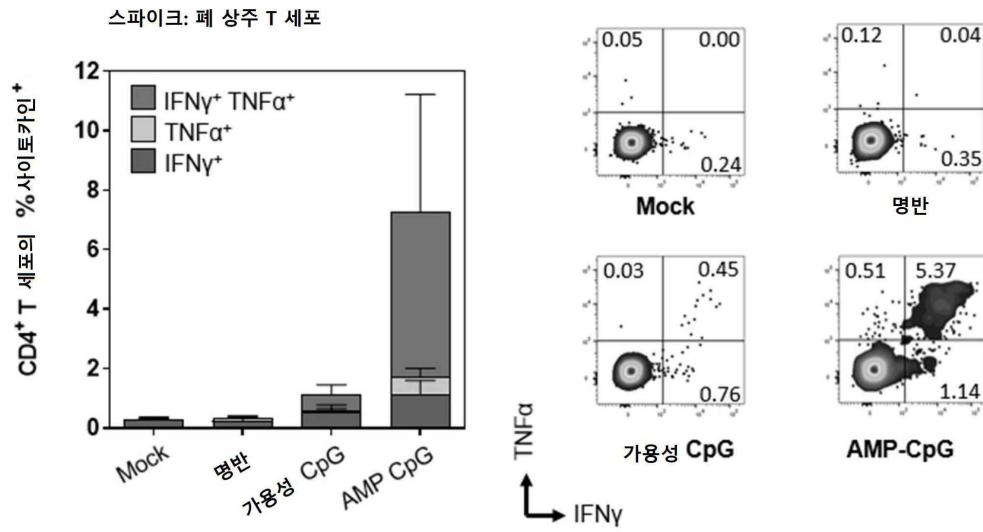
도면29



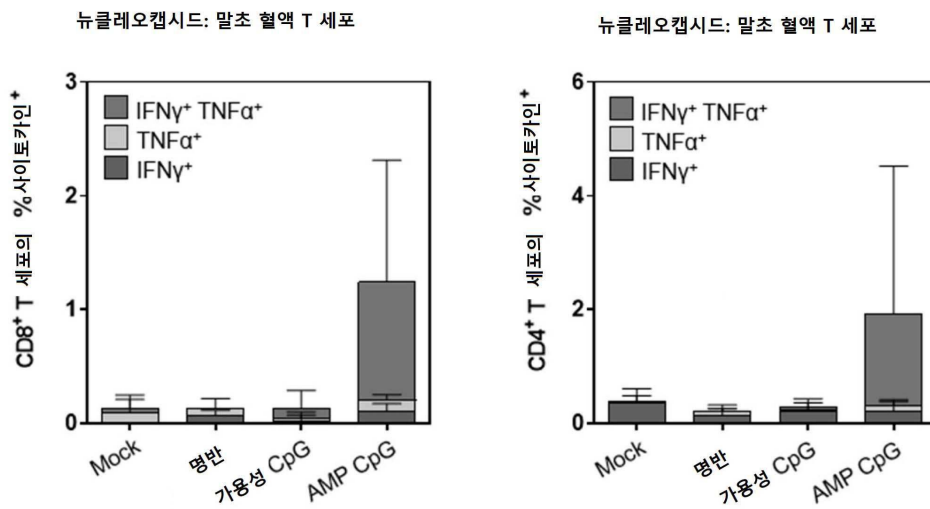
도면30



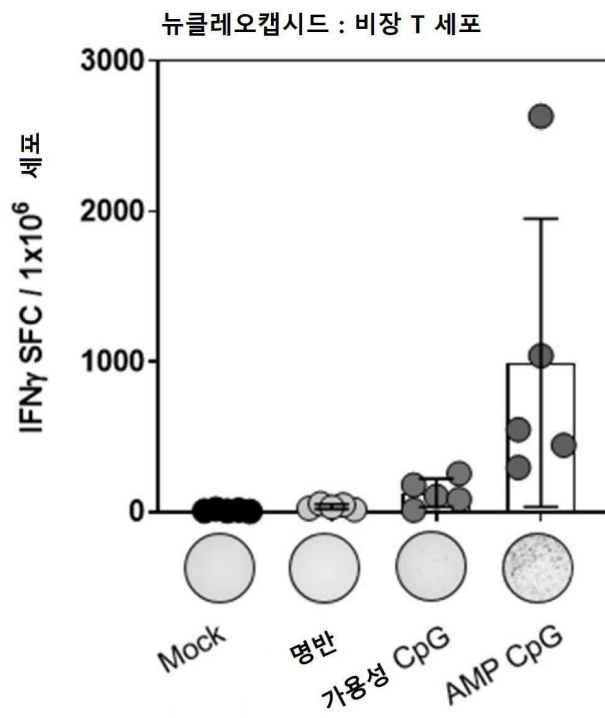
도면31



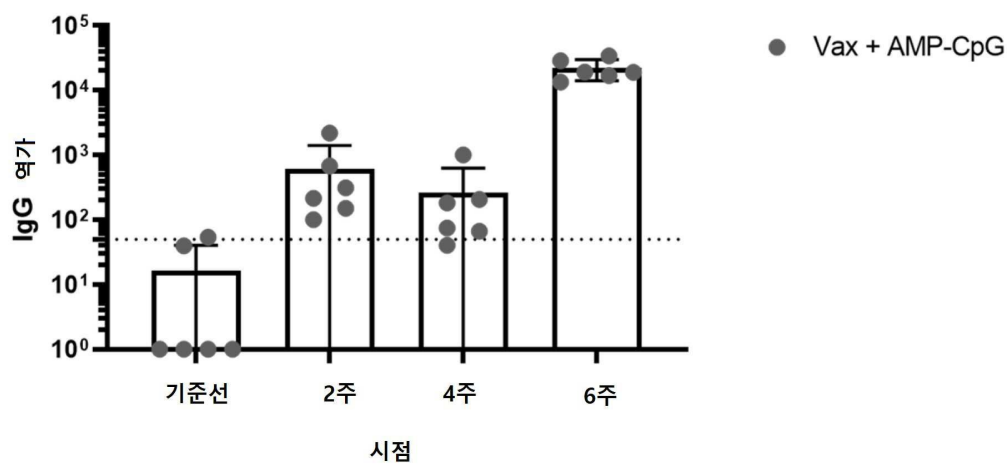
도면32



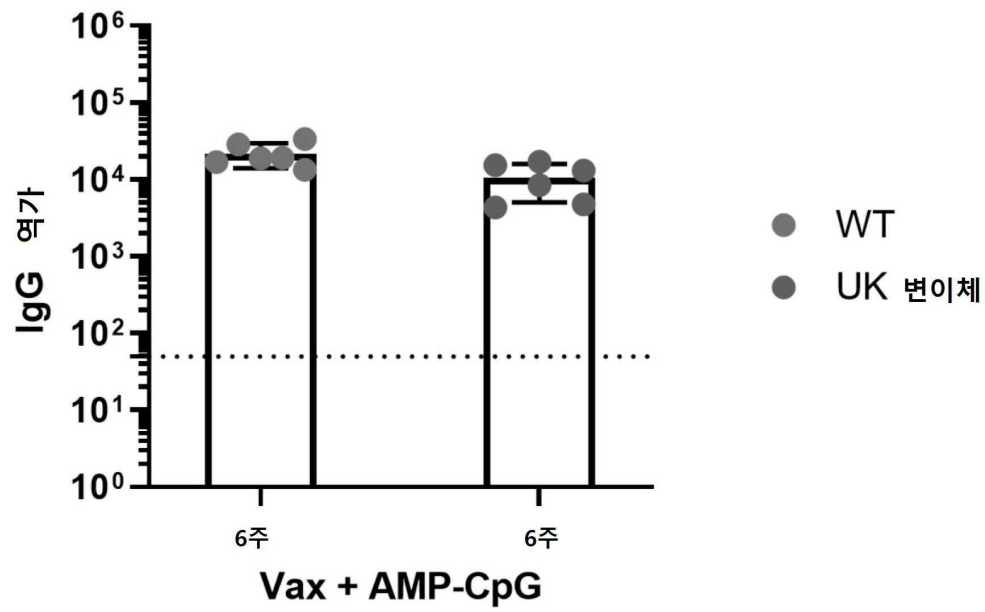
도면33



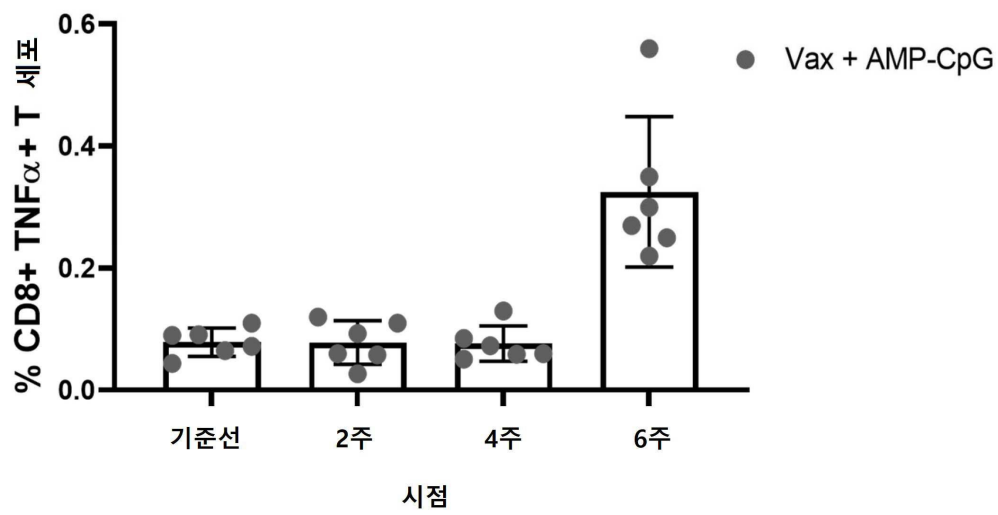
도면34



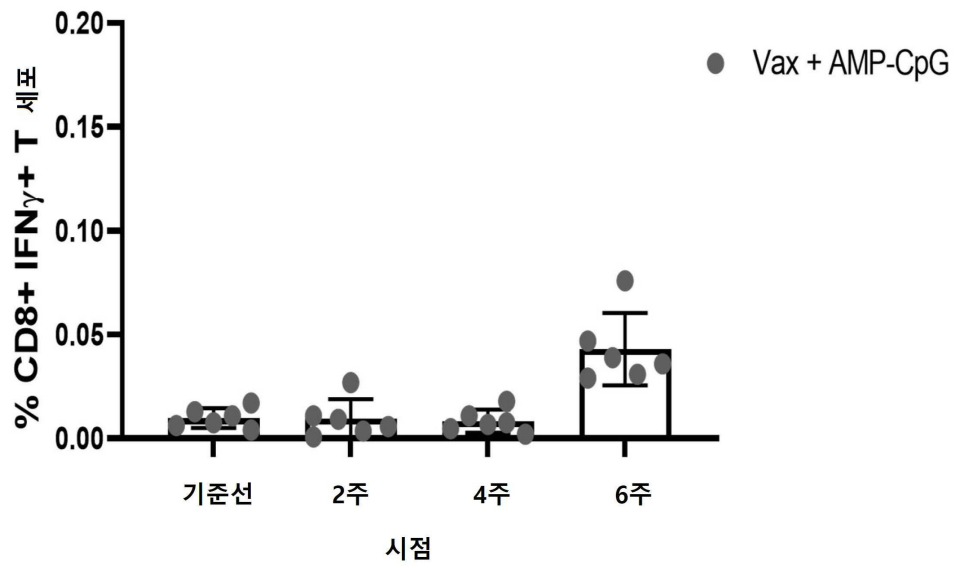
도면35



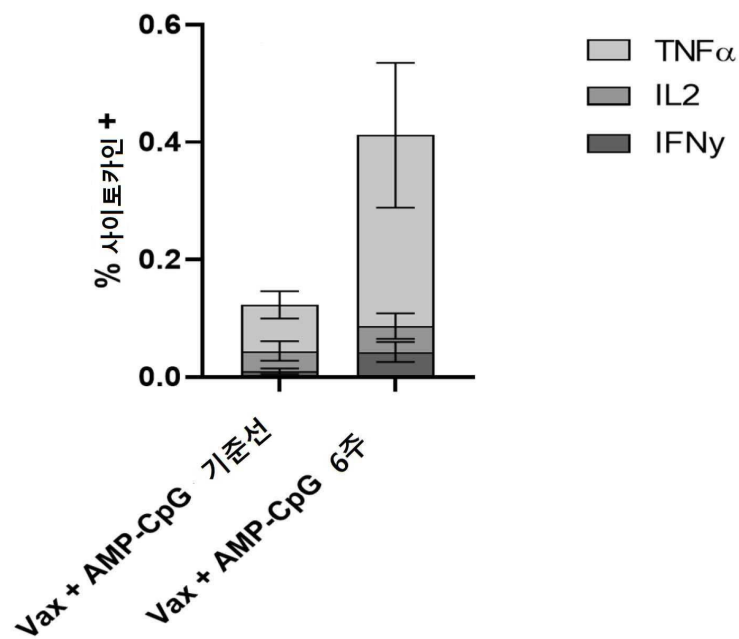
도면36a



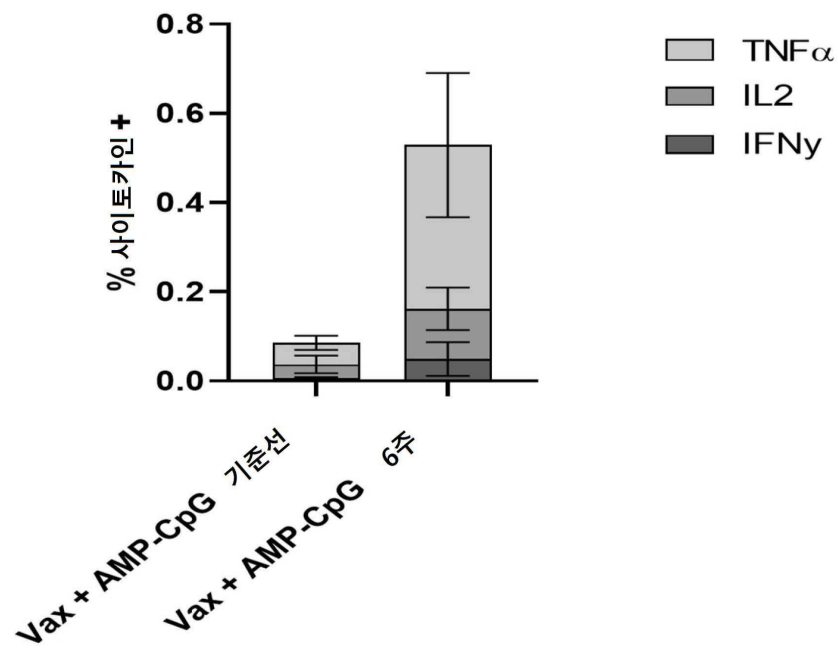
도면36b



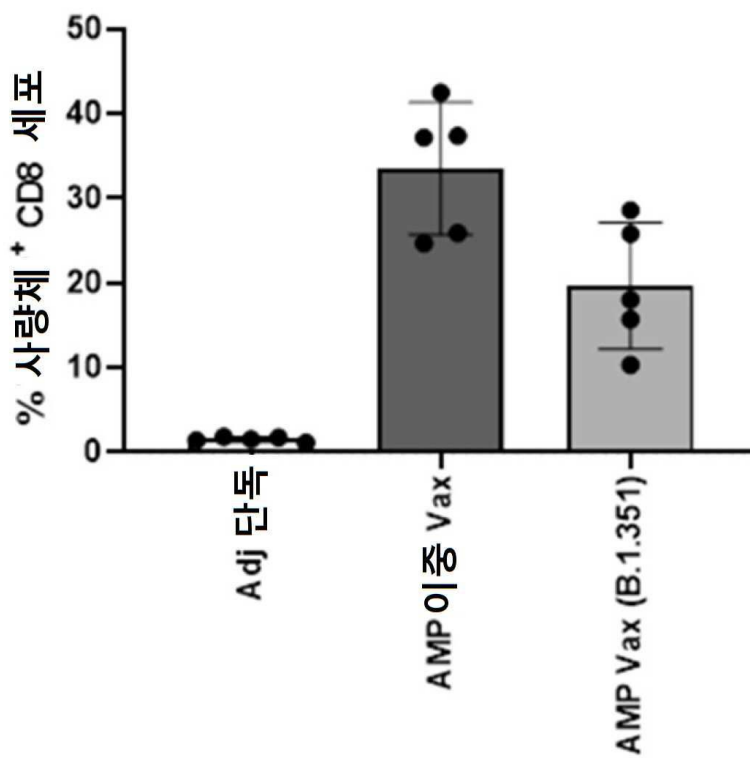
도면37a



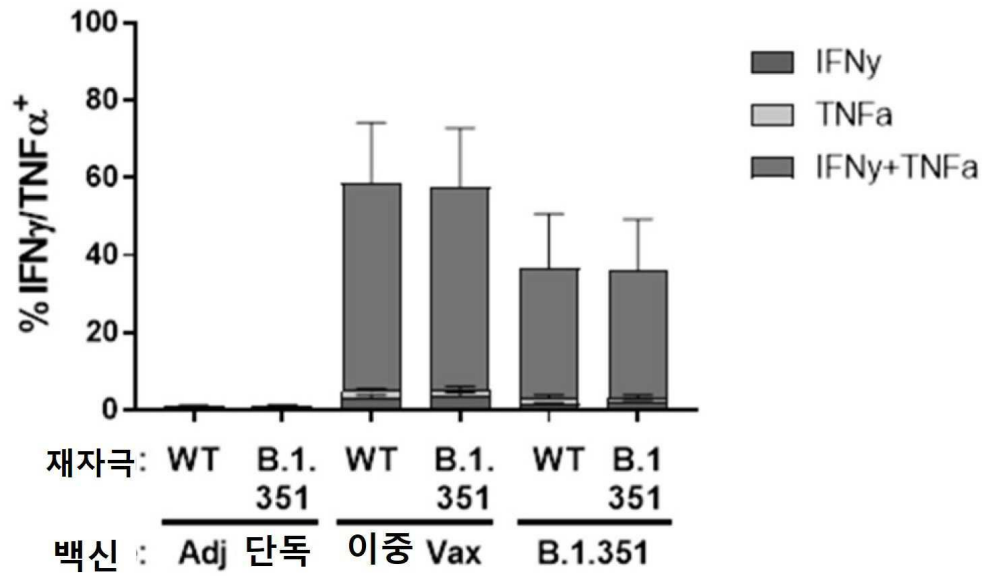
도면37b



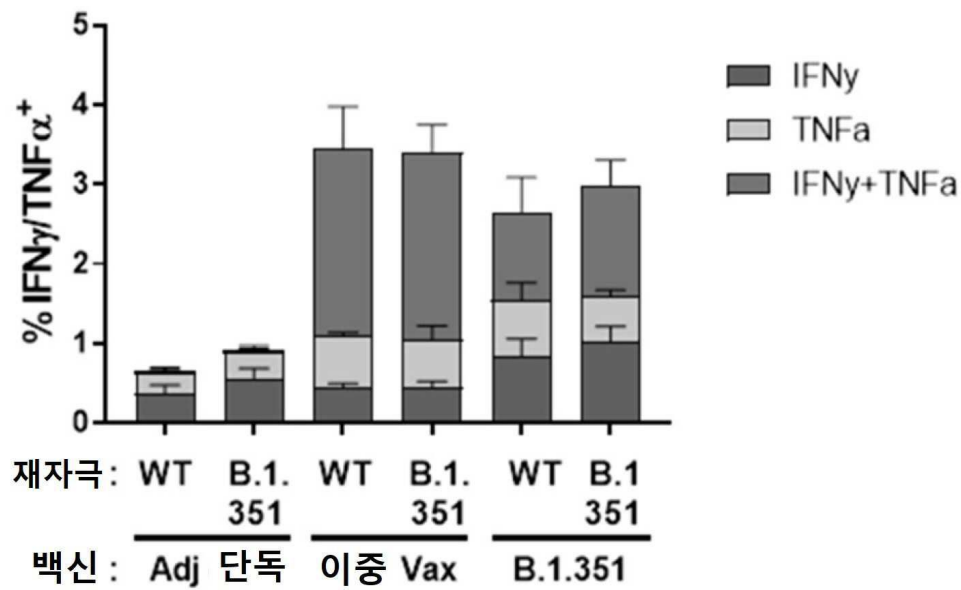
도면38



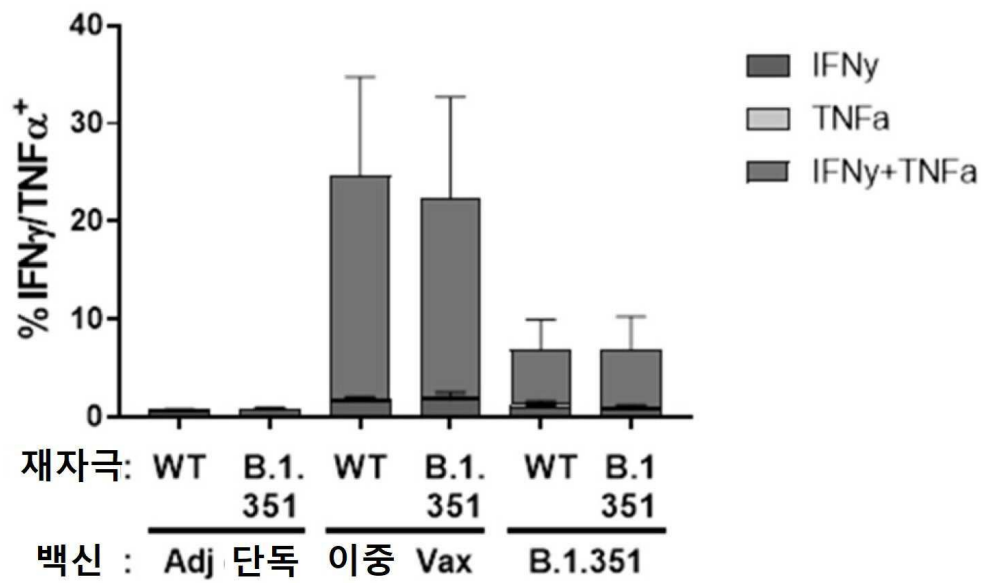
도면39a



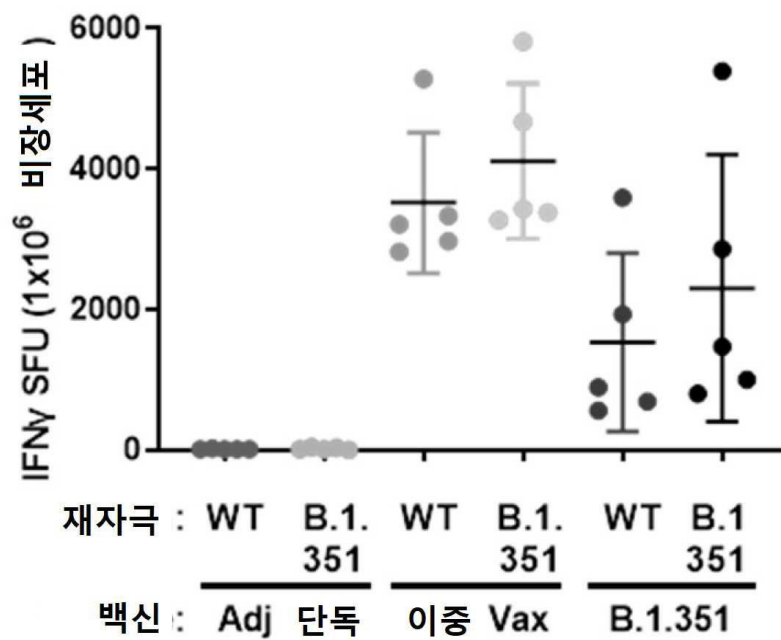
도면39b



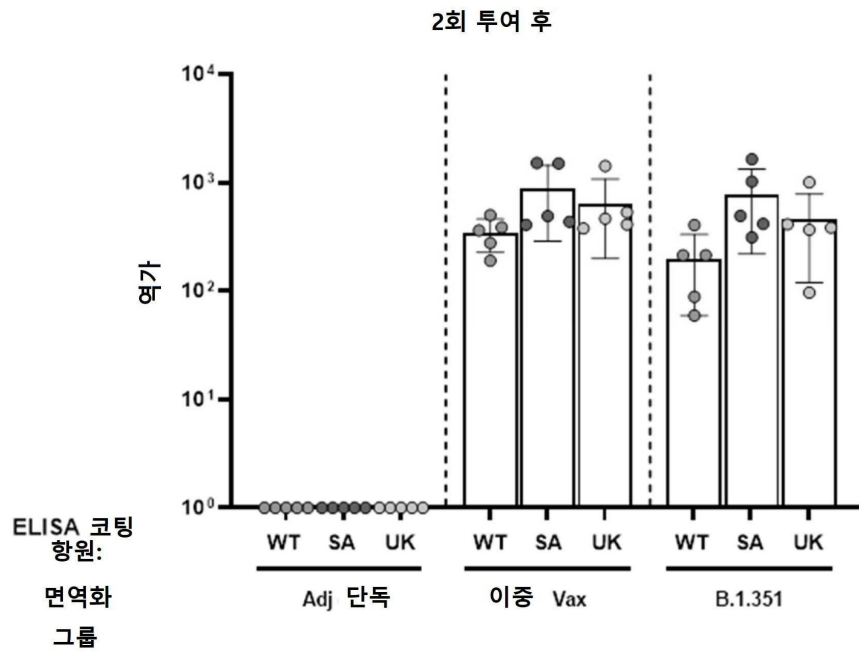
도면39c



도면40



도면41



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Elicio Therapeutics, Inc.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR INDUCING AN IMMUNE RESPONSE AGAINST
CORONAVIRUS

<130> 51026-039W05

<140> PCT/US2021/039134

<141> 2021-06-25

<150> US 63/145,200

<151> 2021-02-03

<150> US 63/124,200

<151> 2020-12-11

<150> US 63/064,836

<151> 2020-08-12

<150> US 63/044,773

<151> 2020-06-26

<160> 71

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Synthetic Construct

<400> 1

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 2

tccatgacgt tcctgacgtt

20

<210> 3

<211> 273

<212> PRT

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<400> 3

Arg Val Gln Pro Thr Glu Ser Ile Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn

1 5 10 15

Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val

20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser

35 40 45

Val Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val

50 55 60

Ser Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp

65 70 75 80

Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln

85 90 95

Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr

100 105 110

Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly

115 120 125

Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys

130 135 140

Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln Ala Gly Ser Thr

145 150 155 160

Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser

165 170 175

Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val

180 185 190

Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly

195 200 205

Pro Lys Lys Ser Thr Asn Leu Val Lys Asn Lys Cys Val Asn Phe Asn

210 215 220

Phe Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Glu Ser Asn Lys Lys

225 230 235 240

Phe Leu Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Ile Ala Asp Thr Thr Asp

245 250 255

Ala Val Arg Asp Pro Gln Thr Leu Glu Ile Leu Asp Ile Thr Pro Cys

260 265 270

Ser

<210> 4

<400> 4

000

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 5

ggggtcaacg ttgagggggg

20

<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 6	
gggggacgat cgtcggggg	20
<210> 7	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 7	
ggggacgacg tcgtggggg g	21
<210> 8	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 8	
tcgtcgttgt cgtttgtcg tt	22
<210> 9	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	
<400> 9	
tcgacgttcg tcgttcgtcg ttc	23
<210> 10	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Construct	

<400>	10
-------	----

tcgcgacgtt cgcccgcacgt tcggta

26

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 11

tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg

22

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 12

t c g t c g t c g t t c g a a c g a c g t t g a t

25

<210> 13

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 13

tgcgaacgt tgcgcgctt cgaacgcgg

29

<210> 14

<211> 1255

<212> PRT

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<400> 14

Met Phe Ile Phe Leu Leu Phe Leu Thr Leu Thr Ser Gly Ser Asp Leu

1 5 10 15

Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp Val Gln Ala Pro Asn Tyr Thr Gln

20 25 30

His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Glu Ile Phe Arg

35 40 45
 Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Tyr Ser
 50 55 60
 Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile Asn His Thr Phe Gly Asn Pro Val
 65 70 75 80
 Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Thr Glu Lys Ser Asn
 85 90 95

 Val Val Arg Gly Trp Val Phe Gly Ser Thr Met Asn Asn Lys Ser Gln
 100 105 110
 Ser Val Ile Ile Ile Asn Asn Ser Thr Asn Val Val Ile Arg Ala Cys
 115 120 125
 Asn Phe Glu Leu Cys Asp Asn Pro Phe Phe Ala Val Ser Lys Pro Met
 130 135 140
 Gly Thr Gln Thr His Thr Met Ile Phe Asp Asn Ala Phe Asn Cys Thr
 145 150 155 160

 Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp Val Ser Glu Lys Ser
 165 170 175
 Gly Asn Phe Lys His Leu Arg Glu Phe Val Phe Lys Asn Lys Asp Gly
 180 185 190
 Phe Leu Tyr Val Tyr Lys Gly Tyr Gln Pro Ile Asp Val Val Arg Asp
 195 200 205
 Leu Pro Ser Gly Phe Asn Thr Leu Lys Pro Ile Phe Lys Leu Pro Leu
 210 215 220

 Gly Ile Asn Ile Thr Asn Phe Arg Ala Ile Leu Thr Ala Phe Ser Pro
 225 230 235 240
 Ala Gln Asp Ile Trp Gly Thr Ser Ala Ala Ala Tyr Phe Val Gly Tyr
 245 250 255
 Leu Lys Pro Thr Thr Phe Met Leu Lys Tyr Asp Glu Asn Gly Thr Ile
 260 265 270
 Thr Asp Ala Val Asp Cys Ser Gln Asn Pro Leu Ala Glu Leu Lys Cys
 275 280 285

Ser Val Lys Ser Phe Glu Ile Asp Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn
290 295 300

Phe Arg Val Val Pro Ser Gly Asp Val Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr
305 310 315 320

Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Lys Phe Pro Ser
325 330 335

Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr
340 345 350

Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Phe Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly
355 360 365

Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr Ala
370 375 380

Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly
385 390 395 400

Gln Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe
405 410 415

Met Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Arg Asn Ile Asp Ala Thr Ser
420 425 430

Thr Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu Arg His Gly Lys Leu
435 440 445

Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro Phe Ser Pro Asp Gly
450 455 460

Lys Pro Cys Thr Pro Pro Ala Leu Asn Cys Tyr Trp Pro Leu Asn Asp
465 470 475 480

Tyr Gly Phe Tyr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val
485 490 495

Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly
500 505 510

Pro Lys Leu Ser Thr Asp Leu Ile Lys Asn Gln Cys Val Asn Phe Asn
515 520 525

Phe Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Pro Ser Ser Lys Arg

530 535 540

 Phe Gln Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Val Ser Asp Phe Thr Asp
 545 550 555 560
 Ser Val Arg Asp Pro Lys Thr Ser Glu Ile Leu Asp Ile Ser Pro Cys
 565 570 575
 Ser Phe Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Ala Ser Ser
 580 585 590
 Glu Val Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Asp Val Ser Thr
 595 600 605

 Ala Ile His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Ala Trp Arg Ile Tyr Ser Thr
 610 615 620
 Gly Asn Asn Val Phe Gln Thr Gln Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu
 625 630 635 640
 His Val Asp Thr Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile
 645 650 655
 Cys Ala Ser Tyr His Thr Val Ser Leu Leu Arg Ser Thr Ser Gln Lys
 660 665 670

 Ser Ile Val Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Asp Ser Ser Ile Ala
 675 680 685
 Tyr Ser Asn Asn Thr Ile Ala Ile Pro Thr Asn Phe Ser Ile Ser Ile
 690 695 700
 Thr Thr Glu Val Met Pro Val Ser Met Ala Lys Thr Ser Val Asp Cys
 705 710 715 720
 Asn Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ala Asn Leu Leu Leu
 725 730 735

 Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu Ser Gly Ile
 740 745 750
 Ala Ala Glu Gln Asp Arg Asn Thr Arg Glu Val Phe Ala Gln Val Lys
 755 760 765
 Gln Met Tyr Lys Thr Pro Thr Leu Lys Tyr Phe Gly Gly Phe Asn Phe
 770 775 780

Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Leu Lys Pro Thr Lys Arg Ser Phe Ile
785 790 795 800

Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Thr Leu Ala Asp Ala Gly Phe Met
805 810 815

Lys Gln Tyr Gly Glu Cys Leu Gly Asp Ile Asn Ala Arg Asp Leu Ile
820 825 830

Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu Thr Val Leu Pro Pro Leu Leu Thr
835 840 845

Asp Asp Met Ile Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Leu Val Ser Gly Thr Ala
850 855 860

Thr Ala Gly Trp Thr Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ile Pro Phe
865 870 875 880

Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe Asn Gly Ile Gly Val Thr Gln Asn
885 890 895

Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Gln Ile Ala Asn Gln Phe Asn Lys Ala
900 905 910

Ile Ser Gln Ile Gln Glu Ser Leu Thr Thr Thr Ser Thr Ala Leu Gly
915 920 925

Lys Leu Gln Asp Val Val Asn Gln Asn Ala Gln Ala Leu Asn Thr Leu
930 935 940

Val Lys Gln Leu Ser Ser Asn Phe Gly Ala Ile Ser Ser Val Leu Asn
945 950 955 960

Asp Ile Leu Ser Arg Leu Asp Lys Val Glu Ala Glu Val Gln Ile Asp
965 970 975

Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr Val Thr Gln
980 985 990

Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser Ala Asn Leu Ala Ala
995 1000 1005

Thr Lys Met Ser Glu Cys Val Leu Gly Gln Ser Lys Arg Val Asp
1010 1015 1020

Phe Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro Gln Ala Ala

1025	1030	1035
Pro His Gly Val Val Phe Leu	His Val Thr Tyr Val	Pro Ser Gln
1040	1045	1050
Glu Arg Asn Phe Thr Thr Ala	Pro Ala Ile Cys His	Glu Gly Lys
1055	1060	1065
Ala Tyr Phe Pro Arg Glu Gly	Val Phe Val Phe Asn	Gly Thr Ser
1070	1075	1080
Trp Phe Ile Thr Gln Arg Asn	Phe Phe Ser Pro Gln	Ile Ile Thr
1085	1090	1095
Thr Asp Asn Thr Phe Val Ser	Gly Asn Cys Asp Val	Val Ile Gly
1100	1105	1110
Ile Ile Asn Asn Thr Val Tyr	Asp Pro Leu Gln Pro	Glu Leu Asp
1115	1120	1125
Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp	Lys Tyr Phe Lys Asn	His Thr Ser
1130	1135	1140
Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp	Ile Ser Gly Ile Asn	Ala Ser Val
1145	1150	1155
Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile	Asp Arg Leu Asn Glu	Val Ala Lys
1160	1165	1170
Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile	Asp Leu Gln Glu Leu	Gly Lys Tyr
1175	1180	1185
Glu Gln Tyr Ile Lys Trp Pro	Trp Tyr Val Trp Leu	Gly Phe Ile
1190	1195	1200
Ala Gly Leu Ile Ala Ile Val	Met Val Thr Ile Leu	Leu Cys Cys
1205	1210	1215
Met Thr Ser Cys Cys Ser Cys	Leu Lys Gly Ala Cys	Ser Cys Gly
1220	1225	1230
Ser Cys Cys Lys Phe Asp Glu	Asp Asp Ser Glu Pro	Val Leu Lys
1235	1240	1245
Gly Val Lys Leu His Tyr Thr		
1250	1255	

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 15

tgactgtgaa cgttcgagat ga

22

<210> 16

<211> 1255

<212> PRT

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<400> 16

Met Phe Ile Phe Leu Leu Phe Leu Thr Leu Thr Ser Gly Ser Asp Leu

1 5 10 15
Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp Val Gln Ala Pro Asn Tyr Thr Gln

20 25 30
His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Glu Ile Phe Arg

35 40 45
Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Tyr Ser

50 55 60
Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile Asn His Thr Phe Gly Asn Pro Val

65 70 75 80
Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Thr Glu Lys Ser Asn

85 90 95
Val Val Arg Gly Trp Val Phe Gly Ser Thr Met Asn Asn Lys Ser Gln

100 105 110
Ser Val Ile Ile Ile Asn Asn Ser Thr Asn Val Val Ile Arg Ala Cys

115 120 125
Asn Phe Glu Leu Cys Asp Asn Pro Phe Phe Ala Val Ser Lys Pro Met

130 135 140
Gly Thr Gln Thr His Thr Met Ile Phe Asp Asn Ala Phe Asn Cys Thr

145 150 155 160

Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp Val Ser Glu Lys Ser
 165 170 175
 Gly Asn Phe Lys His Leu Arg Glu Phe Val Phe Lys Asn Lys Asp Gly
 180 185 190
 Phe Leu Tyr Val Tyr Lys Gly Tyr Gln Pro Ile Asp Val Val Arg Asp
 195 200 205
 Leu Pro Ser Gly Phe Asn Thr Leu Lys Pro Ile Phe Lys Leu Pro Leu
 210 215 220
 Gly Ile Asn Ile Thr Asn Phe Arg Ala Ile Leu Thr Ala Phe Ser Pro
 225 230 235 240
 Ala Gln Asp Ile Trp Gly Thr Ser Ala Ala Ala Tyr Phe Val Gly Tyr
 245 250 255
 Leu Lys Pro Thr Thr Phe Met Leu Lys Tyr Asp Glu Asn Gly Thr Ile
 260 265 270
 Thr Asp Ala Val Asp Cys Ser Gln Asn Pro Leu Ala Glu Leu Lys Cys
 275 280 285
 Ser Val Lys Ser Phe Glu Ile Asp Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn
 290 295 300
 Phe Arg Val Val Pro Ser Gly Asp Val Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr
 305 310 315 320
 Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Lys Phe Pro Ser
 325 330 335
 Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr
 340 345 350
 Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Phe Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly
 355 360 365
 Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr Ala
 370 375 380
 Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly
 385 390 395 400
 Gln Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe

405 410 415
 Met Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Arg Asn Ile Asp Ala Thr Ser
 420 425 430
 Thr Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu Arg His Gly Lys Leu
 435 440 445
 Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro Phe Ser Pro Asp Gly

 450 455 460
 Lys Pro Cys Thr Pro Pro Ala Leu Asn Cys Tyr Trp Pro Leu Asn Asp
 465 470 475 480
 Tyr Gly Phe Tyr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val
 485 490 495
 Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly
 500 505 510
 Pro Lys Leu Ser Thr Asp Leu Ile Lys Asn Gln Cys Val Asn Phe Asn

 515 520 525
 Phe Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Pro Ser Ser Lys Arg
 530 535 540
 Phe Gln Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Val Ser Asp Phe Thr Asp
 545 550 555 560
 Ser Val Arg Asp Pro Lys Thr Ser Glu Ile Leu Asp Ile Ser Pro Cys
 565 570 575
 Ser Phe Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Ala Ser Ser

 580 585 590
 Glu Val Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Asp Val Ser Thr
 595 600 605
 Ala Ile His Ala Gly Gln Leu Thr Pro Ala Trp Arg Ile Tyr Ser Thr
 610 615 620
 Gly Asn Asn Val Phe Gln Thr Gln Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu
 625 630 635 640
 His Val Asp Thr Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile

 645 650 655

Cys Ala Ser Tyr His Thr Val Ser Leu Leu Arg Ser Thr Ser Gln Lys
 660 665 670
 Ser Ile Val Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Asp Ser Ser Ile Ala
 675 680 685
 Tyr Ser Asn Asn Thr Ile Ala Ile Pro Thr Asn Phe Ser Ile Ser Ile
 690 695 700
 Thr Thr Glu Val Met Pro Val Ser Met Ala Lys Thr Ser Val Asp Cys

 705 710 715 720
 Asn Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ala Asn Leu Leu Leu
 725 730 735
 Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu Ser Gly Ile
 740 745 750
 Ala Ala Glu Gln Asp Arg Asn Thr Arg Glu Val Phe Ala Gln Val Lys
 755 760 765
 Gln Met Tyr Lys Thr Pro Thr Leu Lys Tyr Phe Gly Gly Phe Asn Phe

 770 775 780
 Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Leu Lys Pro Thr Lys Arg Ser Phe Ile
 785 790 795 800
 Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Thr Leu Ala Asp Ala Gly Phe Met
 805 810 815
 Lys Gln Tyr Gly Glu Cys Leu Gly Asp Ile Asn Ala Arg Asp Leu Ile
 820 825 830
 Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu Thr Val Leu Pro Pro Leu Leu Thr

 835 840 845
 Asp Asp Met Ile Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Leu Val Ser Gly Thr Ala
 850 855 860
 Thr Ala Gly Trp Thr Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ile Pro Phe
 865 870 875 880
 Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe Asn Gly Ile Gly Val Thr Gln Asn
 885 890 895
 Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Gln Ile Ala Asn Gln Phe Asn Lys Ala

900	905	910	
Ile Ser Gln Ile Gln Glu Ser Leu Thr Thr Thr Ser Thr Ala Leu Gly			
915	920	925	
Lys Leu Gln Asp Val Val Asn Gln Asn Ala Gln Ala Leu Asn Thr Leu			
930	935	940	
Val Lys Gln Leu Ser Ser Asn Phe Gly Ala Ile Ser Ser Val Leu Asn			
945	950	955	960
Asp Ile Leu Ser Arg Leu Asp Lys Val Glu Ala Glu Val Gln Ile Asp			
965	970	975	
Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr Val Thr Gln			
980	985	990	
Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser Ala Asn Leu Ala Ala			
995	1000	1005	
Thr Lys Met Ser Glu Cys Val Leu Gly Gln Ser Lys Arg Val Asp			
1010	1015	1020	
Phe Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro Gln Ala Ala			
1025	1030	1035	
Pro His Gly Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val Pro Ser Gln			
1040	1045	1050	
Glu Arg Asn Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys His Glu Gly Lys			
1055	1060	1065	
Ala Tyr Phe Pro Arg Glu Gly Val Phe Val Phe Asn Gly Thr Ser			
1070	1075	1080	
Trp Phe Ile Thr Gln Arg Asn Phe Phe Ser Pro Gln Ile Ile Thr			
1085	1090	1095	
Thr Asp Asn Thr Phe Val Ser Gly Asn Cys Asp Val Val Ile Gly			
1100	1105	1110	
Ile Ile Asn Asn Thr Val Tyr Asp Pro Leu Gln Pro Glu Leu Asp			
1115	1120	1125	
Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp Lys Tyr Phe Lys Asn His Thr Ser			
1130	1135	1140	

Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp Ile Ser Gly Ile Asn Ala Ser Val

1145 1150 1155

Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile Asp Arg Leu Asn Glu Val Ala Lys

1160 1165 1170

Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp Leu Gln Glu Leu Gly Lys Tyr

1175 1180 1185

Glu Gln Tyr Ile Lys Trp Pro Trp Tyr Val Trp Leu Gly Phe Ile

1190 1195 1200

Ala Gly Leu Ile Ala Ile Val Met Val Thr Ile Leu Leu Cys Cys

1205 1210 1215

Met Thr Ser Cys Cys Ser Cys Leu Lys Gly Ala Cys Ser Cys Gly

1220 1225 1230

Ser Cys Cys Lys Phe Asp Glu Asp Asp Ser Glu Pro Val Leu Lys

1235 1240 1245

Gly Val Lys Leu His Tyr Thr

1250 1255

<210> 17

<211> 180

<212> PRT

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<400> 17

Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Lys Phe Pro Ser Val Tyr

1 5 10 15

Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val

20 25 30

Leu Tyr Asn Ser Thr Phe Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val Ser

35 40 45

Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr Ala Asp Ser

50 55 60

Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr

65 70 75 80

Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Met Gly
85 90 95
Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Arg Asn Ile Asp Ala Thr Ser Thr Gly
100 105 110
Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu Arg His Gly Lys Leu Arg Pro
115 120 125
Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro Phe Ser Pro Asp Gly Lys Pro

130 135 140
Cys Thr Pro Pro Ala Leu Asn Cys Tyr Trp Pro Leu Asn Asp Tyr Gly
145 150 155 160
Phe Tyr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val Val Val
165 170 175
Leu Ser Phe Glu
180

<210> 18

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 18

Gly Gly Gly Ala

1

<210> 19

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 19

Gly Gly Gly Gly

1

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 20

Gly Gly Gly Ala Gly

1 5

<210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 21

Gly Gly Gly Ala Gly Gly

1 5

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 22

Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly

1 5

<210> 23

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 23

Gly Gly Ala Gly

1

<210> 24

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 24

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 25

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 25

Ala Gly Gly Gly

1

<210> 26

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 26

Ser Gly Gly Gly

1

<210> 27

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 27

Gly Gly Ala Gly Gly Ala

1 5

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 28

Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 29

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala

1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 30

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 31

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala

1 5 10

<210> 32

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 32

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 33

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 33

Gly Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly

1 5

<210> 34

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Synthetic Construct

<400> 34

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 35

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 35

Gly Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly

1 5 10

<210> 36

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 36

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10

<210> 37

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 37

Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ala

1 5 10 15

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 38

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 39

Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe

1 5 10

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 40

Tyr Gln Pro Tyr Arg Val Val Val Leu

1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 41

Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu

1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 42

Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val

1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 43

Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 44

Val Ser Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu

1 5

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 45

Val Cys Gly Pro Lys Lys Ser Thr Asn Leu

1 5 10

<210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 46

Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val

1 5 10

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 47

Val Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile

1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 48

Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val

1 5

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 49

Val Asn Phe Asn Phe Asn Gly Leu

1 5

<210> 50

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 50

Lys Cys Tyr Gly Val Ser Pro Thr Lys Leu

1 5 10

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 51

Cys Tyr Gly Val Ser Pro Thr Lys Leu

1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 52

Cys Tyr Gly Val Ser Ala Thr Lys Leu

1 5

<210> 53

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 53

Tyr Gly Val Ser Pro Thr Lys Leu

1 5
 <210> 54
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 54

Ser Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu

1 5 10
 <210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 55

Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu

1 5
 <210> 56
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 56

Glu Ser Ile Val Arg Phe Pro Asn Ile

1 5
 <210> 57
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 57

Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu

1 5
 <210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 58

Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu

1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 59

Val Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val Val

1 5

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 60

Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe

1 5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 61

Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly Lys Ile

1 5

<210> 62

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 62

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 63

<211> 432

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 63

Met Ser Asp Asn Gly Pro Gln Asn Gln Arg Asn Ala Pro Arg Ile Thr

1 5 10 15

Phe Gly Gly Pro Ser Asp Ser Thr Gly Ser Asn Gln Asn Gly Glu Arg

20 25 30

Ser Gly Ala Arg Ser Lys Gln Arg Arg Pro Gln Gly Leu Pro Asn Asn

35 40 45

Thr Ala Ser Trp Phe Thr Ala Leu Thr Gln His Gly Lys Glu Asp Leu

50 55 60

Lys Phe Pro Arg Gly Gln Gly Val Pro Ile Asn Thr Asn Ser Ser Pro

65 70 75 80

Asp Asp Gln Ile Gly Tyr Tyr Arg Arg Ala Thr Arg Arg Ile Arg Gly

85 90 95

Gly Asp Gly Lys Met Lys Asp Leu Ser Pro Arg Trp Tyr Phe Tyr Tyr

100 105 110

Leu Gly Thr Gly Pro Glu Ala Gly Leu Pro Tyr Gly Ala Asn Lys Asp

115 120 125

Gly Ile Ile Trp Val Ala Thr Glu Gly Ala Leu Asn Thr Pro Lys Asp

130 135 140

His Ile Gly Thr Arg Asn Pro Ala Asn Asn Ala Ala Ile Val Leu Gln

145 150 155 160

Leu Pro Gln Gly Thr Thr Leu Pro Lys Gly Phe Tyr Ala Glu Gly Ser
 165 170 175
 Arg Gly Gly Ser Gln Ala Ser Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser Arg Asn
 180 185 190
 Ser Ser Arg Asn Ser Thr Pro Gly Ser Ser Arg Gly Thr Ser Pro Ala
 195 200 205

 Arg Met Ala Gly Asn Gly Gly Asp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Leu Leu
 210 215 220
 Asp Arg Leu Asn Gln Leu Glu Ser Lys Met Ser Gly Lys Gly Gln Gln
 225 230 235 240
 Gln Gln Gly Gln Thr Val Thr Lys Lys Ser Ala Ala Glu Ala Ser Lys
 245 250 255
 Lys Pro Arg Gln Lys Arg Thr Ala Thr Lys Ala Tyr Asn Val Thr Gln
 260 265 270

 Ala Phe Gly Arg Arg Gly Pro Glu Gln Thr Gln Gly Asn Phe Gly Asp
 275 280 285
 Gln Glu Leu Ile Arg Gln Gly Thr Asp Tyr Lys His Trp Pro Gln Ile
 290 295 300
 Ala Gln Phe Ala Pro Ser Ala Ser Ala Phe Phe Gly Met Ser Arg Ile
 305 310 315 320
 Gly Met Glu Val Thr Pro Ser Gly Thr Trp Leu Thr Tyr Thr Gly Ala
 325 330 335

 Ile Lys Leu Asp Asp Lys Asp Pro Asn Phe Lys Asp Gln Val Ile Leu
 340 345 350
 Leu Asn Lys His Ile Asp Ala Tyr Lys Thr Phe Pro Pro Thr Glu Pro
 355 360 365
 Lys Lys Asp Lys Lys Lys Lys Ala Asp Glu Thr Gln Ala Leu Pro Gln
 370 375 380
 Arg Gln Lys Lys Gln Gln Thr Val Thr Leu Leu Pro Ala Ala Asp Leu
 385 390 395 400

 Asp Asp Phe Ser Lys Gln Leu Gln Gln Ser Met Ser Ser Ala Asp Ser

405 410 415
Thr Gln Ala Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly His His His His His His

420 425 430

<210> 64

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 64

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly

1 5

<210> 65

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Synthetic Construct

<400> 65

His His His His His His

1 5

<210> 66

<211> 1216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 66

Val Asn Leu Thr Thr Arg Thr Gln Leu Pro Pro Ala Tyr Thr Asn Ser

1 5 10 15

Phe Thr Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Lys Val Phe Arg Ser Ser Val

20 25 30

Leu His Ser Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Phe Ser Asn Val Thr

35 40 45

Trp Phe His Ala Ile His Val Ser Gly Thr Asn Gly Thr Lys Arg Phe

50 55 60

Asp Asn Pro Val Leu Pro Phe Asn Asp Gly Val Tyr Phe Ala Ser Thr
 65 70 75 80
 Glu Lys Ser Asn Ile Ile Arg Gly Trp Ile Phe Gly Thr Thr Leu Asp
 85 90 95
 Ser Lys Thr Gln Ser Leu Leu Ile Val Asn Asn Ala Thr Asn Val Val
 100 105 110
 Ile Lys Val Cys Glu Phe Gln Phe Cys Asn Asp Pro Phe Leu Gly Val
 115 120 125
 Tyr Tyr His Lys Asn Asn Lys Ser Trp Met Glu Ser Glu Phe Arg Val
 130 135 140
 Tyr Ser Ser Ala Asn Asn Cys Thr Phe Glu Tyr Val Ser Gln Pro Phe
 145 150 155 160
 Leu Met Asp Leu Glu Gly Lys Gln Gly Asn Phe Lys Asn Leu Arg Glu
 165 170 175
 Phe Val Phe Lys Asn Ile Asp Gly Tyr Phe Lys Ile Tyr Ser Lys His
 180 185 190
 Thr Pro Ile Asn Leu Val Arg Asp Leu Pro Gln Gly Phe Ser Ala Leu
 195 200 205
 Glu Pro Leu Val Asp Leu Pro Ile Gly Ile Asn Ile Thr Arg Phe Gln
 210 215 220
 Thr Leu Leu Ala Leu His Arg Ser Tyr Leu Thr Pro Gly Asp Ser Ser
 225 230 235 240
 Ser Gly Trp Thr Ala Gly Ala Ala Ala Tyr Tyr Val Gly Tyr Leu Gln
 245 250 255
 Pro Arg Thr Phe Leu Leu Lys Tyr Asn Glu Asn Gly Thr Ile Thr Asp
 260 265 270
 Ala Val Asp Cys Ala Leu Asp Pro Leu Ser Glu Thr Lys Cys Thr Leu
 275 280 285
 Lys Ser Phe Thr Val Glu Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn Phe Arg
 290 295 300
 Val Gln Pro Thr Glu Ser Ile Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu

305 310 315 320
 Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val Tyr
 325 330 335
 Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val
 340 345 350
 Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val Ser

 355 360 365
 Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp Ser
 370 375 380
 Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr
 385 390 395 400
 Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr Gly
 405 410 415
 Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly Gly

 420 425 430
 Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys Pro
 435 440 445
 Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln Ala Gly Ser Thr Pro
 450 455 460
 Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser Tyr
 465 470 475 480
 Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val Val

 485 490 495
 Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly Pro
 500 505 510
 Lys Lys Ser Thr Asn Leu Val Lys Asn Lys Cys Val Asn Phe Asn Phe
 515 520 525
 Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Glu Ser Asn Lys Lys Phe
 530 535 540
 Leu Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Ile Ala Asp Thr Thr Asp Ala

 545 550 555 560

Val Arg Asp Pro Gln Thr Leu Glu Ile Leu Asp Ile Thr Pro Cys Ser
565 570 575
Phe Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Thr Ser Asn Gln
580 585 590
Val Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Glu Val Pro Val Ala
595 600 605
Ile His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Thr Trp Arg Val Tyr Ser Thr Gly
610 615 620
Ser Asn Val Phe Gln Thr Arg Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu His
625 630 635 640
Val Asn Asn Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile Cys
645 650 655
Ala Ser Tyr Gln Thr Gln Thr Asn Ser Pro Arg Ala Ala Ala Ser Val
660 665 670
Ala Ser Gln Ser Ile Ile Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Glu Asn
675 680 685
Ser Val Ala Tyr Ser Asn Asn Ser Ile Ala Ile Pro Thr Asn Phe Thr
690 695 700
Ile Ser Val Thr Thr Glu Ile Leu Pro Val Ser Met Thr Lys Thr Ser
705 710 715 720
Val Asp Cys Thr Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ser Asn
725 730 735
Leu Leu Leu Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu
740 745 750
Thr Gly Ile Ala Val Glu Gln Asp Lys Asn Thr Gln Glu Val Phe Ala
755 760 765
Gln Val Lys Gln Ile Tyr Lys Thr Pro Pro Ile Lys Asp Phe Gly Gly
770 775 780
Phe Asn Phe Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Ser Lys Pro Ser Lys Arg
785 790 795 800
Ser Phe Ile Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Thr Leu Ala Asp Ala

805 810 815
 Gly Phe Ile Lys Gln Tyr Gly Asp Cys Leu Gly Asp Ile Ala Ala Arg
 820 825 830
 Asp Leu Ile Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu Thr Val Leu Pro Pro
 835 840 845
 Leu Leu Thr Asp Glu Met Ile Ala Gln Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Ala
 850 855 860
 Gly Thr Ile Thr Ser Gly Trp Thr Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln

 865 870 875 880
 Ile Pro Phe Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe Asn Gly Ile Gly Val
 885 890 895
 Thr Gln Asn Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Leu Ile Ala Asn Gln Phe
 900 905 910
 Asn Ser Ala Ile Gly Lys Ile Gln Asp Ser Leu Ser Ser Thr Ala Ser
 915 920 925
 Ala Leu Gly Lys Leu Gln Asp Val Val Asn Gln Asn Ala Gln Ala Leu

 930 935 940
 Asn Thr Leu Val Lys Gln Leu Ser Ser Asn Phe Gly Ala Ile Ser Ser
 945 950 955 960
 Val Leu Asn Asp Ile Leu Ser Arg Leu Asp Lys Val Glu Ala Glu Val
 965 970 975
 Gln Ile Asp Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr
 980 985 990
 Val Thr Gln Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser Ala Asn

 995 1000 1005
 Leu Ala Ala Thr Lys Met Ser Glu Cys Val Leu Gly Gln Ser Lys
 1010 1015 1020
 Arg Val Asp Phe Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro
 1025 1030 1035
 Gln Ser Ala Pro His Gly Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val
 1040 1045 1050

Pro Ala Gln Glu Lys Asn Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys His

1055

1060

1065

Asp Gly Lys Ala His Phe Pro Arg Glu Gly Val Phe Val Ser Asn

1070

1075

1080

Gly Thr His Trp Phe Val Thr Gln Arg Asn Phe Tyr Glu Pro Gln

1085

1090

1095

Ile Ile Thr Thr Asp Asn Thr Phe Val Ser Gly Asn Cys Asp Val

1100

1105

1110

Val Ile Gly Ile Val Asn Asn Thr Val Tyr Asp Pro Leu Gln Pro

1115

1120

1125

Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp Lys Tyr Phe Lys Asn

1130

1135

1140

His Thr Ser Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp Ile Ser Gly Ile Asn

1145

1150

1155

Ala Ser Val Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile Asp Arg Leu Asn Glu

1160

1165

1170

Val Ala Lys Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp Leu Gln Glu Leu

1175

1180

1185

Gly Lys Tyr Glu Gln Tyr Ile Lys Trp Pro Gly Gly Gly Ser Gly

1190

1195

1200

Gly Gly Ser His His His His His His His His His His

1205

1210

1215

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 67

His His His His His His His His His His

1

5

10

<210

> 68

<211> 419

<212> PRT

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<400> 68

```

Met Ser Asp Asn Gly Pro Gln Asn Gln Arg Asn Ala Pro Arg Ile Thr
1           5           10           15
Phe Gly Gly Pro Ser Asp Ser Thr Gly Ser Asn Gln Asn Gly Glu Arg
           20           25           30
Ser Gly Ala Arg Ser Lys Gln Arg Arg Pro Gln Gly Leu Pro Asn Asn
           35           40           45
Thr Ala Ser Trp Phe Thr Ala Leu Thr Gln His Gly Lys Glu Asp Leu

           50           55           60
Lys Phe Pro Arg Gly Gln Gly Val Pro Ile Asn Thr Asn Ser Ser Pro
65           70           75           80
Asp Asp Gln Ile Gly Tyr Tyr Arg Arg Ala Thr Arg Arg Ile Arg Gly
           85           90           95
Gly Asp Gly Lys Met Lys Asp Leu Ser Pro Arg Trp Tyr Phe Tyr Tyr
           100          105          110
Leu Gly Thr Gly Pro Glu Ala Gly Leu Pro Tyr Gly Ala Asn Lys Asp

           115          120          125
Gly Ile Ile Trp Val Ala Thr Glu Gly Ala Leu Asn Thr Pro Lys Asp
           130          135          140
His Ile Gly Thr Arg Asn Pro Ala Asn Asn Ala Ala Ile Val Leu Gln
145          150          155          160
Leu Pro Gln Gly Thr Thr Leu Pro Lys Gly Phe Tyr Ala Glu Gly Ser
           165          170          175
Arg Gly Gly Ser Gln Ala Ser Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser Arg Asn

           180          185          190
Ser Ser Arg Asn Ser Thr Pro Gly Ser Ser Arg Gly Thr Ser Pro Ala
           195          200          205
Arg Met Ala Gly Asn Gly Gly Asp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Leu Leu
210          215          220

```

Asp Arg Leu Asn Gln Leu Glu Ser Lys Met Ser Gly Lys Gly Gln Gln
 225 230 235 240
 Gln Gln Gly Gln Thr Val Thr Lys Lys Ser Ala Ala Glu Ala Ser Lys
 245 250 255
 Lys Pro Arg Gln Lys Arg Thr Ala Thr Lys Ala Tyr Asn Val Thr Gln
 260 265 270
 Ala Phe Gly Arg Arg Gly Pro Glu Gln Thr Gln Gly Asn Phe Gly Asp
 275 280 285
 Gln Glu Leu Ile Arg Gln Gly Thr Asp Tyr Lys His Trp Pro Gln Ile
 290 295 300
 Ala Gln Phe Ala Pro Ser Ala Ser Ala Phe Phe Gly Met Ser Arg Ile
 305 310 315 320
 Gly Met Glu Val Thr Pro Ser Gly Thr Trp Leu Thr Tyr Thr Gly Ala
 325 330 335
 Ile Lys Leu Asp Asp Lys Asp Pro Asn Phe Lys Asp Gln Val Ile Leu
 340 345 350
 Leu Asn Lys His Ile Asp Ala Tyr Lys Thr Phe Pro Pro Thr Glu Pro
 355 360 365
 Lys Lys Asp Lys Lys Lys Lys Ala Asp Glu Thr Gln Ala Leu Pro Gln
 370 375 380
 Arg Gln Lys Lys Gln Gln Thr Val Thr Leu Leu Pro Ala Ala Asp Leu
 385 390 395 400
 Asp Asp Phe Ser Lys Gln Leu Gln Gln Ser Met Ser Ser Ala Asp Ser
 405 410 415
 Thr Gln Ala

<210> 69

<211> 223

<212> PRT

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<400> 69

Arg Val Gln Pro Thr Glu Ser Ile Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn

1 5 10 15

Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val

20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser

35 40 45

Val Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val

50 55 60

Ser Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp

65 70 75 80

Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln

85 90 95

Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr

100 105 110

Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly

115 120 125

Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys

130 135 140

Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln Ala Gly Ser Thr

145 150 155 160

Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser

165 170 175

Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Tyr Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val

180 185 190

Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly

195 200 205

Pro Lys Lys Ser Thr Asn Leu Val Lys Asn Lys Cys Val Asn Phe

210 215 220

<210> 70

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 70

Ala His His His His His His His His His His

1 5 10

<210> 71

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 71

tccatgacgt tctgatgct

20