

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0137110
(43) 공개일자 2024년09월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 39/215 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7029519
(22) 출원일자(국제) 2023년02월02일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년09월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/061878
(87) 국제공개번호 WO 2023/150638
국제공개일자 2023년08월10일
(30) 우선권주장
63/305,979 2022년02월02일 미국(US)
(뒷면에 계속)
- (71) 출원인
워싱턴 유니버시티
미국 미주리 세인트 루이스 브루킹즈 드라이브 1
(우:63130)
- (72) 발명자
다ਿਆ몬드 마이클
미국 미주리 63130 세인트 루이스, 원 브로킹스
드라이브
드미트리브 이고르
미국 미주리 63130 세인트 루이스, 원 브로킹스
드라이브
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
강명구

전체 청구항 수 : 총 35 항

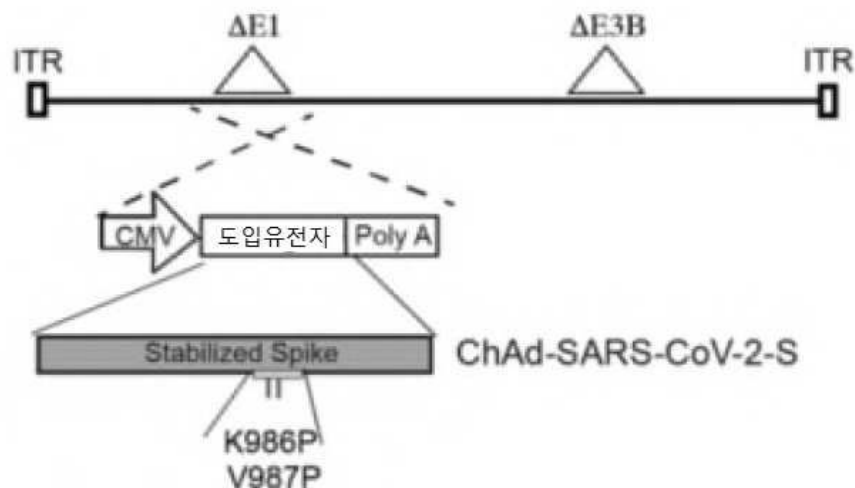
(54) 발명의 명칭 오미크론 코로나바이러스 백신 구조체 및 이를 제조하고 사용하는 방법

(57) 요약

요약서

SARS-CoV2 코로나바이러스의 스파이크 단백질 변이체를 인코딩하는 아데노바이러스 벡터, 그리고 이 벡터를 포함하는 조성물이 본원에서 제공된다. 상기 제공된 조성물을 이용하여 SARS-CoV2를 예방하고 치료하는 방법들이 또한 제공된다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61P 31/14 (2018.01)
C07K 14/005 (2013.01)
A61K 2039/53 (2013.01)
C12N 2710/10043 (2013.01)
C12N 2710/10071 (2013.01)
C12N 2770/20022 (2013.01)
C12N 2770/20034 (2013.01)

(72) 발명자

하산, 아메드

미국 미주리 63130 세인트 루이스, 원 브로킹스 드
 라이브

쿠리엘 데이비드

미국 미주리 63130 세인트 루이스, 원 브로킹스 드
 라이브

(30) 우선권주장

63/375,803	2022년09월15일	미국(US)
63/384,075	2022년11월16일	미국(US)
63/434,815	2022년12월22일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

비-인간 아데노바이러스의 게놈을 포함하는 아데노바이러스 벡터에 있어서, 이때 아데노바이러스의 게놈은 벡터에 천연 E1 및 선택적으로 E3또는 E3B 유전자좌가 결여되도록 변형되었고, 서열 식별 번호: 10, 12, 20, 21 중 임의의 것과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 SARS-CoV-2 스파이크 (S) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 또는 이의 번역원성 부분 또는 이의 단편을 포함하는, 아데노바이러스 벡터.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 이때 상기 비-인간 아데노바이러스는 유인원 아데노바이러스 (SAdV)인, 아데노바이러스 벡터.

청구항 3

청구항 1 또는 2 중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 핵산 서열은 서열 식별 번호: 10-12, 20 또는 21 중 하나 또는 그 이상에 대해 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 인코딩하는, 아데노바이러스 벡터.

청구항 4

청구항 2에 있어서, 서열 식별 번호: 13-19 중 임의의 하나에 대해 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하거나, 이러한 핵산 서열로 구성된, 아데노바이러스 벡터.

청구항 5

서열 식별 번호: 10-12, 20, 21 중 임의의 하나에 대해 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 이의 번역원성 부분, 또는 이의 단편을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 아데노바이러스 벡터.

청구항 6

서열 식별 번호: 13-19 중 임의의 하나에 대해 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하거나, 이러한 핵산 서열로 구성된, 아데노바이러스 벡터.

청구항 7

핵산 서열을 포함하는 아데노바이러스 벡터에 있어서, 이때 상기 핵산 서열은 T19I, L24S, del25-27, 69-70del, G142D, V213G, G339D, S371F, S373P, S375F, T376A, K417N, N440K, S477N, T478K, E484A, Q493R, L452R, F486V, Q498R, N501Y, D614G, H655Y, N679K, P681H, R682G, R683S, R685S, N764K, D796Y, A942P, Q954H, N969K, K988P 및 V989P로 구성된 목록으로부터 적어도 10개, 또는 적어도 15개, 또는 적어도 20개, 또는 적어도 25개, 또는 적어도 30개 돌연변이를 포함하는 서열 식별 번호: 3에 대해 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 동일한 아미노산 서열을 인코딩하는, 아데노바이러스 벡터.

청구항 8

청구항 7에 있어서, F819P, A894P, A901P, A944P, K988P 및 V989P로 제공된 바와 같이, 적어도 2개, 또는 적어도 3개, 또는 적어도 4개, 또는 적어도 5개, 또는 6개의 안정화 돌연변이를 포함하는, 아데노바이러스 벡터.

청구항 9

청구항 5-8 중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 아데노바이러스 벡터는 E1에 기능적 결실을 갖고, 임의 선택적으로 E3 또는 E3B 유전자에 기능적 결실을 갖는, 아데노바이러스 벡터.

청구항 10

청구항 5-9 중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 아데노바이러스 벡터는 유인원 아데노바이러스 벡터인, 아데노바이러스 벡터.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 이때 상기 아데노바이러스 벡터는 침팬지 아데노바이러스 벡터 36인, 아데노바이러스 벡터.

청구항 12

청구항 1-11 중 임의의 한 항에 따른 아데노바이러스 벡터, 그리고 약제학적으로 수용가능한 담체, 희석제, 부형제, 또는 어쥬번트를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 13

청구항 1-11 중 임의의 한 항에 따른 아데노바이러스 벡터, 그리고 약제학적으로 수용가능한 담체, 희석제, 부형제, 또는 어쥬번트를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 14

청구항 12에 있어서, 또는 청구항 10에 있어서, 하나 또는 그 이상의 활성 성분들을 더 포함하는, 약제학적 조성물 또는 면역원성 조성물.

청구항 15

청구항 12에 있어서, 또는 청구항 13에 있어서, 이때 상기 조성물은 비강내 또는 근육내 투여용으로 제형화되는, 약제학적 조성물 또는 면역원성 조성물.

청구항 16

선행 청구항들 중 임의의 한 항에 따른 아데노바이러스 벡터 또는 조성물로 형질도입된 숙주 세포.

청구항 17

선행 청구항들 중 임의의 한 항에 따른 조성물 또는 바이러스 벡터를 생산하는 패키징 세포주.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 이때 상기 세포는 선행 청구항들 중 임의의 한 항의 아데노바이러스 벡터에서 기능적으로 삭제된 아데노바이러스 유전자의 보체를 포함하는, 패키징 세포주.

청구항 19

청구항 17에 있어서, 이때 기능적으로 삭제된 아데노바이러스 유전자의 보체는 E1, E3 또는 E3B 유전자 중 하나 또는 그 이상을 포함하는, 패키징 세포주.

청구항 20

다음을 포함하는 키트: (i) 청구항 16에 따른 숙주 세포, 청구항 18에 따른 패키징 세포주, 청구항 1-11 중 임

의의 한 항에 따른 아데노바이러스 벡터, 청구항 12에 따른 약제학적 조성물 또는 청구항 13에 따른 면역원성 조성물 중 하나 또는 그 이상, 그리고 (ii) 사용 지침.

청구항 21

청구항 1-11 중 임의의 한 항에 따른 아데노바이러스 벡터를 포함하는 코로나바이러스 백신.

청구항 22

청구항 1-11 중 임의의 한 항에 따른 아데노바이러스 벡터, 청구항 9에 따른 약제학적 조성물, 또는 청구항 13에 따른 면역원성 조성물을 이미 투여받은 제1 대상체의 혈청을 포함하는 조성물.

청구항 23

코로나바이러스 감염을 갖는 제2 대상체를 치료하는 방법에 있어서, 청구항 22에 따른 혈청을 포함하는 조성물의 면역원적 효과량을 상기 제2 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 24

코로나바이러스에 대하여 면역 반응의 유도가 필요한 대상체에서 이를 유도하는 방법에 있어서, 청구항 1-11 중 임의의 한 항에 따른 아데노바이러스 벡터를 포함하는 조성물, 청구항 12에 따른 약제학적 조성물 또는 청구항 13에 따른 면역원성 조성물의 면역원적 효과량을 상기 제2 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 25

코로나바이러스 감염의 치료 또는 예방을 필요한 대상체에서 이를 유도하는 방법에 있어서, 청구항 1-11 중 임의의 한 항에 따른 아데노바이러스 벡터를 포함하는 조성물, 청구항 9에 따른 약제학적 조성물 또는 청구항 13에 따른 면역원성 조성물, 또는 청구항 22에 따른 혈청을 포함하는 조성물의 면역원적 효과량을 상기 제2 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 26

청구항 23-25 중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 조성물은 비강으로 투여되는, 방법.

청구항 27

청구항 23-25 중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 조성물은 근육내로 투여되는, 방법.

청구항 28

청구항 23-27 중 임의의 한 항에 있어서, 상기 조성물을 한 번 또는 그 이상 추가 투여하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 29

청구항 24 또는 25에 있어서, 이때 상기 코로나바이러스는 SARS-CoV-2 바이러스, 또는 이의 변이체인, 방법.

청구항 30

청구항 29에 있어서, 이때 상기 코로나바이러스는 알파, 베타, 감마, 델타 또는 오미크론 변이체 또는 이의 하위 변이체인, 방법.

청구항 31

청구항 29에 있어서, 이때 상기 코로나바이러스는 오미크론 균주 또는 이의 하위변이체인, 방법.

청구항 32

청구항 24 또는 25에 있어서, 이때 상기 대상체는 인간인, 방법.

청구항 33

청구항 32에 있어서, 이때 상기 대상체는 코로나바이러스 감염을 갖는 것으로 의심되거나, 이의 감염 발달 위험에 처한 대항체인, 방법.

청구항 34

아데노바이러스를 만드는 방법에 있어서, 청구항 1-21 중 임의의 한 항에 따른 아데노바이러스 벡터로 세포를 형질감염시키는 단계; 상기 세포가 상기 재조합 아데노바이러스를 생산하도록 하는 조건 하에서 상기 세포를 배양하는 단계; 그리고 상기 재조합 아데노바이러스를 수거하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 35

청구항 34에 있어서, 이때 상기 세포는 HEK, Vero 또는 PER 세포인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 정부 지원

[0002] 본 발명은 National Institutes of Health에 의해 제공되는 CA211096에서 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명의 특정 권리를 보유한다.

[0003] 기술의 분야

[0004] 본 명세서는 일반적으로 생명공학 및 의학 분야에 관한 것이며, 더욱 구체적으로는 호흡기 바이러스 감염에 대한 강화된 치료법을 위한 백신에 사용될 수 있는 핵산 구조체, 폴리펩티드 및 벡터 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.

[0005] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0006] 본 출원은 2022년 12월 22일에 출원된 미국 가출원 번호 63/434,815의 이익을 주장하고, 2022년 11월 16일에 출원된 미국 가출원 번호 63/384,075의 이익을 주장하고, 2022년 9월 15일에 출원된 미국 가출원 번호 63/375,803의 이익을 주장하고, 그리고 2022년 2월 2일에 출원된 미국 가출원 번호 63/305,979의 이익을 주장하며, 이의 내용들은 그 전문이 본원의 참고자료에 편입된다.

배경 기술

[0007] 배경

[0008] 바이러스 감염으로 인해 매년 수십만 명이 사망한다. 그러나, 많은 바이러스의 경우 치료 옵션이 제한되어 있다. 또한, 바이러스 보균자는 증상이 없을 수 있으므로 감염되었으나, 증상이 없는 개체로부터 전염률이 높아질 수 있다. 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)는 코로나바이러스감염증 2019(COVID-19) 증후군의 병원체이며, 폐렴, 호흡부전, 전신염증질환으로 급속히 진행될 수 있다. SARS-CoV-2는 2019년 말 중국 우한의 중증 호흡기 질환 환자로부터 처음 분리된 양성 단일 가닥 RNA 바이러스다. 베타코로나바이러스인 SARS-CoV-2는 다른 두 가지 고병원성 호흡기 바이러스인 SARS-CoV 및 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스 (MERS-CoV)와 관련이 있다. SARS-CoV-2 감염은 호흡 부전으로 진행될 수 있고, 심장 병리, 위장 질환, 응고병증 및 고염증 증후군도 나타낼 수 있는 임상 증후군을 초래한다. 노인, 면역 저하자, 동반 질환 (가령, 비만, 당뇨병, 고혈압)이 있는 사람들은 COVID-19로 인해 사망할 위험이 가장 높다. 팬데믹이 시작된 이후, 전 세계적으로 6억 6900만 명 이상의 감염과 680만 명 이상의 사망자가 기록되었다.

[0009] COVID-19의 광범위한 질병률, 사망률 및 불안정한 사회 경제적 결과는 감염의 심각성을 완화하고, 전파를 억제하고, 전염병을 종식시키고, 전염병의 재발을 방지하기 위해 효과적인 SARS-CoV-2 백신 배포의 긴급한 필요성을 강조한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 요약

- [0011] 본 기술의 측면은 비인간 아데노바이러스의 게놈을 포함하는 아데노바이러스 벡터를 포괄한다. 아데노바이러스의 게놈은 벡터에 천연 E1 및 선택적으로 E3 또는 E3B 유전자좌가 결합되도록 변형되었고, 서열 식별 번호: 10, 12, 20, 21 중 임의의 것과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 SARS-CoV-2 스파이크 (S) 단백질을 코딩하는 핵산 서열 또는 이의 번역원성 부분 또는 이의 단편을 포함한다.
- [0012] 본 기술의 또다른 측면서열 식별 번호: 10-12, 20, 21 중 임의의 것에 대해 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 동일한 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열 또는 이의 번역원성 부분, 또는 이의 단편을 포함하는 아데노바이러스 벡터를 포괄한다.
- [0013] 본 기술의 추가적인 측면은 서열 식별 번호: 13-19 중 임의의 하나의 서열에 대해 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 동일한 핵산 서열을 포함하거나, 이로 구성된 아데노바이러스 벡터를 포괄한다.
- [0014] 본 기술의 여전히 또다른 측면은 핵산 서열을 포함하는 아데노바이러스 벡터를 포괄하며, 이때 상기 핵산 서열은 T19I, L24S, del125-27, 69-70del, G142D, V213G, G339D, S371F, S373P, S375F, T376A, K417N, N440K, S477N, T478K, E484A, Q493R, L452R, F486V, Q498R, N501Y, D614G, H655Y, N679K, P681H, R682G, R683S, R685S, N764K, D796Y, A942P Q954H, N969K, K988P 및 V989P로 구성된 목록으로부터 적어도 10개, 또는 적어도 15개, 또는 적어도 20개, 또는 적어도 25개, 또는 적어도 30개 돌연변이를 포함하는 서열 식별 번호: 3에 대해 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 동일한 아미노산 서열을 인코딩한다.
- [0015] 또 다른 측면은 본원에 기술된 아데노바이러스 벡터를 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다. 유사하게, 한 측면은 본원에 기술된 아데노바이러스 벡터를 포함하는 번역원성 조성물을 포괄한다.
- [0016] 본 기술의 일부 측면들은 본원에 기술된 아데노바이러스 벡터로 형질도입된 숙주 세포, 또는 본원에 기술된 아데노바이러스 벡터를 생산하는 패키지 세포주를 포괄한다.
- [0017] 본 기술의 다른 측면들은 키트를 포괄한다. 일반적으로 말하자면, 상기 키트는 다음을 포함한다: (i) 본원에 기술된 숙주 세포, 본원에 기술된 패키징 세포주, 본원에 기술된 아데노바이러스 벡터, 본원에 기술된 약제학적 조성물, 또는 본원에 기술된 번역원성 조성물 중 하나 또는 그 이상의 것, 그리고 (ii) 사용 지침.
- [0018] 본 기술의 특정 측면들은 본원에서 상세히 기술된 아데노바이러스 벡터를 포함하는 코로나바이러스 백신을 포괄한다. 특정 측면들에서, 상기 기술은 본원에 기술된 아데노바이러스 벡터, 본원에 기술된 약제학적 조성물, 또는 본원에 기술된 번역원성 조성물이 이미 투여된 제1 대상체의 혈청을 포함하는 조성물을 포괄한다. 본 기술은 제1 대상체의 혈청을 포함하는 조성물의 번역원성 유효량을 제2 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 코로나바이러스에 감염된 제2 대상체를 치료하는 방법을 추가로 포괄한다.
- [0019] 여전히 또다른 측면에서, 본 기술은 코로나바이러스에 대항하여 면역 반응의 유도를 필요로 하는 대상체에서 이를 유도하는 방법을 포괄한다. 상기 방법은 본원에 기술된 아데노바이러스 벡터를 포함하는 조성물, 본원에 기술된 약제학적 조성물, 또는 본원에 기술된 번역원성 조성물의 면역학적 효과량을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0020] 다른 측면들 및 서술된 것들은 아래에 더 자세하게 설명된다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 당업자는 아래에 설명된 도면이 단지 예시를 위한 것임을 이해할 것이다. 도면은 어떤 식으로든 본 교시의 범위를 제한하려는 것이 아니다.

본 출원 파일에는 컬러로 실행된 도면이 적어도 하나의 도면을 함유한다. 컬러 도면이 있는 본 특허 출원 간행물의 사본은 요청 및 필요한 요금 지불시, 특허청(Office)에서 제공한다.

도 1A 도입유전자 카세트의 다이어그램을 보여준다: ChAd-대조군에는 도입유전자 삽입체가 없고; ChAd-SARS-CoV-2-S는 표시된 두 개의 플러된 돌연변이가 있는 SARS-CoV-2 S 단백질을 인코딩한다.

도 1B는 ChAd-SARS-CoV-2-S 형질도입된 293 세포와 항-S mAbs의 결합을 보여준다. (좌측) 요약: +, ++, +++, -는 차례로 < 25%, 25-50%, > 50%, 및 결합없음을 나타낸다. (우측) 두 가지 실험의 대표적인 유세포 분석 히스토그램.

도 1C는 4-주령 암컷 BALB/c 마우스에 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 근육내 경로로 면역주사하고, 4주 후에 추가접종을 한 것을 보여준다. 프라이밍 또는 부스터-후 21일차에 면역화된 마우스 혈청의 항체 반응을 평가했다.

도 1D는 ELISA 측정된 항-S 및 RBD IgG 수준을 보여준다.

도 1E는 FRNT 결정된 중화 활성을 보여준다. 데이터는 두 가지 실험에서 풀링된다 ($n = 15$ 내지 30; Mann-Whitney 테스트: ****, $P < 0.0001$).

도 1F는 S 단백질 캡티드 풀(pool)로 재-자극한 후, 부스터-면역화 후 7일차 시점에 세포-매개된 반응을 분석했음을 보여준다. CD8+ T 세포에서는 IFN γ 및 그랜자임 B 발현에 대해 비장세포를 분석하였고, 유동 세포분석법을 통해 CD4⁺ T 세포에서만 그랜자임 B 발현을 분석했다.

도 1G는 양성 세포 집단의 빈도 및 숫자를 요약한 것을 보여준다 ($n = 5$; Mann-Whitney 테스트: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 검출 한계 (LOD)를 나타낸다.

도 1H에서는 부스터-후 7일차에 비장이 수확되었고, SARS-CoV-2 스파이크-특이적 IgG+ 항체-분비 세포 (ASC) 빈도는 ELISPOT에 의해 측정되었음을 보여준다 (Mann-Whitney 테스트: ****, $P < 0.0001$). 막대와 열은 중앙값을 표시하고, 점선은 분석의 검출 한계 (LOD)를 나타낸다.

도 2A는 프라이밍 또는 부스터(도 1에 기술됨) 후 21일차에 수집된 ChAd-대조군 면역화된 마우스로부터의 혈청을 ELISA에 의해 S-특이적 IgG 반응에 대해 분석한 것을 보여준다. 4-주령 암컷 BALB/c 마우스에 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 근육내 경로를 통해 프라이밍 또는 부스터 접종했다.

도 2B는 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2 백신접종된 마우스의 혈청 샘플이 프라이밍-후 21일차에 수집되었음을 보여준다. 4-주령 암컷 BALB/c 마우스에 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 근육내 경로를 통해 프라이밍 또는 부스터 접종했다.

도 2C는 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2 백신접종된 마우스의 혈청 샘플을 부스터접종-후 21일차에 수집하였고, FRNT를 통해 중화 활성을 분석했음을 보여준다. 표시된 백신에 대해 개별 마우스에 해당하는 혈청 중화 곡선이 표시된다 ($n =$ 그룹당 15-30 마리). 각 점은 표준 편차 (SD)를 나타내는 오류 막대와 함께 두 번의 기술 복제의 평균을 나타낸다. ChAd-SARS-CoV-2-S 백신은 초점 감소 중화 시험 (FRNT)으로 측정된 중화항체를 유도한다.

도 2D는 근육 경로를 통하여 백신접종된 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S 마우스의 SARS-CoV-2 공격 5일 전, 공격후 8일차에 얻은 쌍별 혈청에서 ELISA 측정된 항-SARS-CoV-2 NP IgG 반응을 보여준다 ($n = 5$: ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; 대응 (paired) t 테스트). 점선은 무경험(naive) 혈청의 평균 IgG 역가를 나타낸다.

도 3은 T 세포 반응을 분석하기 위한 게이팅 전략(Gating strategy)을 보여준다. 4-주령 암컷 BALB/c 마우스에게 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역접종하였고, 4주 후 부스터 접종하였다. T 세포 반응은 부스터-후 7일차 시점에 비장세포에서 분석되었다. 세포는 림프구 (FSC-A/SSC-A), 단일체 (SSC-W/SSC-H), 살아있는 세포 (Aqua-), CD45+, CD19-에 이어 IFN γ 또는 그랜자임 B를 발현하는 CD4+ 또는 CD8+ 세포 집단에 대해 게이팅되었다.

도 4A에서는 표시된 백신 그룹의 혈청에서 오로지 프라이밍 후 FRNT에 의해 결정된 Hu-AdV5-hACE2의 중화 활성을 보여준다. 4-주령-암컷 BALB/c 마우스를 프라이밍하거나, 프라이밍 및 부스터접종했다. Hu-AdV5-hACE2 형질도입 하루 전, 혈청 샘플을 수집했다.

도 4B에서는 표시된 백신 그룹의 혈청에서 프라이밍 및 부스터접종-후 FRNT에 의해 결정된 Hu-AdV5-hACE2의 중화 활성을 보여준다. 각 기호는 단일 동물을 나타내며; 각 점은 두 번의 기술 반복을 나타내고, 막대는 그 범위를 나타낸다. 양성 대조군 (항-Hu-Adv5 혈청)이 참조 프레임으로 내포된다.

도 5A는 SARS-CoV-2 감염에 대해 근육 내로 전달되는 ChAd-SARS-CoV-2-S의 보호 효능을 연구하기 위한 백신접종 및 공격의 계획이다. 4-주령 BALB/c 암컷 마우스를 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역접종했다. 일부

마우스들에게 동종 백신의 부스터 투약분이 제공되었다. 면역접종-후 35일차에 마우스들에게 다음과 같이 SARS-CoV-2를 투여했다: 동물을 항-Ifnar1 mAb로 처리하였고, 하루-뒤 비강내 경로를 통해 Hu-AdV5-hACE2를 형질도입시켰다. 5일 후, 마우스에게 비강 내 경로를 통해 SARS-CoV-2를 4×10^5 포커스-형성 단위(FFU)로 투여했다.

도 5B는 분석을 위해 조직이 4 및 8dpi에서 수확되었음을 보여준다. 폐의 감염성 바이러스는 플라크 분석으로 측정되었다.

도 5C는 RT-qPCR을 통해 폐, 비장 및 심장에서 바이러스 RNA 수준이 4 및 8dpi로 측정되었음을 보여준다 (C) (n = 3-7, Mann-Whitney 테스트: *** P < 0.001).

도 5D는 4dpi로 수확한 폐에서 SARS-CoV-2 프로브 (갈색)를 사용한 바이러스 RNA 제자리(*in situ*) 하이브리드화를 보여준다. 이미지는 고-배율 배율 삽입 (그룹당 n = 3 중에서 대표 이미지)이 포함된 저-배율(상단, 스케일 바, 100 μ m) 및 중간- (중간, 스케일 바, 100 μ m) 확대를 보여준다.

도 5E는 4dpi에서 폐 균질액의 표시된 사이토킨 및 케모킨의 유전자 발현 배수 변화를 보여준데, 이는 Gapdh 수준으로 정규화하고, 백신접종받지 않고, 공격받지 않았던, 무경험 대조군과의 비교 후 RT-qPCR에 의해 결정되었다 (n = 7; Mann-Whitney 테스트: ***, P < 0.001).

도 5F는 프라임-부스트 면역화를 받은 마우스는 부스터 면역접종-후 35일째에 공격받았다. 분석을 위해 조직을 4dpi에서 수집하였다. 폐의 감염성 바이러스는 플라크 분석으로 결정되었다.

도 5G는 프라임-부스트 면역접종을 받은 마우스를 부스터 면역 후 35일째에 감염시켰으며, RT-qPCR을 사용하여 폐, 비장 및 심장에서 바이러스 RNA를 측정했음을 보여준다 (G) (n = 6-7; Mann-Whitney 테스트: **, P < 0.01). (B-C 및 E-G) 열은 중앙값을 표시하고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 6은 ChAd-SARS-CoV-2-S를 사용한 단일 용량의 근육 내 백신접종이 SARS-CoV-2로 인한 폐 염증으로부터 마우스를 보호한다는 것을 보여준다. 4-주령 암컷 BALB/c 마우스를 ChAd-대조군 및 ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역접종하였고, **도 5**에 기술된 방식에 따라 공격하였다. 폐는 8dpi에서 수거하였다. 단면을 헤마톡실린과 에오신으로 착색하였고, 40x (왼쪽, 눈금 막대, 250 μ m), 200x (중간, 눈금, 50 μ m) 및 400x (오른쪽, 눈금 막대, 25 μ m) 배율로 이미지화했다. 각 이미지는 3마리의 마우스 그룹의 대표한다.

도 7A는 ChAd-SARS-CoV-2-S의 비강내 면역접종-후 면역 반응을 연구하기 위한 실험 계획을 보여준다. 5-주령 BALB/c 암컷 마우스에게 비강 경로를 통해 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역주사했다.

도 7B는 프라이밍을 평가한 후 1개월-시점에 면역접종받았던 마우스의 혈청에서 항체 반응을 보여준다. ELISA로 SARS-CoV-2 S- 및 RBD-특이적 IgG를 측정했다.

도 7C에서는 SARS-CoV-2 S- 및 RBD-특이적 IgA 수준을 측정한 ELISA를 보여준다.

도 7D에서는 FRNT 결정된 중화 활성을 보여준다. 데이터는 그룹당 n = 10-25마리의 마우스를 사용한 두 번의 실험에서 풀링되었다 (Mann-Whitney 테스트: ****, P < 0.0001).

도 7E에서는 부스터 투여를 받았던 마우스를 일주일 후에 희생시켜, 점막 및 세포 매개 면역 반응을 평가한 것을 보여준다. SARS-CoV-2 S- 및 RBD-특이적 IgG.

도 7F에서는 BAL 체액 내 SARS-CoV-2 S- 및 RBD-특이적 IgA 수준이 ELISA에 의해 결정되었음을 보여준다.

도 7G는 FRNT로 측정한 SARS-CoV-2에 대한 BAL 유체의 중화 활성을 보여준다.

도 7H는 폐의 CD8+ T 세포를 S 단백질 펩타이드 푸울로 재-자극한 후, 유동 세포분석법으로 IFN γ 및 그랜자임 B 발현에 대해 분석했음을 보여준다.

도 7I는 폐의 CD8+ T 세포도 CD103 및 CD69의 발현에 대해 표현형이 결정되었음을 보여준다.

도 7J는 추가 투여 1주일 후 수확한 비장에서 SARS-CoV-2 스파이크-특이적 IgG+ 및 IgA+ 항체 분비 세포 (ASC) 빈도를 ELISPOT으로 측정했음을 보여준다. 점막 및 세포-매개된 반응에 대한 데이터는 두 가지 실험에서 풀링되었다 (E-I: 그룹당 n = 7-9 마리; Mann-Whitney 테스트: ***, P < 0.001); J: 그룹당 n = 5 마리; Mann-Whitney 테스트: **, P < 0.01; ***, P < 0.001). (B-J) 막대 및 열은 중앙값을 표시하고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 8A에서는 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S 백신 접종된 마우스의 혈청 샘플을 SARS-CoV-2 균주 2019 n-

CoV/USA_WA1/2020에 대한 중화 활성에 대해 테스트했음을 보여준다 (그룹당 $n = 8-10$ 마리). 5-주령 암컷 BALB/c 마우스에 비강 내 접종 경로를 통해 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역주사했다. 면역접종-후 1개월 시점에 수집된 혈청 샘플을 FRNT로 중화 활성에 대해 분석했다. 프라이밍-후 30일차 시점에 마우스에게 부스터 접종하였고, 1주일 후에 희생시켜 면역 반응을 평가했다.

도 8B에서는 ChAd-SARS-CoV-2-S 백신접종된 마우스의 혈청 샘플을 통해 재조합 루시퍼라제-발현시키는 SARS-CoV-2 바이러스(야생형 (왼쪽) 및 D614G 변종 (가운데))의 중화 여부를 테스트한 것을 보여준다. (우) 대응하는 EC50 값을 나타낸다 ($n = 5$; n.s. 유의적이지 않음, 대응 t 테스트).

도 8C에서는 BAL 유체를 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S 백신접종된 마우스로부터 수집했으며, SARS-CoV-2 균주 2019 n-CoV/USA_WA1/2020의 중화는 FRNT 분석을 사용하여 측정되었음을 보여준다 (그룹당 $n = 8-10$ 마리). 각 점은 SD를 나타내는 오류 막대와 함께 두 번의 기술 복제의 평균을 나타낸다.

도 9A에서는 분석을 위해 조직과 비강 세척액을 4 및 8dpi에서 수집했음을 보여준다. 폐의 감염성 바이러스는 플라크 분석으로 측정되었다. 5-주령 BALB/c 암컷 마우스에게 비강 경로를 통해 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역주사했다. 면역접종-후 35일차에 마우스들을 다음과 같이 공격했다: 동물을 항-Ifnar1 mAb로 처리하였고, 하루-뒤 비강내 경로를 통해 Hu-AdV5-hACE2를 형질도입시켰다. 5일 후, 마우스에게 SARS-CoV-2 4×10^5 FFU를 비강 내로 투여했다.

도 9B에서는 폐, 비장, 심장, 비갑개 및 비강 세척의 바이러스 RNA 수준이 RT-qPCR에 의해 4 및 8dpi에서 측정되었음을 보여준다. 5-주령 BALB/c 암컷 마우스에게 비강 경로를 통해 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역주사했다. 면역접종-후 35일차에 마우스들을 다음과 같이 공격했다: 동물을 항-Ifnar1 mAb로 처리하였고, 하루-뒤 비강내 경로를 통해 Hu-AdV5-hACE2를 형질도입시켰다. 5일 후, 마우스에게 SARS-CoV-2 4×10^5 FFU를 비강 내로 투여했다.

도 9C에서는 표시된 사이토킨 및 케모킨의 유전자 발현의 배수 변화를 보여주는데, 이는 RT-qPCR에 의해 결정되었고, Gapdh로 표준화되었으며, 4dpi에서 폐 균질액의 순수 대조군과 비교되었다 (2차례 실험, $n = 6-9$; 중앙값으로 표시된다: *, $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; Mann-Whitney 테스트). 열은 중앙값을 표시하고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다. 5-주령 BALB/c 암컷 마우스에게 비강 경로를 통해 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역주사했다. 면역접종-후 35일차에 마우스들을 다음과 같이 공격했다: 동물을 항-Ifnar1 mAb로 처리하였고, 하루-뒤 비강내 경로를 통해 Hu-AdV5-hACE2를 형질도입시켰다. 5일 후, 마우스에게 SARS-CoV-2 4×10^5 FFU를 비강 내로 투여했다.

도 9D에서는 폐가 8dpi에서 수거되었음을 나타낸다. 단면을 헤마톡실린과 에오신으로 착색하였고, 40x (왼쪽, 눈금 막대, $250 \mu\text{m}$), 200x (중간, 눈금, $50 \mu\text{m}$) 및 400x (오른쪽, 눈금 막대, $25 \mu\text{m}$) 배율로 이미지화했다. 각 이미지는 3마리의 마우스 그룹의 대표한다. 5-주령 BALB/c 암컷 마우스에게 비강 경로를 통해 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역주사했다. 면역접종-후 35일차에 마우스들을 다음과 같이 공격했다: 동물을 항-Ifnar1 mAb로 처리하였고, 하루-뒤 비강내 경로를 통해 Hu-AdV5-hACE2를 형질도입시켰다. 5일 후, 마우스에게 SARS-CoV-2 4×10^5 FFU를 비강 내로 투여했다.

도 9E에서는 비강내 경로로 백신접종된 hAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S 마우스의 SARS-CoV-2 공격-전 5일차 시점 및 공격-후 8일차 시점에 얻은 한 쌍의 혈청에서 ELISA 측정된 항-SARS-CoV-2 NP IgM(왼쪽) 및 IgG(오른쪽) 항체 반응을 보여준다 ($n = 6$: ns; 유의적이지 않음; ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$; 대응 t 테스트). 점선은 무경험 혈청의 평균 IgM 및 IgG 역가를 나타낸다 ($n = 6$). 5-주령 BALB/c 암컷 마우스에게 비강 경로를 통해 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역주사했다. 면역접종-후 35일차에 마우스들을 다음과 같이 공격했다: 동물을 항-Ifnar1 mAb로 처리하였고, 하루-뒤 비강내 경로를 통해 Hu-AdV5-hACE2를 형질도입시켰다. 5일 후, 마우스에게 SARS-CoV-2 4×10^5 FFU를 비강 내로 투여했다.

도 10A는 면역접종 계획을 보여준다. 5-주령 암컷 BALB/c 마우스에게 ChAd-대조군 바이러스 입자 10^{10} 또는 감소하는 투여분량 (10^{10} , 10^9 및 10^8 vp)의 ChAd-SARS-CoV-2-S를 IN 또는 IM 경로를 통해 백신 접종했다.

도 10B에서는 면역접종된 마우스의 혈청에서 체액성 반응을 평가했다 ($n = 6-14$). 100에서 IN-면역접종된 마우스의 항-S 및 RBD IgG 수준을 측정한 ELISA가 제공된다. 백신군과 대조군을 비교하는 Dunnett의 사후-테스트를 사용한 일원 분산 분석: ns, 유의적이지 않음; **, $P < 0.01$; ****, $P < 0.0001$).

도 10C에서는 면역화된 마우스의 혈청에서 체액성 반응을 평가했다 ($n = 6-14$). 100에서 IN-면역접종된 마우스

의 IgA 수준을 측정된 ELISA가 제공된다. 백신군과 대조군을 비교하는 Dunnett의 사후-테스트를 사용한 일원 분산 분석: ns, 유의적이지 않음; **, $P < 0.01$; ****, $P < 0.0001$). 백신군과 대조군을 비교하는 Dunnett의 사후-테스트를 사용한 일원 분산 분석: ns, 유의적이지 않음; **, $P < 0.01$; ****, $P < 0.0001$). 백신군과 대조군을 비교하는 Dunnett의 사후-테스트를 사용한 일원 분산 분석: ns, 유의적이지 않음; **, $P < 0.01$; ****, $P < 0.0001$).

도 10D에서는 백신접종-후 100일 시점에 IN-면역접종된 마우스의 FRNT에 의해 측정된 혈청의 중화 활성을 보여준다. 백신군과 대조군을 비교하는 Dunnett의 사후-테스트를 사용한 일원 분산 분석: ns, 유의적이지 않음; **, $P < 0.01$; ****, $P < 0.0001$).

도 10E는 백신접종-후 100일차 시점에 IN-면역접종된 마우스로부터, 또는 100일차 시점에 IM-면역접종된 마우스로부터 측정된 항-S 및 RBD IgG 수준을 ELISA로 보여준다. 백신군과 대조군을 비교하는 Dunnett의 사후-테스트를 사용한 일원 분산 분석: ns, 유의적이지 않음; **, $P < 0.01$; ****, $P < 0.0001$).

도 10F는 백신접종-후 100일차 시점에 IN-면역접종된 마우스로부터, 또는 100일차 시점에 IM-면역접종된 마우스로부터 측정된 항-S 및 RBD IgA 수준을 ELISA로 보여준다. 백신군과 대조군을 비교하는 Dunnett의 사후-테스트를 사용한 일원 분산 분석: ns, 유의적이지 않음; **, $P < 0.01$; ****, $P < 0.0001$).

도 10G에서는 백신접종-후 100일 시점에 IM-면역접종된 마우스의 FRNT에 의해 측정된 혈청의 중화 활성을 보여준다. 백신군과 대조군을 비교하는 Dunnett의 사후-테스트를 사용한 일원 분산 분석: ns, 유의적이지 않음; **, $P < 0.01$; ****, $P < 0.0001$).

도 10H에서는 면역접종된 마우스의 혈청에서 체액성 반응을 평가했다 ($n = 6-14$). 200에서 IN-면역접종된 마우스의 항-S 및 RBD IgG 수준을 측정된 ELISA가 제공된다. 백신군과 대조군을 비교하는 Dunnett의 사후-테스트를 사용한 일원 분산 분석: ns, 유의적이지 않음; **, $P < 0.01$; ****, $P < 0.0001$).

도 10I에서는 면역접종된 마우스의 혈청에서 체액성 반응을 평가했다 ($n = 6-14$). 200에서 IN-면역접종된 마우스의 항-S 및 RBD IgA 수준을 측정된 ELISA가 제공된다. 백신군과 대조군을 비교하는 Dunnett의 사후-테스트를 사용한 일원 분산 분석: ns, 유의적이지 않음; **, $P < 0.01$; ****, $P < 0.0001$).

도 10J에서는 백신접종-후 200일 시점에 IN-면역접종된 마우스의 FRNT에 의해 측정된 혈청의 중화 활성을 보여준다. 백신군과 대조군을 비교하는 Dunnett의 사후-테스트를 사용한 일원 분산 분석: ns, 유의적이지 않음; **, $P < 0.01$; ****, $P < 0.0001$).

도 10K는 백신접종-후 200일차 시점에 IN-면역접종된 마우스로부터, 또는 100일차 시점에 IM-면역접종된 마우스로부터 측정된 항-S 및 RBD IgG 수준을 ELISA로 보여준다. 백신군과 대조군을 비교하는 Dunnett의 사후-테스트를 사용한 일원 분산 분석: ns, 유의적이지 않음; **, $P < 0.01$; ****, $P < 0.0001$).

도 10L은 백신접종-후 200일차 시점에 IN-면역접종된 마우스로부터, 또는 100일차 시점에 IM-면역접종된 마우스로부터 측정된 항-S 및 RBD IgA 수준을 ELISA로 보여준다. 백신군과 대조군을 비교하는 Dunnett의 사후-테스트를 사용한 일원 분산 분석: ns, 유의적이지 않음; **, $P < 0.01$; ****, $P < 0.0001$).

도 10M에서는 백신접종-후 200일 시점에 IM-면역접종된 마우스의 FRNT에 의해 측정된 혈청의 중화 활성을 보여준다. 백신군과 대조군을 비교하는 Dunnett의 사후-테스트를 사용한 일원 분산 분석: ns, 유의적이지 않음; **, $P < 0.01$; ****, $P < 0.0001$).

도 10N에서는 ELISPOT 분석으로 측정된 골수 내 S-특이적 IgG 또는 IgA 생산 LLPCs의 빈도를 보여준다 ($n = 4$). Mann-Whitney 테스트: *, $P < 0.05$. B-N, 막대는 중앙값을 표시하고, 점선은 분석의 검출 한계 (LOD)를 나타낸다.

도 11A는 ChAd-SARS-CoV-2-S 백신접종된 마우스의 혈청 샘플이 100일째에 수집되었음을 보여준다. 5-주령 암컷 BALB/c 마우스에게 IN 또는 IM 경로를 통해 단일 10^{10} , 10^9 , 또는 10^8 투여분량의 ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역주사했다.

도 11B는 ChAd-SARS-CoV-2-S 백신접종된 마우스의 혈청 샘플을 면역주사한-후 200일차 시점에 수집하여 FRNT를 통해 중화 활성에 대해 분석했음을 보여준다. 5-주령 암컷 BALB/c 마우스에게 IN 또는 IM 경로를 통해 단일 10^{10} , 10^9 , 또는 10^8 투여분량의 ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역주사했다. 표시된 백신에 대해 개별 마우스에 해당하는 혈청 중화 곡선이 표시된다 (그룹당 $n = 6-14$ 마리). 각 점은 SD를 나타내는 두 번의 기술 복제의 평균을 나

타낸다.

도 12A는 항-SARS-CoV-2 (WA1/2020 D614G) 스파이크 및 RBD IgG1의 양을 정량화하기 위해, Luminex 플랫폼으로 분석한 ChAd-SARS-CoV-2-S를 비강 내 접종한 마우스의 혈청을 보여준다. 막대는 평균값을 나타낸다.

도 12B는 다양한 SARS-CoV-2 단백질 변이체에 대한 항-SARS-CoV-2 IgG1의 양을 정량화하기 위해 luminex로 혈청을 분석한 것을 보여준다. 극 좌표(Polar plots)는 각 SARS-CoV-2 단백질 및 변이체에 대한 IgG1 백분위수 중앙값을 나타낸다.

도 12C에서는 SARS-CoV-2 스파이크 또는 RBD 단백질에 대한 각 백신 요법의 IgG 역가와 FcγR 결합 역가를 보여주는 히트맵(heatmap)을 보여준다. 각 사각형은 해당 조건에 대한 그룹 내 평균 z-점수를 나타낸다.

도 12D는 혈청을 일차 마우스 호중구 (mADNP) 또는 J774A.1 세포 (mADCP) 및 SARS-CoV-2 스파이크-코팅된 비드와 함께 배양하였고, 1h 후에 식세포작용을 측정하는 것을 보여준다. 막대는 평균을 나타내고, 오류 막대는 표준 편차를 나타낸다.

도 12E는 혈청을 일차 마우스 호중구 (mADNP) 또는 J774A.1 세포 (mADCP) 및 WA1/2020 D614G, B.1.1.7, 또는 B.1.351 스파이크-코팅된 비드와 함께 배양하였고, 1h 후에 식세포작용을 측정하는 것을 보여준다. 극 좌표(Polar plots)는 각 SARS-CoV-2 단백질 및 변이체에 대한 mADNP 또는 mADCP 백분위수 중앙값을 나타낸다. (A 및 D)의 경우: 백신과 대조군을 비교하는 Dunnett의 사후-테스트를 통한 일원-분산 분석: **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$). (A 및 D): 막대는 중앙값을 나타낸다.

도 13A는 BALB/c 마우스에서 SARS-CoV-2 감염에 대한 ChAd-SARS-CoV-2-S의 보호 효능의 지속성을 보여준다. 5-주령 암컷 BALB/c 마우스는 ChAd-대조군 10^{10} vp 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S 10^{10} , 10^9 및 10^8 로 IN 경로를 통해 획득되었다. 100일차에 마우스들을 다음과 같이 공격했다: 동물을 항-Ifnar1 mAb로 처리하였고, 하루-뒤 IN 경로를 통해 Hu-AdV5-hACE2를 형질도입시켰다. 5일 후, 마우스에게 비강내 경로를 통해 5×10^4 FFU의 SARS-CoV-2 WA1/2020을 접종했다. 그림에 표시된 조직을 4dpi로 수확하였고, RT-qPCR을 통해 면역화 후 100일 동안 공격한 마우스에서 바이러스 RNA 수준을 측정했다 ($n = 6-14$, Kruskal Wallis 및 Dunn의 사후 테스트: ns, 유의적이지 않음; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.1$; ***, $P < 0.001$ ****, $P < 0.0001$). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 13B는 BALB/c 마우스에서 SARS-CoV-2 감염에 대한 ChAd-SARS-CoV-2-S의 보호 효능의 지속성을 보여준다. 5-주령 암컷 BALB/c 마우스는 ChAd-대조군 10^{10} vp 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S 10^{10} , 10^9 및 10^8 로 IN 경로를 통해 획득되었다. 면역접종-후 100일차에 마우스들을 다음과 같이 공격했다: 동물을 항-Ifnar1 mAb로 처리하였고, 하루-뒤 IN 경로를 통해 Hu-AdV5-hACE2를 형질도입시켰다. 5일 후, 마우스에게 비강내 경로를 통해 5×10^4 FFU의 SARS-CoV-2 WA1/2020을 접종했다. 그림에 표시된 조직을 4dpi로 수확하였고, RT-qPCR을 통해 면역화 후 100일 동안 공격한 마우스에서 바이러스 RNA 수준을 측정했다 ($n = 6-14$, Kruskal Wallis 및 Dunn의 사후 테스트: ns, 유의적이지 않음; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.1$; ***, $P < 0.001$ ****, $P < 0.0001$). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 13C는 BALB/c 마우스에서 SARS-CoV-2 감염에 대한 ChAd-SARS-CoV-2-S의 보호 효능의 지속성을 보여준다. 5-주령 암컷 BALB/c 마우스는 ChAd-대조군 10^{10} vp 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S 10^{10} , 10^9 및 10^8 로 IN 경로를 통해 획득되었다. 면역접종-후 100일차에 마우스들을 다음과 같이 공격했다: 동물을 항-Ifnar1 mAb로 처리하였고, 하루-뒤 IN 경로를 통해 Hu-AdV5-hACE2를 형질도입시켰다. 5일 후, 마우스에게 비강내 경로를 통해 5×10^4 FFU의 SARS-CoV-2 WA1/2020을 접종했다. 그림에 표시된 조직을 4dpi로 수확하였고, RT-qPCR을 통해 면역화 후 100일 동안 공격한 마우스에서 바이러스 RNA 수준을 측정했다 ($n = 6-14$, Kruskal Wallis 및 Dunn의 사후 테스트: ns, 유의적이지 않음; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.1$; ***, $P < 0.001$ ****, $P < 0.0001$). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 13D는 BALB/c 마우스에서 SARS-CoV-2 감염에 대한 ChAd-SARS-CoV-2-S의 보호 효능의 지속성을 보여준다. 5-주령 암컷 BALB/c 마우스를 IM 경로를 통해 ChAd-대조군 10^{10} vp 또는 ChAd-대조군 10^{10} vp로 면역화했다. 100일차 시점에 마우스들을 다음과 같이 공격했다: 동물을 항-Ifnar1 mAb로 처리하였고, 하루-뒤 IN 경로를 통해 Hu-AdV5-hACE2를 형질도입시켰다. 5일 후, 마우스에게 비강내 경로를 통해 5×10^4 FFU의 SARS-CoV-2 WA1/2020을 접종했다. 그림에 표시된 조직을 4dpi로 수확하였고, RT-qPCR을 통해 면역화 후 100일 동안 공격한 마우스에서 바이러스 RNA 수준을 측정했다 ($n = 6-14$, Kruskal Wallis 및 Dunn의 사후 테스트: ns, 유의적이지 않음; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.1$; ***, $P < 0.001$ ****, $P < 0.0001$). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

$P < 0.01$; *, $P < 0.1$; ***, $P < 0.001$ ****, $P < 0.0001$). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 13E는 BALB/c 마우스에서 SARS-CoV-2 감염에 대한 ChAd-SARS-CoV-2-S의 보호 효능의 지속성을 보여준다. 5-주령 암컷 BALB/c 마우스는 ChAd-대조군 10^{10} vp 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S 10^{10} , 10^9 및 10^8 로 IM 경로를 통해 획득되었다. 면역접종-후 100일차에 마우스들을 다음과 같이 공격했다: 동물을 항-Ifnar1 mAb로 처리하였고, 하루-뒤 IN 경로를 통해 Hu-AdV5-hACE2를 형질도입시켰다. 5일 후, 마우스에게 비강내 경로를 통해 5×10^4 FFU의 SARS-CoV-2 WA1/2020을 접종했다. 그림에 표시된 조직을 4dpi로 수확하였고, RT-qPCR을 통해 면역화 후 100일 동안 공격한 마우스에서 바이러스 RNA 수준을 측정했다 ($n = 6-14$, Kruskal Wallis 및 Dunn의 사후 테스트: ns, 유의적이지 않음; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.1$; ***, $P < 0.001$ ****, $P < 0.0001$). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 13F는 BALB/c 마우스에서 SARS-CoV-2 감염에 대한 ChAd-SARS-CoV-2-S의 보호 효능의 지속성을 보여준다. 5-주령 암컷 BALB/c 마우스는 ChAd-대조군 10^{10} vp 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S 10^{10} , 10^9 및 10^8 로 IM 경로를 통해 획득되었다. 면역접종-후 100일차에 마우스들을 다음과 같이 공격했다: 동물을 항-Ifnar1 mAb로 처리하였고, 하루-뒤 IN 경로를 통해 Hu-AdV5-hACE2를 형질도입시켰다. 5일 후, 마우스에게 비강내 경로를 통해 5×10^4 FFU의 SARS-CoV-2 WA1/2020을 접종했다. 그림에 표시된 조직을 4dpi로 수확하였고, RT-qPCR을 통해 면역화 후 100일 동안 공격한 마우스에서 바이러스 RNA 수준을 측정했다 ($n = 6-14$, Kruskal Wallis 및 Dunn의 사후 테스트: ns, 유의적이지 않음; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.1$; ***, $P < 0.001$ ****, $P < 0.0001$). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 13G에서는 BALB/c 마우스에서 SARS-CoV-2 감염에 대한 ChAd-SARS-CoV-2-S의 보호 효능의 지속성을 보여준다. 5-주령 암컷 BALB/c 마우스는 ChAd-대조군 10^{10} vp 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S 10^{10} , 10^9 및 10^8 로 IN 경로를 통해 획득되었다. 200일차에 마우스들을 다음과 같이 공격했다: 동물을 항-Ifnar1 mAb로 처리하였고, 하루-뒤 IN 경로를 통해 Hu-AdV5-hACE2를 형질도입시켰다. 5일 후, 마우스에게 비강내 경로를 통해 5×10^4 FFU의 SARS-CoV-2 WA1/2020을 접종했다. 그림에 표시된 조직을 4dpi로 수확하였고, RT-qPCR을 통해 면역화-후 200일 동안 공격한 마우스에서 바이러스 RNA 수준을 측정했다 ($n = 6-14$, Kruskal Wallis 및 Dunn의 사후 테스트: ns, 유의적이지 않음; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.1$; ***, $P < 0.001$ ****, $P < 0.0001$). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 13H에서는 BALB/c 마우스에서 SARS-CoV-2 감염에 대한 ChAd-SARS-CoV-2-S의 보호 효능의 지속성을 보여준다. 5-주령 암컷 BALB/c 마우스는 ChAd-대조군 10^{10} vp 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S 10^{10} , 10^9 및 10^8 로 IN 경로를 통해 획득되었다. 면역접종-후 200일차에 마우스들을 다음과 같이 공격했다: 동물을 항-Ifnar1 mAb로 처리하였고, 하루-뒤 IN 경로를 통해 Hu-AdV5-hACE2를 형질도입시켰다. 5일 후, 마우스에게 비강내 경로를 통해 5×10^4 FFU의 SARS-CoV-2 WA1/2020을 접종했다. 그림에 표시된 조직을 4dpi로 수확하였고, RT-qPCR을 통해 면역화-후 200일 동안 공격한 마우스에서 바이러스 RNA 수준을 측정했다 ($n = 6-14$, Kruskal Wallis 및 Dunn의 사후 테스트: ns, 유의적이지 않음; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.1$; ***, $P < 0.001$ ****, $P < 0.0001$). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 13I에서는 BALB/c 마우스에서 SARS-CoV-2 감염에 대한 ChAd-SARS-CoV-2-S의 보호 효능의 지속성을 보여준다. 5-주령 암컷 BALB/c 마우스는 ChAd-대조군 10^{10} vp 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S 10^{10} , 10^9 및 10^8 로 IN 경로를 통해 획득되었다. 면역접종-후 200일차에 마우스들을 다음과 같이 공격했다: 동물을 항-Ifnar1 mAb로 처리하였고, 하루-뒤 IN 경로를 통해 Hu-AdV5-hACE2를 형질도입시켰다. 5일 후, 마우스에게 비강내 경로를 통해 5×10^4 FFU의 SARS-CoV-2 WA1/2020을 접종했다. 그림에 표시된 조직을 4dpi로 수확하였고, RT-qPCR을 통해 면역화-후 200일 동안 공격한 마우스에서 바이러스 RNA 수준을 측정했다 ($n = 6-14$, Kruskal Wallis 및 Dunn의 사후 테스트: ns, 유의적이지 않음; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.1$; ***, $P < 0.001$ ****, $P < 0.0001$). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 13J에서는 BALB/c 마우스에서 SARS-CoV-2 감염에 대한 ChAd-SARS-CoV-2-S의 보호 효능의 지속성을 보여준다. 5-주령 암컷 BALB/c 마우스를 IM 경로를 통해 ChAd-대조군 10^{10} vp 또는 ChAd-대조군 10^{10} vp로 면역화했다. 200일차 시점에 마우스들을 다음과 같이 공격했다: 동물을 항-Ifnar1 mAb로 처리하였고, 하루-뒤 IN 경로를 통해 Hu-AdV5-hACE2를 형질도입시켰다. 5일 후, 마우스에게 비강내 경로를 통해 5×10^4 FFU의 SARS-CoV-2

WA1/2020을 접종했다. 그림에 표시된 조직을 4dpi로 수확하였고, RT-qPCR을 통해 면역화-후 200일 동안 공격한 마우스에서 바이러스 RNA 수준을 측정했다 ($n = 6-14$, Kruskal Wallis 및 Dunn의 사후 테스트: ns, 유의적이지 않음; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.1$; ***, $P < 0.001$ ****, $P < 0.0001$). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 13K는 BALB/c 마우스에서 SARS-CoV-2 감염에 대한 ChAd-SARS-CoV-2-S의 보호 효능의 지속성을 보여준다. 5-주령 암컷 BALB/c 마우스는 ChAd-대조군 10^{10} vp 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S 10^{10} , 10^9 및 10^8 로 IM 경로를 통해 획득되었다. 면역접종-후 200일차에 마우스들을 다음과 같이 공격했다: 동물을 항-Ifnar1 mAb로 처리하였고, 하루-뒤 IN 경로를 통해 Hu-AdV5-hACE2를 형질도입시켰다. 5일 후, 마우스에게 비강내 경로를 통해 5×10^4 FFU의 SARS-CoV-2 WA1/2020을 접종했다. 그림에 표시된 조직을 4dpi로 수확하였고, RT-qPCR을 통해 면역화-후 200일 동안 공격한 마우스에서 바이러스 RNA 수준을 측정했다 ($n = 6-14$, Kruskal Wallis 및 Dunn의 사후 테스트: ns, 유의적이지 않음; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.1$; ***, $P < 0.001$ ****, $P < 0.0001$). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 13L에서는 BALB/c 마우스에서 SARS-CoV-2 감염에 대한 ChAd-SARS-CoV-2-S의 보호 효능의 지속성을 보여준다. 5-주령 암컷 BALB/c 마우스는 ChAd-대조군 10^{10} vp 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S 10^{10} , 10^9 및 10^8 로 IM 경로를 통해 획득되었다. 면역접종-후 200일차에 마우스들을 다음과 같이 공격했다: 동물을 항-Ifnar1 mAb로 처리하였고, 하루-뒤 IN 경로를 통해 Hu-AdV5-hACE2를 형질도입시켰다. 5일 후, 마우스에게 비강내 경로를 통해 5×10^4 FFU의 SARS-CoV-2 WA1/2020을 접종했다. 그림에 표시된 조직을 4dpi로 수확하였고, RT-qPCR을 통해 면역화-후 200일 동안 공격한 마우스에서 바이러스 RNA 수준을 측정했다 ($n = 6-14$, Kruskal Wallis 및 Dunn의 사후 테스트: ns, 유의적이지 않음; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.1$; ***, $P < 0.001$ ****, $P < 0.0001$). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 14A에서는 SARS-CoV-2 S- 및 RBD-특이적 IgG 수준을 측정한 ELISA를 보여준다. 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^9 vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역주사했다. 면역화-후 6주차 시점에 마우스 혈청의 항체 반응을 평가했다. Mann-Whitney 테스트: ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$.

도 14B에서는 SARS-CoV-2 S- 및 RBD-특이적 IgA 수준을 측정한 ELISA를 보여준다. 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^9 vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역주사했다. 면역화-후 6주차 시점에 마우스 혈청의 항체 반응을 평가했다. Mann-Whitney 테스트: ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$.

도 14C에서는 6주차 시점에서 마우스 혈청에서 FRNT 결정된 중화 활성을 보여준다. 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^9 vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역주사했다. WA1/2020 및 Wash-B.1.351에 대해 6주차에 수집된 면역화된 마우스의 혈청 중화 활성에 대한 쌍별 분석이 제공한다. 양측 Wilcoxon 일치된-쌍별 부호 순위 테스트: *, $P < 0.05$; ****, $P < 0.0001$.

도 14D에서는 6주차 시점에서 마우스 혈청에서 FRNT 결정된 중화 활성을 보여준다. 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^9 vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역주사했다. WA1/2020 및 Wash-B.1.1.28에 대해 6주차에 수집된 면역화된 마우스의 혈청 중화 활성에 대한 쌍별 분석이 제공한다. 양측 Wilcoxon 일치된-쌍별 부호 순위 테스트: *, $P < 0.05$; ****, $P < 0.0001$.

도 14E에서는 SARS-CoV-2 S- 및 RBD-특이적 IgG 수준을 측정한 ELISA를 보여준다. 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^9 vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역주사했다. 면역화-후 9주차 시점에 마우스 혈청의 항체 반응을 평가했다. Mann-Whitney 테스트: ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$.

도 14F에서는 SARS-CoV-2 S- 및 RBD-특이적 IgA 수준을 측정한 ELISA를 보여준다. 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^9 vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역주사했다. 면역화-후 9주차 시점에 마우스 혈청의 항체 반응을 평가했다. Mann-Whitney 테스트: ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$.

도 14G에서는 6주차 시점에서 마우스 혈청에서 FRNT 결정된 중화 활성을 보여준다. 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^9 vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역주사했다. WA1/2020 및 Wash-B.1.351에 대해 9주차에 수집된 면역화된 마우스의 혈청 중화 활성에 대한 쌍별 분석이 제공한다. 양측

Wilcoxon 일치된-쌍별 부호 순위 테스트: *, $P < 0.05$; ****, $P < 0.0001$.

도 14H에서는 6주차 시점에서 마우스 혈청에서 FRNT 결정된 중화 활성을 보여준다. 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^9 vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역주사했다. WA1/2020 및 Wash-B.1.1.28에 대해 9주차에 수집된 면역화된 마우스의 혈청 중화 활성에 대한 쌍별 분석이 제공한다. 양측 Wilcoxon 일치된-쌍별 부호 순위 테스트: *, $P < 0.05$; ****, $P < 0.0001$.

도 15A에서는 실험 계획을 보여준다. 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^{10} vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역주사했다.

도 15B 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^{10} vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역주사했다. 면역화-후 6주차 시점에 마우스를 10^4 FFU의 Wash-B.1.351 SARS-CoV-2로 공격했다. 시간에 따른 체중 변화의 플롯이 표시된다. 데이터는 백신과 대조군을 비교한 평균 $\pm$ SEM이다 (각 그룹에서 $n = 6-9$ 마리; 곡선 아래 면적은 디-대응 t 테스트, **** $P < 0.0001$).

도 15C 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^{10} vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역주사했다. 면역화-후 6주차 시점에 마우스를 10^4 FFU의 Wash-B.1.351 SARS-CoV-2로 공격했다. 폐의 바이러스 RNA 수준은 RT-qPCR에 의해 6dpi에서 측정되었다 ($n = 6-9$; Mann-Whitney 테스트: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 15D 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^{10} vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역주사했다. 면역화-후 6주차 시점에 마우스를 10^4 FFU의 Wash-B.1.351 SARS-CoV-2로 공격했다. 심장의 바이러스 RNA 수준은 RT-qPCR에 의해 6dpi에서 측정되었다 ($n = 6-9$; Mann-Whitney 테스트: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 15E 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^{10} vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역주사했다. 면역화-후 6주차 시점에 마우스를 10^4 FFU의 Wash-B.1.351 SARS-CoV-2로 공격했다. 비강 세척액에서 바이러스 RNA 수준은 RT-qPCR에 의해 6dpi에서 측정되었다 ($n = 6-9$; Mann-Whitney 테스트: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 15F 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^{10} vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역주사했다. 면역화-후 6주차 시점에 마우스를 10^4 FFU의 Wash-B.1.351 SARS-CoV-2로 공격했다. 면역화-후 6주차 시점에 마우스를 10^4 FFU의 Wash-B.1.351 SARS-CoV-2로 공격했다. 뇌의 바이러스 RNA 수준은 RT-qPCR에 의해 6dpi에서 측정되었다 ($n = 6-9$; Mann-Whitney 테스트: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 15G 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^{10} vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역주사했다. 면역화-후 6주차 시점에 마우스를 10^4 FFU의 Wash-B.1.1.28의 SARS-CoV-2로 공격했다. 시간에 따른 체중 변화의 플롯이 표시된다. 데이터는 백신과 대조군을 비교한 평균 $\pm$ SEM이다 (각 그룹에서 $n = 6-9$ 마리; 곡선 아래 면적은 디-대응 t 테스트, **** $P < 0.0001$).

도 15H 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^{10} vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역주사했다. 면역화-후 6주차 시점에 마우스를 10^4 FFU의 Wash-B.1.1.28의 SARS-CoV-2로 공격했다. 폐의 바이러스 RNA 수준은 RT-qPCR에 의해 6dpi에서 측정되었다 ($n = 6-9$; Mann-Whitney 테스트: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 15I 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^{10} vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역주사했다. 면역화-후 6주차 시점에 마우스를 10^4 FFU의 Wash-B.1.1.28의 SARS-CoV-2로 공격했다. 심장의 바이러스 RNA 수준은 RT-qPCR에 의해 6dpi에서 측정되었다 ($n = 6-9$; Mann-Whitney 테스트: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

0.001). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 15J 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^{10} vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역 주사했다. 면역화-후 6주차 시점에 마우스를 10^4 FFU의 Wash-B.1.1.28의 SARS-CoV-2로 공격했다. 비강 세척액에서 바이러스 RNA 수준은 RT-qPCR에 의해 6dpi에서 측정되었다 ($n = 6-9$; Mann-Whitney 테스트: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 15K 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^{10} vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역 주사했다. 면역화-후 6주차 시점에 마우스를 10^4 FFU의 Wash-B.1.1.28의 SARS-CoV-2로 공격했다. 면역화-후 6주차 시점에 마우스를 10^4 FFU의 Wash-B.1.351 SARS-CoV-2로 공격했다. 뇌의 바이러스 RNA 수준은 RT-qPCR에 의해 6dpi에서 측정되었다 ($n = 6-9$; Mann-Whitney 테스트: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 15L 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^{10} vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역 주사했다. 면역화-후 6주차 시점에 마우스를 10^4 FFU의 WA1/2020의 SARS-CoV-2로 공격했다. 시간에 따른 체중 변화의 플롯이 표시된다. 데이터는 백신과 대조군을 비교한 평균 $\pm$ SEM이다 (각 그룹에서 $n = 6-9$ 마리; 곡선 아래 면적은 디-대응 t 테스트, **** $P < 0.0001$).

도 15M 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^{10} vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역 주사했다. 면역화-후 6주차 시점에 마우스를 10^4 FFU의 WA1/2020의 SARS-CoV-2로 공격했다. 폐의 바이러스 RNA 수준은 RT-qPCR에 의해 6dpi에서 측정되었다 ($n = 6-9$; Mann-Whitney 테스트: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 15N 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^{10} vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역 주사했다. 면역화-후 6주차 시점에 마우스를 10^4 FFU의 WA1/2020의 SARS-CoV-2로 공격했다. 심장의 바이러스 RNA 수준은 RT-qPCR에 의해 6dpi에서 측정되었다 ($n = 6-9$; Mann-Whitney 테스트: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 15O 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^{10} vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역 주사했다. 면역화-후 6주차 시점에 마우스를 10^4 FFU의 WA1/2020의 SARS-CoV-2로 공격했다. 비강 세척액에서 바이러스 RNA 수준은 RT-qPCR에 의해 6dpi에서 측정되었다 ($n = 6-9$; Mann-Whitney 테스트: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 15P 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^{10} vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역 주사했다. 면역화-후 9개월 시점에 마우스를 10^4 FFU의 Wash-B.1.351 SARS-CoV-2로 공격했다. 시간에 따른 체중 변화의 플롯이 표시된다. 데이터는 백신과 대조군을 비교한 평균 $\pm$ SEM이다 (각 그룹에서 $n = 6-9$ 마리; 곡선 아래 면적은 디-대응 t 테스트, **** $P < 0.0001$).

도 15Q 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^{10} vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역 주사했다. 면역화-후 6주차 시점에 마우스를 10^4 FFU의 Wash-B.1.351 SARS-CoV-2로 공격했다. 폐의 바이러스 RNA 수준은 RT-qPCR에 의해 6dpi에서 측정되었다 ($n = 6-9$; Mann-Whitney 테스트: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 15R 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^{10} vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역 주사했다. 면역화-후 9개월 시점에 마우스를 10^4 FFU의 Wash-B.1.351 SARS-CoV-2로 공격했다. 심장의 바이러스 RNA 수준은 RT-qPCR에 의해 6dpi에서 측정되었다 ($n = 6-9$; Mann-Whitney 테스트: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 15S 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^{10} vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역

주사했다. 면역화-후 9개월 시점에 마우스를 10^4 FFU의 Wash-B.1.351 SARS-CoV-2로 공격했다. 비강 세척액에서 바이러스 RNA 수준은 RT-qPCR에 의해 6dpi에서 측정되었다 ($n = 6-9$; Mann-Whitney 테스트: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 15T 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^{10} vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역 주사했다. 면역화-후 9개월 시점에 마우스를 10^4 FFU의 Wash-B.1.351 SARS-CoV-2로 공격했다. 면역화-후 9개월 시점에 마우스를 10^4 FFU의 Wash-B.1.351 SARS-CoV-2로 공격했다. 뇌의 바이러스 RNA 수준은 RT-qPCR에 의해 6dpi에서 측정되었다 ($n = 6-9$; Mann-Whitney 테스트: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). 막대는 중앙값을 나타내고, 점선은 분석의 LOD를 나타낸다.

도 16A에서는 FRNT로 측정된 결과 ChAd-SARS-CoV-2-S 백신이 WA1/2020, Wash-B.1.351 또는 Wash-B.1.1.28에 대한 중화 활성을 유도함을 보여준다. 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^9 vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역주사했고, 혈청 샘플을 6주차에 수집했다. 표시된 백신에 대해 개별 마우스에 해당하는 혈청 중화 곡선이 표시된다 ($n =$ 그룹당 7-20 마리). 각 점은 SD를 나타내는 두 번의 기술 복제의 평균을 나타낸다.

도 16B에서는 FRNT로 측정된 결과 ChAd-SARS-CoV-2-S 백신이 WA1/2020, Wash-B.1.351 또는 Wash-B.1.1.28에 대한 중화 활성을 유도함을 보여준다. 5-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^9 vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 면역주사했고, 혈청 샘플을 9개월에 수집했다. 표시된 백신에 대해 개별 마우스에 해당하는 혈청 중화 곡선이 표시된다 ($n =$ 그룹당 7-20 마리). 각 점은 SD를 나타내는 두 번의 기술 복제의 평균을 나타낸다.

도 17에서는 SARS-Cov2-오미크론 S 단백질의 안정화된 변이체와 SARS-CoV2-Wuhan S 단백질의 서열 정렬을 보여준다.

도 18은 오미크론 BA.5이 내포된 ChAd 벡터 파생물에 의해 매개되는 SARS-CoV-2 스파이크 유전자 발현의 평가를 보여준다.

도 19A는 백신 접종, 혈액 샘플링, 바이러스 감염 및 부검의 계획과 시기를 보여준다.

도 19B에서는 SARS-CoV-2 Wuhan-1 S 단백질에 대한 항-SARS-CoV-2 IgG의 결합을 보여준다. Kruskal Wallis와 Dunn의 사후-테스트: ns, 유의적이지 않음; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ ****, $P < 0.0001$).

도 19C에서는 SARS-CoV-2 Wuhan-1 S 단백질에 대한 항-SARS-CoV-2 IgA의 결합을 보여준다. Kruskal Wallis와 Dunn의 사후-테스트: ns, 유의적이지 않음; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ ****, $P < 0.0001$).

도 19D에서는 BA.5 S 단백질에 대한 항-SARS-CoV-2 IgG의 결합을 보여준다. Kruskal Wallis와 Dunn의 사후-테스트: ns, 유의적이지 않음; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ ****, $P < 0.0001$).

도 19E에서는 BA.5 S 단백질에 대한 항-SARS-CoV-2 IgA의 결합을 보여준다. Kruskal Wallis와 Dunn의 사후-테스트: ns, 유의적이지 않음; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ ****, $P < 0.0001$).

도 19F에서는 SARS-CoV-2 BQ.1.1 S 단백질에 항-SARS-CoV-2 IgG의 결합을 보여준다. Kruskal Wallis와 Dunn의 사후-테스트: ns, 유의적이지 않음; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ ****, $P < 0.0001$).

도 19G에서는 SARS-CoV-2 BQ.1.1 S 단백질에 항-SARS-CoV-2 IgA의 결합을 보여준다. Kruskal Wallis와 Dunn의 사후-테스트: ns, 유의적이지 않음; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ ****, $P < 0.0001$).

도 20A에서는 FRNT에 의해 WA1/2020에 대한 중화 활성을 보여준다. 7-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^9 vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S 백신으로 면역주사하였고, 28일 후에 혈청을 채취했다. 각 점은 개별 마우스의 데이터를 나타내며, 두 번의 기술 복제의 평균이다.

도 20B에서는 FRNT에 의해 BA.5에 대한 중화 활성을 보여준다. 7-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^9 vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S 백신으로 면역주사하였고, 28일 후에 혈청을 채취했다. 각 점은

개별 마우스의 데이터를 나타내며, 두 번의 기술 복제의 평균이다.

도 20C에서는 FRNT에 의해 BF.7에 대한 중화 활성을 보여준다. 7-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^9 vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S 백신으로 면역주사하였고, 28일 후에 혈청을 채취했다. 각 점은 개별 마우스의 데이터를 나타내며, 두 번의 기술 복제의 평균이다.

도 20D에서는 FRNT에 의해 BQ.1.1에 대한 중화 활성을 보여준다. 7-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^9 vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S 백신으로 면역주사하였고, 28일 후에 혈청을 채취했다. 각 점은 개별 마우스의 데이터를 나타내며, 두 번의 기술 복제의 평균이다.

도 20E에서는 FRNT에 의해 XBB.1.1에 대한 중화 활성을 보여준다. 7-주령 K18-hACE2 암컷 마우스에게 IN 경로를 통해 10^9 vp ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S 백신으로 면역주사하였고, 28일 후에 혈청을 채취했다. 각 점은 개별 마우스의 데이터를 나타내며, 두 번의 기술 복제의 평균이다.

도 20F는 주어진 백신(ChAd-SARS-CoV-2 S (Wuhan-1))과 감염에 사용된 표시된 SARS-CoV-2 균주에 대한 직접 비교로 표시된 중화 데이터를 보여준다.

도 20G는 주어진 백신 ChAd-SARS-CoV-2-S (BA.5)과 감염에 사용된 표시된 SARS-CoV-2 균주에 대한 직접 비교로 표시된 중화 데이터를 보여준다.

도 20H는 주어진 백신 ChAd-SARS-CoV-2-S (이가)와 감염에 사용된 표시된 SARS-CoV-2 균주에 대한 직접 비교로 표시된 중화 데이터를 보여준다.

도 21A는 SARS-CoV-2 WA1/2020 D614G (왼쪽) 또는 오미크론 BQ.1.1 (오른쪽)을 사용한 공격-후, 6dpi에서 폐의 바이러스 RNA 수준을 보여준다. 동물은 백신접종을 받지않거나, ChAd-대조군, ChAd-SARS-CoV-2 S (Wuhan-1), ChAd-SARS-CoV-2-S (BA.5) or bivalent (ChAd-SARS-CoV-2 S (Wuhan-1) + ChAd-SARS-CoV-2-S (BA.5))의 단일 용량 (총 10^9 개의 바이러스 입자)으로 백신접종을 비강내 경로를 통해 면역화되었다. Kruskal Wallis와 Dunn의 사후-테스트: ns, 유의적이지 않음; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ ****, $P < 0.0001$).

도 21B는 SARS-CoV-2 WA1/2020 D614G (왼쪽) 또는 오미크론 BQ.1.1(오른쪽)로 공격한-후 비강개 (**도 21B**) 및 6dpi에서의 비강 세척액에서 바이러스 RNA 수준을 보여준다. 동물은 백신접종을 받지않거나, ChAd-대조군, ChAd-SARS-CoV-2 S (Wuhan-1), ChAd-SARS-CoV-2-S (BA.5) or bivalent (ChAd-SARS-CoV-2 S (Wuhan-1) + ChAd-SARS-CoV-2-S (BA.5))의 단일 용량 (총 10^9 개의 바이러스 입자)으로 백신접종을 비강내 경로를 통해 면역화되었다. Kruskal Wallis와 Dunn의 사후-테스트: ns, 유의적이지 않음; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ ****, $P < 0.0001$).

도 21C에서는 SARS-CoV-2 WA1/2020 D614G (좌) 또는 오미크론 BQ.1.1 (우) 공격 후 6dpi에서 또는 SARS-CoV-2 WA1/2020 D614G (좌) 또는 오미크론 BQ.1.1 (우)으로 공격 후 6dpi에서 비강 세척액내 바이러스 RNA 수준을 나타낸다. 동물은 백신접종을 받지않거나, ChAd-대조군, ChAd-SARS-CoV-2 S (Wuhan-1), ChAd-SARS-CoV-2-S (BA.5) 또는 이가 (ChAd-SARS-CoV-2 S (Wuhan-1) + ChAd-SARS-CoV-2-S (BA.5))의 단일 용량 (총 10^9 개의 바이러스 입자)으로 백신접종을 비강내 경로를 통해 면역화되었다. Kruskal Wallis와 Dunn의 사후-테스트: ns, 유의적이지 않음; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ ****, $P < 0.0001$).

도 22는 SARS-CoV-2 WA1/2020 D614G (좌) 또는 오미크론 BQ.1.1 (우)로 공격-후 6dpi에서 백신접종된 마우스에서 사이토킨 유도의 히트맵을 보여준다. 하단에는 마우스의 예방접종 상태가 표시된다 (백신접종안됨, ChAd-대조군, ChAd-SARS-CoV-2 S, ChAd-SARS-CoV-2-S, 또는 이가 (ChAd-SARS-CoV-2 S (Wuhan-1) + ChAd-SARS-CoV-2-S (BA.5)). 상기 맵에서 색상은 무경험 마우스와 비교하여 log2-배수 변화를 반영한다.

도 23은 상기 Wuhan 균주와 관련하여 BA.5 S 단백질의 안정화된 변이체의 서열 정렬을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

상세한 설명

본 명세서는 코로나바이러스 감염을 치료 또는 예방하기 위해, 재조합 비-인간 아데노바이러스 벡터 조성물 및 이의 면역원성 조성물의 개발에 적어도 일부분 근거한다. 또한, 본 명세서는 코로나바이러스 감염에 대항하여

지속적인 세포성 매개된 면역성 및 체액-매개된 면역성을 제공하는 본 명세서에 개시된 조성물을 투여하는 방법을 제공한다.

- [0024] 2002~2004년 SARS 유행을 일으킨 중증 급성호흡기 증후군 코로나바이러스 1 (SARS-CoV-1), 2012년 처음 보고된 MERS를 일으킨 중증 호흡기 증후군 코로나바이러스 (MERS-CoV), 그리고 보다 최근의 코로나바이러스 질환 2019 (Covid-19) 범유행의 원인이 된 SARS-CoV-2 모두 세포 표면의 안지오텐신 전환 효소 2(ACE2)에 결합하여 세포를 감염시킨다. 기본적으로, ACE-2는 SARS-CoV-1, SARS-CoV-2, MERS-CoV 및 향후 SARS-CoV 변이체에 대한 기능적 수용체다. ACE-2는 레닌-안지오텐신-알도스테론 시스템(RAAS)의 중요한 구성 요소다. ACE-2는 안지오텐신 2를 안지오텐신 1-7로 전환시킨다. 높은 안지오텐신 2는 혈관 수축, 염증 및 급성 폐 손상과 관련있다. ACE2는 폐, 심장, 신장, 간, 내장 및 다른 조직들을 비롯한 다양한 기관에서 발견된다. SARS-CoV 바이러스는 ACE-2에 결합하여 이들 세포로 진입한다.
- [0025] SARS-CoV-2 RNA 게놈의 길이는 대략적으로 30,000개 뉴클레오타이드다. 5'에서 2/3는 게놈 복제 및 바이러스 RNA 합성을 가능하게 하는 비-구조 단백질을 인코딩한다. 나머지 1/3은 구형 비리온을 형성하는 스파이크 (S), 외피, 막, 핵단백질 (NP)과 같은 구조 단백질과 세포 반응을 조절하는 보조 단백질을 인코딩한다. S 단백질은 비리온에 동종-삼합체 스파이크를 형성하고, 세포 표면 수용체 안지오텐신 전환 효소 2 (ACE2)와 결합하여 코로나바이러스가 인간 세포로 유입되는 것을 촉진시킨다. SARS-CoV 및 SARS-CoV-2 S 단백질은 진입 과정에서 순차적으로 절단되어, S1 및 S2 단편을 생성한 다음, S2를 추가로 처리하여 더 작은 S2' 단백질을 생성한다 (Hoffmann et al., 2020). S1 단백질에는 수용체 결합 도메인(RBD)이 내포되며, S2 단백질은 막 융합을 촉진시킨다. SARS-CoV-2 S 단백질의 용해성, 안정화된 예비-융합 형태의 구조는 저온-전자현미경으로 분석되었으며, 이에 의하면 SARS-CoV-2 S 단백질과 상당한 유사성을 나타낸다. 이러한 형태의 S 단백질은 단클론 항체를 강력하게 중화함으로써 인지되며, 유망한 백신 표적이 될 수 있다.
- [0026] SARS-CoV-2 게놈 서열의 공개로 인해 학계, 정부 및 업계 그룹은 주로 바이러스 S 단백질을 표적으로 삼는 백신 후보 개발을 즉시 착수했다. 향상된 게놈 서열 분석 기능은 특정 시점에 순환하는 SARS-CoV-2 변이체들에 대한 다양한 정보도 제공했다. SARS-CoV-2는 시간이 지남에 따라 돌연변이를 일으켜 새로운 변종의 출현을 가져오며, 이는 서열, 전염성 및 감염의 심각도에서 상이하다. 각종 SARS-CoV-2 변이체들이 출현하였다. 2019년 12월에 확인된 SARS-CoV-2의 원래 형태; 종종 "원종" 또는 "Wuhan" 변종으로 불린다. 2020년 12월부터 2021년 4월 사이에 알파 (B.1.1.7), 베타 (B.1.351), 감마 (P.1), 델타 (B.1.617.2 및 AY 하위계통)를 비롯한 후속 변이체들이 등장했다. 그러나, 현재 지배적인 변종은 2021년 11월경에 등장한 오미크론 변종 (B.1.1.529 및 BA 하위 계열)이다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 바이러스와 관련하여 용어 "변이체"는 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 함유할 수 있는 바이러스 게놈 (유전 코드)이다. 어떤 경우, 계통 또는 계통 그룹과 같이 유사한 유전적 변화를 가진 변이체 그룹이 나타날 수 있다. 여기에서 사용된 "계통(lineage)"은 공통 조상과 밀접하게 관련된 바이러스 그룹이다. 본원에 사용된 용어 "하위계통(sublineage)" 또는 "하위변이체(subvariant)"는 계통 내의 유사한 바이러스 그룹이다. 오미크론의 하위-계통 또는 하위-변이체 및 기타 변이체들이 계속해서 등장하고 있다.
- [0027] SARS-CoV-2 S 단백질을 전달하기 위해 DNA 플라스미드, 지질 나노입자 캡슐화화된 mRNA, 불활성화된 비리온, 바이러스-백터화된 백신을 비롯한 다양한 플랫폼이 개발되었다. 몇몇 백신은 안전성을 평가하기 위해 임상 시험에 들어갔고, 일부 백신은 면역원성과 효능을 평가하는 시험으로 발전했다. 전염병의 긴급성으로 인해, 대부분의 백신은 동물에서의 실질적인 효능 데이터 없이 인간 테스트로 진행되었다. 부분적으로 백신 설계 및 개발이 SARS-CoV-2 감염 및 발병에 대한 접근 가능한 전-임상 질환 모델 생성을 앞지르기 때문에, 이러한 상황이 일어났다.
- [0028] 베타코로나바이러스에 대한 아데노바이러스 (Ad)-기반 백신은 이전에 평가되었다. MERS-CoV의 전체 길이 S 단백질을 인코딩하는 침팬지 Ad-백터화된 백신의 단일 용량투여는 인간 디펩티딜 펩티다제 4 (hDPP4) 형질전환 마우스를 감염으로부터 보호하고, 바이러스 배출을 감소시키며, 낙타에서 생존을 향상시켰으며, 1상 임상 시험에서 인간에게 안전하고 면역원성이 있었다. MERS S1-CD40L 융합 단백질을 발현하는 인간 Ad-기반 백신도 형질전환 hDPP4 마우스에서 또한 보호 효과를 보였다. 전장 S 단백질을 발현하는 Ad-기반의 SARS-CoV 백신은 공격 후 혼잡증의 폐렴을 예방했으며, 붉은털원숭이에서는 면역원성이 높았다. 야생형 SARS-CoV-2 S 단백질 (ChAdOx1 nCoV-19)을 인코딩하는 침팬지 Ad-백터 (Y25, 유인원 Ad-23)는 현재 인간에게 단일 근육 주사로 평가 중이다 (NCT04324606). 일차 프레-프린트(pre-print) 분석에 따르면, 이 백신은 폐 감염과 폐렴을 예방하지만, 상기도 감염과 코 바이러스 배출을 예방하지는 않는다 (doi.org/10.1101/2020.05.13.093195). 그러나, 이 백신은 비강 백신으로는 실패했다.

- [0029] 호흡기 바이러스 감염의 위험이 있거나, 호흡기 바이러스 감염의 경미한 증상이 있거나, 호흡기 바이러스 감염의 중증 증상이 있는 개체를 치료하기 위한 조성물, 방법 및 치료 계획이 본원에 개시되어 있다. 본 명세서의 조성물은 호흡기 바이러스 감염을 치료, 예방 또는 감소용으로 사용될 수 있다. 치료 계획은 바이러스 감염의 위험이 있거나, 바이러스 감염된 개체에게 본 개시내용의 조성물을 투여하여 바이러스 감염을 예방 또는 치료하는 것을 포함할 수 있다. 일부 구체예들에서, 상기도의 바이러스 감염을 줄임으로써 바이러스 전파를 예방하거나 줄일 수 있다. 본 명세서의 조성물 및 방법은 강력한 항원-특이적 항체, 중화 항체, 및 B 및 T 세포 반응을 제공한다. 이는 폐의 바이러스 생산량, 염증 및 병리 현상을 현저하게 감소시켜 감염으로부터 보호한다. 본 명세서의 조성물 및 방법은 혈청 및 폐의 높은 수준의 중화 및 항-RBD IgA 및 IgG와 폐의 SARS-CoV-2 특이적 상주 기억 T 세포를 비롯한 강력한 점막 면역을 생성한다. 개시된 조성물 및 방법은 비강, 상기도, 폐 조직 및 기타 모든 전과 가능한 부위에서 SARS-CoV-2 감염을 완벽하게 보호한다. 항-NP 및 항-ORF8 반응 측정을 기반으로 하여, 본 개시된 조성물의 단일 비강내 용량투여는 단일 용량 투여의 경우보다 훨씬 더 적은 멸균 면역을 부여하는데, 이전에 어떤 COVID-19 백신에서도 설명되지 않았다.
- [0030] 본 명세서의 조성물은 국소적으로, 예를 들어, 비강-내 (예를 들어, 비강 스프레이 또는 흡입으로서) 또는 전신적으로 (예를 들어, 정맥내 또는 복강내) 제형화될 수 있고, 호흡기 바이러스 감염 (예를 들어, SARS-CoV-2와 같은 코로나바이러스 감염)을 치료 또는 예방하기 위해 투여될 수 있다. 본 명세서의 조성물 (예를 들어, 비강 전달 또는 흡입용으로 제형화된 조성물)은 바이러스 감염 (가령, SARS-CoV-2)에 걸릴 위험이 있는 대상체에게 투여될 수 있다. 예를 들면, 본 명세서의 조성물은 고-위험 환경에 있는 개체 (가령, 의료 종사자), 바이러스 (가령, SARS-CoV-2)에 노출되었거나, 노출된 것으로 의심되는 개체 또는 바이러스 감염에 양성 반응을 보인 개체에게 투여될 수 있다. 본 명세서의 조성물은 호흡기 감염 증상 (가령, SARS-CoV-2 감염)을 나타내고 있거나, 투여 당시 무-증상 개체에게 투여될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 명세서의 조성물은 개체에 의해 자가 투여될 수 있고 (가령, 비강 스프레이 또는 흡입으로서) 의료 시설 외부에서 (가령, 집에서) 투여될 수 있다.
- [0031] 본 명세서에 개시된 방법 및 조성물은 호흡기 바이러스 감염을 치료, 예방 또는 감소시키는 데 사용될 수 있다. 일부 구체예들에서, 상기 바이러스 감염은 코로나바이러스 감염일 수 있다. 평균 잠복기가 약 5일인 SARS-CoV-2와 같이 잠복기가 긴 병원체는 감염된 많은 사람들은 자신이 감염되었다는 사실을 인지하지 못할 수 있으므로 전염 위험이 높다. 또한, 코로나바이러스의 보균자는 흔히 무증상이거나 경미한 증상을 나타내어, 바이러스 숙주와 다른 집단 구성원 사이에 무의식적으로 접촉하게 될 수 있다. 코로나바이러스 감염 위험이 있는 대상체는 코로나바이러스 감염의 무증상 보균자와 접촉하여 자신도 모르게 코로나바이러스 감염에 걸릴 수 있다. 위험에 처한 개인 (가령, 코로나바이러스 보균자와 접촉한 적이 있거나 코로나바이러스 보균자와 접촉할 가능성이 있는 개인)의 코로나바이러스 감염을 예방하기 위한 방법과 조성물이 필요하다. 일부 구체예들에서, 본 명세서에 개시된 조성물, 방법 또는 치료 요법은 SARS-CoV-2 감염 (가령, COVID-19)을 치료하거나 예방할 수 있다.
- [0032] 개시된 조성물을 제조하는데 사용되는 성분 뿐만 아니라 본원에 개시된 방법 내에서 사용되는 조성물 자체가 아래에 논의된다. 이들 물질 및 기타 물질이 본 명세서에 개시되어 있으며, 이들 물질의 조합, 부분집합, 상호작용, 그룹 등이 개시되는 경우, 각각은 본원에서 구체적으로 고려되고 설명되며, 한편 이들 화합물의 각각의 다양한 개별적 및 집합적 조합 및 순열에 대한 구체적인 언급은 명시적으로 개시되지 않을 수 있다. 예를 들면, 특정 화합물이 공개되고 논의되고 해당 화합물의 여러 분자에 적용될 수 있는 여러 가지 변형이 논의되는 경우, 달리 구체적으로 나타내지 않는 한, 가능한 변형 및 화합물의 각각의 모든 조합 및 순열이 구체적으로 고려된다. 따라서, 분자 A, B 및 C의 클래스, 뿐만 아니라 분자 D, E 및 F의 클래스 그리고 조합 분자의 예, A-D가 개시된다면, 각각이 개별적으로 언급되지 않더라도, A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D, C-E 및 C-F의 조합을 의미하는 개별적이고 집합적으로 고려된다. 마찬가지로, 이들의 임의의 하위 집합 또는 조합도 개시된다. 따라서, 예를 들어 A-E, B-F 및 C-E의 하위-그룹이 공개된 것으로 간주된다. 이 개념은 개시된 조성물을 제조하고 사용하는 방법의 단계를 포함하지만, 이에 국한되지 않는 본 출원의 모든 측면에 적용된다. 따라서, 수행될 수 있는 다양한 추가 단계가 있다면 이들 추가 단계 각각은 개시된 방법의 임의의 특정 구체예 또는 실시예의 조합으로 수행될 수 있다는 것이 이해된다.
- [0033] 본 발명의 각종 측면들을 다음의 단락들에서 상세하게 더 설명한다.
- [0034] **I. 정의**
- [0035] 본 발명이 보다 쉽게 이해될 수 있도록, 특정 용어가 먼저 정의된다. 명시적으로 다른 언급이 없는 한, 본 명세서에서 이용된 모든 기술적 그리고 과학적 용어는 본 발명에 속하는 당업계 숙련자들에 의해 공통적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나, 변형되거나, 또는 대등한 많은 방법 및

재료가 과도한 실험 없이, 본 발명의 구체예들의 실시예에 사용될 수 있으며, 바람직한 재료 및 방법이 본 명세서에 기재되어 있다. 본 발명의 구체예를 설명하고 청구함에 있어서, 하기 정의에 따라 하기 용어가 사용될 것이다.

- [0036] 본 명세서에 사용된 어법 및 용어는 설명을 위한 것이며, 이에 제한하는 것으로 간주되어서는 안 된다. 예를 들면, "a"와 같은 단수 용어의 사용은 해당 항목의 갯수를 제한하려는 의도가 아니다. 또한, "위", "아래", "좌", "우", "상단", "하단", "하향", "상향" 및 "측면"을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는 관계형 용어는 도면에서 특정 사항을 지칭할 때 사용되지만, 첨부된 청구항 또는 본 발명의 개념의 범위를 제한하기 위한 의도는 아니다.
- [0037] 설명 및 첨부된 청구범위에 사용된 "실질적으로"와 같은 (이에 제한되지 않음) 정도의 용어는 정확하거나 유사하지만 정확한 구성은 아닌 구성을 내포하는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들면, "실질적으로 평면인 표면"은 정확한 평면 표면 또는 유사하지만, 정확한 평면이 아닌 표면을 갖는 것을 의미한다. 유사하게, 설명 및 첨부된 청구범위에 사용된 용어 "약(about)" 또는 "대략적으로"란 인용된 값, 또는 인용된 값의 3배 또는 1/3 더 큰 값을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들면, 약 3 mm에는 1mm에서 9mm까지의 모든 값이 내포되고, 약 50도에는 16.6도에서 150도까지의 모든 값이 내포된다. 예를 들면, 이는 $\pm 5\%$ 이거나 이보다 적은 것을 지칭할 수 있는데, 이를 테면, $\pm 2\%$ 이거나 이보다 적은, 이를 테면, $\pm 1\%$ 이거나 이보다 적은, 이를 테면, $\pm 0.5\%$ 이거나 이보다 적은, 이를 테면, $\pm 0.2\%$ 이거나 이보다 적은, 이를 테면, $\pm 0.1\%$ 이거나 이보다 적은, 이를 테면, $\pm 0.05\%$ 이거나 이보다 적은 수 있다.
- [0038] "~을 포함하는", "~이 내포된" 그리고 "~을 갖는"이라는 용어는 본 개시에서 상호교환적으로 사용된다. "~을 포함하는", "~이 내포된" 그리고 "~을 갖는"이라는 용어는 그렇게 설명된 것들이 내포되지만, 반드시 이에 국한되는 것은 아니라는 의미다.
- [0039] 본 명세서에 사용된 용어 "또는" 및 "및/또는"이란 임의의 하나 또는 임의의 조합을 포괄하거나, 의미하는 것으로 해석되어야 한다. 따라서, "A, B 또는 C" 또는 "A, B 및/또는 C"란 다음 중 임의의 하나를 의미한다: "A," "B" 또는 "C"; "A 및 B"; "A 및 C"; "B 및 C"; "A, B 및 C." 이 정의에 대한 예외는 요소, 기능, 단계 또는 행위의 조합이 어떤 방식으로든 본질적으로 상호 배타적인 경우에만 발생된다.
- [0040] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다. 하기 참고 문헌은 당업자에게 본 발명에 사용된 많은 용어의 일반적인 정의를 제공한다: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); 및 Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991), 이들 모두 본원의 참고자료에 편입된다. 여기에서 사용된 바와 같이, 하기 다음의 용어는 달리 명시되지 않는 한 그 의미를 갖는다.
- [0041] 본 명세서에 사용된 어법 및 용어는 설명을 위한 것이며, 이에 제한하는 것으로 간주되어서는 안 된다. 본 개시 내용의 요소 또는 그의 바람직한 측면(들)을 소개할 때, 관사 "a", "an", "the" 및 "전술한"이란 하나 또는 이상의 요소가 존재함을 의미하도록 의도된다. "~을 포함하는(comprising)", "~이 내포되는(including)" 및 "~을 갖는(having)"이라는 용어는 포괄적인 것으로 의도되며, 열거된 요소 이외의 추가 요소가 존재할 수 있음을 의미한다. "~을 포함하는(comprising)", "~이 내포되는(including)"이라는 용어가 사용될 때마다, 본 명세서에 또한 개시된 요소들"로 구성된(consisting of)"이란 열거된 요소들이외에 추가 요소들이 내포되어 있지 않는, 추가 측면을 명시적으로 고려하고, 포괄한다는 것이 이해되어야 한다.
- [0042] 용어 "약(about)" 또는 "대략(approximately)"은 본원에서 사용된 바와 같이, 당업자에 의해 결정된 특정 값에 대한 허용가능한 오차를 의미하며, 이는 어떻게 이러한 값이 측정되는 또는 결정되는 방법에 따라 부분적으로 의존적일 것이며, 예를 들면, 측정 시스템의 제약이 있을 것이다. 예를 들면, "약(about)"이란 당업계의 관행에 따라, 주어진 값에서 1 또는 1 초과의 표준 편차 이내를 의미할 수 있다. 출원서와 청구범위에 특정 값이 기술되어 있는 경우, 달리 명시하지 않는 한, "약(about)"이라는 용어는 이 "약"이라는 용어에 의해 수정된 값의 10%와 같은 특정 값에 대해 허용 가능한 오류 범위를 의미할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "약"이라는 용어는 인용된 값, 가령, 양, 용량, 온도, 시간, 백분율 등에 대해 $\pm 10\%$, $\pm 9\%$, $\pm 8\%$, $\pm 7\%$, $\pm 6\%$, $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$, 또는 $\pm 1\%$ 의 상대적이라는 의미일 수 있다.
- [0043] 또한, 본 발명의 개념은 다양한 형태의 "측면" 또는 "구체예들"에 영향을 받기 쉬우므로, 본 명세서는 본 발명

개념의 원리의 예로서 간주되도록 의도되었으며, 본 발명 개념을 도시되고 설명된 특정 측면으로 제한하려는 의도는 아니다. 본 발명의 특징 중 어느 하나는 별도로 사용될 수도 있고, 다른 특징과 결합되어 사용될 수도 있다. 상세한 설명에서 "측면", "측면들" 및/또는 이와 유사한 용어에 대한 언급은 언급되는 특징 및/또는 특징이 설명의 적어도 하나의 측면에 내포되는 것을 의미한다. 상세한 설명에서 "측면", "측면들" 및/또는 이와 유사한 용어에 대한 별도의 언급이 반드시 동일한 측면을 지칭하는 것은 아니며, 또한 그렇게 언급되지 않는 한, 및/또는 설명으로부터 당업자에게 쉽게 명백해지는 경우를 제외하고는 상호 배타적이지 않다. 예를 들면, 한 측면에 설명된 특징, 구조, 프로세스, 단계, 동작 및 이와 유사한 것들은 다른 측면에도 내포될 수 있지만 반드시 내포되어야 하는 것은 아니다. 따라서, 본 발명에는 여기에 설명된 측면들의 다양한 조합 및/또는 통합이 내포되어 있을 수 있다. 추가적으로, 본 명세서에 기술된 본 명세서의 모든 측면은 그 실시예에 있어서 필수적인 것은 아니다. 마찬가지로, 본 발명 개념의 다른 시스템, 방법, 특징 및 이점은 도면 및 설명을 검토하면 당업자에게 명백해질 것이다. 이러한 모든 추가적인 시스템, 방법, 특징 및 이점은 본 설명 내에 내포되고, 본 발명의 개념의 범위 내에 속하며, 청구범위 안에 포괄되도록 의도된다.

[0044] 용어 “핵산” 또는 “폴리뉴클레오티드”란 단일 또는 이중-가닥 형태의 데옥시리보핵산 (DNA) 또는 리보핵산 (RNA) 및 이의 중합체를 지칭한다. 특별히 제한되지 않는 한, 이 용어에는 기준 핵산과 유사한 결합 성질을 갖고, 자연 발생적 뉴클레오티드들과 동일한 방식으로 대사되는 천연 뉴클레오티드의 공지된 유사체를 함유하는 핵산이 포괄된다. 명시적으로 지적되지 않는 한, 특정 핵산 서열은 명시된 서열 뿐만 아니라, 보존적으로 변형된 이의 변이체들(가령, 축중 코돈 치환), 대립유전자, 오르소로그(orthologs), SNPs, 그리고 상보적 서열(complementary)이 또한 포괄된다. 특히, 축중 코돈 치환은 하나 또는 그 이상의 선택된 (또는 모든) 코돈의 세 번째 위치가 혼합-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성함으로써 달성될 수 있다. 가령, Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991) 참고, 이의 내용은 이의 전문이 본원에 편입된다. 일부 측면들에서, 핵산 서열은 폴리펩티드 서열을 인코딩한다.

[0045] 본원에서 사용된 바와 같이, "인코딩한다"라는 용어는 고분자 거대분자의 정보를 사용하여 첫 번째 분자와 다른 두 번째 분자의 생성을 지시하는 모든 과정을 광범위하게 의미한다. 두 번째 분자는 첫 번째 분자의 화학적 성질과 다른 화학적 구조를 가질 수 있다. 예를 들면, 일부 측면들에서, "인코딩한다"라는 용어는 절반-보존적 DNA 복제 과정을 설명하며, 여기에서 이중-가닥 DNA 분자의 한 가닥은 DNA-의존적 DNA 중합효소에 의해 새로 합성된 상보적인 자매 가닥을 인코딩화하기 위한 주형으로 사용된다. 다른 측면들에서, DNA 분자는 RNA 분자를 인코딩할 수 있다(가령, DNA-의존적 RNA 중합효소를 사용하는 전사 과정에 의해). 또한, RNA 분자는 해독 과정에서처럼 폴리펩티드를 인코딩할 수 있다. 해독 과정을 설명하는 데 사용될 때, "인코딩한다"라는 용어는 아미노산을 인코딩하는 삼중 코돈까지 확장된다. 일부 측면들에서, RNA 분자는 예를 들어, RNA-의존적 DNA 중합효소를 통합하는 역전사 과정에 의해 DNA 분자를 인코딩할 수 있다. 또다른 측면에서, DNA 분자는 폴리펩티드를 인코딩할 수 있고, 여기서 사용된 "인코딩하다"란 전사 및 해독 과정을 모두 통합하는 것으로 이해된다.

[0046] 핵산은 이것이 또 하나의 핵산 서열과 구조적 또는 기능적 관계로 놓이는 경우, "작동가능하게 연결된" 것이다. 예를 들면, DNA의 한 세그먼트가 동일한 인접 DNA 분자에 대해 서로 상대적으로 위치하고, 구조적 또는 기능적 관계를 갖고 있는 경우, DNA의 또다른 세그먼트에 작동 가능하게 연결될 수 있다; 이를 테면, 코딩 서열의 전사를 촉진하기 위해 코딩 서열에 대해 위치하는 프로모터 또는 인핸서; 해독을 용이하게 하기 위해 코딩 서열에 상대적으로 위치하는 리보솜 결합 부위; 또는 프레-단백질 (가령, 인코딩된 폴리펩티드의 분비에 참여하는 프레-단백질)의 발현을 촉진하기 위해 코딩 서열에 대해 상대적으로 위치하는 프레-서열 또는 분비 리더. 다른 실시예들에서, 작동 가능하게 연결된 핵산 서열은 인접하지 않지만, 그러나 핵산으로서 또는 이에 의해 발현되는 단백질로서 서로 기능적 관계를 갖는 방식으로 위치한다. 예를 들면, 인핸서는 인접할 필요는 없다. 연계(linking)는 편리한 제한 부위에 연결하거나, 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 또는 링커를 사용하여 수행할 수 있다.

[0047] 일부 측면들에서, 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산은 발현 대조군 서열에 작동가능하도록 연계될 수 있다.

[0048] 발현 조절 서열은 작동 가능하게 연계된 이중성 핵산 서열의 발현을 조절하는 핵산 서열을 의미한다. 발현 조절 서열은 이 발현 조절 서열이 전사를 제어 및 조절하고, 적절한 경우, 핵산 서열의 전사 및 해독을 조절할 때, 이 핵산 서열에 작동가능하게 연계된다. 따라서, 발현 제어 서열에는 적절한 프로모터, 인핸서, 전사 종결자, 단백질-인코딩 유전자 앞의 시작 코돈 (ATG), 인트론에 대한 스플라이싱 신호, mRNA의 적절한 해독을 허용하는 해당 유전자의 올바른 판독 프레임 유지 및 중지 코돈이 내포될 수 있다. "조절 서열 (control sequences)"이라는 용어에는, 최소한, 그 존재가 발현에 영향을 줄 수 있는 모든 성분이 내포되며, 그 존재가 유리한 추가 성분, 예를 들어, 리더 서열 및 융합 파트너 서열을 또한 내포할 수 있는 것으로 한다. 발현 조절 서열에는 프

로모터가 내포될 수 있다.

[0049] 프로모터는 전사를 지시하기에 충분한 최소 서열이다. 프로모터-의존적 유전자 발현을 세포-유형 특이적, 조직-특이적 또는 외부 신호나 제제에 의해 유도가능하게 제어할 수 있게 만드는 데 충분한 프로모터 요소도 또한 내포되며; 이러한 요소들은 해당 유전자의 5' 또는 3' 영역에 위치할 수 있다. 구성적 프로모터와 유도성 프로모터가 모두 내포된다 (예를 들면, Bitter et al., Methods in Enzymology 153:516-544, 1987 참고). 예를 들면, 박테리아 시스템에서 클로닝되는 경우, 유도성 프로모터, 이를 테면, 박테리오파지 람다의 pL, plac, ptrp, ptac (ptrp-lac 하이브리드 프로모터) 및 이와 유사한 것들이 사용될 수 있다. 한 구체예에서, 포유류 세포 시스템에서 클로닝될 때, 포유류 세포 계능으로부터 파생된 프로모터 (이를 테면, 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유류 바이러스로부터 파생된 프로모터 (이를 테면, 레트로바이러스 긴 말단 반복부; 아데노바이러스 후기 프로모터; 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터)가 이용될 수 있다. 재조합 DNA 또는 합성 기술에 의해 생산된 프로모터도 핵산 서열의 전사를 제공하는 데 사용될 수 있다. 발현 벡터: 뉴클레오티드 서열이 발현되도록 작동가능하게 연계된 발현 제어 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터. 발현 벡터는 발현을 위하여 충분한 시스(cis)-작용 요소들을 포함하고; 발현을 위한 기타 요소들은 숙주 세포 또는 시험관내 발현 시스템에 의해 공급될 수 있다. 발현 벡터들에는 상기 재조합 폴리뉴클레오티드가 통합되는 당분야에 공지된 모든 것들이 내포되는데, 이를 테면, 코스미드, 플라스미드들 (가령, 네이키드 또는 리포솜 안에 함유된) 및 바이러스들 (가령, 렌티바이러스들, 레트로바이러스들, 아데노바이러스들, 그리고 아데노-연합된 바이러스들)이 있다.

[0050] "이종성(heterologous)"이라는 용어는 다른 유전적 근원에서 유래하는 것을 지칭한다. 세포와 이종성인 핵산 분자는 자신이 발현되는 세포가 아닌 유전적 원천에서 유래한다. 한 구체적이고, 비-제한적인 예에서, 재조합 코로나바이러스 S 단백질을 코딩하는 이종 핵산 분자는 포유동물 세포와 같은 세포에서 발현된다. 세포 또는 유기체에 이종성 핵산 분자를 도입하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 전기천공, 지방감염, 입자총 가속 및 상동 재조합을 포함하는 핵산을 이용한 형질전환이 있다.

[0051] 용어 “펩티드”, “폴리펩티드”, 및 “단백질”은 호환사용되며, 그리고 펩티드 결합에 의해 공유적으로 연계된 아미노산 잔기들을 포함하는 화합물을 지칭한다. 단백질 또는 펩티드는 적어도 두 개의 아미노산을 함유해야 하며, 단백질 서열 또는 펩티드 서열을 구성할 수 있는 아미노산의 최대 숫자에는 제약이 없다. 폴리펩티드에는 펩티드 결합에 의해 서로 연결된 두 개 또는 그 이상의 아미노산을 포함하는 임의의 펩티드 또는 단백질이 내포된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 이 용어는 짧은쇄(당분야에서 펩티드, 올리고펩티드 및 올리고머로 또한 흔히 불리는)펩티드들과 더 긴쇄(일반적으로 다양한 유형의 단백질로 지칭됨)를 모두 지칭한다. “폴리펩티드”에는 그중에서도 예를 들면, 생물학적으로 활성 단편들, 실질적으로 상동성 폴리펩티드들, 올리고펩티드들, 동종이량체들, 이종성 (hetero)이량체, 폴리펩티드들의 변이체들, 변형된 폴리펩티드들, 유도체들, 유사체들, 융합 단백질들이 내포된다. 폴리펩티드에는 천연 펩티드, 재조합 펩티드, 또는 이의 조합이 내포된다.

[0052] 본 출원의 맥락에서, 단백질은 아미노산 서열로 표시되고, 이에 상응하여 핵산 분자 또는 핵산 서열로 표시되는 폴리뉴클레오티드로 표시된다. 본 출원 전반에 걸쳐, 서열 간의 동일성 및 유사성이란, 특정 아미노산 서열 서열 식별 번호 (예를 들어, 서열 식별 번호:Y를 언급한 때)를 언급할 때: 이는 아미노산 서열, 서열 식별 번호:Y와 적어도 60% 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 서열을 포함하는 아미노산 서열로 표시되는 폴리펩티드로 대체될 수 있다. 서열 동일성 또는 유사성의 또 다른 바람직한 수준은 65%이다. 서열 동일성 또는 유사성의 또 다른 바람직한 수준은 70%이다. 서열 동일성 또는 유사성의 또 다른 바람직한 수준은 75%이다. 서열 동일성 또는 유사성의 또 다른 바람직한 수준은 80%이다. 서열 동일성 또는 유사성의 또 다른 바람직한 수준은 85%이다. 서열 동일성 또는 유사성의 또 다른 바람직한 수준은 90%이다. 서열 동일성 또는 유사성의 또 다른 바람직한 수준은 95%이다. 서열 동일성 또는 유사성의 또 다른 바람직한 수준은 98%이다. 서열 동일성 또는 유사성의 또 다른 바람직한 수준은 99%이다.

[0053] 각각 주어진 아미노산 서열과의 동일성 또는 유사성 백분율로 인해 본원에 기술된 각각의 아미노산 서열은 추가로 바람직한 측면에서 각각 주어진 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열과 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성 또는 유사성을 갖는다. "상동성", "서열 동일성" 등의 용어는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. 본원에서 "서열 동일성(identity)"이란 두 개 또는 그 이상의 아미노산 (폴리펩티드 또는 단백질) 서열 간에, 두 개 또는 그 이상의 핵산 (폴리뉴클레오티드) 서열을 비교하

였을 때, 이들 간의 상관관계로 기술된다. 바람직한 측면에서, 서열 동일성은 주어진 두 개 서열 식별 번호 또는 이의 일부분을 기반으로 하여 산출된다. 이의 일부분이란 바람직하게는 두 서열 식별 번호의 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 이상을 의미한다. 당업계에서 "동일성"은 그러한 서열의 스트링 사이의 일치에 의해 결정된 아미노산 서열 또는 핵산 서열 사이의 서열 관련성의 정도를 또한 지칭한다. 두 서열 사이의 서열 동일성 정도는 예를 들어, 전역 또는 국소 정렬 알고리즘과 같은 이 목적을 위해 일반적으로 사용되는 컴퓨터 프로그램을 사용하여 두 서열을 비교함으로써 결정될 수 있다. 비-제한적인 예시로는 BLASTp, BLASTn, Clustal W, MAFFT, Clustal Omega, AlignMe, Praline, GAP, BESTFIT 또는 다른 적합한 방법 또는 알고리즘이 내포되어 있다. Needleman 및 Wunsch 전역 정렬 알고리즘을 사용하여, 일치되는 수를 최대화하고, 갭 수를 최소화하면서, 두 서열을 전체 길이 또는 그 일부에 걸쳐 정렬할 수 있다 (그 일부는 서열 길이의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%를 의미할 수 있음). 디폴트 설정을 사용할 수 있으며, 선호하는 프로그램은 쌍 정렬용으로 Needle (한 측면에서, EMBOSS Needle 6.6.0.0, 갭 오픈 패널티 10, 갭 크기 패널티: 0.5, 엔드 갭 패널티: 허위, 엔드 갭 오픈 패널티: 10, 엔드 갭 크기 패널티: 0.5가 이용됨) 그리고 다중 서열 정렬용으로 MAFFT (한 측면에서, MAFFT v7 디폴트 값은 다음과 같다: BLOSUM62 [b162], 갭 오픈: 1.53, 갭 연장: 0.123, 순서: 정렬됨, 트리 리-빌딩 갯수: 2, 가이드 트리 아웃풋: ON [true], Max 반복: 2, Perform FFTS: 사용되지 않음).

[0054] 두 개 아미노산 서열 간의 "유사성"은 하나의 폴리펩티드의 아미노산 서열과 이의 보존된 아미노산 치환을 제 2 폴리펩티드의 서열과 비교함으로써 결정된다. 서열 동일성 결정에 사용되는 유사한 알고리즘을 서열 유사성 결정에 사용할 수 있다. 선택적으로, 아미노산 유사성의 정도를 결정할 때, 당업자는 또한 소위 "보존적" 아미노산 치환을 고려할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "보존적" 아미노산 치환은 유사한 측쇄를 갖는 잔기의 상호교환성을 지칭한다.

[0055] 예를 들면, 지방족 측쇄를 갖는 아미노산 그룹은 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신이며; 지방족-히드록실기 측쇄를 갖는 아미노산 그룹은 세린 및 트레오닌이며; 아미드 함유 측쇄를 갖는 아미노산 그룹은 아스파라긴 및 글루타민이며; 방향족 측쇄를 갖는 아미노산 그룹은 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판이며; 염기성 측쇄를 갖는 아미노산 그룹은 리신, 아르기닌 및 히스티딘이며; 그리고 황-함유 측쇄를 갖는 아미노산 그룹은 시스테인과 메티오닌이다. 바람직한 보존적 아미노산 치환기는 발린-류신-이소류신, 페닐알라닌-티로신, 라이신-아르기닌, 알라닌-발린 및 아스파라긴-글루타민이다. 본원에 기술된 아미노산 서열의 치환 변이체들은 개시된 서열에서 적어도 하나의 잔기가 제거되고, 그 자리에 상이한 잔기가 삽입된 것이다. 바람직하게는, 상기 아미노산 변화는 보존적이다. 자연 발생적 아미노산 각각에 대한 바람직한 보존적 치환은 다음과 같다: Ala에서 Ser로의 치환; Arg에서 Lys로의 치환; Asn에서 Gln 또는 His로의 치환; Asp에서 Glu로의 치환; Cys에서 Ser 또는 Ala로의 치환; Gln에서 Asn로의 치환; Glu에서 Asp로의 치환; Gly에서 Pro로의 치환; His에서 Asn 또는 Gln로의 치환; Ile에서 Leu 또는 Val로의 치환; Leu에서 Ile 또는 Val로의 치환; Lys에서 Arg로의 치환; Gln 또는 Glu; Met에서 Leu 또는 Ile로의 치환; Phe에서 Met, Leu 또는 Tyr로의 치환; Ser에서 Thr로의 치환; Thr에서 Ser로의 치환; Trp에서 Tyr로의 치환; Tyr에서 Trp 또는 Phe로의 치환; 그리고, Val에서 Ile 또는 Leu로의 치환.

[0056] 어주번트(어주번트)는 항원성을 강화하기 위해 사용되는 비히클을 지칭한다. 일부 구체예들에서, 보조제는 항원이 흡착되는 미네랄 (명반, 수산화알루미늄 또는 인산염) 현탁액을 포함할 수 있으며; 또는 유중수 에멀전, 예를 들면, 항원 용액을 광유에 유화시킨 것 (Freund 불완전 어주번트), 때로는 항원성을 더욱 강화하기 위해 (항원 분해를 억제하거나 대식세포의 유입을 유발함) 죽은 마이코박테리아들이 내포된 것도 있다 (Freund 완전 보조제). 일부 구체예들에서, 개시된 면역원성 조성물에 사용되는 보조제는 레시틴과 카보머 단독중합체의 조합이다 (이를 테면, Advanced Bioadjuvants, LLC의 ADJUPLEX™ ADJUVANT, Wegmann, Clin Vaccine Immunol, 22(9): 1004-1012, 2015 참고). 개시된 면역원성 조성물에 사용하기 위한 추가적인 보조제는 QS21 정제된 식물 추출물, Matrix M, AS01, MF59 및 ALFQ 보조제들이 내포된다. 면역자극 올리고뉴클레오티드 (이를 테면, CpG 모티프를 포함하는 것들)도 어주번트로 사용될 수 있다. 어주번트에는 생물학적 분자 ("생물학적 어주번트"), 이를 테면, 공동-자극 분자들이 내포된다. 예시적인 어주번트에는 IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, OX-40L, 4-1BBL 및 톨-유사 수용체 (TLR) 효현제, 이를 테면, TLR-9 효현제들이 내포된다. 어주번트의 추가 설명은 예를 들면, Singh (ed.) Vaccine adjuvants and Delivery Systems. Wiley-Interscience, 2007).에서 찾아볼 수 있다. 어주번트는 개시된 조성물과 조합하여 사용될 수 있다.

[0057] "항체"라는 용어는 분석물 (항원), 이를 테면, 코로나바이러스 S 단백질, 이의 항원 단편, 또는 이 항원의 이량체 또는 다량체 에 특이적으로 결합하여 인식하는 면역글로불린, 항원 결합 단편 또는 이들의 유도체를 의미한다. 용어 항체는 본 명세서에서 단클론 항체, 다클론 항체, 다중특이적 항체 (가령, 이중특이적 항체), 그리고 원하는 항원-결합 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포함하나, 이에 국한되지 않은 다양한 항체 구조를 포괄하는

광범위한 의미로 이용된다. 항체의 비-제한적 예시에는 예를 들어, 항원에 대한 결합 친화성을 유지하는 온전한 면역글로불린 및 이의 변이체 및 단편이 내포된다. 항체 단편들의 예로는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 디아바디(diabodies); 선형 항체; 단일-쇄 항체 분자들 (예로써 scFv); 그리고 항체 단편들로부터 형성된 다중특이적 항체가 포함되나, 이에 국한되지 않는다. 항체 단편에는 전체 항체의 변형에 의해 생성되거나, 재조합 DNA 방법을 사용하여 새로 합성된 항원 결합 단편이 내포된다 (가령, Kontermann and Dubel (Ed), Antibody Engineering, Vols. 1-2, 2nd Ed., Springer Press, 2010 참고).

[0058] 코로나바이러스는 심각한 호흡기 질환을 일으키는 것으로 알려진 양성 단일 가닥 RNA 바이러스 계열이다. 현재 코로나바이러스 계열에서 인간을 감염시키는 것으로 알려진 바이러스는 알파코로나바이러스 및 베타코로나바이러스 속(genera)에 속한다. 추가적으로, 감마코로나바이러스와 델타코로나바이러스 속이 미래에 인간을 감염시킬 수도 있다고 믿는다.

[0059] 베타코로나바이러스의 비-제한적인 예시에는 중등 호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV), 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스(SARS-CoV), 인간 코로나바이러스 HKU1(HKU1-CoV), 인간 코로나바이러스 OC43(OC43-CoV), 뮌헨 간염 바이러스(MHV-CoV), 박쥐 SARS-유사 코로나바이러스 WIV1(WIV1-CoV) 및 인간 코로나바이러스 HKU9(HKU9-CoV)이 내포된다. 알파코로나바이러스의 비-제한적인 예시에는 인간 코로나바이러스 229E (229E-CoV), 인간 코로나바이러스 NL63 (NL63-CoV), 돼지 전염병 설사 바이러스 (PEDV), 및 전염성 위장염 코로나바이러스 (TGEV)가 내포된다. 델타코로나바이러스의 비-제한적인 예시는 돼지 델타 코로나바이러스 (SDCV)이다.

[0060] 바이러스 계놈은 캡핑되고, 폴리아데닐화되며, 뉴클레오캡시드 단백질로 덮여 있다. 코로나바이러스 비리온에는 스파이크 (S) 단백질이라고 불리는 I 형 융합 당단백질이 포함된 바이러스 외피가 내포되어 있다. 대부분의 코로나바이러스는 계놈의 5'-부분에 복제효소 유전자가 내포되고, 계놈의 3'-부분에 구조 유전자가 내포된 공통 계놈 조직을 가지고 있다.

[0061] 코로나바이러스 스파이크 (S) 단백질: 초기에 전구체 단백질로 합성된 클래스 I 융합 당단백질. 개별 전구체 S 폴리펩티드는 동중삼량체를 형성하고, 골지체 내에서 글리코실화를 겪고, 뿐만 아니라 신호 펩티드를 제거하는 처리 및 세포성 프로테아제에 의한 절단을 거쳐 별도의 SI 및 S2 폴리펩티드 사슬을 생성하게 되고, 이는 이는 동중삼량체 내에서 S1/S2 프로토머로 연합되어 남아있게 되어, 이중이량체의 삼량체가 된다. 상기 S1 하위단위는 바이러스 막으로부터 원위에 있으며, 이의 숙주 수용체에 대한 바이러스 부착을 중재하는 수용체 결합 도메인 (RBD)을 함유하고 있다. 상기 S2 하위단위는 융합 단백질 기전, 이를 테면, 융합 펩티드, 두 개의 헵타드-반복 서열(HR1 및 HR2), 융합 당단백질의 전형적인 중심 나선, 막횡단 도메인 및 세포질 꼬리 도메인을 함유한다.

[0062] 코로나바이러스 스파이크 (S) 단백질 융합-전 형태는 분비 시스템에서 성숙한 코로나바이러스 S 단백질로 처리된 후, 그리고 코로나바이러스 S가 융합 후 형태로 전환되는 융합 현상이 발생하기 전, 코로나바이러스 S 단백질의 엑토도메인에 의해 채택된 구조적 형태다. 융합전 형태의 예시적인 코로나바이러스 S 단백질(HKU1-CoV)의 3차원 구조가 본 명세서에 개시되어 있고, Kirchdoerfer et al., "Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein," Nature, 531 : 118-121, 2016에서 제공된다 (본원의 참고자료에 편입됨).

[0063] "전-융합 형태로 안정화된" 코로나바이러스 엑토도메인 삼량체는 천연 코로나바이러스 S 서열과 비교하였을 때, 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하며, 이는 상응하는 천연 코로나바이러스 S 서열로부터 형성된 코로나바이러스 S 엑토도메인 삼량체와 비교하여 전융합 입체구조의 유지가 증가된다. 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입에 의한 상기 융합전 형태의 "안정화"는 예를 들어, 에너지 안정화 (예를 들어, 융합-후 열린 형태에 비해 융합-전 형태의 에너지 감소) 및/또는 역학적 안정화 (예를 들면, 융합-전 형태에서 융합-후 형태로의 전환 비율 감소)일 수 있다. 추가적으로, 융합-전 형태에서 코로나바이러스 S 엑토도메인 삼량체의 안정화에는 상응하는 천연 코로나바이러스 S 서열과 비교하여 변성에 대한 저항성 증가가 내포될 수 있다. 코로나바이러스 S 엑토도메인 삼량체가 융합-전 형태에 있는지 확인하는 방법이 본원에 제공되며, 음성-착색 전자 현미경 및 융합-전 형태 특이적 항체를 사용한 항체 결합 분석이 내포되지만, 이에 국한되지는 않는다.

[0064] 축퇴 변이체: 본 개시내용의 맥락에서, "축퇴 변이체(degenerate variant)"란 유전자 코드의 결과로서 축퇴된 서열이 내포되어 있는 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 20개의 천연 아미노산이 있으며, 대부분은 하나 이상의 코돈으로 특화된다. 따라서, 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 펩티드의 아미노산 서열이 변하지 않는 한, 이 펩티드를 인코딩하는 모든 축퇴성 뉴클레오티드 서열이 내포되어 있다.

[0065] 한 가지 예시에서, 원하는 반응은 CoV (이를 테면, SARS-CoV-2) 감염을 억제, 감소 또는 예방하는 것이다. 이

방법이 CoV 감염을 완전히 제거하거나 감소 또는 예방할 정도로 효과적인 필요는 없다. 예를 들면, 유효량의 면역원을 투여하면, 적합한 대조군과 비교하였을 때 (예를 들면, 세포 감염 또는 CoV에 감염된 대상체의 수 또는 백분율로 측정하였을 때), CoV 감염을 원하는 양, 예를 들면, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 심지어 적어도 100% (검출가능한 CoV 감염의 제거 또는 예방)의 수준으로 감소시키는 면역 반응을 유도할 수 있다. 에피토프(Epitope): 항원 결정자. 이들은 특정 면역 반응을 유도하는 항원성을 갖는 분자의 특정 화학 그룹 또는 펩타이드 서열이며, 예를 들면, 에피토프는 예를 들어, 에피토프는 B 및/또는 T 세포가 반응하는 항원 영역이다. 항체는 특정 항원 에피토프, 이를 테면, SARS-CoV S 엑토도메인과 같은 코로나바이러스 S 엑토도메인의 에피토프에 결합할 수 있다. 에피토프는 단백질의 3 차 폴딩에 의해 병치된 인접 아미노산과 비연속 아미노산 둘 모두로부터 형성될 수 있다.

[0066] 발현은 핵산 서열의 전사 또는 해독을 의미한다. 예를 들면, 유전자는 DNA가 RNA 또는 RNA 단편으로 전사될 때 발현되며, 일부 예에서는 프로세싱되어 mRNA가 된다. 유전자는 mRNA는 발현되어, 아미노산 서열, 이를 테면, 단백질이나 단백질 단편으로 해독될 수도 있다. 특정 예시에서, 이중성 유전자는 RNA로 전사될 때 발현된다. 또다른 예시에서, 이중성 유전자는 RNA가 아미노산 서열로 해독될 때 발현된다. "발현"이라는 용어는 전사 또는 해독을 나타내기 위해 본원에서 사용된다. 발현 조절에는 전사, 번역, RNA 수송 및 처리에 대한 조절, mRNA와 같은 중간 분자의 분해, 또는 특정 단백질 분자가 생성된 후 이들 분자의 활성화, 불활성화, 구획화 또는 분해를 통한 조절이 내포될 수 있다.

[0067] "숙주 세포"라는 용어는 외인성 핵산이 도입된 세포를 의미하며, 이러한 세포의 자손도 내포된다. 숙주 세포에는 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"들이 내포되며, 여기에는 계대 수에 관계없이, 일차 형질전환된 세포 및 이로부터 유래된 자손들이 내포된다. 숙주 세포에는 외인성 핵산이 도입된 대상체 (가령, 포유동물 대상체 (가령, 인간))의 신체 내 세포들이 내포된다.

[0068] "면역원(immunogen)"은 이를 투여 시, 대상체에서 면역 반응을 유도할 수 있는 임의의 폴리펩티드를 의미한다. 일부 구체예들에서, 상기 면역원은 면역원 (가령, 관심 유전자 산물 또는 이의 단편 (가령, 폴리펩티드))의 후속 발현을 위해, 예를 들어, 폴리뉴클레오티드 또는 벡터에 통합될 수 있는 핵산 분자에 의해 인코딩된다.

[0069] 본원에 사용된 용어 "면역원성 조성물"은 면역 반응을 유발하는데 사용되는 물질로 정의되며, 대상체에게 면역원성 조성물을 투여한 후, 면역성을 부여할 수 있다.

[0070] "면역자극제"라는 용어는 임의의 구성요소의 활성화를 유도하거나, 활성을 증가시켜 면역체계를 자극하는 물질 (가령, 약물 및 영양소)을 의미한다. 면역자극제는 사이토카인 (가령, 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자) 및 인터페론 (가령, IFN- α 및/또는 IFN- γ)이 내포된다.

[0071] "약제학적 조성물"은 바람직하게는, 관심대상의 항원 유전자 생성물을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 이의 단편이 내포된 면역원성 조성물 또는 백신과 같은, 대상체에게 투여하기에 적합하고, 질환 (가령, CoV 감염)을 치료 또는 예방하거나 이 질환의 하나 또는 그 이상의 증상 (가령, CoV 바이러스 역가, 바이러스 확산, 감염 및/또는 세포 융합)을 감소 또는 개선하기 위한 치료학적 또는 생물학적 활성제를 함유하는 임의의 조성물을 의미한다. 본 발명의 목적을 위해, 약제학적 조성물에는 백신이 포함되며, 치료 또는 생물학적 활성제를 전달하는데 적합한 약제학적 조성물에는 예를 들어, 정제, 젤캡, 캡슐, 알약, 분말, 과립제, 현탁액, 에멀전, 용액, 젤, 하이드로겔, 경구 젤, 페이스트, 안약, 연고, 크림, 반창고, 관주, 전달 장치, 좌약, 관장제, 주사제, 임플란트, 스프레이 또는 에어로졸이 내포될 수 있다. 이들 제제 중 임의의 것들은 널리 공지되고, 허용되는 기술 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들면, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (21st ed.), ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2005, 및 Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, ed. J. Swarbrick, Informa Healthcare, 2006을 참고하며, 이들 각각은 본원이 참고자료에 편입되어 있다. 면역 반응은 자극에 대한 B 세포, T 세포 또는 단핵구와 같은 면역 체계 세포의 반응이다. 한 구체예에서, 상기 반응은 특정 항원에 대해 특이적이다 ("항원 특이적 반응"). 한 구체예에서, 면역 반응은 T 세포 반응, 이를 테면, CD4+ 반응 또는 CD8+ 반응이다. 또다른 구체예에서, 상기 반응은 B 세포 반응이며, 이로써 특정 항체가 생성된다.

[0072] 프라임-부스터 백신접종은 대상체에게 제1 면역원성 조성물 (1차 백신)을 투여한 후, 제2 면역원성 조성물 (부스터 백신)을 투여하여, 면역 반응을 유도하는 것을 포함하는 면역요법이다. 상기 프라임 백신 및/또는 부스터 백신에는 면역 반응의 대상이 되는 항원을 발현하는 벡터 (이를 테면, 바이러스 벡터, RNA 또는 DNA 벡터)가 내포된다. 상기 부스터 백신은 프라임 백신 투여-후 대상체에게 투여되고; 프라임 백신과 부스터 백신의 투여 간 적절한 시격, 및 그러한 기간의 예시들이 본원에 개시되어 있다. 일부 구체예들에서, 상기 프라임 백신, 부스터 접종 백신, 또는 이들 프라임 백신과 부스터 접종 백신은 모두 어쥬번트를 추가로 내포하고 있

다.

[0073] 백신은 대상체에서 예방적 또는 치료적 면역 반응을 유도하는 약제학적 조성물이다. 일부 경우에, 상기 면역 반응이 보호성 면역 반응이다. 전형적으로, 백신은 병원체, 예를 들어, 바이러스 병원체의 항원, 또는 병리학적 상태와 관련된 세포 구성성분에 대한 항원 특이적 면역 반응을 유도한다. 백신에는 폴리뉴클레오티드 (이를 테면, 개시된 항원을 코딩하는 핵산), 펩티드 또는 폴리펩티드 (이를 테면, 개시된 항원), 바이러스, 세포 또는 하나 또는 그 이상의 세포 구성요소들이 내포될 수 있다. 비-제한적 예시에서, 백신은 대조군에 비교하였을 때, 코로나바이러스 감염 (이를 테면, SARS-CoV 또는 MERS-CoV 감염)과 관련된 증상의 심각도를 낮추거나, 바이러스 부하를 감소시키는 면역 반응을 유도한다. 또다른 비-제한적 예시에서, 백신은 대조군과 비교하였을 때, 코로나 바이러스 감염 (이를 테면, SARS-CoV 또는 MERS-CoV 감염)을 감소 및/또는 예방하는 면역 반응을 유도한다. 일부 측면들에서, 본 명세서의 백신은 "2가(bivalent)" 또는 "다가(multivalent)"로 지칭될 수 있는데, 그 이유는 두 개 또는 그 이상의 바이러스 병원체, 가령, 두 개의 코로나바이러스 분리주에 대한 면역 반응을 동시에 유도할 수 있는 단일 벡터이기 때문이다.

[0074] 벡터는 관심대상 항원(들)의 코딩 서열에 작동가능하도록 연계되고, 상기 코딩 서열을 발현할 수 있는 프로모터를 보유하는 DNA 또는 RNA 분자를 포함하는 실체다. 비-제한적인 예시에는 복제-불가능한 바이러스 또는 박테리아 또는 기타 미생물, 또는 복제-가능한 바이러스 또는 박테리아 또는 기타 미생물의 네이키드 또는 패키징된 (지질 및/또는 단백질) DNA, 네이키드 또는 패키징된 RNA, 이들의 하위-구성요소들이 내포된다. 벡터는 때때로 구성체 (construct)이라고도 한다. 재조합 DNA 벡터들은 재조합 DNA를 갖는 벡터들이다. 벡터는 숙주 세포에서 복제를 허용하는 핵산 서열, 이를 테면, 복제 원점을 포함할 수 있다. 벡터는 또한 하나 또는 그 이상의 선택가능한 마커 유전자 및 당분야에 공지된 다른 유전적 요소를 포함할 수 있다. 바이러스 벡터는 하나 또는 그 이상의 바이러스로부터 유래된 적어도 일부 핵산 서열들을 갖는 재조합 핵산 벡터들이다.

[0075] 바이러스-유사 입자(VLP)는 여러 바이러스 중 하나에서 파생된 복제되지 않는 바이러스 껍질이다. VLPs는 일반적으로, 캡시드, 코트, 쉘, 표면 및/또는 외피 단백질 또는 이들 단백질로부터 유래된 입자 형성 폴리펩티드로 지칭되는 단백질과 같은 하나 또는 그 이상의 바이러스 단백질로 구성되지만, 이에 국한되지는 않는다. VLPs는 적절한 발현 시스템에서 단백질의 재조합 발현 시 자발적으로 형성될 수 있다. VLPs를 만드는 방법들은 당분야에 공지되어 있다. 바이러스 단백질의 재조합 발현-후, VLPs의 존재는 전자현미경, 생물리학적 특성화 등과 같은 당업계에 공지된 통상적인 기술을 사용하여 탐지될 수 있다. 나아가, VLPs는 공지된 기술, 예를 들어, 밀도 구배 원심분리로 분리할 수 있으며, 특징적인 밀도 밴딩으로 식별될 수 있다. 예를 들면, Baker et al. (1991) Biophys. J. 60: 1445-1456; and Hagensee et al. (1994) /. Virol. 68:4503-4505; Vincente, J Invertebr Pathol., 2011; Schneider-Ohrum and Ross, Curr. Top. Microbiol. Immunol, 354: 53073, 2012) 참고.

[0076] II. 조성물

[0077] 본 명세서의 조성물은 하나 또는 그 이상의 활성제를 포함할 수 있다. 일부 구체예들에서, 활성 제제는 바이러스 감염의 감염성을 예방, 치료 또는 감소시키는 제제일 수 있다. 일부 구체예들에서, 바이러스 감염을 치료하는 것은 바이러스의 감염성 및/또는 전파를 감소시키는 것을 포함할 수 있다. 일부 구체예들에서, 바이러스 감염을 예방하는 것은 바이러스의 감염성 및/또는 전파를 감소시키는 것을 포함할 수 있다. 본 명세서의 조성물은 바이러스 감염을 예방하기 위한 활성제, 바이러스 감염을 치료하기 위한 활성제, 바이러스 감염의 감염성을 감소시키기 위한 활성제, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 본 명세서의 조성물은 약학적으로 허용되는 부형제, 담체 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 나아가, 본 발명의 조성물은 보존제, 가용화제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 감미제, 착색제, 취기제, 염 (본 발명의 물질 자체가 약학적으로 허용되는 염의 형태로 제공될 수 있음), 완충제, 코팅제 또는 항산화제를 함유할 수 있다.

[0078] 본 명세서는 비-인간 아데노바이러스 벡터 조성물 및 호흡기 바이러스 감염을 치료 또는 예방하기 위해, 아데노 바이러스 벡터 및 선택적으로 하나 또는 그 이상의 추가 활성 성분, 약학적으로 허용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 보조제를 포함하는 면역원성 조성물을 사용하는 방법에 관한 것이다. 출원인은 유인원 아데노바이러스 벡터를 사용하면, 인간 아데노바이러스 벡터 플랫폼(PMID:32450106)에서 볼 수 있는 이중성 벡터 교차-면역 문제를 극복할 수 있음을 발견했다. 출원인은 안정화된 형태의 SARS-CoV-2 "S" 단백질과 같은 SARS-CoV-2 항원을 발현하는 침팬지 아데노바이러스 벡터를 구성했으며, 해당 질환의 동물 모델에서 COVID-19로부터 보호할 수 있음을 보여주었다. SARS-CoV-2 항원 또는 이의 면역원성 부분은 아데노바이러스 벡터로 발현될 때, 인간 감염 시, 면역 반응을 자극하여 COVID-19 질환에 대한 면역력을 부여할 수 있다. 출원인은 또한 이 아데노바이러스 벡터 플랫폼이 SARS-CoV-2의 하위-계통 또는 하위-변종에 대한 면역 반응을 생성하는 데 효과적인 SARS-CoV-2 항원

변종을 전달하는 데 성공적으로 사용될 수 있음을 발견했다.

[0079]

본 발명의 다른 측면은 아래에서 더 자세히 설명된다.

[0080]

a) 아데노바이러스 벡터

[0081]

본 명세서에서 SARS-CoV-2 "S" 단백질의 안정화된 형태와 같은 SARS-CoV-2 항원을 코딩하는 DNA의 전달을 위한 아데노바이러스 벡터를 제공한다. SARS-CoV2-Wuhan S 단백질을 인코딩하는 도입유전자의 뉴클레오타이드 서열은 서열 식별 번호: 1로 제공되고, SARS-CoV2-Wuhan S 단백질을 인코딩하는 도입유전자를 포함하는 예시적인 아데노바이러스 벡터의 뉴클레오타이드 서열은 서열 식별 번호: 2로 제공된다. SARS-CoV2-Wuhan S 단백질에 대한 단백질 코딩 서열은 서열 식별 번호: 3으로 제공된다.

[0082]

아데노바이러스는 뉴클레오캡시드와 선형 이중 가닥 DNA 게놈으로 구성된 직경 약 90-100nm의 외피가 없는 바이러스이다. 상기 바이러스 뉴클레오캡시드는 펜톤 및 육각형 캡소머로 구성된다. 독특한 섬유는 각 펜톤 염기와 연합되어 있으며, 숙주 세포 표면의 Coxsackie-아데노바이러스 수용체를 통해 바이러스가 숙주 세포에 부착되는 것을 돕는다. 50개 이상의 혈청형 아데노바이러스 게놈이 확인되었으며, 이들 중 대부분은 인간에게 호흡기 감염, 결막염 및 위장염의 원인이다. 아데노바이러스는 숙주 게놈에 통합되기보다는 일반적으로 숙주 세포 핵의 에피솜 요소로 복제된다. 아데노바이러스의 게놈은 4개의 초기 전사 단위 (E1, E2, E3 및 E4)를 포함하며, 이는 주로 조절 기능을 갖고 바이러스 복제를 위한 숙주 세포를 준비한다. 상기 게놈은 펜톤(L2), 핵소(L3), 스캐폴딩 단백질(L4) 및 섬유 단백질(L5)을 비롯한 구조 단백질을 암호화하는 5개의 후기 전사 단위(L1, L2, L3, L4 및 L5)를 또한 포함하며, 이들은 단일 프로모터의 제어 하에 있다. 상기 게놈의 각 말단은 바이러스 복제에 필요한 역전 말단 반복 (ITR)을 포함한다.

[0083]

재조합 아데노바이러스는 원래 유전자 치료를 위해 개발되었지만, 그러나 이러한 유전자 전달 물질에 의해 유발된 강력하고 지속적인 도입유전자-특이적 면역 반응으로 인해 이러한 유전자 전달 물질이 백신 운반체로서의 이들의 사용을 촉발시켰다. 아데노바이러스는 높은 면역원성 외에도, 임상 백신 개발에 많은 다른 이점을 제공한다. 아데노바이러스 게놈은 비교적 작으며 (26~45kbp), 특성이 잘 알려져 있고 조작하기 쉽다. 단일 전사 단위인 E1의 삭제는 바이러스 복제를 불가능하게 만들어 예측 가능성을 높이고 임상 적용 시 부작용을 줄인다. 재조합 아데노바이러스는 상대적으로 큰 (어떤 경우에는 최대 8kb) 도입유전자를 수용할 수 있어, 하위단위 설계에 유연성을 허용하고, 다양한 세포와 조직으로의 도입유전자 전달을 촉진하는 상대적으로 넓은 방향성을 가지고 있다. 임상 적용을 위해 중요한 점은 재조합 아데노바이러스를 고역가로 확대-생산하고, 정제하는 방법이 잘 확립되어 있다는 것이다. 지금까지, 하위그룹 C 혈청형 AdHu2 또는 AdHu5가 주로 벡터로 사용되었다. 그러나, 전형적인 인간 아데노바이러스 AdHu5를 기반으로 한 1세대 백신 벡터는 고무적인 전임상 데이터에도 불구하고 임상 시험에서 낮은 효능을 보였다. 이후 자연 감염의 결과로, 많은 비율의 인간 성인이 AdHu2 및 AdHu5와 같은 일반적인 인간 혈청형에 대한 상당한 역가의 중화 항체를 보유하고 있음이 발견되었다. 중화 항체는 바이러스가 숙주 세포로 진입하는 것을 차단시킴으로써, 표적 도입유전자의 전달도 차단되어, 바이러스 벡터 백신의 효능을 감소시킬 수 있다.

[0084]

본 명세서에 기술된 조성물에는 치료 목적 또는 백신 목적을 위해 이중 분자를 세포에 전달하는 벡터들이 내포되어 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 벡터에는 네이키드 DNA, 파아지, 트랜스포손, 코스미드, 에피솜, 플라스미드 또는 바이러스를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는 임의의 유전적 요소가 내포될 수 있다. 일부 구체예들에서, 이러한 벡터들은 원숭이 아데노바이러스 DNA (가령, SAdV-36), 그리고 단백질 (가령, S-단백질)을 인코딩하는 도입유전자 또는 핵산 서열을 함유한다. 본원에서 사용된 바와 같이 "도입유전자"란 선택된 이중성 유전자 (이중성 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열)와 숙주 세포에서 유전자 생성물의 해독, 전사 및/또는 발현 유도에 필요한 기타 조절 요소들 또는 발현 조절 서열들의 조합을 의미한다. 몇 가지 구체예들에서, 상기 바이러스 벡터에는 코로나바이러스 S 단백질을 인코딩하는 도입유전자를 발현하는 아데노바이러스 벡터가 내포될 수 있다. 다양한 기원, 하위유형 또는 하위 유형들의 혼합물로부터의 아데노바이러스가 아데노바이러스 벡터에 대한 바이러스 게놈의 공급원으로 사용될 수 있다. 비-인간 아데노바이러스 (가령, 유인원, 침팬지, 고릴라, 조류, 개과, 양 또는 소의 아데노바이러스)를 이용하여 상기 아데노바이러스 벡터를 만들 수 있다. 예를 들면, 유인원 아데노바이러스를 상기 아데노바이러스 벡터의 바이러스 게놈의 공급원으로 이용할 수 있다. 유인원 아데노바이러스는 혈청형 1, 3, 7, 11, 16, 18, 19, 20, 27, 33, 36, 38, 39, 48, 49, 50, 또는 임의의 다른 유인원 아데노바이러스 혈청형일 수 있다. 유인원 아데노바이러스는 당분야에 공지된 임의의 적합한 축약형태, 이를테면, 예를 들면, SV, SAdV, SAV 또는 sAV로 지칭될 수 있다. 일부 예시들에서, 유인원 아데노바이러스 벡터는 혈청형 36의 유인원 아데노바이러스 벡터이다.

- [0085] 전형적으로, SAdV-유래된 아데노바이러스 벡터는 상기 도입유전자가 선택된 아데노바이러스 유전자에 고유한 영역 안에 다른 아데노바이러스 서열을 함유하도록 핵산 분자에 위치되도록 기획된다. 원하는 경우, 상기 도입유전자를 기존 유전자 영역에 삽입하여 해당 영역의 기능을 파괴시킬 수 있다. 대안적으로, 상기 도입유전자는 부분적으로 또는 완전히 결실된 아데노바이러스 유전자 부위에 삽입될 수 있다. 예를 들면, 상기 도입유전자는 특히 선택될 수 있는 기능적 E1 결실 및/또는 기능적 E3 결실(또는 E3B) 및/또는 전체 E3 결실 부위와 같은 부위에 위치할 수 있다. "기능적으로 결실된" 또는 "기능적 결실"이라는 용어는 충분한 양의 유전자 영역이 예를 들어, 돌연변이 또는 변형에 의해 제거되거나 손상되고, 따라서 유전자 영역은 더 이상 유전자 발현의 기능적 산물을 생산할 수 없다는 것을 의미한다. 원한다면, 전체 유전자 영역을 제거할 수도 있다. 한 구체예에서, 본 명세서에 따라 유용한 아데노바이러스 벡터는 유인원 아데노바이러스 SAd36로써, 이것은 E1 및 E3B 유전자에 결실을 갖고 있다. 한 측면에서, 상기 벡터는 전체 E3 결실을 포함한다. 한 측면에서, 상기 아데노바이러스 벡터는 서열 식별 번호: 4의 핵산 서열을 갖는다. 또다른 측면에서, 상기 아데노바이러스 벡터는 서열 식별 번호: 4와 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 갖는다.
- [0086] 예를 들면, 재조합 바이러스 생성에 유용한 벡터 생산을 위해, 상기 벡터는 상기 아데노바이러스 게놈의 5' 단부 또는 상기 아데노바이러스 게놈의 3' 단부, 또는 상기 아데노바이러스 게놈의 5' 단부 및 3' 단부 모두에 도입유전자를 함유할 수 있다. 상기 아데노바이러스 게놈의 5' 단부는 패키징 및 복제에 필요한 5' 시스(cis)-요소를 함유하는데, 가령, 5' 역전된 말단 반복(ITR) 서열 (복제 기점으로 기능함) 그리고 천연 5' 패키징 인핸서 도메인 (선형 Ad 게놈 패키징에 필요한 서열과 E1 프로모터에 대한 인핸서 요소가 포함되어 있음)을 함유한다. 상기 아데노바이러스 게놈의 3' 단부에는 패키징 및 캡슐화에 필요한 3' 시스-요소(ITR 포함)가 내포되어 있다. 적합하게는, 재조합 아데노바이러스는 5' 및 3' 아데노바이러스 시스-요소를 모두 함유하고, 도입유전자는 5' 및 3' 아데노바이러스 서열 사이에 위치한다. 유인원 기반의 아데노바이러스 벡터 (가령, SAdV-36)에는 추가 아데노바이러스 서열이 또한 함유될 수 있다.
- [0087] 적합하게는, 이들 유인원-기반 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 게놈으로부터 유래된 하나 또는 그 이상의 아데노바이러스 요소를 함유한다. 한 구체예에서, 상기 벡터들은 ITRs를 제공하는 아데노바이러스 혈청형과는 상이한 아데노바이러스로부터 유래된 아데노바이러스 서열을 함유한다. 본 명세서에 정의된 바와 같이, 위형(pseudotyped) 아데노바이러스는 아데노바이러스의 캡시드 단백질이 상기 ITRs를 제공하는 아데노바이러스와는 상이한 아데노바이러스로부터 유래된 아데노바이러스를 의미한다. 키메라 또는 하이브리드 아데노바이러스는 당업자에게 공지된 기술을 사용하여 본원에 기술된 아데노바이러스를 사용하여 구축될 수 있다. 가령, US 7,291,498 참고.
- [0088] 상기 도입유전자는 관심대상의 폴리펩티드, 단백질 또는 기타 생성물을 인코딩하는 도입유전자 측면의 벡터 서열과 이중성인 핵산 서열이다. 핵산 코딩 서열은 숙주 세포에서 도입유전자 전사, 해독 및/또는 발현을 허용하는 방식으로 조절 성분에 작동가능하게 연계된다.
- [0089] 일부 구체예들에서, 상기 도입유전자는 SARS-CoV-2 항원, 이를 테면, SARS-CoV-2 "S" 단백질의 안정화된 형태를 인코딩한다. 일부 구체예들에서, 도입유전자는 서열 식별 번호: 3의 코로나바이러스 스파이크 단백질 일부분 (또는 이의 면역원성 부분 또는 이의 변이체)에 대해 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 서열 동일성을 갖는 서열; 또는 K986P 및 V987P 돌연변이를 갖는 서열 식별 번호: 3; 또는 D614G 돌연변이를 갖는 서열 식별 번호: 3에 대해 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 서열 동일성을 갖는 서열을 보유하는 코로나바이러스 스파이크 단백질 (S) 단백질의 적어도 일부분 또는 면역원성 부분, 또는 이의 면역원성 단편 또는 이의 변이체를 인코딩한다. 일부 구체예들에서, 상기 도입유전자는 SARS-CoV-2 변이체의 스파이크 단백질을 인코딩하는데, 비-제한적인 예시에서, 서열 식별 번호: 3과 비교하여 D80G, I44del, F157S, L5F, T95I, A67V, S477N, I44del, Q677H, A701V, F888L, T791I, T859N, D950H, E484Q, D614G, E484K, N501Y, Δ69-70, L452R, 또는 K417N 또는 RBD E484K 돌연변이를 갖는 스파이크 단백질을 인코딩한다. 일부 구체예들에서, 상기 도입유전자는 WA1/2020, B.1.1.7, B.1.351, B.1.1.28, P.1, B.1.427, B.1.526, B.1.526.1, B.1.525, P.2, B.1.617, B.1.617.1, B.1.617.2, B.1.617.3, B.1.429, B.1.429, B.1.529 변이체로부터 스파이크 단백질을 인코딩한다. 상기 각 구체예에서, 상기 스파이크 단백질은 융합 전 안정화된 형태가 되도록 추가로 변형된다 (가령, 잔기 1050에서 1069

사이에, 또는 잔기 981에서 잔기 999 사이에 이중 프로린 치환을 갖는).

- [0090] 다수 스파이크 단백질 돌연변이를 갖는 변이체, 오미크론 (B.1.1.529)은 Botswana에서 처음으로 발견되었다. 특히, 일부 오미크론 변이체의 계통은 다음과 같은 돌연변이를 갖는 S 단백질질을 인코딩한다: A67V, Δ69-70, T95I, G142D/A143-145, A211/L212I, 214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493K, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, 및 L981F. 일부 구체예들에서, 이러한 예시적인 균주 및 기타 새로 출현하는 균주 (예를 들어, 추가 변종의 우려)는 본원에 개시된 방법 및 제형에 대한 후보가 된다. 이와 같이, 일부 구체예들에서, 본 명세서는 또한 오미크론 B.1.1.529 균주 또는 이의 변이체로부터 유래된 유전자도입된 안정화된 스파이크 단백질 서열을 포함하는 제조함 아테노바이러스 벡터를 포괄한다. 상기 오미크론 균주의 하위변이체들의 비-제한적인 예시에는 BA.1.1, BA.2, BA.3, BA.4, 및 BA.5가 내포된다. 예시적인 측면에서, 상기 BA.5 변이체는 다음 돌연변이를 보유할 수 있다: T19I, L24S, del125-27, 69-70del, G142D, V213G, G339D, S371F, S373P, S375F, T376A, K417N, N440K, S477N, T478K, E484A, Q493R, L452R, F486V, Q498R, N501Y, D614G, H655Y, N679K, P681H, R682G, R683S, R685S, N764K, D796Y, Q954H, N969K.
- [0091] 이와 같이, 일부 구체예들에서, 상기 도입유전자 핵산은 서열 식별 번호: 10에서 제공된 안정화된 SARS-CoV2-오미크론-스파이크 단백질 (SARS-CoV2-오미크론-S2P)을 인코딩하거나; 또는 서열 식별 번호: 10 (SARS-CoV-2-오미크론-S2P)에 대해 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 서열 동일성을 갖는 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 인코딩한다.
- [0092] 일부 구체예들에서, 상기 도입유전자 핵산은 서열 식별 번호: 11의 SARS-Cov2-오미크론-스파이크 단백질 (SARS-CoV-2-오미크론-S6P)를 인코딩하거나; 또는 서열 식별 번호: 11 (SARS-CoV2-오미크론-S6P)에 대해 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 서열 동일성을 갖는 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 인코딩한다.
- [0093] 일부 구체예들에서, 상기 도입유전자 핵산은 서열 식별 번호: 12의 SARS-Cov2-오미크론-스파이크 단백질 (SARS-CoV-2-오미크론-S6P δF)를 인코딩하거나; 또는 서열 식별 번호: 12 (SARS-CoV-2-오미크론-S6PdF)에 대해 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 서열 동일성을 갖는 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 인코딩한다.
- [0094] 일부 구체예들에서, 상기 도입유전자 핵산은 서열 식별 번호: 20의 SARS-Cov2-오미크론-스파이크 단백질 (SARS-CoV-2-오미크론-S6PdF)를 인코딩하거나; 또는 서열 식별 번호: 20 (이가 BA.5-S6PdF)에 대해 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 서열 동일성을 갖는 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 인코딩한다.
- [0095] 일부 구체예들에서, 상기 도입유전자 핵산은 서열 식별 번호: 21의 SARS-Cov2-오미크론-스파이크 단백질 (SARS-CoV-2-오미크론-S6P)를 인코딩하거나; 또는 서열 식별 번호: 21 (이가 BA.5-S6P)에 대해 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 서열 동일성을 갖는 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 인코딩한다.
- [0096] 일부 측면들에서, 상기 아테노바이러스 벡터는 핵산 서열 (도입유전자)을 포함하며, 이때 상기 핵산 서열은 서열 식별 번호: 3에 대해 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 인코딩하거나, 다음 돌연변이 T19I, L24S, del125-27, 69-70del, G142D, V213G, G339D, S371F, S373P, S375F, T376A, K417N, N440K, S477N, T478K, E484A, Q493R, L452R, F486V, Q498R, N501Y, D614G, H655Y, N679K, P681H, R682G, R683S, R685S, N764K, D796Y, A942P Q954H, N969K, K988P 및 V989P 중 적어도 5개, 또는 적어도 10개, 또는 적어도 15개, 또는 적어도 20개, 또는 적어도 25개, 또는 적어도 30개 또는 그 이상의 돌연변이를 포함하는 이의 변이체를 인코딩하고: F819P, A894P, A901P, A944P, K988P 및 V989P로 제공된 바와 같이, 적어도 2개, 또는 적어도 3개, 또는 적어도 4개, 또는 적어도 5개, 또는 6개의 안정화 돌연변이를 더 포함한다. 일부 측면들에서, 상기 아테노바이러스 벡터는 서열 식별 번호 3에

대해 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 동일한 단백질, 또는 F819P, A894P, A901P, A944P, K988P 및 V989P로 제공된 바와 같이, 적어도 2개, 또는 적어도 3개, 또는 적어도 4개, 또는 적어도 5개, 또는 6개의 안정화 돌연변이를 포함하는 서열 식별 번호: 10-11 및 20-21로 제공된 바의 오미크론 변이체들을 인코딩한다. Wuhan 서열에 대해 서열 식별 번호: 10, 11, 20, 21의 서열 정렬은 도 23에 제공된다.

[0097] 일부 구체예들에서, 본 명세서는 하나 이상의 코로나바이러스 스파이크 단백질 변이체 또는 이의 일부의 면역원성 단편을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 아데노바이러스 벡터를 포괄한다. 일부 구체예들에서, 본 명세서는 코로나바이러스 스파이크 단백질 (S) 단백질의 적어도 일부분 또는 면역원성 단편, 또는 서열 식별 번호: 3, 10, 11, 20, 또는 21에 대해 적어도 80% 동일한 서열을 갖는 이의 면역원성 단편 또는 이의 변이체를 인코딩하는 핵산 서열, 그리고 SARS-CoV2로부터 파생된 하나 또는 그 이상의 추가 단백질에 대해 약 80% 동일한 서열을 갖는 적어도 일부분 또는 면역원성 단편 또는 이의 변이체를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 아데노바이러스 벡터를 또한 포괄한다. 일부 측면들에서, 상기 하나 또는 그 이상의 추가 단백질은 비-구조적 단백질 1-16 (nsp1-16), S 단백질, 외피 (E), 막 (M) 그리고 뉴클레오캡시드 (N)가 내포된 구조 단백질, 그리고 11개 보조 단백질: ORF3a, ORF3b, ORF3c, ORF3d, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF9c 및 ORF10으로부터 선택될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 명세서는 코로나바이러스 스파이크 단백질 (S) 단백질의 적어도 일부분 또는 면역원성 단편, 또는 서열 식별 번호: 3, 10, 11, 20, 또는 21에 대해 적어도 80% 동일한 서열을 갖는 이의 면역원성 단편 또는 이의 변이체를 인코딩하는 핵산 서열, 그리고 바이러스, 예를 들면, 광견병, 홍역, RSV 또는 인플루엔자로부터 파생된 하나 또는 그 이상의 추가 단백질의 적어도 일부분 또는 면역원성 단편 또는 이의 변이체를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 아데노바이러스 벡터를 또한 포괄한다. 적합한 단백질의 예에는 인플루엔자 헤마글루티닌, 인플루엔자 핵 단백질, 인플루엔자 M2, 파상풍 독소 C 단편, 탄저병 보호 항원, 탄저병 치사 인자, 탄저병 발아 인자, 광견병 당단백질, HBV 표면 항원, HIV gp120, HIV gp160, 인간 암배아 항원, 말라리아 CSP, 말라리아 SSP, 말라리아 MSP, 말라리아 pfg, 보툴리눔 독소 A, 및 결핵균 HSP가 내포되지만, 이에 국한되지는 않는다. 일부 구체예에서, 상기 아데노바이러스 벡터는 2가, 3가 또는 다가 면역원성 단백질/단백질을 발현한다고 하며, 이때 하나 이상의 바이러스, 하나 이상의 SARS-CoV2 계통, 변이체, 하위 계통 또는 하위 변이체에 대해 면역 반응을 유도한다.

[0098] 일부 구체예들에서, 본 명세서는 또한 본 명세서에 개시된 바와 같은 S 단백질 서열을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 플라스미드 및 아데노바이러스 벡터들 (벡터)을 포함한다. 일부 측면들에서, 상기 핵산은 서열 식별 번호: 2, 서열 식별 번호: 5, 또는 서열 식별 번호: 6에 대해 적어도 80% 동일하다. 일부 구체예들에서, 상기 아데노바이러스 벡터 또는 플라스미드는 서열 식별 번호: 2, 5 또는 6에 대해 적어도 약 80% 동일한 핵산 서열을 포함하거나, 이로 구성된다. 일부 구체예들에서, 상기 핵산 서열은 서열 식별 번호: 2, 5 또는 6에 대해 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 동일성을 갖는다.

[0099] 한 구체예에서, 상기 벡터는 서열 식별 번호: 13에서 제공된 핵산 서열을 포함하거나, 이로 구성된다 (ChAd-S6PdF529). 일부 구체예들에서, 상기 벡터는 서열 식별 번호: 13에 대해 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하거나, 이로 구성된다. 일부 구체예들에서, 상기 핵산 서열은 서열 식별 번호: 13에 대해 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 동일성을 갖는다.

[0100] 일부 구체예들에서, 상기 벡터는 서열 식별 번호: 14에서 제공된 바와 같은 핵산 서열을 포함하거나 및/또는 이로 구성된다 (ChAd-S2P529). 일부 구체예들에서, 상기 벡터는 서열 식별 번호: 14에 대해 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하거나, 이로 구성된다. 일부 구체예들에서, 상기 핵산 서열은 서열 식별 번호: 14에 대해 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 동일성을 갖는다.

[0101] 일부 구체예들에서, 상기 벡터는 서열 식별 번호: 15에서 제공된 바와 같은 핵산 서열을 포함하거나 및/또는 이로 구성된다 (ChAd-S6P529). 일부 구체예들에서, 상기 벡터는 서열 식별 번호: 15에 대해 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하거나, 이로 구성된다. 일부 구체예들에서, 상기 핵산 서열은 서열 식별 번호: 15에 대해 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%,

98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 동일성을 갖는다.

[0102] 일부 구체예들에서, 상기 플라스미드는 서열 식별 번호: 16에서 제공된 핵산 서열을 포함하거나, 이로 구성되며 (pSAd36E3E1stS), 이때 상기 전체 E3 유전자는 결실된다. 일부 구체예들에서, 상기 벡터는 서열 식별 번호: 16에 대해 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하거나, 이로 구성된다. 일부 구체예들에서, 상기 핵산 서열은 서열 식별 번호: 16에 대해 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 동일성을 갖는다.

[0103] 일부 구체예들에서, 상기 벡터는 서열 식별 번호: 17에서 제공된 핵산 서열을 포함하거나, 이로 구성되며 (SAd36E3E1stS), 이때 상기 전체 E3 유전자는 결실된다. 일부 구체예들에서, 상기 벡터는 서열 식별 번호: 17에 대해 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하거나, 이로 구성된다. 일부 구체예들에서, 상기 핵산 서열은 서열 식별 번호: 17에 대해 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 동일성을 갖는다.

[0104] 일부 구체예들에서, 상기 벡터는 서열 식별 번호: 18에서 제공된 바와 같은 핵산 서열을 포함하거나 및/또는 이로 구성된다 (ChAd.BA.5-S6PdF). 일부 구체예들에서, 상기 벡터는 서열 식별 번호: 18에 대해 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하거나, 이로 구성된다. 일부 구체예들에서, 상기 핵산 서열은 서열 식별 번호: 18에 대해 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 동일성을 갖는다.

[0105] 일부 구체예들에서, 상기 벡터는 서열 식별 번호: 19에서 제공된 바와 같은 핵산 서열을 포함하거나 및/또는 이로 구성된다 (ChAd.BA.5-S6P). 일부 구체예들에서, 상기 벡터는 서열 식별 번호: 19에 대해 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하거나, 이로 구성된다. 일부 구체예들에서, 상기 핵산 서열은 서열 식별 번호: 19에 대해 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 99.9% 동일성을 갖는다.

[0106] 상기 도입유전자에 대해 위에서 확인된 주요 요소들 외에, 상기 벡터는 이 플라스미드 벡터로 형질감염되거나, 본 발명에 의해 생산된 바이러스로 감염된 세포에서 전사, 해독 및/또는 발현을 허용하는 방식으로 도입유전자에 작동 가능하게 연결된 기존의 제어 요소들이 또한 내포될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "작동가능하게 연결된" 서열에는 관심대상 유전자에 인접한 발현 제어 서열과, 관심대상 유전자에 트랜스(trans)로 작동하는, 또는 거리를 두고 있는 발현 제어 서열 모두가 내포되어 있다. 발현 조절 서열은 적절한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 인핸서 서열; 스플라이싱 및 폴리아데닐화 신호 (polyA)와 같은 효율적인 RNA 처리 신호; 세포질 mRNA를 안정화시키는 서열; 번역 효율을 향상시키는 서열 (예를 들어, Kozak 콘센스 서열); 단백질 안정성을 향상시키는 서열; 및 필요한 경우, 상기 인코딩된 산물의 분비를 향상시키는 서열을 포함한다.

[0107] 천연, 구성적, 유도성 및/또는 조직-특이적인 프로모터를 비롯한, 상당한 수의 발현 조절 서열이 당업계에 공지되어 있고 활용될 수 있다. 구성적 프로모터의 예시에는 레트로바이러스 Rous 육종 바이러스 (RSV) LTR 프로모터 (임의선택적으로 RSV 인핸서와 함께), 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터 (임의선택적으로 CMV 인핸서와 함께) [가령, Boshart *et al.*, Cell, 41:521-530 (1985) 참고], SV40 프로모터, 디하이드로폴레이트 환원효소 프로모터, β -액틴 프로모터, the 포스포글리세롤 키나아제 (PGK) 프로모터, 그리고 EF-1a 프로모터 [Invitrogen]가 내포되나, 이에 국한되지 않는다.

[0108] 유도성 프로모터는 유전자 발현의 조절을 허용하고, 외부적으로 공급된 화합물, 환경 요인, 이를 테면, 온도, 또는 특정 생리학적 상태 (가령, 급성기, 이들 세포의 특정 분화 상태의 존재 또는 오로지 복제 세포들에 의해 조절될 수 있다. 유도성 프로모터 및 유도성 시스템은 Invitrogen, Clontech 및 Ariad를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는 다양한 상업적 소스로부터 입수 가능하다. 많은 다른 시스템이 기술되어 있으며, 당업자들이 용이하게 선택할 수 있다. 예를 들면, 유도성 프로모터들에는 아연-유도성 양(sheep)의 메탈로티오닌 (MT) 프로모터 및 텍사메타손 (Dex)-유도성 마우스 유방 종양 바이러스 (MMTV) 프로모터가 내포된다. 기타 유도성 시스템에는 T7 중합효소 프로모터 시스템 [WO 98/10088]; 엑디손(ecdysone) 곤충 프로모터 [No *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351 (1996)], 테트라사이클론-억제성 시스템 [Gossen *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992)], 테트라사이클론-유도성 시스템 [Gossen *et al*, Science, 268:1766-1769

(1995), Harvey et al, Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518 (1998) 또한 참고]이 내포된다. 기타 시스템에는 FK506 이량체, 카스트라디올 VP 16 또는 p65, 디페놀 무리스레론, RU486-유도성 시스템 [Wang et al, Nat. Biotech., 15:239-243 (1997) 및 Wang et al, Gene Ther., 4:432-441 (1997)] 그리고 라파마이신-유도성 시스템 [Magari et al, J. Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997)]이 내포된다. 일부 유도성 프로모터들의 효과는 시간 경과에 따라 증가된다. 그러한 경우, 여러 억제 인자, 가령, IRES에 의해 TetR에 연결된 TetR를 삽입하여 해당 시스템의 효율성을 향상시킬 수 있다. 대안으로, 원하는 기능을 스크리닝하기 전, 적어도 3일을 기다릴 수도 있다. 이 시스템의 효율성을 향상시키기 위해, 공지된 수단을 통해 원하는 단백질의 발현을 향상시킬 수 있다. 예를 들면, Woodchuck 간염 바이러스 전사 후 조절 요소(WPRE)를 사용.

[0109] 또다른 구체예에서, 상기 도입유전자에 대한 고유 프로모터가 이용될 수 있다. 도입유전자의 발현이 고유한 발현을 모방해야 하는 것이 바람직할 경우, 고유 프로모터가 바람직할 수 있다. 상기 고유 프로모터는 도입유전자의 발현이 일시적으로나 발생적으로, 조직-특이적 방식으로, 또는 특정 전사적 자극에 반응하여 조절되어야 하는 경우, 사용될 수 있다. 추가 구체예에서, 기타 고유한 발현 제어 요소들, 이를 테면, 인핸서 요소, 폴리아데닐화 부위 또는 Kozak 컨센서스 서열을 사용하여 이러한 고유 발현을 모방할 수도 있다. 상기 도입유전자의 또 다른 구체예에는 조직-특이적 프로모터에 작동가능하도록 연계된 도입유전자가 내포된다. 예를 들면, 골 근육에서 발현을 원하는 경우라면, 근육에서 활성인 프로모터를 사용해야 한다. 여기에는 골격 β -액틴, 미오신 경쇄 2A, 디스트로핀, 근육 크레아틴 키나제를 코딩하는 유전자의 프로모터, 뿐만 아니라 자연 발생적 프로모터보다 더 높은 활성을 갖는 합성 근육 프로모터가 내포된다 (Li et al, Nat. Biotech., 17:241-245 (1999) 참고). 조직-특이적인 프로모터의 예시는 간에 대해 공지되어 있다 (알부민, Miyatake et al, J. Virol., 71:5124-32 (1997); 그중에서도 간염 B 바이러스 코어 프로모터, Sandig et al., Gene Ther., 3:1002-9 (1996); 알파-페토 단백질 (AFP), Arbuthnot et al, Hum. Gene Ther., 7:1503-14 (1996)), 뼈 오스테오칼신 (Stein et al, Mol. Biol. Rep., 24:185-96 (1997)); 뼈 시알로단백질 (Chen et al, J. Bone Miner. Res., 11:654-64 (1996)), 림프구 (CD2, Hansal et al, J. Immunol., 161: 1063-8 (1998); 면역글로불린 중쇄; T 세포 수용체 ζ), 신경성 이를 테면, 뉴론-특이적 에놀라제 (NSE) 프로모터 (Andersen et al, Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15 (1993)), 신경섬유 경-쇄 유전자 (Piccioli et al, Proc. Natl Acad. Sci USA, 88:561 1-5 (1991)), 그리고 신경-특이적 vgf 유전자 (Piccioli et al, Neuron, 15:373-84 (1995)). 임의선택적으로, 치료학적으로 유용하거나 면역원성인 산물을 인코딩하는 도입유전자를 운반하는 벡터에는 선택 가능한 마커가 포함될 수도 있고, 리포터 유전자에는 그중에서도 특히 제네티신, 하이그로마이신 또는 푸리마이신 내성을 코딩하는 서열이 내포될 수도 있다. 이러한 선택 가능한 리포터 또는 마커 유전자 (바람직하게는 바이러스 입자로 패키징될 바이러스 게놈 외부에 위치함)는 암피실린 내성과 같은 박테리아 세포 내 플라스미드의 존재를 알리는 데 사용될 수 있다. 상기 벡터의 다른 구성요소에는 복제 원점이 포함될 수 있다. 이들 프로모터 및 기타 프로모터, 그리고 벡터 요소들의 선택은 일반적이며, 이러한 많은 서열들이 이용가능하다 [가령, Sambrook et al, 및 본원에서 언급된 자료들 참고]. 이들 벡터는 당업자에게 공지된 기술과 함께, 본원에 제공된 기술 및 서열을 사용하여 생성된다. 이러한 기술에는 아데노바이러스 게놈의 중첩 올리고뉴클레오타이드 서열의 사용, 중합효소 연쇄 반응, 및 원하는 뉴클레오타이드 서열을 제공하는 임의의 적합한 방법을 이용하여, 텍스트에 설명된 것과 같은 cDNA의 기존 클로닝 기술이 포함될 수 있다 [Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY].

[0110] 일부 구체예들에서, 본 명세서는 개시된 재조합 아데노바이러스 벡터를 포함하는 바이러스-유사 입자(VLP)를 제공한다. VLPs에는 바이러스 복제에 필요한 바이러스 구성 요소가 부족하므로, 매우 약독화되고 복제가 불가능한 바이러스 형태를 나타낸다. 바이러스 유사 입자들 및 그 생산 방법은 당업자에게 공지되어 있고 익숙하며, 인간 유두종 바이러스, HIV (Kang et al., Biol. Chem. 380: 353-64 (1999)), Semliki-Forest 바이러스 (Notka et al., Biol. Chem. 380: 341-52 (1999)), 인간 폴리오마바이러스 (Goldmann et al., J. Virol. 73: 4465-9 (1999)), 로타바이러스 (Jiang et al, Vaccine 17: 1005-13 (1999)), 파르보바이러스 (Casal, Biotechnology and Applied Biochemistry, Vol 29, Part 2, pp 141-150 (1999)), 고양이 파르보바이러스 (Hurtado et al., J. Virol. 70: 5422-9 (1996)), 간염 E 바이러스 (Li et al, J. Virol. 71 : 7207-13 (1997)), 그리고 Newcastle 질화 바이러스를 비롯한 몇몇 바이러스의 바이러스 단백질이 VLP를 형성하는 것으로 알려져 있다. 이러한 VLPs의 형성은 임의의 적합한 기술에 의해 검출될 수 있다. 배지 내 VLPs 검출을 위한 당업계에 공지된 적합한 기술의 예시에는 가령, 전자현미경 기술, 동적 광산란(DLS), 선택적 크로마토그래피 분리 (가령, 이온 교환, 소수성 상호작용 및/또는 VLP의 크기 배제 크로마토그래피 분리) 및 밀도 구배 원심분리가 내포된다.

[0111] **b) 조성물의 구성요소들**

- [0112] 본 명세서는 약제학적 조성물을 또한 제공한다. 상기 약제학적 조성물은 활성 성분으로서 본 명세서의 아데노바이러스 조성물, 그리고 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함한다.
- [0113] 약제학적으로 허용되는 부형제는 희석제, 결합제, 충전제, 완충제, pH 조절제, 봉해제, 분산제, 보존제, 윤활제, 맛-차폐제, 향미제 또는 착색제일 수 있다. 약제학적 조성물을 형성하는데 사용되는 부형제의 양 및 유형은 공지된 제약 과학 원리에 따라 선택될 수 있다.
- [0114] 본원에 기술된 각각의 구체예들에서, 본 발명의 조성물은 본 명세서의 아데노바이러스 조성물 외에, 하나 또는 그 이상의 추가 약물 또는 치료 활성제를 선택적으로 포함할 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 요법에 추가하여, 바이러스 감염 치료에 효과적인 것으로 알려진 다른 요법을 대상체에게 제공할 수도 있다. 일부 구체예들에서, 상기 2차 제제는 코르티코스테로이드, 비스테로이드성 항염증 약물(NSAID), 정맥내 면역글로불린, 키나제 억제제, 융합 또는 재조합 단백질, 단클론 항체, 또는 이들의 조합으로부터 선택된다. 일부 구체예들에서, 병용 요법에 적합한 제제에는 흡입 기관지 확장제 및 흡입 스테로이드가 내포되지만, 이에 국한되지는 않는다.
- [0115] (i) 희석제
- [0116] 한 구체예에서, 상기 부형제는 희석제일 수 있다. 상기 희석제는 압축 가능 (즉, 가소성 변형가능)하거나 마모되기 쉬울 수 있다. 적합한 압축성 희석제의 비-제한적인 예시에는 미정질 셀룰로오스(MCC), 셀룰로오스 유도체, 셀룰로오스 분말, 셀룰로오스 에스테르(즉, 아세테이트 및 부티레이트 혼합 에스테르), 에틸 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 히드록시프로필 셀룰로오스, 히드록시프로필 메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨, 옥수수 전분, 인산화된 옥수수 전분, 젤라틴화된 옥수수 전분, 쌀 전분, 감자 전분, 타피오카 전분, 전분-유당, 전분-탄산칼슘, 전분 글리콜산나트륨, 포도당, 과당, 유당, 유당 일수화물, 자당, 자일로스, 락티톨, 만니톨, 말리톨, 소르비톨, 자일리톨, 말토덱스트린, 트레할로스가 내포된다. 적합한 마모성 취성 희석제의 비-제한적 예시에는 이염기성 인산칼슘(무수 또는 이수화물), 삼염기성 인산칼슘, 탄산칼슘 및 탄산마그네슘이 내포된다.
- [0117] (ii) 결합제
- [0118] 또다른 구체예에서, 상기 부형제는 결합제일 수 있다. 적합한 결합제에는 전분, 전젤라틴화 전분, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 폴리아크릴아미드, 폴리비닐옥소아졸리돈, 폴리비닐알코올, C12-C18지방산 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리올, 당류, 올리고당, 폴리펩티드, 올리고펩티드 및 이들의 조합이 내포되나, 이에 국한되지 않는다.
- [0119] (iii) 충전제
- [0120] 또다른 구체예에서, 상기 부형제는 충전제일 수 있다. 적합한 충전제에는 탄수화물, 무기 화합물 및 폴리비닐피롤리돈이 내포되지만, 이에 국한되지는 않는다. 비-제한적인 예시로서, 상기 충전제는 이염기성 및 삼염기성 황산칼슘 전분, 탄산칼슘, 탄산마그네슘, 미세결정성 셀룰로오스, 이염기성 인산칼슘, 탄산마그네슘, 산화마그네슘, 규산칼슘, 활석, 변성 전분, 유당, 수크로스, 만니톨, 아니면 소르비톨일 수 있다.
- [0121] (iv) 완충제
- [0122] 여전히 또다른 구체예에서, 상기 부형제는 완충제일 수 있다. 적합한 완충제들의 대표적인 예시에는 인산염, 탄산염, 구연산염, 트리스 완충제 및 완충 식염수 (가령, Tris 완충 식염수 또는 인산염 완충 식염수)가 내포되나, 이에 국한되지 않는다.
- [0123] (v) pH 조절제
- [0124] 다양한 구체예들에서, 상기 부형제는 pH 조절제일 수 있다. 비-제한적인 예시로서, 상기 pH 조절제는 탄산나트륨, 중탄산나트륨, 구연산나트륨, 구연산 또는 인산일 수 있다.
- [0125] (vi) 봉해제
- [0126] 추가 구체예에서, 상기 부형제는 봉해제일 수 있다. 상기 봉해제는 비-발포성 또는 발포성일 수 있다. 비-발포성 봉해제의 예시에는 전분 이룰 테면, 옥수수 전분, 감자 전분, 전호화 및 변성 전분, 감미제, 점토 이룰 테면, 벤토나이트, 미결정셀룰로오스, 알지네이트, 전분글리콜산나트륨, 검 이룰 테면, 한천, 구아, 로커스트콩, 카라야, 페시틴, 트라카칸스가 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 적합한 발포성 봉해제의 비-제한적인 예로는 구연산과 복합된 중탄산 나트륨 및 타르타르산과 복합된 중탄산 나트륨이 내포된다.

- [0127] (vii) 분산제
- [0128] 또다른 구체예에서, 상기 부형제는 분산제 또는 분산 강화제일 수 있다. 적합한 분산제에는 전분, 알긴산, 폴리비닐피롤리돈, 구아 검, 카올린, 벤토나이트, 정제 목재 셀룰로오스, 전분 글리콜산 나트륨, 이소정질 규산염 및 미결정 셀룰로오스가 내포되나, 이에 국한되지 않는다.
- [0129] (viii) 부형제
- [0130] 또다른 대체 구체예에서, 상기 부형제는 보존제일 수 있다. 적합한 보존제의 비-제한적인 예에는 항산화제, 이를 테면, BHA, BHT, 비타민 A, 비타민 C, 비타민 E 또는 레티닐 팔미테이트, 구연산, 구연산나트륨; 킬레이트 이를 테면, EDTA 또는 EGTA; 그리고 향균제, 이를 테면, 파라벤, 클로로부탄올 또는 페놀이 내포된다.
- [0131] (ix) 윤활제
- [0132] 추가 구체예에서, 상기 부형제는 윤활제일 수 있다. 적합한 윤활제의 비-제한적인 예시에는 미네랄 이를 테면, 활석 또는 실리카 및 지방 이를 테면, 식물성 스테아린, 스테아르산마그네슘, 스테아르산이 내포된다.
- [0133] (x) 맛-차폐제
- [0134] 여전히 또다른 구체예에서, 상기 부형제는 맛-차폐제일 수 있다. 맛-차폐 물질에는 셀룰로오스 에테르; 폴리에틸렌 글리콜; 폴리비닐알코올; 폴리비닐 알코올 및 폴리에틸렌 글리콜 공중합체; 모노글리세리드 또는 트리글리세리드; 아크릴 중합체; 아크릴 중합체와 셀룰로오스 에테르의 혼합물; 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트; 및 이들의 조합이 내포된다.
- [0135] (xi) 풍미제
- [0136] 대체 구체예에서, 상기 부형제는 풍미제일 수 있다. 풍미제는 합성 향유 및 향료 방향족 및/또는 천연 오일; 식물, 잎, 꽃 및 과일 추출물; 및 이들의 조합에서 선택될 수 있다.
- [0137] (xii) 발색제
- [0138] 여전히 추가 구체예에서, 상기 부형제는 발색제일 수 있다. 적합한 착색제에는 식품, 의약품 및 화장품 색소 (FD&C), 의약품 및 화장품 색소 (D&C), 또는 외용약 및 화장품 색소 (Ext. D&C)가 내포되지만, 이에 국한되지는 않는다.
- [0139] (xiii) 어쥬번트
- [0140] 여전히 추가 구체예에서, 상기 제형은 어쥬번트를 포함할 수 있다. 어쥬번트는 적용된 항원 결정기에 대한 면역 반응을 추가로 증가시키는 것으로 당업계에 알려져 있고, 아데노바이러스 및 적합한 어쥬번트를 포함하는 약제학적 조성물은 예를 들면, WO 2007/110409 (본원의 참고자료에 편입됨)에 개시되어 있다. 적합한 어쥬번트의 예시에는 알루미늄 염 이를 테면, 수산화알루미늄 및/또는 인산 알루미늄; 스쿠알렌-물 에멀전을 비롯한 오일-에멀전 조성물 (또는 수중유 조성물), 이를 테면, MF59 (가령, WO 90/14837 참고); 사포닌 제형, 이를 테면, 예를 들면 QS21 및 면역자극 복합체 (ISCOMS); 박테리아성 또는 미생물 유도체들, 이의 예시로는 모노포스포릴 지질 A (MPL), 3-O-데아실화된 MPL (3dMPL), CpG-모티프 함유하는 올리고뉴클레오타이드, ADP-리보실화 박테리아 독소 또는 이의 돌연변이체, 이를 테면, 대장균 열 불안정 엔테르톡신 LT, 콜레라 독신 CT, 및 이와 유사한 것들이 내포된다. 벡터-인코딩된 어쥬번트를 사용하는 것도 가능한데, 가령, C4-결합 단백질 (C4 bp)의 올리고머화 도메인을 관심대상 항원에 융합시킨 융합체를 인코딩하는 이중성 핵산을 사용함으로써 가능하다. 특정 구체예들에서, 본 발명의 조성물은 알루미늄을 어쥬번트로서, 예를 들어 수산화알루미늄, 인산알루미늄, 인산알루미늄칼륨, 또는 이들의 조합의 형태가 포함되며, 분량투여 당 알루미늄 함량은, 0.05-5 mg, 예를 들면, 0.075-1.0 mg 농도이다.
- [0141] 상기 조성물 중 부형제 또는 부형제들 조합의 중량 분율은 이 조성물의 총 중량의 약 99% 또는 그 미만, 약 97% 또는 그 미만, 약 95% 또는 그 미만, 약 90% 또는 그 미만, 약 85% 또는 그 미만, 약 80% 또는 그 미만, 약 75% 또는 그 미만, 약 70% 또는 그 미만, 약 65% 또는 그 미만, 약 60% 또는 그 미만, 약 55% 또는 그 미만, 약 50% 또는 그 미만, 약 45% 또는 그 미만, 약 40% 또는 그 미만, 약 35% 또는 그 미만, 약 30% 또는 그 미만, 약 25% 또는 그 미만, 약 20% 또는 그 미만, 약 15% 또는 그 미만, 약 10% 또는 그 미만, 약 5% 또는 그 미만, 약 2%, 또는 약 1% 또는 그 미만일 수 있다.
- [0142] 본원에 기재된 제제 및 조성물은 예를 들어, 예를 들면, Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro,

Ed.), 21st edition, ISBN: 0781746736 (2005)(본원에 이의 전문이 참고자료에 통합됨)에 기재된 바와 같이, 하나 또는 그 이상의 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 사용하여 임의의 통상적인 방식으로 제형화될 수 있다. 이러한 제형은 대상체에게 적절한 투여를 위한 형태를 제공하기 위해 적합한 양의 담체와 함께 정제된 형태일 수 있는 본원에 기재된 생물학적 활성제의 치료적 유효량을 함유할 것이다.

[0143] 용어 "제형"은 인간과 같은 대상체에게 투여하기에 적합한 형태로 약물을 제조하는 것을 의미한다. 따라서, "제형"에는 희석제 또는 담체를 포함하는 제약 상 허용되는 부형제가 내포될 수 있다.

[0144] 본원에 사용된 용어 "약제학적으로 허용되는"이란 허용할 수 없는 약리학적 활성 손실 또는 허용할 수 없는 부작용을 유발하지 않는 물질 또는 성분을 말한다. 약제학적으로 허용되는 성분들의 예들은 미국 약전(USP 29) 및 National Formulary (NF 24), United States Pharmacopeial Convention, Inc, Rockville, Maryland, 2005 ("USP/NF")에 모노그래프를 갖는 것들, 또는 좀더 최근 버전, 그리고 FDA의 지속적으로 업데이트되는 Inactive Ingredient Search 온라인 데이터베이스에 나열된 구성 요소들이 될 수 있다. USP/NF 등에 설명되지 않은 다른 유용한 구성 요소도 사용할 수 있다.

[0145] 본원에서 사용되는 용어 "약제학적으로 허용되는 부형제"란 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 향균 및 항진균제, 등장성 또는 흡수 지연제를 포함할 수 있다. 약제학적 활성 물질에 대한 이러한 매질 및 제제의 사용은 당업계에 잘 알려져 있다 (일반적으로 Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 21st edition, ISBN: 0781746736 (2005) 참고). 상기 활성 성분과 양립할 수 없는 임의의 통상적인 매질 또는 물질을 제외하고, 상기 치료요법적 조성물에 사용이 고려된다. 보충 활성 성분 또한 상기 조성물에 혼합될 수 있다.

[0146] "안정한" 제형 또는 조성물은 적어도 약 1 일, 약 1 주 이상, 약 1 개월 이상, 약 3 개월 이상, 약 6 개월 이상, 약 1 년 이상, 또는 약 2 년 이상과 같은 상업적으로 합리적인 시간 동안 약 0℃ 내지 약 60℃와 같은 편리한 온도에서 보관할 수 있도록 충분한 안정성을 갖는 조성물을 지칭할 수 있다.

[0147] 상기 제형은 투여 방식에 맞아야 한다. 본 명세서와 함께 사용되는 제제는 비경구, 폐, 경구, 국소, 점막, 피내 (intradermal), 근육 내, 복강 내, 정맥 내, 피하, 비강내, 경막외, 안과, 볼 및 직장을 포함하나, 이에 국한되지 않는 여러 경로를 사용하여 대상체에게 투여하기 위한 공지된 방법에 의해 제형화될 수 있다. 개별 제제는 또한 하나 또는 그 이상의 추가 제제와 함께 또는 다른 생물학적 활성 또는 생물학적 불활성 제제와 함께 투여될 수 있다. 이러한 생물학적 활성 또는 불활성 제제는 제제(들)와 유체 또는 기계적으로 소통하거나 이온, 공유, 반데르 발스, 수소성, 친수성 또는 기타 물리적 힘에 의해 제제(들)에 부착될 수 있다.

[0148] 일부 측면들에서, 본 명세서는 비강 전달용 제형을 포괄한다. 비강내 전달용 조성물을 포함하는 제형은 생리학적 산성인 비강 pH에 상응하는 pH를 가질 수 있다. 생리학적으로 산성인 비강 pH는 비강 점막 기능이 손상 여부에 따라 달라질 수 있다. 조성물의 pH는 약 6.5 ± 0.5 (5.9 내지 7.3) 또는 약 6.7 ± 0.6 (5.3 내지 7.6)일 수 있다. 조성물의 pH는 약 3.8-7.7 (평균 $\pm$ SD 5.7 ± 0.9)일 수 있다. 비강 전달용 조성물은 약산성 범위일 수 있다. 상기 평균 pH는 pH 5.7의 산성일 수 있다.

[0149] 비강내 투여를 통한 치료제의 효과적인 전달은 점액층의 당단백질과의 결합으로 인한 약물 손실 외에도, 비강 점막의 보호 점액 내층을 통한 수송 속도의 감소를 고려해야 한다. 정상 점액은 물, 전해질, 점액, 거대분자 및 벗겨진 상피 세포로 구성된 점탄성의 젤-유사 물질이다. 이는 주로 밑에 있는 점막 조직을 보호하는 윤활성 덮개 역할을 한다. 점액은 비강 상피와 다른 점막 상피에 위치한 무작위로 분포된 분비 세포에 의해 분비된다. 점액의 구조 단위는 뮤신(mucin)이다. 이 당단백질은 주로 점액의 점탄성 특성을 담당하지만, 다른 거대분자도 이 특성에 기여할 수 있다. 기도 점액에서, 이러한 거대분자들은 국소적으로 생성된 분비성 IgA, IgM, IgE, 리소자임 및 기관지트랜스페린을 포함하며, 이는 또한 숙주 방어 기전에서 중요한 역할을 한다.

[0150] 본 명세서의 통합 투여 방법은 선택적으로 효과적인 점액 용해제 또는 점액 제거제들이 통합되어 있으며, 이들은 비강 내로 투여된 생물치료제의 흡수 및/또는 흡착을 촉진하기 위해 비강 내 점막 표면의 점액을 분해하고 물게 하거나 깨끗하게 만드는 역할을 한다. 이들 방법 내에서, 점액 용해제 또는 점액-제거제는 생물학적 활성제의 비강내 전달을 향상시키기 위해 보조 화합물로서 공동으로 투여된다. 대안적으로, 점액 용해제 또는 점액-제거제의 유효량은 본 발명의 다중-처리 방법 내에서 프로세싱 물질로서, 또는 본 발명의 조합 제형 내에서 첨가제로서 통합되어, 비강 내 점액의 장벽 효과를 감소시켜 바이오치료제 화합물의 비강 내 전달을 향상시키는 개선된 제형을 제공한다.

[0151] 다양한 점액 용해제 또는 점액-제거제가 본 발명의 방법 및 조성물 내에 혼입될 수 있다. 작용 메커니즘에 따라

점액 용해제 및 점액 제거제는 종종 다음 그룹으로 분류될 수 있다: 뮤신 당단백질의 단백질 코어를 절단하는 프로테아제(가령, 프로나제, 파파인); 점액단백질 이황화물 링키지를 분리하는 설프히드릴 화합물; 및 점액 내의 비공유 결합을 파괴하는 세제(가령, Triton X-100, Tween 20). 이러한 맥락에서 추가 화합물에는 담즙염 및 계면활성제, 예를 들어 나트륨 데옥시콜레이트, 나트륨 타우로데옥시콜레이트, 나트륨 글리코콜레이트 및 리소포스파티딜콜린이 내포되지만, 이에 국한되지는 않는다.

[0152] 점액의 구조적 분해를 일으키는 담즙염의 효과는 데옥시콜레이트>타우로콜레이트>글리코콜레이트의 순서다. 본 발명의 방법에 따라 점액 점도 또는 점착을 감소시켜 비강내 전달을 향상시키는 기타 효과적인 제제에는 가령, 단쇄-지방산, 그리고 킬레이트화 작용을 하는 점액 용해제, 이를 테면, N-아실콜라겐 펩티드, 담즙산 및 사포닌(후자는 점액층 구조를 유지하는 데 중요한 역할을 하는 Ca^{2+} 및/또는 Mg^{2+} 를 킬레이트화하여 부분적으로 기능한다)이 내포된다.

[0153] 본 발명의 방법 및 조성물에 사용하기 위한 추가 점액 용해제에는 기관지폐 점액의 점도와 부착을 모두 감소시키는 강력한 점액 용해제인 N-아세틸-L-시스테인(ACS)이 내포되며, 마취된 마우스에서 인간 성장 호르몬의 비강 생체 이용률을 약간 증가(7.5에서 12.2%로의 증가)시키는 것으로 보고되고 있다. 이들 및 기타 점액 용해제 또는 점액 제거제는 비강 내 점액의 극성 점도 및/또는 탄력성을 감소시키기 위해 생물학적 활성제의 투여와 함께 일반적으로 약 0.2 내지 20mM의 농도 범위로 비점막과 접촉된다.

[0154] 또 다른 점액 용해제 또는 점액-제거제는 글리코시다제 효소 범위에서 선택될 수 있으며, 이들은 점액 당단백질 내의 글리코시드 결합을 절단할 수 있는데, 이러한 종류의 효소로 대표적으로 α -아밀라제 및 β -아밀라제가 있으며, 이들의 점액 용해 효과는 제한적일 수는 있다. 대조적으로, 이들 미생물이 숙주의 점액층에 침투할 수 있게 하는 박테리아 글리코시다제.

[0155] 본 명세서 내의 아데노바이러스 조성물과의 조합 사용의 경우, 비-이온성 세제는 일반적으로 점액 용해제 또는 점액-제거제로서 유용하다. 이들 세제는 일반적으로 아데노바이러스 조성물의 활성을 변형하거나 실질적으로 손상시키지 않는다.

[0156] c) 투여

[0157] (i) 투약형

[0158] 상기 조성물은 다양한 투여 형태로 제제화될 수 있고, 치료 유효량의 활성 성분을 전달하는 다수의 다양한 수단에 의해 투여될 수 있다. 이러한 조성물은 원하는 바에 따라, 기존의 무독성 약학적으로 허용되는 담체, 보조제 및 운반체를 함유하는 단위 투약형으로 적합한 경로, 예를 들어 경구, 비경구, 폐, 국소, 점막, 피내, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하, 비강내, 경막외, 안구, 협측 및 직장을 통해 투여될 수 있다. 국소 투여에는 경피 투여 장치, 이를 테면, 경피 패치 또는 이온삼투 장치의 사용이 관계될 수도 있다. 본원에서 사용되는 용어 비경구(parenteral)에는 피하 주사, 정맥 내, 근육 내, 관절-내 또는 대장-내 주사 또는 주입 기술이 포함된다. 약물 제형은 예를 들면, Gennaro, A. R., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. (18th ed, 1995), 및 Liberman, H. A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker Inc., New York, N.Y. (1980)에서 논의된다. 특정 구체예에서, 조성물은 식품 보충제일 수 있거나 조성물은 화장품일 수 있다.

[0159] 비경구 투여(피하, 안구내, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내 및 복강내 포함)의 경우, 이런 조성물은 수성-용액 또는 유성-용액일 수 있다. 수용액에는 멸균 회석제, 이를 테면, 물, 식염수, 약학적으로 허용되는 폴리올 이를 테면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 또는 기타 합성 용매; 향균 및/또는 항진균제 이를 테면, 벤질알코올, 메틸파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 티메로살 및 이와 유사한 것들; 항산화제 이를 테면, 아스코르브산 또는 중아황산나트륨; 킬레이팅제 이를 테면, 에틸렌디아민테트라아세트산; 완충제 이를 테면, 아세트산염, 구연산염 또는 인산염; 및/또는 장성조절제 이를 테면, 염화나트륨, 포도당, 또는 폴리알코올 이를 테면, 만니톨 또는 솔비톨이 내포될 수 있다. 상기 수성 용액의 pH는 염산 또는 수산화 나트륨과 같은 산 또는 염기로 조절될 수 있다. 유성-용액 또는 현탁액은 참깨, 땅콩, 올리브 오일 또는 미네랄 오일을 추가로 포함할 수 있다. 상기 조성물은 단위-투여분량 또는 다중-투여분량, 예를 들면, 밀봉된 용기에 제공될 수 있는데, 예를 들면, 앰플 및 바이알은 사용 직전에 멸균 액체 운반체, 가령, 주사용 물의 첨가만을 필요로 하는 냉동-건조된(동결건조된) 상태로 저장될 수 있다. 즉석 주사 용액 및 현탁액은 멸균 분말, 과립 및 정제로 제조할 수 있다.

[0160] 비강 또는 호흡기(점막) 투여가 필요한 경우, 조성물은 형태로 있을 수 있으며 압착 스프레이 디스펜서, 펌프 디스펜서 또는 에어로졸 디스펜서에 의해 분배될 수 있다. 이러한 디스펜서는 또한 조성물을 구강 또는 구강

(예를 들어 협착 또는 설착) 점막, 비강으로 전달하는데 사용될 수 있다. 에어로졸은 일반적으로 탄화수소에 의해 압력 하에 있다. 펌프 디스펜서는 바람직하게는 계량된 용량 또는 특정 입자 크기를 갖는 용량을 분배할 수 있다.

[0161] 특정 구체예들에서, 본 명세서에서 개시된 벡터 조성물은 예를 들면, 약학적으로 허용되는 완충제, 담체, 부형제 및/또는 어쥬번트와 함께 단일 투여용 조성물로 제형화되어, 예를 들어, 혼합되어 대상체에게 동시에 함께 투여한다. 다른 구체예들에서, 상기 벡터 및 단백질은 예를 들면, 약학적으로 허용되는 완충제, 담체, 부형제 및/또는 어쥬번트와 함께, 별개 조성물로 제형화되고, 24 시간 이내, 이를 테면, 12 시간, 10 시간, 8 시간, 6 시간, 4 시간, 2 시간, 또는 1 시간 또는 그 미만의 시간 내에 별개 조성물로 대상체에게 투여된다.

[0162] 일반적으로, 아데노바이러스 조성물의 안전하고, 효과적인 양은, 예를 들어, 원하지 않는 부작용을 최소화하면서 대상체에게 원하는 치료 효과를 유발할 수 있는 양이다. 다양한 구체예들에서, 본원에 기술된 아데노바이러스 조성물의 효과량은 바이러스 감염을 앓고 있는 대상체에서 바이러스 감염성을 실질적으로 감소시킬 수 있다. 일부 구체예들에서, 효과량은 호흡기 바이러스 감염을 치료할 수 있는 양이다. 일부 구체예들에서, 효과량은 호흡기 바이러스 감염과 연관된 하나 또는 그 이상의 증상을 치료할 수 있는 양이다.

[0163] 단일 투약형을 만들기 위해 약제학적으로 허용되는 담체와 복합될 수 있는 본원에 기술된 조성물의 양은 치료될 숙주 및 특정 투여 방식에 따라 가변적일 것이다. 각 투여 형태의 개별 용량에 함유된 제제의 단위 함량은 필요한 치료적 유효량은 다수의 투여에 의해 도달될 수 있기 때문에, 그 자체로 치료적 유효량을 구성할 필요가 없다는 것을 당업자는 알 수 있을 것이다.

[0164] 상기 아데노바이러스 벡터의 용량은 주로 치료되는 상태, 환자의 나이, 체중 및 건강과 같은 요인에 따라 달라질 것이며, 따라서 환자마다 가변적이다. 예를 들면, 상기 바이러스 벡터의 치료요법적으로 효과적인 성인 인간 또는 성체 동물의 용량은 일반적으로 약 1×10^6 내지 약 1×10^{15} 입자, 약 1×10^7 내지 1×10^{13} 입자, 또는 약 1×10^9 내지 1×10^{12} 입자 바이러스 농도를 함유하는 담체 약 100 μ L 내지 약 100 mL의 범위다. 용량은 동물의 신체 크기와 투여 경로에 따라 달라질 것이다. 예를 들면, 근육내 주사를 위한 적합한 인간 또는 동물의 용량 (약 80 kg의 동물)은 단일 부위에 투여용으로 mL 당 약 1×10^9 내지 약 5×10^{12} 입자다. 선택적으로, 여러 투여 부위로 전달될 수 있다. 또다른 예시에서, 적합한 인간 또는 동물의 용량은 경구 제형의 경우 약 1×10^{11} 내지 약 1×10^{15} 입자일 수 있다. 당업자는 투여 경로에 따라, 그리고 해당 재조합 벡터가 사용되는 치료 또는 백신 적용에 따라 이들 용량을 조정할 수 있다. 상기 도입유전자의 발현 수준, 또는 면역원의 경우 순환 항체의 수준을 모니터링하여 투여량 투여 빈도를 결정할 수 있다. 투여 빈도의 시기를 결정하는 또 다른 방법들은 당업자에게 쉽게 명백할 것이다.

[0165] 선택적인 방법 단계는 바이러스 벡터의 투여와 동시에, 또는 투여-전 또는 투여-후, 해당 환자에게 적합한 양의 단기-작용성 면역 조절제를 공동-투여하는 것과 관련된다. 선택된 면역 조절제는 본원에서 본 발명의 재조합 벡터에 대한 중화 항체의 형성을 억제할 수 있거나 벡터의 세포용해성 T 림프구 (CTL) 제거를 억제할 수 있는 제제로 정의된다. 상기 면역 조절제는 T 헬퍼 서브세트 (T_H 또는 T^+)와 B 세포 사이의 상호작용을 방해하여, 중화 항체 형성을 억제할 수 있다. 대안적으로, 면역 조절제는 T_H 세포와 CTLs 사이의 상호작용을 억제하여, 벡터의 CTL 제거 발생을 감소시킬 수 있다. 다양한 유용한 면역 조절제 및 이의 사용을 위한 용량이 예를 들면, Yang et al., J. Virol., 70(9) (Sept., 1996); International Patent Application Publication No. WO 96/12406 (1996년 5월2일 공개됨); 및 국제 특허 출원 번호 PCT/US96/03035에서 기술되어 있다(이들 모두 본원의 참고자료에 편입됨).

[0166] 임의의 특정 대상체에 대해 특이적 치료요법적 효과 용량 수준은 치료될 장애 및 이 장애의 중증도; 이용되는 특정 화합물의 활성; 이용되는 특이적 조성물; 대상체의 연령, 체중, 전반적인 건강, 성별 및 식이; 투여 시간; 투여 경로; 이용되는 조성물의 배출율; 치료 기간; 이용되는 특정 화합물과 조합 또는 동시에 이용되는 약물; 그리고 의료 분야에 공지된 유사한 인자들을 비롯하여 다양한 인자들에 따라 달라질 것이다 (가령, Koda-Kimble et al. (2004) Applied Therapeutics: The Clinical Use of Drugs, Lippincott Williams & Wilkins, ISBN 0781748453; Winter (2003) Basic Clinical Pharmacokinetics, 4th ed., Lippincott Williams & Wilkins, ISBN 0781741475; Sharqel (2004) Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics, McGraw-Hill/Appleton & Lange, ISBN 0071375503 참고). 예를 들면, 당업자는 원하는 치료 효과를 달성하고, 원하는 효과가 달성 될 때까지 점차적으로 복용량을 증가시키기 위해 필요한 것보다 낮은 수준에서 조성물의 투여 용량을 시작할 수 있다. 원할

경우, 효과적인 일일 용량은 투여 목적을 위해 다중 투여 용량으로 나눌 수 있다. 결과적으로, 단일 용량 조성물은 일일 용량을 구성하기 위해 이러한 양 또는 이의 준-다중용량을 함유할 수 있다. 그러나, 본원에 개시된 바와 같이, 본 명세서의 화합물 및 조성물의 총 일일 사용량은 건전한 의학적 판단의 범위 내에서 담당 의사에 의해 결정될 것임을 이해할 것이다.

[0167] 바이러스 조성물의 투여는 단일 사건으로 실행되거나, 또는 치료 기간에 걸쳐 실시될 수 있다. 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 나노입자 조성물이 매일, 매주, 격주 또는 매달 투여될 수 있다. 급성 병태의 치료를 위해, 치료 시간은 보통 최소 몇 일이 될 수 있다. 특정 병태는 치료를 며칠에서 몇 주로 연장할 수 있다. 예를 들면, 치료는 1 주, 2 주 또는 3 주에 걸쳐 연장될 수 있다. 더 만성적인 병태의 경우, 치료는 몇 주에서 몇 달 또는 1 년 이상으로 연장될 수 있다.

[0168] 본원에 기술된 방법에 따른 치료는 호흡기 바이러스에 대한 전통적인 치료 방식 이전, 이후, 그와 동시에 수행될 수 있다.

[0169] 본 명세서는 활성제의 투여를 촉진하고, 안정성을 촉진시키기 위해, 상기 기술된 화합물들을 포함하는 약제학적 조성물을 포괄한다. 예를 들면, 본 명세서의 화합물은 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 혼합되어, 적합한 대상체 이를 테면, 살아있는 대상체(즉, "치료를 요하는 대상체", 또는 "이를 필요로 하는 대상체")에게 능력 있고, 효과적으로 투여(제공)되는 약제학적 조성물을 만들 수 있다. 본 발명의 측면들과 구체예의 목적을 위해, 상기 대상체는 인간 또는 임의의 다른 동물일 수 있다.

[0170] III. 방법

[0171] 본 명세서는 바이러스의 감염성 또는 전파를 치료, 예방 또는 감소를 필요로 하는 대상체에서 이를 실행시키는 방법을 포괄한다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 상기 대상체의 세포 내로의 바이러스의 내재화를 방지하거나, 상기 대상체의 세포 내로의 바이러스 계놈의 내재화를 방지함으로써 바이러스 감염의 감염성을 예방하거나 감소시킨다. 일부 구체예들에서, 섹션 II에서 기술된 용도로 본 명세서에서 제공된 조성물을 투여하면 바이러스 표면 단백질 (가령, 스파이크 단백질 또는 외피 단백질) 및 숙주 수용체 단백질 (가령, 상위 안지오텐신 전환 효소 (ACE)) 사이의 상호 작용을 방해하거나, 방지하는 면역 반응을 대상에서 생성할 수 있다. 바이러스 감염 위험이 있는 대상체에게 본 개시의 조성물을 투여하는 것은 대상체에서 코로나바이러스 감염 위험을 감소시킬 수 있다.

[0172] 개시된 조성물은 상기 대상체에서 상응하는 코로나바이러스 스파이크 단백질에 대한 면역 반응을 유도하기 위해 대상에게 투여될 수 있다. 특정 실시예에서, 상기 대상체는 인간이다. 상기 면역 반응은 보호 면역 반응, 예를 들어, 상응하는 코로나바이러스에 의한 후속 감염을 억제하는 반응일 수 있다. 면역 반응의 유도는 해당 코로나바이러스와 관련된 감염 및 질환의 치료 또는 억제에 사용될 수 있다.

[0173] 예를 들어, 코로나바이러스에 대한 노출 또는 노출 가능성 때문에, 면역원의 S 단백질에 해당하는 코로나바이러스에 감염되었거나, 감염될 위험이 있는 대상체를 치료 대상으로 선택할 수 있다. 개시된 면역원을 투여한 후, 대상체는 코로나바이러스와 관련된 감염이나 증상, 또는 둘 다에 대해 모니터링될 수 있다.

[0174] 본 명세서의 치료제 및 방법으로 치료하려는 전형적인 대상체에는 인간 뿐만 아니라 인간이 아닌 영장류 및 기타 동물이 내포되어 있다. 본 개시내용의 방법에 따라 예방 또는 치료를 위한 대상을 확인하기 위해, 허용된 선별 방법은 표적이 되는, 또는 의심되는 질환 또는 상태와 관련된 위험 요인을 결정하거나, 대상의 기존 질병 또는 상태의 상태를 결정하기 위해 사용된다. 이러한 스크리닝 방법에는 예를 들어, 환경, 가족, 직업 및 표적이 되었거나 의심되는 질환이나 상태와 연관될 수 있는 기타 위험 요인을 확인하기 위한 기존 정밀 검사, 뿐만 아니라 코로나바이러스 감염을 검출 및/또는 특성화하기 위한 다양한 ELISA 및 기타 면역분석 방법과 같은 진단 방법도 내포된다. 이들 방법 및 기타 통상적인 방법을 통해 임상되는 본 개시내용의 방법 및 제약 조성물을 사용하여 치료가 필요한 환자를 선택할 수 있다. 이들 방법 및 원리에 따라, 조성물은 본원의 교시, 또는 독립적인 예방 프로그램 또는 치료 프로그램으로 기타 기존 방법, 또는 후속 조치로 다른 치료에 대한 보조 요법 또는 조정 치료 요법에 따라 투여될 수 있다.

[0175] 개시된 조성물의 투여는 예방적 또는 치료적 목적을 위한 것일 수 있다. 예방적으로 제공되는 경우, 개시된 치료제는 임의의 증상이 나타나기 전, 예를 들어, 감염이 일어나기 전에 제공된다. 개시된 치료제의 예방적 투여는 임의의 후속 감염을 예방하거나 개선하는 역할을 한다. 치료요법적으로 제공되는 경우, 기술된 치료제는 질환 또는 감염의 증상이 개시될 때 또는 그 이후, 예를 들면, 상기 조성물 안에 있는 S 단백질에 대응하는 코로나바이러스로 감염 증상이 발달된 후, 또는 코로나바이러스 감염으로 진단을 받은 후 제공된다. 따라서, 치료제

는 코로나바이러스에 예상되는 노출 발생-전 바이러스에 노출되었거나 노출이 의심되는 경우 또는 실제 감염이 시작된 후 제공되어, 예상되는 감염의 중증도, 기간 또는 정도 및/또는 관련 질병 증상을 악화시킬 수 있다.

[0176] 본 명세서에 기술된 조성물은 대상체, 바람직하게는 인간에서 코로나바이러스 S 단백질에 대한 면역 반응을 유도 또는 향상에 효과적인 양으로 대상체에게 제공된다. 개시된 조성물의 실제 투여량은 질환 징후 및 대상의 특정 상태 (예를 들어, 대상자체 나이, 체격, 체력, 증상 정도, 감수성 요인 및 이와 유사한 것들), 투여 시간 및 경로, 동시에 투여되는 다른 약물 또는 치료법과 같은 요인, 뿐만 아니라 대상체에서 원하는 활성 또는 생물학적 반응을 유도하기 위한 조성물의 특정 약리학에 따라 달라질 것이다. 최적의 예방적 반응 또는 치료적 반응을 제공하기 위해 용량 요법을 조정할 수 있다.

[0177] 본 명세서에 따른 조성물은 합동 백신접종 프로토콜 또는 병용 제형에 사용될 수 있다. 특정 구체예들에서, 조성물 및 합동 백신접종 프로토콜은 항-바이러스 면역 반응, 이를 테면, 코로나바이러스 S 단백질에 대한 면역 반응을 유도하는 별개 도입유전자 또는 제형을 이용한다. 항-바이러스성 면역 반응을 유도하는 별개의 면역원성 조성물은 단일 면역화 단계로 대상체에게 투여되는 다가 면역원성 조성물에 복합될 수 있거나, 이들은 통합 (또는 프라임-부스트) 면역화 프로토콜로 별개로 (1가 면역원성 조성물로) 투여될 수 있다.

[0178] 여러 가지 부스트가 있을 수 있으며, 각 부스트는 서로 상이한 도입유전자일 수 있다. 일부 예시들에서 상기 부스트는 또다른 부스트, 또는 프라임과 동일한 도입유전자일 수 있다. 상기 프라임 및 부스트는 단일 용량 또는 다중 용량으로 투여될 수 있으며, 예를 들어, 2회 분량, 3회 분량, 4회 분량, 5회 분량, 6회 분량 또는 그 이상의 분량이 대상체에게 며칠, 몇 주 또는 몇 달에 걸쳐 투여될 수 있다. 1~5회 (가령, 1, 2, 3, 4 또는 5회 부스트) 또는 그 이상의 다중 부스트가 제공될 수도 있다. 일련의 순차적 면역접종에서는 다양한 용량을 사용할 수 있다. 예를 들면, 일차 면역접종에서는 상대적으로 많은 분량을 투여한 다음, 상대적으로 더 적은 분량을 부스터로 투여한다.

[0179] 일부 구체예들에서, 상기 부스터는 프라임접종 후 약 2주, 약 3~8주, 또는 약 4주, 또는 프라임접종 후 약 몇 달 후에 투여될 수 있다. 일부 구체예들에서, 상기 부스터는 프라임접종 후 약 5개월, 약 6개월, 약 7개월, 약 8개월, 약 10개월, 약 12개월, 약 18개월, 약 24 개월 또는 그 이상의 기간 또는 그 미만의 기간에 투여될 수 있다. 대상체의 "면역 기억"을 강화하기 위해 적절한 시점에 주기적 추가 부스터를 사용할 수도 있다. 선택된 백신접종 매개변수, 가령, 제형, 투여분량, 요법 및 이와 유사한 것들의 타당성은 대상체로부터 혈청의 분취량을 취하고, 면역화 프로그램 과정 동안 항체 역가를 분석함으로써 결정될 수 있다. 또한, 원하는 효과, 가령, 감염의 예방 또는 질환 상태 개선 (가령, 바이러스 로드 감소)에 대해 대상체의 임상적 상태를 모니터링할 수 있다. 그러한 모니터링에서 백신접종이 최적에 미치지 못하는 나타나면, 이 대상체에게 면역원성 조성물의 추가 투여분량으로 부스터접종을 할 수 있고, 백신접종 매개변수는 면역 반응이 강화될 것으로 예상되는 방식으로 수정될 수 있다.

[0180] 일부 구체예들에서, 본 명세서의 조성물은 단일-투여분량으로 투여된다.

[0181] 본 명세서의 개시된 조성물의 투여 시, 해당 대상체의 면역계는 이 조성물 안에 내포된 코로나바이러스 S 단백질에 특이적인 항체를 생성함으로써, 이 조성물에 대해 전형적으로 반응한다. 이러한 반응은 면역학적으로 유효한 용량이 대상자에게 전달되었음을 의미한다.

[0182] 일부 구체예들에서, 대상체의 항체 반응은 유효 용량/면역화 프로토콜을 평가하는 맥락에서 결정될 것이다. 대부분의 경우, 상기 대상체로부터 얻은 혈청 또는 혈장의 항체 역가를 평가하는 것으로 충분할 것이다. 추가 접종을 실시할 지 여부 및/또는 개인에게 투여되는 치료제의 양을 변경할지에 대한 결정은 적어도 부분적으로는 항체 역가 수준에 기초할 수 있다. 상기 항체 역가 수준은 예를 들어, 면역원에 포함된 재조합 코로나바이러스 S 단백질을 포함하는 항원에 결합하는 혈청 내 항체의 농도를 측정하는 면역결합 분석을 기반으로 할 수 있다.

[0183] 이 방법이 코로나바이러스 감염을 완전히 제거, 감소 또는 예방할 정도로 효과적일 필요는 없다. 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 개시된 조성물로 코로나바이러스에 대한 면역 반응의 유도에 의해 이 코로나바이러스의 감염이 원하는 수준, 예를 들면, 해당 조성물의 부재 시 코로나바이러스의 감염과 비교하였을 때, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 심지어 적어도 100% (검출가능한 감염된 세포들이 제거 또는 방지)로 감소 또는 억제될 수 있다. 추가 예시에서, 개시된 방법에 의해 코로나바이러스 복제가 감소되거나 억제될 수 있다. 이 방법이 효과를 가지기 위해, 코로나바이러스 복제를 완전히 제거할 필요는 없다. 예를 들면, 개시된 하나 또는 그 이상의 조성물을 이용하여 유도된 면역 반응은 대응하는 코로나바이러스의 복제를 원하는 수준, 예를 들면, 해당 조성물의 부재 시 코로나바이러스

의 복제와 비교하였을 때, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 심지어 적어도 100% (코로나바이러스의 검출가능한 복제의 제거 또는 방지) 감소시킬 수 있다.

[0184] 일부 구체예들에서, 상기 개시된 조성물은 어쥬번트의 투여와 함께 해당 대상체에게 투여된다. 어쥬번트는 적용된 항원 결정기에 대한 면역 반응을 추가로 증가시키는 것으로 당업계에 알려져 있고, 아데노바이러스 및 적합한 어쥬번트를 포함하는 약제학적 조성물은 예를 들면, WO 2007/110409 (본원의 참고자료에 편입됨)에 개시되어 있다. 적합한 어쥬번트의 예시들은 본원에서 제공된다.

[0185] 일부 구체예들에서, 하나 또는 그 이상의 상기 개시된 조성물의 치료요법적 효과량을 대상체에게 투여하면 해당 대상체에서 중화 면역 반응이 유도된다. 중화 활성을 평가하기 위해, 대상체의 면역화 후, 적절한 시점에 이 대상체로부터 혈청을 수집하고, 냉동시킨 후, 중화 시험을 위해 보관할 수 있다. 중화 활성을 분석하는 방법은 당업자에게 공지되어 있으며, 본원에 추가로 기재되어 있는데, 여기에는 플라크 감소 중화(PRNT) 분석, 미세중화 분석, 유동 세포분석 기반 분석, 단일-주기 감염 분석이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 일부 구체예들에서, 상기 혈청 중화 활성은 코로나바이러스 슈도바이러스(pseudoviruses)의 패널을 이용하여 분석될 수 있다. 예를 들면, 생물안전성 레벨 3 시설을 요구하지 않고-여러 MERS-CoV 균주들에 대한 백신 후보의 면역원성을 테스트하기 위해, 이전에 SARS-CoV에 대해 개발된 것(Martin et al, Vaccine 26, 6338, 2008; Yang et al, Nature 428, 561, 2004; Naldini et al, PNAS 93, 11382, 1996; Yang et al, PNAS 102, 797, 2005)과 유사한 위험(pseudotyped) 리포터 바이러스 중화 분석이 이전에 개발되었다 (Wand et al., Nat Commun, 6:7712, 2015).

[0186] 다른 구체예들에서, 본 명세서는 호흡기 바이러스 감염의 감염성을 치료, 예방 또는 감소시키는 방법을 제공한다. 일부 구체예들에서, 상기 바이러스 감염은 코로나바이러스 감염일 수 있다. 상기 코로나바이러스는 SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS-CoV, HKU1, OC43, 또는 229E일 수 있다. 상기 코로나바이러스는 베타-코로나바이러스일 수 있다. 코로나바이러스 감염 위험이 있는 대상체는 코로나바이러스 감염의 무증상 보균자와 접촉하여 자신도 모르게 코로나바이러스 감염에 걸릴 수 있다.

[0187] 본 개시내용의 특정 방법은 본원에 기술된 아데노바이러스를 제조하는 방법을 포함한다. 이러한 방법들에는 본원에 기술된 아데노바이러스 벡터로 세포를 형질감염시키는 단계; 세포가 재조합 아데노바이러스를 생산하도록 하는 조건 하에서 세포를 배양하는 단계; 그리고 재조합 아데노바이러스를 수집하는 단계가 내포될 수 있다. 적합한 세포들은 당분야에 공지되어 있다. 일부 구체예들에서, 상기 세포는 HEK, Vero 또는 PER 세포일 수 있다.

[0188] 본 명세서는 제1 대상체의 혈청으로 제2 대상체를 치료하는 방법을 또한 포괄한다. 특히, 본 명세서는 본 명세서에 상세하게 설명된 아데노바이러스 벡터, 본 명세서에 상세하게 설명된 약제학적 조성물, 또는 본 명세서에 상세하게 설명된 면역원성 조성물을 이전에 투여받은 제1 대상체의 혈청을 포함하는 조성물을 포괄한다. 이러한 혈청을 수거하는 방법들은 당분야에 공지되어 있다. 제1 대상체의 혈청으로 제2 대상체를 치료하는 방법은 일반적으로 제1 대상체로부터의 혈청을 포함하는 면역원성 유효량의 조성물을 제2 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 대상체에게 혈청을 투여하는 방법은 알려져 있으며, 혈청의 용량을 결정하는 것은 당업자의 기술 내에 있다.

[0189] 일반적으로, 본원에 기술된 방법은 치료 유효량의 본 명세서의 나노입자 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 본 명세서에 기술된 방법은 일반적으로 이를 필요로 하는 대상체에 대해 수행된다. 대상체는 설치류, 인간, 가축 동물, 반려 동물 또는 동물원의 동물일 수 있다. 한 구체예에서, 상기 대상체는 설치류, 예를 들면, 마우스, 랫, 기니아 피그 등이 될 수 있다. 또다른 구체예에서, 상기 대상체는 가축일 수 있다. 적합한 가축 동물의 비-제한적인 예시에는 돼지, 소, 말, 염소, 양, 라마 및 알파카가 내포될 수 있다. 여전히 또다른 구체예에서, 상기 대상체는 반려동물일 수 있다. 반려동물의 비-제한적인 예시로는 개, 고양이, 토끼, 새 등의 애완동물이 포함될 수 있다. 여전히 또다른 구체예에서, 상기 대상체는 동물원 동물일 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, “동물원용 동물”은 동물원에서 발견될 수 있는 동물을 의미한다. 이러한 동물에는 인간이 아닌 영장류, 큰 고양이, 늑대, 곰이 내포될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 상기 대상체는 인간이다.

[0190] IV. 키트

[0191] 키트가 또한 본원에서 제공된다. 이러한 키트에는 본원에 기술된 제제 또는 조성물, 특정 구체예들에서는 투여 지침이 내포될 수 있다. 성분들에는 다음 중 하나 또는 그 이상이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: (i) 본원에 기술된 숙주 세포, 본원에 기술된 패키징 세포, 본원에 기술된 아데노바이러스 벡터, 본원에 기술된 약제학적 조성물, 또는 본원에 기술된 면역원성 조성물 중 하나 또는 그 이상의 것, 그리고 (ii) 사

용 지침. 일부 구체예들에서, 본 명세서의 키트는 상기 단락 II에서 상세하게 설명된 바와 같은 조성물을 포함할 수 있다. 이러한 키트는 본원에 기술된 방법의 수행을 촉진할 수 있다. 키트로 제공되는 경우, 상기 조성물의 다양한 구성요소를 별도의 용기에 포장하고, 사용 직전에 혼합할 수 있다. 이러한 성분들의 개별 패키징을 원한다면, 이 조성물을 함유하는 하나 또는 그 이상의 단위 투약형을 함유할 수 있는 팩(pack) 또는 디스펜서 장치로 제공될 수 있다. 상기 팩은 예를 들어, 블리스터 팩(blister pack)과 같은 금속 또는 플라스틱 호일을 포함할 수 있다. 특정 경우들에서 상기 구성요소를 별도로 포장하면, 상기 구성요소들의 활성을 잃지 않고 장기간 보관할 수도 있다.

[0192] 키트에는 별도로 포장된 동결건조된 활성 성분들에 추가될 이를 테면, 멸균수 또는 식염수와 같은 시약이 별도의 용기에 내포되어 있을 수도 있다. 예를 들면, 밀봉된 유리 앰플은 동결건조된 성분들을 함유되어 있을 수 있으며, 별도의 앰플에는 멸균수, 멸균 식염수 또는 멸균된 각각이 질소와 같은 중성 비-반응 가스 하에 포장되어 있다. 앰플은 임의의 적합한 재료, 이를 테면, 유리, 폴리카보네이트, 폴리스티렌, 세라믹, 금속 또는 시약을 담는 데 일반적으로 사용되는 기타 재료로 구성될 수 있다. 적합한 용기의 다른 예로는 앰플과 유사한 물질로 제작할 수 있는 병, 알루미늄이나 합금의 호일-안감을 댄 내부로 구성할 수 있는 봉투가 있다. 다른 용기에는 시험관, 약병, 플라스크, 병, 주사기 및 이와 유사한 것들이 내포된다. 용기에는 멸균 접근 포트, 이를 테면, 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개가 있는 병에서 멸균 접근 포트가 있을 수 있다. 다른 용기에는 용이하게 제거할 수 있는 막으로 분리된 두 개의 구획이 있을 수 있고, 이 막을 제거할 경우, 구성 요소들이 혼합될 수 있다. 제거 가능한 막은 유리, 플라스틱, 고무 및 이와 유사한 것일 수 있다.

[0193] 특정 구체예들에서, 키트에는 지침 자료가 함께 제공될 수 있다. 지침은 종이나 기타 인쇄물에 인쇄될 수 있고 및/또는 전자-판독 가능 매체 이를 테면, 플로피 디스크, 미니 CD-ROM, CD-ROM, DVD-ROM, Zip 디스크, 비디오 테이프, 오디오 테이프 및 이와 유사한 것으로 제공될 수 있다. 자세한 지침은 키트와 물리적으로 연관되지 않을 수 있고; 대신 사용자는 키트 제조업체나 배포자가 지정한 인터넷 웹 사이트로 연결될 수 있다.

[0194] 분자 생물학 프로토콜을 활용하여 본원에 기술된 조성물 및 방법은 당업계에 공지된 다양한 표준 기술에 따를 수 있다(가령, Sambrook and Russel (2006) Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN-10: 0879697717; Ausubel et al. (2002) Short Protocols in Molecular Biology, 5th ed., Current Protocols, ISBN-10: 0471250929; Sambrook and Russel (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN-10: 0879695773; Elhai, J. and Wolk, C. P. 1988. Methods in Enzymology 167, 747-754; Studier (2005) Protein Expr Purif. 41(1), 207-234; Gellissen, ed. (2005) Production of Recombinant Proteins: Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems, Wiley-VCH, ISBN-10: 3527310363; Baneyx (2004) Protein Expression Technologies, Taylor & Francis, ISBN-10: 0954523253 참고).

[0195] 본 명세서에 개시된 특이적 구체예들은 "~를 포함하는" 보다는 "~로 구성되는" 또는 "본질적으로 ~로 구성되는" 표현을 사용하여 청구범위에서 추가로 제한될 수 있다. 특허청구범위에 사용된 경우, 제출되거나 보정에서 추가되었는 지 여부에 관계없이, 전환 용어 "~로 구성된다"아닌 청구범위에 명시되지 않은 요소들, 단계들 또는 성분들은 모두 배제된다. "본질적으로 ~로 구성되는"이라는 전환 용어는 청구항에서 범위를 지정시킨 재료 또는 단계에 대해 기본적인, 새로운 특성(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것들로 제한된다. 그렇게 청구된 본 발명의 실시예는 본 명세서에서 본질적으로 또는 명시적으로 설명되고 가능해진다.

[0196] 본 발명의 범위를 벗어나지 않으면서 전술한 재료 및 방법에서 다양한 변경이 이루어질 수 있기 때문에, 상기 설명 및 하기 주어진 실시예에 포함된 모든 물질은 예시적인 것으로 해석되어야 하며, 이에 한정시키는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0197] 실시예들

[0198] 하기 실시예는 본 개시내용의 다양한 실시예를 입증하기 위해 내포된다. 하기 실시예에 개시된 기술들은 본 발명의 실시에서 잘 기능하도록 발명자에 의해 발견된 기술들을 나타내므로, 해당 분야의 숙련된 기술자들에게 자명하며, 따라서 실행을 위해 선호되는 모드를 구성하는 것으로 간주될 수 있다. 그러나, 본 개시에 비추어, 개시된 특정 실시예에 대해 많은 변경이 이루어질 수 있고, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 여전히 유사하거나 또는 유사한 결과를 얻을 수 있음을 당업자는 인식해야 한다.

[0199] 실시예 1: 단일-투여분량 침팬지 아데노바이러스 벡터화된 백신은 인간 ACE2 수용체를 발현하는 마우스에서 SARS-CoV-2 감염 및 폐렴으로부터 보호한다.

[0200] 본 실시예는 S2 하위단위에 두 개 프롤린 치환을 도입시킨 후, 융합-전 안정화된 스파이크 (S) 단백질을 인코딩하는 침팬지 Ad (유인원 AdV-36)-기반 SARS-CoV-2 백신 (ChAd-SARS-CoV-2-S)을 제공한다. ChAd-SARS-CoV-2-S의 근육 내 투여는 S 단백질에 대한 강력한 전신 체액성 및 세포 매개 면역 반응을 유도했다. 1회 또는 2회 백신 투여분량은 인간 ACE2(hACE2) 수용체를 일시적으로 발현시키는 마우스에게 SARS-CoV-2로 공격-후, 폐 감염, 염증 및 병리 현상을 예방하였다. 혈청에서 높은 수준의 중화 항체가 유도되었음에도 불구하고, 상당한 수준의 바이러스 RNA가 여전히 폐에서 검출되었기 때문에 어떠한 투여 요법도 SARS-CoV-2 감염을 완전히 예방하지 못했다. 이에 비해, ChAd-SARS-CoV-2-S를 비강 경로로 한번의 투여분량이 투여된 경우, 높은 수준의 중화항체와 항SARS-CoV-2 IgA가 검출되어 상부 및 하부 호흡기가 감지되었던 모두 감염으로부터 완벽하게 보호되는 것으로 나타났다. 더욱이, 대조군 ChAd 백신과 달리, SARS-CoV-2로 공격후 8일차 시점에서, SARS-CoV-2 NP 단백질에 대한 혈청 항체 반응은 비강 전달을 통해 ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역화된 동물에서는 나타나지 않았다. 따라서, ChAd-SARS-CoV-2-S는 접종 부위에 살균 면역을 부여하여, 바이러스로 인하여 유도된-질환과 전파를 모두 예방할 가능성이 있다.

[0201] 결과

[0202] 침팬지 Ad-백터화된 백신은 항-SARS-CoV-2에 대한 강력한 항체 반응을 유도한다: 유인원 Ad-36 바이러스를 기반으로 하는 두 개의 복제-불능 ChAd 백터가 구축되었다. ChAd-SARS-CoV-2-S 백터는 엑토도메인, 막형단 도메인 및 세포질 도메인이 내포된 도입유전자로써 SARS-CoV-2 S 단백질의 전장의 서열을 인코딩하고 (GenBank: QJQ84760.1), 잔기 K986 및 V987에서 두 개의 프롤린 치환에 의해 융합-전 형태로 안정화된다. 상기 ChAd-대조군에는 도입유전자가 없다. 상기 S 단백질 도입유전자는 사이토메갈로바이러스 프로모터에 의해 전사적으로 조절된다. 백터 복제-불능을 만들고, 패키징 능력을 향상시키기 위해, E1A/B 유전자를 교체하였고, E3B 유전자의 결실을 각각 도입했다 (도 1A). S 단백질이 발현되었고, 항원적으로 온전한지 확인하기 위해, 293T 세포를 형질 도입시켰고, S 단백질에 대항하는 22개의 중화 단클론 항체 패널의 결합은 유동 세포분석으로 확인했다 (도 1B).

[0203] ChAd-SARS-CoV-2-S의 면역원성을 평가하기 위해, 4-주령 BALB/c 마우스 그룹에 ChAd-SARS-CoV-2-S 또는 ChAd-대조군의 10^{10} 바이러스 입자를 근육내 접종하여 면역화했다. 일부 마우스들은 4주 후에 부스터접종을 받았다. 1차 또는 부스터 면역접종후 21일차 시점에 혈청 샘플을 수집하였고 (도 1C), 정제된 S 단백질 및 RBD 단백질에 대한 IgG 반응을 ELISA로 평가했다. ChAd-SARS-CoV-2-S는 높은 수준의 S-특이적, 그리고 RBD-특이적 IgG를 유도한 반면, ChAd 대조군 면역접종된 마우스에서는 검출이 되었더라도 그 수준은 낮았다 (도 1D 및 도 2A). 혈청 샘플은 초점-감소 중화 테스트 (FRNT)를 사용하여 감염성 SARS-CoV-2의 중화 여부를 시험관 내에서 분석했다. 예상한 대로, ChAd-대조군-면역화된 마우스의 혈청은 1차 면역화 또는 부스터 접종-후, SARS-CoV-2 감염을 억제하지 못했다. 대조적으로, ChAd-SARS-CoV-2-S 백신을 접종한 동물의 혈청은 SARS-CoV-2 감염을 강력하게 중화시켰으며, 이를 강화하면 이 억제 활성이 강화되었다 (도 1E 및 도 2B-2C).

[0204] 백신-유도된 메모리 CD8+ T 세포 및 항원 특이적 B 세포 반응: 최적의 백신 면역은 체액성 반응과 세포성 반응으로 구성되는 경우가 많기 때문에, 백신 접종-후 SARS-CoV-2 특이적 CD4+ 및 CD8+ T 세포 수준을 측정했다. 4-주령 BALB/c 마우스를 ChAd-SARS-CoV-2-S 또는 ChAd-대조군으로 면역접종하였고, 3주 후에 부스터접종했다. 백신으로-유발된 SARS-CoV-2 특이적 CD4+ 및 CD8+ T 세포 반응을 평가하기 위해, 부스팅접종-후 1주일 시점에 비장세포를 수거하였고, 253개의 중첩되는 15-mer S 펩티드 풀을 사용하여 생체 외(ex vivo)에서 자극했다. 이어서, 세포내 IFN γ 및 그랜자임 B 발현의 정량화를 유동 세포분석법으로 결정했다. 생체 외에서 펩티드 재-자극 후, ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역접종된 마우스에서 비장 CD8+ T 세포는 IFN γ 를 발현했고, 비장 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 모두 그랜자임 B를 발현했지만, ChAd 대조군 백터는 발현하지 않았다 (도 1F-1G 및 도 3). 항원-특이적 B 세포 반응을 평가하기 위해, 비장세포를 수거하였고, S 단백질을 사용하여 ELISPOT 분석을 실시했다. ChAd-SARS-CoV-2-S 백신은 비장에서 S 단백질-특이적 IgG 항체-분비 세포를 유도한 반면, 대조군 백신은 그렇지 않았다 (도 1H).

[0205] ChAd-SARS-CoV-2-S 백신을 이용한 근육 내 예방접종은 폐의 SARS-CoV-2 감염을 예방한다: BALB/c 마우스가 백터화된 인간 Ad(Hu-Ad5-hACE2)를 비강내 전달한 후 폐에서 hACE2를 발현하는 최근 개발된 SARS-CoV-2 감염 모델에서 ChAd 백신의 보호 활성을 테스트했다. 내생성 마우스 ACE2는 바이러스 진입을 지원하지 않으며, 이 시스템은 마우스 폐에서 SARS-CoV-2 생산적인 감염을 가능하게 한다. 4-주령 BALB/c 마우스는 먼저 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S 백신으로 근육 내 경로를 통해 면역접종되었다. 대략적으로 30일 후, 마우스에게 비강내 및 복강내 경로를 통해 각각 Hu-Ad5-hACE2 및 항-Ifnar1 단일클론 항체(mAb)의 10^8 플라크-형성 단위(PFU)를 투여

했다. 이 모델에서 폐 발병성을 향상시키기 위해 단일 용량의 항-Ifnar1 mAb도 투여되었다. ChAd와 Hu-Ad5 벡터 사이에 교차-면역성이 없음이 확인되었다. ChAd-면역화된 마우스의 혈청은 Hu-Ad5 감염을 중화시키지 않았다 (도 4A-4B).

[0206] Hu-Ad5-hACE2 형질도입-후 5일차 시점에, 마우스에게 SARS-CoV-2의 4×10^5 초점-형성 단위 (FFU)를 비강 내 경로를 통해 감염시켰다 (도 2A). 이 모델에서 바이러스 부하가 최고조인 감염-후 4일차(dpi)에 마우스를 안락사시키고, 바이러스 부하 및 사이토킨 분석을 위해 폐, 비장 및 심장을 수거했다. 특히, 플라크 분석으로 측정된 결과, ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역접종된 마우스의 폐에는 검출가능한 감염성 바이러스가 없었지만, ChAd-대조군으로 백신접종을 받은 마우스에서는 높은 수준으로 존재했다 (도 5B). 이 결과와 일치하게, ChAd-SARS-CoV-2-S 백신 접종 동물의 폐, 심장 및 비장에서 ChAd-대조군 벡터를 투여받은 마우스와 비교하여 바이러스 RNA 수준이 감소됨이 관찰되었다 (도 5C). 4dpi에서 수거한 폐의 바이러스 RNA에 대한 제자리(*in situ*) 혼성화 착색에서는 ChAd-대조군에 비해 ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역접종된 동물의 폐 세포에서 SARS-CoV-2 RNA가 상당히 감소한 것으로 나타났다 (도 5D). 면역접종된 동물의 하위집합을 8dpi 시점에서 안락사시켰고, 평가를 위해 조직을 채취했다. 이 시점에서, 바이러스 RNA 수준은 대조군 ChAd 벡터와 비교하여, ChAd-SARS-CoV-2-S 면역접종된 마우스의 폐 및 비장에서 다시 더 낮거나 없었다 (도 5C). 종합적으로, 이러한 데이터는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 사용한 단일 근육내 면역접종이 마우스의 공격받은 폐에서 SARS-CoV-2 감염을 현저하게 감소시켰지만, 완전히 없애지는 않는다는 것을 나타낸다.

[0207] 다음으로, 폐 염증 및 질병에 대한 백신의 효과를 평가했다. ChAd-대조군에 비해, ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역접종된 동물의 폐 조직에서 *CXCL10*, *IL1 β* , *IL-6*, *CCL5*, *IFN β* 및 *IFN γ* 를 비롯한 여러 전-염증성 사이토킨 및 케모킨 mRNA 수준이 더 낮았다 (도 5E). 더욱이, ChAd-대조군 백신으로 면역접종받았고, SARS-CoV-2로 공격받았던 마우스들은 혈관 주위 및 폐포 위치의 면역 세포 축적, 혈관 울혈 및 간질 부종을 특징으로 하는 바이러스성 폐렴의 증거를 보여주었다. 대조적으로, ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역접종받았던 동물들은 ChAd-대조군으로-면역접종받았던 마우스에서 발생하는 폐 염증 반응의 현저한 약화를 보여주었다 (도 6). 따라서, Ch-Ad-SARS-CoV-2 면역접종은 바이러스 감염과 이에 따른 SARS-CoV-2 감염과 관련된 폐 염증 및 손상을 모두 감소시킨다.

[0208] 그런 다음, 프라임-부스트 백신 요법을 사용하여 향상된 보호를 평가했다. BALB/c 마우스들에게 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S로 근육내 경로를 통해 면역접종하였으며, 4주 후에 동종 부스터 접종했다. 부스터-접종 후 29일차에, 마우스들에게 항-Ifnar1 항체를 1회 투여분량 투여한 후, Hu-Ad5-hACE2를 투여하였고, 5일 후에 SARS-CoV-2로 공격했다. 예상대로, 프라임-부스트 요법은 폐에서 감염성 바이러스가 검출되지 않았고, SARS-CoV-2 공격으로부터 보호되었다 (도 5F). 폐, 비장 및 심장에서 바이러스 RNA의 현저한 감소가 4dpi 시점에서 감지되었지만, 바이러스 RNA의 잔여 수준이 여전히 존재하여 부스터 접종 후에도 보호는 완전하지 않았음을 나타낸다 (도 5G).

[0209] ChAd-SARS-CoV-2-S를 사용한 단일 비강 내 면역접종은 SARS-CoV-2에 대한 살균성 면역을 유도한다: 비인두 경로를 통한 점막 면역화는 호흡기 병원체 접종 부위 또는 그 근처에서 보호를 제공하는 분비성 IgA 항체를 비롯한 국소 면역 반응을 유도할 수 있다. 점막 백신접종의 면역원성과 보호 효능을 평가하기 위해, 5-주령 BALB/c 마우스에 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S의 10^{10} 바이러스 입자를 비강 경로를 통해 접종했다 (도 7A). 체액성 면역 반응을 평가하기 위해 면역접종-후 4주차 시점에 혈청 샘플을 수집했다. ChAd-대조군이 아닌 ChAd-SARS-CoV-2-S의 비강내 면역화는 높은 수준의 S- 및 RBD-특이적 IgG 및 IgA (도 7B-7C)와 SARS-CoV-2 중화 항체(기하 평균 역가 1/1,574)를 유도했다 (도 7D 및 도 8A). ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역접종된 마우스의 혈청 항체는 S 단백질의 D614G 돌연변이를 인코딩하는 재조합 루시퍼라제 발현 SARS-CoV-2 변형체를 동등하게 중화시켰고 (도 8B); 이 발견은 많은 순환 바이러스에 이 치환이 함유되어 있고, 세포 배양에서 더 큰 감염성과 관련이 있기 때문에 중요하다 (doi.org/10.1101/2020.06.12.148726). 면역접종된 마우스의 기관지폐포 세척액(BAL)에서 SARS-CoV-2 특이 항체 반응을 또한 평가했다. ChAd-SARS-CoV-2-S를 접종한 마우스의 BAL 유체는 중화 활성을 갖는 항체(도 7G 및 도 8C)를 비롯하여, 높은 수준의 S- 및 RBD-특이적 IgG와 IgA 항체를 나타냈지만, ChAd-대조군으로 백신접종된 마우스는 나타내지 않았다 (도 7E-7F).

[0210] 점막 면역접종을 통해 활성화된 T 세포 반응을 평가하기 위해, 마우스에게 ChAd-SARS-CoV-2-S 또는 ChAd-대조군을 비강 투여하여 백신을 접종하였고, 4주 후에 마찬가지로 부스터접종했다. 부스터접종-후 1-주일 시점에 폐를 적출하였고, T 세포를 유동 세포분석법으로 분석했다. S 펩티드 폴을 이용한 생체 외 재-자극으로 ChAd-SARS-CoV-2-S 백신을 제공받았던 마우스의 폐에서 IIFN γ 및 그란자임 B를 생성하는 CD8 $^{+}$ T 세포가 현저히 증가했다 (도 7H). 구체적으로, 폐에서 IFN γ -분비하는, 항원-특이적 CD103 $^{+}$ CD69 $^{+}$ CD8 $^{+}$ T 세포 집단이 식별되었고 (도 7I),

이는 백신으로-유도된 상주 기억 T 세포와 표현형적으로 일치한다. 비장에서, ChAd-SARS-CoV-2-S로 비강 면역접종을 실시한 후, S 단백질을 대항한 IgA 또는 IgG를 생성하는 항체-분비 형질 세포가 검출되었다 (도 7J). 주목할 점은, IgG보다 항-S IgA를 분비하는 B 세포의 빈도가 약 5배 더 높은 것으로 관찰되었다.

[0211] 단일-투여분량 비강 면역접종-후, ChAd 백신의 보호 효능을 평가했다. 백신접종-후 30일차에, 위에 설명한 바와 같이 마우스에게 10^8 PFU의 Hu-Ad5-hACE2와 항-Ifnar1 mAb를 투여했다. 5일 후, 마우스에게 SARS-CoV-2 4×10^5 FFU로 공격했다. 4dpi와 8dpi에서, 폐, 비장, 심장, 비갑개 (nasal turbinates), 비강 세척액을 채취하여 바이러스 부하를 평가했다. ChAd-SARS-CoV-2-S 백신의 비강 투여는 폐에서 감염성 바이러스가 없다는 것을 판단하여 놀라운 보호 효능을 입증했고 (도 9A), 폐, 비장, 심장, 비강 비강 또는 비강 세척액에서 측정 가능한 바이러스 RNA가 거의 없다 (도 9B). 4 dpi에서 폐와 비갑개의 바이러스 RNA 수치가 매우 낮은 것은 복제되지 않는 바이러스가 입력되었기 때문일 가능성이 높고, 이 시점에서 hACE2 수용체 발현이 결핍된 C57BL/6 마우스에서도 비슷한 수치가 측정되었다. 폐 균질물의 사이토킨 및 케모킨 mRNA 수치도 ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역된 마우스에서 ChAd-대조 백신보다 상당히 낮았고 (도 9C), 잔류 발현은 인간 Ad 벡터 hACE2 전달 시스템으로 인한 것일 가능성이 있다. 마지막으로, 비강 경로로 ChAd-SARS-CoV-2-S로 백신접종하였고, SARS-CoV-2로 공격받은 동물의 폐 조직에 대한 조직병리학적 분석은 ChAd-대조 백신 접종 동물에서 관찰된 광범위한 염증과 비교하여, 8 dpi에서 최소한의 혈관 주위 및 폐포 침윤이 있었거나, 전혀 없었음을 보여주었다 (도 9D).

[0212] ChAd-SARS-CoV-2-S를 비강으로 투여했을 때 살균성 면역이 달성되었는지 확인하기 위해, 8 dpi에서 항-NP 항체를 측정하였고, SARS-CoV-2 감염 5일-전의 반응과 비교했다. 상기 백신 벡터에는 NP 유전자가 없기 때문에, SARS-CoV-2 노출 후 NP에 대항한 체액 면역 반응이 유도되면 바이러스 단백질 번역과 활성 감염이 있음을 시사한다. SARS-CoV-2 공격 후, 비강 경로로 백신접종을 받은 ChAd-대조 마우스 또는 근육 경로로 백신접종을 받은 ChAd-대조군 마우스와 ChAd-SARS-CoV-2-S 마우스에서 항-NP 항체 반응이 감지되었다 (도 9E 및 도 2D). 주목할 점은, 비강 투여 경로를 통해 ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역접종을 받았던 마우스들 중 어느 것도 SARS-CoV-2 감염 후 항-NP 항체 반응이 크게 증가하지 않았다. 이러한 데이터를 우리들의 바이러스학적 분석과 결합하면, ChAd-SARS-CoV-2-S의 단일 비강 면역화는 강력하고, 살균상 점막 면역을 유도함을 시사하고, 이는 hACE2 수용체를 발현하는 쥐의 상기도 및 하기도에서 SARS-CoV-2 감염을 예방한다.

[0213] 논의

[0214] 이 사례에서, SARS-CoV-2의 백신 플랫폼으로 복제-불능 ChAd 벡터의 근육 내 및 비강 내 투여에 대해 평가했다. 안정화된 S 단백질-기반 백신을 근육 내 주사로 단일 분량 투여면역화로 S 및 RBD-특이적 결합과 중화 항체가 유도되었다. 폐에서 감염성 바이러스가 사라지고, 폐와 기타 장기들에서 바이러스 RNA 수치가 상당히 감소한 것으로 증명된 바와 같이, 한차례 또는 두차례 분량투여에 의한 백신접종으로 SARS-CoV-2 공격에 대항하여 인간 ACE2를 발현하는 마우스를 보호하였다. ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역접종된 마우스는 대조군 ChAd 백신과 비교했을 때 폐 병리, 폐 염증 및 폐렴 증거가 현저히 감소하거나 전혀 나타나지 않았다. 그러나, ChAd-SARS-CoV-2-S의 근육 내 백신접종은 폐를 비롯한 여러 조직에서 검출가능한 바이러스 RNA 수치와 항-NP 항체 반응 유도를 통해 입증된 바와 같이, 살균 면역을 부여하지 못했다. 비강 투여 경로를 통해 ChAd-SARS-CoV-2-S를 단일 투여분량으로 투여받아 면역접종된 마우스도 SARS-CoV-2 공격으로부터 보호되었다. 그러나, 비강 백신 접종은 강력한 IgA와 중화 항체 반응을 생성하여 상기도와 하기도 SARS-CoV-2 감염을 예방하고 야생형 및 D614G 변이체 바이러스의 감염을 억제했다. 상부 기도 조직에서 매우 낮은 바이러스 RNA와 도전 상황에서 NP에 대한 혈청학적 반응이 없다는 사실은 대부분의 동물이 ChAd-SARS-CoV-2-S를 비강 단일 분량투여로 투여받으면 살균 면역에 도달한다는 것을 강력히 시사한다.

[0215] 여러 백신 후보(가령, 지질-캡슐화된 mRNA, DNA, 불활성화 및 바이러스-벡터)가 전염병을 통제하기 위한 신속한 노력으로 인체 임상 시험으로 빠르게 진행되었지만, 전-임상 모델에서 효능이 입증된 연구는 거의 없다. 전장의 SARS-CoV-2 S 단백질을 인코딩하는 DNA 플라스미드 백신을 2-3회 분량투여받아 면역화된 Rhesus 원숭이는 혈청에서 중화 항체를 유도하였고, BAL과 비강 점막액에서 바이러스 부하를 감소시켰다. 게다가, 정제되고 불활성화된 SARS-CoV-2를 2주 동안 3회 접종한 결과 중화 항체가 유도되었고, 투여한 용량에 따라 리서스원숭이에서 감염과 바이러스성 폐렴에 대해 부분적 또는 완전한 보호 효과가 나타났다. 이러한 도전 모델의 한 가지 한계는 리서스(rhesus) 원숭이가 일부 인간과 다른 비-인간 영장류 종과 비교하여, SARS-CoV-2 감염 후 가벼운 간질성 폐렴을 앓는다는 것이다. hACE2 발현 마우스에 대한 이번 사례는 ChAd-SARS-CoV-2-S 백신을 근육 내 또는 비강 내로 단일 분량투여하면, 바이러스 복제, 염증 및 폐 질환에 대해 실질적이고 완전한 보호 효과가 있을 수 있음을 보여주었다.

- [0216] 본 명세서는 SARS-CoV-2를 비롯한 신종 RNA 바이러스에 대한 비-인간 Ad 벡터 백신의 사용을 뒷받침한다. 이전 연구에서는 임신을 포함한 여러 가지 마우스 공격 모델에서 Zika 바이러스 (ZIKV)의 prM-E 유전자를 인코딩하는 고릴라 Ad의 단일-분량투여 또는 이중-분량투여 요법의 효능이 입증되었다. 다른 연구자들은 ChAd 또는 리서스 원숭이 Ad 백신 후보를 ZIKV에 대해 평가하였으며, 마우스와 비-인간 영장류에서 효능을 보였다. 야생형 SARS-CoV-2 S 단백질 (ChAdOx1)을 인코딩하는 다른 ChAd는 현재 인간을 대상으로 임상 시험 중이다(NCT04324606). 아직 인간 실험 데이터는 보고되지 않았지만, 리서스 원숭이에 대한 연구에 따르면, 근육 단일 분량투여는 폐 감염을 보호하지만, 상부 호흡기 감염에는 보호하지 못하는 것으로 나타났다(biorxiv.org/content/10.1101/2020.05.13.093195v1). SARS-CoV-2에 대항하여 평가된 백신 중 어느 것도 전-임상 또는 임상 연구에서 면역 증강의 증거를 보여주지 않았고, 이는 다른 인간 및 동물 코로나바이러스에 대한 연구에 기초한 이론적인 위험이다. 실제로, SARS-CoV 백신이나 항체에 대한 데이터와는 대조적으로, SARS-CoV-2 S 단백질을 인코딩하는 ChAd로 면역접종을 받은 동물이나 수동으로 전달된 단일 클론 항체를 투여받은 동물에서는 감염, 면역병리학 또는 질환의 증가가 관찰되지 않았다.
- [0217] ChAd-SARS-CoV-2-S는 체외(*ex vivo*) S 펩티드 재-자극 후, 높은 비율과 수의 IFN γ 및 그랜자임을 발현하는 세포를 포함하여 SARS-CoV-2 특이적 CD8⁺ T 세포 반응을 유도했다. ChAd-SARS-CoV-2-S 백신에 의한 강력한 CD8⁺ T 세포 반응의 유도는 다른 유인원 Ad 벡터에 대한 보고와 일치한다. ChAd 백신 벡터는 인간 아데노바이러스에 대한 기존 면역 문제를 극복하고, 뿐만 아니라 소진된 T 세포 반응을 유도하지 않기 때문에 면역학적 이점도 있다.
- [0218] ChAd-SARS-CoV-2-S를 비강으로 단일 분량투여하면, 동일한 백신과 분량투여로 근육 주사로 한 번 또는 두 번 면역접종한 것보다 SARS-CoV-2 감염에 대항한 면역력이 더 우수했다. 혈청 중화 항체 반응이 비슷하다는 점을 감안할 때, 비강 전달-후 관찰된 더 큰 보호 효과는 점막 면역 반응으로 인한 것이라고 가설을 세웠다. 실제로, 혈청과 폐에서 높은 수준의 항-SARS-CoV-2 IgA가 검출되었고, IgA를 분비하는 B 세포가 비강에서 검출되었다. 게다가, 비강 백신 접종은 폐에서 SARS-CoV-2 특이적 CD8⁺ T 세포, 즉 CD103⁺CD69⁺ 세포를 유도했는데, 이는 상주형 메모리 표현형일 가능성이 높다. 우리가 아는 바로는, 현재 임상 시험 중인 SARS-CoV-2 백신 플랫폼 중에 비강 전달 방식을 사용하는 것은 없다. 인플루엔자 A 바이러스 백신의 비강 전달에 대한 관심이 크게 증가했는데, 그 이유는 국소적인 체액 면역 반응과 세포 면역 반응을 유발할 수 있기 때문이다. 실제로, 인플루엔자 A 바이러스 재-감염에 대한 살균 면역에는 폐의 국소적 적응 면역 반응이 필요하고, 이 반응은 근육 주사가 아닌 비강 접종을 통해 최적으로 유도된다. 비강 투여 경로를 통해 생-약독화 바이러스 백신을 투여하는 것에 대한 우려가 있는 반면, 하위단위-기반 또는 복제-불능 벡터 백신은 더 안전한 방식으로 점막 면역을 생성하는 데 유망한데, 특히 제형의 발전으로 그 가능성이 높아졌다.
- [0219] 요약하면, 본 실시예에서는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 이용한 면역이 중화 항체와 항원-특이적 CD8⁺ T 세포 반응을 모두 유도한다는 것을 확인했다. ChAd-SARS-CoV-2-S의 단일 근육 내 면역접종은 폐의 SARS-CoV-2 감염 및 염증에 대한 보호 효과를 제공하는 한편, ChAd-SARS-CoV-2-S의 비강 투여는 점막 면역을 유도하며, 우수한 보호 기능을 제공하며, 적어도 일시적으로 hACE2 수용체를 발현하는 마우스의 경우에는 살균 면역을 증진시키는 것으로 보인다. 따라서, 본 실시예는 SARS-CoV-2 감염, 질병 및 전염을 제어하기 위한 플랫폼으로서 ChAd-SARS-CoV-2-S의 비강 전달을 뒷받침한다.
- [0220] **방법**
- [0221] **바이러스 및 세포:** Vero E6 (CRL-1586, American Type Culture Collection (ATCC), Vero CCL81 (ATCC), 및 HEK293 세포는 10% 태아 소 혈청 (FBS), 10mM HEPES pH 7.3, 1mM 피루베이트 나트륨, 1X 비-필수 아미노산, 및 100U/ml의 페니실린-스트렙토마이신이 보충된 Dulbecco 변형된 Eagle 배지 (DMEM)에서 37°C에서 배양하였다.
- [0222] SARS-CoV-2 균주 n 2019 n-CoV/USA_WA1/2020는 Centers for Disease Control and Prevention (a gift from Natalie Thornburg)에서 구하였다. 상기 바이러스는 Vero CCL81 세포에서 한 번 계대하였고, Vero E6 세포에서 초점 형성 분석(FFA)으로 적정되었다. 재조합 루시퍼라제-발현시키는 전장의 SARS-CoV-2 리포터 바이러스 (2019 n-CoV/USA_WA1/2020 균주)는 이미 보고되었고 (Zost et al., 2020), D614G 변이체는 도처에서 기술될 것이다. 감염성 SARS-CoV-2를 대상으로 한 모든 작업은 적절한 양압 공기 호흡기 및 보호 장비를 사용하여 기관 생물 안전 위원회가 승인한 BSL3 및 A-BSL3 시설에서 수행되었다.
- [0223] **마우스 실험:** 동물 연구는 미국 국립보건원의 실험동물 관리 및 사용 지침(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health)의 권장 사항에 따라 수행되었다. 이 프로토콜은

Washington University School of Medicine의 Institutional Animal Care and Use Committee에서 승인되었다 (보증 번호 A3381-01). 바이러스 접종은 케타민 염산염과 크실라진으로 마취를 유도하였고, 유지한 상태에서 수행되었으며, 동물의 고통을 최소화하기 위해 모든 노력을 기울였다.

[0224] 암컷 BALB/c 마우스는 Jackson Laboratory (카탈로그 000651)에서 구입했다. 4-5주령의 동물에게 50 μ l PBS에 녹인 ChAdV-empty 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S의 1010 바이러스 입자(vp)를 뒷다리 근육 주사 또는 비강 접종을 통해 면역주사하였다. 면역접종된 동물 중 일부는 1차 면역 접종 후 4주 후에 1차 면역 접종에 사용된 것과 동일한 경로를 사용하여 부스터 접종을 받았다. 백신접종받은 마우스 (10~11-주령)에게 10^8 PFU의 Hu-AdV5-hACE2를 비강 투여하기 전날, 2mg의 항-Ifnar1 mAb(MAR1-5A3, Leinco)를 복강내 주사로 단회 투여했다. Hu-AdV5를 도입한 후 5일차 시점에 마우스에게 4×10^5 FFU의 SARS-CoV-2를 비강으로 접종시켰다. 동물들은 4dpi 또는 8dpi에서 안락사시켰고, 조직을 수확하여 바이러스학적, 면역학적, 병리학적 분석을 실시했다.

[0225] **김앤지 아데노바이러스 벡터의 구축:** 유인원 Ad36 벡터 (ChAd)는 Penn Vector Core of the University of Pennsylvania에서 얻었다. ChAd 게놈은 E1 및 E3B 영역에서 삭제되도록 설계되었다 (GenBank: FJ025917.1; 차례로 뉴클레오타이드 455-3026 및 30072-31869). 변형된 인간 거대세포바이러스 주요 즉각적 초기 프로모터 서열이 보완적인 DNA 가닥에 반시계 방향으로 E1 유전자 대신 통합되었다. CMV 변형에는 TATA 박스와 mRNA 시작 (GenBank: MN920393, 뉴클레오타이드 174211-174212) 사이 동시에 삽입된 (5'-TCT CTA TCA CTG ATA GGG AGA TCT CTA TCA CTG ATA GG GA-3')(서열 식별 번호: 7) tet 오퍼레이터 2 (TetO2)의 두 개 사본이 내포되어 있었다. SARS-CoV-2 S (간기 K986 및 V987에서 두 개 프롤린 치환을 갖고, 이를 S의 융합전 형태를 안정화시키는 사전융합 안정화된 돌연변이체를 인코딩함)는 pSAd36 게놈 플라스미드에서 CMV-tetO2 프로모터 제어 하에 고유한 PmeI 부위에 복제되어 pSAd36-S가 생성되었다. 마찬가지로, 서열 식별 번호: 10, 11, 20, 21로 개시된 돌연변이체 SAR-CoV-2S 단백질도 유사하게 클론되었다. 동시에, 도입유전자가 없는 비어있는 CMV-tetO2 카세트에 갖는 pSAd36-대조군도 생성되었다. pSAd36-S와 pSAd-대조 플라스미드는 PacI 제한 효소로 선형화되어, T-Rex 293-HEK 세포 (Invitrogen)에 형질감염시킬 수 있는 바이러스 게놈을 방출했다. 추출된 복제-불능 ChAd-SARS-CoV-2-S 및 ChAd-대조군 벡터는 293개 세포에서 확대되었고, CsCl 밀도-구배 초원심분리로 정제되었다. 각 벡터 준비물의 바이러스 입자 농도는 260nm에서 분광 광도법을 통해 결정되었다.

[0226] **인간 아데노바이러스 벡터 발현시키는 인간 ACE2의 구축:** 코돈-최적화된 hACE2 서열을 셔틀 벡터 (pShuttle-CMV, Addgene 240007)로 클론시켜 pShuttle-hACE2를 생성시켰다. pShuttle-hACE2를 PmeI을 이용하여 선형화시키고, 후속적으로 *E. coli* 균주 BJ5183로 the HuAdv5 백본 플라스미드 (pAdEasy-1 벡터; Addgene 240005)를 공동-형질전환시켜, 상동성 재조합에 의해 pAdV5-ACE2를 만들었다. HuAdv5 게놈을 함유하는 pAdEasy-1 플라스미드는 E1 유전자 및 E3 유전자에 결실을 보유한다. hACE2는 사이토메갈로바이러스 프로모터의 전사 제어 하에 있고, 3' 단부에는 SV40 폴리아데닐화 신호가 측면에 위치한다. pAd-hACE2는 T-Rex 293 HEK 세포 (Invitrogen)에 형질감염되기 전, PacI 제한 효소로 선형화되어 HuAdv5-hACE2를 생성시켰다. 재조합 HuAdv5-hACE2는 293-HEK 세포에서 생산되었으며, CsCl 밀도-구배 초원심분리로 정제되었다. 상기 바이러스 역가는 293-HEK 세포에서 플라크 분석에 의해 결정되었다.

[0227] **제자리 RNA 혼성화 및 조직학:** RNA 제자리 혼성화는 제조업체의 지침에 따라 RNAscope 2.5 HD (Brown) (Advanced Cell Diagnostics)를 사용하여 수행되었다. 부검 시 좌측 폐 조직을 수집하여, 10% 중성 완충 포르말린(NBF)으로 팽창시킨 후, 처리하기 전 7일 동안 10% NBF에 담가 고정시켰다. 파라핀-매립된 폐 절편을 60°C에서 1시간 동안 항온처리하여 파라핀을 제거하였고, 내인성 과산화효소를 실온에서 10분 동안 H₂O₂로 처리하여 제거했다. 슬라이드를 RNAscope Target Retrieval Reagents에서 15분간 끓인 후, SARS-CoV2 RNA 프로브 (Advanced Cell Diagnostics 848561) 혼성화 및 신호 증폭을 실시하기 전에 RNAscope Protease Plus 시약에서 30분간 항온처리했다. 절편들을 Gill의 헤마톡실린으로 대조 착색시켰고, 명시야(brightfield) 현미경으로 시각화했다. 일부 폐 절편은 헤마톡실린-에오신 착색시킨 후, 조직학적 검사를 위해 처리되었다.

[0228] **SARS-CoV-2 중화 분석:** 열 불활성화된 혈청 샘플을 연속 희석하여 37°C에서 1시간 동안 10^2 FFU의 SARS-CoV-2와 함께 항온처리했다. 상기 바이러스-혈청 혼합물을 96웰 플레이트의 Vero 세포 단층 층에 첨가하였고, 37°C에서 1시간 동안 항온처리했다. 이어서, 세포 위에 2% FBS가 보충된 MEM에 1% (w/v) 메틸셀룰로오스를 적층시켰다. 고정하기 전 30시간 동안 플레이트를 실온에서 1시간 동안 PBS에 4% PFA를 첨가하여 항온처리했다. 세포를 세척한 다음, 0.1% (w/v) 사포닌 (Sigma)과 0.1% BSA가 보충된 PBS에서 항-SARS-CoV-2 CR3022 항체 (Yuan et al., 2020)(1 μ g/mL)와 HRP-접합된 염소 항-인간 IgG (Sigma)와 순차적으로 항온처리했다. TrueBlue 과산화효소 기

질(KPL)을 사용하여 BioSpot 분석기(Cellular Technology Limited)에서 초점을 세기 전에 플레이트를 현상했다. 루시퍼라제 발현시키는 SARS-CoV-2에 대한 중화 실험의 경우, 혈청 샘플을 1:50으로 시작하여 3배로 희석한 다음, 각 재조합 바이러스 (야생형 및 D614G) 85 PFU와 혼합했다. 투명-바닥 검은-벽 96-웰 플레이트 (Corning)에 도달한 Vero E6 세포에 혈청-바이러스 혼합물을 접종하였고, 세포를 37℃에서 48시간 동안 항온처리했다. 그 후, 세포를 용해시켰고, 루시퍼라제 활성을 제조업체의 사양에 따라 Nano-Glo Luciferase Assay System (Promega)을 사용하여 측정했다.

[0229] *Hu-AdV5 중화 분석*: Hu-AdV5-hACE2 전환 1일 전, ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S로 근육 내 면역을 접종한 쥐의 혈청 샘플을 채취했다. 혈청은 열-불활성화되었으며, 37℃에서 1시간 동안 10^2 FFU의 HuAdV5와 항온처리하기 전에 연속 희석되었다. 바이러스-혈청 혼합물을 96-웰 플레이트의 HEK293 세포 단층에 첨가하였고, 37℃에서 1시간 동안 항온처리했다. 그런 다음, 세포 위에 5% FBS가 보충된 MEM에 1% (w/v) 메틸셀룰로오스를 적층시켰다. 고정하기 전, 플레이트를 37℃에서 48시간 동안 항온처리하였고, 후 실온에서 1시간 동안 PBS에 2% PFA를 첨가하여 고정시켰다. 이어서, 플레이트를 PBS로 세척하였고, 투과성 완충액 (0.1% (w/v) 사포닌과 0.1% BSA가 보충된 PBS)에 희석한 바이오틴화된 항-HuAdV5-핵소 항체 (2 µg/mL; Novus Biologicals NB600413)와 함께 4℃에서 하룻밤 동안 항온처리했다. 플레이트를 다시 세척한 후, 투과성 완충액에서 스트렙타비딘-HRP(1:3000; Vector Laboratories SA-5004)와 함께 실온에서 30분 동안 항온처리했다. 최종 일련의 세척-후, TrueBlue 과산화효소 기질(KPL)을 사용하여 플레이트를 현상하였고, BioSpot 분석기(Cellular Technology Limited)에서 초점을 계수했다.

[0230] *단백질 발현 및 정제*: 2019-nCoV/USA-WA1/2020 SARS-CoV-2 균주로부터 정제된 RNA를 cDNA로 역전사하여 재조합 유전자 클로닝을 위한 템플릿으로 사용했다. 전장의 SARS-CoV-2 NP(NP-FL)는 핵사히스티딘 태그가 있는 pET21a에 복제되었고, Terrific Broth(bioWORLD)에서 BL21(DE3)-RIL *E. coli*를 사용하여 재조합적으로 발현되었다. 25℃에서 이소프로필 β-d-1-티오갈락토피라노사이드(Goldbio)로 하룻밤 유도 후, 세포는 니켈 친화성 정제를 위해 20 mM Tris-HCl pH 8.5, 1 M NaCl, 5 mM β-머캅토에탄올 및 5 mM 이미다졸에서 용해되었다. 500 mM 이미다졸이 보충된 사전 완충액에서 용출한 후, 크기 배제법을 사용하여 단백질을 균질하게 정제하였고, 어떤 경우에는 양이온 교환 크로마토그래피를 사용했다. SARS-CoV-2 RBD 및 S 엑토도메인 (S1/S2 푸린 절단 부위가 파괴되었고, 이중 프롤린 돌연변이가 S2 하위단위로 도입되었고 그리고 폴론 삼량체화 모티프가 통합되었다)은 C-말단 핵사히스티딘 또는 옥타히스티딘 태그와 함께 pFM1.2로 클로닝되었고, Expi293F 세포에 일시적으로 형질 전환되었고, 그리고 이전에 설명한 바와 같이(Alsoussi et al., 2020) 코발트 충전 수지 크로마토그래피(G-Biosciences)로 정제했다.

[0231] *ELISA*: 정제된 항원 (S, RBD 또는 NP)을 50 mM Na₂CO₃ pH 9.6 (70 µL)에 2 µg/mL 농도로 96웰 Maxisorp 투명 플레이트에 코팅하여 4℃에서 하룻밤 동안 보관했다. 코팅 완충액을 흡출시켰고, 웰은 200 µL의 1X PBS + 0.05% Tween-20 + 1% BSA + 0.02% NaN₃ (Blocking buffer, PBSTBA)으로 1 h 동안 37℃에서, 또는 하룻밤 동안 4℃에서 차단시켰다. 열-불활성화된 혈청 샘플을 별도의 96-웰 폴리프로필렌 플레이트에서 PBSTBA에 희석했다. 그런 다음, 플레이트를 1X PBS + 0.05% Tween-20(PBST)로 3번 세척한 다음 각각의 혈청 희석액 50 µL를 첨가했다. 혈청은 차단된 ELISA 플레이트에서 적어도 1시간 동안 실온에서 항온처리되었다. ELISA 플레이트를 다시 PBST로 세 번 세척한 다음, PBST에 1:2000 항-마우스 IgG-HRP(Southern Biotech Cat. #1030-05) 50 µL 또는 PBSTBA(SouthernBiotech)에 1:10000 바이오틴화된 항-마우스 IgG, 항-마우스 IgM 또는 항-마우스 IgA를 첨가했다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 항온처리한 후, PBST로 3번 세척하였고, 1:5000으로 희석한 스트렙타비딘-HRP (ThermoFisher) 용액을 웰에 첨가했다. 실온에서 1시간 동안 항온처리한 후, 플레이트를 PBST로 3번 세척하였고, 1-Step Ultra TMB-ELISA 50 µL를 첨가했다(ThermoFisher Cat. #34028). 12~15분 동안 항온처리한 후, 2 M 황산 50 µL로 반응을 중단시켰다. 황산을 첨가한 후 2분 이내에 450nm에서 각 웰의 흡광도를 관독했다 (Synergy H1). 광학 밀도 측정(450 nm)은 마이크로플레이트 리더(Bio-Rad)를 사용하여 결정했다.

[0232] *ELISpot 분석*: MultiScreen-HA 필터 96-웰 플레이트(Millipore) 플레이트는 4℃에서 하룻밤 동안 3 µg/ml의 SARS-CoV-2 S 단백질로 미리 코팅되었다. PBST로 세척한 후, 플레이트를 배양배지(RPMI, 10% FBS, 페니실린-스트렙토마이신, 1 mM 피루브산나트륨, 0.1 mM 비-필수 아미노산, 10 mM HEPES 및 50 mM β-머캅토에탄올)로 37℃에서 4시간 동안 방치했다. 배양액에 있는 비장세포의 단세포 현탁액을 S 단백질로 코팅된 판에 넣고, 37℃, 5% 습도 CO₂에서 4시간 동안 항온처리했다. PBS 및 PBST로 세척한 후, 플레이트를 바이오틴화된 항-IgG 또는 항-IgA(Southern Biotech)로 항온처리한 다음, 스트렙타비딘 접합된 호스래디시 퍼옥시다제로 항온처리했다 (각각 실온에서 1시간씩). PBS로 추가 세척한 후, 3-아미노-9-에틸카바졸 (Sigma) 기질 용액을 첨가하여 스팟 현상

(spot development)을 실시했다. 물로 씻어내어 이 반응을 중단시켰다. 반점은 Biospot 플레이트 리더 (Cellular Technology)를 사용하여 계수되었다.

[0233] **바이러스 부하 측정:** 케타민과 크실라진 카테일을 사용하여, SARS-CoV-2에 감염된 마우스를 안락사시키고, 장기를 채취했다. 조직을 무게 측정하였고, Dulbecco 변형된 Eagle 배지 (DMEM) 1ml (2% 태아 송아지 혈청(FBS) 함유)에 MagNA Lyser(Roche)를 사용하여 비드로 균질화시켰다. MagMax mirVana 총 RNA 분리 키트(Thermo Scientific)와 Kingfisher 듀오 프라임 추출기(Thermo Scientific)를 사용하여 정제된 조직 균질물에서 RNA를 추출했다. SARS-CoV-2 RNA 수준은 이전에 설명한 바와 같이, 원-스텝 정량 역전사효소 PCR(qRT-PCR) TaqMan 분석법을 통해 측정했다 (Hassan et al., 2020). SARS-CoV-2 뉴클레오패시드 (N) 특이적 프라이머 및 프로브 세트가 이용되었다: (L 프라이머: ATGCTGCAATCGTGCTACAA (서열 식별 번호: 8); R 프라이머: GACTGCCGCTCTGCTC (서열 식별 번호: 9). 바이러스 RNA는 log10 척도에서 밀리그램당 (N)개의 유전자 사본 수로 표현되었다. 일부 샘플의 경우, 바이러스 역가는 Vero E6 세포의 플라크 검사를 통해 확인되었다. 사이토카인과 케모킨 mRNA 측정. 폐 균질물에서 추출한 RNA 폐 균질물에 DNase 처리를 한 후, 제조업체의 프로토콜에 따라 RNase 억제제를 첨가한 고-성능 cDNA 역-전사 키트 (Thermo Scientific)를 사용하여 cDNA를 합성했다. 사이토카인 및 케모킨 발현은 TaqMan Fast Universal PCR 마스터 믹스 (Thermo Scientific)와 다음의 것들에 특이적인 시판되는 프라이머/프로브 세트를 이용하여 측정되었다: IFN- γ (IDT: Mm.PT.58.41769240), IL-6 (Mm.PT.58.10005566), IL-1 β (Mm.PT.58.41616450), TNF- α (Mm.PT.58.12575861), CXCL10 (Mm.PT.58.43575827), CCL2 (Mm.PT.58.42151692), CCL5 (Mm.PT.58.43548565), CXCL11 (Mm.PT.58.10773148.g), IFN- β (Mm.PT.58.30132453.g), 및 IFN γ -2/3 (Thermo Scientific Mm04204156_gH), 그리고 그 결과들은 GAPDH (Mm.PT.39a.1) 수준으로 정규화되었다. 배수 변화는 무경험 대조군에 대해 처리된 마우스를 비교하는 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 이용하여 측정되었다.

[0234] **펩티드 제자극 및 세포 내 사이토카인 착색:** 근육 내 백신접종된 마우스로부터의 비장 세포를 브레펠딘 A (Biolegend, 420601)로 4 시간 처리-전, 37°C에서 12 시간 동안 15-mer SARS-COV-2 S 펩티드가 중첩되는 253개의 푸울과 함께 배양에서 항온처리하였다. Fc γ R 항체 (BioLegend, 클론 93)으로 차단후, 얼음 위에서 세포를 CD45 BUV395 (BD BioSciences 클론 30-F11); CD44 PE-Cy7, CD4 PE-Cy5, CD8b PreCP-Cy5.5, 및 CD19 APC-Cy7 (BioLegend 클론, IM7, GK1.5, YTS156.7.7, 및 6D5 차례로), 그리고 Fixable Aqua Dead Cell Stain (Invitrogen, L34966)로 착색시켰다. 착색된 세포는 고정되었고, Foxp3/전사 인자 착색 완충액 세트 (eBioscience, 00-5523)로 투과성이 향상되었다. 후속적으로, 세포내 착색은 항-IFN- γ Alexa 647 (BD Biosciences, 클론 XMG1.2), 항-TNF α BV605 (BioLegend, 클론 MP6-XT22) 및 항-GrB PE (Invitrogen, GRB04)로 수행되었다. 비장 면역화된 마우스의 폐를 수확하여 (167 μ g/ml)의 Liberase DH (Sigma) 및 (100 μ g/ml)의 DNase I (Sigma)가 보충된 RPMI 배지로 구성된 소화 완충액에서 37°C에서 1시간 동안 절단했다. 폐 세포는 위에서 설명한 253개의 중첩된 15-mer SARS-CoV-2 S 펩티드 푸울과 함께 37°C에서 브레펠딘 A의 존재 하에 37°C에서 5시간 동안 항온처리되었다. 그런 다음, 폐 세포는 CD4-PE-Cy5를 대체한 CD4-BV421(BioLegend 클론 GK1.5)을 제외하고, 위에서 설명한 대로 염색되었고, CD19 착색이 내포되지 않았으며, CD103-FITC와 CD69-BV711(BioLegend 클론, 각각 2E7과 H1.2F3)이 추가되었다. 분석은 FlowJo X 10.0 소프트웨어를 사용하여 BD LSRFortessa X-20 세포분석기로 수행되었다.

[0235] **유동 세포분석-기반의 항원 특징화:** HEK-293T 세포는 ChAd-SARS-CoV-2-S(MOI 5)로의 전환 24h 전, 6-웰 플레이트에 10^6 개/웰의 세포로 씨딩되었다 (MOI 5). 20시간 후, 세포를 수확하였고, 고정시키고 Foxp3 전사 인자 착색 완충액 세트(Thermo Fisher)를 사용하여 투과시키고 다음의 항-SARS-CoV-2 중화 마우스 mAbs로 항온처리한 후 바이러스 항원에 대해 착색했다: SARS2-01, SARS2-02, SARS2-07, SARS2-11, SARS2-12, SARS2-16, SARS2-18, SARS2-20, SARS2-21, SARS2-22, SARS2-23, SARS2-29, SARS2-31, SARS2-32, SARS2-34, SARS2-38, SARS2-39, SARS2-50, SARS2-55, SARS2-58, SARS2-66, 및 SARS2-71 (L. VanBlargan and M. Diamond, 공개되지 않은 결과). 동형(isotype)-일치되는 항-HCV E2 mAb인 H77.39가 음성 대조군으로 사용되었다. 세포를 세척하였고, Alexa Fluor 647 접합 염소 항 마우스 IgG(Thermo Fisher)로 항온처리한 후 MACSQuant Analyzer 10(Miltenyi Biotec)을 사용하여 유세포 분석기로 분석했다. 주어진 mAb에 대해 양성 반응을 보인 세포의 백분율을 항-SARS-CoV-2 mAb의 올리고클론 혼합물로 포화시킨 양으로 착색시킨 세포와 비교했다.

[0236] **실시예 2: 비장 내 백신은 마우스에서 SARS-CoV-2 변종에 대해 내구성 있는 보호 효과를 나타낸다**

[0237] 항체 중화 작용을 감소시키는 SARS-CoV-2 변종은 백신 효능과 COVID-19 팬데믹의 종식을 위협할 수 있다. 실시예 1은 동물에서 단일-분량투여의 비장 투여 스파이크 단백질-기반 침팬지 아데노바이러스-백터화된 백신(ChAd-SARS-CoV-2-S)의 보호 활동을 보여주며, 이는 인간을 대상으로 한 시험으로 진행되었다. 본 실시예는 마우스에

서의 내구성, 분량투여-반응, 교차-보호 활성을 제공한다. ChAd-SARS-CoV-2-S를 비강으로 단일 분량투여하면 혈청에서 지속적으로 높은 중화 항체와 Fc 효과 항체 반응이 유도되었고, 골수에서 S-특이적 IgG와 IgA를 분비하는 장수형 형질 세포가 유도되었다. 100배의 백신 분량투여 범위와 200-일 기간 동안 역학적 SARS-CoV-2 균주에 대한 보호 효과가 관찰되었다. 백신접종-후 6주 또는 9개월 시점에, 혈청 항체는 B.1.351 및 B.1.1.28 스파이크 단백질을 이용해 SARS-CoV-2 균주를 중화시켰고, 공격-후 상부 호흡기관 및 하부 호흡 기관에서 거의 완전한 보호 효과를 나타냈다. 따라서, 마우스에게 실시한 실험에서 ChAd-SARS-CoV-2-S를 비강으로 접종한 것이 기존 균주 및 새로운 SARS-CoV-2 균주에 대해 지속적인 보호 효과를 제공하는 것으로 나타났다.

[0238] SARS-CoV-2 바이러스의 스파이크 (S) 단백질은 항체-기반 및 백신 대응의 주요 표적이다. S 단백질은 바이러스의 주요 부착 및 진입 인자 역할을 하며, 세포 표면 수용체인 안지오텐신 전환 효소 2(ACE2)와 결합해 SARS-CoV-2가 인간 세포로 진입하는 것을 촉진한다. SARS-CoV-2 S 단백질은 절단되어 S1과 S2 단편을 생성하는데, S1 단백질은 수용체 결합 도메인 (RBD)을 함유하고, S2 단백질은 막 융합과 세포질로의 바이러스 침투를 촉진한다. SARS-CoV-2 S 단백질의 융합-전 형태는 강력하게 중화하는 단일 클론 항체나 단백질 억제제에 의해 인지된다.

[0239] SARS-CoV-2 S 단백질을 표적으로 하는 많은 백신 후보는 DNA 플라스미드, 지질 나노입자로 캡슐화된 mRNA, 불활성화된 바이러스 입자, 단백질 하위단위 또는 바이러스 벡터 백신 플랫폼을 사용하여 개발되었다. 근육 주사(IM)로 투여되는 몇 가지 백신 (가령, Pfizer/BioNTech BNT162b2; Moderna 1273 mRNA; Johnson & Johnson Ad26.COV2 및 AstraZeneca ChAdOx1 nCoV-19 아데노바이러스 플랫폼)들은 전 세계적으로 수억 회분의 백신이 투여된 많은 국가에서 긴급 사용 승인을 받았다(covid19.who.int).

[0240] 근육 주사로 투여된 백신은 심각한 질환과 사망을 예방하는 강력한 전신 면역을 유도하기는 하지만, 특히 상부 기도 감염이 감소하지 않을 경우 SARS-CoV-2 전염을 억제할 수 있는 능력에 대한 의문이 여전히 남아 있다. 실제로, IM-투여되는 많은 백신은 전-임상 연구에서 상부 기도 감염 및 전염에 대해 다양한 보호 효과를 보였으며 실질적인 점막 면역 (IgA)을 유도하지 못했다. 이 문제는 스파이크 단백질에 치환을 갖는 B.1.1.7, B.1.351, B.1.1.28을 비롯한 전염성이 더 강한 SARS-CoV-2 변이체들의 등장으로 인해 중요하다. 슈도바이러스(pseudoviruses)와 진짜 SARS-CoV-2 균주를 이용한 실험 결과, 백신으로 유도한 혈청에 의한 중화 작용은 L452, E484 및 기타 위치들에서 스파이크 유전자의 돌연변이를 나타내는 변이체에 비해 약하다는 사실이 밝혀졌다. 보호에 대한 부정적인 영향이 있을 수 있다는 점 외에도, 특정 변이체에 대한 면역력이 약화되고, 호흡기 점막에서 자연적으로 더 낮아진 항-S IgG 수치가 결합되면, 상부 기도에서 내성의 추가 선택에 대한 조건 및 일반 대중으로 전파될 수 있는 환경이 조성될 수 있다.

[0241] 본원에서 기술된 바와 같이, 단일-분량투여, 비강 (IN)-전달된 침팬지 아데노바이러스 (원숭이 Ad-36)-기반 SARS-CoV-2 백신 (ChAd-SARS-CoV-2-S)은 융합-전 안정화된 S 단백질을 인코딩하는데, 이는 강력한 체액성, 세포성, 점막 면역 반응을 유도하고, K18-hACE2 형질전환 마우스, 햄스터 및 비-인간 영장류에서 상부 기도 감염 및 하부 기도 감염을 제한한다. 인체 임상시험 (BBV154, 임상시험 NCT04751682) 단계에 이미 들어간 이 백신은 현재 일부 국가에서 긴급 사용이 허가된 침팬지 Ad-23-기반 SARS-CoV-2 백신인 ChAdOx1 nCoV-19와 상이하다. 여기에서, ChAd-SARS-CoV-2-S의 잠재적 유용성을 평가하기 위한 추가 단계로서, 마우스에서의 분량투여-반응, 지속성, 교차-보호 활성, 상부 기도 감염에 대한 효과를 평가했다. IN 면역화 후 약 9개월이 지나 ChAd-SARS-CoV-2-S 백신을 접종한 동물의 혈청에서 중화 항체와 항-S 단백질 IgA 수치가 높은 수준을 유지했으며, B.1.351 및 B.1.1.28 스파이크 단백질을 함유한 SARS-CoV-2 균주에 의한 감염을 억제했다. 현재, 감염성 K18-hACE2 형질전환 마우스는 B.1.351 스파이크 단백질을 나타내는 SARS-CoV-2 바이러스로 공격받은 후에도 상부 호흡기 감염 및 하부 호흡기 감염으로부터 완전히 보호되었다.

[0242] 결과

[0243] 단일 ChAd-SARS-CoV-2-S 면역화는 다양한 복용량에서 지속적인 항스파이크 및 중화 반응을 유도한다: ChAd-SARS-CoV-2-S의 분량투여를 증가시키면서(10^8 , 10^9 , 및 10^{10} 바이러스 입자 [vp]) 또는 10^{10} vp의 ChAd-대조군 백신으로 IM-면역화 또는 IN-면역화 후 100일 또는 200일 시점에서 BALB/c 마우스의 체액 면역 반응의 지속성을 평가했다 (도 10A). 먼저, ELISA를 통해 항-S, 항-RBD IgG와 IgA 수치를 측정했다. 백신접종-후 1개월 시점, 30일, 100일 또는 200일 시점의 이전 결과와 일치하게, ChAd-SARS-CoV-2-S를 사용한 IN-면역 접종은 IM-면역 접종 또는 ChAd-대조군을 사용한 백신 접종보다 우수한 항체 반응을 유도했다 (도 10B-10M 및 도 11). 혈청 내 항-S 및 항-RBD 특이적 결합 IgG 수치는 100일 또는 200일 시점에서 IM 면역접종보다 IN 면역접종 후에 더 높았다. 10^{10} , 10^9 , 및 10^8 vp의 ChAd-SARS-CoV-2-S로 IN 면역접종 후 100일 차 시점에서, S-특이적 IgG 반응의 기하

학적 평균 역가(GMT)는 1.1×10^6 , 4.8×10^5 , 및 2.6×10^5 이었고, RBD-특이적 IgG는 3.2×10^5 , 1.8×10^5 , 및 8.7×10^4 이었다 (도 10B). 비교하면, 10^{10} , 10^9 , 및 10^8 vp의 ChAd-SARS-CoV-2-S로 IM 면역접종 후 100일 시점에서 S- 및 RBD-특이적 IgG 반응은 4 내지 6배 더 낮았고 ($P < 0.0001$), S-특이적 IgG 역가는 2.1×10^5 , 1.1×10^5 , 및 4.5×10^4 이었고, RBD-특이적 IgG 역가는 5.1×10^4 , 2.9×10^4 , 및 2.3×10^4 이었다 (도 10E). IN-면역화 또는 IM-면역화-후 200일 시점에 S- 및 RBD-특이적 IgG 역가에서 유사한 분량투여 반응이 관찰되었다 (도 10H 및 도 10K). 10^{10} , 10^9 , 및 10^8 vp의 ChAd-SARS-CoV-2-S로 IN-면역접종 후 200일차 시점에서, S-특이적 IgG의 GMT는 2.8×10^6 , 2.4×10^6 , 및 1.2×10^6 이었고, RBD-특이적 IgG는 1.1×10^6 , 6.1×10^5 , 및 3.2×10^5 이었다 (도 10H). 10^{10} , 10^9 , 및 10^8 vp의 ChAd-SARS-CoV-2-S로 IM 면역주사 후 200일차 시점에서, S-특이적 IgG의 GMT는 8.1×10^5 , 6.9×10^5 , 및 2.6×10^5 이었고, RBD-특이적 IgG GMT는 1.4×10^5 , 1.3×10^5 , 및 8.0×10^4 이었다 (도 10K). 따라서, IN 면역접종 후에 항-S 및 항-RBD IgG 수치가 IM 면역접종 후 보다 더 높았으며, 단일-분량투여 백신접종 후 몇 달이 지나도 혈청에서 증가는 지속되었다.

[0244] 다음으로 혈청 IgA 반응의 유도과 지속성을 평가했다. IM 면역화는 S- 또는 RBD-특이적 IgA를 유도하지 못했지만(도 1F 및 L), IN-면역접종 후 100일 또는 200일차 시점에 상당한 수준의 항-S- 및 RBD-IgA가 검출되었다 (도 1C 및 I). 10^{10} , 10^9 , 및 10^8 vp의 ChAd-SARS-CoV-2-S로 IN 면역접종-후 100일차 시점에서, S-특이적 IgA의 GMT는 4.8×10^3 , 1.2×10^3 , 및 8.4×10^2 이었고, RBD-특이적 IgA는 2.2×10^3 , 4.6×10^2 , 및 2.9×10^2 이었다 (도 1C). IgG에서 본 바와 같이, IgA 수준은 시간이 경과함에 따라 증가를 지속하였고, 10^{10} , 10^9 , 및 10^8 vp의 ChAd-SARS-CoV-2-S로 IN 면역접종 후 200일차 시점에서 S-특이적 IgA의 GMT는 1.1×10^4 , 7.4×10^3 , 및 5.4×10^3 이었고, RBD-특이적 IgA는 5.2×10^3 , 3.8×10^3 , 및 9.8×10^2 이었다 (도 1I).

[0245] 그 다음, 혈청학적 반응의 기능적 상관관계는 쏫점-감소 중화 테스트 (FRNT)를 이용하여 중화 활성을 검정하여 평가되었다 (도 10D, 도 10G, 도 10J, 도 10M 및 도 11). 예상대로, ChAd-대조군으로 치료한 마우스의 혈청에서는 중화 활동이 감지되지 않았다. ChAd-SARS-CoV-2-S의 10^{10} , 10^9 및 10^8 vp로 IN 면역접종한 후 100일차에 평균 유효 절반-최대 저해 역가[EC50]는 각각 39,449, 9,989 및 7,270이었다 (도 10D). 비교해보면, ChAd-SARS-CoV-2-S의 10^{10} , 10^9 , 및 10^8 vp로 IM 면역접종을 실시한 후, 이 시점에서 EC50 값은 각각 4,988, 2,017 및 391로 8-20배 더 낮았다 ($P < 0.0001$) (도 10G). ChAd-SARS-CoV-2-S의 10^{10} , 10^9 , 및 10^8 vp로 IN 면역접종한 후 200일차 시점에 관찰된 더 높은 항-S 및 RBD 역가와 일치하여, EC50 값은 각각 45,591, 22,769 및 23,433이었다 (도 10J). 비교해보면, ChAd-SARS-CoV-2-S의 10^{10} , 10^9 , 및 10^8 vp로 IM 면역접종을 실시한 후 200일차 시점에서 EC50 값은 각각 2,524, 940, 716으로 훨씬 낮았다 (도 10M).

[0246] 장수-형 형질 세포(LLPCs)는 골수에 존재하며, 혈청 수치와 상관관계가 있는 높은 수준의 항체를 구성적으로 분비한다. ChAd-SARS-CoV-2-S 10^{10} vp로 IM- 또는 IN-면역접종 후 200일차 시점에 항원-특이적 LLPCs 수준을 평가하기 위해, CD138⁺ 세포를 골수에서 분리하여 ELISPOT 분석을 사용하여 S-특이적 IgG 또는 IgA 생성을 평가했다. IN 면역접종 후 IM 면역접종 후 보다 S-특정 IgG를 분비하는 LLPC의 빈도가 ~4배 더 높은 것으로 관찰되었다 (도 10N). 추가적으로, IN 면역화-후, IM 면역화 후에는 존재하지 않았던 S-특이 IgA를 생성하는 LLPCs의 수가 더 많이 검출되었다 (도 10N). 이러한 데이터를 종합하면 다음 사항이 확인된다: (a) 단일-분량투여 IN 면역접종은 IM 면역접종보다 우수한 체액 면역을 촉진한다; (b) ChAd-SARS-CoV-2-S의 100-배 더 낮은 접종 분량투여는 마우스에서 강력한 중화 항체 반응을 유도한다; (c) IN 면역화는 혈청 IgA 반응과 SARS-CoV-2 S 단백질에 대한 IgA-특이적 LLPCs를 유도한다; 그리고 (d) ChAd-SARS-CoV-2-S에 의해 유도된 체액 면역은 지속적이며 백신접종 후 6개월 동안 증가한다.

[0247] ChAd-SARS-CoV-2-S의 IN 접종은 Fc 작동체 기능 용량을 통해 광범위한 항체 반응을 유도한다: 체액 반응을 더욱 자세히 특성화하기 위해, BALB/c 마우스로부터 유래된 혈청을 사용하여 SARS-CoV-2 변이체 단백질에 대한 항체 결합과 Fc 작동체 기능을 IN 또는 IM 백신접종-후 90일차 시점에 분석했다. 우리의 SARS-CoV-2 단백질 패널에는 WA1/2020, B.1.1.7, B.1.351, B.1.1.28 균주에 해당하는 스파이크 (D614G, E484K, N501Y, Δ69-70, K417N) 및 RBD (E484K) 항원이 내포되어 있었다. 먼저, 루미넥스 플랫폼을 사용하여 여러 동형(IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM 및 IgA)에 대한 항-SARS-CoV-2 특이적 항체 반응과 Fcγ 수용체 (마우스 FcγRIIB, FcγRIII, Fcγ

RIV)에 결합하는 능력을 측정했다. ELISA로 얻은 데이터와 일치하게(도 10B 및 도 10E), ChAd-SARS-CoV-2-S의 IN 백신접종은 IM 면역접종보다 D614G 스파이크 및 WA1/2020 RBD 단백질에 대한 IgG1 수치가 더 높았고, 예상대로 백신 투여분량을 줄이면 항체 역가가 더 낮아졌다(도 12A). IN 면역접종-후, 항-SARS-CoV-2 IgG1 역가는 IM 면역접종-후보다 모든 스파이크 및 RBD 변종에 대해 더 높았으며, 역가는 백신 분량투여에 따라 감소했다(도 12B). 히트맵에 표시된 대로, 이러한 경향은 모든 항-SARS-CoV-2 특이적 항체 동형에 대해 관찰되었으며, Fc γ R 결합 패턴과 상관 관계가 있다(도 12C). 이들 데이터에서 IN 백신접종이 IM 백신접종보다 SARS-CoV-2에 대한 더 큰 규모의, 그리고 더 광범위한 항체 하위유형 반응이 유도됨을 시사한다.

[0248] 항체 작동체 기능, 이를 테면, 옵소닌화(opsonization)는 부분적으로 Fc γ 수용체 결합을 통해 매개된다. 항체 역가와 Fc γ R 결합 역가의 관찰된 차이가 작동체 기능의 차이를 초래하는지 확인하기 위해, 항체-의존적 호중구(ADNP) 및 세포 식세포작용(ADCP) 분석이 수행되었다(도 12D-12E). IN 백신접종된 마우스의 혈청은 IM 백신접종된 마우스의 혈청보다 ADNP를 실질적으로 더 많이 자극했다. 그러나, IN 백신접종 및 IM 백신접종-후, 유래된 항체에서 ADCP의 최소한의 차이가 나타났다(도 12D-12E). 이들 데이터는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 이용한 IN 백신접종이 IM 백신접종-후 보다 더 크고, 기능적인 항체 반응을 유도한다는 것을 보여준다.

[0249] *비강 투여된 ChAd-SARS-CoV-2-S는 BALB/c 마우스에서 SARS-CoV-2 공격에 대한 지속적인 보호를 유도한다:* ChAd-SARS-CoV-2-S 백신의 효능을 평가하기 위해, 도 10A 에서 기술된 분량투여 요법을 제공받은 면역화된 BALB/c 마우스를 SARS-CoV-2로 공격했다. 바이러스 공격은 Hu-Ad5-hACE2의 체내 도입에 의해 선행되었고, 이를 통해 BALB/c 마우스에서 hACE2의 이소성(ectopi) 발현과 과거 SARS-CoV-2 균주에 의한 SARS-CoV-2의 생산적 감염이 가능해졌다. 동물은 ChAd-대조군의 10^{10} vp 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S의 10^8 , 10^9 , 또는 10^{10} vp로 IN 또는 IM 경로를 통해 한 번 면역접종을 받았다. 백신접종-후 95일 또는 195일차 시점에 마우스에게 Hu-Ad5-hACE2 및 항-Ifnar1 mAb의 10^8 플라크-형성 단위(PFU)를 투여하였고; 후자는 선천 면역을 약화시키고, 이 모델에서는 병인성을 증가시킨다. 5일 후, BALB/c 마우스에게 IN 경로를 통해 5×10^4 FFU (초점 형성 단위)의 SARS-CoV-2(균주 WA1/2020)를 투여했다. 감염-후 4일차(dpi)에, 면역접종-후 100일차 시점에 공격받은 마우스로부터 폐, 비강 및 심장을 채취했으며, 면역접종-후 200일차 시점에 공격받은 제2 코호트에서는 비강 비강 및 비강 세척액을 수집했다. 조직은 서브게놈 RNA (N 유전자)에 대한 프라이머를 사용하여 정량 역-전사 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR)을 통해 바이러스 부하에 대해 평가되었다. 3가지 분량투여로 IN 면역 접종은 ChAd-대조군 백신을 접종한 동물에 비해 백신접종 후 100일차 시점에 폐, 비강 및 심장에서 바이러스 RNA가 거의 없다는 증거에 의해 놀라운 보호 효과를 유도했다(도 13A-13C). 면역접종-후 200일차 시점에, IN으로 전달된 ChAd-SARS-CoV-2-S의 보호 효과는 ChAd-대조군에 의해 면역화된 마우스와 비교했을 때, 상부 호흡기관 및 하부 호흡 기관에서 강력한 수준을 유지했다. 그럼에도 불구하고, ChAd-SARS-CoV-2-S의 가장 낮은 10^8 vp의 분량투여로 면역접종된 동물의 폐와 비강 비강에서 제한된 감염 돌파가 관찰되었다(도 13G 및 도 13I). 비교해 보면, IM-면역접종 후 100일차 시점의 보호 효과는 동일한 도전 시점에서 IN 면역접종을 한 경우 보다 낮았다. 심장과 비강에서는 바이러스 RNA가 검출되지 않았지만(도 13E-13F), IM 경로로 ChAd-SARS-CoV-2-S로 면역화된 마우스의 폐에서는 IN 경로에 비해 최소 1,000~30,000배($P < 0.0001$) 더 높은 수치가 측정되었다(도 13A 및 도 13D). 10^8 vp의 분량투여에서 폐의 바이러스 RNA 부하 감소가 더 이상 ChAd-대조군으로 백신접종된 마우스와 다르지 않았기 때문에, IM 경로를 통한 분량투여의 더 큰 영향이 또한 관찰되었다(도 13D). IM-면역접종 후 200일차 시점에 폐, 비강 세척액 및 비강 비강에서 SARS-CoV-2 감염으로부터의 보호 효과가 IN 면역접종-후 보다 낮은 것으로 관찰되었다(도 13G-13L).

[0250] *ChAd-SARS-CoV-2-S는 hACE2 형질전환 마우스에서 지속적인 면역을 유도한다:* 다음으로, K18-hACE2 C57BL/6 마우스에서 체내 전달된 ChAd-SARS-CoV-2-S의 면역원성을 평가했는데, 이 마우스는 BALB/c 마우스보다 SARS-CoV-2 감염에 더 취약하다. 5-주령 K18-hACE2 마우스에 IN 경로를 통해 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S 10^9 vp를 접종했다. 6-주 후에 혈청 샘플을 채취하여, 체액성 면역 반응을 평가했다. ChAd-SARS-CoV-2-S 면역접종으로 S 및 RBD 특이 IgG 및 IgA의 높은 수치가 유도되었지만, ChAd-대조군에 의해서는 그러지 않았다(도 14A-14B). B.1.351 및 B.1.1.28 변이체의 스파이크 단백질을 갖는 WA1/2020 및 기타 두 가지 SARS-CoV-2 균주들에 대한 중화 항체 역가는 FRNT 분석을 통해 측정되었다(도 14C-14D 및 도 16). ChAd-SARS-CoV-2-S의 단일 IN 분량투여 후 WA1/2020에 대하여 수준의 중화 항체가 유도되었다(EC50 9,591). 백신-유도된 인간 혈청에서 볼 수 있듯이, WA1/2020와 비교하여 Wash-B.1.351 (~5-배, $P < 0.0001$; 도 14C) 및 Wash-B.1.1.28 (~3-배, $P < 0.0001$; 도 14D) SARS-CoV-2 균주에 대항하는 중화 항체의 역가는 감소됨이 관찰되었다. 체액 반응의 내구성을

평가하려면, 별개의 K18-hACE2 마우스 코호트는 IN 경로를 통해 면역접종을 받았고, 혈청 샘플은 9개월 후에 수집되었다. ChAd-SARS-CoV-2-S는 이 시점에서 S- 및 RBD-특이적 IgG와 IgA의 높은 수준을 유도했으며, WA1/2020에 대한 중화 항체(EC50은 12,550)를 유도했다 (도 14E-14H 및 도 16). Wash-B.1.351 및 Wash-B.1.1.28 바이러스에 대해 테스트하였을 때, WA1/2020에 비교하여 중화 역가의 감소가 관찰되었지만 (~6 내지 8-배, $P < 0.05$; 도 14G-14H), 여전히 높은 수준이 유지되었다 (차례로, EC50 1,627 및 1,918).

[0251] ChAd-SARS-CoV-2-S는 hACE2 형질전환 마우스에서 Wash B.1.351 및 Wash-B.1.1.28 공격에 대한 교차-보호를 부여한다: 관심 변이체에 해당하는 스파이크 유전자를 갖는 WA1/2020 및 두 개의 키메라 바이러스 (Wash-B.1.351 및 Wash-B.1.1.28)에 대한 ChAd-SARS-CoV-2-S의 보호 효능이 테스트되었다 (도 15A). 5-주령 K18-hACE2 마우스는 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S의 단일 10^9 vp 분량투여로 IN 경로를 통해 면역접종을 받았다. 6주 후, 마우스에게 IN 경로로 10^4 FFU의 Wash-B.1.351, Wash B.1.1.28 또는 WA1/2020로 공격했다. ChAd-SARS-CoV-2로 면역된 모든 마우스는 체중 감소를 보이지 않았고, 한편 대부분의 ChAd-대조군으로 백신접종 받은 마우스는 3-6dpi에서 상당한 체중 감소를 경험했다 (도 15B, 도 15G, 및 도 15L). 놀랍게도, ChAd-SARS-CoV-2-S 백신접종-후 6dpi에서 상부 호흡기 및 하부 호흡기, 심장 및 뇌에서 SARS-CoV-2 RNA가 거의 검출되지 않았다 (도 15C-15F, 도 15H-15K, 및 도 15M-15O). 교차-보호 반응의 내구성에 대한 추가 테스트로서, 5-주령 K18-hACE2 마우스는 ChAd-대조군 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S의 단일 10^{10} vp 분량투여로 IN 경로를 통해 면역접종을 받았다. 9개월 후, 마우스를 IN 경로를 통해 Wash-B.1.351 10^4 FFU로 공격했다. ChAd-SARS-CoV-2-S 백신접종 받은 마우스는 ChAd-대조군을 투여한 마우스와 달리, 체중을 유지했다 (도 15P). 더욱이, 일부 마우스의 상부 호흡기관 및 하부 호흡 기관, 심장 및 뇌에서 Wash-B.1.351 SARS-CoV-2 RNA의 매우 낮은 양만이 감지되었기 때문에, 실질적인 바이러스 보호가 관찰되었다 (도 15Q-15T).

[0252] 논의

[0253] 백신으로 유발된 면역 반응의 지속성은 SARS-CoV-2 감염에 대한 지속적인 보호를 제공하고, 현재 팬데믹을 억제하는 데 중요하다. 이 연구에서, ChAd-SARS-CoV-2-S를 이용한 단일 IN 면역 접종이 S 및 RBD 특이적 결합과 중화 항체를 유도했으며, 이러한 항체는 수개월 동안 지속적으로 증가하여 지속적인 생식 중심 반응을 시사했다. IN 백신접종-후 6개월 시점에, 골수에서 LLPCs가 검출되었으며, SARS-CoV-2 특이적 IgG와 IgA를 분비했는데, 이것이 순환계에서 지속적으로 높은 항바이러스 항체 수치를 유지하는 데 기여한 것으로 보인다. 비교하면, ChAd-SARS-CoV-2-S를 이용한 IM 면역접종은 혈청 중화 항체 수치를 낮추고, 스파이크-특이적 IgG 분비 LLPCs를 줄였으며, 혈청이나 세포 IgA 반응은 사실상 나타나지 않았다. 적어도 마우스에서, ChAd-SARS-CoV-2-S를 이용한 단일 IN 분량투여 면역접종은 100-분량투여 범위에서 지속적인 체액 면역을 생산하는 것으로 관찰되었다. 이러한 전-임상 면역원성 결과는 SARS-CoV-2에 대한 mRNA 백신을 사용한 인간 연구와 알맞게 비교되며, 최소한 몇 달 이상 지속되는 체액성 면역 반응을 보인다. 이에 비해, SARS-CoV-2에 자연적으로 감염된 후 항체 반응의 지속성은 상당히 다를 수 있다.

[0254] ChAd-SARS-CoV-2-S의 단일 면역 접종은 6개월 동안 여러 시점에서 hACE2-형질전환 BALB/c 마우스 또는 K18-hACE2 형질전환 C57BL/6 마우스에서 SARS-CoV-2(WA1/2020 균주) 감염에 대한 지속적인 보호 효과를 나타냈다. 특히, IN 면역접종은 상부 호흡기 및 하부 호흡기 감염에 대해 사실상 완벽한 바이러스적 보호를 제공했으며, 100-배 낮은 백신 분량투여에서는 제한적인 감염 돌파만이 관찰되었다. 상부 호흡기 감염이 사라지는 것은 IN 백신접종이 전염을 예방할 수 있음을 시사한다. 비교해 보면, IM 면역접종은 폐에서 바이러스 RNA 수치를 감소시켰지만, 상부 호흡기 샘플에서 상동성 WA1/2020 균주에 대한 보호 효과는 상당히 낮은 것으로 나타났다. 다양한 플랫폼의 많은 SARS-CoV-2 백신 후보가 동물 모델에서 면역원성과 보호 효능을 입증했지만, 우리가 하는 한, 어떤 것도 변이체 바이러스에 대한 내구성이나 보호성이 입증되지 않았다. IN 면역접종에 의해 부여되는 장기간 보호는 100-배 더 낮은 접종 분량투여에서도 유망하다. 쥐에서의 결과가 재현된다면, 분량투여 감축 전략(dose sparing strategies)을 통해 대량의 백신을 생산하여 SARS-CoV-2의 감염과 전파를 억제할 수 있을 것이다.

[0255] 수용체 결합 모티프의 아미노산 돌연변이 (가령, B.1.351 및 B.1.1.28)를 동반한 SARS-CoV-2 S 변이체의 출현은 많은 중화 항체의 억제 활동에 대한 저항성을 나타내기 때문에 우려의 대상이다. 실제로, BNT162b2 mRNA 또는 ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) 백신을 접종한 대상체의 인간 혈청은 B.1.351에 대한 중화 효과가 감소한 것으로 나타났다. 우려스럽게도, IM으로 투여된 ChAdOx1 nCoV-19(AZD1222)는 인간에서 경미하거나 중등도의 B.1.351 감염에 대해 보호 효능이 감소된 것으로 나타났다. K18-hACE2 형질전환 마우스에서, IN-전달된 ChAd-SARS-CoV-2-S

의 면역원성을 WA1/2020 및 B.1.1.28 또는 B.1.351 스파이크 단백질을 발현하는 키메라 SARS-CoV-2 균주와 비교했을 때, 변이체 바이러스의 중화율은 3~8배 감소했지만 역가는 >1,000로 유지되었다. ChAd-SARS-CoV-2-S의 IN 면역접종-후 6주차 시점에 K18-hACE2 마우스는 WA1/2020, Wash-B.1.351 및 Wash-B.1.1.28로 인하여 체중 감소와 상부 호흡기, 하부 호흡기 및 뇌 감염으로부터 완전히 보호되었다. 주목할 점은, 단일 IN 면역접종-후 9개월차 시점에 K18-hACE2 마우스의 별도 집단에서 동물이 Wash-B.1.351의 공격으로부터 완전히 보호되었다는 것이다. SARS-CoV-2 백신의 경우 보호 연관성이 완전히 확립되지 않았지만, 변이체 바이러스에 대한 높은 수준의 교차-중화 항체와 강력한 바이러스 특이적 전신 및 점막 CD8⁺ T 세포 반응이 결합되어 보호에 기여할 가능성이 높다. 이 외에도, 항체 작동체 기능은 SARS-CoV-2 감염 및 질병 예방에 도움이 될 수 있다. 실제로, IN-전달된 ChAd-SARS-CoV-2-S에서 유래한 혈청에서는 SARS-CoV-2 변이체 단백질에 대한 향상된 Fc 작동체 기능이 관찰되었으며, 여기에는 강력한 ADNP 및 ADCP 반응 유도가 내포되었다.

[0256] 요약하면, 본 실시예에서는 ChAd-SARS-CoV-2-S를 이용한 IN 면역접종이 SARS-CoV-2에 대한 강력하고 지속적인 IgG 및 IgA 항체 결합, 중화 항체, Fc 작동체 기능 및 LLPC 반응을 유도한다는 것을 보여준다. 마우스의 경우, ChAd-SARS-CoV-2-S를 이용한 단일 IN 면역 접종은 B.1.351 및 B.1.1.28 변이체에 해당하는 스파이크 단백질을 나타내는 SARS-CoV-2 균주에 대한 교차-보호 효과를 제공하며, 이는 백신접종-후 9개월 시점에도 유지되었다. 다양한 동물 모델 30, 31, 32에서의 전-임상 평가 효능과 우려되는 변이체에 대한 지속적인 보호 면역을 고려할 때, ChAd-SARS-CoV-2-S를 IN으로 전달하는 것은 SARS-CoV-2 감염을 예방하고 전염을 억제하는 데 유망한 플랫폼이다.

[0257] **방법**

[0258] **바이러스 및 세포:** Vero E6 (CRL-1586, American Type Culture Collection (ATCC), Vero-TMPRSS2 57, Vero (CCL-81, ATCC) 및 HEK293 (CRL-1573, ATCC) 세포들을 37°C에서 10% 태아 소 혈청 (FBS), 10 mM HEPES pH 7.3, 1 mM 피루베이트 나트륨염, 1X 비-필수 아미노산, 및 100 U/ml 페니실린-스트렙토마이신이 보충된 Dulbecco의 변형된 Eagle 배지 (DMEM)에서 배양시켰다. Vero-TMPRSS2 세포에도 5 µg/mL의 블라스티시딘이 보충되었다.

[0259] SARS-CoV-2 균주 2019n-CoV/USA_WA1/2020(WA1/2020)은 Centers for Disease Control and Prevention에서 구했다. 상기 바이러스는 Vero CCL-81 세포에서 한 번 계대되었고, vero E6 세포에서 초점-형성 분석(FFA)으로 적정되었다. 변이체 스파이크 유전자를 갖는 Wash-B.1.351 및 Wash-B.1.1.28 키메라 바이러스는 이전 28, 58에 설명되었다. 모든 바이러스는 Vero-TMPRSS2 세포에서 한 차례 계대되었고, 차세대 시퀀싱을 통해 치환의 도입과 안정성을 확인했다. 모든 바이러스 실험은 승인된 생물안전 수준 3 (BSL-3) 시설에서 수행되었다.

[0260] **마우스 실험:** 동물 연구는 미국 국립보건원의 실험동물 관리 및 사용 지침(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health)의 권장 사항에 따라 수행되었다. 이 프로토콜은 Washington University School of Medicine의 Institutional Animal Care and Use Committee에서 승인되었다 (보충 번호 A3381-01). 바이러스 접종은 케타민 염산염과 크실라진으로 마취를 유도하였고, 유지한 상태에서 수행되었으며, 동물의 고통을 최소화하기 위해 모든 노력을 기울였다.

[0261] 암컷 BALB/c (카탈로그 000651) 및 K18-hACE2 C57BL/6 (카탈로그 034860) 마우스는 Jackson Laboratory에서 구입했다. 4~5-주령 동물에게 50 µl PBS에 포함된 ChAdV-대조군 1010 vp 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S 10⁸, 10⁹, 또는 10¹⁰ vp를 IM(뒷다리) 또는 IN 주사를 통해 면역접종했다. 백신접종된 BALB/c 마우스 (10~11-주령)에게 Hu-Ad5-hACE2 37 108 PFU를 IN 투여하기 하루 전 날에 항-Ifnar1 mAb(MAR1-5A3 59(Leinco)) 2 mg을 단회 복강내로 주사했다. Hu-Ad5-hACE2 전환-후 5일차 시점에, 마우스에게 IN 경로를 통해 4 x 10⁵ FFU의 WA1/2020 SARS-CoV-2를 접종했다. K18-hACE2 마우스는 면역화 후 지정된 날짜에 IN 경로를 통해 104 FFU의 SARS-CoV-2 (WA1/2020, Wash-B.1.351 또는 Wash-B.1.1.28)를 공격받았다. 동물들은 6dpi에서 안락사시켰고, 바이러스 분석을 위해 조직을 수거했다.

[0262] **침팬지 및 인간 아데노바이러스 벡터:** ChAd-SARS-CoV-2 및 ChAd-대조군 백신 벡터는 유인원 Ad36 백본 60에서 유래되었으며, 구축 및 검증은 본원에 설명되어 있다. 구축된 복제-불능 ChAd-SARS-CoV-2-S 및 ChAd-대조군 벡터는 HEK293 세포에서 확장되었고, CsCl 밀도-구배 초원심분리로 정제되었다. 각 벡터 준비물의 바이러스 입자 농도는 260nm에서 분광 광도법을 통해 결정되었다. Hu-AdV5-hACE2 벡터도 위에 설명되어 있으며, HEK293 세포에서 생산되었다. 바이러스 역가는 HEK293 세포의 플라크 검사를 통해 결정되었다.

[0263] **SARS-CoV-2 중화 분석:** 열-불활성화된 혈청 샘플을 연속 희석하여 10² FFU의 다양한 SARS-CoV-2 균주와 함께 37

℃에서 1시간 동안 항온처리했다. 바이러스-혈청 혼합물을 96웰 플레이트의 Vero 세포 단층에 첨가하였고, 37℃에서 1시간 동안 항온처리했다. 이어서, 세포 위에 2% FBS가 보충된 MEM에 1% (w/v) 메틸셀룰로오스를 적층시켰다. 고정하기 전 30시간 동안 플레이트를 실온에서 1시간 동안 PBS에 4% PFA를 첨가하여 항온처리했다. 세포를 세척한 다음, PBS에 0.1% 사포닌과 0.1% 소 혈청 알부민이 보충된 SARS2-2, SARS2-11, SARS2-16, SARS2-31, SARS2-38, SARS2-57 및 SARS2-71 62 항-S 항체와 HRP-접합된 염소 항-마우스 IgG(Sigma, 12-349)의 올리고클로날 푸울과 순차적으로 항온처리했다. TrueBlue 과산화효소 기질(KPL)을 사용하여 BioSpot 분석기(Cellular Technology Limited)에서 초점을 세기 전에 플레이트를 현상했다.

[0264] **단백질 발현 및 정제:** WA1/2020 SARS-CoV-2 균주에 해당하는 정제된 S 및 RBD 단백질의 복제 및 생산은 이전에 설명되었다. 간략하게 설명하면, 융합-전 안정화된 S 64와 RBD를 헥사히스티딘 태그가 있는 pCAGGS 포유류 발현 벡터에 클론시키고, Expi293F 세포에 일시적으로 형질 전환시켰다. 단백질은 코발트-충전된 수지 크로마토그래피(G-Biosciences)로 정제되었다.

[0265] **ELISA:** 정제된 항원(S 또는 RBD)을 50 mM Na₂CO₃ pH 9.6(70 μ L)에 2 μ g/mL 농도로 96웰 Maxisorp 투명 플레이트에 코팅하고 4℃에서 하룻밤 동안 보관했다. 코팅 완충액을 흡출해낸 후, 웰을 1X PBS + 0.05% Tween-20 + 1% BSA + 0.02% Na₃N(차단 완충액, PBSTBA) 200 μ L로 4℃에서 하룻밤 동안 차단시켰다. 열-불활성화된 혈청 샘플을 별도의 96-웰 폴리프로필렌 플레이트에서 PBSTBA에 희석했다. 그런 다음, 플레이트를 1X PBS + 0.05% Tween-20(PBST)로 3번 세척한 다음 각각의 혈청 희석액 50 μ L를 첨가했다. 혈청은 차단된 ELISA 플레이트에서 적어도 1시간 동안 실온에서 항온처리되었다. ELISA 플레이트를 다시 PBST로 세 번 세척한 다음, PBST에 1:1,000 항-마우스 IgG-HRP (Southern Biotech Cat. #1030-05) 50 μ L 또는 PBSTBA (SouthernBiotech)에 1:1000 항-마우스 IgA-HRP를 첨가했다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 항온처리한 후 PBST로 3번 세척하였고, 1-Step Ultra TMB-ELISA 100 μ L (ThermoFisher Cat. #34028)를 첨가했다. 10~12분 동안 항온처리한 후, 2M 황산 50 μ L로 반응을 중단시켰다. 광학 밀도 측정(450 nm)은 마이크로플레이트 리더(Bio-Rad)를 사용하여 결정했다.

[0266] **ELISPOT 분석:** 골수에서 S-특이적 형질세포를 정량화하기 위해, 대퇴골과 경골을 RPMI 1640에서 유발과 유발을 사용하여 으깨고, 100 μ m 스트레이너로 여과한 후 ACK 용해에 사용했다. CD138⁺ 세포는 제조업체의 지침(EasySep Mouse CD138 Positive Selection, STEMCELL)에 따라 양성 선택 및 자기 비드로 풍부화되었다. 풍부한 CD138⁺ 세포를 SARS-CoV-2 S 단백질로 미리 코팅한 MultiScreen-HA 필터 플레이트(Millipore)에 10% FBS가 보충된 RPMI 1640에서 하룻밤 동안 항온처리했다. 초점은 항-마우스 IgG-바이오틴 또는 항-마우스 IgA-바이오틴 및 스트렙타비딘-HRP로 순차적으로 항온처리한 후 TruBlue 기질(KPL)을 사용하여 발달되었다. BioSpot 기기를 사용하여 플레이트의 이미지를 촬영하고, 초점을 수동으로 계수했다.

[0267] **바이러스 부하 측정:** 케타민과 크실라진 각테일을 사용하여, SARS-CoV-2에 감염된 마우스를 안락사시키고, 장기를 채취했다. 조직을 무게 측정하고, Dulbecco 변형된 Eagle 배지(DMEM) 1ml(2% 태아우시혈청(FBS) 함유)에 MagNA Lyser(Roche)를 사용하여 비드로 균질화했다. MagMax mirVana 전체 RNA 분리 키트(Thermo Scientific)와 KingFisher Flex 추출 시스템(Thermo Scientific)을 사용하여 정제된 조직 균질물에서 RNA를 추출했다. SARS-CoV-2 RNA 수치는 이전 (37)에 설명한 바와 같이, 단계적 정량 역전사 PCR(qRT-PCR) TaqMan 분석법을 통해 측정되었다. SARS-CoV-2 뉴클레오키프(N) 특이적 프라이머와 프로브 세트는 위에서 설명한 대로 사용되었다. 바이러스 RNA는 log10 척도에서 밀리그램당(N)개의 유전자 사본 수로 표현되었다.

[0268] **Luminex 분석:** Luminex 분석은 이전에 설명한 대로 수행되었다. 간략하게 설명하자면, 단백질 (스파이크: D614G, E484K, N501Δ69-70, K417N, B.1.1.7, B.1.351; 수용체 수용체 결합 도메인(RBD) (ImmuneTech): WT, E484K, B.1.1.7, B.1.351, B.1.128)는 Sulfo-NHS 및 EDC (Thermo Fisher)를 사용한 NHS-에스터 링키지를 이용하여 자기 Luminex microplex 카르복실화된 비드에 카르복시-결합되었고, 그 다음 혈청(IgG1, Fc γ RIIb, Fc γ RIII 1:3000; IgG2a, G2b, G3, A, Fc γ RIV 1:1000, IgM 1:500)과 함께 2 h 동안 37℃에서 항온처리되었다. 동형 분석은 면역 복합체를 각 동형에 대해 2차 염소 항-마우스 PE 항체(IgG1 1070-09, IgG2a 1080-09S, IgG2b 1090-09S, IgG3 1100-09, IgM 1020-09, IgA 1040-09 Southern Biotech)로 항온처리함으로써 수행되었다. Fc γ R 결합은 바이오틴화된 Fc γ R(Fc γ RIIB, Fc γ RIII 및 Fc γ RIV, Duke Protein Production Facility 제공)을 스트렙타아비딘-PE (Prozyme)에 접합하여 면역 복합체를 항온처리함으로써 정량화했다. 유동 세포분석은 IQE(Intellicyt)를 사용하여 수행하였고, 분석은 IntelliCyt ForeCyt (v8.1)에서 수행하였다.

[0269] **항체-의존적 호중구 또는 세포 식세포작용:** 항체-의존적 호중구 식세포작용(ADNP) 및 세포 식세포작용(ADCP) 분석은 이전에 설명한 대로 수행되었다. 간략하게 설명하자면, 스파이크 단백질은 Sulfo-NHS 및 EDC (Thermo

Fisher)를 사용한 NHS-에스테르 연결을 사용하여 파란색, 황록색 또는 빨간색 FluoSphere™Carboxylate로 변형된 미세구체 0.2 μm (ThermoFisher)에 카복시 결합되었다. 스파이크-코팅된 비드를 희석된 혈청(1:150 ADNP, 1:100 ADCP)과 함께 37°C에서 2시간 동안 항온처리했다. ADNP 분석의 경우, BALB/c 마우스로부터 골수 세포를 수집하였고, 적혈구를 ACK 용해를 받았다. 남은 세포를 PBS로 세척한 후 96-웰 플레이트에 분주했습니다(웰당 5×10^4 개 세포). 비드-항체 복합체를 세포에 첨가하였고, 37°C에서 1시간 동안 항온처리했다. 세척 후, 세포는 다음 항체로 착색되었다: CD11b APC (BioLegend 101212), CD11c A700 (BioLegend 117320), Ly6G Pacific Blue (127628), Ly6C BV605 (BioLegend 128036), Fcblock (BD Bioscience 553142) 및 CD3 PE/Cy7 (BioLegend 100320). 세포는 4% PFA로 고정되었고, BD LSRFortessa(BD Biosciences)에서 처리되었다. 호중구는 $CD3^-$, $CD11b^+$, $Ly6G^+$ 로 특정되었다. 호중구 식세포 작용 점수는 (% FITC+) x (FITC의 기하 평균 형광 강도)/10000으로 산출되었다. ADCP 분석을 위해, J774A.1(ATCC TIB-67) 마우스 단핵구를 스파이크 코팅 비드-항체 복합체와 함께 37°C에서 1시간 동안 항온처리했다. 세포를 5 mM EDTA PBS로 세척하였고, 4% PFA로 고정시킨 후 BD LSRFortessa (BD Biosciences)에서 분석했다. 세포 식세포 작용 점수는 (% FITC+) x (FITC의 기하 평균 형광 강도)/10000으로 산출되었다.

[0270] **실시예 3: FROM CHAD 벡터로부터 SARS-CoV-2 스파이크 GENE (BA. 5) 변이체 발현**

[0271] SAR-CoV2-오미크론 BA.5(2가)의 S6P 및 S6PdF 변이체를 포함하는 아데노바이러스 벡터는 이전에 침팬지 아데노바이러스 벡터의 구축에서 논의한 대로 구축하고 발현을 테스트했다. 이들 구조체는 각각 ChAd.BA.5-S6P, ChAd.BA.5-S6PdF로 지칭된다. 인간 A549 세포의 단층층을 새로 생성된 ChAd.BA.5-S6P (오미크론 변이체 BA.5로부터 파생되고, S6P를 포함) 3×10^3 vp/세포 및 ChAd.BA.5-S6PdF 벡터 또는 ChAd-SARS-CoV-2-S(WA1/2020-S2P) 및 ChAd.BA.1-S6PdF 벡터, 또는 도입유전자를 휴대하지 않는 ChAd 벡터로 감염시켰다. SARS-CoV-2 스파이크 유전자의 발현은 스파이크 당단백질의 다양한 에피토프에 결합하는 일차 mAb 각테일을 사용한 유동 세포분석을 통해 감염-후 48시간 시점에 검출되었다. 도 18에서 제공된 바와 같이, ChAd.BA.5-S6P 및 ChAd.BA.5-S6PdF 벡터를 감염시킨 결과 각각 90% 및 92%의 세포가 스파이크 유전자를 발현시켰는데, 이는 ChAd-SARS-CoV-2-S(WA1/2020-S2P) (93%) 및 ChAd.BA.1-S6PdF (96%)가 달성한 발현 수준과 매우 유사하다. ChAd 음성 대조군을 통한 감염은 1차 및 2차 Alexa Fluor 594-접합 F(ab')₂ 단편 (당나귀 항-마우스 IgG, 4.2%)으로 배양한 대조군 미감염 세포와 유사한 5% 배경 수준의 발현을 보였다. 이들 데이터는 ChAd.BA.5-S6P 및 ChAd.BA.5-S6PdF 벡터 모두 효율적인 스파이크 발현을 유도하여, ChAd-SARS-CoV-2-S 및 ChAd.BA.1-S6PdF 백신 벡터가 달성한 것과 비교할 만한 강력한 면역 반응을 가져올 수 있음을 시사한다.

[0272] **실시예 4: CHAD-WUHAN-S 및 CHAD.BA.5-S 또는 CHAD-BIVALT를 사용한 비강내 백신 접종은 마우스에서 SARS-CoV-2 변종에 대해 지속적으로 보호한다**

[0273] Ch-AD-대조군, ChAD-Wuhand-S, ChAd-BA.5 및 ChAD-2가를 함유한 비강 백신의 효능은 여기에 제공된 방법을 사용하여 생체 내에서 테스트되었다. 도 23은 관련 S-단백질의 서열 정렬을 제공한다. 도 19A는 백신 접종 시기, 혈액 채취, 바이러스 감염 및 괴사 검사에 대한 개략도를 제공한다. 최초 실험에서, SARS-CoV-2 Wuhan-1 (도 19B-C), BA.5 (도 19D-E), 또는 BQ.1.1 (도 21F-G) S 단백질에 항-SARS-CoV-2 IgG (도 19B, 19D, 19F) 또는 IgA (도 19C, 19E, 19G)의 결합을 테스트했다. 2가 ChAd-CoV-2 S(Wuhan) 및 ChAd-CoV-2-S(BA.5)를 비강 내 면역접종한 경우, 각각의 단가 백신 성분에 비해 백신접종-후 28일차 시점에 얻은 혈청을 사용한 ELISA 검사에 따르면 Wuhan-1, BA.5 및 BQ.1.1 스파이크 단백질에 대한 IgA 및 IgG 반응 범위가 더 넓었다.

[0274] 다음으로, Ch-AD-대조군, ChAD-Wuhand-S, ChAd-BA.5 및 ChAD-2가를 이용한 비강 면역접종의 WA1/2020에 대한 중화 활성을 FRNT를 사용하여 시험했다. 도 20A에서는 FRNT에 의해 WA1/2020에 대한 중화 활성을 보여준다. 도 20B에서는 FRNT에 의해 BA.5에 대한 중화 활성을 보여준다. 도 20C에서는 FRNT에 의해 BF.7에 대한 중화 활성을 보여준다. 도 20D에서는 FRNT에 의해 BQ.1.1에 대한 중화 활성을 보여준다. 도 20E에서는 FRNT에 의해 XBB.1.1에 대한 중화 활성을 보여준다. 각 점은 개별 마우스의 데이터를 나타내며, 두 번의 기술 복제의 평균이다. 도 20F-H는 감염에 사용된 명시된 SARS-CoV-2 변이체에 대항하는 주어진 백신 (ChAd-SARS-CoV-2 S (Wuhan-1, 도 20F), ChAd-SARS-CoV-2-S (BA.5, 도 20G) 또는 이가 (ChAd-SARS-CoV-2 S (Wuhan-1) + ChAd-SARS-CoV-2-S (BA.5), 도 20H)에 대한 직접 비교로 플롯팅된 중화 데이터를 나타낸다.

[0275] 제시된 데이터에 따르면, 2가 ChAd-CoV-2 S (Wuhan) 및 ChAd-CoV-2-S (BA.5)를 비강 면역접종한 것이 각각의 단가 백신보다 Wuhan-1, BA.5 및 BQ.1.1 바이러스에 대한 혈청 중화 항체 반응이 더 강했다.

[0276] 끝으로, SARS-CoV-2 WA1/2020 D614G (왼쪽) 또는 오미크론 BQ.1.1(오른쪽)로 공격한 후, 6 dpi에서 폐 (도 21A), 비강 비갑개(도 21B) 및 비강 세척액(도 21C)의 바이러스 RNA 수치를 분석했다. 2가 ChAd-CoV-2 S(Wuhan) 및 ChAd-CoV-2-S(BA.5)를 비강 접종한 것은 각각의 단가 백신보다 WA1/2020 D614G 및 BQ.1.1 바이러스에 의한 폐 감염에 대한 보호 효과가 더 컸다. 이는 사이토카인 수치로 측정했을 때 폐 염증에 대한 보호가 향상된 것과 일치했다 (도 22).

[0277] 등가물

[0278] 여기에 여러 가지 창의적인 실시예가 설명되고 설명되었지만, 해당 분야의 통상의 기술자는 여기에 설명된 기능을 수행하고 및/또는 결과 및/또는 하나 이상의 이점을 얻기 위한 다양한 다른 수단 및/또는 구조를 쉽게 상상할 수 있을 것이며, 그리고 그러한 각각의 변형 및/또는 수정은 여기에 기술된 창의적인 실시예의 범위 내에 있는 것으로 간주된다. 좀더 일반적으로, 본 기술 분야에 숙련된 사람이라면 여기에 설명된 모든 매개변수, 치수, 재료 및 구성이 예시적인 것이며 실제 매개변수, 치수, 재료 및/또는 구성은 발명의 내용이 사용되는 특정 응용 분야에 따라 달라질 수 있음을 쉽게 이해할 수 있을 것이다. 해당 기술 분야의 숙련자라면 단순한 실험을 통해 여기에 기술된 특정한 창의적 실시예에 상응하는 많은 실시예를 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 따라서, 앞서 언급한 실시예는 단지 예시로 제시된 것이며, 첨부된 청구항 및 이에 상응하는 사항의 범위 내에서, 구체적으로 설명 및 청구된 것과 다른 방식으로 발명적 실시예가 실시될 수 있다는 것을 이해해야 한다. 본 명세서의 창의적인 실시예는 여기에 기술된 각각의 개별적인 특징, 시스템, 기사, 재료, 키트 및/또는 방법에 관한 것이다. 또한, 이러한 두 개 이상의 특징, 시스템, 제품, 재료, 키트 및/또는 방법의 어떠한 조합도, 이러한 특징, 시스템, 제품, 재료, 키트 및/또는 방법이 서로 모순되지 않는다면, 본 명세서의 창의적 범위에 내포된다.

[0279] 여기에 공개된 모든 참고문헌, 특허 및 특허 출원은 각각 인용된 주제와 관련하여 참고로 포함되어 있으며, 어떤 경우에는 문서 전체를 포괄할 수 있다.

[0280] 본 명세서 및 청구항에서 사용되는 "및/또는"이라는 문구는 그렇게 결합된 요소, 가령, 즉, 어떤 경우에는 접속적으로 존재하고 다른 경우에는 분리적으로 존재하는 요소 중 "하나 또는 둘 다"를 의미하는 것으로 이해되어야 한다. "및/또는"으로 나열된 여러 요소는 동일한 방식으로 해석되어야 하며, 즉, "하나 또는 그 이상"의 요소가 결합된 것이다. "및/또는" 절에서 구체적으로 식별된 요소 외에도 다른 요소가 선택적으로 존재할 수 있으며, 이는 구체적으로 식별된 요소와 관련이 있거나 관련이 없을 수 있다. 따라서, 제한적이지 않은 실시예로, "포함하는"과 같은 개방형 언어와 함께 사용될 때 "A 및/또는 B"에 대한 참조는 한 구체예에서 A만을(선택적으로 B 이외의 요소를 포함함) 참조할 수 있고; 또다른 구체예에서, B에만(선택적으로 A가 아닌 다른 요소를 포함함); 여전히 또다른 구체예에서 A와 B 둘 다에(선택적으로 다른 요소를 포함함); 등.

[0281] 본 명세서 및 청구항에서 사용된 "또는"은 위에서 정의한 "및/또는"과 동일한 의미를 갖는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들면, 목록의 항목을 구분할 때 "또는" 또는 "및/또는"은 포괄적인 것으로 해석되어야 하는데, 즉, 적어도 하나 이상의 요소 또는 목록이 포함되는 것뿐만 아니라, 선택적으로 추가 나열되지 않은 요소도 포함하는 것을 의미한다. "단 하나의" 또는 "정확히 하나의"과 같이 명확하게 반대되는 용어만, 또는 청구항에서 사용될 때 "구성되는"과 같은 용어만이 여러 요소 또는 요소 목록 중 정확히 하나의 요소가 포함된다는 것을 나타낸다. 일반적으로, 본 문서에서 사용되는 "또는"이라는 용어는 "둘 중 하나", "중 하나", "중 하나만" 또는 "~중 정확히 하나"와 같은 배타적 용어가 앞에 오는 경우에만 배타적 대안(즉, "둘 중 하나이지만 둘 다는 아님")을 나타내는 것으로 해석되어야 한다. "본질적으로 구성되는"이라는 표현은 특허청구범위에서 사용될 때 특허법 분야에서 사용되는 일반적인 의미를 갖는다.

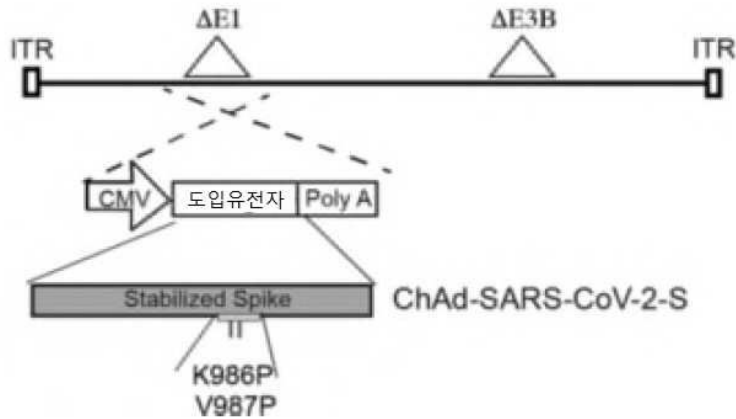
[0282] 본 명세서 및 청구항에서 사용되는 "적어도 하나"라는 문구는 하나 이상의 요소 목록을 참조할 때 요소 목록에 있는 하나 이상의 요소에서 선택된 적어도 하나의 요소를 의미하는 것으로 이해되어야 하지만, 그러나 요소 목록에 구체적으로 나열된 모든 요소를 각각 하나씩 이상 포함하지는 않으며, 요소 목록에 있는 요소의 조합을 제외하지 않는다. 이 정의에 따르면 "적어도 하나"라는 문구가 참조하는 요소 목록 내에서 구체적으로 식별된 요소 외에도 다른 요소가 선택적으로 존재할 수 있으며, 구체적으로 식별된 요소와 관련이 있든 없든 존재할 수 있다. 따라서, 비-제한적인 실시예로써, "A와 B 중 적어도 하나" (또는, 등가적으로, "A 또는 B 중 적어도 하나", 또는, 등가적으로 "A 및/또는 B 중 적어도 하나")는 한 구체예에서, B 없이, 하나 A 이상을 임의선택적으로 내포하는 적어도 하나(그리고 B 이외의 다른 요소들을 임의선택적으로 내포하고); 또다른 구체예에서, A 없이 하나 B 이상이 임의선택적으로 내포된 적어도 하나 (그리고 A 이외의 다른 요소들이 임의선택적으로 내포된); 여전히 또다른 구체예에서, 하나의 A 이상이 임의선택적으로 내포된 적어도 하나, 그리고 하나 B 이상이 임의선택적으로 내포된 적어도 하나 (그리고 다른 요소들이 임의선택적으로 내포된); 등등을 지칭한다.

[0283]

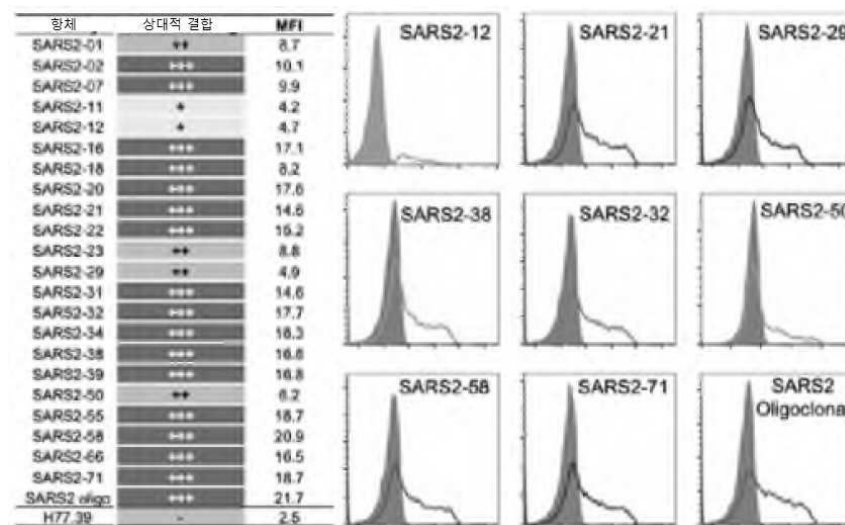
달리 정의되지 않는 한, 여기에 사용된 모든 기술 용어는 이 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 기술을 가진 자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서 및 첨부된 청구항에서 사용되는 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥상 명확히 달리 규정되지 않는 한 복수형 참조를 포함한다. 본 문서에서 "또는"에 대한 모든 언급은 달리 명시되지 않는 한 "및/또는"을 포괄하는 것으로 의도된다.

도면

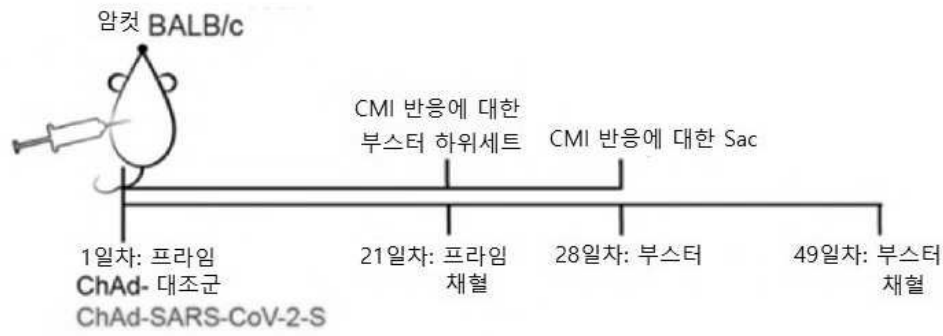
도면1a



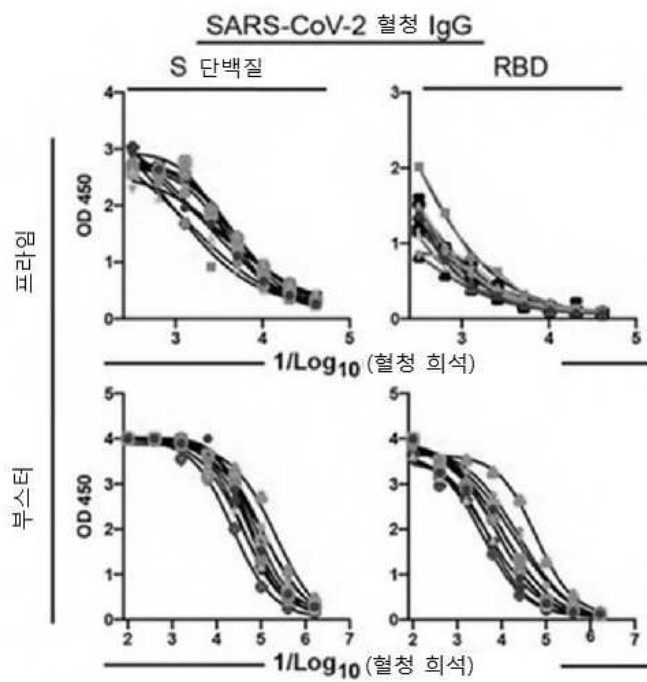
도면1b



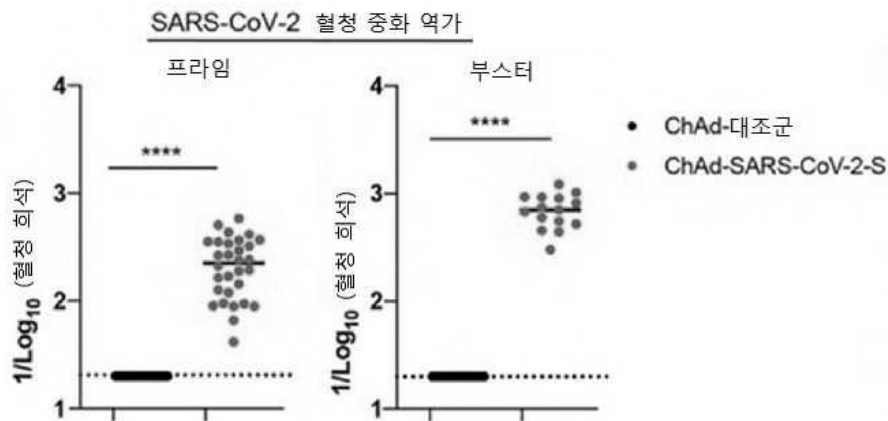
도면1c



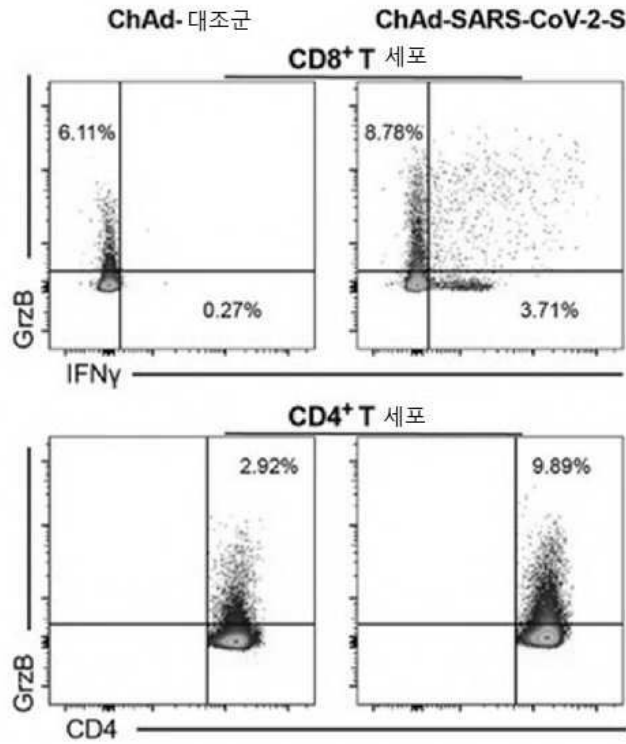
도면1d



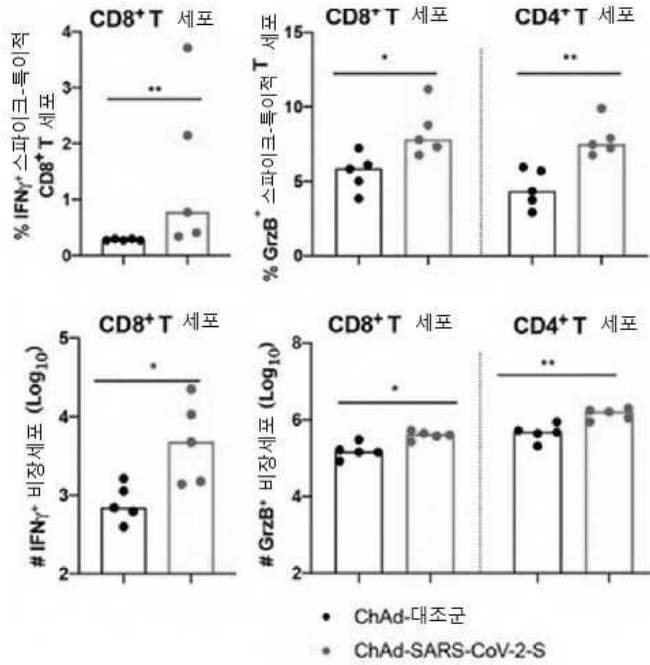
도면1e



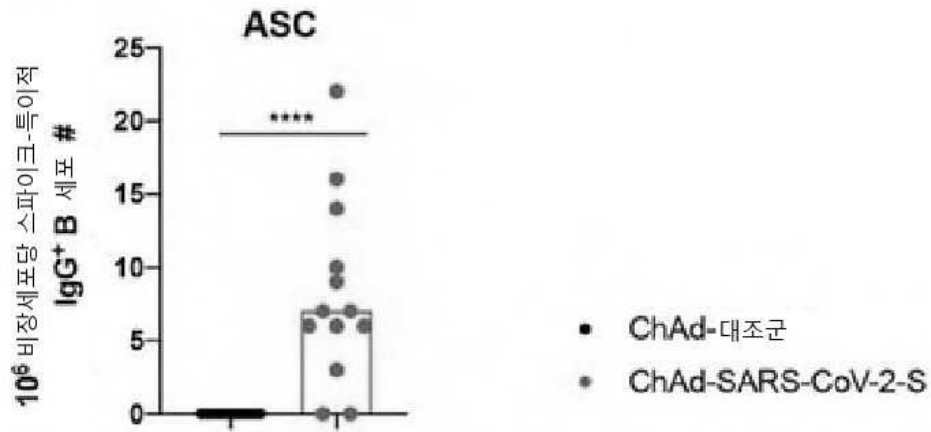
도면1f



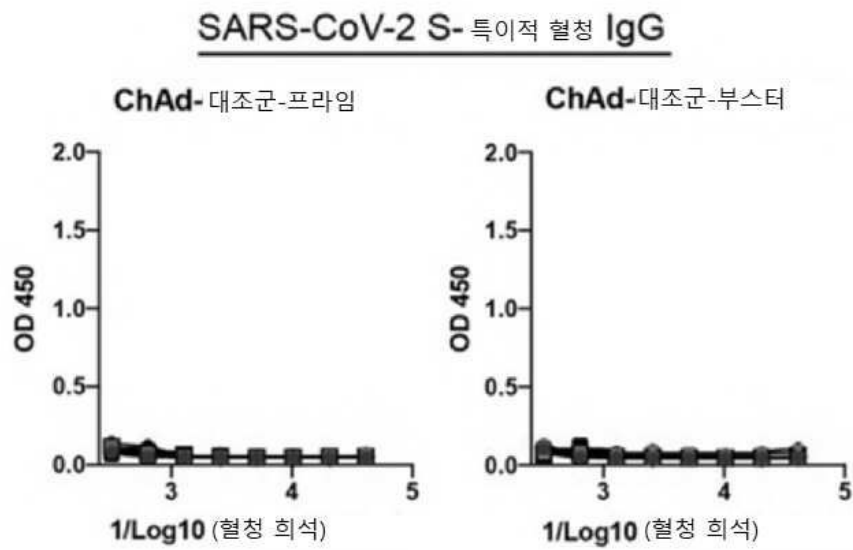
도면1g



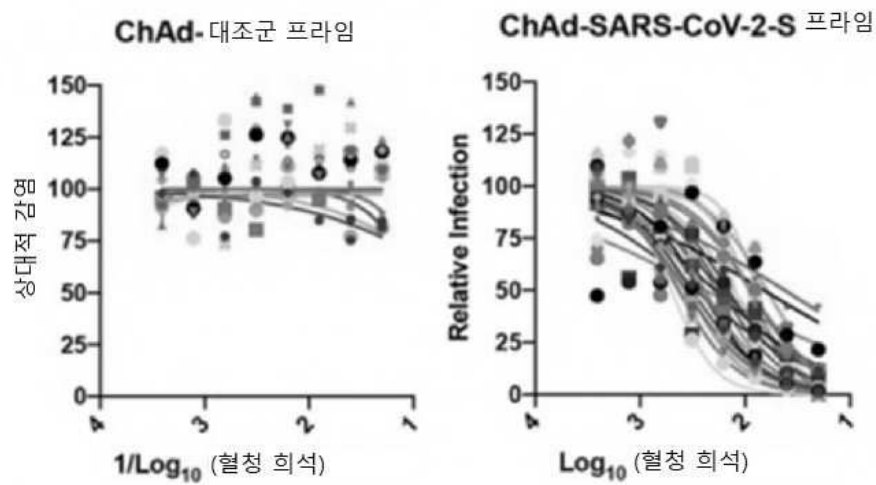
도면1h



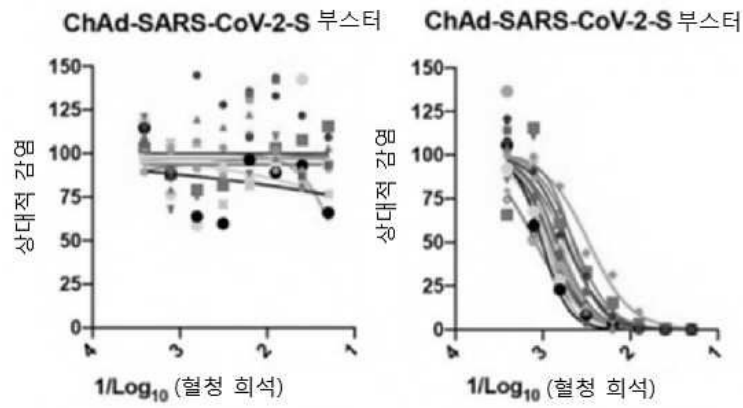
도면2a



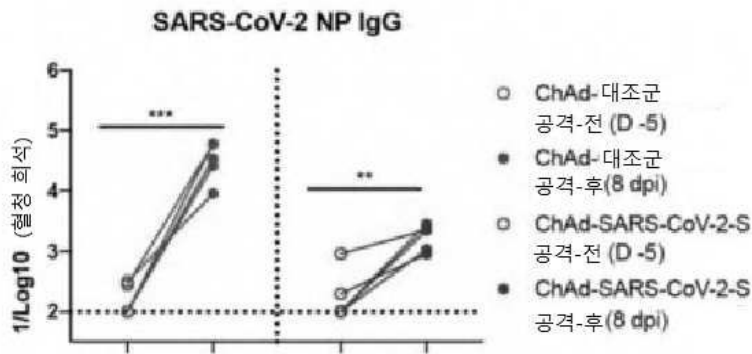
도면2b



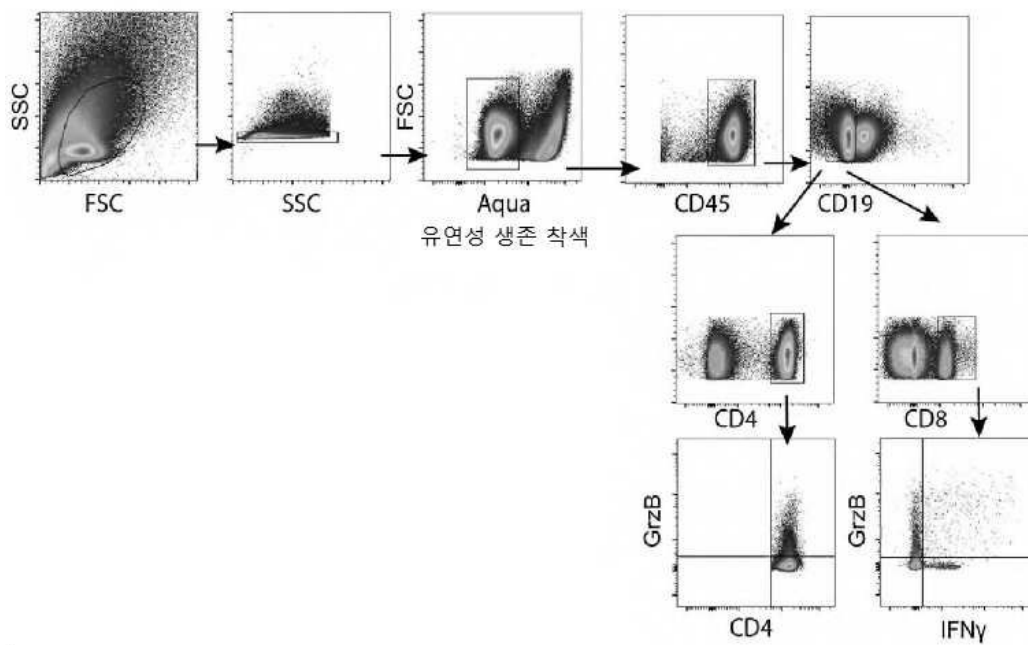
도면2c



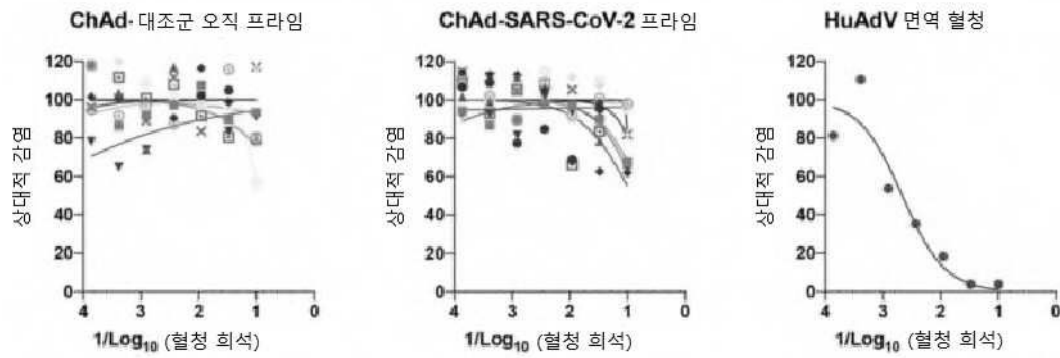
도면2d



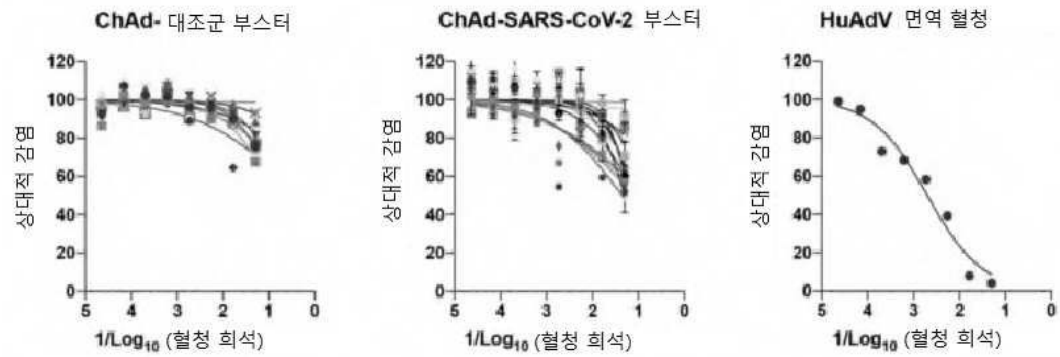
도면3



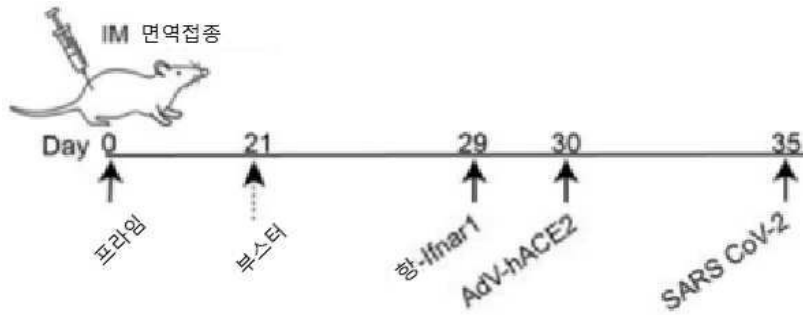
도면4a



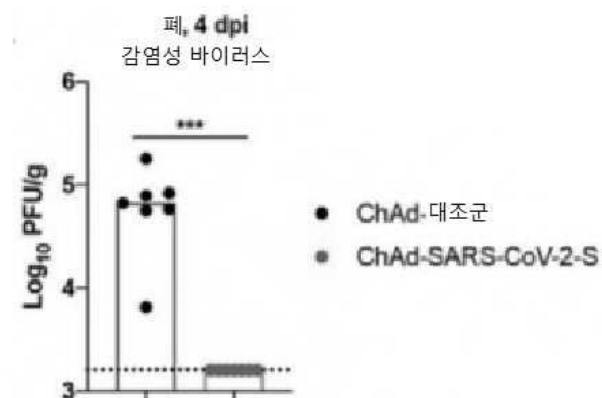
도면4b



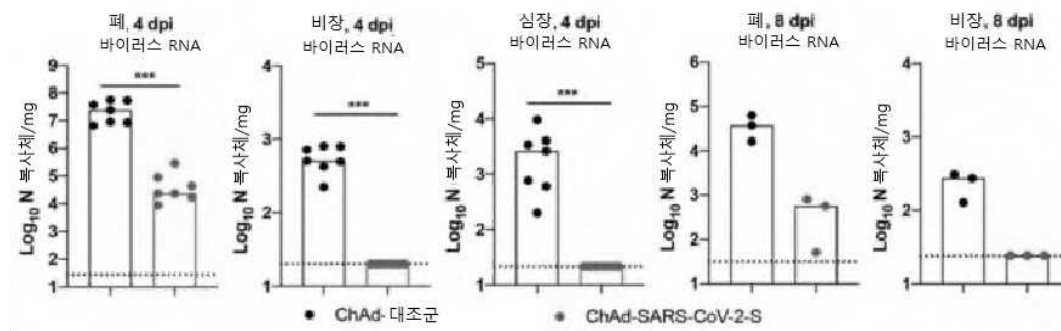
도면5a



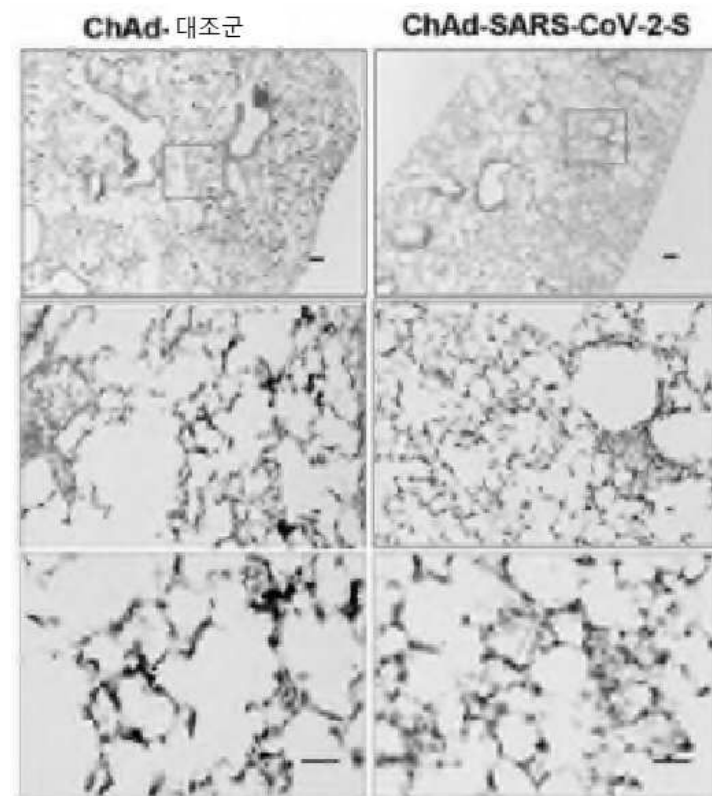
도면5b



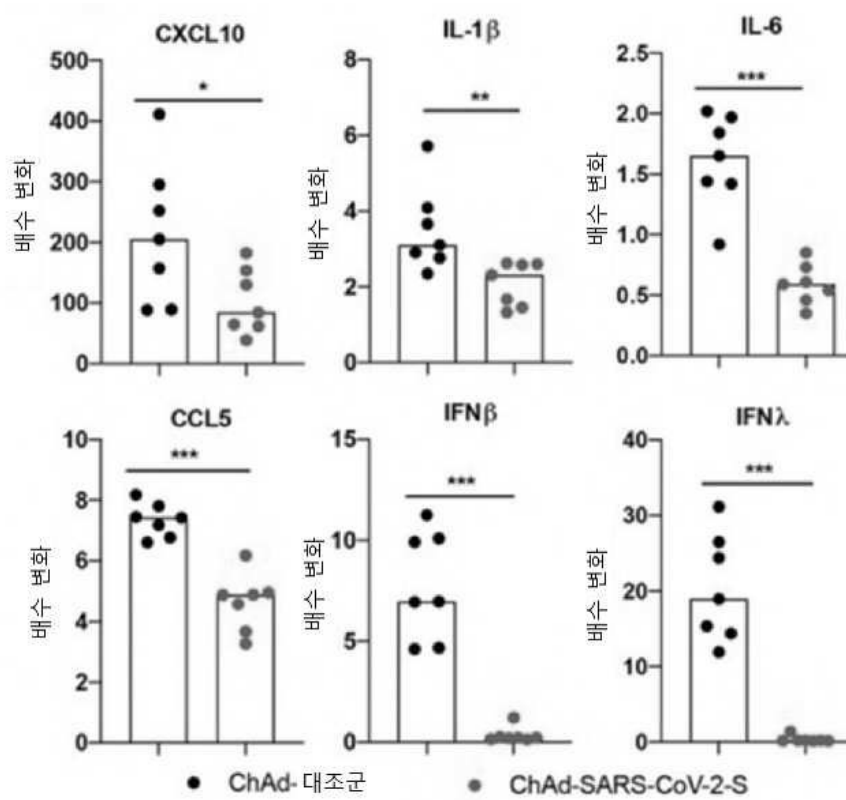
도면5c



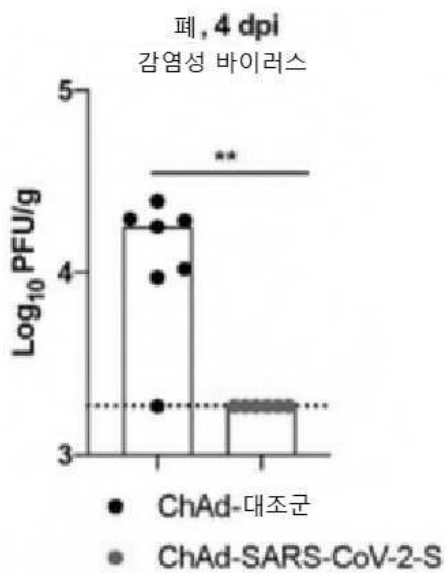
도면5d



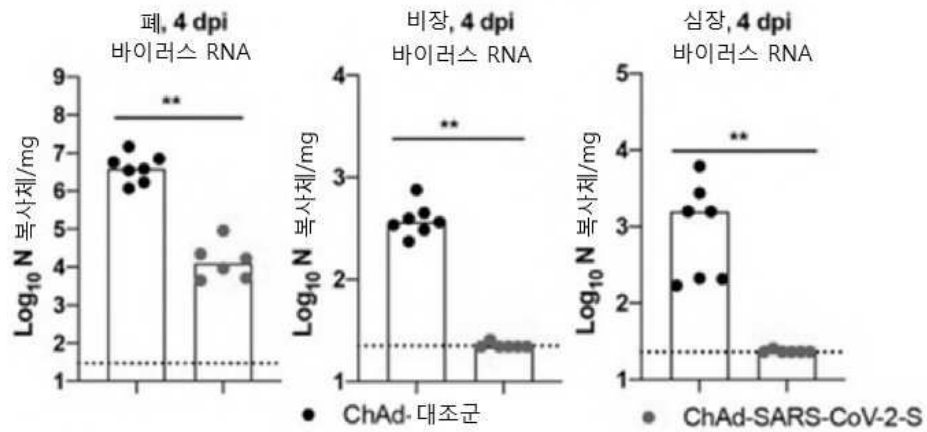
도면5e



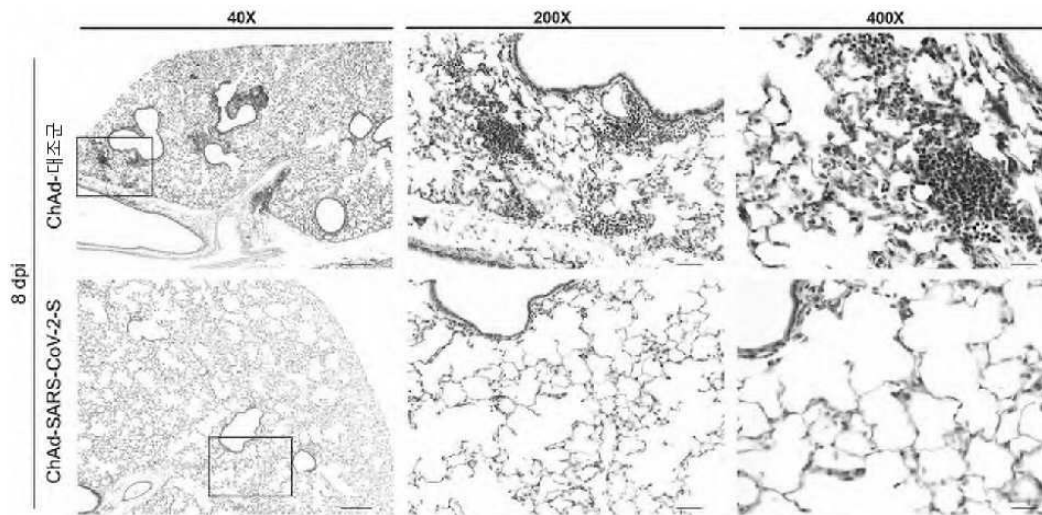
도면5f



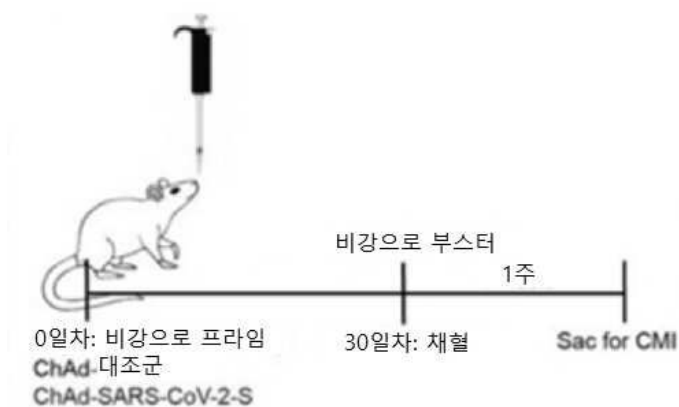
도면5g



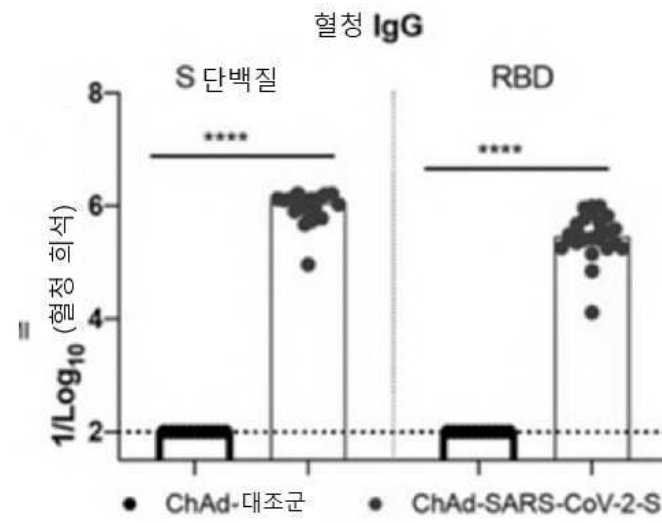
도면6



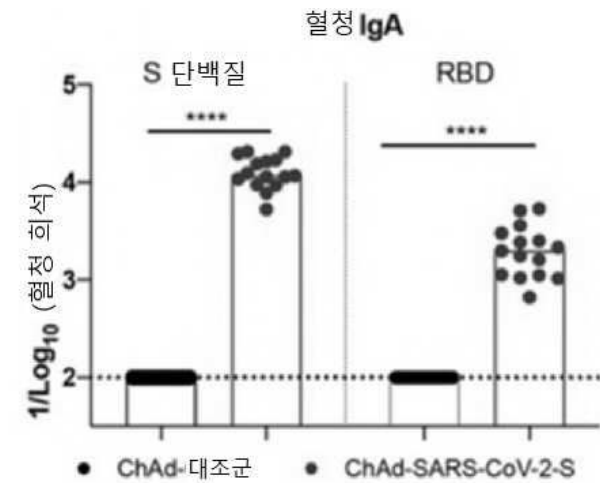
도면7a



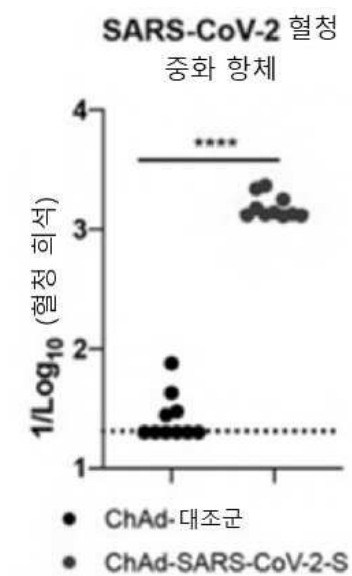
도면7b



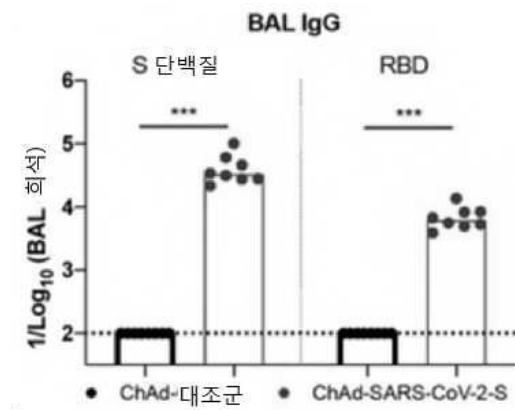
도면7c



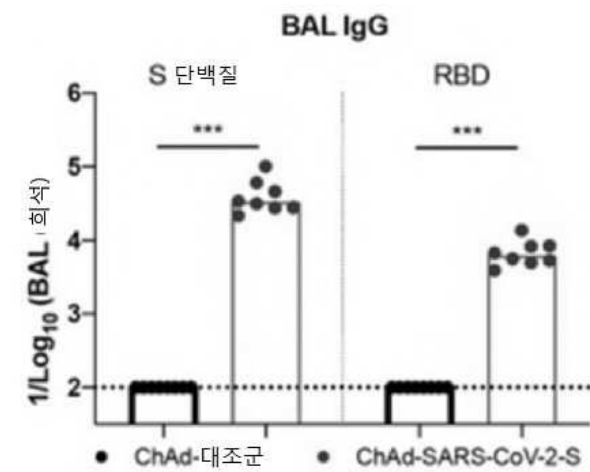
도면7d



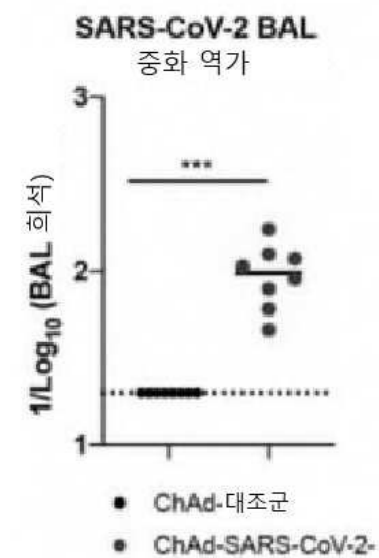
도면7e



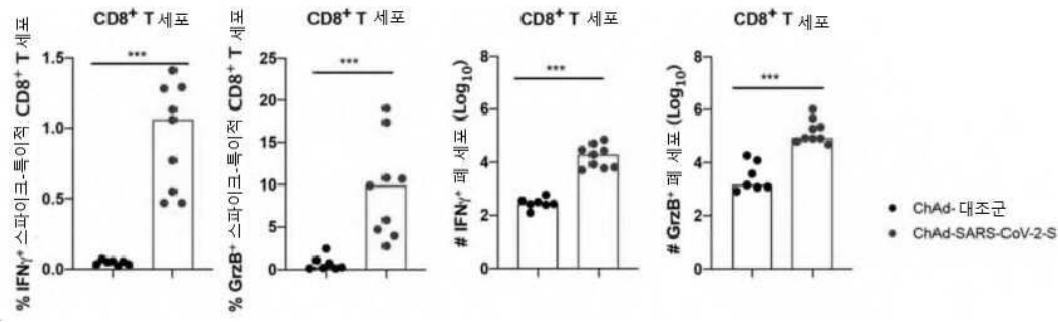
도면7f



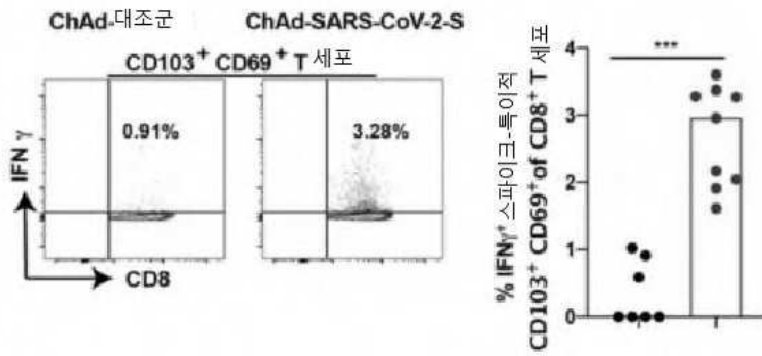
도면7g



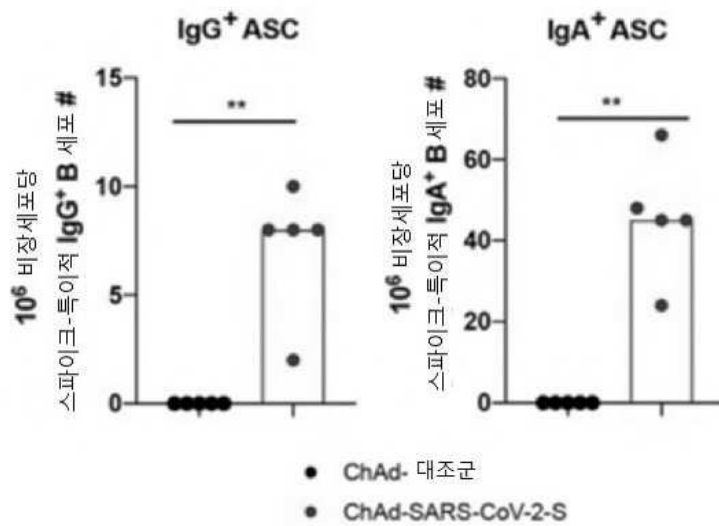
도면7h



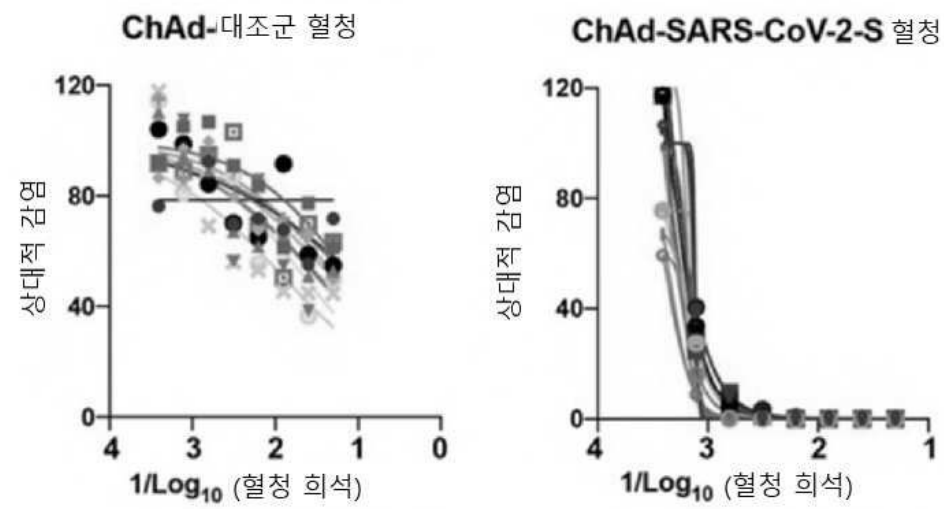
도면7i



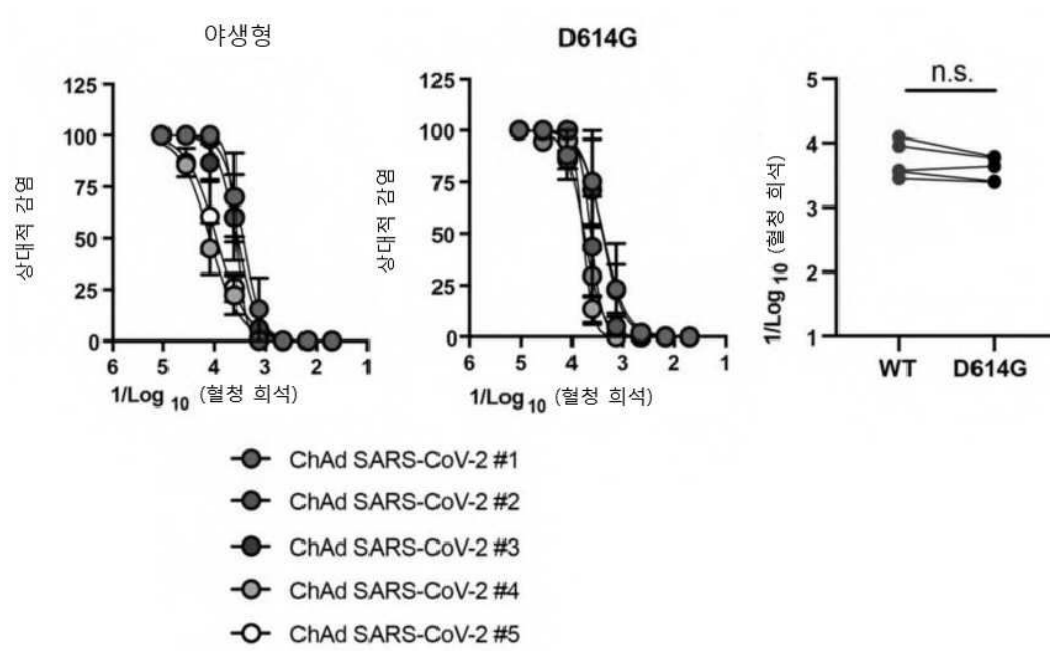
도면7j



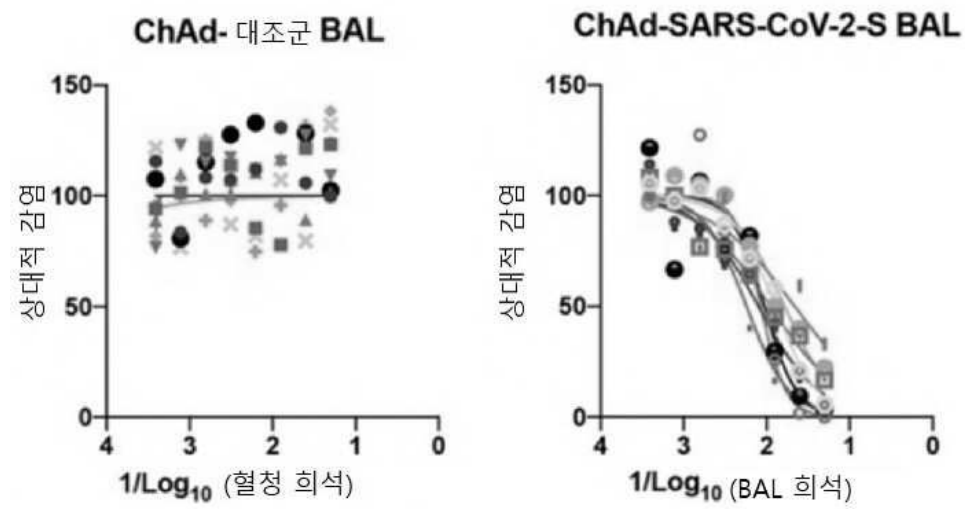
도면8a



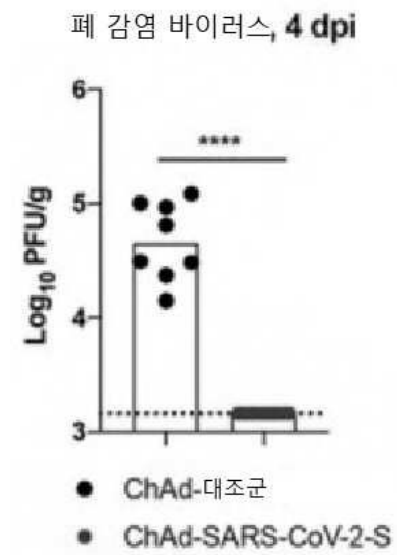
도면8b



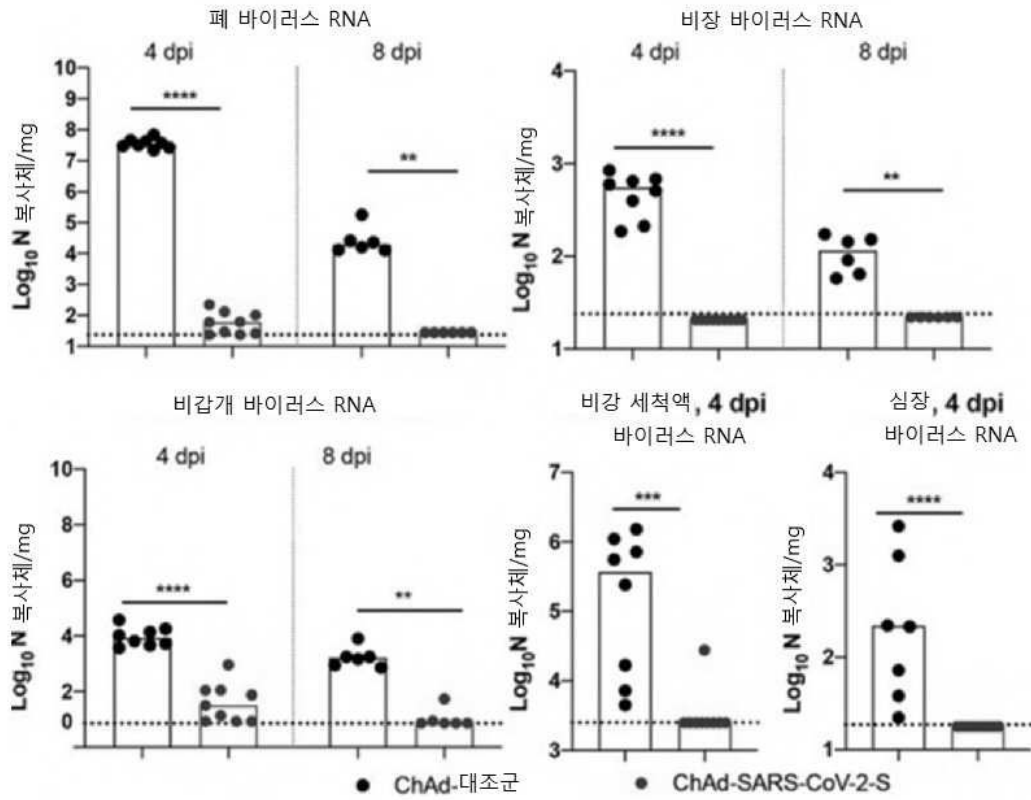
도면8c



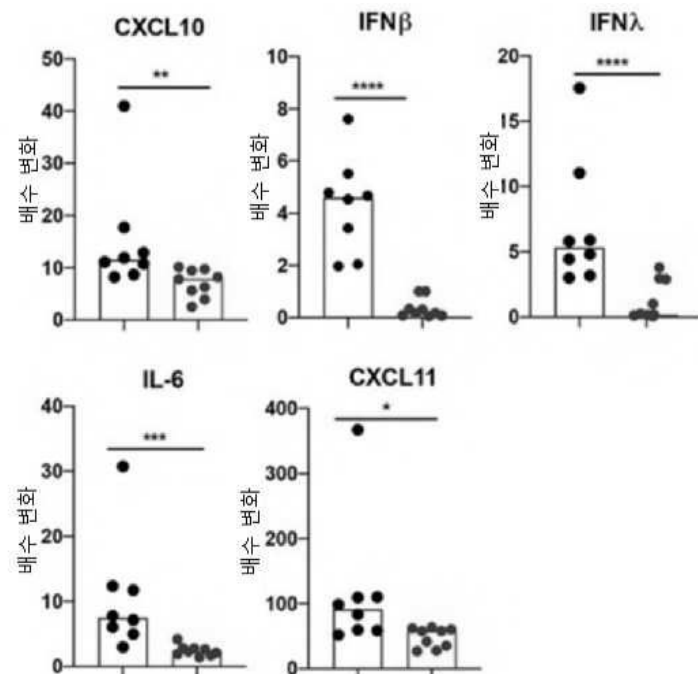
도면9a



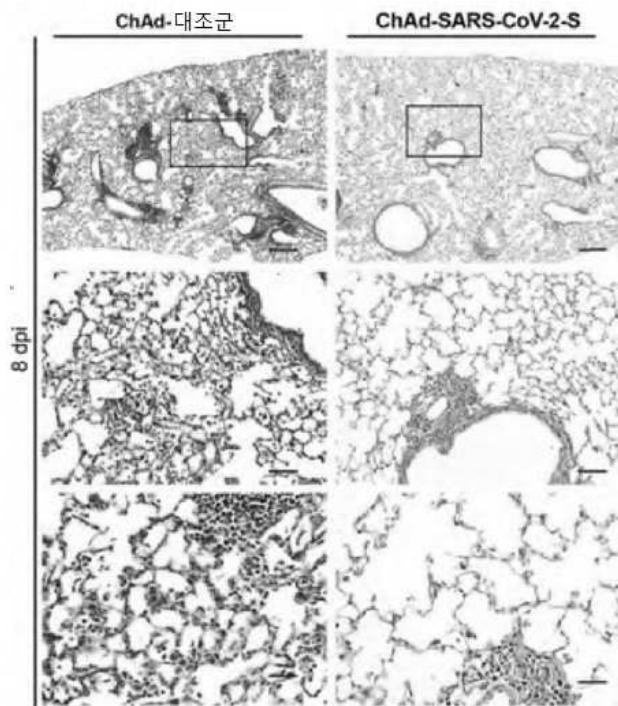
도면9b



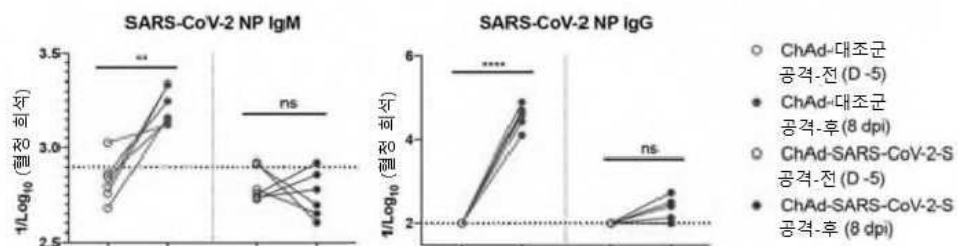
도면9c



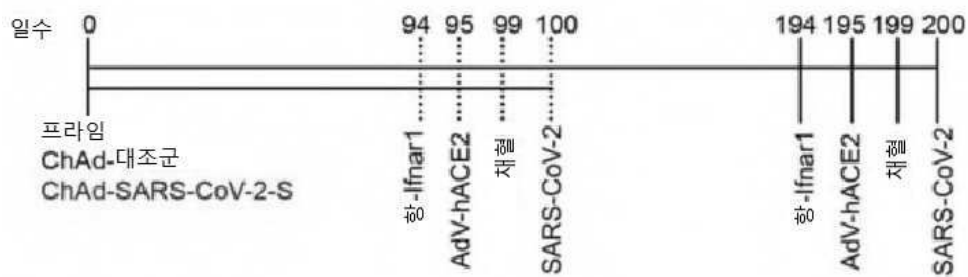
도면9d



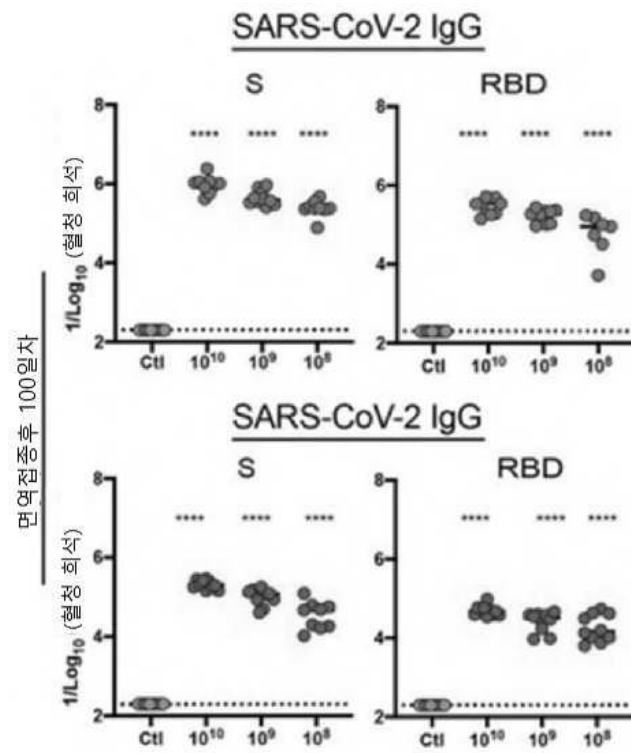
도면9e



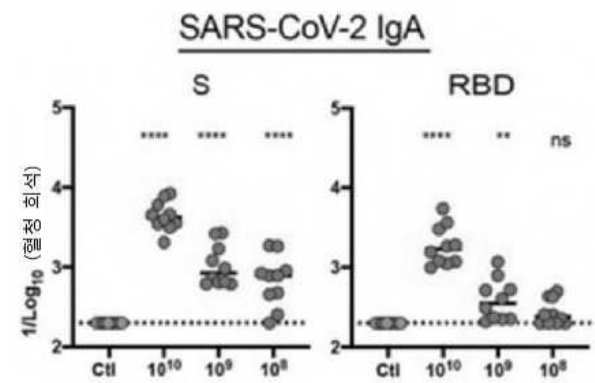
도면10a



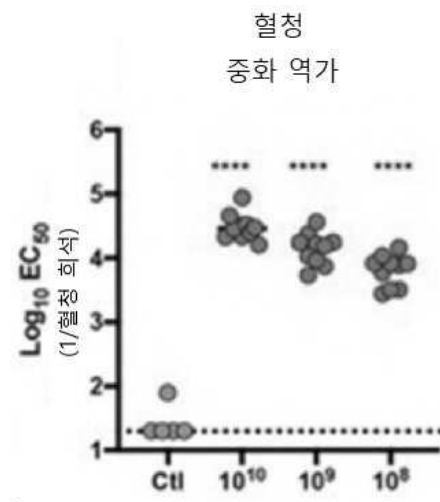
도면10b



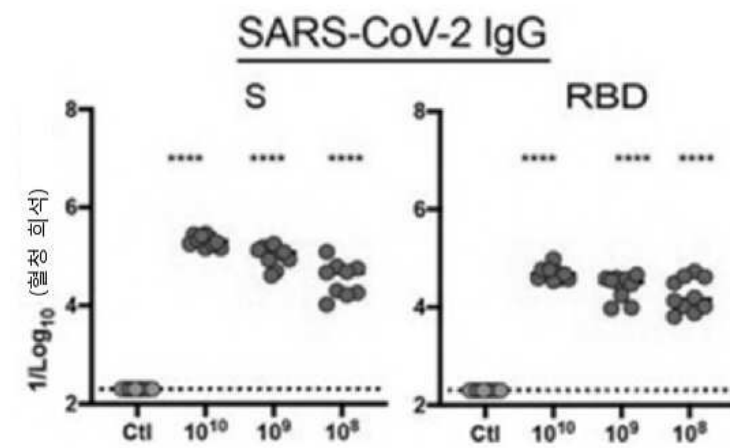
도면10c



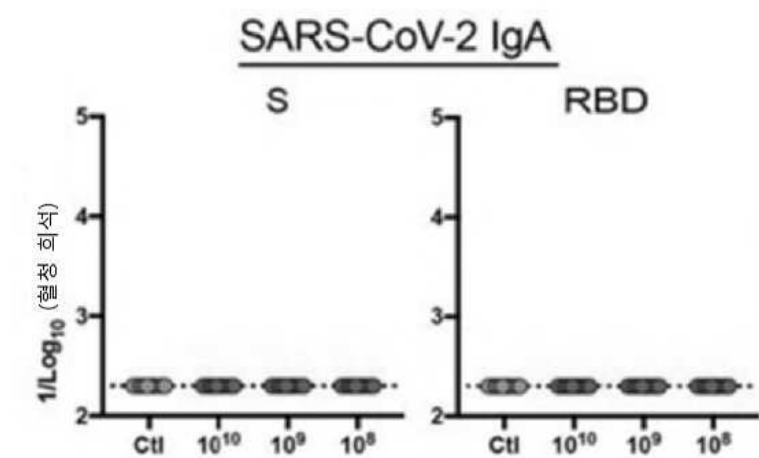
도면10d



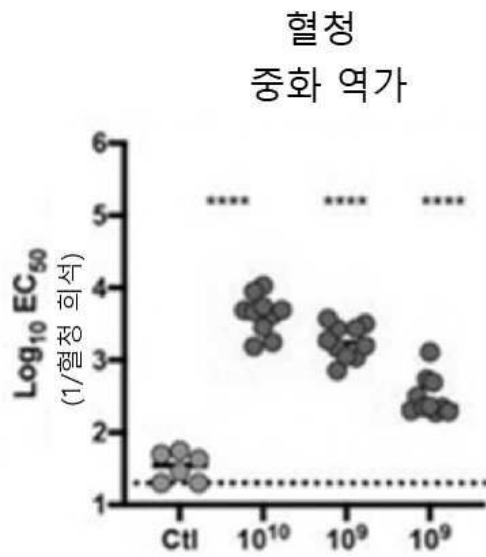
도면10e



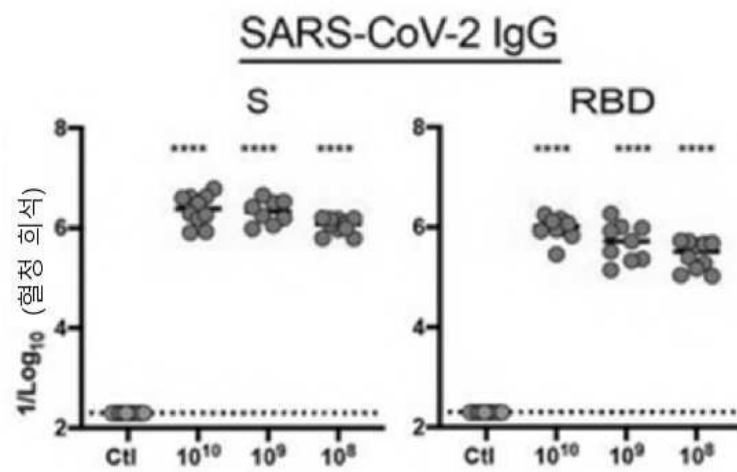
도면10f



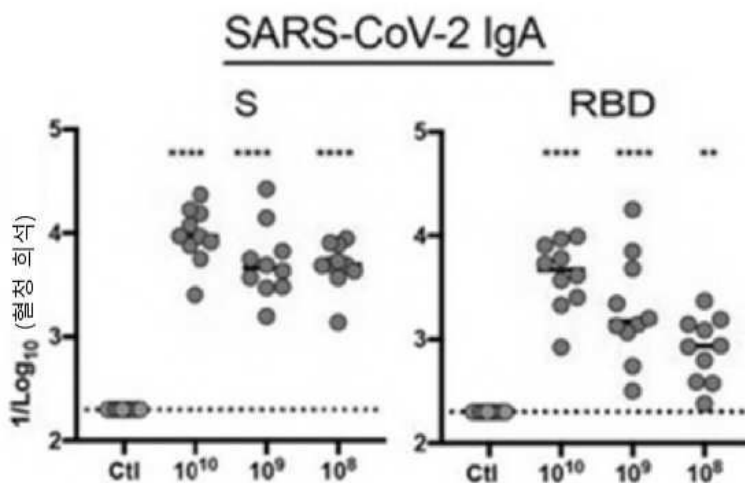
도면10g



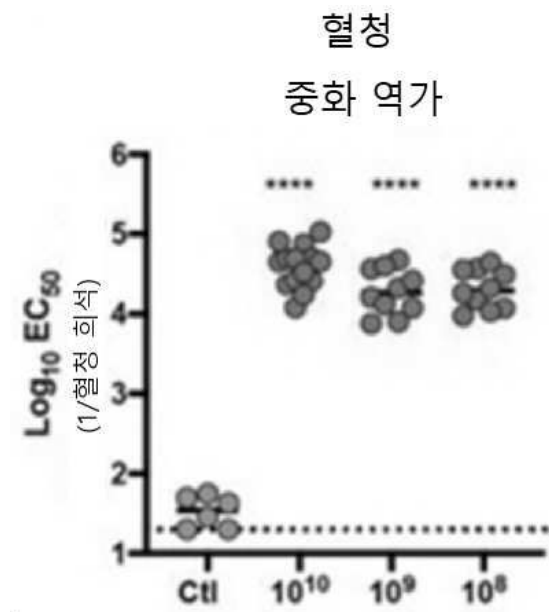
도면10h



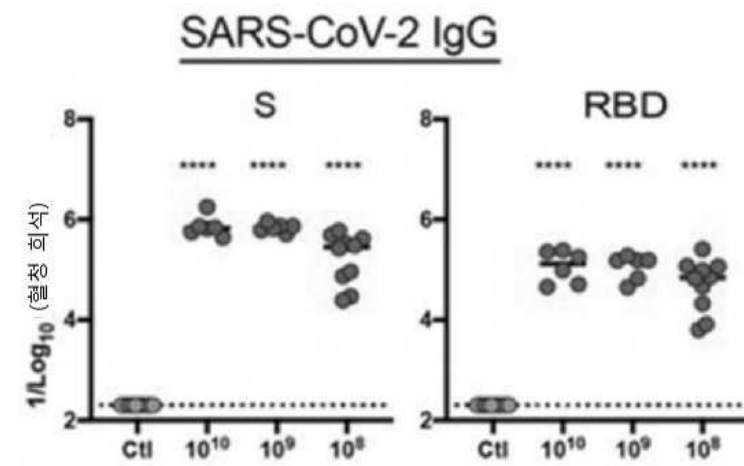
도면10i



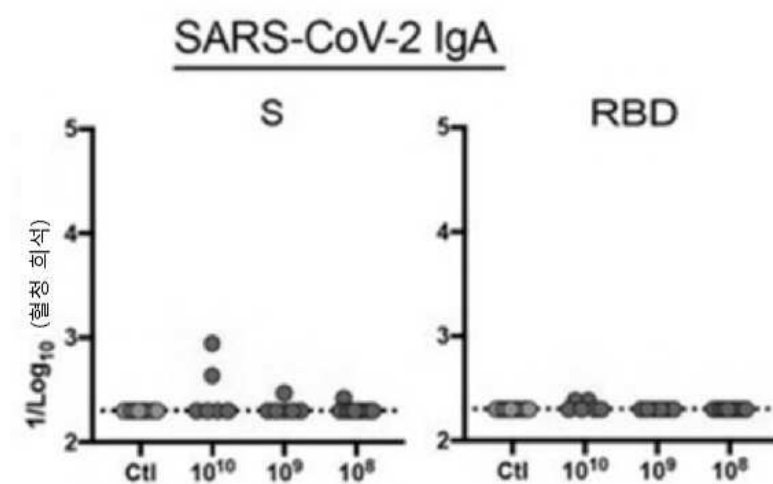
도면10j



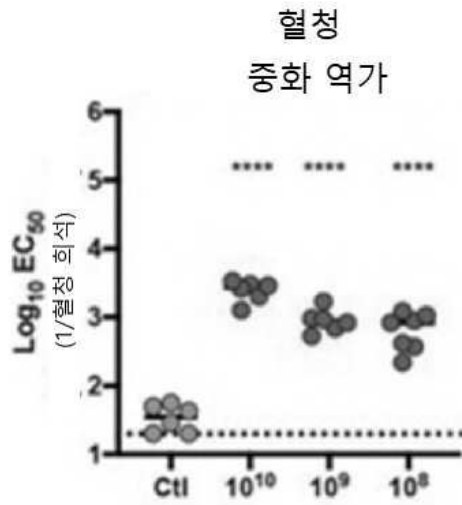
도면10k



도면10l



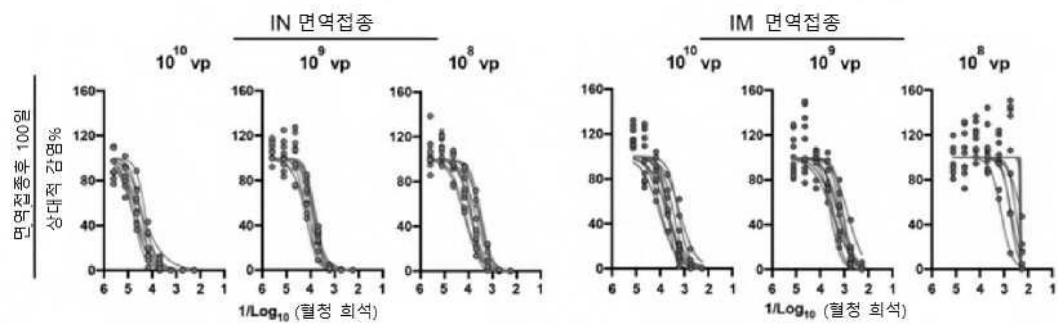
도면10m



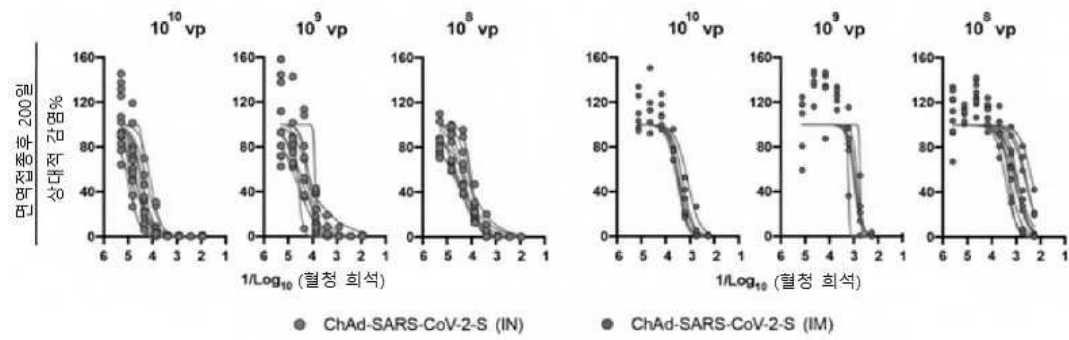
도면10n



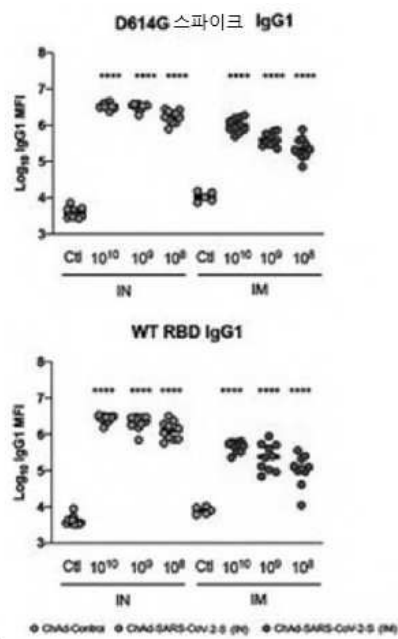
도면11a



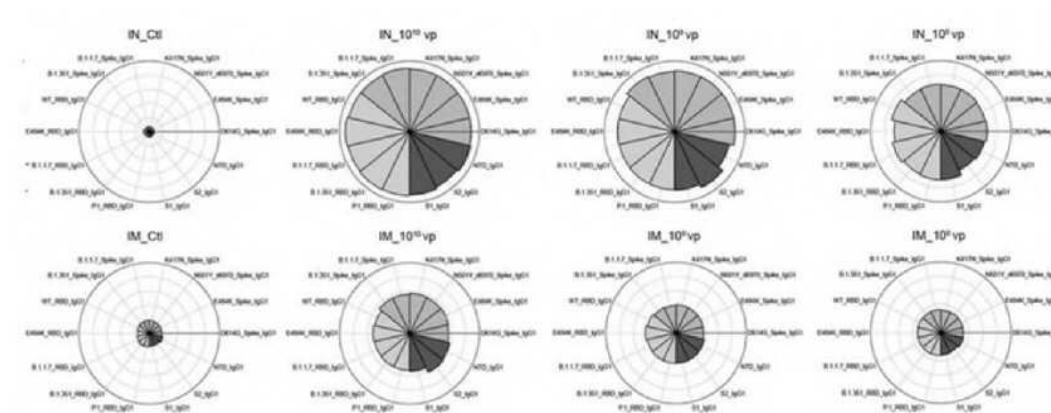
도면11b



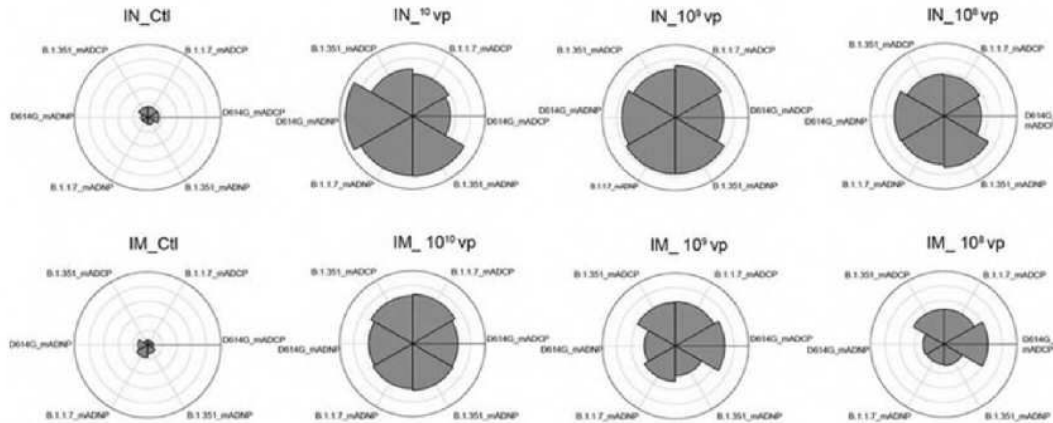
도면12a



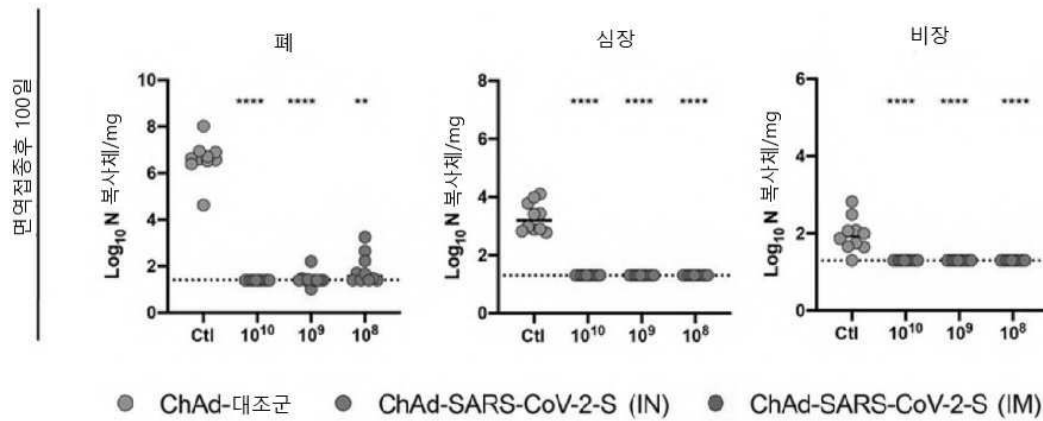
도면12b



도면12e



도면13abc

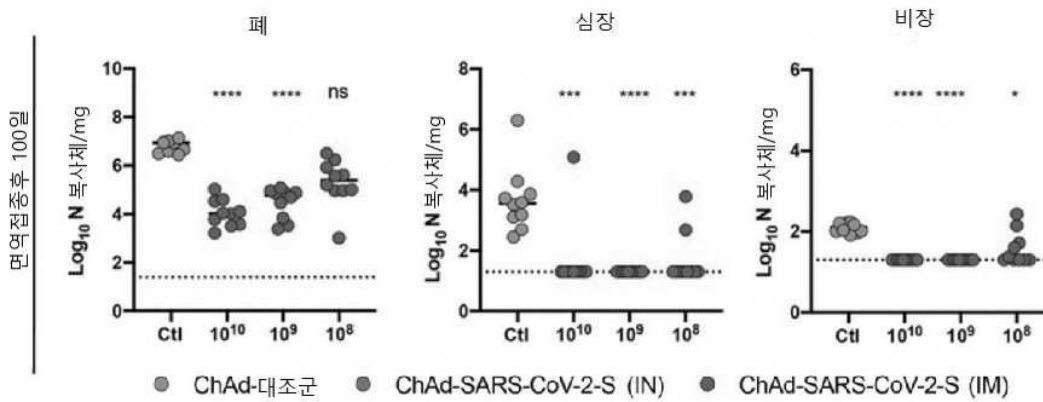


도. 13A

도. 13B

도. 13C

도면13def

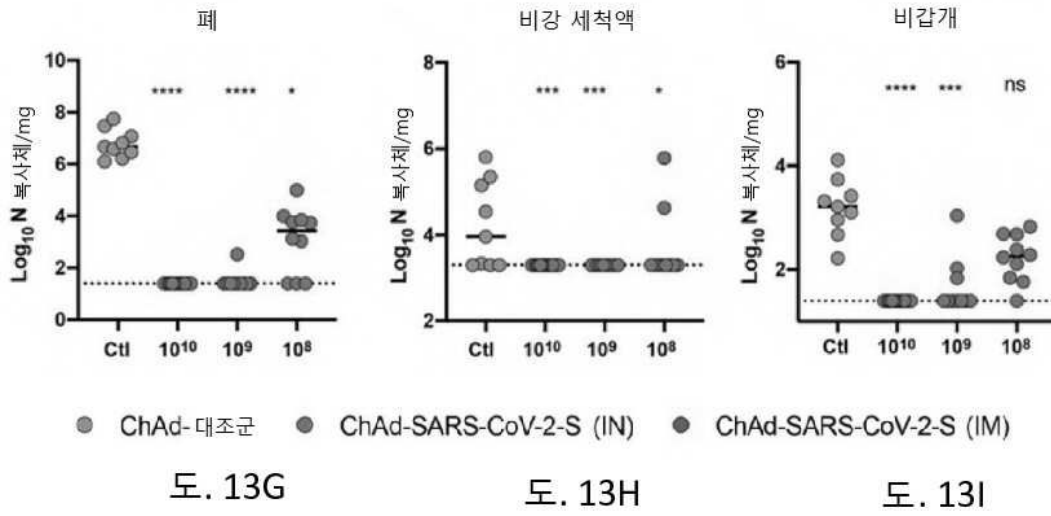


도. 13D

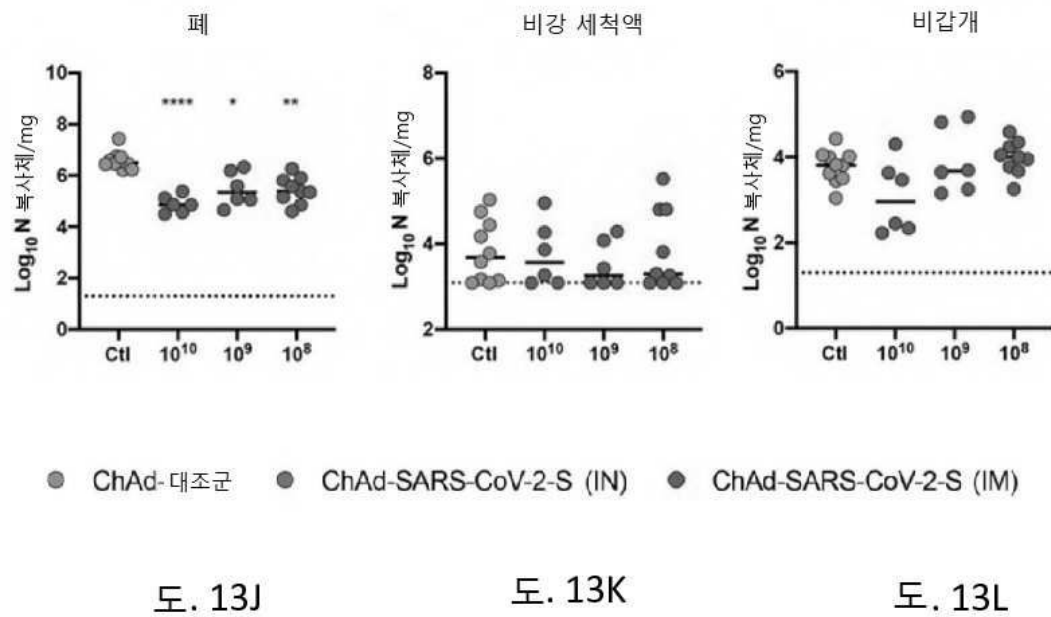
도. 13E

도. 13F

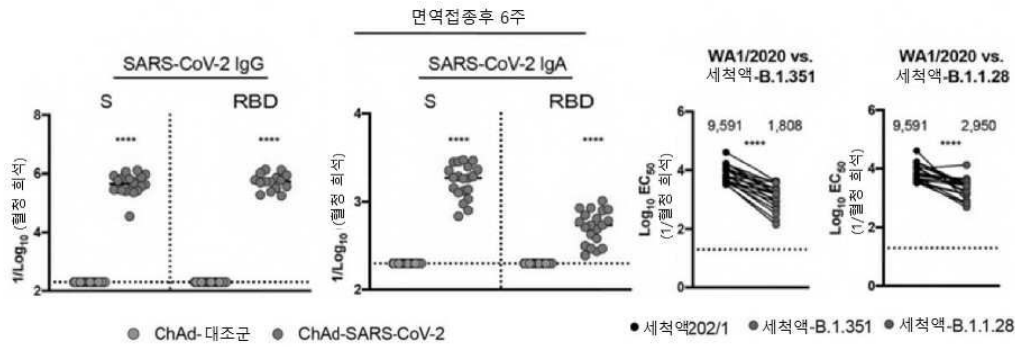
도면13ghi



도면13jkl



도면14

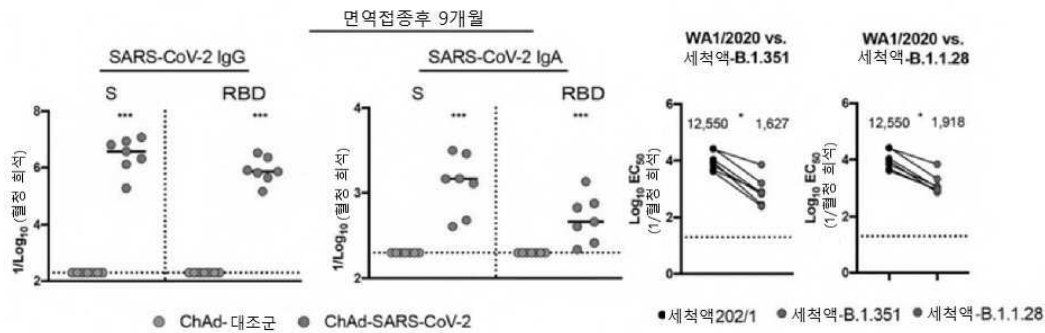


도. 14A

도. 14B

도. 14C

도. 14D



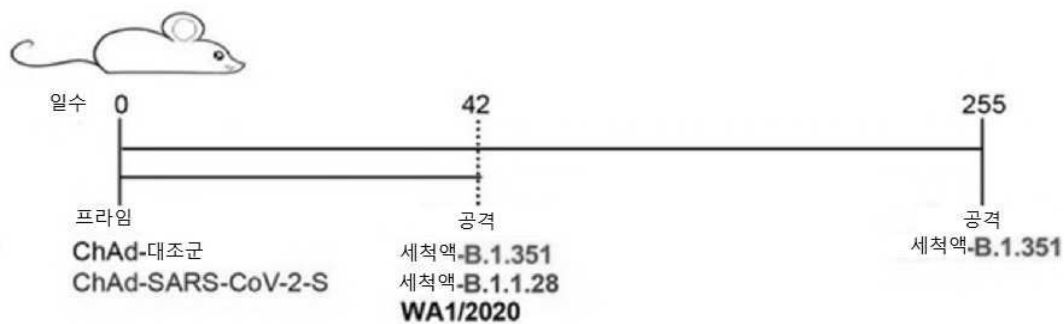
도. 14E

도. 14F

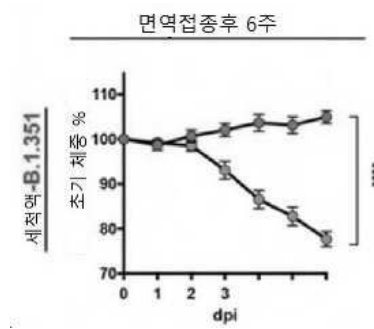
도. 14G

도. 14H

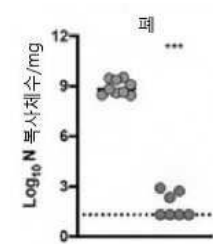
도면15a



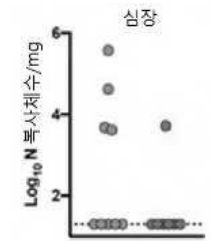
도면15b



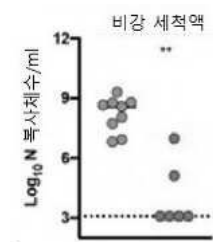
도면15c



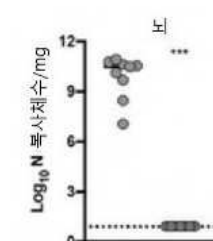
도면15d



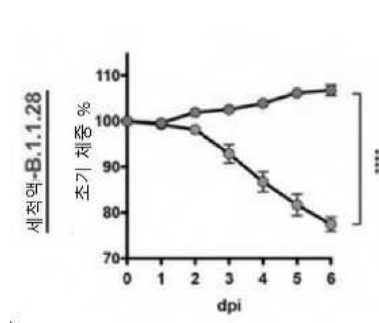
도면15e



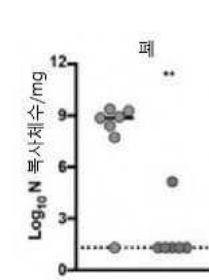
도면15f



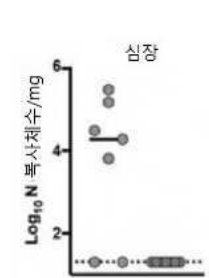
도면15g



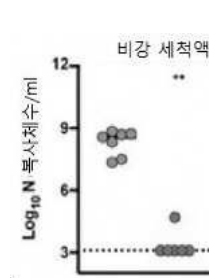
도면15h



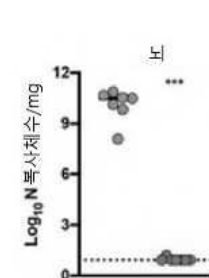
도면15i



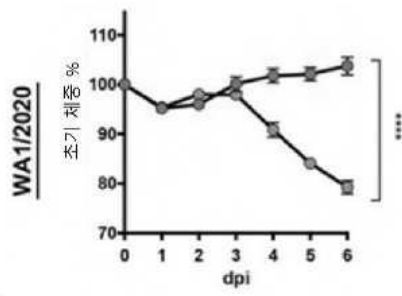
도면15j



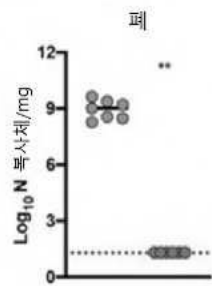
도면15k



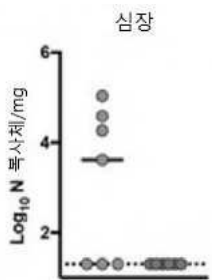
도면15l



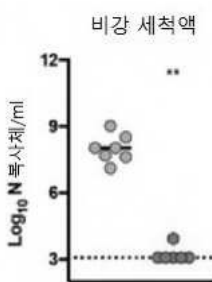
도면15m



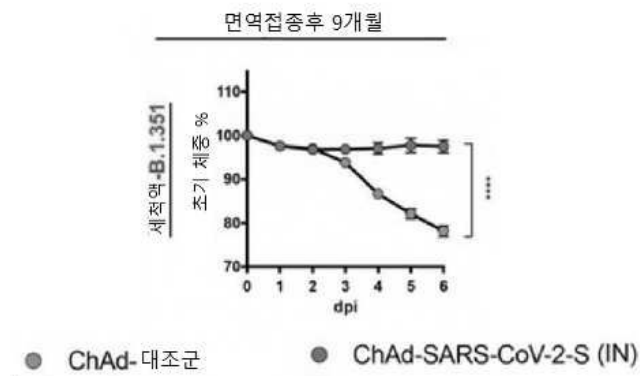
도면15n



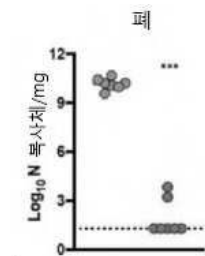
도면15o



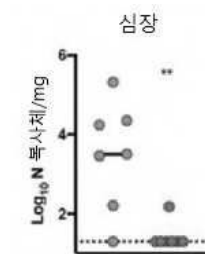
도면15p



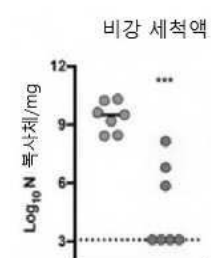
도면15q



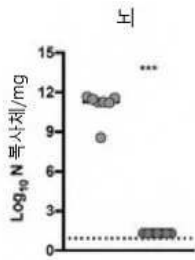
도면15r



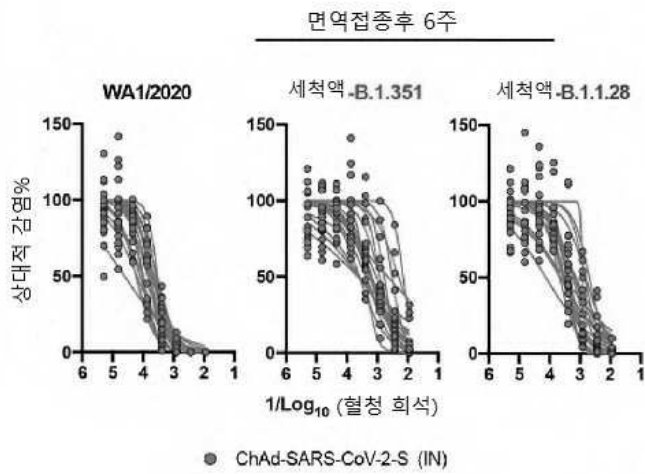
도면15s



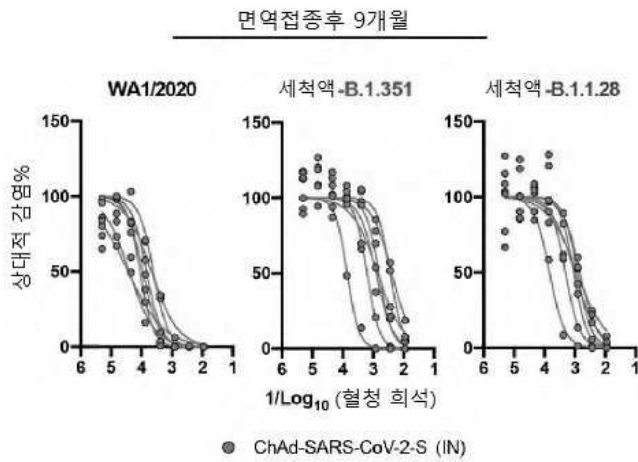
도면15t



도면16a



도면16b



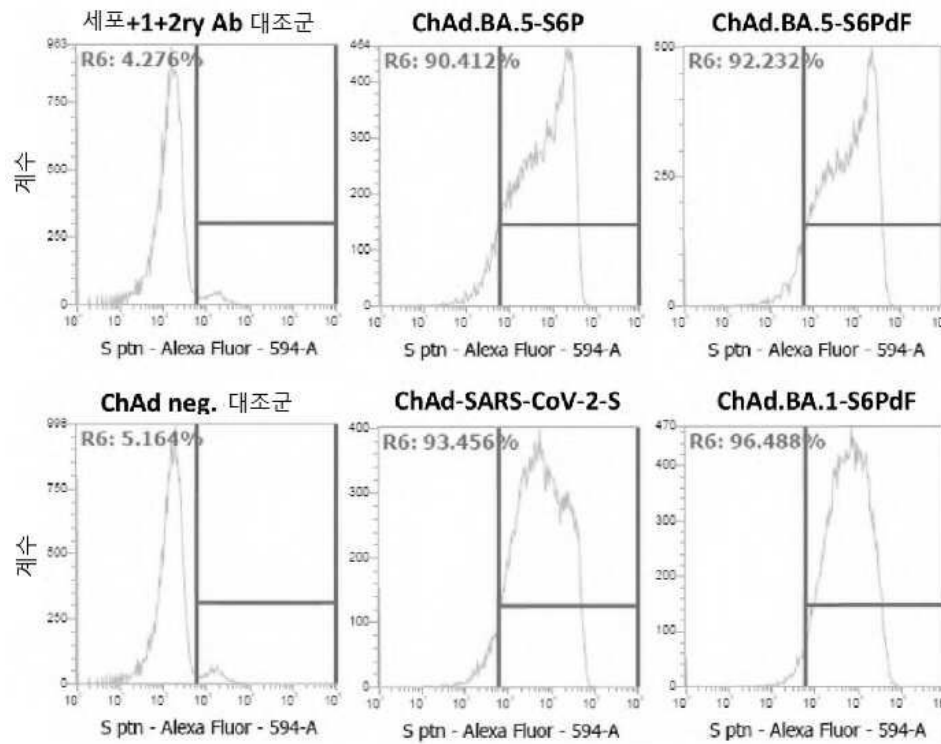
도면17a

	(1)	1	10	20	30	40	50	60	70	Section 1
SARS-CoV2-Wuhan-S	(1)	HFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLFPAYTHSFTAGVYTPDAVFSSVLHSTQDLFLPFFSNVTHFAIHVSGTNGT								
SARS-CoV2-Omicron-US	(1)	HFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLFPAYTHSFTAGVYTPDAVFSSVLHSTQDLFLPFFSNVTHFAIHVSGTNGT								
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(1)	HFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLFPAYTHSFTAGVYTPDAVFSSVLHSTQDLFLPFFSNVTHFAIHVSGTNGT								
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(1)	HFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLFPAYTHSFTAGVYTPDAVFSSVLHSTQDLFLPFFSNVTHFAIHVSGTNGT								
SARS-CoV2-Omicron-S6PdF	(1)	HFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLFPAYTHSFTAGVYTPDAVFSSVLHSTQDLFLPFFSNVTHFAIHVSGTNGT								
	(77)	77	90	100	110	120	130	140	150	Section 2
SARS-CoV2-Wuhan-S	(77)	KRFDNHVLFPNDGVYFASDEKSNIIAGWIFGTTLDSEKTSGLLVNNATNVVIKVCSEFQFCNDPFLDGVVYHNNKSW								
SARS-CoV2-Omicron-US	(75)	KRFDNHVLFPNDGVYFASDEKSNIIAGWIFGTTLDSEKTSGLLVNNATNVVIKVCSEFQFCNDPFLDGVVYHNNKSW								
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(75)	KRFDNHVLFPNDGVYFASDEKSNIIAGWIFGTTLDSEKTSGLLVNNATNVVIKVCSEFQFCNDPFLDGVVYHNNKSW								
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(75)	KRFDNHVLFPNDGVYFASDEKSNIIAGWIFGTTLDSEKTSGLLVNNATNVVIKVCSEFQFCNDPFLDGVVYHNNKSW								
SARS-CoV2-Omicron-S6PdF	(75)	KRFDNHVLFPNDGVYFASDEKSNIIAGWIFGTTLDSEKTSGLLVNNATNVVIKVCSEFQFCNDPFLDGVVYHNNKSW								
	(153)	153	160	170	180	190	200	210	220	Section 3
SARS-CoV2-Wuhan-S	(153)	HESEFVYSSANNCTFEYVSQFFLMDLEGRGQGNFKNLREYVFNIDGYFKIYSKHTPIIVSEFSDLPQGFSALEPL								
SARS-CoV2-Omicron-US	(148)	HESEFVYSSANNCTFEYVSQFFLMDLEGRGQGNFKNLREYVFNIDGYFKIYSKHTPIIVSEFSDLPQGFSALEPL								
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(148)	HESEFVYSSANNCTFEYVSQFFLMDLEGRGQGNFKNLREYVFNIDGYFKIYSKHTPIIVSEFSDLPQGFSALEPL								
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(148)	HESEFVYSSANNCTFEYVSQFFLMDLEGRGQGNFKNLREYVFNIDGYFKIYSKHTPIIVSEFSDLPQGFSALEPL								
SARS-CoV2-Omicron-S6PdF	(148)	HESEFVYSSANNCTFEYVSQFFLMDLEGRGQGNFKNLREYVFNIDGYFKIYSKHTPIIVSEFSDLPQGFSALEPL								
	(229)	229	240	250	260	270	280	290	304	Section 4
SARS-CoV2-Wuhan-S	(227)	VQLPIGINTTRFQTLALHRSYLTPODSSSGWTAGAAAYVGYLOPRTFLLKYHNGTITDAVDCALDPLSETKCT								
SARS-CoV2-Omicron-US	(224)	VQLPIGINTTRFQTLALHRSYLTPODSSSGWTAGAAAYVGYLOPRTFLLKYHNGTITDAVDCALDPLSETKCT								
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(224)	VQLPIGINTTRFQTLALHRSYLTPODSSSGWTAGAAAYVGYLOPRTFLLKYHNGTITDAVDCALDPLSETKCT								
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(224)	VQLPIGINTTRFQTLALHRSYLTPODSSSGWTAGAAAYVGYLOPRTFLLKYHNGTITDAVDCALDPLSETKCT								
SARS-CoV2-Omicron-S6PdF	(224)	VQLPIGINTTRFQTLALHRSYLTPODSSSGWTAGAAAYVGYLOPRTFLLKYHNGTITDAVDCALDPLSETKCT								
	(305)	305	310	320	330	340	350	360	370	Section 5
SARS-CoV2-Wuhan-S	(303)	LKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFFNITLCPFEVFNATRFASVYANNKRIENCVADYSVLYNABFFTFK								
SARS-CoV2-Omicron-US	(300)	LKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFFNITLCPFEVFNATRFASVYANNKRIENCVADYSVLYNABFFTFK								
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(300)	LKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFFNITLCPFEVFNATRFASVYANNKRIENCVADYSVLYNABFFTFK								
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(300)	LKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFFNITLCPFEVFNATRFASVYANNKRIENCVADYSVLYNABFFTFK								
SARS-CoV2-Omicron-S6PdF	(300)	LKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFFNITLCPFEVFNATRFASVYANNKRIENCVADYSVLYNABFFTFK								
	(381)	381	390	400	410	420	430	440	456	Section 6
SARS-CoV2-Wuhan-S	(379)	CYGVSPKTLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVVKQIAFGQTGNIADYNTKLPDDFTGCVIANNENLDSKVSIGNYTYLR								
SARS-CoV2-Omicron-US	(376)	CYGVSPKTLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVVKQIAFGQTGNIADYNTKLPDDFTGCVIANNENLDSKVSIGNYTYLR								
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(376)	CYGVSPKTLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVVKQIAFGQTGNIADYNTKLPDDFTGCVIANNENLDSKVSIGNYTYLR								
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(376)	CYGVSPKTLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVVKQIAFGQTGNIADYNTKLPDDFTGCVIANNENLDSKVSIGNYTYLR								
SARS-CoV2-Omicron-S6PdF	(376)	CYGVSPKTLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVVKQIAFGQTGNIADYNTKLPDDFTGCVIANNENLDSKVSIGNYTYLR								
	(457)	457	470	480	490	500	510	520	532	Section 7
SARS-CoV2-Wuhan-S	(455)	LFRKSNLKPFERDISTEYQAGNRPONGVAGFNCYFPLSSTSEFPTGVCGRQPYRVVVLSEFLLHAPATVCGPFRKS								
SARS-CoV2-Omicron-US	(452)	LFRKSNLKPFERDISTEYQAGNRPONGVAGFNCYFPLSSTSEFPTGVCGRQPYRVVVLSEFLLHAPATVCGPFRKS								
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(452)	LFRKSNLKPFERDISTEYQAGNRPONGVAGFNCYFPLSSTSEFPTGVCGRQPYRVVVLSEFLLHAPATVCGPFRKS								
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(452)	LFRKSNLKPFERDISTEYQAGNRPONGVAGFNCYFPLSSTSEFPTGVCGRQPYRVVVLSEFLLHAPATVCGPFRKS								
SARS-CoV2-Omicron-S6PdF	(452)	LFRKSNLKPFERDISTEYQAGNRPONGVAGFNCYFPLSSTSEFPTGVCGRQPYRVVVLSEFLLHAPATVCGPFRKS								
	(533)	533	540	550	560	570	580	590	600	Section 8
SARS-CoV2-Wuhan-S	(531)	TNLVNKKCVNFENGLKGTGVLTESNKKFLPFQGFGRDIADTTDAVADPQTLLEILDITPCSFGGVSVITPGNTEN								
SARS-CoV2-Omicron-US	(528)	TNLVNKKCVNFENGLKGTGVLTESNKKFLPFQGFGRDIADTTDAVADPQTLLEILDITPCSFGGVSVITPGNTEN								
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(528)	TNLVNKKCVNFENGLKGTGVLTESNKKFLPFQGFGRDIADTTDAVADPQTLLEILDITPCSFGGVSVITPGNTEN								
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(528)	TNLVNKKCVNFENGLKGTGVLTESNKKFLPFQGFGRDIADTTDAVADPQTLLEILDITPCSFGGVSVITPGNTEN								
SARS-CoV2-Omicron-S6PdF	(528)	TNLVNKKCVNFENGLKGTGVLTESNKKFLPFQGFGRDIADTTDAVADPQTLLEILDITPCSFGGVSVITPGNTEN								

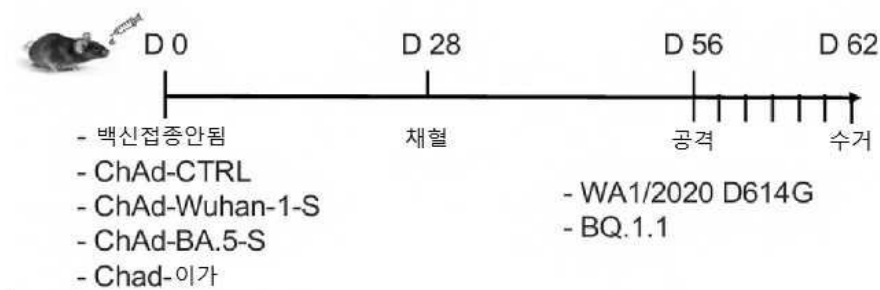
도면17b

Section 9									
	(609)	609	620	630	640	650	660	670	684
SARS-CoV2-Wuhan-S	(607)	QVAVLYCGVNCTEVPVAIHADQLTPTTRVYVSTGSRVFTQTRAGCLIGAEVYVNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSEPF							
SARS-CoV2-Omicron-US	(604)	QVAVLYCGVNCTEVPVAIHADQLTPTTRVYVSTGSRVFTQTRAGCLIGAEVYVNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSEPF							
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(604)	QVAVLYCGVNCTEVPVAIHADQLTPTTRVYVSTGSRVFTQTRAGCLIGAEVYVNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSEPF							
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(604)	QVAVLYCGVNCTEVPVAIHADQLTPTTRVYVSTGSRVFTQTRAGCLIGAEVYVNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSEPF							
SARS-CoV2-Omicron-S6PdF	(604)	QVAVLYCGVNCTEVPVAIHADQLTPTTRVYVSTGSRVFTQTRAGCLIGAEVYVNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSEPF							
Section 10									
	(685)	685	690	700	710	720	730	740	760
SARS-CoV2-Wuhan-S	(683)	BARSVASQSI IAYTMSLGAENSVAYSNNIAIPTNFTISVTTIELPVSMTKTSVDCMTYICGDSFECNLLLOYGS							
SARS-CoV2-Omicron-US	(680)	BARSVASQSI IAYTMSLGAENSVAYSNNIAIPTNFTISVTTIELPVSMTKTSVDCMTYICGDSFECNLLLOYGS							
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(680)	BARSVASQSI IAYTMSLGAENSVAYSNNIAIPTNFTISVTTIELPVSMTKTSVDCMTYICGDSFECNLLLOYGS							
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(680)	BARSVASQSI IAYTMSLGAENSVAYSNNIAIPTNFTISVTTIELPVSMTKTSVDCMTYICGDSFECNLLLOYGS							
SARS-CoV2-Omicron-S6PdF	(680)	BARSVASQSI IAYTMSLGAENSVAYSNNIAIPTNFTISVTTIELPVSMTKTSVDCMTYICGDSFECNLLLOYGS							
Section 11									
	(761)	761	770	780	790	800	810	820	836
SARS-CoV2-Wuhan-S	(759)	FCTQLRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKXFGGFNF3QILPDPFKFKRSPIEDLLFNKVTLADAGFI							
SARS-CoV2-Omicron-US	(756)	FCTQLRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKXFGGFNF3QILPDPFKFKRSPIEDLLFNKVTLADAGFI							
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(756)	FCTQLRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKXFGGFNF3QILPDPFKFKRSPIEDLLFNKVTLADAGFI							
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(756)	FCTQLRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKXFGGFNF3QILPDPFKFKRSPIEDLLFNKVTLADAGFI							
SARS-CoV2-Omicron-S6PdF	(756)	FCTQLRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKXFGGFNF3QILPDPFKFKRSPIEDLLFNKVTLADAGFI							
Section 12									
	(837)	837	850	860	870	880	890	900	912
SARS-CoV2-Wuhan-S	(835)	RQYGDCLGDI AARDLICAQKFTGLTVLPFLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGALQIFPAMQAHYRPNIG							
SARS-CoV2-Omicron-US	(832)	RQYGDCLGDI AARDLICAQKFTGLTVLPFLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGALQIFPAMQAHYRPNIG							
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(832)	RQYGDCLGDI AARDLICAQKFTGLTVLPFLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGALQIFPAMQAHYRPNIG							
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(832)	RQYGDCLGDI AARDLICAQKFTGLTVLPFLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGALQIFPAMQAHYRPNIG							
SARS-CoV2-Omicron-S6PdF	(832)	RQYGDCLGDI AARDLICAQKFTGLTVLPFLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGALQIFPAMQAHYRPNIG							
Section 13									
	(913)	913	920	930	940	950	960	970	988
SARS-CoV2-Wuhan-S	(911)	VTQNVLYENQKLIANQFNHSAIGKIQDELSTPSALGKLQDVVNHQAALNTLVKQLSSFGAISSVLNDIFSRLLDK							
SARS-CoV2-Omicron-US	(908)	VTQNVLYENQKLIANQFNHSAIGKIQDELSTPSALGKLQDVVNHQAALNTLVKQLSSFGAISSVLNDIFSRLLDK							
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(908)	VTQNVLYENQKLIANQFNHSAIGKIQDELSTPSALGKLQDVVNHQAALNTLVKQLSSFGAISSVLNDIFSRLLDK							
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(908)	VTQNVLYENQKLIANQFNHSAIGKIQDELSTPSALGKLQDVVNHQAALNTLVKQLSSFGAISSVLNDIFSRLLDK							
SARS-CoV2-Omicron-S6PdF	(908)	VTQNVLYENQKLIANQFNHSAIGKIQDELSTPSALGKLQDVVNHQAALNTLVKQLSSFGAISSVLNDIFSRLLDK							
Section 14									
	(989)	989	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1064
SARS-CoV2-Wuhan-S	(987)	VBAEVQIDRLITGRLOSQTYYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSCEVLGQSKRVDFCGKGYHLSFPQSAFPGVVF							
SARS-CoV2-Omicron-US	(984)	VBAEVQIDRLITGRLOSQTYYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSCEVLGQSKRVDFCGKGYHLSFPQSAFPGVVF							
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(984)	VBAEVQIDRLITGRLOSQTYYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSCEVLGQSKRVDFCGKGYHLSFPQSAFPGVVF							
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(984)	VBAEVQIDRLITGRLOSQTYYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSCEVLGQSKRVDFCGKGYHLSFPQSAFPGVVF							
SARS-CoV2-Omicron-S6PdF	(984)	VBAEVQIDRLITGRLOSQTYYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSCEVLGQSKRVDFCGKGYHLSFPQSAFPGVVF							
Section 15									
	(1065)	1065	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130
SARS-CoV2-Wuhan-S	(1063)	LHVTTYVPAQSEKFTTAPAICHGDKARFPREGVTVSNGTHWFVTRNFEYEPQIITDNTFVSGNCDVVGIVNNTVY							
SARS-CoV2-Omicron-US	(1060)	LHVTTYVPAQSEKFTTAPAICHGDKARFPREGVTVSNGTHWFVTRNFEYEPQIITDNTFVSGNCDVVGIVNNTVY							
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(1060)	LHVTTYVPAQSEKFTTAPAICHGDKARFPREGVTVSNGTHWFVTRNFEYEPQIITDNTFVSGNCDVVGIVNNTVY							
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(1060)	LHVTTYVPAQSEKFTTAPAICHGDKARFPREGVTVSNGTHWFVTRNFEYEPQIITDNTFVSGNCDVVGIVNNTVY							
SARS-CoV2-Omicron-S6PdF	(1060)	LHVTTYVPAQSEKFTTAPAICHGDKARFPREGVTVSNGTHWFVTRNFEYEPQIITDNTFVSGNCDVVGIVNNTVY							
Section 16									
	(1141)	1141	1150	1160	1170	1180	1190	1200	1216
SARS-CoV2-Wuhan-S	(1139)	DPLQPELDSPFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVYNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKMPW							
SARS-CoV2-Omicron-US	(1136)	DPLQPELDSPFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVYNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKMPW							
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(1136)	DPLQPELDSPFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVYNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKMPW							
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(1136)	DPLQPELDSPFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVYNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKMPW							
SARS-CoV2-Omicron-S6PdF	(1136)	DPLQPELDSPFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVYNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKMPW							
Section 17									
	(1217)	1217	1230	1240	1250	1260	1275		
SARS-CoV2-Wuhan-S	(1215)	YIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCNTSCCSCLGKCCSCGSCCKFDEDDSEFVLKGVKLYHT							
SARS-CoV2-Omicron-US	(1212)	YIWLGFIAGLIAIAVMVTIMLCCNTSCCSCLGKCCSCGSCCKFDEDDSEFVLKGVKLYHT							
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(1212)	YIWLGFIAGLIAIAVMVTIMLCCNTSCCSCLGKCCSCGSCCKFDEDDSEFVLKGVKLYHT							
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(1212)	YIWLGFIAGLIAIAVMVTIMLCCNTSCCSCLGKCCSCGSCCKFDEDDSEFVLKGVKLYHT							
SARS-CoV2-Omicron-S6PdF	(1212)	YIWLGFIAGLIAIAVMVTIMLCCNTSCCSCLGKCCSCGSCCKFDEDDSEFVLKGVKLYHT							

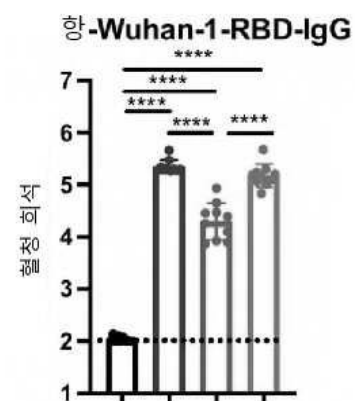
도면 18



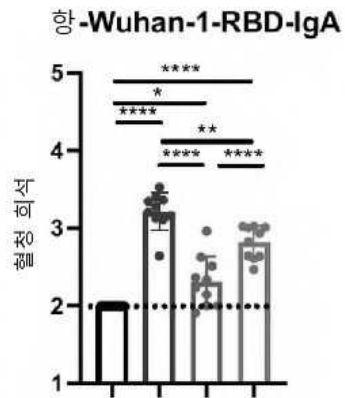
도면 19a



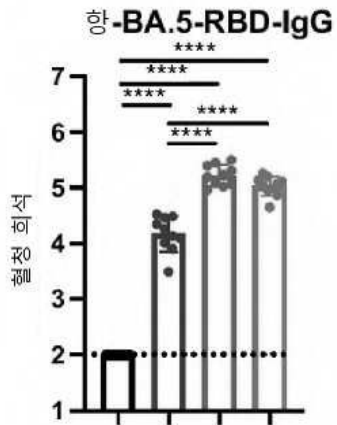
도면 19b



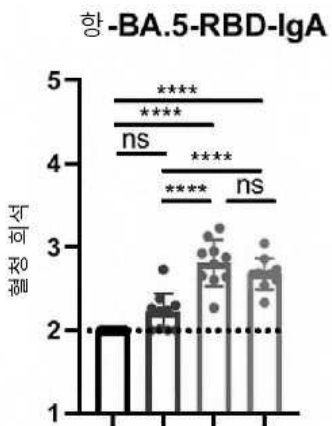
도면19c



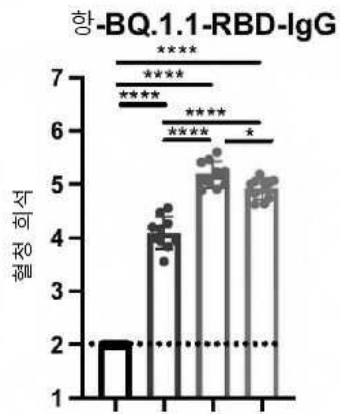
도면19d



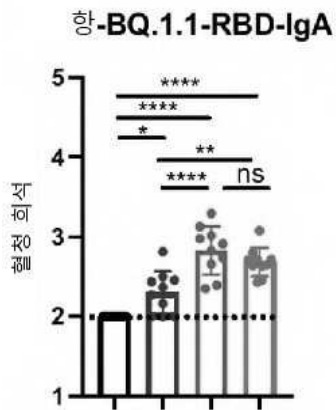
도면19e



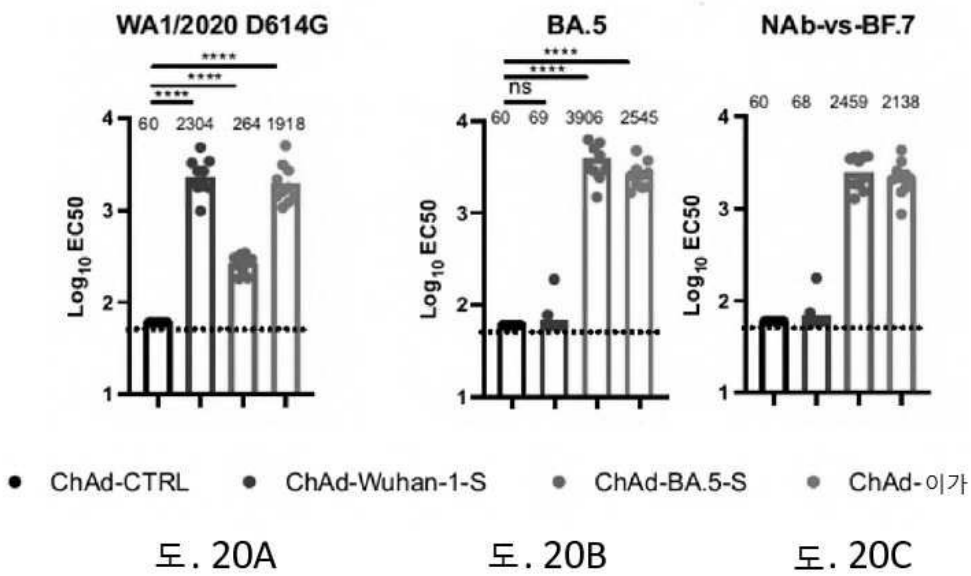
도면19f



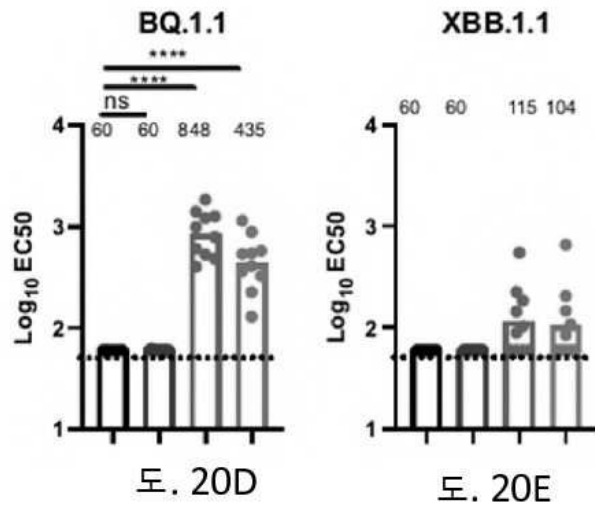
도면19g



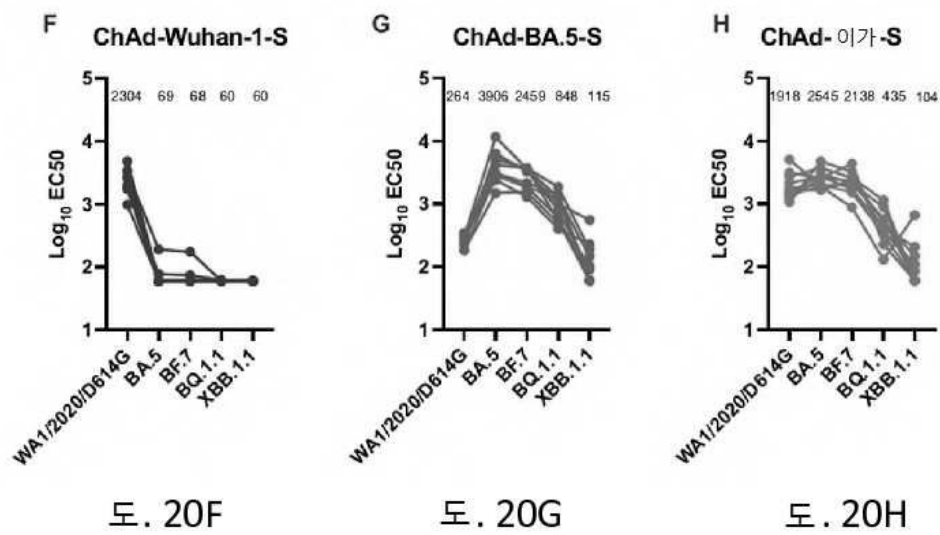
도면20abc



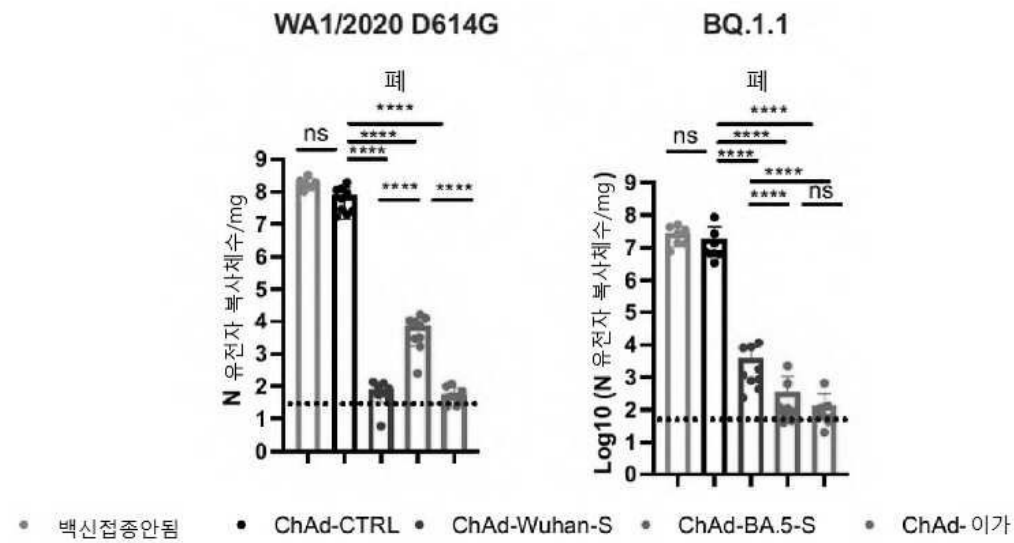
도면20de



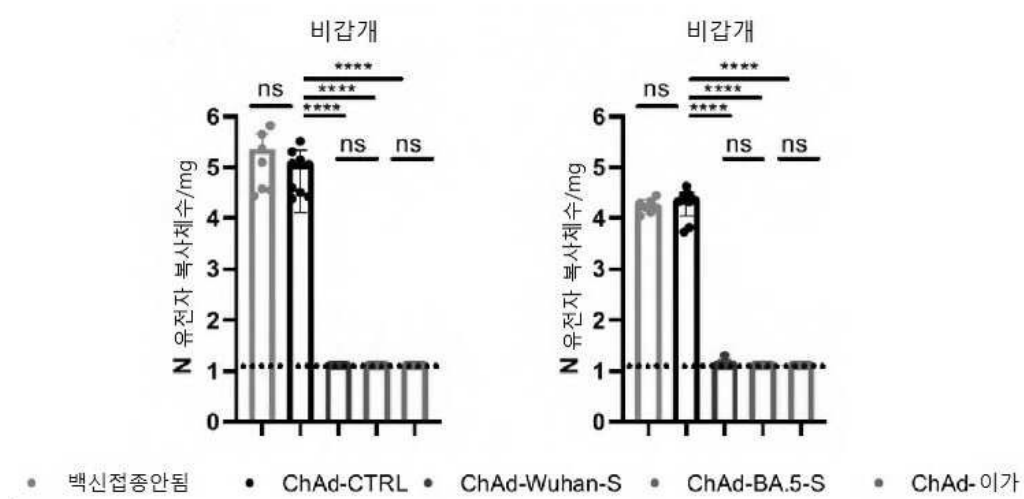
도면20fgh



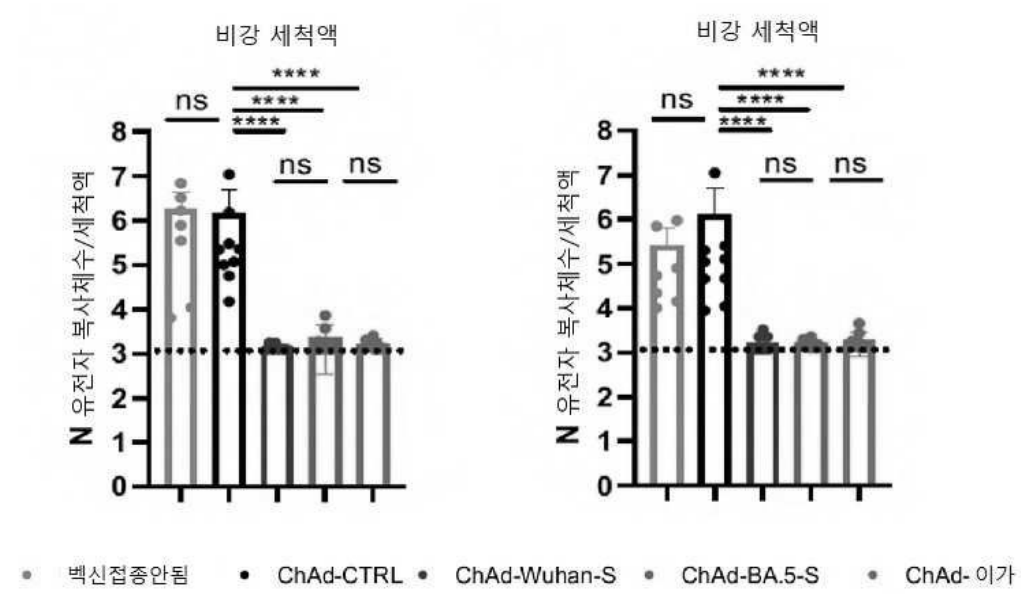
도면21a



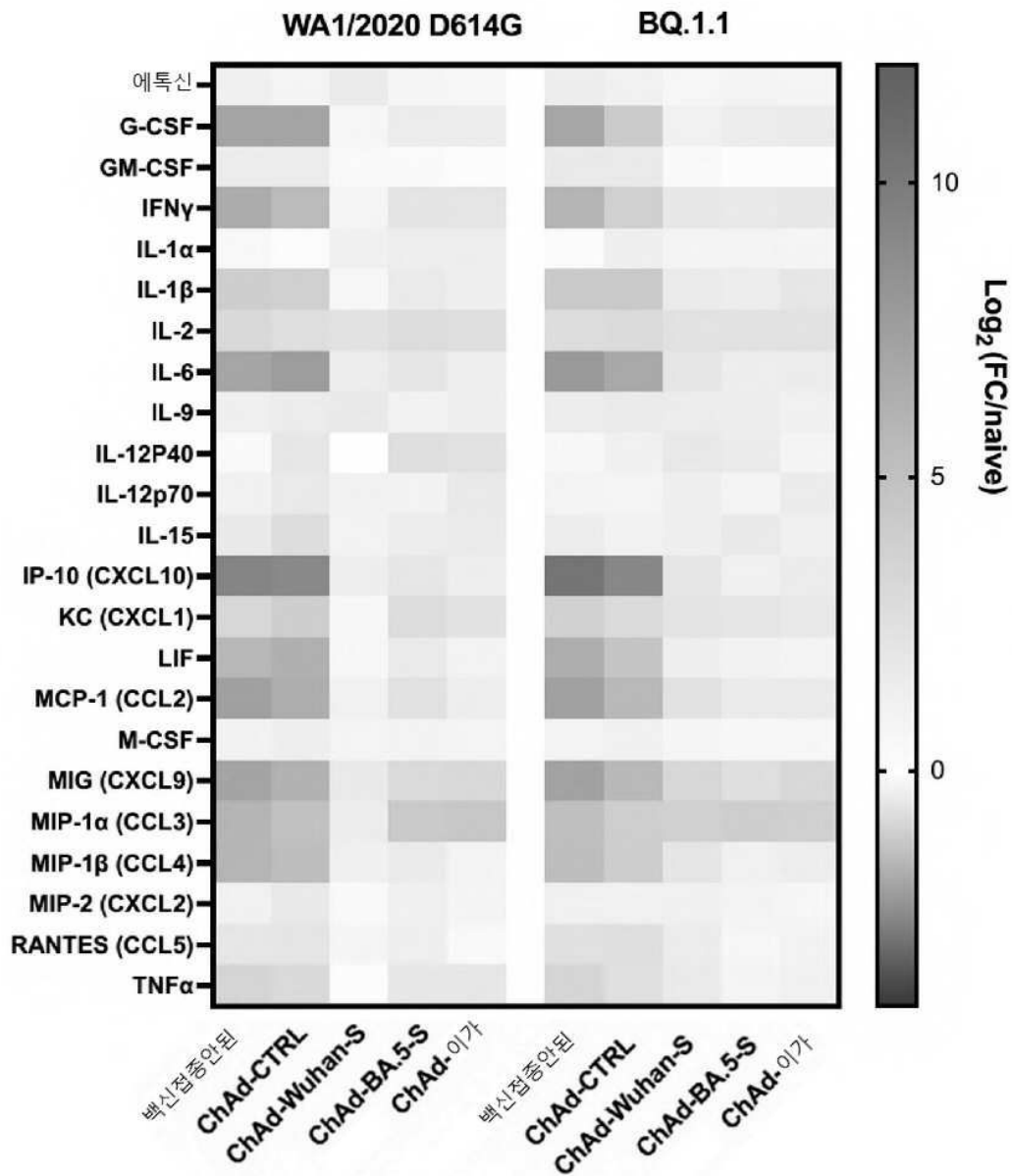
도면21b



도면21c



도면22



도면23b

	cov	pid	721	800
1 SEQ_ID_NO_3	100.0%	100.0%	TLSVTEILPVS TKTS DGT YICDSTEASN LLOYSFQTO NRALT GIAVEQDNTQEF Q KQ YKTPPIKDF	
2 SEQ_ID_NO_20	99.6%	96.6%	TLSVTEILPVS TKTS DGT YICDSTEASN LLOYSFQTO NRALT GIAVEQDNTQEF Q KQ YKTPPIKDF	
3 SEQ_ID_NO_21	99.6%	96.9%	TLSVTEILPVS TKTS DGT YICDSTEASN LLOYSFQTO NRALT GIAVEQDNTQEF Q KQ YKTPPIKDF	
4 SEQ_ID_NO_10	99.6%	96.7%	TLSVTEILPVS TKTS DGT YICDSTEASN LLOYSFQTO NRALT GIAVEQDNTQEF Q KQ YKTPPIKDF	
5 SEQ_ID_NO_11	99.6%	96.4%	TLSVTEILPVS TKTS DGT YICDSTEASN LLOYSFQTO NRALT GIAVEQDNTQEF Q KQ YKTPPIKDF	
6 SEQ_ID_NO_12	99.6%	96.2%	TLSVTEILPVS TKTS DGT YICDSTEASN LLOYSFQTO NRALT GIAVEQDNTQEF Q KQ YKTPPIKDF	
	cov	pid	801	880
1 SEQ_ID_NO_3	100.0%	100.0%	GFNFSQLPD SKSKRSF ED LFNKVLADAGE KQYDCLDIA RD LIG QKNGLT VLPPLTDE IIAQYTSALL	
2 SEQ_ID_NO_20	99.6%	96.6%	GFNFSQLPD SKSKRSF ED LFNKVLADAGE KQYDCLDIA RD LIG QKNGLT VLPPLTDE IIAQYTSALL	
3 SEQ_ID_NO_21	99.6%	96.9%	GFNFSQLPD SKSKRSF ED LFNKVLADAGE KQYDCLDIA RD LIG QKNGLT VLPPLTDE IIAQYTSALL	
4 SEQ_ID_NO_10	99.6%	96.7%	GFNFSQLPD SKSKRSF ED LFNKVLADAGE KQYDCLDIA RD LIG QKNGLT VLPPLTDE IIAQYTSALL	
5 SEQ_ID_NO_11	99.6%	96.4%	GFNFSQLPD SKSKRSF ED LFNKVLADAGE KQYDCLDIA RD LIG QKNGLT VLPPLTDE IIAQYTSALL	
6 SEQ_ID_NO_12	99.6%	96.2%	GFNFSQLPD SKSKRSF ED LFNKVLADAGE KQYDCLDIA RD LIG QKNGLT VLPPLTDE IIAQYTSALL	
	cov	pid	881	960
1 SEQ_ID_NO_3	100.0%	100.0%	AGTITSMTFSAGPALQIPFQ AYRFGIGVTONVLYENKLI NOFNSAIG QDS SST SALCK QD VANNQ	
2 SEQ_ID_NO_20	99.6%	96.6%	AGTITSMTFSAGPALQIPFQ AYRFGIGVTONVLYENKLI NOFNSAIG QDS SST SALCK QD VANNQ	
3 SEQ_ID_NO_21	99.6%	96.9%	AGTITSMTFSAGPALQIPFQ AYRFGIGVTONVLYENKLI NOFNSAIG QDS SST SALCK QD VANNQ	
4 SEQ_ID_NO_10	99.6%	96.7%	AGTITSMTFSAGPALQIPFQ AYRFGIGVTONVLYENKLI NOFNSAIG QDS SST SALCK QD VANNQ	
5 SEQ_ID_NO_11	99.6%	96.4%	AGTITSMTFSAGPALQIPFQ AYRFGIGVTONVLYENKLI NOFNSAIG QDS SST SALCK QD VANNQ	
6 SEQ_ID_NO_12	99.6%	96.2%	AGTITSMTFSAGPALQIPFQ AYRFGIGVTONVLYENKLI NOFNSAIG QDS SST SALCK QD VANNQ	
	cov	pid	961	1040
1 SEQ_ID_NO_3	100.0%	100.0%	INTLWQSSFGALSSNDLSRDPPEEQDRITCRQS QTYTQQLRAAE RSNLAATK SECVLCQSK	
2 SEQ_ID_NO_20	99.6%	96.6%	INTLWQSSFGALSSNDLSRDPPEEQDRITCRQS QTYTQQLRAAE RSNLAATK SECVLCQSK	
3 SEQ_ID_NO_21	99.6%	96.9%	INTLWQSSFGALSSNDLSRDPPEEQDRITCRQS QTYTQQLRAAE RSNLAATK SECVLCQSK	
4 SEQ_ID_NO_10	99.6%	96.7%	INTLWQSSFGALSSNDLSRDPPEEQDRITCRQS QTYTQQLRAAE RSNLAATK SECVLCQSK	
5 SEQ_ID_NO_11	99.6%	96.4%	INTLWQSSFGALSSNDLSRDPPEEQDRITCRQS QTYTQQLRAAE RSNLAATK SECVLCQSK	
6 SEQ_ID_NO_12	99.6%	96.2%	INTLWQSSFGALSSNDLSRDPPEEQDRITCRQS QTYTQQLRAAE RSNLAATK SECVLCQSK	
	cov	pid	1041	1120
1 SEQ_ID_NO_3	100.0%	100.0%	RDFGCKVHUSFQS DPGVVFH TYVPAQKNFTTAPALQIDK HFRREGVFSN DMF TORNFYE Q ITTD	
2 SEQ_ID_NO_20	99.6%	96.6%	RDFGCKVHUSFQS DPGVVFH TYVPAQKNFTTAPALQIDK HFRREGVFSN DMF TORNFYE Q ITTD	
3 SEQ_ID_NO_21	99.6%	96.9%	RDFGCKVHUSFQS DPGVVFH TYVPAQKNFTTAPALQIDK HFRREGVFSN DMF TORNFYE Q ITTD	
4 SEQ_ID_NO_10	99.6%	96.7%	RDFGCKVHUSFQS DPGVVFH TYVPAQKNFTTAPALQIDK HFRREGVFSN DMF TORNFYE Q ITTD	
5 SEQ_ID_NO_11	99.6%	96.4%	RDFGCKVHUSFQS DPGVVFH TYVPAQKNFTTAPALQIDK HFRREGVFSN DMF TORNFYE Q ITTD	
6 SEQ_ID_NO_12	99.6%	96.2%	RDFGCKVHUSFQS DPGVVFH TYVPAQKNFTTAPALQIDK HFRREGVFSN DMF TORNFYE Q ITTD	
	cov	pid	1121	1200
1 SEQ_ID_NO_3	100.0%	100.0%	NTF S NCOVIGIANTVD Q E DSFKEE DKYFIONITS D DLGD SGN S V N QKE DR NE VON NESLI	
2 SEQ_ID_NO_20	99.6%	96.6%	NTF S NCOVIGIANTVD Q E DSFKEE DKYFIONITS D DLGD SGN S V N QKE DR NE VON NESLI	
3 SEQ_ID_NO_21	99.6%	96.9%	NTF S NCOVIGIANTVD Q E DSFKEE DKYFIONITS D DLGD SGN S V N QKE DR NE VON NESLI	
4 SEQ_ID_NO_10	99.6%	96.7%	NTF S NCOVIGIANTVD Q E DSFKEE DKYFIONITS D DLGD SGN S V N QKE DR NE VON NESLI	
5 SEQ_ID_NO_11	99.6%	96.4%	NTF S NCOVIGIANTVD Q E DSFKEE DKYFIONITS D DLGD SGN S V N QKE DR NE VON NESLI	
6 SEQ_ID_NO_12	99.6%	96.2%	NTF S NCOVIGIANTVD Q E DSFKEE DKYFIONITS D DLGD SGN S V N QKE DR NE VON NESLI	
	cov	pid	1201	1275
1 SEQ_ID_NO_3	100.0%	100.0%	DQEL KYEQQIMMY NIGTAGLIATVW DMLCC TCCCLKGCC CESCKFDEDDOSEVLCK K HYT	
2 SEQ_ID_NO_20	99.6%	96.6%	DQEL KYEQQIMMY NIGTAGLIATVW DMLCC TCCCLKGCC CESCKFDEDDOSEVLCK K HYT	
3 SEQ_ID_NO_21	99.6%	96.9%	DQEL KYEQQIMMY NIGTAGLIATVW DMLCC TCCCLKGCC CESCKFDEDDOSEVLCK K HYT	
4 SEQ_ID_NO_10	99.6%	96.7%	DQEL KYEQQIMMY NIGTAGLIATVW DMLCC TCCCLKGCC CESCKFDEDDOSEVLCK K HYT	
5 SEQ_ID_NO_11	99.6%	96.4%	DQEL KYEQQIMMY NIGTAGLIATVW DMLCC TCCCLKGCC CESCKFDEDDOSEVLCK K HYT	
6 SEQ_ID_NO_12	99.6%	96.2%	DQEL KYEQQIMMY NIGTAGLIATVW DMLCC TCCCLKGCC CESCKFDEDDOSEVLCK K HYT	

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.