(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0160349
(43) 공개일자 2023년11월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/005 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/005 (2013.01)
A61K 39/215 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7036140
(22) 출원일자(국제) 2022년03월18일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년10월20일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/020974
(87) 국제공개번호 WO 2022/203963
국제공개일자 2022년09월29일
(30) 우선권주장
63/164,487 2021년03월22일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
노바백스, 인코포레이티드
미국 메릴랜드 20878 게이더스버그 퍼스트필드 로드 21
(72) 발명자
스미스 게일
미국 20878 메릴랜드 게이더스버그 퍼스트필드 로드 21 노바백스 인코포레이티드 내
마서리 마이클 제이
미국 20878 메릴랜드 게이더스버그 퍼스트필드 로드 21 노바백스 인코포레이티드 내
티엔 징-후이
미국 20878 메릴랜드 게이더스버그 퍼스트필드 로드 21 노바백스 인코포레이티드 내
(74) 대리인
특허법인(유한)케이비케이

전체 청구항 수 : 총 66 항

(54) 발명의 명칭 **코로나 바이러스 백신 제제**

(57) 요 약

백신에 사용하기에 적합한 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질 및 이를 포함하는 나노입자가 본 명세서에 개시된다. 나노 입자는 향상된 안정성과 우수한 면역원성을 초래하는 세제 코어로 둘러싸여 있고 이와 관련된 병원체로부터의 항원을 제시한다. 백신 및 나노입자를 제조하기 위한 투여량, 제형 및 방법이 또한 개시된다.

대 표 도 - 도1

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSN
VTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNN
ATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEG
KQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLAL
HRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLK
SFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYS
VLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLP
DDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGF
NCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNG
LTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQ
VAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIG
AGICASYQTQTNSP**RRAR**SVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVS
MTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYK
TPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICA
QKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVT
QNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGA
ISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECV
LGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPRE
GVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEEL
DKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWP
WYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT

(52) CPC특허분류
A61P 31/14 (2018.01)
A61K 2039/545 (2013.01)
A61K 2039/55577 (2013.01)
A61K 2039/57 (2013.01)
A61K 2039/575 (2013.01)
C12N 2770/20022 (2013.01)
C12N 2770/20034 (2013.01)
C12N 2770/20071 (2013.01)

(30) 우선권주장
63/176,825 2021년04월19일 미국(US)
63/177,059 2021년04월20일 미국(US)
63/195,986 2021년06월02일 미국(US)
63/280,395 2021년11월17일 미국(US)
63/290,439 2021년12월16일 미국(US)
63/292,196 2021년12월21일 미국(US)
63/293,468 2021년12월23일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

다음을 포함하는 코로나바이러스(CoV) 스파이크(S) 당단백질:

(i) 불활성화된 퓨린 절단 부위를 갖는 S1 서브유닛, 여기서 S1 서브유닛은 N-말단 도메인(NTD), 수용체 결합 도메인(RBD), 서브도메인 1 및 2(SD1/2)를 포함하고, 여기서 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ의 아미노산 서열을 갖는다;

여기서 NTD는 선택적으로 다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이를 포함하고:

(a) 아미노산 56, 57, 131, 132, 144, 145, 228, 229, 230, 231, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산의 결실;

(b) 아미노산 132 뒤에 1, 2, 3 또는 4개의 아미노산의 삽입; 및

(c) 아미노산 5, 6, 7, 13, 51, 53, 56, 57, 62, 63, 67, 82, 125, 129, 131, 132, 133, 139, 143, 144, 145, 177, 200, 201, 202, 209, 229, 233, 240, 245 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산의 돌연변이;

여기서 RBD는 선택적으로 아미노산 333, 404, 419, 426, 439, 440, 464, 465, 471, 477, 481, 488 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이를 포함하고;

여기서 SD1/2 도메인은 557, 600, 601, 642, 664, 668 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이를 임의로 포함하고;

(ii) S2 서브유닛, 여기서 아미노산 973 및 974가 프롤린이고,

S2 서브유닛은 선택적으로 다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함한다:

(a) 676-685, 676-702, 702-711, 775-793, 806-815 및 이들의 조합으로부터 하나 이상의 아미노산의 결실;

(b) 688, 703, 846, 875, 937, 969, 1014, 1058, 1105 및 1163 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이; 및

(c) TMCT로부터 하나 이상의 아미노산의 결실;

여기서 CoV S 당단백질의 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 서열을 갖는 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

아미노산 676-685의 결실을 포함하는 코로나바이러스 S 당단백질.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

아미노산 702-711의 결실을 포함하는 코로나바이러스 S 당단백질.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

아미노산 806-815의 결실을 포함하는 코로나바이러스 S 당단백질.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

아미노산 775-793의 결실을 포함하는 코로나바이러스 S 당단백질.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

NTD의 아미노산 1-292의 결실을 포함하는 코로나바이러스 S 당단백질.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

막관통 및 세포질 꼬리(TMCT)의 아미노산 1201-1260의 결실을 포함하는 코로나바이러스 S 당단백질.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

SEQ ID NOS: 85-89, 105, 106, 및 112-115, 164-168로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 코로나바이러스 S 당단백질.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서,

신호 펩타이드를 포함하고, 임의로 신호 펩타이드는 SEQ ID NO: 5 또는 SEQ ID NO: 117의 아미노산 서열을 포함하는 것인 코로나바이러스 S 당단백질.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

C-말단 융합 단백질을 포함하는 코로나바이러스 S 당단백질.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

C-말단 융합 단백질은 헥사히스티딘 태그인 코로나바이러스 S 당단백질.

청구항 12

제 10 항에 있어서,

C-말단 융합 단백질은 폴돈인 코로나바이러스 S 당단백질.

청구항 13

제 12 항에 있어서,

폴돈은 SEQ ID NO: 68에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 것인 코로나바이러스 S 당단백질.

청구항 14

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서,

ΔHca1은 야생형 CoV S 당단백질(SEQ ID NO: 2)의 ΔHca1보다 적어도 2배 더 큰 코로나바이러스 S 당단백질.

청구항 15

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 있어서,

S2 서브유닛, NTD, RBD 및 SD1/2는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 당단백질의 상응하는 서브유닛

또는 도메인과 95% 동일한 것인 코로나바이러스 S 당단백질.

청구항 16

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 있어서,

S2 서브유닛, NTD, RBD 및 SD1/2는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 당단백질의 상응하는 서브유닛 또는 도메인과 97% 동일한 것인 코로나바이러스 S 당단백질.

청구항 17

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 있어서,

S2 서브유닛, NTD, RBD 및 SD1/2는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 당단백질의 상응하는 서브유닛 또는 도메인과 99% 동일한 것인 코로나바이러스 S 당단백질.

청구항 18

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 있어서,

S2 서브유닛, NTD, RBD 및 SD1/2는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 당단백질의 상응하는 서브유닛 또는 도메인과 99.5% 동일한 것인 코로나바이러스 S 당단백질.

청구항 19

제 1 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항의 S 당단백질을 암호화하는 분리된 핵산.

청구항 20

제 19 항의 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 21

제 1 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항의 코로나바이러스 S 당단백질을 포함하는 나노입자.

청구항 22

제 21 항에 있어서,

나노입자는 약 20nm 내지 약 35nm의 Zavg 직경을 갖는 것인 나노입자.

청구항 23

제 21 항에 있어서,

나노입자는 약 0.2 내지 약 0.45의 다분산 지수를 갖는 것인 나노입자.

청구항 24

제 1 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항의 코로나바이러스 S 당단백질을 발현하는 세포.

청구항 25

제 1 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항의 코로나바이러스 S 당단백질 및 약학적으로 허용 가능한 완충액을 포함하는 백신 조성물.

청구항 26

제 25 항에 있어서,

항원보강제를 포함하는 백신 조성물.

청구항 27

제 26 항에 있어서,

항원보강제는 적어도 2개의 iscom 입자를 포함하며, 여기서:

제 1 iscom 입자는 퀼라야 사포나리아(*Quiillaja Saponaria*) 몰리나의 분획 A를 포함하고 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C는 포함하지 않으며;

제 2 iscom 입자는 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C를 포함하고 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A를 포함하지 않는 것인 백신 조성물.

청구항 28

제 27 항에 있어서,

퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C는 각각 항원보강제에서 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량 합계의 약 85중량% 및 약 15중량%를 차지하는 것인 백신 조성물.

청구항 29

제 27 항에 있어서,

퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C는 각각 항원보강제에서 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량 합계의 약 92중량% 및 약 8중량%를 차지하는 것인 백신 조성물.

청구항 30

제 26 항에 있어서,

항원보강제는 약 50㎍의 투여량으로 투여되는 것인 백신 조성물.

청구항 31

제 25 항 내지 제 30 항 중 어느 한 항의 백신 조성물을 투여하는 단계를 포함하여 대상에서 SARS-CoV-2에 대한 면역 반응을 자극하는 방법.

청구항 32

제 31 항에 있어서,

대상은 0일에 제 1 투여량을 투여받고 21일에 부스트 투여량을 투여받는 것인 방법.

청구항 33

제 31 항에 있어서,

대상은 약 3㎍ 내지 약 25㎍의 코로나바이러스 S 당단백질을 투여받는 것인 방법.

청구항 34

제 31 항에 있어서,

대상은 약 5㎍의 코로나바이러스 S 당단백질을 투여받는 것인 방법.

청구항 35

제 31 항 내지 제 34 항 중 어느 한 항에 있어서,

백신 조성물은 근육내 투여되는 것인 방법.

청구항 36

제 31 항, 제 33 항, 제 34 항 및 제 35 항 중 어느 한 항에 있어서,

백신 조성물의 단일 투여량이 투여되는 것인 방법.

청구항 37

제 31 항 내지 제 35 항 중 어느 한 항에 있어서,

다중 투여량의 백신 조성물이 투여되는 것인 방법.

청구항 38

제 31 항 내지 제 37 항 중 어느 한 항에 있어서,

백신 조성물은 인플루엔자 당단백질과 공동 투여되는 것인 방법.

청구항 39

다음을 포함하는 면역원성 조성물:

(i) 제 1 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항의 코로나바이러스 S(CoV S) 당단백질, 및 비이온성 세제 코어를 포함하는 나노입자;

(ii) 약학적으로 허용 가능한 완충제, 및

(iii) 사포닌 항원보강제.

청구항 40

제 39 항에 있어서,

약 3㎍ 내지 약 25㎍의 CoV S 당단백질을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 41

제 40 항에 있어서,

약 5㎍의 CoV S 당단백질을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 42

제 39 항에 있어서,

사포닌 항원보강제는 적어도 2개 iscom 입자를 포함하고, 여기서:

제 1 iscom 입자는 퀼라야 사포나리아(*Quiillaja Saponaria*) 몰리나의 분획 A를 포함하고 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C는 포함하지 않으며;

제 2 iscom 입자는 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C를 포함하고 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A를 포함하지 않는 것인 면역원성 조성물.

청구항 43

제 42 항에 있어서,

퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A는 항원보강제에서 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량 합계의 50-96중량%를 차지하고 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C는 항원보강제에서 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량 합계의 나머지를 차지하는 것인 면역원성 조성물.

청구항 44

제 42 항에 있어서,

퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C는 각각 항원보강제에서 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량 합계의 약 85중량% 및 약 15중량%를 차

지하는 것인 면역원성 조성물.

청구항 45

제 39 항에 있어서,

약 50㎍의 사포닌 항원보강제를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 46

제 39 항에 있어서,

비이온성 세제는 폴리소르베이트-20(PS20), 폴리소르베이트-40(PS40), 폴리소르베이트-60(PS60), 폴리소르베이트-65(PS65) 및 폴리소르베이트-80(PS80)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인 면역원성 조성물.

청구항 47

제 39 항 내지 제 46 항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함하여 대상에서 SARS-CoV-2 또는 이종 SARS-CoV-2 균주에 대한 면역 반응을 자극하는 것인 방법.

청구항 48

제 47 항에 있어서,

약 3㎍ 내지 약 25㎍의 CoV S 당단백질이 투여되는 것인 방법.

청구항 49

제 47 항 또는 제 48 항에 있어서,

약 5㎍의 CoV S 당단백질이 투여되는 것인 방법.

청구항 50

제 47 항 내지 제 49 항 중 어느 한 항에 있어서,

사포닌 항원보강제는 적어도 2개 iscom 입자를 포함하고, 여기서:

제 1 iscom 입자는 퀼라야 사포나리아(*Quillaja Saponaria*) 몰리나의 분획 A를 포함하고 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C는 포함하지 않으며;

제 2 iscom 입자는 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C를 포함하고 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A를 포함하지 않는 것인 방법.

청구항 51

제 50 항에 있어서,

퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A는 항원보강제에서 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량 합계의 50-96중량%를 차지하고 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C는 항원보강제에서 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량 합계의 나머지를 차지하는 것인 방법.

청구항 52

제 50 항 또는 제 51 항에 있어서,

퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C는 각각 항원보강제에서 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량 합계의 약 85중량% 및 약 15중량%를 차지하는 것인 방법.

청구항 53

제 47 항 내지 제 52 항 중 어느 한 항에 있어서,

약 50㎍의 사포닌 항원보강제를 투여하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 54

제 47 항 내지 제 53 항 중 어느 한 항에 있어서,

비이온성 세제는 폴리소르베이트-20(PS20), 폴리소르베이트-40(PS40), 폴리소르베이트-60(PS60), 폴리소르베이트-65(PS65) 및 폴리소르베이트-80(PS80)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 55

제 47 항 내지 제 54 항 중 어느 한 항에 있어서,

대상은 0일에 제 1 투여량을 투여받고 21일에 부스트 투여량을 투여받는 것인 방법.

청구항 56

제 47 항 내지 제 55 항 중 어느 한 항에 있어서,

단일 투여량의 면역원성 조성물이 투여되는 것인 방법.

청구항 57

제 47 항 내지 제 56 항 중 어느 한 항에 있어서,

제 47 항의 면역원성 조성물과 상이한 제 2 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 58

제 57 항에 있어서,

제 2 면역원성 조성물은 SARS-Cov-2 스파이크 당단백질을 암호화하는 mRNA, SARS-Cov-2 스파이크 당단백질을 암호화하는 플라스미드 DNA, SARS-Cov-2 스파이크 당단백질을 암호화하는 바이러스 벡터 또는 불활성화된 SARS-CoV-2 바이러스를 포함하는 것인 방법.

청구항 59

제 47 항 내지 제 58 항 중 어느 한 항에 있어서,

이종 SARS-CoV-2 균주는 B.1.1.7 SARS-CoV-2 균주, B.1.351 SARS-CoV-2 균주, P.1 SARS-CoV-2 균주, B.1.617.2 SARS-CoV-2 균주, B.1.525 SARS-CoV-2 균주, B.1.526 SARS-CoV-2 균주, B.1.617.1 SARS-CoV-2 균주, C.37 SARS-CoV-2 균주, B.1.621 SARS-CoV-2 균주 및 Cal.20C SARS-CoV-2 균주로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 60

제 47 항 내지 제 59 항 중 어느 한 항에 있어서,

코로나바이러스 질환-19(COVID-19)를 예방하기 위한 면역원성 조성물의 효능은 면역원성 조성물 투여 후 최대 약 2개월, 최대 약 2.5개월, 최대 약 3개월, 최대 약 3.5개월, 최대 약 4개월, 최대 약 4.5개월, 최대 약 5개월, 최대 약 5.5개월, 최대 약 6개월, 최대 약 6.5개월, 최대 약 7개월, 최대 약 7.5개월, 최대 약 8개월, 최대 약 8.5개월, 최대 약 9개월, 최대 약 9.5개월, 최대 약 10개월, 최대 약 10.5개월, 최대 약 11개월, 최대 약 11.5개월, 또는 최대 약 12개월 동안 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 100%인 방법.

청구항 61

제 47 항 내지 제 60 항 중 어느 한 항에 있어서,

코로나바이러스 질환-19(COVID-19)를 예방하기 위한 면역원성 조성물의 효능은 면역원성 조성물 투여 후 최대

약 2개월 동안, 최대 약 2.5개월, 최대 약 3개월, 최대 약 3.5개월, 최대 약 4개월, 최대 약 4.5개월, 최대 약 5개월, 최대 약 5.5개월, 최대 약 6개월, 최대 약 6.5개월, 최대 약 7개월, 최대 약 7.5개월, 최대 약 8개월, 최대 약 8.5개월, 최대 약 9개월, 최대 약 9.5개월, 최대 약 10개월, 최대 약 10.5개월, 최대 약 11개월, 최대 약 11.5개월, 또는 최대 약 12개월 동안 약 50% 내지 약 99%, 약 50% 내지 약 95%, 약 50% 내지 약 90%, 50% 내지 약 85%, 약 50% 내지 약 80%, 약 60% 내지 약 99%, 약 60% 내지 약 95%, 약 60% 내지 약 90%, 약 60% 내지 약 85% %, 약 60% 내지 약 80%, 약 40% 내지 약 99%, 약 40% 내지 약 95%, 약 40% 내지 약 90%, 약 40% 내지 약 85%, 약 40% % 내지 약 80%, 약 40% 내지 약 75%, 약 40% 내지 약 70%, 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 55%, 또는 약 40% 내지 약 50%인 방법.

청구항 62

제 47 항 내지 제 61 항 중 어느 한 항에 있어서,

COVID-19는 경증 COVID-19인 방법.

청구항 63

제 47 항 내지 제 61 항 중 어느 한 항에 있어서,

COVID-19는 중등도 COVID-19인 방법.

청구항 64

제 47 항 내지 제 61 항 중 어느 한 항에 있어서,

COVID-19는 중증 COVID-19인 방법.

청구항 65

SEQ ID NO: 87의 아미노산 서열을 갖는 코로나 S(CoV S) 당단백질 및 비이온성 세제 코어를 포함하는 나노입자, 약학적으로 허용 가능한 완충제, 및 (iii) 사포닌 항원보강제를 대상에게 투여하는 단계를 포함하여 이종 SARS-CoV-2 균주에 대한 보호 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 이종 SARS-CoV-2 균주는 SEQ ID NO: 1의 SARS-CoV-2 S 당단백질과 비교하여 약 1 내지 약 60개의 변형을 갖는 SARS-CoV-2 S 당단백질을 갖는 것인 방법.

청구항 66

제 65 항에 있어서,

이종 SARS-CoV-2 균주는 SEQ ID NO: 1의 SARS-CoV-2 당단백질과 비교하여 약 1 내지 약 20개의 변형, 약 1 내지 약 10개의 변형, 약 10 내지 약 20개 변형, 10개 내지 약 30개 변형, 약 10개 내지 약 40개 변형, 10개 내지 약 50개 변형, 10개 내지 약 60개 변형, 20개 내지 약 60개 변형, 20개 내지 약 50개의 변형, 약 20개 내지 약 40개의 변형, 약 5개 내지 약 15개의 변형, 또는 약 5개 내지 약 10개의 변형을 갖는 SARS-CoV-2 S 당단백질을 갖는 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 일반적으로 면역 반응을 자극하는 데 유용한 비천연 발생 코로나바이러스(CoV) 스파이크(S) 폴리펩타이드 및 이를 포함하는 나노입자 및 백신에 관한 것이다. 나노입자는 선택적으로 세제 코어와 관련된 항원, 예를 들어, 당단백질 항원을 제공하고 일반적으로 재조합 접근법을 사용하여 생산된다. 나노입자는 개선된 안정성과 향상된 에피토프 제시를 가진다. 본 발명은 또한 나노입자를 함유하는 조성물, 이를 생산하는 방법, 및 면역 반응을 자극하는 방법을 제공한다.

배 경 기 술

[0002] 감염성 질환은 전 세계적으로 문제이다. 일부 병원체에 대한 백신 개발에 진전이 있었지만 많은 것이 인간 건강에 위협으로 남아 있다. 급성호흡기증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)의 발병은 미국에서만 7,900만명 이상을 감염시켰고 최소 960,000명을 사망시켰다. 전세적으로, 사망자가 600만명을 넘어섰다. SARS-CoV-2 코로나바

이러스는 지난 17년 동안 수백 명을 사망시킨 중증 급성 호흡기증후군 코로나바이러스(SARS-CoV) 및 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV)와 같은 바이러스 계열에 속한다. SARS-CoV-2는 질환 COVID-19를 유발한다. 세계보건기구(WHO)는 2020년 3월에 코로나19를 글로벌 팬데믹으로 분류하였다. 팬데믹은 여전히 진행 중이다. 이를 통제하려는 노력은 SARS-CoV-2 변이체의 출현으로 인해 방해를 받았다.

[0003] SARS-CoV-2 및 이의 변이체에 의해 유발된 생명을 위협하는 전염병의 중증도를 예방하거나 감소시키는 백신의 개발이 바람직하다. 그러나, 인간 백신 개발은 병원체의 고도로 정교한 회피 메커니즘과 백신 안정화의 어려움으로 인해 여전히 힘들다. 최적의 경우, 백신은 감염원을 차단하거나 중화하는 항체를 유도하고 냉장이 불가능한 환경을 비롯한 다양한 환경에서 안정적으로 유지되어야 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 상기 과제를 해결하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명은 SARS-CoV-2 및 SARS-CoV-2 변이체에 대한 면역 반응을 유도하기에 적합한 비천연 CoV S 폴리펩타이드를 제공한다. 본 발명은 또한 당단백질을 함유하는 나노입자뿐만 아니라 면역 반응을 자극하는 방법을 제공한다.

[0006] 본 발명은 또한 SARS-CoV-2 및 이의 변이체, 중동 호흡기 증후군(MERS) 및 중증 급성 호흡기 증후군(SARS)을 포함하는 다중 코로나바이러스에 대한 면역 반응을 유도하기에 적합한 CoV S 폴리펩타이드를 제공한다.

[0007] 본 발명에서 다음을 포함하는 CoV S 폴리펩타이드가 제공된다:

[0008] (i) 불활성화된 퓨린 절단 부위를 갖는 S1 서브유닛, S1 서브유닛은 N-말단 도메인(NTD), 수용체 결합 도메인(RBD), 서브도메인 1 및 2(SD1/2)를 포함하고, 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ의 아미노산 서열을 가지며;

[0009] 여기서 NTD는 선택적으로 다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함한다:

[0010] (a) 아미노산 56, 57, 131, 132, 144, 145, 228, 229, 230, 231, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산의 결실;

[0011] (b) 아미노산 132 뒤에 1, 2, 3 또는 4개의 아미노산의 삽입; 및

[0012] (c) 아미노산 5, 6, 7, 13, 51, 53, 56, 57, 62, 63, 67, 82, 125, 129, 131, 132, 133, 139, 143, 144, 145, 177, 200, 201, 202, 209, 229, 233, 240, 245 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산의 돌연변이;

[0013] 여기서 RBD는 선택적으로 아미노산 333, 404, 419, 426, 439, 440, 464, 465, 471, 477, 481, 488 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이를 포함하고;

[0014] 여기서 SD1/2 도메인은 557, 600, 601, 642, 664, 668 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이를 임의로 포함하고;

[0015] (ii) S2 서브유닛, 여기서 아미노산 973 및 974가 프롤린이고, S2 서브유닛은 선택적으로 다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함한다:

[0016] (a) 676-685, 676-702, 702-711, 775-793, 806-815 및 이들의 조합으로부터 하나 이상의 아미노산의 결실;

[0017] (b) 688, 703, 846, 875, 937, 969, 1014, 1058, 1105 및 1163 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이; 및

[0018] (c) TMCT로부터 하나 이상의 아미노산의 결실; 여기서 CoV S 당단백질의 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 서열을 갖는 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다.

[0019] 실시태양에서, 코로나바이러스 S 당단백질은 아미노산 676-685의 결실을 포함한다. 실시태양에서, 코로나바이러스 S 당단백질은 아미노산 702-711의 결실을 포함한다. 실시태양에서, 코로나바이러스 S 당단백질은 아미노산 806-815의 결실을 포함한다. 실시태양에서, 코로나바이러스 S 당단백질은 아미노산 775-793의 결실을 포함한다.

실시태양에서, 코로나바이러스 S 당단백질은 NTD의 아미노산 1-292의 결실을 포함한다. 실시태양에서, 코로나바이러스 S 당단백질은 TMCT의 아미노산 1201-1260의 결실을 포함한다. 실시태양에서, 코로나바이러스 S 당단백질은 SEQ ID NOS: 85-89, 105, 106 및 112-115, 164-168로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NOS: 85-89, 105, 106, 및 112-115, 164-168 중 어느 하나와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다. 실시태양에서, 코로나바이러스 S 당단백질은 신호 펩타이드를 포함하고, 선택적으로 신호 펩타이드는 SEQ ID NO: 5 또는 SEQ ID NO: 117의 아미노산 서열을 포함한다. 실시태양에서, 코로나바이러스 S 당단백질은 C-말단 융합 단백질을 포함한다. 실시태양에서, C-말단 융합 단백질은 헥사히스티딘 태그이다. 실시태양에서, C-말단 융합 단백질은 폴돈이다. 실시태양에서, 폴돈은 SEQ ID NO: 68에 상응하는 아미노산 서열을 갖는다. 실시태양에서, 코로나바이러스 S 당단백질은 야생형 CoV S 당단백질(SEQ ID NO: 2)의 ΔHcal보다 적어도 2배 더 큰 ΔHcal을 갖는다. 실시태양에서, 본 발명에 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 당단백질의 상응하는 서브유닛 또는 도메인과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5% 동일한 S2 서브유닛, NTD, RBD 및 SD1/2를 갖는 코로나바이러스 S 당단백질이 제공된다.

[0020] 본 명세서에 기술된 CoV S 당단백질을 암호화하는 분리된 핵산이 본 발명에 제공된다.

[0021] 본 명세서에 기술된 CoV S 당단백질을 암호화하는 분리된 핵산을 포함하는 벡터가 본 발명에 제공된다.

[0022] 본 명세서에 기술된 CoV S 당단백질을 포함하는 나노입자가 본 발명에 제공된다. 실시태양에서, 나노입자는 약 20nm 내지 약 35nm 사이의 Zavg 직경을 갖는다. 실시태양에서, 나노입자는 약 0.2 내지 약 0.45의 다분산 지수를 갖는다. 본 명세서에 기술된 CoV S 당단백질을 발현하는 세포가 본 발명에 제공된다.

[0023] 본 명세서에 기술된 CoV S 당단백질을 포함하는 나노입자를 포함하는 백신 조성물이 본 발명에 제공된다. 실시태양에서, 백신 조성물은 항원보강제를 포함한다. 실시태양에서, 항원보강제는 적어도 2개의 iscom 입자를 포함하며, 여기서: 제 1 iscom 입자는 퀼라야 사포나리아(*Quiillaja Saponaria*) 몰리나의 분획 A를 포함하고 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C는 포함하지 않으며; 제 2 iscom 입자는 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C를 포함하고 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A를 포함하지 않는다. 실시태양에서, 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C는 항원보강제에서 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A와 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량 합계의 각각 약 85중량% 및 약 15중량%를 차지한다. 실시태양에서, 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C는 항원보강제에서 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A와 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량 합계의 각각 약 92중량% 및 약 8중량%를 차지한다. 실시태양에서, 백신 조성물은 약 50㎍의 항원보강제를 포함한다.

[0024] 본 명세서에 기술된 백신 조성물을 투여하는 단계를 포함하여 대상에서 SARS-CoV-2에 대한 면역 반응을 자극하는 방법이 본 발명에 제공된다. 실시태양에서, 대상은 0일차에 1차 용량을 투여받고 21일차에 추가 용량을 투여받는다. 실시태양에서, 대상은 약 3㎍ 내지 약 25㎍의 코로나바이러스 S 당단백질을 투여받는다. 실시태양에서, 대상은 약 5㎍의 코로나바이러스 S 당단백질을 투여받는다. 실시태양에서, 백신 조성물은 근육내로 투여된다. 실시태양에서, 백신 조성물의 단일 용량이 투여된다. 실시태양에서, 백신 조성물의 다중 용량이 투여된다. 실시태양에서, 백신 조성물은 인플루엔자 당단백질과 함께 투여된다.

[0025] 본 발명에 다음에 포함하는 면역원성 조성물이 제공된다: (i) 본 명세서에 기술된 CoV S 당단백질 및 비이온성 세제 코어를 포함하는 나노입자; (ii) 약학적으로 허용 가능한 완충제; 및 (iii) 사포닌 항원보강제. 실시태양에서, 면역원성 조성물은 약 3㎍ 내지 약 25㎍의 CoV S 당단백질을 포함한다. 실시태양에서, 면역원성 조성물은 약 5㎍의 CoV S 당단백질을 포함한다. 실시태양에서, 사포닌 항원보강제는 적어도 2개의 iscom 입자를 포함하며, 여기서: 제 1 iscom 입자는 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A를 포함하고 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C를 포함하지 않으며; 제 2 iscom 입자는 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C를 포함하고 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A를 포함하지 않는다. 실시태양에서, 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A는 50-96중량%을 차지하며 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C는 항원보강제에서 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A와 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량 합계의 각각 나머지를 차지한다. 실시태양에서, 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C는 항원보강제에서 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A와 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량 합계의 각각 약 85중량% 및 약 15중량%를 차지한다. 실시태양에서, 면역원성 조성물은 약 50㎍의 사포닌 항원보강제를 포함한다. 실시태양에서, 비이온성 세제는 폴리소르베이트-20(PS20), 폴리소르베이트-40(PS40), 폴리소르베이트-60(PS60), 폴리소르베이트-65(PS65) 및 폴리소르베이트-

80(PS80)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0026] 실시태양에서, 본 명세서에 제공된 면역원성 조성물 또는 백신 조성물을 투여하는 단계를 포함하여 SARS-CoV-2 또는 이종 SARS-CoV-2 균주에 대한 면역 반응을 자극하는 방법이 본 발명에 제공된다. 실시태양에서, 방법은 약 3㎍ 내지 약 25㎍의 CoV S 당단백질을 투여하는 단계를 포함한다. 실시태양에서, 방법은 약 5㎍의 CoV S 당단백질을 투여하는 단계를 포함한다. 실시태양에서, 사포닌 항원보강제는 적어도 2개의 iscom 입자를 포함하며, 여기서: 제 1 iscom 입자는 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A를 포함하고 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C를 포함하지 않으며; 제 2 iscom 입자는 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C를 포함하고 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A를 포함하지 않는다. 실시태양에서, 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A는 50-96중량%을 차지하며 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C는 항원보강제에서 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A와 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량 합계의 각각 나머지를 차지한다. 실시태양에서, 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C는 항원보강제에서 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A와 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량 합계의 각각 약 85중량% 및 약 15중량%를 차지한다. 실시태양에서, 면역원성 조성물은 약 50㎍의 사포닌 항원보강제를 포함한다. 실시태양에서, 비이온성 세제는 폴리소르베이트-20(PS20), 폴리소르베이트-40(PS40), 폴리소르베이트-60(PS60), 폴리소르베이트-65(PS65) 및 폴리소르베이트-80(PS80)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 실시태양에서, 대상은 0일차에 1차 용량을 투여받고 21일차에 추가 용량을 투여받는다. 실시태양에서, 면역원성 조성물의 단일 용량이 투여된다. 실시태양에서, 방법은 제 2 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 실시태양에서, 제 2 면역원성 조성물은 SARS-Cov-2 스파이크 당단백질을 암호화하는 mRNA, SARS-Cov-2 스파이크 당단백질을 암호화하는 플라스미드 DNA, SARS-Cov-2 스파이크 당단백질을 암호화하는 바이러스 벡터 또는 불활성화된 SARS-CoV-2 바이러스를 포함한다. 실시태양에서, 이종 SARS-CoV-2 균주는 B.1.1.7 SARS-CoV-2 균주, B.1.351 SARS-CoV-2 균주, P.1 SARS-CoV-2 균주, B.1.617.2 SARS-CoV-2 균주, B.1.525 SARS-CoV-2 균주, B.1.526 SARS-CoV-2 균주, B.1.617.1 SARS-CoV-2 균주, C.37 SARS-CoV-2 균주, B.1.621 SARS-CoV-2 균주 및 Cal.20C SARS-CoV-2 균주로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 실시태양에서, 코로나바이러스 질환-19(COVID-19)를 예방하기 위한 면역원성 조성물의 효능은 면역원성 조성물 투여 후 최대 약 2개월, 최대 약 2.5개월, 최대 약 3개월, 최대 약 3.5개월, 최대 약 4개월, 최대 약 4.5개월, 최대 약 5개월, 최대 약 5.5개월, 최대 약 6개월, 최대 약 6.5개월, 최대 약 7개월, 최대 약 7.5개월, 최대 약 8개월, 최대 약 8.5개월, 최대 약 9개월, 최대 약 9.5개월, 최대 약 10개월, 최대 약 10.5개월, 최대 약 11개월, 최대 약 11.5개월, 또는 최대 약 12개월 동안 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 100%이다. 실시태양에서, 코로나바이러스 질환-19(COVID-19)를 예방하기 위한 면역원성 조성물의 효능은 면역원성 조성물 투여 후 최대 약 2개월, 최대 약 2.5개월, 최대 약 3개월, 최대 약 3.5개월, 최대 약 4개월, 최대 약 4.5개월, 최대 약 5개월, 최대 약 5.5개월, 최대 약 6개월, 최대 약 6.5개월, 최대 약 7개월, 최대 약 7.5개월, 최대 약 8개월, 최대 약 8.5개월, 최대 약 9개월, 최대 약 9.5개월, 최대 약 10개월, 최대 약 10.5개월, 최대 약 11개월, 최대 약 11.5개월, 또는 최대 약 12개월 동안 약 50% 내지 약 99%, 약 50% 내지 약 95%, 약 50% 내지 약 90%, 50% 내지 약 85%, 약 50% 내지 약 80%, 약 60% 내지 약 99%, 약 60% 내지 약 95%, 약 60% 내지 약 90%, 약 60% 내지 약 85% %, 약 60% 내지 약 80%, 약 40% 내지 약 99%, 약 40% 내지 약 95%, 약 40% 내지 약 90%, 약 40% 내지 약 85%, 약 40% % 내지 약 80%, 약 40% 내지 약 75%, 약 40% 내지 약 70%, 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 55%, 또는 약 40% 내지 약 50%이다. 실시태양에서, COVID-19는 경증 COVID-19이다. 실시태양에서, COVID-19는 중등도의 COVID-19이다. 실시태양에서, COVID-19는 중증 COVID-19이다. 실시태양에서, SEQ ID NO: 87의 아미노산 서열을 갖는 코로나 S(CoV S) 당단백질 및 비이온성 세제 코어를 포함하는 나노입자, 약학적으로 허용 가능한 완충제, 및 (iii) 사포닌 항원보강제를 대상에게 투여하는 단계를 포함하여 이종 SARS-CoV-2 균주에 대한 보호 면역 반응을 유도하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 이종 SARS-CoV-2 균주는 SEQ ID NO: 1의 SARS-CoV-2 S 당단백질과 비교하여 약 1 내지 약 60개의 변형을 갖는 SARS-CoV-2 S 당단백질을 갖는다. 실시태양에서, 이종 SARS-CoV-2 균주는 SEQ ID NO: 1의 SARS-CoV-2 당단백질과 비교하여 약 1 내지 약 20개의 변형, 약 1 내지 약 10개의 변형, 약 10 내지 약 20개 변형, 10개 내지 약 30개 변형, 약 10개 내지 약 40개 변형, 10개 내지 약 50개 변형, 10개 내지 약 60개 변형, 20개 내지 약 60개 변형, 20개 내지 약 50개의 변형, 약 20개 내지 약 40개의 변형, 약 5개 내지 약 15개의 변형, 또는 약 5개 내지 약 10개의 변형을 갖는 SARS-CoV-2 S 당단백질을 갖는다.

발명의 효과

[0027] 본 발명의 내용 중에 포함되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 특허 또는 출원 파일은 컬러로 제작된 적어도 하나의 도면을 포함한다. 컬러 도면이 있는 이 특허 또는 특허 출원 간행물의 사본은 요청 및 필요한 수수료 지불 시 특허청에서 제공될 것이다.

도 1은 SARS-CoV-2 스파이크(S) 단백질의 야생형 아미노산 서열(SEQ ID NO: 1)의 개략도를 나타낸다. 퓨린 절단 부위 RRAR(SEQ ID NO: 6)은 굵게 강조 표시되고 신호 펩타이드는 밑줄이 그어진다.

도 2는 비활성 퓨린 절단 부위, 융합 펩타이드 결실, 및 K986P 및 V987P 돌연변이를 갖는 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드의 1차 구조를 도시한다. 도메인 위치는 신호 펩타이드를 함유하는 SARS-CoV-2로부터의 야생형 CoV S 폴리펩타이드의 아미노산 서열(SEQ ID NO: 1)과 관련하여 번호가 매겨진다.

도 3은 비활성 퓨린 절단 부위, 아미노산 819-828의 융합 펩타이드 결실, 및 K986P 및 V987P 돌연변이를 갖는 BV2378 CoV S 폴리펩타이드의 1차 구조를 나타낸다. 도메인 위치는 신호 펩타이드를 함유하는 SARS-CoV-2로부터의 야생형 CoV S 폴리펩타이드의 아미노산 서열(SEQ ID NO: 1)과 관련하여 번호가 매겨진다.

도 4는 CoV S 폴리펩타이드 BV2364, BV2365, BV2366, BV2367, BV2368, BV2369, BV2373, BV2374, 및 BV2375의 정제를 나타낸다. 데이터는 QQAQ(SEQ ID NO: 7)의 아미노산 서열을 갖는 불활성 퓨린 절단 부위를 갖는 BV2365(SEQ ID NO: 4) 및 BV2373(SEQ ID NO: 87)이 단일 사슬(SO)으로 발현된다. 대조적으로, 절단 생성물 S2의 존재에 의해 명백한 바와 같이 온전한 퓨린 절단 부위(예를 들어, BV2364, BV2366 및 BV2374)를 함유하는 CoV S 폴리펩타이드는 절단된다.

도 5는 CoV S 폴리펩타이드 BV2361, BV2365, BV2369, BV2365, BV2373 및 BV2374가 생물층 간섭계에 의해 인간 안지오텐-전환 효소 2 전구체(hACE2)에 결합함을 나타낸다.

도 6은 SARS-CoV-2의 BV2361이 MERS-CoV 수용체인 다이펩티딜 펩티다제 IV(DPP4)와 결합하지 않고 MERS S 단백질이 생물층 간섭계에 의해 인간 안지오텐신-전환 효소 2 전구체(hACE2)에 결합하지 않음을 나타낸다.

도 7은 BV2361이 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA)에 의해 hACE2에 결합함을 나타낸다.

도 8은 BV2373 CoV S 폴리펩타이드의 1차 구조 및 퓨린 절단 부위, K986P 및 V987P에 대한 변형을 나타낸다.

도 9는 야생형 CoV S 폴리펩타이드 및 CoV S 폴리펩타이드 BV2365 및 BV2373의 정제를 나타낸다.

도 10은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질(EMB ID: 21374)의 cryoEM 구조에 중첩된 BV2373 CoV S 폴리펩타이드의 크라이로-전자 현미경(cryoEM) 구조를 보여준다.

도 11a-f는 CoV S 스파이크 폴리펩타이드 BV2365 및 BV2373이 hACE2에 결합함을 보여준다. 생물층 간섭계는 BV2365(도 11b) 및 BV2373(도 11c)이 야생형 CoV S 폴리펩타이드(도 11a)와 유사한 해리 역학으로 hACE2에 결합한다는 것을 보여준다. ELISA는 야생형 CoV S 폴리펩타이(도 11d) 및 BV2365(도 11e)는 유사한 친화도로 hACE2에 결합하는 반면 BV2373은 더 높은 친화도로 hACE2에 결합한다(도 11f).

도 12a-b는 hACE2에 대한 CoV S 폴리펩타이드 BV2373(도 12a) 및 BV2365(도 12b)의 결합에 대한 온도, 2회의 동결/해동 주기, 산화, 교반 및 pH 극한과 같은 스트레스 조건의 효과를 나타낸다.

도 13a-b는 분획 A 및 분획 C 이스컴(iscom) 매트릭스(예를 들어, MATRIX-M™)와 함께 또는 없이 0.1㎍ 내지 10㎍의 BV2373의 2회 용량(도 13a) 및 1회 용량(도 13b)에 의한 마우스의 면역화 13일, 21일 및 28일 후에 항-CoV S 폴리펩타이드 IgG 역가를 나타낸다.

도 14는 MATRIX-M™과 함께 또는 없이 0.1㎍ 내지 10㎍의 BV2373의 1회 용량 또는 2회 용량로 면역화된 마우스에서 hACE2의 상호작용을 차단하는 항체의 유도를 나타낸다.

도 15는 MATRIX-M™과 함께 또는 없이 0.1㎍ 내지 10㎍의 BV2373의 1회 용량 또는 2회 용량으로 면역화된 마우스에서 검출된 바이러스 중화 항체를 나타낸다.

도 16은 MATRIX-M™과 함께 또는 없이 14일 간격으로 BV2373의 1회 용량 또는 BV2373의 2회 용량으로 면역화된 Ad/CMV/hACE2 마우스의 폐에서 바이러스 로드(SARS-CoV-2)를 나타낸다.

도 17a-c는 BV2373으로 면역화한 후 마우스에 의해 나타난 체중 감소를 나타낸다. 도 17a는 1회 0.01㎍, 0.1㎍, 1㎍, 또는 10㎍의 BV2373 + MATRIX-M™에 의한 체중 감소에 대한 면역화의 효과를 나타낸다. 도 17b는 BV2373(0.01㎍, 0.1㎍, 1㎍)과 MATRIX-M™의 2회 용량으로 체중 감소에 대한 면역화 효과를 보여준다. 도 17c는 MATRIX-M™의 존재 또는 부재하에 2회 용량의 BV2373(10㎍)에 의한 체중 감소에 대한 면역화의 효과를 나타낸다.

도 18a-b는 SARS-CoV-2 감염 4일(도 18a) 또는 7일(도 18b) 마우스의 폐 조직병리학에 대한 BV2373의 효과를 보여준다.

도 19는 MATRIX-M™의 존재하에 BV2373으로 면역화된 마우스와 비교하여 항원보강제의 부재하에서 BV2373으로 면역화된 마우스의 비장에서 생체외 자극 후 IFN-γ 분비 세포의 수를 나타낸다.

도 20a-e는 MATRIX-M™의 존재 또는 부재하에서 BV2373으로 면역화된 마우스의 비장에서 CD4+ T 세포를 분비하는 사이토카인의 빈도를 나타낸다. 도 20a는 CD4+ T 세포를 분비하는 IFN-γ의 빈도를 나타낸다. 도 20b는 CD4+ T 세포를 분비하는 TNF-α의 빈도를 나타낸다. 도 20c는 CD4+ T 세포를 분비하는 IL-2의 빈도를 나타낸다. 도 20d는 IFN-γ, TNF-α 및 IL-2로부터 선택된 2개의 사이토카인을 분비하는 CD4+ T 세포의 빈도를 나타낸다. 도 20e는 IFN-γ, TNF-α 및 IL-2를 발현하는 CD4+ T 세포의 빈도를 나타낸다.

도 21a-e는 MATRIX-M™의 존재 또는 부재하에서 BV2373으로 면역화된 마우스의 비장에서 사이토카인 분비 $CD8^+$ T 세포의 빈도를 나타낸다. 도 21a는 $CD8^+$ T 세포를 분비하는 IFN-γ의 빈도를 나타낸다. 도 21b는 $CD8^+$ T 세포를 분비하는 TNF-α의 빈도를 나타낸다. 도 21c는 CD8+ T 세포를 분비하는 IL-2의 빈도를 나타낸다. 도 21d는 IFN-γ, TNF-α 및 IL-2로부터 선택된 2개의 사이토카인을 분비하는 $CD8^+$ T 세포의 빈도를 나타낸다. 도 21e는 IFN-γ, TNF-α 및 IL-2를 발현하는 $CD8^+$ T 세포의 빈도를 나타낸다.

도 22는 MATRIX-M™의 존재 또는 부재하에서 BV2373으로 면역화된 마우스의 비장에서 IFN-γ, TNF-α, 및 IL-2로부터 선택된 1개(단일), 2개(이중) 또는 3개(삼중) 사이토카인을 발현하는 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ 세포의 빈도를 예시한다.

도 23a-c는 $CD4^+$ T 세포로부터의 유형 2 사이토카인 분비에 대한 MATRIX-M™의 존재 또는 부재하에서 BV2373에 의한 면역화의 효과를 예시한다. 도 23a는 IL-4 분비 세포의 빈도를 나타낸다. 도 23b는 IL-5 $CD4^+$ 분비 세포의 빈도를 나타낸다. 도 23c는 $CD4^+$ T 세포를 분비하는 IL-4에 대한 IFN-γ 분비의 비율을 나타낸다.

도 24a-b는 $CD4^+$ T 여포 보조 세포(TFH)의 존재를 평가함으로써 배 중심 형성에 대한 MATRIX-M™의 존재 또는 부재하에서 BV2373에 의한 마우스 면역화의 효과를 예시한다. 도 24a는 비장에서 CD4+ T 여포 헬퍼 세포의 빈도를 나타내고, 도 24b는 $CD4^+$ T 여포 헬퍼 세포의 표현형(예를 들어, $CD4^+$ $CXCR5^+$ $PD\text{-}1^+$)을 나타낸다.

도 25a-b는 배 중심(GC) B 세포의 존재를 평가함으로써 배 중심 형성에 대한 MATRIX-M™의 존재 또는 부재하에서 BV2373에 의한 마우스 면역화의 효과를 예시한다. 도 25a는 비장에서 GC B 세포의 빈도를 나타내고, 도 25b는 $CD4^+$ T 여포 헬퍼 세포의 표현형(예를 들어, $CD19^+$ $GL7^+$ $CD\text{-}95^+$)을 나타낸다.

도 26a-c는 올리브 개코원숭이에서 항체 반응에 대한 MATRIX-M™의 존재 또는 부재하에서 BV2373에 의한 면역화의 효과를 나타낸다. 도 26a는 BV2373으로 면역화한 후 개코원숭이에서 항-SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드 IgG 역가를 나타낸다. 도 26b는 MATRIX-M™의 존재하에서 5㎍ 또는 25㎍의 BV2373에 의한 단일 면역화 후 개코원숭이에서 항체를 차단하는 hACE2의 존재를 나타낸다. 도 26c는 BV2373 및 MATRIX-M™으로 단일 면역화 후 바이러스 중화 항체의 역가를 나타낸다.

도 27은 BV2373으로 면역화한 후 올리브 개코원숭이에서 항-SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드 IgG와 중화 항체 역가 사이의 유의한 상관관계를 나타낸다.

도 28은 MATRIX-M™의 존재 또는 부재하에서 BV2373으로 면역화된 올리브 개코원숭이의 말초혈 단핵 세포(PBM

C)에서 IFN-γ 분비 세포의 빈도를 나타낸다.

도 29a-e는 MATRIX-M™의 존재 또는 부재하에서 BV2373으로 면역화된 올리브 개코원숭이의 PBMC에서 CD4+ T 세포를 분비하는 사이토카인의 빈도를 나타낸다. 도 29a는 CD4+ T 세포를 분비하는 IFN-γ의 빈도를 보여준다. 도 29b는 CD4+ T 세포를 분비하는 IL-2의 빈도를 나타낸다. 도 29c는 CD4+ T 세포를 분비하는 TNF-α의 빈도를 나타낸다. 도 29d는 IFN-γ, TNF-α 및 IL-2로부터 선택된 2개의 사이토카인을 분비하는 CD4+ T 세포의 빈도를 나타낸다. 도 29e는 IFN-γ, TNF-α 및 IL-2를 발현하는 CD4+ T 세포의 빈도를 나타낸다.

도 30은 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질(SEQ ID NO: 109)(BV2384)의 개략도를 나타낸다. 퓨린 절단 부위 GSAS(SEQ ID NO: 97)는 한 번 밑줄이 그어져 있고, K986P 및 V987P 돌연변이는 두 번 밑줄이 그어져 있다.

도 31은 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질(SEQ ID NO: 86)(BV2373)의 개략도를 나타낸다. 퓨린 절단 부위 QQAQ(SEQ ID NO: 7)는 한 번 밑줄이 그어져 있고, K986P 및 V987P 돌연변이는 두 번 밑줄이 그어져 있다.

도 32는 CoV S 폴리펩타이드 BV2373(SEQ ID NO: 87) 및 BV2384(SEQ ID NO: 109)의 정제를 나타낸다.

도 33은 정제 후 BV2384(SEQ ID NO: 109) 순도의 주사 농도계 플롯을 나타낸다.

도 34는 정제 후 BV2373(SEQ ID NO: 87) 순도의 주사 농도계 플롯을 나타낸다.

도 35a-b는 BV2373 및 MATRIX-M™의 투여에 반응하여 항-S 항체(도 35a) 및 중화 항체(도 35b)의 유도를 예시한다. 시노몰구스 원숭이는 2.5㎍, 5㎍ 또는 25㎍의 BV2373과 25㎍ 또는 50㎍ MATRIX-M™ 항원보강제를 1회 또는 2회(0일 및 21일) 용량으로 투여되었다. 대조군은 BV2373 또는 MATRIX-M™가 투여되지 않았다. 항체는 21일 및 33일에 측정되었다.

도 36a-b는 사이노몰구스 원숭이의 기관지폐포 세척액(BAL)에서 평가된 바와 같이 본 명세서에 개시된 백신 제제에 의한 SARS-CoV-2 바이러스 복제의 감소를 예시한다. 사이노몰구스 원숭이는 표시된 대로 BV2373 및 MATRIX-M™을 투여받았다. 대상은 0일과 0일 및 21일에 2회 용량으로 그룹에서 면역화되었다. 대상 동물은 37일에 1x104 pfu SARS-CoV-2 바이러스로 면역성 검사되었다. 바이러스 RNA(도 36a, 존재하는 총 RNA에 해당) 및 바이러스 서브게놈 RNA(도 36b, 복제 바이러스에 해당) 수준은 감염성 바이러스에 대한 공격 후 2일 및 4일에 세기관지 세척(BAL)에서 평가되었다(d2pi 및 d4pi). 대부분의 대상은 바이러스 RNA를 나타내지 않았다. 2일에 일부 대상에서 소량의 RNA가 측정되었다. 4일까지 2.5㎍의 가장 낮은 용량에서 2명의 대상을 제외하고는 RNA가 측정되지 않았다. 하위 게놈 RNA는 1명의 대상을 제외하고 다시 최저 용량에서 2일 또는 4일에 검출되지 않았다.

도 37a-b는 사이노몰구스 원숭이의 비강 면봉에서 평가된 바와 같이 본 명세서에 개시된 백신 제형에 의한 SARS-CoV-2 바이러스 복제의 감소를 예시한다. 사이노몰구스 원숭이는 표시된 대로 MATRIX-M™과 함께 BV2373을 투여받았다. 대상은 0일과 21일에 2회 투여로 그룹으로 면역화되었다. 대상 동물은 37일에 $1x10^4$ SARS-CoV-2 바이러스로 면역섬 검사되었다. 바이러스 RNA(도 37a) 및 바이러스 서브게놈(sg) RNA(도 37b)를 감염 2일 및 4일 후에 비강 면봉으로 평가하였다(d2pi 및 d4pi). 대부분의 대상은 바이러스 RNA를 나타내지 않았다. 2일 및 4일에 소량의 RNA가 일부 대상에서 측정되었다. 서브게놈 RNA가 2일 또는 4일에 검출되지 않았다. 대상은 0일과 0일 및 21일에 2회 용량으로 그룹에서 면역화되었다. 이 데이터는 백신이 코 전체 바이러스 RNA를 100 - 1000배 및 sgRNA를 감지할 수 없는 수준으로 감소시키고 백신에 대한 면역 반응이 바이러스 복제를 차단하고 바이러스 확산 방지를 예방할 것임을 확인한다.

도 38a-b는 1회 용량(도 38a) 또는 2회 용량의 BV2373 및 25㎍ 또는 50㎍의 MATRIX-M™(도 38b)으로 시노몰구스 원숭이를 면역화한 후 21일 및 35일 후에 항-CoV S 폴리펩타이드 IgG 역가를 나타낸다.

38c-38d는 1회 용량(도 38c) 또는 2회 용량의 BV2373(5㎍) 및 MATRIX-M™(25㎍ 또는 50㎍)으로 시노몰구스 원숭이를 면역화 21일 및 35일 후에 시노몰구스 원숭이의 hACE2 억제 역가를 나타낸다(도 38d).

도 38e는 BV2373 및 MATRIX-M™의 투여 후 시노몰구스 원숭이에서 항-CoV S 폴리펩타이드 IgG 역가와 hACE2 억제 역가 사이의 유의한 상관관계를 보여준다. 데이터는 표 4의 그룹 2-6에 대해 표시된다.

도 39는 2회 용량의 BV2373 및 MATRIX-M™으로 면역화 35일 후 또는 회복기 인간 혈청으로 면역화한 후 시노몰구스 원숭이의 항-CoV S 폴리펩타이드 역가 및 hACE2 억제 역가를 나타낸다(그룹 2, 4 및 6). 이 데이터는 BV2373 및 MATRIX-M™으로 면역화된 시노몰구스 원숭이의 항-CoV S 폴리펩타이드 및 hACE2 억제 역가가 회복기 혈청으로 면역화된 시노몰구스 원숭이보다 우수함을 나타낸다.

40a-b는 세포변성 효과(CPE)(도 40a) 및 플라크 감소 중화 테스트(PRNT)(도 40b)에 의해 결정된 BV2373 및 MATRIX-M™으로 면역화된 사이노몰구스 원숭이의 SARS-CoV-2 중화 역가를 나타낸다.

도 41은 BV2373 및 선택적으로 MATRIX-M™을 포함하는 백신의 안전성 및 효능을 평가한 임상 시험의 투여 시기를 나타낸다. AESI는 특별한 관심의 부작용을 나타낸다. MAEE는 의학적으로 발생하는 유해 사례를 나타내고 SAE는 심각한 유해 사례를 나타낸다.

도 42a-b는 BV2373 및 MATRIX-M™을 포함하는 백신을 평가한 임상 시험에서 환자가 경험한 국소(도 42a) 및 전신 유해 사례(도 4b)를 나타낸다. 그룹 A-E는 표 5에 나와 있다. 데이터는 백신이 잘 견디고 안전하다는 것을 나타낸다.

도 43a-b는 BV2373 및 MATRIX-M™을 포함하는 백신을 평가한 임상 시험에서 참가자의 면역화 21일 및 35일 후 항-CoV S 폴리펩타이드 IgG(도 43a) 및 중화 역가(도 43b)를 나타낸다. 가로 막대는 각각 사분위수 범위(IRQ)와 곡선 아래의 중앙값을 나타낸다. 수염 끝점은 IQR의 중앙값 ± 1.5배 이하 또는 이상의 최대값 및 최소값과 같다. 회복기 혈청 패널은 베일러 의대의 PCR 확인 COVID-19 참가자의 검체(ELISA 검체 29개, 미세중화 검체 32개(MN IC>99))를 포함한다. COVID-19의 중증도는 입원 환자의 빨간색 표시(중환자실 포함), 외래 치료 환자의 경우 파란색 표시(응급실에서 수집한 검체), 및 무증상(노출된) 환자에 대한 녹색 표시(접촉/노출 평가에서 수집한 검체)로 표시된다.

도 44a-c는 회복기 혈청(도 44a), 2회 25㎍ 용량의 BV2373(도 44b), 및 MATRIX-M™과 함께 2회 용량(5㎍ 및 25㎍)의 BV2373(도 44c)이 투여된 환자에서 항-CoV S 폴리펩타이드 IgG와 중화 항체 역가 사이의 상관관계를 보여준다. 회복기 혈청 또는 항원보강제 BV2373으로 치료받은 환자에서 중화 항체 역가와 항-CoV-S IgG 역가 사이에 강한 상관관계가 관찰되었지만 항원보강제가 없는 BV2373으로 치료받은 환자에서는 그렇지 않았다.

도 45a-d는 T 헬퍼 1(Th1) 사이토카인 인터페론-감마(IFN γ), 종양 괴사 인자-알파(TNF-α), 및 인터루킨(IL)-2 및 T 헬퍼2(Th2) 사이토카인 IL-5 및 IL 13을 생성하는 항원 특이적 $CD4^+$ T 세포의 빈도는 BV2373을 사용한 자극 후 그룹 A(위약, 도 45a), B(25㎍ BV2373, 도 45b), C(5㎍ BV2373 및 50㎍ MATRIX-M™, 도 45c) 및 D(25㎍ BV2373 및 50㎍ MATRIX-M™, 도 45d)에 있는 참가자의 사이토카인을 나타낸다. Th1 사이토카인 패널에서 "Any 2"는 두 가지 유형의 Th1 사이토카인을 동시에 생성할 수 있는 $CD4^+$ T 세포를 의미한다. "모두 3"은 IFN-γ, TNF-α 및 IL-2를 동시에 생성하는 $CD4^+$ T 세포를 나타낸다. Th2 패널에서 "둘 다"는 Th2 사이토카인 IL-5 및 IL-13을 동시에 생성할 수 있는 $CD4^+$ T 세포를 의미한다.

도 46a는 SEQ ID NO: 1과 관련하여 번호가 매겨진 신호 펩타이드를 함유하는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드의 1차 구조를 나타낸다. 도 46b는 신호 펩타이드가 없는 SEQ ID NO: 2에 대해 번호가 매겨진 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드의 야생형의 1차 구조를 나타낸다.

도 47은 분획 A 및 분획 C iscom 매트릭스(MATRIX-M™) 항원보강제와 조합된 BV2373의 효능, 면역원성 및 안전성을 평가한 3상 임상 시험에서 대상의 무작위 배정을 도시한다.

도 48은 분획 A 및 분획 C iscom 매트릭스(MATRIX-M™)과 조합된 BV2373 또는 위약으로 백신 접종 후 대상이 경험한 증상이 있는 COVID-19 누적 사건 비율(%)을 도시하는 카플란-마이어 그래프이다.

도 49는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드를 포함하는 SARS-CoV-2 또는 아미노산 69, 70 및 144의 결실 및 N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A 및 D1118H의 돌연변이를 갖는 CoV S 폴리펩타이드를 포함하는 이종 B.1.1.7 SARS-CoV-2 균주에 대한 분획 A 및 분획 C iscom 매트릭스(MATRIX-M™)와 조합된

BV2373의 백신 효능을 도시한다.

도 50은 분획 A 및 분획 C iscom과 조합된 BV2373매트릭스(MATRIX-M™)("A"로 표시) 또는 위약("B"로 표시)으로 첫 번째 백신 접종 용량("백신 1"로 표시) 및 두 번째 백신 접종 용량("백신 2"로 표시) 후 대상이 경험한 부작용을 보여주는 그래프이다.

도 51은 BV2438 CoV S 폴리펩타이드의 다이어그램을 도시한다. 구조적 요소는 절단 가능한 신호 펩타이드(SP), N 말단 도메인(NTD), 수용체 결합 도메인(RBD), 하위 도메인 1 및 2(SD1 및 SD2), S2 절단 부위(S2'), 융합 펩타이드(FP), 헵타드(heptad) 반복체 1(HR1), 중앙 나선(CH), 헵타드 반복체 2(HR2), 막횡단 도메인(TM) 및 세포질 꼬리(CT)를 포함한다. SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드로부터의 아미노산 변화는 선형 다이어그램 아래에 검정색 텍스트로 표시된다.

도 52a는 예상 분자량 ~170 kD의 주요 단백질 생성물을 도시하는 정제된 전장 BV2438의 쿠마시 블루 염색으로 환원된 SDS-PAGE 겔을 도시한다. 도 52b는 주사 농도계의 그래프를 도시한다. 도 52c는 BV2438의 음성 염색 투과 전자 현미경 사진을 도시한다. BV2438은 길이 15nm, 폭 11nm의 잘 정의된 전구 모양의 입자를 형성한다(왼쪽 패널). 삼량체는 PS-80 미셀에 연결된 8nm 유연한 링커를 나타내었다(왼쪽 패널). 클래스 평균 이미지는 2D 이미지(중간 패널)에 중첩된 사전 융합 SARS-CoV-2 삼량체 스파이크 단백질 엑토도메인(PDB ID 6VXX)의 저온-EM 해결 구조와 rS-B.1.351 삼량체의 좋은 적합성을 보여주었다. 오른쪽 패널은 PS-80 미셀에 고정된 2개의 BV2438 삼량체를 보여준다.

도 53은 실시예 10의 마우스 연구 설계를 도시한다. 마우스 그룹(n = 20/그룹)은 연구 0일 및 14일에 재조합 S(rS) BV2438(SA) 또는 BV2373(WU) 단백질의 다양한 조합으로 프라임/부스트 요법으로 면역화되었다. 마우스는 BV2438로 프라이밍 및 부스팅하거나, BV2373으로 프라이밍 및 부스팅하거나, BV2373으로 프라이밍되고 BV2438로 부스팅하거나, 2가 BV2373+BV2438로 프라이밍 및 부스팅되었다. 항원 용량은 각 1가 면역화에 대해 1μg rS이거나, 2가 면역화 시 각 구조물에 대해 1μg rS이었다(총 2μg rS). 모든 항원 용량은 5μg 사포닌 항원보강제와 함께 투여되었다. 대조 그룹은 제제 완충제(위약)를 투여받았다. 혈청과 조직은 다이어그램에 나열된 시점에 수집되었다.

도 54a-b는 실시예 10의 마우스 연구 21일차에 수집된 혈청 내 항-SARS-CoV-2 S IgG 혈청 역가를 도시한다. ELISA를 사용하여 Wuhan-Hu-1 스파이크 단백질(도 54a) 또는 B.1.351 스파이크 단백질(도 54b)에 대한 항체 역가를 측정하였다. 막대는 기하 평균 역가(GMT)를 나타내고 오차 막대는 각 그룹에 대한 95% 신뢰 구간(CI)을 나타낸다. 개별 동물 역가는 색상 기호로 표시된다. 도 54c-d는 SARS-CoV-2 수용체 hACE2와 Wuhan-Hu-1 스파이크 단백질(도 54c) 또는 B.1.351 스파이크 단백질(도 54d) 사이의 결합을 방해할 수 있는 21일에 수집된 혈청의 기능적 항체 역가(ELISA로 측정)를 도시한다. 막대는 기하 평균 역가(GMT)를 나타내고 오차 막대는 각 그룹에 대한 95% 신뢰 구간(CI)을 나타낸다. 개별 동물 역가는 색상 기호로 표시된다. 도 54e는 n = 5마리의 동물/그룹으로부터 32일차에 수집된 혈청 내 SARS-CoV-2 중화 항체 역가가 PRNT 분석을 사용하여 결정되었음을 도시한다. 혈청은 SARS-CoV-2 USA-WA1, B.1.351 변이체 또는 B.1.1.7 변이체를 중화하는 능력을 평가하였다. 막대는 기하 평균 역가(GMT)를 나타내고 오차 막대는 각 그룹에 대한 95% 신뢰 구간(CI)을 나타낸다. 개별 동물 역가는 기호로 표시된다. $\log_{10}$으로 변환된 데이터에 대해 투키 사후 테스트를 통해 일원 ANOVA를 수행하여 통계적 유의성을 계산하였다.

도 55a-f는 살아있는 SARS-CoV-2 B.1.351 또는 B.1.1.7 바이러스에 의한 면역성 검사에 대해 Wuhan-Hu-1 또는 B.1.351 기반 SARS-CoV-2 rS를 이용한 면역화의 보호 효능을 도시한다. 연구 설계는 도 53에 기술되었다. 면역화된 마우스(n = 10/그룹)는 살아있는 SARS-CoV-2 B.1.351(왼쪽 패널) 또는 B.1.1.7(오른쪽 패널)로 면역성 검사되었다. 면역성 검사 후 4일 동안, 마우스는 매일 계량되고 이들의 체중 감소율은 면역성 검사 당일의 체중에 대해 계산하였다. 도 55a 및 도 55b는 평균 체중 감소율을 기호로 도시한다. 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다. 마우스의 절반을 면역성 검사 후 2일에 희생시켰고, 폐 조직에 플라크 형성 검정을 실시하여 폐 바이러스 역가를 결정하였다(도 55c, 도 55d). 나머지 마우스는 면역성 검사 후 4일째에 희생되었다. 도 55e 및 도 55f는 폐 조직 내 SARS-CoV-2 서브게놈 RNA의 수준을 보여주며, 시험처리 후 2일째에 각 위약 그룹의 평균에 대한 RNA의 변화 배수로 표시된다. 가로 막대는 각 시점에서 n = 5 마우스의 그룹 평균 배수 변화를 나타내고 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다.

도 56a-h는 마우스에서 BV2373 또는 BV2438 요법으로 면역화 시 유도된 세포 매개 면역을 도시한다. 도 56a는 마우스 연구 설계를 도시한다. 마우스 그룹(n = 8/그룹)은 BV2373 또는 BV2438을 기반으로 한 SARS-CoV-2 rS의

다양한 조합으로 0일과 21일에 프라임/부스트 요법으로 면역화되었다. 마우스는 BV2438로 프라이밍 및 부스팅하거나, BV2373으로 프라이밍 및 부스팅하거나, BV2373으로 프라이밍되고 BV2438로 부스팅하거나, 2가 BV2373 및 BV2438로 프라이밍 및 부스팅되었다. 항원 용량은 각 1가 면역화에 대해 1μg rS이거나, 2가 면역화 시 각 구조물에 대해 1μg rS이었다(총 2μg rS). 모든 예방접종은 5μg Matrix-M1 항원보강제가 투여되었다. 대조 그룹은 제제 완충제(위약, n = 5)를 투여받았다. 세포 수집을 위해 28일차에 비장이 수확되었다. 비장세포는 BV2373 또는 BV2438로 자극한 후, ELISA를 수행하여 대표적인 Th1 사이토카인인 IFN-γ-양성 세포(도 56b) 및 대표적인 Th2 사이토카인인 IL-5-양성 세포(도 56c)를 결정하였다. 도 56b 및 도 56c의 데이터는 면역화에 대한 반응의 Th1/Th2 균형을 계산하기 위해 사용되었다(도 56d). 도 56e는 세포내 사이토카인 염색을 사용하여 3개의 Th1 사이토카인(IFN-γ, IL-2 및 TNF-α)에 대해 양성으로 염색된 다기능 CD4+ T 세포의 수가 정량화되었고 10^6 CD4+ T 세포당 삼중 사이토카인 양성 세포의 수로 표시된 것을 도시한다. 도 56f는 T 여포 보조 세포의 정량화를 도시한다. T 여포 보조 세포는 모든 CD4+ T 세포 중 PD-1+CXCR5+ 세포의 비율을 결정함으로써 정량화되었다. 도 56g는 배중심 형성은 유동 세포측정법을 사용하여 CD19+ B 세포 중 GL7+CD95+ 세포의 백분율을 결정함으로써 평가되었다는 것을 도시한다. 회색 막대는 평균을 나타내고 오류 막대는 표준 편차를 나타낸다. 개별 동물 데이터는 색상 기호로 도시된다. 게이팅 전략의 예가 도 56h에 도시된다. 실험 그룹 간의 차이는 투키 사후 테스트를 사용한 일원 ANOVA에 의해 평가되었다(도 56b의 데이터는 분석 전에 $\log_{10}$-변환되었다). P 값 < 0.05는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. **** = p < 0.0001.

도 57a-e는 BV2373 또는 BV2438로 면역화한 후의 CD4+ 및 CD8+ T 세포 반응을 도시한다. 마우스 그룹(n = 8/그룹)은 프라임/부스트 요법으로 0일 및 21일에 BV2373 또는 BV2438의 다양한 조합으로 면역화되었다. 마우스는 BV2438로 프라이밍 및 부스팅하거나, BV2373으로 프라이밍 및 부스팅하거나, BV2373으로 프라이밍되고 BV2438로 부스팅하거나, 2가 BV2373 및 BV2438로 프라이밍 및 부스팅되었다. 항원 용량은 각 1가 면역화에 대해 1μg rS이거나, 2가 면역화 시 각 구조물에 대해 1μg rS이었다(총 2μg rS). 모든 항원 용량은 5μg 사포닌 항원보강제와 함께 투여되었다. 대조 그룹은 제제 완충제(위약, n = 5)를 투여받았다. 세포 수집을 위해 28일차에 비장을 수확하였다. 분리된 비장세포는 rS-WU1 또는 rS-B.1.351로 자극한 후, 세포내 사이토카인 염색을 실시하여 CD4+ T 세포가 IFN-γ(도 57a), IL-2(도 57b), TNF-α(도 57c), 또는 IL-4(도 57d)에 대해 양성인지 여부를 결정하였다. CD8+ T 세포 반응을 조사하기 위해, 세포는 전체 Wuhan-Hu-1 스파이크 단백질 서열에 상응하는 펩타이드 풀로 자극한 다음, IFN-γ, IL-2 및 TNF-α에 대해 ICS를 실시하였다(도 57e).

도 58a-g는 개코원숭이에서 BV2373으로 면역화한 지 약 1년 후 1회 또는 2회의 추가 BV2438 투여량의 면역원성을 도시한다. 도 58a는 연구 설계를 보여준다. 소규모 개코원숭이 집단(n = 2-3/그룹)은 원래 0일차와 21일차(각각 0주차와 3주차)에 사포닌 항원보강제와 함께 또는 항원보강제가 첨가되지 않은 25μg BV2373과 함께 1μg, 5μg 또는 25μg BV2373으로 면역화되었다. 대략 1년 후, 318일과 339일(각각 45주차와 48주차)에 모든 동물에 50μg 사포닌 항원보강제와 함께 3μg BV2438을 1회 또는 2회 추가 투여하였다. 도 58b는 연구 과정에 걸친 항-CoV S IgG 역가를 도시한다. 개별 동물의 역가는 시간 경과에 따라 표시되며, 다양한 색상의 기호와 선은 초기 rS-WU1 예방접종 시리즈에 대한 다양한 용량 그룹을 나타낸다. BV2438 부스트 전(303일차)뿐만 아니라 부스트 후 7, 21, 35 및 81일에 수집된 혈청을 분석하여 ELISA에 의한 항-rS-WU1(도 58c) 및 rS-B.1.351(도 58d) IgG 역가(수평선은 수단을 나타냄), rS-WU1 또는 rS-B.1.351과 hACE2 수용체 사이의 상호작용을 방해할 수 있는 ELISA에 의한 항체 역가(도 58e, 수평선은 수단을 나타냄), 및 PRNT 분석을 사용한 SARS-CoV-2 균주 USA-WA1, B.1.351 및 B.1.1.7(도 58f, 회색 막대는 기하 평균을 나타내고 오류 막대는 95% 신뢰 구간을 나타냄)을 중화할 수 있는 항체 역가를 결정하였다. 3 Th1 사이토카인(IFN-γ, IL-2 및 TNF-α)에 대해 양성인 다기능 CD4+ T 세포의 존재는 BV2373 또는 BV2438로 자극한 후 세포내 사이토카인 염색으로 평가되었다(도 58g). 회색 막대는 평균을 나타내고 색상 기호는 개별 동물 데이터를 나타낸다.

도 59a-g는 개코원숭이의 BV2438 증가에 대한 개별 사이토카인 반응을 도시한다. 소규모 개코원숭이 집단(n = 2-3/그룹)은 0일차와 21일차(각각 0주차와 3주차)에 1μg, 5μg 또는 25μg BV2373과 50μg 사포닌 항원보강제 또는 항원보강제가 첨가되지 않은 25μg BV2373으로 면역화하였다. 약 1년 후, 모든 동물에게 318일 및 339일(각각 45주 및 48주)에 50μg 사포닌 항원보강제와 함께 3μg BV2438을 1회 또는 2회 추가 투여하였다. PBMC는 사전 부스트(303일, 43주), 첫 번째 rS-B.1.351 부스트 후 7일(325일, 46주) 및 첫 번째 rS-B.1.351 부스트 후 35일(353일, 50주) 수집하였다. PBMC는 BV2373 또는 BV2438로 자극하고 ELISA를 수행하여 Th1 사이토카인인 IFN-γ 생산 세포(도 59a) 및 Th2 사이토카인인 IL-4 생산 세포(도 59b)를 측정하였다. CD4+ T 세포도 BV2373 또는 BV2438로 자극한 후 ICS를 수행하여 IFN-γ(도 59c), IL-2(도 59d), TNF-α(도 59e), IL-5(도 59f) 및 IL-13(도 59g)를 생성하는 세포를 측정하였다.

도 60a-b는 BV2373으로 면역화된 인간 대상으로부터의 SARS-CoV-2 변이체 중화 역가를 도시한다. B.1.1.7(도 60a) 및 B.1.351(도 60b)과 비교하여 USA-WA1에 대한 중화 항체의 존재를 결정하기 위해 임상 연구 참가자(n=30)의 혈청 샘플을 PRNT 분석에 적용하였다. 개별 대상의 역가는 검은색 원으로 표시되며, 선은 USA-WA1에 대한 개인의 역가를 해당 변이체에 대한 역가에 연결한다.

도 61a-Bb는 다음 SARS-CoV-2 변이체: (i) SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질과 비교하여 D614G 돌연변이가 있는 CoV S 폴리펩타이드를 갖는 SARS-CoV-2 바이러스; (ii) SARS-CoV-2 알파 균주, SARS-CoV-2 베타 균주 및 SARS-CoV-2 델타 균주에 대해 BV2373 및 사포닌 항원보강제를 사용한 부스트 전과 후의 항-S 단백질 IgG 역가를 도시한다. 도 61a는 35일부터 217일까지 증가 배수를 도시한다. 도 61b는 189일부터 217일까지 증가 배수를 도시한다.

도 62a-b는 다음 SARS-CoV-2 변이체: (i) SEQ ID NO: 1의 아미노산을 갖는 단백질과 비교하여 D614G 돌연변이가 있는 CoV S 폴리펩타이드를 갖는 SARS-CoV-2 바이러스; (ii) SARS-CoV-2 알파 균주, SARS-CoV-2 베타 균주 및 SARS-CoV-2 델타 균주. 도 62a는 35일부터 217일까지 증가 배수를 보여준다. 도 62b는 189일부터 217일까지 증가 배수를 보여준다.

도 63은 실시예 11에 기술된 시험 참가자에 대한 추가 투여의 다이어그램을 도시한다.

도 64a-b는 실시예 11에 기술된 시험의 그룹 B2 환자의 국소(도 64a) 및 전신(도 64b) 반응성을 도시한다.

도 65는 실시예 11에 설명된 환자의 연구일별 조상 SARS-CoV-2 균주에 대한 혈청 IgG 역가를 도시한다.

도 66은 실시예 11에 기술된 환자의 연구일별 조상 SARS-CoV-2 균주에 대한 중화 항체 활성을 도시한다.

도 67은 D614G 돌연변이 및 B.1.617.2(델타 변이체)를 함유한 SARS-CoV-2 균주에 대한 실시예 11의 BV2373 및 사포닌 항원보강제를 포함하는 면역원성 조성물에 대한 중화 항체 99(neut99) 값을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] ***정의***

[0030] 본 명세서 및 첨부된 청구 범위에서 사용된 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥에 명백하게 달리 지시되어 있지 않는 한 복수 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "단백질"에 대한 언급은 하나의 단백질 또는 이러한 단백질의 혼합물을 의미할 수 있고, "방법"에 대한 언급은 당업자에게 공지된 등가 단계 및/또는 방법에 대한 언급을 포함한다.

[0031] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "항원보강제"는 면역원과 조합하여 사용될 때, 면역원에 대해 유도된 면역 반응을 증가시키거나 변경시키거나 변형시키는 화합물을 의미한다. 면역 반응의 변형은 항체 및 세포 면역 반응의 하나 또는 모두의 특이성을 강화시키거나 확대시키는 것을 포함할 수 있다.

[0032] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 수치에 선행할 때 용어 "약" 또는 "대략"은 ±10%의 범위 값을 나타낸다. 예를 들어, "약 100"은 90과 110을 포함한다.

[0033] 본 명세서에 사용된 용어 "면역원", "항원" 및 "에피토프"는 당단백질을 비롯한 단백질 및 면역 반응을 유도할 수 있는 펩타이드와 같은 물질을 의미한다.

[0034] 본 명세서에 사용된 "면역원성 조성물"은 대상에 대한 조성물의 투여가 항원에 대한 체액성 및/또는 세포성 면역 반응의 대상에서 발현을 초래하는 항원을 포함하는 조성물이다.

[0035] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "서브유닛" 조성물, 예를 들어 백신은 하나 이상의 선택된 항원을 포함하나 병원체의 모든 항원을 포함하지 않는다. 이러한 조성물은 손상되지 않은 바이러스 또는 이러한 세포 또는 입자의 용해물을 실질적으로 함유하지 않고 전형적으로 병원체로부터의 적어도 부분적으로 정제된, 종종 실질적으로 정제된 면역원성 폴리펩타이드로부터 제조된다. 본 발명에 개시된 서브유닛 조성물에서 항원은 종종 바큘로바이러스 시스템을 사용하여 통상적으로 재조합적으로 제조된다.

[0036] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "실질적으로"는 물질이 이것이 함유된 샘플의 큰 백분율을 구성하는 물질(예를 들어, 화합물, 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드)의 분리를 의미한다. 예를 들어, 한 샘플에서, 실질적으로 정제된 성분은 샘플의 85%, 바람직하게는 85%-90%, 보다 바람직하게는 적어도 95%-99.5% 및 가장 바람직하게는 99%를 포함한다. 성분이 실질적으로 대체되는 경우, 샘플에 남아있는 양은 약 0.5% 내지 약 10% 이하, 바람

직하게는 약 0.5% 내지 약 1.0% 이하이다.

[0037] 본 명세서에 사용된 바와 같이 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"는 유익한 또는 바람직한 결과, 예를 들어 임상 결과를 얻는 접근법을 의미한다. 본 발명의 목적을 위해, 유익한 또는 바람직한 결과는 감염 또는 질환의 개시 또는 진행을 억제 또는 억압; 감염 또는 질환의 증상의 발현을 개선 또는 감소; 또는 이의 조합을 포함할 수 있다.

[0038] 본 명세서에서 사용된 "예방(prevention)"은 "예방(prophylaxis)"과 상호교환적으로 사용되며 감염 또는 질환의 완전한 예방 또는 그 감염 또는 질환의 증상의 발현의 예방; 감염 또는 질환 또는 증상의 개시 지연; 또는 이후에 발현된 감염 또는 질환 또는 이의 증상의 심각성의 감소를 의미할 수 있다.

[0039] 본 명세서에 사용된 "유효 투여량" 또는 "유효량"은 병원체 감염의 적어도 하나의 증상을 감소시키는 면역 반응을 유도하기에 충분한 면역원의 양을 의미한다. 유효 투여량 또는 유효량은 예를 들어 중화 분비물 및/또는 혈청 항체의 양을, 예를 들어 플라크 중화, 보체 고정, 효소-결합 면역 흡착제(ELISA) 또는 미세중화 분석에 의해 측정함으로써 결정될 수 있다.

[0040] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "백신"은 병원체에 대항하는 면역 반응을 유도하는데 사용되는 병원체로부터 유래된 면역원과 같은 면역원성 조성물을 의미한다. 면역 반응은 항체의 형성 및/또는 세포-매개 반응의 형성을 포함할 수 있다. 문맥에 따라, 용어 "백신"은 면역 반응을 만들기 위해 대상에게 투여되는 면역원의 현탁액 또는 용액을 의미할 수도 있다. 바람직하게는, 백신은 SARS-CoV-2 또는 이의 변이체로부터의 감염을 예방하는 데 효과적인 면역 반응을 유도한다.

[0041] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "대상"은 인간 및 다른 동물을 포함한다. 통상적으로, 대상은 인간이다. 예를 들어, 대상은 성인, 십대, 어린이(2세 내지 14세), 유아(생후 내지 2년) 또는 신생아(2개월까지)일 수 있다. 특정 양태에서, 대상은 4개월령까지 또는 6개월령까지이다. 양태에서, 성인은 65세 이상, 또는 약 60세 이상의 노인이다. 양태에서, 대상은 임산부 또는 임신하려고 하는 여성이다. 다른 양태에서, 대상은 인간이 아니며; 예를 들어, 비인간 영장류; 예를 들어, 개코원숭이, 침팬지, 고릴라 또는 필리핀 원숭이이다. 특정 양태에서, 대상은 개 또는 고양이와 같은 애완 동물일 수 있다.

[0042] 양태에서, 대상은 면역 저하되어 있다. 실시태양에서, 면역 저하 대상은 면역억제를 유발하는 약물을 투여받는다. 면역억제를 유발하는 약물의 비제한적인 예는 코르티코스테로이드(예를 들어, 프레드니손), 알킬화제(예를 들어, 사이클로포스파미드), 항대사제(예를 들어, 아자티오프린 또는 6-머캅토퓨린), 이식 관련 면역억제제(예를 들어, 사이클로스포린, 타크로리무스, 시롤리무스, 또는 미코페놀레이트 모페틸), 미톡산트론, 화학요법제, 메토트렉세이트, 종양괴사인자(TNF) 차단제(예를 들어, 에타네르셉트, 아달리무맙, 인플릭시맙)을 포함한다. 실시태양에서, 면역 저하된 대상은 바이러스(예를 들어, 인간 면역결핍 바이러스 또는 엡스타인-바 바이러스)로 감염된다. 실시태양에서, 바이러스는 호흡기 세포융합 바이러스, 인플루엔자, 파라인플루엔자, 아데노바이러스 또는 피코나바이러스와 같은 호흡기 바이러스이다. 실시태양에서, 면역 저하 대상은 후천성 면역결핍 증후군(AIDS)을 앓고 있다. 실시태양에서, 면역 저하 대상은 인간 면역결핍 바이러스(HIV)에 걸린 사람이다. 실시태양에서, 면역 저하 대상은 염증을 예방하거나 이식 거부를 방지하도록 설계된 치료 요법으로 인해 면역 저하된다. 실시태양에서, 면역 저하 대상은 이식을 받은 대상이다. 실시태양에서, 면역 저하 대상은 방사선 요법 또는 비장절제술을 받았다. 실시태양에서, 면역 저하 대상은 암, 자가면역 질환, 결핵, 물질 남용 장애(예를 들어, 알코올, 오피오이드 또는 코카인 남용 장애), 뇌졸중 또는 뇌혈관 질환, 고형 장기 또는 혈액 줄기세포 이식, 낫적혈구병, 지중해빈혈, 자가면역림프증식증후군(ALPS), 자가면역다선증후군 1형(APS-1), NF-κB를 동반한 B세포 확장 및 T세포 무반응(BENTA) 질환, 카스파제-8 결핍 상태(CEDS), 만성 육아종성 질환(CGD), 공통 가변성 면역결핍(CVID), 선천성 호중구 감소증 증후군, 세포독성 T-림프구 관련 항원 4(CTLA-4) 결핍, DOCK8 결핍, GATA2 결핍, 면역결핍을 동반한 당화 장애, 고면역글로불린 E 증후군(HIES), 고면역글로불린 M 증후군, 당뇨병, 제 1 형 당뇨병, 제 2 형 당뇨병, 인터페론 감마 결핍, 인터루킨 12 결핍, 인터루킨 23 결핍, 백혈구 유착 결핍, 지질다당류 반응 베이지색 앵커(LRBA) 결핍, PI3 키나제 질환, PLCG2 관련 항체 결핍 및 면역 조절 장애(PLAID), 중증 복합 면역 결핍증(SCID), STAT3 우성 음성 질환, STAT3 기능 획득 질환, 사마귀, 저감마글로불린혈증, 감염 및 골수 카테시스 (WHIM) 증후군, 위스콧-알드리치 증후군(WAS), X-연관 무감마글로불린혈증(XLA), X-연관 림프증식성 질환(XLP), 요독증, 영양실조 또는 XMEN 질환으로 진단받았다. 실시태양에서, 면역 저하 대상은 현재 또는 과거 흡연자이다. 실시태양에서, 면역 저하 대상은 B 세포 결함, T 세포 결함, 대식세포 결함, 사이토카인 결함, 식세포 결핍, 식세포 기능 장애, 보체 결핍 또는 이들의 조합을 갖는다.

[0043] 실시태양에서, 대상은 과체중이거나 비만이다. 실시태양에서, 과체중 대상은 체질량 지수(BMI)가 ≥ 25kg/m^2 및

< 30kg/m^{2}이다. 실시예에서, 비만 대상은 BMI가 ≥ 30kg/m^{2}이다. 실시태양에서, 대상은 정신 건강 이상을 갖는다. 실시태양에서, 정신 건강 이상은 우울증, 정신분열증 또는 불안이다.

[0044] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "약학적으로 허용 가능한"은 포유류 및 더욱 구체적으로 인간에서의 사용을 위해 미국 연방 정부 또는 주정부의 규제 기관에 의해 승인되거나 미국 약전, 유럽 약전 또는 기타 일반적으로 인정되는 약전에 열거된 것을 의미한다. 이러한 조성물은 척추 동물에서 보호 면역 반응을 유도하기위한 백신 및/또는 항원 조성물로서 유용할 수 있다.

[0045] 본 명세서에 사용된 바와 같이 용어 "약"은 표시된 수치의 ±10%를 의미한다.

[0046] 본 명세서에 사용된 용어 "NVX-CoV2373"은 BV2373 스파이크 당단백질(SEQ ID NO: 87) 및 분획 A 및 분획 C 이스컴(iscom) 매트릭스(예를 들어, MATRIX-M™)를 포함하는 백신 조성물을 지칭한다.

[0047] 본 명세서에 사용된 바와 같이, CoV S 폴리펩타이드를 지칭하는 용어 "변형"은 CoV S 폴리펩타이드의 하나 이상의 아미노산의 돌연변이, 결실 또는 첨가를 지칭한다. CoV S 폴리펩타이드 내 변형의 위치는 폴리펩타이드의 서열을 SEQ ID NO: 1(신호 펩타이드를 함유하는 CoV S 폴리펩타이드) 또는 SEQ ID NO: 2(신호 펩타이드가 없는 성숙한 CoV S 폴리펩타이드)에 정렬하는 것에 기초하여 결정될 수 있다.

[0048] 본 명세서에서 용어 "이종 SARS-CoV-2 균주"와 상호교환적으로 사용되는 SARS-CoV-2의 변이체는 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드와 비교하여 적어도 약 2개, 적어도 약 3개, 적어도 약 4개, 적어도 약 5개, 적어도 약 6개, 적어도 약 7개, 적어도 약 8개, 적어도 약 9개, 적어도 약 10개, 적어도 약 11개, 적어도 약 12개, 적어도 약 13개, 적어도 약 14개, 적어도 약 15개, 적어도 약 16개, 적어도 약 17개, 적어도 약 18개, 적어도 약 19개, 적어도 약 20개, 적어도 약 21개, 적어도 약 22개, 적어도 약 23개, 적어도 약 24개, 적어도 약 25개, 적어도 약 26개, 적어도 약 27개, 적어도 약 28개, 적어도 약 29개, 적어도 약 30개, 적어도 약 31개, 적어도 약 32개, 적어도 약 33개, 적어도 약 34개, 또는 적어도 약 35개의 변형, 약 2개 내지 약 35개 변형, 약 5개 내지 약 10개 변형, 약 5개 내지 약 20개 변형, 약 10개 내지 약 20개 변형, 약 15개 내지 약 25개 변형, 약 20개 내지 30개 변형, 약 20개 내지 약 40개 변형, 약 25개 내지 약 45개 변형을 갖는 CoV S 폴리펩타이드를 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스이다. 실시태양에서, 이종 SARS-CoV-2 균주는 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 70%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98% 또는 적어도 약 99% 동일성을 갖는 CoV S 폴리펩타이드를 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스이다. 실시태양에서, 이종 SARS-CoV-2 균주는 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드와 약 70% 내지 약 99.9% 동일성을 갖는 CoV S 폴리펩타이드를 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스이다. 실시태양에서, 이종 SARS-CoV-2 균주는 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드와 약 70% 내지 약 99.5% 동일성을 갖는 CoV S 폴리펩타이드를 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스이다. 실시태양에서, 이종 SARS-CoV-2 균주는 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드와 약 90% 내지 약 99.9% 동일성을 갖는 CoV S 폴리펩타이드를 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스이다. 실시태양에서, 이종 SARS-CoV-2 균주는 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드와 약 90% 내지 약 99.8% 동일성을 갖는 CoV S 폴리펩타이드를 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스이다. 실시태양에서, 이종 SARS-CoV-2 균주는 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드와 약 95% 내지 약 99.9% 동일성을 갖는 CoV S 폴리펩타이드를 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스이다. 실시태양에서, 이종 SARS-CoV-2 균주는 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드와 약 95% 내지 약 99.8% 동일성을 갖는 CoV S 폴리펩타이드를 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스이다. 실시태양에서, 이종 SARS-CoV-2 균주는 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드와 약 95% 내지 약 99% 동일성을 갖는 CoV S 폴리펩타이드를 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스이다.

[0049] 용어 "B.1.1.7 SARS-CoV-2 균주"("알파" 균주라고도 함)는 아미노산 69, 70 및 144의 결실 및 N501Y, A570D, D614G, P681H 또는 P681R, T716I, S982A 및 D1118H의 돌연변이를 포함하는 CoV S 폴리펩타이드를 갖는 이종 SARS-CoV-2 균주를 의미하며, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. B.1.1.7 SARS-CoV-2 균주의 CoV S 폴리펩타이드는 선택적으로 아미노산 145의 결실, E484K, L432R 또는 S494P의 돌연변이, 또는 이들의 조합을 함유할 수 있다.

[0050] 용어 "B.1.351 SARS-CoV-2 균주"("베타" 균주라고도 함)는 D80A, K417N, E484K, N501Y, D614G 및 A701V의 돌연변이를 포함하는 CoV S 폴리펩타이드를 갖는 이종 SARS-CoV-2 균주를 의미하며, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID

NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. B.1.617.2 SARS-CoV-2 균주의 CoV S 폴리펩타이드는 선택적으로 다음 돌연변이: D215G; L242H; R246I; 또는 241-243의 1, 2 또는 3개 아미노산의 결실 중 하나 이상을 포함할 수 있으며, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드와 관련하여 번호가 매겨진다. 실시태양에서, 베타 균주의 CoV S 폴리펩타이드는 D80A, D215G, L242H, K417N, E484K, N501Y, D614G 및 A701V의 돌연변이를 포함하며, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드와 관련하여 번호가 매겨진다. 실시태양에서, 베타 균주의 CoV S 폴리펩타이드는 D80A, D215G, K417N, E484K, N501Y, D614G, 및 A701V의 돌연변이, 아미노산 241-243의 1, 2 또는 3개 아미노산의 결실을 포함하며, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, 베타 균주는 D80A, L242H, R246I, N501Y, K417N, E484K, D614G 및 A701V의 돌연변이를 포함하며, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드와 관련하여 번호가 매겨진다.

[0051] 용어 "P.1 SARS-CoV-2 균주"("감마" 균주라고도 함)는 돌연변이 L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y, T1027I 및 V1176F를 포함하는 CoV S 폴리펩타이드를 갖는 이종 SARS-CoV-2 균주를 의미하며, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다.

[0052] 용어 "Cal.20C SARS-CoV-2 균주"는 돌연변이 S13I, W152C 및 L452R을 포함하는 CoV S 폴리펩타이드를 갖는 이종 SARS-CoV-2 균주를 의미하며, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다.

[0053] 용어 "B.1.617.2 균주"("델타" 균주라고도 함)는 아미노산 157 및 158의 결실과 T19R, E156G, L452R, T478K, D614G, P681R 및 D950N의 돌연변이를 포함하는 CoV S 폴리펩타이드를 갖는 이종 SARS-CoV-2 균주를 의미하며, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. B.1.617.2 SARS-CoV-2 균주의 폴리펩타이드는 선택적으로 다음 돌연변이: G142D; W64H; H66W; V70F; T95I; Y145H; D213V; L214R; A222V; W258I 또는 W258L; K417N; N439K; E484K 또는 E484Q; N501Y; 및 Q613H 중 하나 이상을 함유하며, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, 델타 균주는 아미노산 157 및 158의 결실 및 T19R, G142D, E156G, L452R, T478K, D614G, P681R 및 D950N의 돌연변이를 포함하는 CoV S 폴리펩타이드를 포함한다. 실시태양에서, 델타 균주는 아미노산 157 및 158의 결실 및 T19R, T95I, G142D, Y145H, E156G, A222V, K417N L452R, T478K, D614G, P681R 및 D950N의 돌연변이를 포함하는 CoV S 폴리펩타이드를 포함하며, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, 델타 균주는 아미노산 157 및 158의 결실과 T19R, G142D, E156G, W258I, K417N, N439K, L452R, T478K, E484K, N501Y, D614G, P681R 및 D950N의 돌연변이를 포함하는 CoV S 폴리펩타이드를 포함하며, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, 델타 균주는 아미노산 157 및 158의 결실 및 T19R, W64H, H66W, G142D, E156G, D213V, L214R, W258I, K417N, N439K, L452R, T478K, E484K, N501Y, D614G, P681R 및 D950N의 돌연변이를 포함하는 CoV S 폴리펩타이드를 포함하며, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, 델타 균주는 아미노산 157 및 158의 결실과 T19R, G142D, E156G, K417N, L452R, T478K, E484Q, D614G, P681R 및 D950N의 돌연변이를 포함하는 CoV S 폴리펩타이드를 포함하며, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다.

[0054] 용어 "B.1.525 균주"("에타" 균주라고도 함)는 돌연변이 Q52R; A67V; E484K; D614G; Q677H; F888L; 및 아미노산 69, 70, 144, 145 중 1, 2, 3 또는 4의 결실을 포함하는 CoV S 폴리펩타이드를 갖는 이종 SARS-CoV-2 균주를 의미하며, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다.

[0055] 용어 "B.1.526 균주"("이오타" 균주라고도 함)는 돌연변이 L5F; T95I; D253G; E484K; D614G; 및 A701V를 포함하는 CoV S 폴리펩타이드를 갖는 이종 SARS-CoV-2 균주를 의미하며, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다.

[0056] 용어 "B.1.617.1 균주"("카파" 균주라고도 함)는 돌연변이 L452R; E484Q; D614G; P681R; 및 Q1071H를 포함하는 CoV S 폴리펩타이드를 갖는 이종 SARS-CoV-2 균주를 의미하며, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산

서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드에 대해 매겨진다.

[0057] 용어 "C.37 균주"("람다" 균주라고도 함)는 돌연변이 G75V; T76I; R246N; L452Q; F490S; D614G; T859N; 및 아미노산 247-253의 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 결실을 포함하는 CoV S 폴리펩타이드를 갖는 이종 SARS-CoV-2 균주를 의미하며, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다.

[0058] 용어 "B.1.621 균주"("뮤" 균주라고도 함)는 돌연변이 T95I; Y144S; Y145N; R346K; E484K; N501Y; D614G; P681H; 및 D950N을 포함하는 CoV S 폴리펩타이드를 갖는 이종 SARS-CoV-2 균주를 의미하며, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다.

[0059] 본 명세서에 기술된 면역원성 조성물 또는 백신 조성물의 "효능"이라는 용어는 면역원성 조성물을 투여하지 않은 그룹과 비교하여 면역원성 조성물을 투여한 그룹에서 질환(예를 들어, COVID-19)의 감소 백분율을 의미한다. 실시태양에서, 효능(E)은 다음 방정식을 사용하여 계산된다: E(%) = (1 - RR) x 100, 여기서 RR = 면역원성 조성물을 투여한 그룹과 면역원성 조성물을 투여하지 않은 그룹 사이의 발생률의 상대적 위험이다. 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 면역원성 조성물은 SARS-CoV-2 바이러스 또는 이종 SARS-CoV-2 균주에 대해 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 약 50% 내지 약 99%, 약 50% 내지 약 98%, 약 60% 내지 약 99%, 약 60% 내지 약 98%, 약 70% 내지 약 98%, 약 70% 내지 약 95%, 약 70% 내지 약 99%, 약 80% 내지 약 99%, 약 80% 내지 약 98%, 약 80% 내지 약 95%, 약 85% 내지 약 99%, 약 85% 내지 약 98%, 약 85% 내지 약 95%, 약 90% 내지 약 95%, 약 90% 내지 98%, 또는 약 90% 내지 약 99%인 효능을 가진다.

[0060] SARS-CoV-2 또는 이의 변이체에 대해 "양성"인 대상은 SARS-CoV-2 또는 이의 변이체에 대해 양성 PCR 테스트 또는 혈청학적 테스트를 보인다. 양성 PCR 테스트는 SARS-CoV-2 또는 이의 변이체의 유전 물질을 검출한다. 양성 혈청학적 테스트는 SARS-CoV-2 단백질, 일반적으로 SARS-CoV-2의 뉴클레오캡시드 단백질 또는 이의 변이체에 대한 항체의 존재를 보여준다.

[0061] 용어 "무증상"은 SARS-CoV-2 또는 SARS-CoV-2 변이체에 대해 양성 반응을 보이지만 COVID-19의 어떠한 증상도 경험하지 않는 대상을 의미한다.

[0062] COVID-19를 지칭할 때 용어 "경증"은 SARS-CoV-2 또는 이의 변이체에 대해 양성 PCR 테스트 또는 혈청학적 테스트를 보이며 다음 증상: (i) 발열; (ii) 새로 발생한 기침; (iii) 숨가쁨 또는 호흡 곤란의 새로 발병 또는 악화; 피로; 전신 근육통이나 신체 통증; 두통; 미각 또는 후각 상실; 인후염, 울혈 또는 콧물; 또는 메스꺼움, 구토 또는 설사로부터 선택된 두 가지 추가 COVID-19 증상을 보이는 대상을 의미한다.

[0063] COVID-19를 지칭할 때 "중등도"라는 용어는 SARS-CoV-2 또는 이의 변이체에 대해 양성 PCR 테스트 또는 혈청학적 테스트를 보이며 다음 증상: (i) 3일 이상 ≥38.4℃의 고열; (ii) 심각한 하기도 감염(LRTI)의 임의의 증거를 보이는 대상을 의미하며, 증거는 (a) 운동 여부에 관계없이 호흡 곤란; (b) 빈호흡(휴식 시 분당 호흡수 24 내지 29회); (c) SpO2 94% 내지 95%; (d) 폐렴 또는 LRTI와 일치하는 비정상적인 흉부 엑스레이 또는 컴퓨터 단층촬영(CT); 또는 (e) 폐 청진 시 우발적인 소리(예를 들어, 악설음/수포음, 천명음, 건성수포음, 흉막 문지름, 협착음)에서 선택된다.

[0064] COVID-19를 지칭할 때 "중증"이라는 용어는 SARS-CoV-2 또는 이의 변이체에 대한 양성 PCR 테스트 또는 혈청학적 테스트를 보이며 다음 증상: (i) 빈호흡 휴식 시 분당 호흡수 ≥ 30; (ii) 안정시 심박수는 분당 ≥ 125회; (iii) ≤ 93%의 SpO2 또는 PaO2/FiO2 < 300mmHg; (iv) 고유량 산소 요법 또는 비침습적 환기, 비침습적 양압 환기(예를 들어, 지속성 기도압(CPAP) 또는 이중 수준 양압(BiPAP))에 대한 요구 사항; (v) 기계적 환기 또는 체외막 산소 공급(ECMO)에 대한 요구 사항; (vi) (a) 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS)을 포함한 급성 호흡 부전; (b) 급성 신부전; (c) 급성 간부전; (d) 급성 우심 또는 좌심부전; (e) 패혈성 쇼크 또는 심장성 쇼크(수축기 혈압(SBP) < 90mmHg 또는 확장기 혈압(DBP) 또는 < 60mmHg로 정의되는 쇼크); (f) 급성 뇌졸중(허혈성 또는 출혈성); (g) 급성 심근경색증(AMI), 심부 정맥 혈전증(DVT) 또는 폐색전증(PE)과 같은 급성 혈전증 사건; (h) 혈관수축제, 전신 코르티코스테로이드 또는 혈액투석에 대한 요구 사항; (vii) 중환자실 입원; 또는 (viii) 사망으로부터 선택된 하나 이상의 주요 기관계 이상 또는 쇠약의 하나 이상을 보이는 대상을 의미한다.

[0065] ***코로나바이러스(CoV) 스파이크(S) 단백질을 함유하는 백신 조성물***

[0066] 본 발명은 비천연 발생 코로나바이러스(CoV) 스파이크(S) 폴리펩타이드, CoV S 폴리펩타이드를 함유하는 나노입

자, 및 비천연 발생 CoV S 폴리펩타이드 또는 CoV S 폴리펩타이드를 함유하는 나노입자를 함유하는 면역원성 조성물 및 백신 조성물을 제공한다. 실시태양에서, 면역 반응을 자극하기 위해 CoV S 폴리펩타이드, 나노입자, 면역원성 조성물 및 백신 조성물을 사용하는 방법이 본 명세서에 제공된다.

[0067] 또한 나노입자 및 백신 조성물의 제조 방법이 본 명세서에 제공한다. 유리하게는, 방법은 곤충 세포에서 단백질의 재조합 발현과 관련된 단백질과 같은 다른 단백질에 의한 오염이 실질적으로 없는 나노입자를 제공한다. 실시태양에서, 발현은 바큘로바이러스/Sf9 시스템에서 발생한다.

[0068] *CoV S 폴리펩타이드 항원*

[0069] 본 발명의 백신 조성물은 비-천연 발생 CoV S 폴리펩타이드를 함유한다. CoV S 폴리펩타이드는 SARS-CoV-2, 예를 들어 SARS-CoV-2, MERS CoV 및 SARS CoV를 포함하나 이에 제한되지 않는 코로나바이러스로부터 유래될 수 있다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 SARS-CoV-2의 변이체로부터 유래된다. 실시태양에서, SARS-CoV-2의 변이체는 SARS-CoV-2 VUI 202012/01, B. 1.1.7, 501Y.V2, Cal.20C 또는 P.1이다. 실시태양에서, SARS-CoV-2의 변이체는 SARS-CoV-2 VUI 202012/01, B.1.1.7("501Y.V1" 및 "알파"라고도 함), B.1.351("501Y.V2" 및 "베타"라고도 함), B. 1.617.2("델타"라고도 함), Cal.20C("엡실론"이라고도 함) 또는 P.1("감마"라고도 함)이다. SARS-CoV-2의 변이체는 세계보건기구(WHO) 표지(예를 들어, 알파, 베타, 감마, 델타 등), 명명된 글로벌 발병(PANGO)의 계통의 발생 할당, 이의 GISAID 분기 또는 이의 Nextstrain 분기에 의해 지정된다.

[0070] 아래 표는 변이체 SARS-CoV-2 균주 목록을 제공한다:

[0071]

WHO 표지	Pango 계통*	GISAID 분기	Nextstrain 분기	SEQ ID NO: 1과 비교한 변형	SEQ ID NO: 1과 비교한 선택적 변형
알파	B.1.1.7	GRY	20I (V1)	아미노산 69 및 70의 결실; 아미노산 144의 결실; N501Y; A570D; D614G; P681H 또는 P681R, T716I; S982A; 및 D1118H	아미노산 145의 결실; E484K; L432R; S494P
베타	B.1.351	GH/501Y.V2	20H (V2)	D80A; K417N; E484K; N501Y; D614G; A701V;	D215G; L242H; R246I; 241-243의 1, 2 또는 3개 아미노산의 결실
감마	P.1	GR/501Y.V3	20J (V3)	L18F; T20N; P26S; D138Y; R190S; K417T; E484K; N501Y; D614G; H655Y; T1027I; 및 V1176F	

델타	B.1.617.2	G/478K.V1	21A, 21I, 21J	T19R; E156G; 아미노산 157 및 158의 결실; L452R; T478K; D614G; P681R; D950N	G142D; W64H; H66W; V70F; T95I; Y145H; D213V; L214R; A222V; W258I 또는 W258L; K417N; N439K; E484K 또는 E484Q; N501Y; Q613H
에타	B.1.525			Q52R; A67V; 아미노산 69-70의 결실; 아미노산 144-145의 결실; E484K; D614G; Q677H; F888L	
이오타	B.1.526			L5F, T95I, D253G; E484K; D614G; A701V	
카파	B.1.617.1			L452R; E484Q; D614G; P681R; Q1071H	
람다	C.37			G75V, T76I, R246N, 247-253의 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개 아미노산의 결실; L452Q; F490S; D614G; T859N	
뮤	B.1.621			T95I; Y144S; Y145N; R346K; E484K; N501Y; D614G; P681H; D950N	

[0072]

[0073] 실시태양에서, SARS-CoV-2 바이러스는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드를 갖고, SARS-CoV-2의 변이체는 SEQ ID NO: 1과 비교하여 적어도 약 1개, 적어도 약 2개, 적어도 약 3개, 적어도 약 4개, 적어도 약 5개, 적어도 약 6개, 적어도 약 7개, 적어도 약 8개, 적어도 약 9개, 적어도 약 10개, 적어도 약 11개, 적어도 약 12개, 적어도 약 13개, 적어도 약 14개, 적어도 약 15개, 적어도 약 16개, 적어도 약 17개, 적어도 약 18개, 적어도 약 19개, 적어도 약 20개, 적어도 약 21개, 적어도 약 22개, 적어도 약 23개, 적어도 약 24개, 적어도 약 25개, 적어도 약 26개, 적어도 약 27개, 적어도 약 28개, 적어도 약 29개, 적어도 약 30개, 적어도 약 31개, 적어도 약 32개, 적어도 약 33개, 적어도 약 34개, 적어도 약 35개, 적어도 약 36개, 적어도 약 37개, 적어도 약 38개, 적어도 약 39개, 적어도 약 40개, 적어도 약 41개, 적어도 약 42, 적어도 약 43, 적어도 약 44, 적어도 약 45, 적어도 약 46, 적어도 약 47, 적어도 약 48, 적어도 약 49, 적어도 약 50개, 적어도 약 51개, 적어도 약 52개, 적어도 약 53개, 적어도 약 54개, 적어도 약 55개, 적어도 약 56개, 적어도 약 57개, 적어도 약 58개, 적어도 약 59개, 또는 적어도 약 60개 변형을 갖는 CoV S 폴리펩타이드를 포함한다.

[0074] SARS-CoV S 단백질과 달리, SARS-CoV-2 S 단백질은 S1/S2 절단 부위에 4개의 아미노산이 삽입되어 다염기성 RRAR 퓨린 유사 절단 모티프를 생성한다. SARS-CoV-2 S 단백질은 퓨린 절단 부위에서 단백질분해적으로 S1 및 S2 소단위로 절단되는 비활성 전구체(S0)로 합성되며, 이는 비공유 결합으로 유지되어 융합 전 삼량체를 형성한다. SARS-CoV-2 S 단백질의 S2 도메인은 융합 펩타이드(FP), 2개의 헵타드 반복부(HR1 및 HR2), 막횡단(TM) 도메인 및 세포질 꼬리(CT)를 포함한다. SARS-CoV-2 S 단백질의 S1 도메인은 4개 별개의 도메인: N-말단 도메인(NTD) 및 수용체 결합 도메인(RBD)을 포함하는 C-말단 도메인 및 2개의 서브도메인 SD1 및 SD2로 접힌다. 융합 전 SARS-CoV-2 S 단백질 삼량체는 S-단백질 수용체 결합 및 절단 시 융합 전에서 융합 후 형태로 구조적 재배열을 겪는다.

[0075] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 번역 후 글리코실화로 인한 당단백질이다. 당단백질은 신호 펩타이드, S1 서브유닛, S2 서브유닛, NTD, a, RBD, 2개의 서브도메인(SD1 및 SD2, 도 46a-b에서 SD1/2로 표시되고 여기서 "SD1/2"로 지칭됨), 온전한 또는 변형된 융합 펩타이드, HR1 도메인, HR2 도메인, TM 및 CD 중 적어도 하나 이

상을 포함한다. 실시태양에서, 각 도메인에 대한 아미노산은 도 2 및 도 46a(SEQ ID NO: 1에 따라 표시됨), 도 46b(SEQ ID NO: 2에 따라 표시됨), 및 도 3(SEQ ID NO: 1에 따라 표시됨)에 제공된다. 실시태양에서, 각 도메인은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2에서와 같이 각 도메인데 대한 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 적어도 99.5% 동일성을 가질 수 있다. 각 도메인은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2에 표시된 것과 비교하여 최대 약 1개, 최대 약 2개, 최대 약 3개, 최대 약 4개, 최대 약 5개, 최대 약 10개, 최대 약 20개, 최대 약 30개, 최대 약 35개, 최대 약 40개, 최대 약 45개, 최대 약 50개, 최대 약 55개, 최대 약 60개, 최대 약 65개, 또는 최대 약 70개 아미노산의 결실, 삽입 또는 돌연변이를 가질 수 있다. 각 도메인은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2에 표시된 것과 비교하여 약 1 내지 약 5개 아미노산, 약 3 내지 약 10개 아미노산, 약 5 내지 약 10개 아미노산, 약 8 내지 약 12개 아미노산, 약 10 내지 약 15개 아미노산, 약 12개 내지 약 17개 아미노산, 약 15개 내지 약 20개 아미노산, 약 18개 내지 약 23개 아미노산, 약 20개 내지 약 25개 아미노산, 약 22개 내지 약 27개 아미노산, 또는 약 25개 내지 30개 아미노산, 약 30개 내지 약 35개 아미노산, 약 35개 내지 약 40개 아미노산, 약 40개 내지 약 45개 아미노산, 약 45개 내지 약 50개 아미노산, 약 50개 내지 약 55개 아미노산, 또는 약 55개 내지 약 60개 아미노산의 결실, 삽입 또는 돌연변이를 가질 수 있다. 도 2 및 3은 성숙 펩타이드에 존재하지 않는 13개 아미노산 N-말단 신호 펩타이드를 예시한다. CoV S 폴리펩타이드는 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드에 대한 면역 반응을 자극하는 데 사용될 수 있다.

[0076] 실시태양에서, 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)가 변형되어 비천연 생성 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드가 생성된다(도 1). 실시태양에서, CoV 스파이크(S) 당단백질은 S1 서브유닛 및 S2 서브유닛을 포함하고, 여기서 S1 서브유닛은 NTD, RBD, SD1/2, 및 불활성 퓨린 절단 부위(아미노산 669-672)를 포함하고, 여기서 S2 서브유닛은 아미노산 973 및 974의 돌연변이를 포함하고;

[0077] 여기서 NTD(아미노산 1-318)는

[0078] (a) 아미노산 56, 57, 131, 132, 144, 145, 228, 229, 230, 231, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산의 결실;

[0079] (b) 아미노산 132 뒤에 1, 2, 3 또는 4개의 아미노산의 삽입; 및

[0080] (c) 아미노산 5, 6, 7, 13, 39, 51, 53, 54, 56, 57, 62, 63, 67, 82, 125, 129, 131, 132, 133, 139, 143, 144, 145, 177, 200, 201, 202, 209, 229, 233, 240, 245 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산의 돌연변이;

[0081] 로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 변형을 선택적으로 포함하고;

[0082] 여기서 RBD는 아미노산 333, 404, 419, 426, 439, 440, 464, 465, 471, 477, 481, 488 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산의 돌연변이를 선택적으로 포함하고;

[0083] 여기서 SD1/2는 557, 600, 601, 642, 664, 668 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산의 돌연변이를 선택적으로 포함하고; 및

[0084] 여기서 S2 서브유닛은

[0085] (a) 676-685, 676-702, 702-711, 775-793, 806-815 및 이들의 조합으로부터의 하나 이상의 아미노산의 결실;

[0086] (b) 688, 703, 846, 875, 937, 969, 973, 974, 1014, 1058, 1105, 및 1163 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산의 돌연변이; 및

[0087] (c) 막횡단 및 세포질 도메인(TMCT)으로부터 하나 이상의 아미노산의 결실(아미노산 1201-1260)

[0088] 로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 변형을 선택적으로 포함하고,

[0089] 여기서 CoV S 당단백질의 아미노산은 SEQ ID NO: 2에 대해 번호가 매겨진다.

[0090] 도 3은 비활성 퓨린 절단 부위, 결실된 융합 펩타이드(예를 들어, 아미노산 819-828의 결실), K986P 및 V987 돌연변이를 갖는 BV2378로 불리는 CoV S 폴리펩타이드를 나타내며, 여기서 아미노산은 SEQ ID NO: 1에 대해 번호가 매겨진다. 성숙한 BV2378 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 1-13인 신호 펩타이드의 하나 이상의 아미노산이 결여되어 있다.

[0091] 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩타이드는 융합 전 형태로 존재한다. 실시태양에서, 본 명세서에

기술된 CoV S 폴리펩타이드는 유연한 HR2 도메인을 포함한다. 달리 언급하지 않는 한 도메인의 유연성은 전이 전자 현미경(TEM) 및 2D 클래스 에버리징(class averaging)에 의해 결정된다. 전자 밀도의 감소는 유연한 영역에 해당한다.

[0092] *CoV S 폴리펩타이드 항원 - S1 서브유닛에 대한 변형*

[0093] S1 서브유닛의 아미노산 서열(SEQ ID NO: 121)은 아래에 도시된다.

[0094] QCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQ
SLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLP
QGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFR
VQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADY
NYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPAT
VCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIH
ADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRAR

[0095] SEQ ID NO: 121의 밑줄 친 영역은 변형될 수 있는 S1 서브유닛 내의 아미노산을 나타낸다.

[0096] 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 S1 서브유닛에 대해 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5%의 동일성을 갖는 S1 서브유닛을 포함한다. S1 서브유닛은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 S1 서브유닛의 아미노산 서열과 비교하여 최대 약 1, 최대 약 2, 최대 약 3, 최대 약 4, 최대 약 5, 최대 약 10, 최대 약 15, 최대 약 20, 최대 약 25, 또는 최대 약 30개의 아미노산의 결실, 삽입 또는 돌연변이를 가질 수 있다. S1 서브유닛은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 S1 서브유닛과 비교하여 약 1개 내지 약 5개 아미노산, 약 3개 내지 약 10개 아미노산, 약 5개 내지 10개 아미노산, 약 8개 내지 12개 아미노산, 약 10개 내지 15개 아미노산, 약 12개 내지 17개 아미노산, 약 15개 내지 20개 아미노산, 약 18개 내지 23개 아미노산, 약 20개 내지 25개 아미노산, 약 22개 내지 약 27개 아미노산, 또는 약 25개 내지 30개 아미노산의 결실, 삽입 또는 돌연변이를 가질 수 있다.

[0097] 실시태양에서, S1 서브유닛은 표 1A에 도시된 변형의 임의의 조합을 함유할 수 있다.

[0098] [표 1A]

S1에 대한 변형(SEQ ID NO: 121) * SEQ ID NO: 1의 아미노산 14-685 및 SEQ ID NO: 2의 아미노산 1-672			
SEQ ID NO: 1 내의 위치	SEQ ID NO: 2 내의 위치	SEQ ID NO: 121 내의 위치	잠재적 변형
14-305	1-292	1-292	· 최대 약 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 또는 292 아미노산의 결실
18	5	5	· 페닐알라닌에 대한 돌연변이 · 티로신에 대한 돌연변이 · 트립토판에 대한 돌연변이
19	6	6	· 아르기닌에 대한 돌연변이 · 리신에 대한 돌연변이 · 히스티딘에 대한 돌연변이
20	7	7	· 아스파라긴에 대한 돌연변이 · 글루타민에 대한 돌연변이 · 아이소루신에 대한 돌연변이 · 발린에 대한 돌연변이
26	13	13	· 세린에 대한 돌연변이 · 트레오닌에 대한 돌연변이
52	39	39	· 아르기닌에 대한 돌연변이 · 리신에 대한 돌연변이 · 히스티딘에 대한 돌연변이

[0099]

64	51	51	· 히스티딘에 대한 돌연변이 · 리신에 대한 돌연변이 · 아르기닌에 대한 돌연변이
66	53	53	· 트립토판에 대한 돌연변이 · 티로신에 대한 돌연변이 · 페닐알라닌에 대한 돌연변이
67	54	54	· 발린에 대한 돌연변이 · 아이소루신에 대한 돌연변이 · 루신에 대한 돌연변이
69	56	56	· 아미노산의 결실
70	57	57	· 아미노산의 결실 · 페닐알라닌에 대한 돌연변이 · 티로신에 대한 돌연변이 · 트립토판에 대한 돌연변이
75	62	62	· 발린에 대한 돌연변이 · 루신에 대한 돌연변이 · 아이소루신에 대한 돌연변이
76	63	63	· 아이소루신에 대한 돌연변이 · 발린에 대한 돌연변이 · 루신에 대한 돌연변이
80	67	67	· 알라닌에 대한 돌연변이 · 글리신에 대한 돌연변이
95	82	82	· 베타 가지형 아미노산에 대한 돌연변이 · 아이소루신에 대한 돌연변이 · 발린에 대한 돌연변이
138	125	125	· 티로신에 대한 돌연변이 · 페닐알라닌에 대한 돌연변이 · 트립토판에 대한 돌연변이
142	129	129	· 아스파르트산에 대한 돌연변이 · 글루탐산에 대한 돌연변이
144	131	131	· 아미노산의 결실 · 세린에 대한 돌연변이
145	132	132	· 아미노산의 결실 · 히스티딘에 대한 돌연변이 · 아스파라긴에 대한 돌연변이 · 글루타민에 대한 돌연변이 · 아미노산 132 뒤에 1, 2, 3, 또는 4개 아미노산의 삽입(예를 들어, 아스파라긴)
146	133	133	· 방향족 아미노산에 대한 돌연변이 · 티로신에 대한 돌연변이 · 페닐알라닌에 대한 돌연변이 · 트립토판에 대한 돌연변이
152	139	139	· 시스테인에 대한 돌연변이 · 메티오닌에 대한 돌연변이 · 세린에 대한 돌연변이 · 트레오닌에 대한 돌연변이
156	143	143	· 글리신에 대한 돌연변이 · 알라닌에 대한 돌연변이
157	144	144	· 아미노산의 결실
158	145	145	· 아미노산의 결실
190	177	177	· 세린에 대한 돌연변이 · 트레오닌에 대한 돌연변이 · 시스테인에 대한 돌연변이

[0100]

[0101]

213	200	200	· 발린에 대한 돌연변이 · 루신에 대한 돌연변이 · 아이소루신에 대한 돌연변이 · 베타 가지형 아미노산에 대한 돌연변이
214	201	201	· 아르기닌에 대한 돌연변이 · 리신에 대한 돌연변이 · 히스티딘에 대한 돌연변이
215	202	202	· 글리신에 대한 돌연변이 · 알라닌에 대한 돌연변이
222	209	209	· 발린에 대한 돌연변이 · 루신에 대한 돌연변이 · 아이소루신에 대한 돌연변이
241-244	228-231	228-231	· 1, 2, 3, 또는 4개 아미노산의 결실
242	229	229	· 히스티딘에 대한 돌연변이 · 리신에 대한 돌연변이 · 아르기닌에 대한 돌연변이
246	233	233	· 베타 가지형 아미노산에 대한 돌연변이 · 아이소루신에 대한 돌연변이 · 발린에 대한 돌연변이 · 트레오닌에 대한 돌연변이 · 아스파라긴에 대한 돌연변이
247	234	234	· 아미노산의 결실
248	235	235	· 아미노산의 결실
249	236	236	· 아미노산의 결실
250	237	237	· 아미노산의 결실
251	238	238	· 아미노산의 결실
252	239	239	· 아미노산의 결실
253	240	240	· 글리신에 대한 돌연변이 · 아미노산의 결실
258	245	245	· 아이소루신에 대한 돌연변이 · 발린에 대한 돌연변이 · 루신에 대한 돌연변이 · 베타 가지형 아미노산에 대한 돌연변이
346	333	333	· 리신에 대한 돌연변이 · 아르기닌에 대한 돌연변이 · 히스티딘에 대한 돌연변이
417	404	404	· 아스파라긴에 대한 돌연변이 · 트레오닌에 대한 돌연변이 · 아이소루신에 대한 돌연변이 · 발린에 대한 돌연변이 · 세린에 대한 돌연변이 · 글루타민에 대한 돌연변이 · 베타 가지형 아미노산에 대한 돌연변이
432	419	419	· 리신에 대한 돌연변이 · 아르기닌에 대한 돌연변이 · 히스티딘에 대한 돌연변이
439	426	426	· 리신에 대한 돌연변이 · 아르기닌에 대한 돌연변이 · 히스티딘에 대한 돌연변이

452	439	439	· 아르기닌에 대한 돌연변이 · 리신에 대한 돌연변이 · 히스티딘에 대한 돌연변이 · 글루타민에 대한 돌연변이 · 아스파라긴에 대한 돌연변이
453	440	440	· 페닐알라닌에 대한 돌연변이 · 트립토판에 대한 돌연변이
477	464	464	· 아스파라긴에 대한 돌연변이 · 글루타민에 대한 돌연변이
478	465	465	· 리신에 대한 돌연변이 · 아르기닌에 대한 돌연변이 · 히스티딘에 대한 돌연변이
484	471	471	· 리신에 대한 돌연변이 · 아르기닌에 대한 돌연변이 · 히스티딘에 대한 돌연변이 · 글루타민에 대한 돌연변이 · 아스파라긴에 대한 돌연변이
490	477	477	· 세린에 대한 돌연변이 · 트레오닌에 대한 돌연변이
494	481	481	· 프롤린에 대한 돌연변이
501	488	488	· 티로신에 대한 돌연변이 · 페닐알라닌에 대한 돌연변이 · 트립토판에 대한 돌연변이
570	557	557	· 아스파르트산에 대한 돌연변이 · 글루탐산에 대한 돌연변이
613	600	600	· 히스티딘에 대한 돌연변이 · 리신에 대한 돌연변이 · 아르기닌에 대한 돌연변이
614	601	601	· 글리신에 대한 돌연변이 · 알라닌에 대한 돌연변이
655	642	642	· 티로신에 대한 돌연변이 · 페닐알라닌에 대한 돌연변이 · 트립토판에 대한 돌연변이
677	664	664	· 히스티딘에 대한 돌연변이
681	668	668	· 히스티딘에 대한 돌연변이 · 리신에 대한 돌연변이 · 아르기닌에 대한 돌연변이
682-685	669-672	669-672	· 불활성 퓨린 절단 부위(표 1E 참조)

[0102]

[0103] *CoV S 폴리펩타이드 항원 - S1 서브유닛에 대한 변형 - NTD*

[0104] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 NTD에 대한 하나 이상의 변형을 함유한다. 실시태양에서, NTD는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 14-305 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 1-292에 상응하는 SEQ ID NO: 118의 아미노산 서열을 갖는다.

[0105] NTD의 아미노산 서열(SEQ ID NO: 118)은 아래에 도시된다.

[0106] QCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKS

[0107] 실시태양에서, NTD는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 14 내지 331 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 1 내지 318에 상응하는 SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 갖는다. NTD의 아미노산 서열(SEQ ID NO: 45)은 아래에 도시된다.

[0108] QCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPN

[0109] 실시태양에서, NTD 및 RBD는 최대 약 1개 아미노산, 최대 약 5개 아미노산, 최대 약 10개 아미노산, 또는 최대 약 20개 아미노산까지 겹친다.

[0110] 실시태양에서, 본 명세서에 제공된 NTD는 C-말단에서 최대 5개, 최대 10개, 최대 15개, 최대 20개, 최대 25개, 또는 최대 30개 아미노산까지 연장될 수 있다.

[0111] 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 NTD에 대해 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 적어도 99.5% 동일성을 갖는 NTD를 포함한다. NTD는 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 NTD의 아미노산 서열과 비교하여 최대 약 1개, 최대 약 2개, 최대 약 3개, 최대 약 4개, 최대 약 5개, 최대 약 10개, 최대 약 15개, 최대 약 20개, 최대 약 25개, 또는 최대 약 30개 아미노산의 결실, 삽입 또는 돌연변이를 가질 수 있다. NTD는 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 NTD와 비교하여 약 1 내지 약 5개 아미노산, 약 3 내지 약 10개 아미노산, 약 5 내지 10개 아미노산, 약 8 내지 12개 아미노산, 약 10 내지 15개 아미노산, 약 12개 내지 17개 아미노산, 약 15개 내지 20개 아미노산, 약 18개 내지 23개 아미노산, 약 20개 내지 25개 아미노산, 약 22개 내지 약 27개 아미노산, 또는 약 25개 내지 30개 아미노산의 결실, 삽입 또는 돌연변이를 가질 수 있다.

[0112] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 N-말단 도메인(NTD)(SEQ ID NO: 2의 아미노산 1-292에 상응)으로부터 하나 이상의 아미노산의 결실을 함유한다. 일부 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 NTD의 최대 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 1220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 또는 292개의 아미노산의 결실을 함유한다.

[0113] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 NTD로부터의 하나 이상의 아미노산(SEQ ID NO: 2의 아미노산 1-318에 상응)의 결실을 함유한다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 NTD의 아미노산 1-318의 결실을 함유한다. 실시태양에서, NTD의 결실은 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드의 단백질 발현을 향상시킨다. 실시태양에서 NTD 결실을 갖는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NOS: 46, 48, 49, 51, 52, 및 54로 표시되는 아미노산 서열을 갖는다. 실시태양에서, NTD 결실을 갖는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 50, 및 SEQ ID NO: 53으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 분리된 핵산 서열에 의해 암호화된다.

[0114] 실시태양에서, NTD는 표 1B에 도시된 변형의 임의의 조합을 함유할 수 있다. 변형은 참조를 위한 성숙한 S 폴리펩타이드 서열인 SEQ ID NO:2와 관련하여 제시된다.

[0115] [표 1B]

NTD에 대한 돌연변이 (SEQ ID NO: 118) * SEQ ID NO: 1의 아미노산 14-135 및 SEQ ID NO: 2의 아미노산 1-292			
SEQ ID NO: 1 내의 위치	SEQ ID NO: 2 잔기	SEQ ID NO: 121 또는 SEQ ID NO: 45 잔기	변형
18	5	5	· 페닐알라닌에 대한 돌연변이 · 티로신에 대한 돌연변이 · 트립토판에 대한 돌연변이
19	6	6	· 아르기닌에 대한 돌연변이 · 리신에 대한 돌연변이 · 히스티딘에 대한 돌연변이
20	7	7	· 아스파라긴에 대한 돌연변이 · 글루타민에 대한 돌연변이 · 아이소루신에 대한 돌연변이 · 발린에 대한 돌연변이
26	13	13	· 세린에 대한 돌연변이 · 트레오닌에 대한 돌연변이
64	51	51	· 히스티딘에 대한 돌연변이 · 리신에 대한 돌연변이 · 아르기닌에 대한 돌연변이
66	53	53	· 트립토판에 대한 돌연변이 · 티로신에 대한 돌연변이 · 페닐알라닌에 대한 돌연변이
69	56	56	· 아미노산의 결실
70	57	57	· 아미노산의 결실 · 페닐알라닌에 대한 돌연변이 · 티로신에 대한 돌연변이 · 트립토판에 대한 돌연변이
75	62	62	· 발린에 대한 돌연변이 · 루신에 대한 돌연변이 · 아이소루신에 대한 돌연변이
76	63	63	· 아이소루신에 대한 돌연변이 · 발린에 대한 돌연변이 · 루신에 대한 돌연변이
80	67	67	· 알라닌에 대한 돌연변이 · 글리신에 대한 돌연변이

[0116]

248	235	235	· 아미노산의 결실
249	236	236	· 아미노산의 결실
250	237	237	· 아미노산의 결실
251	238	238	· 아미노산의 결실
252	239	239	· 아미노산의 결실
253	240	240	· 글리신에 대한 돌연변이 · 아미노산의 결실
258	245	245	· 아이소루신에 대한 돌연변이 · 발린에 대한 돌연변이 · 루신에 대한 돌연변이 · 베타 가지형 아미노산에 대한 돌연변이

[0117]

[0118] *CoV S 폴리펩타이드 항원 - S1 서브유닛에 대한 변형 - RBD*

[0119] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 RBD에 대한 하나 이상의 변형을 함유한다. 실시태양에서, RBD는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 331-527 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 318-514에 상응하는 SEQ ID NO: 126의 아미노산 서열을 갖는다.

[0120] RBD의 아미노산 서열(SEQ ID NO: 126)은 아래에 도시된다:

[0121] NITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGC
VIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGP

[0122] 실시태양에서, RBD는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 335-530 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 322-517에 상응하는 SEQ ID NO: 116의 아미노산 서열을 갖는다. RBD의 아미노산 서열(SEQ ID NO: 116)은 아래에 도시된다.

[0123] LCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAW
NSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKS

[0124] 실시태양에서, 본 명세서에 제공된 바와 같은 RBD는 N-말단 또는 C-말단에서 최대 1개 아미노산, 최대 5개 아미노산, 최대 10개 아미노산, 최대 15개 아미노산, 최대 15개 아미노산, 20개 아미노산, 최대 25개 아미노산 또는 최대 30개 아미노산까지 연장될 수 있다.

[0125] 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 RBD에 대해 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 적어도 99.5% 동일성을 갖는 RBD를 포함한다. RBD는 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 RBD의 아미노산 서열과 비교하여 최대 약 1개, 최대 약 2개, 최대 약 3개, 최대 약 4개, 최대 약 5개, 최대 약 10개, 최대 약 15개, 최대 약 20개, 최대 약 25개, 또는 최대 약 30개 아미노산의 결실, 삽입 또는 돌연변이를 가질 수 있다. RBD는 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 RBD와 비교하여 약 1 내지 약 5개 아미노산, 약 3 내지 약 10개 아미노산, 약 5 내지 10개 아미노산, 약 8 내지 12개 아미노산, 약 10 내지 15개 아미노산, 약 12개 내지 17개 아미노산, 약 15개 내지 20개 아미노산, 약 18개 내지 23개 아미노산, 약 20개 내지 25개 아미노산, 약 22개 내지 약 27개 아미노산, 또는 약 25개 내지 30개 아미노산의 결실, 삽입 또는 돌연변이를 가질 수 있다.

[0126] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 RBD에 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 돌연변이를 갖는다. 실시태양에서, RBD는 표 1C에 나타낸 바와 같은 변형의 임의의 조합을 함유할 수 있다.

[0127] [표 1C]

RBD에 대한 돌연변이 (SEQ ID NO: 126) * SEQ ID NO: 1의 아미노산 331-527 및 SEQ ID NO: 2의 아미노산 318-514			
SEQ ID NO: 1 내의 위치	SEQ ID NO: 2 내의 위치	SEQ ID NO: 126 내의 위치	잠재적 변형
346	333	16	· 리신에 대한 돌연변이 · 아르기닌에 대한 돌연변이 · 히스티딘에 대한 돌연변이
417	404	87	· 아스파라긴에 대한 돌연변이 · 트레오닌에 대한 돌연변이 · 아이소루신에 대한 돌연변이 · 발린에 대한 돌연변이 · 세린에 대한 돌연변이 · 글루타민에 대한 돌연변이 · 베타 가지형 아미노산에 대한 돌연변이
432	419	102	· 리신에 대한 돌연변이 · 아르기닌에 대한 돌연변이 · 히스티딘에 대한 돌연변이
439	426	109	· 리신에 대한 돌연변이 · 아르기닌에 대한 돌연변이 · 히스티딘에 대한 돌연변이
452	439	122	· 아르기닌에 대한 돌연변이 · 리신에 대한 돌연변이 · 히스티딘에 대한 돌연변이 · 글루타민에 대한 돌연변이 · 아스파라긴에 대한 돌연변이
453	440	123	· 페닐알라닌에 대한 돌연변이 · 트립토판에 대한 돌연변이
477	464	147	· 아스파라긴에 대한 돌연변이 · 글루타민에 대한 돌연변이
478	465	148	· 리신에 대한 돌연변이 · 아르기닌에 대한 돌연변이 · 히스티딘에 대한 돌연변이
484	471	154	· 리신에 대한 돌연변이 · 아르기닌에 대한 돌연변이 · 히스티딘에 대한 돌연변이 · 글루타민에 대한 돌연변이 · 아스파라긴에 대한 돌연변이
490	477	160	· 세린에 대한 돌연변이 · 트레오닌에 대한 돌연변이
494	481	164	· 프롤린에 대한 돌연변이
501	488	171	· 티로신에 대한 돌연변이 · 페닐알라닌에 대한 돌연변이 · 트립토판에 대한 돌연변이

[0128]

[0129] *CoV S 폴리펩타이드 항원 - SD1/2에 대한 변형*

[0130] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 542-681 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 529-668에 상응하는 SEQ ID NO: 122의 아미노산 서열을 갖는 SD1/2 도메인에 대한 하나 이상의 변형을 함유한다.

[0131] SD1/2(SEQ ID NO: 122) 도메인의 의 아미노산 서열은 아래에 도시된다.

[0132] NFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVF QTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSP

[0133] 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 SD1/2에 대해 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 적어도 99.5% 동일성을 갖는 SD1/2 도메인을 포함한다. SD1/2 도메인은 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 SD1/2의 아미노산 서열과 비교하여 최대 약 1개, 최대 약 2개, 최대 약 3개, 최대 약 4개, 최대 약 5개, 최대 약 10개, 최대 약 15개, 최대 약 20개, 최대 약 25개, 또는 최대 약 30개 아미노산의 결실, 삽입 또는 돌연변이를 가질 수 있다. SD1/2 도메인은 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 SD1/2 도메인과 비교하여 약 1 내지 약 5개 아미노산, 약 3 내지 약 10개 아미노산, 약 5 내지 10개 아미노산, 약 8 내지 12개 아미노산, 약 10 내지 15개 아미노산, 약 12개 내지 17개 아미노산, 약 15개 내지 20개 아미노산, 약 18개 내지 23개 아미노산, 약 20개 내지 25개 아미노산, 약 22개 내지 약 27개 아미노산,

또는 약 25개 내지 30개 아미노산의 결실, 삽입 또는 돌연변이를 가질 수 있다.

[0134] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 SD1/2 도메인에 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개의 돌연변이를 갖는다. 실시태양에서, SD1/2 도메인은 표 1D에 나타낸 바와 같은 변형의 임의의 조합을 함유할 수 있다.

[0135] [표 1D]

SD1/2에 대한 변형 (SEQ ID NO: 122)

* SEQ ID NO: 1의 아미노산 542-681 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 529-668

SEQ ID NO: 1내의 위치	SEQ ID NO: 2 내의 위치	SEQ ID NO: 122 내의 위치	잠재적 변형
570	557	29	→ 아스파르트산에 대한 돌연변이 → 글루탐산에 대한 돌연변이
613	600	600	→ 히스티딘에 대한 돌연변이 → 리신에 대한 돌연변이 → 아르기닌에 대한 돌연변이
614	601	73	→ 글리신에 대한 돌연변이 → 알라닌에 대한 돌연변이
655	642	114	→ 티로신에 대한 돌연변이 → 페닐알라닌에 대한 돌연변이 → 트립토판에 대한 돌연변이
677	664	664	→ 히스티딘에 대한 돌연변이
681	668	140	→ 히스티딘에 대한 돌연변이 → 리신에 대한 돌연변이 → 아르기닌에 대한 돌연변이

[0136]

[0137] *CoV S 폴리펩타이드 항원 - 퓨린 절단 부위에 대한 변형*

[0138] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 하나 이상의 돌연변이에 의해 불활성화되는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 682-685 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 669-672에 해당하는 퓨린 부위(RRAR)를 함유한다. 퓨린 절단 부위의 불활성화는 퓨린이 CoV S 폴리펩타이드를 절단하는 것을 방지한다. 실시태양에서, 불활성화된 퓨린 절단 부위를 포함하는 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩타이드는 단일 사슬로 발현된다.

[0139] 실시태양에서, 천연 퓨린 절단 부위를 포함하는 하나 이상의 아미노산은 임의의 천연 아미노산으로 돌연변이된다. 실시태양에서, 아미노산은 L-아미노산이다. 아미노산의 비제한적인 예는 알라닌, 아르기닌, 글리신, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 세린, 트레오닌, 히스티딘, 라이신, 메티오닌, 프롤린, 발린, 아이소류신, 류신, 티로신, 트립토판, 및 페닐알라닌을 포함한다.

[0140] 실시태양에서, 천연 퓨린 절단 부위를 포함하는 하나 이상의 아미노산이 글루타민으로 돌연변이된다. 실시태양에서, 1, 2, 3 또는 4개의 아미노산이 글루타민으로 돌연변이될 수 있다. 실시태양에서, 천연 퓨린 절단 부위를 포함하는 아르기닌 중 1개는 글루타민으로 돌연변이된다. 실시태양에서, 천연 퓨린 절단 부위를 포함하는 아르기닌 중 2개는 글루타민으로 돌연변이된다. 실시태양에서, 천연 퓨린 절단 부위를 포함하는 아르기닌 중 3개는 글루타민으로 돌연변이된다.

[0141] 실시태양에서, 천연 퓨린 절단 부위를 포함하는 하나 이상의 아미노산이 알라닌으로 돌연변이된다. 실시태양에서, 1, 2, 3, 또는 4개의 아미노산이 알라닌으로 돌연변이될 수 있다. 실시태양에서, 천연 퓨린 절단 부위를 포함하는 아르기닌 중 1개는 알라닌으로 돌연변이된다. 실시태양에서, 천연 퓨린 절단 부위를 포함하는 아르기닌 중 2개는 알라닌으로 돌연변이된다. 실시태양에서, 천연 퓨린 절단 부위를 포함하는 아르기닌 중 3개는 알라닌으로 돌연변이된다.

[0142] 실시태양에서, 천연 퓨린 절단 부위에서 하나 이상의 아미노산이 글리신으로 돌연변이된다. 실시태양에서, 1, 2, 3 또는 4개의 아미노산이 글리신으로 돌연변이될 수 있다. 실시태양에서, 천연 퓨린 절단 부위의 아르기닌 중 1개는 글리신으로 돌연변이된다. 실시태양에서, 천연 퓨린 절단 부위에서 아르기닌 중 2개는 글리신으로 돌연변이된다. 실시태양에서, 천연 퓨린 절단 부위를 포함하는 아르기닌 중 3개는 글리신으로 돌연변이된다.

[0143] 실시태양에서, 천연 퓨린 절단 부위에서 하나 이상의 아미노산이 아스파라긴으로 돌연변이된다. 예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개의 아미노산이 아스파라긴으로 돌연변이될 수 있다. 실시태양에서, 천연 퓨린 절단 부위에서 아르기닌 중 1개는 아스파라긴으로 돌연변이된다. 실시태양에서, 천연 퓨린 절단 부위에서 아르기닌 중 2개는 아스

파라긴으로 돌연변이된다. 실시태양에서, 천연 퓨린 절단 부위에서 아르기닌 중 3개는 아스파라긴으로 돌연변이된다.

[0144] CoV S 폴리펩타이드 내에 함유된 불활성화된 퓨린 부위의 아미노산 서열의 비제한적인 예는 표 1E에서 찾을 수 있다.

[0145] [표 1E]

푸린 절단 부위의 아미노산 서열	활성 또는 불활성 푸린 절단 부위
RRAR (SEQ ID NO: 6)	활성
QQAQ (SEQ ID NO: 7)	불활성
QRAR (SEQ ID NO: 8)	불활성
RQAR (SEQ ID NO: 9)	불활성
RRAQ (SEQ ID NO: 10)	불활성
QQAR (SEQ ID NO: 11)	불활성
RQAQ (SEQ ID NO: 12)	불활성
QRAQ (SEQ ID NO: 13)	불활성
NNAN (SEQ ID NO: 14)	불활성
NRAR (SEQ ID NO: 15)	불활성
RNAR (SEQ ID NO: 16)	불활성
RRAN (SEQ ID NO: 17)	불활성
NNAR (SEQ ID NO: 18)	불활성
RNAN (SEQ ID NO: 19)	불활성
NRAN (SEQ ID NO: 20)	불활성
AAAA (SEQ ID NO: 21)	불활성
ARAR (SEQ ID NO: 22)	불활성
RAAR (SEQ ID NO: 23)	불활성
RRAA (SEQ ID NO: 24)	불활성
AAAR (SEQ ID NO: 25)	불활성
RAAA (SEQ ID NO: 26)	불활성
ARAA (SEQ ID NO: 27)	불활성
GGAG (SEQ ID NO: 28)	불활성
GRAR (SEQ ID NO: 29)	불활성
RGAR (SEQ ID NO: 30)	불활성
RRAG (SEQ ID NO: 31)	불활성
GGAR (SEQ ID NO: 32)	불활성
RGAG (SEQ ID NO: 33)	불활성
GRAG (SEQ ID NO: 34)	불활성
GSAS (SEQ ID NO: 97)	불활성
GSGA (SEQ ID NO: 111)	불활성

[0146]

[0147] 실시태양에서, 활성 퓨린 절단 부위(SEQ ID NO: 6) 대신에, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩타이드는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유한다. 실시태양에서, 불활성화된 퓨린 절단 부위의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 7-34 또는 SEQ ID NO: 97 중 어느 하나로 표시된다. 실시태양에서, 불활성화된 퓨린 절단 부위의 아미노산 서열은 QQAQ(SEQ ID NO: 7). 실시태양에서, 불활성화된 퓨린 절단 부위의 아미노산 서열은 GSAS(SEQ ID NO: 97)이다. 실시태양에서, 불활성화된 퓨린 절단 부위의 아미노산 서열은 GSGA(SEQ ID NO: 111)이다. 실시태양에서, 불활성화된 퓨린 절단 부위의 아미노산 서열은 GG, GGG(SEQ ID NO: 127), GGGG(SEQ ID NO: 128), 또는 GGGGG(SEQ ID NO: 129)이다.

[0148] *CoV S 폴리펩타이드 항원 - S2 서브유닛에 대한 변형*

[0149] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 686-1273 또는 SEQ ID NO:2의 아미노산 673-1260에 상응하는 SEQ ID NO: 120의 아미노산 서열을 갖는 S2 서브유닛에 대한 하나 이상의 변형을 함유한다.

[0150] S2 서브유닛의 아미노산 서열(SEQ ID NO: 120)은 아래에 도시된다.

[0151] SVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT

[0152] 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 S1 서브유닛에 대해 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5%의 동일성을 갖는 S2 서브유닛을 포함한다. S2 서브유닛은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 S2 서브유닛의 아미노산 서열과 비교하여 최대 약 1, 최대 약 2, 최대 약 3, 최대 약 4, 최대 약 5, 최대 약 10, 최대 약 15, 최대 약 20, 최대 약 25, 또는 최대 약 30개의 아미노산의 결실, 삽입 또는 돌연변이를 가질 수 있다. S2 서브유닛은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 S2 서브유닛과 비교하여 약 1개 내지 약 5개 아미노산, 약 3개 내지 약 10개 아미노산, 약 5개 내지 10개 아미노산, 약 8개 내지 12개 아미노산, 약 10개 내지 15개 아미노산, 약 12개 내지 17개 아미노산, 약 15개 내지 20개 아미노산, 약 18개 내지 23개 아미노산, 약 20개 내지 25개 아미노산, 약 22개 내지 약 27개 아미노산, 또는 약 25개 내지 30개 아미노산의 결실, 삽입 또는 돌연변이를 가질 수 있다.

[0153] 실시태양에서, S2 서브유닛은 표 1F에 도시된 변형의 임의의 조합을 함유할 수 있다.

[0154] [표 1F]

S2에 대한 변형 (SEQ ID NO: 120)

* SEQ ID NO: 1의 아미노산 686-1273 및 SEQ ID NO: 2의 아미노산 673-1260

SEQ ID NO: 1 내의 위치	SEQ ID NO: 2 내의 위치	SEQ ID NO: 120 내의 위치	가능한 변형
689-698	676-685	4-13	· → 최대 약 1, 최대 약 2, 최대 약 3, 최대 약 4, 최대 약 5, 최대 약 6, 최대 약 7, 최대 약 8, 최대 약 9 또는 최대 약 10개 아미노산의 결실
701	688	16	· → 베타 가지형 아미노산에 대한 돌연변이 · → 발린에 대한 돌연변이 · → 아이소루신에 대한 돌연변이 · → 트레오닌에 대한 돌연변이
715-724	702-711	30-39	· → 최대 약 1, 최대 약 2, 최대 약 3, 최대 약 4, 최대 약 5, 최대 약 6, 최대 약 7, 최대 약 8, 최대 약 9 또는 최대 약 10개 아미노산의 결실
716	703	31	· → 베타 가지형 아미노산에 대한 돌연변이 · → 발린에 대한 돌연변이 · → 아이소루신에 대한 돌연변이
788-806	775-793	103-121	· → 최대 약 1, 최대 약 2, 최대 약 3, 최대 약 4, 최대 약 5, 최대 약 6, 최대 약 7, 최대 약 8, 최대 약 9, 최대 약 10, 최대 약 11, 최대 약 12, 최대 약 13, 최대 약 14, 최대 약 15, 최대 약 16, 최대 약 17, 최대 약 18 또는 최대 약 19개 아미노산의 결실

[0155]

819-828	806-815	134-143	→ 최대 약 1, 최대 약 2, 최대 약 3, 최대 약 4, 최대 약 5, 최대 약 6, 최대 약 7, 최대 약 8, 최대 약 9 또는 최대 약 10개 아미노산의 결실
859	846	174	→ 아스파라긴에 대한 돌연변이 → 글루타민에 대한 돌연변이
888	875	203	→ 루신에 대한 돌연변이 → 아이소루신에 대한 돌연변이 → 발린에 대한 돌연변이
950	937	265	→ 아스파라긴에 대한 돌연변이 → 글루타민에 대한 돌연변이
982	969	297	→ 알라닌에 대한 돌연변이 → 글리신에 대한 돌연변이 → 트레오닌에 대한 돌연변이
986	973	301	→ 프롤린에 대한 돌연변이 → 글리신에 대한 돌연변이
987	974	302	→ 프롤린에 대한 돌연변이 → 글리신에 대한 돌연변이
1027	1014	342	→ 아이소루신에 대한 돌연변이 → 발린에 대한 돌연변이 → 세린에 대한 돌연변이
1071	1058	386	→ 히스티딘에 대한 돌연변이 → 아르기닌에 대한 돌연변이 → 리신에 대한 돌연변이
1118	1105	433	→ 히스티딘에 대한 돌연변이 → 리신에 대한 돌연변이 → 아르기닌에 대한 돌연변이 → 아스파라긴에 대한 돌연변이 → 글루타민에 대한 돌연변이
1176	1163	491	→ 페닐알라닌에 대한 돌연변이 → 티로신에 대한 돌연변이 → 트립토판에 대한 돌연변이
1214-1237	1201-1224	1-24	→ TM의 하나 이상의 아미노산의 결실
1238-1273	1225-1260	1-36	→ CD의 하나 이상의 아미노산의 결실

[0156]

[0157] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)의 아미노산 676-685 내의 하나 이상의 결실에 상응하는 결실을 함유한다. 실시태양에서, 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)의 아미노산 676-685의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 아미노산이 결실된다. 실시태양에서, 아미노산 676-685 내의 아미노산의 결실은 연속적이며, 예를 들어, 아미노산 676 및 677이 결실되거나 아미노산 680 및 681이 결실된다. 실시태양에서, 아미노산 676-685 내의 아미노산의 결실은 비연속적이며, 예를 들어, 아미노산 676 및 680이 결실되거나 아미노산 677 및 682가 결실된다. 실시태양에서, 아미노산 676-685 내의 하나 이상의 결실에 상응하는 결실을 함유하는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 62 및 SEQ ID NO: 63으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는다.

[0158] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)의 아미노산 702-711 내의 하나 이상의 결실에 상응하는 결실을 함유한다. 실시태양에서, 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)의 아미노산 702-711의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 아미노산이 결실된다. 실시태양에서, 아미노산 702-711 내의 아미노산의 하나 이상의 결실은 연속적이며, 예를 들어, 아미노산 702 및 703이 결실되거나 아미노산 708 및 709가 결실된다. 실시태양에서, 아미노산 702-711 내의 아미노산의 결실은 비연속적이며, 예를 들어, 아미노산 702 및 704가 결실되거나 아미노산 707 및 710이 결실된다. 실시태양에서, 아미노산 702-711 내의 하나 이상의 결실에 상응하는 결실을 함유하는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 64 및 SEQ ID NO: 65로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는다.

[0159] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 천연 CoV S 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)의 아미노산 775-793 내의 하나 이상의 결실에 상응하는 결실을 함유한다. 실시태양에서, 천연 SARS-CoV-2 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)의 아미노산 775-793의 최대 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 또는 19개의 아미노산이 결실된다. 실시태양에서, 아미노산 775-793 내의 아미노산의 하나 이상의 결실은 연속적이며, 예를 들어, 아미노산 776 및 777이 결실되거나 아미노산 780 및 781이 결실된다. 실시태양에서, 아미노산 775-793 내의 아미노산의 결실은 비연속적이며, 예를 들어, 아미노산 775 및 790이 결실되거나 아미노산 777 및 781이 결실된다.

[0160] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 806-815에 상응하는 융합 펩타이드(SEQ ID NO:

104)의 결실을 함유한다. 실시태양에서, CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)의 융합 펩타이드의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 아미노산이 결실된다. 실시태양에서, 융합 펩타이드 내의 아미노산의 결실은 연속적이며, 예를 들어, 아미노산 806 및 807이 결실되거나 아미노산 809 및 810이 결실된다. 실시태양에서, 융합 펩타이드 내의 아미노산의 결실은 비연속적이며, 예를 들어, 아미노산 806 및 808이 결실되거나 아미노산 810 및 813이 결실된다. 실시태양에서, 융합 펩타이드의 하나 이상의 아미노산에 상응하는 결실을 함유하는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NOS: 66, 77, 및 105-108로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는다.

[0161] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)의 Lys-973에 돌연변이를 함유한다. 실시태양에서, Lys-973은 임의의 천연 아미노산으로 돌연변이된다. 실시태양에서, Lys-973은 프롤린으로 돌연변이된다. 실시태양에서, Lys-973은 글리신으로 돌연변이된다. 실시태양에서, 아미노산 973에 돌연변이를 함유하는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 84-89, 105-106, 및 109-110으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0162] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)의 Val-974에서 돌연변이를 함유한다. 실시태양에서, Val-974는 임의의 천연 아미노산으로 돌연변이된다. 실시태양에서, Val-974는 프롤린으로 돌연변이된다. 실시태양에서, Val-974는 글리신으로 돌연변이된다. 실시태양에서, 아미노산 974에 돌연변이를 함유하는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 84-89, 105-106, 및 109-110으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0163] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)의 Lys-973 및 Val-974에서 돌연변이를 함유한다. 실시태양에서, Lys-973 및 Val-974는 임의의 천연 아미노산으로 돌연변이된다. 실시태양에서, Lys-973 및 Val-974는 프롤린으로 돌연변이된다. 실시태양에서, 아미노산 973 및 974에 돌연변이를 함유하는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NOS: 84-89, 105-106, 및 109-110에서 선택된다.

[0164] *CoV S 폴리펩타이드 항원 - S2 서브유닛 - HR1 도메인에 대한 변형*

[0165] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 912-984 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 889-971에 상응하는 SEQ ID NO: 119의 아미노산 서열을 갖는 HR1 도메인에 대한 하나 이상의 변형을 함유한다.

[0166] HR1 도메인의 아미노산 서열(SEQ ID NO: 119)은 아래에 도시된다.

[0167] MAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRL

[0168] 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 HR1 도메인에 대해 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5%의 동일성을 갖는 HR1 도메인을 포함한다. HR1 도메인은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 HR1 도메인의 아미노산 서열과 비교하여 최대 약 1, 최대 약 2, 최대 약 3, 최대 약 4, 최대 약 5, 최대 약 10, 최대 약 15, 최대 약 20, 최대 약 25, 또는 최대 약 30개의 아미노산의 결실, 삽입 또는 돌연변이를 가질 수 있다. HR1 도메인은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 HR1 도메인과 비교하여 약 1개 내지 약 5개 아미노산, 약 3개 내지 약 10개 아미노산, 약 5개 내지 10개 아미노산, 약 8개 내지 12개 아미노산, 약 10개 내지 15개 아미노산, 약 12개 내지 17개 아미노산, 약 15개 내지 20개 아미노산, 약 18개 내지 23개 아미노산, 약 20개 내지 25개 아미노산, 약 22개 내지 약 27개 아미노산, 또는 약 25개 내지 30개 아미노산의 결실, 삽입 또는 돌연변이를 가질 수 있다.

[0169] 실시태양에서, HR1 도메인은 표 1G에 도시된 변형의 임의의 조합을 함유할 수 있다.

[0170] [표 1G]

[0171]

HR1에 대한 돌연변이 (SEQ ID NO: 119) * SEQ ID NO: 1의 아미노산 912-984 및 SEQ ID NO: 2의 아미노산 889-971			
SEQ ID NO: 1 내의 위치	**SEQ ID NO: 2 내의 위치**	**SEQ ID NO: 119 내의 위치**	**잠재적 돌연변이**
982	969	81	● 알라닌으로 돌연변이 ● 글리신으로 돌연변이 ● 트레오닌으로 돌연변이

[0172] *CoV S 폴리펩타이드 항원 - S2 서브유닛 - HR2 도메인에 대한 변형*

[0173] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 1163-1213 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 1150-1200에 상응하는 SEQ ID NO: 125의 아미노산 서열을 갖는 HR2 도메인에 대한 하나 이상의 변형을 함유한다.

[0174] HR2 도메인의 아미노산 서열(SEQ ID NO: 125)은 아래에 도시된다.

[0175] DVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWP

[0176] 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 HR1 도메인에 대해 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5%의 동일성을 갖는 HR2 도메인을 포함한다. HR2 도메인은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 HR2 도메인의 아미노산 서열과 비교하여 최대 약 1, 최대 약 2, 최대 약 3, 최대 약 4, 최대 약 5, 최대 약 10, 최대 약 15, 최대 약 20, 최대 약 25, 또는 최대 약 30개의 아미노산의 결실, 삽입 또는 돌연변이를 가질 수 있다. HR2 도메인은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 HR2 도메인과 비교하여 약 1개 내지 약 5개 아미노산, 약 3개 내지 약 10개 아미노산, 약 5개 내지 10개 아미노산, 약 8개 내지 12개 아미노산, 약 10개 내지 15개 아미노산, 약 12개 내지 17개 아미노산, 약 15개 내지 20개 아미노산, 약 18개 내지 23개 아미노산, 약 20개 내지 25개 아미노산, 약 22개 내지 약 27개 아미노산, 또는 약 25개 내지 30개 아미노산의 결실, 삽입 또는 돌연변이를 가질 수 있다.

[0177] *CoV S 폴리펩타이드 항원 - TM 도메인에 대한 변형*

[0178] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 1214-1237 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 1201-1244에 상응하는 SEQ ID NO: 123의 아미노산 서열을 갖는 TM 도메인에 대한 하나 이상의 변형을 함유한다.

[0179] TM 도메인의 아미노산 서열(SEQ ID NO: 123)은 아래에 도시된다.

[0180] WYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCM

[0181] 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 TM 도메인에 대해 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5%의 동일성을 갖는 TM 도메인을 포함한다. TM 도메인은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 TM 도메인의 아미노산 서열과 비교하여 최대 약 1, 최대 약 2, 최대 약 3, 최대 약 4, 최대 약 5, 최대 약 10, 최대 약 15, 최대 약 20, 최대 약 25, 또는 최대 약 30개의 아미노산의 결실, 삽입 또는 돌연변이를 가질 수 있다. TM 도메인은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 TM 도메인과 비교하여 약 1개 내지 약 5개 아미노산, 약 3개 내지 약 10개 아미노산, 약 5개 내지 10개 아미노산, 약 8개 내지 12개 아미노산, 약 10개 내지 15개 아미노산, 약 12개 내지 17개 아미노산, 약 15개 내지 20개 아미노산, 약 18개 내지 23개 아미노산, 약 20개 내지 25개 아미노산, 약 22개 내지 약 27개 아미노산, 또는 약 25개 내지 30개 아미노산의 결실, 삽입 또는 돌연변이를 가질 수 있다.

[0182] 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩타이드는 전체 TM 도메인이 결여되어 있다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 TM 도메인을 포함한다.

[0183] *CoV S 폴리펩타이드 항원 - CT 도메인에 대한 변형*

[0184] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 1238-1273 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 1225-1260에 상응하는 SEQ ID NO: 124의 아미노산 서열을 갖는 CT 도메인에 대한 하나 이상의 변형을 함유한다.

[0185] CT의 아미노산 서열(SEQ ID NO: 124)은 아래에 도시된다.

[0186] TSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT

[0187] 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 CT에 대해 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5%의 동일성을 갖는 CT를 포함한다. CT는 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 CT의 아미노산 서열과 비교하여 최대 약 1, 최대 약 2, 최대 약 3, 최대 약 4, 최대 약 5, 최대 약 10, 최대 약 15, 최대 약 20, 최대 약 25, 또는 최대 약 30개의 아미노산의 결실, 삽입 또는 돌연변이를 가질 수 있다. CT는 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2의 CT와 비교하여 약 1개 내지 약 5개 아미노산, 약 3개 내지 약 10개 아미노산, 약 5개 내지 10개 아미노산, 약 8개 내지 12개 아미노산, 약 10개 내지 15개 아미노산, 약 12개 내지 17개 아미노산, 약 15개 내지 20개 아미노산, 약 18개 내지 23개 아미노산, 약 20개 내지 25개 아미노산, 약 22개 내지 약 27개 아미노산, 또는 약 25개 내지 30개 아미노산의 결실, 삽입 또는 돌연변이를 가질 수 있다.

[0188] 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩타이드는 전체 CT가 결여되어 있다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 CT를 포함한다.

[0189] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 TM 및 CT를 포함한다. 실시태양에서, CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드는 막

횡단 및 세포질 꼬리(TMCT)(아미노산 1201-1260에 상응)로부터 하나 이상의 아미노산의 결실을 함유한다. TMCT의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 39로 표시된다. 실시태양에서, TMCT의 하나 이상의 잔기가 결실된 CoV S 폴리펩타이드는 증진된 단백질 발현을 갖는다. 실시태양에서, TMCT로부터 하나 이상의 결실을 갖는 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 40, 41, 42, 52, 54, 59, 61, 88, 및 89로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진다. 실시태양에서, TM-CD로부터 하나 이상의 결실을 갖는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 39, 43, 53, 및 60으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 분리된 핵산 서열에 의해 암호화된다.

[0190] *CoV S 폴리펩타이드 항원 - 돌연변이의 비제한적 조합*

[0191] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)의 아미노산 56 및 57의 결실을 함유한다.

[0192] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)의 아미노산 131 및 132의 결실을 함유한다.

[0193] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)의 아미노산 56 및 131의 결실을 함유한다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)의 아미노산 57 및 131의 결실을 함유한다.

[0194] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)의 아미노산 56, 57, 및 131의 결실을 함유한다.

[0195] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)의 아미노산 56 및 132의 결실을 함유한다.

[0196] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)의 아미노산 57 및 132의 결실을 함유한다.

[0197] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)의 아미노산 56, 57, 및 132의 결실을 함유한다.

[0198] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)의 아미노산 56, 57, 131, 및 132의 결실을 함유한다.

[0199] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 CoV S 폴리펩타이드의 융합전 형태를 안정화시키는 돌연변이를 함유한다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 융합전 형태를 안정화시키는 프롤린 또는 글리신 치환을 함유한다. 이 전략은 다음 문서에 기술된 바와 같이 사전융합 안정화된 MERS-CoV S 단백질을 개발하는 데 활용되었으며, 이 문서는 각각 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함된다: Proc Natl Acad Sci USA. 2017 Aug 29;114(35):E7348-E7357; Sci Rep. 2018 Oct 24;8(1):15701; 미국 공개 번호 2020/0061185; 및 PCT 출원 번호 PCT/US2017/058370.

[0200] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 Lys-973 및 Val-974에서의 돌연변이 및 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유한다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 Lys-973 및 Val-974의 프롤린으로의 돌연변이 및 QQAQ(SEQ ID NO: 7) 또는 GSAS(SEQ ID NO: 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유한다. Lys-973 및 Val-974에서의 돌연변이 및 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유하는 예시적인 CoV S 폴리펩타이드가 도 8에 도시되어 있다. 실시태양에서, Lys-973 및 Val-974의 프롤린으로의 돌연변이 및 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유하는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NOS: 86 또는 87의 아미노산 서열 및 SEQ ID NOS: 96의 핵산 서열을 갖는다.

[0201] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 Lys-973 및 Val-974에서의 돌연변이, 불활성화된 퓨린 절단 부위, 및 융합 펩타이드의 하나 이상의 아미노산의 결실을 함유한다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 Lys-973 및 Val-974의 프롤린으로의 돌연변이, QQAQ(SEQ ID NO: 7) 또는 GSAS(SEQ ID NO: 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위 및 융합 펩타이드의 하나 이상의 아미노산의 결실을 함유한다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 Lys-973 및 Val-974의 프롤린으로의 돌연변이, 불활성화된 퓨린 절단 부위, 및 SEQ ID NO: 105 또는 106의 아미노산 서열을 갖는 융합 펩타이드의 하나 이상의 아미노산 결실을 함유한다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 Leu-5의 페닐알라닌으로의 돌연변이, Thr-7의 아스파라긴으로의 돌연변이, Pro-13의 세린으로의 돌연변이, Asp-125의 티로신으로의 돌연변이, Arg-177의 세린으로의 돌연변이, Lys-404의 트레오닌으로의 돌연변이, Glu-471의 라이신으로의 돌연변이, Asn-488의 티로신으로의 돌연변이, His-642의 티로신으로의 돌연변이, Thr-

1014의 아이소류신으로의 돌연변이, Lys-973 및 Val-974의 프롤린으로의 돌연변이, 및 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)와 비교하여 QQAQ(SEQ ID NO: 7) 또는 GSAS(SEQ ID NO: 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유한다.

[0202] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 Trp-139의 시스테인으로의 돌연변이, Leu-439의 아르기닌으로의 돌연변이, Lys-973 및 Val-974의 프롤린으로의 돌연변이, 및 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)와 비교하여 QQAQ(SEQ ID NO: 7) 또는 GSAS(SEQ ID NO: 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유한다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 Trp-152의 시스테인으로의 돌연변이, Leu-452의 아르기닌으로 돌연변이, Ser-13의 아이소류신으로의 돌연변이, Lys-986 및 Val-987의 프롤린으로의 돌연변이, 및 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 1)와 비교하여 QQAQ(SEQ ID NO: 7) 또는 GSAS(SEQ ID NO: 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유한다.

[0203] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 Lys-404의 트레오닌 또는 아스파라긴으로의 돌연변이, Glu-471의 라이신으로의 돌연변이, Asn-488의 티로신으로의 돌연변이, Leu-5의 페닐알라닌으로의 돌연변이, Asp-67의 알라닌으로, Asp-202의 글리신으로의 돌연변이, 하나 이상의 아미노산 229-231의 결실, Arg-233의 아이소류신으로의 돌연변이, Lys-973 및 Val-974의 프롤린으로의 돌연변이, 및 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)와 비교하여 QQAQ(SEQ ID NO: 7) 또는 GSAS(SEQ ID NO: 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유한다.

[0204] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 Asn-488의 티로신으로의 돌연변이, Lys-973 및 Val-974의 프롤린으로의 돌연변이, 및 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)와 비교하여 QQAQ(SEQ ID NO: 7) 또는 GSAS(SEQ ID NO: 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유한다. 실시태양에서, Asn-488의 티로신으로의 돌연변이, Lys-973 및 Val-974의 프롤린으로의 돌연변이, 및 QQAQ(SEQ ID NO: 7) 또는 GSAS(SEQ ID NO: 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 갖는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 112의 아미노산 서열을 포함한다.

[0205] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 Asp-601의 글리신으로의 돌연변이, Asn-488의 티로신으로의 돌연변이, Lys-973 및 Val-974의 프롤린으로의 돌연변이, 및 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)와 비교하여 QQAQ(SEQ ID NO: 7) 또는 GSAS(SEQ ID NO: 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유한다. 실시태양에서, Asn-488의 티로신으로의 돌연변이, Lys-973 및 Val-974의 프롤린으로의 돌연변이, 및 QQAQ(SEQ ID NO: 7) 또는 GSAS(SEQ ID NO: 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 갖는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 113의 아미노산 서열을 포함한다.

[0206] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 아미노산 56, 57, 및 131의 결실, Asn-488의 티로신으로의 돌연변이, Ala-557의 아스파르테이트로의 돌연변이, Asp-601의 글리신으로의 돌연변이, Pro-668의 히스티딘으로의 돌연변이, Thr-703의 아이소류신으로의 돌연변이, Ser-969의 알라닌으로의 돌연변이, Asp-1105의 히스티딘으로의 돌연변이, Lys-973 및 Val-974의 프롤린으로의 돌연변이, 및 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)와 비교하여 QQAQ(SEQ ID NO: 7) 또는 GSAS(SEQ ID NO: 96) 또는 GG의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유한다. 실시태양에서, 아미노산 56, 57 및 131의 결실, Asn-488의 티로신으로의 돌연변이, Ala-557의 아스파르테이트로의 돌연변이, Asp-601의 글리신으로의 돌연변이, Pro-668의 히스티딘으로의 돌연변이, Thr-703의 아이소류신으로의 돌연변이, Ser-969의 알라닌으로의 돌연변이, Asp-1105의 히스티딘으로의 돌연변이, Lys-973 및 Val-974의 프롤린으로의 돌연변이, 및 QQAQ(SEQ ID NO: 7) 또는 GSAS(SEQ ID NO: 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 갖는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 114의 아미노산 서열을 포함한다. 실시태양에서, 아미노산 56, 57 및 131의 결실, Asn-488의 티로신으로의 돌연변이, Ala-557의 아스파르테이트로의 돌연변이, Asp-601의 글리신으로의 돌연변이, Pro-668의 히스티딘으로의 돌연변이, Thr-703의 이소류신으로의 돌연변이, Ser-969의 알라닌으로의 돌연변이, Asp-1105의 히스티딘으로의 돌연변이, Lys-973 및 Val-974의 프롤린으로의 돌연변이, 및 QQAQ(SEQ ID NO: 7) 또는 GSAS(SEQ ID NO: 96) 또는 GG의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 갖는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 133의 아미노산 서열을 포함한다. 실시태양에서, 아미노산 56, 57 및 131의 결실, Asn-488의 티로신으로의 돌연변이, Ala-557의 아스파르테이트로의 돌연변이, Asp-601의 글리신으로의 돌연변이, Pro-668의 히스티딘으로의 돌연변이, Thr-703의 이소류신으로의 돌연변이, Ser-969의 알라닌으로의 돌연변이, Asp-1105의 히스티딘으로의 돌연변이, Lys-973 및 Val-974의 프롤린으로의 돌연변이, 및 QQAQ(SEQ ID NO: 7) 또는 GSAS(SEQ ID NO: 96) 또는 GG의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 갖는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 137 또는 SEQ ID NO: 138의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시태양에서, SEQ ID NO: 114 또는 SEQ ID NO: 136의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이

드는 SEQ ID NO: 135의 핵산 서열을 갖는 핵산에 의해 암호화된다. 일부 실시태양에서, SEQ ID NO: 137 또는 SEQ ID NO: 138의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 139의 서열을 갖는 핵산에 의해 암호화된다.

[0207] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 아미노산 56, 57, 및 131의 결실, Asn-488의 티로신으로의 돌연변이, Ala-557의 아스파르테이트로의 돌연변이, Asp-601의 글리신으로의 돌연변이, Pro-668의 히스티딘으로의 돌연변이, Thr-703의 아이소류신으로의 돌연변이, Ser-969의 알라닌으로의 돌연변이, Asp-1105의 히스티딘으로의 돌연변이, Lys-973 및 Val-974의 프롤린으로의 돌연변이, 및 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)와 비교하여 QQAQ(SEQ ID NO: 7) 또는 GSAS(SEQ ID NO: 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유한다. 실시태양에서, 아미노산 56, 57 및 132의 결실, Asn-488의 티로신으로의 돌연변이, Ala-557의 아스파르테이트로의 돌연변이, Asp-601의 글리신으로의 돌연변이, Pro-668의 히스티딘으로의 돌연변이, Thr-703의 아이소류신으로의 돌연변이, Ser-969의 알라닌으로의 돌연변이, Asp-1105의 히스티딘으로의 돌연변이, Lys-973 및 Val-974의 프롤린으로의 돌연변이, 및 QQAQ(SEQ ID NO: 7) 또는 GSAS(SEQ ID NO: 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 갖는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 114의 아미노산 서열을 포함한다.

[0208] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 Asn-488의 티로신으로의 돌연변이, Asp-67의 알라닌으로의 돌연변이, Leu-229의 히스티딘으로의 돌연변이, Asp-202의 글리신으로의 돌연변이, Lys-404의 아스파라긴으로의 돌연변이, Glu-471의 라이신으로의 돌연변이, Ala-688의 발린으로의 돌연변이, Asp-601의 글리신으로의 돌연변이, Lys-973 및 Val-974의 프롤린으로의 돌연변이, 및 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)와 비교하여 QQAQ(SEQ ID NO: 7) 또는 GSAS(SEQ ID NO: 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유한다. 실시태양에서, Asn-488의 티로신으로의 돌연변이, Asp-67의 알라닌으로의 돌연변이, Leu-229의 히스티딘으로의 돌연변이, Asp-202의 글리신으로의 돌연변이, Lys-404의 아스파라긴으로의 돌연변이, Glu-471의 라이신으로의 돌연변이, Ala-688의 발린으로의 돌연변이, Asp-601의 글리신으로의 돌연변이, Lys-973 및 Val-974의 프롤린으로의 돌연변이, 및 QQAQ(SEQ ID NO: 7) 또는 GSAS(SEQ ID NO: 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위는 SEQ ID NO: 115의 아미노산 서열을 포함한다.

[0209] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 아미노산 131의 결실, N488Y, A557D, D601G, P668H, T703I, S969A 및 D1105H로부터 선택된 하나 이상의 변형을 함유하며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(SEQ ID NO: 7)의 아미노산 서열을 갖는다. 실시태양에서, 불활성화된 퓨린 절단 부위는 GG의 아미노산 서열을 갖는다.

[0210] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, D67A, D202G, L229H, K404N, E471K, N488Y, D601G 및 A688V로부터 선택된 하나 이상의 변형을 함유하며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(SEQ ID NO: 7)의 아미노산 서열을 갖는다. 실시태양에서, 불활성화된 퓨린 절단 부위는 GG의 아미노산 서열을 갖는다.

[0211] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, 아미노산 229-231의 결실, D67A, D202G, K404N, E471K, N488Y, D601G 및 A688V로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다.

[0212] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K973P, V974P, QQAQ(SEQ ID NO: 7)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위, 아미노산 229-231의 결실, L5F, D67A, D202G, K404N, E471K, N488Y, D601G 및 A688V로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, K973P, V974P, QQAQ(SEQ ID NO: 7)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위, 아미노산 229-231의 결실, L5F, D67A, D202G, K404N, E471K, N488Y, D601G 및 A688V로부터 선택된 하나 이상의 변형을 갖는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 144의 아미노산 서열을 포함하며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, SEQ ID NO: 144의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 145의 서열을 갖는 핵산에 의해 암호화된다.

[0213] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K973P, V974P, GG의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위, 아미노산 229-231의 결실, L5F, D67A, D202G, K404N, E471K, N488Y, D601G 및 A688V로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, K973P, V974P, GG의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위, 아미노산 229-231의

결실, L5F, D67A, D202G, K404N, E471K, N488Y, D601G 및 A688V로부터 선택된 하나 이상의 변형을 갖는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 144의 아미노산 서열을 포함하며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, SEQ ID NO: 144의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 145의 서열을 갖는 핵산에 의해 암호화된다.

[0214] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, L5F, T7N, P13S, D125Y, R177S, K404T, E471K, N488Y, D601G, H642Y, T1014I, 및 V1163F로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, L5F, T7N, P13S, D125Y, R177S, K404T, E471K, N488Y, D601G, H642Y, T1014I, 및 V1163F로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 151의 아미노산 서열을 가지며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, SEQ ID NO: 151의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 150의 서열을 갖는 핵산에 의해 암호화된다.

[0215] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, 아미노산 229-231의 결실, L5F, D67A, D202G, L229H, K404N, E471K, N488Y, D601G 및 A688V로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다.

[0216] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, K404N, E471K, N488Y, L5F, D67A, D202G, L229H, D601G, A688V 및 아미노산 229-231의 결실로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(SEQ ID NO: 7)의 아미노산 서열을 갖는다. 실시태양에서, 불활성화된 퓨린 절단 부위는 GG의 아미노산 서열을 갖는다

[0217] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, K404N, E471K 및 N488K로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, K404N, E471K 및 N488Y로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함한다. 실시태양예에서, CoV S 폴리펩타이드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, K404N, E471K 및 N488K로부터 선택된 하나 이상의 변형을 갖는 CoV S 폴리펩타이드의 RBD이며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, K404N, E471K 및 N488Y로부터 선택된 하나 이상의 변형을 갖는 CoV S 폴리펩타이드의 RBD이며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다.

[0218] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K973P, V974P, GG의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위, D601G, E404N, E471K 및 N488Y로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함한다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K973P, V974P, GG의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위, 및 D601G 돌연변이로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, K973P, V974P, GG의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위, 및 D601G 돌연변이로부터 선택된 변형을 포함하는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:133의 아미노산 서열을 갖는다.

[0219] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하며, 선택적으로 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(SEQ ID NO: 7) 또는 GG, K404N, E471K, N488K, D67A, D202G, L229H, D601G 및 A688V이며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 132 또는 SEQ ID NO: 141의 아미노산 서열을 가지며, 선택적으로 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(SEQ ID NO: 7) 또는 GG, K404N, E471K, N488K, D67A, D202G, L229H, D601G 및 A688V이다. 실시태양에서, SEQ ID NO: 132의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 131의 핵산 서열을 갖는 핵산에 의해 암호화된다. 실시태양에서, SEQ ID NO: 132의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 142의 핵산 서열을 갖는 핵산에 의해 암호화된다.

[0220] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, W139C 및 L439R로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, W139C 및 L439R 변형을 포함하는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 117 또는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 신호 펩타이드로 발현된다. 실시

태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, D601G, W139C 및 L439R로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, D601G, W139C 및 L439R 변형을 포함하고 SEQ ID NO: 117 또는 SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열을 갖는 신호 펩타이드로 발현된다.

[0221] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, D601G, L5F, D67A, D202G, 아미노산 229-231의 결실, R233I, K404N, E471K, N488Y 및 A688V를 포함하며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다.

[0222] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하며, 선택적으로 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(SEQ ID NO: 7), W139C, S481P, D601G 및 L439R이며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유하며, 선택적으로 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(SEQ ID NO: 7), W139C, D601G 및 L439R이며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 153의 아미노산 서열을 가지며, 선택적으로 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(SEQ ID NO: 7), W139C, S481P, 및 D601G이다. 실시태양에서, SEQ ID NO: 153의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 117의 아미노산 서열을 갖는 신호 펩타이드를 포함한다. 실시태양에서, SEQ ID NO: 153의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 153의 아미노산 서열을 갖는 신호 펩타이드를 포함한다.

[0223] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하며, 선택적으로 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(SEQ ID NO: 7), T82I, D240G, E471K, D601G 및 A688V이며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 156의 아미노산 서열을 가지며, 선택적으로 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(SEQ ID NO: 7), T82I, D240G, E471K, D601G 및 A688V이며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 154 또는 SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열을 갖는 신호 펩타이드를 포함하며, 선택적으로 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(SEQ ID NO: 7), T82I, D240G, E471K, D601G 및 A688V이며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다.

[0224] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하며, 선택적으로 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(SEQ ID NO: 7), T82I, D240G, S464N, D601G 및 A688V이며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 158의 아미노산 서열을 가지며, 선택적으로 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(SEQ ID NO: 7), T82I, D240G, S464N, D601G 및 A688V이며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 154의 신호 펩타이드를 포함하며, 선택적으로 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(SEQ ID NO: 7), T82I, D240G, S464N, D601G 및 A688V이며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다.

[0225] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하며, 선택적으로 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(SEQ ID NO: 7), 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 아미노산 131의 결실, N488Y 돌연변이, A557D 돌연변이, D601G 돌연변이, P668H 돌연변이, T703I 돌연변이, S969A 돌연변이 및 D1105H 돌연변이이며, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하며, 선택적으로 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(SEQ ID NO: 7), 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 아미노산 132의 결실, N488Y 돌연변이, A557D 돌연변이, D601G 돌연변이, P668H 돌연변이, T703I 돌연변이, S969A 돌연변이 및 D1105H 돌연변이이며, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드에 대해 번

호가 매겨진다.

[0226] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하며, 선택적으로 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(SEQ ID NO: 7), D67A 돌연변이, L229H 돌연변이, R233I 돌연변이, A688V 돌연변이, N488Y 돌연변이, K404N 돌연변이, E471K 돌연변이, 및 D601G 돌연변이이며, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다.

[0227] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하며, 선택적으로 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(SEQ ID NO: 7), L5F 돌연변이, T7N 돌연변이, P13S 돌연변이, D125Y 돌연변이, R177S 돌연변이, K404T 돌연변이, E471K 돌연변이, N488Y 돌연변이, D601G 돌연변이, H642Y 돌연변이, T1014I 돌연변이, 및 T1163F 돌연변이이며, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다.

[0228] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K986P, V987P, 불활성화된 퓨린 절단 부위로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하며, 선택적으로 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(SEQ ID NO: 7), S13I 돌연변이, W152C 돌연변이, 및 L452R 돌연변이이며, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 K986P, V987P, 불활성화된 퓨린 절단 부위로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하며, 선택적으로 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(SEQ ID NO: 7), S13I 돌연변이, W152C 돌연변이, 및 L452R 돌연변이이며, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨지며 N-말단 신호 펩타이드가 결여되어 있다.

[0229] 실시태양에서, CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드는 폴리펩타이드 링커를 포함한다. 실시태양에서, 폴리펩타이드 링커는 글리신 및 세린을 함유한다. 실시태양에서, 링커는 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 또는 약 100% 글리신를 가진다.

[0230] 실시태양에서, 폴리펩타이드 링커는 $(SGGG)_n$(SEQ ID NO: 91)의 반복체를 가지며, 여기서 n은 1 내지 50(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50)의 정수이다. 실시태양에서, 폴리펩타이드 링커는 SEQ ID NO: 90에 상응하는 아미노산 서열을 갖는다.

[0231] 실시태양에서, 폴리펩타이드 링커는 $(GGGGS)_n$(SEQ ID NO: 93)의 반복체를 가지며, 여기서 n은 1 내지 50(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50)의 정수이다.

[0232] 일부 양태에서, 폴리펩타이드 링커는 $(GGGS)_n$(SEQ ID NO: 92)의 반복체를 가지며, 여기서 n은 1 내지 50(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50)의 정수이다.

[0233] 일부 실시태양에서, 폴리펩타이드 링커는 폴리(Gly)n 링커이고, 여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20이다. 다른 실시태양에서, 링커는 다이펩타이드, 트라이펩타이드, 및 사중펩타이드로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 실시태양에서, 링커는 알라닌-세린(AS), 류신-글루탐산(LE), 및 세린-아르기닌(SR)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 다이펩타이드이다.

[0234] 실시태양에서, 폴리펩타이드 링커는 자연 발생 CoV S 폴리펩타이드 또는 본 명세서에 개시된 CoV S 폴리펩타이드의 1 내지 100개의 연속 아미노산을 포함한다. 실시태양에서, 폴리펩타이드 링커는 SEQ ID NO: 94에 상응하는 아미노산 서열을 갖는다.

[0235] 실시태양에서, CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드는 폴돈을 포함한다. 실시태양에서, TMCT는 폴드온으로 대체된다. 실시태양에서, 폴돈은 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드의 삼량체화를 유발한다. 실시태양에서, 폴돈은 당업계에 공지된 아미노산 서열이다. 실시태양에서, 폴돈은 SEQ ID NO: 68의 아미노산 서열을 갖는다. 실시태양에서, 폴돈은 T4 피브리틴 삼량체화 모티프이다. 실시태양에서, T4 피브리틴 삼량체화 도메인은 SEQ ID NO: 103의 아미노산 서열을 갖는다. 실시태양에서, 폴돈은 폴리펩타이드 링커에 의해 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드로부터 아

미노산 서열로 분리된다. 폴리펩타이드 링커의 비제한적인 예는 본 발명 전반에 걸쳐 발견된다.

[0236] 실시태양에서, 본 발명은 코로나바이러스 S 단백질의 단편 및 이를 포함하는 나노입자 및 백신을 포함하는 CoV S 폴리펩타이드를 제공한다. 실시태양에서, 코로나바이러스 S 단백질의 단편은 10 내지 1500개의 아미노산 길이(예를 들어, 약 10, 약 20, 약 30, 약 40, 약 50, 약 60, 약 70, 약 80, 약 90, 약 100 , 약 150, 약 200, 약 250, 약 300, 약 350, 약 400, 약 450, 약 500, 약 550, 약 600, 약 650, 약 700, 약 750, 약 800, 약 850, 약 900 950, 약 1000, 약 1050, 약 1100, 약 1150, 약 1200, 약 1250, 약 1300, 약 1350, 약 1400, 약 1450, 또는 약 1500개의 아미노산 길이)이다. 실시태양에서, 코로나바이러스 S 단백질의 단편은 수용체 결합 도메인(RBD), 서브도메인 1, 서브도메인 2, 상부 나선, 융합 펩타이드, 연결 영역, 7면체 반복체 1, 중심 나선, 7면체 반복체 2, NTD 및 TMCT로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0237] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 RBD 및 서브도메인 1을 포함한다. 실시태양에서, RBD 및 서브도메인 1을 포함하는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 319 내지 591이다.

[0238] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 코로나바이러스 S 단백질의 단편을 함유하고, 여기서 코로나바이러스 S 단백질의 단편은 RBD이다. RBD의 비제한적 예는 SARS-CoV-2의 RBD(아미노산 서열 = SEQ ID NO: 69), SARS의 RBD(아미노산 서열 = SEQ ID NO: 70), 및 MERS의 RBD(아미노산 서열 = SEQ ID NO: 71)를 포함한다.

[0239] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 폴리펩타이드 링커에 의해 연결된 2개 이상의 RBD를 함유한다. 실시태양에서, 폴리펩타이드 링커는 SEQ ID NO: 90 또는 SEQ ID NO: 94의 아미노산 서열을 갖는다.

[0240] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 RBD를 함유한다.

[0241] 일부 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 폴리펩타이드 링커에 의해 연결된 2개 이상의 SARS-CoV-2 RBD를 함유한다. 실시태양에서, 2개 이상의 SARS-CoV-2 RBD를 함유하는 항원은 SEQ ID NOS: 72-75 중 하나에 상응하는 아미노산 서열을 갖는다.

[0242] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 SARS-CoV-2 RBD 및 SARS RBD를 함유한다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 SARS-CoV-2 RBD 및 SARS RBD를 포함하며, 여기서 각각의 RBD는 폴리펩타이드 링커에 의해 분리된다. 실시태양에서, SARS-CoV-2 RBD 및 SARS RBD를 포함하는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NOS: 76-79로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는다.

[0243] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 SARS-CoV-2 RBD 및 MERS RBD를 포함한다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 SARS-CoV-2 RBD 및 MERS RBD를 포함하고, 여기서 각각의 RBD는 폴리펩타이드 링커에 의해 분리된다.

[0244] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 SARS RBD 및 MERS RBD를 포함한다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 SARS RBD 및 MERS RBD를 포함하며, 여기서 각각의 RBD는 폴리펩타이드 링커에 의해 분리된다.

[0245] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 SARS-CoV-2 RBD, SARS RBD 및 MERS RBD를 함유한다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 SARS-CoV-2 RBD, SARS RBD 및 MERS RBD를 포함하며, 여기서 각각의 RBD는 폴리펩타이드 링커에 의해 분리된다. 실시태양에서, SARS-CoV-2 RBD, SARS RBD 및 MERS RBD를 포함하는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NOS: 80-83으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는다.

[0246] 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩타이드는 N-말단 신호 펩타이드로 발현된다. 실시태양에서, N-말단 신호 펩타이드는 SEQ ID NO: 5(MFVFLVLLPLVSS)의 아미노산 서열을 갖는다. 실시태양에서, N-말단 신호 펩타이드는 SEQ ID NO: 117(MFVFLVLLPLVSI)의 아미노산 서열을 갖는다. 실시태양에서, N-말단 신호 펩타이드는 SEQ ID NO: 154 (MFVFFVLLPLVSS)의 아미노산 서열을 갖는다. 실시태양에서, 신호 펩타이드는 CoV S 단백질의 발현을 가능하게 하는 임의의 신호 펩타이드로 대체될 수 있다. 실시태양에서, CoV S 단백질 신호 펩타이드 아미노산 중 하나 이상이 결실되거나 돌연변이될 수 있다. 개시 메티오닌 잔기는 발현을 개시하기 위해 유지된다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 148, 및 SEQ ID NO: 150으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 핵산 서열에 의해 암호화된다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드의 N-말단 신호 펩타이드는 천연 CoV 스파이크(S) 신호 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 5)에 비해 Ser-13에서 돌연변이를 함유한다. 실시태양에서, Ser-13은 임의의 천연 아미노산으로 돌연변이된다. 실시태양에서, Ser-13은 알라닌, 메티오닌, 아이소류신, 류신, 트레오닌 또는 발린으로 돌연변이된다. 실시태양에서, Ser-13은 아이소류신으로 돌연변이된다.

[0247] 숙주 세포에서 CoV S 단백질의 발현 후, N-말단 신호 펩타이드는 절단되어 성숙한 CoV 단백질 서열(SEQ ID NOS: 2, 4, 38, 41, 44, 48, 51, 54, 58, 61, 63, 65, 67, 73, 75, 78, 79, 82, 83, 85, 87, 89, 106, 110, 132, 133, 114, 138, 141, 144, 147, 151, 153, 156, 및 158, 164-168)을 제공한다. 실시태양에서, 신호 펩타이드는 숙주 세포 프로테아제에 의해 절단된다. 양태에서, 전장 단백질은 숙주 세포로부터 분리되고 신호 펩타이드는 후속적으로 절단될 수 있다.

[0248] 발현 및 정제 동안 SEQ ID NOS: 1, 3, 36, 40, 42, 46, 49, 52, 56, 59, 62, 64, 66, 72, 74, 76, 77, 80, 81, 84, 86, 87, 105, 107, 88, 109, 130, 134, 136, 137, 140, 143, 146, 149, 152, 155, 157, 159-163에 상응하는 아미노산 서열에 의한 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드로부터의 신호 펩타이드의 절단 이후, SEQ ID NOS: 2, 4, 38, 41, 44, 48, 51, 54, 58, 61, 63, 65, 67, 73, 75, 78, 79, 82, 83, 85, 106, 108, 89, 및 110, 112-115, 132, 133, 114, 138, 141, 144, 147, 151, 153, 156, 및 158, 164-168 로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 성숙 폴리펩타이드가 얻어지고 CoV S 나노입자 백신 또는 CoV S 나노입자를 생산하는 데 사용된다.

[0249] 유리하게는, 개시된 CoV S 폴리펩타이드는 천연 CoV 스파이크(S) 단백질에 비해 향상된 단백질 발현 및 안정성을 가질 수 있다.

[0250] 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩타이드는 천연 코로나바이러스 S 단백질(SEQ ID NO: 2)로부터의 추가 변형을 함유한다. 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 코로나바이러스 S 단백질은 천연 코로나바이러스 S 단백질에 대해 적어도 80%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 97%, 또는 적어도 99% 동일성을 나타낸다. 당업자는 공지된 기술을 사용하여 천연 단백질 또는 본 명세서에 기술된 임의의 CoV S 폴리펩타이드에 대한 재조합 코로나바이러스 S 단백질의 백분율 동일성을 계산할 것이다. 예를 들어, 백분율 동일성은 온라인에서 사용할 수 있는 도구 CLUSTALW2 또는 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)를 사용하여 계산할 수 있다. 다음 디폴트 매개변수는 CLUSTALW2 쌍별 정렬: 단백질 중량 매트릭스 = Gonnet; 갭 오픈 = 10; 간격 확장 = 0.1에 사용될 수 있다.

[0251] 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 87의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 적어도 99.5% 동일하다. CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 87의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드의 아미노산 서열과 비교하여 최대 약 1개, 최대 약 2개, 최대 약 3개, 최대 약 4개, 최대 약 5개, 최대 약 10개, 최대 약 15개, 최대 약 20개, 최대 약 25개, 최대 약 30개, 최대 약 35개, 최대 약 40개, 최대 약 45개, 또는 최대 약 50개 아미노산의 결실, 삽입 또는 돌연변이를 가질 수 있다. CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 87의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드와 비교하여 약 1 내지 약 5개 아미노산, 약 3개 내지 약 10개 아미노산, 약 5개 내지 10개 아미노산, 약 8개 내지 12개 아미노산, 약 10개 내지 15개 아미노산, 약 12개 내지 17개 아미노산, 약 15개 내지 20개 아미노산, 약 18 내지 23개 아미노산, 약 20 내지 25개 아미노산, 약 22 내지 약 27개 아미노산, 약 25 내지 30개 아미노산, 약 30 내지 35개 아미노산, 약 35 내지 40개 아미노산, 약 40개 내지 약 45개 아미노산 또는 약 45개 내지 50개 아미노산의 결실, 삽입 또는 돌연변이를 가질 수 있다. 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩타이드는 코로나바이러스 S 단백질(SEQ ID NO: 87)과 비교하여 약 1개, 약 2개, 약 3개, 약 4개, 약 5개, 약 6개, 약 7개, 약 8개, 약 9개, 약 10개, 약 11개, 약 12개, 약 13개, 약 14개, 약 15개, 약 16개, 약 17개, 약 18개, 약 19개, 약 20개, 약 21개, 약 22개, 약 23개, 약 24개, 또는 약 25개의 치환을 포함한다.

[0252] 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NOS: 2, 4, 38, 41, 44, 48, 51, 54, 58, 61, 63, 65, 67, 73, 75, 78, 79, 82, 83, 85, 106, 108, 89, 및 110, 112-115, 132, 133, 114, 138, 141, 144, 147, 151, 153, 156, 및 158, 164-168의 아미노산 서열과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 적어도 99.5% 동일하다. CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NOS: 2, 4, 38, 41, 44, 48, 51, 54, 58, 61, 63, 65, 67, 73, 75, 78, 79, 82, 83, 85, 106, 108, 89, 및 110, 112-115, 132, 133, 114, 138, 141, 144, 147, 151, 153, 156, 및 158, 164-168의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드의 아미노산 서열과 비교하여 최대 약 1개, 최대 약 2개, 최대 약 3개, 최대 약 4개, 최대 약 5개, 최대 약 10개, 최대 약 15개, 최대 약 20개, 최대 약 25개, 최대 약 30개, 최대 약 35개, 최대 약 40개, 최대 약 45개, 또는 최대 약 50개 아미노산의 결실, 삽입 또는 돌연변이를 가질 수 있다. CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NOS: 2, 4, 38, 41, 44, 48, 51, 54, 58, 61, 63, 65, 67, 73, 75, 78, 79, 82, 83, 85, 106, 108, 89, 및 110, 112-115, 132, 133, 114, 138, 141, 144, 147, 151, 153, 156, 및 158, 164-168의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드와 비교하여 약 1 내지 약 5개 아미노산, 약 3개 내지 약 10개 아미노산, 약 5개 내지 10개 아미노산, 약 8개 내지 12개 아미노산, 약 10개 내지 15개 아미노산, 약 12개 내지 17개 아미노산, 약 15개 내지 20개 아미노산, 약 18

내지 23개 아미노산, 약 20 내지 25개 아미노산, 약 22 내지 약 27개 아미노산, 약 25 내지 30개 아미노산, 약 30 내지 35개 아미노산, 약 35 내지 40개 아미노산, 약 40개 내지 약 45개 아미노산 또는 약 45개 내지 50개 아미노산의 결실, 삽입 또는 돌연변이를 가질 수 있다. 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩타이드는 코로나바이러스 S 단백질(SEQ ID NO: 87)과 비교하여 약 1개, 약 2개, 약 3개, 약 4개, 약 5개, 약 6개, 약 7개, 약 8개, 약 9개, 약 10개, 약 11개, 약 12개, 약 13개, 약 14개, 약 15개, 약 16개, 약 17개, 약 18개, 약 19개, 약 20개, 약 21개, 약 22개, 약 23개, 약 24개, 또는 약 25개의 치환을 포함한다.

[0253] 실시태양에서, 코로나바이러스 S 폴리펩타이드는 N-말단, C-말단, 또는 N-말단과 C-말단 모두에서 연장된다. 양태에서, 연장은 정제 또는 검출과 같은 기능에 유용한 태그이다. 양태에서 태그는 에피토프를 함유한다. 예를 들어, 태그는 폴리글루타메이트 태그, FLAG-태그, HA-태그, 폴리히스-태그(약 5-10개의 히스티딘을 가짐)(SEQ ID NO: 101), 헥사히스티딘 태그(SEQ ID NO: 100), 8X-His-태그(8개의 히스티딘을 가짐)(SEQ ID NO: 102), Myc-태그, 글루타티온-S-트랜스퍼라제-태그, 녹색 형광 단백질-태그, 말토스 결합 단백질-태그, 티오레독신 -태그, 또는 Fc-태그일 수 있다. 다른 양태에서, 연장은 발현을 향상시키기 위해 단백질에 융합된 N-말단 신호 펩타이드일 수 있다. 이러한 신호 펩타이드는 종종 세포에서 발현되는 동안 절단되지만, 일부 나노입자는 온전한 신호 펩타이드를 갖는 항원을 함유할 수 있다. 따라서, 나노입자가 항원을 포함하는 경우, 항원은 연장을 함유할 수 있고 따라서 나노입자에 혼입될 때 융합 단백질일 수 있다. 서열에 대한 동일성을 계산하기 위해, 연장은 포함되지 않는다. 실시태양에서, 태그는 프로테아제 절단 부위이다. 프로테아제 절단 부위의 비제한적 예는 HRV3C 프로테아제 절단 부위, 키모트립신, 트립신, 엘라스타제, 엔도펩티다제, 카스파제-1, 카스파제-2, 카스파제-3, 카스파제-4, 카스파제-5, 카스파제-6, 카스파제-7, 카스파제-8, 카스파제-9, 카스파제-10, 엔테로키나제, 인자 Xa, 그랜자임 B, TEV 프로테아제 및 트롬빈을 포함한다. 실시태양에서, 프로테아제 절단 부위는 HRV3C 프로테아제 절단 부위이다. 실시태양에서, 프로테아제 절단 부위는 SEQ ID NO: 98의 아미노산 서열을 포함한다.

[0254] 실시태양에서, CoV S 당단백질은 융합 단백질을 포함한다. 실시태양에서, CoV S 당단백질은 N-말단 융합 단백질을 포함한다. 실시태양에서, Cov S 당단백질은 C-말단 융합 단백질을 포함한다. 실시태양에서, 융합 단백질은 단백질 발현, 정제 또는 검출에 유용한 태그를 포함한다. 시릿태양에서, 태그는 폴리히스-태그(약 5-10개의 히스티딘을 가짐), Myc-태그, 글루타티온-S-트랜스퍼라제-태그, 녹색 형광 단백질-태그, 말토스 결합 단백질-태그, 티오레독신-태그, 스트렙-태그, 트윈-스트렙-태그 또는 Fc-태그이다. 실시태양에서, 태그는 Fc-태그이다. 실시태양에서, Fc-태그는 단량체, 이량체 또는 삼량체이다. 실시태양에서, 태그는 헥사히스티딘 태그, 예를 들어 6개의 히스티딘을 포함하는 폴리히스-태그(SEQ ID NO: 100)이다. 실시태양에서, 태그는 SEQ ID NO: 99의 아미노산 서열을 갖는 트윈-스트렙-태그이다.

[0255] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 다른 코로나바이러스 단백질을 포함하는 융합 단백질이다. 실시태양에서, 다른 코로나바이러스 단백질은 동일한 코로나바이러스에서 유래된다. 실시태양에서, 다른 코로나바이러스 단백질은 다른 코로나바이러스로부터 유래된다.

[0256] 양태에서, CoV S 단백질은 절단될 수 있다. 예를 들어, N-말단은 약 10개의 아미노산, 약 30개의 아미노산, 약 50개의 아미노산, 약 75개의 아미노산, 약 100개의 아미노산 또는 약 200개의 아미노산으로 절단될 수 있다. C-말단은 N-말단 대신 또는 N-말단에 부가하여 절단될 수 있다. 예를 들어, C-말단은 약 10개의 아미노산, 약 30개의 아미노산, 약 50개의 아미노산, 약 75개의 아미노산, 약 100개의 아미노산 또는 약 200개의 아미노산으로 절단될 수 있다. 절단을 갖는 단백질에 대한 동일성을 계산하기 위해, 동일성은 단백질의 나머지 부분에 대해 측정된다.

[0257] *CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드를 포함하는 나노입자*

[0258] 실시태양에서, 성숙한 CoV S 폴리펩타이드 항원이 코로나바이러스 S 나노입자를 포함하는 백신을 생산하는 데 사용된다. 실시태양에서, 본 발명의 나노입자는 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩타이드를 포함한다. 실시태양에서, 본 발명의 나노입자는 세제 코어와 연관된 CoV S 폴리펩타이드를 포함한다. 세제의 존재는 항원을 조직화하고 제시하는 코어를 형성함으로써 나노입자의 형성을 촉진한다. 실시태양에서, 나노입자는 머리 영역이 바깥쪽으로 돌출하고 소수성 영역과 PS80 세제가 당단백질에 의해 둘러싸인 중심 코어를 형성하는 다중 올리고머 당단백질 세제(예를 들어, PS80) 나노입자로 조립된 CoV S 폴리펩타이드를 함유할 수 있다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 단백질의 세제 코어로의 결합을 촉진하기 위해 본질적으로 막횡단 도메인을 함유하거나 함유하도록 적응된다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 헤드 도메인을 포함한다. 도 10은 본 발명의 CoV S 폴리펩타이드의 예시적인 구조를 도시한다. 주로 CoV S 폴리펩타이드 삼량체의 막횡단 도메인은 세제와 결합한다. 그러나, 폴리펩타이드의 다른 부분도 상호작용할 수 있다. 유리하게는, 나노입자는 세제 주위에 단백질의 다중 복

제물의 조직화로 인해 향상된 안정성 및/또는 면역계에 대한 개선된 제시를 제공하도록 환경 스트레스에 대한 개선된 내성을 갖는다.

[0259] 실시태양에서, 세제 코어는 비이온성 세제 코어이다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 비이온성 세제 코어와 결합된다. 실시태양에서, 세제는 폴리소르베이트-20(PS20), 폴리소르베이트-40(PS40), 폴리소르베이트-60(PS60), 폴리소르베이트-65(PS65) 및 폴리소르베이트-80(PS80)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0260] 실시태양에서, 세제는 PS80이다.

[0261] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 삼량체를 형성한다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드 나노입자는 비이온성 세제 코어를 둘러싸는 다중 폴리펩타이드 삼량체로 구성된다. 실시태양에서, 나노입자는 적어도 약 1개의 삼량체를 함유한다. 실시태양에서, 나노입자는 스파이크 단백질의 적어도 약 5개의 삼량체 내지 약 30개의 삼량체를 함유한다. 실시태양에서, 각각의 나노입자는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 15, 20, 25, 또는 30개의 삼량체를 함유할 수 있으며, 그 사이의 모든 값과 범위를 포함한다. 본 명세서에 개시된 조성물은 상이한 수의 삼량체를 갖는 나노입자를 함유할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 삼량체의 수가 2-9 범위인 나노입자를 함유할 수 있으며; 실시태양에서, 조성물의 나노입자는 2-6개의 삼량체를 함유할 수 있다. 실시태양에서, 조성물은 나노입자당 2 내지 6개의 삼량체, 또는 나노입자당 2 내지 9개의 삼량체를 갖는 나노입자의 이종 집단을 함유한다. 실시태양에서, 조성물은 실질적으로 균질한 나노입자 집단을 함유할 수 있다. 예를 들어, 집단은 5개의 삼량체를 갖는 약 95% 나노입자를 함유할 수 있다.

[0262] 본 명세서에 개시된 나노입자는 입자 크기의 범위이다. 실시태양에서, 본 명세서에 개시된 나노입자는 입자 크기가 약 20nm 내지 약 60nm, 약 20nm 내지 약 50nm, 약 20nm 내지 약 45nm, 약 20nm 내지 약 35nm, 약 20nm 내지 약 30nm, 약 25nm 내지 약 35nm, 또는 약 25nm 내지 약 45nm의 Z-avedml 입자 크기에 이른다. 입자 크기(Z-ave)는 달리 명시되지 않는 한 Zetasizer NanoZS(Malvern, UK)를 사용하여 동적 광산란(DLS)에 의해 측정된다.

[0263] 실시태양에서, 본 명세서에 개시된 CoV S 폴리펩타이드를 포함하는 나노입자는 야생형 CoV S 폴리펩타이드를 포함하는 나노입자와 비교하여 감소된 입자 크기를 갖는다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 입자 크기가 적어도 약 40% 더 작으며, 예를 들어 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 85% 더 작다.

[0264] 본 명세서에 개시된 CoV S 폴리펩타이드를 포함하는 나노입자는 야생형 CoV S 폴리펩타이드를 포함하는 나노입자보다 크기, 모양 및 질량이 더 균질하다. 이질성의 척도인 다분산 지수(PDI)는 달리 명시되지 않는 한 Malvern Setasizer를 사용하여 동적 광산란에 의해 측정된다. 실시태양에서, 본 명세서에서 측정된 입자는 약 0.2 내지 약 0.45, 예를 들어, 약 0.2, 약 0.25, 약 0.29, 약 0.3, 약 0.35, 약 0.40, 또는 약 0.45의 PDI를 갖는다. 실시태양에서, 본 명세서에서 측정된 나노입자는 야생형 CoV S 폴리펩타이드를 포함하는 나노입자의 PDI보다 적어도 약 25% 이상 더 작은 PDI, 예를 들어 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 또는 적어도 약 60% 더 작은 PDI를 가진다.

[0265] CoV S 폴리펩타이드 및 이를 포함하는 나노입자는 야생형 CoV S 폴리펩타이드 또는 이의 나노입자에 비해 개선된 열적 안정성을 갖는다. CoV S 폴리펩타이드의 열 안정성은 달리 명시되지 않는 한 시차 주사 열량계(DSC)를 사용하여 측정된다. 전이 엔탈피(ΔHcal)는 CoV S 폴리펩타이드를 펼치는 데 필요한 에너지이다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 야생형 CoV S 폴리펩타이드와 비교하여 증가된 ΔHcal을 갖는다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드의 ΔHcal은 야생형 CoV S 폴리펩타이드의 ΔHcal보다 약 2배, 약 3배, 약 4배, 약 5배, 약 6배, 약 7배, 약 8배, 약 9배 또는 약 10배 더 크다.

[0266] 몇몇 나노입자 유형이 본 발명에 개시된 백신 조성물에 포함될 수 있다. 양태에서, 나노입자 유형은 이량체 또는 단량체일 수 있는 이방성 막대의 형태이다. 다른 양태에서, 나노입자 유형은 구형 올리고머이다. 또 다른 양태에서, 나노입자는 중간 나노입자로 기술될 수 있으며, 처음 두 가지 유형의 침강 특성 중간을 갖는다. 나노입자 유형의 형성은 생산 과정에서 세제 및 단백질 농도를 제어하여 조절될 수 있다. 나노입자 유형은 침강 계수를 측정함으로써 결정될 수 있다.

[0267] *CoV S 폴리펩타이드 항원을 함유하는 나노입자의 생산*

[0268] 본 발명의 나노입자는 천연적으로 발생하지 않는 생성물이며, 그 성분은 자연에서 함께 존재하지 않는다. 일반적으로, 본 발명에 개시된 방법은 제 1 세제를 사용하여 단백질을 분리시킨 후 제 1 세제를 제 2 세제와 교환하여 나노입자를 형성시키는 세제 교환 접근법을 사용한다.

[0269] 나노입자에 함유된 항원은 전형적으로 숙주 세포에서의 재조합 발현에 의해 생성된다. 표준 재조합 기술이 사용될 수 있다. 실시태양, CoV S 폴리펩타이드는 곤충 숙주 세포에서 바큘로바이러스 시스템을 사용하여 발현된다. 실시태양에서, 바큘로바이러스는 카텝신-L 낙아웃 바큘로바이러스, 키티나제 낙아웃 바큘로바이러스이다. 선택적으로, 바큘로바이러스는 카텝신-L 및 키티나제 모두에 대한 이중 낙아웃이다. 높은 수준의 발현은 곤충 세포 발현 시스템에서 얻을 수 있다. 곤충 세포의 비 제한적인 예는 담배거세미나방종(*Spodoptera frugiperda*)(Sf) 세포, 예를 들어, Sf9, Sf21, 무늬밤나방(*Trichoplusiani*) 세포, 예를 들면, 하이 파이브(High Five) 세포, 드로소필라(Drosophila) S2 세포이다. 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩타이드는 임의의 적합한 숙주 세포에서 생산된다. 실시태양에서, 숙주 세포는 곤충 세포이다. 실시태양에서, 곤충 세포는 Sf9 세포이다.

[0270] 전형적인 형질 감염 및 세포 성장 방법이 세포를 배양하는데 사용될 수 있다. 벡터, 예컨대 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터는 당업계에 공지된 방법에 따라 숙주 세포 내로 형질감염될 수 있다. 예를 들어, 핵산을 진핵 세포에 도입하는 것은 칼슘 포스페이트 공-침전, 전기천공, 마이크로인젝션, 리포펙션 및 폴리아민 형질감염 시약을 이용한 형질감염에 의해 달성될 수 있다. 한 실시태양에서, 벡터는 재조합 바큘로바이러스이다.

[0271] 숙주 세포를 성장시키는 방법은 배치, 배치-공급, 연속 및 관류 세포 배양 기술을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 세포 배양은 세포가 증식 및 분리를 위해 단백질(예를 들어, 재조합 단백질)을 증식 및 발현하는 생물 반응기(발효 챔버)에서 세포의 성장 및 증식을 의미한다. 전형적으로, 세포 배양은 생물 반응기에서 무균, 제어된 온도 및 대기 조건하에 수행된다. 생물 반응기는 온도, 대기, 교반 및/또는 pH와 같은 환경 조건을 모니터할 수 있는 세포 배양에 사용되는 챔버이다. 한 실시태양에서, 생물 반응기는 스테인리스 강 챔버이다. 다른 실시태양에서, 생물 반응기는 사전 멸균된 비닐 백(예를 들어, Cellbag®, Wave Biotech, Bridgewater, NJ)이다. 다른 실시태양에서, 사전 멸균된 비닐 백은 약 50 L 내지 3500 L 백이다.

[0272] *CoV 스파이크(S) 단백질 항원을 함유하는 나노입자의 추출 및 정제*

[0273] 숙주 세포의 성장 후, 단백질은 세제 및 정제 프로토콜을 사용하여 숙주 세포로부터 수확될 수 있다. 일단 숙주 세포가 48 내지 96 시간 동안 성장하면, 배양액으로부터 세포를 분리하고 세제 함유 용액을 첨가하여 세포막을 용해시켜 세제 추출물 중에 단백질을 방출시킨다. 트리톤 X-100과 NP-9으로도 알려진 TERGITOL® 노닐페놀 에톡실레이트는 추출을 위해 각각 선호되는 세제이다. 세제는 약 0.1% 내지 약 1.0%의 최종 농도로 첨가될 수 있다. 예를 들어, 농도는 약 0.1%, 약 0.2%, 약 0.3%, 약 0.5%, 약 0.7%, 약 0.8% 또는 약 1.0%일 수 있다. 상기 범위는 약 0.1% 내지 약 0.3%일 수 있다. 양태에서, 농도는 약 0.5%이다.

[0274] 다른 양태에서, 상이한 제 1 세제는 단백질을 숙주 세포로부터 분리하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 제 1 세제는 비스(폴리에틸렌 글리콜 비스[이미다조 일카본일]), 노녹시놀-9, 비스(폴리에틸렌 글리콜 비스[이미다조일카본일]), BRIJ® 폴리에틸렌 글리콜 도데실 에터 35, BRIJ® 폴리에틸렌 글리콜(3) 세틸 에터 56, BRIJ® 알코올 에톡실레이트 72, BRIJ® 폴리옥실 2 스테아릴 에터 76, BRIJ® 폴리에틸렌 글리콜 모노올레릴 에터 92V, BRIJ® 폴리옥시에틸렌(10) 올레일 에터 97, BRIJ® 폴리에틸렌 글리콜 헥사데실 에터 58P, CREMOPHOR® EL 마크로골글리세롤 리시놀레이트, 데카에틸렌글리콜 모노도데실 에터, N-데카노일-N-메틸글루카민, n-데실 알파-D-글루코피라노시드, 데실 베타-D-말토피라노시드, n-도데카노일-N-메틸글루카미드, n-도데실 알파-D-말토사이드, n-도데실 베타-D-말토사이드, n-도데실 베타-D-말토사이드, 헵타 에틸렌 글리콜 모노데실 에터, 헵타 에틸렌 글리콜 모노도데실 에터, 헵타 에틸렌 글리콜 모노테트라 데실 에터, n-헥사데실 베타-D-말토사이드, 헥사 에틸렌 글리콜 모노도데실 에터, 헥사에틸렌 글리콜 모노헥사데실 에터, 헥사에틸렌 글리콜 모노옥타데실 에터, 헥사에틸렌 글리콜 모노테트라데실 에터, Igepal CA-630, Igepal CA-630, 메틸-6-O-(N-헵틸 카바모일)-α-D-글루코피라노사이드, 노나에틸렌 글리콜 모노도데실 에터, N-노마노일-N-메틸글루카민, N-노나노일-N-메틸글루카민, 옥타에틸렌 글리콜 모노데실 에터, 옥타에틸렌 글리콜모노도데실 에터, 옥타에틸렌 글리콜 모노헥사데실 에터, 옥타에틸렌 글리콜 모노옥타데실 에터, 옥타에틸렌 글리콜 모노테트라데실 에터, 옥틸-β-D-글루코피라노사이드, 펜타에틸렌 글리콜 모노데실 에터, 펜타에틸렌 글리콜 모노도데실 에터, 펜타에틸렌 글리콜 모노헥사데실 에터, 펜타에틸렌 글리콜 모노헥실 에터, 펜타에틸렌 글리콜 모노옥타데실 에터, 펜타에틸렌 글리콜 모노옥틸 에터, 폴리에틸렌 글리콜 다이글리시딜 에터, 폴리에틸렌 글리콜 에터 W-1, 폴리옥시에틸렌 10 트라이데실 에터, 폴리옥시에틸렌 100 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 20 아이소헥사데실 에터, 폴리옥시에틸렌 20 올레일 에터, 폴리옥시에틸렌 40 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 50 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 8 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 비스(이미 다졸일 카본일), 폴리옥시에틸렌 25 프로필렌 글리콜 스테아레이트, 킬라자 껍질의 사포닌, SPAN® 20 소르비탄 라우레이트, SPAN® 40 소르비탄 모노팔미테이트, SPAN® 60 소르비탄 스테아레이트, SPAN® 65 소르비탄 트리스테아레이트, SPAN® 80 소르비탄 모노올리에이트, SPAN® 85 소르비탄 트리올레에이트,

TERGITOL® 2차 알코올 에톡실레이트 유형 15-S-12, TERGITOL® 2차 알코올 2차 알코올 에톡실레이트 유형 15-S-30, TERGITOL® 2차 알코올 에톡실레이트 유형 15-S-5, TERGITOL® 2차 알코올 에톡실레이트 유형 15-S-7, TERGITOL® 2차 알코올 에톡실레이트 유형 15-S-9, TERGITOL® 노닐페놀 에톡실레이트 유형 NP-10, TERGITOL® 노닐페놀 에톡실레이트 유형 NP-4, TERGITOL® 노닐페놀 에톡실레이트 유형 NP-40, TERGITOL® 노닐페놀 에톡실레이트 유형 NP-7, TERGITOL® 노닐페놀 에톡실레이트 유형 NP-9, TERGITOL® 분지형 2차 알코올 에톡실레이트 유형 TMN-10, TERGITOL® 분지형 2차 알코올 에톡실레이트 유형 TMN-6, TRITON™ X-100 폴리에틸렌 글리콜 tert-옥틸페닐 에터 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0275] 그런 후에 나노입자는 원심 분리를 사용하여 세포 파편으로부터 분리될 수 있다. 일부 실시태양에서, 염화세슘, 수크로오스 및 아이딕사놀을 사용하는 구배 원심분리가 사용될 수 있다. 예를 들어 이온 교환, 친화성 및 겔 여과 크로마토그래피를 포함하는 표준 정제 기술과 같은 다른 기술이 대안으로서 또는 부가적으로 사용될 수 있다.

[0276] 예를 들어, 제 1 컬럼은 FRACTOGEL® EMD 메타크릴레이트 기반 폴리머 비드 TMAE(EMD Millipore)와 같은 이온 교환 크로마토그래피 수지일 수 있고, 제 2 컬럼은 렌틸(*Lens culinaris*) 렉틴 친화성 수지일 수 있으며, 제 3 컬럼은 FRACTOGEL® EMD 메타크릴레이트 기반 폴리머 비드 SO3(EMD Millipore) 수지와 같은 양이온 교환 컬럼일 수 있다. 다른 양태에서, 양이온 교환 컬럼은 MMC 컬럼 또는 누비아 C 프라임 컬럼(Bio-Rad Laboratories, Inc)일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에 개시된 방법은 세제 추출 컬럼; 예를 들어 소수성 상호작용 컬럼을 사용하지 않는다. 이러한 컬럼은 정제 과정에서 세제를 제거하는데 종종 사용되지만 여기에 공개된 방법에 부정적인 영향을 줄 수 있다.

[0277] *CoV 폴리펩타이드 항원을 함유하는 나노입자의 세제 교환*

[0278] 나노입자를 형성하기 위해, 숙주 세포로부터 단백질을 추출하는데 사용되는 제 1 세제는 실질적으로 제 2 세제로 대체되어 나노입자 구조에 도달한다. NP-9는 바람직한 추출 세제이다. 전형적으로, 나노입자는 HPLC로 측정했을 때 검출 가능한 NP-9를 함유하지 않는다. 제 2 세제는 전형적으로 PS20, PS40, PS60, PS65 및 PS80으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 바람직하게는, 제 2 세제는 PS80이다.

[0279] 특정 양태에서, 세제 교환은 그들의 탄수화물 잔기를 통해 당단백질을 결합시키는 친화성 크로마토그래피를 사용하여 수행된다. 예를 들어, 친화성 크로마토그래피는 레귐 렉틴 컬럼을 사용할 수 있다. 레귐 렉틴은 식물에서 처음 발견된 단백질로 탄수화물 잔여물과 특이적으로 가역적으로 상호작용하는 것으로 밝혀졌다. 예를 들어, Sharon and Lis, "Legume lectins--a large family of homologous proteins," FASEB J. 1990 Nov;4(14):3198-208; Liener, "The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine," Elsevier, 2012 참조. 적절한 렉틴은 콘카나발린(concanavalin) A(con A), 완두 렉틴, 세인포인(sainfoin) 렉팀 및 렌즈 렉틴을 포함한다. 렌틸 렉틴은 이의 결합 특성 때문에 세제 교환을 위한 바람직한 컬럼이다. 렉틴 컬럼은 시판되고 있다; 예를 들어, 캅토 렌틸 렉틴은 GE 헬스케어에서 구입할 수 있다. 특정 양태에서, 렌틸 렉틴 컬럼은 재조합 렉틴을 사용할 수 있다. 분자 수준에서, 탄수화물 모이어티는 렌틸 렉틴에 결합하여 단백질의 아미노산을 유리시켜 세제 주위에 결합시켜 항원, 예를 들어, 세제에 고정된 이량체, 삼량체 또는 사량체일 수 있는 당단백질 올리고머의 여러 복제물을 갖는 나노입자를 제공하는 것으로 생각된다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 삼량체를 형성한다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드 삼량체는 세제에 고정되어 있다. 실시태양에서, 각각의 CoV S 폴리펩타이드 나노입자는 비이온성 코어와 관련된 적어도 하나의 삼량체를 함유한다.

[0280] 세제 교환 동안 나노입자를 형성하기 위해 단백질과 함께 배양될 때, 세제는 조기 정제 단계 동안 약 0.1%(w/v)까지 존재할 수 있고, 이 양은 최적 안정성을 갖는 최종 나노입자를 얻기 위해 낮아진다. 예를 들어, 비이온성 세제(예를 들어, PS80)는 약 0.005%(v/v) 내지 약 0.1%(v/v), 예를 들어, 약 0.005%(v/v), 약 0.006%(v/v), 약 0.007%(v/v), 약 0.008 %(v/v), 약 0.009%(v/v), 약 0.01%(v/v), 약 0.015%(v/v), 약 0.02%(v/v), 약 0.025%(v/v), 약 0.03%(v/v), 약 0.035%(v/v), 약 0.04%(v/v), 약 0.045%(v/v), 약 0.05%(v/v), 약 0.055%(v/v), 약 0.06%(v/v), 약 0.065%(v/v), 약 0.07%(v/v), 약 0.075%(v/v), 약 0.08%(v/v), 약 0.085%(v/v), 약 0.09%(v/v), 약 0.095%(v/v), 또는 약 0.1%(v/v) PS80일 수 있다. 실시태양에서, 나노입자는 약 0.03% 내지 약 0.05% PS80을 함유한다. 실시태양에서, 나노입자는 약 0.01%(v/v) PS80을 함유한다.

[0281] 실시태양에서, 정제된 CoV S 폴리펩타이드는 투석된다. 실시태양에서, 투석은 정제 후에 발생한다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드는 인산나트륨, NaCl 및 PS80을 포함하는 용액에서 투석된다. 실시태양에서, 인산나트륨을 포함하는 투석 용액은 약 5mM 내지 약 100mM의 인산나트륨, 예를 들어 약 5mM, 약 10mM, 약 15mM, 약 20mM, 약 25mM, 약 30mM, 약 30mM, 35mM, 약 40mM, 약 45mM, 약 50mM, 약 55mM, 약 60mM, 약 65mM, 약 70mM, 약

75mM, 약 80mM, 약 85mM, 약 90mM, 약 95mM 또는 약 100mM 인산나트륨을 함유한다. 실시태양에서, 인산나트륨을 포함하는 용액의 pH는 약 6.5, 약 6.6, 약 6.7, 약 6.8, 약 6.9, 약 7.0, 약 7.1, 약 7.2, 약 7.3, 약 7.4, 또는 약 7.5이다. 실시태양에서, 염화나트륨을 포함하는 투석 용액은 약 50mM NaCl 내지 약 500mM NaCl, 예를 들어, 약 50mM, 약 60mM, 약 70mM, 약 80mM, 약 90mM, 약 100mM, 약 110mM, 약 120mM, 약 130mM, 약 140mM, 약 150mM, 약 160mM, 약 170mM, 약 180mM, 약 190mM, 약 200mM, 약 210mM, 약 220mM, 약 230mM, 약 240mM, 약 250mM, 약 260mM, 약 270mM, 약 280mM, 약 290mM, 약 300mM, 약 310mM, 약 320mM, 약 330mM, 약 340mM, 약 350mM, 약 360mM , 약 370mM, 약 380mM, 약 390mM, 약 400mM, 약 410mM, 약 420mM, 약 430mM, 약 440mM, 약 450mM, 약 460mM, 약 470mM, 약 480mM, 약 490mM, 또는 약 500mM NaCl을 포함한다. 실시태양에서, PS80을 포함하는 투석 용액은 약 0.005%(v/v), 약 0.006%(v/v), 약 0.007%(v/v), 약 0.008%(v/v), 약 0.009%(v/v), 약 0.01%(v/v), 약 0.015%(v/v), 약 0.02%(v/v), 약 0.025%(v/v), 약 0.03%(v/v), 약 0.035%(v/v), 약 0.04%(v/v), 약 0.045%(v/v), 약 0.05%(v/v), 약 0.055%(v/v), 약 0.06%(v/ v), 약 0.065%(v/v), 약 0.07%(v/v), 약 0.075%(v/v), 약 0.08%(v/v), 약 0.085%(v/v), 약 0.09 %(v/v), 약 0.095%(v/v), 또는 약 0.1%(v/v) PS80을 포함한다. 실시태양에서, 투석 용액은 약 25mM 인산나트륨(pH 7.2), 약 300mM NaCl, 및 약 0.01%(v/v) PS80을 포함한다.

[0282] 세제 교환은 위에서 논의된 바와 같이 정제된 단백질로 수행되어 정제되고, 저장을 위해 냉동되고, 이어서 세제 교환을 위해 해동될 수 있다.

[0283] 본 명세서에 개시된 조성물의 안정성은 다양한 방식으로 측정될 수 있다. 한 접근법에서, 가혹한 저장 조건을 모방함으로써 나노입자에 스트레스를 가하도록 설계된 다양한 처리 후에 항원 단백질의 무결성을 결정하기 위해 펩타이드 맵이 제조될 수 있다. 따라서, 안정성의 척도는 대조군 샘플과 비교하여 스트레스를 받은 샘플에서 항원 펩타이드의 상대적 존재비이다. 예를 들어, CoV S 폴리펩타이드를 함유하는 나노입자의 안정성은 나노입자를 다양한 pH, 프로테아제, 염, 과산화수소를 포함하나 이에 제한되지 않는 산화제, 다양한 온도, 동결/해동 주기 및 교반에 노출시킴으로써 평가될 수 있다. 도 12a-b는 BV2373(SEQ ID NO: 87) 및 BV2365(SEQ ID NO: 4)가 다양한 스트레스 조건하에서 hACE2에 대한 결합을 유지함을 보여준다. 세제 코어에 고정된 당단백질의 위치는 바람직하지 않은 상호작용을 감소시켜 향상된 안정성을 제공하는 것으로 생각된다. 예를 들어, 프로테아제 기반 분해에 대한 개선된 보호는 차폐 효과를 통해 달성될 수 있으며, 이에 의해 당단백질을 본 명세서에 개시된 몰비로 고정시켜 프로테아제 접근을 차단하는 입체 장애를 초래한다. 안정성은 손상되지 않은 단백질을 모니터링하여 측정될 수 있다. 도 33 및 도 34는 각각 SEQ ID NO: 109 및 87의 아미노산 서열을 갖는 CoV 폴리펩타이드를 함유하는 나노입자를 비교한다. 도 34는 SEQ ID NO: 87의 아미노산 서열을 갖는 CoV 폴리펩타이드가 정제 동안 특히 우수한 안정성을 보이는 것을 나타낸다. 도 34의 폴리펩타이드는 QQAQ(SEQ ID NO: 7)의 아미노산 서열을 갖는 퓨린 절단 부위를 포함한다.

[0284] *CoV S 폴리펩타이드 항원을 함유하는 백신 조성물*

[0285] 본 발명은, 예를 들어, 나노입자에 CoV S 폴리펩타이드를 포함하는 백신 조성물을 제공한다. 양태에서, 백신 조성물은 동일한 종의 바이러스로부터의 하나 초과의 바이러스 균주로부터의 항원을 갖는 나노입자를 함유할 수 있다. 다른 실시태양에서, 본 발명은 백신 조성물의 성분 중 하나 이상으로 채워진 하나 이상의 용기를 포함하는 약학적 팩 또는 키트를 제공한다.

[0286] 본 명세서에 개시된 조성물은 예방적으로 또는 치료적으로 사용될 수 있지만, 전형적으로 예방적이다. 따라서, 본 발명은 감염을 치료 또는 예방하는 방법을 포함한다. 상기 방법은 본 발명의 면역원성 조성물의 치료적 또는 예방적 양을 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 바람직하게는, 약학적 조성물은 보호 효과를 제공하는 백신 조성물이다. 다른 양태에서, 보호 효과는 노출된 집단의 비율에서 감염과 관련된 증상의 개선을 포함할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 치료되지 않은 대상과 비교하여 발열 피로, 근육통, 두통, 인후통, 구토, 설사, 발진, 신장 및 간 기능 장애 증상, 내부 출혈 및 외부 출혈로부터 선택된 하나 이상의 바이러스 질환 증상을 예방 또는 감소시킬 수 있다.

[0287] 나노입자는 다양한 부형제, 버퍼 등의 존재하에 백신으로서 투여하기 위해 제제화될 수 있다. 예를 들어, 백신 조성물은 인산나트륨, 염화나트륨 및/또는 히스티딘을 함유할 수 있다. 인산나트륨은 약 10mM 내지 약 50mM, 약 15mM 내지 약 25mM, 또는 약 25mM; 특별한 경우에, 약 22mM 인산 나트륨이 존재한다. 히스티딘은 약 0.1%(w/v), 약 0.5%(w/v), 약 0.7%(w/v), 약 1%(w/v), 약 1.5%(w/v), 약 2%(w/v), 또는 약 2.5%(w/v)로 존재할 수 있다. 염화나트륨은 존재할 때 약 150mM일 수 있다. 특정 조성물에서, 염화나트륨은 더 높은 농도, 예를 들어 약 200mM 내지 약 500mM으로 존재할 수 있다. 실시태양에서, 염화나트륨은 약 200mM, 약 250mM, 약 300mM,

약 350mM, 약 400mM, 약 450mM, 또는 약 500mM을 포함하나 이에 제한되지 않는 고농도로 존재한다.

[0288] 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 나노입자는 특정 pH 수준에서 개선된 안정성을 갖는다. 실시태양에서, 나노입자는 약산성 pH 수준에서 안정하다. 예를 들어, 나노입자는 약산성 pH, 예를 들어 pH 5.8 내지 pH 7.0에서 안정하다. 실시태양에서, 나노입자 및 나노입자를 함유하는 조성물은 약 pH 5.9 내지 약 pH 6.8, 약 pH 6.0 내지 약 pH 6.5, 약 pH 6.1 내지 약 pH 6.4, 약 pH 6.1 내지 약 pH 6.3, 또는 약 pH 6.2를 포함하는 약 pH 5.8 내지 약 pH 7.0 범위의 pH에서 안정할 수 있다. 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 나노입자 및 조성물은 약 pH 7.0 내지 약 pH 7.4를 포함하는 중성 pH에서 안정하다. 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 나노입자 및 조성물은 약 알칼리성 pH, 예를 들어, 이 사이의 모든 값과 범위를 포함하는 약 pH 7.0 내지 약 pH 8.5, 약 pH 7.0 내지 약 pH 8.0, 또는 pH 7.0 내지 약 pH 7.5에서 안정하다.

[0289] *항원보강제*

[0290] 특정 실시태양에서, 본 발명에 개시된 조성물은 면역 반응을 향상시키기 위해 하나 이상의 항원보강제와 조합될 수 있다. 다른 실시태양에서, 조성물은 항원보강제 없이 제조되며, 따라서 항원보강제 없는 조성물로서 투여되도록 이용될 수 있다. 유리하게는, 본 발명에 개시된 항원보강제 없는 조성물은 단일 투여량으로 투여될 때 보호 면역 반응을 제공할 수 있다. 견고한 면역 반응을 유도하는 명반이없는 조성물은 성인 약 60세 이상에서 특히 유용하다.

[0291] *알루미늄 기반 항원보강제*

[0292] 실시태양에서, 항원보강제는 명반(예를 들어, $AlPO_4$ 또는 $Al(OH)_3$)일 수 있다. 전형적으로, 나노입자는 실질적으로 명반에 결합된다. 예를 들어, 나노입자는 명반에 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95% 결합될 수 있다. 종종, 나노입자는 조성물에서 명반에 92% 내지 97% 결합된다. 투여량 당 존재하는 명반의 양은 전형적으로 약 400㎍ 내지 약 1250㎍의 범위이다. 예를 들어, 명반은 약 300㎍ 내지 약 900㎍, 약 400㎍ 내지 약 800㎍, 약 500㎍ 내지 약 700㎍, 약 400㎍ 내지 약 600㎍, 또는 약 400㎍ 내지 약 500㎍의 투여량 당 존재할 수 있다. 전형적으로, 명반은 120㎍의 단백질 나노입자의 투여량에 대해 약 400㎍으로 존재한다.

[0293] *사포닌 항원보강제*

[0294] 사포닌을 함유하는 항원보강제는 또한 본 발명에 개시된 면역원과 조합될 수 있다. 사포닌은 퀼라야 사포나리아 몰리나(*Quillaja saponaria* Molina) 나무의 껍질에서 추출한 글리코사이드이다. 전형적으로, 사포닌은 다단계 정제 공정을 사용하여 여러 분획으로 제조된다. 본 발명에 사용된 바와 같이, 용어 "퀼라야 사포나리아 몰리나로부터의 사포닌 분획"은 퀼라야 시포나리아의 반정제 또는 정의된 사포닌 분획 또는 이의 실질적으로 순수한 분획을 기술하기 위해 일반적으로 사용된다.

[0295] *사포닌 분획*

[0296] 사포닌 분획을 생산하기 위한 몇 가지 접근법이 적합하다. 분획 A, B 및 C는 미국 특허 제6,352,697호에 기술되어 있으며 다음과 같이 제조될 수 있다. 미생물 인 퀼라야 사포나리아 몰리나 추출물인 Quil A의 친유성 분획을 크로마토그래피로 분리하고 물 속 70% 아세토나이트릴로 용출시켜 친유성 분획을 회수하였다. 그런 후에 이 친유성 분획은 산성수 속 25% 내지 60% 아세토나이트릴 구배를 사용하는 용출에 의한 반-분취용 HPLC에 의해 분리된다. 본 발명에서 "분획 A" 또는 "QH-A"로 불리는 분획은 약 39% 아세토나이트릴에서 용출되는 분획이거나, 분획에 상응한다. 본 발명에서 "분획물 B" 또는 "QH-B"로 불리는 분획은 약 47% 아세토나이트릴에서 용출되는 분획이거나, 분획에 상응한다. 본 발명에서 "분획 C" 또는 "QH-C"로 불리는 분획은 약 49% 아세토나이트릴에서 용출되는 분획이거나, 분획에 상응한다. 분획의 정제에 관한 추가 정보는 미국 특허 제5,057,540호에서 발견된다. 본 발명에 기술된 바와 같이 제조 될 때, 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A, B 및 C는 각각 정의 가능한 특성을 갖는 화학적으로 밀접하게 관련된 분자의 그룹 또는 패밀리를 나타낸다. 이들이 얻어지는 크로마토그래피 조건은 용출 프로파일 및 생물학적 활성의 면에서 배치-투-배치(batch-to-batch) 재현성이 매우 일정한 것이다.

[0297] 다른 사포닌 분획이 기술되어 있다. 분획 B3, B4 및 B4b가 EP 0436620에 기술된다. 분획 QA1-QA22는 EP 03632279 B2, Q-VAC(Nor-Feed, AS 덴마크), Quillaja saponaria Molina Spikoside(Isconova AB, Ultunaallen 2B, 756 51 Uppsala, Sweden)에 기술되어 있다. EP 03632279 B2의 분획 QA-1, QA-2, QA-3, QA-4, QA-5, QA-6, QA-7, QA-8, QA-9, QA-10, QA-11, QA-12, QA-13, QA-14, QA-15, QA-16, QA-17, QA-18, QA-19, QA-20, QA-21 및 QA-22, 특히 QA-7, QA-17, QA-18 및 QA-21이 사용될 수 있다. 이들은 EP 0 3632 279 B2, 특히 6 페이지 및 8 페이지 및 9 페이지의 실시예 1에 기술된 바와 같이 얻어진다.

[0298] 본 발명에 기술되고 항원보강제를 형성하기 위해 사용되는 사포닌 분획은 종종 실질적으로 순수한 분획이다; 즉, 분획은 다른 물질로부터의 오염의 존재가 실질적으로 없다. 특정 양태에서, 실질적으로 순수한 사포닌 분획은 40중량% 이하, 30중량% 이하, 25중량% 이하, 20중량% 이하, 15중량% 이하, 10중량% 이하, 7 중량% 이항, 5중량% 이하, 2중량% 이하, 1중량% 이하, 0.5중량% 이하 또는 0.1중량% 이하의 다른 사포닌 또는 다른 항원보강제 물질과 같은 다른 화합물을 함유할 수 있다.

[0299] *ISCOM 구조*

[0300] 사포닌 분획은 ISCOM(Immune Stimulating COMplex)이라 불리는 우리-유사(cage-like) 입자의 형태로 투여될 수 있다. ISCOM은 EP0109942B1, EP0242380B1 및 EP0180546B1에 기술된 바와 같이 제조될 수 있다. 특정 실시태양에서, EP 9600647-3(PCT/SE97/00289)에 기술된 바와 같이 트랜스포트 및/또는 패신저 항원이 사용될 수 있다.

[0301] *매트릭스 항원보강제*

[0302] 실시태양에서, ISCOM은 ISCOM 매트릭스 복합체이다. ISCOM 매트릭스 복합체는 적어도 하나의 사포닌 분획 및 지질을 포함한다. 지질은 적어도 콜레스테롤과 같은 스테롤이다. 특정 양태에서, ISCOM 매트릭스 복합체는 또한 인지질을 함유한다. ISCOM 매트릭스 복합체는 또한 반드시 글리코사이드가 아닌 하나 이상의 다른 면역조절(항원보강제-활성) 물질을 함유할 수 있으며 전문이 본 명세서에 참고로 포함되는 EP0436620B1에 기술된 바와 같이 제조될 수 있다.

[0303] 다른 양태에서, ISCOM은 ISCOM 복합체이다. ISCOM 복합체는 적어도 하나의 사포닌, 적어도 하나의 지질 및 적어도 하나의 항원 또는 에피토프를 함유한다. ISCOM 복합체는 항원의 일부가 입자 내로 통합되도록 세제 처리에 의해 결합된 항원을 함유한다. 대조적으로, ISCOM 매트릭스는 항원과의 혼합물로서 제제화되며, ISCOM 매트릭스 입자와 항원 사이의 결합은 정전기 및/또는 소수성 상호작용에 의해 매개된다.

[0304] 하나의 실시태양에 따르면, ISCOM 매트릭스 복합체 또는 ISCOM 복합체에 통합된 사포닌 분획 또는 ISCOM 또는 ISCOM 매트릭스 복합체에 통합되거나 이와 혼합 된 적어도 하나의 추가 항원보강제는 퀼라야 사포나리아, 퀼라야 사포나리아의 반정제 제제, 퀼라야 사포나리아의 정제 제제의 분획 A, 분획 B 또는 분획 C 또는 임의의 정제된 서브-분획, 예를 들어, QA 1-21로부터 선택된다.

[0305] 특정 태양에서, 각각의 ISCOM 입자는 적어도 2개의 사포닌 분획을 함유할 수 있다. 상이한 사포닌 분획의 중량%의 임의의 조합이 사용될 수 있다. 임의의 두 분획의 중량%의 임의의 조합이 사용될 수 있다. 예를 들어, 입자는 분획 A의 임의의 중량% 및 미정제 사포닌 분획 또는 분획 C와 같은 다른 사포닌 분획의 임의의 중량%를 함유할 수 있다. 따라서, 특정 양태에서, 각각의 ISCOM 매트릭스 입자 또는 각각의 ISCOM 복합체 입자는 0.1 내지 99.9중량%, 5 내지 95중량%, 10 내지 90중량%, 15 내지 85중량%, 20 내지 80중량%, 25 내지 75중량%, 30 내지 70중량%, 35 내지 65중량%, 40 내지 60중량%, 45 내지 55중량%, 40 내지 60중량% 또는 50중량% 사포닌 분획, 예를 들어, 분획 A 및 각각의 경우 나머지 100%까지의 다른 사포닌, 예를 들어, 임의의 미정제 분획 또는 임의의 다른 분획, 예를 들어, 분획 C를 함유할 수 있다. 중량은 사포닌 분획의 총 중량으로 계산된다. ISCOM 매트릭스 복합체 및 ISCOM 복합체 항원보강제의 예는 전문이 본 명세서에 참고로 포함되는 미국 공개 출원 제2013/0129770호에 개시되어 있다.

[0306] 특정 실시태양에서, ISCOM 매트릭스 또는 ISCOM 복합체는 5 내지 99중량%의 한 분획, 예를 들어, 분획 A 및 나머지 100중량%까지의 다른 분획, 예를 들어, 미정제 사포닌 분획 또는 분획 C을 포함한다. 중량은 사포닌 분획의 총 중량으로 계산된다.

[0307] 또 다른 실시태양에서, ISCOM 매트릭스 또는 ISCOM 복합체는 40중량% 내지 99중량%의 한 분획, 예를 들어, 분획 A 및 1중량% 내지 60중량%의 다른 분획, 미정제 사포닌 분획 또는 분획 C를 포함한다. 중량은 사포닌 분획의 총 중량으로 계산된다.

[0308] 또 다른 실시태양에서, ISCOM 매트릭스 또는 ISCOM 복합체는 70중량% 내지 95중량%의 한 분획, 예를 들어, 분획 A 및 30중량% 내지 5중량%의 다른 분획, 미정제 사포닌 분획 또는 분획 C를 포함한다. 중량은 사포닌 분획의 총 중량으로 계산된다. 다른 실시태양에서, 퀼라야 사포나리아 몰리나로부터의 사포닌 분획은 QA 1-21의 임의의 하나로부터 선택된다.

[0309] 사포닌 분획의 혼합물을 함유하는 입자 이외에, ISCOM 매트릭스 입자 및 ISCOM 복합체 입자는 단지 하나의 사포닌 분획을 사용하여 형성될 수 있다. 본 발명에 개시된 조성물은 다수의 입자를 함유할 수 있으며, 여기서 각각의 입자는 단 하나의 사포닌 분획을 함유한다. 즉, 특정 조성물은 하나 이상의 상이한 유형의 ISCOM-매트릭스

복합체 입자 및/또는 하나 이상의 상이한 유형의 ISCOM 복합체 입자를 함유할 수 있으며, 각각의 개별 입자는 퀼라야 사포나리아 몰리나로부터의 하나의 사포닌 분획을 함유하며, 여기서 한 복합체의 하나의 사포닌 분획은 다른 복합체 입자의 사포닌 분획과는 상이하다.

[0310] 특정 양태에서, 하나의 유형의 사포닌 분획 또는 미정제 사포닌 분획은 하나의 ISCOM 매트릭스 복합체 또는 입자로 통합될 수 있고 다른 유형의 실질적으로 순수한 사포닌 분획 또는 미정제 사포닌 분획은 다른 ISCOM 매트릭스 복합체 또는 입자 A로 통합될 수 있다. 조성물 또는 백신은 적어도 두 유형의 복합체 또는 입자를 포함할 수 있으며 각 유형은 물리적으로 상이한 입자로 통합된 하나의 유형의 사포닌을 갖는다.

[0311] 조성물에서, ISCOM 매트릭스 복합체 입자 및/또는 ISCOM 복합체 입자의 혼합물이 사용될 수 있고 여기서 하나의 사포닌 분획 퀼라야 사포나리아 몰리나 및 다른 사포닌 퀼라야 사포나리아 몰리나는 상이한 ISCOM 매트릭스 복합체 입자 및/또는 ISCOM 복합체 입자에 개별적으로 혼입된다.

[0312] 하나의 사포닌 분획을 각각 갖는 ISCOM 매트릭스 또는 ISCOM 복합체 입자는 중량%의 임의의 조합으로 조성물에 존재할 수 있다. 특정 양태에서, 조성물은 0.1중량% 내지 99.9중량%, 5중량% 내지 95중량%, 10중량% 내지 90중량%, 15중량% 내지 85중량%, 20중량% 내지 80중량%, 25중량% 내지 75중량%, 30중량% 내지 70중량%, 35중량% 내지 65중량%, 40중량% 내지 60중량%, 45중량% 내지 55중량%, 40중량% 내지 60중량% 또는 50중량%의 제 1 사포닌 분획을 함유하는 ISCOM 매트릭스 또는 복합체를 함유할 수 있고 나머지 부분은 상이한 사포닌 분획을 함유하는 ISCOM 매트릭스 또는 복합체로 구성되었다. 양태에서, 나머지 부분은 하나 이상의 ISCOM 매트릭스 또는 각 매트릭스 또는 복합 입자가 오직 하나의 사포닌 분획만을 함유하는 복합체이다. 다른 측면에서, ISCOM 매트릭스 또는 복합체 입자는 하나 이상의 사포닌 분획을 함유할 수 있다.

[0313] 특정 조성물에서, 제 1 ISCOM 매트릭스 또는 ISCOM 복합 입자의 최적 사포닌 분획은 분획 A이고, 제 2 ISCOM 매트릭스 또는 ISCOM 복합 입자의 최적 사포닌 분획은 분획 C이다.

[0314] 바람직한 조성물은 분획 A를 함유하는 제 1 ISCOM 매트릭스 및 분획 C를 함유하는 제 2 ISCOM 매트릭스를 포함하며, 여기서 분획 A ISCOM 매트릭스는 총 사포닌 항원보강제의 중량 당 약 70%를 구성하고, 분획 C ISCOM 매트릭스는 총 사포닌 항원보강제의 중량 당 약 30%를 구성한다. 또 다른 바람직한 조성물에서, 분획 A ISCOM 매트릭스는 총 사포닌 항원보강제의 중량 당 약 85%를 구성하고, 분획 C ISCOM 매트릭스는 총 사포닌 항원보강제의 중량 당 약 15%를 구성한다. 따라서, 특정 조성물에서, 분획 A ISCOM 매트릭스는 약 70% 내지 약 85%의 범위로 존재하고, 분획 C ISCOM 매트릭스는 조성물에서 사포닌 항원보강제의 총 중량의 약 15% 내지 약 30%의 범위로 존재한다. 실시태양에서, 분획 A ISCOM 매트릭스는 중량으로 50-96중량%를 차지하고 분획 C ISCOM 매트릭스는 항원보강제에서 분획 A ISCOM 매트릭스 및 분획 C ISCOM의 중량의 합계의 나머지를 각각 차지한다. 본 명세서에서 MATRIX-M™으로 지칭되는 특히 바람직한 조성물에서, 분획 A ISCOM 매트릭스는 조성물 중 사포닌 항원보강제의 총 중량의 약 85%로 존재하고 분획 C ISCOM 매트릭스는 약 15%로 존재한다. MATRIX-M™은 Matrix-M1으로 상호 교환 가능하게 지칭될 수 있다.

[0315] 예시적인 QS-7 및 QS-21 분획, 이들의 생산 및 이들의 용도는 미국 특허 제5,057,540호; 제6,231,859호; 제6,352,697호; 제6,524,584호; 제6,846,489호; 제7,776,343호 및 제8,173,141호에 개시되며, 이들은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0316] 실시태양에서, 다른 항원보강제가 추가로 또는 대안으로서 사용될 수 있다. 본 발명에 전문이 참조로 포함된 Vogel et al., "A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients (2nd Edition),"에 기술된 임의의 항원보강제의 포함은 본 발명의 범위 내에서 구상된다. 다른 항원보강제는 완전 프로인트 항원보강제(살상균 결핵균이 함유된 면역 반응의 비특이적 자극제), 불완전 프로인트 항원보강제 및 수산화 알루미늄 항원보강제를 포함한다. 다른 항원보강제는 GMCSP, BCG, thur-MDP 및 nor-MDP와 같은 MDP 화합물, CGP(MTP-PE), 지질 A 및 모노포스포릴 지질 A(MPL), MF-59, 박테리아, MPL, 트레할로스 다이미콜레이트(TDM)으로부터 추출된 3개 구성요소를 함유하는 RIBI 및 2% 스쿠알렌/TWEEN® 폴리소르베이트 80 에멀젼 속 세포벽 골격성분을 포함한다. 실시태양에서, 항원보강제는 소수층상 지질 소포일 수 있다; 예를 들어, 노바좀(NOVASOMES)®. 노바좀(NOVASOMES)®은 약 100nm 내지 약 500nm 범위의 소수층상 비인지질 소포이다. 이들은 BRIJ® 알코올 에톡실레이트 72, 콜레스테롤, 올레산 및 스쿠알렌을 포함한다. NOVASOMES®은 효과적인 항원보강제인 것으로 나타났다(미국 특허 제5,629,021호, 제6,387,373호 및 제4,911,928호 참조).

[0317] *투여 및 투여량*

[0318] 실시태양에서, 본 발명은 하나 이상의 코로나바이러스에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 실시태양에서, 반응은 SARS-CoV-2 바이러스, MERS 및 SARS 중 하나 이상에 대한 것이다. 실시태양에서, 반응은 이종 SARS-CoV-2 균주에 대한 것이다. 이종 SARS-CoV-2 균주의 비제한적인 예는 Cal.20C SARS-CoV-2 균주, P.1 SARS-CoV-2 균주, B.1.351 SARS-CoV-2 균주 및 B.1.1.7 SARS-CoV-2 균주를 포함한다. 이 방법은 나노입자를 함유하거나 재조합 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드를 함유하는 조성물의 면역학적 유효량을 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 유리하게는, 본 명세서에 개시된 단백질은 특히 유용한 항-코로나바이러스 반응 중 하나 이상을 유도한다.

[0319] 실시태양에서, 나노입자 또는 CoV S 폴리펩타이드는 항원보강제와 함께 투여된다. 양태에서, 나노입자 또는 CoV S 폴리펩타이드는 항원보강제 없이 투여된다. 양태에서, 항원보강제는 예를 들어 비공유 상호작용에 의해 나노입자에 결합될 수 있다. 다른 양태에서, 항원보강제는 나노입자와 함께 투여되지만, 항원보강제와 나노입자는 실질적으로 상호작용하지 않는다.

[0320] 실시태양에서, 나노입자 또는 CoV S 폴리펩타이드는 SARS-CoV-2 감염, 이종 SARS-CoV-2 균주 감염, SARS 감염, 또는 MERS 감염 중 하나 이상의 예방 및/또는 치료에 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 SARS-CoV-2 바이러스, MERS 및 SARS 중 하나 이상에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 방법은 나노입자 또는 CoV S 폴리펩타이드를 함유하는 조성물의 면역학적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함한다. 유리하게는, 본 명세서에 개시된 단백질은 특히 유용한 항-코로나바이러스 반응을 유도한다.

[0321] 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 나노입자 또는 CoV S 폴리펩타이드를 함유하는 조성물은 나노입자 또는 CoV S 폴리펩타이드의 마지막 투여량 투여 후 최대 약 3개월, 최대 약 4개월, 최대 약 5개월, 최대 약 6개월, 최대 약 7개월, 최대 약 8개월, 최대 약 9개월, 최대 약 10개월, 최대 약 11개월, 최대 약 12개월, 최대 약 13개월, 최대 약 14개월, 최대 약 15개월, 최대 약 16개월, 최대 약 17개월, 최대 약 18개월, 최대 약 19개월, 최대 약 20개월, 최대 약 20개월, 최대 21개월, 최대 약 22개월, 최대 약 23개월, 최대 약 24개월, 최대 약 2.5년, 최대 약 3년, 최대 약 3.5년, 최대 약 4년, 최대 약 4.5년, 최대 약 5년 동안 대상에서 SARS-CoV-2 또는 이종 SARS-CoV-2 균주에 대한 보호 반응을 유도한다. 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 나노입자 또는 CoV S 폴리펩타이드는 적어도 6개월 동안 대상에서 보호 반응을 유도한다.

[0322] 실시태양에서, 보호 반응은 SARS-CoV-2 또는 이종 SARS-CoV-2 균주에 의해 발생하는 무증상 감염에 대한 것이다. 실시태양에서, 보호 반응은 SARS-CoV-2 또는 이종 SARS-CoV-2 균주에 의해 발생하는 증상 감염에 대한 것이다.

[0323] 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 나노입자 또는 CoV S 폴리펩타이드를 함유하는 조성물은 본 명세서에 기술된 나노입자 또는 CoV S 폴리펩타이드의 최종 투여 후 약 1개월 이하, 약 2개월 이하, 약 2.5개월 이하, 약 3개월 이하, 약 3.5개월 이하, 약 4개월 이하, 약 4.5개월 이하, 약 5개월 이하, 최대 약 5.5개월, 최대 약 6개월, 최대 약 6.5개월, 최대 약 7개월, 최대 약 7.5개월, 최대 약 8개월, 최대 약 8.5개월, 최대 약 9개월, 최대 약 9.5개월 이하, 약 10개월 이하, 약 10.5개월 이하, 약 11개월 이하, 약 11.5개월 이하, 약 12개월 이하, 약 12.5개월 이하, 약 13개월 이하, 약 13.5개월 이하 개월, 최대 약 14개월, 최대 약 14.5개월, 최대 약 15개월, 최대 약 15.5개월, 최대 약 16개월, 최대 약 16.5개월, 최대 약 17개월, 최대 약 17.5개월, 최대 약 18개월, 최대 약 18.5개월, 최대 약 19개월, 최대 약 19.5개월, 최대 약 20개월, 최대 약 20.5개월, 최대 약 21개월, 최대 약 21.5개월, 최대 약 22개월, 최대 약 22.5개월, 최대 약 23개월, 최대 약 23.5개월, 최대 약 24개월, 최대 약 2.1년, 최대 약 2.2년, 최대 약 2.3년, 최대 약 2.4개월 나노입자 또는 CoV의 마지막 투여량 투여 후 최대 약 2.5년, 최대 약 2.6년, 최대 약 2.7년, 최대 약 2.8년, 최대 약 2.9년, 최대 약 3년 또는 그 이상 동안 약 50% 내지 약 99%, 약 80% 내지 약 99%, 약 75% 내지 약 99%, 약 80% 내지 약 95%, 약 90% 내지 약 98%, 약 75% 내지 약 95%, 약 80% 내지 약 90%, 약 85% 내지 약 95%, 약 80% 내지 약 95%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%인 SARS-CoV-2 바이러스 또는 이종 SARS-CoV-2 균주(예를 들어, B.1.1.7 SARS-CoV-2 균주, B.1.351 SARS-CoV-2 균주, P.1 SARS-CoV-2 균주, B.1.617.2 SARS-CoV-2 균주, B.1.525 SARS- CoV-2 균주, B.1.526 SARS-CoV-2 균주, B.1.617.1 SARS-CoV-2 균주, C.37 SARS-CoV-2 균주, B.1.621 SARS-CoV-2 균주 또는 Cal.20C SARS-CoV-2 균주)에 의한 코로나바이러스 질환-19(COVID-19)를 예방하는 데 효능을 갖는다. 실시태양에서, COVID-19는 경증 COVID-19이다. 실시태양에서, COVID-19는 중등도 COVID-19이다. 실시태양에서, COVID-19는 중증 COVID-19이다. 실시태양에서, COVID-19는 무증상 COVID-19이다.

[0324] 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 나노입자 또는 CoV S 폴리펩타이드를 함유하는 조성물은 본 명세서에 기술된 나노입자 또는 CoV S 폴리펩타이드의 마지막 투여량 투여 후 최대 약 7.5개월 동안 적어도 82%의 SARS-CoV-2 바이러스 또는 이종 SARS-CoV-2 균주에 대한 효능을 갖는다. 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 나노입자 또는 CoV S 폴리펩타이드를 함유하는 조성물은 본 명세서에 기술된 나노입자 또는 CoV S 폴리펩타이드의 마지막 투여량 투여 후 최대 약 7.5개월 동안 약 80% 내지 약 90%의 SARS-CoV-2 바이러스 또는 이종 SARS-CoV-2 균주에 대한 효능을 갖는다.

[0325] 실시태양에서, 나노입자 또는 CoV S 폴리펩타이드를 함유하는 조성물은 무증상 질환에 대해 적어도 75%의 효능을 갖는다. 실시태양에서, 나노입자 또는 CoV S 폴리펩타이드는 최대 약 1개월, 최대 약 2개월, 최대 약 2.5개월, 최대 약 3개월, 최대 약 3.5개월, 최대 약 4개월, 최대 약 4.5개월, 최대 약 5개월, 최대 약 5.5개월, 최대 약 6개월, 최대 약 6.5개월, 최대 약 7개월, 최대 약 7.5개월, 최대 약 8개월, 최대 약 8.5개월, 최대 약 9개월, 최대 약 9.5개월, 최대 약 10개월, 최대 약 10.5개월, 최대 약 11개월, 최대 약 11.5개월, 최대 약 12개월, 최대 약 12.5개월, 최대 약 13개월, 최대 약 13.5개월, 최대 약 14개월, 최대 약 14.5개월, 최대 약 15개월, 최대 약 15.5개월, 최대 약 16개월, 최대 약 16.5개월, 최대 약 17개월, 최대 약 17.5개월, 최대 약 18개월, 최대 약 18.5개월, 최대 약 19개월, 최대 약 19.5개월, 최대 약 20개월, 최대 약 20.5개월, 최대 약 21개월, 최대 약 21.5개월, 최대 약 22개월, 최대 약 22.5개월, 최대 약 23개월, 최대 약 23.5개월, 또는 최대 약 24개월, 또는 그 이상 동안 유증상 COVID-19에 대해 80% 내지 90%, 80% 내지 99%, 82% 내지 99%, 82% 내지 95%, 85% 내지 95%, 85% 내지 99%, 85% 내지 97%, 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 효능을 갖는다.

[0326] 실시태양에서, 나노입자 또는 CoV S 폴리펩타이드를 함유하는 조성물은 최대 약 1개월, 최대 약 2개월, 최대 약 2.5개월, 최대 약 3개월, 최대 약 3.5개월, 최대 약 4개월, 최대 약 4.5개월, 최대 약 5개월, 최대 약 5.5개월, 최대 약 6개월, 최대 약 6.5개월, 최대 약 7개월, 최대 약 7.5개월, 최대 약 8개월, 최대 약 8.5개월, 최대 약 9개월, 최대 약 9.5개월, 최대 약 10개월, 최대 약 10.5개월, 최대 약 11개월, 최대 약 11.5개월, 최대 약 12개월, 최대 약 12.5개월, 최대 약 13개월, 최대 약 13.5개월, 최대 약 14개월, 최대 약 14.5개월, 최대 약 15개월, 최대 약 15.5개월, 최대 약 16개월, 최대 약 16.5개월, 최대 약 17개월, 최대 약 17.5개월, 최대 약 18개월, 최대 약 18.5개월, 최대 약 19개월, 최대 약 19.5개월, 최대 약 20개월, 최대 약 20.5개월, 최대 약 21개월, 최대 약 21.5개월, 최대 약 22개월, 최대 약 22.5개월, 최대 약 23개월, 최대 약 23.5개월, 또는 최대 약 24개월, 또는 그 이상 동안 유증상 COVID-19에 대해 95% 내지 97%, 95% 내지 99%, 95% 내지 98%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 효능을 갖는다.

[0327] 실시태양에서, 나노입자 또는 CoV S 폴리펩타이드를 함유하는 조성물은 최대 약 1개월, 최대 약 2개월, 최대 약 2.5개월, 최대 약 3개월, 최대 약 3.5개월, 최대 약 4개월, 최대 약 4.5개월, 최대 약 5개월, 최대 약 5.5개월, 최대 약 6개월, 최대 약 6.5개월, 최대 약 7개월, 최대 약 7.5개월, 최대 약 8개월, 최대 약 8.5개월, 최대 약 9개월, 최대 약 9.5개월, 최대 약 10개월, 최대 약 10.5개월, 최대 약 11개월, 최대 약 11.5개월, 최대 약 12개월, 최대 약 12.5개월, 최대 약 13개월, 최대 약 13.5개월, 최대 약 14개월, 최대 약 14.5개월, 최대 약 15개월, 최대 약 15.5개월, 최대 약 16개월, 최대 약 16.5개월, 최대 약 17개월, 최대 약 17.5개월, 최대 약 18개월, 최대 약 18.5개월, 최대 약 19개월, 최대 약 19.5개월, 최대 약 20개월, 최대 약 20.5개월, 최대 약 21개월, 최대 약 21.5개월, 최대 약 22개월, 최대 약 22.5개월, 최대 약 23개월, 최대 약 23.5개월, 또는 최대 약 24개월, 또는 그 이상 동안 중등도 COVID-19에 대해 75% 내지 95%, 75% 내지 90%, 75% 내지 85%, 75% 내지 98%, 80% 내지 98%, 80% 내지 95%, 80% 내지 90%, 85% 내지 98%, 85% 내지 95%, 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 효능을 갖는다.

[0328] 실시태양에서, 나노입자 또는 CoV S 폴리펩타이드를 함유하는 조성물은 최대 약 1개월, 최대 약 2개월, 최대 약 2.5개월, 최대 약 3개월, 최대 약 3.5개월, 최대 약 4개월, 최대 약 4.5개월, 최대 약 5개월, 최대 약 5.5개월, 최대 약 6개월, 최대 약 6.5개월, 최대 약 7개월, 최대 약 7.5개월, 최대 약 8개월, 최대 약 8.5개월, 최대 약 9개월, 최대 약 9.5개월, 최대 약 10개월, 최대 약 10.5개월, 최대 약 11개월, 최대 약 11.5개월, 최대 약 12개월, 최대 약 12.5개월, 최대 약 13개월, 최대 약 13.5개월, 최대 약 14개월, 최대 약 14.5개월, 최대 약 15개월, 최대 약 15.5개월, 최대 약 16개월, 최대 약 16.5개월, 최대 약 17개월, 최대 약 17.5개월, 최대 약 18

개월, 최대 약 18.5개월, 최대 약 19개월, 최대 약 19.5개월, 최대 약 20개월, 최대 약 20.5개월, 최대 약 21개월, 최대 약 21.5개월, 최대 약 22개월, 최대 약 22.5개월, 최대 약 23개월, 최대 약 23.5개월, 또는 최대 약 24개월, 또는 그 이상 동안 경증 COVID-19에 대해 40% 내지 95%, 40% 내지 90%, 40% 내지 85%, 40% 내지 80%, 40% 내지 75%, 40% 내지 70%, 40% 내지 65%, 40% 내지 60%, 50% 내지 95%, 50% 내지 90%, 50% 내지 85%, 50% 내지 80%, 50% 내지 75%, 50% 내지 70%, 50% 내지 65%, 50% 내지 60%, 적어도 40%, 적어도 41%, 적어도 42%, 적어도 43%, 적어도 44%, 적어도 45%, 적어도 46%, 적어도 47%, 적어도 48%, 적어도 49%, 적어도 50%, 적어도 51%, 적어도 52%, 적어도 53%, 적어도 54%, 적어도 55%, 적어도 56%, 적어도 57%, 적어도 58%, 적어도 59%, 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 효능을 갖는다.

[0329] 본 발명에 개시된 조성물은 전신 경로 또는 점막 경로 또는 경피 경로를 통해 또는 특정 조직 내로 직접 투여될 수 있다. 본 발명에서 사용된 바와 같이 용어 "전신 투여"는 비경구 투여 경로를 포함한다. 특히, 비경구 투여는 피하, 복강내, 정맥내, 동맥내, 근육내 또는 흉골내 주사, 정맥내 또는 신장 투석 주입 기술을 포함한다. 전형적으로, 전신 비경구 투여는 근육내 주사이다. 본 발명에 사용된 바와 같이 용어 "점막 투여"는 경구, 비강내, 질내, 직장내, 기관내, 장 및 안과 투여를 포함한다. 바람직하게는, 투여는 근육내 투여이다.

[0330] 조성물은 단일 투여량 계획 또는 다중 투여량 계획으로 투여될 수 있다. 다중 투여량은 1차 접종 일정이나 부스터 예방 접종 일정에 사용될 수 있다. 실시태양예에서, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30회 투여량이 투여된다. 다중 투여량 계획에서, 다양한 투여량은 동일한 또는 상이한 경로, 예를 들어 비경구 프라임 및 점막 부스트, 점막 프라임 및 비경구 부스트 등에 의해 제공될 수 있다. 양태에서, 부스트 투여량은 1차 투여량 후 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 2개월, 약 3개월, 약 4개월, 약 5개월, 약 6개월, 약 7개월, 약 3개월, 8개월, 약 9개월, 약 10개월, 약 11개월, 약 12개월(1년), 약 2년, 약 3년, 약 4년, 약 5년, 약 6년, 약 7년, 약 8년, 약 9년, 또는 약 10년에 투여된다. 실시태양에서, 부스트 투여량은 최초 투여량 투여 후 매년 투여된다. 실시태양에서, 후속 부스트 투여량은 이전 투여량의 투여 후 3주 또는 4주에 투여된다. 실시태양에서, 1차 투여량은 0일에 투여되고, 부스트 투여량은 21일에 투여된다. 실시태양에서, 1차 투여량은 0일에 투여되고, 부스트 투여량은 28일에 투여된다. 실시태양에서, 1차 투여량은 0일에 투여되고, 부스트 투여량은 21일에 투여되고, 2차 부스트 투여량은 1차 투여량 투여 후 약 6개월 후에 투여된다. 실시태양에서, 1차 투여량은 0일에 투여되고, 부스트 투여량은 28일에 투여되고, 2차 부스트 용량은 1차 용량 투여 후 약 6개월 후에 투여된다. 실시태양에서, 1차 투여량은 0일에 투여되고, 부스트 투여량은 21일에 투여되고, 2차 부스트 투여량은 2차 투여량 투여 후 약 6개월 후에 투여된다. 실시태양에서, 1차 투여량은 0일에 투여되고, 부스트 투여량은 28일에 투여되고, 2차 부스트 투여량은 2차 투여량 투여 후 약 6개월 후에 투여된다.

[0331] 실시태양에서, 부스트 투여량은 초기 투여량과 동일한 면역학적 조성물을 포함한다. 실시태양에서, 부스트 투여량은 초기 투여량과 다른 면역학적 조성물을 포함한다. 실시태양에서, 다른 면역학적 조성물은 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질, SARS-Cov-2 스파이크 당단백질을 암호화하는 mRNA, SARS-Cov-2 스파이크 당단백질을 암호화하는 플라스미드 DNA, SARS-Cov-2 스파이크 당단백질을 암호화하는 바이러스 벡터 또는 불활성화된 SARS-CoV-2 바이러스이다. 실시태양에서, 부스트 투여량은 초기 조성물을 포함한다. 실시태양에서, 초기 투여량은 SARS-CoV-2 S 당단백질(예를 들어, SEQ ID NO: 87의 아미노산 서열을 갖는 SARS CoV-2 S 당단백질)을 포함하고, 부스트 용량은 동일한 SARS-CoV-2 S 당단백질(예를 들어, SEQ ID NO: 87의 아미노산 서열을 갖는 SARS CoV-2 S 당단백질)을 포함한다. 실시태양에서, 초기 투여량은 초기 투여량은 SARS-CoV-2 S 당단백질(예를 들어, SEQ ID NO: 87의 아미노산 서열을 갖는 SARS CoV-2 S 당단백질)을 포함하고, 부스트 용량은 다른 SARS-CoV-2 S 당단백질(예를 들어, SEQ ID NO: 132의 아미노산 서열을 갖는 SARS CoV-2 S 당단백질)을 포함한다. 실시태양에서, 초기 투여량은 SARS-CoV-2 S 당단백질(예를 들어, SEQ ID NO: 87의 아미노산 서열을 갖는 SARS CoV-2 S 당단백질 및 SEQ ID NO: 132의 아미노산 서열을 갖는 SARS CoV-2 S 당단백질)의 조합을 포함한다. 실시태양에서, 부스트 투여량은 SARS-CoV-2 S 당단백질(예를 들어, SEQ ID NO: 87의 아미노산 서열을 갖는 SARS CoV-2 S 당단백질 및 SEQ ID NO: 132의 아미노산 서열을 갖는 SARS CoV-2 S 당단백질)의 조합을 포함한다. 실시태양에서, 초기 투여량은 SARS-CoV-2 S 당단백질, SARS-Cov-2 S 당단백질을 암호화하는 플라스미드 DNA, SARS-CoV-2 스파이크 당단백질을 암호화하는 바이러스 벡터 또는 불활성화된 SARS-CoV-2 바이러스를 포함한다. 실시태양에서, 초기 투여량은 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질, SARS-CoV-2 스파이크 당단백질을 암호화하는 플라스미드 DNA, SARS-Cov-2 스파

이크 당단백질을 암호화하는 바이러스 벡터 또는 불활성화된 SARS-CoV-2 바이러스를 포함하며, 부스트 투여량은 하나 이상의 SARS-CoV-2 S 당단백질을 포함한다.

[0332] 일부 실시태양에서, μg 단위로 측정된 투여량은 용질을 포함하는 투여량의 총 중량, 또는 CoV S 폴리펩타이드 나노입자의 중량, 또는 CoV S 폴리펩타이드의 중량일 수 있다. 투여량은 A280 또는 ELISA의 단백질 농도 분석을 사용하여 측정된다.

[0333] 소아 투여를 포함하는 항원의 투여량은 약 5μg 내지 약 25μg, 약 1μg 내지 약 300μg, 약 90μg 내지 약 270μg, 약 100μg 내지 약 160μg, 약 110μg 내지 약 150μg, 약 120μg 내지 약 140μg, 또는 약 140μg 내지 약 160μg의 범위일 수 있다. 실시태양에서, 투여량은 명반과 함께 투여된 약 120μg이다. 양태에서, 소아 투여량은 약 1μg 내지 약 90μg의 범위일 수 있다. 실시태양에서, CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드의 용량은 이 사이의 모든 값과 범위를 포함하는 약 1μg, 약 2μg, 약 3μg, 약 4μg, 약 5μg, 약 6μg, 약 7μg, 약 8μg, 약 9μg, 10μg, 약 11μg, 약 12μg, 약 13μg, 약 14μg, 약 15μg, 약 16μg, 약 17μg, 약 18μg, 약 19μg, 약 20μg, 약 21μg, 약 22μg, 약 23μg, 약 24μg, 약 25μg, 약 26μg, 약 27μg, 약 28μg, 약 29μg, 약 30μg, 약 40μg, 약 50μg, 약 60μg, 약 70μg, 약 80μg, 약 90μg, 약 100μg, 약 110μg, 약 120μg, 약 130μg, 약 140μg, 약 150μg, 약 160μg, 약 170μg, 약 180μg, 약 190μg, 약 200μg, 약 210μg, 약 220μg, 약 230μg, 약 240μg, 약 250μg, 약 260μg, 약 270μg, 약 280μg, 약 290μg, 또는 약 300μg이다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드의 투여량은 5μg이다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드의 투여량은 25μg이다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드의 투여량은 초기 투여량과 부스트 용량에 대해 동일하다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드의 투여량은 초기 투여량 및 부스트 투여량과 다르다.

[0334] 특정 집단은 항원보강제와 함께 또는 항원보강제 없이 투여될 수 있다. 특정 양태에서, 조성물은 첨가된 항원보강제가 없을 수 있다. 그러한 상황에서 투여량은 약 10% 증가될 수 있다.

[0335] 실시태양에서, 비-천연 CoV S 폴리펩타이드와 함께 투여되는 항원보강제의 투여량은 약 1μg 내지 약 100μg, 예를 들어, 약 1μg, 약 2μg, 약 3μg, 약 4μg, 약 5μg, 약 6μg, 약 7μg, 약 8μg, 약 9μg, 약 10μg, 약 11μg, 약 12μg, 약 13μg, 약 14μg, 약 15μg, 약 16μg, 약 17μg, 약 18μg, 약 19μg, 약 20μg, 약 21μg, 약 22μg, 약 23μg, 약 24μg, 약 25μg, 약 26μg, 약 27μg, 약 28μg, 약 29μg, 약 30μg, 약 31μg, 약 32μg, 약 33μg, 약 34μg, 약 35μg, 약 36μg, 약 37μg, 약 38μg, 약 39μg, 약 40μg, 약 41μg, 약 42μg, 약 43μg, 약 44μg, 약 45μg, 약 46μg, 약 47μg, 약 48μg, 약 49μg, 약 50μg, 약 51μg, 약 52μg, 약 53μg, 약 54μg, 약 55μg, 약 56μg, 약 57μg, 약 58μg, 약 59μg, 약 60μg, 약 61μg, 약 62μg, 약 63μg, 약 64μg, 약 65μg, 약 66μg, 약 67μg, 약 68μg, 약 69μg, 약 70μg, 약 71μg, 약 72μg, 약 73μg, 약 74μg, 약 75μg, 약 76μg, 약 77μg, 약 78μg, 약 79μg, 약 80μg, 약 81μg, 약 82μg, 약 83μg, 약 84μg, 약 85μg, 약 86μg, 약 87μg, 약 88μg, 약 89μg, 약 90μg, 약 91μg, 약 92μg, 약 93μg, 약 94μg, 약 95μg, 약 96μg, 약 97μg, 약 98μg, 약 99μg, 또는 약 100μg의 항원보강제이다. 실시태양에서, 항원보강제의 투여량은 약 50μg이다. 실시태양에서, 항원보강제는 사포닌 항원보강제, 예를 들어 MATRIX-M™이다.

[0336] 실시태양에서, 투여량은 약 0.1mL 내지 약 1.5mL, 예를 들어, 약 0.1mL, 약 0.2mL, 약 0.25mL, 약 0.3mL, 약 0.4mL, 약 0.5mL, 약 0.5mL, 약 0.5mL의 부피로 투여된다. 0.6mL, 약 0.7mL, 약 0.8mL, 약 0.9mL, 약 1.0mL, 약 1.1mL, 약 1.2mL, 약 1.3mL, 약 1.4mL, 또는 약 1.5mL의 부피로 투여된다. 실시태양에서, 투여량은 0.25mL의 부피로 투여된다. 실시태양에서, 투여량은 0.5mL의 부피로 투여된다. 실시태양에서, 투여량은 0.6mL의 부피로 투여된다.

[0337] MERS, SARS 또는 SARS-CoV-2 코로나바이러스에 대한 백신에 대한 특정 실시태양에서, 투여량은 약 1μg/mL 내지 약 50μg/mL, 약 10μg/mL 내지 약 100μg/mL, 약 10μg/mL 내지 약 50μg/mL, 약 175μg/mL 내지 약 325μg/mL, 약 200μg/mL 내지 약 300μg/mL, 약 220μg/mL 내지 약 280μg/mL, 또는 약 240μg/mL 내지 약 260μg/mL의 CoV S 폴리펩타이드 농도를 포함할 수 있다.

[0338] 다른 실시태양에서, 본 발명은 유효량의 나노입자 또는 CoV S 폴리펩타이드를 조성물에 첨가하는 단계를 포함하여 포유동물에 대한 감염 또는 이의 하나 이상의 질환 증상에 대한 면역을 유도하는 백신 조성물을 제제화하는 방법을 제공한다. 개시된 CoV S 폴리펩타이드 및 나노입자는 감염원에 대한 면역 또는 실질적인 면역을 부여하는 면역 반응을 자극하는 조성물을 제조하는 데 유용하다. 따라서, 한 실시태양에서, 본 발명은 적어도 1회 유효 용량의 나노입자 및/또는 CoV S 폴리펩타이드를 투여하는 단계를 포함하여 대상에서 감염 또는 이의 하나 이상의 질환 증상에 대한 면역을 유도하는 방법을 제공한다.

[0339] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드 또는 이를 포함하는 나노입자는 추가의 면역원성 조성물과 조합하여 투여된

다. 실시태양에서, 추가의 면역원성 조성물은 SARS-CoV-2에 대한 면역 반응을 유도한다. 실시태양에서, 추가의 면역원성 조성물은 개시된 CoV S 폴리펩타이드 또는 이를 포함하는 나노입자의 약 1분, 약 5분, 약 10분, 약 20분, 약 30분, 약 40분, 약 50분, 약 1시간, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 6시간, 약 7시간, 약 8시간, 약 9시간, 약 10시간, 약 11시간, 약 12시간, 약 13시간, 약 14시간, 약 15시간, 약 16 시간, 약 17시간, 약 18시간, 약 19시간, 약 20시간, 약 21시간, 약 22시간, 약 23시간, 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 7일, 약 8일, 약 9일, 약 10일, 약 11일, 약 12일, 약 13일, 약 14일, 약 15일, 약 16일, 약 17일, 약 18일 일, 약 19일, 약 20일, 약 21일, 약 22일, 약 23일, 약 24일, 약 25일, 약 26일, 약 27일, 약 28일, 약 29일, 약 30일, 또는 약 31일 내에 투여된다. 실시태양에서, 추가 조성물은 CoV S 폴리펩타이드 또는 이를 포함하는 나노입자를 포함하는 조성물의 제 1 투여량과 함께 투여된다. 실시태양에서, 추가 조성물은 CoV S 폴리펩타이드 또는 이를 포함하는 나노입자를 포함하는 조성물의 부스트 투여량과 함께 투여된다.

[0340] 실시태양에서, 추가 면역원성 조성물은 SARS-Cov-2 스파이크 당단백질을 암호화하는 mRNA, SARS-Cov-2 스파이크 당단백질을 암호화하는 플라스미드 DNA, SARS-Cov-2 스파이크 당단백질을 암호화하는 바이러스 벡터, 또는 불활성화된 SARS-CoV-2 바이러스를 포함한다.

[0341] 실시태양에서, 추가 면역원성 조성물은 CoV S 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA를 포함한다. 실시태양에서, mRNA는 SEQ ID NO: 1의 위치 986 및 987에서 프롤린 치환을 포함하는 CoV S 폴리펩타이드를 암호화한다. 실시태양에서, mRNA는 온전한 퓨린 절단 부위를 포함하는 CoV S 폴리펩타이드를 암호화한다. 실시태양에서, mRNA는 SEQ ID NO: 1의 위치 986 및 987에서 프롤린 치환 및 온전한 퓨린 절단 부위를 포함하는 CoV S 폴리펩타이드를 암호화한다. 실시태양에서, mRNA는 SEQ ID NO: 1의 위치 986 및 987에서 프롤린 치환 및 불활성 퓨린 절단 부위를 포함하는 CoV S 폴리펩타이드를 암호화한다. 실시태양에서, mRNA는 SEQ ID NO: 87의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드를 암호화한다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA는 지질 나노입자에 캡슐화된다. CoV S 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA를 포함하는 예시적인 면역원성 조성물은 전문이 본 명세서에 참고로 포함되는 Jackson et al. N. Eng. J. Med. 2020. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2-preliminary report에 기술된다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA를 포함하는 조성물은 25㎍, 100㎍, 또는 250㎍의 투여량으로 투여된다.

[0342] 실시태양에서, 추가 면역원성 조성물은 CoV S 폴리펩타이드를 암호화하는 아데노바이러스 벡터를 포함한다. 실시태양에서, AAV 벡터는 야생형 CoV S 폴리펩타이드를 암호화한다. 실시태양에서, AAV 벡터는 SEQ ID NO: 1의 위치 986 및 987에서 프롤린 치환 및 온전한 퓨린 절단 부위를 포함하는 CoV S 폴리펩타이드를 암호화한다. 실시태양에서, AAV 벡터는 SEQ ID NO: 1의 위치 986 및 987에서 프롤린 치환 및 불활성 퓨린 절단 부위를 포함하는 CoV S 폴리펩타이드를 암호화한다. 실시태양에서, AAV 벡터는 SEQ ID NO: 87의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드를 암호화한다. 다음 간행물은 CoV S 폴리펩타이드를 암호화하는 아데노바이러스 벡터를 포함하는 면역원성 조성물을 설명하며, 이들 각각은 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다: van Doremalen N. et al. A single dose of ChAdOx1 MERS provides protective immunity in rhesus macaques. Science Advances, 2020; van Doremalen N. et al. ChAdOx1 nCoV-19 vaccination prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques. bioRxiv, (2020).

[0343] 실시태양에서, 추가 면역원성 조성물은 데옥시리보핵산(DNA)을 포함한다. 실시태양에서, 추가 면역원성 조성물은 플라스미드 DNA를 포함한다. 실시태양에서, 플라스미드 DNA는 CoV S 폴리펩타이드를 암호화한다. 실시태양에서, DNA는 SEQ ID NO: 1의 위치 986 및 987에서 프롤린 치환 및 온전한 퓨린 절단 부위를 포함하는 CoV S 폴리펩타이드를 암호화한다. 실시태양에서, DNA는 SEQ ID NO: 1의 위치 986 및 987에서 프롤린 치환 및 불활성 퓨린 절단 부위를 포함하는 CoV S 폴리펩타이드를 암호화한다. 실시태양에서, DNA는 SEQ ID NO: 87의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드를 암호화한다.

[0344] 실시태양에서, 추가 면역원성 조성물은 불활성화된 바이러스 백신을 포함한다.

[0345] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드 또는 CoV S 폴리펩타이드를 포함하는 나노입자는 SARS-CoV-2 또는 이종 SARS-CoV-2 균주에 의해 유발된 감염이 확인되었거나 사전에 확인된 환자에게 투여된다. SARS-CoV-2 또는 이종 SARS-CoV-2 균주에 의한 감염은 핵산 증폭 테스트(예를 들어, 중합효소 연쇄 반응) 또는 혈청학적 테스트(예를 들어, SARS-CoV-2 바이러스 항원에 대한 항체 테스트)를 통해 확인될 수 있다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드 또는 CoV S 폴리펩타이드를 포함하는 나노입자는 환자가 COVID-19로 진단된 후 적어도 약 3일, 적어도 약 1주, 적어도 약 2주, 적어도 약 3주, 적어도 약 4주 후에 환자에게 투여된다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드 또는 CoV S 폴리펩타이드를 포함하는 나노입자는 환자가 COVID-19로 진단된 후 1주 내지 1년 사이, 예를 들어

약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 1개월, 약 2개월, 약 3개월, 약 4개월, 약 5개월, 약 6개월, 약 7개월, 약 8개월, 약 9개월, 약 10개월, 약 11개월, 또는 약 1년 동안 환자에게 투여된다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드 또는 CoV S 폴리펩타이드를 포함하는 나노입자는 환자가 COVID-19로 진단된 후 1주 내지 20년, 예를 들어 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 1개월, 약 2개월, 약 3개월, 약 4개월, 약 5개월, 약 6개월, 약 7개월, 약 8개월, 약 9개월, 약 10개월, 약 11개월, 약 1년, 약 2년, 약 3년, 약 4년, 약 5년, 약 6년, 약 7년, 약 8년, 약 9년, 약 10년, 약 11년, 약 12년 약 13년, 약 14년, 약 15년, 약 16년, 약 17년, 약 18년, 약 19년, 또는 약 20년 동안 환자에게 투여된다.

[0346] 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드 또는 이를 포함하는 나노입자는 환자에게 제 1 면역원성 조성물이 투여된 후에 투여된다. 제 1 면역원성 조성물의 비제한적인 예는 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질, SARS-Cov-2 스파이크 당단백질을 암호화하는 mRNA, SARS-Cov-2 스파이크 당단백질을 암호화하는 플라스미드 DNA, SARS-Cov-2 스파이크 당단백질을 암호화하는 바이러스 벡터 또는 불활성화된 SARS-CoV-2 바이러스를 포함한다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드 또는 이를 포함하는 나노입자는 제 1 면역원성 조성물의 투여 후 약 1주 내지 약 1년, 약 1주 내지 1개월, 약 3주 내지 4주, 약 1주 내지 5년, 약 1년 내지 약 5년, 약 1년 내지 약 3년, 약 3년 내지 약 5년, 약 5년 내지 약 10년, 약 1년 내지 약 10년, 또는 약 1년 내지 약 2년에 투여된다. 실시태양에서, CoV S 폴리펩타이드 또는 이를 포함하는 나노입자는 제 1 면역원성 조성물 투여 후 약 1주 내지 약 1년, 예를 들어 제 1 면역원성 조성물 투여 후 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 7주, 약 8주, 약 9주, 약 10주, 약 1개월, 약 2개월, 약 3개월, 약 4개월, 약 5개월, 약 6개월, 약 7개월, 약 8개월, 약 9개월, 약 10개월, 약 11개월, 또는 약 1년에 투여된다.

[0347] 실시태양에서, CoV S 단백질 또는 CoV S 단백질을 포함하는 나노입자는 MERS, SARS, SARS-CoV-2 및 이종 SARS-CoV-2 균주 중 하나 이상에 대한 면역 또는 실질적인 면역을 부여하는 면역 반응을 자극하는 면역원성 조성물을 제조하는 데 유용하다. 점막 면역과 세포 면역 모두는 감염과 질환에 대한 면역에 기여할 수 있다. 상기도에서 국소적으로 분비되는 항체는 자연 감염에 대한 내성의 주요 요인이다. 분비성 면역글로불린 A(sIgA)는 상기도 보호에 관여하고 혈청 IgG는 하기도 보호에 관여한다. 감염에 의해 유도된 면역 반응은 동일한 바이러스 또는 항원적으로 유사한 바이러스 균주에 의한 재감염으로부터 보호한다.

[0348] 본 명세서에 개시된 나노입자로 면역화된 후 숙주에서 생성된 항체는 또한 다른 사람에게 투여될 수 있으며, 이로써 대상에서 수동 투여를 제공할 수 있다.

[0349] 실시태양에서, CoV S 단백질 또는 CoV S 단백질을 포함하는 나노입자는 다음으로부터 선택된 하나 이상의 변형이 있는 S 단백질을 함유하는 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 교차 중화 항체를 유도한다:

[0350] (a) NTD의 하나 이상의 아미노산의 결실, 여기서 하나 이상의 아미노산은 아미노산 56, 57, 131, 132, 229, 230, 231 또는 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다; 및

[0351] (b) NTD의 하나 이상의 아미노산의 돌연변이, 여기서 하나 이상의 돌연변이는 아미노산 67, 82, 133, 229, 202, 209, 240, 139, 5, 233, 7, 13, 125, 177, 또는 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다;

[0352] (c) RBD의 하나 이상의 아미노산의 돌연변이, 여기서 하나 이상의 돌연변이는 아미노산 488, 404, 471, 464, 439, 481, 426, 440 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다;

[0353] (d) SD1/2의 하나 이상의 아미노산으로의 돌연변이, 여기서 하나 이상의 아미노산은 601, 557, 668, 642 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다;

[0354] (e) 불활성 퓨린 절단 부위(아미노산 669-672의 하나 이상의 돌연변이에 해당);

[0355] (f) S2 서브유닛의 하나 이상의 아미노산의 결실, 여기서 아미노산은 676-702, 702-711, 775-793, 806-815; 및 이의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다;

[0356] (g) S2 서브유닛의 하나 이상의 아미노산의 돌연변이, 여기서 아미노산은 973, 974, 703, 1105, 688, 969, 1014 및 1163; 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다;

[0357] (h) TMCT로부터 하나 이상의 아미노산(아미노산 1201-1260)의 결실, 여기서 CoV S 당단백질의 아미노산은 SEQ ID NO: 2에 대해 번호가 매겨진다.

[0358] 실시태양에서, CoV S 단백질 또는 CoV S 단백질을 포함하는 나노입자는 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 아미노산 131의 결실, N488Y, A557D, D601G, P668H, T703I, S969A, D1105H, N426K, 및 Y440F로부터 선택된

하나 이상의 변형을 갖는 S 단백질을 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 교차-중화 항체를 유도하며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다.

[0359] 실시태양에서, CoV S 단백질 또는 CoV S 단백질을 포함하는 나노입자는 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 아미노산 131의 결실, N488Y, A557D, D601G, P668H, T703I, S969A 및 D1105H로부터 선택된 하나 이상의 변형을 갖는 S 단백질을 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 교차-중화 항체를 유도하며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다.

[0360] 실시태양에서, CoV S 단백질 또는 CoV S 단백질을 포함하는 나노입자는 D67A, D202G, L229H, K404N, E471K, N488Y, D601G 및 A688V로부터 선택된 하나 이상의 변형을 갖는 S 단백질을 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 교차-중화 항체를 유도하며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다.

[0361] 실시태양에서, CoV S 단백질 또는 CoV S 단백질을 포함하는 나노입자는 아미노산 229-231의 결실, D67A, D202G, K404N, E471K, N488Y, D601G 및 A688V로부터 선택된 하나 이상의 변형을 갖는 S 단백질을 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 교차-중화 항체를 유도하며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다.

[0362] 실시태양에서, CoV S 단백질 또는 CoV S 단백질을 포함하는 나노입자는 아미노산 229-231, L5F, D67A, D202G, K404N, E471K, N488Y, D601G 및 A688V로부터 선택된 하나 이상의 변형을 갖는 S 단백질을 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 교차-중화 항체를 유도하며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다.

[0363] 실시태양에서, CoV S 단백질 또는 CoV S 단백질을 포함하는 나노입자는 L5F, T7N, P13S, D125Y, R177S, K404T, E471K, N488Y, D601G, H642Y, T1014I 및 V1163F로부터 선택된 하나 이상의 변형을 갖는 S 단백질을 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 교차-중화 항체를 유도하며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다.

[0364] 실시태양에서, CoV S 단백질 또는 CoV S 단백질을 포함하는 나노입자는 W139C 및 L439R로부터 선택된 하나 이상의 변형을 갖는 S 단백질을 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 교차-중화 항체를 유도하며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, W139C 및 L439R 변형을 포함하는 CoV S 단백질은 SEQ ID NO: 117 또는 SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열을 갖는 신호 펩타이드로 발현된다. 실시태양에서, CoV S 단백질 또는 CoV S 단백질을 포함하는 나노입자는 D601G, W139C 및 L439R로부터 선택된 하나 이상의 변형을 갖는 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 교차-중화 항체를 유도하며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, D601G, W139C 및 L439R 변형을 포함하는 CoV S 단백질 또는 나노입자는 SEQ ID NO: 117 또는 SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열을 갖는 신호 펩타이드로 발현된다.

[0365] 실시태양에서, CoV S 단백질 또는 CoV S 단백질을 포함하는 나노입자는 D601G, L5F, D67A, D202G, 아미노산 229-231의 결실, R233I, K404N, E471K, N488Y 및 A688V로부터 선택된 하나 이상의 변형을 갖는 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 교차-중화 항체를 유도하며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 실시태양에서, CoV S 단백질 또는 CoV S 단백질을 포함하는 나노입자는 L5F, D67A, D202G, 아미노산 229-231의 결실, R233I, K404N, E471K, N488Y 및 A688V로부터 선택된 하나 이상의 변형을 갖는 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 교차-중화 항체를 유도하며, 아미노산은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다.

[0366] 실시태양에서, 본 발명은 고친화성 항-MERS-CoV, 항-SARS-CoV, 및 항-SARS-CoV-2 바이러스 항체 중 하나 이상을 생산하는 방법을 제공한다. 본 명세서에 개시된 나노입자로 면역화에 의해 생성된 고친화성 항체는 S CoV 폴리펩타이드 또는 S CoV 폴리펩타이드를 포함하는 나노입자를 포함하는 면역원성 조성물을 동물에게 투여하고, 동물로부터 혈청 및/또는 혈장을 수집하고, 혈청 및/또는 혈장으로부터의 항체를 정제하여 생산된다. 한 실시태양에서, 동물은 인간이다. 실시태양에서, 동물은 닭, 마우스, 기니피그, 래트, 토끼, 염소, 인간, 말, 양 또는 소이다. 한 실시태양에서, 동물은 소 또는 말이다. 다른 실시태양에서, 소 또는 말 동물은 형질전환이다. 다른 실시태양에서, 형질전환 소 또는 말 동물은 인간 항체를 생산한다. 실시태양에서, 동물은 모노클로날 항체를 생산한다. 실시태양에서, 동물은 다클론 항체를 생산한다. 한 실시태양에서, 방법은 항원보강제 또는 면역 자극 화합물의 투여를 추가로 포함한다. 추가 실시태양에서, 정제된 고친화성 항체는 인간 대상에게 투여된다. 한 실시

태양에서, 인간 대상은 MERS, SARS 및 SARS-CoV-2 중 하나 이상에 감염될 위험이 있다.

[0367] 실시태양에서, CoV S 단백질 또는 나노입자는 인플루엔자 당단백질 또는 인플루엔자 당단백질을 포함하는 나노입자와 함께 투여된다. 적합한 당단백질 및 나노입자는 미국 공개 번호 2018/0133308 및 미국 공개 번호 2019/0314487에 기술되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 본 명세서에 참고로 포함된다. 실시태양에서, CoV S 단백질 또는 나노입자는 (a) 세제-코어 나노입자, 여기서 세제-코어 나노입자는 B형 인플루엔자 균주로부터의 재조합 인플루엔자 혈구응집소(HA) 당단백질을 포함한다; 및 (b) 헤마글루티닌 사포닌 매트릭스 나노입자(HaSMaN), 여기서 HaSMaN은 A형 인플루엔자 균주 및 ISCOM 매트릭스 항원보강제로부터의 재조합 인플루엔자 HA 당단백질을 포함한다. 실시태양에서, CoV S 단백질 또는 나노입자는 비이온성 세제 코어 및 인플루엔자 HA 당단백질을 포함하는 나노입자와 공동 투여되며, 여기서 인플루엔자 HA 당단백질은 비이온성 세제 코어 및 비이온성 세제 코어와 결합하는 막횡단 도메인으로부터 바깥쪽으로 돌출하는 헤드 영역을 함유하며, 여기서 인플루엔자 HA 당단백질은 HA0 당단백질이고, 인플루엔자 HA 당단백질의 아미노산 서열은 천연 인플루엔자 HA 단백질의 아미노산 서열과 100% 동일성을 갖는다. 실시태양에서, 인플루엔자 당단백질 또는 나노입자는 CoV S 단백질 또는 나노입자와 공동제제화된다.

[0368] 본 발명에 인용된 모든 특허, 특허 출원, 참고문헌 및 저널 기사는 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 여기에 명시적으로 포함된다.

[0369] **실시예**

[0370] **실시예 1**

[0371] **코로나바이러스 스파이크(S) 폴리펩타이드 나노입자의 발현 및 정제**

[0372] 천연 코로나바이러스 스파이크(S) 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 1 및 SEQ ID NO: 2) 및 SEQ ID NOS: 3, 4, 38, 41, 44, 48, 51, 54, 58, 61, 63, 65, 67, 73, 75, 78, 79, 82, 83, 85, 87, 106, 108, 89, 112-115, 132, 133, 114, 138, 141, 144, 147, 151, 153, 156, 158, 164-168에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 CoV 스파이크 폴리펩타이드는 바큘로바이러스 발현 시스템에서 발현되었고 코로나바이러스 스파이크(S) 폴리펩타이드를 발현하는 재조합 플라크를 선별하고 확인하였다. 각각의 경우에 신호 펩타이드는 SEQ ID NO: 5이다. 도 4 및 도 9는 CoV 스파이크 폴리펩타이드 BV2364, BV2365, BV2366, BV2367, BV2368, BV2369, BV2373, BV2374, 및 BV237의 성공적인 정제를 보여준다. 표 2는 앞서 언급한 CoV 스파이크 폴리펩타이드의 서열 특성을 보여준다.

[0373] [표 2]

[0374] 선택된 CoV 스파이크 폴리펩타이드

CoV S 폴리펩타이드	변형	SEQ ID NO.
BV2364	결실된 N-말단 도메인	48
BV2365	불활성 퓨린 절단 부위	4
BV2361 / BV2366	야생형	2
BV2367	아미노산 676-685의 결실, 불활성 퓨린 절단 부위	63
BV2368	아미노산 702-711의 결실, 불활성 퓨린 절단 부위	65
BV2369	아미노산 806-815의 결실, 불활성 퓨린 절단 부위	67
"NVX-CoV2373"로 본 발명에서 불리는 조성물로 제제화된 BV2373	불활성 퓨린 절단 부위, K973P 돌연변이, V974P 돌연변이	87
BV2374	K973P 돌연변이, V974P 돌연변이	85
BV2374	불활성 퓨린 절단 부위 및 His-tag	58
BV2384	불활성 퓨린 절단 부위 (GSAS), K973P, V974P 돌연변이	110
BV2425	불활성 퓨린 절단 부위, K973P, V974P 돌연변이, 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 아미노산 131의 결실, N488Y 돌연변이, A557D 돌연변이, D601G 돌연변이, P668H 돌연변이, T703I 돌연변이, S969A 돌연변이, 및 D1105H 돌연변이	114
BV2426	불활성 퓨린 절단 부위, K973P 돌연변이, V974P 돌연변이, D67A 돌연변이, D202G 돌연변이, L229H 돌연변이, K404N 돌연변이, E471K 돌연변이, N488Y 돌연변이, D601G 돌연변이, 및 A688V 돌연변이	115
BV2438	불활성 퓨린 절단 부위 (QQAQ: SEQ ID NO: 7), K973P 돌연변이, V974P 돌연변이, K404N 돌연변이, E471K 돌연변이, N488Y 돌연변이, D67A 돌연변이, D202G 돌연변이, L229H 돌연변이, D601G 돌연변이, A688V 돌연변이	132
BV2423	불활성 퓨린 절단 부위 (GG), K973P 돌연변이, V974P 돌연변이, D601G 돌연변이	133
BV2425	불활성 퓨린 절단 부위 (QQAQ: SEQ ID NO: 7), K973P 돌연변이, V974P 돌연변이, 아미노산 56, 57, 및 131의 결실, N488Y 돌연변이, A557D 돌연변이, D601G 돌연변이, P668H 돌연변이, T703I 돌연변이, S969A 돌연변이, D1105H 돌연변이	114

[0375]

BV2425-2	불활성 퓨린 절단 부위 (GG), K973P 돌연변이, V974P 돌연변이, 아미노산 56, 57, 및 131의 결실, N488Y 돌연변이, A557D 돌연변이, D601G 돌연변이, P668H 돌연변이, T703I 돌연변이, S969A 돌연변이, D1105H 돌연변이	138
BV2439	불활성 퓨린 절단 부위 (GG), K973P 돌연변이, V974P 돌연변이, K404N 돌연변이, E471K 돌연변이, N488K 돌연변이, D67A 돌연변이, D202G 돌연변이, L229H 돌연변이, D601G 돌연변이, A688V 돌연변이	141
BV2441	불활성 퓨린 절단 부위 (QQAQ: SEQ ID NO: 7), K973P 돌연변이, V974P 돌연변이, K404N 돌연변이, E471K 돌연변이, N488Y 돌연변이, D67A 돌연변이, D202G 돌연변이, D601G 돌연변이, A688V 돌연변이, 아미노산 229-231의 결실	144
BV2442	불활성 퓨린 절단 부위 (GG), K973P 돌연변이, V974P 돌연변이, K404N 돌연변이, E471K 돌연변이, N488Y 돌연변이, D67A 돌연변이, D202G 돌연변이, D601G 돌연변이, A688V 돌연변이, 아미노산 229-231의 결실	147
BV2443	불활성 퓨린 절단 부위 (QQAQ: SEQ ID NO: 7), K973P 돌연변이, V974P 돌연변이, T7N 돌연변이, P13S 돌연변이, D125Y 돌연변이, R177S 돌연변이, K404T 돌연변이, E471K 돌연변이, N488Y 돌연변이, D601G 돌연변이, H642Y 돌연변이, T1014Y 돌연변이, V1163F 돌연변이	151
BV2448	불활성 퓨린 절단 부위 (QQAQ: SEQ ID NO: 7), K973P 돌연변이, V974P 돌연변이, W139C 돌연변이, S481P 돌연변이, D601G 돌연변이, L439R 돌연변이	153
BV1.526NY-1	불활성 퓨린 절단 부위 (QQAQ: SEQ ID NO: 7), K973P 돌연변이, V974P 돌연변이, T82I 돌연변이, D240G 돌연변이, E471K 돌연변이, D601G 돌연변이, A688V 돌연변이	156

[0376]

BV1.526NY-2	불활성 퓨린 절단 부위 (QQAQ: SEQ ID NO: 7), K973P 돌연변이, V974P 돌연변이, T82I 돌연변이, D240G 돌연변이, E464K 돌연변이, D601G 돌연변이, A688V 돌연변이	158
BV2465	돌연변이: T6R, G129D, R145G, L439R, T465K, D601G, P668R, D937G, K973P, V974P, 불활성 퓨린 절단 부위 (QQAQ: SEQ ID NO: 7), 결실: 143, 144	164
BV2457	T82I, G129D, E141K, L439R, T471Q, D601G, P668R, Q1058H, K973P, V974P, 불활성 퓨린 절단 부위 (QQAQ: SEQ ID NO: 7)	165
BV2472	돌연변이: T6R, G129D, R145G, K404N, L439R, T465K, D601G, P668R, D937G, W245I, K973P, V974P, 불활성 퓨린 절단 부위 (QQAQ: SEQ ID NO: 7), 결실: 143, 144	166
BV2480	T82I, Y131S, Y132N, R333K, E471K, N488Y, D601G,P668H, D937N, 불활성 퓨린 절단 부위 (QQAQ: SEQ ID NO: 7), K973P 돌연변이, V974P 돌연변이	167
BV2481	T82I, Y131T, Y132S, R333K, E471K, N488Y, D601G, P668H, D937N, 불활성 퓨린 절단 부위 (QQAQ: SEQ ID NO: 7), K973P 돌연변이, V974P 돌연변이 아미노산 132 뒤에 아스파라긴의 삽입	168

[0377]

[0378] 야생형 BV2361 단백질(SEQ ID NO: 2)은 인간 안지오텐신 전환효소 2 전구체(hACE2)에 결합한다. CoV S 폴리펩타이드의 결합을 평가하기 위해 생물층 간섭계 및 ELISA를 수행하였다.

[0379] *생물층 간섭계(BLI)*

[0380] Octet QK384 시스템(Pall Forte Bio, Fremont, CA)을 사용하여 BLI 실험을 수행하였다. His 태그가 붙은 인간 ACE2(2㎍ mL-1)를 니켈 충전 Ni-NTA 바이오센서 팁에 고정하였다. 기준선 후, SARS-CoV-2 S 단백질 함유 샘플을 연속적으로 2배 희석하고 600초 동안 결합되도록 한 후 추가로 900초 동안 해리하였다. 데이터는 Octet 소프트웨어 HT 101:1 글로벌 커브 핏으로 분석되었다.

[0381] CoV S 폴리펩타이드 BV2361, BV2365, BV2369, BV2365, BV2373, BV2374는 hACE2에 결합하는 능력을 보유한다(도 5, 도 11a-c). 해리 동역학은 S-단백질이 유체상 S 단백질의 부재하에서 관찰의 900초에 걸쳐 최소 또는 해리 없음에 의해 명백한 바와 같이 단단히 결합된 채로 남아 있음을 보여주었다(도 11a-c).

[0382] 또한, 결합은 특이적이다. 야생형 CoV S 단백질 BV2361과 CoV S 폴리펩타이드 BV2365 및 BV2373은 MERS-CoV 수용체 다이펩티딜 펩티다제 IV(DPP4)에 결합하지 않는다. 또한, MERS S 단백질은 인간 안지오텐신 전환 효소 2 전구체(hACE2)에 결합하지 않는다(도 6 및 도 11d-f).

[0383] *ELISA*

[0384] hACE2에 대한 CoV S 폴리펩타이드의 특이성은 ELISA에 의해 확인되었다. 96개의 웰 플레이트를 4℃에서 밤새 100μL SARS-CoV-2 스파이크 단백질(2μg/mL)로 코팅하였다. 플레이트를 0.05% Tween(PBS-T) 완충액이 포함된 인산염 완충 식염수로 세척하고 TBS Startblock 차단 완충액(ThermoFisher, Scientific)으로 차단하였다. His-태그된 hACE2 및 hDPP4 수용체를 3배 연속 희석하고(5-0.0001㎍/mL) 실온에서 2시간 동안 코팅된 웰에 첨가하였다. 플레이트를 PBS-T로 세척하였다. 최적으로 희석된 양고추냉이 퍼옥시다제(HRP) 접합된 항히스티딘을 첨가하고 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 퍼옥시다제 기질(TMB, T0440-IL, Sigma, St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 발색하였다. SpectraMax Plus 플레이트 판독기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 450nm의 OD에서 플레이트를 읽고 SoftMax 소프트웨어로 데이터를 분석하였다. EC50 값은 GraphPad Prism 7.05 소프트웨어를 사용하여 4-파라미터 피팅에 의해 계산하였다.

[0385] ELISA 결과는 야생형 CoV S 폴리펩타이드(BV2361), BV2365 및 BV2373 단백질이 hACE2에 특이적으로 결합했지만 MERS-CoV(IC_{50} > 5000ng mL-1)에 의해 사용되는 hDPP-4 수용체에는 결합하지 못함을 보여주었다. 야생형 CoV S 폴리펩타이드와 BV2365는 유사한 친화도로 hACE2에 결합한 반면(IC50 = 36-38ng/mL), BV2373은 2배 더 낮은 농도(IC_{50} = 18ng/mL)에서 hACE2 결합의 50% 포화에 도달하였다(도 7, 도 11d-f).

[0386] *단백질 및 나노입자 생산*

[0387] 재조합 바이러스는 Sf9 곤충 세포의 감염에 의해 증폭된다. 곤충 세포의 배양물은 ~3 MOI(감염 다중도 = 바이러스 ffu 또는 pfu/cell)에서 바큘로바이러스로 감염시킨다. 배양물 및 상청액을 감염 후 48-72시간에 수확한다. 대략 30mL의 조 세포 수확물을 대략 800 x g에서 15분 동안 원심분리하여 정화한다. 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질을 함유하는 생성된 미정제 세포 수확물은 하기에 기술된 바와 같이 나노입자로 정제된다.

[0388] 나노입자를 생성하기 위해, 비이온성 계면활성제 TERGITOL® 노닐페놀 에톡실레이트 NP-9가 막 단백질 추출 프로토콜에 사용된다. 미정제 추출은 음이온 교환 크로마토그래피, 렌틸 렉틴 친화도/HIC 및 양이온 교환 크로마토그래피를 통해 추가로 정제된다. 세척된 세포는 세제 처리에 의해 용해된 다음 BV 및 Sf9 숙주 세포 DNA 및 단백질의 침전을 유도하는 낮은 pH 처리를 받는다. 중화된 저 pH 처리 용해물은 두 번째 저 pH 처리가 수행되기 전에 정화되고 음이온 교환 및 친화성 크로마토그래피에서 추가로 정제된다.

[0389] 친화성 크로마토그래피는 Sf9/BV 단백질, DNA 및 NP-9를 제거할 뿐만 아니라 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질을 농축하는 데 사용된다. 간단히 말해서, 렌즈콩 렉틴은 칼슘과 망간을 함유하는 금속 단백질로, 글루코스 또는 만노오스를 함유하는 글리코실화 단백질과 다당류에 가역적으로 결합한다. 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질 함유 음이온 교환 흐름 통과 분획은 렌틸 렉틴 친화성 크로마토그래피 수지(Capto Lentil Lectin, GE Healthcare)에 적재된다. 글리코실화된 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질은 수지에 선택적으로 결합되는 반면 글리코실화되지 않은 단백질과 DNA는 컬럼 흐름을 통해 제거된다. 약하게 결합된 당단백질은 높은 염도와 낮은 몰 농도의 메틸 알파-D-만노피라노사이드(MMP)를 함유하는 완충액에 의해 제거된다.

[0390] 컬럼 세척은 또한 NP-9 세제를 계면활성제 폴리소르베이트 80(PS80)으로 세제 교환하는 데 사용된다. 코로나바이러스 스파이크(S) 폴리펩타이드는 MMP 농도가 높은 렌즈콩 렉틴 컬럼에서 나노입자 구조로 용출된다. 용출 후, 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질 삼량체는 세제 코어에 포함된 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질 삼량체와 PS80으로 구성된 나노입자로 조립된다.

[0391] **실시예 2**

[0392] **마우스에서 코로나바이러스 스파이크(S) 폴리펩타이드 나노입자 백신의 면역원성**

[0393] 실시예 1에 기술된 바와 같은 SEQ ID NO: 87의 CoV S 폴리펩타이드("BV2373"으로도 불림)를 포함하는 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질 조성물을 암컷 BALB/c 마우스(7-9주령; Harlan Laboratories Inc., Frederick, MD)를 사용하여 쥐 모델에서 면역원성 및 독성에 대해 평가하였다. 조성물은 사포닌 항원보강제, 예를 들어 MATRIX-M™의 존재 및 부재하에서 평가되었다. MATRIX-M™을 함유하는 조성물은 5㎍의 MATRIX-M™을 함유하였다. 0.01㎍, 0.1㎍, 1㎍ 및 10㎍을 포함한 다양한 투여량의 코로나바이러스 스파이크(S) 폴리펩타이드를 함유하는 백신은 단일 투여량(단일 프라이밍 투여량이라고도 함)(연구 14일차) 또는 14일 간격으로 2회 투여량(프라임/부스트 요법이라고도 함)(연구 0일 및 14일)으로 근육내 투여되었다. 위약 그룹은 면역되지 않은 대조군으로 사용되었다. 연구일-1, 13, 21 및 28일에 분석을 위해 혈청을 수집하였다. 백신을 접종한 동물과 대조군 동물은 1회(단일 투여량) 또는 2회(2회 투여량) 면역 접종 후 42일에 SARS-CoV-2로 비강내로 면역성 검사를 받았다.

[0394] *백신 면역원성*

[0395] 0.1-10㎍ BV2373 및 MATRIX-M™의 단일 프라이밍 투여량으로 면역화된 동물은 단일 면역화 후 21-28일에 검출된 상승된 항-S IgG 역가를 가졌다(도 13b). 10㎍ 투여량의 BV2373 및 MATRIX-M™으로 면역화된 마우스는 단일 프라이밍 투여량 후 21-28일에 검출된 CoV S 단백질 및 바이러스 중화 항체에 대한 hACE2 수용체 결합을 차단하는 항체를 생성하였다(도 14 및 도 15). 프라임/부스트 요법(2회 투여량)으로 면역화된 동물은 모든 투여량 수준에 걸쳐 추가 면역화 후 7-16일에 검출된 유의하게 상승된 항-S IgG 역가를 가졌다(도 13a). BV2373(1㎍ 및 10㎍) 및 MATRIX-M™으로 면역화된 동물은 면역화 후 유사한 높은 항-S IgG 역가를 가졌다(각각 GMT = 139,000 및 84,000). BV2373(0.1㎍, 1㎍ 또는 10㎍) 및 MATRIX-M™으로 면역화된 마우스는 항원보강제 없이 10㎍ BV2373으

로 면역화된 마우스에 비해 유의하게($p \leq 0.05$ 및 $p \leq 0.0001$) 더 높은 항-S IgG 역가를 가졌다(도 13a). 이러한 결과는 MATRIX-M™ 항원보강제가 제공하는 10-100배 투여량 절약 가능성을 나타낸다. 또한, BV2373 및 MATRIX-M™의 2회 투여량에 의한 면역화는 모든 투여량 수준에서 S-단백질(IC50 = 218 - 1642)에 대한 hACE2 수용체 결합을 차단하고 Vero E6 세포에 대한 SARS-CoV-2의 세포변성 효과(CPE)를 중화시키는(CPE의 100% 차단 = 7680 - 20,000) 고역가 항체를 유도하였다(도 14 및 도 15).

[0396] *SARS CoV-2 면역성 검사*

[0397] 보호 면역의 유도를 평가하기 위해, 면역화된 마우스를 SARS-CoV-2로 면역성검사하였다. 마우스는 야생형 SARS-CoV-2 바이러스의 복제를 지원하지 않기 때문에 초기 백신 접종 후 52일째에, 마우스를 hACE2(Ad/hACE2)를 발현하는 아데노바이러스로 비강 내 감염시켜 허용 가능하게(permissive) 만들었다. 마우스에 1.5×10^5 pfu의 SARS-CoV-2를 콧구멍 사이에 나누어 50μL로 비강 접종하였다. 면역성 검사된 마우스의 체중을 감염 당일 및 감염 후 최대 7일 동안 매일 칭량하였다. 감염 4일 및 7일 후, 각 백신 및 대조군에서 5마리의 마우스를 희생시키고, 폐를 채취하여 폐 조직학을 위해 준비하였다.

[0398] 바이러스 역가는 플라크 분석에 의해 정량화되었다. 간략하게, 수확된 폐는 1.0mm 유리 비드(Sigma Aldrich) 및 비드럽터(Beadruptor)(Omini International Inc.)를 사용하여 PBS에서 균질화되었다. 균질물은 융합 배양물 근처의 Vero E6에 첨가되었고 SARS-CoV-2 바이러스 역가는 6점 희석 곡선을 사용하여 플라크 형성 단위(pfu)를 계산하여 결정되었다.

[0399] 감염 4일 후, 위약 처리된 마우스는 10^4 SARS-CoV-2 pfu/lung를 갖는 반면, MATRIX-M™ 없이 BV2363으로 면역화된 마우스는 10^3 pfu/lung를 가졌다(도 16). MATRIX-M™ 프라임 전용 마우스 그룹이 있는 BV2373은 바이러스 역가에서 투여량 의존적 감소를 나타냈으며, 10μg BV2373 투여량의 접종자는 감염 후 4일째에 검출 가능한 바이러스가 없었다. 1μg, 0.1μg 및 0.01μg BV2373 투여량을 받은 마우스는 모두 위약 백신을 접종한 마우스와 비교하여 역가의 현저한 감소를 보여주었다. 프라임/부스트 그룹에서, 10μg, 1μg 및 0.1μg 투여량으로 면역화된 마우스는 거의 검출할 수 없는 폐 바이러스 부하를 가졌던 반면, 0.01μg 그룹은 위약 동물에 비해 1 log 감소의 감소를 나타냈다.

[0400] 체중 감소는 바이러스 부하 결과와 유사하였다. BV2373(0.1μg, 1μg 및 10μg) 및 MATRIX-M™의 단일 투여량을 투여받은 동물은 백신 접종되지 않은 위약 동물과 비교하여 체중 감소로부터 현저한 보호를 나타냈다(도 17a). 항원보강제와 함께 프라임 및 부스트 투여량을 받은 마우스는 또한 모든 투여량 수준에서 체중 감소에 대해 상당한 보호를 나타냈다(도 17b-c). 체중 감소에 대한 보호에 대한 항원보강제의 존재 효과를 평가하였다. 프라임/부스트(2회 투여량)와 항원보강제를 투여받은 마우스는 위약에 비해 체중 감소로부터 유의하게 보호된 반면, 항원보강제 없이 면역화된 그룹은 그렇지 않았다(도 17c). 이러한 결과는 BV2373이 SARS-CoV-2에 대한 보호를 제공하고 낮은 혈청학적 반응과 관련된 낮은 투여량의 백신이 체중 감소를 악화시키거나 과장된 질환을 나타내지 않는다는 것을 보여주었다.

[0401] 폐 조직병리학을 감염 후 4일 및 7일에 평가하였다(도 18a 및 도 18b). 감염 후 4일째에, 위약-면역된 마우스는 혼합 염증 세포 집단으로 둘러싸인 폐포 중격의 비후와 함께 큰 기도에서 상피 세포의 박리를 나타냈다. 주로 호중구와 대식세포로 이루어진 염증 세포와 함께 폐 전체에서 동맥주위 커핑이 관찰되었다. 감염 후 7일까지, 위약 처리된 마우스는 증가된 동맥주위 커핑과 함께 기관지주위 염증을 나타냈다. 두꺼워진 폐포 중격은 폐포 중격 전체에 걸쳐 증가된 확산 간질 염증과 함께 남아 있었다(도 18b).

[0402] BV2373 면역화된 마우스는 투여량 의존적 방식으로 감염 후 4일 및 7일 모두에서 폐 병변의 유의한 감소를 나타내었다. 주요 단독 그룹은 위약 마우스와 비교하여 기관지 및 세동맥 주변의 염증 감소와 함께 10μg 및 1μg 투여량에서 감소된 염증을 나타낸다. 프라임 전용 그룹의 더 낮은 투여량에서, 폐 염증은 위약 그룹과 유사하며 체중 감소 및 폐 바이러스 역가와 관련이 있다. 프라임/부스트 면역화된 그룹은 시험된 모든 투여량에 대해 폐 염증의 상당한 감소를 나타내었고, 이는 다시 폐 바이러스 역가 및 체중 감소 데이터와 상관관계가 있다. 4일과 7일에 크고 작은 기관지의 상피 세포는 최소한의 세기관지 박리 및 바이러스 감염 징후로 실질적으로 보존되었다. 10μg, 1μg 및 0.1μg 투여량으로 면역화된 동물의 세동맥은 위약과 유사하게 0.01μg 투여량으로 볼 수 있는 중간 정도의 커핑과 함께 최소한의 염증을 나타낸다. 폐포 염증은 염증과 관련된 더 낮은 0.01μg 투여량으로 더 높은 투여량을 받은 동물에서 감소되었다(도 18a-18b). 이들 데이터는 BV2373이 면역성 검사 후 폐 염증을 감소시키고 검출 가능한 중화 활성을 최소화하거나 전혀 유발하지 않는 BV2373의 투여량 및 요법조차도 바이러스에

대한 염증 반응의 악화와 관련이 없음을 입증한다. 또한, 백신은 면역성 검사 받은 마우스에서 백신 관련 강화 호흡기 질환(VAERD)을 일으키지 않는다.

[0403] *T 세포 반응*

[0404] T 세포 반응에 대한 SEQ ID NO: 87의 CoV S 폴리펩타이드를 포함하는 백신 조성물의 효과를 평가하였다. BALB/c 마우스(그룹당 N = 6)는 21일 간격으로 2회 투여량으로 5㎍ MATRIX-M™와 함께 또는 없이 10㎍ BV2373으로 근육내 면역화시켰다. 2차 면역화 7일 후(연구일 28) 비장을 수집하였다. 백신을 접종하지 않은 그룹(N = 3)을 대조군으로 사용하였다.

[0405] 항원-특이적 T 세포 반응은 ELISPOT™ 효소 결합 면역흡착 분석법 및 두 번째 면역화(연구 28일) 후 7일에 수집된 비장으로부터의 세포내 사이토카인 염색(ICCS)에 의해 측정되었다. 생체 외 자극 후 IFN-γ 분비 세포의 수는 ELISPOT™ 분석에 의해 측정된 바와 같이 BV2373 단독에 비해 BV2373 및 MATRIX-M™으로 면역화된 마우스의 비장에서 20배(p = 0.002) 증가하였다(도 19). CD4+ 및 CD8+ T 세포 반응을 개별적으로 조사하기 위해, ICCS 분석을 표면 마커 염색과 함께 수행하였다. 표시된 데이터는 CD44hi CD62L - 효과기 메모리 T 세포 집단에 대해 게이팅된다. IFN-γ+, TNF-α+ 및 IL-2+ 사이토카인 분비 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 빈도는 항원보강제 없이 면역화된 마우스와 비교하여 BV2373으로 면역화된 마우스의 비장에서 유의하게 더 높았다(p <0.0001)(도 20a-c 및 도 21a-c). 또한, 동시에 적어도 2개 또는 3개의 사이토카인을 생성하는 다기능 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 빈도도 항원보강제의 부존재하에서 면역화된 마우스에 비해 BV2373/MATRIX-M™ 면역화된 마우스의 비장에서 유의하게 증가하였다(p <0.0001)(도 20d-e 및 도 21d-e). BV2373/MATRIX-M™에 의한 면역화는 CD4+ 및 CD8+ T 세포 집단 내에서 더 높은 비율의 다기능 표현형(예를 들어, IFN-γ, TNF-α 및 IL-2 중 하나 이상을 분비하는 T 세포)을 초래하였다. 기억 CD4+ T 세포에서 검출된 다기능 표현형의 비율은 CD8+ T 세포에서보다 높았다(도 22).

[0406] CD4+ T 세포로부터의 유형 2 사이토카인 IL-4 및 IL-5 분비도 각각 ICCS 및 ELISPOT™에 의해 결정되었다. BV2373/MATRIX-M™에 의한 면역은 또한 BV2373 단독 면역과 비교하여 유형 2 사이토카인 IL-4 및 IL-5 분비(2배)를 증가시켰지만, 유형 1 사이토카인 생산의 증가(예를 들어, IFN-γ 증가 20배)보다는 더 적은 정도로 증가시켰다(도 23a-c). 이러한 결과는 MATRIX-M™ 항원보강제의 투여가 CD4+ T 세포 발달을 Th1 반응 쪽으로 치우치게 함을 나타낸다.

[0407] 배아 중심 형성에 대한 면역화의 효과는 비장에서 CD4+ T 여포 헬퍼(TFH) 세포 및 배아 중심(GC) B 세포의 빈도를 측정함으로써 평가하였다. MATRIX-M™ 투여는 TFH 세포(CD4+ CXCR5+ PD-1+)의 빈도를 유의하게 증가시켰고(p=0.01), GC B 세포(CD19+GL7+CD95+)의 빈도도 비장에서 유의하게 증가시켰다(p=0.0002)(도 24a-b 및 도 25a-b).

[0408] **실시예 3**

[0409] **올리브 개코원숭이에서 코로나바이러스 스파이크(S) 폴리펩타이드 나노입자 백신의 면역원성**

[0410] 개코원숭이에서 BV2373을 포함하는 백신 조성물의 면역원성을 평가하였다. 성체 올리브 개코원숭이는 투여량 범위(1㎍, 5㎍ 및 25㎍)의 BV2373과 21일 간격으로 2회 투여량으로 근육내(IM) 주사에 의해 투여된 50㎍ MATRIX-M™ 항원보강제로 면역화되었다. 비인간 영장류에서 MATRIX-M™의 항원보강 활성을 평가하기 위해, 다른 동물 그룹을 MATRIX-M™ 없이 25㎍의 BV2373으로 면역화하였다. 항-S 단백질 IgG 역가는 모든 투여량 수준(GMT = 1249-19,000)에 걸쳐 BV2373/MATRIX-M™으로 면역화된 동물에서 단일 프라이밍 면역화의 21일 이내에 검출되었다. 항-S 단백질 IgG 역가는 모든 투여량 수준에 걸쳐 추가 면역화(28일 및 35일) 후 1 내지 2주 이내에 log(GMT = 33,000-174,000)에 걸쳐 증가하였다(도 26a).

[0411] 낮은 수준의 hACE2 수용체 차단 항체가 BV2373(5㎍ 또는 25㎍) 및 MATRIX-M™(GMT = 22-37)을 사용한 단일 면역화 후 동물에서 검출되었다. 수용체 차단 항체 역가는 BV2373/MATRIX-M™(GMT = 150-600)으로 면역화된 모든 그룹에 걸쳐 추가 면역화의 1 내지 2주 내에 유의하게 증가하였다(도 26b). 바이러스 중화 항체는 BV2373/MATRIX-M™으로 단일 면역화한 후 모든 투여량 그룹에 걸쳐 증가되었다(GMT = 190-446). 25㎍ BV2373 단독으로 면역화된 동물은 hACE2에 대한 S-단백질 결합을 차단하는 검출가능한 항체를 갖지 않았다(도 26c). 중화 역가는 추가

접종 후 1주일에 6배 내지 8배 증가하였다(GMT = 1160-3846). 중화 역가는 2차 면역화(GMT = 6400-17,000) 후 추가로 25배 내지 38배 증가하였다(도 26c). 항-S IgG 수준과 중화 항체 역가 사이에는 상당한 상관관계($p<0.0001$)가 있었다(도 27). 비인간 영장류에서 항원보강된 백신의 면역원성은 실시예 2의 결과와 일치하며 중화 항체의 생성 및 투여량 절약을 촉진하는 MATRIX-M™의 역할을 추가로 뒷받침한다.

[0412] 2차 면역화 7일 후(28일째) PBMC를 수집하고, T 세포 반응을 ELISPOT 분석에 의해 측정하였다. BV2373(5㎍ 또는 25㎍) 및 MATRIX-M™으로 면역화된 동물의 PBMC는 가낭 높은 수의 IFN-γ 분비 세포를 가졌으며, 이는 25㎍ BV2373 단독 또는 BV2373(1㎍) 및 MATRIX-M™에 의해 면역화된 동물과 비교하여 5배 더 컸다(도 28). ICCS 분석에 따르면, BV2373(5㎍) 및 MATRIX-M™에 의한 면역화는 IFN-γ+, IL-2+ 및 TNF-α+ CD4+ T 세포의 가장 높은 빈도를 나타내었다(도 29a-c). 이러한 경향은 또한 적어도 2개 또는 3개의 유형 1 사이토카인이 동시에 생성된 다기능 CD4+ T 세포에 대해 사실이었다(도 29d-e).

[0413] **실시예 4.**

[0414] **코로나바이러스 스파이크(S) 폴리펩타이드 나노입자 백신의 구조적 특징화**

[0415] 투과 전자 현미경(TEM) 및 2차원(2D) 클래스 평균을 사용하여 BV2373의 미세구조를 결정하였다. 음성으로 염색된 BV2373의 고배율(67,000x 및 100,000x) TEM 이미지는 S-단백질 동종삼량체에 해당하는 입자를 보여주었다.

[0416] 자동화된 선택 프로토콜을 사용하여 2D 클래스 평균 이미지를 구성하였다(Lander G.C. et al. *J Struct Biol.* 166, 95-102 (2009); Sorzano C.O. et al., *J Struct Biol.* 148, 194-204 (2004.)). 동종삼량체 구조의 2D 클래스 평균화의 두 라운드는 길이가 15nm이고 너비가 13nm인 삼각형 입자 모양을 나타냈다(도 10, 왼쪽 상단). 최근 해결된 SARS-CoV-2 스파이크 단백질(EMD ID: 21374)의 cryoEM 구조를 2D BV2373 이미지 위에 오버레이하면 왕관 모양의 S1(NTD 및 RBD) 및 S2 줄기와 잘 일치함을 나타내었다(도 10, 왼쪽 하단). 또한 2D 이미지에서 명백한 것은 NTD/RBD 크라운 반대쪽의 삼량체 구조의 끝에서 돌출된 희미한 돌출이었다(도 10, 오른쪽 상단). 더 큰 상자 크기를 사용한 2D 클래스 평균은 이러한 희미한 투영이 S-삼량체와 비정질 구조 사이의 연결을 형성함을 보여주었다.(도 10, 오른쪽 하단).

[0417] 동적 광산란(DLS)은 야생형 CoV S 단백질이 BV2365(33.4nm) 및 BV2373(27.2nm)의 2배 더 작은 입자 크기와 비교하여 69.53nm의 Z-평균 입자 직경을 가짐을 보여준다. 다분산 지수(PDI)는 BV2365 및 BV2373 입자가 야생형 스파이크-단백질(PDI = 0.46)과 비교하여 크기, 모양 및 질량(PDI = 0.25-0.29)이 일반적으로 균일함을 나타내었다(표 3).

[0418] [표 3]

[0419] SARS-CoV-2 삼량체 스파이크 단백질의 입자 크기 및 열안정성

SARS-CoV-2 S 단백질	시차 주사 열량계(DSC)		동적 광 산란(DLS)	
	T_{max}(℃)[1]	ΔHcal (kJ/mol)	Z-avg 지름[2] (nm)	PDI[3]
야생형	58.6	153	69.53	0.46
BV2365	61.3	466	33.40	0.25
BV2373	60.4	732	27.21	0.29

[1]T_{max}: 용융 온도
[2]Z-avg: Z-평균 입자 크기
[3]PDI: 다분산성 지수

[0420]

[0421] S-삼량체의 열 안정성은 시차 주사 열량계(DSC)에 의해 결정하였다. 야생형 CoV S-단백질의 열전이 온도(T_{max} = 58.6℃)는 각각 T_{max} = 61.3℃ 및 60.4℃로 BV2365 및 BV2373과 유사하였다(표 3). 더 중요한 것은 WT 스파이크 단백질을 펼치는 데 필요한 더 낮은 엔탈피(ΔHcal = 153kJ/mol)와 비교하여 BV2365 및 BV2373 변이체를 펼치는 데 필요한 전이 엔탈피의 3-5배 증가이었다(각각 ΔHcal = 466 및 732kJ/mol). 이러한 결과는 WT 스파이크 단백질의 열 안정성과 비교하여 BV2365 및 BV2373의 개선된 열 안정성과 일치한다(표 3).

[0422] CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드 나노입자 백신의 안정성을 동적 광 산란에 의해 평가하였다. 다양한 pH, 온도, 염 농도 및 프로테아제를 사용하여 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드 나노입자 백신의 안정성을 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드를 함유하는 나노입자 백신과 비교하였다.

[0423] **실시예 5.**

[0424] **코로나바이러스 스파이크(S) 폴리펩타이드 나노입자 백신의 안정성**

[0425] CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드 나노입자 백신의 안정성을 동적 광 산란에 의해 평가하였다. 다양한 pH, 온도, 염 농도 및 프로테아제를 사용하여 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드 나노입자 백신의 안정성을 천연 CoV 스파이크(S) 폴리펩타이드를 함유하는 나노입자 백신과 비교하였다. 2-프롤린 치환이 없는 BV2365 및 2개의 프롤린 치환이 있는 BV2373의 안정성은 hACE2 포획 ELISA를 사용하여 다양한 환경 스트레스 조건에서 평가되었다. 극한의 pH(pH 4 및 pH 9에서 48시간), 장기간 교반(48시간), 동결/해동(2 주기) 및 승온(25℃ 및 37℃에서 48시간)에서 BV2373의 배양은 hACE2 수용체 결합에 영향을 미치지 않았다(IC50 = 14.0 - 18.3ng mL-1).

[0426] 과산화수소에 의한 산화 조건은 BV2373에 대한 hACE2 결합의 결합을 8배 감소시켰다(IC50 = 120ng mL-1)(도 12a). 2-프롤린 치환이 없는 BV2365는 다중 조건 하에서 hACE2 결합의 상당한 손실에 의해 결정되는 바와 같이 덜 안정하였다(도 12b).

[0427] BV2384(SEQ ID NO: 110) 및 BV2373(SEQ ID NO: 87)의 안정성을 비교하였다. BV2384는 GSAS의 퓨린 절단 부위 서열(SEQ ID NO: 97)을 갖는 반면, BV2373은 QQAQ(SEQ ID NO: 7)의 퓨린 절단 부위를 갖는다. SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯에 의해 입증된 바와 같이, BV2384는 BV2373과 비교하여 광범위한 분해를 나타냈다(도 32). 또한, 주사 농도계 및 회수 데이터는 BV2373(도 34)과 비교하여 전체 길이 CoV S 단백질 BV2384의 예상치 못한 손실, 더 낮은 순도 및 회수(도 33)를 보여준다.

[0428] **실시예 6**

[0429] **시노몰구스 원숭이의 면역 반응**

[0430] 본 발명자들은 SARS-CoV-2 감염의 시노몰구스 원숭이 모델에서 BV2373에 의해 유도된 면역 반응을 평가하였다. 그룹 1-6은 표 4에 표시된 대로 처리되었다.

[0431] [표 4]

[0432] 시노몰구스 원숭이 연구의 그룹 1-6

[0433]

그룹 (N=4)	BV2373 투여량	MATRIX-M™ 투여량	면역화 (일)	채혈 (일)	면역성 검사 (일)
1	위약	-	0, 21	0, 21, 33	35
2	2.5 ㎍	25 ㎍	0, 21	0, 21, 33	35
3	5 ㎍	25 ㎍	0	0, 21, 33	35
4	5 ㎍	50 ㎍	0, 21	0, 21, 33	35
5	5 ㎍	50 ㎍	0	0, 21, 33	35
6	25 ㎍	50 ㎍	0, 21	0, 21, 33	35

[0434] BV2373을 포함하는 백신의 투여는 중화 항체(도 35b)를 포함하는 항-CoV-S 항체(도 35a)의 유도를 초래하였다. 항-CoV-S 항체는 BV2373의 1회 투여량(도 38a) 또는 2회 투여량(도 38b)의 투여 후에 유도되었다. BV2373을 포함하는 백신의 투여는 또한 hACE2에 대한 CoV S 단백질의 결합을 차단하는 항체의 생성을 초래하였다(도 38c 및 도 38d). BV2373 투여 후 시노몰구스 원숭이에서 항-CoV S 폴리펩타이드 IgG 역가와 hACE2 억제 역가 사이에 상당한 상관관계가 있었다(도 38e). 중화 항체의 생산을 유도하는 BV2373의 능력은 세포변성 효과(CPE)(도 40a) 및 플라크 감소 중화 테스트(PRNT)(도 40b)에 의해 평가되었다. 데이터는 표 4의 백신 제제가 대조군과 대조적으로 SARS-CoV-2 중화 역가를 생성함을 나타내었다.

[0435] 항-CoV-S 항체를 유도하는 BV2373의 능력 및 시노몰구스 원숭이에서 CoV S 단백질에 대한 hACE2의 결합을 차단하는 항체를 포함하는 백신을 인간 회복기 혈청과 비교하였다. 데이터는 BV2373 백신 제제가 인간 회복기 혈청과 비교하여 우수한 항-CoV S 폴리펩타이드 및 hACE2 억제 역가를 유도함을 나타내었다(도 39).

[0436] BV2373 백신 제제는 또한 SARS-CoV-2 바이러스 복제의 감소를 야기하였다(도 36a-b). 바이러스 RNA(도 36a, 존재하는 총 RNA에 해당) 및 바이러스 서브게놈 RNA(sgRNA)(도 36b, 복제 바이러스에 해당) 수준을 감염성 바이러스에 의한 면역섬 검사 2일 및 4일(d2pi 및 d4pi) 후에 세기관지 세척(BAL)에서 평가하였다. 대부분의 대상은 바이러스 RNA를 나타내지 않았다. 2일째에, 일부 대상에서 소량의 RNA가 측정되었다. 4일째에, 2.5㎍의 가장 낮은 투여량에서 2명의 대상을 제외하고는 RNA가 측정되지 않았다. 서브게놈 RNA는 1명의 대상을 제외하고 2일 또는 4일에서 검출되지 않았고, 다시 최저 용량에서 검출되었다. 바이러스 RNA(도 37a) 및 바이러스 서브게놈(sg) RNA(도 37b)를 감염 후 2일 및 4일(d2pi 및 d4pi) 후에 비강 면봉으로 평가하였다. 대부분의 대상은 바이러스

RNA를 나타내지 않았다. 2일 및 4일에 일부 대상에서 소량의 RNA가 측정되었다. 2일 또는 4일에 서브게놈 RNA가 검출되지 않았다. 대상은 0일 및 0일과 21일에 2회 투여량으로 그룹에서 면역화되었다. 이 데이터는 백신이 코 총 바이러스 RNA를 100 - 1000배 감소시키고 sgRNA를 검출할 수 없는 수준으로 감소시키고 백신에 대한 면역 반응이 바이러스 복제를 차단하고 바이러스 확산을 방지할 것임을 확인시킨다.

[0437] **실시예 7**

[0438] **인간에서 CoV S 폴리펩타이드 나노입자 백신의 평가**

[0439] 본 발명자들은 18-59세의 건강한 참가자 131명을 대상으로 무작위, 관찰자 맹검, 위약 대조 1상 임상 테스트에서 BV2373을 포함하는 백신의 안전성과 효능을 평가하였다. 참가자들은 21일 간격으로 2회의 근육 주사로 면역화되었다. 참가자들은 MATRIX-M™(n=106) 또는 위약(n=25)이 있거나 없는 BV2373을 받았다. 그룹 A-E는 표 5에 표시된 대로 처리되었다. 도 41은 임상 종점 평가의 타임라인을 보여준다.

[0440] [표 5]

[0441] 1상 인간 연구의 그룹 A-E

[0442]

그룹 (N=25)	참가자		0일		21일 (+ 5일)	
	무작위	센티넬 (Sentinel)	BV2373 투여량	MATRIX-M™ 투여량	BV2373 투여량	MATRIX-M™ 투여량
A	25	-	0 ㎍	0 ㎍	0 ㎍	0 ㎍
B	25	-	25 ㎍	0 ㎍	25 ㎍	0 ㎍
C	25	3	5 ㎍	50 ㎍	5 ㎍	50 ㎍
D	25	3	25 ㎍	50 ㎍	25 ㎍	50 ㎍
E	25	-	25 ㎍	50 ㎍	0 ㎍	0 ㎍

[0443] 전반적인 반응원성은 온화했고 백신 접종은 잘 견뎠다. 국소 반응원성은 BV2373 및 MATRIX-M™으로 치료받은 환자에서 더 빈번하였다(도 42a-b).

[0444] MATRIX-M™이 있거나 없는 BV2373의 면역원성을 평가하였다. 백신 접종 21일 후, 항-CoV-S 항체가 모든 백신 요법에서 검출되었다(도 43a). MATRIX-M™을 포함하는 백신 요법에서 기하 평균 배수 증가(GMFR)는 비항원보강 BV2373에 의해 유도된 것을 초과하였다. 두 번째 백신 접종 후 7일(28일)에, 항-CoV-S 역가는 첫 번째 백신 접종보다 8배 증가했으며 14일 이내에(35일) 반응이 다시 두 배 이상 증가하여 GMFR이 BV2373 단독으로 관찰된 것에 비해 약 100배 도달하였다. BV2373/MATRIX-M™에 의한 단일 백신 접종은 무증상(노출된) COVID-19 환자와 유사한 항-CoV-S 역가 수준을 달성하였다. 두 번째 백신 접종은 외래 치료를 받은 COVID-19 환자의 회복기 혈청을 6배 초과한 GMEU 수준을 달성하였고, COVID 19로 입원한 환자의 회복기 혈청과 유사한 수준을 달성하였고, 전체 회복기 혈청 항-CoV-S 항체를 거의 6배 초과하였다. 2회 투여량 5㎍ 및 25㎍ BV2373/MATRIX-M™ 요법의 반응은 유사하였다. 이것은 투여량 절약을 가능하게 하는 항원보강제(MATRIX-MTM)의 능력을 강조한다.

[0445] 중화 항체는 BV2373으로 처리된 모든 그룹에서 유도되었다(도 43b). BV2373 및 MATRIX-M™ 요법으로 처리된 그룹은 BV2373 단독으로 처리된 그룹보다 대략 5배의 GMFR을 나타내었다(도 43b). 항원보강제에 의한 두 번째 백신 접종은 항체 역가를 중화하는 데 중대한 영향을 미쳐서 항원보강제가 없는 단일 백신 접종에 비해 >100배 증가를 유도하였다. BV2373/MATRIX-M™에 의한 두 번째 백신 접종은 회복기 혈청과 비교했을 때 외래 치료를 받은 COVID-19 환자보다 4배 더 높은 GMT 수준을 달성했으며, 이는 COVID-19로 입원한 환자의 수준에 걸쳐 있었고 전체 회복기 혈청 GMT를 4배 초과하였다.

[0446] 치료가 필요한 임상 증상이 있는 COVID-19 환자로부터 얻은 회복기 혈청은 질환 중증도에 따라 증가하는 비례적인 항-CoV-S IgG 및 중화 역가를 나타내었다(도 43a-b).

[0447] 회복기 혈청으로 치료된 환자(r= 0.958)(도 44a)에서 관찰된 것과 유사한 BV2373 및 MATRIX-M™으로 치료된 환자(r=0.9466, 도 44c)에서 중화 항체 역가와 항-CoV-S IgG 사이에 강한 상관관계가 관찰되었다. 이러한 상관관계는 항원보강제가 첨가되지 않은 BV2373(r=0.7616)을 투여받은 대상에서 관찰되지 않았다(도 44b). 5㎍ 및 25㎍ BV2373/MATRIX-M™ 그룹(표 5의 그룹 C-E)은 유사한 크기의 2회 투여량 반응을 보여주었고 모든 참가자는 2회 투여량 요법을 사용할 때 두 가지 분석 측정 중 하나를 사용하여 혈청 전환되었다.

[0448] 16명의 참가자(그룹 A부터 D까지 각각 4명의 참가자)의 T 세포 반응은 BV2373/MATRIX-M™ 요법이 BV2373으로 자극시 IFN-γ, IL-2 및 TNF-α 생산의 면에서 항원-특이적 다기능성 CD4+ T-세포 반응을 유도하였다. Th1 사이토카인의 생산에 대한 강한 편향이 있었다(도 45a-d).

[0449] **실시예 8**

[0450] **차세대 CoV S 폴리펩타이드 나노입자의 발현, 정제 및 평가**

[0451] SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, 또는 SEQ ID NO: 115의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드는 바큘로바이러스 발현 시스템에서 발현되고 코로나바이러스 스파이크 (S) 폴리펩타이드를 발현하는 재조합 플라크가 선택되고 확인된다. SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, 및 SEQ ID NO: 115의 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열을 갖는 N-말단 신호 펩타이드를 사용하여 발현된다.

[0452] SEQ ID NO: 112의 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드는 Asn-488의 티로신으로의 돌연변이, Lys-973 및 Val-974의 프롤린으로의 돌연변이, 및 QQAQ(SEQ ID NO: 7)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 포함한다.

[0453] SEQ ID NO: 113의 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드는 Asp-601의 글리신으로의 돌연변이, Asn-488의 티로신으로의 돌연변이, Lys-973 및 Val-974의 프롤린으로의 돌연변이, 및 QQAQ(SEQ ID NO: 7)의 불활성화된 퓨린 절단을 포함한다.

[0454] SEQ ID NO: 114의 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드는 아미노산 56, 57, 및 131의 결실, Asn-488의 티로신으로의 돌연변이, Ala-557의 아스파르테이트로의 돌연변이, Asp-601의 글리신으로의 돌연변이, Pro-668의 히스티딘으로의 돌연변이, Thr-703의 아이소류신으로의 돌연변이, Ser-969의 알라닌으로의 돌연변이, Asp-1105의 히스티딘으로의 돌연변이, Lys-973 및 Val-974의 프롤린으로의 돌연변이, 및 QQAQ(SEQ ID NO: 7)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화 퓨린 절단 부위를 포함한다.

[0455] SEQ ID NO: 115의 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드는 Asn-488의 티로신으로의 돌연변이, Asp-67의 알라닌으로의 돌연변이, Leu-229의 히스티딘으로의 돌연변이, Asp-202의 글리신으로의 돌연변이, 돌연변이 Lys-404에서 아스파라긴으로의 돌연변이, Glu-471에서 라이신으로의 돌연변이, Ala-688에서 발린으로의 돌연변이, Asp-601에서 글리신으로의 돌연변이, Lys-973 및 Val-974에서 프롤린으로의 돌연변이, 및 QQAQ의 아미노산 서열을 갖는 불활성화 퓨린 절단 부위를 포함한다.

[0456] CoV S 폴리펩타이드 나노입자는 실시예 1에서와 같이 생성된다. SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, 및 SEQ ID NO: 113 및 SEQ ID NO: 115의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드의 안정성 및 면역원성은 실시예 2-7에서와 같이 평가된다.

[0457] **실시예 9**

[0458] **BV2373 및 사포닌 항원보강제는 이종 SARS-CoV-2 균주에 대한 보호 면역 반응을 유도한다**

[0459] **목적:** 본 발명자는 영국의 33개 현장에 걸쳐 BV2373과 사포닌 항원보강제(본 실시예에서 MATRIX-M™이라고도 하는 분획 A 및 분획 C iscom 매트릭스) 또는 위약(1:1)을 21일 간격으로 근육 내 5μg 용량을 2회 투여받은 18-84세 성인을 대상으로 무작위, 관찰자 맹검, 위약 대조 제3상 시험을 실시하였다. 1차 효능 종료점은 2차 접종 후 7일에 경증, 중등도 또는 중증 COVID-19로 바이러스학적으로 확인되었다.

[0460] 총 15,187명의 참가자가 무작위로 배정되었으며, 그 중 7569명의 참가자는 BV2373 및 MATRIX-M™을 투여 받았고 7570명은 위약을 투여 받았다. 27.8%는 65세 이상이었고, 4%는 SARS-CoV-2 감염에 대한 기본 혈청학적 증거가 있었다. 2차 접종 후 적어도 7일에 증상 개시와 함께 BV2373 및 MATRIX-M™ 투여군 중 10건의 COVID-19가 있었고, 위약 투여군 중 96건이 발생했으며; BV2373과 MATRIX-M™은 COVID-19 예방 효과가 89.7%(95% 신뢰 구간, 80.2 내지 94.6)였다. 5건의 중증 COVID-19가 있었고, 모두 위약군에서 보고되었다. 사후 분석은 프로토타입 SARS-CoV-2 균주와 B.1.1.7 변이체에 대해 각각 96.4%(73.8 내지 99.5) 및 86.3%(71.3 내지 93.5)의 효능이 있는 것으로 나타났다. 프로토타입 SARS-CoV-2 균주는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 단백질을 포함한다. B.1.1.7 변종은 아미노산 56, 57 및 131의 결실과 N488Y, A557D, D601G, P668H, T703I, S969A, 및 D1105H의 돌연변이를 갖는 CoV S 단백질을 포함하며, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖

는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. 백신 동반 질환이 있는 참가자와 65세 이상 참가자를 포함한 하위 그룹 전체에서 효능은 유사하였다. 반응원성은 일반적으로 경미하고 일시적이었으며 BV2373 및 MATRIX-M™을 투여한 그룹에서 더 자주 발생하였다. 심각한 부작용의 발생률은 두 그룹에서 낮았고 비슷하였다. BV2373과 MATRIX-M™의 2회 투여량 요법은 프로토타입과 B.1.1.7 변이체의 혼합에 대해 89.7%의 효능을 나타냈으며, 안전성 프로필은 다른 승인된 COVID-19 백신과 유사하였다.

[0461] **방법:** 시험 설계 및 참가자: 본 발명자는 21일 간격으로 근육내 투여된 BV2373 및 MATRIX-M™ 또는 위약의 2회 5㎍ 투여량의 안전성과 효능을 평가하였다. 이 3상 시험은 영국의 33개 모집 현장에서 수행되었다. 적격 참가자는 건강하거나 인간 면역 결핍 바이러스 및 심장 및 호흡기 질환을 포함하나 이에 제한되지 않는 만성 질환을 앓고 있는 18세 내지 84세(포함)의 남성 및 임신하지 않은 여성이었다. 선별검사에서 평가된 건강 상태는 병력, 활력 징후 및 신체 검사를 기반으로 하였다. 주요 제외 기준은 문서화된 COVID-19 병력, 면역억제 요법 치료 또는 면역결핍 상태 진단을 포함하였다.

[0462] 참가자들은 블록 무작위화를 통해 1:1 비율로 무작위 배정되어 사전 생성된 무작위화 계획에 따른 중앙 집중식 대화형 반응 기술 시스템을 사용하여 21일 간격으로 BV2373 및 MATRIX-M™ 또는 위약(생리 식염수) 2회 투여량을 투여받았다. 무작위화는 현장 및 65세 이상 연령별로 계층화되었다. 400명을 대상으로 한 하위 연구에서, 참가자들은 첫 번째 접종과 동시에 계절성 인플루엔자 백신을 접종받았다. 이것은 관찰자 블라인드(observer-blinded) 연구이었다.

[0463] 각각의 백신접종 후, 참가자들은 급성 반응의 존재 여부를 모니터링하기 위해 적어도 30분 동안 연구 장소에서 관찰을 받았다. 요청된 국소 및 전신 부작용은 참가자 하위 그룹(예측된 부작용 하위 그룹)에서 각 투여량 후 7일 동안 전자 일기를 통해 수집되었다. 모든 참가자는 제 1 투여량부터 제 2 투여량 후 28일까지 원치 않는 부작용에 대해 평가되었고; 심각한 부작용, 특별한 관심을 끄는 부작용, 의학적 치료를 받은 부작용은 제 1 투여량부터 제 2 투여량 후 1년까지 평가되었다. 적어도 1회 투여량의 백신 또는 위약을 투여받은 모든 참가자에 대한 안전성 데이터가 보고된다.

[0464] **안전성 및 효능:** 1차 종점은 바이러스학적으로 확인된 증상이 있는 경증, 중등도 또는 중증 COVID-19의 첫 번째 발생에 대한 BV2373 및 MATRIX-M™의 효능이었고, 기준선에서 혈청 음성인 참가자의 경우 두 번째 백신 접종 후 적어도 7일에 발병하였다. 유증상 COVID-19는 미국 식품의약국(FDA) 기준에 따라 정의되었다.

[0465] 시험 내내 의심되는 COVID-19의 증상을 모니터링하고 COVID-19 전자 증상 일지(InFLUenza 환자 보고 결과[FLU-PRO©] 설문지)를 사용하여 최소 10일 동안 수집하였다. COVID-19 의심 증상이 시작되면, SARS-CoV-2 감염을 확인하기 위해 3일에 걸쳐 매일 코와 목의 호흡기 검체를 수집하였다. Thermo TaqPath™ 시스템(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 사용하여 중합효소 연쇄 반응(PCR) 테스트(영국 DHSC 실험실)를 사용하여 바이러스학적 확인을 수행하였다.

[0466] BV2373 및 MATRIX-M™ 또는 위약을 1회 이상 투여받은 모든 참가자에 대해 안전성을 분석하고 설명적으로 요약하였다. 예측된 국소 및 전신 부작용도 FDA 독성 등급 기준 및 각 주사 후 지속 기간에 따라 요약되었다. 원치 않는 부작용은 *Medical Dictionary for Regulatory Activity*(MedDRA) 버전 23.1을 사용하여 선호 용어 및 기관계 분류로 코드화하고 중증도 및 연구 백신과의 관계로 요약하였다.

[0467] 시험은 1차 종점에 대한 통계적 유의성을 달성할 것으로 예상되는 총 사례 수 - 100건의 경증, 중등도 또는 중증 코로나19 사례 목표 - 에 따라 설계되고 추진되었다. 최종 분석을 위한 100개 사례의 목표 수는 70% 이상의 백신 효능에 대해 >95% 검정력을 제공하도록 선택되었다. 단일 중간 분석은 Pocock 경계 조건을 사용하여 예상되는 총 1차 종점의 약 50%(50개 사건)의 누적을 기반으로 효능에 대한 수행하였다. 1차 목표의 중간 및 최종 분석을 위한 주요(가설 테스트) 사건 기반 분석은 1차 종점에 대해 0.025의 전반적인 일방적인 제 1 유형 오류율로 수행되었다. 1차 종점은 기준선에서 혈청 음성이었고, 연구 백신 또는 위약을 모두 투여받았으며, 1차 종점에 영향을 미치는 주요 프로토콜 편차가 없었으며, 두 번째 주사 후 6일 이내에 유증상 COVID-19가 확인된 사례가 없는 참가자를 대상으로 분석하였다(프로토콜별 효능 모집단). 백신 효능은 E(%) = (1 - RR) × 100으로 정의되었으며, 여기서 RR = 두 연구 그룹(BV2373 및 MATRIX-M™ 또는 위약) 간의 발병률의 상대 위험도이다. 평균 질병 발생률은 1000명당 연간 발생률로 보고되었다. 추정된 RR과 신뢰 구간(CI)은 강력한 오차 분산을 사용하는 포아송 회귀 분석을 사용하여 도출하였다. 1차 평가변수에 대한 가설 테스트는 귀무 가설에 대해 수행하였

다: H0: 백신 효능 ≤30%. 성공 기준은 통계적으로 유의미한 백신 효능을 입증하기 위해 귀무 가설의 기각을 필요로 하였다.

[0468] 2020년 9월 28일부터 11월 28일 사이에 총 16,645명의 참가자가 선별되었고 15,187명의 참가자가 무작위로 선정되었다(도 47). 총 15,139명의 참가자가 BV2373과 MATRIX-M™(7569) 또는 위약(7570)의 적어도 1회 투여량을 투여받았고, 14,039명의 참가자(BV2373 및 MATRIX-M™ 그룹 7020명 및 위약 그룹 7019명)가 프로토콜별 효능 모집단에 대해 기준을 충족하였다. 기준 인구통계는 프로토콜별 효능 모집단에서 BV2373과 MATRIX-M™ 및 위약 그룹 간에 균형이 잘 잡혀 있었으며, 여기서 48.4%는 여성, 94.5%는 백인, 0.4%는 흑인 또는 아프리카계 미국인, 0.8%는 히스패닉 또는 라틴계, 44.6%는 적어도 하나의 동반 질환이 있었다(질병 통제 예방 센터[CDC] 정의에 근거). 이들 참가자의 평균 연령은 56세였으며 27.9%는 65세 이상이었다. 표 6은 임상시험 참가자들의 기본 인구통계에 대한 요약을 제공한다.

[0469] [표 6]

[0470] 임상시험 참가자의 인구통계 및 기본 특성

[0471]

	BV2373 및 MATRIX-M™ n=7020	위약 n=7019	총 N=14,039
연령, 세			
중앙	56.0	56.0	56.0
범위	18, 84	18, 84	18, 84
연령 그룹, n (%)			
18-64세	5067 (72.2)	5062 (72.1)	10129 (72.1)
≥65y	1953 (27.8)	1957 (27.9)	3910 (27.9)
성별, n (%)			
남성	3609 (51.4)	3629 (51.7)	7238 (51.6)
여성	3411 (48.6)	3390 (48.3)	6801 (48.4)
인종 또는 종족 그룹, n (%)			
백인	6625 (94.4)	6635 (94.5)	13260 (94.5)
흑인 또는 아프리카 미국인	26 (0.4)	26 (0.4)	52 (0.4)
아시아인	201 (2.9)	212 (2.9)	413 (2.9)
미국 인디언 또는 알라스카 원주민	4 (<0.1)	0	4 (<0.1)
하와이 원주민 또는 다른 태평양 섬주민	1 (<0.1)	0	1 (<0.1
다인종	70 (1.0)	59 (0.8)	136 (0.9)
보고되지 않음	85 (1.2)	79 (1.1)	176 (1.2)
기타	4 (<0.1)	6 (<0.1)	11 (<0.1)
결여	4	2	8
히스패닉 또는 라틴	63 (0.9)	51 (0.7)	114 (0.8)
SARS-CoV-2 혈청 상태, n (%)			
음성	6964 (99.2%)	6944 (98.9)	13908 (99.1)
양성	0	0	0
결여	56	75	131
BMI, kg/m², n (%)			
> 30.0: 비만	313 (4.5)	323 (4.6)	636 (4.5)
동반질환 상태*			
예	3117 (44.4)	3143 (44.8)	6260 (44.6)
아니오	3903 (55.6)	3876 (55.2)	7779 (55.4)

[0472] SD, 표준편차; 체질량지수(BMI)는 체중(kg)을 키(m)의 제곱으로 나누어 계산한다. 백분율은 각 치료 및 전체 내에서 설정된 프로토콜별 효능 분석을 기반으로 한다. *동반이환 대상은 병력으로 보고된 동반 질환 중 하나 이상을 갖고 있거나 30kg/m^2 초과의 선별 BMI 값을 갖는 것으로 확인된 사람들이다.

[0473] 예측된 유해 사례 하위 그룹은 2714명의 참가자를 포함하였다. 전반적으로, BV2373 및 MATRIX-M™ 접종자는 1차 투여(59.4% 대 20.9%) 및 2차 투여(80.2% 대 17.0%) 후에 위약 접종자보다 더 높은 빈도의 예측된 국소 부작용을 보고하였다(도 50).

[0474] BV2373 및 MATRIX-M™ 접종자 중에서, 가장 흔하게 보고된 국소 부작용은 1차 투여(54.9% 및 30.7%) 및 2차 투여(76.6% 및 51.9%) 모두 후 주사 부위 압통 및 통증이었으며, 대부분 사건은 중증도가 1등급(경증) 또는 2등급(중등도)이고 평균 기간이 짧다(1차 투여 후 2.3일 및 1.7일, 및 2차 투여 후 2.8 및 2.2일). 예측된 국소 부작용은 나이가 많은 BV2373 및 MATRIX-M™ 접종자(≥65세)보다 젊은 BV2373 및 MATRIX-M™ 접종자(18 내지 64세)에

서 더 자주 보고되었다.

[0475] 전반적으로, BV2373 및 MATRIX-M™ 접종자는 1차 투여(47.6% 대 37.9%) 및 2차 투여(64.6% 대 30.8%) 후에 위약 접종자보다 더 높은 빈도로 유발된 전신 부작용을 나타내었다(도 50). BV2373 및 MATRIX-M™ 접종자 중에서, 가장 흔하게 보고된 전신 부작용은 1차 투여(24.5%, 22.3%, 20.5%)와 2차 투여(40.7%, 41.1%, 및 41.0%) 후 두통, 근육통 및 피로를 나타내었고, 대부분의 사건은 중증도가 1등급 또는 2등급이고 평균 지속 기간이 짧다(1차 접종 후 1.6, 1.5, 1.9일 및 2차 접종 후 1.9, 1.8, 1.9일). 4등급 전신 부작용은 1차 투여 후 BV2373 및 MATRIX-M™ 참가자 2명에서 및 2차 투여 후 BV2373 및 MATRIX-M™ 참가자 1명에서 보고되었다. 전신 부작용은 나이든 백신 접종자보다 젊은 백신 접종자에게서 더 자주 보고되었으며, 1차 투여보다 2차 투여 후에 더 자주 보고되었다. 특히, 발열(온도 ≥38℃)은 1차 및 2차 투여 후 BV2373 및 MATRIX-M™ 접종자 2.3%와 5.1%로 보고되었고, 3등급 발열(39-40℃)은 각각 1차 및 2차 투여 후 참가자의 0.4% 및 0.6%이며; 하나의 등급 4 발열(>40℃)은 백신의 각 투여 후 보고되었다.

[0476] 최종 유효성 분석의 데이터 마감일까지 최소 1회 용량의 백신 또는 위약을 투여받은 15,139명의 참가자 모두 원치 않는 부작용에 대해 평가되었다. 원치 않는 부작용의 빈도는 위약 접종자 중에서보다 BV2373 및 MATRIX-M™ 접종자에서 높았으며(25.3% 대 20.5%), 심각한 부작용(1.0% 대 0.8%), 심각한 부작용(0.5% 대 0.5%), 의학적 부작용(3.8% 대 3.9%), 백신(0.3% 대 0.3%) 또는 연구(0.2% 대 0.2%) 중단으로 이어지는 부작용, 잠재적인 면역 매개 질환(<0.1 대 <0.1%) 및 COVID-19와 관련된 특별히 관심 있는 부작용(0.1% 대 0.3%)의 유사한 빈도를 갖는다. 잠재적인 면역 매개 질환으로 간주되는 BV2373 및 MATRIX-M™ 접종자(심근염)에서 관련된 심각한 부작용 1건이 보고되었다; 독립적인 SMC는 이 사건을 바이러스성 심근염일 가능성이 가장 높은 것으로 간주하였다. 참가자는 회복되었다. 아나필락시스 사례는 없었으며 백신과 관련된 질환 강화의 증거도 없었다. 단일 백신 접종 후 7일 만에 증상이 발현된 BV2373 및 MATRIX-M™ 그룹에서 1명 및 위약 그룹에서 1명인 2명의 COVID-19 관련 사망이 보고되었다.

[0477] 프로토콜별 효능 모집단의 참가자 14,039명 중에서, 백신 접종자 중 두 번째 접종 후 최소 7일에 발병한 바이러스학적으로 확인된 증상이 있는 경증, 중등도 또는 중증 COVID-19의 10건(1000명-년당 6.53명; 95% CI: 3.32 내지 12.85) 및 89.7%(95% CI, 80.2 내지 94.6; 도 49)의 백신 효능에 대해 위약 투여자 중 96건(1000명-년당 63.43, 95% CI: 45.19 내지 89.03)이 있었다. 경증, 중등도 또는 중증의 COVID-19를 앓고 있는 65세 이상 10건 중에서, 1명은 BV2373과 MATRIX-M™을 투여받았고 9명은 위약을 투여받았다. 중증 COVID-19가 5명의 참가자에게서 발생했는데, 그 중 BV2373과 MATRIX-M™을 투여받은 사람은 아무도 없었고, 5명은 위약을 투여받았다. 프로토콜별 백신 접종자 중 입원이나 사망은 없었다. 65세 이상 참가자의 백신 효능은 88.9%(95% CI, 12.8 내지 98.6)였으며 1차 투여 후 14일째의 효능은 83.4%(95% CI, 73.6 내지 89.5)였다(도 49). 1차 종점의 사후 분석은 분리된 균주가 각각 SARS CoV-2 프로토타입 균주, SARS-CoV-2 B.1.1.7 변이체 또는 알려지지 않은 COVID-19 사례 29건, 66건, 11건으로 확인되었다. 알려지지 않은 샘플은 변이 확인이 수행되지 않은 비-DHSC PCR 테스트(예를 들어, 지역 병원 실험실)로 PCR 테스트를 수행한 샘플이었다. 프로토타입 균주에 대한 백신 효능은 96.4%(95% CI, 73.8 내지 99.4)인 반면, B.1.1.7 변이체에 대한 효능은 86.3%(95% CI, 71.3 내지 93.5)였다. (도 49).

[0478] **논의:** 21일 간격으로 제공된 BV2373 및 MATRIX-M™의 2회 투여량 요법은 프로토타입 및 B.1.1.7 변종 모두에 의해 유발된 유증상 COVID-19에 대해 안전하고 89.7% 효과적인 것으로 밝혀졌다. 이 연구에서 누적된 사례의 시기를 통해 현재 영국 이외의 지역에서 널리 유통되고 있으며 곧 미국에서 가장 두드러진 균주가 될 것으로 예상되는 B.1.1.7 변종을 포함하여 다양한 균주에 대한 백신 효능에 대한 사후 평가가 가능해졌다. 이 변종은 이전 변종보다 전염성이 더 높고 치명률도 더 높은 것으로 알려져 있어 효과적인 백신의 필요성이 강조된다. 이것은 B.1.1.7 변종에 대해 3상 시험에서 높은 백신 효능(86.3%)을 입증한 제 1 백신이다. 이 연구는 개별 SARS-CoV-2 균주에 대한 효능을 평가할 수 있는 근거가 없었지만, BV2373과 사포닌 항원보강제는 시험 참가자에게서 발견된 모든 균주에 대해 상당한 효능을 입증하였다. 특히, 프로토타입 균주에 대해 결정된 효능의 96.4% 점 추정치는 BNT161b2 mRNA 백신(95.0%) 및 mRNA-1273 백신(94.1%)에 대해 이 균주에 대해 보고된 것과 유사하며 아데노바이러스 벡터 바이러스에 의해 입증된 것보다 더 높다.

[0479] 마지막으로, BV2373 및 사포닌 항원보강제 조성물은 또한 B.1.351 변이체에 대해 효능을 나타내었다.

[0480] 중증 질환(입원, 중환자실 입원 및 사망 포함)의 예방은 백신 접종 프로그램의 중요한 목표이며, BV2373 및 사포닌 항원보강제의 2회 투여량 요법은 다른 허가 받은 COVID-19 백신에 대해 보고된 것과 유사하게 매우 높은 효능을 나타내었다. 또한, BV2373과 사포닌 항원보강제는 다른 COVID-19 백신과 유사한 범위에서 1차 투여량 후 보호 수준을 제공하였다. BV2373 및 사포닌 항원보강제의 1/2상 연구에서 관찰된 유리한 안전성 프로파일이 이번 3상 시험에서 확인되었다. 반응원성은 일반적으로 경증 또는 중등도였으며, 반응은 노인 대상에서는 덜 흔하고 경미했으며 2차 투여 이후에는 더 흔했다. 주사 부위 압통 및 통증, 피로, 두통 및 근육통은 가장 흔하게 보고된 국소 및 전신 부작용이었으며 위약보다 백신에서 더 흔했다. 심각한 부작용 발생률은 백신 그룹과 위약 그룹에서 유사했고(각각 0.5%), 백신 접종으로 인한 사망은 없었다.

[0481] 이 시험의 결과는 프로토타입 SARS-CoV-2 및 SARS-CoV-2 변이체 B.1.1.7에 의해 유발된 COVID-19가 예방접종을 통해 예방될 수 있다는 추가 증거를 제공하며, 이는 단백질-기반 항원보강 백신에 대한 첫 번째 증거를 제공한다. 이러한 데이터는 BV2373과 사포닌 항원보강제가 표준 냉장고 온도에서 보관될 수 있으며, 더욱이 스파이크 단백질 항원에 대한 광범위한 에피토프 반응을 유도할 수 있음을 확인시킨다. 이러한 광범위한 대응은 다양한 이종 SARS-CoV-2 균주에 대한 보호 효능을 제공한다.

[0482] **실시예 10**

[0483] **BV2438 및 사포닌 항원보강제는 이종 SARS-CoV-2 균주에 대한 보호 면역 반응을 유도한다**

[0484] **목적:** 사포닌 항원보강제와 조합하여 재조합 CoV 스파이크(rS) 단백질 BV2438(SEQ ID NO: 132), BV2373(SEQ ID NO: 87) 또는 둘 다를 함유하는 조성물의 면역원성 및 생체내 보호를 평가하였다. 사포닌 항원보강제는 2개의 iscom 입자를 함유하며, 여기서: 제 1 iscom 입자는 퀼라야 사포나리아(*Quillaja Saponaria*) 몰리나의 분획 A를 포함하고 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C는 포함하지 않으며; 제 2 iscom 입자는 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C를 포함하고 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A를 포함하지 않는다. 실시태양에서, 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C는 항원보강제에서 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 A와 퀼라야 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량 합계의 각각 약 85중량% 및 약 15중량%를 차지한다.

[0485] SARS-CoV-2/WA1, SARS-CoV-2/B.1.1.7 및 SARS-CoV-2/B.1.351 균주에 대한 BV2438 및 BV2373 면역화 요법의 단독 또는 앞서 언급한 사포닌 항원보강제와의 조합의 효능을 평가하였다. SARS-CoV-2/WA1 균주는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩타이드를 갖는다. SARS-CoV-2/B.1.1.7 균주는 아미노산 69, 70 및 144의 결실 및 N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A 및 D1118H의 돌연변이를 포함하는 CoV S 폴리펩타이드를 가지며, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨진다. SARS-CoV-2/B.1.351 균주는 D80A, L242H, R246I, A701V, N501Y, K417N, E484K 및 D614G의 돌연변이를 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 CoV S 폴리펩타이드를 가지며, CoV S 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩타이드에 대해 번호가 매겨져 있다.

[0486] **방법:**

[0487] *세포 및 바이러스:* 바이러스 및 세포는 이전에 설명된 대로 처리되었다(18). 간략하게, Vero E6 세포(ATCC# CRL 1586)를 10%(v/v) 소 태아 혈청(Gibco), 1%(v/v) 페니실린/스트렙토마이신(Gemini Bio-products) 및 1%(v/v) L-글루타민(2 mM 최종 농도, Gibco)(Vero media)이 보충된 DMEM(Quality Biological)에서 배양하였다. 세포는 37℃ 및 5% CO2에서 유지되었다. SARS-CoV-2/WA1은 CDC(BEI #NR-52281)에서 제공되었다. SARS-CoV-2/B.1.17 및 SARS-CoV-2/B.1.351은 존스 홉킨스 대학의 Andy Pekosz 박사가 풍부하게 제공하였다. CPE가 보이기 시작하는 이틀 동안 Vero E6 세포를 감염시켜 두 바이러스에 대한 스톡을 준비하였다. -80℃에서 보관하기 위해 분취하기 전에 원심분리를 통해 배지를 수집하고 정화하였다. 스톡 역가는 이전에 기술한 대로 Vero E6 세포를 사용하여 플라크 분석으로 결정하였다.

[0488] SARS-CoV-2 *단백질 발현:* SARS-CoV-2 구조체는 전장 S 당단백질 유전자 서열(GenBank MN908947 뉴클레오타이드 21563-25384)로부터 합성적으로 생성되었다. 전장 S-유전자는 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda(Sf9)) 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화되었으며 GenScript(Piscataway, NJ, USA)에 의해 합성적으로 생성되었다. 퀵체인지 라이트닝(QuikChange Lightning) 부위 지정 돌연변이 유발 키트(Agilent)를 사용하여 두 개의 스파이크 단백질 변이체를 생성하였다. 퓨린 절단 부위(682-RRAR-685)는 단백질 분해효소 저항성을 갖도록 682-QQAQ-685로 돌연변이되었고 위치 K986P 및 V987P(2P)에 2개의 프롤린 치환을 도입하여 이중 돌연변이 BV2373을 생산하였다. B.1.351 변이체를 기반으로 한 재조합 스파이크 구조체를 생성하기 위해, D60A, D215G, L242H, K417N, E484K, N501Y, D614G 및 A701V 점 돌연변이도 도입되었다. 오토그라파 캘리포니아

(Autographa californica) 다면체 프로모터의 전사 제어하에서 pFastBac 배큘로바이러스 전달 벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA)의 BamHI - HindIII 부위 사이에 전체 길이 S-유전자를 복제하였다. 재조합 배큘로바이러스 구조체를 플라크 정제하였고 마스터 시드 스톡을 준비하여 작업 바이러스 스톡을 생산하는 데 사용하였다. 바큘로바이러스 마스터 및 작업 스톡 역가는 급속 역가 키트(Clontech, Mountain View, CA)를 사용하여 결정하였다. 재조합 바큘로바이러스 스톡은 Sf9 세포를 세포당 ≤0.01의 플라크 형성 단위(pfu)의 감염 다중도(MOI)로 감염시켜 제조하였다.

[0489] 발현 및 정제: SARS-CoV-2 S 단백질은 이전에 설명한 대로 Sf9 세포에서 생성하였다. 간략하게, 세포를 무혈청 배지에서 확장시키고 재조합 배큘로바이러스로 감염시켰다. 세포를 27±2℃에서 배양하고 감염 후 68-72시간에 원심분리(15분 동안 4000 x g)를 통해 수확하였다. 세포 펠렛을 류펩틴과 함께 25 mM Tris HCl(pH 8.0), 50 mM NaCl 및 0.5-1.0%(v/v) 폴리옥시에틸렌 노닐페놀(NP-9, TERGITOL®) NP-9에 현탁시켰다. S-단백질은 NP-9 세제가 함유된 Tris 완충액을 사용하여 원형질막에서 추출하였으며, 10,000 x g에서 30분 동안 원심분리하여 정화시켰다. S-단백질은 TMAE 음이온 교환 및 렌즈콩 렉틴 친화성 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 중공사 접선 유동 여과를 사용하여 25mM 인산나트륨(pH 7.2), 300mM NaCl, 0.02%(v/v) 폴리소르베이트 80(PS 80) 속 100-150 μg mL-1의 정제된 스파이크 단백질을 제제화하였다. 정제된 S-단백질은 Gel-Code Blue 시약(Pierce, Rockford, IL)으로 염색된 4-12% 구배 SDS-PAGE로 평가하고 순도는 OneDscan 시스템(BD Biosciences, Rockville, MD)을 사용하여 스캐닝 농도계로 결정하였다.

[0490] *시차 주사 열량계:* 샘플(각각 BV2426 Lot 01Feb21 및 BV2373 Lot 15Dec20; rS-B.1.351BV2438 및 rS-WU1BV2373) 및 상응하는 완충액을 분당 1℃로 4℃에서 120℃로 가열하고 차등 열용량 변화는 NanoDSC(TA Instruments, New Castle, DE)에서 측정하였다. 별도의 버퍼 스캔을 수행하여 기준선을 얻었으며, 기준선 수정 프로파일을 생성하기 위해 샘플 스캔에서 이를 뺀다. 피크 정점이 위치한 온도는 전이 온도(Tmax)이고 피크 아래 면적은 전이 엔탈피(ΔHcal)를 제공한다.

[0491] *투과 전자 현미경 및 2D 클래스 평균화:* 전자 현미경 검사는 FEI Eagle 4k x 4k CCD 카메라가 장착된 120keV에서 작동되는 FEI Tecani T12 전자 현미경을 사용하여 나노이미징 서비스(NanoImaging Services)(San Diego, CA)에 의해 수행하였다. SARS-CoV-2 S 단백질은 제제 완충액에서 2.5 μg mL-1로 희석하였다. 샘플(3 μL)을 나이트로셀룰로오스로 지지된 400메시 구리 그리드에 적용하고 우라닐 포맷으로 염색하였다. 각 그리드의 이미지는 샘플의 전체 분포를 평가하기 위해 여러 규모로 획득하였다. 고배율 이미지는 150,000x(X nm/픽셀) 및 92,000x(0.16 nm/픽셀)의 공칭 배율에서 획득하였다. 이미지는 -2.0 μm 내지 -1.5 μm(110,000x)의 공칭 디포커스와 ~25e/Å^{2}의 전자 선량에서 획득하였다.

[0492] 클래스 평균화를 위해, 92,000x 고배율 이미지로부터 입자를 식별한 후, 앞서 설명한 바와 같이 정렬 및 분류하였다.

[0493] 생물발광 영상화(BLI)에 의한 hACE2 수용체에 대한 SARS-CoV-2 S 결합 동역학: S-단백질 수용체 결합 동역학은 Octet QK384 시스템(Pall Forte Bio, Fremont, CA)을 사용하여 생물층 간섭계(BLI)에 의해 결정하였다. His 태그가 붙은 인간 ACE2(2 μg·mL-1)를 니켈 충전 Ni-NTA 바이오센서 팁에 고정하였다. 기준선 이후, SARS-CoV-2 rS 단백질 용액은 300nM~4.7nM 범위에 걸쳐 동역학 완충액에서 2배 연속 희석하였으며, 600초 동안 결합된 후 추가로 600-900초 동안 해리하였다. 데이터는 Octet 소프트웨어 HT 10.0을 사용하여 1:1 전역 곡선 맞춤으로 분석하였다.

[0494] 마우스 연구 설계: 암컷 BALB/c 마우스(7-9주령, 17-22g, 그룹당 N = 20)는 단독, 조합 또는 이종 프라임/부스트로서 rS-WU1BV2373, rS-B.1.351BV2438과 5 μg 사포닌 기반 Matrix-M™ 항원보강제(Novavax, AB, Uppsala, SE)를 14일 간격(연구 0일 및 1일차)으로 2회 투여량으로 근육내(IM) 주사하여 면역화하였다. 위약 그룹은 음성 대조군으로 백신 제제 완충액을 주입하였다. 혈청은 연구일 -1, 14, 21, 32일에 분석을 위해 수집하였다. 백신 접종 동물과 대조 동물에 연구일 46일에 SARS-CoV-2에 의해 비강으로 면역성 검사하였다.

[0495] Matrix-M 사포닌 항원보강제에 의해 매개되는 세포 반응을 평가하기 위해, 암컷 BALB/c 마우스 그룹(그룹당 N = 8마리)을 위에서 설명한 동일한 요법으로 21일 간격으로 주사하여 IM 면역화하였다. 비장은 두 번째 면역화 7일 후(연구일 28) 수집하였다. 백신을 접종하지 않은 그룹(N=5)은 대조군으로 사용하였다.

[0496] *개코원숭이 연구 설계:* 9마리의 성체 개코원숭이(연구 시작 시 연령 10-16세)를 그룹당 2-3명의 4개 그룹으로 무작위화하고 50 μg Matrix-M 사포닌 항원보강제와 함께 1, 5 또는 25 μg rS의 rS-WU1BV2373을 IM 주사하여 면역화하였다. 별도의 그룹은 항원보강제 없이 25 μg rS로 면역화하였다. 이 1차 면역화 시리즈에서 동물에게 21

일 간격으로 2회 투여량으로 백신접종하였다. 1차 면역화 시리즈 후의 면역원성 결과는 이전에 기술하였다(15). 대략 1년 후(45주), 모든 동물에 50㎍ Matrix-M 사포닌 항원보강제와 함께 3㎍ 투여량의 rS-B.1.351BV2438을 1회 또는 2회 추가 투여하였다. 항체 및 세포 매개 면역 반응을 측정하기 위해 부스트 전후에 혈청 및 PBMC를 수집하였다.

[0497] *마우스에서 SARS-CoV-2 면역성 검사:* 인산염 완충 식염수(PBS)에 희석된 자일라진(0.38mg/마우스)과 케타민(1.3mg/마우스)의 혼합물 50㎕를 복강내 주사하여 마우스를 마취시켰다. SARS-CoV-2의 7 x 104 pfu B.1.117 또는 1 x 105 pfu B.1.351 균주를 50㎕로 마우스에게 비강 내 접종하였다. 면역성 검사된 마우스의 체중을 감염 당일과 감염 후 4일 동안 매일 측정하였다. 감염 후 2일 및 4일째에, 각 백신접종 그룹과 대조 그룹에서 5마리의 마우스를 희생시키고, 폐를 채취하여 플라크 분석으로 바이러스 역가를 결정하고 qRT-PCR로 바이러스 RNA 수준을 측정하였다.

[0498] *SARS-CoV-2 플라크 분석:* SARS-CoV-2 폐 역가는 1.0mm 유리 비드(Sigma Aldrich) 및 비드 분쇄기(Omini International Inc.)를 사용하여 PBS(Quality Biological Inc.)에서 수확된 폐를 균질화하여 정량화하였다. 합류 배양 근처 Vero E6에 균질액을 추가하고 6점 희석 곡선을 사용하여 플라크 형성 단위(pfu)를 계산하여 SARS-CoV-2 바이러스 역가를 결정하였다.

[0499] *ELISA에 의한 항-SARS-CoV-2 스파이크 IgG:* ELISA를 사용하여 항-SARS-CoV-2 S IgG 역가를 결정하였다. 간단히 말하면, 96웰 미세적정 플레이트(ThermoFischer Scientific, Rochester, NY, USA)를 1.0㎍ mL-1의 SARS-CoV-2 스파이크 단백질로 코팅하였다. 플레이트를 PBS-T로 세척하고 TBS Startblock 차단 완충액(ThermoFisher, Scientific)으로 차단하였다. 마우스, 개코원숭이 또는 인간 혈청 샘플을 연속적으로 희석(10-2 내지 10-8)하고 차단된 플레이트에 첨가한 후 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 배양 후, 1시간 동안 첨가된 플레이트를 PBS-T 및 HRP-접합 염소 항-마우스 IgG 또는 염소 항-인간 IgG(Southern Biotech, Birmingham, AL, USA)로 세척하였다. 플레이트를 PBS-T로 세척하고 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 퍼옥시다제 기질(TMB, TO440-IL, Sigma, St Louis, MO, USA)을 첨가하였다. 반응을 TMB 중지 용액(ScyTek Laboratories, Inc. Logan, UT)을 사용하여 중지시켰다. 플레이트를 SpectraMax Plus 플레이트 판독기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 OD 450nm에서 판독하고 데이터를 SoftMax 소프트웨어로 분석하였다. EC50 값은 SoftMax Pro 6.5.1 GxP 소프트웨어를 사용하여 4-매개변수 피팅으로 계산하였다. 개별 동물 항-SARS-CoV-2 S IgG 역가와 그룹 기하 평균 역가(GMT) 및 95% 신뢰 구간(± 95% CI)은 GraphPad Prism 7.05 소프트웨어로 표시하였다.

[0500] *hACE2 수용체 차단 항체:* 인간 ACE2 수용체 차단 항체를 ELISA에 의해 결정하였다. 96개의 웰 플레이트를 4℃에서 밤새 1.0㎍ mL-1 SARS-CoV-2 S 단백질로 코팅하였다. PBS-T로 세척하고 StartingBlock(TBS) 차단 완충액(ThermoFisher Scientific)으로 차단한 후, 면역화된 마우스, 개코원숭이 또는 인간 그룹의 연속 희석 혈청을 코팅된 웰에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 세척 후, 30ng mL-1의 히스티딘-태그된 hACE2(Sino Biologics, Beijing, CHN)를 실온에서 1시간 동안 웰에 첨가하였다. 세척 후, HRP-접합 항히스티딘 IgG(Southern Biotech, Birmingham, AL, USA)를 첨가한 후, 세척하고 TMB 기질을 첨가하였다. 플레이트는 SpectraMax plus 플레이트 판독기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 OD 450nm에서 판독하고 데이터를 SoftMax Pro 6.5.1 GxP 소프트웨어로 분석하였다. 각 샘플의 각 희석에 대한 % 억제는 SoftMax Pro 프로그램에서 다음 방정식을 사용하여 계산하였다: 100-[(MeanResults/ControlValue@PositiveControl)*100].

[0501] 혈청 희석 대 % 억제 플롯을 생성하였고 데이터에 대한 4 매개변수 로지스틱(4PL) 곡선 피팅에 의해 곡선 피팅을 수행하였다. SARS-CoV-2 S 단백질(BV2373 또는 BV2438)에 대한 hACE2의 50% 억제(IC50)에서의 혈청 항체 역가는 SoftMax Pro 프로그램에서 결정하였다.

[0502] *플라크 감소 중화 역가 분석(PRNT)에 의한 SARS-CoV-2 중화 역가:* PRNT는 이전에 기술한 대로 처리되었다(20). 간단히 말하면, 혈청 샘플을 DMEM(Quality Biological)에서 초기 1:40 희석과 1:2 연속 희석으로 희석하여 총 11회 희석하였다. 무혈청 대조군은 모든 플레이트에 포함되었다. 그런 다음 SARS-CoV-2를 플라크 분석 웰당 50 PFU의 목표에 대한 각 희석액에 1:1로 첨가하고 37℃(5.0% CO2)에서 1시간 동안 배양하였다. 샘플 역가는 플라크 분석에 의해 결정하였고 중화 역가는 비처리 대조군과 비교하여 결정하였다. 4-매개변수 로지스틱 곡선은 PRISM(GraphPad, San Diego, CA)에서 이러한 중화 데이터에 맞춰졌고 바이러스(PRNT50)의 50%를 중화하는 데 필요한 희석은 해당 곡선 맞춤을 기반으로 계산하였다.

[0503] *표면 및 세포내 사이토카인 염색:* 표면 염색을 위해, 쥐의 비장세포를 먼저 항-CD16/32 항체와 함께 배양하여 Fc 수용체를 차단하였다. T 여포성 보조 세포(Tfh)를 특징화하기 위해, 비장세포를 다음 항체 또는 염료와 함께 배양하였다: BV650-접합 항CD3, APC-H7-접합 항CD4, FITC-접합 항-CD8, Percp-cy5.5-접합 항-CXCR5, APC-접합

항-PD-1, Alexa Fluor 700-접합 항-CD19, PE-접합 항-CD49b(BD Biosciences, San Jose, CA) 및 노란색 LIVE/DEAD® 염료(Life Technologies, NY). 배 중심(GC) B 세포를 염색하기 위해, 비장세포를 FITC-결합 항-CD3, PerCP-Cy5.5 결합 항-B220, APC-결합 항-CD19, PE-cy7-결합 항-CD95 및 BV421-접합 항-GL7(BD Biosciences) 및 황색 생존 염료(LIVE/DEAD®)(Life Technologies, NY)로 표지화하였다.

[0504] 쥐 비장세포의 세포내 사이토카인 염색(ICCS)을 위해, 세포를 96-웰 U-바닥 플레이트에서 웰당 2 x 106개 세포로 배양하였다. 세포를 rS-WU1BV2373 또는 rS-B.1.351BV2438 스파이크 단백질로 자극하였다. 배양의 마지막 4시간 동안 BD GolgiPlug™ 및 BD GolgiStop™(BD Biosciences)의 존재하에서 플레이트를 37℃에서 6시간 동안 배양하였다. 세포는 CD3(BV650), CD4(APC-H7), CD8(FITC), CD44(Alexa Fluor 700) 및 CD62L(PE)(BD Pharmingen, CA)에 대한 쥐 항체와 노란색 LIVE/DEAD® 염료로 표지하였다. Cytofix/Cytoperm(BD Biosciences)으로 고정한 후, 세포를 PerCP-Cy5.5-접합 항-IFN-γ, BV421-접합 항-IL-2, PE-cy7-접합 항-TNF-α 및 APC-접합 항-IL-4(BD Biosciences)와 함께 배양하였다. 모든 염색된 샘플은 LSR-Fortessa 또는 FACSymphony 유세포 분석기(Becton Dickinson, San Jose, CA)를 사용하여 수집하고 데이터는 FlowJo 소프트웨어 버전 Xv10(Tree Star Inc., Ashland, OR)을 사용하여 분석하였다.

[0505] 개코원숭이 PBMC의 ICS의 경우, 도 5a에 나열된 시점에 수집된 PBMC를 rS-WU1BV2373 또는 rS-B.1.351BV2438을 사용하여 위에서 설명한 대로 자극하였다. 세포는 인간/NHP 항체 BV650-접합 항-CD3, APC-H7-접합 항-CD4, FITC-접합 항-CD8, BV421-접합 항-IL-2, PerCP-Cy5.5-접합 항-IFN-γ, PE-cy7-접합 항-TNF-α, APC-접합 항-IL-15, BV711-접합 항-IL-13(BD Biosciences) 및 노란색 LIVE/DEAD®생존성 염료으로 표지하였다.

[0506] *효소 결합 면역흡착 분석(ELISA):* 쥐 IFN-γ 및 IL-5 ELISpot 분석은 마우스 IFN-γ 및 IL-5 ELISpot 키트(3321-2H 및 3321-2A, Mabtech, Cincinnati, OH)에 대한 제조업체의 절차에 따라 수행하였다. 간단히 말하면, 200μL 용량의 4 x 105 비장 세포를 항-IFN-γ 또는 항-IL-5 항체로 사전 코팅된 플레이트에서 rS-WU1BV2373 또는 rS-B.1.351BV2438로 자극하였다. 검출 2차 항체는 클론 RS-6A2 IFN-γ 및 클론 TRFK4이었다. 각 자극 조건은 3회 반복하여 수행하였다. 검정 플레이트를 5% CO2 인큐베이터에서 37℃에서 24-48시간 동안 배양하고 BD ELISpot AEC 기질 세트(BD Biosciences, San Diego, CA)를 사용하여 현상하였다. ELISpot 리더와 ImmunoSpot 소프트웨어 v6(Cellular Technology, Ltd., Shaker Heights, OH)을 사용하여 스팟을 계산하고 분석하였다. IFN-γ 또는 IL-5 분비 세포의 수는 배지 대조군에서 배경 수를 빼서 구했다. 그래프에 표시된 데이터는 3중 웰의 평균이다.

[0507] 유사하게, 개코원숭이 IFN-γ 및 IL-4 검정은 Mabtech의 NHP IFN-γ 및 인간 IL-4 검정 키트를 사용하여 수행하였다. IFN-γ의 경우, 코팅 항체 인간 IFN-γ 3420-2H 및 검출 항체 클론 7-B6-1을 사용하였다. IL-4의 경우, 코팅 항체 인간 IL-43410-2H(클론 IL4-I) 및 검출 항체 클론 IL4-II를 사용하였다. 분석은 3회 수행하였다.

[0508] 통계 분석: GraphPad Prism 8.0 소프트웨어(La Jolla, CA)를 사용하여 통계 분석을 수행하였다. 혈청 항체 역가는 도면에 표시된 대로 개별 동물 및 기하 평균 역가(GMT) 및 95% 신뢰 구간(95% CI) 또는 평균 ± SEM에 대해 도표로 나타내었다. 그룹 간 차이의 통계적 유의성을 평가하기 위해 log10 변환 데이터에 대해 Tukey의 다중 비교 사후 테스트를 사용한 일반적인 일원 분산 분석을 수행하였다. P-값 ≤0.05는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0509] **BV2438 항원의 생물물리학적 특성, 구조 및 기능:** 정제된 BV2438은 환원되고 SDS-PAGE에 적용되었을 때 대략 170 kDa의 예상 분자량으로 이동하였다(도 52a). BV2438의 열 안정성은 시차 주사 열량계(DSC)를 통해 BV2373의 열 안정성과 비교되었고; BV2438의 주요 피크는 프로토타입 BV2373 단백질과 비교하여 열 전이 온도(Tmax)가 4℃ 증가하고 전이 엔탈피(ΔHCal)가 1.3배 더 높은 것으로 나타났으며, 이는 BV2438의 안정성이 증가했음을 나타낸다(도 52b, 표 7). 평균 16,049개 입자의 2회 2차원(2D) 클래스와 결합된 투과 전자 현미경(TEM)을 사용하여 BV2438의 미세 구조를 확인하였다. 고배율(92,000x 및 150,000x) TEM 이미지는 길이가 15nm, 너비가 11nm인 전구 모양의 입자 모양이 나타났으며, 이는 SARS-CoV-2 스파이크 삼량체(PDB ID 6VXX; 도 52c)의 사전 융합 형태와 일치하였다. 이는 프로토타입 BV2373 단백질에 대해 이전에 관찰한 것과 일치한다.

[0510] 변이체 스파이크 단백질 구조체 BV2438의 기능적 특성을 확인하기 위해, hACE2 수용체에 대한 이 rS 단백질의 결합을 이전에 기술된 바와 같이 생물층 간섭계(BLI)를 사용하여 측정하였다. BV2438은 결합 상수(Ka)가 3.94 x 10^4로 hACE2에 단단하고 안정적으로 결합하는 것으로 확인되었으며, 이는 프로토타입 단백질 BV2373(Ka = 1.08 x 10^4)에 비해 hACE2에 대한 3.6배 더 큰 연관성을 나타낸다. 이 두 단백질의 해리 상수는 본질적으로 동일하였다(BV2438 및 BV2373의 경우 각각 1.46 x 10^{-7} 및 1.56 x 10^{-7}). 본 발명자는 이전에 설명한 대로 ELISA를 사용

하여 hACE2에 대한 BV2438 결합을 추가로 평가하였다. 이 분석에서, BV2438은 프로토타입 구조체 BV2373(EC_{50} = 9.4 ng/mL)보다 약간 낮은 농도(EC_{50} = 8.0 ng/mL)에서 hACE2의 50% 포화도를 달성했으며, 이는 BV2438이 BV2373에 비해 hACE2에 대해 약간 더 높은 친화성을 나타냄을 확인한다(표 7).

[0511] [표 7]

[0512] SARS-CoV-2 재조합 스파이크 단백질의 열안정성 및 hACE2 결합

SARS-CoV-2 rS 단백질	시차 주사 열량계(DSC)		hACE2 결합		
	T_{max} (℃)	ΔHcal (kJ mol^{-1})	생물층 간섭계에 의한 hACE2 결합 동역학		hACE2 ELISA (EC_{50}, ng/mL)
			K_a (1/Ms)	K_{dis} (1/s)	
BV2438	67.24	725.1	3.94×10^{4}	1.46×10^{-7}	8.0
BV2373	63.21	546.0	1.08×10^{4}	1.56×10^{-7}	9.4

[0513]

[0514] T_{max}, 용융 온도; K_a, 결합 상수; K_{dis}, 해리 상수; EC_{50}, 절반 최대 결합.

[0515] **마우스에서의 BV2438 면역원성:** 본 발명자들은 사포닌 항원보강제와 함께 제제화된 BV2438 및 BV2373의 항체 매개 및 세포 매개 면역원성을 평가하였다. 항체 매개 면역원성을 평가하기 위해, 마우스 그룹(n = 20)을 프라임 및 부스트로서 BV2373 또는 BV2438, 프라임으로서 BV2373 및 부스트로서 BV2438을 사용하거나, 프라임 및 부스트 예방 접종을 위해 두 백신을 2가 제제에 결합하여 면역화시켰다. 위약 그룹은 음성 대조군으로 백신 제제 완충액을 투여하였다. 1가 면역화 그룹에서, 1μg의 rS와 5μg의 사포닌 항원보강제를 0일과 14일에 근육 내 주사하였다. 2가 면역화의 경우, 1μg의 각 rS 구조체를 각 면역화마다 투여하였고, 총 2μg rS의 경우, 5μg의 사포닌 항원보강제와 함께 투여하였다. 연구 설계는 도 53에 제시되어 있다. 4가지 백신 요법 중 하나로 면역화된 마우스는 백신화 후 21일째에 ELISA에 의해 B.2 스파이크 및 B.1.351 스파이크 둘 다에 대해 상승된 항체 역가를 나타냈다. BV2373 또는 BV2438을 사용한 1가 백신접종은 2가 백신접종 또는 이종 백신접종에 비해 상당히 낮은 항-S(WU1) IgG 역가를 생성했지만, 어느 쪽도 IgG 역가를 2배 이상 감소시키지 않았다(도 54a, 도 54b). 반대로, BV2373 단독에 의한 면역화는 다른 모든 면역화 요법에 비해 B.1.351 스파이크에 대한 역가가 상당히 낮아졌고; 1가 BV2438 또는 2가 rS에 의한 면역화는 테스트된 요법 중에서 가장 높은 항-B.1.351 스파이크 IgG 역가가 발생했으며, 이들 요법 간에는 유의한 차이가 없었다(도 54a, 도 54b). 위약 그룹의 동물은 예상대로 검출할 수 없는 항-B.2 스파이크 및 항-B.1.351 스파이크 IgG 역가를 나타냈다.

[0516] hACE2 결합에 대한 스파이크를 억제하는 마우스 혈청의 능력도 평가하였다. 모든 면역화 요법은 21일차에 임의의 그룹 사이에 유의미한 차이 없이 CoV 스파이크 폴리펩타이드에 대한 hACE2 결합을 차단하는 항체의 생성을 초래하였다(도 54c, 도 54d). 그러나 BV2373 단독에 의한 면역화는 B.1.351 스파이크와 hACE2 사이의 결합을 방해할 수 있는 혈청 역가가 상당히 낮아졌고; BV2373 단독 면역화 그룹의 역가는 BV2438 단독 면역화 그룹의 역가보다 4.6배 낮았고($p < 0.0001$), 2가 rS를 투여한 그룹의 역가보다 3.1배 낮았다($p < 0.0001$).

[0517] 다음으로 본 발명자들은 다양한 백신접종 요법 중에서 중화 항체 역가를 평가하였다. 백신 접종 후 32일째에 백신 접종을 받은 동물로부터 수집한 혈청은 플라크 감소 중화 역가 분석($PRNT_{50}$)에서 SARS-CoV-2/WA1, SARS-CoV-2/B.1.1.7 및 SARS-CoV-2/B.1.351 균주를 사용하여 평가하였다. 1가 BV2373 그룹의 혈청은 3가지 바이러스 균주 각각에 대해 유사한 중화 항체 역가를 나타냈다. 1가 BV2438로 면역화된 마우스로부터의 혈청은 B.2 균주에 비해 B.1.351 및 B.1.1.7 균주에 대해 상승된 중화 항체 역가를 생성하였다(도 54e). 이종 백신 그룹은 2가 BV2373/BV2438 백신접종 요법과 마찬가지로 B.2 균주와 비교하여 B.1.351 및 B.1.17 균주에 대해 유사하게 상승된 중화 항체 역가를 생성하였다.

[0518] **BALB/c 마우스에서 SARS-CoV-2에 대한 BV2438 보호:** 도 53에 기술된 대로 백신접종된 마우스를 B.1.1.7 또는 B.1.351을 사용한 면역성 검사에 대한 보호 면역을 생성하는 능력에 대해 평가하였다. SARS-CoV-2/Wuhan 1(B.2) 균주는 야생형 마우스에서 복제되지 않는 반면, B.1.1.7 및 B.1.351 균주는 스파이크 ORF에 501Y 돌연변이가 있어 스파이크 단백질이 마우스 ACE2와 결합하고 세포에 들어가게 한다. 백신접종 후 46일째에, 마우스에게 B.1.17의 7×10^{4} PFU(그룹당 n=10마리 마우스) 또는 B.1.351의 1×10^{5} PFU(그룹당 n=10마리의 마우스)를 비강내 접종하였다. 면역성 검사 기간 이후 동안 매일 마우스의 체중을 측정하였고, 감염 후 2일 및 4일째(연구일 48 및 50일), 그룹당 5마리의 마우스를 아이소플루란 흡입으로 안락사시켰다. 그런 다음 각 마우스의 폐에서 플라크 형성 분석을 통해 바이러스 부하를 평가하고 RT-PCR을 통해 바이러스 RNA를 평가하였다. B.1.1.7에 감염된 위약 BALB/c 마우스는 체중 감소가 없었으며 이 SARS-CoV-2 균주에 감염된 백신접종 그룹에서는 체중 감소가 관

찰되지 않았다. B.1.351 감염된 마우스의 경우, B.1.351 감염 후 4일까지 위약 백신접종 그룹에서 20% 체중 감소가 관찰되었다(도 55a, 도 55b). 두 가지 요법으로 백신접종된 모든 마우스는 B.1.351 감염 후 체중 감소로부터 보호되었으며, 이는 이 모델에서 보호의 임상적 상관관계를 입증한다.

[0519] 감염 후 2일째에, 위약 그룹의 B.1.1.7 감염된 마우스는 4 x 10^4 pfu/g 폐를 나타냈고, 이는 위약 백신접종 그룹에서 감염 후 4일까지 검출할 수 없는 수준으로 떨어졌다. 임의의 BV2373 또는 BV2438 요법으로 면역화 시, 감염 후 2일 또는 4일째에 검출 가능한 생 바이러스가 없었으며, 이는 백신접종 후 5-log 초과 감소와 감염으로부터 보호를 나타내었다. (도 55c, 도 55d). 감염 후 2일째에, 가짜 백신접종 그룹의 B.1.351 감염된 마우스는 8 x 10^8 pfu/g 폐를 나타냈고, 이는 감염 후 4일째에 2 x 10^5 pfu/g 폐로 떨어졌다. 임의의 rS 요법으로 면역화한 경우, B.1.351 감염된 마우스에서 감염 후 2일 또는 4일째에 검출 가능한 생 바이러스가 없었다. 이는 가짜 백신접종된 마우스로부터 감염 후 2일까지 바이러스 부하가 > 5 log 감소하여 바이러스 역가의 극적인 감소를 입증한다(도 55c, 도 55d). 폐 RNA는 또한 챌린지 후 하위 게놈(sgRNA) SARS-CoV-2 mRNA 생성에 대해 분석하였다. 각각의 위약 그룹의 수준과 비교하여, 본 발명자들은 두 균주 모두로 감염시킨 후 2일 및 4일에 면역화된 마우스에서 폐 sgRNA 수준의 >99% 감소를 발견하였다(도 55e, 도 55f).

[0520] 이러한 결과는 사포닌 항원보강제와 함께 제제화되고 1가, 2가 또는 이종 요법으로 투여된 BV2373 및 BV2438이 마우스에서 SARS-CoV-2, B.1.1.7 및 B.1.351의 두 균주에 대한 보호를 제공한다는 것을 확인시킨다. 체중 감소 감소, 높은 중화 항체 역가 및 생쥐 폐의 바이러스 복제 제거와 함께, 본 발명자들은 변이체 스파이크 표적 백신에 의한 높은 보호 백신 반응을 입증한다.

[0521] **마우스에서 BV2438의 세포 매개 면역원성:** BALB/c 마우스 그룹(n = 8/그룹)을 위에서 언급한 동일한 BV2373 또는 BV2438 요법으로 21일 간격으로 면역화하였다(도 56a). 음성 대조군(n=4)에는 백신 제제 완충액을 주사하였다. 추가 면역화 후 7일인 연구일 28일에 비장을 채취하였다. 비장세포를 수집하고 ELISpot 및 세포내 사이토카인 염색(ICS)을 실시하여 BV2373 또는 BV2438로 자극 시 사이토카인 분비를 조사하였다. 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA)은 모든 백신접종 요법에서 IL-5 생산 세포의 수에 비해 더 많은 수의 IFN-γ 생산 세포를 나타냈는데, 이는 Th1-편향된 반응을 의미한다(도 56b-d). rS로 자극 시, 강한 Th1 반응이 IFN-γ, IL-2 또는 TNF-α를 발현하는 CD4+ T 세포 및 3가지 사이토카인 모두를 발현하는 다기능 CD4+ T 세포의 존재에 의해 측정된 바와 같이 ICS에 의해 관찰되었다(도 56e, 도 57a-e). Th2 사이토카인 IL-4를 발현했지만 IL-2 및 TNF-α에 대해서는 음성인 CD4+ T 세포도 존재했지만, Th1 사이토카인에 대해 관찰된 것보다 낮은 비율로 존재하였다(도 57a-e). BV2373 또는 BV2438 자극 시 테스트된 모든 사이토카인에 대해 백신접종 그룹 간에 사이토카인 양성 세포 수의 유의미한 차이가 관찰되지 않았다.

[0522] T 여포성 보조 세포(CSCR5+PD-1+CD4+)는 더 큰 백분율의 CD4+ T 세포를 나타내는 경향이 있었지만, 위약 동물과 비교하여 백신접종된 동물에서는 통계적으로 유의한 상승이 관찰되지 않았다(도 56f). 유사하게, 배중심 형성은 유동 세포측정법을 사용하여 CD19+ B 세포 중 GL7+CD95+ 세포의 백분율을 결정함으로써 평가되었으며, 위약 그룹에 비해 백신접종 그룹에서 배중심 B 세포의 백분율이 더 높은 경향이 관찰되었지만, 1가 BV2438 요법에 의한 면역화된 동물만 유의하게 더 높은 비율을 나타내었다(위약과 비교하여 p = 0.049; 도 56g).

[0523] **개코원숭이에서 BV2373으로 1차 면역화한 지 1년 후 BV2373으로 부스팅하여 유도된 기억소거 반응:** 개코원숭이의 작은 집단(n = 총 9마리)에게 BV2373(50㎍ 사포닌 항원보강제와 함께 1㎍, 5㎍ 또는 25㎍ 또는 항원보강제가 첨가되지 않은 25㎍ rS)으로 1차 면역화 시리즈를 실시하였다. 약 1년 후, 모든 동물에 50㎍ 사포닌 항원보강제와 함께 3㎍ BV2438을 1회 또는 2회 투여량으로 부스트하여 결과적인 면역 반응을 조사하였다(도 58a). 첫 번째 BV2438 부스트 7일 후, 원래 항원보강된 BV2373을 투여받은 동물은 1차 면역화 시리즈 동안 최고 면역 반응에서 원래 관찰된 것보다 더 높은 항-S(WU1) IgG 역가 수준으로 나타나는 강력한 기억소거 반응을 나타내었다(도 58b). 이 반응은 BV2438의 두 번째 부스터 투여에 의해 더 강화되지 않는 것으로 보였지만, 본 연구에서 활용된 작은 표본 크기가 의미 있는 정량 분석을 방해하였다. 1차 면역화 시리즈 동안 항원보강제가 첨가되지 않은 BV2373을 투여받은 동물은 BV2438 부스팅에 대해 더 약한 반응을 보였지만, 여전히 높은 항-S(WU1) IgG 반응을 나타내었다. BV2438 부스트는 BV2373 및 BV2438에 대해 필적할 만한 항체 역가를 유도했으며, 원래 항원보강제가 첨가되지 않은 BV2373을 투여받은 동물은 더 약한 반응을 나타냈다(도 58c, 도 58d).

[0524] 야생형 CoV S 단백질(SEQ ID NO: 2) 또는 B.1.351 rS와 hACE2 사이의 상호작용을 방해할 수 있는 혈청 항체 역가도 부스트 전 및 BV2438의 1 또는 2 투여에 의한 부스트 후 7, 21, 35 및 89일에 평가하였다. 항-S IgG 역가에 대해 관찰된 것과 유사하게, 1차 면역화 시리즈 동안 항원보강된 백신을 투여받은 동물은 BV2438 부스트 후 7일에 강력한 hACE2 억제 항체 반응을 나타냈지만, 부스트 전에는 역가가 검출되지 않았다. BV2438-hACE2 차단

항체 수준에 비해 BV2373-hACE2 차단 항체의 역가는 약간 더 높았지만, 작은 표본 크기가 의미 있는 정량 분석을 방해하였다. 1차 면역화 시리즈 동안 항원보강제가 첨가되지 않은 백신을 투여받은 동물은 BV2438 부스트 후 더 낮은 hACE2 차단 역가를 나타내었다(도 58e).

[0525] 중화 항체 역가는 WA1, B.1.351 및 B.1.1.7을 중화하는 능력에 대해 혈청을 테스트함으로써 생 바이러스 미세중화 분석으로 분석하였다. BV2438 추가 투여 이전에 수집된 혈청은 이러한 모든 바이러스에 대해 검출할 수 없는 중화 항체 수준을 가졌다. 백신 접종 후 7일까지, 3가지 균주를 모두 중화하는 고역가 항체가 검출되었으며 이 항체 반응은 백신 접종 후 35일 동안 높게 유지되었다. 1차 시리즈에서 항원보강제가 첨가되지 않은 BV2373으로 면역화된 동물은 훨씬 더 넓은 범위의 중화 역가와 함께 상당히 낮은 항체 수준을 나타내었다(도 58f). 종합적으로, 이 데이터는 1차 백신접종 시리즈 후 1년이 지나도 강력하고 지속적인 항체 반응을 보여준다.

[0526] 3개의 Th1 사이토카인을 발현하는 다기능 T 세포도 개코원숭이에서 첫 번째 BV2438 부스터 투여 후 7일에 관찰되었으며, 이러한 반응은 첫 번째 부스터 투여 후 35일에도 유지되었다(도 58g 및 도 59a-g).

[0527] **BV2373 백신접종을 받은 성인의 혈청에 의한 SARS-CoV-2 변이체의 중화:** BV2373 및 사포닌 항원보강제를 함유하는 백신은 현재 B.1.1.7 및 B.1.351이 만연한 지역을 포함하여 전 세계적으로 임상 시험 중이다. 본 발명자들은 USA-WA1, B.1.1.7 및 B.1.351을 중화하기 위해 이러한 시험에서 개인의 혈청 용량을 평가하였다. 미세중화 분석은 $PRNT_{50}$ 판독으로 수행하였다(도 60a, 도 60b). 두 번째 백신 투여 후 임상 시험 참가자로부터 무작위로 선택된 30개의 혈청 샘플을 분석하였다. WA1과 B.1.1.7을 비교할 때, 대부분의 혈청 샘플에 걸쳐 중화 활성에 변화가 없었고; 단 1개의 샘플만이 B.1.1.7에 대한 중화 항체 역가에서 통계적으로 유의미한 변화를 보였다. WA1 대 B.1.351 중화 역가는 $PRNT_{50}$ 분석에서 평균에서 1 표준 편차만큼 감소된 중화를 나타내는 30개 샘플 중 5개 샘플로 중화 역가의 증가된 범위를 보여주었다. 이 데이터는 B.1.1.7과 비교하여 BV2373 및 사포닌 항원보강제를 투여받은 소수의 백신접종자에서 B.1.351의 감소된 중화를 입증한다.

[0528] **논의:** 본 발명자들은 사포닌 항원보강제에 의해 항원보강된 B.1.351 스파이크 변이체를 사용하는 전체 길이의 안정화된 사전 융합 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질 백신이 높은 수준의 기능성 면역을 유도할 수 있고 B.1.1.7 및 B.1.351 SARS-CoV-2 균주 모두로부터 마우스를 보호할 수 있음을 보여주었다. BV2438에 의한 마우스 또는 비-인간 영장류 면역화는 항-S 항체, hACE2-수용체 억제 항체 및 SARS-CoV-2 중화 항체를 유도하였다. 또한, BV2438 백신은 $CD4^+$ T 세포 반응을 유도하고 배중심 형성을 유도하며 B.1.351 및 B.1.1.7 면역성 검사에 대한 보호를 제공하였다.

[0529] 마우스에서, B.1.351 변이체-지향 백신으로 백신접종한 후 생산된 항체는 hACE2와 변이 스파이크 또는 조상 스파이크 사이의 결합을 동일한 정도로 억제할 수 있었으며, 이는 이 변이체-지향 백신이 조상 SARS-CoV-2 변종에 대해 "후진"을 효율적으로 보호할 수 있음을 나타내었다.

[0530] 본 발명자들의 시험으로부터의 인간 백신 혈청의 분석은 강력한 항체 반응과 최소한의 중화 손실을 입증한다. 본 발명자들은 남아프리카의 WA1 시험 참가자에게서 획기적인 감염의 증거가 있음에도 불구하고, B.1.351 바이러스가 B.1.1.7 및 WA1에 비해 중화를 크게 감소시키지 않는다는 것을 관찰하였다. 모든 획기적인 감염은 B.1.351이었다. 따라서 단일 또는 다중 변이체 rS 백신을 포함하는 부스터 백신접종은 이 연구에서 볼 수 있듯이 항체 수준을 높이고 변이체에 대한 적용 범위를 넓힐 것이다.

[0531] **실시예 11**

[0532] **BV2373 및 사포닌 항원보강제는 단일 부스트 투여 후 이종 SARS-CoV-2 균주에 대한 보호 면역 반응을 유도한다**

[0533] 참가자: 18세 이상 84세 이하의 건강한 남성 및 여성 참가자를 본 연구에 등록하기 위해 모집하였다. 참가자의 체질량 지수가 17 내지 35kg/m^2이고, 등록 전에 사전 동의를 제공할 수 있었고, (여성 참가자의 경우) 이성애 활동을 하지 않거나 승인된 피임법을 사용하는 데 동의한 경우 참가자가 자격을 갖추었다. 중증급성호흡기증후군(SARS) 병력이 있거나 COVID-19 진단이 확인된 참가자, 심각한 만성 질환(예를 들어, 당뇨병, 울혈성 심부전, 자가면역 질환, 악성종양)이 있거나 새로운 진단으로 이어질 수 있는 현재 진단되지 않은 질환에 대해 평가 중인 참가자는 질병은 연구에서 제외되었다. 임신 중이거나 수유 중인 여성도 제외되었다.

[0534] 무작위화: 환자를 무작위로 5개 그룹으로 배정하였다. 5개 치료 그룹 중 1개는 위약 대조군(그룹 A)이었고 2개는 부스터에 의한 추가 접종을 고려한 활성 백신군(그룹 B 및 그룹 C)이었다. 약 6개월 후, 0일째와 21일째(그룹 B)에 BV2373(5㎍)과 사포닌 항원보강제(50㎍)를 2회 투여하거나(그룹 B) 0일차에 BV2373(5㎍)과 사포닌

항원보강제(50㎍) 및 21일째에 위약의 1회 투여하는 1차 백신접종 시리즈를 무작위로 받은 동의한 참가자들을 1:1로 다시 무작위 배정하여 189일째에 동일한 수준의 BV2373의 단일 부스터 용량과 사포닌 항원보강제(그룹 B2 및 C2) 또는 위약(그룹 B1 또는 C1)을 투여하였다. 그룹 B 참가자가 이 실시예의 주요 초점이다.

[0535] 목적 및 방법: 본 발명자들은 BV2373의 3회 근육내 5㎍ 용량과 50㎍ 사포닌 항원보강제(분획 A 및 분획 C iscom 매트릭스, 이 실시예에서는 MATRIX-M™이라고도 함) 또는 위약(1:1)을 투여받은 18 내지 84세의 건강한 성인을 대상으로 제 2 상, 무작위, 관찰자 블라인드, 위약-제어 시험을 수행하였다. 첫 번째와 두 번째 투여는 21일 간격으로 투여됐다. 첫 번째 투여와 두 번째 투여는 '1차 백신접종 시리즈'라고 한다. 세 번째 투여("부스트" 투여)는 1차 백신접종 시리즈 후 약 6개월 후에 투여되었다. 세 가지 투여 모두의 주입량은 0.5mL였다. 조상 SARS-CoV-2 균주 에 대한 IgG, MN_{50} 및 hACE2 억제에 대한 분석을 포함하여 안전성 및 면역원성 매개변수를 평가하고 변이체(B.1.351 [베타], B.1.1.7 [알파], B.1.617.2 [델타])를 선택하였다.

[0536] 참가자들은 백신 접종 당일과 그 후 추가 6일 동안 반응성을 기록하기 위해 전자 일기를 활용하였다. 면역원성 분석을 위한 혈액 샘플은 추가 접종을 받은 후 28일째에 채취되었으며, 이때 안전성에 대한 추적 조사도 실행하였다. 면역 반응 측정은 혈청 면역글로불린 G(IgG) 항체, 중화 항체 활성(억제 농도 >50%[MN_{50}]에서의 미세중화 분석) 및 인간 안지오텐신 전환 효소 2(hACE2) 수용체 결합 억제에 대한 분석을 포함하였다. SARS CoV-2 rS 단백질 항원에 특이적인 혈청 IgG 항체 수준은 적격 IgG 효소 결합 면역흡착 분석법(ELISA)을 사용하여 검출하였다. SARS-CoV-2 바이러스에 특이적인 중화 항체는 검증된 야생형 바이러스 MN 분석을 사용하여 측정하였다. 혈청 IgG 및 MN_{50} 분석 데이터는 조상 및 베타 변이체 SARS-CoV-2 균주 모두에 대해 수집하였다. 목적에 맞는 기능적 hACE2 억제 분석과 항-rS(항재조합 스파이크) IgG 활성 분석을 모두 사용하여 SARS-CoV-2의 조상 B.1.351(베타), B.1.1.7(알파) 및 B.1.617.2(델타) 변이체 균주에 대한 반응을 분석하였다.

[0537] 안전성 결과는 부스터 후 7일 동안 참가자가 보고한 반응성 사건뿐만 아니라 부스터 후 28일 동안 발생한 원치 않는 부작용을 포함하였다. 부스터 반응성은 예측된 국소 및 전신 이상반응에 따라 별도로 문서화되었다. 부스터로부터 부스터 후 28일까지의 원치 않는 부작용이 기록되었다. 또한 부작용이 심각한지, 백신 접종과 관련되었는지, COVID-19와 관련되었는지, 잠재적 면역 매개 질환(PIMMC)인지, 불연속적 또는 예정에 없던 의사 방문으로 이어지는 것인지에 대한 데이터도 수집되었다. 면역원성 분석을 위한 참여자 샘플은 부스터 직전과 28일 후에 수집되었다.

[0538] 통계: 분석은 부스터 투여 후 28일(217일)에 그룹 B2에서 수집된 데이터와 비교하기 위해 1차 백신접종 시리즈(0일, 21일, 35일, 105일 및 189일) 동안 및 그 후에 얻은 그룹 B 참가자의 안전성 및 면역원성 데이터를 포함하였다. 또한 결과는 참가자 연령 그룹별로 분석되었다: 18세 이상 84세 이하, 18세 이상 59세 이하, 60세 이상 84세 이하.

[0539] 안전성 분석은 BV2373 및 사포닌 항원보강제(그룹 B2) 또는 위약(그룹 B1)의 단일 부스터 접종을 받은 모든 참가자를 포함하였다. 안전성 분석은 각 백신 접종 후 7일까지 분석된 국소적 및 전신적 부작용과 부스터 후 28일까지 원치 않는 부작용이 발생한 참가자의 수와 백분율로 제시되었다.

[0540] 결과: 총 1610명의 참가자가 선별되었다. 그룹 B(n=257)에 무작위로 배정된 3명의 참가자를 제외한 모든 참가자가 1차 백신접종 시리즈에서 BV2373 및 사포닌 항원보강제의 두 가지 용량을 모두 투여받았으며 동일한 용량 수준에서 단일 부스터 용량 조사를 위해 고려되었다(도 63). 그룹 B 참가자의 재배정은 189일에 이루어졌으며, 동의한 참가자 210명이 그룹 B2(n=104)에서 BV2373 및 사포닌 항원보강제의 단일 부스터를 받거나 그룹 B1(n=106)에서 위약을 받도록 1:1로 배정되었다. 그룹 B2에서, 1명을 제외한 모든 참가자가 부스터로 활성 백신을 투여받았다. 그룹 B1의 6명의 참가자를 제외한 모든 참가자는 부스터로 위약을 투여받았고; 나머지 6명의 참가자 중 4명은 부스터를 투여받지 않았으며(그 중 1명은 진행 중인 부작용으로 인해 안전성을 위해 그룹 B1에 포함됨) 2명은 부스터로 실수로 활성 백신을 투여받았고 그룹 B2에서 안전성을 평가 받았다. 그룹 A의 한 참가자를 제외한 모든 참가자는 세 가지 용량 모두에 대해 위약을 투여받았으며 나머지 참가자는 부스터 용량으로 활성 백신을 투여받았다.

[0541] 인구통계 및 기본 특성은 일반적으로 활성(그룹 B2) 및 위약(그룹 B1) 부스터 그룹(표 8) 사이에서 균형을 이루었으며, 단, 그룹 B2(45%)보다 그룹 B1(58%)의 여성 참가자 비율이 더 높았다. 그룹 A, B1, B2 전체에서, 평균 연령은 약 57세였으며 참가자의 45%는 60세 이상에서 84세 이하였다. 대부분의 참가자는 백인(87%)이었고 히스패닉이나 라틴계(95%)는 아니었다. 기준선 SARS-CoV-2 혈청형은 대부분 음성이었다(98%).

[0542] 예측된 국소 및 전신 반응성 사건의 안전성 보고는 BV2373 및 사포닌 항원보강제의 세 가지 용량 모두에서 증가하는 경향을 보여주었다(도 64a-b). 부스터 이후, 그룹 B2의 참가자는 1차 백식접종 시리즈 후 70.0%(5.2% ≥ 3등급)에 비해 82.5%(13.4% ≥ 3등급)의 국소 반응(압통, 통증, 부기 및 홍반) 발생률을 보고하였다. 4등급 국소 반응은 드물었으며, 1차 백신접종 시리즈 후 참가자가 없는 것과 비교하여 그룹 B2의 한 참가자가 두 가지 사건(통증 및 압통)을 보고하였다. 부스터 후, 국소 반응은 홍반(2.5일)을 제외한 모든 사건에 대해 평균 지속 기간이 2.0일로 짧았다. 1차 백신접종 시리즈 이후에도 국소 반응은 일시적이었는데, 통증과 압통의 평균 지속 기간은 2.0일, 홍반과 부기의 평균 지속 기간은 1.0일이었다.

[0543] 전신 반응은 1차 백신접종 시리즈 후 모든 사건(피로, 두통, 근육통, 권태감, 관절통, 메스꺼움/구토 및 발열)에 대한 발생률이 52.8%(5.6% ≥ 3등급)에 비해 76.5%(15.3% ≥ 3등급)로 유사한 패턴을 나타내었다. 4등급 전신 반응은 드물었으며, 1차 백신접종 시리즈 후 참가자가 없는 것과 비교하여 그룹 B2의 한 참가자가 3가지 사건(두통, 권태감, 근육통)을 보고하였다. 부스터 후, 전신 반응은 2.0일 지속된 근육통을 제외한 모든 증상에 대해 평균 1.0일 지속으로 사실상 일시적이었다. 모든 전신 반응은 1차 백신접종 시리즈 이후에도 일시적이었으며, 모든 사건의 평균 지속 기간은 1.0일이었다.

[0544] 1차 백신접종 시리즈 또는 부스터 투여 후 젊은 성인(18세 이상 59세 이하)에 비해 노인(60세 이상 84세 이하)에서 국소 및 전신 반응원성 사건이 덜 빈번하고 덜 심각하였다. 더 젊은 집단에서는, 부스터 후 국소 및 전신 반응이 각각 참가자의 84.9%(18.9% ≥ 3등급) 및 84.9%(26.4% ≥ 3등급)으로 보고된 반면, 노년층 참가자의 79.5%(6.8% ≥ 3등급) 및 66.7%(2.2% ≥ 3등급)으로 각각 보고되었다.

[0545] 원치 않는 부작용은 활성 부스트 참가자(그룹 B2), 위약 부스트 참가자(그룹 B1) 및 연구 전반에 걸쳐 3회 용량의 위약을 투여받은 참가자(그룹 A)에 걸쳐 요약되었다. 부스터 후 28일 동안, 처음에 1차 백신접종 시리즈 동안 활성 백신을 접종한 참가자(그룹 B2 및 B1)는 위약만 접종한 참가자(그룹 A)보다 원치 않는 부작용 발생률이 더 높았고, 참가자의 12.4%, 12.7%, 및 11.0%가 각각 그러한 사건을 보고하였다. 원치 않는 심각한 부작용에 대해서도 비슷한 경향이 나타났다(각각 5.7%, 3.9% 및 2.4%). 보고된 다른 유형의 AE는 의학적으로 참석한 AE(의료 방문이 필요한 사건, MAAE), 잠재적 면역 매개 질환(PIMMC), COVID-19와 관련된 사건 및 심각한 부작용(SAE)을 포함하였다.

[0546] 전반적으로, MAAE는 세 그룹(그룹 B2, B1 및 A의 경우 각각 30.5%, 26.1% 및 23.2%)에 걸쳐 활동적인 부스팅 참가자에서 약간 더 높은 빈도로 발생했으며, 관련 사건은 소수의 참가자에게서 보고되었다(각각 1.9%, 0%, 1.2%). PIMMC로 간주되는 사건은 연구 전반에 걸쳐 드물었으며 그룹 B2와 그룹 A의 참가자 한 명이 각각 단일 사건을 보고하였고; 두 사건 모두 연구 치료와 관련이 없는 것으로 평가되었다. COVID-19와 관련된 부작용을 보고한 참가자는 없었다.

[0547] SAE는 또한 연구 전반에 걸쳐 드물게 발생하여, 그룹 B2, B1 및 A 참가자의 각각 5.7%, 3.3% 및 1.6%에서 발생하였고, 모든 사건은 연구 치료와 관련이 없는 것으로 평가되었다.

[0548] 그룹 B2 및 B1 참가자에 대한 SAE 평가는 활성 부스팅과의 관계를 나타내지 않았는데, 이는 SAE가 1차 투여, 2차 투여 및 부스터 이후 그룹 B2 참가자의 0%, 4.8% 및 1.0%에서 발생하고, 그룹 B2 참가자의 0%, 2.0% 및 2.0%에서 발생했기 때문이다.

[0549] 그룹 B IgG 및 MN50 기하 평균 역가(GMT)의 감소는 1차 백신접종 시리즈(35일)부터 189일까지 관찰되었다(각각 IgG의 경우 43,905 ELISA 단위[EU] 내지 6,064 EU, 및 MN50의 경우 1,470 내지 63). 부스터 후 28일째(217일), IgG 및 MN50 역가는 부스터 전 역가 및 1차 시리즈에 의해 생성된 35일 역가 둘 다에 비해 강력하게 증가하였다(도 65, 도 66).

[0550] 조상 SARS-CoV-2 균주의 경우, 혈청 IgG GMT는 1차 백신 접종 시리즈(35일) 후 43,905 EU에서 부스터(217일) 후 204,367 EU로 약 4.7배 증가하였다. 부스팅 후 더 높은 배수 증가가 젊은 성인(4.1배)에 비해 노년층(5.1배)에서 나타났다. 마찬가지로, 조상 SARS-CoV-2 균주에 특이적인 MN50 분석 GMT는 동일한 시점에 걸쳐 1,470에서 6,023으로 약 4.1배 증가했으며, 노년층과 젊은 성인에서는 각각 4.0배 및 3.8배 증가하였다.

[0551] 베타 변이체의 경우, IgG GMT는 부스터 전 189일의 4,317 EU에서 217일의 175,190 EU로 증가했는데, 이는 부스터 후 약 40.6배 증가를 반영한다. 이러한 역가는 조상 계통에 대해 35일째에 관찰된 역가보다 4배 더 높았다(GMT 175,190 EU 대 43,905 EU). 베타 종 MN50 분석 데이터는 부스터 전(189일)부터 부스터 후(217일)까지 역가가 약 50.1배(GMT 13 대 661) 유사한 배수 증가를 나타냈지만, 역가는 35일째 조상 균주에서 나타난 것보다 낮았다(GMT 661 대 1,470). (표 9, 표 10).

[0552] 35일째(그룹 B) 및 217일째(그룹 B2)의 참가자 혈청을 사용하여 추가 SARS-CoV-2 변이체에 대한 면역 반응을 평가하기 위해 두 가지 분석법을 개발하였다. 기능적 hACE2 억제 분석을 활용하여 조상 균주(SEQ ID NO: 1과 비교하여 D614G 돌연변이가 있는 CoV S 폴리펩타이드를 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스) 및 SARS-CoV-2의 델타, 베타 및 알파 변이체에 대한 활성을 비교하였다. 각각의 순서로, hACE2 억제 역가의 6배, 6.6배, 10.8배, 8.1배, 19.9배 증가가 관찰되었다(표 12A, 표 12B, 도 62a-b). SARS-CoV-2의 동일한 균주에 걸쳐 항-rS IgG 활성을 비교한 두 번째 분석은 5.4배(조상), 11.1배(델타), 6.5배(베타), 9.7배(알파) 더 높은 역가가 부스터 이후에 관찰되었음을 발견하였다(표 11A, 표 11B, 도 61a-b).

[0553] 결과: 1차 2회 용량 시리즈 이후 약 6개월에 단일 부스터 용량의 백신을 투여하면 반응원성 사건이 점진적으로 증가하고 면역원성이 크게 향상되었다.

[0554] 189일째 부스팅 전, 면역화된 참가자의 항-SARS-CoV-2 항체 역가는 35일째 1차 백신접종 시리즈 후 채취한 샘플과 비교할 때 현저히 낮았다(그룹 B IgG 및 MN_{50} GMT는 43,905 EU 내지 6,064 EU에서 1,470 내지 63으로 각각 낮아졌다). 중화 항체의 존재는 유증상 COVID-19에 대한 보호를 강력하게 나타낸다.

[0555] 본 연구에서, 부스터에 대한 항체 반응은 조상 백신 균주뿐만 아니라 알파, 베타 및 델타를 포함하는 보다 최근의 SARS-CoV-2 변이체에 대해 평가되었다. 조상 균주의 경우, 217일째의 IgG 역가는 부스터 전 189일차 역가보다 약 34배 더 높았으며, 중화 항체 역가는 부스터 후 약 96배 증가하였다. 부스터 후 IgG 및 MN 역가는 모두 35일째에 1차 2회 투여 후 관찰된 것보다 >4배 더 높았으며, 이는 35일차 역가가 영국 3상 연구(89.7%)뿐만 아니라 미국/멕시코 3상 연구(90.4%)에서도 높은 수준의 임상 효능에 해당한다는 점에서 주목할만하다. 연령대별로 분류하면, 더 높은 배수 증가가 젊은 성인(18세 이상 59세 이하)에 비해 노인(60세 이상 84세 이하)에서 나타났다. 이 발견은 1차 2회 백신접종 시리즈 후 항체 반응이 젊은 성인에서 나타나는 것보다 낮기 때문에 부스터 투여가 노인에게 추가적인 이점을 제공할 수 있음을 시사한다.

[0556] 베타 변이체의 경우, IgG 및 MN 항체 역가의 40배 내지 50배 증가가 부스터 이후 나타났으며, IgG 역가는 1차 백신접종 시리즈 후 조상 균주에 대해 나타난 것보다 대략 4배 더 높았다. IgG에 대한 관찰과 달리, 베타 변이체에 대한 MN_{50} GMT는 이 변종에 대해 알려진 감소된 중화 반응과 일치하여 1차 백신접종 시리즈 후 조상 균주의 MN50 GMT보다 부스터 후 더 낮았다(GMT 661 대 1,470) .

[0557] SARS-CoV-2의 델타 변이체의 경우, 부스터 후 217일 역가를 35일 역가와 비교할 때 기능적 hACE2 억제 역가의 6.6배 증가가 나타났다. 동일한 시점에서 비교한 항-rS IgG 활성은 부스터와 관련된 9.7배(델타) 더 높은 역가를 발견하였다.

[0558] 국소 및 전신 반응성 발생률은 이전 투여에 비해 6개월 부스터 투여 후 더 높았으며 이는 세 번째 투여에서 나타난 증가된 면역원성을 반영한다. 그러나, 3등급 이상 사건의 발생률은 상대적으로 낮은 수준을 유지하였고 참가자의 10% 이상이 피로(12.2%)만 기록하였다. 전체적으로, 5건의 4등급(잠재적으로 생명을 위협할 수 있음) 예측된 국소 및 전신 부작용이 보고되었다. 이러한 5가지 사건(통증, 압통, 두통, 권태감 및 근육통)은 모두 백신과 관련된 약물 과민증의 부작용과 동시에 활성 부스터 그룹의 동일한 참가자에 의해 보고되었다. 약물 과민증 사건은 중증도가 경미한 것으로 평가되었다. 참가자는 이 사건에 대해 어떠한 의학적 치료도 구하지 않았으며 참가자의 모든 증상은 6일에 걸쳐 해결되었다.

[0559] 표 13은 SEQ ID NO: 1 또는 SARS-CoV-2 델타 변이체와 비교하여 D614G 돌연변이가 있는 SARS-CoV-2 바이러스의 99% 중화에 대한 기하 평균 역가를 보여준다. 도 67은 D614G 돌연변이 및 B.1.617.2(델타 변이체)를 함유하는 SARS-CoV-2 균주에 대한 실시예 11의 BV2373 및 사포닌 항원보강제를 포함하는 면역원성 조성물에 대한 중화 항체 99(neut99) 값을 보여준다.

[0560] 전반적으로, 1차 시리즈 약 6개월 후에 투여된 BV2373 및 사포닌 항원보강제의 단일 부스터 투여는 2개의 3상 연구에서 높은 수준의 효능과 관련된 항체 역가보다 4배 더 높은 체액성 항체의 실질적인 증가를 유도하는 동시에 허용 가능한 안전 프로필도 나타내었다. 이러한 발견은 부스터 프로그램에서 백신의 사용을 뒷받침한다.

[0561] [표 8]

[0562] 그룹 A, B1, B2의 인구통계학적 및 기본 특징

매개변수	그룹 A N = 172	그룹 B1 N = 102	그룹 B2 N = 105
연령(세)			
평균 (SD)	51.9 (17.23)	52.0 (16.99)	51.7 (17.12)
중앙	56.0	57.5	58.0
최소, 최대	18, 83	19, 80	19, 82
연령 그룹 (n [%])			
18 내지 59세	95 (55.2)	55 (53.9)	57 (54.3)
60 내지 84세	77 (44.8)	47 (46.1)	48 (45.7)
성별 (n [%])			
남성	100 (58.1)	43 (42.2)	58 (55.2)
여성	72 (41.9)	59 (57.8)	47 (44.8)
인종 (n [%])			
백인	151 (87.8)	86 (84.3)	93 (88.6)
흑인 또는 아프리카 미국인	2 (1.2)	3 (2.9)	3 (2.9)
아시아인	15 (8.7)	10 (9.8)	7 (6.7)
미국 인디언 또는 알라스카 원주민	2 (1.2)	1 (1.0)	1 (1.0)
다인종	2 (1.2)	1 (1.0)	1 (1.0)
행방불명	0	1 (1.0)	0
민족성 (n [%])			
히스패닉 또는 라틴	11 (6.4)	3 (2.9)	1 (1.0)
히스패닉 또는 라틴 아님	161 (93.6)	97 (95.1)	104 (99.0)
알려지지 않음	0	2 (2.0)	0
기준선 BMI (kg/m2)			
평균 (SD)	27.29 (4.207)	26.69 (4.060)	27.43 (4.040)
중앙	27.40	26.50	27.10
최소, 최대	17.7, 35.0	17.3, 34.9	18.2, 34.9
기준선 SARS-CoV-2 상태 (n [%])			
음성	169 (98.3)	101 (99.0)	102 (97.1)
양성	2 (1.2)	1 (1.0)	3 (2.9)
중간	1 (0.6)	0	0

[0563]

[0564] BMI = 체질량 지수; SARS-CoV-2 = 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 2; SD = 표준편차

[0565] A = 0일, 21일, 189일에 위약

[0566] B1 = 0일과 21일에 BV2373 5㎍ + 사포닌 항원보강제 50㎍, 189일에 위약

[0567] B2 = 0일, 21일, 189일에 BV2373 5㎍ + 사포닌 항원보강제 50㎍

[0568] 1 안전성 분석 세트의 참가자는 치료 오류를 조절하기 위해 받은 치료에 따라 계산된다.

[0569] [표 9]

[0570] BV2373 및 사포닌 항원보강제를 투여받은 참가자의 연구일별 조상 및 베타 변이체 SARS-CoV-2 균주에 대한 1차 및 부스터 백신접종 후 혈청 IgG 기하 평균 역가

	혈청 IgG GMT (EU [95% CI])				
연령 그룹	35일 조상 균주	189일 조상 균주	217일 조상 균주	189일 베타 균주	217일 베타 변종
모든 참가자, 18 내지 84세	43,905 (37,500, 51,403)	6,064 (4,625, 7,952)	204,367 (164,543, 253,828)	4,317 (3,261, 5,715)	175,190 (139,895, 219,391)
참가자 18 내지 59세	65,255(55,747, 76,385)	8,102 (6,041, 10,866)	270,224 (214,304, 340,736)	6,310 (4,642, 8,578)	226,103 (176,090, 290,321)
참가자 60 내지 84세	28,137 (21,617, 36,623)	4,238 (2,631, 6,826)	144,440 (99,617, 209,431)	2,700 1,682, 4,333)	127,601 (86,809, 187,561)

[0571]

[0572] CI = 신뢰 구간; ELISA = 효소 결합 면역 분석법; EU = ELISA 단위; GMT = 기하학적 평균 역가

[0573] [표 10]

[0574] BV2373 및 사포닌 항원보강제를 투여받은 참가자의 연구일별 조상 및 베타 변이체 SARS-CoV-2 균주에 대한 1차 및 부스터 백신접종 후 항체 활성 중화

연령 그룹	MN_{50} GMT (95% CI)				
	35일 조상 균주	189일 조상 균주	217일 조상 균주	189일 베타 균주	217일 베타 변종
모든 참가자, 18 내지 84세	1,470 (1,008, 2,145)	63 (49, 81)	6,023 (4,542, 7,988)	13 (11, 15)	661 (493, 886)
참가자 18 내지 59세	2,281(1,414, 3,678)	80 (56, 114)	8,568 (6,646, 11,046)	14 (11, 18)	871 (656, 1,156)
참가자 60 내지 84세	981 (560, 1,717)	47 (33, 65)	3,936 (2,341, 6,620)	12 (10, 15)	469 (270, 816)

[0575]

[0576] CI = 신뢰 구간; GMT = 기하학적 평균 역가; MN_{50} = 억제 농도 >50%에서의 미세중화 분석

[0577] [표 11A]

[0578] 시간 경과에 따른 항-CoV S IgG

	항 - rS BV2373 역가 (EC50) (SEQ ID NO: 1과 비교된 D614G 돌연변이를 갖는 스파이크 단백질을 포함하는 SARS-CoV 2 바이러스)				항 - rS BV2465 역가 (EC50) (델타)				항 - rS BV2438 역가 (EC50) (베타)				항 - rS BV2425 역가 (EC50) (알파)			
	D0	D35	D189	D217	D0	D35	D189	D217	D0	D35	D189	D217	D0	D35	D189	D217
GMT	166	60742	5361	327758	156	26097	3143	290782	161	40416	4066	264321	156	24333	2739	235145
하부 95%CI	134	42176	3782	225862	144	17501	1952	195349	139	28091	2767	177965	143	15234	1777	152897
하부 95%CI	206	87481	7599	475623	169	38916	5059	432836	188	58147	5975	392582	171	38865	4223	361636
GMFR (D35-D217)	GMFR : 5.4 (CI - 3.34 - 8.71)				GMFR : 11.1 (CI - 6.5 - 19.1)				GMFR : 6.54 (CI - 3.97 - 10.8)				GMFR : 9.7 (CI - 5.56 - 11.9)			
GMFR(D189-D217)	GMFR : 61.2 (CI - 38.9 - 96.4)				GMFR : 92.6 (CI - 52.8 - 162.4)				GMFR : 65.0 (CI - 40.0 - 105.4)				GMFR : 85.9 (CI - 50.4 - 146.1)			

[0579]

[0580] [표 11B]

[0581] BV2373 및 사포닌 항원보강제를 투여받은 참가자의 연구일별 조상 및 변이 SARS-CoV-2 균주에 대한 1차 및 부스터 백신접종 후 항-rS IgG 기하 평균 역가

	조상		델타		베타		알파	
매개변수	35일	217일	35일	217일	35일	217일	35일	217일
GMT (95% CI)	60,742 (42,176, 87,481)	327,758 (225,86, 475,623)	26,097(17,501,38,916)	290,782(195,349, 432,836)	40,416(28,091, 58,147)	264,321(177,965, 392,582)	24,333(15,234, 38,865)	235,145(152,897, 361,636)
GMFR (95% CI)	5.4 (3.34, 8.71)		11.1 (6.5, 19.1)		6.54 (3.97, 10.8)		9.7 (5.56, 11.9)	

[0582]

[0583] [표 12A]

[0584] 시간 경과에 따른 50% hACE2 억제 역가

	항 - rS BV2373 RI 역가 (SEQ ID NO: 1과 비교된 D614G 돌연변이를 갖는 스파이크 단백질을 포함하는 SARS-CoV 2 바이러스)				항 - rS BV2465 RI 역가 (델타)				항 - rS BV2438 RI 역가 (베타)				항 - rS BV2425 RI 역가 (알파)			
	D0	D35	D189	D217	D0	D35	D189	D217	D0	D35	D189	D217	D0	D35	D189	D217
GMT	10	119.6	13.3	723.1	10	40.0	10.9	265.3	10	24.6	10.8	265.2	10	28.7	10.7	234.4
하부 95%CI	10	78.7	10.03	533.5	10	27.03	9.12	192.9	10	16.7	9.18	189.3	10	20.0	9.30	170.2
하부 95%CI	10	181.9	17.6	980.0	10	59.5	12.99	364.7	10	36.04	12.8	371.5	10	41.05	12.3	322.8
GMFR (D35-D217)	GMFR : 6.1 (CI - 3.79 - 9.89)				GMFR : 6.61 (CI - 4.34 - 10.09)				GMFR : 10.8 (CI - 7.1 - 16.4)				GMFR : 8.1 (CI - 5.56 - 11.9)			
GMFR(D189-D217)	GMFR : 54.4 (CI - 37.0 - 79.8)				GMFR : 24.4 (CI - 16.6- 35.7)				GMFR : 24.5 (CI - 16.5 - 36.4)				GMFR : 21.9 (CI - 15.07- 31.9)			

[0585]

[0586] [표 12B]

[0587] BV2373 및 사포닌 항원보강제를 투여받은 참가자에 대한 연구일별 조상 및 변이체 SARS-CoV-2 균주에 대한 1차 및 부스터 백신접종 후 hACE2 억제 기하 평균 역가

	조상		델타		베타		알파	
매개변수	35일	217일	35일	217일	35일	217일	35일	217일
GMT (95% CI)	119.6 (78.7, 181.9)	723.1 (533.5, 980.0)	40.0(27.03, 59.5)	265.3(192.9, 364.7)	24.6(16.7, 36.04)	265.2(189.3, 371.5)	28.7(20.0, 41.05)	234.4(170.2, 322.8)
GMFR (95% CI)	6.1 (3.79, 9.89)		6.61 (4.34, 10.09)		10.8 (7.1, 16.4)		8.1 (5.56, 11.9)	

[0588]

[0589] [표 13]

[0590] D614G 돌연변이 및 B.1.617-2 델타 변이체를 갖는 SARS-CoV-2 바이러스의 중화에 대한 기하 평균 역가

	D614G 돌연변이를 갖는 SARS-CoV-2 바이러스 Neut99 역가		델타 Neut99 역가 (B.617.2)	
	D35	D217	D35	D217
GMT	853	13123	331.6	4629
하부 95%CI	490.2	7619	212	2961
상부 95%CI	1484	22603	518.5	7236
GMFR (D35-D217)	GMFR : 15.4 (CI - 15.5 - 15.2)		GMFR : 13.9 (CI - 13.95 - 13.96)	

[0591]

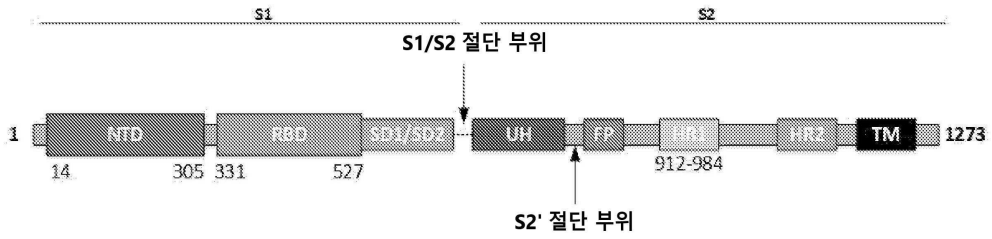
[0592] 본 명세서에 인용된 모든 참고문헌, 기사, 간행물, 특허, 특허 간행물 및 특허 출원은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 포함된다. 그러나, 본 명세서에 인용된 참고 문헌, 기사, 간행물, 특허, 특허 간행물 및 특허 출원에 대한 언급은 그들이 유효한 선행 기술을 구성하거나 세계 어느 나라의 일반적인 지식의 일부를 구성한다는 승인 또는 제안 형식이 아니며 그렇게 받아들여서도 안 된다.

도면

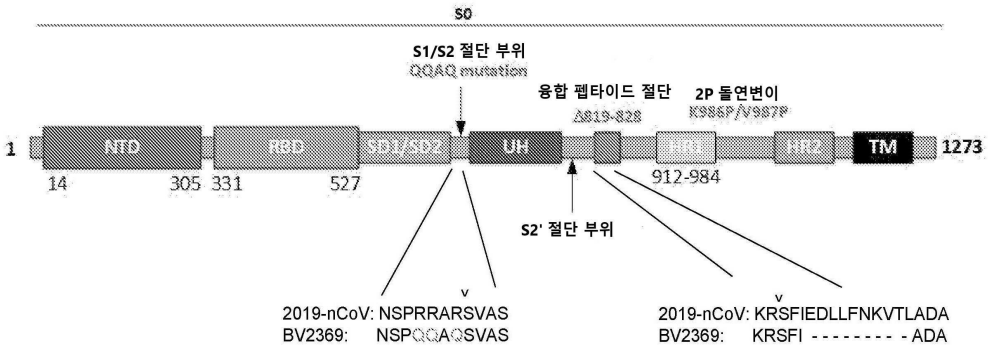
도면1

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSN
VTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNN
ATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEG
KQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLAL
HRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLK
SFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYS
VLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLP
DDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGF
NCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNG
LTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQ
VAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIG
AGICASYQTQTNSP**RRAR**SVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVS
MTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYK
TPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICA
QKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVT
QNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGA
ISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECV
LGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPRE
GVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEEL
DKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWP
WYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT

도면2

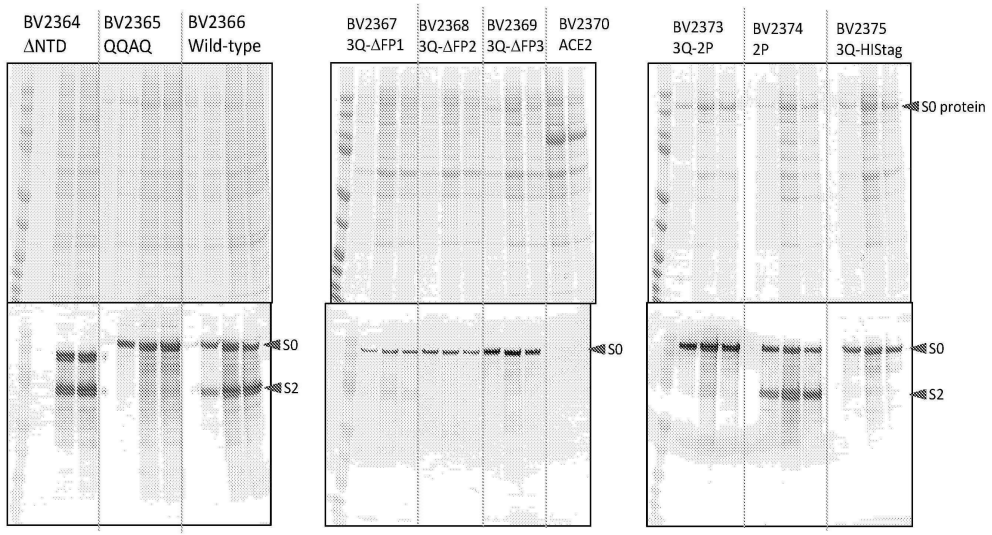


도면3

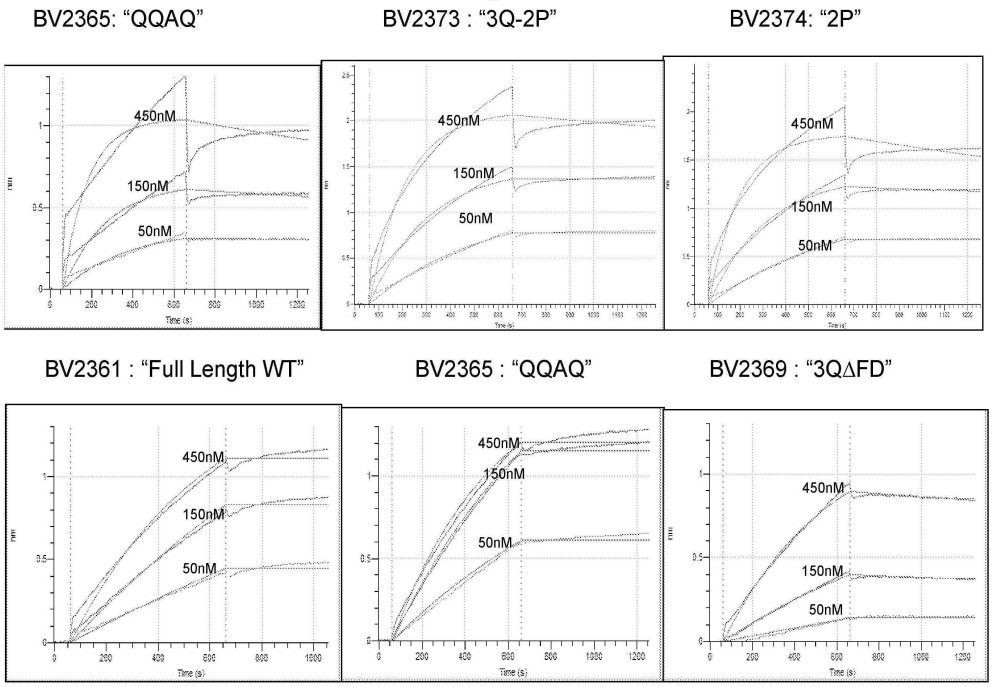


BV2378: 3Q-ΔFP-2P

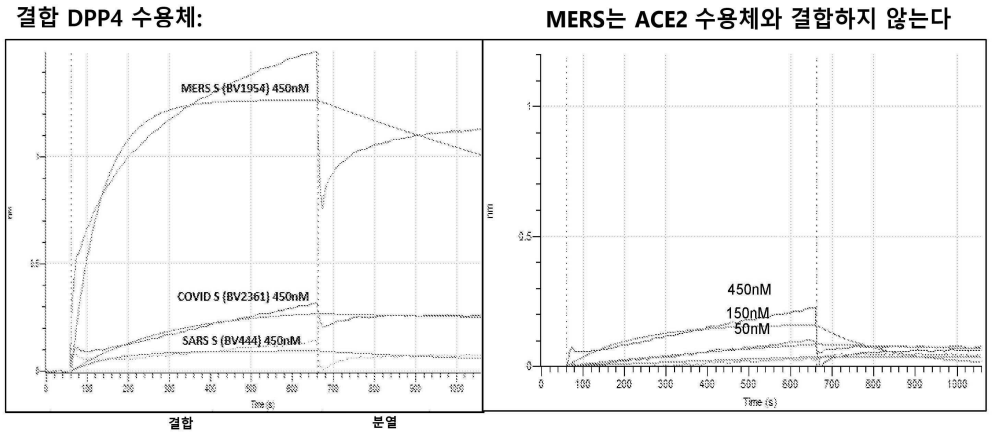
도면4



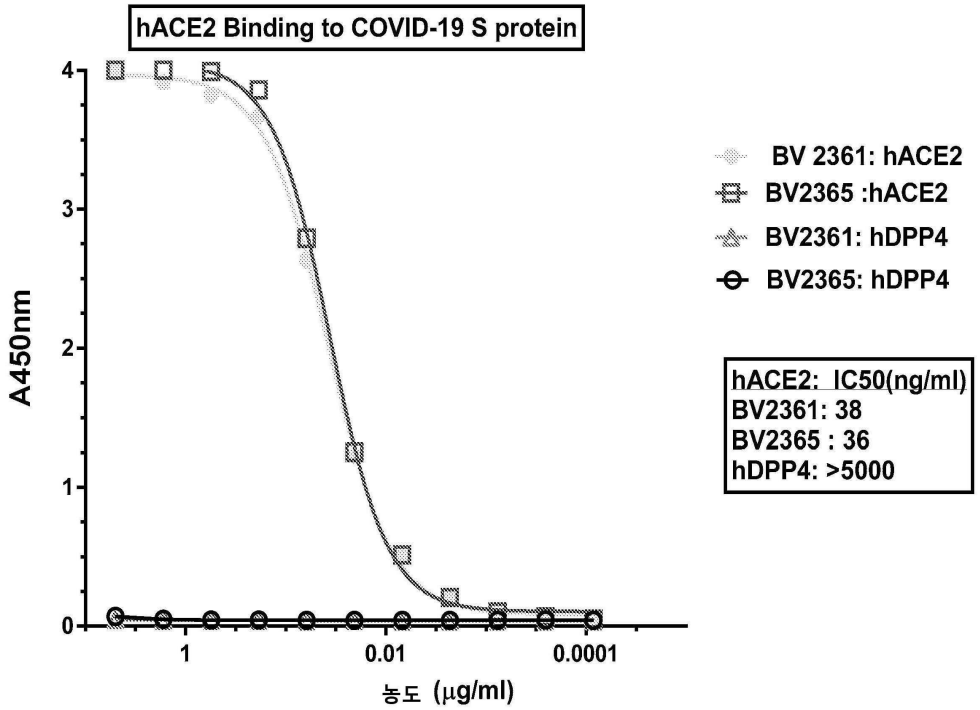
도면5


BV2365: “QQAQ”
BV2373 : “3Q-2P”
BV2374: “2P”
450nM
150nM
50nM
BV2361 : “Full Length WT”
BV2365 : “QQAQ”
BV2369 : “3QΔFD”
Time (s)

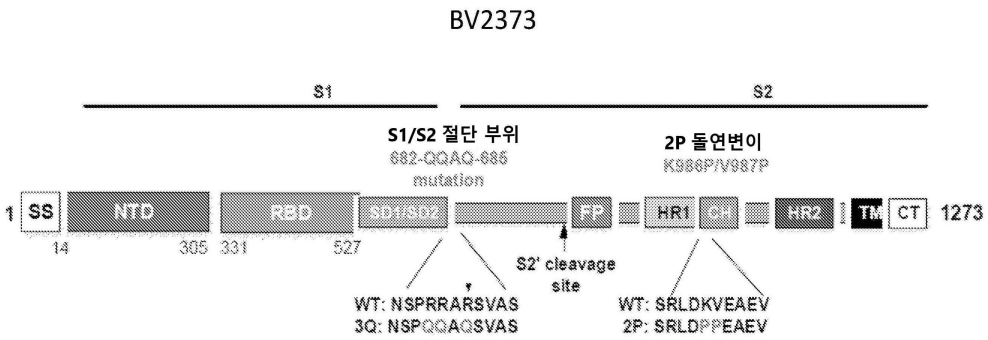
도면6


결합 DPP4 수용체:
MERS는 ACE2 수용체와 결합하지 않는다
MERS S (BV1954) 450nM
COVID S (BV2361) 450nM
SARS S (BV444) 450nM
450nM
150nM
50nM
Time (s)
결합
분열

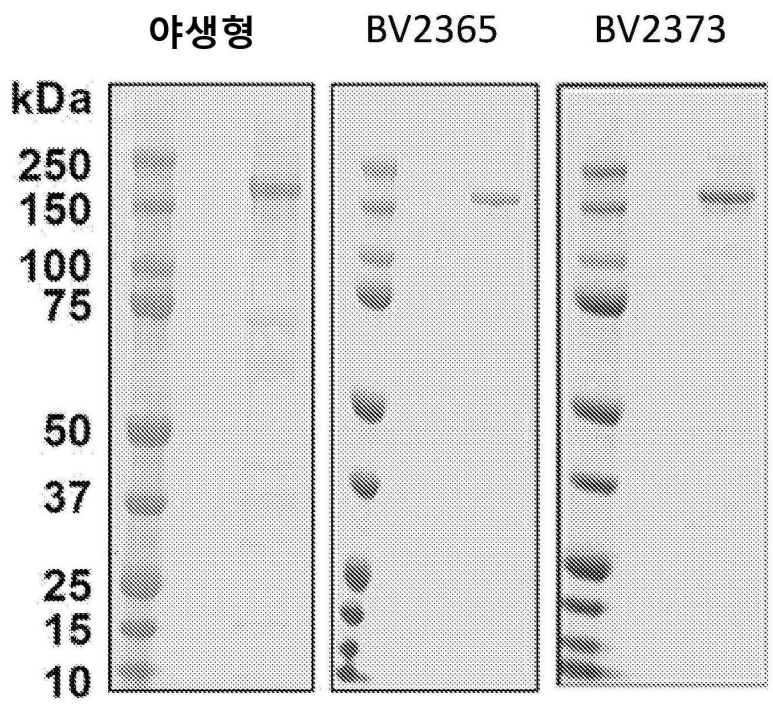
도면7


hACE2 Binding to COVID-19 S protein
A450nm
4
3
2
1
0
1
0.01
0.0001
농도 (μg/ml)
BV 2361: hACE2
BV2365 :hACE2
BV2361: hDPP4
BV2365: hDPP4
hACE2: IC50(ng/ml)
BV2361: 38
BV2365 : 36
hDPP4: >5000

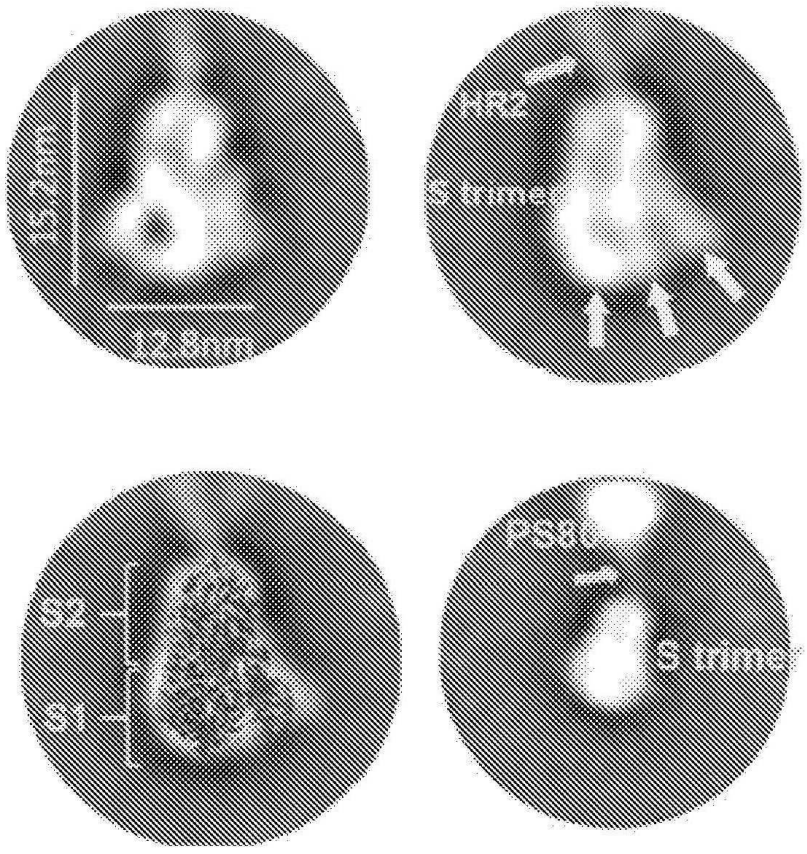
도면8


BV2373
S1
S2
S1/S2 절단 부위
682-QQAQ-685
mutation
2P 돌연변이
K986P/V987P
1
SS
NTD
RBD
SD1/SD2
FP
HR1
CH
HR2
TM
CT
1273
14
305
331
527
S2' cleavage site
WT: NSPRRARSVAS
3Q: NSPQQAQSVAS
WT: SRLDKVEAEV
2P: SRLDPPEAEV

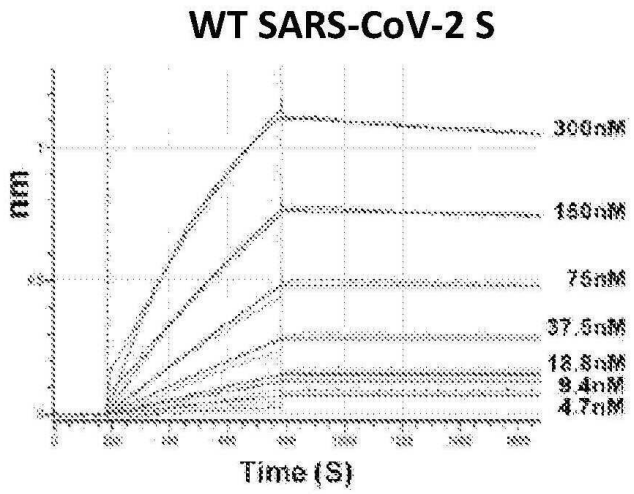
도면9


야생형
BV2365
BV2373
kDa
250
150
100
75
50
37
25
15
10

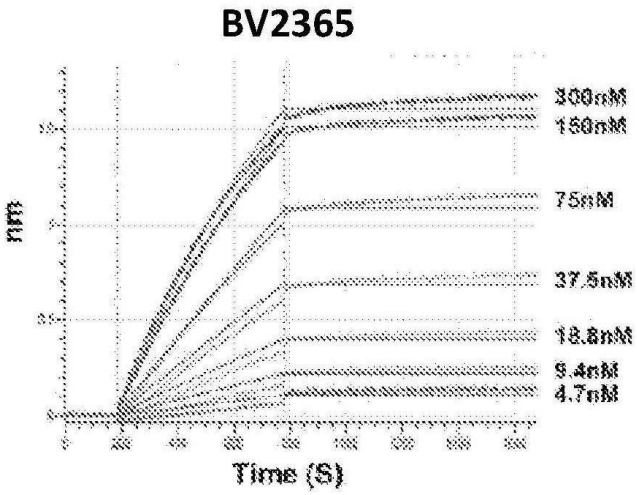
도면10


HR2
3 trimer
S2
S1
S trimer

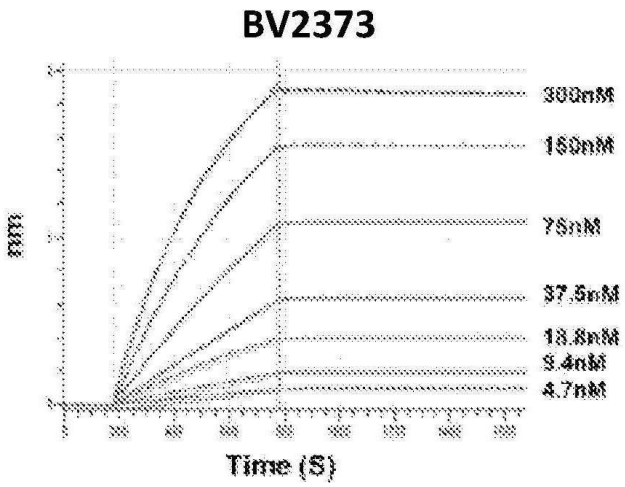
도면11a



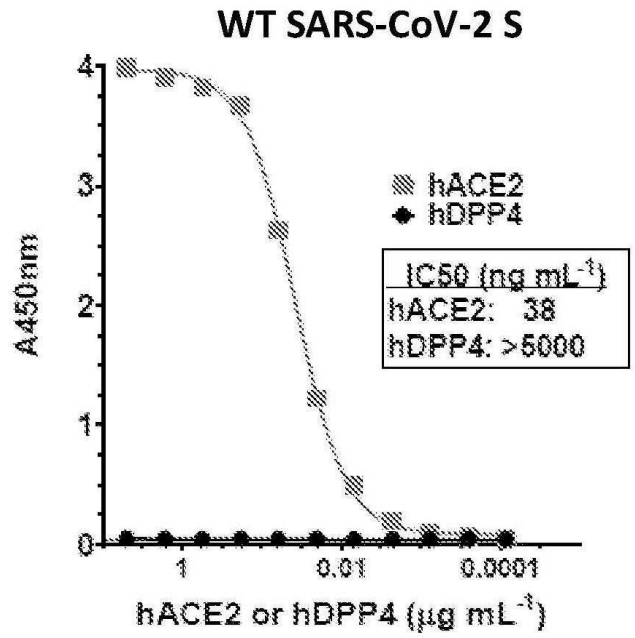
도면11b



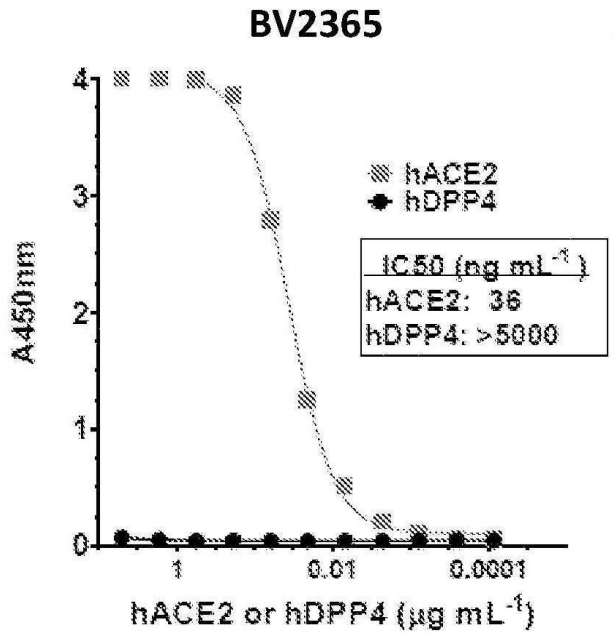
도면11c



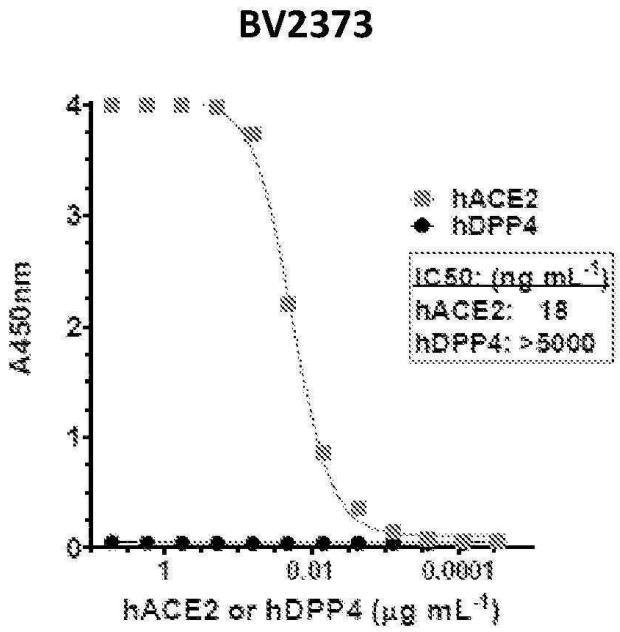
도면11d


WT SARS-CoV-2 S
A450nm
hACE2
hDPP4
IC50 (ng mL-1)
hACE2: 38
hDPP4: >5000
hACE2 or hDPP4 (µg mL-1)

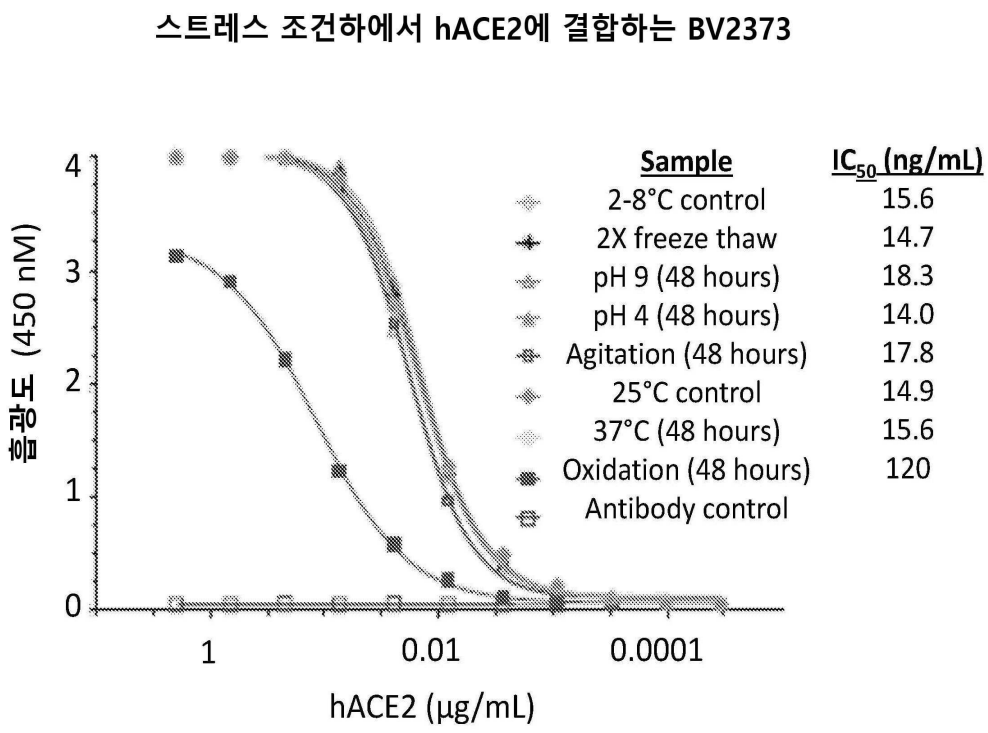
도면11e


BV2365
A450nm
hACE2
hDPP4
IC50 (ng mL-1)
hACE2: 36
hDPP4: >5000
hACE2 or hDPP4 (µg mL-1)

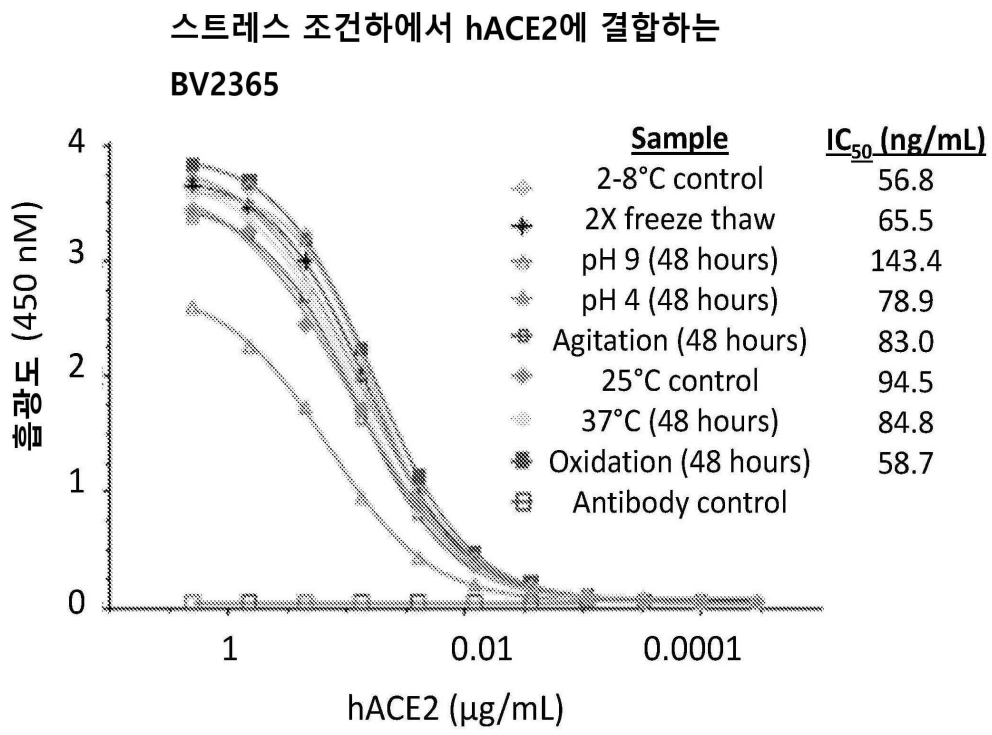
도면11f


BV2373
A450nm
hACE2
hDPP4
IC50: (ng mL-1)
hACE2: 18
hDPP4: >5000
hACE2 or hDPP4 (µg mL-1)

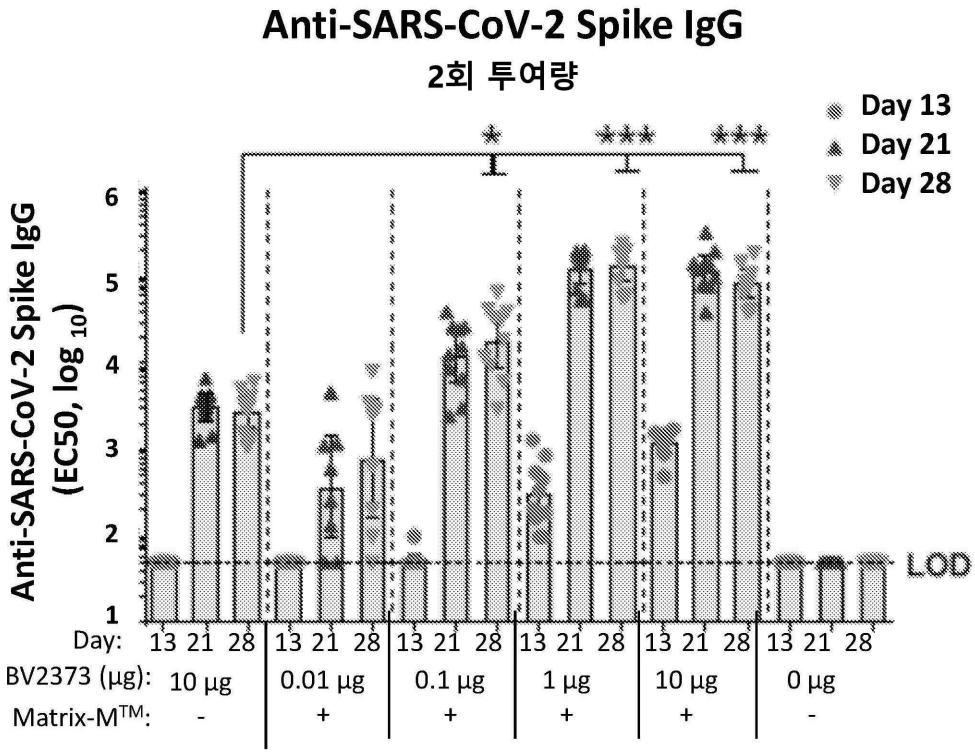
도면12a


스트레스 조건하에서 hACE2에 결합하는 BV2373
흡광도 (450 nM)
hACE2 (µg/mL)
Sample
IC50 (ng/mL)
2-8°C control 15.6
2X freeze thaw 14.7
pH 9 (48 hours) 18.3
pH 4 (48 hours) 14.0
Agitation (48 hours) 17.8
25°C control 14.9
37°C (48 hours) 15.6
Oxidation (48 hours) 120
Antibody control

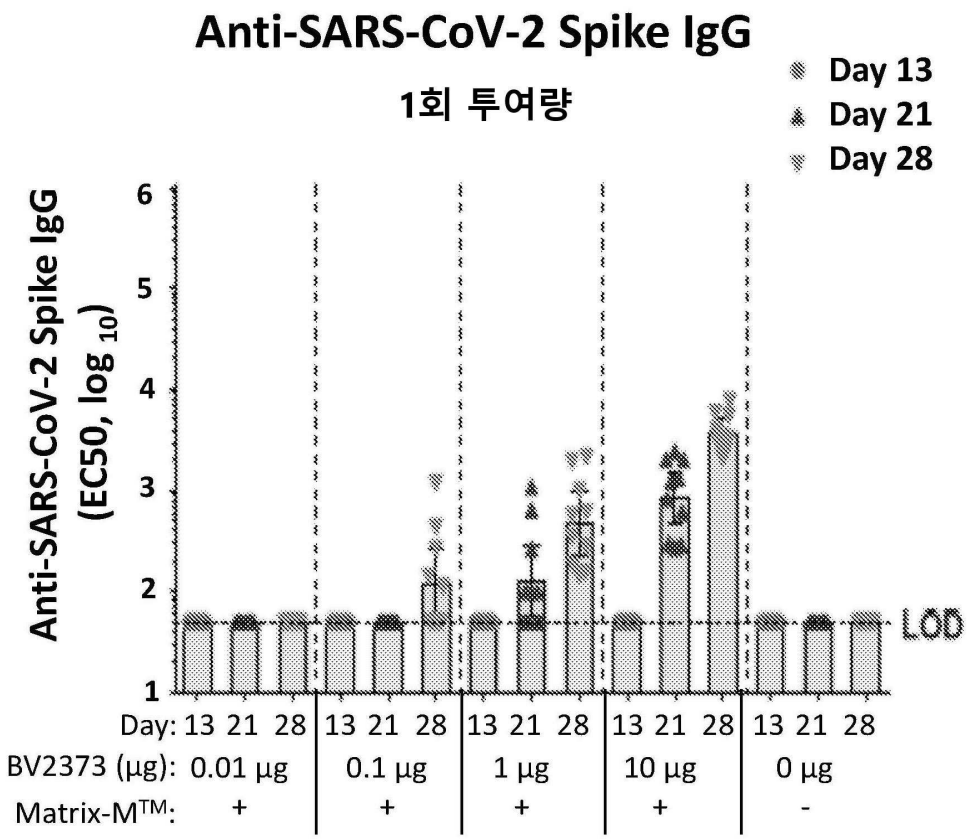
도면12b


스트레스 조건하에서 hACE2에 결합하는
BV2365
흡광도 (450 nM)
4
3
2
1
0
1
0.01
0.0001
hACE2 (μg/mL)
Sample
IC50 (ng/mL)
2-8°C control 56.8
2X freeze thaw 65.5
pH 9 (48 hours) 143.4
pH 4 (48 hours) 78.9
Agitation (48 hours) 83.0
25°C control 94.5
37°C (48 hours) 84.8
Oxidation (48 hours) 58.7
Antibody control

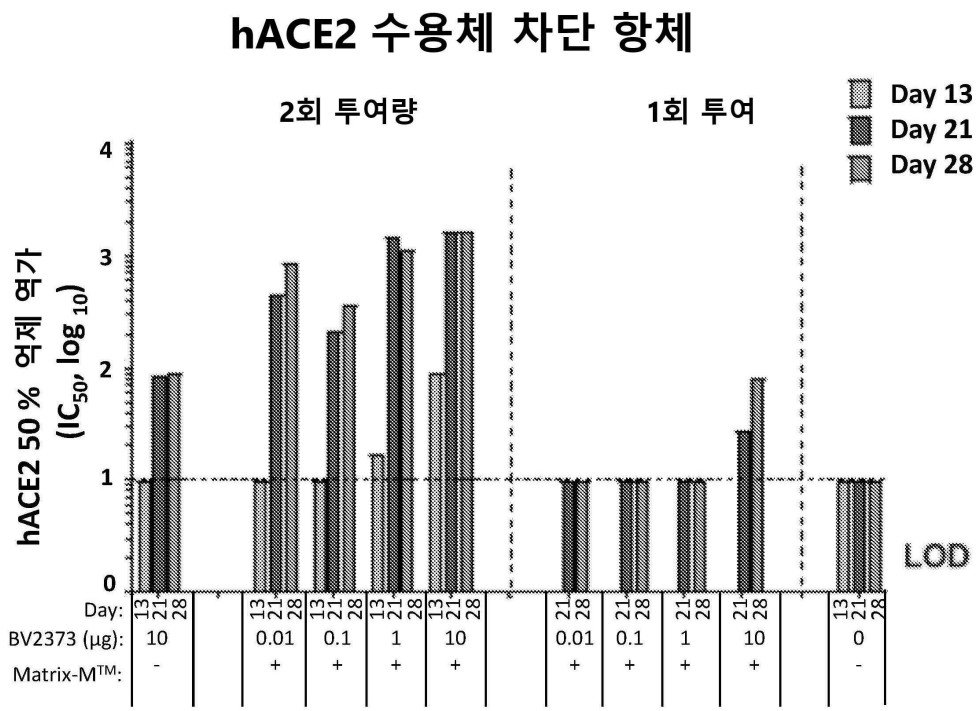
도면13a


Anti-SARS-CoV-2 Spike IgG
2회 투여량
Day 13
Day 21
Day 28
Anti-SARS-CoV-2 Spike IgG
(EC50, log 10)
6
5
4
3
2
1
LOD
*
***
***
Day: 13 21 28 13 21 28 13 21 28 13 21 28 13 21 28 13 21 28
BV2373 (μg): 10 μg 0.01 μg 0.1 μg 1 μg 10 μg 0 μg
Matrix-M™: - + + + + -

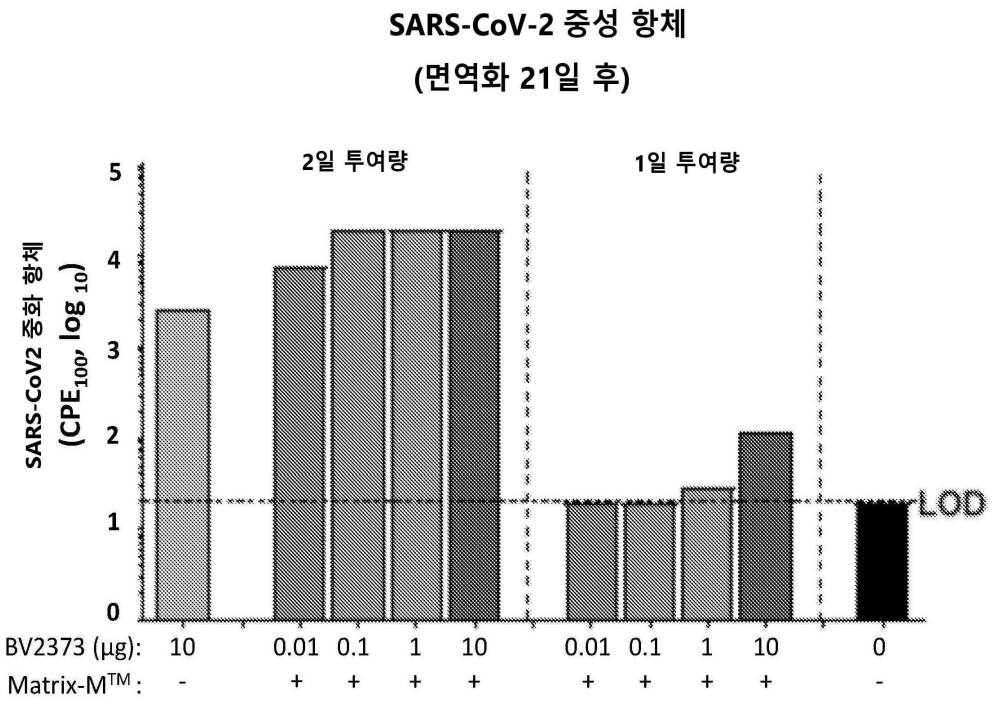
도면13b


Anti-SARS-CoV-2 Spike IgG
1회 투여량
Day 13
Day 21
Day 28
Anti-SARS-CoV-2 Spike IgG
(EC50, log 10)
6
5
4
3
2
1
LOD
Day: 13 21 28 13 21 28 13 21 28 13 21 28 13 21 28
BV2373 (μg): 0.01 μg 0.1 μg 1 μg 10 μg 0 μg
Matrix-M™: + + + + -

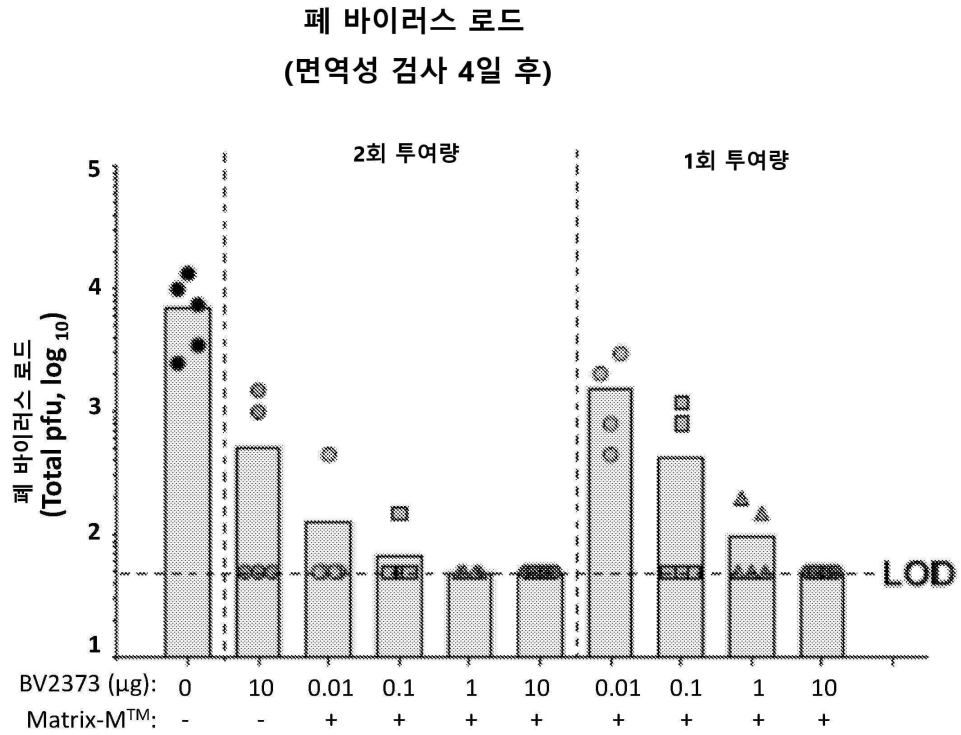
도면14


hACE2 수용체 차단 항체
2회 투여량
1회 투여
Day 13
Day 21
Day 28
hACE2 50 % 억제 역가
(IC50, log 10)
4
3
2
1
0
LOD
Day:
BV2373 (μg): 10 0.01 0.1 1 10 0.01 0.1 1 10 0
Matrix-M™: - + + + + + + + + -

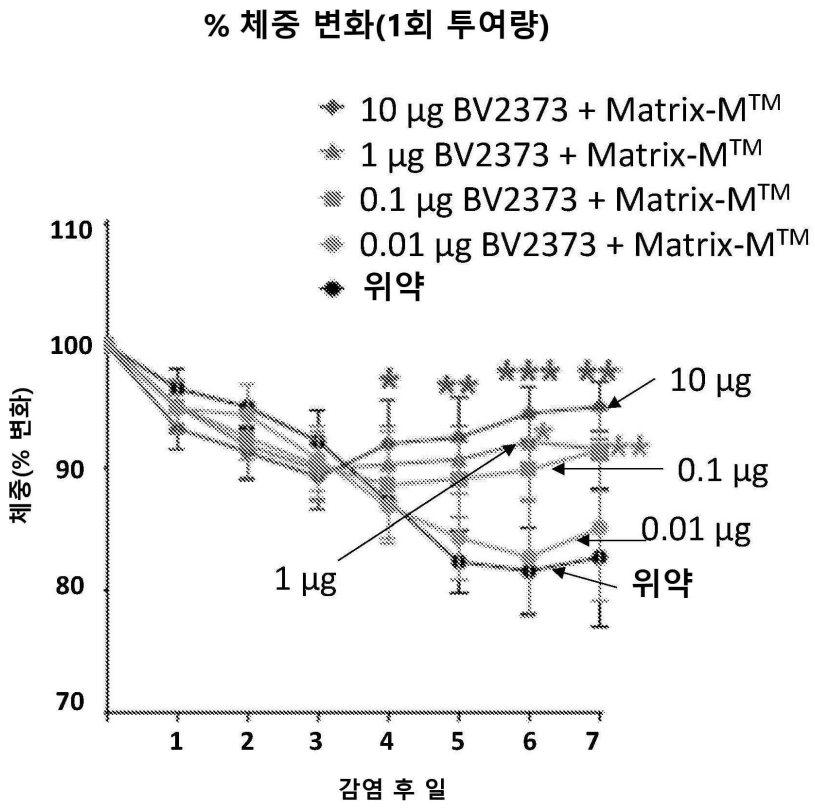
도면15


SARS-CoV-2 중성 항체
(면역화 21일 후)
2일 투여량
1일 투여량
SARS-CoV2 중화 항체
(CPE100, log 10)
5
4
3
2
1
0
LOD
BV2373 (μg): 10 0.01 0.1 1 10 0.01 0.1 1 10 0
Matrix-M™: - + + + + + + + + -

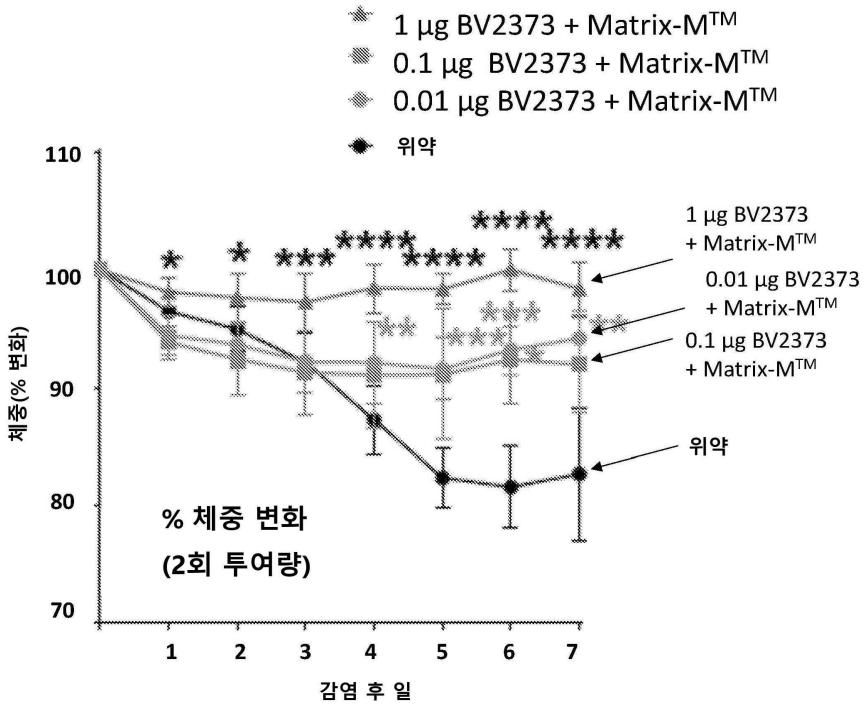
도면16


폐 바이러스 로드
(면역성 검사 4일 후)
2회 투여량
1회 투여량
폐 바이러스 로드
(Total pfu, log 10)
5
4
3
2
1
LOD
BV2373 (μg): 0 10 0.01 0.1 1 10 0.01 0.1 1 10
Matrix-M™: - - + + + + + + + +

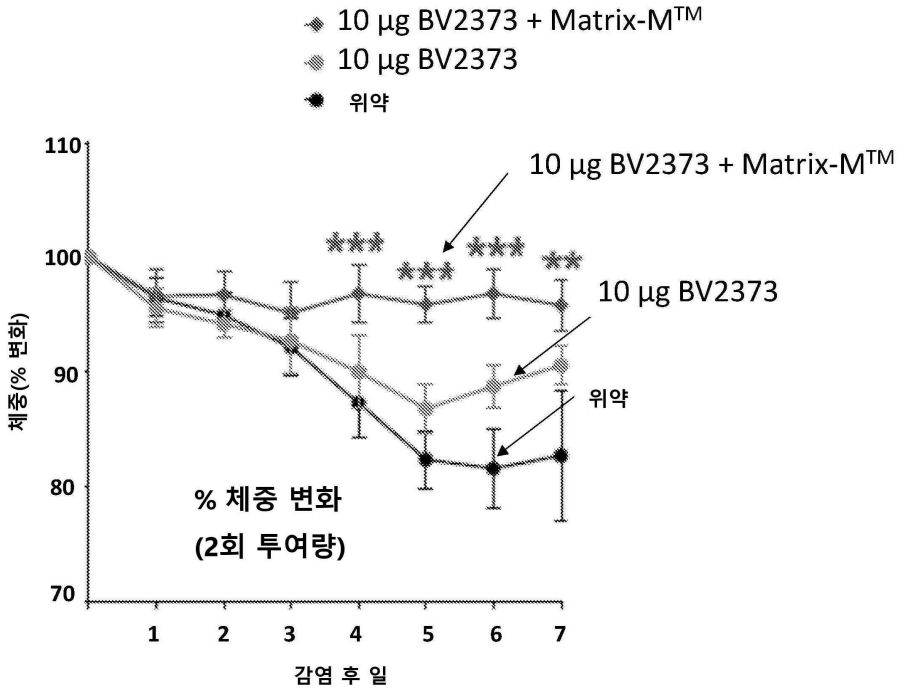
도면17a


% 체중 변화(1회 투여량)
10 μg BV2373 + Matrix-M™
1 μg BV2373 + Matrix-M™
0.1 μg BV2373 + Matrix-M™
0.01 μg BV2373 + Matrix-M™
위약
체중(% 변화)
110
100
90
80
70
1
2
3
4
5
6
7
감염 후 일
10 μg
0.1 μg
0.01 μg
1 μg
위약

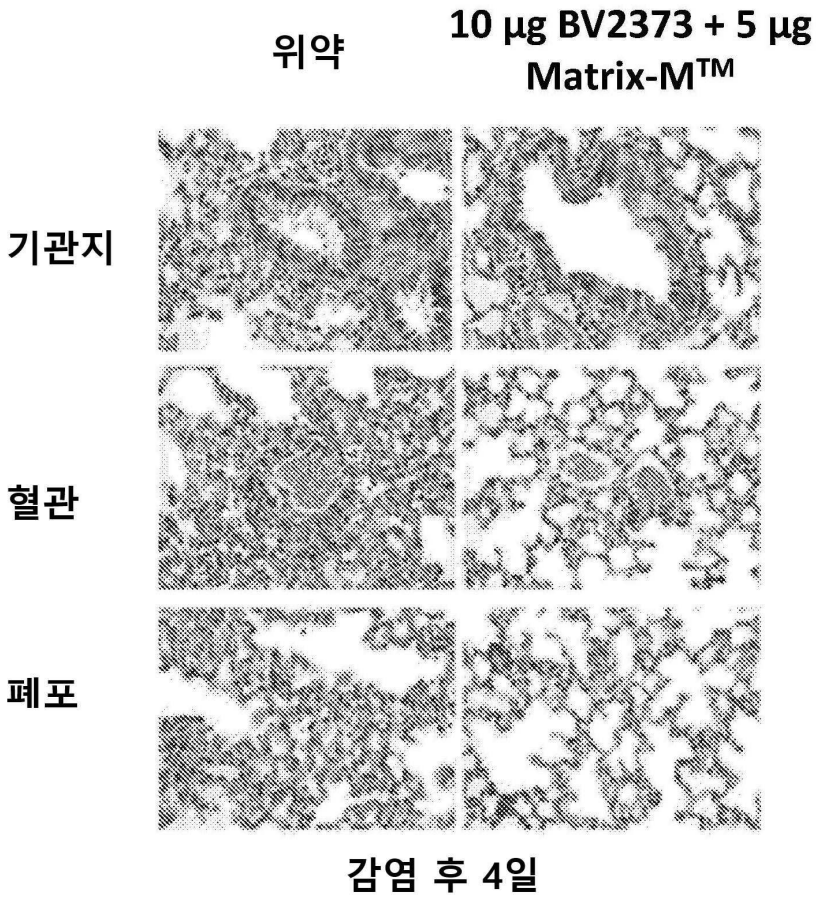
도면17b


1 μg BV2373 + Matrix-M™
0.1 μg BV2373 + Matrix-M™
0.01 μg BV2373 + Matrix-M™
위약
체중(% 변화)
110
100
90
80
70
1
2
3
4
5
6
7
감염 후 일
% 체중 변화
(2회 투여량)
1 μg BV2373
+ Matrix-M™
0.01 μg BV2373
+ Matrix-M™
0.1 μg BV2373
+ Matrix-M™
위약

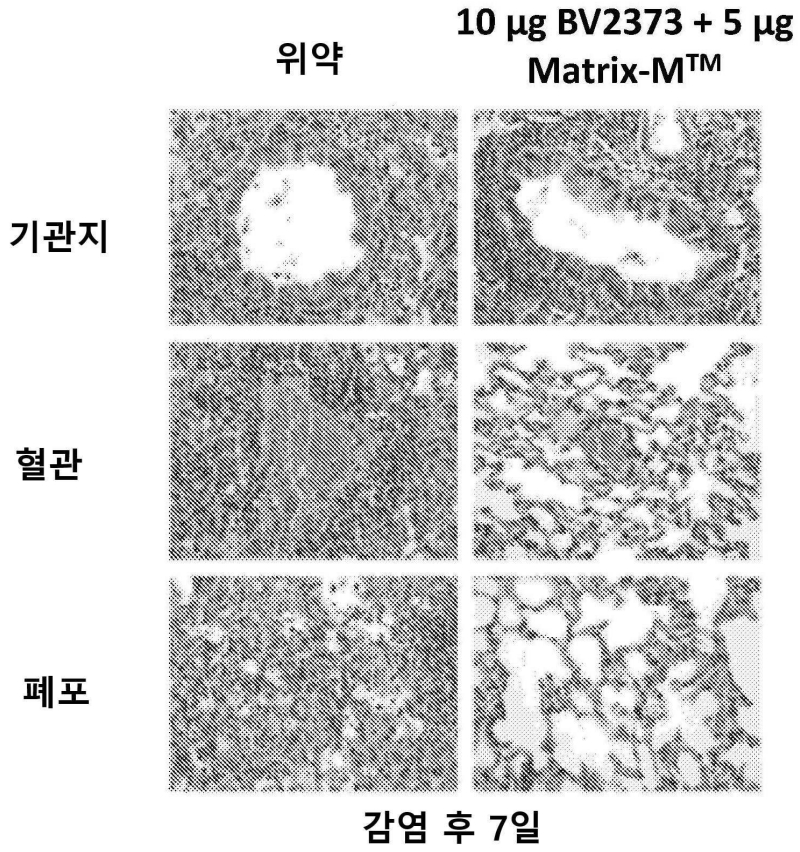
도면17c


10 μg BV2373 + Matrix-M™
10 μg BV2373
위약
110
100
90
80
70
체중(% 변화)
***
***
***
**
10 μg BV2373 + Matrix-M™
10 μg BV2373
위약
% 체중 변화
(2회 투여량)
1
2
3
4
5
6
7
감염 후 일

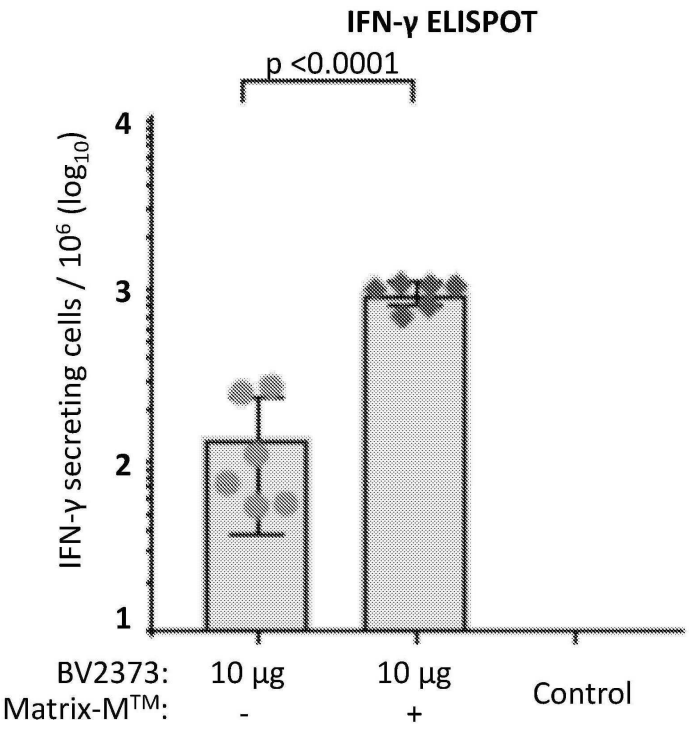
도면18a


위약
10 μg BV2373 + 5 μg Matrix-M™
기관지
혈관
폐포
감염 후 4일

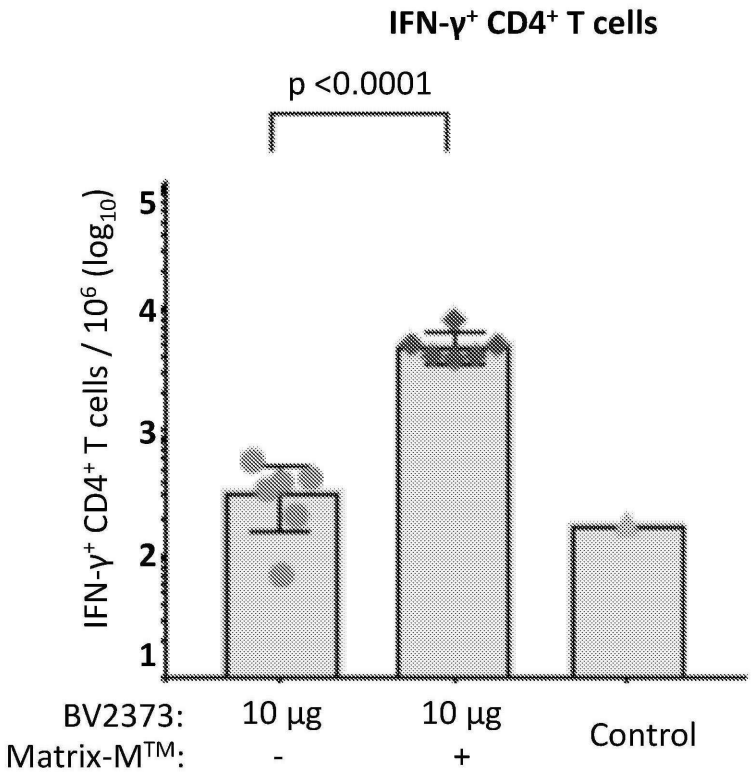
도면18b


위약
10 μg BV2373 + 5 μg Matrix-M™
기관지
혈관
폐포
감염 후 7일

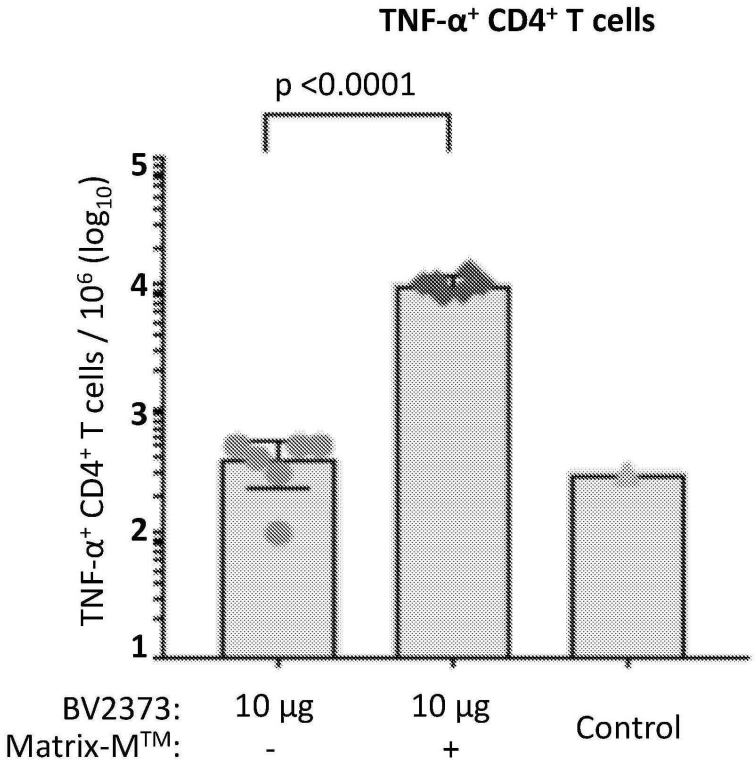
도면19


IFN-γ ELISPOT
p <0.0001
IFN-γ secreting cells / 10^6 (log10)
4
3
2
1
BV2373:
Matrix-M™:
10 μg
-
10 μg
+
Control

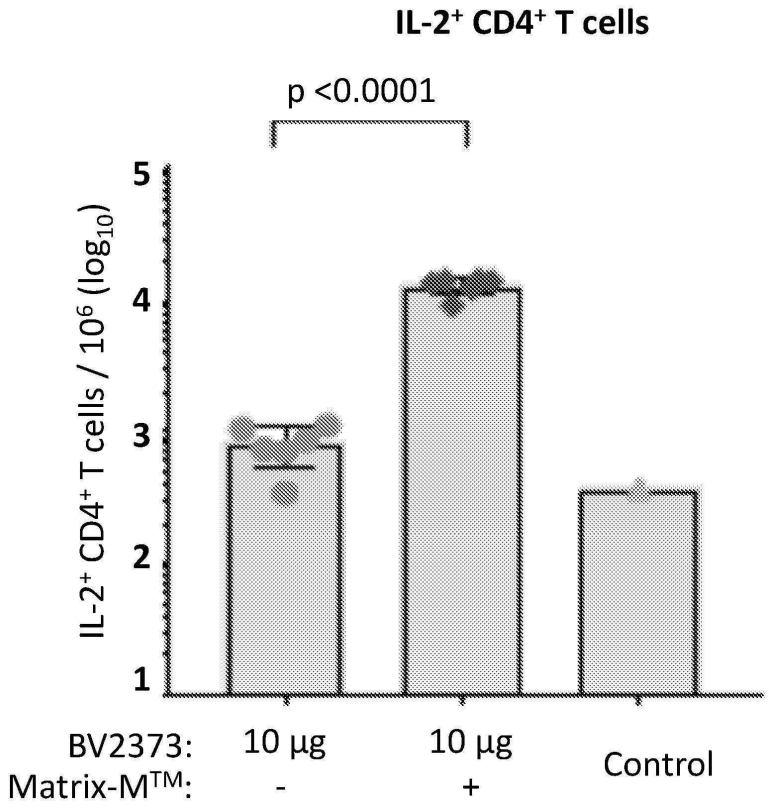
도면20a


IFN-γ+ CD4+ T cells
p <0.0001
IFN-γ+ CD4+ T cells / 10^6 (log10)
5
4
3
2
1
BV2373:
Matrix-M™:
10 µg
-
10 µg
+
Control

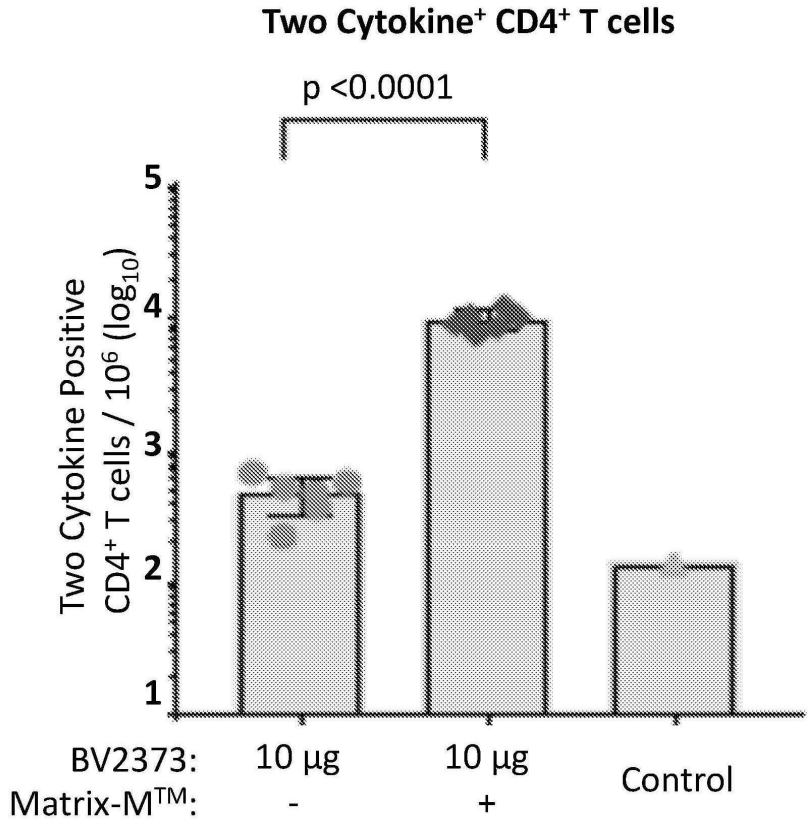
도면20b


TNF-α+ CD4+ T cells
p <0.0001
TNF-α+ CD4+ T cells / 10^6 (log10)
5
4
3
2
1
BV2373:
Matrix-M™:
10 µg
-
10 µg
+
Control

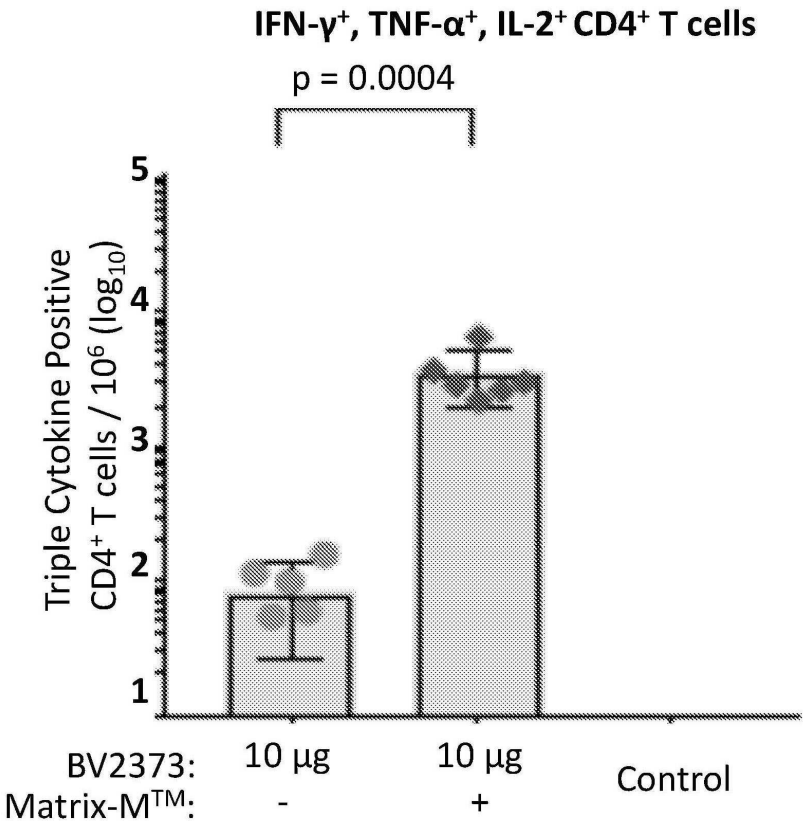
도면20c


IL-2+ CD4+ T cells
p <0.0001
IL-2+ CD4+ T cells / 10^6 (log10)
5
4
3
2
1
BV2373:
Matrix-M™:
10 µg
-
10 µg
+
Control

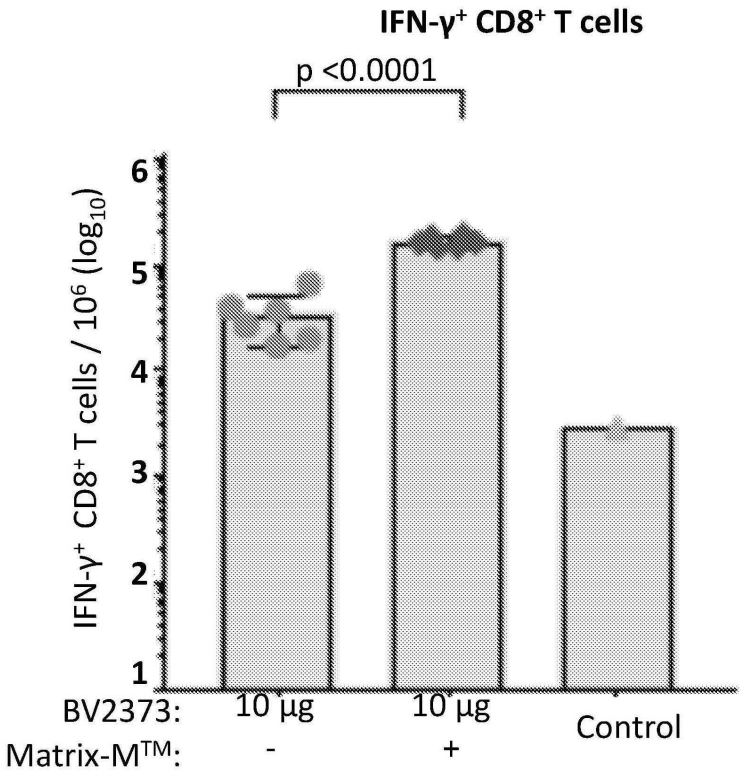
도면20d


Two Cytokine+ CD4+ T cells
p <0.0001
Two Cytokine Positive CD4+ T cells / 10^6 (log10)
5
4
3
2
1
BV2373:
Matrix-M™:
10 µg
-
10 µg
+
Control

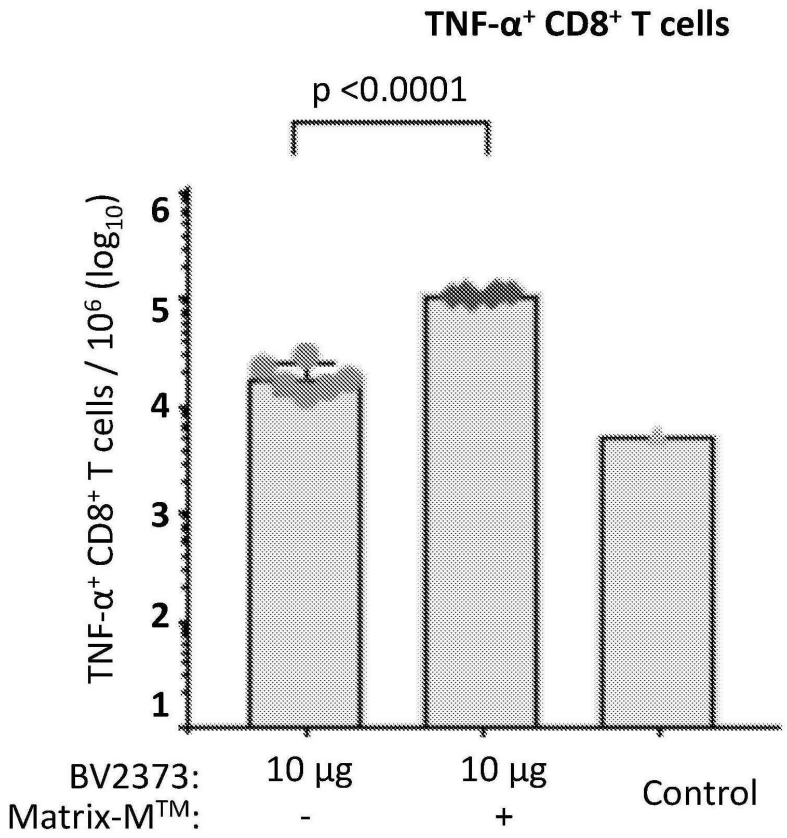
도면20e


IFN-γ+, TNF-α+, IL-2+ CD4+ T cells
p = 0.0004
Triple Cytokine Positive
CD4+ T cells / 10^6 (log10)
5
4
3
2
1
BV2373:
Matrix-M™:
10 µg
-
10 µg
+
Control

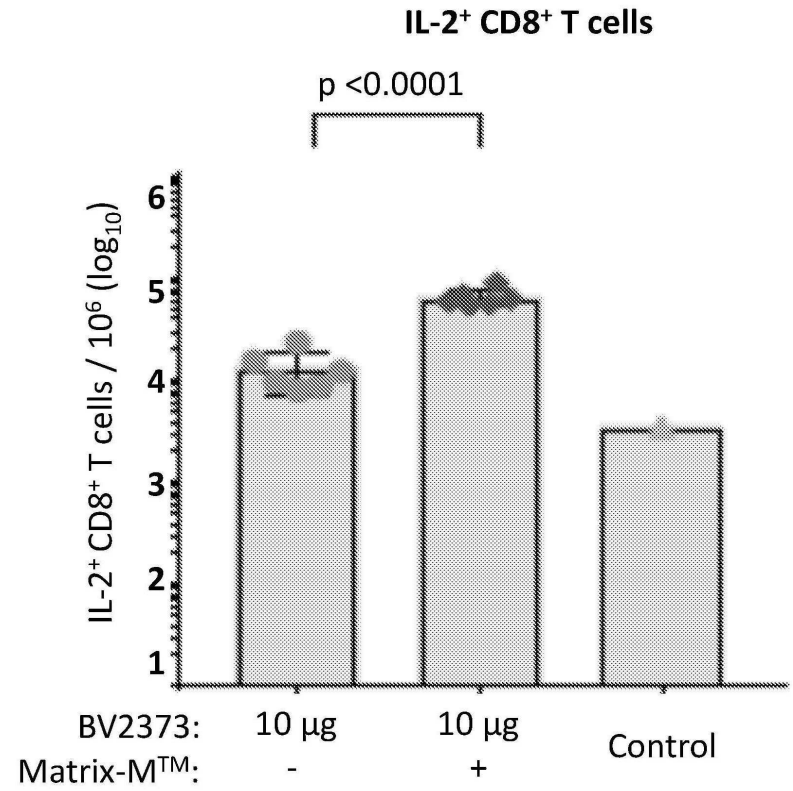
도면21a


IFN-γ+ CD8+ T cells
p <0.0001
IFN-γ+ CD8+ T cells / 10^6 (log10)
6
5
4
3
2
1
BV2373:
Matrix-M™:
10 µg
-
10 µg
+
Control

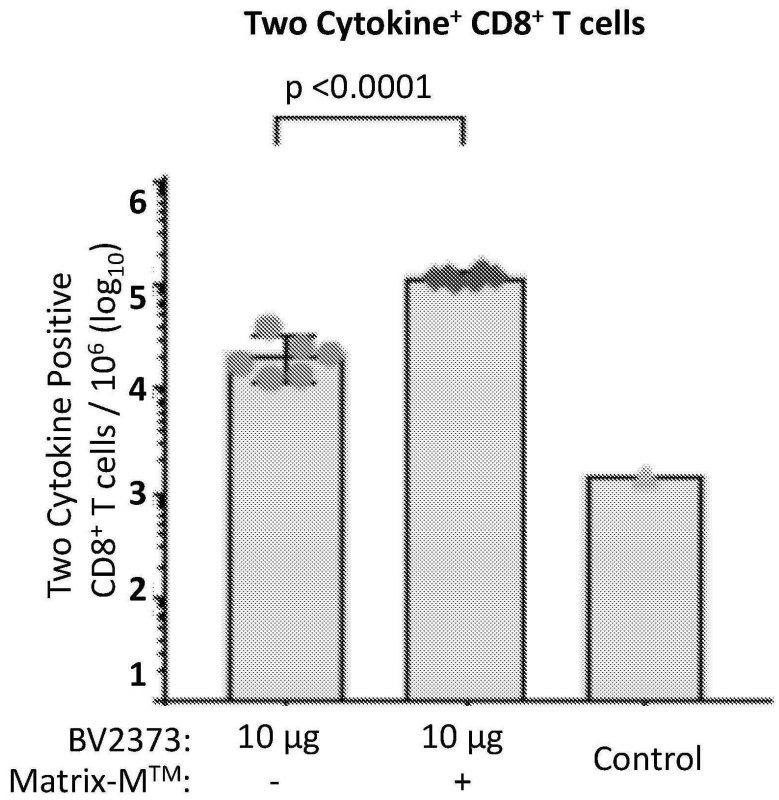
도면21b


TNF-α+ CD8+ T cells
p <0.0001
TNF-α+ CD8+ T cells / 10^6 (log10)
6
5
4
3
2
1
BV2373:
Matrix-M™:
10 µg
-
10 µg
+
Control

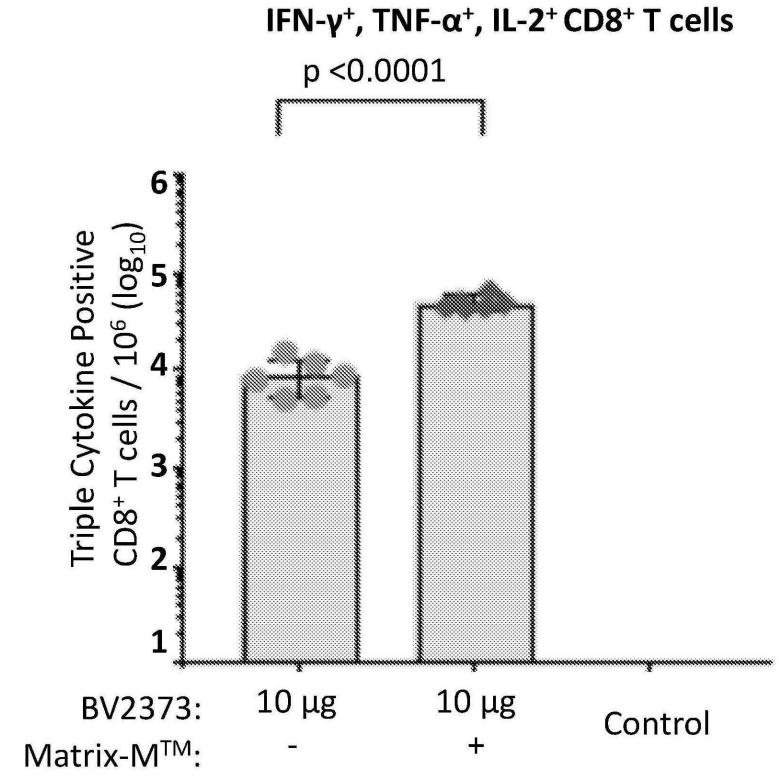
도면21c


IL-2+ CD8+ T cells
p <0.0001
IL-2+ CD8+ T cells / 10^6 (log10)
6
5
4
3
2
1
BV2373:
Matrix-M™:
10 µg
-
10 µg
+
Control

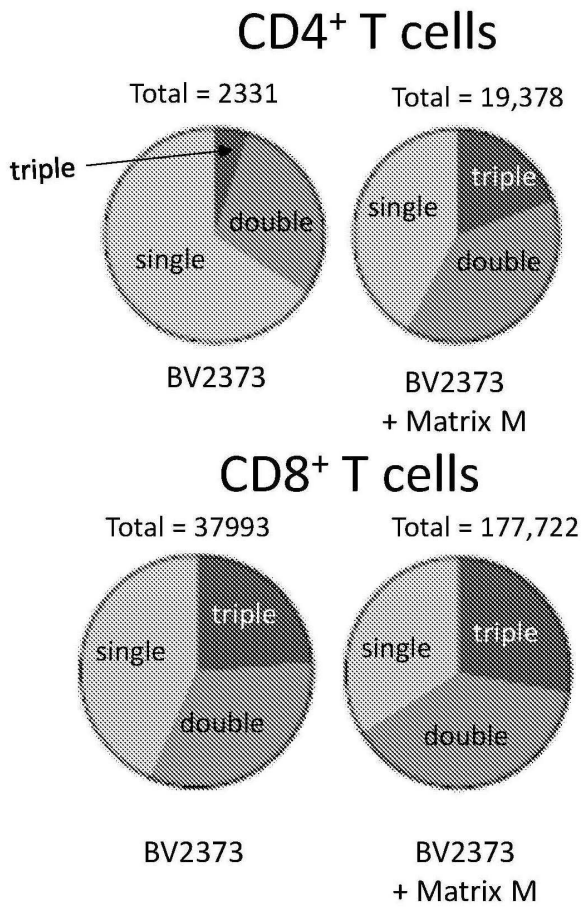
도면21d


Two Cytokine+ CD8+ T cells
p <0.0001
Two Cytokine Positive CD8+ T cells / 10^6 (log10)
6
5
4
3
2
1
BV2373:
Matrix-M™:
10 µg
-
10 µg
+
Control

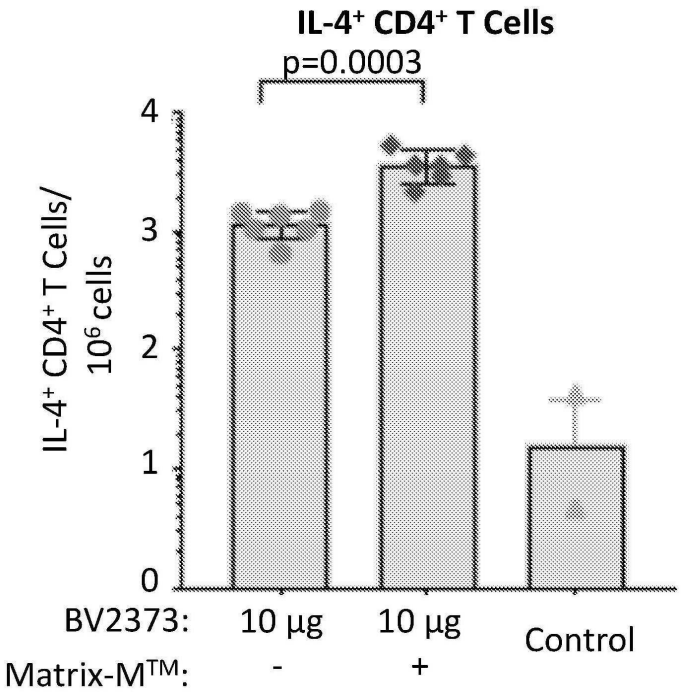
도면21e


IFN-γ+, TNF-α+, IL-2+ CD8+ T cells
p <0.0001
Triple Cytokine Positive CD8+ T cells / 10^6 (log10)
6
5
4
3
2
1
BV2373:
Matrix-M™:
10 µg
-
10 µg
+
Control

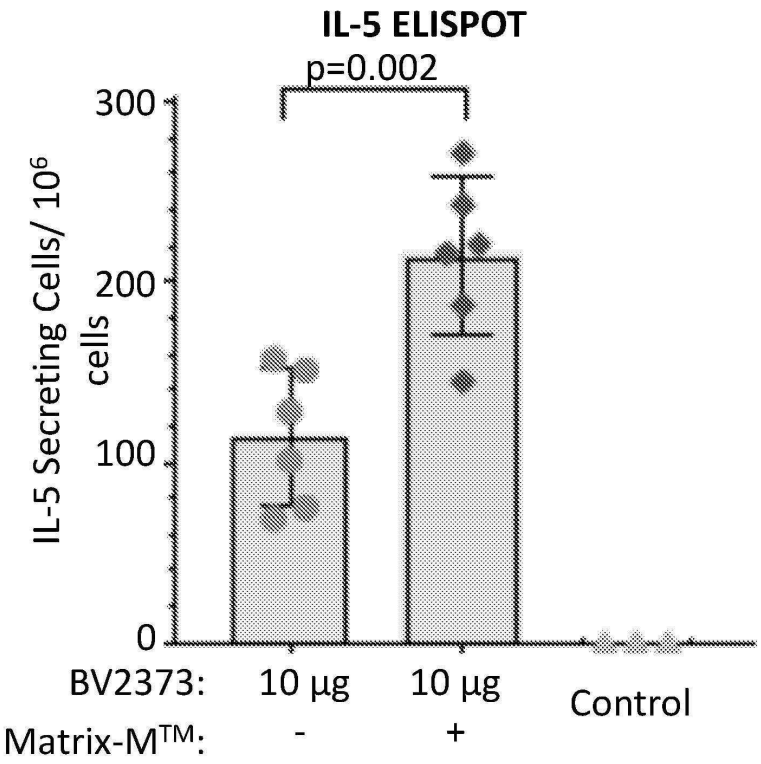
도면22


CD4+ T cells
Total = 2331
Total = 19,378
triple
double
single
single
triple
double
BV2373
BV2373
+ Matrix M
CD8+ T cells
Total = 37993
Total = 177,722
single
triple
double
single
triple
double
BV2373
BV2373
+ Matrix M

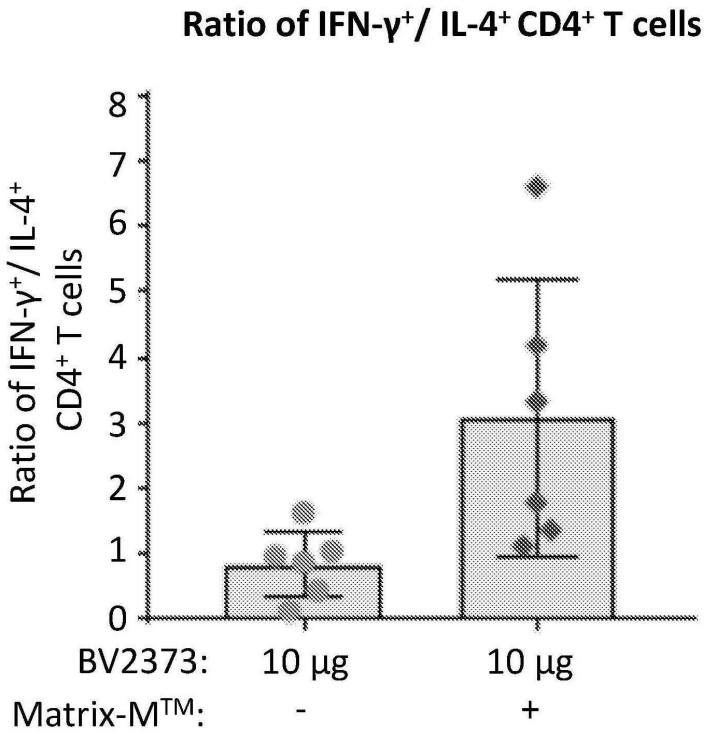
도면23a


IL-4+ CD4+ T Cells
p=0.0003
IL-4+ CD4+ T Cells/ 10^6 cells
0
1
2
3
4
BV2373:
10 µg
10 µg
Control
Matrix-M™:
-
+

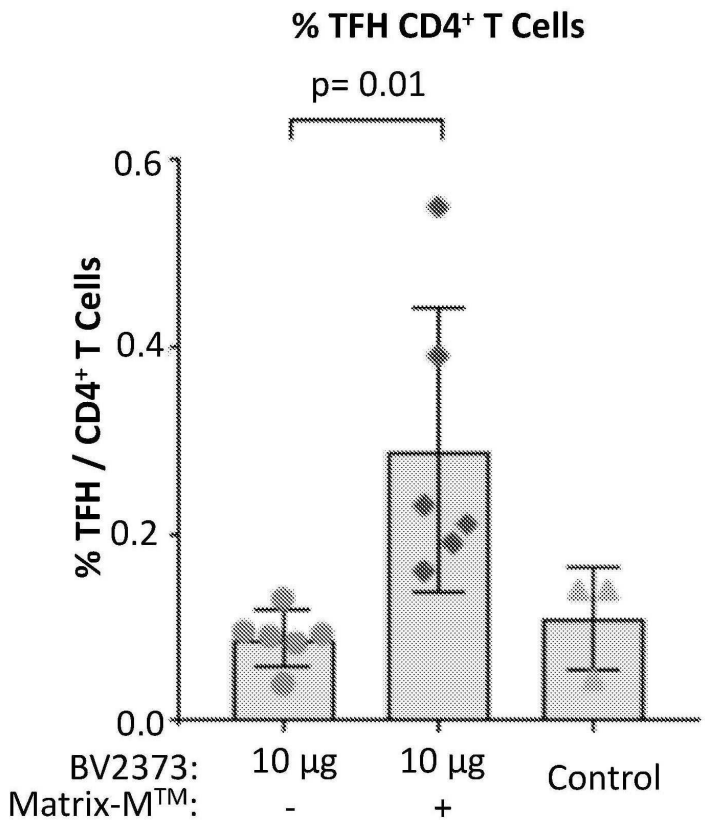
도면23b


IL-5 ELISPOT
p=0.002
IL-5 Secreting Cells/ 10^6 cells
300
200
100
0
BV2373:
10 µg
10 µg
Control
Matrix-M™:
-
+

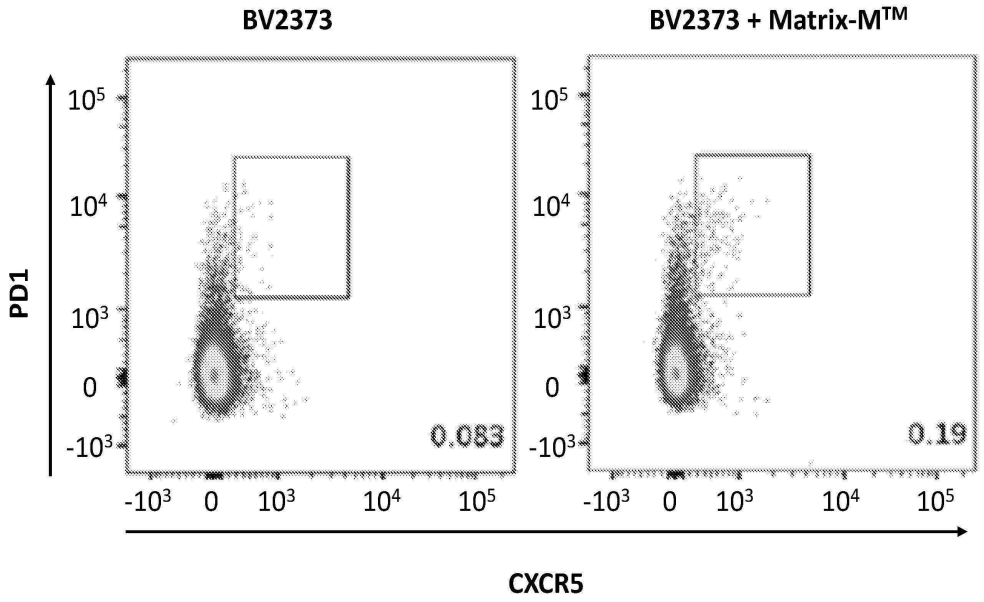
도면23c


Ratio of IFN-γ+/ IL-4+ CD4+ T cells
Ratio of IFN-γ+/ IL-4+ CD4+ T cells
8
7
6
5
4
3
2
1
0
BV2373:
10 µg
10 µg
Matrix-M™:
-
+

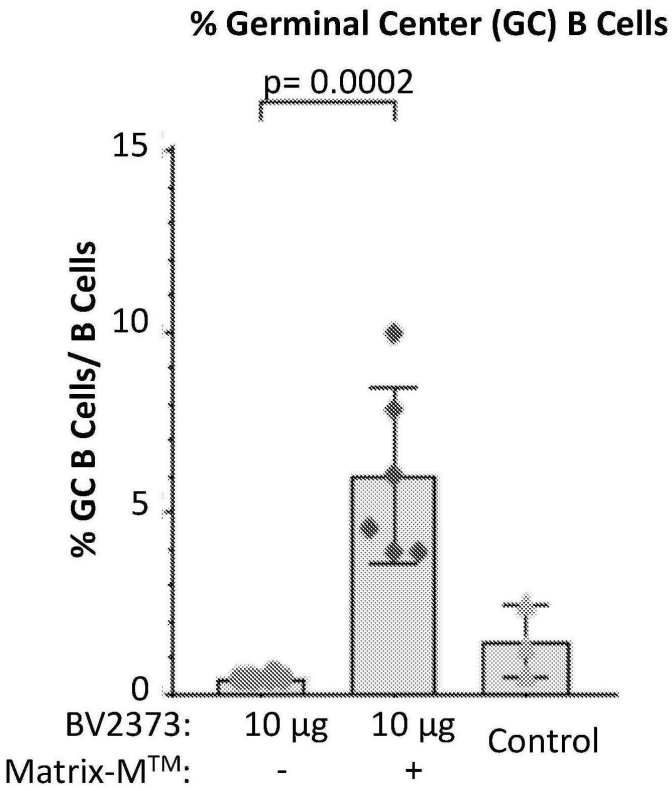
도면24a


% TFH CD4+ T Cells
p= 0.01
% TFH / CD4+ T Cells
0.6
0.4
0.2
0.0
BV2373:
Matrix-M™:
10 µg
-
10 µg
+
Control

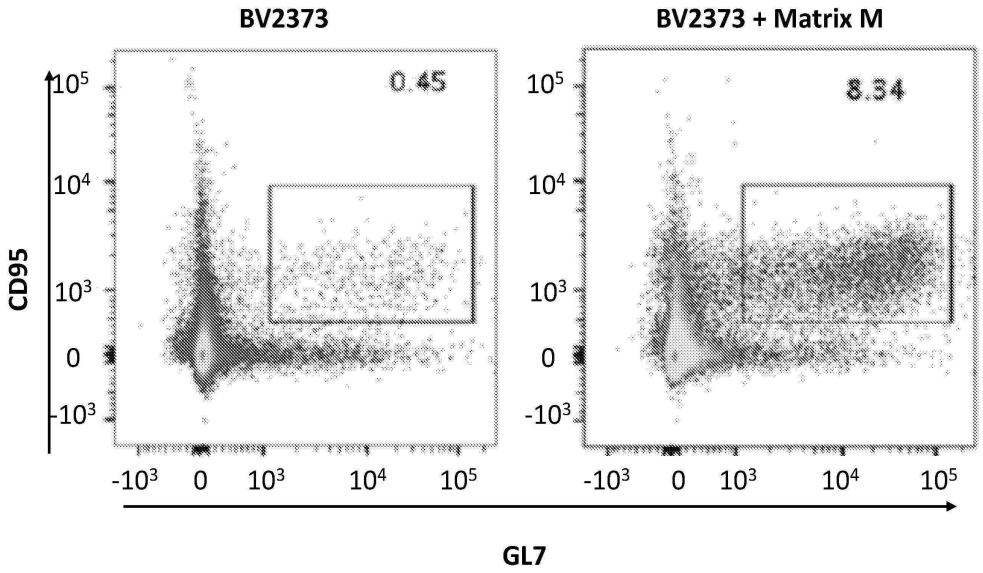
도면24b


BV2373
BV2373 + Matrix-M™
PD1
CXCR5
0.083
0.19

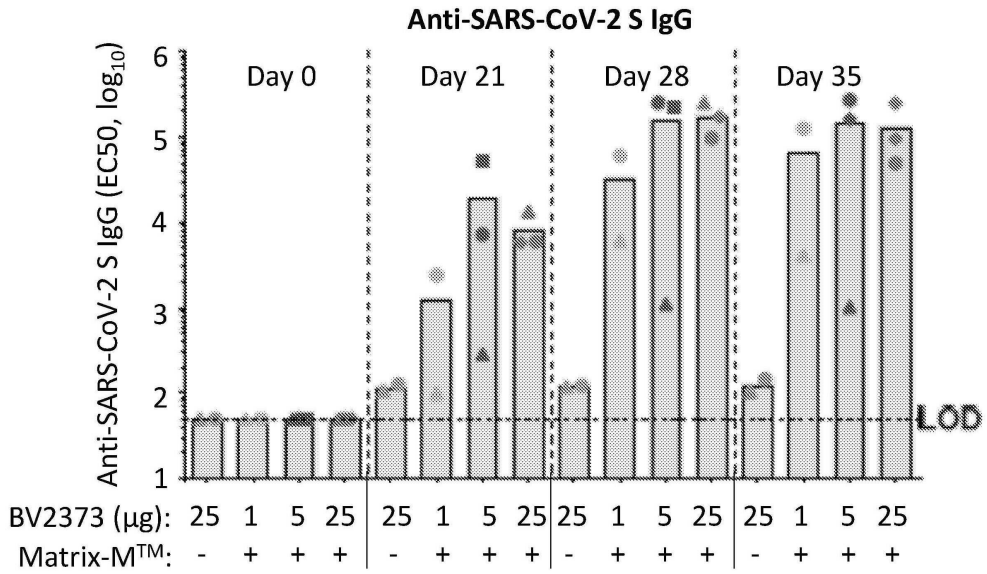
도면25a


% Germinal Center (GC) B Cells
p= 0.0002
% GC B Cells/ B Cells
15
10
5
0
BV2373:
10 µg
10 µg
Control
Matrix-M™:
-
+

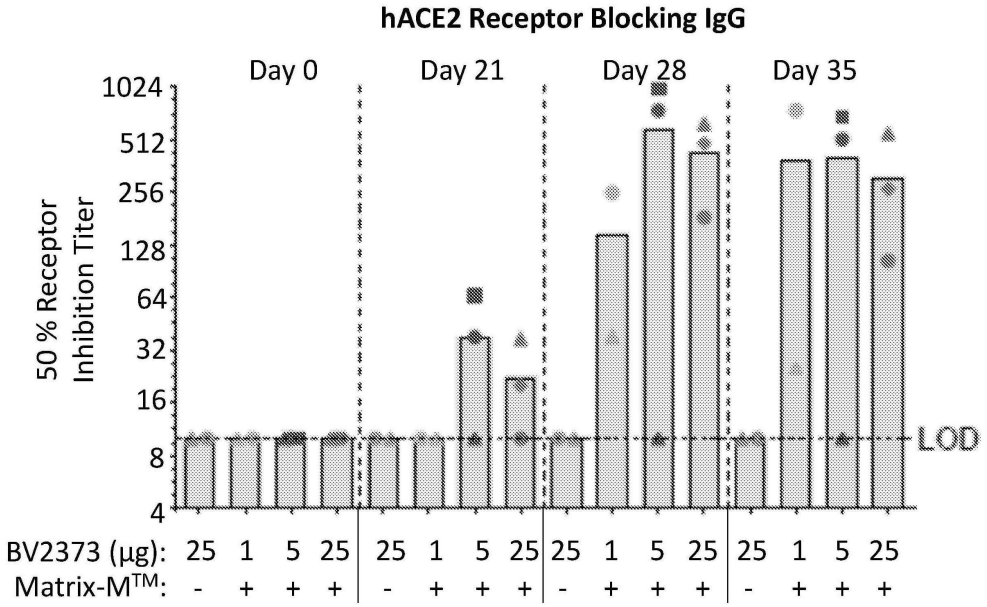
도면25b


BV2373
BV2373 + Matrix M
0.45
8.34
CD95
GL7
10⁵
10⁴
10³
0
-10³

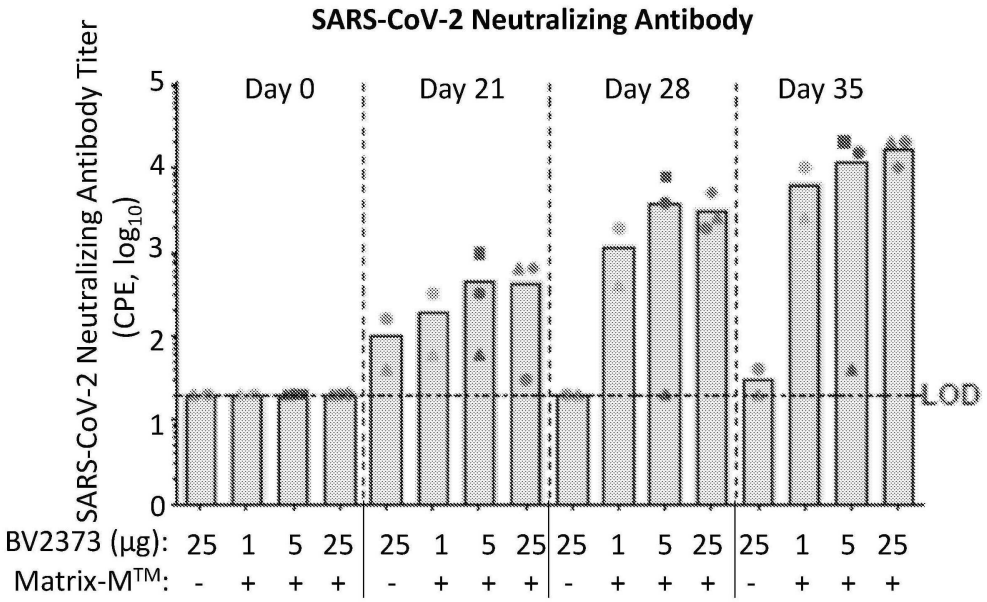
도면26a


Anti-SARS-CoV-2 S IgG
Anti-SARS-CoV-2 S IgG (EC50, log10)
Day 0
Day 21
Day 28
Day 35
LOD
BV2373 (μg): 25 1 5 25 25 1 5 25 25 1 5 25 25 1 5 25
Matrix-M™: - + + + - + + + - + + + - + + +

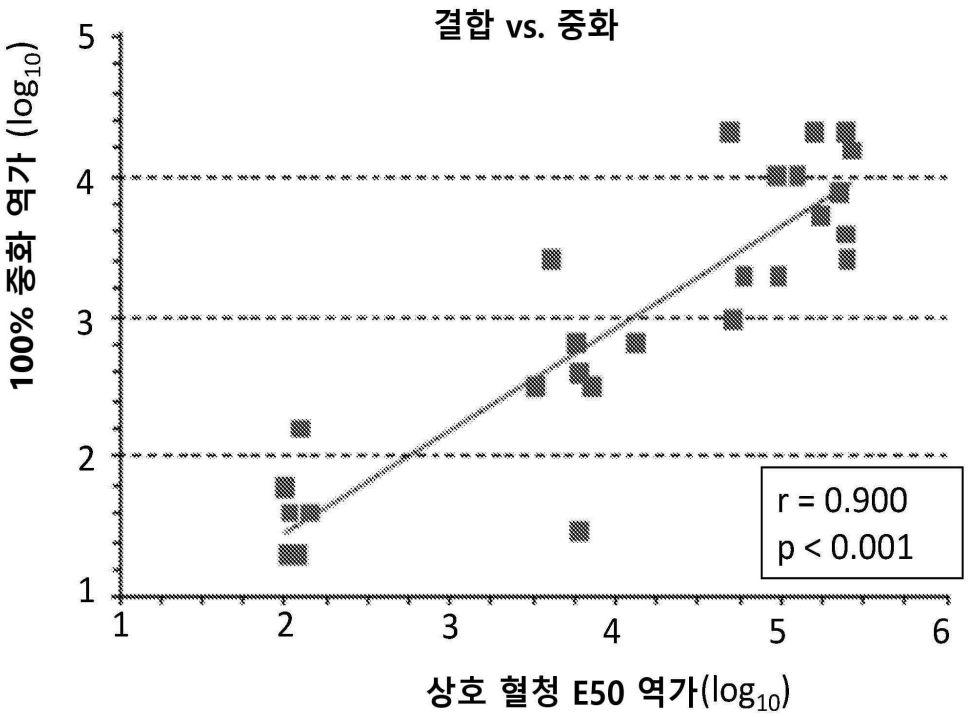
도면26b


hACE2 Receptor Blocking IgG
50 % Receptor Inhibition Titer
Day 0
Day 21
Day 28
Day 35
LOD
BV2373 (μg): 25 1 5 25 25 1 5 25 25 1 5 25 25 1 5 25
Matrix-M™: - + + + - + + + - + + + - + + +

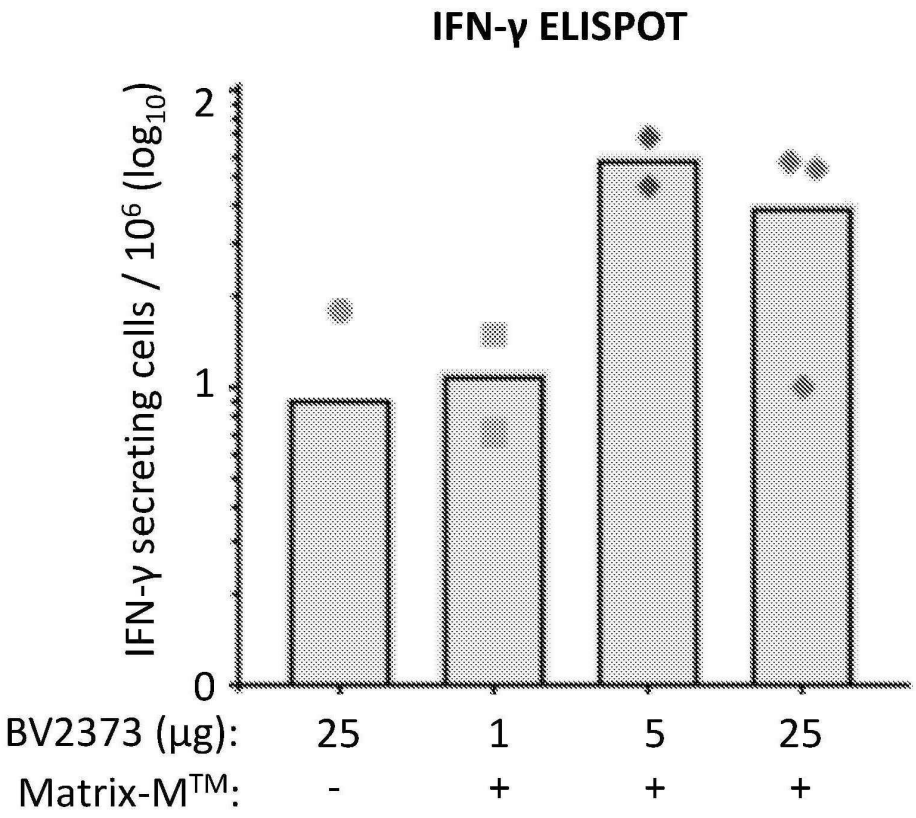
도면26c


SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody
SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Titer (CPE, log10)
Day 0
Day 21
Day 28
Day 35
LOD
BV2373 (μg): 25 1 5 25 25 1 5 25 25 1 5 25 25 1 5 25
Matrix-M™: - + + + - + + + - + + + - + + +

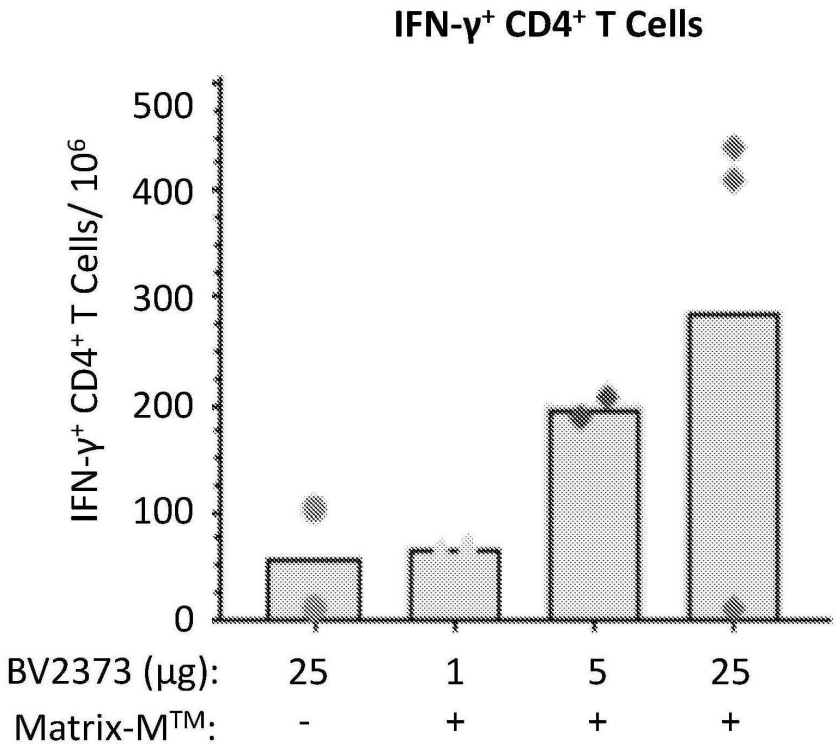
도면27


결합 vs. 중화
100% 중화 역가 (log10)
상호 혈청 E50 역가(log10)
r = 0.900
p < 0.001

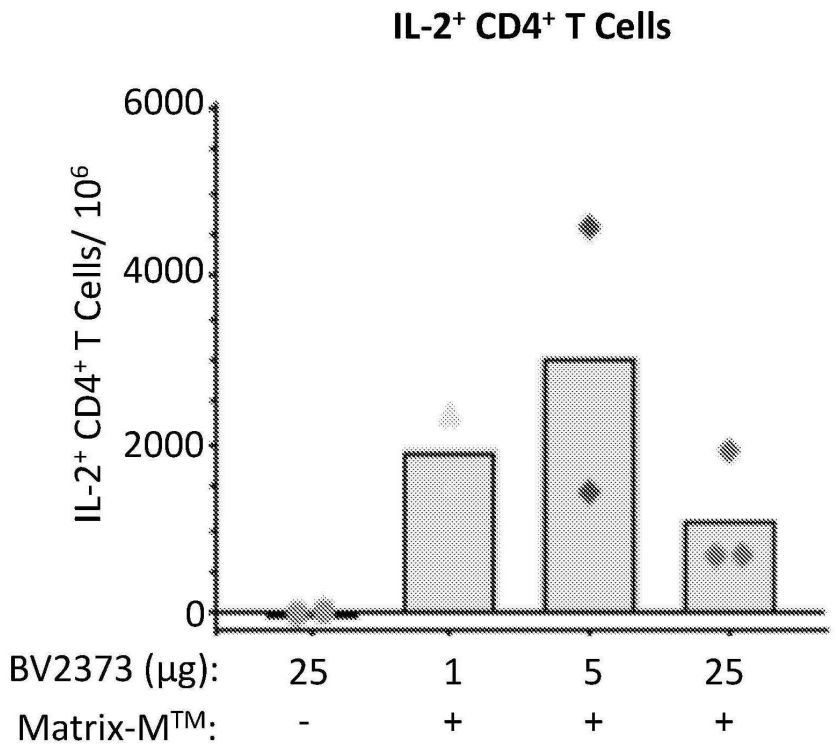
도면28


IFN-γ ELISPOT
IFN-γ secreting cells / 10^6 (log10)
2
1
0
BV2373 (µg):
25
1
5
25
Matrix-M™:
-
+
+
+

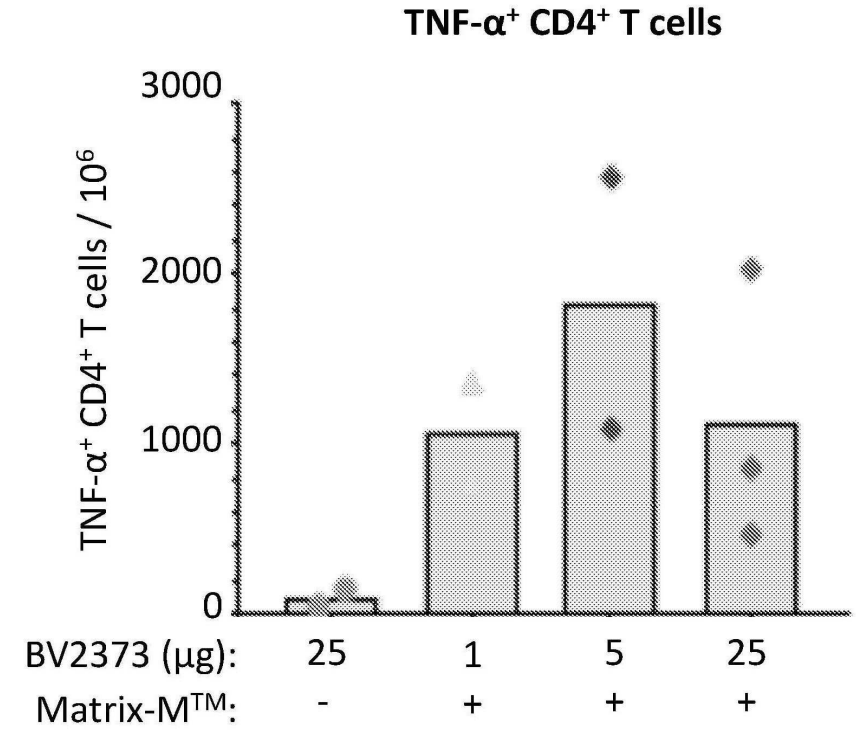
도면29a


IFN-γ+ CD4+ T Cells
IFN-γ+ CD4+ T Cells/ 10^6
500
400
300
200
100
0
BV2373 (µg):
25
1
5
25
Matrix-M™:
-
+
+
+

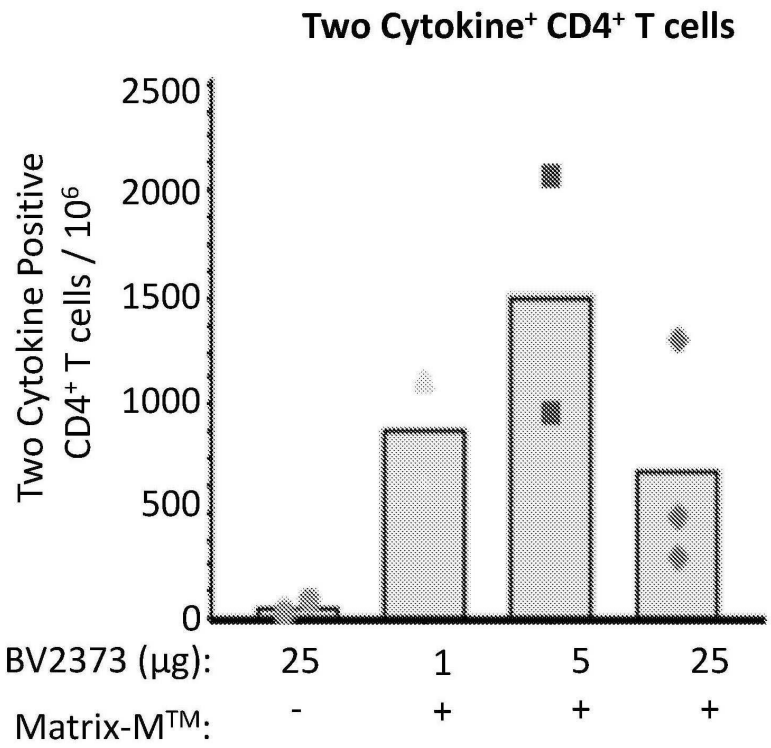
도면29b


IL-2+ CD4+ T Cells
6000
4000
2000
0
IL-2+ CD4+ T Cells/ 10^6
BV2373 (µg): 25 1 5 25
Matrix-M™: - + + +

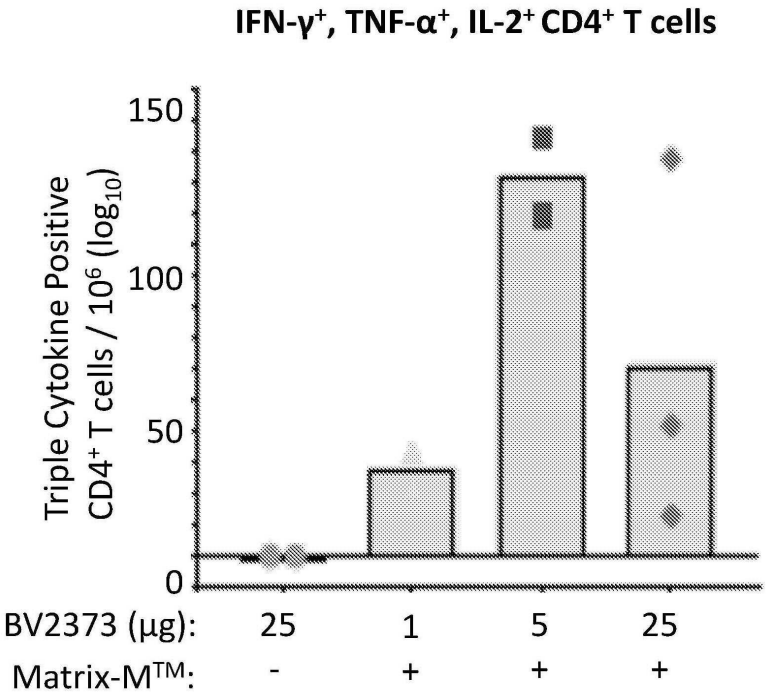
도면29c


TNF-α+ CD4+ T cells
3000
2000
1000
0
TNF-α+ CD4+ T cells / 10^6
BV2373 (µg): 25 1 5 25
Matrix-M™: - + + +

도면29d


Two Cytokine+ CD4+ T cells
Two Cytokine Positive CD4+ T cells / 10^6
2500
2000
1500
1000
500
0
BV2373 (µg): 25 1 5 25
Matrix-M™: - + + +

도면29e


IFN-γ+, TNF-α+, IL-2+ CD4+ T cells
Triple Cytokine Positive CD4+ T cells / 10^6 (log10)
150
100
50
0
BV2373 (µg): 25 1 5 25
Matrix-M™: - + + +

도면30

BV2384: CoV-2019/GSAS/K986P/V987P (SEQ ID NO: 109)

Isoelectric Pt (pI) 5.89

단일 펩타이드

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGT
NGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYH
KNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQG
FSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCAL
DPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYS
VLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSN
NLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVV
LSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEIL
DITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNN
SYECDIPIGAGICASYQTQTNSP**GSAS**SVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSM
TKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQ
ILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSAL
LAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQD
VVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLD**PP**EAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASAN
LAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFV
SNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDIS
GINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSC
LKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT

도면31

BV2373 (SEQ ID NO: 86)

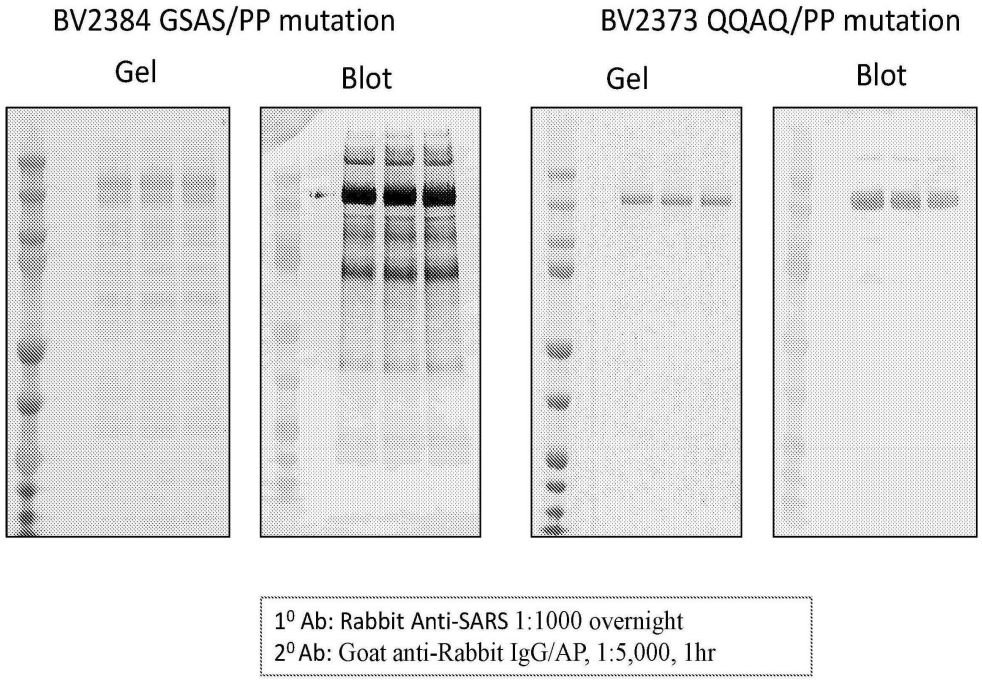
CoV-2019/QQAQ/K986P/V987P

불활성 퓨린 절단 부위

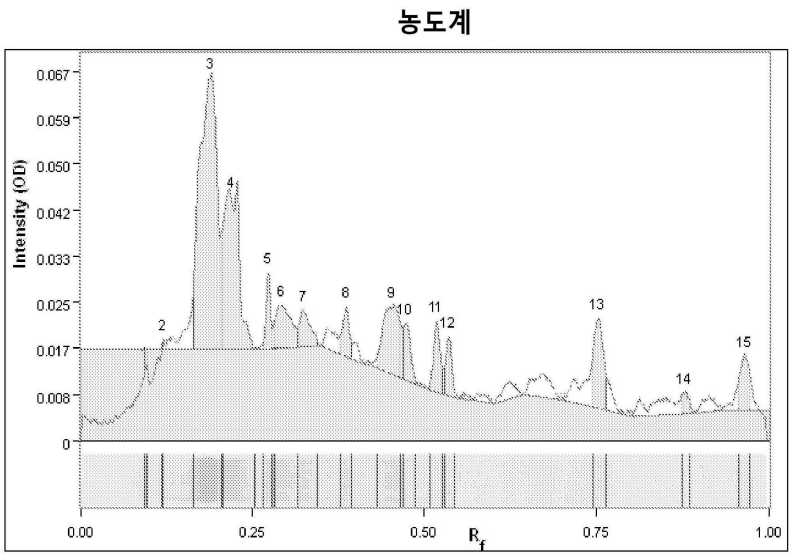
단일 펩타이드

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGT
NGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYH
KNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQG
FSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCA
LDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADY
SVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNS
NNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVV
VLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEI
LDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVN
NSYECDIPIGAGICASYQTQTNSP**QQAQ**SVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVS
MTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFS
QILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSA
LLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQ
DVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLD**PP**EAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASA
NLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVF
VSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGD
ISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCC
SCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT

도면32



도면33



순도: 38.5%

Protein concentration:

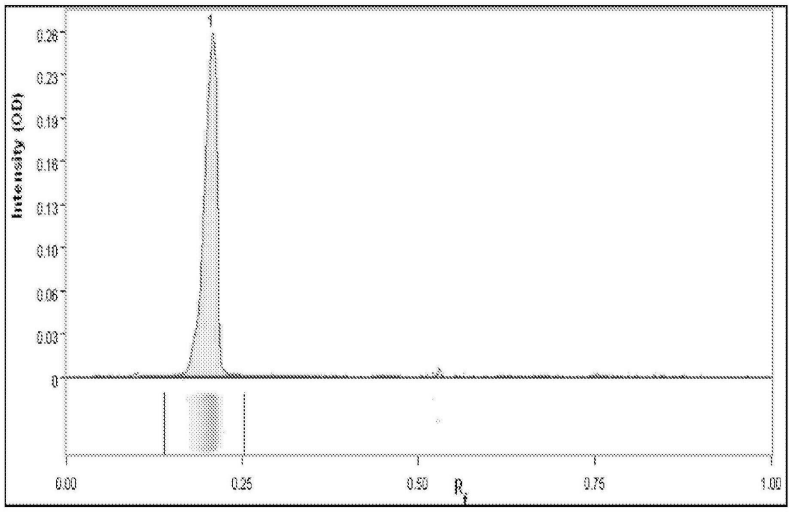
A280(0.9226) - A340(0.187) = 0.7356 /1.067 = 0.6894 mg/mL

Total Volume: 19.0mL X 0.6894 mg/mL = 13.098 mg

Yield: 13.098mg/4.8 liter = 2.728 mg/L

도면34

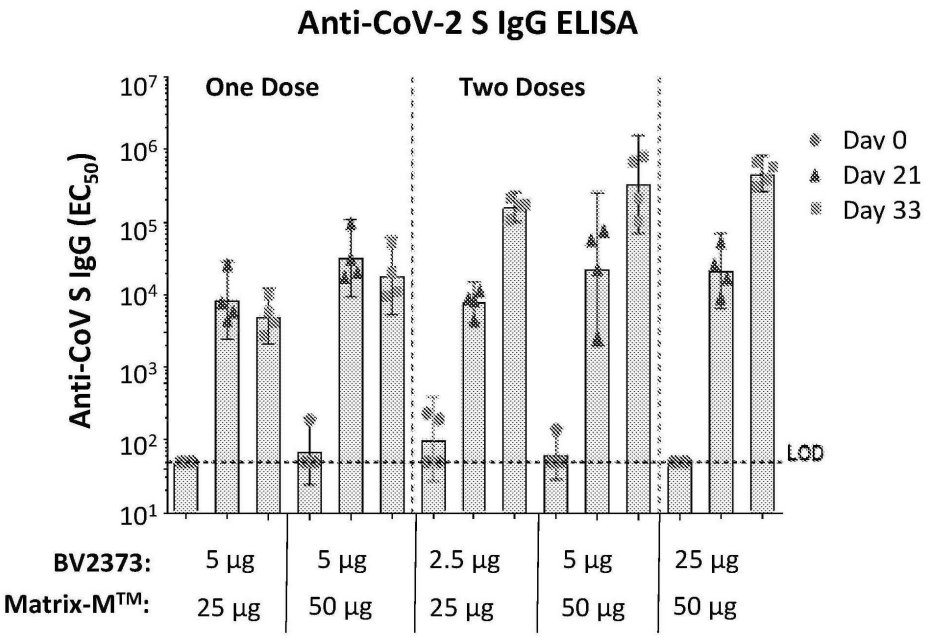
농도계



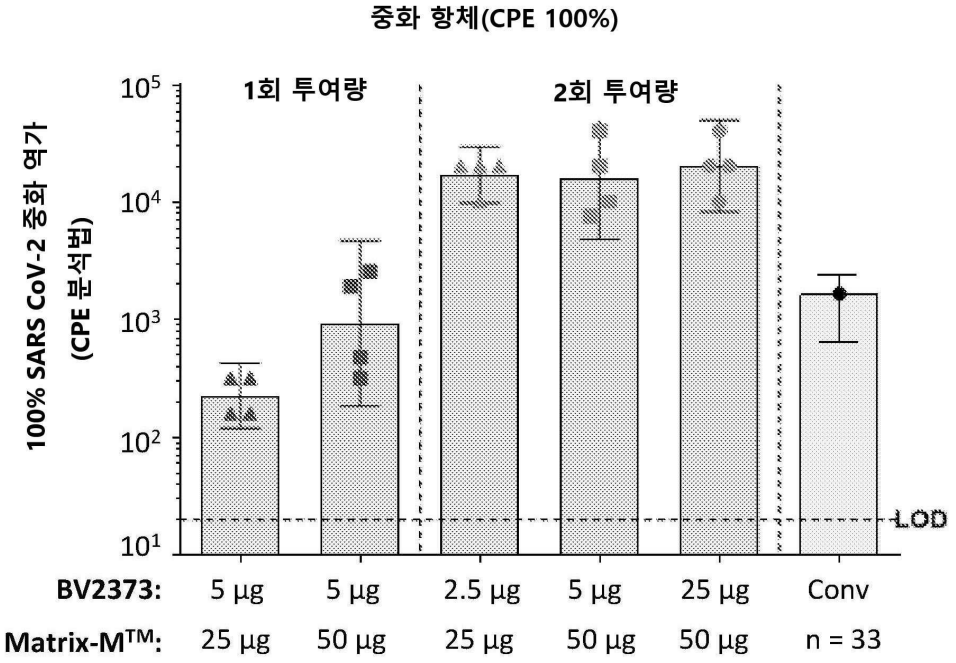
순도: 94.8%

Protein concentration:
A280(0.8368) - A340(0.0248) = 0.8142 /1.067 = 0.761 mg/mL
Total Volume: 42.47mL X 0.761 mg/mL = 42.32 mg
Yield: 42.32mg/5 liter = 6.4 mg/L

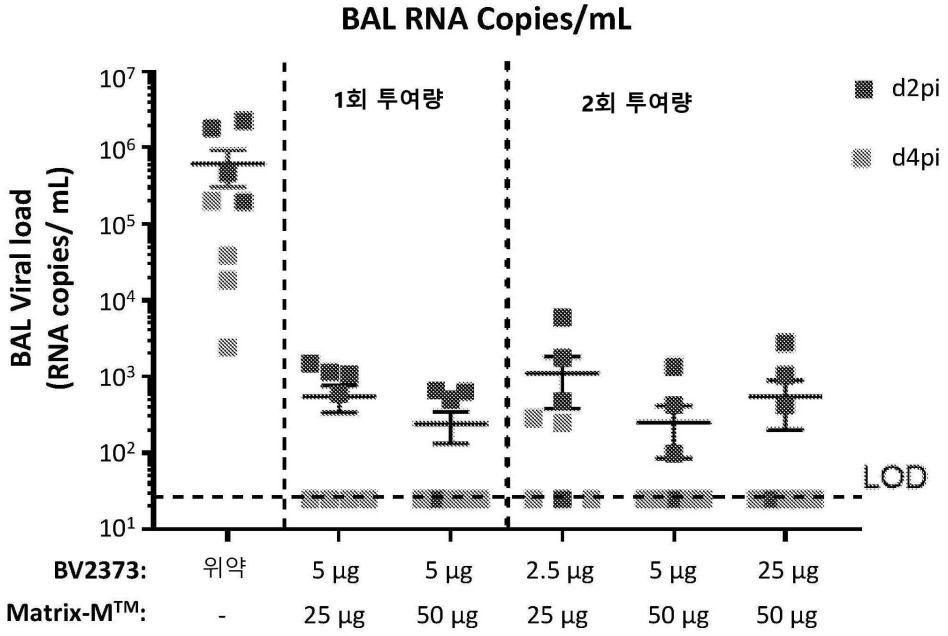
도면35a



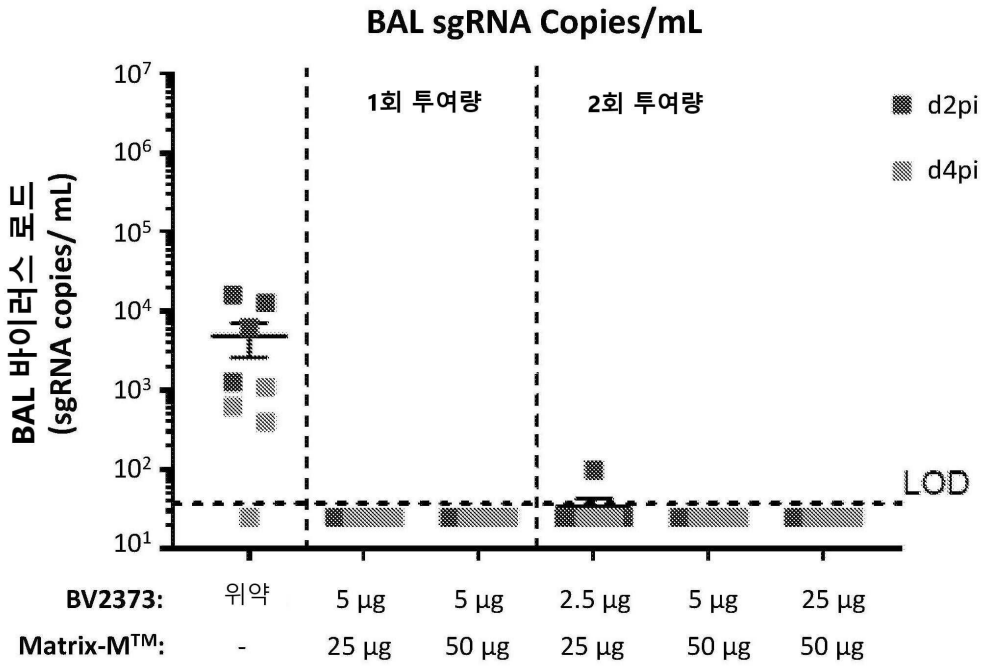
도면35b


중화 항체(CPE 100%)
1회 투여량
2회 투여량
100% SARS CoV-2 중화 역가
(CPE 분석법)
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
LOD
BV2373: 5 μg 5 μg 2.5 μg 5 μg 25 μg Conv
Matrix-M™: 25 μg 50 μg 25 μg 50 μg 50 μg n = 33

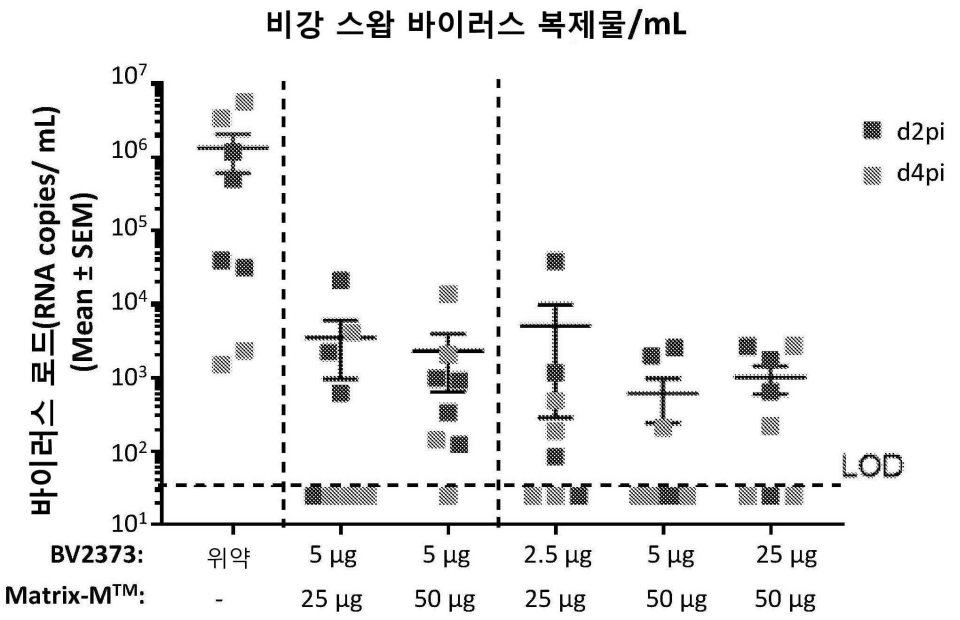
도면36a


BAL RNA Copies/mL
1회 투여량
2회 투여량
d2pi
d4pi
BAL Viral load
(RNA copies/ mL)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
LOD
BV2373: 위약 5 μg 5 μg 2.5 μg 5 μg 25 μg
Matrix-M™: - 25 μg 50 μg 25 μg 50 μg 50 μg

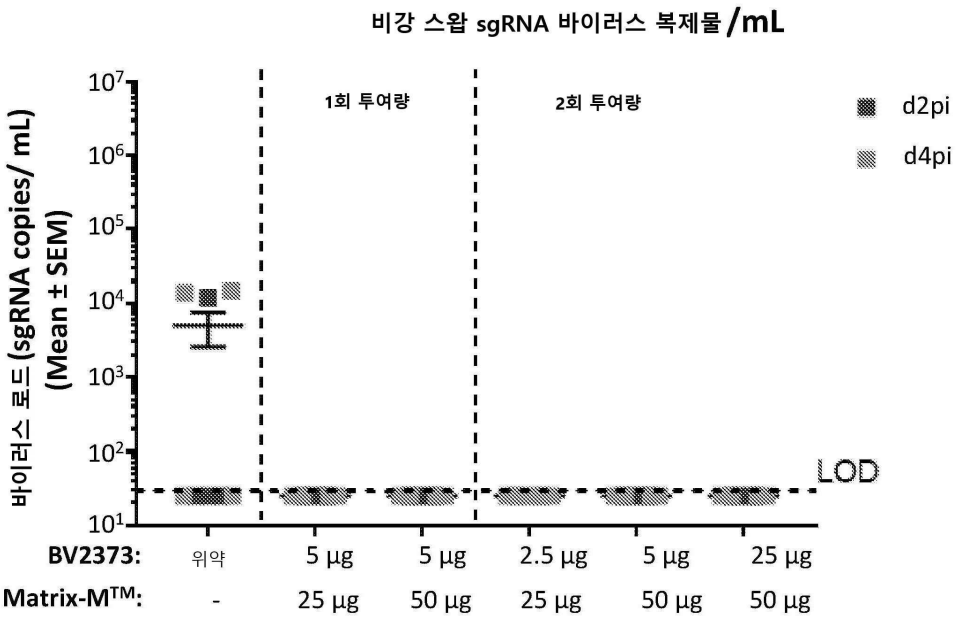
도면36b


BAL sgRNA Copies/mL
BAL 바이러스 로드
(sgRNA copies/ mL)
1회 투여량
2회 투여량
d2pi
d4pi
LOD
BV2373:
위약
5 μg
5 μg
2.5 μg
5 μg
25 μg
Matrix-M™:
-
25 μg
50 μg
25 μg
50 μg
50 μg

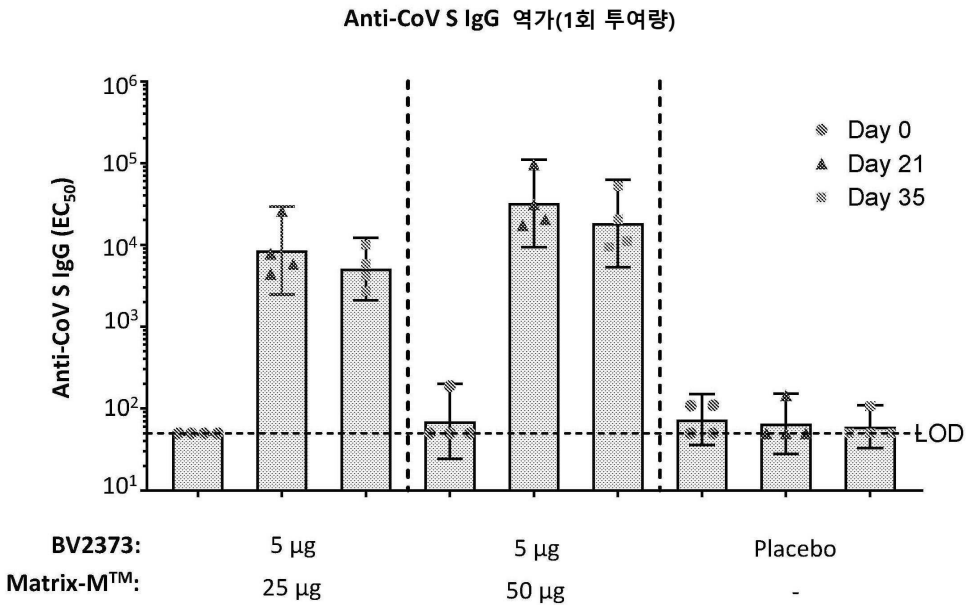
도면37a


비강 스왑 바이러스 복제물/mL
바이러스 로드(RNA copies/ mL)
(Mean ± SEM)
d2pi
d4pi
LOD
BV2373:
위약
5 μg
5 μg
2.5 μg
5 μg
25 μg
Matrix-M™:
-
25 μg
50 μg
25 μg
50 μg
50 μg

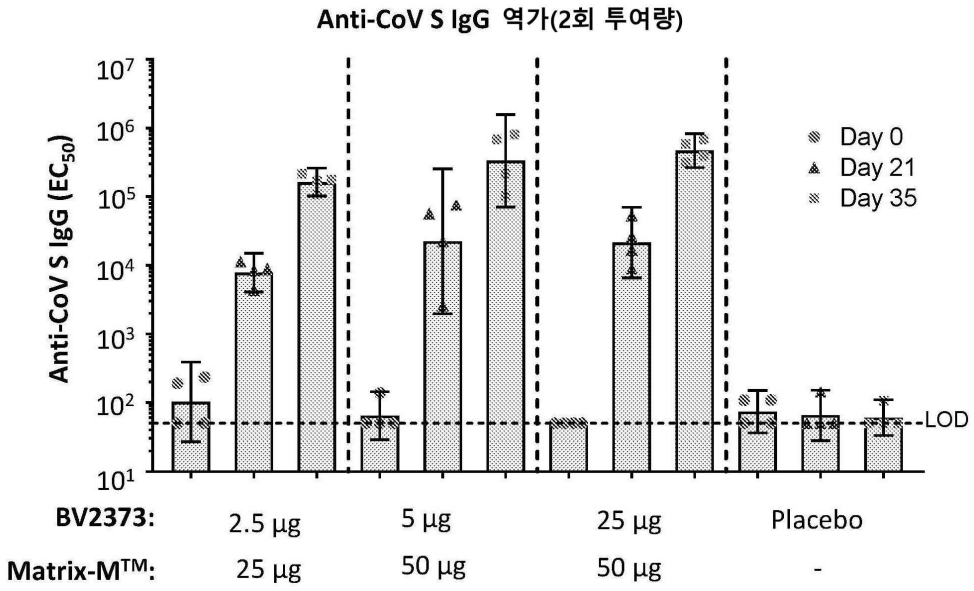
도면37b


비강 스왑 sgRNA 바이러스 복제물/mL
바이러스 로드 (sgRNA copies/ mL) (Mean ± SEM)
1회 투여량
2회 투여량
d2pi
d4pi
LOD
BV2373:
위약
5 µg
5 µg
2.5 µg
5 µg
25 µg
Matrix-M™:
-
25 µg
50 µg
25 µg
50 µg
50 µg

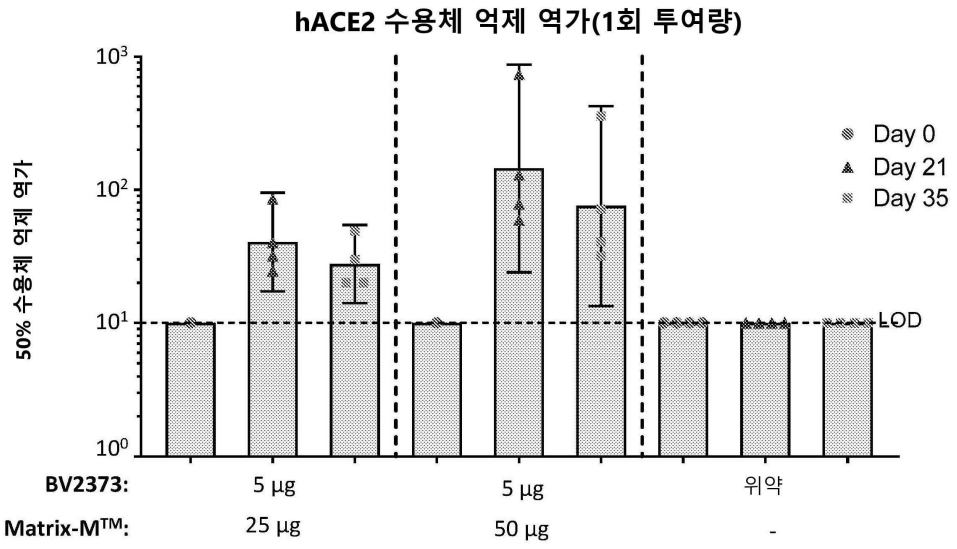
도면38a


Anti-CoV S IgG 역가(1회 투여량)
Anti-CoV S IgG (EC50)
Day 0
Day 21
Day 35
LOD
BV2373:
5 µg
5 µg
Placebo
Matrix-M™:
25 µg
50 µg
-

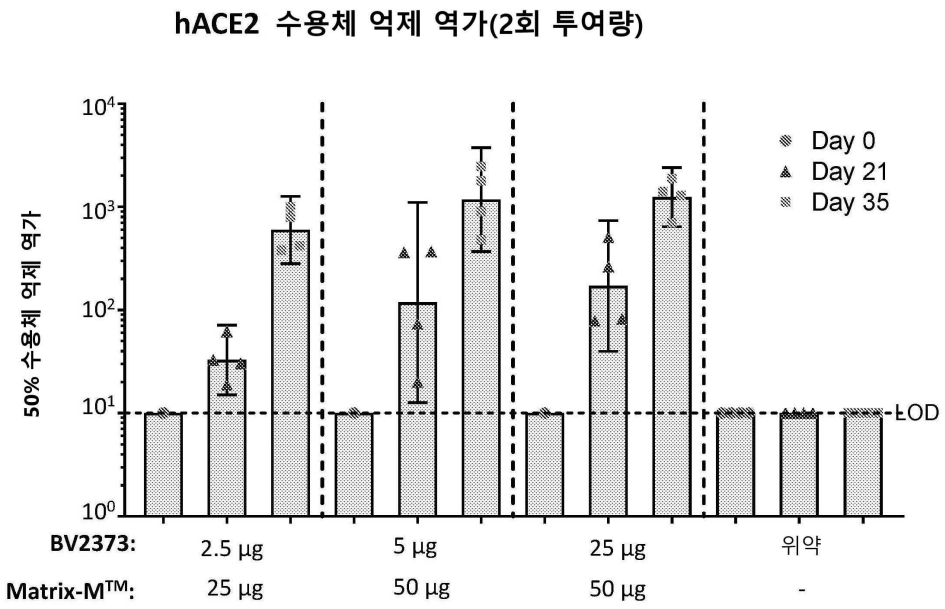
도면38b


Anti-CoV S IgG 역가(2회 투여량)
Anti-CoV S IgG (EC50)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
Day 0
Day 21
Day 35
LOD
BV2373:
2.5 µg
5 µg
25 µg
Placebo
Matrix-M™:
25 µg
50 µg
50 µg
-

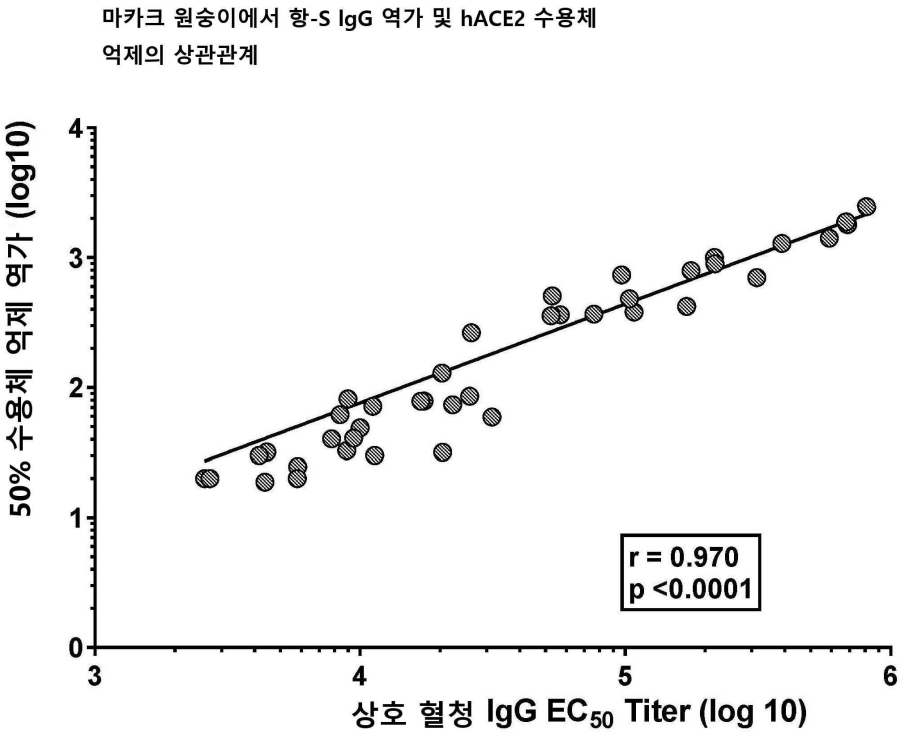
도면38c


hACE2 수용체 억제 역가(1회 투여량)
50% 수용체 억제 역가
10^3
10^2
10^1
10^0
Day 0
Day 21
Day 35
LOD
BV2373:
5 µg
5 µg
위약
Matrix-M™:
25 µg
50 µg
-

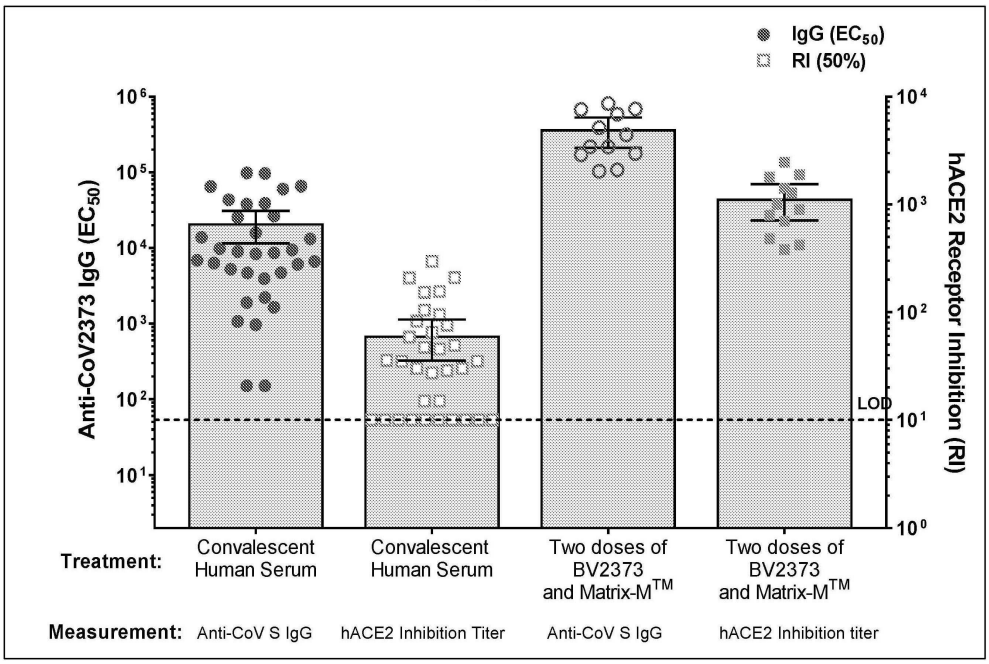
도면38d


hACE2 수용체 억제 역가(2회 투여량)
50% 수용체 억제 역가
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
Day 0
Day 21
Day 35
LOD
BV2373:
2.5 μg
5 μg
25 μg
위약
Matrix-M™:
25 μg
50 μg
50 μg
-

도면38e

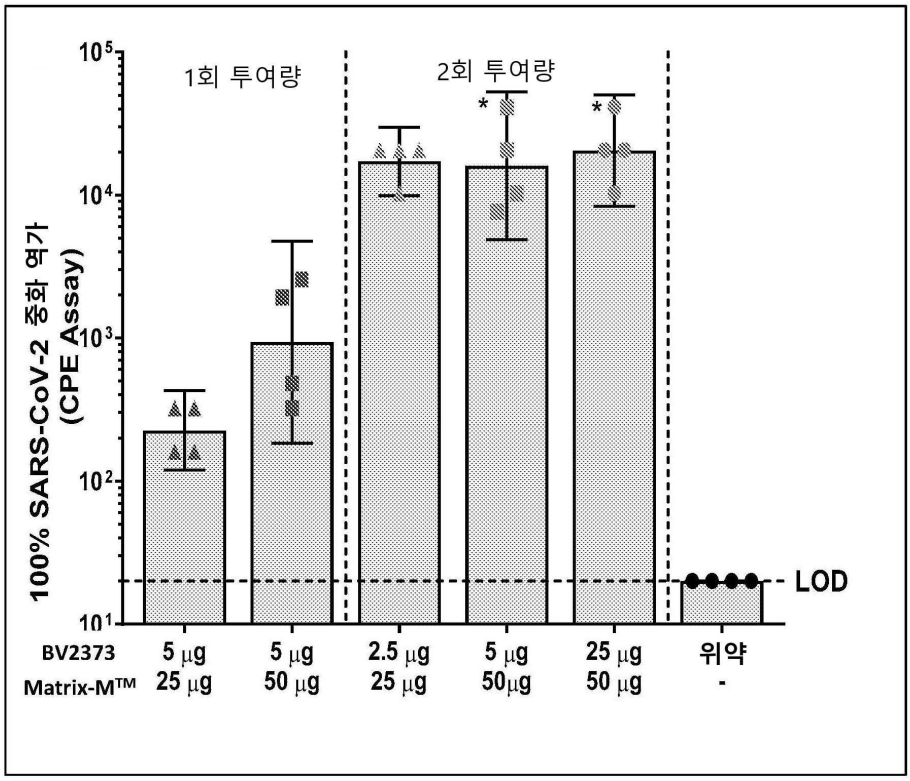

마카크 원숭이에서 항-S IgG 역가 및 hACE2 수용체 억제의 상관관계
50% 수용체 억제 역가 (log10)
상호 혈청 IgG EC_{50} Titer (log 10)
r = 0.970
p <0.0001
0
1
2
3
4
3
4
5
6

도면39

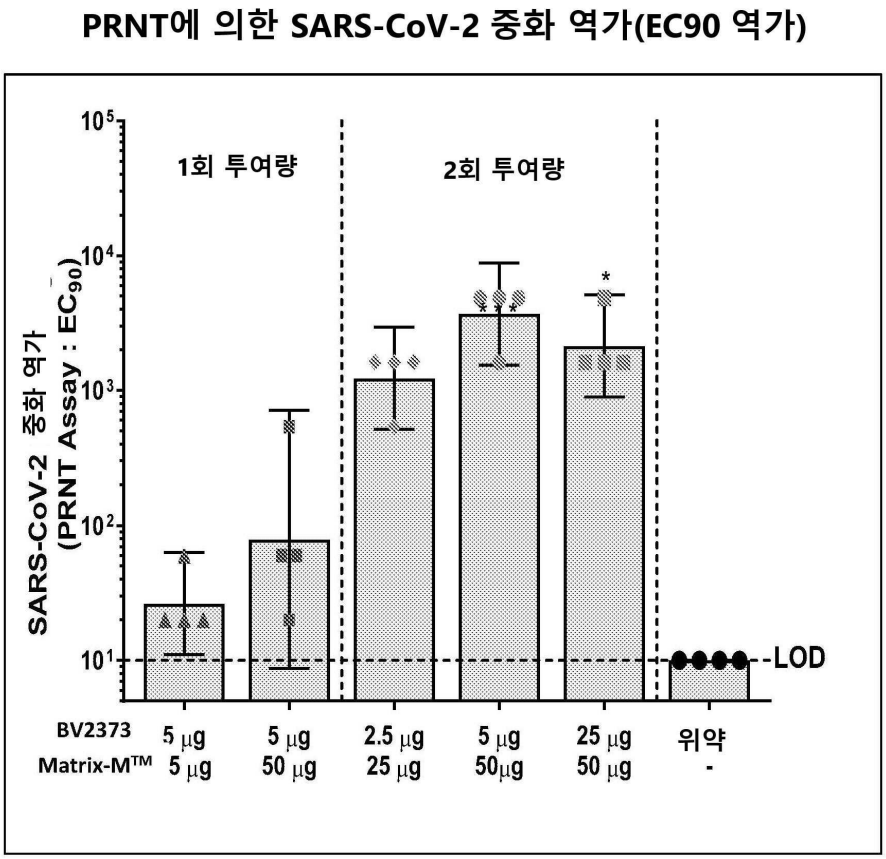


도면40a

CPE에 의한 SARS-CoV-2 중화 역가(100% 중화)



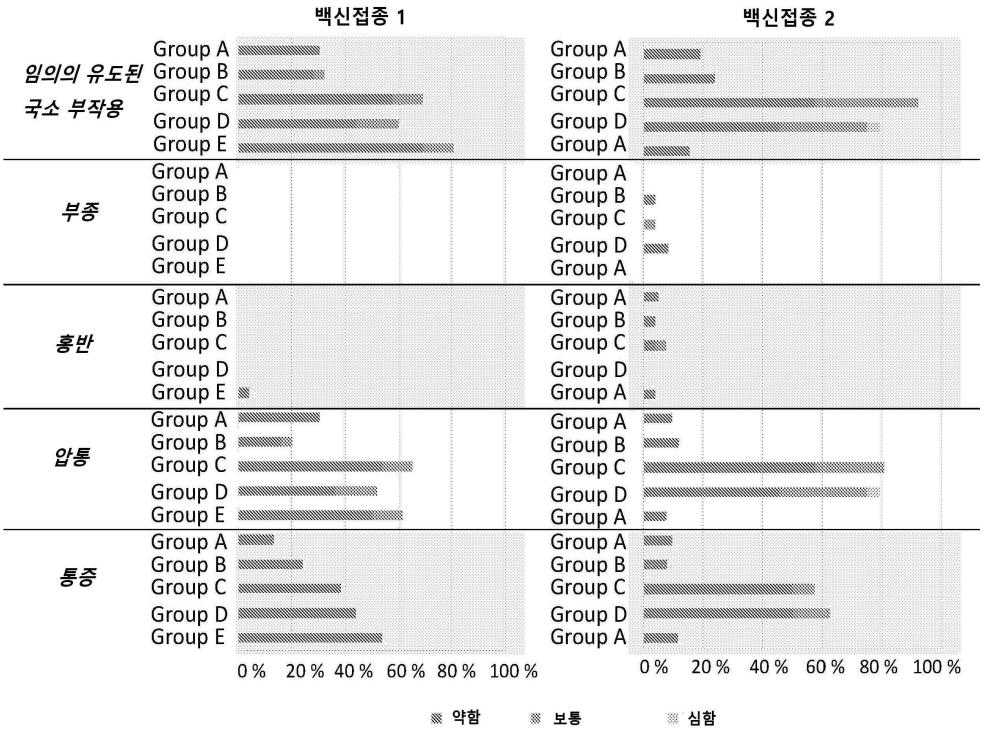
도면40b



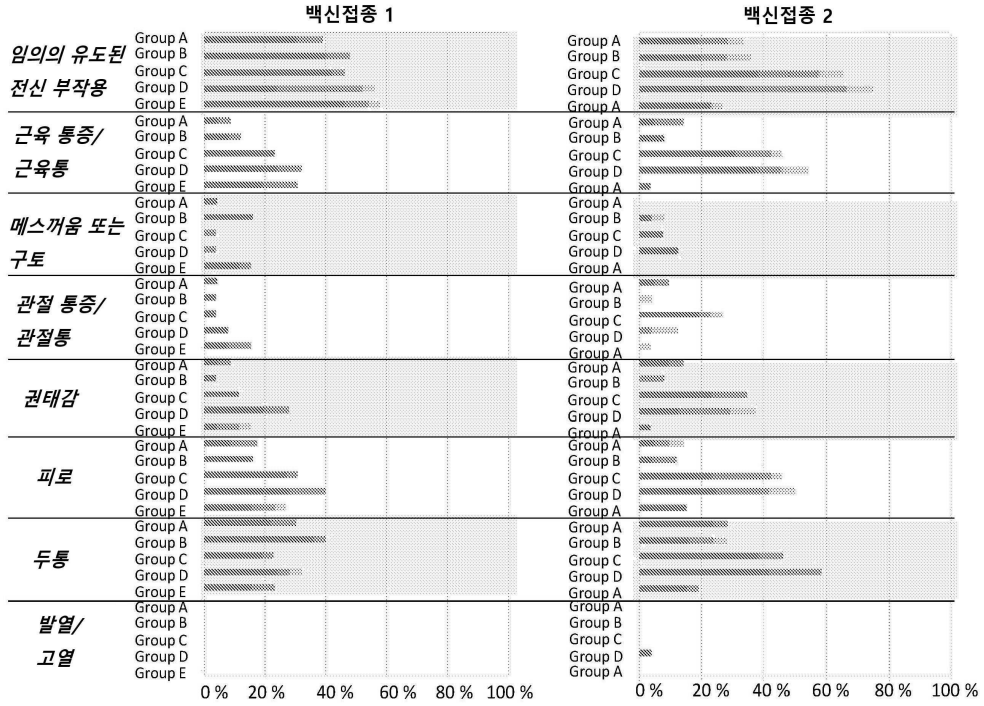
도면41

Procedure	Screening	Day							
		0	7	21	28	35	49	185	189	336
Vaccination		X		X						
Blood sample: safety	X		X	X	X					
Blood sample: immunogenicity		X	X	X	X	X	X	X	X	
Nasal swab	X					X				
Reactogenicity		⟷		⟷						
Unsolicited AE		⟷	⟷	⟷	⟷	⟷				
MAAE: All/Related		⟷	⟷	⟷	⟷	⟷	⟷	⟷	⟷	
SAE or AESI		⟷	⟷	⟷	⟷	⟷	⟷	⟷	⟷	⟷

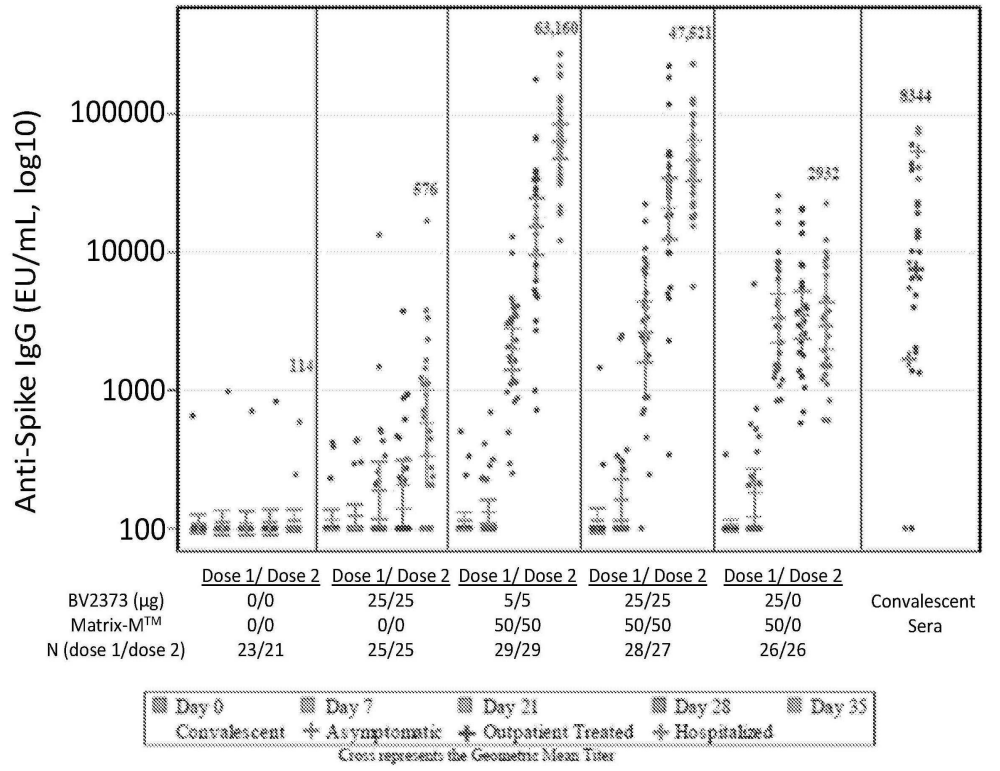
도면42a


백신접종 1
백신접종 2
임의의 유도된 국소 부작용
부종
홍반
압통
통증
Group A
Group B
Group C
Group D
Group E
0 %
20 %
40 %
60 %
80 %
100 %
약함
보통
심함

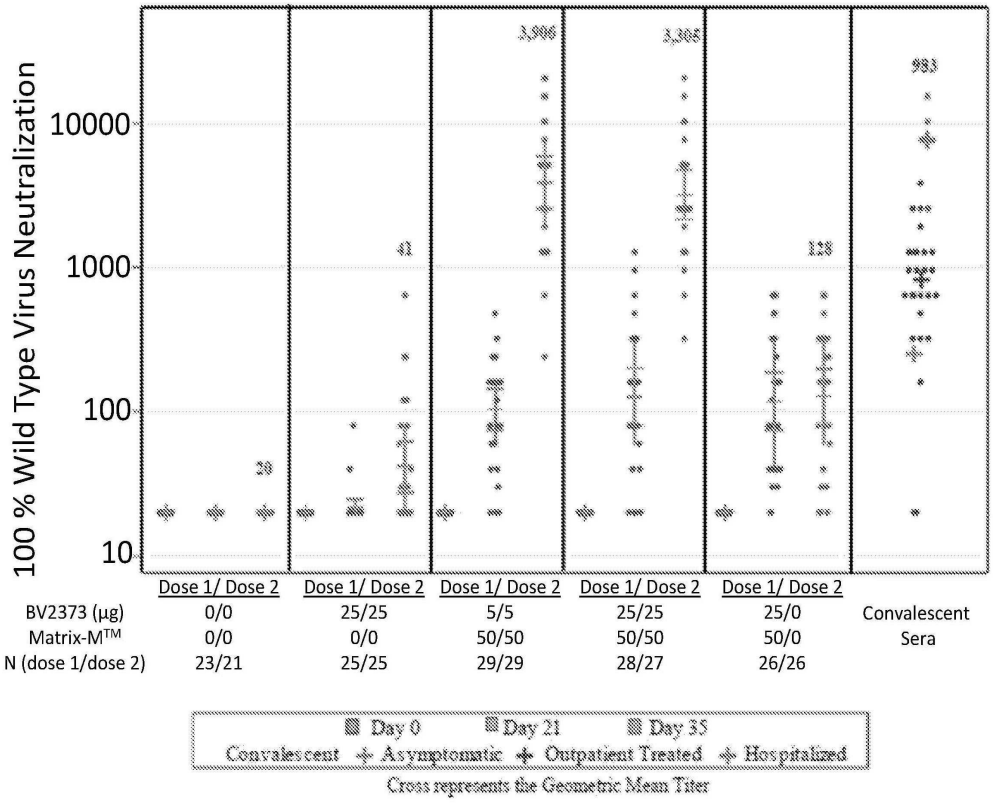
도면42b


백신접종 1
백신접종 2
임의의 유도된 전신 부작용
근육 통증/ 근육통
메스꺼움 또는 구토
관절 통증/ 관절통
권태감
피로
두통
발열/ 고열
Group A
Group B
Group C
Group D
Group E
0 %
20 %
40 %
60 %
80 %
100 %

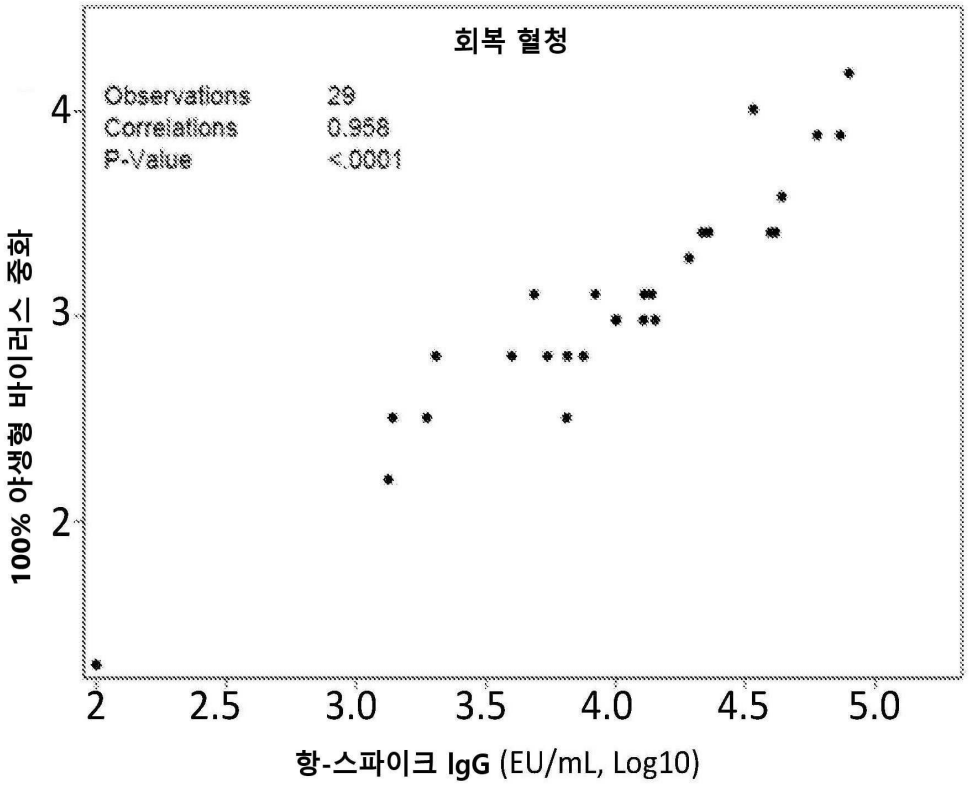
도면43a


Anti-Spike IgG (EU/mL, log10)
100000
10000
1000
100
63,160
47,521
8344
2932
576
114
Dose 1/ Dose 2
Dose 1/ Dose 2
Dose 1/ Dose 2
Dose 1/ Dose 2
Dose 1/ Dose 2
BV2373 (µg)
0/0
25/25
5/5
25/25
25/0
Convalescent
Matrix-M™
0/0
0/0
50/50
50/50
50/0
Sera
N (dose 1/dose 2)
23/21
25/25
29/29
28/27
26/26
Day 0
Day 7
Day 21
Day 28
Day 35
Convalescent
Asymptomatic
Outpatient Treated
Hospitalized
Cross represents the Geometric Mean Titer

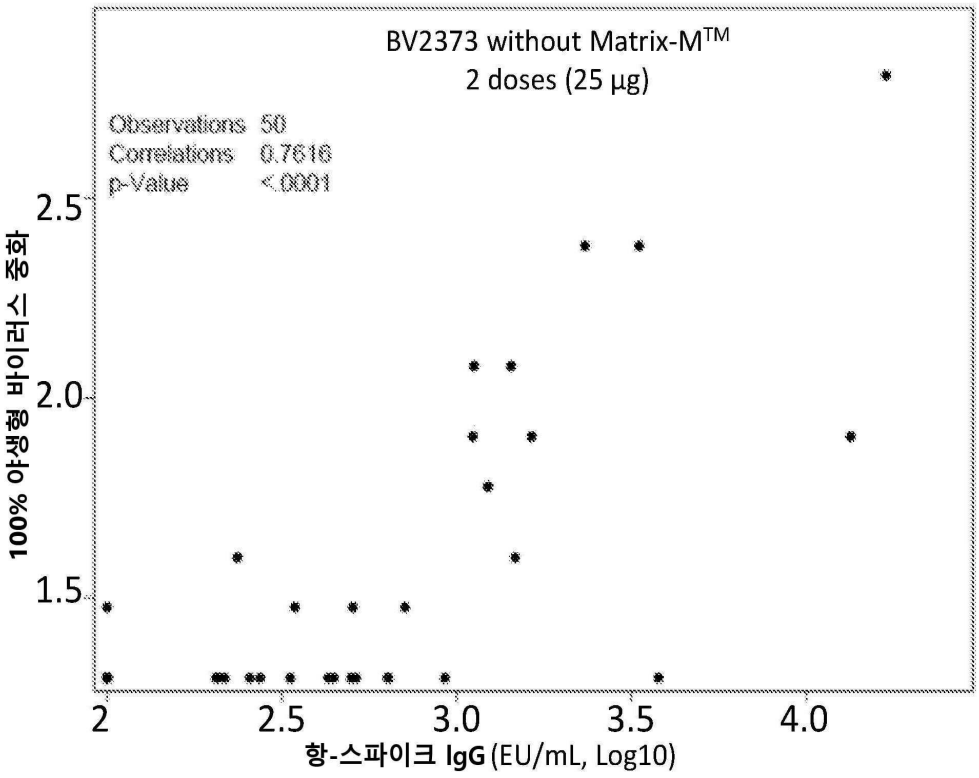
도면43b


100 % Wild Type Virus Neutralization
10000
1000
100
10
3,986
3,365
983
128
41
20
Dose 1/ Dose 2
Dose 1/ Dose 2
Dose 1/ Dose 2
Dose 1/ Dose 2
Dose 1/ Dose 2
BV2373 (µg)
0/0
25/25
5/5
25/25
25/0
Convalescent
Matrix-M™
0/0
0/0
50/50
50/50
50/0
Sera
N (dose 1/dose 2)
23/21
25/25
29/29
28/27
26/26
Day 0
Day 21
Day 35
Convalescent
Asymptomatic
Outpatient Treated
Hospitalized
Cross represents the Geometric Mean Titer

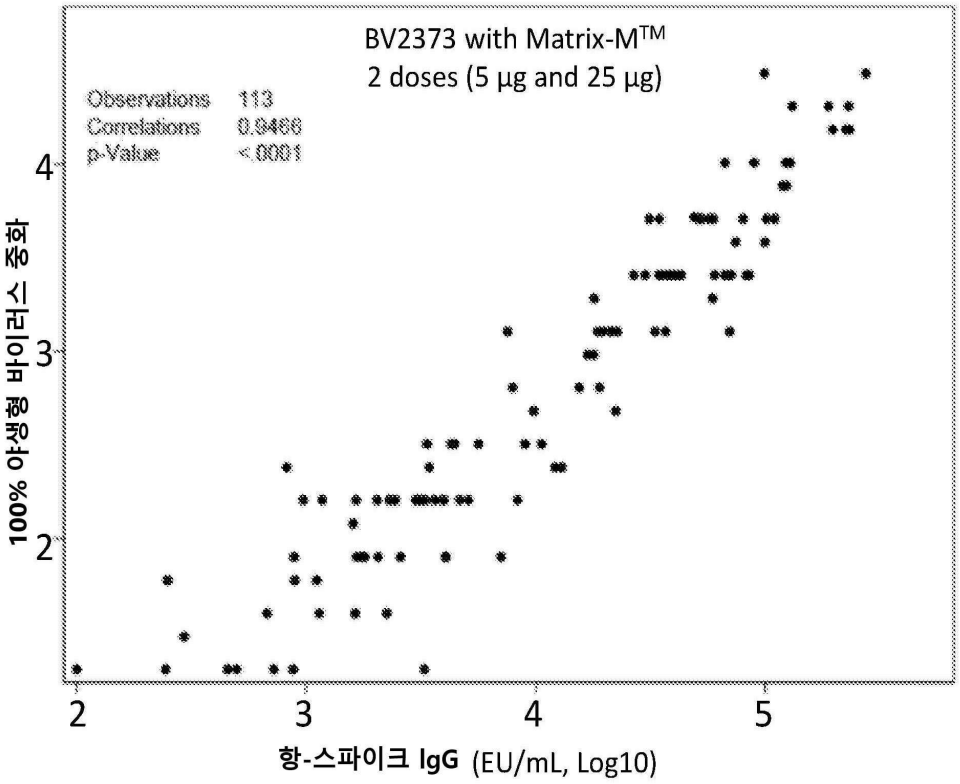
도면44a


회복 혈청
Observations 29
Correlations 0.958
P-Value <.0001
100% 야생형 바이러스 중화
4
3
2
2
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
5.0
항-스파이크 IgG (EU/mL, Log10)

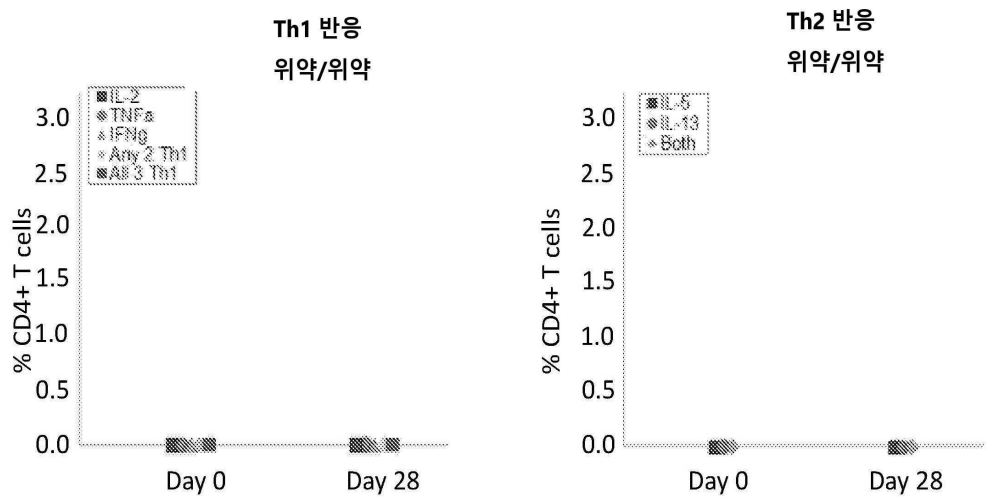
도면44b


BV2373 without Matrix-M™
2 doses (25 µg)
Observations 50
Correlations 0.7616
p-Value <.0001
100% 야생형 바이러스 중화
2.5
2.0
1.5
2
2.5
3.0
3.5
4.0
항-스파이크 IgG (EU/mL, Log10)

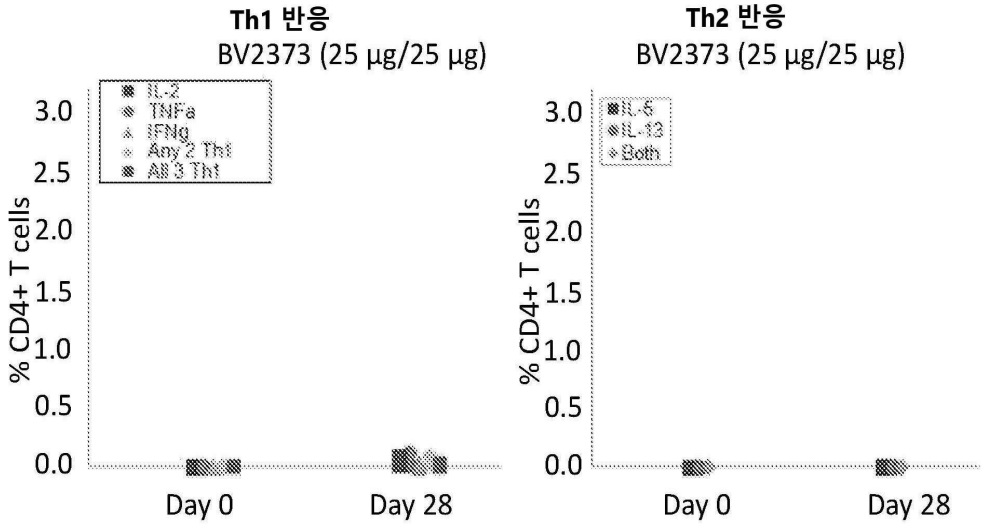
도면44c


BV2373 with Matrix-M™
2 doses (5 µg and 25 µg)
Observations 113
Correlations 0.9468
p-Value <.0001
100% 야생형 바이러스 중화
항-스파이크 IgG (EU/mL, Log10)
2
3
4
5

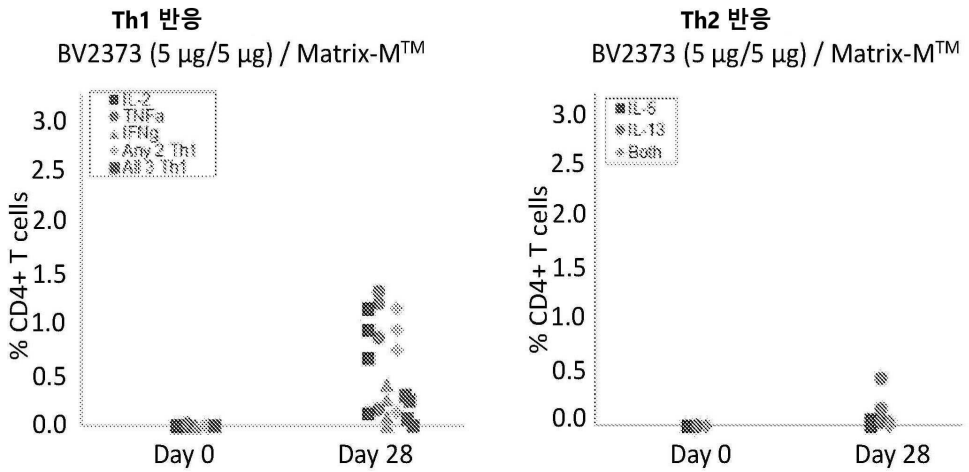
도면45a


Th1 반응
위약/위약
IL-2
TNFα
IFNg
Any 2 Th1
All 3 Th1
% CD4+ T cells
Day 0
Day 28
Th2 반응
위약/위약
IL-5
IL-13
Both
% CD4+ T cells
Day 0
Day 28

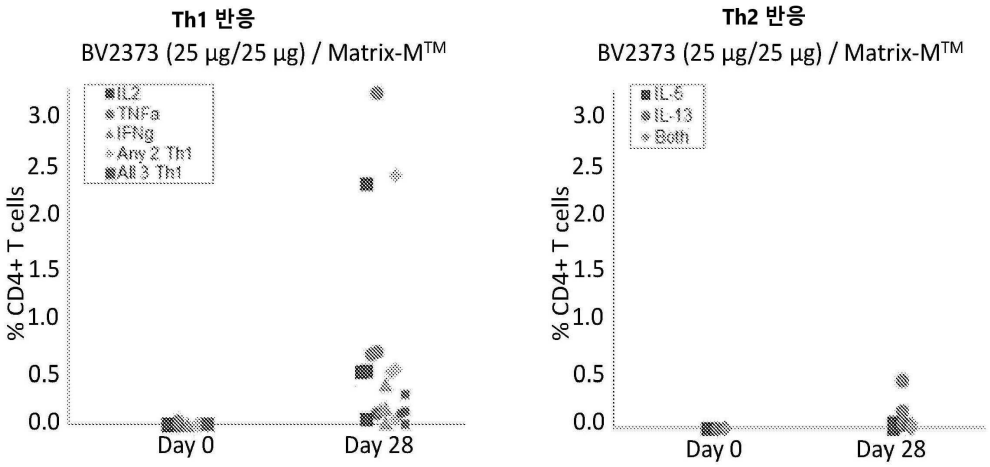
도면45b



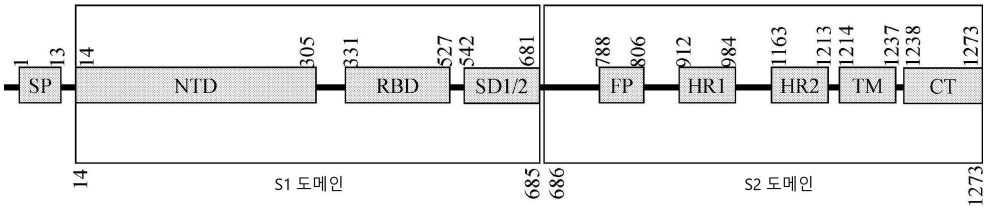
도면45c



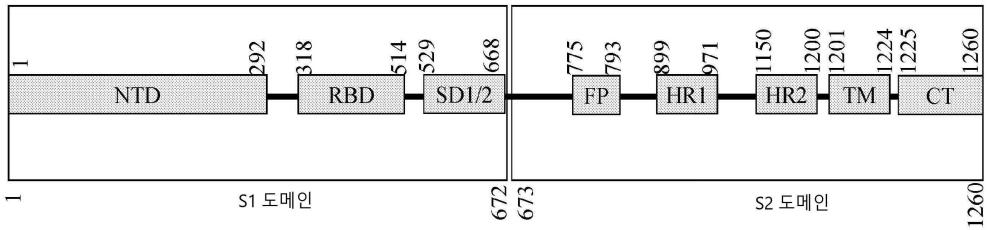
도면45d



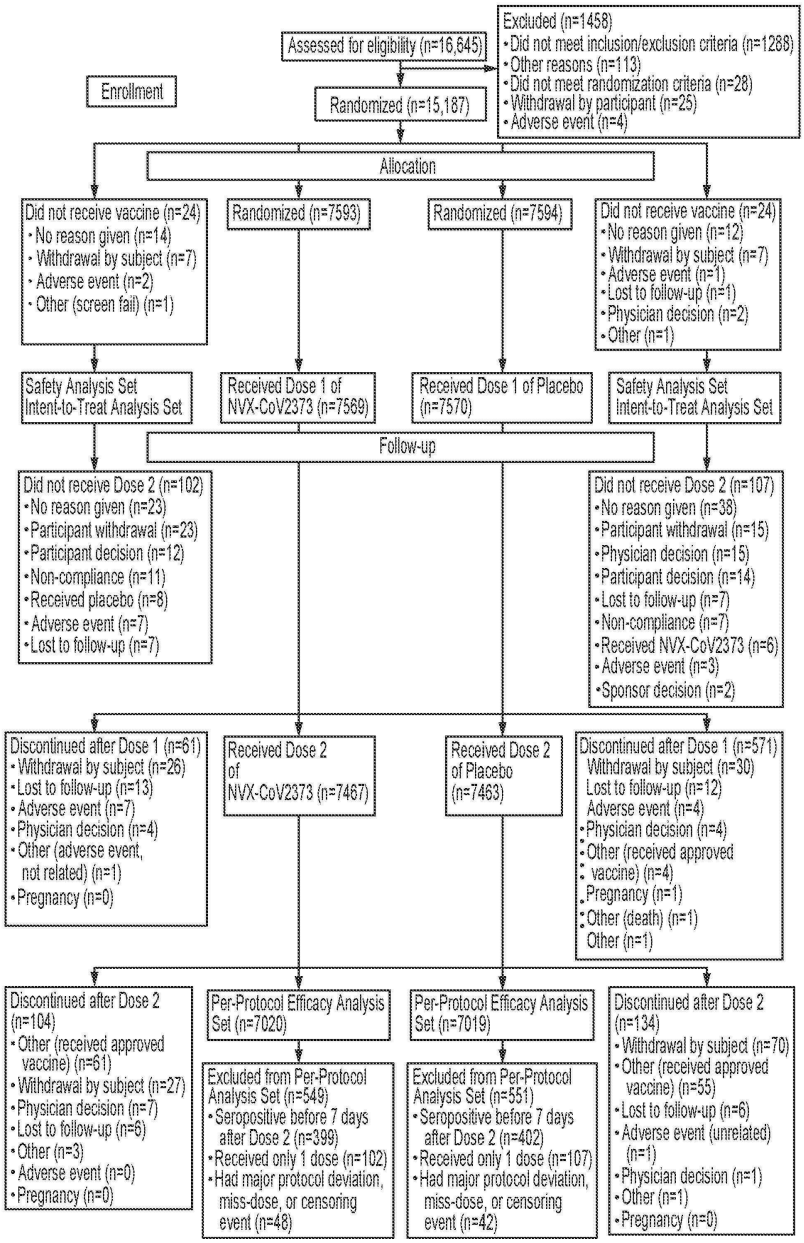
도면46a


1
13
14
305
331
527
542
681
788
806
912
984
1163
1213
1214
1237
1238
1273
SP
NTD
RBD
SD1/2
FP
HR1
HR2
TM
CT
14
S1 도메인
685
686
S2 도메인
1273

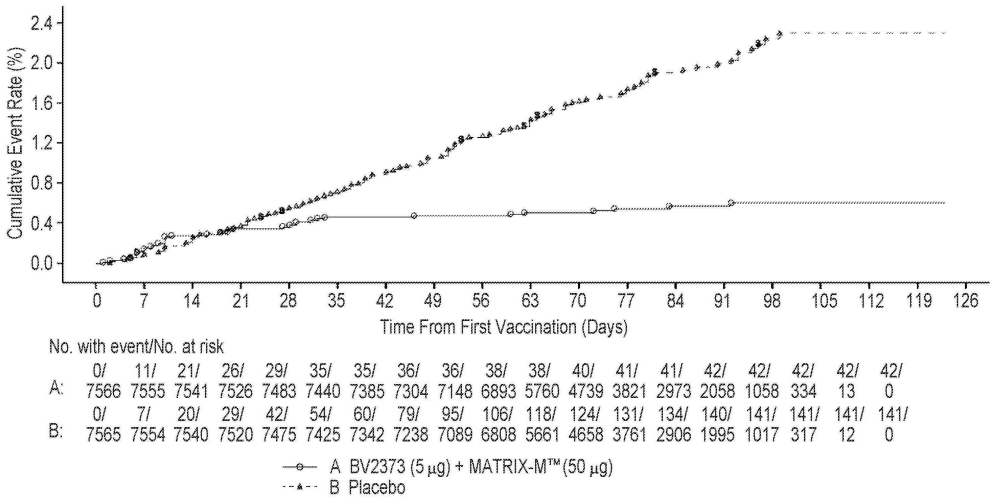
도면46b


1
292
318
514
529
668
775
793
899
971
1150
1200
1201
1224
1225
1260
NTD
RBD
SD1/2
FP
HR1
HR2
TM
CT
1
S1 도메인
672
673
S2 도메인
1260

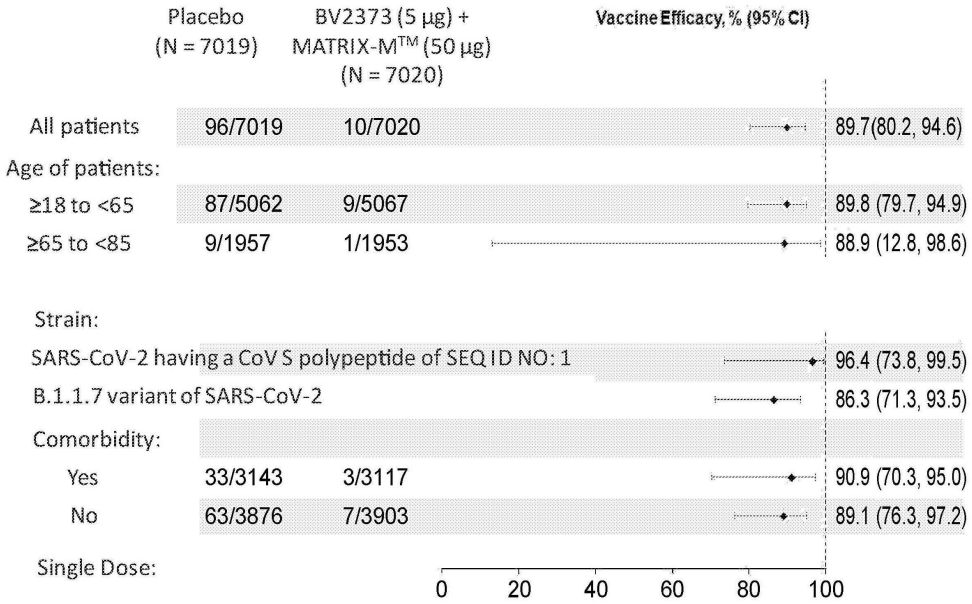
도면47


Enrollment
Assessed for eligibility (n=16,645)
Excluded (n=1458)
•Did not meet inclusion/exclusion criteria (n=1288)
•Other reasons (n=113)
•Did not meet randomization criteria (n=28)
•Withdrawal by participant (n=25)
•Adverse event (n=4)
Randomized (n=15,187)
Allocation
Did not receive vaccine (n=24)
• No reason given (n=14)
• Withdrawal by subject (n=7)
• Adverse event (n=2)
• Other (screen fail) (n=1)
Randomized (n=7593)
Randomized (n=7594)
Did not receive vaccine (n=24)
•No reason given (n=12)
•Withdrawal by subject (n=7)
•Adverse event (n=1)
•Lost to follow-up (n=1)
•Physician decision (n=2)
•Other (n=1)
Safety Analysis Set
Intent-to-Treat Analysis Set
Received Dose 1 of
NVX-CoV2373 (n=7569)
Received Dose 1 of Placebo
(n=7570)
Safety Analysis Set
Intent-to-Treat Analysis Set
Follow-up
Did not receive Dose 2 (n=102)
•No reason given (n=23)
•Participant withdrawal (n=23)
•Participant decision (n=12)
•Non-compliance (n=11)
•Received placebo (n=8)
•Adverse event (n=7)
•Lost to follow-up (n=7)
Did not receive Dose 2 (n=107)
•No reason given (n=38)
•Participant withdrawal (n=15)
•Physician decision (n=15)
•Participant decision (n=14)
•Lost to follow-up (n=7)
•Non-compliance (n=7)
•Received NVX-CoV2373 (n=6)
•Adverse event (n=3)
•Sponsor decision (n=2)
Discontinued after Dose 1 (n=61)
•Withdrawal by subject (n=26)
•Lost to follow-up (n=13)
•Adverse event (n=7)
•Physician decision (n=4)
•Other (adverse event,
not related) (n=1)
•Pregnancy (n=0)
Received Dose 2
of
NVX-CoV2373 (n=7467)
Received Dose 2
of Placebo
(n=7463)
Discontinued after Dose 1 (n=571)
Withdrawal by subject (n=30)
Lost to follow-up (n=12)
Adverse event (n=4)
•Physician decision (n=4)
•Other (received approved
vaccine) (n=4)
•Pregnancy (n=1)
•Other (death) (n=1)
Other (n=1)
Discontinued after Dose 2
(n=104)
•Other (received approved
vaccine) (n=61)
•Withdrawal by subject (n=27)
•Physician decision (n=7)
•Lost to follow-up (n=6)
•Other (n=3)
•Adverse event (n=0)
•Pregnancy (n=0)
Per-Protocol Efficacy Analysis
Set (n=7020)
Per-Protocol Efficacy Analysis
Set (n=7019)
Discontinued after Dose 2
(n=134)
•Withdrawal by subject (n=70)
•Other (received approved
vaccine) (n=55)
•Lost to follow-up (n=6)
•Adverse event (unrelated)
(n=1)
•Physician decision (n=1)
•Other (n=1)
•Pregnancy (n=0)
Excluded from Per-Protocol
Analysis Set (n=549)
•Seropositive before 7 days
after Dose 2 (n=399)
•Received only 1 dose (n=102)
•Had major protocol deviation,
miss-dose, or censoring
event (n=48)
Excluded from Per-Protocol
Analysis Set (n=551)
•Seropositive before 7 days
after Dose 2 (n=402)
•Received only 1 dose (n=107)
•Had major protocol deviation,
miss-dose, or censoring
event (n=42)

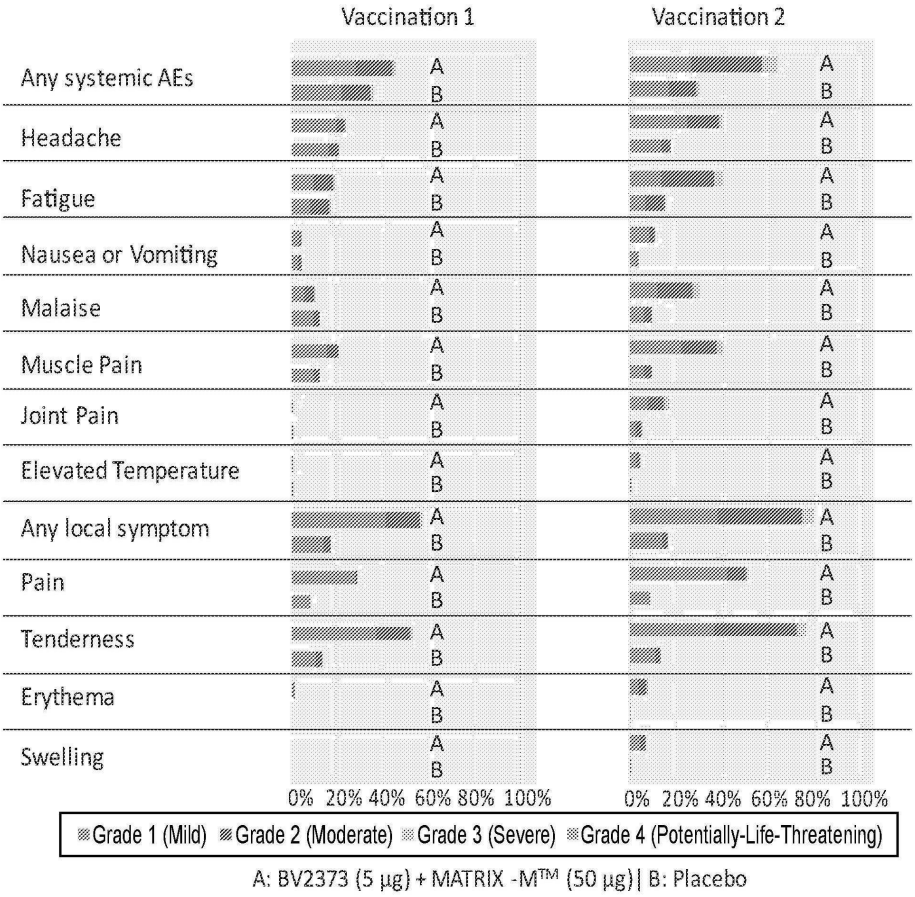
도면48


Cumulative Event Rate (%)
2.4
2.0
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70 77 84 91 98 105 112 119 126
Time From First Vaccination (Days)
No. with event/No. at risk
A: 0/7566 11/7555 21/7541 26/7526 29/7483 35/7440 35/7385 36/7304 36/7148 38/6893 38/5760 40/4739 41/3821 41/2973 42/2058 42/1058 42/334 42/13 42/0
B: 0/7565 7/7554 20/7540 29/7520 42/7475 54/7425 60/7342 79/7238 95/7089 106/6808 118/5661 124/4658 131/3761 134/2906 140/1995 141/1017 141/317 141/12 141/0
A BV2373 (5 μg) + MATRIX-M™ (50 μg)
B Placebo

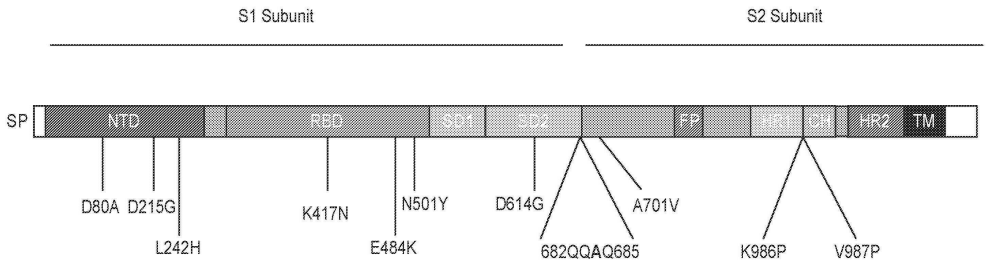
도면49


Placebo (N = 7019)
BV2373 (5 μg) + MATRIX-M™ (50 μg) (N = 7020)
Vaccine Efficacy, % (95% CI)
All patients 96/7019 10/7020 89.7(80.2, 94.6)
Age of patients:
≥18 to <65 87/5062 9/5067 89.8 (79.7, 94.9)
≥65 to <85 9/1957 1/1953 88.9 (12.8, 98.6)
Strain:
SARS-CoV-2 having a CoV S polypeptide of SEQ ID NO: 1 96.4 (73.8, 99.5)
B.1.1.7 variant of SARS-CoV-2 86.3 (71.3, 93.5)
Comorbidity:
Yes 33/3143 3/3117 90.9 (70.3, 95.0)
No 63/3876 7/3903 89.1 (76.3, 97.2)
Single Dose:
0 20 40 60 80 100

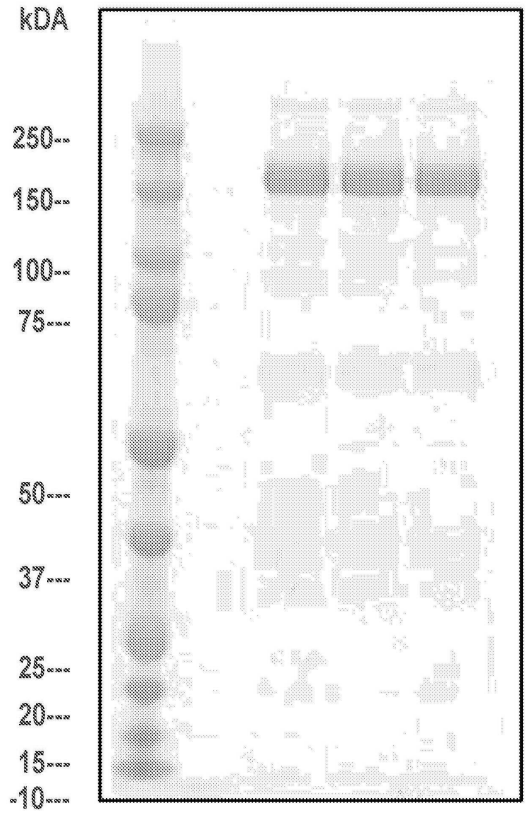
도면50


Vaccination 1
Vaccination 2
Any systemic AEs
Headache
Fatigue
Nausea or Vomiting
Malaise
Muscle Pain
Joint Pain
Elevated Temperature
Any local symptom
Pain
Tenderness
Erythema
Swelling
A
B
0% 20% 40% 60% 80% 100%
Grade 1 (Mild) Grade 2 (Moderate) Grade 3 (Severe) Grade 4 (Potentially-Life-Threatening)
A: BV2373 (5 µg) + MATRIX -M™ (50 µg) | B: Placebo

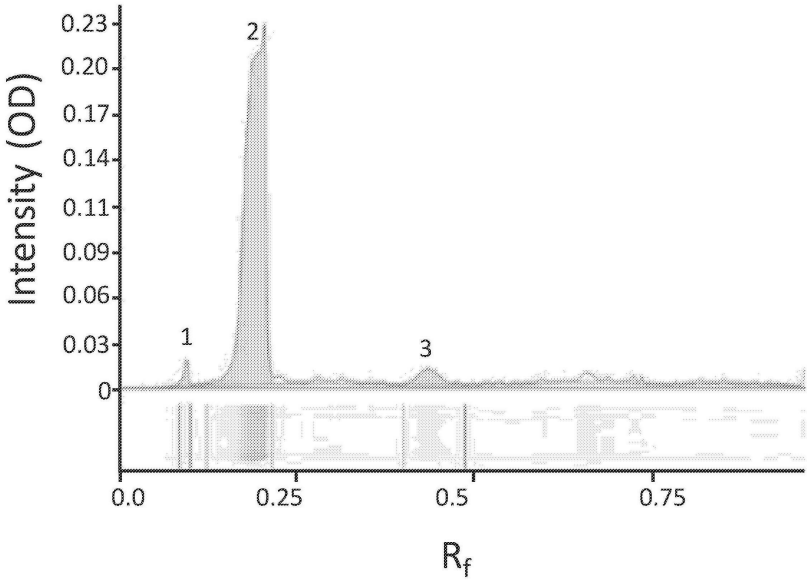
도면51


S1 Subunit
S2 Subunit
SP
NTD
RBD
SD1
SD2
FP
HR1
CH
HR2
TM
D80A
D215G
L242H
K417N
E484K
N501Y
D614G
682QQAQ685
A701V
K986P
V987P

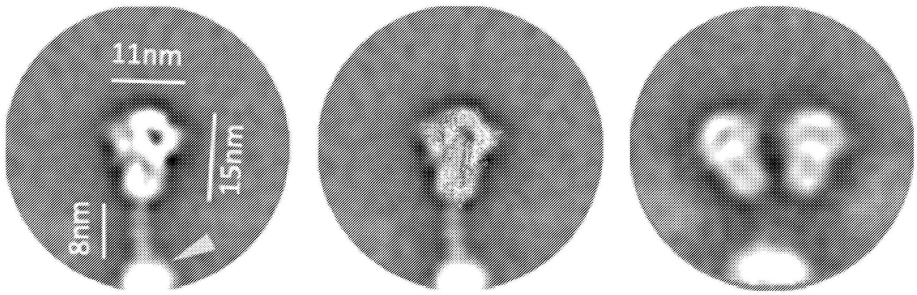
도면52a


kDA
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10

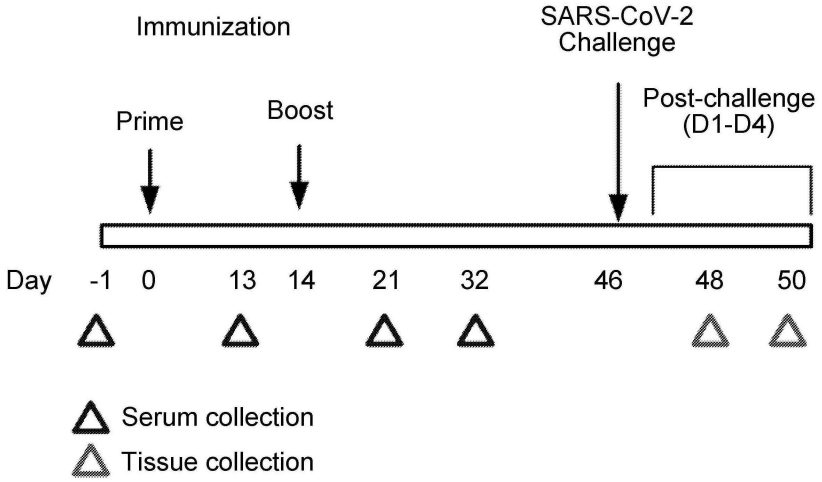
도면52b


Intensity (OD)
0.23
0.20
0.17
0.14
0.11
0.09
0.06
0.03
0
1
2
3
0.0
0.25
0.5
0.75
Rf

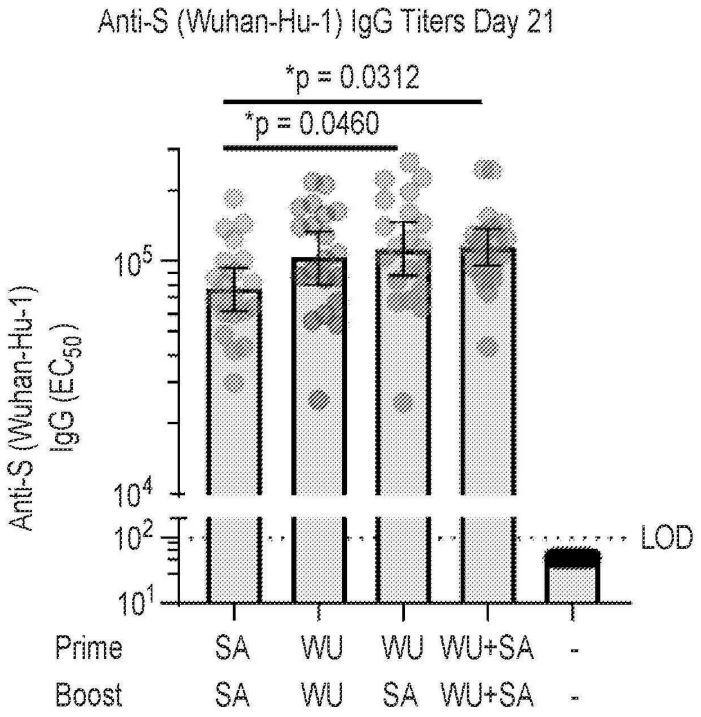
도면52c



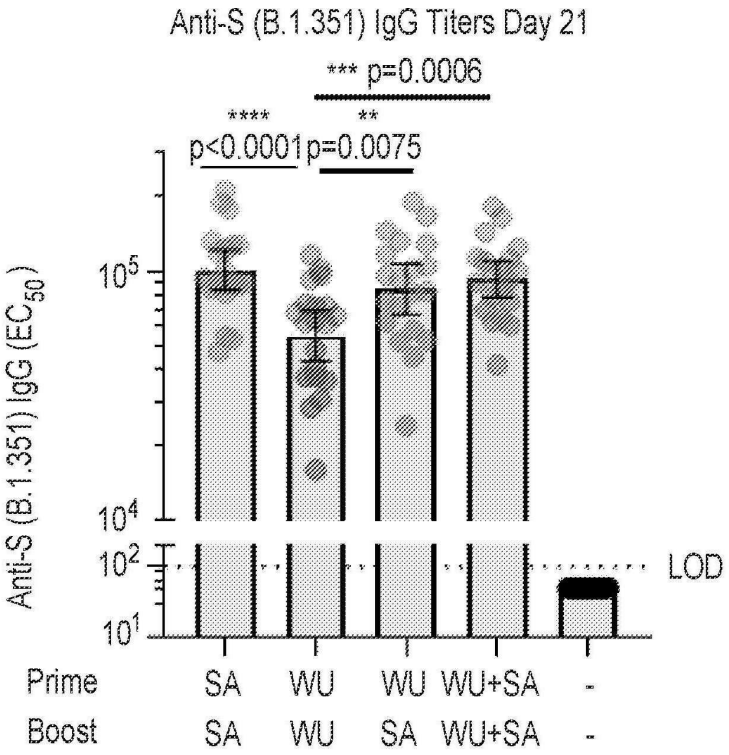
도면53



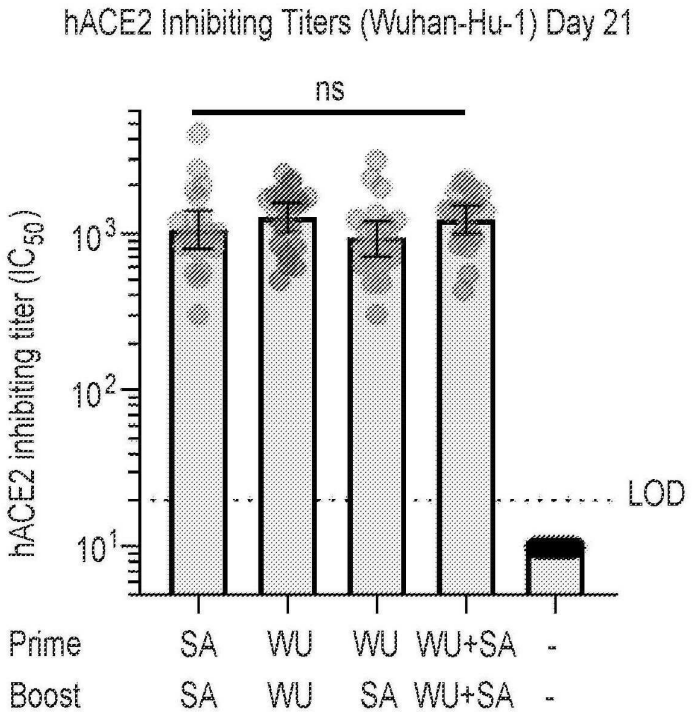
도면54a



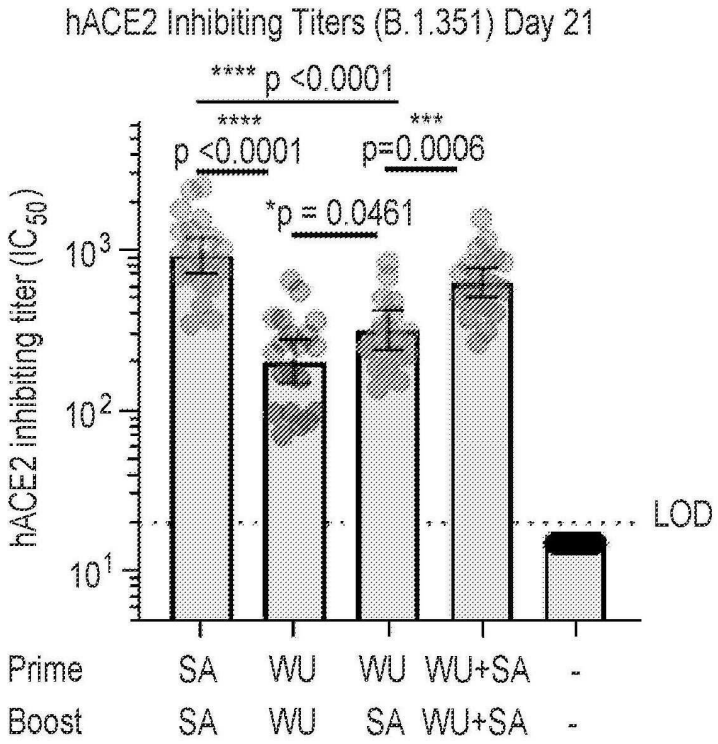
도면54b


Anti-S (B.1.351) IgG Titers Day 21
*** p=0.0006
****
**
p<0.0001
p=0.0075
Anti-S (B.1.351) IgG (EC50)
10^5
10^4
10^2
10^1
LOD
Prime SA WU WU WU+SA -
Boost SA WU SA WU+SA -

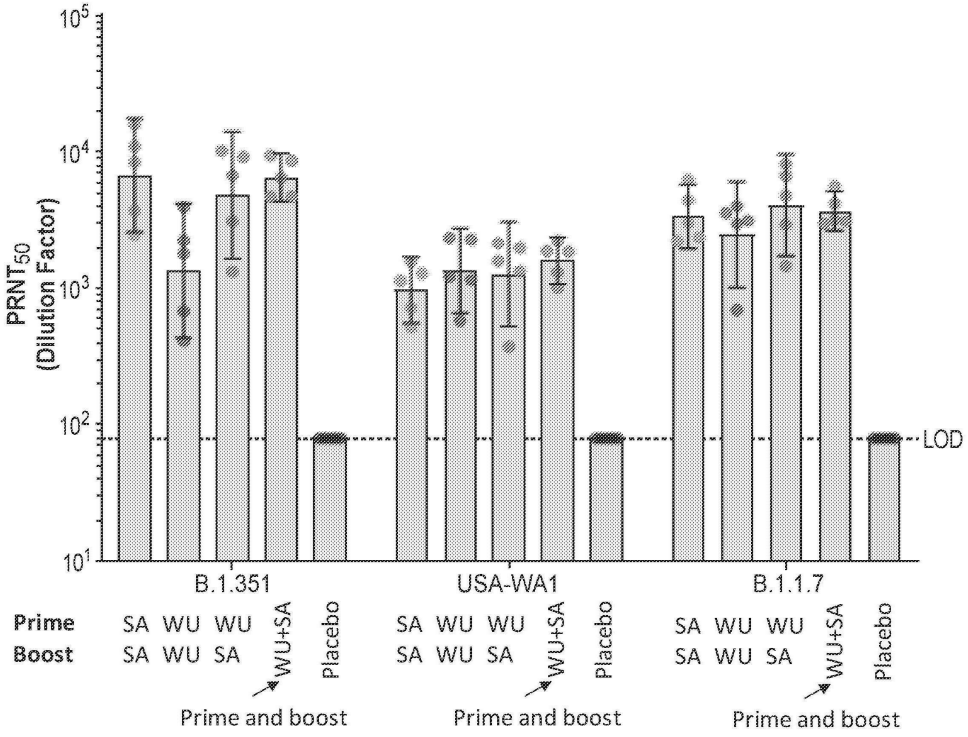
도면54c


hACE2 Inhibiting Titers (Wuhan-Hu-1) Day 21
ns
hACE2 inhibiting titer (IC50)
10^3
10^2
10^1
LOD
Prime SA WU WU WU+SA -
Boost SA WU SA WU+SA -

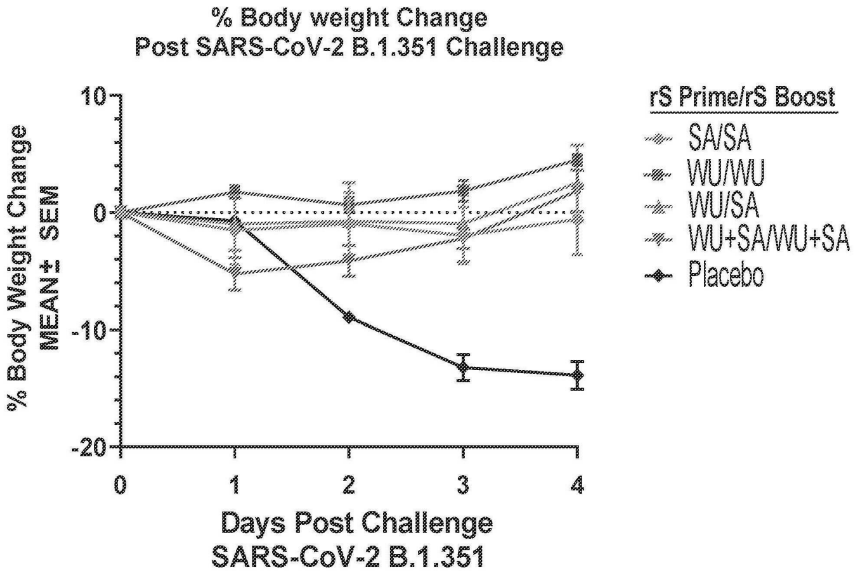
도면54d


hACE2 Inhibiting Titers (B.1.351) Day 21
**** p <0.0001
****
p <0.0001
***
p=0.0006
*p = 0.0461
hACE2 inhibiting titer (IC50)
10^3
10^2
10^1
LOD
Prime SA WU WU WU+SA -
Boost SA WU SA WU+SA -

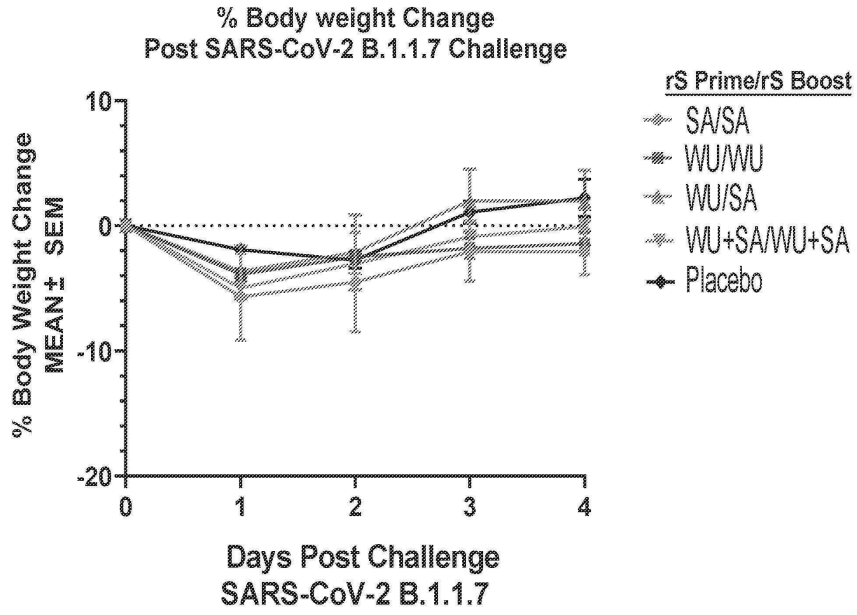
도면54e


PRNT50 (Dilution Factor)
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
LOD
B.1.351
USA-WA1
B.1.1.7
Prime SA WU WU WU+SA Placebo
Boost SA WU SA
Prime and boost

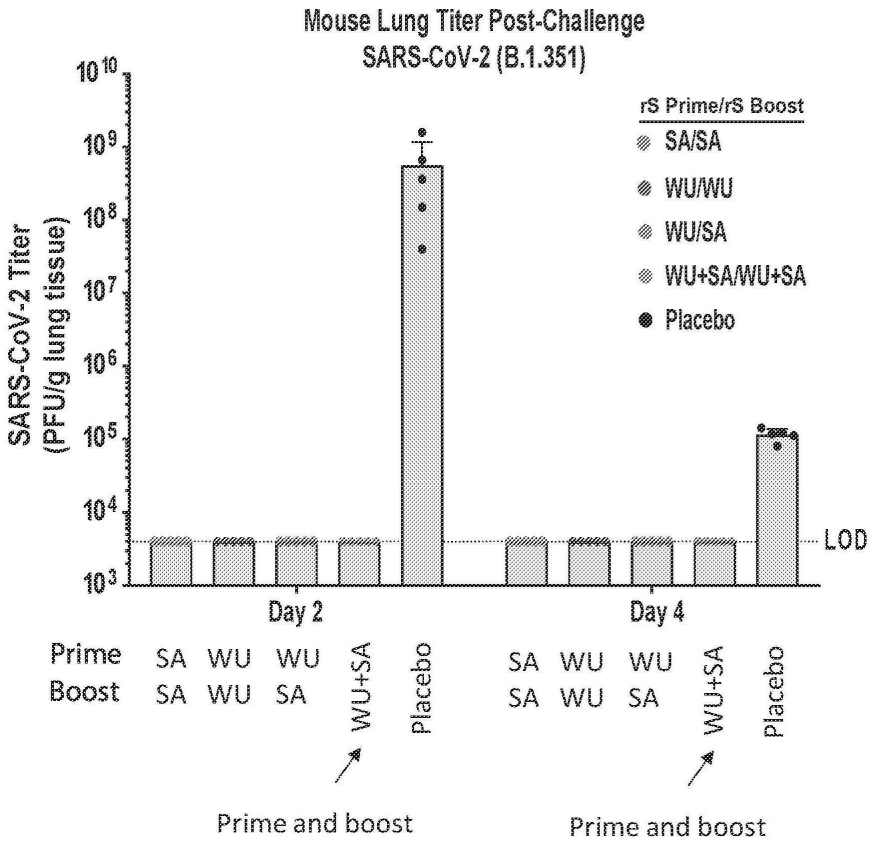
도면55a


% Body weight Change
Post SARS-CoV-2 B.1.351 Challenge
% Body Weight Change
MEAN ± SEM
10
0
-10
-20
0
1
2
3
4
Days Post Challenge
SARS-CoV-2 B.1.351
rS Prime/rS Boost
SA/SA
WU/WU
WU/SA
WU+SA/WU+SA
Placebo

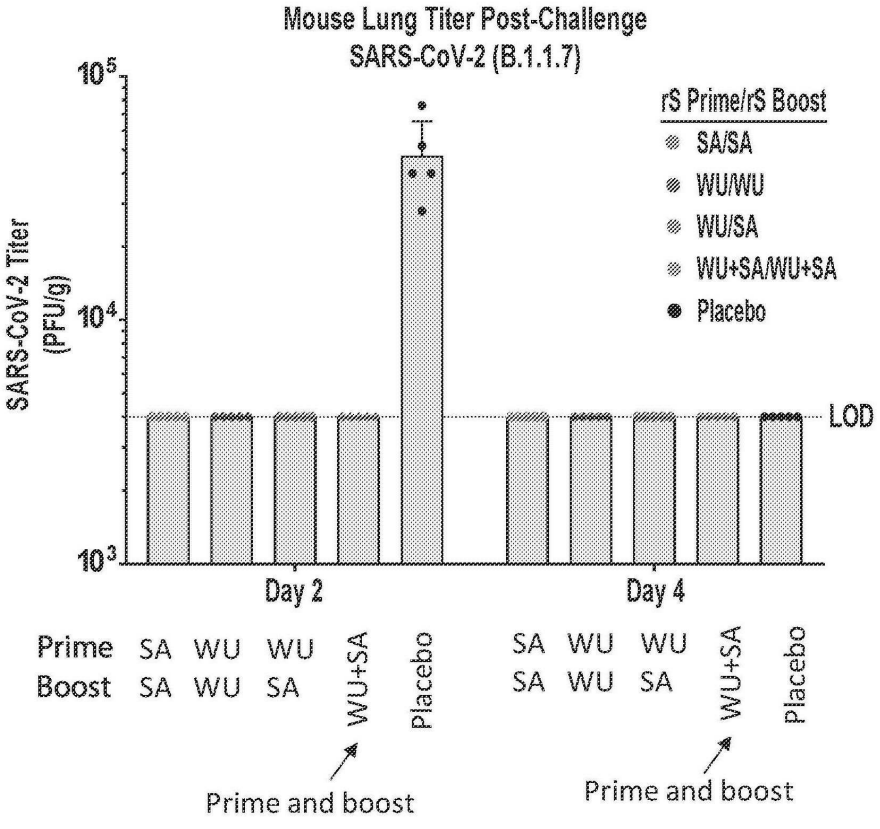
도면55b


% Body weight Change
Post SARS-CoV-2 B.1.1.7 Challenge
% Body Weight Change
MEAN ± SEM
10
0
-10
-20
0
1
2
3
4
Days Post Challenge
SARS-CoV-2 B.1.1.7
rS Prime/rS Boost
SA/SA
WU/WU
WU/SA
WU+SA/WU+SA
Placebo

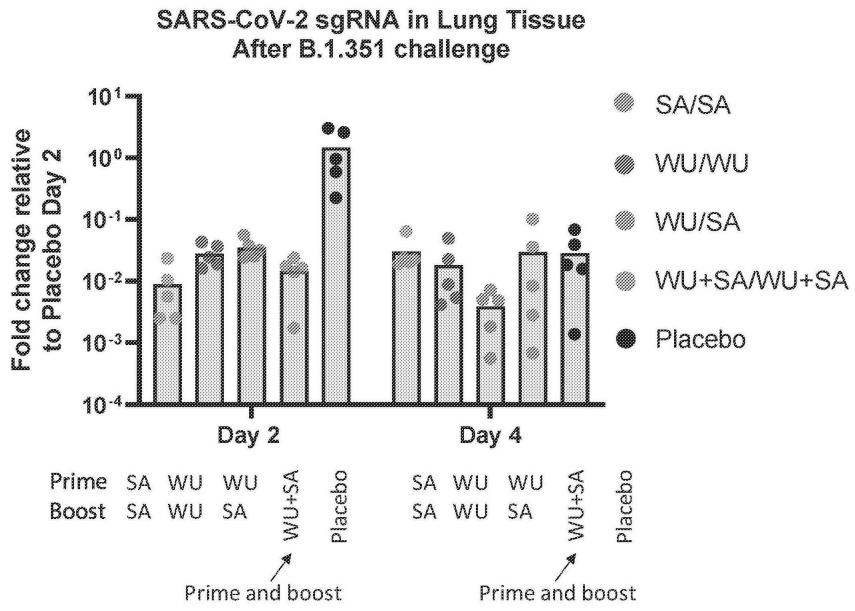
도면55c


Mouse Lung Titer Post-Challenge
SARS-CoV-2 (B.1.351)
SARS-CoV-2 Titer (PFU/g lung tissue)
rS Prime/rS Boost
SA/SA
WU/WU
WU/SA
WU+SA/WU+SA
Placebo
LOD
Day 2
Day 4
Prime SA WU WU WU+SA Placebo SA WU WU WU+SA Placebo
Boost SA WU SA SA WU SA
Prime and boost
Prime and boost

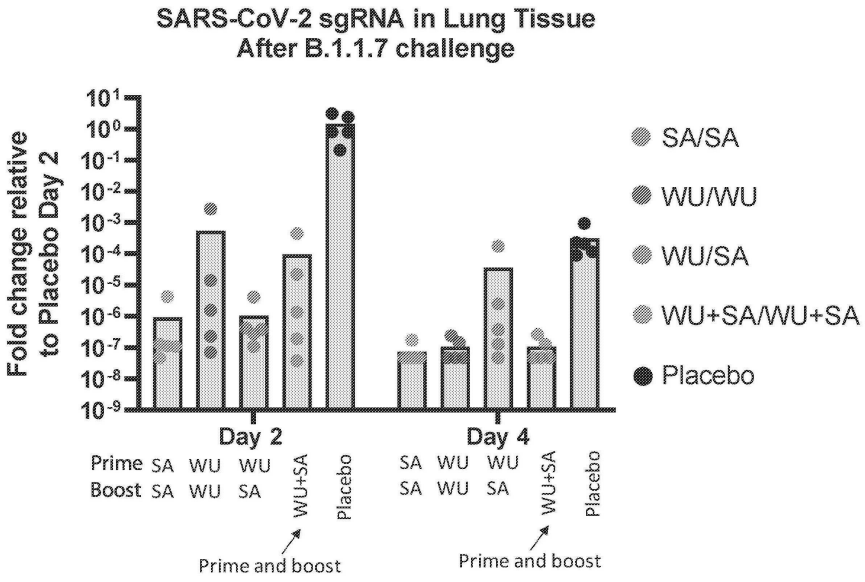
도면55d


Mouse Lung Titer Post-Challenge
SARS-CoV-2 (B.1.1.7)
SARS-CoV-2 Titer (PFU/g)
rS Prime/rS Boost
SA/SA
WU/WU
WU/SA
WU+SA/WU+SA
Placebo
LOD
Day 2
Day 4
Prime SA WU WU WU+SA Placebo SA WU WU WU+SA Placebo
Boost SA WU SA SA WU SA
Prime and boost
Prime and boost

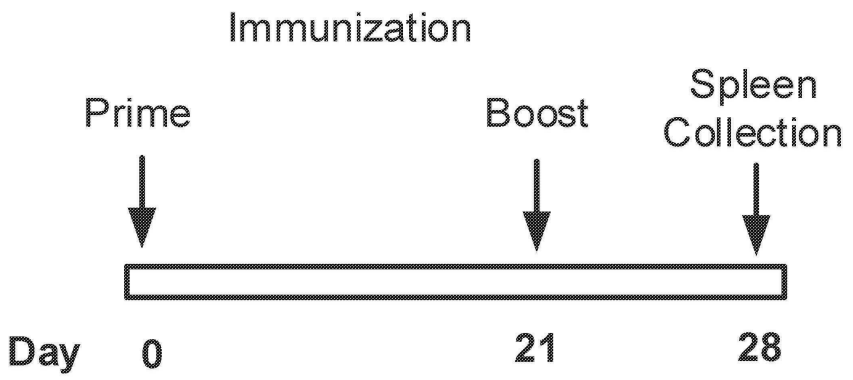
도면55e


SARS-CoV-2 sgRNA in Lung Tissue
After B.1.351 challenge
Fold change relative to Placebo Day 2
SA/SA
WU/WU
WU/SA
WU+SA/WU+SA
Placebo
Day 2
Day 4
Prime SA WU WU WU+SA Placebo SA WU WU WU+SA Placebo
Boost SA WU SA SA WU SA
Prime and boost
Prime and boost

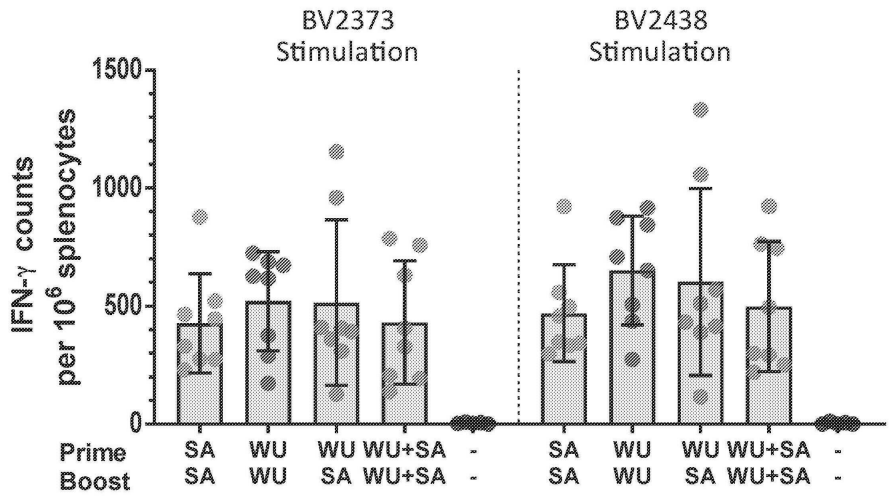
도면55f


SARS-CoV-2 sgRNA in Lung Tissue
After B.1.1.7 challenge
Fold change relative to Placebo Day 2
SA/SA
WU/WU
WU/SA
WU+SA/WU+SA
Placebo
Day 2
Day 4
Prime SA WU WU WU+SA Placebo SA WU WU WU+SA Placebo
Boost SA WU SA SA WU SA
Prime and boost
Prime and boost

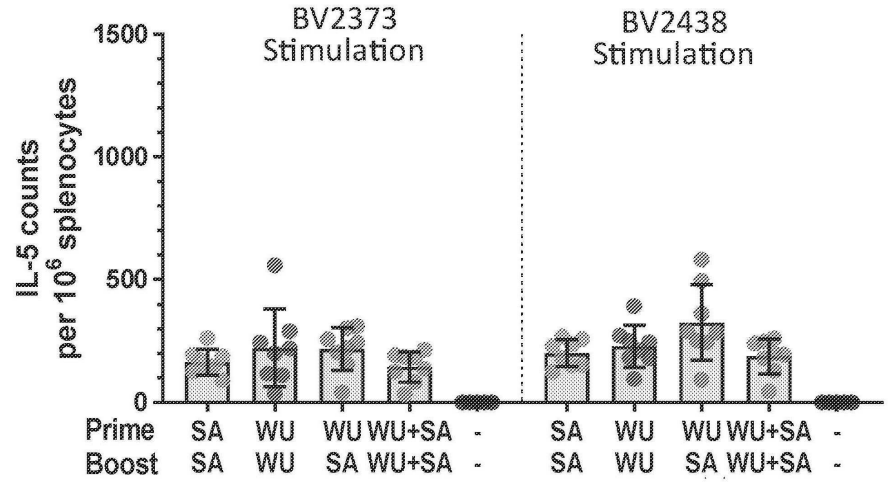
도면56a



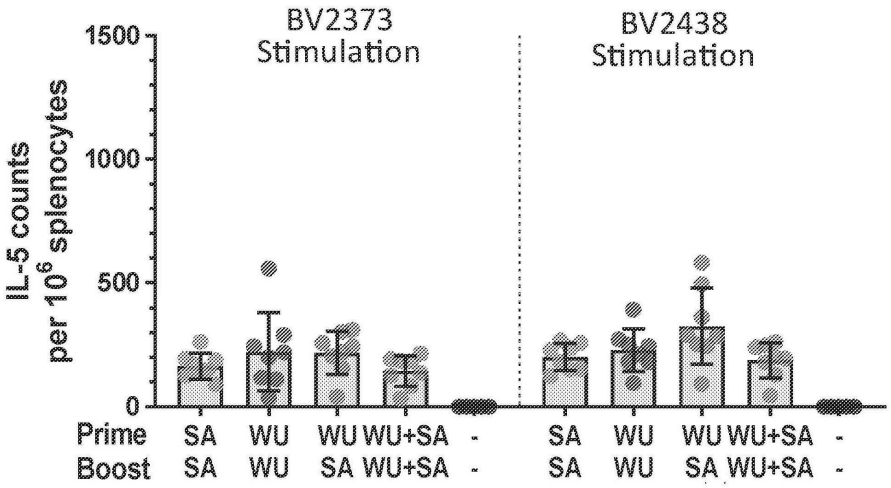
도면56b



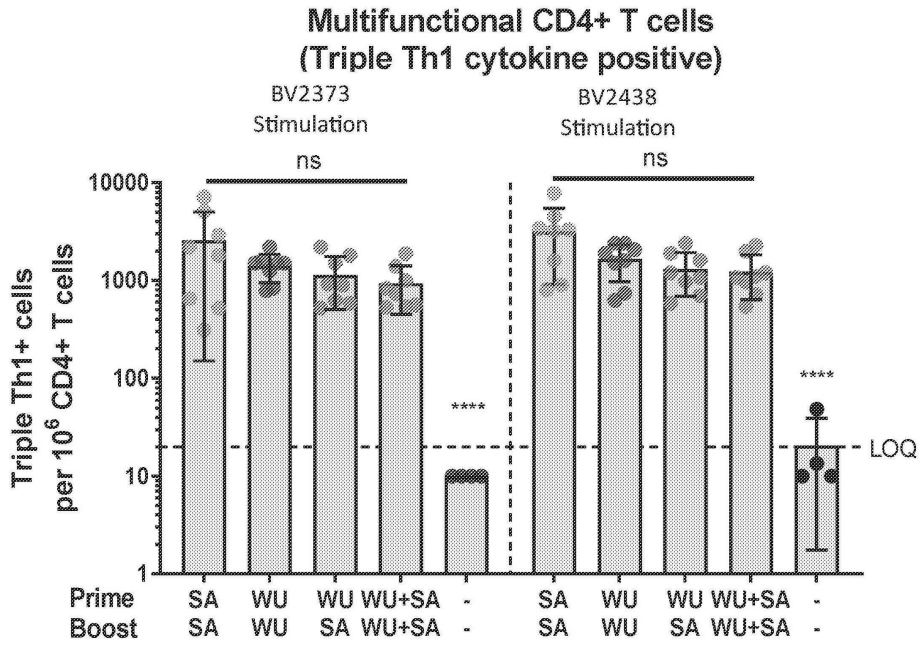
도면56c



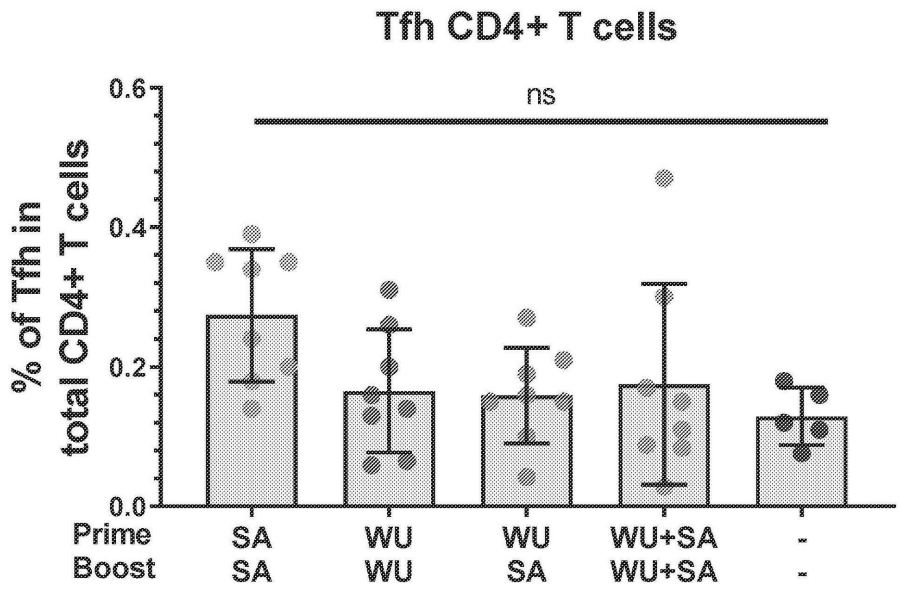
도면56d


BV2373
Stimulation
BV2438
Stimulation
IL-5 counts
per 10^6 splenocytes
1500
1000
500
0
Prime SA WU WU WU+SA - SA WU WU WU+SA -
Boost SA WU SA WU+SA - SA WU SA WU+SA -

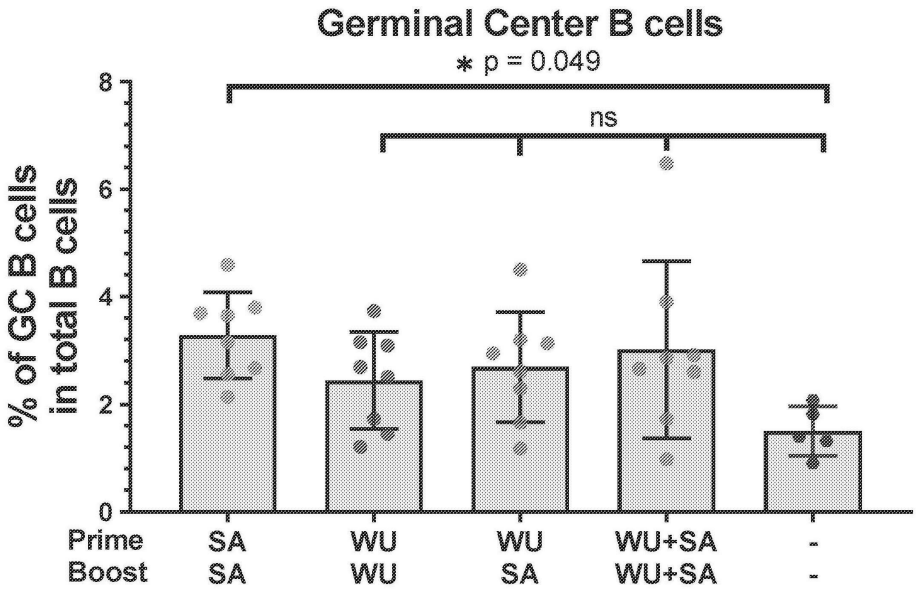
도면56e


Multifunctional CD4+ T cells
(Triple Th1 cytokine positive)
BV2373
Stimulation
BV2438
Stimulation
ns
ns
Triple Th1+ cells
per 10^6 CD4+ T cells
10000
1000
100
10
1
****
****
LOQ
Prime SA WU WU WU+SA - SA WU WU WU+SA -
Boost SA WU SA WU+SA - SA WU SA WU+SA -

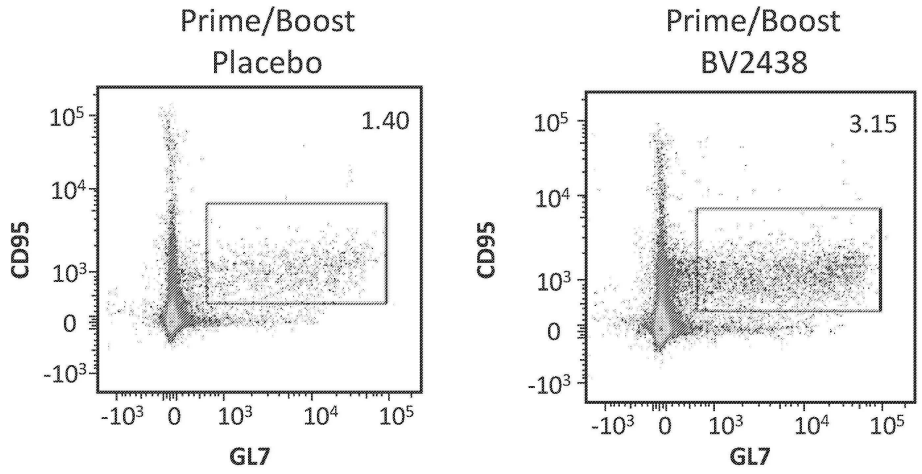
도면56f


Tfh CD4+ T cells
ns
% of Tfh in total CD4+ T cells
0.6
0.4
0.2
0.0
Prime
Boost
SA
SA
WU
WU
WU
SA
WU+SA
WU+SA
-
-

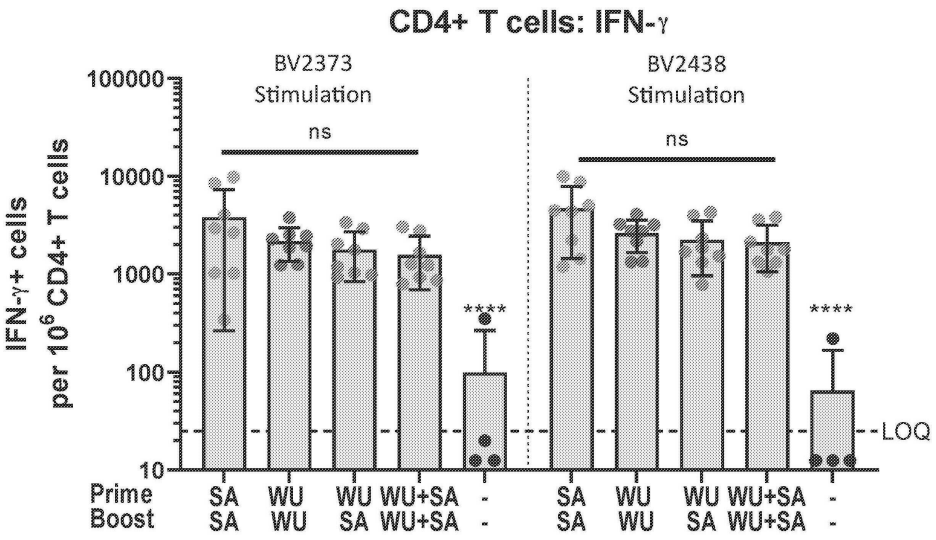
도면56g


Germinal Center B cells
* p = 0.049
ns
% of GC B cells in total B cells
8
6
4
2
0
Prime
Boost
SA
SA
WU
WU
WU
SA
WU+SA
WU+SA
-
-

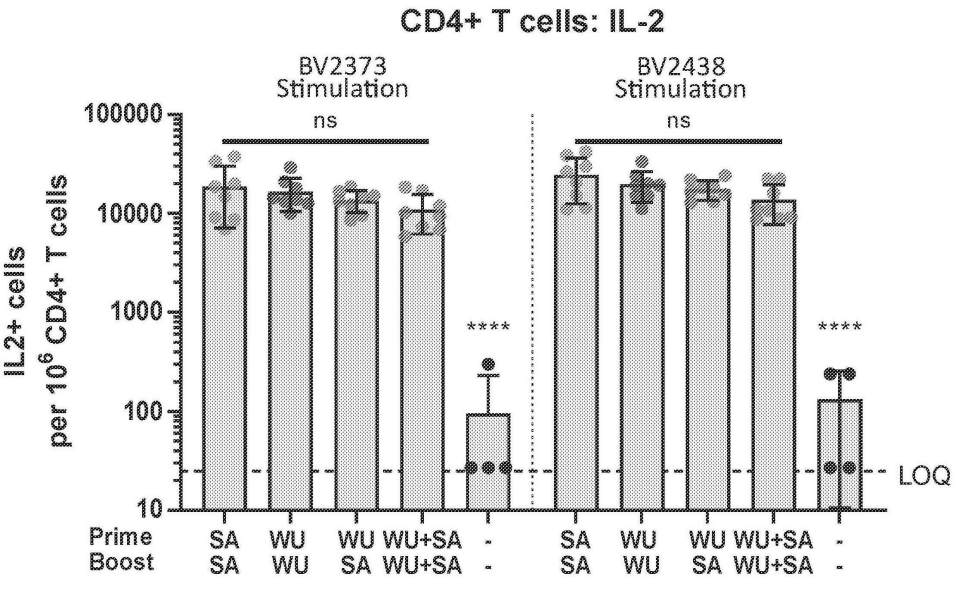
도면56h



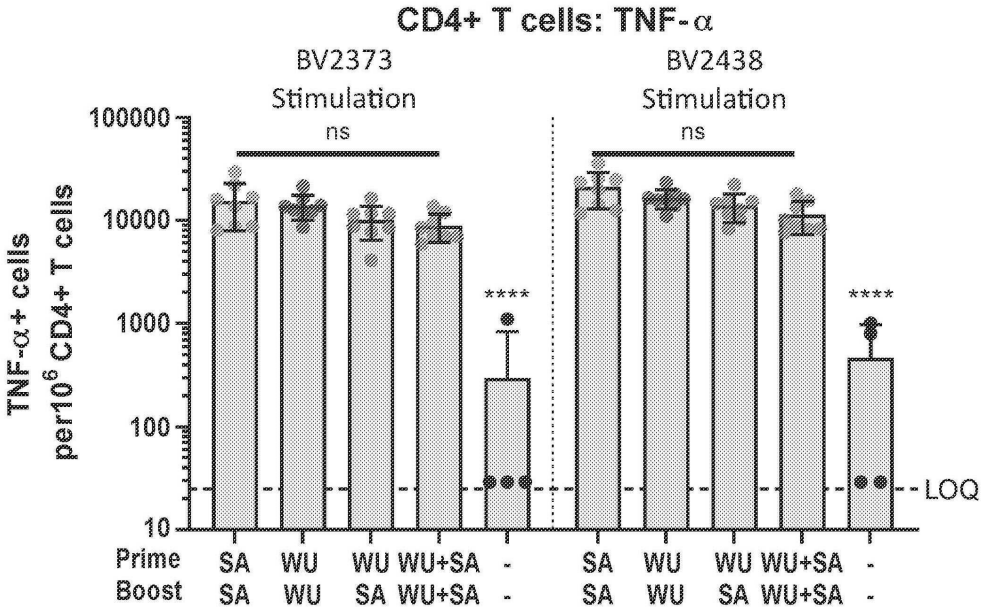
도면57a



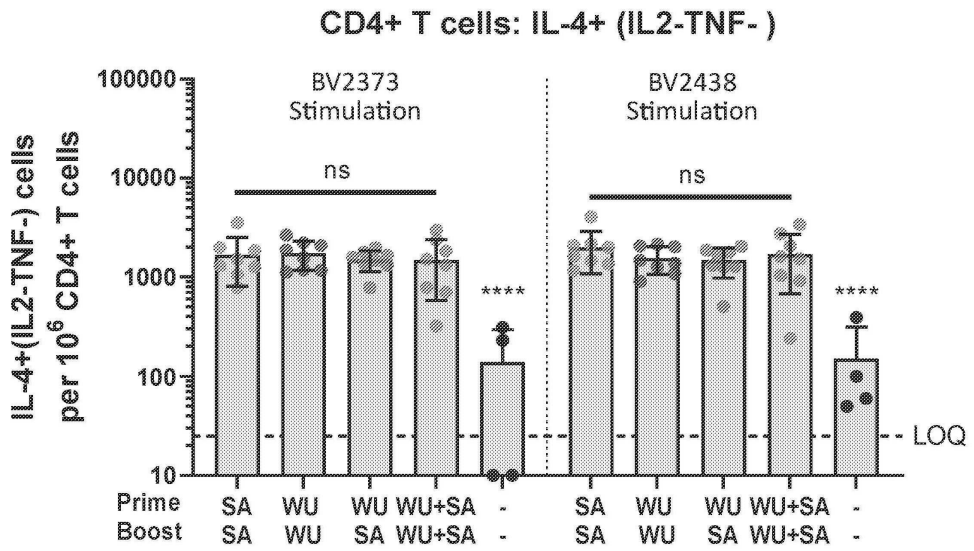
도면57b



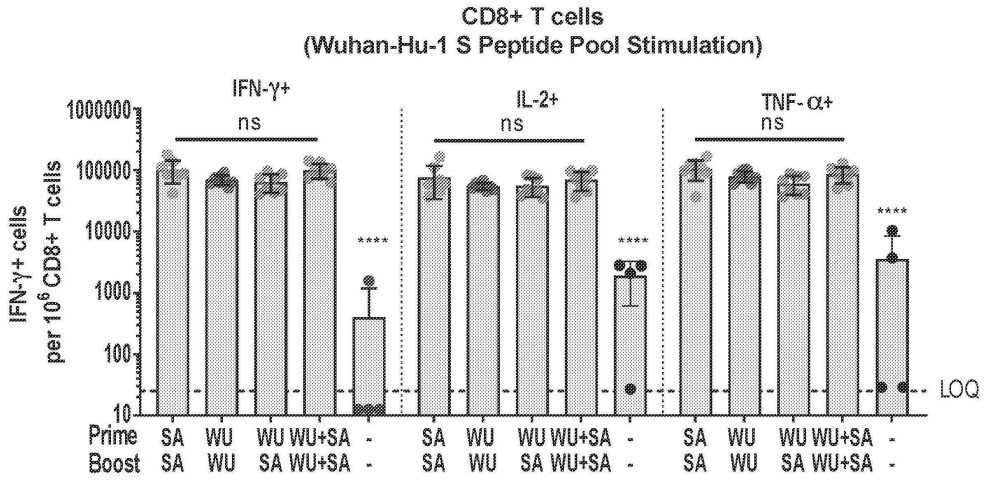
도면57c


CD4+ T cells: TNF-α
BV2373
Stimulation
BV2438
Stimulation
ns
ns
****
****
LOQ
TNF-α+ cells
per10^6 CD4+ T cells
100000
10000
1000
100
10
Prime
Boost
SA
WU
WU
WU+SA
-
SA
WU
SA
WU+SA
-

도면57d


CD4+ T cells: IL-4+ (IL2-TNF-)
BV2373
Stimulation
BV2438
Stimulation
ns
ns
****
****
LOQ
IL-4+(IL2-TNF-) cells
per 10^6 CD4+ T cells
100000
10000
1000
100
10
Prime
Boost
SA
WU
WU
WU+SA
-
SA
WU
SA
WU+SA
-

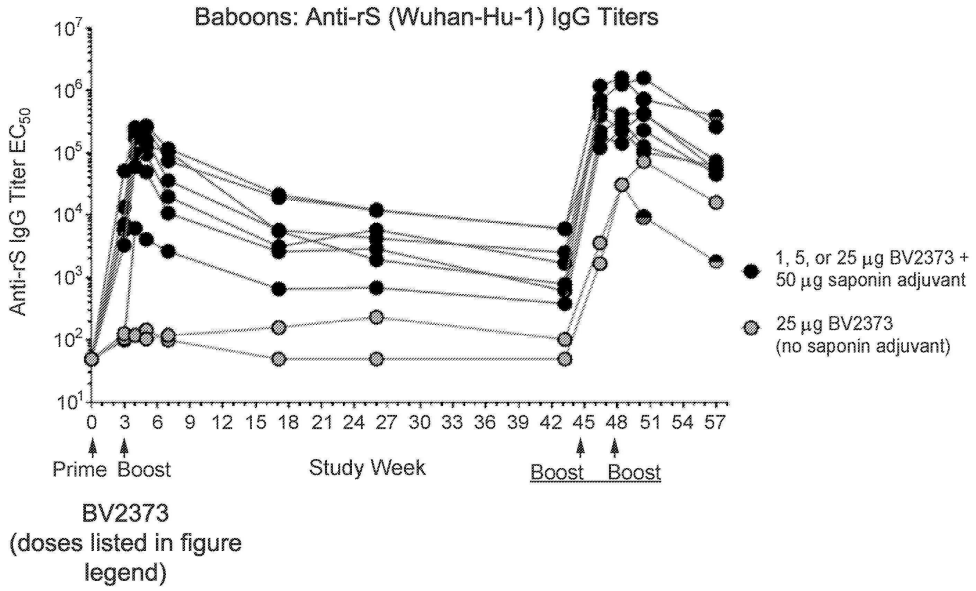
도면57e



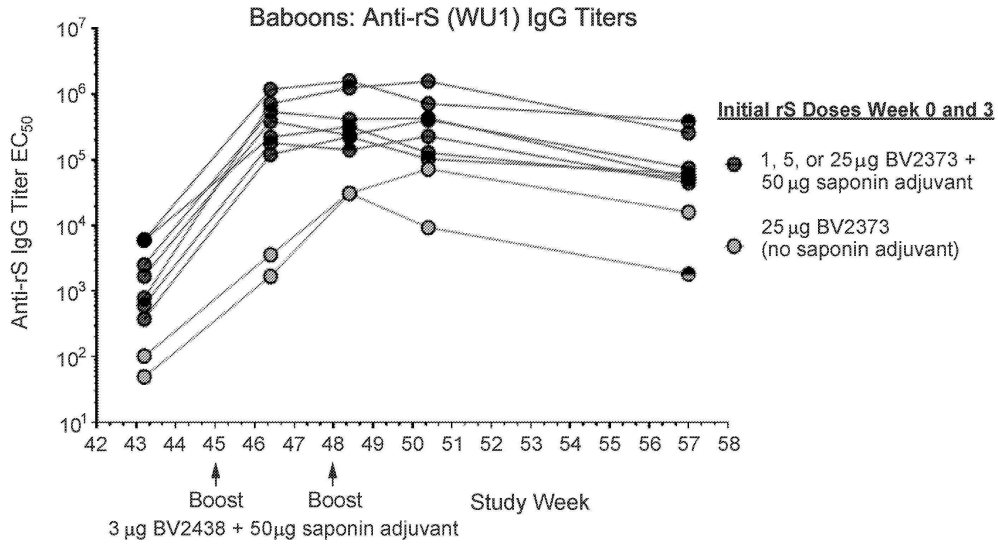
도면58a



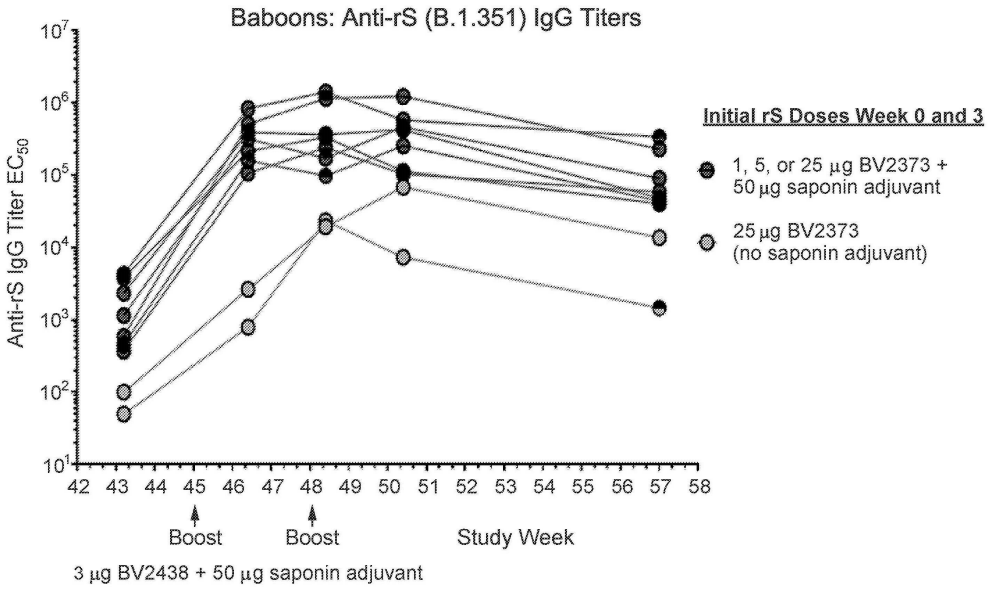
도면58b



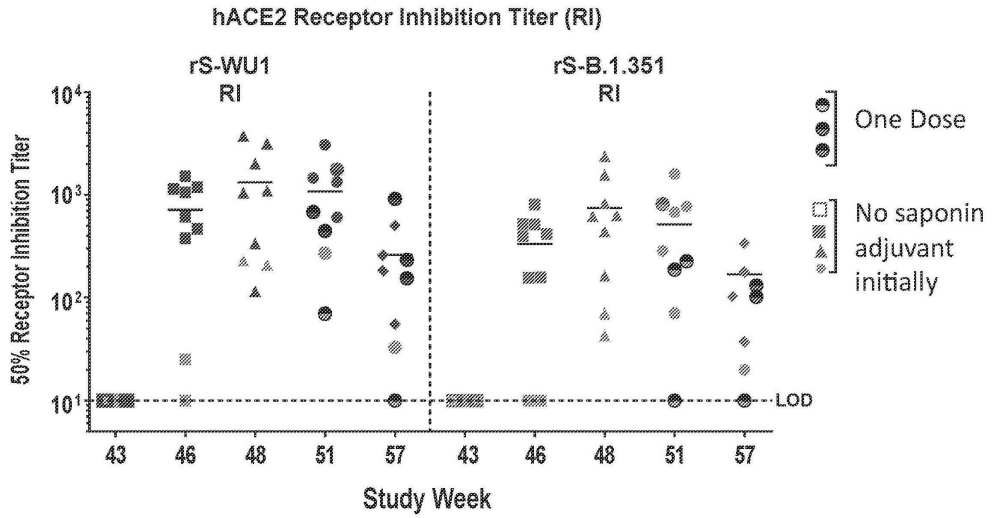
도면58c


Baboons: Anti-rS (WU1) IgG Titers
Anti-rS IgG Titer EC50
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58
Boost
Boost
Study Week
3 μg BV2438 + 50μg saponin adjuvant
Initial rS Doses Week 0 and 3
1, 5, or 25μg BV2373 + 50 μg saponin adjuvant
25 μg BV2373 (no saponin adjuvant)

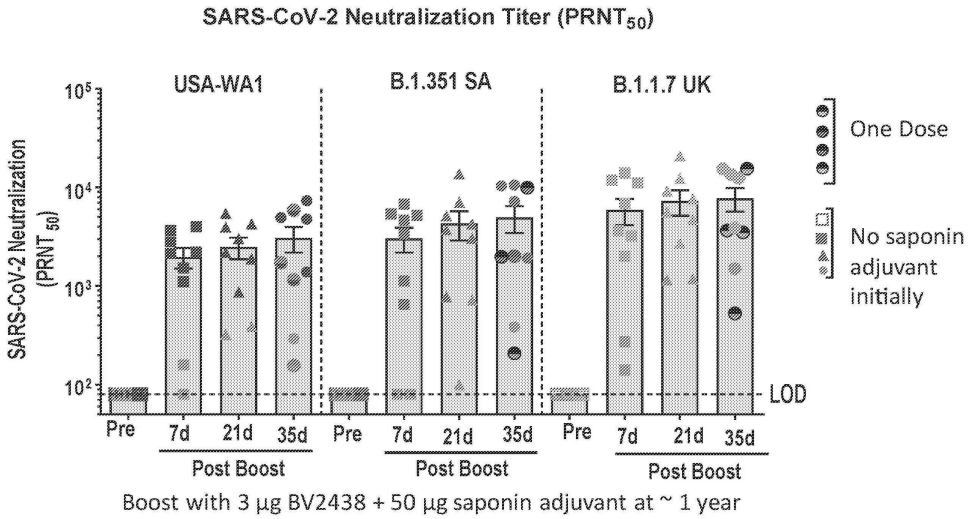
도면58d


Baboons: Anti-rS (B.1.351) IgG Titers
Anti-rS IgG Titer EC50
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58
Boost
Boost
Study Week
3 μg BV2438 + 50 μg saponin adjuvant
Initial rS Doses Week 0 and 3
1, 5, or 25 μg BV2373 + 50 μg saponin adjuvant
25 μg BV2373 (no saponin adjuvant)

도면58e

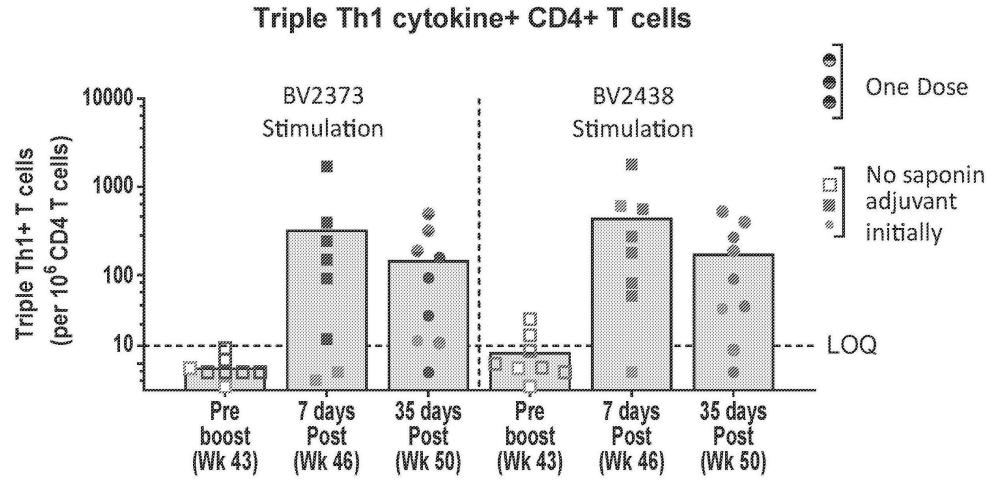


도면58f



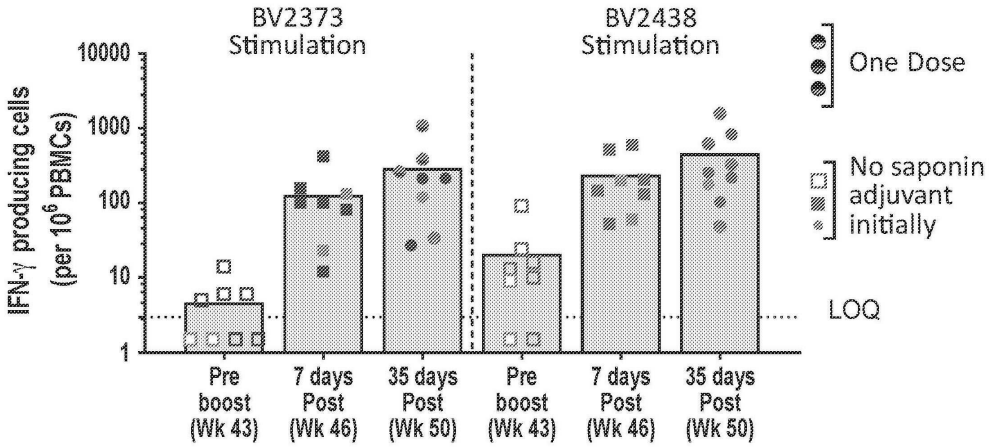
Boost with 3 μg BV2438 + 50 μg saponin adjuvant at ~ 1 year

도면58g



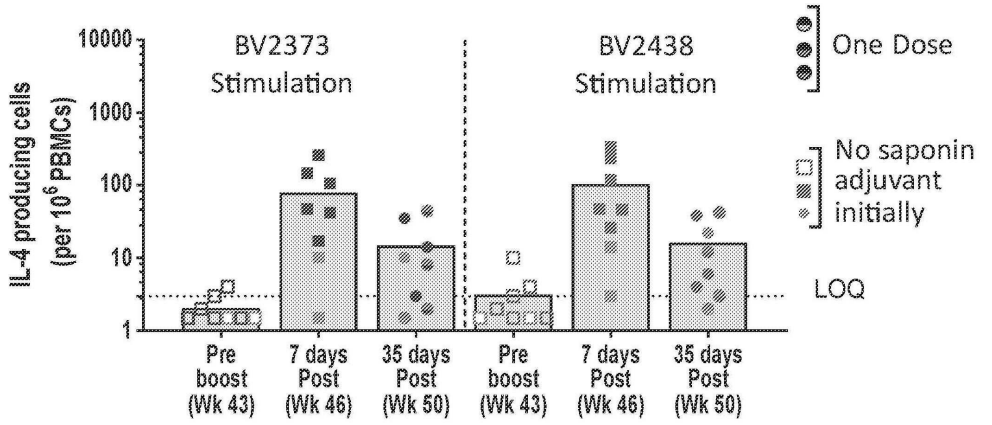
Boost with 3 μg BV2438 + 50 μg saponin adjuvant at ~ 1 year

도면59a



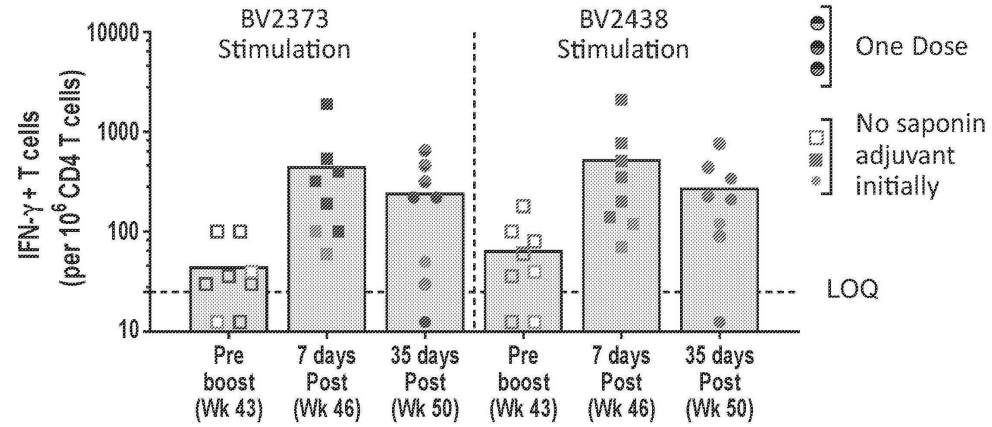
Boost with 3 µg BV2438 + 50 µg saponin adjuvant at ~ 1 year

도면59b



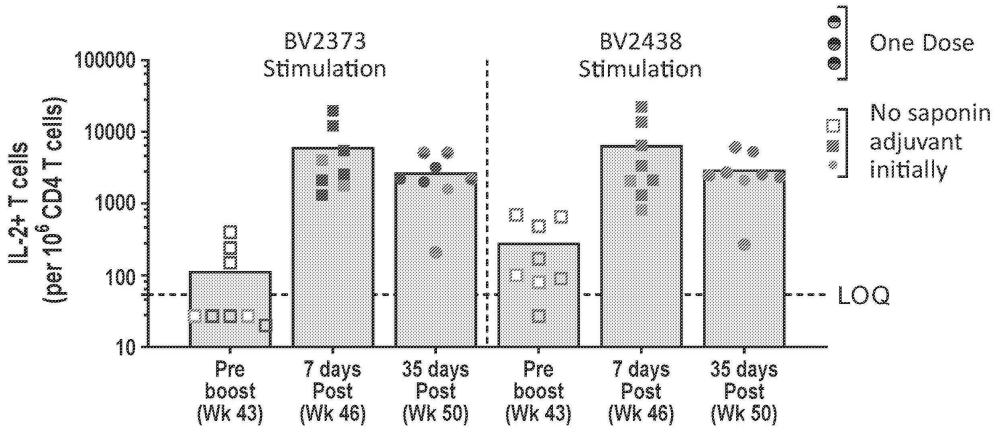
Boost with 3 µg BV2438 + 50 µg saponin adjuvant at ~ 1 year

도면59c



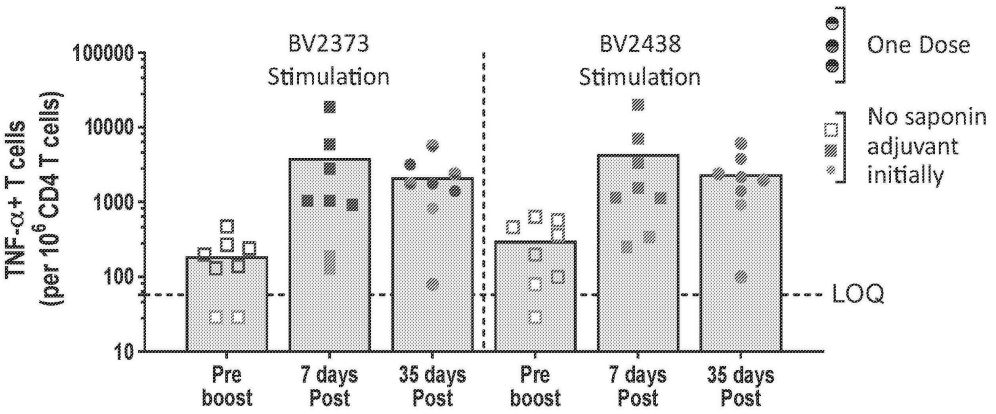
Boost with 3 µg BV2438 + 50 µg saponin adjuvant at ~ 1 year

도면59d



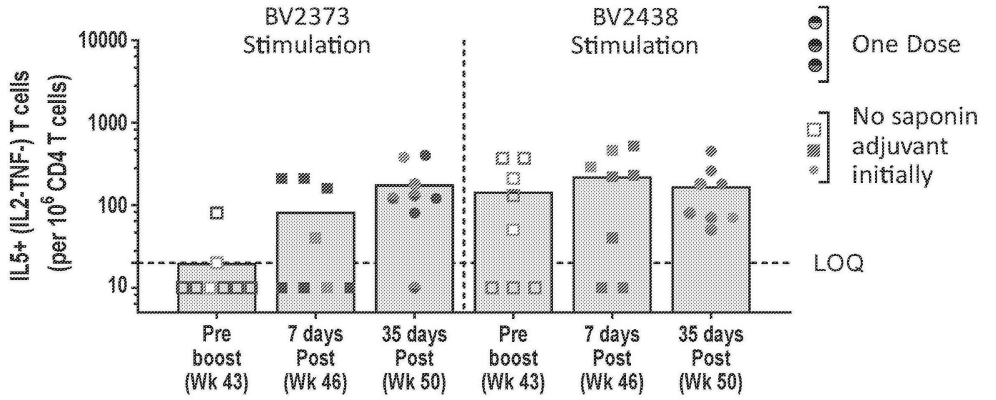
Boost with 3 μg BV2438 + 50 μg saponin adjuvant at ~ 1 year

도면59e



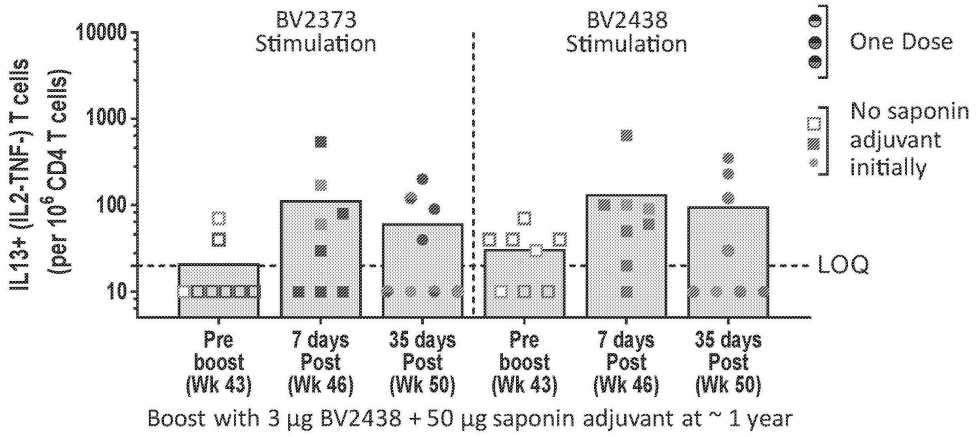
Boost with 3 μg BV2438 + 50 μg saponin adjuvant at ~ 1 year

도면59f

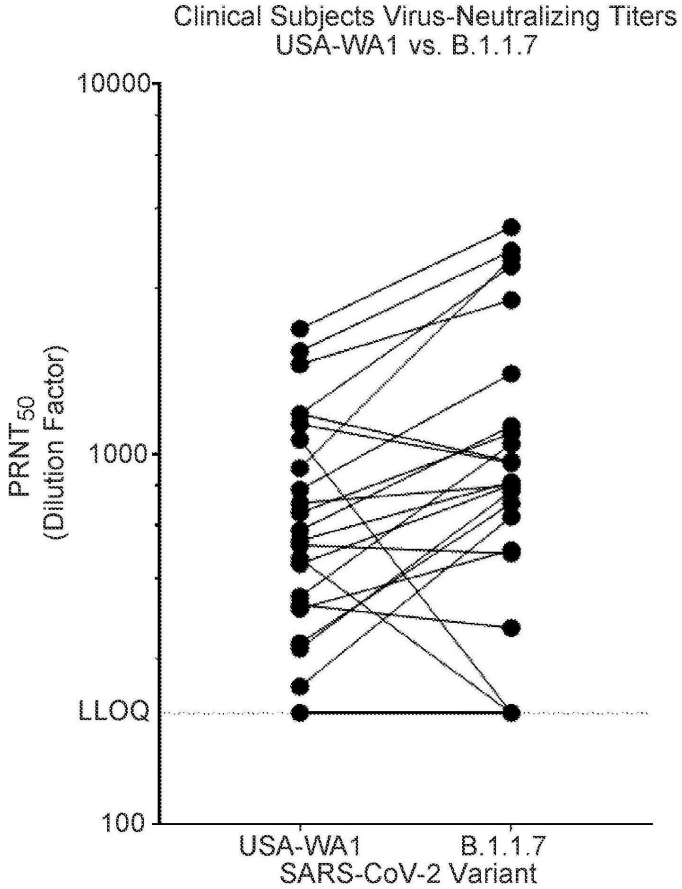


Boost with 3 μg BV2438 + 50 μg saponin adjuvant at ~ 1 year

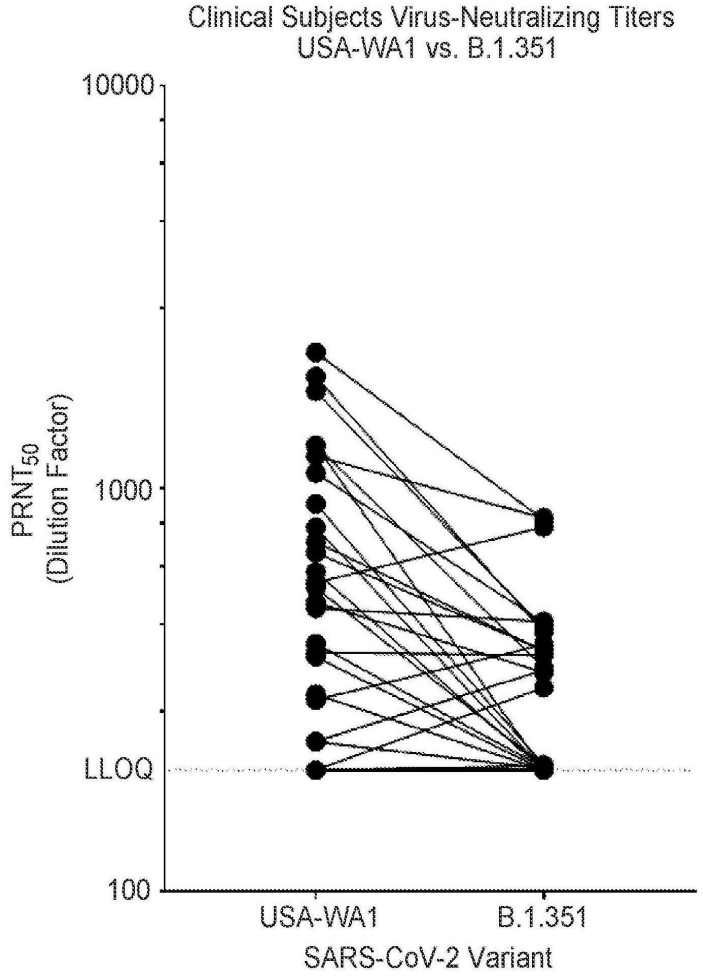
도면59g


BV2373
Stimulation
BV2438
Stimulation
One Dose
No saponin
adjuvant
initially
IL13+ (IL2-TNF-) T cells
(per 10^6 CD4 T cells)
10000
1000
100
10
LOQ
Pre
boost
(Wk 43)
7 days
Post
(Wk 46)
35 days
Post
(Wk 50)
Pre
boost
(Wk 43)
7 days
Post
(Wk 46)
35 days
Post
(Wk 50)
Boost with 3 µg BV2438 + 50 µg saponin adjuvant at ~ 1 year

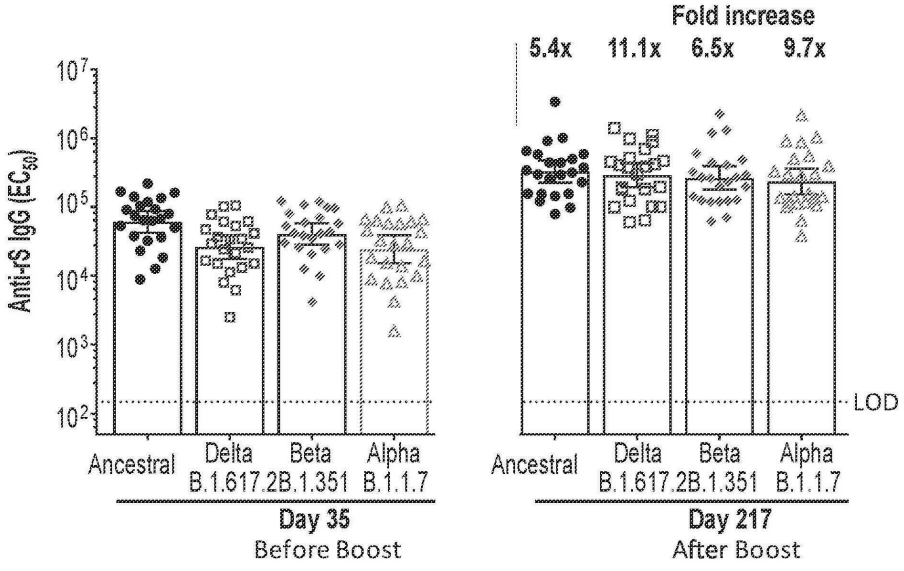
도면60a


Clinical Subjects Virus-Neutralizing Titers
USA-WA1 vs. B.1.1.7
10000
1000
LLOQ
100
PRNT50
(Dilution Factor)
USA-WA1
B.1.1.7
SARS-CoV-2 Variant

도면60b

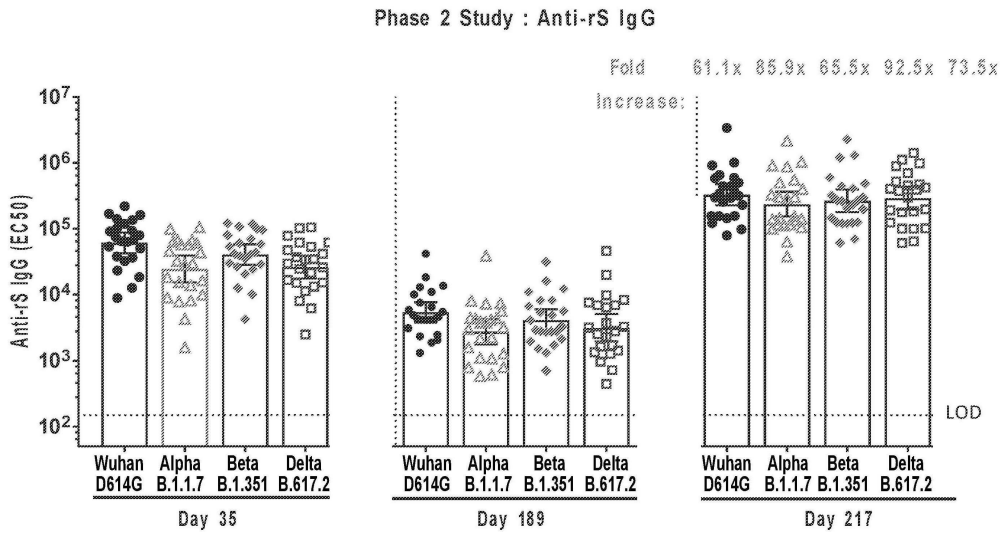


도면61a

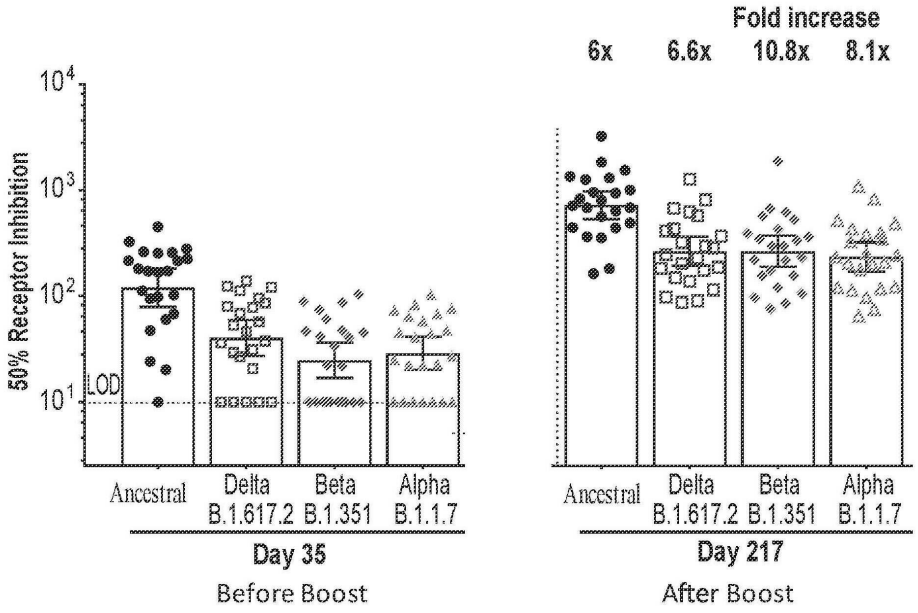


Anti-rS IgG = anti-recombinant spike immunoglobulin G antibody

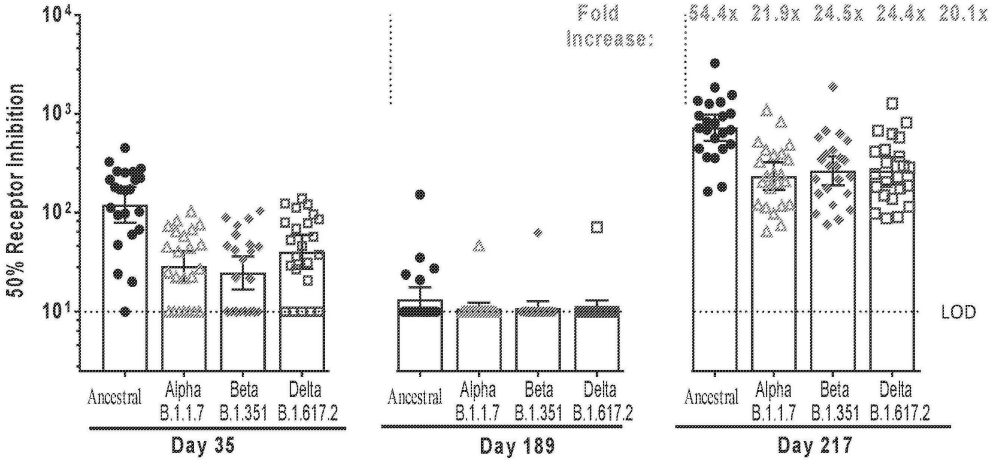
도면61b


Phase 2 Study : Anti-rS IgG
Fold Increase:
61.1x 85.9x 65.5x 92.5x 73.5x
Anti-rS IgG (EC50)
LOD
Wuhan D614G
Alpha B.1.1.7
Beta B.1.351
Delta B.617.2
Day 35
Day 189
Day 217

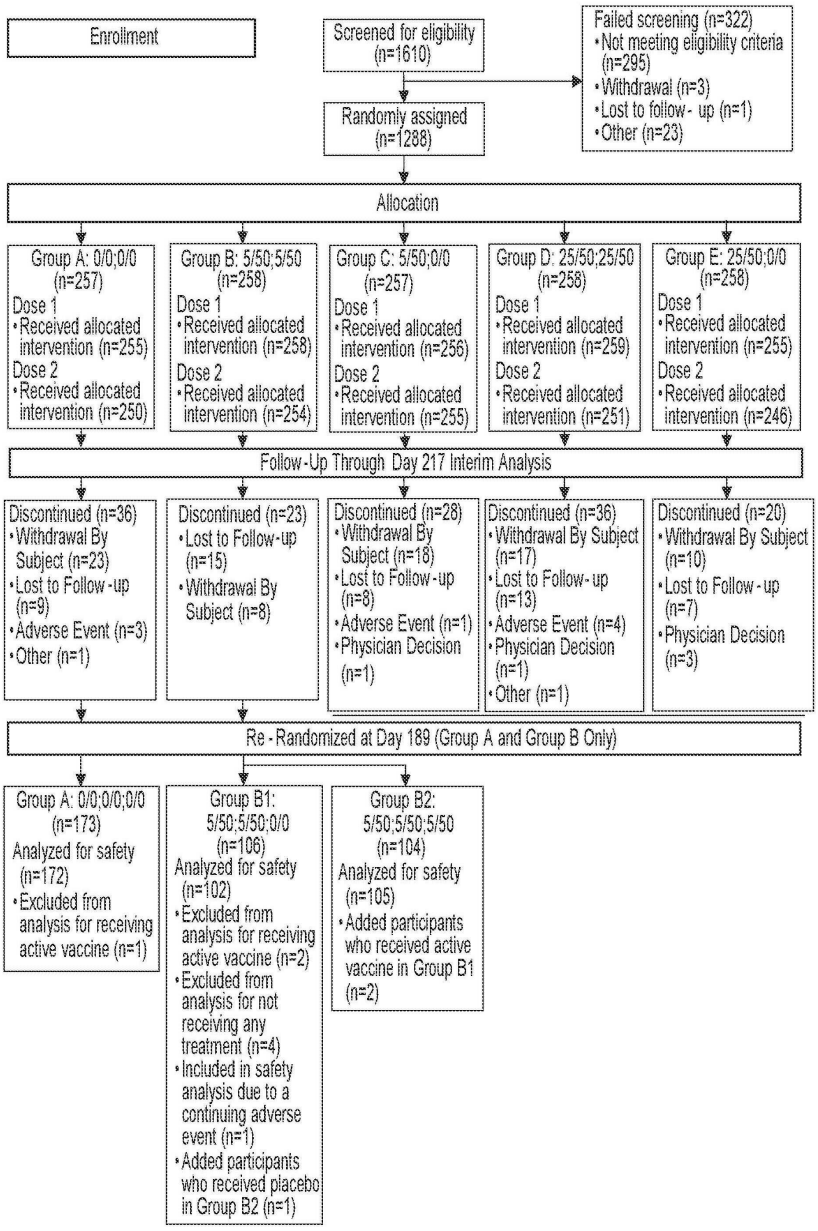
도면62a


Fold increase
6x 6.6x 10.8x 8.1x
50% Receptor Inhibition
LOD
Ancestral
Delta B.1.617.2
Beta B.1.351
Alpha B.1.1.7
Day 35
Before Boost
Day 217
After Boost

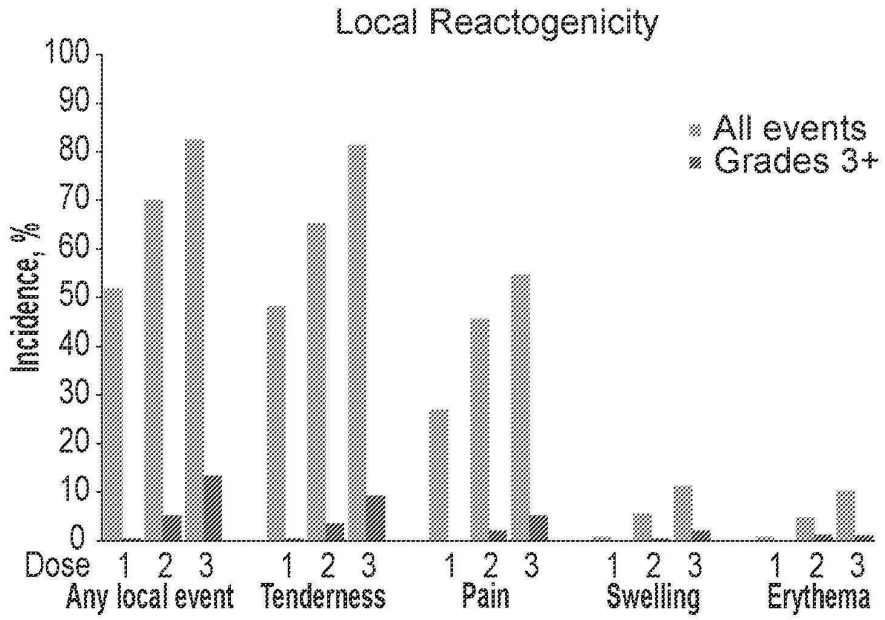
도면62b


50% Receptor Inhibition
Fold Increase:
54.4x 21.9x 24.5x 24.4x 20.1x
LOD
Ancestral
Alpha B.1.1.7
Beta B.1.351
Delta B.1.617.2
Day 35
Day 189
Day 217

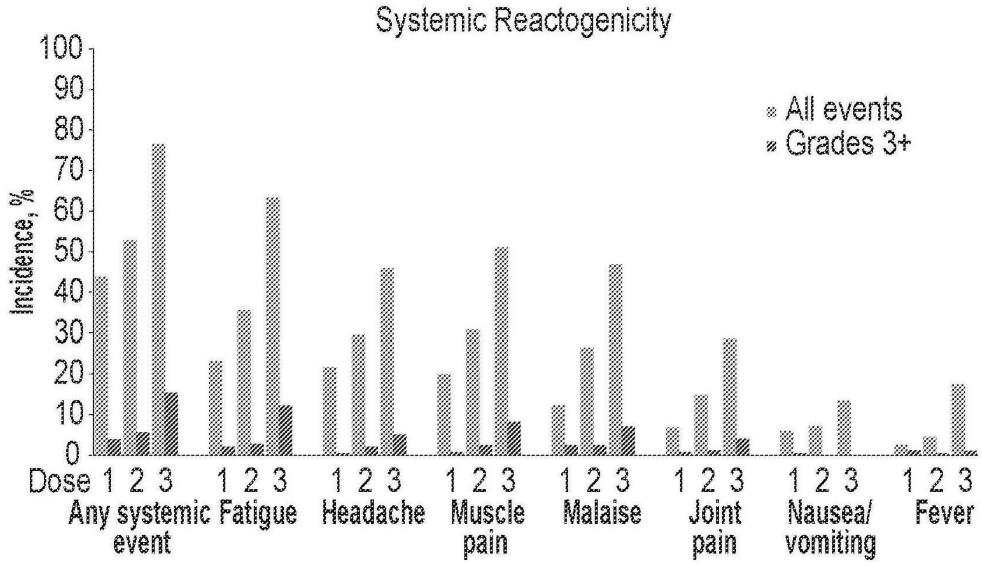
도면63


Enrollment
Screened for eligibility (n=1610)
Failed screening (n=322)
•Not meeting eligibility criteria (n=295)
•Withdrawal (n=3)
•Lost to follow- up (n=1)
•Other (n=23)
Randomly assigned (n=1288)
Allocation
Group A: 0/0;0/0 (n=257)
Dose 1
•Received allocated intervention (n=255)
Dose 2
•Received allocated intervention (n=250)
Group B: 5/50;5/50 (n=258)
Dose 1
•Received allocated intervention (n=258)
Dose 2
•Received allocated intervention (n=254)
Group C: 5/50;0/0 (n=257)
Dose 1
•Received allocated intervention (n=256)
Dose 2
•Received allocated intervention (n=255)
Group D: 25/50;25/50 (n=258)
Dose 1
•Received allocated intervention (n=259)
Dose 2
•Received allocated intervention (n=251)
Group E: 25/50;0/0 (n=258)
Dose 1
•Received allocated intervention (n=255)
Dose 2
•Received allocated intervention (n=246)
Follow-Up Through Day 217 Interim Analysis
Discontinued (n=36)
•Withdrawal By Subject (n=23)
•Lost to Follow-up (n=9)
•Adverse Event (n=3)
•Other (n=1)
Discontinued (n=23)
•Lost to Follow-up (n=15)
•Withdrawal By Subject (n=8)
Discontinued (n=28)
•Withdrawal By Subject (n=18)
•Lost to Follow-up (n=8)
•Adverse Event (n=1)
•Physician Decision (n=1)
Discontinued (n=36)
•Withdrawal By Subject (n=17)
•Lost to Follow-up (n=13)
•Adverse Event (n=4)
•Physician Decision (n=1)
•Other (n=1)
Discontinued (n=20)
•Withdrawal By Subject (n=10)
•Lost to Follow-up (n=7)
•Physician Decision (n=3)
Re-Randomized at Day 189 (Group A and Group B Only)
Group A: 0/0;0/0;0/0 (n=173)
Analyzed for safety (n=172)
•Excluded from analysis for receiving active vaccine (n=1)
Group B1: 5/50;5/50;0/0 (n=106)
Analyzed for safety (n=102)
•Excluded from analysis for receiving active vaccine (n=2)
•Excluded from analysis for not receiving any treatment (n=4)
•Included in safety analysis due to a continuing adverse event (n=1)
•Added participants who received placebo in Group B2 (n=1)
Group B2: 5/50;5/50;5/50 (n=104)
Analyzed for safety (n=105)
•Added participants who received active vaccine in Group B1 (n=2)

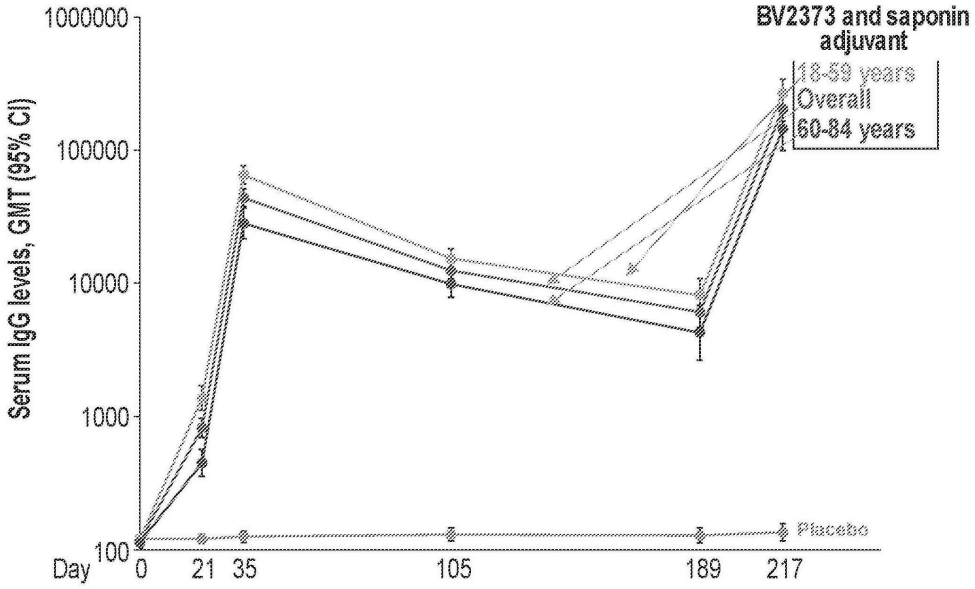
도면64a


Local Reactogenicity
All events
Grades 3+
Incidence, %
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Dose 1 2 3
Any local event
Tenderness
Pain
Swelling
Erythema

도면64b

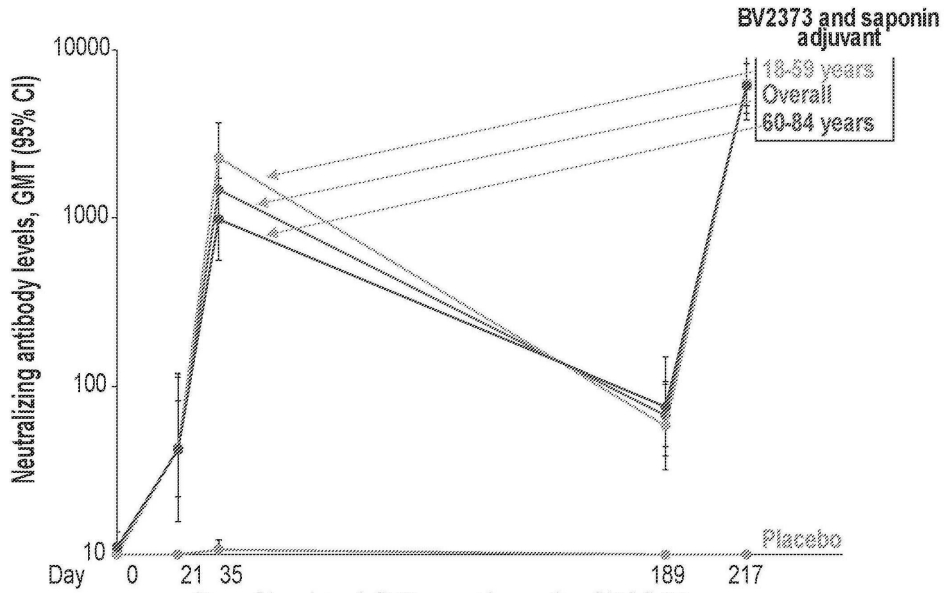

Systemic Reactogenicity
All events
Grades 3+
Incidence, %
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Dose 1 2 3
Any systemic event
Fatigue
Headache
Muscle pain
Malaise
Joint pain
Nausea/ vomiting
Fever

도면65



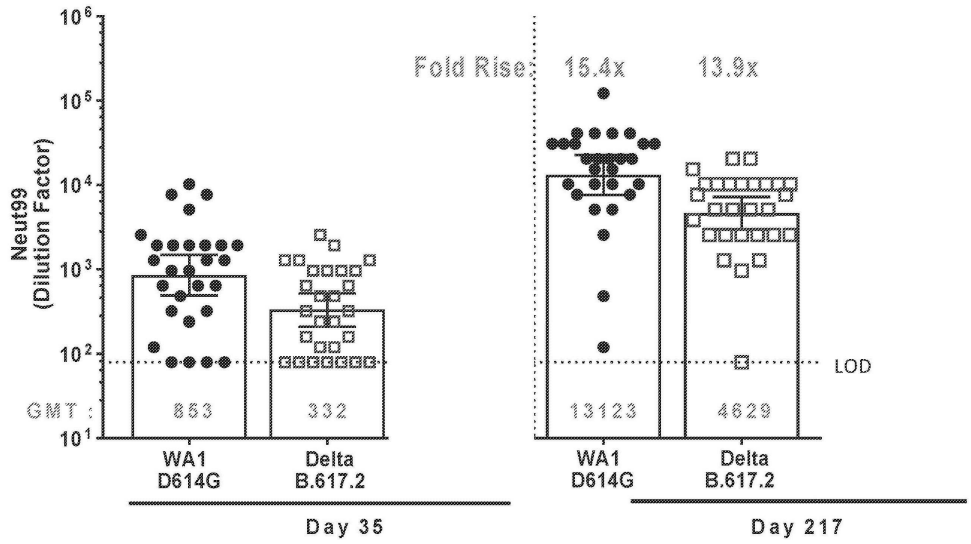
CI = confidence interval; GMT = geometric mean titers, IgG = immunoglobulin G; SARS-CoV-2 = severe acute respiratory syndrome 2

도면66



CI = confidence interval; GMT = geometric mean titers, SARS-CoV-2 = severe acute respiratory syndrome 2

도면67


Fold Rise: 15.4x 13.9x
Neut99 (Dilution Factor)
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
LOD
GMT :
853
332
13123
4629
WA1 D614G
Delta B.617.2
WA1 D614G
Delta B.617.2
Day 35
Day 217

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.