(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0125935
(43) 공개일자 2024년08월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/005 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/005 (2013.01)
A61K 39/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7021797
(22) 출원일자(국제) 2022년11월30일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년06월28일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/080700
(87) 국제공개번호 WO 2023/102448
국제공개일자 2023년06월08일
(30) 우선권주장
63/284,497 2021년11월30일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
노바백스, 인코포레이티드
미국 메릴랜드 20878 게이더스버그 퍼스트필드 로드 21
(72) 발명자
스미스 게일
미국 메릴랜드 20878 게이더스버그 퍼스트필드 로드 21 노바백스 인코포레이티드 내
마사레 마이클 제이.
미국 메릴랜드 20878 게이더스버그 퍼스트필드 로드 21 노바백스 인코포레이티드 내
티엔 징-후이
미국 메릴랜드 20878 게이더스버그 퍼스트필드 로드 21 노바백스 인코포레이티드 내
(74) 대리인
특허법인태평양

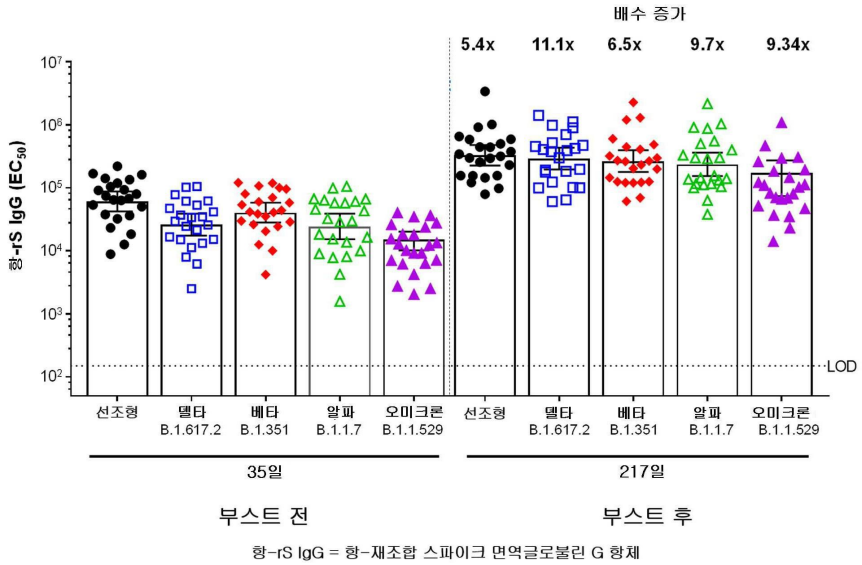
전체 청구항 수 : 총 75 항

(54) 발명의 명칭 **코로나바이러스 백신 제형물**

(57) 요 약

백신에 사용하기 위해 적합한 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질 및 이를 포함하는 나노입자가 본 명세서에 개시된다. 상기 나노입자는 세제 코어를 둘러싸거나 이와 회합된 병원체로부터의 항원을 제공하여서 향상된 안전성 및 양호한 면역원성을 야기한다. 복용량, 제형물, 및 백신 및 나노입자를 제조하기 위한 방법이 또한 개시된다.

대 표 도



항-rS IgG = 항-재조합 스파이크 면역글로불린 G 항체

(52) CPC특허분류
A61P 31/14 (2018.01)
A61K 2039/55555 (2013.01)
A61K 2039/55577 (2013.01)
C12N 2770/20022 (2013.01)
C12N 2770/20034 (2013.01)

(30) 우선권주장
63/292,120 2021년12월21일 미국(US)
63/293,519 2021년12월23일 미국(US)
63/332,530 2022년04월19일 미국(US)
63/367,678 2022년07월05일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

(i) 불활성화된 퓨린 절단 부위를 갖는 S1 서브유닛으로서, 상기 S1 서브유닛은 N-말단 도메인(NTD), 수용체 결합 도메인(RBD), 하위도메인 1 및 2(SD1/2)를 포함하고, 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(서열번호 7)의 아미노산 서열을 가지며;

상기 NTD는 임의적으로

(a) 아미노산 11-14, 56, 57, 130, 131, 132, 144, 145, 198, 199, 228, 229, 230, 231, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 결실; 및

(b) 아미노산 5, 6, 7, 11, 12, 13, 14, 51, 53, 54, 56, 57, 62, 63, 67, 70, 82, 125, 129, 131, 132, 133, 134, 139, 143, 144, 145, 170, 177, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 209, 229, 233, 239, 240, 244, 245, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이; 및

(c) 아미노산 214 및 215 사이에 EPE의 아미노산 서열을 갖는 트리펩티드의 삽입;으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 포함하고;

상기 RBD는 임의적으로 아미노산 326, 333, 355, 358, 360, 362, 363, 392, 395, 404, 419, 426, 427, 431, 432, 433, 439, 440, 447, 464, 465, 471, 473, 477, 480, 481, 483, 485, 488, 492, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이를 포함하고;

상기 SD1/2 도메인은 임의적으로 534, 557, 591, 600, 601, 626, 642, 645, 664, 666, 668, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이를 포함하고; 및

(ii) 아미노산 973 및 974가 프롤린인 S2 서브유닛으로서,

상기 S2 서브유닛은 임의적으로

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

(b) 688, 691, 703, 751, 783, 843, 846, 875, 937, 941, 956, 968, 969, 1014, 1058, 1105, 1163, 1186 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이; 및

(c) TMCT로부터의 하나 이상의 아미노산의 결실;로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 포함하고;

및 (i)의 (a)-(c) 및 (ii)의 (a)-(c)에서의 어느 하나의 변형의 조합;을 포함하는 코로나바이러스(CoV) 스파이크(S) 당단백질로서,

상기 CoV S 당단백질의 아미노산은 서열번호 2의 서열을 갖는 폴리펩티드에 관해 번호가 지정되는 CoV S 당단백질.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

(i) 6, 14, 54, 70, 82, 129, 133, 134, 139, 143, 144, 170, 197, 199, 200, 239, 244, 326, 333, 355, 358, 360, 362, 363, 392, 395, 404, 427, 431, 432, 433, 439, 447, 464, 465, 471, 473, 477, 480, 483, 485, 488, 492, 534, 591, 601, 626, 642, 645, 666, 668, 691, 751, 783, 843, 941, 956, 968, 및 1186으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이;

(ii) 11, 12, 13, 56, 57, 130, 131, 132, 144, 145, 및 198로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 결실; 및

(iii) 아미노산 214 및 215 사이에 EPE의 아미노산 서열을 갖는 트리펩티드의 삽입;으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 포함하고,

상기 CoV S 당단백질의 아미노산은 서열번호 2의 서열을 갖는 폴리펩티드에 관해 번호가 지정되는 CoV S 당단백질.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

T6I, T6R, A14S, A54V, V70A, T82I, G129D, H133Q, K134E, W139R, E143G, F144L, Q170E, I197V, L199I, V200E, V200G, G239V, G244S, G326D, G326H, R333T, L355I, S358F, S358L, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, K431T, V432P, G433S, L439R, L439Q, N447K, S464N, T465K, E471A, F473V, F473S, F477S, Q480R, G483S, Q485R, N488Y, Y492H, T534K, T591I, D601G, G626V, H642Y, N645S, N666K, P668H, S691L, N751K, D783Y, N843K, Q941H, N956K, L968F, D1186N, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 아미노산 130의 결실, 아미노산 131의 결실, 아미노산 132의 결실, 아미노산 144의 결실, 아미노산 145의 결실, 아미노산 198의 결실, 및 아미노산 214 및 215 사이에 EPE의 아미노산 서열을 갖는 트리펩티드의 삽입;으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 포함하고,

상기 CoV S 당단백질의 아미노산은 서열번호 2의 서열을 갖는 폴리펩티드에 관해 번호가 지정되는 CoV S 당단백질.

청구항 4

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CoV S 당단백질은

(i) A54V, T82I, G129D, L199I, G326D, S358L, S360P, S362F, K404N, N427K, G433S, S464N, T465K, E471A, Q480R, G483S, Q485R, N488Y, Y492H, T534K, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, N843K, Q941H, N956K, L968F, 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 아미노산 130의 결실, 아미노산 131의 결실, 아미노산 132의 결실, 아미노산 198의 결실, 및 아미노산 214 및 215 사이에 EPE의 아미노산 서열을 갖는 트리펩티드의 삽입;

(ii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, S464N, T465K, E471A, Q480R, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실;

(iii) T6R, A14S, T82I, G129D, E143G, L199I, G326D, S358L, S360P, K404N, N427K, G433S, S464N, T465K, E471A, Q480R, G483S, Q485R, N488Y, Y492H, T534K, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, N843K, Q941H, N956K, L968F, 아미노산 144의 결실, 아미노산 145의 결실, 아미노산 198의 결실, 및 아미노산 214 및 215 사이에 EPE의 아미노산 서열을 갖는 트리펩티드의 삽입;

(iv) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, K404N, N427K, L439Q, S464N, T465K, E471A, Q480R, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, S691L, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실;

(v) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, S464N, T465K, E471A, Q480R, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실;

(vi) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, D601G, H642Y, N645S, N666K, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

(vii) V3G, T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, G626V, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노

산 57의 결실;

(viii) V3G, T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

(ix) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

(x) T6I, A14S, G129D, K134E, W139R, F144L, I197V, V200G, G244S, G326H, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, G433S, N447K, S464N, T465K, E471A, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실;

(xi) T6I, A14S, G129D, K134E, W139R, F144L, I197V, V200G, G244S, G326H, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, G433S, L439R, N447K, S464N, T465K, E471A, F473S, Q485R, N488Y, Y492H, T591I, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, D1186N, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실;

(xii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N645S, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

(xiii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

(xiv) T6I, A14S, V70A, G129D, H133Q, Q170E, V200E, G239V, G326H, R333T, L355I, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, V432P, G433S, N447K, S464N, T465K, E471A, F473S, F477S, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 및 아미노산 131의 결실;

(xv) T6I, A14S, G129D, H133Q, Q170E, V200E, G326H, R333T, L355I, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, V432P, G433S, N447K, S464N, T465K, E471A, F473S, F477S, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 및 아미노산 131의 결실;

(xvi) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, K431T, L439R, N447K, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

(xvii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, K431T, L439R, N447K, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실; 및

(xviii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 및 아미노산 131의 결실;로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형의 조합을 포함하고,

상기 CoV S 당단백질의 아미노산은 서열번호 2의 서열을 갖는 폴리펩티드에 관해 번호가 지정되는 CoV S 당단백

질.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CoV S 당단백질은 서열번호 174, 175, 186, 188, 190, 195, 217-228, 233-236, 및 243 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% 동일한 CoV S 당단백질.

청구항 6

청구항 1 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CoV S 당단백질의 NTD는 서열번호 174, 175, 186, 188, 190, 195, 217-228, 233-236, 및 243 중 어느 하나의 NTD와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 CoV S 당단백질.

청구항 7

청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CoV S 당단백질의 RBD는 서열번호 174, 175, 186, 188, 190, 195, 217-228, 233-236, 및 243 중 어느 하나의 RBD와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 CoV S 당단백질.

청구항 8

청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CoV S 당단백질의 S1 서브유닛은 서열번호 174, 175, 186, 188, 190, 195, 217-228, 233-236, 및 243 중 어느 하나의 S1 서브유닛과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 CoV S 당단백질.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CoV S 당단백질의 S2 서브유닛은 서열번호 174, 175, 186, 188, 190, 195, 217-228, 및 233-236, 및 243 중 어느 하나의 S2 서브유닛과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 CoV S 당단백질.

청구항 10

청구항 1 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CoV S 당단백질의 SD1/2는 서열번호 174, 175, 186, 188, 190, 195, 217-228, 233-236, 및 243 중 어느 하나의 SD1/2와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 CoV S 당단백질.

청구항 11

청구항 1 내지 청구항 10 중 어느 한 항에 있어서,

각각의 NTD, RBD, S1 서브유닛, S2 서브유닛, 및 SD1/2는 서열번호 174, 175, 186, 188, 190, 195, 217-228, 233-236, 및 243 중 어느 하나의 해당 NTD, RBD, S1 서브유닛, S2 서브유닛, 및 SD1/2와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 CoV S 당단백질.

청구항 12

청구항 1 내지 청구항 11 중 어느 한 항에 있어서,

단백질 태그를 포함하는 CoV S 당단백질.

청구항 13

청구항 12에 있어서,

상기 단백질 태그는 상기 당단백질의 N-말단에 있는 CoV S 당단백질.

청구항 14

청구항 12에 있어서,

상기 단백질 태그는 상기 당단백질의 C-말단에 있는 CoV S 당단백질.

청구항 15

청구항 12 내지 청구항 14 중 어느 한 항에 있어서,

상기 단백질 태그는 폴리글루타메이트 태그, FLAG-태그, HA-태그, (약 5-10개 히스티딘을 갖는) 폴리His-태그(서열번호 101), 헥사히스티딘 태그(서열번호 100), (8개 히스티딘을 갖는) 8X-His-태그(서열번호 102), Myc-태그, 글루타티온-S-트랜스퍼라아제-태그, 녹색 형광 단백질-태그, 말토오스 결합 단백질-태그, 티오레독신-태그, Fc-태그, 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 CoV S 당단백질.

청구항 16

청구항 1 내지 청구항 15 중 어느 한 항에 있어서,

N-말단 신호 펩티드를 포함하는 CoV S 당단백질.

청구항 17

청구항 16에 있어서,

상기 N-말단 신호 펩티드는 서열번호 5, 117, 154, 및 193 중 어느 하나로부터 선택되는 CoV S 당단백질.

청구항 18

청구항 1 내지 청구항 17 중 어느 한 항의 CoV S 당단백질을 포함하는 핵산.

청구항 19

청구항 18에 있어서,

상기 핵산은 서열번호 196, 197, 198, 199, 201, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 또는 216 중 어느 하나의 핵산과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 핵산.

청구항 20

청구항 18 또는 청구항 19의 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 21

청구항 1 내지 청구항 17 중 어느 한 항의 CoV S 당단백질 및 비이온성 세제 코어를 포함하는 나노입자.

청구항 22

청구항 21에 있어서,

상기 나노입자의 융해 온도는 시차 주사 열량측정법에 의해 결정될 때 4℃에서 약 1개월 동안 보관한 후 적어도 55℃, 적어도 56℃, 적어도 57℃, 적어도 58℃, 적어도 59℃, 적어도 60℃, 적어도 61℃, 적어도 62℃, 적어도 63℃, 적어도 64℃, 적어도 65℃, 또는 약 55℃ 내지 약 65℃인 나노입자.

청구항 23

청구항 21 또는 청구항 22에 있어서,

상기 나노입자의 융해 온도는 시차 주사 열량측정법에 의해 결정될 때 25℃에서 약 1개월 동안 보관한 후 적어도 55℃, 적어도 56℃, 적어도 57℃, 적어도 58℃, 적어도 59℃, 적어도 60℃, 적어도 61℃, 적어도 62℃, 적어도 63℃, 적어도 64℃, 적어도 65℃, 또는 약 55℃ 내지 약 65℃인 나노입자.

청구항 24

청구항 21 내지 청구항 23 중 어느 한 항에 있어서,

상기 나노입자의 융해 온도는 시차 주사 열량측정법에 의해 결정될 때 37℃에서 약 1개월 동안 보관한 후 적어도 55℃, 적어도 56℃, 적어도 57℃, 적어도 58℃, 적어도 59℃, 적어도 60℃, 적어도 61℃, 적어도 62℃, 적어도 63℃, 적어도 64℃, 적어도 65℃, 또는 약 55℃ 내지 약 65℃인 나노입자.

청구항 25

청구항 21 내지 청구항 24 중 어느 한 항에 있어서,

상기 나노입자는 동적 광 산란에 의해 결정될 때 4℃에서 약 1개월 동안 보관한 후 약 30 nm 내지 약 65 nm 또는 약 30 nm 내지 약 50 nm의 Zavg 직경을 갖는 나노입자.

청구항 26

청구항 21 내지 청구항 25 중 어느 한 항에 있어서,

상기 나노입자는 동적 광 산란에 의해 결정될 때 25℃에서 약 1개월 동안 보관한 후 약 30 nm 내지 약 65 nm 또는 약 30 nm 내지 약 50 nm의 Zavg 직경을 갖는 나노입자.

청구항 27

청구항 21 내지 청구항 26 중 어느 한 항에 있어서,

상기 나노입자는 동적 광 산란에 의해 결정될 때 37℃에서 약 1개월 동안 보관한 후 약 30 nm 내지 약 120 nm, 약 30 nm 내지 약 80 nm, 또는 약 30 nm 내지 약 60 nm의 Zavg 직경을 갖는 나노입자.

청구항 28

청구항 21 내지 청구항 27 중 어느 한 항에 있어서,

상기 나노입자는 동적 광 산란에 의해 결정될 때 4℃에서 약 1개월 동안 보관한 후 약 0.1 nm 내지 약 0.4 nm, 약 0.15 nm 내지 약 0.35 nm, 또는 약 0.2 nm 내지 약 0.45 nm의 다분산도 지수를 갖는 나노입자.

청구항 29

청구항 21 내지 청구항 28 중 어느 한 항에 있어서,

상기 나노입자는 동적 광 산란에 의해 결정될 때 25℃에서 약 1개월 동안 보관한 후 약 0.1 nm 내지 약 0.4 nm, 약 0.15 nm 내지 약 0.35 nm, 또는 약 0.2 nm 내지 약 0.45 nm의 다분산도 지수를 갖는 나노입자.

청구항 30

청구항 21 내지 청구항 29 중 어느 한 항에 있어서,

상기 나노입자는 동적 광 산란에 의해 결정될 때 37℃에서 약 1개월 동안 보관한 후 약 0.1 nm 내지 약 0.4 nm, 약 0.15 nm 내지 약 0.35 nm, 또는 약 0.2 nm 내지 약 0.45 nm의 다분산도 지수를 갖는 나노입자.

청구항 31

청구항 21 내지 청구항 30 중 어느 한 항에 있어서,

상기 비이온성 세제는 폴리소르베이트-20(PS20), 폴리소르베이트-40(PS40), 폴리소르베이트-60(PS60), 폴리소르

베이트-65(PS65), 및 폴리소르베이트-80(PS80)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 나노입자.

청구항 32

청구항 31에 있어서,

상기 비이온성 세제는 PS80인 나노입자.

청구항 33

청구항 1 내지 청구항 17 중 어느 한 항의 CoV S 당단백질을 발현하는 세포.

청구항 34

청구항 33에 있어서,

상기 세포는 곤충 세포인 세포.

청구항 35

청구항 1 내지 청구항 17 중 어느 한 항의 적어도 하나의 CoV S 당단백질 또는 청구항 21 내지 청구항 32 중 어느 한 항의 나노입자 및 약학적으로 허용가능한 버퍼를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 36

청구항 35에 있어서,

2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10가지 상이한 CoV S 당단백질을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 37

청구항 35 또는 청구항 36에 있어서,

적어도 하나의 CoV S 당단백질은

(i) A54V, T82I, G129D, L199I, G326D, S358L, S360P, S362F, K404N, N427K, G433S, S464N, T465K, E471A, Q480R, G483S, Q485R, N488Y, Y492H, T534K, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, N843K, Q941H, N956K, L968F, 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 아미노산 130의 결실, 아미노산 131의 결실, 아미노산 132의 결실, 아미노산 198의 결실, 및 아미노산 214 및 215 사이에 EPE의 아미노산 서열을 갖는 트리펩티드의 삽입;

(ii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, S464N, T465K, E471A, Q480R, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실;

(iii) T6R, A14S, T82I, G129D, E143G, L199I, G326D, S358L, S360P, K404N, N427K, G433S, S464N, T465K, E471A, Q480R, G483S, Q485R, N488Y, Y492H, T534K, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, N843K, Q941H, N956K, L968F, 아미노산 144의 결실, 아미노산 145의 결실, 아미노산 198의 결실, 및 아미노산 214 및 215 사이에 EPE의 아미노산 서열을 갖는 트리펩티드의 삽입;

(iv) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, K404N, N427K, L439Q, S464N, T465K, E471A, Q480R, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, S691L, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실;

(v) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, S464N, T465K, E471A, Q480R, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실;

(vi) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, D601G, H642Y, N645S, N666K, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

(vii) V3G, T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, G626V, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

(viii) V3G, T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

(ix) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

(x) T6I, A14S, G129D, K134E, W139R, F144L, I197V, V200G, G244S, G326H, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, G433S, N447K, S464N, T465K, E471A, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실;

(xi) T6I, A14S, G129D, K134E, W139R, F144L, I197V, V200G, G244S, G326H, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, G433S, L439R, N447K, S464N, T465K, E471A, F473S, Q485R, N488Y, Y492H, T591I, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, D1186N, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실;

(xii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N645S, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

(xiii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

(xiv) T6I, A14S, V70A, G129D, H133Q, Q170E, V200E, G239V, G326H, R333T, L355I, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, V432P, G433S, N447K, S464N, T465K, E471A, F473S, F477S, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 및 아미노산 131의 결실;

(xv) T6I, A14S, G129D, H133Q, Q170E, V200E, G326H, R333T, L355I, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, V432P, G433S, N447K, S464N, T465K, E471A, F473S, F477S, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 및 아미노산 131의 결실;

(xvi) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, K431T, L439R, N447K, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

(xvii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, K431T, L439R, N447K, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실; 및

(xviii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y,

Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 및 아미노산 131의 결실;로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형의 조합을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 38

청구항 35 내지 청구항 37 중 어느 한 항에 있어서,

적어도 하나의 CoV S 당단백질은 서열번호 174, 175, 186, 188, 190, 195, 217-228, 및 233-236 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% 동일한 면역원성 조성물.

청구항 39

청구항 35 내지 청구항 38 중 어느 한 항에 있어서,

적어도 하나의 CoV S 당단백질은

(xix) 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 및 아미노산 131의 결실, N488Y, A557D, D601G, P668H 또는 P668R, T703I, S969A, 및 D1105H;

(xx) D67A, K404N, E471K, N488Y, D601G, 및 A688V;

(xxi) D67A, D202G, L229H, K404N, E471K, N488Y, D601G, 및 A688V;

(xxii) D67A, D202G, 아미노산 228-230 중 1, 2, 또는 3개 아미노산의 결실, K404N, E471K, N488Y, D601G, 및 A688V;

(xxiii) D67A, L229H, R233I, N488Y, K404N, E471K, D601G, 및 A688V;

(xxiv) L5F, T7N, P13S, D125Y, R177S, K404T, E471K, N488Y, D601G, H642Y, T1014I, 및 V1163F;

(xxv) W139C 및 L439;

(xxvi) 아미노산 144의 결실, 아미노산 145의 결실, T6R, E143G, L439R, T465K, D601G, P668R, 및 D937N;

(xxvii) 아미노산 144의 결실, 아미노산 145의 결실, T6R, G129D, E143G, L439R, T465K, D601G, P668R, 및 D937N;

(xxviii) 아미노산 144의 결실, 아미노산 145의 결실, T6R, T82I, G129D, Y132H, E143G, A209V, K404N L439R, T465K, D601G, P668R, 및 D937N;

(xxix) 아미노산 144의 결실, 아미노산 145의 결실, T6R, G129D, E143G, W245I, K404N, N426K, L439R, T465K, E471K, N488Y, D601G, P668R, 및 D937N;

(xxx) 아미노산 144의 결실, 아미노산 145의 결실, T6R, W51H, H53W, G129D, E143G, D200V, L201R, W245I, K404N, N426K, L439R, T465K, E471K, N488Y, D601G, P668R, 및 D937N;

(xxxi) 아미노산 144의 결실, 아미노산 145의 결실, T6R, G129D, E143G, K404N, L439R, T465K, E471Q, D601G, P668R, 및 D937N;

(xxxii) Q39R, A54V, E471K; D601G, Q664H, F875L, 및 아미노산 56, 57, 131, 132 중 1, 2, 3, 또는 4개의 결실;

(xxxiii) T82I, D240G, E471K, D601G, 및 A688V;

(xxxiv) L439R, E471Q, D601G, P668R, 및 Q1058H;

(xxxv) G62V, T63I, R233N, L439Q, F477S, D601G, T846N, 및 아미노산 234-240 중 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 결실;

(xxxvi) T82I, Y131S, Y132N, R333K, E471K, N488Y, D601G, P668H, 및 D937N; 및

(xxxvii) G129D, G326D, S360P, S362F, K404N, N427K, T465K, E471A 또는 E471K, Q480K 또는 Q480R, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, 및 N953K;로 이루어진 군으로부터 선택되는

변형의 조합을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 40

청구항 35 내지 청구항 39 중 어느 한 항에 있어서,

상기 면역원성 조성물은 서열번호 87의 CoV S 당단백질과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 CoV S 당단백질을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 41

청구항 35 내지 청구항 40 중 어느 한 항에 있어서,

서열번호 85-89, 105, 106, 및 112-115의 CoV S 당단백질과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 CoV S 당단백질을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 42

청구항 35 내지 청구항 41 중 어느 한 항에 있어서,

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 면역원성 조성물.

청구항 43

청구항 35 내지 청구항 42 중 어느 한 항에 있어서,

적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 또는 적어도 4가지 헤마글루티닌(HA) 당단백질을 포함하고, 여기서 각각의 HA 당단백질은 상이한 인프루엔자 바이러스주로부터 유래되는 면역원성 조성물.

청구항 44

청구항 35 내지 청구항 43 중 어느 한 항에 있어서,

호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 융합(F) 당단백질을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 45

청구항 35 내지 청구항 44 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 (i) 서열번호 87의 폴리펩티드와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 제1 CoV S 당단백질, 및 (ii) 서열번호 175의 폴리펩티드와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 제2 CoV S 당단백질을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 46

청구항 35 내지 청구항 45 중 어느 한 항에 있어서,

약 1 ㎍ 내지 약 50 ㎍, 약 3 ㎍ 내지 약 25 ㎍, 약 5 ㎍ 내지 약 25 ㎍, 또는 약 5 ㎍ 내지 약 100 ㎍의 CoV S 당단백질을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 47

청구항 35 내지 청구항 45 중 어느 한 항에 있어서,

1 ㎍ 내지 약 50 ㎍, 약 3 ㎍ 내지 약 25 ㎍, 약 5 ㎍ 내지 약 25 ㎍, 또는 약 5 ㎍ 내지 약 100 ㎍의 각각의 CoV S 당단백질을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 48

청구항 35 내지 청구항 46 중 어느 한 항에 있어서,

약 5 ㎍의 CoV S 당단백질을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 49

청구항 35 내지 청구항 45 중 어느 한 항에 있어서,

약 5 ㎍의 각각의 CoV S 당단백질을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 50

청구항 35 내지 청구항 49 중 어느 한 항에 있어서,

어주번트를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 51

청구항 50에 있어서,

상기 어주번트는 적어도 2 종의 이스콤 입자를 포함하며, 여기서

제1 이스콤 입자는 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A는 포함하지만 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 포함하지 않고; 및

제2 이스콤 입자는 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 포함하지만 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A는 포함하지 않는 면역원성 조성물.

청구항 52

청구항 51에 있어서,

상기 어주번트에서 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 각각 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량의 합의 약 85 중량% 및 약 15 중량%를 차지하는 면역원성 조성물.

청구항 53

청구항 51에 있어서,

상기 어주번트에서 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 각각 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량의 합의 약 92 중량% 및 약 8 중량%를 차지하는 면역원성 조성물.

청구항 54

청구항 51에 있어서,

상기 어주번트에서, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량의 합중, 각각 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A는 적어도 약 85 중량%를 차지하고, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 나머지를 차지하는 면역원성 조성물.

청구항 55

청구항 51에 있어서,

상기 어주번트에서, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량의 합중, 각각, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A는 50-96 중량%를 차지하고, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 나머지를 차지하는 면역원성 조성물.

청구항 56

청구항 50 내지 청구항 55 중 어느 한 항에 있어서,

약 25 ㎍ 내지 약 100 ㎍의 어주번트를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 57

청구항 50 내지 청구항 55 중 어느 한 항에 있어서,

약 50 ㎍의 어주번트를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 58

청구항 35 내지 청구항 57 중 어느 한 항의 면역원성 조성물을 포함하는 사전충진된 주사기.

청구항 59

청구항 35 내지 청구항 57 중 어느 한 항의 면역원성 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, SARS-CoV-2 또는 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주에 대한 면역 반응을 자극하는 방법.

청구항 60

청구항 59에 있어서,

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 용량의 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 61

청구항 59 또는 청구항 60에 있어서,

제1 용량의 면역원성 조성물 및 상기 제1 용량의 약 3주 후에 제2 용량의 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 62

청구항 59 내지 청구항 61 중 어느 한 항에 있어서,

제1 용량의 면역원성 조성물 및 상기 제1 용량의 약 21일 후에 제2 용량의 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 63

청구항 59 내지 청구항 62 중 어느 한 항에 있어서,

적어도 3 용량의 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 제3 용량의 면역원성 조성물은 상기 제1 또는 제2 용량 후 적어도 6개월, 적어도 7개월, 적어도 8개월, 적어도 9개월, 적어도 10개월, 적어도 11개월, 적어도 12개월, 적어도 13개월, 적어도 14개월, 적어도 15개월, 적어도 16개월, 적어도 17개월, 적어도 18개월, 적어도 19개월, 적어도 20개월, 적어도 21개월, 적어도 22개월, 적어도 23개월, 또는 적어도 24개월에 투여되는 방법.

청구항 64

청구항 59 내지 청구항 63 중 어느 한 항에 있어서,

제1 면역원성 조성물과 상이한 제2 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 65

청구항 64에 있어서,

상기 제2 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 방법.

청구항 66

청구항 64에 있어서,

상기 제2 면역원성 조성물은 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 또는 적어도 4가지 헤마글루티닌(HA) 당단백질을 포함하고, 여기서 각각의 HA 당단백질은 상이한 인프루엔자 바이러스주로부터 유래되는 방법.

청구항 67

청구항 64에 있어서,

상기 제2 면역원성 조성물은 상기 제1 면역원성 조성물과 상이한 CoV S 당단백질을 포함하는 방법.

청구항 68

청구항 59 내지 청구항 67 중 어느 한 항에 있어서,

상기 면역원성 조성물은 근육내로 투여되는 방법.

청구항 69

청구항 59 내지 청구항 68 중 어느 한 항에 있어서,

사전충진된 주사기로 상기 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 70

청구항 59 내지 청구항 69 중 어느 한 항에 있어서,

상기 방법은 면역원성 조성물의 투여 후 적어도 약 2개월, 적어도 약 2.5개월, 적어도 약 3개월, 적어도 약 3.5개월, 적어도 약 4개월, 적어도 약 4.5개월, 적어도 약 5개월, 적어도 약 5.5개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 6.5개월, 적어도 약 7개월, 적어도 약 7.5개월, 적어도 약 8개월, 적어도 약 8.5개월, 적어도 약 9개월, 적어도 약 9.5개월, 적어도 약 10개월, 적어도 약 10.5개월, 적어도 약 11개월, 적어도 약 11.5개월, 적어도 약 12개월, 적어도 13개월, 적어도 14개월, 적어도 15개월, 적어도 16개월, 적어도 17개월, 적어도 18개월, 적어도 19개월, 적어도 20개월, 적어도 21개월, 적어도 22개월, 적어도 23개월, 또는 적어도 24개월 동안 약 50% 내지 약 99%, 약 50% 내지 약 95%, 약 50% 내지 약 90%, 약 50% 내지 약 85%, 약 50% 내지 약 80%, 약 60% 내지 약 99%, 약 65% 내지 약 95%, 약 65% 내지 약 90%, 약 65% 내지 약 85%, 약 69% 내지 약 81%, 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%의 효능으로 COVID-19를 예방하는 방법.

청구항 71

청구항 59 내지 청구항 69 중 어느 한 항에 있어서,

상기 방법은 면역원성 조성물의 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, 최대 약 12개월, 최대 13개월, 최대 14개월, 최대 15개월, 최대 16개월, 최대 17개월, 최대 18개월, 최대 19개월, 최대 20개월, 최대 21개월, 최대 22개월, 최대 23개월, 또는 최대 24개월 동안 약 50% 내지 약 99%, 약 50% 내지 약 95%, 약 50% 내지 약 90%, 약 50% 내지 약 85%, 약 50% 내지 약 80%, 약 60% 내지 약 99%, 약 65% 내지 약 95%, 약 65% 내지 약 90%, 약 65% 내지 약 85%, 약 69% 내지 약 81%, 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%의 효능으로 COVID-19를 예방하는 방법.

청구항 72

청구항 59 내지 청구항 71 중 어느 한 항에 있어서,

상기 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주는 B.1.1.529; BA.1, BA.1.1, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5, B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2, AY, B.1.427, B.1.429, B.1.525, B.1.526, B.1.617.1, B.1.617.3, P.2, B.1.621, 또는 B.1.621.1로 이루어진 군으로부터 선택되는 PANGO 계통을 갖는 방법.

청구항 73

청구항 59 내지 청구항 72 중 어느 한 항에 있어서,

상기 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주는 알파, 베타, 감마, 델타, 엡실론, 아이오타, 카파, 제타, 뮤, 또는 오미크론의 세계 보건 기구 라벨을 갖는 방법.

청구항 74

청구항 43의 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 SARS-CoV-2, 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주, 인프루엔자 바이러스, 또는 이들의 조합에 대한 면역 반응을 자극하는 방법.

청구항 75

청구항 43 또는 청구항 44의 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 SARS-CoV-2, 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주, 인프루엔자 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 또는 이들의 조합에 대한 면역 반응을 자극하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 다음의 출원에 대한 우선권을 주장한다: 2021년 11월 30일 출원된 미국 출원 제63/284,497호; 2021년 12월 21일 출원된 미국 출원 제63/292,120호; 2021년 12월 23일 출원된 미국 출원 제63/293,519호; 2022년 4월 19일 출원된 미국 출원 제63/332,530호; 및 2022년 7월 5일 출원된 미국 출원 제63/367,678호. 상기 출원들의 내용은 모든 목적을 위하여 그 전체 내용이 인용에 의해 본 명세서에 통합된다.

[0003] **전자적으로 제출된 테스트 파일의 설명**

[0004] 전자적 서열목록(NOVV_096_01WO_SeqList_ST26.xml; 크기: 623,736 바이트; 생성일: 2022년 11월 30일)의 내용은 그 전체가 인용에 의해 본 명세서에 통합된다.

[0005] **기술분야**

[0006] 본 개시는 일반적으로 면역 반응을 자극하기 위해 유용한 비-자연적으로 발생하는 코로나바이러스(CoV) 스파이크(Spike)(S) 폴리펩티드 및 나노입자(nanoparticle) 및 이를 포함하는 백신에 관한 것이다. 상기 나노입자는 임의적으로 세제(detergent core) 코어와 회합되고, 전형적으로 재조합 접근법을 이용해 생산되는 항원, 예를 들면, 당단백질 항원을 제공한다. 상기 나노입자는 개선된 안전성 및 향상된 에피토프 제시를 갖는다. 본 개시는 또한 상기 나노입자를 함유하는 조성물, 이를 생산하기 위한 방법, 및 면역 반응을 자극하는 방법을 제공한다.

배 경 기 술

[0007] 감염성 질환은 전세계에 걸쳐서 문제로 남아 있다. 일부 병원체에 대한 백신의 개발에 있어서 진전이 있어 왔지만, 많은 것이 인간의 건강에 대한 위협으로 남아 있다. 돌발 급성 호흡기 증후군(sudden acute respiratory syndrome) 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)의 대발생은 전세계적으로 650만명의 사망을 유발하였다. 상기 SARS-CoV-2 코로나바이러스는 과거 17년 동안 수백명의 사람들을 사망하게 한 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스(SARS-CoV) 및 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV)와 동일한 바이러스의 패밀리에 속한다. SARS-CoV-2는 COVID-19 질환을 유발한다.

[0008] SARS-CoV-2 코로나바이러스와 같은 생명을 위협하는 감염성 질환의 증세를 예방하거나 감소시키는 백신의 개발이 요망된다. 그러나, 인간 백신 개발은 병원체의 매우 높은 수준의 회피 메커니즘 및 백신 안정화의 어려움으

로 인해 도전과제로 남아 있다. 최적인 것은, 백신은 감염성 물질을 차단 또는 중화하는 항체를 유도하고, 또한 냉동을 할 수 없는 환경을 포함하는 다양한 환경에서 안정하게 남아 있어야 한다.

발명의 내용

[0009] 본 개시는 SARS-CoV-2에 대한 면역 반응을 유도하기 위해 적합한 비-자연적으로 발생하는 CoV S 폴리펩티드를 제공한다. 본 개시는 또한 당단백질을 함유하는 나노입자뿐만 아니라 면역 반응을 자극하는 방법을 제공한다.

[0010] 본 개시는 또한 SARS-CoV-2, 중동 호흡기 증후군(MERS), 및 중증 급성 호흡기 증후군(SARS)을 포함하는 다수의 코로나바이러스에 대한 면역 반응을 유도하기 위해 적합한 CoV S 폴리펩티드를 제공한다.

[0011] (i) 불활성화된 퓨린 절단 부위를 갖는 S1 서브유닛(subunit)으로서, 상기 S1 서브유닛은 N-말단 도메인(NTD), 수용체 결합 도메인(RBD), 하위도메인(subdomain) 1 및 2(SD1/2)를 포함하고, 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(서열번호 7)의 아미노산 서열을 가지며;

[0012] 상기 NTD는 임의적으로

[0013] (a) 아미노산 11-14, 56, 57, 130, 131, 132, 144, 145, 198, 199, 228, 229, 230, 231, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 결실; 및

[0014] (b) 아미노산 5, 6, 7, 11, 12, 13, 14, 51, 53, 54, 56, 57, 62, 63, 67, 70, 82, 125, 129, 131, 132, 133, 134, 139, 143, 144, 145, 170, 177, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 209, 229, 233, 239, 240, 244, 245, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이; 및

[0015] (c) 아미노산 214 및 215 사이에 EPE의 아미노산 서열을 갖는 트리펩티드의 삽입;으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 포함하고;

[0016] 상기 RBD는 임의적으로 아미노산 326, 333, 355, 358, 360, 362, 363, 392, 395, 404, 419, 426, 427, 431, 432, 433, 439, 440, 447, 464, 465, 471, 473, 477, 480, 481, 483, 485, 488, 492, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이를 포함하고; 및

[0017] 상기 SD1/2 도메인은 임의적으로 534, 557, 591, 600, 601, 626, 642, 645, 664, 666, 668, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이를 포함하고; 및

[0018] (ii) 아미노산 973 및 974가 프롤린인 S2 서브유닛으로서, 상기 S2 서브유닛은 임의적으로

[0019] (a) 676-685, 676-702, 702-711, 775-793, 806-815 및 이들의 조합으로부터의 하나 이상의 아미노산의 결실; 및

[0020] (b) 688, 691, 703, 751, 783, 843, 846, 875, 937, 941, 956, 968, 969, 1014, 1058, 1105, 1163, 1186 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이; 및

[0021] (c) TMCT로부터의 하나 이상의 아미노산의 결실;로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 포함하고;

[0022] 및 (i)의 (a)-(c) 및 (ii)의 (a)-(c)에서의 어느 하나의 변형의 조합;을 포함하는 CoV S 폴리펩티드가 본 명세서에 제공되며,

[0023] 여기서, 상기 CoV S 당단백질의 아미노산은 서열번호 2의 서열을 갖는 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다.

[0024] 구현예에서, 상기 하나 이상의 변형은 (i) 6, 14, 54, 70, 82, 129, 133, 134, 139, 143, 144, 170, 197, 199, 200, 239, 244, 326, 333, 355, 358, 360, 362, 363, 392, 395, 404, 427, 431, 432, 433, 439, 447, 464, 465, 471, 473, 477, 480, 483, 485, 488, 492, 534, 591, 601, 626, 642, 645, 666, 668, 691, 751, 783, 843, 941, 956, 968, 및 1186으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이; (ii) 11, 12, 13, 56, 57, 130, 131, 132, 144, 145, 및 198로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 결실; (iii) 아미노산 214 및 215 사이에 EPE의 아미노산 서열을 갖는 트리펩티드의 삽입; 및 (i)-(iii)에서의 변형의 조합으로부터 선택되며, 여기서 상기 CoV S 당단백질의 아미노산은 서열번호 2의 서열을 갖는 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, 상기 하나 이상의 변형은 T6I, T6R, A14S, A54V, V70A, T82I, G129D, H133Q, K134E, W139R, E143G, F144L, Q170E, I197V, L199I, V200E, V200G, G239V, G244S, G326D, G326H, R333T, L355I, S358F, S358L, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, K431T, V432P, G433S,

L439R, L439Q, N447K, S464N, T465K, E471A, F473V, F473S, F477S, Q480R, G483S, Q485R, N488Y, Y492H, T534K, T591I, D601G, G626V, H642Y, N645S, N666K, P668H, S691L, N751K, D783Y, N843K, Q941H, N956K, L968F, D1186N, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 아미노산 130의 결실, 아미노산 131의 결실, 아미노산 132의 결실, 아미노산 144의 결실, 아미노산 145의 결실, 아미노산 198의 결실, 및 아미노산 214 및 215 사이에 EPE의 아미노산 서열을 갖는 트리펩티드의 삽입, 및 이들의 조합으로부터 선택된다; 여기서, 상기 CoV S 당단백질의 아미노산은 서열번호 2의 서열을 갖는 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다.

[0025] 구현예에서, 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형의 조합을 포함하는 CoV S 당단백질이 본 명세서에 제공된다:

[0026] (i) A54V, T82I, G129D, L199I, G326D, S358L, S360P, S362F, K404N, N427K, G433S, S464N, T465K, E471A, Q480R, G483S, Q485R, N488Y, Y492H, T534K, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, N843K, Q941H, N956K, L968F, 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 아미노산 130의 결실, 아미노산 131의 결실, 아미노산 132의 결실, 아미노산 198의 결실, 및 아미노산 214 및 215 사이에 EPE의 아미노산 서열을 갖는 트리펩티드의 삽입;

[0027] (ii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, S464N, T465K, E471A, Q480R, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실;

[0028] (iii) T6R, A14S, T82I, G129D, E143G, L199I, G326D, S358L, S360P, K404N, N427K, G433S, S464N, T465K, E471A, Q480R, G483S, Q485R, N488Y, Y492H, T534K, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, N843K, Q941H, N956K, L968F, 아미노산 144의 결실, 아미노산 145의 결실, 아미노산 198의 결실, 및 아미노산 214 및 215 사이에 EPE의 아미노산 서열을 갖는 트리펩티드의 삽입;

[0029] (iv) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, K404N, N427K, L439Q, S464N, T465K, E471A, Q480R, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, S691L, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실;

[0030] (v) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, S464N, T465K, E471A, Q480R, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실;

[0031] (vi) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, D601G, H642Y, N645S, N666K, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

[0032] (vii) V3G, T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, G626V, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

[0033] (viii) V3G, T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

[0034] (ix) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

[0035] (x) T6I, A14S, G129D, K134E, W139R, F144L, I197V, V200G, G244S, G326H, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, G433S, N447K, S464N, T465K, E471A, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실;

[0036] (xi) T6I, A14S, G129D, K134E, W139R, F144L, I197V, V200G, G244S, G326H, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, G433S, L439R, N447K, S464N, T465K, E471A, F473S, Q485R, N488Y, Y492H, T591I, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, D1186N, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실;

[0037] (xii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N645S, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

[0038] (xiii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

[0039] (xiv) T6I, A14S, V70A, G129D, H133Q, Q170E, V200E, G239V, G326H, R333T, L355I, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, V432P, G433S, N447K, S464N, T465K, E471A, F473S, F477S, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 및 아미노산 131의 결실;

[0040] (xv) T6I, A14S, G129D, H133Q, Q170E, V200E, G326H, R333T, L355I, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, V432P, G433S, N447K, S464N, T465K, E471A, F473S, F477S, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 및 아미노산 131의 결실;

[0041] (xvi) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, K431T, L439R, N447K, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

[0042] (xvii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, K431T, L439R, N447K, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실; 및

[0043] (xviii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 및 아미노산 131의 결실; 여기서, 상기 CoV S 당단백질의 아미노산은 서열번호 2의 서열을 갖는 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, 상기 CoV S 당단백질은 서열번호 174, 175, 186, 188, 190, 195, 217-228, 233-236, 및 243 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% 동일하다. 구현예에서, 상기 CoV S 당단백질의 NTD는 서열번호 174, 175, 186, 188, 190, 195, 217-228, 233-236, 및 243 중 어느 하나의 NTD와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일하다. 구현예에서, 상기 CoV S 당단백질의 RBD 서열번호 174, 175, 186, 188, 190, 195, 217-228, 233-236, 및 243 중 어느 하나의 RBD와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일하다. 구현예에서, 상기 CoV S 당단백질의 S1 서브유닛은 서열번호 174, 175, 186, 188, 190, 195, 217-228, 233-236, 및 243 중 어느 하나의 S1 서브유닛과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일하다. 구현예에서, 상기 CoV S 당단백질의 S2 서브유닛은 서열번호 174, 175, 186, 188, 190, 195, 217-228, 233-236, 및 243 중 어느 하나의 S2 서브유닛과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일하다. 구현예에서, 상기 CoV S 당단백질의 SD1/2는 서열번호 174, 175, 186, 188, 190, 195, 217-228, 233-236, 및 243 중 어느 하나의 SD1/2와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는

100% 동일하다. 구현예에서, 상기 CoV S 당단백질의 각각의 NTD, RBD, S1 서브유닛, S2 서브유닛, 및 SD1/2는 서열번호 174, 175, 186, 188, 190, 195, 217-228, 233-236, 및 243 중 어느 하나의 해당 NTD, RBD, S1 서브유닛, S2 서브유닛, 및 SD1/2와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일하다. 구현예에서, 상기 CoV S 당단백질은 단백질 태그(tag)를 포함한다. 구현예에서, 상기 단백질 태그는 당단백질의 N-말단에 있다. 구현예에서, 상기 단백질 태그는 당단백질의 C-말단에 있다. 구현예에서, 상기 단백질 태그는 폴리글루타메이트 태그, FLAG-태그, HA-태그, (약 5-10개 히스티딘을 갖는) 폴리His-태그(서열번호 101), 헥사히스티딘 태그(서열번호 100), (8개 히스티딘을 갖는) 8X-His-태그(서열번호 102), Myc-태그, 글루타티온-S-트랜스퍼라아제(transferase)-태그, 녹색 형광 단백질-태그, 말토오스 결합 단백질-태그, 티오레독신-태그, Fc-태그, 또는 이들의 조합으로부터 선택된다. 구현예에서, 상기 CoV S 당단백질은 N-말단 신호 펩티드를 포함한다. 구현예에서, 상기 N-말단 신호 펩티드는 서열번호 5, 117, 154, 및 193 중 어느 하나로부터 선택된다.

[0044] 구현예에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 당단백질을 포함하는 핵산이 본 명세서에 제공된다. 구현예에서, 상기 핵산은 서열번호 196, 197, 198, 199, 201, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 또는 216 중 어느 하나의 핵산과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일하다. 구현예에서, 청구항 18 또는 청구항 19의 핵산을 포함하는 벡터(vector)가 본 명세서에 제공된다.

[0045] 구현예에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 당단백질 및 비이온성 세제 코어를 포함하는 나노입자가 본 명세서에 제공된다. 구현예에서, 상기 나노입자의 융해 온도(melting temperature)는 시차 주사 열량측정법(differential scanning calorimetry)에 의해 결정될 때 4℃에서 약 1개월 동안 보관한 후 적어도 55℃, 적어도 56℃, 적어도 57℃, 적어도 58℃, 적어도 59℃, 적어도 60℃, 적어도 61℃, 적어도 62℃, 적어도 63℃, 적어도 64℃, 적어도 65℃, 또는 약 55℃ 내지 약 65℃이다. 구현예에서, 상기 나노입자의 융해 온도는 시차 주사 열량측정법에 의해 결정될 때, 25℃에서 약 1개월 동안 보관한 후 적어도 55℃, 적어도 56℃, 적어도 57℃, 적어도 58℃, 적어도 59℃, 적어도 60℃, 적어도 61℃, 적어도 62℃, 적어도 63℃, 적어도 64℃, 적어도 65℃, 또는 약 55℃ 내지 약 65℃이다. 구현예에서, 상기 나노입자의 융해 온도는 시차 주사 열량측정법에 의해 결정될 때, 37℃에서 약 1개월 동안 보관한 후 적어도 55℃, 적어도 56℃, 적어도 57℃, 적어도 58℃, 적어도 59℃, 적어도 60℃, 적어도 61℃, 적어도 62℃, 적어도 63℃, 적어도 64℃, 적어도 65℃, 또는 약 55℃ 내지 약 65℃이다. 구현예에서, 상기 나노입자는 동적 광 산란(dynamic light scattering)에 의해 결정될 때, 4℃에서 약 1개월 동안 보관한 후 약 30 nm 내지 약 65 nm 또는 약 30 nm 내지 약 50 nm의 Zavg 직경을 갖는다. 구현예에서, 상기 나노입자는 동적 광 산란에 의해 결정될 때, 25℃에서 약 1개월 동안 보관한 후 약 30 nm 내지 약 65 nm 또는 약 30 nm 내지 약 50 nm의 Zavg 직경을 갖는다. 구현예에서, 상기 나노입자는 동적 광 산란에 의해 결정될 때, 37℃에서 약 1개월 동안 보관한 후 약 30 nm 내지 약 120 nm, 약 30 nm 내지 약 80 nm, 또는 약 30 nm 내지 약 60 nm의 Zavg 직경을 갖는다. 구현예에서, 상기 나노입자는 동적 광 산란에 의해 결정될 때, 4℃에서 약 1개월 동안 보관한 후 약 0.1 nm 내지 약 0.4 nm, 약 0.15 nm 내지 약 0.35 nm, 또는 약 0.2 nm 내지 약 0.45 nm의 다분산도 지수(polydispersity index)를 갖는다. 구현예에서, 상기 나노입자는 동적 광 산란에 의해 결정될 때, 25℃에서 약 1개월 동안 보관한 후 약 0.1 nm 내지 약 0.4 nm, 약 0.15 nm 내지 약 0.35 nm, 또는 약 0.2 nm 내지 약 0.45 nm의 다분산도 지수를 갖는다. 구현예에서, 상기 나노입자는 동적 광 산란에 의해 결정될 때, 37℃에서 약 1개월 동안 보관한 후 약 0.1 nm 내지 약 0.4 nm, 약 0.15 nm 내지 약 0.35 nm, 또는 약 0.2 nm 내지 약 0.45 nm의 다분산도 지수를 갖는다. 구현예에서, 상기 비이온성 세제는 폴리소르베이트(polysorbate)-20(PS20), 폴리소르베이트-40(PS40), 폴리소르베이트-60(PS60), 폴리소르베이트-65(PS65), 및 폴리소르베이트-80(PS80)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 구현예에서, 상기 비이온성 세제는 PS80이다.

[0046] 구현예에서, 본 명세서에 기술된 CoV 당단백질을 발현하는 세포가 본 명세서에 제공된다. 구현예에서, 상기 세포는 곤충 세포이다.

[0047] 구현예에서, 적어도 하나의 본 명세서에 기술된 CoV S 당단백질 또는 본 명세서에 기술된 나노입자 및 약학적으로 허용가능한 버퍼(buffer)를 포함하는 면역원성 조성물이 본 명세서에 제공된다. 구현예에서, 상기 조성물은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10가지 상이한 CoV S 당단백질을 포함한다. 구현예에서, 적어도 하나의 CoV S 당단백질은 (i) A54V, T82I, G129D, L199I, G326D, S358L, S360P, S362F, K404N, N427K, G433S, S464N, T465K, E471A, Q480R, G483S, Q485R, N488Y, Y492H, T534K, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, N843K, Q941H, N956K, L968F, 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 아미노산 130의 결실, 아미노산 131의 결실, 아미노산 132의 결실, 아미노산 198의 결실, 및 아미노산 214 및 215 사이에 EPE의 아미노산 서열을 갖는

트리펩티드의 삽입; (ii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, S464N, T465K, E471A, Q480R, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실; (iii) T6R, A14S, T82I, G129D, E143G, L199I, G326D, S358L, S360P, K404N, N427K, G433S, S464N, T465K, E471A, Q480R, G483S, Q485R, N488Y, Y492H, T534K, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, N843K, Q941H, N956K, L968F, 아미노산 144의 결실, 아미노산 145의 결실, 아미노산 198의 결실, 및 아미노산 214 및 215 사이에 EPE의 아미노산 서열을 갖는 트리펩티드의 삽입; (iv) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, K404N, N427K, L439Q, S464N, T465K, E471A, Q480R, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, S691L, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실; (v) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, S464N, T465K, E471A, Q480R, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실; (vi) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, D601G, H642Y, N645S, N666K, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실; (vii) V3G, T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, G626V, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실; (viii) V3G, T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실; (ix) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실; (x) T6I, A14S, G129D, K134E, W139R, F144L, I197V, V200G, G244S, G326H, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, G433S, N447K, S464N, T465K, E471A, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실; (xi) T6I, A14S, G129D, K134E, W139R, F144L, I197V, V200G, G244S, G326H, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, G433S, L439R, N447K, S464N, T465K, E471A, F473S, Q485R, N488Y, Y492H, T591I, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, D1186N, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실; (xii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N645S, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실; (xiii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실; (xiv) T6I, A14S, V70A, G129D, H133Q, Q170E, V200E, G239V, G326H, R333T, L355I, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, V432P, G433S, N447K, S464N, T465K, E471A, F473S, F477S, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 및 아미노산 131의 결실; (xv) T6I, A14S, G129D, H133Q, Q170E, V200E, G326H, R333T, L355I, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, V432P, G433S, N447K, S464N, T465K, E471A, F473S, F477S, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 및 아미노산 131의 결실; (xvi) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, K431T, L439R, N447K, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실; (xvii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, K431T, L439R, N447K, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실; 및 (xviii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V,

Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 및 아미노산 131의 결실;로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형의 조합을 포함한다. 구현예에서, 상기 면역원성 조성물은 서열번호 174, 175, 186, 188, 190, 195, 217-228, 233-236, 및 243 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% 동일성(identity)을 갖는 적어도 하나의 CoV S 당단백질을 포함한다. 구현예에서, 상기 면역원성 조성물은 서열번호 87의 CoV S 당단백질과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 CoV S 당단백질을 포함한다. 구현예에서, 상기 면역원성 조성물은 서열번호 85-89, 105, 106, 및 112-115의 CoV S 당단백질과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 CoV S 당단백질을 포함한다. 구현예에서, 상기 면역원성 조성물은 SARS-Cov-2 스파이크 당단백질을 암호화하는 mRNA, SARS-Cov-2 스파이크 당단백질을 암호화하는 플라스미드(plasmid) DNA, SARS-Cov-2 스파이크 당단백질을 암호화하는 바이러스 벡터, 또는 불활성화된 SARS-CoV-2 바이러스를 포함한다. 구현예에서, 상기 면역원성 조성물은 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 또는 적어도 4개의 헤마글루티닌(HA) 당단백질을 포함하며, 여기서 각각의 HA 당단백질은 상이한 인프루엔자 바이러스주(strain)로부터 유래된다. 구현예에서, 상기 면역원성 조성물은 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 융합(F) 당단백질을 포함한다. 구현예에서, 상기 면역원성 조성물은 (i) 서열번호 87의 폴리펩티드와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 제1 CoV S 당단백질 및 (ii) 서열번호 175의 폴리펩티드와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 제2 CoV S 당단백질을 포함한다. 구현예에서, 상기 면역원성 조성물은 약 1 ㎍ 내지 약 50 ㎍; 약 3 ㎍ 내지 약 25 ㎍, 약 5 ㎍ 내지 약 25 ㎍, 또는 약 5 ㎍ 내지 약 100 ㎍의 CoV S 당단백질을 포함한다. 구현예에서, 상기 면역원성 조성물은 약 1 ㎍ 내지 약 50 ㎍; 약 3 ㎍ 내지 약 25 ㎍, 약 5 ㎍ 내지 약 25 ㎍, 또는 약 5 ㎍ 내지 약 100 ㎍의 각각의 CoV S 당단백질을 포함한다. 구현예에서, 상기 면역원성 조성물은 약 5 ㎍의 CoV S 당단백질을 포함한다. 구현예에서, 상기 면역원성 조성물은 약 5 ㎍의 각각의 CoV S 당단백질을 포함한다. 구현예에서, 상기 면역원성 조성물은 어주번트(adjuvant)를 포함한다. 구현예에서, 상기 어주번트는 사포닌 어주번트이다. 구현예에서, 상기 사포닌 어주번트는 적어도 2개의 이스콤 입자(iscom particle)를 포함하며, 여기서 제1 이스콤 입자는 퀼라자 사포나리아 몰리나(Quillaja Saponaria Molina)의 분획(fraction) A는 포함하지만 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 포함하지 않는다; 제2 이스콤 입자는 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 포함하지만 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A는 포함하지 않는다. 구현예에서, 상기 어주번트에서 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 각각 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량의 합의 약 85 중량% 및 약 15 중량%를 차지한다. 구현예에서, 상기 어주번트에서 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 각각 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량의 합의 약 92 중량% 및 약 8 중량%를 차지한다. 구현예에서, 상기 어주번트에서, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량의 합 중, 각각, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A가 적어도 약 85 중량%를 차지하고, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C가 나머지를 차지한다. 구현예에서, 상기 어주번트에서, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량의 합 중, 각각, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A가 50-96중량%를 차지하고, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C가 나머지를 차지한다. 구현예에서, 상기 면역원성 조성물은 약 25 ㎍ 내지 약 100 ㎍의 어주번트를 포함한다. 구현예에서, 상기 면역원성 조성물은 약 50 ㎍의 어주번트를 포함한다.

[0048] 본 명세서에 기술된 면역원성 조성물을 포함하는 사전충진된 주사기가 본 명세서에 제공된다. 구현예에서, 본 명세서에 기술된 면역원성 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 SARS-CoV-2 또는 이종성(heterogeneous) SARS-CoV-2 바이러스주에 대한 면역 반응을 자극하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 구현예에서, 상기 방법은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 용량의 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 구현예에서, 상기 방법은 제1 용량의 면역원성 조성물 및 상기 제1 용량의 약 3주 후에 제2 용량의 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 구현예에서, 상기 방법은 제1 용량의 면역원성 조성물 및 상기 제1 용량의 약 21일 후에 제2 용량의 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 구현예에서, 상기 방법은 제1 용량의 면역원성 조성물 및 상기 제1 용량의 약 28일 후에 제2 용량의 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 구현예에서, 상기 방법은 적어도 3 용량의 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 제3 용량의 면역원

성 조성물은 상기 제1 또는 제2 용량의 적어도 6개월, 적어도 7개월, 적어도 8개월, 적어도 9개월, 적어도 10개월, 적어도 11개월, 적어도 12개월, 적어도 13개월, 적어도 14개월, 적어도 15개월, 적어도 16개월, 적어도 17개월, 적어도 18개월, 적어도 19개월, 적어도 20개월, 적어도 21개월, 적어도 22개월, 적어도 23개월, 또는 적어도 24개월 후에 투여된다. 구현예에서, 상기 방법은 제1 면역원성 조성물과 상이한 제2 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 구현예에서, 상기 제2 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. 구현예에서, 상기 제2 면역원성 조성물은 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 또는 적어도 4가지 헤마글루티닌(HA) 당단백질을 포함하며, 여기서 각각의 HA 당단백질은 상이한 인프루엔자 바이러스주로부터 유래된다. 구현예에서, 상기 제2 면역원성 조성물은 제1 면역원성 조성물과 상이한 CoV S 당단백질을 포함한다. 구현예에서, 상기 제2 면역원성 조성물은 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 융합(F) 단백질을 포함한다. 구현예에서, 상기 면역원성 조성물은 근육내로 투여된다. 구현예에서, 상기 방법은 사전충진된 주사기로 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 구현예에서, 상기 방법은 면역원성 조성물의 투여 후 적어도 약 2개월, 적어도 약 2.5개월, 적어도 약 3개월, 적어도 약 3.5개월, 적어도 약 4개월, 적어도 약 4.5개월, 적어도 약 5개월, 적어도 약 5.5개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 6.5개월, 적어도 약 7개월, 적어도 약 7.5개월, 적어도 약 8개월, 적어도 약 8.5개월, 적어도 약 9개월, 적어도 약 9.5개월, 적어도 약 10개월, 적어도 약 10.5개월, 적어도 약 11개월, 적어도 약 11.5개월, 적어도 약 12개월, 적어도 13개월, 적어도 14개월, 적어도 15개월, 적어도 16개월, 적어도 17개월, 적어도 18개월, 적어도 19개월, 적어도 20개월, 적어도 21개월, 적어도 22개월, 적어도 23개월, 또는 적어도 24개월 동안 약 50% 내지 약 99%, 약 50% 내지 약 95%, 약 50% 내지 약 90%, 약 50% 내지 약 85%, 약 50% 내지 약 80%, 약 60% 내지 약 99%, 약 65% 내지 약 95%, 약 65% 내지 약 90%, 약 65% 내지 약 85%, 약 69% 내지 약 81%, 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%의 효능으로 COVID-19를 예방한다. 구현예에서, 상기 방법은 면역원성 조성물의 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, 최대 약 12개월, 최대 13개월, 최대 14개월, 최대 15개월, 최대 16개월, 최대 17개월, 최대 18개월, 최대 19개월, 최대 20개월, 최대 21개월, 최대 22개월, 최대 23개월, 또는 최대 24개월 동안 약 50% 내지 약 99%, 약 50% 내지 약 95%, 약 50% 내지 약 90%, 약 50% 내지 약 85%, 약 50% 내지 약 80%, 약 60% 내지 약 99%, 약 65% 내지 약 95%, 약 65% 내지 약 90%, 약 65% 내지 약 85%, 약 69% 내지 약 81%, 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%의 효능으로 COVID-19를 예방한다. 구현예에서, 상기 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주는 B.1.1.529; BA.1, BA.1.1, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5, B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2, AY, B.1.427, B.1.429, B.1.525, B.1.526, B.1.617.1, B.1.617.3, P.2, B.1.621, 또는 B.1.621.1로 이루어진 군으로부터 선택되는 PANGO 계통(lineage)을 갖는다. 구현예에서, 상기 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주는 알파, 베타, 감마, 델타, 엡실론, 아이오타, 카파, 제타, 뮤, 또는 오미크론의 세계 보건 기구 라벨(World Health Organization Label)을 갖는다. 본 명세서에 기술된 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 SARS-CoV-2, 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주, 인프루엔자 바이러스, 또는 이들의 조합에 대한 면역 반응을 자극하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 본 명세서에 기술된 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 SARS-CoV-2, 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주, 인프루엔자 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 또는 이들의 조합에 대한 면역 반응을 자극하는 방법이 본 명세서에 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0049] 본 특허 또는 출원 파일은 컬러로 실행된 적어도 하나의 도면을 포함한다. 컬러 도면(들)을 갖는 본 특허 또는 특허 출원 공개공보의 사본은 특허청에서 용청시 필요한 관납료의 지불과 함께 제공될 것이다.

도 1은 SARS-CoV-2 스파이크(S) 단백질의 야생형 아미노산 서열(서열번호 1)의 개략도를 보여준다. 퓨린 절단 부위 RRAR(서열번호 6)는 굵게 강조되어 있고, 신호 펩티드는 밑줄쳐 있다.

도 2는 불활성 퓨린 절단 부위, 융합 펩티드 결실, 및 K986P 및 V987P 돌연변이를 갖는 SARS-CoV-2 S 폴리펩티

드의 1차 구조를 보여준다. 도메인 위치는 신호 펩티드를 함유하는 SARS-CoV-2(서열번호 1)로부터의 야생형 CoV S 폴리펩티드의 아미노산 서열에 관해 번호가 지정된다.

도 3은 불활성 퓨린 절단 부위, 아미노산 819-828의 융합 펩티드 결실, 및 K986P 및 V987P 돌연변이를 갖는 BV2378 CoV S 폴리펩티드의 1차 구조를 보여준다. 도메인 위치는 신호 펩티드를 함유하는 SARS-CoV-2(서열번호 1)로부터의 야생형 CoV S 폴리펩티드의 아미노산 서열에 관해 번호가 지정된다.

도 4는 CoV S 폴리펩티드 BV2364, BV2365, BV2366, BV2367, BV2368, BV2369, BV2373, BV2374, 및 BV2375의 정제를 보여준다. 상기 데이터는 QQAQ(서열번호 7)의 아미노산 서열을 갖는 불활성 퓨린 절단 부위를 갖는 BV2365(서열번호 4) 및 BV2373(서열번호 87)이 단일 사슬(SO)로 발현됨을 밝힌다. 이와 대조적으로, 온전한 퓨린 절단 부위를 함유하는 CoV S 폴리펩티드(예컨대, BV2364, BV2366, 및 BV2374)는 절단 생성물 S2의 존재에 의해 분명한 것과 같이 절단된다.

도 5는 바이오-층 간섭계법(bio-layer interferometry)에 의해 CoV S 폴리펩티드 BV2361, BV2365, BV2369, BV2365, BV2373, 및 BV2374가 인간 안지오텐신(angiotensin)-전환 효소 2 전구체(hACE2)에 결합함을 보여준다.

도 6은 바이오-층 간섭계법에 의해 SARS-CoV-2로부터의 BV2361이 MERS-CoV 수용체, 디펩티드성 펩티다아제(peptidase) IV(DPP4)에 결합하지 않고, MERS S 단백질이 인간 안지오텐신-전환 효소 2 전구체(hACE2)에 결합하지 않음을 보여준다.

도 7은 효소-결합 면역흡착 에세이(ELISA)에 의해 BV2361가 hACE2에 결합함을 보여준다.

도 8은 BV2373 CoV S 폴리펩티드 및 퓨린 절단 부위에 대한 변형인 K986P, 및 V987P의 1차 구조를 보여준다.

도 9는 야생형 CoV S 폴리펩티드 및 CoV S 폴리펩티드 BV2365 및 BV2373의 정제를 보여준다.

도 10은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질(EMB ID: 21374)의 저온-전자 현미경(cryoEM) 구조 위에 중첩된 BV2373 CoV S 폴리펩티드의 저온-EM 구조를 보여준다.

도 11a 내지 **도 11f**는 CoV S 스파이크 폴리펩티드 BV2365 및 BV2373이 hACE2에 결합함을 보여준다. 바이오-층 간섭계법은 BV2365(**도 11b**) 및 BV2373(**도 11c**)이 야생형 CoV S 폴리펩티드(**도 11a**)와 유사한 해리 동역학(dissociation kinetics)으로 hACE2에 결합함을 밝힌다. ELISA는 야생형 CoV S 폴리펩티드(**도 11d**) 및 BV2365(**도 11e**)는 유사한 친화도로 hACE2에 결합하지만, BV2373은 더 높은 친화도로 hACE2에 결합함을 보여준다(**도 11f**).

도 12a 및 **도 12b**는 hACE2에 대한 CoV S 폴리펩티드 BV2373(**도 12a**) 및 BV2365(**도 12b**)의 결합에 대한 스트레스 조건, 예컨대 온도, 2회의 냉동/해동 사이클, 산화, 교반, 및 극단적 pH의 영향을 보여준다.

도 13a 및 **도 13b**는 분획 A 및 분획 C 이스콤 매트릭스(예컨대, 매트릭스(MATRIX)-M™)가 있거나 없는 2 용량(**도 13a**) 및 1 용량의 0.1 ㎍ 내지 10 ㎍의 BV2373(**도 13b**)으로 마우스를 면역화한 후 13일, 21일, 및 28일에 항-CoV S 폴리펩티드 IgG 역가를 보여준다.

도 14는 매트릭스-M™이 있거나 없는 1 용량 또는 2 용량의 0.1 ㎍ 내지 10 ㎍의 BV2373으로 면역화된 마우스에서 hACE2의 상호작용을 차단하는 항체의 유도를 보여준다.

도 15는 매트릭스-M™이 있거나 없는 1 용량 또는 2 용량의 0.1 ㎍ 내지 10 ㎍의 BV2373로 면역화된 마우스에서 검출된 바이러스 중화 항체를 보여준다.

도 16은 매트릭스-M™이 있거나 없는 단일 용량의 BV2373 또는 14일 떨어진 2 용량의 BV2373 중 하나로 면역화된 Ad/CMV/hACE2 마우스의 폐에서 바이러스 부하(load)(SARS-CoV-2)를 보여준다.

도 17a 내지 **도 17c**는 BV2373로 면역화한 후 마우스에 의해 나타내는 체중 손실을 보여준다. **도 17a**는 단일 0.01 ㎍, 0.1 ㎍, 1 ㎍, 또는 10 ㎍의 BV2373 + 매트릭스-M™을 이용한 면역화의 체중 손실에 대한 효과를 보여준다. **도 17b**는 2 용량의 BV2373(0.01 ㎍, 0.1 ㎍, 1 ㎍) + 매트릭스-M™을 이용한 면역화의 체중 손실에 대한 효과를 보여준다. **도 17c**는 매트릭스-M™의 존재 또는 부재시에 2 용량의 BV2373(10 ㎍)을 이용한 면역화의 체중 손실에 대한 효과를 보여준다.

도 18a 및 **도 18b**는 SARS-CoV-2으로 감염된 후 4일(**도 18a**) 또는 7일(**도 18b**)에 마우스의 폐 조직병리학에 대한 BV2373의 효과를 보여준다.

도 19는 매트릭스-M™의 존재시에 BV2373로 면역화된 마우스와 비교하여 어주번트의 부재시에 BV2373으로 면역

화된 마우스의 비장에서 생체외(*ex vivo*) 자극된 후 IFN-γ 분비 세포의 수를 보여준다.

도 20a 내지 **도 20e**는 매트릭스-M™의 존재 또는 부재시에 BV2373으로 면역화된 마우스의 비장에서 사이토카인(cytokine) 분비 CD4+ T 세포의 빈도를 보여준다. **도 20a**는 IFN-γ 분비 CD4+ T 세포의 빈도를 보여준다. **도 20b**는 TNF-α 분비 CD4+ T 세포의 빈도를 보여준다. **도 20c**는 IL-2 분비 CD4+ T 세포의 빈도를 보여준다. **도 20d**는 IFN-γ, TNF-α, 및 IL-2로부터 선택되는 2가지 사이토카인을 분비하는 CD4+ T 세포의 빈도를 보여준다. **도 20e**는 IFN-γ, TNF-α, 및 IL-2를 발현하는 CD4+ T 세포의 빈도를 보여준다.

도 21a 내지 **도 21e**는 매트릭스-M™의 존재 또는 부재시에 BV2373으로 면역화된 마우스의 비장에서 사이토카인 분비 $CD8^+$ T 세포의 빈도를 보여준다. **도 21a**는 IFN-γ 분비 $CD8^+$ T 세포의 빈도를 보여준다. **도 21b**는 TNF-α 분비 $CD8^+$ T 세포의 빈도를 보여준다. **도 21c**는 IL-2 분비 $CD8^+$ T 세포의 빈도를 보여준다. **도 20d**는 IFN-γ, TNF-α, 및 IL-2로부터 선택되는 2가지 사이토카인을 분비하는 $CD8^+$ T 세포의 빈도를 보여준다. **도 21e**는 IFN-γ, TNF-α, 및 IL-2를 발현하는 $CD8^+$ T 세포의 빈도를 보여준다.

도 22는 매트릭스-M™의 존재 또는 부재시에 BV2373으로 면역화된 마우스의 비장에서 IFN-γ, TNF-α, 및 IL-2로부터 선택되는 1가지(단일), 2가지(이중), 또는 3가지(3중) 사이토카인을 발현하는 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ 세포의 빈도를 도시한다.

도 23a 내지 **도 23c**는 $CD4^+$ T 세포로부터의 타입 2 사이토카인 분비에 대하여, 매트릭스-M™의 존재 또는 부재시에 BV2373로 면역화한 효과를 도시한다. **도 23a**는 IL-4 분비 세포의 빈도를 보여준다. **도 23b**는 IL-5 분비 $CD4^+$ 세포의 빈도를 보여준다. **도 23c**는 IFN-γ 분비 대 IL-4 분비 $CD4^+$ T 세포의 비를 보여준다.

도 24a 및 **도 24b**는 배 중심(germinal center) 형성에 대하여, 매트릭스-M™의 존재 또는 부재시에 BV2373으로 마우스를 면역화한 효과를 $CD4^+$ T 여포 보조 세포(TFH)의 존재를 평가함으로써 도시한다. **도 24a**는 비장에서 $CD4^+$ T 여포 보조 세포의 빈도를 보여주고, 및 **도 24b**는 $CD4^+$ T 여포 보조 세포의 표현형(예컨대, $CD4^+$ $CXCR5^+$ $PD\text{-}1^+$)을 보여준다.

도 25a 및 **도 25b**는 배 중심 형성에 대하여, 매트릭스-M™의 존재 또는 부재시에 BV2373으로 마우스를 면역화한 효과를 배 중심(GC) B 세포의 존재를 평가함으로써 도시한다. **도 25a**는 비장에서 GC B 세포의 빈도를 보여주고, 및 **도 25b**는 $CD4^+$ T 여포 보조 세포의 표현형(예컨대, $CD19^+$ $GL7^+$ $CD\text{-}95^+$)을 밝힌다.

도 26a 내지 **도 26c**는 올리브 개코원숭이(baboon)에서의 항체 반응에 대하여, 매트릭스-M™의 존재 또는 부재시에 BV2373으로 면역화한 효과를 보여준다. **도 26a**는 BV2373으로 면역화한 후 개코원숭이에서 항-SARS-CoV-2 S 폴리펩티드 IgG 역가를 보여준다. **도 26b**는 매트릭스-M™의 존재시에 5 ㎍ 또는 25 ㎍의 BV2373로 단일 면역화한 후 개코원숭이에서 hACE2 수용체 차단 항체의 존재를 보여준다. **도 26c**는 BV2373 및 매트릭스-M™으로 단일 면역화한 후 바이러스 중화 항체의 역가를 보여준다.

도 27은 BV2373으로 면역화한 후 올리브 개코원숭이에서 항-SARS-CoV-2 S 폴리펩티드 IgG 및 중화 항체 역가 사이의 현저한 연관성을 보여준다.

도 28은 매트릭스-M™의 존재 또는 부재시에 BV2373으로 면역화된 올리브 개코원숭이의 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC)에서 IFN-γ 분비 세포의 빈도를 보여준다.

도 29a 내지 **도 29e**는 매트릭스-M™의 존재 또는 부재시에 BV2373으로 면역화된 올리브 개코원숭이의 PBMC에서 사이토카인 분비 CD4+ T 세포의 빈도를 보여준다. **도 29a**는 IFN-γ 분비 CD4+ T 세포의 빈도를 보여준다. **도 29b**는 IL-2 분비 CD4+ T 세포의 빈도를 보여준다. **도 29c**는 TNF-α 분비 CD4+ T 세포의 빈도를 보여준다. **도 29d**는 IFN-γ, TNF-α, 및 IL-2로부터 선택되는 2가지 사이토카인을 분비하는 CD4+ T 세포의 빈도를 보여준다. **도 29e**는 IFN-γ, TNF-α, 및 IL-2를 발현하는 CD4+ T 세포의 빈도를 보여준다.

도 30은 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질(서열번호 109)(BV2384)의 개략도를 보여준다. 퓨린 절단 부위 GSAS(서열번호 97)는 1번 밑줄쳐 있고, K986P 및 V987P 돌연변이는 2번 밑줄쳐 있다.

도 31은 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질(서열번호 86)(BV2373)의 개략도를 보여준다. 퓨린 절단 부위 QQAQ

(서열번호 7)는 1번 밑줄쳐 있고, K986P 및 V987P 돌연변이는 2번 밑줄쳐 있다.

도 32는 CoV S 폴리펩티드 BV2373(서열번호 87) 및 BV2384(서열번호 109)의 정제를 보여준다.

도 33은 정제 후 BV2384(서열번호 109) 순도의 주사 농도계 플롯(scanning densitometry plot)을 보여준다.

도 34는 정제 후 BV2373(서열번호 87) 순도의 주사 농도계 플롯을 보여준다.

도 35a 및 **도 35b**는 BV2373 및 매트릭스-M™의 투여에 대한 반응으로 항-S 항체(**도 35a**) 및 중화 항체(**도 35b**)의 유도를 도시한다. 시노몰구스 마카크(cynomolgus macaque)는 25 ㎍ 또는 50 ㎍의 매트릭스-M™ 어주번트와 함께 1 또는 2 용량(0일 및 21일)의 2.5 ㎍, 5 ㎍, 또는 25 ㎍의 BV2373로 투여되었다. 대조군은 BV2373 또는 매트릭스-M™을 모두 받지 않았다. 항체는 21일 및 33일에 측정되었다.

도 36a 및 **도 36b**는 시노몰구스 마카크에서 기관지폐포 세척(BAL)으로 평가될 때 본 명세서에 개시된 백신 제형물에 의한 SARS-CoV-2 바이러스 복제의 감소를 도시한다. 시노몰구스 마카크는 나타낸 것과 같이 BV2373 및 매트릭스-M™으로 투여되었다. 대상체는 0일에 면역화되었고, 0일 및 21일에 2 용량으로 군을 나누었다. 대상 동물은 37일에 1×10^4 pfu SARS-CoV-2 바이러스로 챌린지(challenge)되었다. 바이러스 RNA(**도 36a**, 존재하는 총 RNA에 해당함) 및 바이러스 서브-게놈 RNA(**도 36b**, 복제하는 바이러스에 해당함) 레벨은 감염성 바이러스로 챌린지-후 2일 및 4일(d2pi 및 d4pi)에 기관지폐포 세척(BAL)으로 평가되었다. 대부분의 대상체는 바이러스 RNA를 보이지 않았다. 2일에 일부 대상체에서 소량의 RNA가 측정되었다. 4일까지, 2.5 ㎍의 가장 낮은 용량에서 2마리 대상체의 경우를 제외하고는 RNA가 측정되지 않았다. 서브-게놈 RNA는, 다시 가장 낮은 용량에서 1마리 대상체를 제외하고는 2일 또는 4일에 검출되지 않았다.

도 37a 및 **도 37b**는 시노몰구스 마카크에서 코 면봉(nasal swab)으로 평가될 때 본 병세서에 개시된 백신 제형물에 의한 SARS-CoV-2 바이러스 복제의 감소를 도시한다. 시노몰구스 마카크는 나타낸 것과 같이 매트릭스-M™과 함께 BV2373으로 투여되었다. 대상체는 0일에 면역화되었고, 0일 및 21일에 2 용량으로 군을 나누었다. 대상 동물은 37일에 1×10^4 SARS-CoV-2 바이러스로 챌린지되었다. 바이러스 RNA(**도 37a**) 및 바이러스 서브-게놈(sg) RNA(**도 37b**)는 감염-후 2일 및 4일(d2pi 및 d4pi)에 코 면봉에 의해 평가되었다. 대부분의 대상체는 바이러스 RNA를 보이지 않았다. 2일 및 4일에 일부 대상체에서 소량의 RNA가 측정되었다. 서브-게놈 RNA는 2일 또는 4일에 검출되지 않았다. 대상체는 0일에 면역화되었고, 0일 및 21일에 2 용량으로 군을 나누었다. 상기 데이터는 백신이 코의 총 바이러스 RNA를 100-1,000배까지, 그리고 sgRNA를 검출불가능한 레벨로 감소시킴을 보이고, 백신에 대한 면역 반응이 바이러스 복제를 차단하고 바이러스 전파를 방지할 것임을 확인한다.

도 38a 및 **도 38b**는 1 용량(**도 38a**) 또는 2 용량의 BV2373 및 25 ㎍ 또는 50 ㎍의 매트릭스-M™(**도 38b**)으로 시노몰구스 마카크를 면역화한 후 21일 및 35일에 항-CoV S 폴리펩티드 IgG 역가를 보여준다.

도 38c 및 **도 38d**는 1 용량(**도 38c**) 또는 2 용량의 BV2373(5 ㎍) 및 매트릭스-M™(25 ㎍ 또는 50 ㎍)(**도 38d**)으로 시노몰구스 마카크를 면역화한 후 21일 및 365일에 시노몰구스 마카크의 hACE2 억제 역가를 보여준다.

도 38e는 BV2373 및 매트릭스-M™을 투여한 후 시노몰구스 마카크에서 항-CoV S 폴리펩티드 IgG 역가 및 hACE2 억제 역가 사이의 현저한 연관성을 보여준다. 데이터는 표 11의 그룹 2-6에 대해 나타나 있다.

도 39는 2 용량의 BV2373 및 매트릭스-M™으로 면역화한 후 또는 표 11의 회복기 인간 혈청(그룹 2, 4, 및 6)으로 면역화한 후 35일에 시노몰구스 마카크의 항-CoV S 폴리펩티드 역가 및 hACE2 억제 역가를 보여준다. 상기 데이터는 BV2373 및 매트릭스-M™으로 면역화된 시노몰구스 마카크의 항-CoV S 폴리펩티드 및 hACE2 억제가 회복기 혈청으로 면역화된 시노몰구스 마카크보다 뛰어남을 보여준다.

도 40a 및 **도 40b**는 세포변성 효과(CPE)(**도 40a**) 및 플라크 감소 중화 테스트(PRNT)(**도 40b**)에 의해 결정될 때 BV2373 및 매트릭스-M™으로 면역화된 시노몰구스 마카크의 SARS-CoV-2 중화 역가를 보여준다.

도 41은 BV2373 및 임의적으로 매트릭스-M™을 포함하는 백신의 안전성 및 효능을 평가하는 임상 시험의 투여 타이밍(timing)을 보여준다. AESI는 특별한 관심이 있는 부작용 사건을 나타낸다. MAEE는 의료진이 검진한 부작용 사건을 나타내고, SAE는 심각한 부작용 사건을 나타낸다.

도 42a 및 **도 42b**는 BV2373 및 매트릭스-M™을 포함하는 백신을 평가하는 임상 시험에서 환자가 경험한 국소(**도 42a**) 및 전신 부작용 사건(**도 42b**)을 보여준다. 그룹 A-E는 표 12에서 확인된다. 상기 데이터는 백신이 내성이 좋고 안전하였음을 보여준다.

도 43a 및 **도 43b**는 BV2373 및 매트릭스-M™을 포함하는 백신을 평가하는 임상 시험에서 참가자를 면역화한 후 21일 및 35일에 항-CoV S 폴리펩티드 IgG(**도 43a**) 및 중화 역가(**도 43b**)를 보여준다. 수평 막대는 각각 사분 범위(IRQ) 및 곡선 아래의 평균 면적을 나타낸다. 휘스커(whisker) 종점은 평균±IQR의 1.5배 이하 또는 이상의 최대 및 최소 값과 같다. 회복기 혈청 패널은 베일러 의과 대학으로부터 PCR-확인된 COVID-19 참가자로부터의 검체(ELISA에 대한 29 검체 및 미세중화에 대한 32 검체(MN $IC_{>99}$))를 포함한다. COVID-19의 증세는 (집중 돌봄 세팅을 포함하는) 입원한 환자의 경우 적색 표시, 외래환자-처리된 환자(응급 부서에서 수집된 샘플)의 경우 청색 표시, 및 무증상(노출된) 환자(접촉/노출 평가로부터 수집된 샘플)의 경우 녹색 표시로 나타낸다.

도 44a 내지 **도 44c**는 회복기 혈청(**도 44a**), 2회 25 ㎍ 용량의 BV2373(**도 44b**), 및 매트릭스-M™과 함께 2 용량(5 ㎍ 및 25 ㎍)의 BV2373(**도 44c**)이 투여된 환자에서 항-CoV S 폴리펩티드 IgG 및 중화 항체 역가 사이의 연관성을 보여준다. 강한 연관성이 회복기 혈청 또는 어주번트화 BV2373으로 처리된 환자에서 중화 항체 역가 및 항-CoV-S IgG 역가 사이에 관찰되었지만, 어주번트 부재시 BV2373로 처리된 환자에서는 그렇지 않았다.

도 45a 내지 **도 45d**는 BV2373로 자극한 후 그룹 A(위약, **도 45a**), B(25 ㎍의 BV2373, **도 45b**), C(5 ㎍의 BV2373 및 50 ㎍ 매트릭스-M™, **도 45c**), 및 D(25 ㎍의 BV2373 및 50 ㎍ 매트릭스-M™, **도 45d**)에서 참가자로부터 T 헬퍼(helper) 1(Th1) 사이토카인인 인터페론-감마(IFN-γ), 종양 괴사 인자-알파(TNF-α), 및 인터루킨(IL)-2 및 T 헬퍼 2(Th2) 사이토카인인 IL-5 및 IL-13 표시된 사이토카인을 생산하는 항원-특이적 $CD4^+$ T 세포의 빈도를 보여준다. Th1 사이토카인 패널에서 "임의의 2"는 동시에 2가지 타입의 Th1 사이토카인을 생산할 수 있는 $CD4^+$ T 세포를 의미한다. "모든 3"은 IFN-γ, TNF-α, 및 IL-2를 동시에 생산하는 $CD4^+$ T 세포를 표시한다. Th2 패널에서 "양쪽"은 Th2 사이토카인인 IL-5 및 IL-13을 동시에 생산할 수 있는 $CD4^+$ T 세포를 의미한다.

도 46a는 서열번호 1에 관해 번호가 지정된 신호 펩티드를 함유하는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩티드의 1차 구조를 보여준다. **도 46b**는 서열번호 2에 관해 번호가 지정된 신호 펩티드가 없는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩티드의 1차 구조를 보여준다.

도 47은 분획 A 및 분획 C 이스콤 매트릭스(매트릭스-M™) 어주번트와 조합한 BV2373의 효능, 면역원성, 및 안전성을 평가한 3상 임상 시험에서 대상체의 무작위화를 보여준다.

도 48은 징후가 있는 COVID-19의 발병(분획 A 및 분획 C 이스콤 매트릭스(매트릭스-M™) 또는 위약과 조합한 BV2373으로 백신화한 후 대상체가 경험한 누적 사건 비율(%))을 보여주는 카플란-마이어(Kaplan-Meyer) 플롯이다.

도 49는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드를 포함하는 SARS-CoV-2 또는 아미노산 69, 70, 및 144의 결실 및 N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, 및 D1118H의 돌연변이를 갖는 CoV S 폴리펩티드를 포함하는 이종성 B.1.1.7 SARS-CoV-2 바이러스주에 대한 분획 A 및 분획 C 이스콤 매트릭스(매트릭스-M™)와 조합한 BV2373의 백신 효능을 보여준다.

도 50은 분획 A 및 분획 C 이스콤 매트릭스(매트릭스-M™)("A"로 표시됨) 또는 위약("B"로 표시됨)과 조합한 BV2373로 제1 백신화 투여("백신화 1"로 표시됨) 및 제2 백신화 투여("백신화 2"로 표시됨) 후 환자가 경험한 부작용 사건을 보여주는 그래프이다.

도 51은 BV2438 CoV S 폴리펩티드의 다이어그램(diagram)을 보여준다. 구조적 요소는 절단가능한 신호 펩티드(SP), N-말단 도메인(NTD), 수용체 결합 도메인(RBD), 하위도메인 1 및 2(SD1 및 SD2), S2 절단 부위(S2'), 융합 펩티드(FP), 헵타드 반복체(heptad repeat) 1(HR1), 중앙 나선(CH), 헵타드 반복체 2(HR2), 막통과 도메인(TM), 및 세포질 꼬리(cytoplasmic tail, CT)를 포함한다. 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드로부터의 아미노산 변화는 선형 다이어그램 아래에 검은 글씨로 나타나 있다.

도 52a는 ~170 kD의 예상된 분자량에서 주된 단백질 생성물을 보여주는 정제된 전장 BV2438의 감소된 SDS-PAGE 겔을 쿠마시 블루(Coomassie blue) 염색으로 보여준다. **도 52b**는 주사 농도계의 그래프를 보여준다. **도 52c**는 BV2438의 음성 염색 투과 전자 현미경 사진을 보여준다. BV2438은 15 nm의 길이 및 11 nm의 폭을 갖는 잘-정의된 전구-형상 입자를 형성한다(왼쪽 패널). 3량체(trimer)는 PS-80 마이셀(micelle)에 연결된 8 nm의 유연한 링커(linker)를 나타내었다(왼쪽 패널). 클래스 평균 이미지는 2D 이미지 위에 중첩된 융합전(prefusion) SARS-CoV-2 3량체성 스파이크 단백질 엑토도메인(PDB ID 6VXX)의 저온-EM 분석 구조와 rS-B.1.351 3량체가 잘 맞는다

는 것을 보여주었다(가운데 패널). 오른쪽 패널은 PS-80 마이셀 내로 고정된 2개의 BV2438 3량체를 보여준다.

도 53은 실시예 10의 마우스 연구 디자인을 보여준다. 마우스의 그룹(n = 20/그룹)은 다양한 조합의 재조합 S(rS) BV2438(SA) 또는 BV2373(WU) 단백질로 연구 0일 및 14일에 프라임(prime)/부스트(boost) 요법(regimen)으로 면역화되었다. 마우스는 BV2438로 프라임 및 부스트되거나, BV2373으로 프라임 및 부스트되거나, BV2373으로 프라임되고 BV2438로 부스트되거나, 또는 2가의(bivalent) BV2373+BV2438로 프라임 및 부스트되었다. 항원 용량은 각각의 1가의(monovalent) 면역화의 경우 1 ㎍ rS, 또는 2가의 면역화시 각각의 구조체에 대해 1 ㎍ rS (총 2 ㎍ rS)였다. 모든 항원 용량은 5 ㎍의 사포닌 어주번트와 함께 투여되었다. 대조군은 제형물 버퍼(위약)를 받았다. 혈청 및 조직은 다이어그램에 나열된 시점에서 수집되었다.

도 54a 및 **도 54b**는 실시예 10의 마우스 연구의 21일에 수집된 혈청에서 항-SARS-CoV-2 S IgG 혈청 역가를 보여준다. ELISA를 사용하여 우한(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 표시하고, 오차 막대는 각각의 그룹에 대한 95% 신뢰 구간(CI)을 나타낸다. 개별 동물 역가는 컬러 기호로 표시되어 있다. **도 54c** 및 **도 54d**는 21일에 수집된 혈청에서 SARS-CoV-2 수용체 hACE2와 우한-Hu-1 스파이크 단백질(**도 54c**) 또는 B.1.351 스파이크 단백질(**도 54d**) 사이의 결합을 파괴할 수 있는 (ELISA에 의해 측정될 때의) 기능적 항체 역가를 보여준다. 막대는 기하 평균 역가(GMT)를 표시하고, 오차 막대는 각각의 그룹에 대한 95% 신뢰 구간(CI)을 나타낸다. 개별 동물 역가는 컬러 기호로 표시되어 있다. **도 54e**는 PRNT 에세이를 이용해 결정된 n = 5 동물/그룹으로부터 32일에 수집된 혈청에서 SARS-CoV-2 중화 항체 역가를 보여준다. 혈청은 SARS-CoV-2 USA-WA1, B.1.351 변이체(variant), 또는 B.1.1.7 변이체를 중화시키기 위한 그 능력에 대해 평가되었다. 막대는 기하 평균 역가(GMT)를 표시하고, 오차 막대는 각각의 그룹에 대한 95% 신뢰 구간(CI)을 나타낸다. 개별 동물 역가는 기호로 표시되어 있다. 통계적 유의성은 $\log_{10}$으로 변환된 데이터에 대해 Tukey 사후 검정을 이용하여 일원(one-way) ANOVA를 수행함으로써 계산되었다.

도 55a 내지 **도 55f**는 살아있는 SARS-CoV-2 B.1.351 또는 B.1.1.7 바이러스를 이용한 챌린지에 대해 우한-Hu-1 또는 B.1.351을 기반으로 한 SARS-CoV-2 rS를 이용한 면역화의 보호 효능을 보여준다. 상기 연구 디자인은 **도 53**에 기술되어 있다. 면역화된 마우스(n = 10/그룹)는 살아있는 SARS-CoV-2 B.1.351(왼쪽 패널) 또는 B.1.1.7 (오른쪽 패널)로 챌린지되었다. 챌린지 후 4일 동안, 마우스는 매일 체중을 재었고, 챌린지한 날의 체중과 비교하여 그 체중 손실 백분율을 계산하였다. **도 55a** 및 **도 55b**는 기호와 함께 평균 백분율 체중 손실을 보여준다. 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다. 마우스 중 절반은 챌린지-후 2일에 희생시켰고, 폐 조직은 플라크 형성 에세이를 거쳐서 폐 바이러스 역가를 결정하였다(**도 55c**, **도 55d**). 남아 있는 마우스는 챌린지-후 4일에 희생시켰다. **도 55e** 및 **도 55f**는 폐 조직에서 SARS-CoV-2 서브게놈 RNA의 레벨을 보여주며, 챌린지-후 2일에 해당 위약 그룹에서의 평균에 대한 RNA의 배수-변화로서 표현되었다. 수평 막대는 각각의 시점에서 n = 5 마우스로부터의 그룹 평균 배수-변화를 나타내고, 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다.

도 56a 내지 **도 56h**는 마우스에서 BV2373 또는 BV2438 요법으로 면역화시 유도된 세포-매개성 면역력을 보여준다. **도 56a**는 마우스 연구 디자인을 보여준다. 마우스의 그룹(n = 8/그룹)은 다양한 조합의 SARS-CoV-2 rS에 기반한 BV2373 또는 BV2438을 이용하여 0일 및 21일에 프라임/부스트 요법으로 면역화되었다. 마우스는 BV2438로 프라임 및 부스트되거나, BV2373으로 프라임 및 부스트되거나, BV2373으로 프라임되고 BV2438로 부스트되거나, 또는 2가의 BV2373 및 BV2438로 프라임 및 부스트되었다. 항원 용량은 각각의 1가의 면역화의 경우 1 ㎍ rS, 또는 2가의 면역화시 각각의 구조체에 대해 1 ㎍ rS(총 2 ㎍ rS)였다. 모든 면역화는 5 ㎍의 매트릭스-M1 어주번트와 함께 투여되었다. 대조군은 제형물 버퍼(위약, n = 5)를 받았다. 세포 수집을 위해 비장을 28일에 수확하였다. 비장세포를 BV2373 또는 BV2438로 자극한 후, ELISA를 거쳐서 대표적인 Th1 사이토카인으로 IFN-γ-양성 세포(**도 56b**) 및 대표적인 Th2 사이토카인으로 IL-5-양성 세포(**도 56c**)를 결정하였다. **도 56b** 및 **도 56c**로부터의 데이터를 사용하여 면역화에 대한 반응의 Th1/Th2 균형을 계산하였다(**도 56d**). **도 56e**는 세포내 사이토카인 염색을 이용해 3가지 Th1 사이토카인(IFN-γ, IL-2, 및 TNF-α)에 대해 양성적으로 염색된 다기능성 CD4+ T 세포가 10^6 CD4+ T 세포 당 3중 사이토카인 양성 세포의 수로서 정량화 및 표현되었음을 보여준다. **도 56f**는 T 여포 보조 세포의 정량화를 보여준다. T 여포 보조 세포는 모든 CD4+ T 세포 중에서 PD-1+CXCR5+ 세포의 백분율을 결정함으로써 정량화되었다. **도 56g**는 배 중심 형성을 보여준다. 배 중심 형성은 유세포 분석을 이용하여 CD19+ B 세포 중에서 GL7+CD95+ 세포의 백분율을 결정함으로써 평가되었다. 회색 막대는 평균을 나타내고, 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다. 개별 동물 데이터는 색상 기호로 나타나 있다. 게이팅 전략(gating strategy)의 예는 **도 56h**에 나타나 있다. 실험 그룹 간의 차이는 Tukey 사후 검정을 이용한 일원 ANOVA에 의해 평가되었다(**도 56b**

의 데이터는 분석 전에 log_{10}으로 변환되었다). P 값 < 0.05을 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다; **** = p < 0.0001.

도 57a 내지 **도 57e**는 BV2373 또는 BV2438을 이용한 면역화로부터 CD4+ 및 CD8+ T 세포 반응을 보여준다. 마우스의 그룹(n = 8/그룹)은 다양한 조합의 BV2373 또는 BV2438을 이용해 0일 및 21일에 프라임/부스트 요법으로 면역화되었다. 마우스는 BV2438로 프라임 및 부스트되거나, BV2373으로 프라임 및 부스트되거나, BV2373으로 프라임되고 BV2438로 부스트되거나, 또는 2가의 BV2373 및 BV2438로 프라임 및 부스트되었다. 항원 용량은 각각의 1가의 면역화의 경우 1 ㎍ rS, 또는 2가의 면역화시 각각의 구조체에 대해 1 ㎍ rS(총 2 ㎍ rS)였다. 모든 항원 용량은 5 ㎍의 사포닌 어주번트와 함께 투여되었다. 대조군은 제형물 버퍼(위약, n = 5)를 받았다. 세포 수집을 위해 비장을 28일에 수확하였다. 단리된 비장세포를 rS-WU1 또는 rS-B.1.351 중 하나로 자극한 후, 세포내 사이토카인 염색을 거쳐서 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 위하여, 세포를 전체 우한-Hu-1 스파이크 단백질 서열에 해당하는 펩티드 풀로 자극한 후, IFN-γ, IL-2, 및 TNF-α에 대한 ICS를 거쳤다(**도 57e**).

도 58a 내지 **도 58g**는 개코원숭이에서 BV2373으로 면역화한 후 대략 1년에 1 또는 2회의 부스터(booster) BV2438 용량의 면역원성을 보여준다. **도 58a**는 연구 디자인을 보여준다. 작은 코호트(cohort)의 개코원숭이(n = 2-3/그룹)는 원래 0일 및 21일(각각 0주 및 3주)에 사포닌 어주번트와 함께 1 ㎍, 5 ㎍, 또는 25 ㎍의 BV2373로, 또는 어주번트 없이 25 ㎍의 BV2373으로 면역화되었다. 대략 1년 후, 모든 동물은 318일 및 339일(각각 45주 및 48주)에 50 ㎍의 사포닌 어주번트와 함께 1 또는 2 용량의 3 ㎍의 BV2438로 부스트되었다. **도 58b**는 연구의 과정에 걸쳐서 항-CoV S IgG 역가를 보여준다. 개별 동물의 역가는 시간에 따라 나타나 있고, 상이한 색상 기호 및 선은 초기 rS-WU1 면역화 시리즈에 대한 상이한 용량 그룹을 나타낸다. BV2438 부스트 전(303일) 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(수평 선은 평균을 나타냄), ELISA에 의한 rS-WU1 또는 rS-B.1.351 및 hACE2 수용체 사이의 상호작용을 파괴할 수 있는 항체 역가(**도 58e,** 수평 선은 평균을 나타냄), 및 PRNT 에세이를 이용해 SARS-CoV-2 바이러스주 USA-WA1, B.1.351, 및 B.1.1.7을 중화할 수 있는 항체 역가(**도 58f**, 회색 막대는 기하 평균을 나타내고, 오차 막대는 95% 신뢰 구간을 나타냄)를 결정하였다. 3가지 Th1 사이토카인(IFN-γ, IL-2, 및 TNF-α)에 대한 다기능성 CD4+ T 세포 양성의 존재는 BV2373 또는 BV2438로 자극한 후 세포내 사이토카인 염색으로 평가하였다(**도 58g**). 회색 막대는 평균을 나타내고, 색상 기호는 개별 동물 데이터를 나타낸다.

도 59a 내지 **도 59g**는 개코원숭이에서 BV2438 부스트에 대한 개별 사이토카인 반응을 보여준다. 작은 코호트의 개코원숭이(n = 2-3/그룹)는 0일 및 21일(각각 0주 및 3주)에 50 ㎍의 사포닌 어주번트와 함께 1 ㎍, 5 ㎍, 또는 25 ㎍의 BV2373로, 또는 어주번트 없이 25 ㎍의 BV2373으로 면역화되었다. 대략 1년 후, 모든 동물은 318일 및 339일(각각 45주 및 48주)에 50 ㎍의 사포닌 어주번트와 함께 1 또는 2 용량의 3 ㎍의 BV2438로 부스트되었다. PBMC는 부스트-전(303일; 43주), 첫번째 rS-B.1.351 부스트 후 7일(325일; 46주), 및 첫번째 rS-B.1.351 부스트 후35일(353일; 50주)에 수집하였다. PBMC는 BV2373 또는 BV2438로 자극하였고, ELISA를 거쳐서 Th1 사이토카인으로서 IFN-γ 생산 세포(**도 59a**) 및 Th2 사이토카인으로서 IL-4 생산 세포(**도 59b**)를 측정하였다. CD4+ T 세포는 또한 BV2373 또는 BV2438으로 자극한 후, ICS를 거쳐서 IFN-γ(**도 59c**), IL-2(**도 59d**), TNF-α(**도 59e**), IL-5(**도 59f**), 및 IL-13(**도 59g**)을 생산하는 세포를 측정하였다.

도 60a 및 **도 60b**는 BV2373으로 면역화된 인간 대상체로부터 SARS-CoV-2 변이체 중화 역가를 보여준다. 임상 연구 참가자(n= 30)로부터의 혈청 샘플은 PRNT 에세이를 거쳐서 B.1.1.7(**도 60a**) 및 B.1.351(**도 60b**)과 비교하여 USA-WA1에 대한 중화 항체의 존재를 결정하였다. 개별 대상체의 역가는 검은 원으로 나타나 있고, 선들은 USA-WA1에 대한 개체의 역가를 해당 변이체에 대한 역가와 연결한다.

도 61은 SARS-CoV-2 변이체(예컨대, B.1.1.529("오미크론"), 델타, 또는 베타 변이체)가 남아프리카 공화국에서 변이체에 의해 유발되는 SARS-CoV-2의 백분율 대비 서열분석된 SARS-CoV-2 감염의 1%를 차지할 때로부터 경과된 날의 수를 플롯팅한다. 상기 플롯은 오미크론 변이체가 보다 신속하게 확산되고 다른 변이체와 경쟁에서 이김을 보여준다.

도 62는 남아프리카 공화국의 츠와니(Tshwane)에서 SARS-CoV-2에 대해 양성인 테스트가 1%로부터 30%로 증가되었음을 보여준다. 오미크론 변이체는 2021년 11월 11일에 처음 발견되었는데, 이는 증가된 양성인 테스트가 오미크론 변이체에 의해 유발되었음을 제시한다.

도 63은 서열번호 1의 서열을 갖는 SARS-CoV-2 단백질의 S 단백질과 비교하여 SARS-CoV-2 오미크론 변이체의 S

단백질에서의 돌연변이를 보여준다.

도 64는 SARS-CoV-2 오미크론 변이체의 S 단백질 내의 돌연변이의 위치를 보여준다. 상기 오미크론 변이체는 RBD 및 NTD에서 다수의 돌연변이; 퓨린 절단 부위에 인접한 돌연변이(H655Y; N679K; P681H); 아미노산 105-107의 결실; 및 뉴클레오캡시드에서 R203K 및 G204R 돌연변이;를 함유한다.

도 65a 내지 **도 65d**는 CoV S 스파이크 폴리펩티드 BV2373(**도 65a**) 및 BV2509(**도 65b**)가 유사한 결합 동역학으로 hACE2에 결합함을 보여준다. ELISA는 BV2373 폴리펩티드(**도 65c**) 및 BV2509(**도 65d**)가 유사한 친화도로 hACE2에 결합함을 보여준다.

도 66a 및 **도 66b**는 다음의 SARS-CoV-2 변이체에 대해 BV2373 및 사포닌 어주번트를 이용한 부스트 전후의 항-S 단백질 IgG 역가를 보여준다: (i) 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질과 비교하여 D614G 돌연변이를 갖는 CoV S 폴리펩티드를 갖는 SARS-CoV-2 바이러스; (ii) SARS-CoV-2 알파 바이러스주, SARS-CoV-2 베타 바이러스주, SARS-CoV-2 델타 바이러스주, 및 SARS-CoV-2 오미크론 바이러스주. **도 66a**는 35일로부터 217일까지의 배수 증가를 보여준다. **도 66b**는 189일로부터 217일까지의 배수 증가를 보여준다.

도 67a 내지 **도 67d**는 다음의 SARS-CoV-2 변이체에 대해 BV2373 및 사포닌 어주번트를 이용한 부스트 전후의 기능적 hACE2 억제를 보여준다: (i) 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질과 비교하여 D614G 돌연변이를 갖는 CoV S 폴리펩티드를 갖는 SARS-CoV-2 바이러스; (ii) SARS-CoV-2 알파 바이러스주, SARS-CoV-2 베타 바이러스주, SARS-CoV-2 델타 바이러스주, 및 SARS-CoV-2 오미크론 바이러스주. **도 67a**는 35일로부터 217일까지의 배수 증가를 보여준다. **도 67b**는 189일로부터 217일까지의 배수 증가를 보여준다. **도 67c**는 35일로부터 217일까지의 배수 증가를 보여준다. **도 67d**는 청소년에서 기능적 hACE2 억제를 보여준다. 청소년(12-18세 연령)은 성인보다 변이체에 대해 2.4-4배 기능적 면역 반응을 나타내었다.

도 68은 실시예 11에 기술된 시험의 참가자에 대한 부스터 투여의 다이어그램을 보여준다.

도 69a 및 **도 69b**는 실시예 11에 기술된 시험의 그룹 B2에서 환자의 국소(**도 69a**) 및 전신(**도 69b**) 반응원성(reactogenicity)을 보여준다.

도 70은 실시예 11에 기술된 환자의 연구일까지 선조형(ancestral) SARS-CoV-2 바이러스주에 대한 혈청 IgG 역가를 보여준다.

도 71은 실시예 11에 기술된 환자의 연구일까지 선조형 SARS-CoV-2 바이러스주에 대한 중화 항체 활성을 보여준다.

도 72는 D614G 돌연변이를 함유하는 SARS-CoV-2 바이러스주, B.1.617.2(델타 변이체), 및 B. 1.1.529(오미크론 변이체)에 대한 실시예 11의 BV2373 및 사포닌 어주번트를 포함하는 면역원성 조성물에 대한 중화 항체 99(neut99) 값을 보여준다.

도 73은 SARS-CoV-2 오미크론 BA.1 변이체, WA1 변이체, 및 델타 변이체에 대한 BV2373, BV2509, 또는 이들의 조합, 및 사포닌 어주번트를 포함하는 면역원성 조성물(실시예 12 참조)에 대한 중화 항체 99(neut99) 값을 보여준다.

도 74a 및 **도 74b**는 SARS CoV-2 오미크론 BA.1 변이체(도 74a) 또는 WA1 변이체(도 74b)로 챌린지한 후 2일에 마우스 폐에서 바이러스 부하를 보여준다. 각각의 조성물은 위약과 비교하여 바이러스 부하를 감소시켰다. 마우스는 실시예 12의 방법에 따라 면역화되었다.

도 75a 내지 **도 75e**는 서열번호 186(**도 75a**); 서열번호 188(**도 75b**); 서열번호 190(**도 75c**); 서열번호 192(**도 75d**), 및 서열번호 87(**도 75e**)의 서열을 갖는 정제된 SARS-CoV-2 S 단백질의 Tris-아세테이트 겔을 보여준다.

도 76a 내지 **도76e**는 서열번호 188(**도 76a**); 서열번호 186(**도 76b**); 서열번호 190(**도 76c**); 서열번호 192(**도 76d**), 및 서열번호 87(**도 76e**)의 아미노산 서열을 갖는 단백질의 입자 크기 분포를 보여준다(실시예 8 참조).

도 77a 내지 **도 77e**는 서열번호 188(**도 77a**); 서열번호 186(**도 77b**); 서열번호 190(**도 77c**); 서열번호 192(**도 77d**), 및 서열번호 87(**도 77e**)의 아미노산 서열을 갖는 SARS-CoV-2 S 단백질의 HPLC-SEC 자취를 보여준다.

도 78a 내지 **도 78e**는 서열번호 188(**도 78a**); 서열번호 186(**도 78b**); 서열번호 190(**도 78c**); 서열번호 192(**도 78d**), 및 서열번호 87(**도 78e**)의 아미노산 서열을 갖는 SARS-CoV-2 S 단백질의 결합 동역학을 보여준다.

도 79a 내지 **도 79e**는 서열번호 188(**도 79a**); 서열번호 186(**도 79b**); 서열번호 190(**도 79c**); 서열번호 192(**도**

79d), 및 서열번호 87(**도 79e**)의 아미노산 서열을 갖는 SARS-CoV-2 S 단백질의 hACE2에 대한 결합을 보여준다.

도 80a 내지 **도 80e**는 서열번호 188(**도 80a**); 서열번호 186(**도 80b**); 서열번호 190(**도 80c**); 서열번호 192(**도 80d**), 및 서열번호 87(**도 80e**)의 아미노산 서열을 갖는 SARS-CoV-2 S 단백질의 열적 안전성을 보여준다.

도 81은 서열번호 2; 서열번호 188; 및 서열번호 92의 아미노산 서열을 갖는 SARS-CoV-2 S 단백질의 결정 구조를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] ***정의***

[0051] 본 명세서, 및 첨부된 청구항에서 사용될 때, 단수 형태인 "한", "하나", 및 "상기"는 문맥이 달리 명확하게 지시하지 않는 한, 복수의 참조물을 포함한다. 따라서, 예를 들면, "단백질"에 대한 인용은 하나의 단백질 또는 이러한 단백질의 혼합물을 나타낼 수 있고, "방법"에 대한 인용은 본 기술분야의 기술자에게 알려진 동등한 단계 및/또는 방법에 대한 인용을 포함하는 등이다.

[0052] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "어주번트"는, 면역원(immunogen)과 조합해 사용될 때, 상기 면역원에 대해 유도되는 면역 반응을 증대시키거나 달리 변경 또는 변형시키는 화합물을 나타낸다. 면역 반응의 변형은 항체 및 세포성 면역 반응 중 하나 또는 모두의 특이성을 강화 또는 넓히는 것을 포함할 수 있다.

[0053] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "약" 또는 "대략"은 숫자 값의 앞에 기재될 때 ±10%의 범위를 나타낸다. 예를 들면, "약 100"은 90 내지 110을 포괄한다.

[0054] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "면역원", "항원", 및 "에피토프"는 면역 반응을 일으킬 수 있는 당단백질, 및 펩티드를 포함하는 단백질과 같은 물질을 나타낸다.

[0055] 본 명세서에서 사용될 때, "면역원성 조성물"은 항원을 포함하는 조성물이며, 상기 조성물을 대상체에게 투여할 때 상기 대상체에서 항원에 대한 체액성 및/또는 세포성 면역 반응의 발생을 야기한다.

[0056] 본 명세서에서 사용될 때, "서브유닛" 조성물, 예를 들면 백신은 병원체로부터의 하나 이상의 선택된 항원을 포함하지만 모든 항원을 포함하지는 않는다. 이러한 조성물은 온전한 바이러스 또는 이러한 세포 또는 입자의 용해물(lysate)이 실질적으로 없으며, 전형적으로 병원체로부터 적어도 부분적으로 정제되거나, 종종 실질적으로 정제된 면역원성 폴리펩티드로부터 제조된다. 본 명세서에 개시된 서브유닛 조성물 내의 항원은 전형적으로 종종 바큘로바이러스 시스템을 이용해 재조합적으로 제조된다.

[0057] 본 명세서에서 사용될 때, "실질적으로"는 물질이 이것이 함유되는 샘플의 다수의 백분율을 형성하게 하는 물질(예컨대, 화합물, 폴리뉴클레오티드, 또는 폴리펩티드)의 단리를 나타낸다. 예를 들면, 샘플에서, 실질적으로 정제된 성분은 85%, 바람직하게는 85%-90%, 보다 바람직하게는 적어도 95%-99.5%, 가장 바람직하게는 적어도 99%의 샘플을 포함한다. 성분이 실질적으로 교체되면, 샘플 내에 남아있는 양은 약 0.5% 내지 약 10% 이하, 바람직하게는 약 0.5% 내지 약 1.0% 미만이다.

[0058] 용어 "치료하다", "치료", 및 "치료하는"은, 본 명세서에서 사용될 때, 유익하거나 원하는 결과, 예를 들면, 임상적 결과를 얻기 위한 접근법을 나타낸다. 본 개시의 목적을 위하여, 유익하거나 원하는 결과는 감염 또는 질환의 개시 또는 진행을 억제 또는 저해하는 것; 감염 또는 질환의 징후의 발생을 완화 또는 감소시키는 것; 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0059] "방지"는, 본 명세서에서 사용될 때, "예방"과 상호교환적으로 사용되며, 감염 또는 질환의 완전한 방지, 또는 감염 또는 질환의 징후의 발생의 방지; 감염 또는 질환 또는 그 징후의 발병에서의 지연; 또는 이후 발생된 감염 또는 질환 또는 그 징후의 증세에서의 감소;를 의미할 수 있다.

[0060] 본 명세서에서 사용될 때, "유효 용량" 또는 "유효량"은 병원체 감염의 적어도 하나의 징후를 감소시키는 면역 반응을 유도하기에 충분한 면역원의 양을 나타낸다. 유효 용량 또는 유효량은, 예컨대, 플라크 중화, 보체 고정, 효소-결합 면역흡착(ELISA), 또는 미세중화 에세이에 의해, 예컨대, 중화하는 분비성 및/또는 혈청 항체의 양을 측정함으로써 결정될 수 있다.

[0061] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "백신"은 보호성 면역력(예컨대, 병원체를 이용한 감염에 대해 대상체를 보호하거나, 및/또는 병원체를 이용한 감염에 의해 유발되는 질환 또는 증상의 증세를 감소시키는 면역력)을 제공하는 병원체에 대한 면역 반응을 유도하기 위해 사용되는 병원체로부터 유래되는 면역원과 같은 면역원성 조성물을

나타낸다. 상기 보호성 면역 반응은 항체 및/또는 세포-매개성 반응의 형성을 포함할 수 있다. 문맥에 따라, 용어 "백신"은 또한 보호성 면역력을 생성하기 위해 대상체에게 투여되는 면역원의 현탁액 또는 용액을 나타낼 수 있다.

[0062] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "대상체"는 인간 및 다른 동물을 포함한다. 전형적으로, 상기 대상체는 인간이다. 예를 들면, 상기 대상체는 성인, 10대, 어린이(2세 내지 14세의 연령), 유아(출생 내지 2세), 또는 신생아(2개월까지)일 수 있다. 특정 측면에서, 상기 대상체는 최대 4개월까지의 연령, 또는 최대 6개월까지의 연령이다. 한 측면에서, 상기 성인은 약 65세 또는 그 이상, 또는 약 60세 또는 그 이상의 어른이다. 한 측면에서, 상기 대상체는 임신한 여성 또는 임신의 의향이 있는 여성이다. 다른 측면에서, 대상체는 인간이 아니다; 예를 들면, 비-인간 영장류, 예를 들면, 개코원숭이, 침팬지, 고릴라, 또는 마카크이다. 소정 측면에서, 상기 대상체는 반려동물, 예컨대 개 또는 고양이일 수 있다.

[0063] 한 측면에서, 상기 대상체는 면역손상되어 있다. 구현예에서, 상기 면역손상된 대상체는 면역억제를 유발하는 약이 투여된다. 면역억제를 유발하는 약의 비제한적 예는 코르티코스테로이드(예컨대, 프레드니손), 알킬화제(예컨대, 시클로포스파미드), 항대사물질(예컨대, 아자티오프린 또는 6-메르캅토퓨린), 이식-관련 면역역제 약물(예컨대, 시클로스포린, 타크롤리무스, 시롤리무스, 또는 마이코페놀레이트 모페틸), 미톡산트론, 화학치료제, 메토트렉세이트, 종양 괴사 인자(TNF)-차단제(예컨대, 에타네르셉트, 아달리무맙, 인플릭시맙)를 포함한다. 구현예에서, 상기 면역손상된 대상체는 바이러스(예컨대, 인간 면역결핍 바이러스 또는 엡스테인-바 바이러스)로 감염된다. 구현예에서, 상기 바이러스는 호흡기 바이러스, 예컨대 호흡기 세포융합 바이러스, 인프루엔자, 파라인플루엔자, 아데노바이러스, 또는 피코르나바이러스이다. 구현예에서, 상기 면역손상된 대상체는 후천성 면역결핍 증후군(AIDS)을 갖는다. 구현예에서, 상기 면역손상된 대상체는 인간 면역결핍 바이러스(HIV)와 함께 살아가는 사람이다. 구현예에서, 상기 면역손상된 대상체는 염증을 방지하거나 이식의 거부를 방지하도록 디자인된 치료 요법으로 인해 면역손상된다. 구현예에서, 상기 면역손상된 대상체는 이식을 받은 대상체이다. 구현예에서, 상기 면역손상된 대상체는 방사선 치료법 또는 비장절제술을 받았다. 구현예에서, 상기 면역손상된 대상체는 암, 자가면역 질환, 결핵, 물질 사용 장애(예컨대, 알코올, 오피오이드, 또는 코카인 사용 장애), 뇌졸중 또는 뇌혈관 질환, 고형 장기 또는 혈액 줄기 세포 이식, 겸상 세포 질환, 지중해빈혈, 자가면역 림프구증식 증후군(ALPS), 자가면역 다선성 증후군 타입 1(APS-1), NF-κB를 갖는 B-세포 확장 및 T-세포 아네르기(BENTA) 질환, 카스파아제 8 결핍 상태(CEDS), 만성 육아종 질환(CGD), 공통 가변성 면역결핍(CVID), 선천성 호중구감소 증후군, 세포독성 T-림프구-연관 항원 4(CTLA-4)의 결핍, DOCK8 결핍, GATA2 결핍, 면역결핍을 갖는 글리코실화 장애, 고-면역글로불린 E 증후군(HIES), 고-면역글로불린 M 증후군, 당뇨병, 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병, 인터페론 감마 결핍, 인터루킨 12 결핍, 인터루킨 23 결핍, 백혈구 부착 결핍, 리포폴리사카라이드-반응성 베이지-유사 고정(LRBA) 결핍, PI3 키나아제(kinase) 질환, PLCG2-연관 항체 결핍 및 면역조절장애(PLAID), 중증 복합 면역결핍(SCID), STAT3 우성-음성 질환, STAT3 기능-획득 질환, 사마귀, 저감마글로불린혈증, 감염, 및 호산구 골수정체(myelokathexis)(WHIM) 증후군, 비스코트-알드리치(Wisckott-Aldrich) 증후군(WAS), X-연관 무감마글로불린혈증(XLA), X-연관 림프구증식 질환(XLP), 요독증, 영양실조, 또는 XMEN 질환으로 진단되었다. 구현예에서, 상기 면역손상된 대상체는 현재 또는 과거에 담배 흡연자이다. 구현예에서, 상기 면역손상된 대상체는 B-세포 결함, T-세포 결함, 대식세포 결함, 사이토카인 결함, 식세포 결핍, 식세포 기능장애, 보체 결핍 또는 이들의 조합을 갖는다.

[0064] 구현예에서, 상기 대상체는 과체중 또는 비만이다. 구현예에서, 과체중 대상체는 ≥ 25 kg/㎡ 및 < 30 kg/㎡의 신체 질량 지수(BMI)를 갖는다. 구현예에서, 비만 대상체는 ≥ 30 kg/㎡인 BMI를 갖는다. 구현예에서, 상기 대상체는 정신 건강 증상을 갖는다. 구현예에서, 상기 정신 건강 증상은 우울증, 조현병, 또는 불안증이다.

[0065] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "약학적으로 허용가능한"은 미국 연방 또는 주 정부의 규제 기관에 의해 승인되거나, 포유동물, 보다 구체적으로는 인간에서 사용하기 위해 미국 약전, 유럽 약전 또는 다른 일반적으로 인정된 약전에서 열거된 것을 의미한다. 상기 조성물은 척추동물에서 보호성 면역 반응을 유도하기 위한 백신 및/또는 항원성 조성물로서 유용할 수 있다.

[0066] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "약"은 표시된 숫자 값의 ±10%를 의미한다.

[0067] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "NVX-CoV2373"은 BV2373 스파이크 당단백질(서열번호 87) 및 분획 A 및 분획 C 이스콤 매트릭스(예컨대, 매트릭스-M™)를 포함하는 백신 조성물을 나타낸다.

[0068] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "변형"은, 이것이 CoV S 폴리펩티드를 나타낼 때, CoV S 폴리펩티드의 하나 이상의 아미노산의 돌연변이, 결실, 또는 부가를 나타낸다. CoV S 폴리펩티드 내의 변형의 위치는 폴리펩티드의

서열을 서열번호 1(CoV S 폴리펩티드 함유 신호 펩티드) 또는 서열번호 2(신호 펩티드가 없는 성숙한 CoV S 폴리펩티드)와 정렬하는 것에 기반해 결정될 수 있다.

[0069] 본 명세서에서 "이종성 SARS-CoV-2 바이러스주"와 상호교환적으로 사용되는 용어 SARS-CoV-2 "변이체"는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 SARS-CoV S 폴리펩티드와 비교할 때 하나 이상의 변형을 갖는 CoV S 폴리펩티드를 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스를 나타낸다. 예를 들면, SARS-CoV-2 변이체는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드와 비교할 때 적어도 약 2, 적어도 약 3, 적어도 약 4, 적어도 약 5, 적어도 약 6, 적어도 약 7, 적어도 약 8, 적어도 약 9, 적어도 약 10, 적어도 약 11, 적어도 약 12, 적어도 약 13, 적어도 약 14, 적어도 약 15, 적어도 약 16, 적어도 약 17, 적어도 약 18, 적어도 약 19, 적어도 약 20, 적어도 약 21, 적어도 약 22, 적어도 약 23, 적어도 약 24, 적어도 약 25, 적어도 약 26, 적어도 약 27, 적어도 약 28, 적어도 약 29, 적어도 약 30, 적어도 약 31, 적어도 약 32, 적어도 약 33, 적어도 약 34, 또는 적어도 약 35개 변형을 가질 수 있다. 예를 들면, SARS-CoV-2 변이체는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드와 비교할 때 적어도 하나 및 최대 2, 최대 3, 최대 4, 최대 5, 최대 6, 최대 7, 최대 8, 최대 9, 최대 10, 최대 11, 최대 12, 최대 13, 최대 14, 최대 15, 최대 16, 최대 17, 최대 18, 최대 19, 최대 20, 최대 21, 최대 22, 최대 23, 최대 24, 최대 25, 최대 26, 최대 27, 최대 28, 최대 29, 최대 30, 최대 31, 최대 32, 최대 33, 최대 34, 최대 35개 변형, 최대 40개 변형, 최대 45개 변형, 최대 50개 변형, 최대 55개 변형, 최대 60개 변형, 최대 65개 변형, 최대 70개 변형, 최대 75개 변형, 최대 80개 변형, 최대 85개 변형, 최대 90개 변형, 최대 95개 변형, 또는 최대 100개 변형을 가질 수 있다. 한 측면에서, SARS-CoV-2 변이체는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드와 비교할 때 약 2 내지 약 35개 변형, 약 5 내지 약 10개 변형, 약 5 내지 약 20개 변형, 약 10 내지 약 20개 변형, 약 15 내지 약 25개 변형, 약 20 내지 30개 변형, 약 20 내지 약 40개 변형, 약 25 내지 약 45개 변형, 약 25 내지 약 100개 변형, 약 25 내지 약 45개 변형, 약 35 내지 약 100개 변형을 가질 수 있다.

[0070] 구현예에서, 상기 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드와 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 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 폴리펩티드를 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스이다. 구현예에서, 상기 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드와 약 70% 내지 약 99.9% 동일성을 갖는 CoV S 폴리펩티드를 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스이다. 구현예에서, 상기 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드와 약 70% 내지 약 99.5% 동일성을 갖는 CoV S 폴리펩티드를 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스이다. 구현예에서, 상기 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드와 약 90% 내지 약 99.9% 동일성을 갖는 CoV S 폴리펩티드를 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스이다. 구현예에서, 상기 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드와 약 90% 내지 약 99.8% 동일성을 갖는 CoV S 폴리펩티드를 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스이다. 구현예에서, 상기 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드와 약 95% 내지 약 99.9% 동일성을 갖는 CoV S 폴리펩티드를 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스이다. 구현예에서, 상기 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드와 약 95% 내지 약 99.8% 동일성을 갖는 CoV S 폴리펩티드를 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스이다. 구현예에서, 상기 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드와 약 95% 내지 약 99% 동일성을 갖는 CoV S 폴리펩티드를 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스이다. 구현예에서, 상기 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주는 알파, 베타, 감마, 델타, 엡실론, 에타, 아이오타, 카파, 제타, 뮤, 또는 오미크론의 세계 보건 기구 라벨을 갖는다. 구현예에서, 상기 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주는 B.1.1.529; BA.1, BA.1.1, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5, B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2, AY, B.1.427, B.1.429, B.1.525, B.1.526, B.1.617.1, B.1.617.3, P.2, B.1.621, 또는 B.1.621.1로 이루어진 군으로부터 선택되는 PANGO 계통을 갖는다. 다음의 문서는 Pango 계통 지정을 기술하고, 그 전체 내용이 인용에 의해 본 명세서에 통합된다: O'Toole et al. BMC Genomics, 23, 121 (2022).

[0071] 구현예에서, 상기 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주는 오미크론의 세계 보건 기구 라벨을 갖는다. 구현예에서, 오미크론의 세계 보건 기구 라벨을 갖는 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주는 서열번호 2의 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩티드와 비교하여 적어도 35개 변형을 갖는다. 구현예에서, 오미크론의 세계 보건 기구 라벨을 갖는 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주는 서열번호 2의 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩티드와 비교하여 35 내지 55, 35 내지 65, 35 내지 75, 35 내지 85, 35 내지 95, 또는 35 내지 105개 변형을 갖는다. 구현예에서, 상기 변형은 T6I, T6R, A14S, A54V, V70A, T82I, G129D, H133Q, K134E, W139R, E143G, F144L, Q170E, I197V, L199I, V200E, V200G, G239V, G244S, G326D, G326H, R333T, L355I, S358F, S358L, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N,

N427K, K431T, V432P, G433S, L439R, L439Q, N447K, S464N, T465K, E471A, F473V, F473S, F477S, Q480R, G483S, Q485R, N488Y, Y492H, T534K, T591I, D601G, G626V, H642Y, N645S, N666K, P668H, S691L, N751K, D783Y, N843K, Q941H, N956K, L968F, D1186N, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 아미노산 130의 결실, 아미노산 131의 결실, 아미노산 132의 결실, 아미노산 144의 결실, 아미노산 145의 결실, 아미노산 198의 결실, 및 아미노산 214 및 215 사이에 EPE의 아미노산 서열을 갖는 트리펩티드의 삽입, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0072] 구현예에서, 상기 변이체의 CoV S 폴리펩티드는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형의 조합을 포함한다:

[0073] (i) A54V, T82I, G129D, L199I, G326D, S358L, S360P, S362F, K404N, N427K, G433S, S464N, T465K, E471A, Q480R, G483S, Q485R, N488Y, Y492H, T534K, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, N843K, Q941H, N956K, L968F, 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 아미노산 130의 결실, 아미노산 131의 결실, 아미노산 132의 결실, 아미노산 198의 결실, 및 아미노산 214 및 215 사이에 EPE의 아미노산 서열을 갖는 트리펩티드의 삽입;

[0074] (ii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, S464N, T465K, E471A, Q480R, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실;

[0075] (iii) T6R, A14S, T82I, G129D, E143G, L199I, G326D, S358L, S360P, K404N, N427K, G433S, S464N, T465K, E471A, Q480R, G483S, Q485R, N488Y, Y492H, T534K, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, N843K, Q941H, N956K, L968F, 아미노산 144의 결실, 아미노산 145의 결실, 아미노산 198의 결실, 및 아미노산 214 및 215 사이에 EPE의 아미노산 서열을 갖는 트리펩티드의 삽입;

[0076] (iv) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, K404N, N427K, L439Q, S464N, T465K, E471A, Q480R, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, S691L, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실;

[0077] (v) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, S464N, T465K, E471A, Q480R, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실;

[0078] (vi) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, D601G, H642Y, N645S, N666K, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

[0079] (vii) V3G, T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, G626V, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

[0080] (viii) V3G, T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

[0081] (ix) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

[0082] (x) T6I, A14S, G129D, K134E, W139R, F144L, I197V, V200G, G244S, G326H, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, G433S, N447K, S464N, T465K, E471A, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실;

[0083] (xi) T6I, A14S, G129D, K134E, W139R, F144L, I197V, V200G, G244S, G326H, R333T, S358F, S360P, S362F,

T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, G433S, L439R, N447K, S464N, T465K, E471A, F473S, Q485R, N488Y, Y492H, T591I, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, D1186N, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실;

[0084] (xii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N645S, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

[0085] (xiii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

[0086] (xiv) T6I, A14S, V70A, G129D, H133Q, Q170E, V200E, G239V, G326H, R333T, L355I, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, V432P, G433S, N447K, S464N, T465K, E471A, F473S, F477S, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 및 아미노산 131의 결실;

[0087] (xv) T6I, A14S, G129D, H133Q, Q170E, V200E, G326H, R333T, L355I, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, V432P, G433S, N447K, S464N, T465K, E471A, F473S, F477S, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 및 아미노산 131의 결실;

[0088] (xvi) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, K431T, L439R, N447K, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

[0089] (xvii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, K431T, L439R, N447K, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실; 및

[0090] (xviii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 및 아미노산 131의 결실;

[0091] (xix) 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 및 아미노산 131의 결실, N488Y, A557D, D601G, P668H 또는 P668R, T703I, S969A, 및 D1105H;

[0092] (xx) D67A, K404N, E471K, N488Y, D601G, 및 A688V;

[0093] (xxi) D67A, D202G, L229H, K404N, E471K, N488Y, D601G, 및 A688V;

[0094] (xxii) D67A, D202G, 아미노산 228-230 중 1, 2, 또는 3개 아미노산의 결실, K404N, E471K, N488Y, D601G, 및 A688V;

[0095] (xxiii) D67A, L229H, R233I, N488Y, K404N, E471K, D601G, 및 A688V;

[0096] (xxiv) L5F, T7N, P13S, D125Y, R177S, K404T, E471K, N488Y, D601G, H642Y, T1014I, 및 V1163F;

[0097] (xxv) W139C 및 L439;

[0098] (xxvi) 아미노산 144의 결실, 아미노산 145의 결실, T6R, E143G, L439R, T465K, D601G, P668R, 및 D937N;

[0099] (xxvii) 아미노산 144의 결실, 아미노산 145의 결실, T6R, G129D, E143G, L439R, T465K, D601G, P668R, 및 D937N;

[0100] (xxviii) 아미노산 144의 결실, 아미노산 145의 결실, T6R, T82I, G129D, Y132H, E143G, A209V, K404N L439R,

T465K, D601G, P668R, 및 D937N;

[0101] (xxix) 아미노산 144의 결실, 아미노산 145의 결실, T6R, G129D, E143G, W245I, K404N, N426K, L439R, T465K, E471K, N488Y, D601G, P668R, 및 D937N;

[0102] (xxx) 아미노산 144의 결실, 아미노산 145의 결실, T6R, W51H, H53W, G129D, E143G, D200V, L201R, W245I, K404N, N426K, L439R, T465K, E471K, N488Y, D601G, P668R, 및 D937N;

[0103] (xxxi) 아미노산 144의 결실, 아미노산 145의 결실, T6R, G129D, E143G, K404N, L439R, T465K, E471Q, D601G, P668R, 및 D937N;

[0104] (xxxii) Q39R, A54V, E471K; D601G, Q664H, F875L, 및 아미노산 56, 57, 131, 132 중 1, 2, 3, 또는 4개의 결실;

[0105] (xxxiii) T82I, D240G, E471K, D601G, 및 A688V;

[0106] (xxxiv) L439R, E471Q, D601G, P668R, 및 Q1058H;

[0107] (xxxv) G62V, T63I, R233N, L439Q, F477S, D601G, T846N, 및 아미노산 234-240 중 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 결실;

[0108] (xxxvi) T82I, Y131S, Y132N, R333K, E471K, N488Y, D601G, P668H, 및 D937N; 및

[0109] (xxxvii) G129D, G326D, S360P, S362F, K404N, N427K, T465K, E471A 또는 E471K, Q480K 또는 Q480R, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, 및 N953K;

[0110] 여기서, 상기 CoV S 당단백질의 아미노산은 서열번호 2의 서열을 갖는 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다.

[0111] 본 명세서에 기술된 면역원성 조성물 또는 백신 조성물의 "효능"이란 용어는 면역원성 조성물이 투여되지 않은 그룹과 비교할 때 면역원성 조성물이 투여된 그룹에서 질환(예컨대, COVID-19)의 백분율 감소를 나타낸다. 구현예에서, 효능(E)은 다음의 방정식을 이용해 계산된다: E (%) = (1 - RR) × 100, 여기서 RR = 면역원성 조성물이 투여된 그룹 및 면역원성 조성물이 투여되지 않은 그룹 사이의 발병률의 상대적 위험성. 구현예에서, 본 명세서에 기술된 면역원성 조성물은 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 SARS-CoV-2 바이러스 또는 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주에 대한 효능을 갖는다.

[0112] ***코로나바이러스(CoV) 스파이크(S) 단백질을 함유하는 백신 조성물***

[0113] 본 개시는 비-자연적으로 발생하는 코로나바이러스(CoV) 스파이크(S) 폴리펩티드, CoV S 폴리펩티드를 함유하는 나노입자, 및 비-자연적으로 발생하는 CoV S 폴리펩티드 또는 CoV S 폴리펩티드를 함유하는 나노입자 중 하나를 함유하는 면역원성 조성물 및 백신 조성물을 제공한다. 구현예에서, SARS-CoV-2 바이러스 또는 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주에 대한 면역 반응을 자극하기 위하여 CoV S 폴리펩티드, 나노입자, 면역원성 조성물, 및 백신 조성물을 이용하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 구현예에서, 상기 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주는 B.1.1.529; BA.1, BA.1.1, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5, B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2, AY, B.1.427, B.1.429, B.1.525, B.1.526, B.1.617.1, B.1.617.3, P.2, B.1.621, 또는 B.1.621.1로 이루어진 군으로부터 선택되는 PANGO 계통을 갖는다. 구현예에서, 상기 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주는 알파, 베타, 감마, 델타, 엡실론, 에타, 아이오타, 카파, 제타, 뮤, 또는 오미크론의 세계 보건 기구 라벨을 갖는다.

[0114] 상기 나노입자 및 백신 조성물을 제조하는 방법이 또한 본 명세서에 제공된다. 유리하게는, 상기 방법은 다른 단백질, 예컨대 곤충 세포에서 단백질의 재조합 발현과 연관되는 단백질에 의한 오염이 실질적으로 없는 나노입자를 제공한다. 구현예에서, 발현은 바큘로바이러스/Sf9 시스템에서 일어난다.

[0115] *CoV S 폴리펩티드 항원*

[0116] 본 개시의 백신 조성물은 비-자연적으로 발생하는 CoV S 폴리펩티드를 함유한다. CoV S 폴리펩티드는 SARS-CoV-2를 비제한적으로 포함하는 코로나바이러스, 예를 들면 SARS-CoV-2, MERS CoV, 및 SARS CoV로부터 유래될 수 있

다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주로부터 유래된다.

[0117] 상기 SARS-CoV S 단백질과 대조적으로, 상기 SARS-CoV-2 S 단백질은 S1/S2 절단 부위에 4개 아미노산 삽입을 가져서 다염기성 RRAR 퓨린-유사 절단 모티프(motif)를 야기한다. 상기 SARS-CoV-2 S 단백질은 비-공유결합으로 연결되어 융합전 3량체를 형성하도록 남아 있는 S1 및 S2 서브유닛으로 퓨린 절단 부위에서 단백질분해적으로 절단된 불활성 전구체(SO)로서 합성된다. 상기 SARS-CoV-2 S 단백질의 S2 도메인은 융합 펩티드(FP), 2개의 헵타드 반복체(HR1 및 HR2), 막통과(TM) 도메인, 및 세포질 꼬리(CT)를 포함한다. 상기 SARS-CoV-2 S 단백질의 S1 도메인은 4개의 별개의 도메인으로 접힌다: N-말단 도메인(NTD) 및 수용체 결합 도메인(RBD)을 함유하는 C-말단 도메인 및 2개의 하위도메인 SD1 및 SD2. 상기 융합전 SARS-CoV-2 S 단백질 3량체는 S-단백질 수용체 결합 및 절단시 융합전으로부터 융합후 입체형태로 구조적 재배열이 일어난다.

[0118] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 번역-후 글리코실화로 인해 당단백질이다. 상기 당단백질은 신호 펩티드, S1 서브유닛, S2 서브유닛, NTD, RBD, 2개의 하위도메인(SD1 및 SD2, **도 46a** 및 **도 46b**에서 SD1/2로 표시되고, 본 명세서에서 "SD1/2"로 나타냄), 온전한 또는 변형된 융합 펩티드, HR1 도메인, HR2 도메인, TM, 및 CD 중 하나 이상을 포함한다. 구현예에서, 각각의 도메인에 대한 아미노산은 **도 2** 및 **도 46a**(서열번호 1에 따라 나타냄), **도 46b**(서열번호 2에 따라 나타냄), 및 **도 3**(서열번호 1에 대응해 나타냄)에 제공된다. 구현예에서, 각각의 도메인은 서열번호 1 또는 서열번호 2에서와 같은 각각의 도메인에 대한 서열과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5% 동일성을 가질 수 있다. 각각의 도메인은 서열번호 1 또는 서열번호 2에 나타낸 경우와 비교하여 최대 약 1, 최대 약 2, 최대 약 3, 최대 약 4, 최대 약 5, 최대 약 10, 최대 약 20, 또는 최대 약 30개 아미노산의 결실, 삽입, 또는 돌연변이를 가질 수 있다. 각각의 도메인은 서열번호 1 또는 서열번호 2에 나타낸 경우와 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 12 내지 17개 아미노산, 약 15 내지 20개 아미노산, 약 18 내지 23개 아미노산, 약 20 내지 25개 아미노산, 약 22 내지 약 27개 아미노산, 또는 약 25 내지 30개 아미노산의 결실, 삽입, 또는 돌연변이를 가질 수 있다. **도 2** 및 **도 3**은 성숙한 펩티드로부터는 없는 13-아미노산의 N-말단 신호 펩티드를 도시함을 주목한다. 상기 CoV S 폴리펩티드는 자연형 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드에 대한 면역 반응을 자극하기 위해 사용될 수 있다.

[0119] 구현예에서, 상기 자연형 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 2)는 변형되어서 비-자연적으로 발생하는 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드(**도 1**)를 야기한다. 구현예에서, 상기 CoV 스파이크(S) 당단백질은 S1 서브유닛 및 S2 서브유닛을 포함하며, 여기서 상기 S1 서브유닛은 NTD, RBD, SD1/2, 및 불활성 퓨린 절단 부위(아미노산 669-672)를 포함하고, 상기 S2 서브유닛은 아미노산 973 및 974의 돌연변이를 포함한다;

[0120] 여기서, 상기 NTD는 임의적으로 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 포함한다:

[0121] (a) 아미노산 11-14, 56, 57, 130, 131, 132, 144, 145, 198, 199, 228, 229, 230, 231, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 결실;

[0122] (b) 아미노산 5, 6, 7, 11, 12, 13, 14, 51, 53, 54, 56, 57, 62, 63, 67, 70, 82, 125, 129, 131, 132, 133, 134, 139, 143, 144, 145, 170, 177, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 209, 229, 233, 239, 240, 244, 245, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이; 및

[0123] (c) 아미노산 214 및 215 사이에 EPE의 아미노산 서열을 갖는 트리펩티드의 삽입;

[0124] 여기서, 상기 RBD는 임의적으로 아미노산 326, 333, 355, 358, 360, 362, 363, 392, 395, 404, 419, 426, 427, 431, 432, 433, 439, 440, 447, 464, 465, 471, 473, 477, 480, 481, 483, 485, 488, 492, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이를 포함하고;

[0125] 여기서, 상기 SD1/2 도메인은 임의적으로 534, 557, 591, 600, 601, 626, 642, 645, 664, 666, 668, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이를 포함하고; 및

[0126] (ii) S2 서브유닛, 여기서 아미노산 973 및 974는 프롤린이고, 상기 S2 서브유닛은 임의적으로 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 포함하고:

[0127] (a) 676-685, 676-702, 702-711, 775-793, 806-815 및 이들의 조합으로부터의 하나 이상의 아미노산의 결실;

[0128] (b) 688, 691, 703, 751, 783, 843, 846, 875, 937, 941, 956, 968, 969, 1014, 1058, 1105, 1163, 1186 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이; 및

[0129] (c) TMCT로부터의 하나 이상의 아미노산의 결실; 여기서, 상기 CoV S 당단백질의 아미노산은 서열번호 2의 서열을 갖는 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다.

[0130] 구현예에서, 상기 CoV 스파이크(S) 당단백질은 S1 서브유닛 및 S2 서브유닛을 포함하며, 여기서 상기 S1 서브유닛은 NTD, RBD, SD1/2, 및 불활성 퓨린 절단 부위(아미노산 669-672)를 포함하고, 상기 S2 서브유닛은 프롤린으로의 아미노산 973 및 974의 돌연변이를 포함하며; 여기서, 상기 CoV S 당단백질은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형의 조합을 포함한다:

[0131] (i) A54V, T82I, G129D, L199I, G326D, S358L, S360P, S362F, K404N, N427K, G433S, S464N, T465K, E471A, Q480R, G483S, Q485R, N488Y, Y492H, T534K, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, N843K, Q941H, N956K, L968F, 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 아미노산 130의 결실, 아미노산 131의 결실, 아미노산 132의 결실, 아미노산 198의 결실, 및 아미노산 214 및 215 사이에 EPE의 아미노산 서열을 갖는 트리펩티드의 삽입;

[0132] (ii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, S464N, T465K, E471A, Q480R, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실;

[0133] (iii) T6R, A14S, T82I, G129D, E143G, L199I, G326D, S358L, S360P, K404N, N427K, G433S, S464N, T465K, E471A, Q480R, G483S, Q485R, N488Y, Y492H, T534K, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, N843K, Q941H, N956K, L968F, 아미노산 144의 결실, 아미노산 145의 결실, 아미노산 198의 결실, 및 아미노산 214 및 215 사이에 EPE의 아미노산 서열을 갖는 트리펩티드의 삽입;

[0134] (iv) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, K404N, N427K, L439Q, S464N, T465K, E471A, Q480R, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, S691L, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실;

[0135] (v) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, S464N, T465K, E471A, Q480R, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실;

[0136] (vi) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, D601G, H642Y, N645S, N666K, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

[0137] (vii) V3G, T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, G626V, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

[0138] (viii) V3G, T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

[0139] (ix) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

[0140] (x) T6I, A14S, G129D, K134E, W139R, F144L, I197V, V200G, G244S, G326H, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, G433S, N447K, S464N, T465K, E471A, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실;

[0141] (xi) T6I, A14S, G129D, K134E, W139R, F144L, I197V, V200G, G244S, G326H, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, G433S, L439R, N447K, S464N, T465K, E471A, F473S, Q485R, N488Y, Y492H, T591I, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, D1186N, 아미노산 11의 결실, 아미

노산 12의 결실, 및 아미노산 13의 결실;

[0142] (xii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N645S, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

[0143] (xiii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

[0144] (xiv) T6I, A14S, V70A, G129D, H133Q, Q170E, V200E, G239V, G326H, R333T, L355I, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, V432P, G433S, N447K, S464N, T465K, E471A, F473S, F477S, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 및 아미노산 131의 결실;

[0145] (xv) T6I, A14S, G129D, H133Q, Q170E, V200E, G326H, R333T, L355I, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, V432P, G433S, N447K, S464N, T465K, E471A, F473S, F477S, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 및 아미노산 131의 결실;

[0146] (xvi) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, K431T, L439R, N447K, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실;

[0147] (xvii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, K431T, L439R, N447K, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 및 아미노산 57의 결실; 및

[0148] (xviii) T6I, A14S, G129D, V200G, G326D, R333T, S358F, S360P, S362F, T363A, D392N, R395S, K404N, N427K, L439R, S464N, T465K, E471A, F473V, Q485R, N488Y, Y492H, D601G, H642Y, N666K, P668H, N751K, D783Y, Q941H, N956K, 아미노산 11의 결실, 아미노산 12의 결실, 아미노산 13의 결실, 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 및 아미노산 131의 결실.

[0149] **도 3**은 BV2378로 불리는 CoV S 폴리펩티드를 보여주며, 이것은 불활성 퓨린 절단 부위, 결실된 융합 펩티드(예컨대, 아미노산 819-828의 결실), K986P, 및 V987 돌연변이를 갖고, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 1에 관해 번호가 지정된다. 상기 성숙한 BV2378 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 1-13인 신호 펩티드의 하나 이상의 아미노산이 없다.

[0150] 구현예에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩티드는 융합전 입체형태로 존재한다. 구현예에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩티드는 유연한 HR2 도메인을 포함한다. 달리 언급하지 않는 한, 도메인의 유연성은 투과 전자현미경(TEM) 및 2D 클래스 평균화(class averaging)에 의해 결정된다. 전자 밀도에서의 감소는 유연한 도메인에 해당한다.

[0151] ***CoV S 폴리펩티드 항원- S1 서브유닛에 대한 변형***

[0152] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 121의 아미노산 서열을 갖는 S1 서브유닛에 대한 하나 이상의 변형을 함유한다.

[0153] 상기 S1 서브유닛의 아미노산 서열(서열번호 121)은 아래에 나타나 있다.

[0154] QCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQ
SLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLP
QGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFR
VQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADY

NYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPAT
VCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIH
ADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRAR

[0155] 구현예에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 S1 서브유닛과 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 갖는 S1 서브유닛을 포함한다. 상기 S1 서브유닛은 서열번호 1 또는 서열번호 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, 최대 약 30개 아미노산, 최대 약 35개 아미노산, 최대 약 40개 아미노산, 최대 약 45개 아미노산, 또는 최대 약 50개 아미노산의 결실, 삽입, 또는 돌연변이를 가질 수 있다. 상기 S1 서브유닛은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 S1 서브유닛과 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 12 내지 17개 아미노산, 약 15 내지 20개 아미노산, 약 18 내지 23개 아미노산, 약 20 내지 25개 아미노산, 약 22 내지 약 27개 아미노산, 또는 약 25 내지 30개 아미노산의 결실, 삽입, 또는 돌연변이를 가질 수 있다.

[0156] 구현예에서, 상기 S1 서브유닛은 표 1에 나타낸 변형의 임의의 조합을 함유할 수 있다.

표 1

[0157]

S1(서열번호 121)에 대한 변형 * 서열번호 1의 아미노산 14-685 및 서열번호 2의 아미노산 1-672			
서열번호 1 내의 위치	**서열번호 2 내의 위치**	**서열번호 121 내의 위치**	**잠재적인 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 292개 아미노산의 결실
18	5	5	● 페닐알라닌으로의 돌연변이 ● 티로신으로의 돌연변이 ● 트립토판으로의 돌연변이
19	6	6	● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 리신으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이
20	7	7	● 아스파라긴으로의 돌연변이 ● 글루타민으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 발린으로의 돌연변이
24	11	11	● 세린으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이 ● 결실
25	12	12	● 아미노산 25 이후 아미노산 프롤린-프롤린-알라닌(PPA)의 삽입 ● 결실
26	13	13	● 세린으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이 ● 결실
27	14	14	● 세린으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이
52	39	39	● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 리신으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이
64	51	51	● 히스티딘으로의 돌연변이 ● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이

66	53	53	● 트립토판으로의 돌연변이 ● 티로신으로의 돌연변이 ● 페닐알라닌으로의 돌연변이
67	54	54	● 발린으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 루이신으로의 돌연변이
69	56	56	● 아미노산의 결실
70	57	57	● 아미노산의 결실 ● 페닐알라닌으로의 돌연변이 ● 티로신으로의 돌연변이 ● 트립토판으로의 돌연변이
75	62	62	● 발린으로의 돌연변이 ● 루이신으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이
76	63	63	● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 발린으로의 돌연변이 ● 루이신으로의 돌연변이
80	67	67	● 알라닌으로의 돌연변이 ● 글리신으로의 돌연변이
83	70	70	● 알라닌으로의 돌연변이
95	82	82	● 베타 분지된 아미노산으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 발린으로의 돌연변이
138	125	125	● 티로신으로의 돌연변이 ● 페닐알라닌으로의 돌연변이 ● 트립토판으로의 돌연변이
142	129	129	● 아스파르트산으로의 돌연변이 ● 글루탐산으로의 돌연변이
143	130	130	● 아미노산의 결실
144	131	131	● 아미노산의 결실 ● 세린으로의 돌연변이
145	132	132	● 아미노산의 결실 ● 히스티딘으로의 돌연변이 ● 아스파라긴으로의 돌연변이 ● 글루타민으로의 돌연변이
146	133	133	● 방향족 아미노산으로의 돌연변이 ● 티로신으로의 돌연변이 ● 페닐알라닌으로의 돌연변이 ● 트립토판으로의 돌연변이 ● 글루타민으로의 돌연변이
147	134	134	● 글루탐산으로의 돌연변이 ● 아스파르트산으로의 돌연변이
152	139	139	● 시스테인으로의 돌연변이 ● 메티오닌으로의 돌연변이 ● 세린으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 리신으로의 돌연변이
156	143	143	● 글리신으로의 돌연변이 ● 알라닌으로의 돌연변이
157	144	144	● 아미노산의 결실 ● 루이신으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 발린으로의 돌연변이 ● 베타-분지된 아미노산으로의 돌연변이

158	144	144	● 아미노산의 결실
183	170	170	● 글루탐산으로의 돌연변이 ● 아스파르트산으로의 돌연변이
190	177	177	● 세린으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이 ● 시스테인으로의 돌연변이
210	197	197	● 발린으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 루이신으로의 돌연변이 ● 베타 분지된 아미노산으로의 돌연변이
211	198	198	● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 발린으로의 돌연변이 ● 루이신으로의 돌연변이 ● 베타 분지된 아미노산으로의 돌연변이 ● 아미노산의 결실
212	199	199	● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 발린으로의 돌연변이 ● 루이신으로의 돌연변이 ● 베타 분지된 아미노산으로의 돌연변이 ● 아미노산의 결실
213	200	200	● 발린으로의 돌연변이 ● 루이신으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 베타 분지된 아미노산으로의 돌연변이 ● 프롤린으로의 돌연변이 ● 글리신으로의 돌연변이 ● 글루탐산으로의 돌연변이 ● 아스파르트산으로의 돌연변이
214	201	201	● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 리신으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이 ● 아스파르트산으로의 돌연변이 ● 글루탐산으로의 돌연변이 ● 아미노산 214 이후 아미노산 글루탐산-프롤린-글루탐산(EPE)의 삽입
215	202	202	● 글리신으로의 돌연변이 ● 알라닌으로의 돌연변이 ● 아미노산 215 이후 아미노산 글루탐산-프롤린-글루탐산(EPE)의 삽입
222	209	209	● 발린으로의 돌연변이 ● 루이신으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이
241-244	228-231	228-231	● 1, 2, 3, 또는 4개 아미노산의 결실
242	229	229	● 히스티딘으로의 돌연변이 ● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이
246	233	233	● 베타-분지된 아미노산으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 발린으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이 ● 아스파라긴으로의 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 ● 발린으로의 돌연변이 ● 루이신으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 베타 분지된 아미노산으로의 돌연변이
253	240	240	● 글리신으로의 돌연변이 ● 아미노산의 결실
257	244	244	● 세린으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이 ● 아스파라긴으로의 돌연변이 ● 글루타민으로의 돌연변이
258	245	245	● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 발린으로의 돌연변이 ● 루이신으로의 돌연변이 ● 베타 분지된 아미노산으로의 돌연변이
339	326	326	● 아스파르트산으로의 돌연변이 ● 글루탐산으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이
346	333	333	● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이 ● 세린으로의 돌연변이
368	355	355	● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 루이신으로의 돌연변이 ● 발린으로의 돌연변이 ● 베타-분지된 아미노산으로의 돌연변이
371	358	358	● 루이신으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 발린으로의 돌연변이 ● 페닐알라닌으로의 돌연변이
373	360	360	● 프롤린으로의 돌연변이
375	362	362	● 페닐알라닌으로의 돌연변이 ● 티로신으로의 돌연변이 ● 트립토판으로의 돌연변이
376	363	363	● 알라닌으로의 돌연변이 ● 글리신으로의 돌연변이
405	392	392	● 아스파라긴으로의 돌연변이 ● 글루타민으로의 돌연변이
408	395	395	● 세린으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이
417	404	404	● 아스파라긴으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 발린으로의 돌연변이 ● 세린으로의 돌연변이 ● 글루타민으로의 돌연변이 ● 베타-분지된 아미노산으로의 돌연변이
432	419	419	● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이
439	426	426	● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이

440	427	427	● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이
444	431	431	● 트레오닌으로의 돌연변이 ● 세린으로의 돌연변이
445	432	432	● 프롤린으로의 돌연변이
446	433	433	● 세린으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이 ● 아스파라긴으로의 돌연변이 ● 글루타민으로의 돌연변이
452	439	439	● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 리신으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이 ● 글루타민으로의 돌연변이 ● 아스파라긴으로의 돌연변이
453	440	440	● 페닐알라닌으로의 돌연변이 ● 트립토판으로의 돌연변이
460	447	447	● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이
477	464	464	● 아스파라긴으로의 돌연변이 ● 글루타민으로의 돌연변이
478	465	465	● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이
484	471	471	● 알라닌으로의 돌연변이 ● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이 ● 글루타민으로의 돌연변이 ● 아스파라긴으로의 돌연변이
486	473	473	● 발린으로의 돌연변이 ● 루이신으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 세린으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이
490	477	477	● 세린으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이
493	480	480	● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이
494	481	481	● 프롤린으로의 돌연변이
496	483	483	● 세린으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이
498	485	485	● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이
501	488	488	● 티로신으로의 돌연변이 ● 페닐알라닌으로의 돌연변이 ● 트립토판으로의 돌연변이
505	492	492	● 히스티딘으로의 돌연변이
547	534	534	● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이
570	557	557	● 아스파르트산으로의 돌연변이 ● 글루탐산으로의 돌연변이

604	591	591	● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 루이신으로의 돌연변이 ● 발린으로의 돌연변이 ● 베타 분지된 아미노산으로의 돌연변이
613	600	600	● 히스티딘으로의 돌연변이 ● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이
614	601	601	● 글리신으로의 돌연변이 ● 알라닌으로의 돌연변이
639	626	626	● 발린으로의 돌연변이 ● 루이신으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이
655	642	642	● 티로신으로의 돌연변이 ● 페닐알라닌으로의 돌연변이 ● 트립토판으로의 돌연변이
658	645	645	● 세린으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이
677	664	664	● 히스티딘으로의 돌연변이
679	666	666	● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이
681	668	668	● 히스티딘으로의 돌연변이 ● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이
682-685	669-672	669-672	● 불활성 퓨린 절단 부위(표 5 참조)

[0158] ***CoV S 폴리펩티드 항원- S1 서브유닛-NTD에 대한 변형***

[0159] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 NTD에 대한 하나 이상의 변형을 함유한다. 구현예에서, 상기 NTD는 서열번호 1의 아미노산 14-305 또는 서열번호 2의 아미노산 1-292에 해당하는 서열번호 118의 아미노산 서열을 갖는다.

[0160] NTD의 아미노산 서열(서열번호 118)은 아래에 나타나 있다.

[0161] QCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQ
SLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLP
QGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKS

[0162] 구현예에서, 상기 NTD는 서열번호 1의 아미노산 14 내지 331 또는 서열번호 2의 아미노산 1-318에 해당하는 서열번호 45의 아미노산 서열을 갖는다. NTD의 아미노산 서열(서열번호 45)은 아래에 나타나 있다.

[0163] QCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQ
SLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLP
QGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFR
VQPTESIVRFPN

[0164] 구현예에서, 상기 NTD 및 RBD는 최대 약 1개 아미노산, 최대 약 5개 아미노산, 최대 약 10개 아미노산, 또는 최대 약 20개 아미노산까지 중첩된다.

[0165] 구현예에서, 본 명세서에 제공된 것과 같은 NTD는 최대 5, 최대 10, 최대 15, 최대 20, 최대 25, 또는 최대 30개 아미노산까지 C-말단에서 연장될 수 있다.

[0166] 구현예에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 NTD와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5% 동일성을 갖는 NTD를 포함한다. 상기 NTD는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 NTD의 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 30개 아미노산의 결실, 삽입, 또는 돌연변이를 가질 수 있다. 상기 NTD는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 NTD와 비교할 때 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 12 내지 17개 아미노산, 약 15 내지 20개 아미노산, 약 18 내지 23개 아미노산, 약 20 내지 25개 아미노산, 약 22 내지 약 27개 아미노산, 또는 약 25 내지 30개 아미노산의 결실, 삽입, 또는 돌연변이를 가질 수 있다.

[0167] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 N-말단 도메인(NTD)(서열번호 2의 아미노산 1-292에 해당함)으로부터 하나 이상의 아미노산의 결실을 함유한다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 NTD의 최대 약 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 292개 아미노산의 결실을 함유한다.

[0168] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 NTD(서열번호 2의 아미노산 1-318에 해당함)로부터 하나 이상의 아미노산의 결실을 함유한다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 2의 NTD의 아미노산 1-318의 결실을 함유한다. 구현예에서, 상기 NTD의 결실은 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드의 단백질 발현을 향상시킨다. 구현예에서, NTD 결실을 갖는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 46, 48, 49, 51, 52, 및 54로 나타내는 아미노산 서열을 갖는다. 구현예에서, NTD 결실을 갖는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 47, 서열번호 50, 및 서열번호 53으로 이루어진 군으로부터 선택되는 단리된 핵산 서열에 의해 암호화된다.

[0169] 구현예에서, 상기 NTD는 표 2에 나타낸 변형의 임의의 조합을 함유할 수 있다. 상기 변형은 참조용의 성숙한 S 폴리펩티드 서열인 서열번호 2에 관해 나타나 있다.

표 2

[0170]

NTD(서열번호 118)에 대한 변형 * 서열번호 1의 아미노산 14-305 및 서열번호 2의 아미노산 1-292			
서열번호 1 내의 위치	**서열번호 2 잔기**	**서열번호 118 또는 서열번호 45 잔기**	**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 292개 아미노산의 결실
18	5	5	● 페닐알라닌으로의 돌연변이 ● 티로신으로의 돌연변이 ● 트립토판으로의 돌연변이
19	6	6	● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 리신으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이
20	7	7	● 아스파라긴으로의 돌연변이 ● 글루타민으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 발린으로의 돌연변이
24	11	11	● 세린으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이 ● 결실
25	12	12	● 아미노산 25 이후 아미노산 프롤린-프롤린-알라닌(PPA)의 삽입 ● 결실
26	13	13	● 세린으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이 ● 결실
27	14	14	● 세린으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이
52	39	39	● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 리신으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이

64	51	51	● 히스티딘으로의 돌연변이 ● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이
66	53	53	● 트립토판으로의 돌연변이 ● 티로신으로의 돌연변이 ● 페닐알라닌으로의 돌연변이
67	54	54	● 발린으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 루이신으로의 돌연변이
69	56	56	● 아미노산의 결실
70	57	57	● 아미노산의 결실 ● 페닐알라닌으로의 돌연변이 ● 티로신으로의 돌연변이 ● 트립토판으로의 돌연변이
75	62	62	● 발린으로의 돌연변이 ● 루이신으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이
76	63	63	● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 발린으로의 돌연변이 ● 루이신으로의 돌연변이
80	67	67	● 알라닌으로의 돌연변이 ● 글리신으로의 돌연변이
83	70	70	● 알라닌으로의 돌연변이
95	82	82	● 베타 분지된 아미노산으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 발린으로의 돌연변이
138	125	125	● 티로신으로의 돌연변이 ● 페닐알라닌으로의 돌연변이 ● 트립토판으로의 돌연변이
142	129	129	● 아스파르트산으로의 돌연변이 ● 글루탐산으로의 돌연변이
143	130	130	● 아미노산의 결실
144	131	131	● 아미노산의 결실 ● 세린으로의 돌연변이
145	132	132	● 아미노산의 결실 ● 히스티딘으로의 돌연변이 ● 아스파라긴으로의 돌연변이 ● 글루타민으로의 돌연변이
146	133	133	● 방향족 아미노산으로의 돌연변이 ● 티로신으로의 돌연변이 ● 페닐알라닌으로의 돌연변이 ● 트립토판으로의 돌연변이 ● 글루타민으로의 돌연변이 ● 아스파라긴으로의 돌연변이
147	134	134	● 글루탐산으로의 돌연변이 ● 아스파르트산으로의 돌연변이
152	139	139	● 시스테인으로의 돌연변이 ● 메티오닌으로의 돌연변이 ● 세린으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 리신으로의 돌연변이
156	143	143	● 글리신으로의 돌연변이 ● 알라닌으로의 돌연변이

157	144	144	● 아미노산의 결실 ● 루이신으로의 돌연변이
158	144	144	● 아미노산의 결실
183	170	170	● 글루탐산으로의 돌연변이 ● 아스파르트산으로의 돌연변이
190	177	177	● 세린으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이 ● 시스테인으로의 돌연변이
210	197	197	● 발린으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 루이신으로의 돌연변이 ● 베타 분지된 아미노산으로의 돌연변이
211	198	198	● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 발린으로의 돌연변이 ● 루이신으로의 돌연변이 ● 베타 분지된 아미노산으로의 돌연변이 ● 아미노산의 결실
212	199	199	● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 발린으로의 돌연변이 ● 루이신으로의 돌연변이 ● 베타 분지된 아미노산으로의 돌연변이 ● 아미노산의 결실
213	200	200	● 발린으로의 돌연변이 ● 루이신으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 베타 분지된 아미노산으로의 돌연변이 ● 프롤린으로의 돌연변이 ● 글리신으로의 돌연변이 ● 글루탐산으로의 돌연변이 ● 아스파르트산으로의 돌연변이
214	201	201	● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 리신으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이 ● 아스파르트산으로의 돌연변이 ● 글루탐산으로의 돌연변이 ● 아미노산 214 이후 아미노산 글루탐산-프롤린-글루탐산(EPE)의 삽입
215	202	202	● 글리신으로의 돌연변이 ● 알라닌으로의 돌연변이 ● 아미노산 215 이후 아미노산 글루탐산-프롤린-글루탐산(EPE)의 삽입
222	209	209	● 발린으로의 돌연변이 ● 루이신으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이
241-244	228-231	228-231	● 1, 2, 3, 또는 4개 아미노산의 결실
242	229	229	● 히스티딘으로의 돌연변이 ● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이
246	233	233	● 베타-분지된 아미노산으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 발린으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이 ● 아스파라긴으로의 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 ● 발린으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 루이신으로의 돌연변이 ● 베타 분지된 아미노산으로의 돌연변이
253	240	240	● 글리신으로의 돌연변이 ● 아미노산의 결실
257	244	244	● 세린으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이
258	245	245	● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 발린으로의 돌연변이 ● 루이신으로의 돌연변이 ● 베타 분지된 아미노산으로의 돌연변이

[0171] ***CoV S 폴리펩티드 항원- S1 서브유닛-RBD에 대한 변형***

[0172] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 RBD에 대한 하나 이상의 변형을 함유한다.

[0173] 구현예에서, 상기 RBD는 서열번호 1의 아미노산 331-527 또는 서열번호 2의 아미노산 318-514에 해당하는 서열번호 126의 아미노산 서열을 갖는다.

[0174] 상기 RBD의 아미노산 서열(서열번호 126)은 아래에 나타나 있다:

[0175] NITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGC
VIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGP

[0176] 구현예에서, 상기 RBD는 서열번호 1의 아미노산 335-530 또는 서열번호 2의 아미노산 322-517에 해당하는 서열번호 116의 아미노산 서열을 갖는다.

[0177] 상기 RBD의 아미노산 서열(서열번호 116)은 아래에 나타나 있다.

[0178] LCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAW
NSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKS

[0179] 구현예에서, 본 명세서에 제공되는 것과 같은 RBD는 최대 1개 아미노산, 최대 5개 아미노산, 최대 10개 아미노산, 최대 15개 아미노산, 최대 20개 아미노산, 최대 25개 아미노산, 또는 최대 30개 아미노산까지 N-말단 또는 C-말단에 연장될 수 있다.

[0180] 구현예에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 RBD와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5% 동일성을 갖는 RBD를 포함한다. 상기 RBD는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 RBD의 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 30개 아미노산의 결실, 삽입, 또는 돌연변이를 가질 수 있다. 상기 RBD는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 RBD와 비교할 때 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 12 내지 17개 아미노산, 약 15 내지 20개 아미노산, 약 18 내지 23개 아미노산, 약 20 내지 25개 아미노산, 약 22 내지 약 27개 아미노산, 또는 약 25 내지 30개 아미노산의 결실, 삽입, 또는 돌연변이를 가질 수 있다.

[0181] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 RBD에서 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 또는 적어도 20개의 돌연변이를 갖는다. 구현예에서, 상기 RBD는 표 3에 나타낸 것과 같은 변형의 임의의 조합을 함유할 수 있다.

표 3

[0182]

RBD(서열번호 126)에 대한 변형 * 서열번호 1의 **아미노산** 331-527 및 서열번호 2의 아미노산 318-514			
서열번호 1 내의 위치	**서열번호 2 내의 위치**	**서열번호 126 내의 위치**	**잠재적인 변형**
339	326	9	● 아스파르트산으로의 돌연변이 ● 글루탐산으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이
346	333	16	● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이 ● 세린으로의 돌연변이
368	355	38	● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 루이신으로의 돌연변이 ● 발린으로의 돌연변이 ● 베타-분지된 아미노산으로의 돌연변이
371	358	41	● 루이신으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 발린으로의 돌연변이 ● 페닐알라닌으로의 돌연변이 ● 티로신으로의 돌연변이 ● 트립토판으로의 돌연변이
373	360	43	● 프롤린으로의 돌연변이
375	362	45	● 페닐알라닌으로의 돌연변이 ● 티로신으로의 돌연변이 ● 트립토판으로의 돌연변이
376	363	46	● 알라닌으로의 돌연변이 ● 글리신으로의 돌연변이
405	392	75	● 아스파라긴으로의 돌연변이 ● 글루타민으로의 돌연변이
408	395	78	● 세린으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이
417	404	87	● 아스파라긴으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 발린으로의 돌연변이 ● 세린으로의 돌연변이 ● 글루타민으로의 돌연변이 ● 베타-분지된 아미노산으로의 돌연변이
432	419	102	● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이
439	426	109	● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이
440	427	110	● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이
444	431	114	● 트레오닌으로의 돌연변이 ● 세린으로의 돌연변이
445	432	115	● 프롤린으로의 돌연변이
446	433	116	● 세린으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이

452	439	122	● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 리신으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이 ● 글루타민으로의 돌연변이 ● 아스파라긴으로의 돌연변이
453	440	123	● 페닐알라닌으로의 돌연변이 ● 트립토판으로의 돌연변이
460	447	130	● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이
477	464	147	● 아스파라긴으로의 돌연변이 ● 글루타민으로의 돌연변이
478	465	148	● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이
484	471	154	● 알라닌으로의 돌연변이 ● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이 ● 글루타민으로의 돌연변이 ● 아스파라긴으로의 돌연변이
486	473	156	● 발린으로의 돌연변이 ● 루이신으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 세린으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이
490	477	160	● 세린으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이
493	480	163	● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이
494	481	164	● 프롤린으로의 돌연변이
496	483	166	● 세린으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이
498	485	168	● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이
501	488	171	● 티로신으로의 돌연변이 ● 페닐알라닌으로의 돌연변이 ● 트립토판으로의 돌연변이
505	492	175	● 히스티딘으로의 돌연변이

[0183] ***CoV S 폴리펩티드 항원- SD1/2에 대한 변형***

[0184] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 542-681 또는 서열번호 2의 아미노산 529-668에 해당하는 서열번호 122의 아미노산 서열을 갖는 SD1/2에 대한 하나 이상의 변형을 함유한다.

[0185] 상기 SD1/2의 아미노산 서열(서열번호 122)은 아래에 나타나 있다.

[0186] NFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVF QTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSP

[0187] 구현예에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 SD1/2와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5% 동일성을 갖는 SD1/2를 포함한다. 상기 SD1/2는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 SD1/2의 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 30개 아미노산의 결실, 삽입, 또는 돌연변이를 가질 수 있다. 상기 SD1/2는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 SD1/2와 비교할 때 약 1 내

지 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 12 내지 17개 아미노산, 약 15 내지 20개 아미노산, 약 18 내지 23개 아미노산, 약 20 내지 25개 아미노산, 약 22 내지 약 27개 아미노산, 또는 약 25 내지 30개 아미노산의 결실, 삽입, 또는 돌연변이를 가질 수 있다.

[0188] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 SD1/2에서 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 또는 적어도 20개의 돌연변이를 갖는다. 구현예에서, 상기 SD1/2는 표 4에 나타낸 것과 같은 변형의 임의의 조합을 함유할 수 있다.

표 4

[0189]

SD1/2(서열번호 122)에 대한 변형 * 서열번호 1의 아미노산 542-681 또는 서열번호 2의 아미노산 529-668			
서열번호 1 내의 위치	**서열번호 2 내의 위치**	**서열번호 122 내의 위치**	**잠재적인 변형**
547	534	6	● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이
570	557	29	● 아스파르트산으로의 돌연변이 ● 글루탐산으로의 돌연변이
604	591	63	● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 루이신으로의 돌연변이 ● 발린으로의 돌연변이 ● 베타-분지된 아미노산으로의 돌연변이
613	600	72	● 히스티딘으로의 돌연변이 ● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이
614	601	73	● 글리신으로의 돌연변이 ● 알라닌으로의 돌연변이
639	626	98	● 발린으로의 돌연변이 ● 루이신으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이
655	642	114	● 티로신으로의 돌연변이 ● 페닐알라닌으로의 돌연변이 ● 트립토판으로의 돌연변이
658	645	117	● 세린으로의 돌연변이
677	664	136	● 히스티딘으로의 돌연변이
679	666	138	● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이
681	668	140	● 히스티딘으로의 돌연변이 ● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이
547	534	6	● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이
570	557	29	● 아스파르트산으로의 돌연변이 ● 글루탐산으로의 돌연변이
613	600	72	● 히스티딘으로의 돌연변이 ● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이
614	601	73	● 글리신으로의 돌연변이 ● 알라닌으로의 돌연변이

655	642	114	● 티로신으로의 돌연변이 ● 페닐알라닌으로의 돌연변이 ● 트립토판으로의 돌연변이
677	664	136	● 히스티딘으로의 돌연변이
679	666	138	● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이

[0190] ***CoV S 폴리펩티드 항원- 퓨린 절단 부위에 대한 변형***

[0191] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 682-685 또는 서열번호 2의 아미노산 669-672에 해당하고, 하나 이상의 돌연변이에 의해 불활성화된 퓨린 부위(RRAR)를 함유한다. 상기 퓨린 절단 부위의 불활성화는 퓨린이 CoV S 폴리펩티드를 절단하는 것을 방지한다. 구현예에서, 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유하는 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩티드는 단일 사슬로서 발현된다.

[0192] 구현예에서, 자연형 퓨린 절단 부위를 포함하는 하나 이상의 아미노산은 임의의 천연 아미노산으로 돌연변이된다. 구현예에서, 상기 아미노산은 L-아미노산이다. 아미노산의 비제한적 예는 알라닌, 아르기닌, 글리신, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 세린, 트레오닌, 히스티딘, 리신, 메티오닌, 프롤린, 발린, 이소루이신, 루이신, 티로신, 트립토판, 및 페닐알라닌을 포함한다.

[0193] 구현예에서, 상기 자연형 퓨린 절단 부위를 포함하는 하나 이상의 아미노산은 글루타민으로 돌연변이된다. 구현예에서, 1, 2, 3, 또는 4개 아미노산이 글루타민으로 돌연변이될 수 있다. 구현예에서, 상기 자연형 퓨린 절단 부위를 포함하는 아르기닌 중 1개가 글루타민으로 돌연변이된다. 구현예에서, 상기 자연형 퓨린 절단 부위를 포함하는 아르기닌 중 2개가 글루타민으로 돌연변이된다. 구현예에서, 상기 자연형 퓨린 절단 부위를 포함하는 아르기닌 중 3개가 글루타민으로 돌연변이된다.

[0194] 구현예에서, 상기 자연형 퓨린 절단 부위를 포함하는 하나 이상의 아미노산은 알라닌으로 돌연변이된다. 구현예에서, 1, 2, 3, 또는 4개 아미노산이 알라닌으로 돌연변이될 수 있다. 구현예에서, 상기 자연형 퓨린 절단 부위를 포함하는 아르기닌 중 1개가 알라닌으로 돌연변이된다. 구현예에서, 상기 자연형 퓨린 절단 부위를 포함하는 아르기닌 중 2개가 알라닌으로 돌연변이된다. 구현예에서, 상기 자연형 퓨린 절단 부위를 포함하는 아르기닌 중 3개가 알라닌으로 돌연변이된다.

[0195] 구현예에서, 상기 자연형 퓨린 절단 부위를 포함하는 하나 이상의 아미노산은 글리신으로 돌연변이된다. 구현예에서, 1, 2, 3, 또는 4개 아미노산이 글리신으로 돌연변이될 수 있다. 구현예에서, 상기 자연형 퓨린 절단 부위의 아르기닌 중 1개가 글리신으로 돌연변이된다. 구현예에서, 상기 자연형 퓨린 절단 부위를 포함하는 아르기닌 중 2개가 글리신으로 돌연변이된다. 구현예에서, 상기 자연형 퓨린 절단 부위를 포함하는 아르기닌 중 3개가 글리신으로 돌연변이된다.

[0196] 구현예에서, 상기 자연형 퓨린 절단 부위를 포함하는 하나 이상의 아미노산은 아스파라긴으로 돌연변이된다. 예를 들면 1, 2, 3, 또는 4개 아미노산이 아스파라긴으로 돌연변이될 수 있다. 구현예에서, 상기 자연형 퓨린 절단 부위를 포함하는 아르기닌 중 1개가 아스파라긴으로 돌연변이된다. 구현예에서, 상기 자연형 퓨린 절단 부위를 포함하는 아르기닌 중 2개가 아스파라긴으로 돌연변이된다. 구현예에서, 상기 자연형 퓨린 절단 부위를 포함하는 아르기닌 중 3개가 아스파라긴으로 돌연변이된다.

[0197] CoV S 폴리펩티드 내에 함유되는 불활성화된 퓨린 부위의 아미노산 서열의 비제한적 예는 표 5에서 발견된다.

표 5

[0198]

퓨린 절단 부위의 아미노산 서열	**활성 또는 불활성 퓨린 절단 부위**
RRAR(서열번호 6)	활성
QQAQ(서열번호 7)	불활성
QRAR(서열번호 8)	불활성
RQAR(서열번호 9)	불활성
RRAQ(서열번호 10)	불활성
QQAR(서열번호 11)	불활성
RQAQ(서열번호 12)	불활성
QRAQ(서열번호 13)	불활성

NNAN(서열번호 14)	불활성
NRAR(서열번호 15)	불활성
RNAR(서열번호 16)	불활성
RRAN(서열번호 17)	불활성
NNAR(서열번호 18)	불활성
RNAN(서열번호 19)	불활성
NRAN(서열번호 20)	불활성
AAAA(서열번호 21)	불활성
ARAR(서열번호 22)	불활성
RAAR(서열번호 23)	불활성
RRAA(서열번호 24)	불활성
AAAR(서열번호 25)	불활성
RAAA(서열번호 26)	불활성
ARAA(서열번호 27)	불활성
GGAG(서열번호 28)	불활성
GRAR(서열번호 29)	불활성
RGAR(서열번호 30)	불활성
RRAG(서열번호 31)	불활성
GGAR(서열번호 32)	불활성
RGAG(서열번호 33)	불활성
GRAG(서열번호 34)	불활성
GSAS(서열번호 97)	불활성
GSGA(서열번호 111)	불활성

[0199] 구현예에서, 활성 퓨린 절단 부위(서열번호 6) 대신에, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩티드는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유한다. 구현예에서, 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위의 아미노산 서열은 서열번호 7 내지 서열번호 34 또는 서열번호 97 중 어느 하나에 의해 나타낸다. 구현예에서, 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위의 아미노산 서열은 QQAQ(서열번호 7)이다. 구현예에서, 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위의 아미노산 서열은 GSAS(서열번호 97)이다. 구현예에서, 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위의 아미노산 서열은 GSGA(서열번호 111)이다. 구현예에서, 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위의 아미노산 서열은 GG, GGG(서열번호 127), GGGG(서열번호 128), 또는 GGGGG(서열번호 129)이다.

[0200] *CoV S 폴리펩티드 항원- S2 서브유닛에 대한 변형*

[0201] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는는 서열번호 1의 아미노산 686-1273 또는 서열번호 2의 아미노산 673-1260에 해당하는 서열번호 120의 아미노산 서열을 갖는 S2 서브유닛에 하나 이상의 변형을 함유한다.

[0202] 상기 S2 서브유닛(서열번호 120)의 아미노산 서열은 아래에 나타나 있다.

[0203] SVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT

[0204] 구현예에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 S2 서브유닛과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5% 동일성을 갖는 S2 서브유닛을 포함한다. 상기 S2 서브유닛은 서열번호 1 또는 서열번호 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 30개 아미노산의 결실, 삽입, 또는 돌연변이를 가질 수 있다. 상기 S2 서브유닛은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 S2 서브유닛과 비교할 때 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 12 내지 17개 아미노산, 약 15 내지 20개 아미노산, 약 18 내지 23개 아미노산, 약 20 내지 25개 아미노산, 약 22 내지 약 27개 아미노산, 또는 약 25 내지 30개 아미노산의 결실, 삽입, 또는 돌연변이를 가질 수 있다.

[0205] 구현예에서, 상기 S2 서브유닛은 표 6에 나타낸 것과 같은 변형의 임의의 조합을 함유할 수 있다.

표 6

[0206]

S2(서열번호 120)에 대한 변형 * 서열번호 1의 아미노산 686-1273 및 서열번호 2의 아미노산 673-1260			
서열번호 1 내의 위치	**서열번호 2 내의 위치**	**서열번호 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-분지된 아미노산으로의 돌연변이 ● 발린으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이
704	691	19	● 루이신으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 발린으로의 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-분지된 아미노산으로의 돌연변이 ● 발린으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이
764	751	79	● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 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
796	783	111	● 티로신으로의 돌연변이 ● 페닐알라닌으로의 돌연변이 ● 트립토판으로의 돌연변이
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
856	843	171	● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이
859	846	174	● 아스파라긴으로의 돌연변이 ● 글루타민으로의 돌연변이
888	875	203	● 루이신으로의 돌연변이 ● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 발린으로의 돌연변이
950	937	265	● 아스파라긴으로의 돌연변이 ● 글루타민으로의 돌연변이
954	941	269	● 히스티딘으로의 돌연변이 ● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이
969	956	284	● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이
981	968	296	● 페닐알라닌으로의 돌연변이 ● 티로신으로의 돌연변이 ● 트립토판으로의 돌연변이

982	969	297	● 알라닌으로의 돌연변이 ● 글리신으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이
986	973	301	● 프롤린으로의 돌연변이 ● 글리신으로의 돌연변이
987	974	302	● 프롤린으로의 돌연변이 ● 글리신으로의 돌연변이
1027	1014	342	● 이소루이신으로의 돌연변이 ● 발린으로의 돌연변이 ● 세린으로의 돌연변이
1071	1058	386	● 히스티딘으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 리신으로의 돌연변이
1118	1105	433	● 히스티딘으로의 돌연변이 ● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 아스파라긴으로의 돌연변이 ● 글루타민으로의 돌연변이
1176	1163	491	● 페닐알라닌으로의 돌연변이 ● 티로신으로의 돌연변이 ● 트립토판으로의 돌연변이
1199	1186	514	● 아스파라긴으로의 돌연변이 ● 글루타민으로의 돌연변이
1214-1237	1201-1224	1-24	● TM의 하나 이상의 아미노산의 결실
1238-1273	1225-1260	1-36	● CD의 하나 이상의 아미노산의 결실

[0207] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 자연형 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 2)의 아미노산 676-685 내의 하나 이상의 결실에 해당하는 결실을 함유한다. 구현예에서, 상기 자연형 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 2)의 아미노산 676-685의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 아미노산이 결실된다. 구현예에서, 아미노산 676-685 내의 아미노산의 결실은 연이은 예컨대 아미노산 676 및 677이 결실되거나, 아미노산 680 및 681이 결실된다. 구현예에서, 아미노산 676-685 내의 아미노산의 결실은 연잇지 않은 예컨대 아미노산 676 및 680이 결실되거나, 아미노산 677 및 682가 결실된다. 구현예에서, 아미노산 676-685 내의 하나 이상의 결실에 해당하는 결실을 함유하는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 62 및 서열번호 63으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는다.

[0208] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 자연형 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 2)의 아미노산 702-711 내의 하나 이상의 결실에 해당하는 결실을 함유한다. 구현예에서, 자연형 SARS-CoV-2 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 2)의 아미노산 702-711의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 아미노산이 결실된다. 구현예에서, 아미노산 702-711 내의 아미노산의 하나 이상의 결실은 연이은 예컨대 아미노산 702 및 703이 결실되거나, 아미노산 708 및 709가 결실된다. 구현예에서, 아미노산 702-711 내의 아미노산의 결실은 연잇지 않은 예컨대 아미노산 702 및 704가 결실되거나, 아미노산 707 및 710이 결실된다. 구현예에서, 아미노산 702-711 내의 하나 이상의 결실에 해당하는 결실을 함유하는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 64 및 서열번호 65로 이루어진 군으로부터 선택되는 아민노산 서열을 갖는다.

[0209] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 자연형 CoV S 폴리펩티드(서열번호 2)의 아미노산 775-793 내의 하나 이상의 결실에 해당하는 결실을 함유한다. 구현예에서, 상기 자연형 SARS-CoV-2 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 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 19개 아미노산이 결실된다. 구현예에서, 아미노산 775-793 내의 아미노산의 하나 이상의 결실은 연이은 예컨대 아미노산 776 및 777이 결실되거나, 아미노산 780 및 781이 결실된다. 구현예에서, 아미노산 775-793 내의 아미노산의 결실은 연잇지 않은 예컨대 아미노산 775 및 790이 결실되거나, 아미노산 777 및 781이 결실된다.

[0210] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 806-815에 해당하는 융합 펩티드(서열번호 104)의 결실을 함유한다. 구현예에서, 상기 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 2)의 융합 펩티드의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 아미노산이 결실된다. 구현예에서, 상기 융합 펩티드 내의 아미노산의 결실은 연이은 예

컨대 아미노산 806 및 807이 결실되거나, 아미노산 809 및 810이 결실된다. 구현예에서, 상기 융합 펩티드 내의 아미노산의 결실은 연잇지 않은 예컨대 아미노산 806 및 808이 결실되거나, 아미노산 810 및 813이 결실된다. 구현예에서, 상기 융합 펩티드의 하나 이상의 아미노산에 해당하는 결실을 함유하는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 66, 77, 및 105-108로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는다.

[0211] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 자연형 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 2)의 Lys-973에 돌연변이를 함유한다. 구현예에서, Lys-973은 임의의 천연 아미노산으로 돌연변이된다. 구현예에서, Lys-973은 프롤린으로 돌연변이된다. 구현예에서, Lys-973은 글리신으로 돌연변이된다. 구현예에서, 아미노산 973에 돌연변이를 함유하는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 84-89, 105-106, 및 109-110으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0212] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 자연형 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 2)의 Val-974에 돌연변이를 함유한다. 구현예에서, Val-974는 임의의 천연 아미노산으로 돌연변이된다. 구현예에서, Val-974는 프롤린으로 돌연변이된다. 구현예에서, Val-974는 글리신으로 돌연변이된다. 구현예에서, 아미노산 974에 돌연변이를 함유하는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 84-89, 105-106, 및 109-110으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0213] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 자연형 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 2)의 Lys-973 및 Val-974에 돌연변이를 함유한다. 구현예에서, Lys-973 및 Val-974는 임의의 천연 아미노산으로 돌연변이된다. 구현예에서, Lys-973 및 Val-974는 프롤린으로 돌연변이된다. 구현예에서, 아미노산 973 및 974에 돌연변이를 함유하는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 84-89, 105-106, 109-110, 175, 220, 및 217-228로부터 선택된다.

[0214] *CoV S 폴리펩티드 항원- S2 서브유닛-HR1 도메인에 대한 변형*

[0215] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 912-984 또는 서열번호 2의 아미노산 889-971에 해당하는 서열번호 119의 아미노산 서열을 갖는 HR1 도메인에 하나 이상의 변형을 함유한다.

[0216] 상기 HR1 도메인의 아미노산 서열(서열번호 119)은 아래에 나타나 있다.

[0217] MAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRL

[0218] 구현예에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 HR1 도메인과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5% 동일성인 HR1 도메인을 포함한다. 상기 HR1 도메인은 서열번호 1 또는 서열번호 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 30개 아미노산의 결실, 삽입, 또는 돌연변이를 가질 수 있다. 상기 HR1 도메인은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 HR1 도메인과 비교할 때 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 12 내지 17개 아미노산, 약 15 내지 20개 아미노산, 약 18 내지 23개 아미노산, 약 20 내지 25개 아미노산, 약 22 내지 약 27개 아미노산, 또는 약 25 내지 30개 아미노산의 결실, 삽입, 또는 돌연변이를 가질 수 있다.

[0219] 구현예에서, 상기 HR1 도메인은 표 7에 나타낸 것과 같은 변형의 임의의 조합을 함유할 수 있다.

표 7

[0220]

HR1(서열번호 119)에 대한 변형 * 서열번호 1의 아미노산 912-984 및 서열번호 2의 아미노산 889-971			
서열번호 1 내의 위치	**서열번호 2 내의 위치**	**서열번호 119 내의 위치**	**가능한 변형**
950	937	49	● 아스파라긴으로의 돌연변이 ● 글루타민으로의 돌연변이
954	941	53	● 히스티딘으로의 돌연변이
969	956	68	● 리신으로의 돌연변이 ● 아르기닌으로의 돌연변이 ● 히스티딘으로의 돌연변이
981	968	80	● 페닐알라닌으로의 돌연변이 ● 티로신으로의 돌연변이 ● 트립토판으로의 돌연변이

982	969	81	● 알라닌으로의 돌연변이 ● 글리신으로의 돌연변이 ● 트레오닌으로의 돌연변이

[0221] *CoV S 폴리펩티드 항원- S2 서브유닛-HR2 도메인에 대한 변형*

[0222] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 1163-1213 또는 서열번호 2의 아미노산 1150-1200에 해당하는 서열번호 125의 아미노산 서열을 갖는 HR2 도메인에 하나 이상의 변형을 함유한다.

[0223] 상기 HR2 도메인의 아미노산 서열(서열번호 125)은 아래에 나타나 있다.

[0224] DVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWP

[0225] 구현예에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 HR2 도메인과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5% 동일성을 갖는 HR2 도메인을 포함한다. 상기 HR2 도메인은 서열번호 1 또는 서열번호 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 30개 아미노산의 결실, 삽입, 또는 돌연변이를 가질 수 있다. 상기 HR2 도메인은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 HR2 도메인과 비교할 때 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 12 내지 17개 아미노산, 약 15 내지 20개 아미노산, 약 18 내지 23개 아미노산, 약 20 내지 25개 아미노산, 약 22 내지 약 27개 아미노산, 또는 약 25 내지 30개 아미노산의 결실, 삽입, 또는 돌연변이를 가질 수 있다.

[0226] *CoV S 폴리펩티드 항원- TM 도메인에 대한 변형*

[0227] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 1214-1237또는 서열번호 2의 아미노산 1201-1224에 해당하는 서열번호 123의 아미노산 서열을 갖는 TM 도메인에 하나 이상의 변형을 함유한다.

[0228] 상기 TM 도메인의 아미노산 서열(서열번호 123)은 아래에 나타나 있다.

[0229] WYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCM

[0230] 구현예에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 TM 도메인과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5% 동일성을 갖는 TM 도메인을 포함한다. 상기 TM 도메인은 서열번호 1 또는 서열번호 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 30개 아미노산의 결실, 삽입, 또는 돌연변이를 가질 수 있다. 상기 TM 도메인은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 TM 도메인과 비교할 때 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 12 내지 17개 아미노산, 약 15 내지 20개 아미노산, 약 18 내지 23개 아미노산, 약 20 내지 25개 아미노산, 약 22 내지 약 27개 아미노산, 또는 약 25 내지 30개 아미노산의 결실, 삽입, 또는 돌연변이를 가질 수 있다.

[0231] 구현예에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩티드는 전체 TM 도메인이 없다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 TM 도메인을 포함한다.

[0232] *CoV S 폴리펩티드 항원- CT에 대한 변형*

[0233] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 1238-1273 또는 서열번호 2의 아미노산 1225-1260에 해당하는 서열번호 124의 아미노산 서열을 갖는 CT에 하나 이상의 변형을 함유한다.

[0234] 상기 CT의 아미노산 서열(서열번호 124)은 아래에 나타나 있다:

[0235] TSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT

[0236] 구현예에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 CT와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5% 동일성을 갖는 CT를 포함한다. 상기 CT는 서열번호 1 또는 서열번호 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 30개 아미노산의 결실, 삽입, 또는 돌연변이를 가질 수 있다. 상기 CT는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 CT와 비교할 때 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 12 내지 17개 아미노산, 약 15 내지 20개 아미노산, 약 18 내지 23개 아미노산, 약 20 내지 25개 아미노산, 약 22 내지 약 27개 아미노산, 또는 약 25 내지 30개 아미노산의 결실, 삽입, 또는 돌연변이를 가질 수 있다.

[0237] 구현예에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩티드는 CT가 없다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 CT를 포함한다.

[0238] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 TM 및 CT를 포함한다. 구현예에서, 상기 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드는 막통과 및 세포질 꼬리(TMCT)(아미노산 1201-1260에 해당함)로부터의 하나 이상의 아미노산의 결실을 함유한다. 상기 TMCT의 아미노산 서열은 서열번호 39로 나타낸다. 구현예에서, 상기 TMCT의 하나 이상의 잔기의 결실을 갖는 CoV S 폴리펩티드는 향상된 단백질 발현을 갖는다. 구현예에서, 상기 TMCT로부터 하나 이상의 결실을 갖는 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드는 서열번호 40, 41, 42, 52, 54, 59, 61, 88, 및 89로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는다. 구현예에서, 상기 TM-CD로부터 하나 이상의 결실을 갖는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 39, 43, 53, 및 60으로 이루어진 군으로부터 선택되는 단리된 핵산 서열에 의해 암호화된다.

[0239] *CoV S 폴리펩티드 항원- 돌연변이의 비제한적 조합*

[0240] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 자연형 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 2)의 아미노산 56 및 57의 결실을 함유한다.

[0241] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 자연형 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 2)의 아미노산 131 및 132의 결실을 함유한다.

[0242] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 자연형 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 2)의 아미노산 56 및 131의 결실을 함유한다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 자연형 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 2)의 아미노산 57 및 131의 결실을 함유한다.

[0243] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 자연형 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 2)의 아미노산 56, 57, 및 131의 결실을 함유한다.

[0244] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 자연형 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 2)의 아미노산 56 및 132의 결실을 함유한다.

[0245] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 자연형 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 2)의 아미노산 57 및 132의 결실을 함유한다.

[0246] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 자연형 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 2)의 아미노산 56, 57, 및 132의 결실을 함유한다.

[0247] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 자연형 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 2)의 아미노산 56, 57, 131, 및 132의 결실을 함유한다.

[0248] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 상기 CoV S 폴리펩티드의 융합전 입체형태를 안정화시키는 돌연변이를 함유한다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 융합전 입체형태를 안정화시키는 프롤린 또는 글리신 치환을 함유한다. 상기 전략은 각각의 그 전체 내용이 인용에 의해 본 명세서에 통합되는 다음의 문서에 기술된 것과 같은 융합전 안정화된 MERS-CoV S 단백질을 개발하기 위해 이용되었다: Proc Natl Acad Sci USA. 2017 Aug 29;114(35):E7348-E7357; Sci Rep. 2018 Oct 24;8(1):15701; 미국 공개 제2020/0061185호; 및 PCT 출원 제PCT/US2017/058370호.

[0249] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 Lys-973 및 Val-974에 돌연변이 및 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유한다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 프롤린으로의 Lys-973 및 Val-974의 돌연변이 및 QQAQ(서열번호 7) 또는 GSAS(서열번호 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유한다. Lys-973 및 Val-974에 돌연변이 및 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유하는 예시적인 CoV S 폴리펩티드는 **도 8**에 도시되어 있다. 구현예에서, 프롤린으로의 Lys-973 및 Val-974의 돌연변이 및 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유하는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 86 또는 87의 아미노산 서열 및 서열번호 96의 핵산 서열을 갖는다.

[0250] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 상기 융합 펩티드의 Lys-973 및 Val-974에 돌연변이, 불활성화된 퓨린 절단 부위, 및 하나 이상의 아미노산의 결실을 함유한다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 상기 융합 펩티드의 프롤린으로의 Lys-973 및 Val-974의 돌연변이, QQAQ(서열번호 7) 또는 GSAS(서열번호 96)의 아미노산 서열을

갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위, 및 하나 이상의 아미노산의 결실을 함유한다. 구현예에서, 상기 융합 펩티드의 프롤린으로의 Lys-973 및 Val-974의 돌연변이, 불활성화된 퓨린 절단 부위, 및 하나 이상의 아미노산의 결실을 함유하는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 105 또는 106의 아미노산 서열을 갖는다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 자연형 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 2)와 비교하여 페닐알라닌으로의 Leu-5의 돌연변이, 아스파라긴으로의 Thr-7의 돌연변이, 세린으로의 Pro-13의 돌연변이, 티로신으로의 Asp-125의 돌연변이, 세린으로의 Arg-177의 돌연변이, 트레오닌으로의 Lys-404의 돌연변이, 리신으로의 Glu-471의 돌연변이, 티로신으로의 Asn-488의 돌연변이, 티로신으로의 His-642의 돌연변이, 이소루이신으로의 Thr-1014의 돌연변이, 프롤린으로의 Lys-973 및 Val-974의 돌연변이, 및 QQAQ(서열번호 7) 또는 GSAS(서열번호 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유한다.

[0251] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 자연형 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 2)과 비교하여 시스테인으로의 Trp-139의 돌연변이, 아르기닌으로의 Leu-439의 돌연변이, 프롤린으로의 Lys-973 및 Val-974의 돌연변이, 및 QQAQ(서열번호 7) 또는 GSAS(서열번호 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유한다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 자연형 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 1)와 비교하여시스테인으로의 Trp-152의 돌연변이, 아르기닌으로의 Leu-452의 돌연변이, 이소루이신으로의 Ser-13의 돌연변이, 프롤린으로의 Lys-986 및 Val-987의 돌연변이, 및 QQAQ(서열번호 7) 또는 GSAS(서열번호 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유한다.

[0252] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 자연형 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 2)와 비교하여 트레오닌 또는 아스파라긴으로의 Lys-404의 돌연변이, 리신으로의 Glu-471의 돌연변이, 티로신으로의 Asn-488의 돌연변이, 페닐알라닌으로의 Leu-5의 돌연변이, 알라닌으로의 Asp-67의 돌연변이, 글리신으로의 Asp-202의 돌연변이, 아미노산 229-231 중 하나 이상의 결실, 이소루이신으로의 Arg-233의 돌연변이, 프롤린으로의 Lys-973 및 Val-974의 돌연변이, 및 QQAQ(서열번호 7) 또는 GSAS(서열번호 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유한다.

[0253] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 자연형 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 2)와 비교하여 티로신으로의 Asn-488의 돌연변이, 프롤린으로의 Lys-973 및 Val-974의 돌연변이, 및 QQAQ(서열번호 7) 또는 GSAS(서열번호 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유한다. 구현예에서, 티로신으로의 Asn-488의 돌연변이, 프롤린으로의 Lys-973 및 Val-974의 돌연변이, 및 QQAQ(서열번호 7) 또는 GSAS(서열번호 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 갖는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 112의 아미노산 서열을 포함한다.

[0254] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 자연형 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 2)와 비교하여 글리신으로의 Asp-601의 돌연변이, 티로신으로의 Asn-488의 돌연변이, 프롤린으로의 Lys-973 및 Val-974의 돌연변이, 및 QQAQ(서열번호 7) 또는 GSAS(서열번호 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유한다. 구현예에서, 티로신으로의 Asn-488의 돌연변이, 프롤린으로의 Lys-973 및 Val-974의 돌연변이, 및 QQAQ(서열번호 7) 또는 GSAS(서열번호 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 갖는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 113의 아미노산 서열을 포함한다.

[0255] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 자연형 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 2)와 비교하여 아미노산 56, 57, 및 131의 결실, 티로신으로의 Asn-488의 돌연변이, 아스파테이트로의 Ala-557의 돌연변이, 글리신으로의 Asp-601의 돌연변이, 히스티딘으로의 Pro-668의 돌연변이, 이소루이신으로의 Thr-703의 돌연변이, 알라닌으로의 Ser-969의 돌연변이, 히스티딘으로의 Asp-1105의 돌연변이, 프롤린으로의 Lys-973 및 Val-974의 돌연변이, 및 QQAQ(서열번호 7), GSAS(서열번호 96), 또는 GG의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유한다. 구현예에서, 아미노산 56, 57, 및 131의 결실, 티로신으로의 Asn-488의 돌연변이, 아스파테이트로의 Ala-557의 돌연변이, 글리신으로의 Asp-601의 돌연변이, 히스티딘으로의 Pro-668의 돌연변이, 이소루이신으로의 Thr-703의 돌연변이, 알라닌으로의 Ser-969의 돌연변이, 히스티딘으로의 Asp-1105의 돌연변이, 프롤린으로의 Lys-973 및 Val-974의 돌연변이, 및 QQAQ(서열번호 7) 또는 GSAS(서열번호 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 갖는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 114의 아미노산 서열을 포함한다. 구현예에서, 아미노산 56, 57, 및 131의 결실, 티로신으로의 Asn-488의 돌연변이, 아스파테이트로의 Ala-557의 돌연변이, 글리신으로의 Asp-601의 돌연변이, 히스티딘으로의 Pro-668의 돌연변이, 이소루이신으로의 Thr-703의 돌연변이, 알라닌으로의 Ser-969의 돌연변이, 히스티딘으로의 Asp-1105의 돌연변이, 프롤린으로의 Lys-973 및 Val-974의 돌연변이, 및 QQAQ(서열번호 7) 또는 GSAS(서열번호 96) 또는 GG의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 갖는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 136의 아미노산 서열을 포함한다. 구현예에서, 아미노산 56의 결실,

57, 및 131, 티로신으로의 Asn-488의 돌연변이, 아스파테이트로의 Ala-557의 돌연변이, 글리신으로의 Asp-601의 돌연변이, 히스티딘으로의 Pro-668의 돌연변이, 이소루이신으로의 Thr-703의 돌연변이, 알라닌으로의 Ser-969의 돌연변이, 히스티딘으로의 Asp-1105의 돌연변이, 프롤린으로의 Lys-973 및 Val-974의 돌연변이, 및 GG의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 갖는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 137 또는 서열번호 138의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 서열번호 114 또는 서열번호 136의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 135의 핵산 서열을 갖는 핵산에 의해 암호화된다. 일부 구현예에서, 서열번호 137 또는 서열번호 138의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 139의 서열을 갖는 핵산에 의해 암호화된다.

[0256] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 자연형 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 2)와 비교하여 아미노산 56, 57, 및 132의 결실, 티로신으로의 Asn-488의 돌연변이, 아스파테이트로의 Ala-557의 돌연변이, 글리신으로의 Asp-601의 돌연변이, 히스티딘으로의 Pro-668의 돌연변이, 이소루이신으로의 Thr-703의 돌연변이, 알라닌으로의 Ser-969의 돌연변이, 히스티딘으로의 Asp-1105의 돌연변이, 프롤린으로의 Lys-973 및 Val-974의 돌연변이, 및 QQAQ(서열번호 7) 또는 GSAS(서열번호 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유한다. 구현예에서, 아미노산 56, 57, 및 132의 결실, 티로신으로의 Asn-488의 돌연변이, 아스파테이트로의 Ala-557의 돌연변이, 글리신으로의 Asp-601의 돌연변이, 히스티딘으로의 Pro-668의 돌연변이, 이소루이신으로의 Thr-703의 돌연변이, 알라닌으로의 Ser-969의 돌연변이, 히스티딘으로의 Asp-1105의 돌연변이, 프롤린으로의 Lys-973 및 Val-974의 돌연변이, 및 QQAQ(서열번호 7) 또는 GSAS(서열번호 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 갖는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 114의 아미노산 서열을 포함한다.

[0257] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 자연형 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 2)와 비교하여 티로신으로의 Asn-488의 돌연변이, 알라닌으로의 Asp-67의 돌연변이, 히스티딘으로의 Leu-229의 돌연변이, 글리신으로의 Asp-202의 돌연변이, 아스파라긴으로의 Lys-404의 돌연변이, 리신으로의 Glu-471의 돌연변이, 발린으로의 Ala-688의 돌연변이, 글리신으로의 Asp-601의 돌연변이, 프롤린으로의 Lys-973 및 Val-974의 돌연변이, 및 QQAQ(서열번호 7) 또는 GSAS(서열번호 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 함유한다. 구현예에서, 티로신으로의 Asn-488의 돌연변이, 알라닌으로의 Asp-67의 돌연변이, 히스티딘으로의 Leu-229의 돌연변이, 글리신으로의 Asp-202의 돌연변이, 아스파라긴으로의 Lys-404의 돌연변이, 리신으로의 Glu-471의 돌연변이, 발린으로의 Ala-688의 돌연변이, 글리신으로의 Asp-601의 돌연변이, 프롤린으로의 Lys-973 및 Val-974의 돌연변이, 및 QQAQ(서열번호 7) 또는 GSAS(서열번호 96)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 갖는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 115의 아미노산 서열을 포함한다.

[0258] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 아미노산 131의 결실, N488Y, A557D, D601G, P668H, T703I, S969A, 및 D1105H로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(서열번호 7)의 아미노산 서열을 갖는다. 구현예에서, 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 GG의 아미노산 서열을 갖는다.

[0259] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, D67A, D202G, L229H, K404N, E471K, N488Y, D601G, 및 A688V로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(서열번호 7)의 아미노산 서열을 갖는다. 구현예에서, 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 GG의 아미노산 서열을 갖는다.

[0260] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, 아미노산 229-231의 결실, D67A, D202G, K404N, E471K, N488Y, D601G, 및 A688V로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다.

[0261] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K973P, V974P, QQAQ(서열번호 7)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위, 아미노산 229-231의 결실, L5F, D67A, D202G, K404N, E471K, N488Y, D601G, 및 A688V로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, K973P, V974P, QQAQ(서열번호 7)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위, 아미노산 229-231의 결실, L5F, D67A, D202G, K404N, E471K, N488Y, D601G, 및 A688V로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 갖는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 144의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, 서열번호 144의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 145의 서열을 갖는 핵산에 의해

암호화된다.

[0262] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K973P, V974P, GG의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위, 아미노산 229-231의 결실, L5F, D67A, D202G, K404N, E471K, N488Y, D601G, 및 A688V로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, K973P, V974P, GG의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위, 아미노산 229-231의 결실, L5F, D67A, D202G, K404N, E471K, N488Y, D601G, 및 A688V로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 갖는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 144의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, 서열번호 144의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 145의 서열을 갖는 핵산에 의해 암호화된다.

[0263] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, L5F, T7N, P13S, D125Y, R177S, K404T, E471K, N488Y, D601G, H642Y, T1014I, 및 V1163F로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, L5F, T7N, P13S, D125Y, R177S, K404T, E471K, N488Y, D601G, H642Y, T1014I, 및 V1163F로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 151의 아미노산 서열을 가지며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, 서열번호 151의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 150의 서열을 갖는 핵산에 의해 암호화된다.

[0264] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, 아미노산 229-231의 결실, L5F, D67A, D202G, L229H, K404N, E471K, N488Y, D601G, 및 A688V로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다.

[0265] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, K404N, E471K, N488Y, L5F, D67A, D202G, L229H, D601G, A688V, 및 아미노산 229-231의 결실로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(서열번호 7)의 아미노산 서열을 갖는다. 구현예에서, 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 GG의 아미노산 서열을 갖는다.

[0266] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, K404N, E471K, 및 N488K로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, K404N, E471K, 및 N488Y로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유한다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, K404N, E471K, 및 N488K로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 갖는 CoV S 폴리펩티드의 RBD이며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, K404N, E471K, 및 N488Y로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 갖는 CoV S 폴리펩티드의 RBD이며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다.

[0267] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K973P, V974P, GG의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위, D601G, E404N, E471K, 및 N488Y로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유한다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K973P, V974P, GG의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위, 및 D601G 돌연변이 로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, K973P, V974P, GG의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위, 및 D601G 돌연변이로부터 선택되는 변형을 함유하는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 133의 아미노산 서열을 갖는다.

[0268] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위(임의적으로 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(서열번호 7) 또는 GG임), K404N, E471K, N488K, D67A, D202G, L229H, D601G, 및 A688V로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위(임의적으로 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(서열번호 7) 또는 GG임), K404N, E471K, N488K, D67A, D202G, L229H, D601G, 및 A688V로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 132 또는 서열번호 141의 아미노산 서열을 갖는다. 구현예에서, 서열번호 132의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드는 서열번

호 131의 핵산 서열을 갖는 핵산에 의해 암호화된다. 구현예에서, 서열번호 132의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 142의 핵산 서열을 갖는 핵산에 의해 암호화된다.

[0269] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, W139C 및 L439R로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, W139C 및 L439R 변형을 포함하는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 117 또는 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 신호 펩티드와 함께 발현된다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, D601G, W139C, 및 L439R로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 포함하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, D601G, W139C, 및 L439R 변형을 포함하고, 서열번호 117 또는 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 신호 펩티드와 함께 발현된다.

[0270] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위, D601G, L5F, D67A, D202G, 아미노산 229-231의 결실, R233I, K404N, E471K, N488Y, 및 A688V로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 포함하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다.

[0271] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위(임의적으로 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(서열번호 7)임), W139C, S481P, D601G, 및 L439R로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위(임의적으로 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(서열번호 7)임), W139C, D601G, 및 L439R로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위(임의적으로 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(서열번호 7)임), W139C, S481P, 및 D601G로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위(임의적으로 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(서열번호 7)임), W139C, S481P, D601G, 및 L439R로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 153의 아미노산 서열을 갖는다. 구현예에서, 서열번호 153의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 117의 아미노산 서열을 갖는 신호 펩티드를 포함한다. 구현예에서, 서열번호 153의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 신호 펩티드를 포함한다.

[0272] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위(임의적으로 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(서열번호 7)임), T82I, D240G, E471K, D601G, 및 A688V로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위(임의적으로 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(서열번호 7)임), T82I, D240G, E471K, D601G, 및 A688V로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 156의 아미노산 서열을 가지며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위(임의적으로 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(서열번호 7)임), T82I, D240G, E471K, D601G, 및 A688V로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 154 또는 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 신호 펩티드를 포함하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다.

[0273] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위(임의적으로 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(서열번호 7)임), T82I, D240G, S464N, D601G, 및 A688V로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위(임의적으로 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(서열번호 7)임), T82I, D240G, S464N, D601G, 및 A688V 로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 158의 아미노산 서열을 가지며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위(임의적으로 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(서열번호 7)임), T82I, D240G, S464N, D601G, 및 A688V로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 154의 신호 펩티드를 포함하며, 여기

서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다.

[0274] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위(임의적으로 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(서열번호 7)임), 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 아미노산 131의 결실, N488Y 돌연변이, A557D 돌연변이, D601G 돌연변이, P668H 돌연변이, T703I 돌연변이, S969A 돌연변이, 및 D1105H 돌연변이로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하며, 여기서 상기 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위(임의적으로 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(서열번호 7)임), 아미노산 56의 결실, 아미노산 57의 결실, 아미노산 132의 결실, N488Y 돌연변이, A557D 돌연변이, D601G 돌연변이, P668H 돌연변이, T703I 돌연변이, S969A 돌연변이, D1105H 돌연변이로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하며, 여기서 상기 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다.

[0275] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위(임의적으로 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(서열번호 7)임), D67A 돌연변이, L229H 돌연변이, R233I 돌연변이, A688V 돌연변이, N488Y 돌연변이, K404N 돌연변이, E471K 돌연변이, 및 D601G 돌연변이로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하며, 여기서 상기 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다.

[0276] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K973P, V974P, 불활성화된 퓨린 절단 부위(임의적으로 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(서열번호 7)임), L5F 돌연변이, T7N 돌연변이, P13S 돌연변이, D125Y 돌연변이, R177S 돌연변이, K404T 돌연변이, E471K 돌연변이, N488Y 돌연변이, D601G 돌연변이, H642Y 돌연변이, T1014I 돌연변이, 및 T1163F 돌연변이로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하며, 여기서 상기 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다.

[0277] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K986P, V987P, 불활성화된 퓨린 절단 부위(임의적으로 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(서열번호 7)임), S13I 돌연변이, W152C 돌연변이, 및 L452R 돌연변이로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하며, 여기서 상기 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K986P, V987P, 불활성화된 퓨린 절단 부위(임의적으로 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(서열번호 7)임), S13I 돌연변이, W152C 돌연변이, 및 L452R 돌연변이로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하며, 여기서 상기 CoV S 폴리펩티드는 N-말단 신호 펩티드가 없는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다.

[0278] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K986P, V987P, A67V, T95I, G142D, L212I, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y,Y505H, T547K,D614G, H655Y, H679K, P681H, N764K, D796Y,N856K, Q954H, N969K, L981F, 아미노산 69, 70, 143, 144, 145, 및 211의 결실, 및 아미노산 214 및 215 사이에 아미노산 EPE의 삽입으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하며, 임의적으로 여기서 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(서열번호 7)이고, 상기 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, 하나 이상의 전술한 변형을 갖는 CoV S 폴리펩티드는 N-말단 신호 펩티드가 없다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 159의 아미노산 서열을 갖는다.

[0279] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 K986P, V987P, A67V, T95I, G142D, L212I, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, H679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 함유하며, 임의적으로 여기서 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(서열번호 7)이고, 상기 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, 하나 이상의 전술한 변형을 갖는 CoV S 폴리펩티드는 N-말단 신호 펩티드가 없다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 160의 아미노산 서열을 갖는다.

[0280] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 159 또는 167 중 어느 하나이다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드의 아미노산 서열은 서열번호 159 또는 167 중 어느 하나와 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5% 동일성을 갖는다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 160 또는 170 중 어느 하나이다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드의 아미노산 서열은 서열번호 160 또

는 170 중 어느 하나와 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5% 동일성을 갖는다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 161, 162, 163, 164, 165, 166, 168, 169, 171, 및 172 중 어느 하나의 핵산에 의해 암호화된다. 구현예에서, 서열번호 160, 170, 159, 또는 167 중 어느 하나의 CoV S 폴리펩티드는 N-말단 신호 펩티드가 없다. 예를 들면, 상기 CoV S 폴리펩티드는 C-말단이 MFVFLVLLPLVSS(서열번호 5)인 서열번호 160, 170, 159, 또는 167의 폴리펩티드 서열을 포함한다.

[0281] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 아래의 표에 기술된 것과 같은 변형의 세트를 함유하며, 여기서 상기 변형은 서열번호 1에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 아래의 표에 기술된 것과 같은 불활성화된 퓨린 절단 부위(임의적으로 상기 퓨린 절단 부위는 QQAQ(서열번호 7)임), 및 K986P 및 V987P 변형의 변형의 세트를 함유하며, 여기서 상기 변형은 서열번호 1에 관해 번호가 지정된다.

표 8

[0282]

	변형 조합 1	변형 조합 2	변형 조합 3	변형 조합 4	변형 조합 5	변형 조합 6
돌연변이	T19R T95I G142D Y145H E156G A222V K417N L452R T478K D614G P681R D950N	A67V T95I, G142D G339D S371L S373P S375F **K417N, E484K** **T478K, N501Y** N440K, Q493K G446S, Q498R Y505H, T547K **D614G**, H655Y N679K, **P681H** N764K, D796Y N856J, Q954H N969K, L981	T19R G142D E156G K417N N439K L452R T478K E484K N501Y D614G P681R D950N W258I	W64H H66W D213V L214R T19R G142D E156G K417N N439K L452R T478K E484K N501Y D614G P681R D950N W258I	T19R G142D E156G K417N L452R T478K E484Q D614G P681R D950N	D80A D215G L242H K417N E484K N501Y D614G A701V
결실 삽입	F157 결실 R158 결실	H69-V70 결실 143-145 결실 211-212 결실 214 및 215 사이에 EPE의 삽입	F157 결실 R158 결실	F157 결실 R158 결실	F157 결실 R158 결실	

[0283] 구현예에서, 상기 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드는 폴리펩티드 링커를 포함한다. 구현예에서, 상기 폴리펩티드 링커는 글리신 및 세린을 함유한다. 구현예에서, 상기 링커는 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 또는 약 100% 글리신을 갖는다.

[0284] 구현예에서, 상기 폴리펩티드 링커는 $(SGGG)_n$(서열번호 91)의 반복체를 가지며, 여기서 n은 1 내지 50의 정수(예컨대, 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)이다. 구현예에서, 상기 폴리펩티드 링커는 서열번호 90에 해당하는 아미노산 서열을 갖는다.

[0285] 구현예에서, 상기 폴리펩티드 링커는 $(GGGGS)_n$(서열번호 93)의 반복체를 가지며, 여기서 n은 1 내지 50의 정수(예컨대, 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)이다.

[0286] 구현예에서, 상기 폴리펩티드 링커는 $(GGGS)_n$(서열번호 92)의 반복체를 가지며, 여기서 n은 1 내지 50의 정수(예컨대, 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)이다.

[0287] 한 측면에서, 상기 폴리펩티드 링커는 폴리-(Gly)n 링커이며, 여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20이다. 다른 구현예에서, 상기 링커는 디펩티드, 트리펩티드, 및 쿼드리펩티드로 이루어진 군으로부터 선택된다. 구현예에서, 상기 링커는 알라닌-세린(AS), 루이신-글루탐산(LE), 및 세린-아르기닌(SR)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 디펩티드이다.

[0288] 구현예에서, 상기 폴리펩티드 링커는 자연적으로 발생하는 CoV S 폴리펩티드 또는 본 명세서에 개시된 CoV S 폴리펩티드의 1 내지 100개의 인접한 아미노산을 포함한다. 구현예에서, 상기 폴리펩티드 링커는 서열번호 94에 해당하는 아미노산 서열을 갖는다.

[0289] 구현예에서, 상기 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드는 폴돈(foldon)을 포함한다. 구현예에서, 상기 TMCT는 폴돈으로 교체된다. 구현예에서, 폴돈은 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드의 3량체화를 유발한다. 구현예에서, 상기 폴돈은 본 기술분야에 알려진 아미노산 서열을 갖는다. 구현예에서, 상기 폴돈은 서열번호 68의 아미노산 서열을 갖는다. 구현예에서, 상기 폴돈은 T4 피브리틴(fibritin) 3량체화 모티프이다. 구현예에서, 상기 T4 피브리틴 3량체화 도메인은 서열번호 103의 아미노산 서열을 갖는다. 구현예에서, 상기 폴돈은 폴리펩티드 링커에 의해 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드로부터 아미노산 서열이 분리된다. 폴리펩티드 링커의 비제한적 예는 본 개시의 전반에 걸쳐서 발견된다.

[0290] 구현예에서, 본 개시는 코로나바이러스 S 단백질의 단편을 포함하는 CoV S 폴리펩티드 및 이를 포함하는 나노입자 및 백신을 제공한다. 구현예에서, 상기 코로나바이러스 S 단백질의 단편은 10 내지 1500개 아미노산의 길이이다(예컨대, 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, 약 950, 약 1000, 약 1050, 약 1100, 약 1150, 약 1200, 약 1250, 약 1300, 약 1350, 약 1400, 약 1450, 또는 약 1500개 아미노산의 길이). 구현예에서, 상기 코로나바이러스 S 단백질의 단편은 수용체 결합 도메인(RBD), 하위도메인 1, 하위도메인 2, 상부 나선, 융합 펩티드, 연결 영역, 헵타드 반복체 1, 중앙 나선, 헵타드 반복체 2, NTD, 및 TMCT로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0291] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 RBD 및 하위도메인 1을 포함한다. 구현예에서, RBD 및 하위도메인 1을 포함하는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 319 내지 591이다.

[0292] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 코로나바이러스 S 단백질의 단편을 함유하며, 여기서 상기 코로나바이러스 S 단백질의 단편은 RBD이다. RBD의 비제한적 예는 SARS-CoV-2의 RBD(아미노산 서열 = 서열번호 69), SARS의 RBD(아미노산 서열 = 서열번호 70), 및 MERS의 RBD(아미노산 서열 = 서열번호 71)를 포함한다.

[0293] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 폴리펩티드 링커에 의해 연결되는 2 이상의 RBD를 함유한다. 구현예에서, 상기 폴리펩티드 링커는 서열번호 90 또는 서열번호 94의 아미노산 서열을 갖는다.

[0294] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개 RBD를 함유한다.

[0295] 일부 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 폴리펩티드 링커에 의해 연결되는 2 이상의 SARS-CoV-2 RBD를 함유한다. 구현예에서, 2 이상의 SARS-CoV-2 RBD를 함유하는 항원은 서열번호 72-75 중 하나에 해당하는 아미노산 서열을 갖는다.

[0296] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 SARS-CoV-2 RBD 및 SARS RBD를 함유한다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 SARS-CoV-2 RBD 및 SARS RBD를 포함하며, 여기서 각각의 RBD는 폴리펩티드 링커에 의해 분리된다. 구현예에서, SARS-CoV-2 RBD 및 SARS RBD를 포함하는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 76-79로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는다.

[0297] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 SARS-CoV-2 RBD 및 MERS RBD를 함유한다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 SARS-CoV-2 RBD 및 MERS RBD를 포함하며, 여기서 각각의 RBD는 폴리펩티드 링커에 의해 분리된다.

[0298] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 SARS RBD 및 MERS RBD를 포함한다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 SARS RBD 및 MERS RBD를 포함하며, 여기서 각각의 RBD는 폴리펩티드 링커에 의해 분리된다.

[0299] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 SARS-CoV-2 RBD, SARS RBD, 및 MERS RBD를 함유한다. 구현예에서, 상기

CoV S 폴리펩티드는 SARS-CoV-2 RBD, SARS RBD, 및 MERS RBD를 함유하며, 여기서 각각의 RBD는 폴리펩티드 링커에 의해 분리된다. 구현예에서, SARS-CoV-2 RBD, SARS RBD, 및 MERS RBD를 포함하는 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 80-83으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는다.

[0300] 구현예에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩티드는 N-말단 신호 펩티드와 함께 발현된다. 구현예에서, 상기 N-말단 신호 펩티드는 서열번호 5의 아미노산 서열(MFVFLVLLPLVSS)을 갖는다. 구현예에서, 상기 N-말단 신호 펩티드는 서열번호 117의 아미노산 서열(MFVFLVLLPLVSI)을 갖는다. 구현예에서, 상기 N-말단 신호 펩티드는 서열번호 154의 아미노산 서열(MFVFFVLLPLVSS)을 갖는다. 구현예에서, 상기 N-말단 신호 펩티드는 서열번호 193의 아미노산 서열(MFGFLVLLPLVSS)을 갖는다. 구현예에서, 상기 신호 펩티드는 CoV S 단백질을 발현할 수 있는 임의의 신호 펩티드로 교체될 수 있다. 구현예에서, CoV S 단백질 신호 펩티드 아미노산의 하나 이상은 결실 또는 돌연변이될 수 있다. 개시 메티오닌 잔기는 발현을 개시하기 위해 유지된다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 35, 서열번호 37, 서열번호 95, 서열번호 43, 서열번호 47, 서열번호 50, 서열번호 53, 서열번호 55, 서열번호 57, 서열번호 96, 서열번호 60, 서열번호 131, 서열번호 135, 서열번호 142, 서열번호 145, 서열번호 148, 서열번호 150, 서열번호 196, 서열번호 197; 서열번호 198; 서열번호 199; 서열번호 201; 서열번호 202; 서열번호 204; 서열번호 206; 서열번호N 208; 서열번호 210; 서열번호 212; 서열번호 214; 및 서열번호 216으로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열에 의해 암호화된다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드의 N-말단 신호 펩티드는 자연형 CoV 스파이크(S) 신호 폴리펩티드(서열번호 5)와 비교하여 Ser-13에 돌연변이를 함유한다. 구현예에서, Ser-13은 임의의 천연 아미노산으로 돌연변이된다. 구현예에서, Ser-13은 알라닌, 메티오닌, 이소루이신, 루이신, 트레오닌, 또는 발린으로 돌연변이된다. 구현예에서, Ser-13은 이소루이신으로 돌연변이된다.

[0301] 숙주 세포에서 CoV S 단백질을 발현한 후, 상기 N-말단 신호 펩티드는 절단되어 성숙한 CoV 단백질 서열(서열번호 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, 158, 174, 175, 176, 181-184, 186, 188, 190, 195, 217-228 233-236, 및 243)을 제공한다. 구현예에서, 상기 신호 펩티드는 숙주 세포 프로테아제(protease)에 의해 절단된다. 한 측면에서, 전장(full-length) 단백질이 숙주 세포로부터 단리되고, 후속해서 신호 펩티드가 절단될 수 있다.

[0302] 발현 및 정제하는 동안에 서열번호 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, 160, 173, 177-180, 185, 189, 191, 194, 200, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 229-232, 및 242에 해당하는 아미노산 서열을 갖는 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드로부터 신호 펩티드를 절단한 후, 서열번호 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, 158, 174, 175, 176, 181-184, 186, 188, 190, 195, 217-228, 233-236, 및 243으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 성숙한 폴리펩티드가 입수되고, CoV S 나노입자 백신 또는 CoV S 나노입자를 생산하기 위해 사용된다.

[0303] 유리하게는, 본 개시된 CoV S 폴리펩티드는 자연형 CoV 스파이크(S) 단백질과 비교하여 향상된 단백질 발현 및 안전성을 가질 수 있다.

[0304] 구현예에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩티드는 자연형 코로나바이러스 S 단백질(서열번호 2)로부터 추가 변형을 함유한다. 구현예에서, 본 명세서에 기술된 코로나바이러스 S 단백질은 자연형 코로나바이러스 S 단백질과 적어도 80%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 97%, 또는 적어도 99% 동일성을 나타낸다. 본 기술분야의 기술자는 자연형 단백질 또는 본 명세서에 기술된 임의의 CoV S 폴리펩티드에 대한 재조합 코로나바이러스 S 단백질의 동일성 백분율을 계산하기 위해 알려진 기술을 사용할 것이다. 예를 들면, 동일성 백분율은 온라인에서 이용가능한 수단인 CLUSTALW2 또는 기본 국소 정렬 검색 도구(BLAST)를 이용해 계산될 수 있다. 다음의 디폴트 파라미터가 CLUSTALW2 쌍별 정렬을 위해 사용될 수 있다: 단백질 가중치 매트릭스 = Gonnet; 갭 오픈(Gap Open) = 10; 갭 연장(Gap Extension) = 0.1.

[0305] 구현예에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 87, 서열번호 174, 서열번호 175, 서열번호 176, 서열번호 181-184, 서열번호 186, 서열번호 188, 서열번호 190, 서열번호 195; 서열번호 217-228, 서열번호 233-236, 및 서열번호 243 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5% 동일하다. CoV S 폴리펩티드는 서열번호 87, 서열번호 174, 서열번호 175, 서열번호 176, 서열번호

181-184, 서열번호 186, 서열번호 188, 서열번호 190, 서열번호 195; 서열번호 217-228, 서열번호 233-236, 및 서열번호 243 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드의 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, 최대 약 30, 최대 약 35, 최대 약 40, 최대 약 45, 또는 최대 약 50개 아미노산의 결실, 삽입, 또는 돌연변이를 가질 수 있다. CoV S 폴리펩티드는 서열번호 87, 서열번호 174, 서열번호 175, 서열번호 176, 서열번호 181-184, 서열번호 186, 서열번호 188, 서열번호 190, 서열번호 195; 서열번호 217-228, 서열번호 233-236, 및 서열번호 243 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드와 비교할 때 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 12 내지 17개 아미노산, 약 15 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 40 내지 45개 아미노산, 또는 약 45 내지 50개 아미노산의 결실, 삽입, 또는 돌연변이를 가질 수 있다. 구현예에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 87, 서열번호 174, 서열번호 175, 서열번호 176, 서열번호 181-184, 서열번호 186, 서열번호 188, 서열번호 190, 서열번호 195; 서열번호 217-228, 서열번호 233-236, 및 서열번호 243 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 코로나바이러스 S 단백질과 비교하여 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 또는 약 25개의 치환을 포함한다.

[0306] 구현예에서, 상기 코로나바이러스 S 폴리펩티드는 N-말단, C-말단, 또는 N-말단 및 C-말단 모두에서 연장된다. 한 측면에서, 상기 연장은 기능, 예컨대 정제 또는 검출을 위해 유용한 태그이다. 한 측면에서, 상기 태그는 에피토프를 함유한다. 예를 들면, 상기 태그는 폴리글루타메이트 태그, FLAG-태그, HA-태그, (약 5-10개 히스티딘을 갖는) 폴리His-태그(서열번호 101), 헥사히스티딘 태그(서열번호 100), (8개 히스티딘을 갖는) 8X-His-태그(서열번호 102), Myc-태그, 글루타티온-S-트랜스퍼라아제-태그, 녹색 형광 단백질-태그, 말토오스 결합 단백질-태그, 티오레독신-태그, 또는 Fc-태그일 수 있다. 다른 측면에서, 상기 연장은 발현을 향상시키기 위해 단백질에 융합되는 N-말단 신호 펩티드일 수 있다. 이러한 신호 펩티드는 종종 세포에서 발현되는 동안에 절단되지만, 일부 나노입자는 온전한 신호 펩티드를 갖는 항원을 함유할 수 있다. 따라서, 나노입자가 항원을 포함할 때, 상기 항원은 연장을 함유할 수 있고, 이에 따라 나노입자 내로 통합될 때 융합 단백질일 수 있다. 서열에 대한 동일성을 계산하기 위한 목적의 경우, 연장은 포함되지 않는다. 구현예에서, 상기 태그는 프로테아제 절단 부위이다. 프로테아제 절단 부위의 비제한적 예는 HRV3C 프로테아제 절단 부위, 키모트립신, 트립신, 알라스타아제, 엔도펩티다아제, 카스파아제(caspase)-1, 카스파아제-2, 카스파아제-3, 카스파아제-4, 카스파아제-5, 카스파아제-6, 카스파아제-7, 카스파아제-8, 카스파아제-9, 카스파아제-10, 엔테로키나아제, 인자 Xa, 그랜자임(Granzyme) B, TEV 프로테아제, 및 트롬빈을 포함한다. 구현예에서, 상기 프로테아제 절단 부위는 HRV3C 프로테아제 절단 부위이다. 구현예에서, 상기 프로테아제 절단 부위는 서열번호 98의 아미노산 서열을 포함한다.

[0307] 구현예에서, 상기 CoV S 당단백질은 융합 단백질을 포함한다. 구현예에서, 상기 CoV S 당단백질은 N-말단 융합 단백질을 포함한다. 구현예에서, 상기 Cov S 당단백질은 C-말단 융합 단백질을 포함한다. 구현예에서, 상기 융합 단백질은 단백질 발현, 정제, 또는 검출을 위해 유용한 태그를 포괄한다. 구현예에서, 상기 태그는 (약 5-10개 히스티딘을 갖는) 폴리His-태그, Myc-태그, 글루타티온-S-트랜스퍼라아제-태그, 녹색 형광 단백질-태그, 말토오스 결합 단백질-태그, 티오레독신-태그, 스트렙(Strep)-태그, 트윈(Twin)-스트렙-태그, 또는 Fc-태그이다. 구현예에서, 상기 태그는 Fc-태그이다. 구현예에서, 상기 Fc-태그는 단량체성(monomeric), 2량체성(dimeric), 또는 3량체성이다. 구현예에서, 상기 태그는 헥사히스티딘 태그, 예컨대 6개 히스티딘(서열번호 100)을 함유하는 폴리His-태그이다. 구현예에서, 상기 태그는 서열번호 99의 아미노산 서열을 갖는 트윈-스트렙-태그이다.

[0308] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 다른 코로나바이러스 단백질을 포함하는 융합 단백질이다. 구현예에서, 상기 다른 코로나바이러스 단백질은 동일한 코로나바이러스로부터 유래된다. 구현예에서, 상기 다른 코로나바이러스 단백질은 상이한 코로나바이러스로부터 유래된다.

[0309] 한 측면에서, 상기 CoV S 단백질은 절단될 수 있다. 예를 들면, N-말단은 약 10개 아미노산, 약 30개 아미노산, 약 50개 아미노산, 약 75개 아미노산, 약 100개 아미노산, 또는 약 200개 아미노산까지 절단될 수 있다. C-말단은 N-말단 대신에 또는 이에 더하여 절단될 수 있다. 예를 들면, C-말단은 약 10개 아미노산, 약 30개 아미노산, 약 50개 아미노산, 약 75개 아미노산, 약 100개 아미노산, 또는 약 200개 아미노산까지 절단될 수 있다. 절단을 갖는 단백질에 대한 동일성을 계산하기 위한 목적의 경우, 동일성은 단백질의 남아 있는 부분에 대해 측정된다.

[0310] *CoV 스파이크(S) 폴리펩티드를 함유하는 나노입자*

[0311] 구현예에서, 상기 성숙한 CoV S 폴리펩티드 항원은 코로나바이러스 S 나노입자를 포함하는 백신을 생산하기 위해 사용된다. 구현예에서, 본 개시의 나노입자는 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩티드를 포함한다. 구현예에서, 본 개시의 나노입자는 세제 코어와 회합된 CoV S 폴리펩티드를 포함한다. 상기 세제의 존재는 항원을 조직하고 제공하는 코어를 형성함으로써 나노입자의 형성을 용이하게 한다. 구현예에서, 상기 나노입자는 다중-올리고머성(multi-oligomeric)) 당단백질-세제(예컨대, PS80) 나노입자로 조립되는 CoV S 폴리펩티드를 함유할 수 있으며, 여기서 헤드 영역은 바깥으로 돌출되고 소수성 영역 및 PS80 세제는 당단백질에 의해 둘러싸인 중심 코어를 형성한다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 내재적으로 세제 코어 내로의 단백질의 회합을 촉진하는 막통과 도메인을 함유하거나, 함유하도록 적응된다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 헤드 도메인을 함유한다. **도 10**은 본 개시의 CoV S 폴리펩티드의 예시적인 구조를 보여준다. 1차적으로, CoV S 폴리펩티드 3량체의 막통과 도메인은 세제와 회합된다; 그러나, 상기 폴리펩티드의 다른 부분이 또한 상호작용할 수 있다. 유리하게는, 상기 나노입자는 환경적 스트레스에 대해 개선된 저항성을 가져서, 향상된 안전성 및/또는 세제 주변에 다수 사본의 단백질을 조직함으로 인한 면역 시스템에 대한 개선된 제시를 제공한다.

[0312] 구현예에서, 상기 세제 코어는 비이온성 세제 코어이다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 상기 비이온성 세제 코어와 회합된다. 구현예에서, 상기 세제는 폴리소르베이트-20(PS20), 폴리소르베이트-40(PS40), 폴리소르베이트-60(PS60), 폴리소르베이트-65(PS65) 및 폴리소르베이트-80(PS80)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0313] 구현예에서, 상기 세제는 PS80이다.

[0314] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 3량체를 형성한다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드 나노입자는 비이온성 세제 코어를 둘러싸는 다수의 폴리펩티드 3량체로 구성된다. 구현예에서, 상기 나노입자는 적어도 약 1개 3량체 이상을 함유한다. 구현예에서, 상기 나노입자는 스파이크 단백질의 적어도 약 5개 3량체 내지 약 30개 3량체를 함유한다. 구현예에서, 각각의 나노입자는 그 사이의 모든 값 및 범위를 포함하는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 15, 20, 25, 또는 30개 3량체를 함유할 수 있다. 본 명세서에 개시된 조성물은 상이한 수의 3량체를 갖는 나노입자를 함유할 수 있다. 예를 들면, 조성물은 3량체의 수가 2-9의 범위인 나노입자를 함유할 수 있다; 구현예에서, 조성물 내의 나노입자는 2-6개 3량체를 함유할 수 있다. 구현예에서, 상기 조성물은 나노입자 당 2 내지 6개 3량체, 또는 나노입자 당 2 내지 9개 3량체를 갖는 나노입자의 이종성 개체군(population)을 함유한다. 구현예에서, 상기 조성물은 실질적으로 나노입자의 균질한 개체군을 함유할 수 있다. 예를 들면, 상기 개체군은 5개 3량체를 갖는 나노입자를 약 95% 함유한다.

[0315] 본 명세서에 개시된 나노입자는 입자 크기에 있어서 범위를 갖는다. 구현예에서, 본 명세서에 개시된 나노입자는 약 20 nm 내지 약 60 nm, 약 20 nm 내지 약 50 nm, 약 20 nm 내지 약 45 nm, 약 20 nm 내지 약 35 nm, 약 20 nm 내지 약 30 nm, 약 25 nm 내지 약 35 nm, 약 25 nm 내지 약 45 nm, 약 30 nm 내지 약 120 nm, 약 30 nm 내지 약 80 nm, 약 30 nm 내지 약 60 nm, 약 30 nm 내지 약 65 nm, 또는 약 30 nm 내지 약 50 nm의 Z-ave 크기의 입자 크기 범위이다. 입자 크기(Z-ave)는 달리 특정되지 않는 한 Zetasizer NanoZS(Malvern, UK)를 이용하는 동적 광 산란(DLS)에 의해 측정된다.

[0316] 구현예에서, 본 명세서에 개시된 CoV S 폴리펩티드를 포함하는 나노입자는 야생형 CoV S 폴리펩티드를 포함하는 나노입자와 비교하여 감소된 입자 크기를 갖는다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 입자 크기에서 적어도 약 40% 더 작고, 예를 들면, 입자 크기에서 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.

[0317] 본 명세서에 개시된 CoV S 폴리펩티드를 포함하는 나노입자는 야생형 CoV S 폴리펩티드를 포함하는 나노입자보다 크기, 형상, 및 질량에 있어서 보다 균질하다. 불균질성(heterogeneity)의 척도인 다분산도 지수(PDI)는 달리 특정되지 않는 한 Malvern Setasizer를 이용하는 동적 광 산란에 의해 측정된다. 구현예에서, 본 명세서에서 측정된 입자는 약 0.1 내지 약 0.45, 예를 들면, 약 0.1, 약 0.2, 약 0.25, 약 0.29, 약 0.3, 약 0.35, 약 0.40, 또는 약 0.45의 PDI를 갖는다. 구현예에서, 본 명세서에서 측정된 나노입자는 서열번호 2의 야생형 CoV S 폴리펩티드를 포함하는 나노입자의 PDI보다 적어도 약 25% 더 작은, 예를 들면, 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 갖는다.

[0318] 상기 CoV S 폴리펩티드 및 이를 포함하는 나노입자는 야생형 CoV S 폴리펩티드 또는 그의 나노입자와 비교할 때 개선된 열적 안전성을 갖는다. 상기 CoV S 폴리펩티드의 열적 안전성은 달리 특정되지 않는 한 시차 주사 열량

측정법(DSC)을 이용해 측정된다. 전이 엔탈피(ΔHcal)는 CoV S 폴리펩티드를 펴기 위해 필요한 에너지이다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 야생형 CoV S 폴리펩티드와 비교할 때 증가된 ΔHcal을 갖는다. 구현예에서, CoV S 폴리펩티드의 ΔHcal은 야생형 CoV S 폴리펩티드의 ΔHcal보다 약 2배, 약 3배, 약 4배, 약 5배, 약 6배, 약 7배, 약 8배, 약 9배, 또는 약 10배 더 크다.

[0319] 몇 가지 나노입자 타입이 본 명세서에 개시된 백신 조성물에 포함될 수 있다. 한 측면에서, 상기 나노입자 타입은 2량체 또는 단량체일 수 있는 이방성막대의 형태이다. 다른 측면에서, 상기 나노입자 타입은 구형 올리고머이다. 또 다른 측면에서, 상기 나노입자는 처음 2가지 타입 사이의 중간의 침강 특성을 갖는 중간체 나노입자로서 기술될 수 있다. 나노입자 타입의 형성은 생산 공정 동안에 세제 및 단백질 농도를 제어함으로써 조절될 수 있다. 나노입자 타입은 침강 계수를 측정함으로써 결정될 수 있다.

[0320] *CoV S 폴리펩티드 항원을 함유하는 나노입자의 생산*

[0321] 본 개시의 나노입자는 비-자연적으로 발생하는 생성물이고, 그 성분은 자연에서 함께 발생하지 않는다. 일반적으로, 본 명세서에 개시된 방법은 세제 교환 접근법을 이용하며, 여기서 제1 세제는 단백질을 단리하기 위해 사용되고, 이후 나노입자를 형성하기 위해 상기 제1 세제는 제2 세제로 교환된다.

[0322] 상기 나노입자에 함유되는 항원은 전형적으로 숙주 세포에서 재조합 발현에 의해 생산된다. 표준 재조합 기술이 사용될 수 있다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 바큘로바이러스 시스템을 이용하는 곤충 숙주 세포에서 발현된다. 구현예에서, 상기 바큘로바이러스는 카텝신(cathepsin)-L 낙-아웃(knock-out) 바큘로바이러스, 키티나아제(chitinase) 낙-아웃 바큘로바이러스이다. 임의적으로, 상기 바큘로바이러스는 카텝신-L 및 키티나아제 모두에 대해 이중 낙-아웃된다. 높은 레벨의 발현이 곤충 세포 발현 시스템에서 수득될 수 있다. 곤충 세포의 비제한적 예는 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda)(Sf) 세포, 예컨대 Sf9, Sf21, 트리코플루시아니(Trichoplusiani) 세포, 예컨대 하이 파이브(High Five) 세포, 및 드로소필라(Drosophila) S2 세포이다. 구현예에서, 본 명세서에 기술된 CoV S 폴리펩티드는 임의의 적합한 숙주 세포에서 생산된다. 구현예에서, 상기 숙주 세포는 곤충 세포이다. 구현예에서, 상기 곤충 세포는 Sf9 세포이다.

[0323] 전형적인 형질감염 및 세포 성장 방법이 세포를 배양하기 위해 사용될 수 있다. 벡터, 예컨대, 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터는 본 기술분야에 잘 알려진 방법에 따라 숙주 세포내로 형질감염될 수 있다. 예를 들면, 진핵생물 세포 내로 핵산을 도입하는 것은 인산칼슘 공동-침전, 전기천공법, 미세주입법, 리포펙션(lipofection), 및 폴리아민 형질감염 시약을 채용하는 형질감염에 의해 달성될 수 있다. 한 구현예에서, 상기 벡터는 재조합 바큘로바이러스이다.

[0324] 숙주 세포를 성장시키기 위한 방법은 회분식(batch), 유가식(batch-fed), 연속식 및 관류 세포 배양 기술을 비제한적으로 포함한다. 세포 배양은 세포가 증식하고 정제 및 단리를 위해 단백질(예컨대, 재조합 단백질)을 발현하는 생물반응기(발효 챔버)에서의 세포의 성장 및 증식을 의미한다. 전형적으로, 세포 배양은 생물반응기에서 멸균, 제어된 온도 및 대기 조건 하에 수행된다. 생물반응기는 세포를 배양하기 위해 사용되는 챔버이며, 온도, 대기, 교반 및/또는 pH와 같은 환경 조건이 모니터링될 수 있다. 한 구현예에서, 상기 생물반응기는 스테인리스 스틸 챔버이다. 다른 구현예에서, 상기 생물반응기는 사전-멸균된 플라스틱 가방(예컨대, Cellbag®, Wave Biotech, Bridgewater, N.J.)이다. 다른 구현예에서, 상기 사전-멸균된 플라스틱 가방은 약 50 L 내지 3500 L 가방이다.

[0325] *CoV 스파이크(S) 단백질 항원을 함유하는 나노입자의 추출 및 정제*

[0326] 숙주 세포의 성장 후, 상기 단백질은 세제 및 정제 프로토콜을 이용해 숙주 세포로부터 수확될 수 있다. 숙주 세포가 48 내지 96시간 동안 성장하면, 상기 세포는 배지로부터 단리되고, 세제-함유 용액을 첨가해 세포막을 가용화시켜서, 세제 추출물 내에 단백질을 방출한다. 트리톤(Triton) X-100 및 NP-9로도 알려져 있는 TERGITOL® 노닐페놀 에톡실레이트는 각각 추출을 위한 바람직한 세제이다. 상기 세제는 약 0.1% 내지 약 1.0%의 최종 농도로 첨가될 수 있다. 예를 들면, 상기 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. 한 측면에서, 상기 농도는 약 0.5%이다.

[0327] 다른 측면에서, 상이한 제1 세제가 숙주 세포로부터 단백질을 단리하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들면, 상기 제1 세제는 비스(폴리에틸렌 글리콜 비스[이미다조일카르보닐]), 노녹시놀-9, 비스(폴리에틸렌 글리콜 비스[이미다조일 카르보닐]), BRIJ® 폴리에틸렌 글리콜 도데실 에테르 35, BRIJ® 폴리에틸렌 글리콜 (3) 세틸 에테르 56, BRIJ® 알코올 에톡실레이트 72, BRIJ® 폴리옥실 2 스테아릴 에테르 76, BRIJ® 폴리에틸렌 글리콜 모노올레일 에테르 92V, BRIJ® 폴리옥시에틸렌 (10) 올레일 에테르 97, BRIJ® 폴리에틸렌 글리콜 헥사데실 에테르

58P, CREMOPHOR® EL 마크로골글리세롤 리시놀레에이트, 데카에틸렌글리콜 모노도데실 에테르, N-데카노일-N-메틸글루카민, n-데실 알파-D-글루코피라노시드,데실 베타-D-말토피라노시드, n-도데카노일-N-메틸글루카미드, n-도데실 알파-D-말토시드, n-도데실 베타-D-말토시드, n-도데실 베타-D-말토시드, 헵타에틸렌 글리콜 모노데실 에테르, 헵타에틸렌 글리콜 모노도데실 에테르, 헵타에틸렌 글리콜 모노테트라데실 에테르, n-헥사데실 베타-D-말토시드, 헥사에틸렌 글리콜 모노도데실 에테르, 헥사에틸렌 글리콜 모노헥사데실 에테르, 헥사에틸렌 글리콜 모노옥타데실 에테르, 헥사에틸렌 글리콜 모노테트라데실 에테르, Igepal CA-630, Igepal CA -630, 메틸-6-O-(N -헵틸카바모일)-알파-D-글루코피라노시드, 노나에틸렌 글리콜 모노도데실 에테르, N-노나노일-N-메틸글루카민, N-노나노일N-메틸글루카민, 옥타에틸렌 글리콜 모노데실 에테르, 옥타에틸렌 글리콜모노도데실 에테르, 옥타에틸렌 글리콜 모노헥사데실 에테르, 옥타에틸렌 글리콜 모노옥타데실 에테르, 옥타에틸렌 글리콜 모노테트라데실 에테르, Octyl-베타-D 글루코피라노시드, 펜타에틸렌 글리콜 모노데실 에테르, 펜타에틸렌 글리콜 모노도데실 에테르, 펜타에틸렌 글리콜 모노헥사데실 에테르, 펜타에틸렌 글리콜 모노헥실 에테르, 펜타에틸렌 글리콜 모노옥타데실 에테르, 펜타에틸렌 글리콜 모노옥틸 에테르, 폴리에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르, 폴리에틸렌 글리콜 에테르 W-1, 폴리옥시에틸렌 10 트리데실 에테르, 폴리옥시에틸렌 100 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 20 이소헥사데실 에테르, 폴리옥시에틸렌 20 올레일 에테르, 폴리옥시에틸렌 40 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 50 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 8 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 비스(이미다졸릴 카르보닐), 폴리옥시에틸렌 25 프로필렌 글리콜 스테아레이트, 퀼라자(Quillaja) 껍질로부터의 사포닌, SPAN® 20 소르비탄 라우레이트, SPAN® 40 소르비탄 모노팔미테이트, SPAN® 60 소르비탄 스테아레이트, SPAN® 65 소르비탄 트리스테아레이트, SPAN® 80 소르비탄 모노올레에이트, SPAN® 85 소르비탄 트리올레에이트, TERGITOL® 2차 알코올 에톡실레이트 타입 15-S-12, TERGITOL® 2차 알코올 에톡실레이트 타입 15-S-30, TERGITOL® 2차 알코올 에톡실레이트 타입 15-S-5, TERGITOL® 2차 알코올 에톡실레이트 타입 15-S-7, TERGITOL® 2차 알코올 에톡실레이트 타입 15-S-9, TERGITOL® 노닐페놀 에톡실레이트 타입 NP-10, TERGITOL® 노닐페놀 에톡실레이트 타입 NP-4, TERGITOL® 노닐페놀 에톡실레이트 타입 NP-40, TERGITOL® 노닐페놀 에톡실레이트 타입 NP-7, TERGITOL® 노닐페놀 에톡실레이트 타입 NP-9, TERGITOL® 분지된 2차 알코올 에톡실레이트 타입 TMN-10, TERGITOL® 분지된 2차 알코올 에톡실레이트 타입 TMN-6, 트리톤™ X-100 폴리에틸렌 글리콜 tert-옥틸페닐 에테르 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0328] 이후, 상기 나노입자는 원심분리를 이용해 세포 파편(debris)으로부터 단리될 수 있다. 구현예에서, 염화세슘, 수크로오스 및 이오딕사놀을 이용하는 것과 같은 구배 원심분리가 이용될 수있다. 다른 기술이, 예컨대, 이온 교환, 친화도, 및 겔 여과 크로마토그래피를 포함하는 표준 정제 기술의 대안으로서 또는 이에 더하여 이용될 수 있다.

[0329] 예를 들면, 제1 컬럼은 이온 교환 크로마토그래피 수지, 예컨대 FRACTOGEL® EMD 메타크릴레이트 기반 폴리머성 비드 TMAE(EMD Millipore)일 수 있고, 제2 컬럼은 렌틸(Lens culinaris) 렉틴 친화도 수지일 수 있고, 제3 컬럼은 양이온 교환 컬럼, 예컨대 FRACTOGEL® EMD 메타크릴레이트 기반 폴리머성 비드 SO3(EMD Millipore) 수지일 수 있다. 다른 측면에서, 상기 양이온 교환 컬럼은 MMC 컬럼 또는 누비아(Nuvia) C 프라임 컬럼(Bio-Rad Laboratories, Inc)일 수 있다. 바람직하게는, 본 명세서에 개시된 방법은 세제 추출 컬럼; 예를 들면 소수성 상호작용 컬럼을 이용하지 않는다. 이러한 컬럼은 종종 정제 동안에 세제를 제거하기 위해 이용되지만, 본 명세서에 개시된 방법에 부정적인 영향을 끼칠 수 있다.

[0330] *CoV S 폴리펩티드 항원을 함유하는 나노입자의 세제 교환*

[0331] 나노입자를 형성하기 위하여, 숙주 세포로부터 단백질을 추출하기 위해 사용되는 제1 세제는 실질적으로 나노입자 구조로 도달하기 위한 제2 세제로 교체된다. NP-9는 바람직한 추출 세제이다. 전형적으로, 상기 나노입자는 HPLC에 의해 측정될 때 검출가능한 NP-9를 함유하지 않는다. 상기 제2 세제는 전형적으로 PS20, PS40, PS60, PS65, 및 PS80으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는, 상기 제2 세제는 PS80이다.

[0332] 특정 측면에서, 세제 교환은 그 탄수화물 모이어티(moiety)를 통해 당단백질에 결합하기 위한 친화성 크로마토그래피를 이용해 수행된다. 예를 들면, 상기 친화성 크로마토그래피는 레굼(legume) 렉틴 컬럼을 이용할 수 있다. 레굼 렉틴은 원래 식물에서 확인되고 탄수화물 잔기와 특이적으로 및 가역적으로 상호작용하는 것으로 나타난 단백질이다. 예를 들면, [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. 적합한 렉틴은 콘카나발린 A(con A), 완두콩 렉틴, 사인포인(sainfoin) 렉틴, 및 렌틸 렉틴을 포함한다. 렌틸 렉틴은 그 결합 특서으로 인해 세제 교환을 위한 바람직한 컬럼이다. 렉틴 컬럼은 상업적으로 이용가능하다; 예를 들면, 카프토 렌틸 렉틴은 GE 헬스케어(Healthcare)로부터 이용가능하다. 소정 측면에서, 상기 렌틸 렉틴 컬럼은 재조합 렉틴을 이용할 수 있다. 분자 레벨에서, 탄수화물

모이어티가 렌틸 렉틴에 결합하고, 단백질의 아미노산을 유리시켜 세제 주변에 유착함으로써, 다수 사본의 항원, 예컨대, 세제에 고정된 2량체, 3량체, 또는 4량체일 수 있는 당단백질 올리고머를 갖는 나노입자를 제공하는 세제 코어의 형성을 야기하는 것으로 생각된다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 3량체를 형성한다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드 3량체는 세제에 고정된다. 구현예에서, 각각의 CoV S 폴리펩티드 나노입자는 비이온성 코어와 회합된 적어도 하나의 3량체를 함유한다.

[0333] 세제 교환 동안에 단백질과 인큐베이션하여 나노입자를 형성할 때, 상기 세제는 초기 정제 단계 동안에 최대 약 0.1% (w/v)까지 존재할 수 있으며, 상기 양은 최적 안전성을 갖는 최종 나노입자를 달성하기 위해 낮아진다. 예를 들면, 비이온성 세제(예컨대, PS80)는 약 0.005% (v/v) 내지 약 0.1% (v/v), 예를 들면, 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. 구현예에서, 상기 나노입자는 약 0.03% 내지 약 0.05% PS80를 함유한다. 구현예에서, 상기 나노입자는 약 0.01% (v/v) PS80을 함유한다.

[0334] 구현예에서, 정제된 CoV S 폴리펩티드는 투석된다. 구현예에서, 투석은 정제 후에 일어난다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드는 인산나트륨, NaCl, 및 PS80을 포함하는 용액에서 투석된다. 구현예에서, 인산나트륨을 포함하는 투석 용액은 약 5 mM 내지 약 100 mM의 인산나트륨, 예를 들면, 약 5 mM, 약 10 mM, 약 15 mM, 약 20 mM, 약 25 mM, 약 30 mM, 약 35 mM, 약 40 mM, 약 45 mM, 약 50 mM, 약 55 mM, 약 60 mM, 약 65 mM, 약 70 mM, 약 75 mM, 약 80 mM, 약 85 mM, 약 90 mM, 약 95 mM, 또는 약 100 mM의 인산나트륨을 함유한다. 구현예에서, 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. 구현예에서, 염화나트륨을 포함하는 투석 용액은 약 50 mM NaCl 내지 약 500 mM NaCl, 예를 들면, 약 50 mM, 약 60 mM, 약 70 mM, 약 80 mM, 약 90 mM, 약 100 mM, 약 110 mM, 약 120 mM, 약 130 mM, 약 140 mM, 약 150 mM, 약 160 mM, 약 170 mM, 약 180 mM, 약 190 mM, 약 200 mM, 약 210 mM, 약 220 mM, 약 230 mM, 약 240 mM, 약 250 mM, 약 260 mM, 약 270 mM, 약 280 mM, 약 290 mM, 약 300 mM, 약 310 mM, 약 320 mM, 약 330 mM, 약 340 mM, 약 350 mM, 약 360 mM, 약 370 mM, 약 380 mM, 약 390 mM, 약 400 mM, 약 410 mM, 약 420 mM, 약 430 mM, 약 440 mM, 약 450 mM, 약 460 mM, 약 470 mM, 약 480 mM, 약 490 mM, 또는 약 500 mM의 NaCl을 포함한다. 구현예에서, 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)의 PS80을 포함한다. 구현예에서, 상기 투석 용액은 약 25 mM의 인산나트륨(pH 7.2), 약 300 mM의 NaCl, 및 약 0.01% (v/v)의 PS80을 포함한다.

[0335] 세제 교환은 상기 논의되고 정제된 것과 같이 정제되고, 보관을 위해 냉동된 후, 세제 교환을 위해 해동된 단백질을 이용해 수행될 수 있다.

[0336] 본 명세서에 개시된 조성물의 안전성은 다양한 방식으로 측정될 수 있다. 한 접근법에서, 가혹한 보관 조건을 모방함으로써 나노입자에 스트레스를 주도록 디자인된 다양한 처리 후에 항원 단백질의 온전성(integrity)을 결정하기 위해 펩티드 맵(map)이 준비될 수 있다. 따라서, 안전성의 척도는 대조군 샘플과 비교하여 스트레스를 받은 샘플에서 항원 펩티드의 상대적인 풍부함이다. 예를 들면, CoV S 폴리펩티드를 함유하는 나노입자의 안전성은 과산화수소, 다양한 온도, 냉동/해동 주기, 및 교반을 비제한적으로 포함하는 다양한 pH, 프로테아제, 염, 산화제에 나노입자를 노출시킴으로써 평가될 수 있다. **도 12a** 및 **도 12b**는 BV2373(서열번호 87) 및 BV2365(서열번호 4)가 다양한 스트레스 조건 하에 hACE2에 대한 결합을 유지함을 보여준다. 세제 코어 내로 고정된 당단백질의 위치는 원하지 않는상호작용을 감소시킴으로써 향상된 안전성을 제공하는 것으로 생각된다. 예를 들면, 프로테아제-기반 분해에 대한 개선된 보호는 본 명세서에 개시된 몰 비로 당단백질을 코어 내로 고정하여 프로테아제 접근을 차단하는 입체적 장애를 야기하는 차폐 효과를 통해 달성될 수 있다. 안전성은 또한 온전한 단백질을 모니터링함으로써 측정될 수 있다. **도 33** 및 **도 34**는 각각 서열번호 109 및 서열번호 87의 아미노산 서열을 갖는 CoV 폴리펩티드를 함유하는 나노입자를 비교한다. **도 34**는 서열번호 87의 아미노산 서열을 갖는 CoV 폴리펩티드가 정제 동안에 특히 양호한 안전성을 보임을 시사한다. **도 34**의 폴리펩티드는 QQAQ의 아미노산 서열(서열번호 7)을 갖는 퓨린 절단 부위를 포함한다.

[0337] ***CoV S 폴리펩티드 항원을 함유하는 백신 조성물***

[0338] 본 개시는, 예를 들면, 나노입자에서 CoV S 폴리펩티드를 포함하는 백신 조성물을 제공한다. 한 측면에서, 상기 백신 조성물은 동일한 종의 바이러스로부터의 하나 이상의 바이러스의 바이러스주로부터 유래되는 항원을 갖는 나노입자를 함유할 수 있다. 다른 구현예에서, 본 개시는 백신 조성물의 하나 이상의 성분으로 채워진 하나 이상의 용기를 포함하는 약학적 팩 또는 키트를 제공한다.

[0339] 본 명세서에 개시된 조성물은 예방적으로 또는 치료적으로 사용될 수 있지만, 전형적으로는 예방적일 것이다. 따라서, 본 개시는 감염을 치료 또는 예방하기 위한 방법을 포함한다. 상기 방법은 대상체에게 치료적 또는 예방적 양의 본 개시의 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 수반한다. 바람직하게는, 상기 약학적 조성물은 보호 효과를 제공하는 백신 조성물이다. 다른 측면에서, 상기 보호 효과는 노출된 개체군의 백분율에서 감염과 연관된 징후의 완화를 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 조성물은 비처리 대상체와 비교하여 열 피로, 근육 통증, 두통, 인후통, 구토, 설사, 발진, 손상된 신장 및 간 기능의 징후, 내부 출혈 및 외부 출혈로부터 선택되는 하나 이상의 바이러스 질환 징후를 예방 또는 감소시킬 수 있다.

[0340] 상기 나노입자는 다양한 부형제, 버퍼, 등의 존재시에 백신으로서 투여하기 위해 제형화될 수 있다. 예를 들면, 상기 백신 조성물은 인산나트륨, 염화나트륨, 및/또는 히스티딘을 함유할 수 있다. 인산나트륨은 약 10 mM 내지 약 50 mM, 약 15 mM 내지 약 25 mM, 또는 내지 25 mM로 존재할 수 있다; 특별한 경우에, 약 22 mM의 인산나트륨이 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. 존재시, 염화나트륨은 약 150 mM일 수 있다. 소정 조성물에서, 상기 염화나트륨은 더 높은 농도, 예를 들면 약 200 mM 내지 약 500 mM로 존재할 수 있다. 구현예에서, 상기 염화나트륨은 약 200 mM, 약 250 mM, 약 300 mM, 약 350 mM, 약 400 mM, 약 450 mM, 또는 약 500 mM을 비제한적으로 포함하는 높은 농도로 존재한다.

[0341] 구현예에서, 본 명세서에 기술된 나노입자는 소정 pH 레벨에서 개선된 안전성을 갖는다. 구현예에서, 상기 나노입자는 약간 산성인 pH 레벨에서 안정하다. 예를 들면, 상기 나노입자는 약간 산성인 pH, 예를 들면 pH 5.8 내지 pH 7.0에서 안정하다. 구현예에서, 상기 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 7.0의 범위의 pH에서 안정할 수 있다. 구현예에서, 본 명세서에 기술된 나노입자 및 조성물은 약 pH 7.0 내지 약 pH 7.4를 포함하는 중성 pH에서 안정하다. 구현예에서, 본 명세서에 기술된 나노입자 및 조성물은, 예를 들면 그 사이의 모든 값 및 범위를 포함하는 약 pH 7.0 내지 약 pH 8.5, 약 pH 7.0 내지 약 pH 8.0, 또는 약 pH 7.0 내지 약 pH 7.5의 약간 알칼리성인 pH에서 안정하다.

[0342] ***어주번트***

[0343] 소정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 조성물은 면역 반응을 향상시키기 위한 하나 이상의 어주번트와 조합될 수 있다. 다른 구현예에서, 상기 조성물은 어주번트 없이 제조되고, 따라서 어주번트-부재 조성물로서 투여되도록 이용가능하다. 유리하게는, 본 명세서에 개시된 어주번트-부재 조성물은 단일 용량으로 투여될 때 보호성 면역 반응을 제공할 수 있다. 강력한 면역 반응을 유도하는 알룸(alum)-부재 조성물은 특히 약 60세 또는 그 이상의 성인에서 유용하다.

[0344] *알루미늄-기반 어주번트*

[0345] 구현예에서, 상기 어주번트는 알룸(예컨대, $AlPO_4$ 또는 $Al(OH)_3$)일 수 있다. 전형적으로, 나노입자가 실질적으로 알룸에 결합된다. 예를 들면, 상기 나노입자는 알룸에 적어도 80% 결합, 적어도 85% 결합, 적어도 90% 결합 또는 적어도 95% 결합될 수 있다. 종종, 상기 나노입자는 조성물에서 알룸에 92% 내지 97% 결합된다. 알룸의 양은 용량 당 존재하며, 전형적으로 약 400 μg 내지 약 1,250 μg의 범위이다. 예를 들면, 상기 알룸은 용량 당 약 300 μg 내지 약 900 μg, 약 400 μg 내지 약 800 μg, 약 500 μg 내지 약 700 μg, 약 400 μg 내지 약 600 μg, 또는 약 400 μg 내지 약 500 μg의 양으로 존재할 수 있다. 전형적으로, 상기 알룸은 120 μg 용량의 단백질 나노입자에 대해 약 400 μg으로 존재한다.

[0346] ***사포닌 어주번트***

[0347] 사포닌을 함유하는 어주번트가 또한 본 명세서에 개시된 면역원과 조합될 수 있다. 사포닌은 퀼라자 사포나리아 몰리나 나무의 껍질로부터 유래되는 글리코시드이다. 전형적으로, 사포닌은 다수의 분획을 야기하는 다중-단계 정제 공정을 이용해 제조된다. 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "퀼라자 사포나리아 몰리나로부터의 사포틴

분획"은 총칭해서 퀼라자 사포나리아의 반-정제 또는 정의된 사포닌 분획 또는 실질적으로 순수한 그의 분획을 기술하기 위해 사용된다.

[0348] ***사포닌 분획***

[0349] 사포닌 분획을 생성하기 위해서는 몇 가지 접근법이 적합하다. 분획 A, B, 및 C는 미국 특허 제6,352,697호에 기술되어 있으며, 다음과 같이 제조될 수 있다. Quil A로부터의 친유성 분획인 미정제(crude) 수성 퀼라자 사포나리아 몰리나 추출물이 크로마토그래피에 의해 분리되고, 수 중의 70% 아세토니트릴로 용출하여 친유성 분획을 회수한다. 이후, 상기 친유성 분획은 산성수 중의 25% 내지 60% 아세토니트릴의 구배를 이용해 용출하는 반-제조용 HPLC에 의해 분리된다. 본 명세서에서 "분획 A" 또는 "QH-A"로 나타내는 분획은 대략 39% 아세토니트릴에서 용출되는 분획이거나 이에 해당한다. 본 명세서에서 "분획 B" 또는 "QH-B"로 나타내는 분획은 대략 47% 아세토니트릴에서 용출되는 분획이거나 이에 해당한다. 본 명세서에서 "분획 C" 또는 "QH-C"로 나타내는 분획은 대략 49% 아세토니트릴에서 용출되는 분획이거나 이에 해당한다. 분획의 정제와 관련한 부가적인 정보는 미국 특허 제5,057,540호에서 발견된다. 본 명세서에서 기술된 것과 같이 제조될 때, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A, B 및 C는 각각 정의할 수 있는 특성을 갖는 화학적으로 매우 연관된 분자의 군 또는 패밀리를 나타낸다. 이들이 입수되는 크로마토그래피 조건은 용출 프로필 및 생물학적 활성의 측면에서 배치-대-배치(batch-to-batch) 재현가능성(reproducibility)이 매우 일관적인 것이다.

[0350] 다른 사포닌 분획이 기술되어 있다. 분획 B3, B4 및 B4b는 EP 0436620에 기술되어 있다. 분획 QA1-QA22는 EP03632279 B2, Q-VAC(Nor-Feed, AS Denmark), 퀼라자 사포나리아 몰리나 스피코사이드(Isconova AB, Ultunaallen 2B, 756 51 Uppsala, Sweden)에 기술되어 있다. EP 0 3632 279 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 및 9 페이지의 실시예 1에 기술된 것과 같이 수득된다.

[0351] 본 명세서에 기술되고 어주번트를 형성하기 위해 사용되는 사포닌 분획은 종종 실질적으로 순수한 분획이다; 즉, 상기 분획은 다른 물질로부터의 오염물의 존재가 실질적으로 부재하다. 특정 측면에서, 실질적으로 순수한 사포닌 분획은 최대 40 중량%까지, 최대 30 중량%까지, 최대 25 중량%까지, 최대 20 중량%까지, 최대 15 중량%까지, 최대 10 중량%까지, 최대 7 중량%까지, 최대 5 중량%까지, 최대 2 중량%까지, 최대 1 중량%까지, 최대 0.5 중량%까지, 또는 최대 0.1 중량%까지 다른 화합물, 예컨대 다른 사포닌 또는 다른 어주번트 물질을 함유할 수 있다.

[0352] *이스콤 구조*

[0353] 사포닌 분획은 이스콤(Immune Stimulating COMplex, ISCOM)으로 나타내는 케이지(cage)-유사 입자의 형태로 투여될 수 있다. 이스콤은 EP0109942B1, EP0242380B1 및 EP0180546 B1에 기술된 것과 같이 제조될 수 있다. 특정 구현예에서, EP 9600647-3(PCT/SE97/00289)에 기술된 것과 같은 이송 및/또는 패신저(passenger) 항원이 사용될 수 있다.

[0354] *매트릭스 어주번트*

[0355] 구현예에서, 상기 이스콤은 이스콤 매트릭스 복합체이다. 이스콤 매트릭스 복합체는 적어도 하나의 사포닌 분획 및 지질을 포함한다. 상기 지질은 적어도 스테롤, 예컨대 콜레스테롤이다. 특정 측면에서, 상기 이스콤 매트릭스 복합체는 또한 인지질을 함유한다. 상기 이스콤 매트릭스 복합체는 또한, 글리코시드가 필수적인 것은 아니지만, 하나 이상의 다른 면역조절성(어주번트-활성) 물질을 함유할 수 있고, 그 전체 내용이 인용에 의해 본 명세서에 통합되는 EP0436620B1에 기술된 것과 같이 생산될 수 있다.

[0356] 다른 측면에서, 상기 이스콤은 이스콤 복합체이다. 이스콤 복합체는 적어도 하나의 사포닌, 적어도 하나의 지질, 및 적어도 한 종류의 항원 또는 에피토프를 함유한다. 상기 이스콤 복합체는 세제 처리와 연관되어서 항원의 일부가 입자 내로 통합되는 항원을 함유한다. 이와 대조적으로, 이스콤 매트릭스는 항원과의 혼합물로서 제형화되고, 이스콤 매트릭스 입자 및 항원 사이의 회합은 정전기 및/또는 소수성 상호작용에 의해 매개된다.

[0357] 한 구현예에 따르면, 이스콤 매트릭스 복합체 또는 이스콤 복합체 내로 통합되는 사포닌 분획, 또는 역시 이스콤 또는 이스콤 매트릭스 복합체 내로 통합되거나 이와 혼합되는 적어도 하나의 부가적인 어주번트는 퀼라자 사포나리아의 분획 A, 분획 B, 또는 분획 C, 퀼라자 사포나리아의 반정제된 제조물, 퀼라자 사포나리아의 정제된 제조물, 또는 임의의 정제된 하위-분획, 예컨대 QA 1-21로부터 선택된다.

[0358] 특정 측면에서, 각각의 이스콤 입자는 적어도 2가지 사포닌 분획을 함유할 수 있다. 상이한 사포닌 분획의 중량%의 임의의 조합이 사용될 수 있다. 임의의 2가지 분획의 중량%의 임의의 조합이 사용될 수 있다. 예를 들면, 상기 입자는 각각 임의의 중량%의 분획 A 및 임의의 중량%의 다른 사포닌 분획, 예컨대 미정제 사포닌 분획 또는 분획 C를 함유할 수 있다. 따라서, 특정 측면에서, 각각의 이스콤 매트릭스 입자 또는 각각의 이스콤 복합체 입자는 각각의 경우에 한 사포닌 분획, 예컨대 분획 A의 0.1 내지 99.9 중량%, 5 내지 95 중량%, 10 내지 90 중량%, 15 내지 85 중량%, 20 내지 80 중량%, 25 내지 75 중량%, 30 내지 70 중량%, 35 내지 65 중량%, 40 내지 60 중량%, 45 내지 55 중량%, 40 내지 60 중량%, 또는 50 중량%, 및 다른 사포닌, 예컨대 임의의 미정제 분획 또는 임의의 다른 분획, 예컨대 분획 C를 나머지 100%까지 함유할 수 있다. 상기 중량은 사포닌 분획의 총 중량으로 계산된다. 이스콤 매트릭스 복합체 및 이스콤 복합체 어주번트의 예는 그 전체 내용이 인용에 의해 본 명세서에 통합되는 미국 공개 출원 제2013/0129770호에 개시되어 있다.

[0359] 특정 구현예에서, 상기 이스콤 매트릭스 또는 이스콤 복합체는 5-99 중량%의 한 분획, 예컨대 분획 A 및 나머지 100 중량%까지의 다른 분획, 예컨대 미정제 사포닌 분획 또는 분획 C를 포함한다. 상기 중량은 사포닌 분획의 총 중량으로 계산된다.

[0360] 다른 구현예에서, 상기 이스콤 매트릭스 또는 이스콤 복합체는 40 중량% 내지 99 중량%의 한 분획, 예컨대 분획 A, 및 1 중량% 내지 60 중량%의 다른 분획, 예컨대 미정제 사포닌 분획 또는 분획 C를 포함한다. 상기 중량은 사포닌 분획의 총 중량으로 계산된다.

[0361] 또 다른 구현예에서, 상기 이스콤 매트릭스 또는 이스콤 복합체는 70 중량% 내지 95 중량%의 한 분획, 예컨대 분획 A, 및 30 중량% 내지 5 중량%의 다른 분획, 예컨대, 미정제 사포닌 분획, 또는 분획 C를 포함한다. 상기 중량은 사포닌 분획의 총 중량으로 계산된다. 다른 구현예에서, 퀼라자 사포나리아 몰리나로부터의 사포닌 분획은 QA 1-21 중 어느 하나로부터 선택된다.

[0362] 사포닌 분획의 혼합물을 함유하는 입자 이외에, 이스콤 매트릭스 입자 및 이스콤 복합체 입자는 각각 한 사포닌 분획만을 이용해 형성될 수 있다. 본 명세서에 개시된 조성물은 다수의 입자를 함유할 수 있고, 여기서 각각의 입자는 한 사포닌 분획만을 함유한다. 즉, 소정 조성물은 하나 이상의 상이한 타입의 이스콤-매트릭스 복합체 입자 및/또는 하나 이상의 상이한 타입의 이스콤 복합체 입자를 함유할 수 있고, 각각의 개별 입자는 퀼라자 사포나리아 몰리나로부터의 한 사포닌 분획을 함유하며, 여기서 한 복합체에서의 사포닌 분획은 다른 복합체 입자에서의 사포닌 분획과 상이하다.

[0363] 특정 측면에서, 한 타입의 사포닌 분획 또는 미정제 사포닌 분획은 한 이스콤 매트릭스 복합체 또는 입자 내로 통합될 수 있고, 다른 타입의 실질적으로 순수한 사포닌 분획, 또는 미정제 사포닌 분획은 다른 이스콤 매트릭스 복합체 또는 입자 내로 통합될 수 있다. 조성물 또는 백신은 적어도 2가지 타입의 복합체 또는 입자를 포함할 수 있고, 각각의 타입은 물리적으로 상이한 입자 내로 통합된 한 타입의 사포닌을 갖는다.

[0364] 상기 조성물에서, 이스콤 매트릭스 복합체 입자 및/또는 이스콤 복합체 입자의 혼합물이 사용될 수 있고, 여기서 퀼라자 사포나리아 몰리나의 한 사포닌 분획 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 다른 사포닌 분획은 상이한 이스콤 매트릭스 복합체 입자 및/또는 이스콤 복합체 입자 내로 별도로 통합된다.

[0365] 각각 한 사포닌 분획을 갖는 이스콤 매트릭스 또는 이스콤 복합체 입자는 조성물에서 임의의 조합의 중량%로 존재할 수 있다. 특정 측면에서, 조성물은 제1 사포닌 분획을 함유하는 0.1 중량% 내지 99.9 중량%, 5 중량% 내지 95 중량%, 10 중량% 내지 90 중량%, 15 중량% 내지 85 중량%, 20 중량% 내지 80 중량%, 25 중량% 내지 75 중량%, 30 중량% 내지 70 중량%, 35 중량% 내지 65 중량%, 40 중량% 내지 60 중량%, 45 중량% 내지 55 중량%, 40 중량% 내지 60 중량%, 또는 50 중량%의 이스콤 매트릭스 또는 복합체 및 상이한 사포닌 분획을 함유하는 이스콤 매트릭스 또는 복합체로 구성되는 나머지 부분을 함유할 수 있다. 한 측면에서, 상기 나머지 부분은 각각의 매트릭스 또는 복합체 입자가 한 사포닌 분획만을 함유하는 하나 이상의 이스콤 매트릭스 또는 복합체이다. 다른 측면에서, 상기 이스콤 매트릭스 또는 복합체 입자는 하나 이상의 사포닌 분획을 함유할 수 있다.

[0366] 특정 조성물에서, 제1 이스콤 매트릭스 또는 이스콤 복합체 입자 내의 유일한 사포닌 분획은 분획 A이고, 제2 이스콤 매트릭스 또는 이스콤 복합체 입자 내의 유일한 사포닌 분획은 분획 C이다.

[0367] 구현예에서, 상기 어주번트에서, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량의 합 중, 각각, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A가 중량 기준으로 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99 %를 차지하고, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C가 나머지를 차지한다.

[0368] 바람직한 조성물은 분획 A를 함유하는 제1 이스콤 매트릭스 및 분획 C를 함유하는 제2 이스콤 매트릭스를 포함하며, 여기서 분획 A 이스콤 매트릭스는 총 사포닌 어주번트의 약 70 중량%를 구성하고, 분획 C 이스콤 매트릭스는 총 사포닌 어주번트의 약 30 중량%를 구성한다. 다른 바람직한 조성물에서, 분획 A 이스콤 매트릭스는 총 사포닌 어주번트의 약 85 중량%를 구성하고, 분획 C 이스콤 매트릭스는 총 사포닌 어주번트의 약 15 중량%를 구성한다. 다른 바람직한 조성물에서, 분획 A 이스콤 매트릭스는 총 사포닌 어주번트의 약 92 중량%를 구성하고, 분획 C 이스콤 매트릭스는 총 사포닌 어주번트의 약 8 중량%를 구성한다. 따라서, 소정 조성물에서, 분획 A 이스콤 매트릭스는 조성물 내의 사포닌 어주번트의 총 중량의 약 70% 내지 약 85%의 범위로 존재하고, 분획 C 이스콤 매트릭스는 약 15% 내지 약 30%의 범위로 존재한다. 소정 조성물에서, 분획 A 이스콤 매트릭스는 조성물 내의 사포닌 어주번트의 총 중량의 약 70% 내지 약 92%의 범위로 존재하고, 분획 C 이스콤 매트릭스는 약 8% 내지 약 30%의 범위로 존재한다. 구현예에서, 상기 어주번트에서, 분획 A 이스콤 매트릭스 및 분획 C 이스콤의 중량의 합 중, 각각, 분획 A 이스콤 매트릭스는 50-96 중량%를 차지하고, 분획 C 이스콤 매트릭스는 나머지를 차지한다. 본 명세서에서 매트릭스-M™으로 나타내는 특히 바람직한 조성물에서, 분획 A 이스콤 매트릭스는 조성물 내의 사포닌 어주번트의 총 중량의 약 85%로 존재하고, 분획 C 이스콤 매트릭스는 약 15%로 존재한다. 매트릭스-M™은 상호교환적으로 매트릭스-M1로 나타낼 수 있다.

[0369] 예시적인 QS-7 및 QS-21 분획, 그의 생산 및 그의 용도는 인용에 의해 본 명세서에 통합되는 미국 특허 제5,057,540호; 제6,231,859호; 제6,352,697호; 제6,524,584호; 제6,846,489호; 제7,776,343호, 및 제8,173,141호에 기술되어 있다.

[0370] 구현예에서, 다른 어주번트가 부가적으로 또는 대체제로서 사용될 수 있다. 모든 목적을 위하여 그 전체 내용이 인용에 의해 본 명세서에 통합되는 ["Vogel et al., "A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients (2nd Edition)"]에 기술된 임의의 어주번트가 포함되는 것은 본 개시의 범위 내인 것으로 예상된다. 다른 어주번트는 완전 프로인트(Freund) 어주번트(죽은 마이코박테리움 투베르쿨로시스(Mycobacterium tuberculosis)를 함유하는 면역 반응의 비-특이적 자극제), 불완전 프로인트 어주번트 및 수산화알루미늄 어주번트를 포함한다. 다른 어주번트는 GMCSP, BCG, MDP 화합물, 예컨대 thur-MDP 및 nor-MDP, CGP(MTP-PE), 지질 A, 및 모노포스포릴 지질 A(MPL), MF-59, 박테리아로부터 추출된 3 종의 성분을 함유하는 RIBI, MPL, 트레할로오스 디마이콜레이트(TDM) 및 2% 스쿠알렌/TWEEN® 폴리소르베이트 80 에멀전 중의 세포벽 골격(CWS)을 포함한다. 구현예에서, 상기 어주번트는 포시라멜라(paucilamellar) 지질 소낭(vesicle), 예를 들면, NOVASOMES®일 수 있다. NOVASOMES®은 약 100 nm 내지 약 500 nm 범위의 포시라멜라 비-인지질 소낭이다. 이것은 BRIJ® 알코올 에톡실레이트 72, 콜레스테롤, 올레산 및 스쿠알렌을 포함한다. NOVASOMES®은 효과적인 어주번트인 것으로 나타나 있다(미국 특허 제5,629,021호, 제6,387,373호, 및 제4,911,928호 참조).

[0371] ***투여 및 복용량***

[0372] 구현예에서, 본 개시는 하나 이상의 코로나바이러스에 대한 면역 반응을 일으키기 위한 방법을 제공한다. 구현예에서, 상기 반응은 SARS-CoV-2 바이러스, MERS, 및 SARS 중 하나 이상에 대한 것이다. 구현예에서, 상기 반응은 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주에 대한 것이다. 구현예에서, 상기 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주는 알파, 베타, 감마, 델타, 엡실론, 에타, 아이오타, 카파, 제타, 뮤, 또는 오미크론의 세계 보건 기구 라벨을 갖는다. 구현예에서, 상기 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주는 B.1.1.529; BA.1, BA.1.1, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5, B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2, AY, B.1.427, B.1.429, B.1.525, B.1.526, B.1.617.1, B.1.617.3, P.2, B.1.621, 또는 B.1.621.1로 이루어진 군으로부터 선택되는 PANGO 계통을 갖는다. 상기 방법은 나노입자를 함유하거나 재조합 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드를 함유하는 면역학적 유효량의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 수반한다. 유리하게는, 본 명세서에 개시된 단백질은 특히 유용한 항-코로나바이러스 반응 중 하나 이상을 유도한다.

[0373] 구현예에서, 상기 나노입자 또는 CoV S 폴리펩티드는 어주번트와 함께 투여된다. 한 측면에서, 상기 나노입자 또는 CoV S 폴리펩티드는 어주번트 없이 투여된다. 한 측면에서, 상기 어주번트는, 예컨대 비-공유적 상호작용에 의해 나노입자에 결합될 수 있다. 다른 측면에서, 상기 어주번트는 나노입자와 공동-투여되지만, 상기 어주번트 및 나노입자는 실질적으로 상호작용하지 않는다.

[0374] 구현예에서, 상기 나노입자 또는 CoV S 폴리펩티드는 SARS-CoV-2 감염, 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주 감염, SARS 감염, 또는 MERS 감염 중 하나 이상을 예방 및/또는 치료하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 개시는 SARS-CoV-2 바이러스, 이종성 SARS-CoV-2 바이러스, MERS, 및 SARS 중 하나 이상에 대해 면역 반응을 일으키기 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은 나노입자 또는 CoV S 폴리펩티드를 함유하는 면역학적 유효량의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 수반한다. 유리하게는, 본 명세서에 개시된 단백질은 특히 유용한 항-코로나바이러

스 반응을 유도한다.

[0375] 구현예에서, 본 명세서에 기술된 나노입자 또는 CoV S 폴리펩티드는 SARS-CoV-2 바이러스 또는 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주에 대해 약 50% 및 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%, 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%의 효능을 갖는다.

[0376] 본 명세서에 개시된 조성물은 전신 경로 또는 점막 경로 또는 경피 경로를 통해, 또는 직접적으로 특정 조직 내로 투여될 수 있다. 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "전신 투여"는 비경구 경로의 투여를 포함한다. 특히, 비경구 투여는 피하, 복강내, 정맥내, 동맥내, 근육내, 또는 흉골내 주사, 정맥내, 또는 신장 투석 주입 기술을 포함한다. 전형적으로, 상기 전신, 비경구 투여는 근육내 주사이다. 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "점막 투여"는 구강, 비강내, 질내, 직장내, 기관내, 장내 및 안구 투여를 포함한다. 바람직하게는, 투여는 근육내이다.

[0377] 조성물은 단일 용량 일정 또는 다수 용량 일정으로 투여될 수 있다. 다수 용량은 1차 면역화 일정 또는 부스터 면역화 일정에 사용될 수 있다. 구현예에서, 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 30 용량이 투여된다. 다수 용량 일정에서, 다양한 용량이 동일한 또는 상이한 경로, 예컨대 비경구 프라임 및 점막 부스트, 점막 프라임 및 비경구 부스트, 등에 의해 제공될 수 있다. 한 측면에서, 부스트 용량은 제1 용량의 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 2개월, 약 3개월, 약 4개월, 약 5개월, 약 6개월, 약 7개월, 약 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 10년 후에 투여된다. 구현예에서, 부스트 용량은 초기 용량의 투여 후 매년 투여된다. 구현예에서, 후속 부스트 용량은 앞선 용량의 3주 또는 4주 후에 투여된다. 구현예에서, 상기 제1 용량은 0일에 투여되고, 상기 부스트 용량은 21일에 투여된다. 구현예에서, 상기 제1 용량은 0일에 투여되고, 상기 부스트 용량은 28일에 투여된다. 구현예에서, 상기 제1 용량은 0일에 투여되고, 부스트 용량은 21일에 투여되고, 제2 부스트 용량은 상기 제1 용량 또는 제2 용량의 투여 후 약 6개월에 투여된다. 구현예에서, 상기 제1 용량은 0일에 투여되고, 상기 부스트 용량은 28일에 투여되고, 제2 부스트 용량은 상기 제1 용량의 투여 후 약 6개월에 투여된다. 구현예에서, 상기 제1 용량은 0일에 투여되고, 부스트 용량은 21일에 투여되고, 제2 부스트 용량은 상기 제2 용량의 투여 후 약 6개월에 투여된다. 구현예에서, 상기 제1 용량은 0일에 투여되고, 상기 부스트 용량은 28일에 투여되고, 제2 부스트 용량은 상기 제2 용량의 투여 후 약 6개월에 투여된다.

[0378] 구현예에서, 상기 제1 용량은 0일에 투여되고, 부스트 용량은 21일에 투여되고, 제2 부스트 용량은 상기 제1 용량 또느 제1 부스트 용량의 투여 후 약 1년에 투여된다. 구현예에서, 상기 제1 용량은 0일에 투여되고, 제1 부스트 용량은 28일에 투여되고, 제2 부스트 용량은 상기 제1 용량의 투여 후 약 1년에 투여된다. 구현예에서, 상기 제1 용량은 0일에 투여되고, 부스트 용량은 21일에 투여되고, 제2 부스트 용량은 상기 제2 용량의 투여 후 약 1년에 투여된다. 구현예에서, 상기 제1 용량은 0일에 투여되고, 제1 부스트 용량은 28일에 투여되고, 제2 부스트 용량은 상기 제2 용량의 투여 후 약 1년에 투여된다. 구현예에서, 상기 제2 부스트 용량은 상기 제1 부스트 용량 후 6개월 내지 24개월 또는 12개월 내지 24개월에 투여된다.

[0379] 구현예에서, 상기 부스트 용량은 초기 용량과 동일한 면역학적 조성물을 포함한다. 구현예에서, 상기 부스트 용량은 초기 용량과 상이한 면역학적 조성물을 포함한다. 구현예에서, 상기 상이한 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. 구현예에서, 상기 부스트 용량은 초기 조성물을 포함한다. 구현예에서, 상기 초기 용량은 SARS-CoV-2 S 당단백질(예컨대, 서열번호 87의 아미노산 서열을 갖는 SARS CoV-2 S 당단백질)을 포함하고, 상기 부스트 용량은 동일한 SARS-CoV-2 S 당단백질(예컨대, 서열번호 87의 아미노산 서열을 갖는 SARS CoV-2 S 당단백질)을 포함한다. 구현예에서, 상기 초기 용량은 SARS-CoV-2 S 당단백질(예컨대, 서열번호 87의 아미노산 서열을 갖는 SARS CoV-2 S 당단백질)을 포함하고, 상기 부스트 용량은 상이한 SARS-CoV-2 S 당단백질(예컨대, 서열번호 132의 아미노산 서열을 갖는 SARS CoV-2 S 당단백질)을 포함한다.

[0380] 구현예에서, 상기 초기 용량은 SARS-CoV-2 S 당단백질의 조합(예컨대, 서열번호 87의 아미노산 서열을 갖는 SARS CoV-2 S 당단백질 및 서열번호 132의 아미노산 서열을 갖는 SARS CoV-2 S 당단백질)을 포함한다. 구현예에서, 상기 부스트 용량은 SARS-CoV-2 S 당단백질의 조합(예컨대, 서열번호 87의 아미노산 서열을 갖는 SARS CoV-

2 S 당단백질 및 서열번호 132의 아미노산 서열을 갖는 SARS CoV-2 S 당단백질)을 포함한다. 구현예에서, 상기 초기 용량은 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. 구현예에서, 상기 초기 용량은 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질, SARS-Cov-2 스파이크 당단백질을 암호화하는 플라스미드 DNA, SARS-Cov-2 스파이크 당단백질을 암호화하는 바이러스 벡터, 또는 불활성화된 SARS-CoV-2 바이러스를 포함하고, 상기 부스트 용량은 하나 이상의 SARS-CoV-2 S 당단백질을 포함한다.

[0381] 구현예에서, ㎍ 단위로 측정될 때, 상기 용량은 용질, 또는 CoV S 폴리펩티드 나노입자의 중량, 또는 CoV S 폴리펩티드의 중량을 포함하는 용량의 총 중량일 수 있다. 용량은 A280 또는 ELISA의 단백질 농도 에세이를 이용해 측정된다.

[0382] 소아에 대한 투여를 포함하는 항원의 용량은 약 5 ㎍ 내지 약 25 ㎍, 약 1 ㎍ 내지 약 300 ㎍, 약 90 ㎍ 내지 약 270 ㎍, 약 100 ㎍ 내지 약 160 ㎍, 약 110 ㎍ 내지 약 150 ㎍, 약 120 ㎍ 내지 약 140 ㎍, 또는 약 140 ㎍ 내지 약 160 ㎍의 범위일 수 있다. 구현예에서, 상기 용량은 약 120 ㎍이고, 알룸과 함께 투여된다. 한 측면에서, 소아 용량은 약 1 ㎍ 내지 약 90 ㎍의 범위일 수 있다. 구현예에서, CoV 스파이크(S) 폴리펩티드의 용량은 그 사이의 모든 값 및 범위를 포함하는 약 1 ㎍, 약 2 ㎍, 약 3 ㎍, 약 4 ㎍, 약 5 ㎍, 약 6 ㎍, 약 7 ㎍, 약 8 ㎍, 약 9 ㎍, 약 10 ㎍, 약 11 ㎍, 약 12 ㎍, 약 13 ㎍, 약 14 ㎍, 약 15 ㎍, 약 16 ㎍, 약 17 ㎍, 약 18 ㎍, 약 19 ㎍, 약 20 ㎍, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25 ㎍, 약 26 ㎍, 약 27 ㎍, 약 28 ㎍, 약 29 ㎍, 약 30 ㎍, 약 40 ㎍, 약 50, 약 60, 약 70, 약 80, 약 90, 약 100 ㎍, 약 110 ㎍, 약 120 ㎍, 약 130 ㎍, 약 140 ㎍, 약 150 ㎍, 약 160 ㎍, 약 170 ㎍, 약 180 ㎍, 약 190 ㎍, 약 200 ㎍, 약 210 ㎍, 약 220 ㎍, 약 230 ㎍, 약 240 ㎍, 약 250 ㎍, 약 260 ㎍, 약 270 ㎍, 약 280 ㎍, 약 290 ㎍, 또는 약 300 ㎍이다. 구현예에서, CoV S 폴리펩티드의 용량은 5 ㎍이다. 구현예에서, CoV S 폴리펩티드의 용량은 25 ㎍이다. 구현예에서, CoV S 폴리펩티드의 용량은 초기 용량 및 부스트 용량의 경우와 동일하다. 구현예에서, CoV S 폴리펩티드의 용량은 초기 용량 및 부스트 용량의 경우와 상이하다.

[0383] 소정 개체군은 어주번트가 있거나 없이 투여될 수 있다. 소정 측면에서, 조성물은 첨가된 어주번트가 없을 수 있다. 이러한 상황에서, 상기 용량은 약 10%까지 증가될 수 있다.

[0384] 구현예에서, 본 명세서에 기술된 면역원성 조성물은 사전충진된 주사기로 제공된다. 상기 면역원성 조성물이 사전충진된 주사기로 제조될 때, 상기 CoV S 폴리펩티드 및 어주번트는 투여에 앞서 조합된다.

[0385] 구현예에서, 비-자연적으로 발생하는 CoV S 폴리펩티드와 함께 투여되는 어주번트의 용량은 약 1 ㎍ 내지 약 100 ㎍, 예를 들면, 약 1 ㎍, 약 2 ㎍, 약 3 ㎍, 약 4 ㎍, 약 5 ㎍, 약 6 ㎍, 약 7 ㎍, 약 8 ㎍, 약 9 ㎍, 약 10 ㎍, 약 11 ㎍, 약 12 ㎍, 약 13 ㎍, 약 14 ㎍, 약 15 ㎍, 약 16 ㎍, 약 17 ㎍, 약 18 ㎍, 약 19 ㎍, 약 20 ㎍, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25 ㎍, 약 26 ㎍, 약 27 ㎍, 약 28 ㎍, 약 29 ㎍, 약 30 ㎍, 약 31 ㎍, 약 32 ㎍, 약 33 ㎍, 약 34 ㎍, 약 35 ㎍, 약 36 ㎍, 약 37 ㎍, 약 38 ㎍, 약 39 ㎍, 약 40 ㎍, 약 41 ㎍, 약 42 ㎍, 약 43 ㎍, 약 44 ㎍, 약 45 ㎍, 약 46 ㎍, 약 47 ㎍, 약 48 ㎍, 약 49 ㎍, 약 50 ㎍, 약 51 ㎍, 약 52 ㎍, 약 53 ㎍, 약 54 ㎍, 약 55 ㎍, 약 56 ㎍, 약 57 ㎍, 약 58 ㎍, 약 59 ㎍, 약 60 ㎍, 약 61 ㎍, 약 62 ㎍, 약 63 ㎍, 약 64 ㎍, 약 65 ㎍, 약 66 ㎍, 약 67 ㎍, 약 68 ㎍, 약 69 ㎍, 약 70 ㎍, 약 71 ㎍, 약 72 ㎍, 약 73 ㎍, 약 74 ㎍, 약 75 ㎍, 약 76 ㎍, 약 77 ㎍, 약 78 ㎍, 약 79 ㎍, 약 80 ㎍, 약 81 ㎍, 약 82 ㎍, 약 83 ㎍, 약 84 ㎍, 약 85 ㎍, 약 86 ㎍, 약 87 ㎍, 약 88 ㎍, 약 89 ㎍, 약 90 ㎍, 약 91 ㎍, 약 92 ㎍, 약 93 ㎍, 약 94 ㎍, 약 95 ㎍, 약 96 ㎍, 약 97 ㎍, 약 98 ㎍, 약 99 ㎍, 또는 약 100 ㎍의 어주번트이다. 구현예에서, 어주번트의 용량은 약 50 ㎍이다. 구현예에서, 상기 어주번트는 사포닌 어주번트, 예컨대, 매트릭스-M™이다.

[0386] 구현예에서, 상기 용량은 약 0.1 ㎖ 내지 약 1.5 ㎖, 예를 들면, 약 0.1 ㎖, 약 0.2 ㎖, 약 0.25 ㎖, 약 0.3 ㎖, 약 0.4 ㎖, 약 0.5 ㎖, 약 0.6 ㎖, 약 0.7 ㎖, 약 0.8 ㎖, 약 0.9 ㎖, 약 1.0 ㎖, 약 1.1 ㎖, 약 1.2 ㎖, 약 1.3 ㎖, 약 1.4 ㎖, 또는 약 1.5 ㎖의 부피로 투여된다. 구현예에서, 상기 용량은 0.25 ㎖의 부피로 투여된다. 구현예에서, 상기 용량은 0.5 ㎖의 부피로 투여된다. 구현예에서, 상기 용량은 0.6 ㎖의 부피로 투여된다.

[0387] MERS, SARS, 또는 SARS-CoV-2 코로나바이러스에 대한 백신을 위한 특정 구현예에서, 상기 용량은 약 1 ㎍/㎖ 내지 약 50 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖ 내지 약 100 ㎍/㎖, 약 10 ㎍/㎖ 내지 약 50 ㎍/㎖, 약 175 ㎍/㎖ 내지 약 325 ㎍/㎖, 약 200 ㎍/㎖ 내지 약 300 ㎍/㎖, 약 220 ㎍/㎖ 내지 약 280 ㎍/㎖, 또는 약 240 ㎍/㎖ 내지 약 260 ㎍/㎖ 농도의 CoV S 폴리펩티드를 포함할 수 있다.

[0388] 다른 구현예에서, 본 개시는 조성물에 유효 용량의 나노입자 또는 CoV S 폴리펩티드를 첨가하는 단계를 포함하

는 포유동물에게 감염 또는 그의 적어도 하나의 질환 징후에 대한 면역력을 유도하기 위한 백신 조성물을 제형화하는 방법을 제공한다. 본 개시된 CoV S 폴리펩티드 및 나노입자는 감염성 물질에 대한 면역력 또는 상당한 면역력을 부여하는 면역 반응을 자극하는 조성물을 제조하는데 유용하다. 따라서, 한 구현예에서, 본 개시는 적어도 한 유효 용량의 나노입자 및/또는 CoV S 폴리펩티드를 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 감염 또는 그의 적어도 하나의 질환 징후에 대한 면역력을 유도하는 방법을 제공한다.

[0389] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드 또는 이를 포함하는 나노입자는 부가적인 면역원성 조성물과 조합하여 투여된다. 구현예에서, 상기 부가적인 면역원성 조성물은 SARS-CoV-2에 대한 면역 반응을 유도한다. 구현예에서, 상기 부가적인 면역원성 조성물은 본 개시된 CoV S 폴리펩티드 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 16시간, 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, 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 이내에 투여된다. 구현예에서, 상기 부가적인 조성물은 제1 용량의 CoV S 폴리펩티드 또는 이를 포함하는 나노입자를 포함하는 조성물로 투여된다. 구현예에서, 상기 부가적인 조성물은 부스트 용량의 CoV S 폴리펩티드 또는 이를 포함하는 나노입자를 포함하는 조성물로 투여된다.

[0390] 구현예에서, 상기 부가적인 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.

[0391] 구현예에서, 상기 부가적인 면역원성 조성물은 CoV S 폴리펩티드를 암호화하는 mRNA를 포함한다. 구현예에서, 상기 mRNA는 서열번호 1의 위치 986 및 987에서 프롤린 치환을 포함하는 CoV S 폴리펩티드를 암호화한다. 구현예에서, 상기 mRNA는 온전한 퓨린 절단 부위를 포함하는 CoV S 폴리펩티드를 암호화한다. 구현예에서, 상기 mRNA는 서열번호 1의 위치 986 및 987에서 프롤린 치환 및 온전한 퓨린 절단 부위를 포함하는 CoV S 폴리펩티드를 암호화한다. 구현예에서, 상기 mRNA는 서열번호 1의 위치 986 및 987에서 프롤린 치환 및 불활성 퓨린 절단 부위를 포함하는 CoV S 폴리펩티드를 암호화한다. 구현예에서, 상기 mRNA는 서열번호 87의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드를 암호화한다. 구현예에서, CoV S 폴리펩티드를 암호화하는 mRNA는 지질 나노입자에 캡슐화된다. CoV S 폴리펩티드를 암호화하는 mRNA를 포함하는 예시적인 면역원성 조성물은 그 전체 내용이 인용에 의해 본 명세서에 통합되는 [Jackson et al. N. Eng. J. Med. 2020. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2-preliminary report]에 기술되어 있다. 구현예에서, CoV S 폴리펩티드를 암호화하는 mRNA를 포함하는 조성물은 25 ㎍, 100 ㎍, 또는 250 ㎍의 용량으로 투여된다.

[0392] 구현예에서, 상기 부가적인 면역원성 조성물은 CoV S 폴리펩티드를 암호화하는 아데노바이러스 벡터를 포함한다. 구현예에서, 상기 AAV 벡터는 야생형 CoV S 폴리펩티드를 암호화한다. 구현예에서, 상기 AAV 벡터는 서열번호 1의 위치 986 및 987에서 프롤린 치환 및 온전한 퓨린 절단 부위를 포함하는 CoV S 폴리펩티드를 암호화한다. 구현예에서, 상기 AAV 벡터는 서열번호 1의 위치 986 및 987에서 프롤린 치환 및 불활성 퓨린 절단 부위를 포함하는 CoV S 폴리펩티드를 암호화한다. 구현예에서, 상기 AAV 벡터는 서열번호 87의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드를 암호화한다. 다음의 공개문헌은 CoV S 폴리펩티드를 암호화하는 아데노바이러스 벡터를 포함하는 면역원성 조성물을 기술하며, 이들 각각은 그 전체 내용이 인용에 의해 본 명세서에 통합된다: [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)].

[0393] 구현예에서, 상기 부가적인 면역원성 조성물은 데옥시리보핵산(DNA)을 포함한다. 구현예에서, 상기 부가적인 면역원성 조성물은 플라스미드 DNA를 포함한다. 구현예에서, 상기 플라스미드 DNA는 CoV S 폴리펩티드를 암호화한다. 구현예에서, 상기 DNA는 서열번호 1의 위치 986 및 987에서 프롤린 치환 및 온전한 퓨린 절단 부위를 포함하는 CoV S 폴리펩티드를 암호화한다. 구현예에서, 상기 DNA는 서열번호 1의 위치 986 및 987에서 프롤린 치환 및 불활성 퓨린 절단 부위를 포함하는 CoV S 폴리펩티드를 암호화한다. 구현예에서, 상기 DNA는 서열번호 87의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드를 암호화한다. 구현예에서, 상기 DNA는 서열번호 174 또는 서열번호 175의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드를 암호화한다.

[0394] 구현예에서, 상기 부가적인 면역원성 조성물은 불활성화된 바이러스 백신을 포함한다.

[0395] 구현예에서, CoV S 폴리펩티드를 포함하는 CoV S 폴리펩티드 또는 나노입자는 SARS-CoV-2 또는 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주에 의해 유발된 확정된 감염을 갖거나 이전에 가졌던 환자에게 투여된다. SARS-CoV-2 또는 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주를 이용한 감염은 핵산 증폭 테스트(예컨대, 중합효소 연쇄 반응) 또는 혈청학적 테스트(예컨대, SARS-CoV-2 바이러스 항원에 대한 항체에 대한 테스트)에 의해 확정될 수 있다. 구현예에서, CoV S 폴리펩티드 또는 CoV S 폴리펩티드를 포함하는 나노입자는 환자가 COVID-19로 진단된 후 적어도 약 3일, 적어도 약 1주, 적어도 약 2주, 적어도 약 3주, 적어도 약 4주에 환자에게 투여된다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드 또는 CoV S 폴리펩티드를 포함하는 나노입자는 환자가 COVID-19로 진단된 후 1주 내지 1년 사이, 예를 들면, 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 1년에 환자에게 투여된다. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드 또는 CoV S 폴리펩티드를 포함하는 나노입자는 환자가 COVID-19로 진단된 후 1주 내지 20년 사이, 예를 들면, 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 20년에 환자에게 투여된다.

[0396] 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드 또는 이를 포함하는 나노입자는 환자에게 제1 면역원성 조성물이 투여된 후에 투여된다. 제1 면역원성 조성물의 비제한적 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. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드 또는 이를 포함하는 나노입자는 제1 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. 구현예에서, 상기 CoV S 폴리펩티드 또는 이를 포함하는 나노입자는 제1 면역원성 조성물의 투여 후 약 1주 내지 약 1년, 예를 들면, 제1 면역원성 조성물의 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.

[0397] 구현예에서, 상기 CoV S 단백질 또는 CoV S 단백질을 포함하는 나노입자는 MERS, SARS, SARS-CoV-2, 및 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주 중 하나 이상에 대한 면역력 또는 상당한 면역력을 부여하는 면역 반응을 자극하기 위한 면역원성 조성물을 제조하기 위해 유용하다. 점막성 및 세포성 면역력 모두가 감염 및 질환에 대한 면역력에 기여할 수 있다. 상기도에 국소 분비되는 항체는 자연적 감염에 대한 저항에 있어서의 주된 인자이다. 분비성 면역글로불린 A(sIgA)는 상기도의 보호에 관련되고, 혈청 IgG는 하기도의 보호에 관련된다. 감염에 의해 유도되는 면역 반응은 동일한 바이러스 또는 항원적으로 유사한 바이러스의 바이러스주를 이용한 재감염에 대해 보호한다. 본 명세서에 개시된 나노입자를 이용한 면역화 후 숙주에서 생산된 항체는 또한 다른 대상체에게 투여되어서 상기 대상체에서 수동적 투여를 제공할 수 있다.

[0398] 구현예에서, 상기 CoV S 단백질 또는 CoV S 단백질을 포함하는 나노입자는 (a) 아미노산 11-14, 56, 57, 130, 131, 132, 144, 145, 198, 199, 228, 229, 230, 231, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 676-685, 676-702, 702-711, 775-793, 806-815 및 이들의 조합으로부터 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 결실; (b) 아미노산 5, 6, 7, 11, 12, 13, 14, 51, 53, 54, 56, 57, 62, 63, 67, 70, 82, 125, 129, 131, 132, 133, 134, 139, 143, 144, 145, 170, 177, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 209, 229, 233, 239, 240, 244, 245, 326, 333, 355, 358, 360, 362, 363, 392, 395, 404, 419, 426, 427, 431, 432, 433, 439, 440, 447, 464, 465, 471, 473, 477, 480, 481, 483, 485, 488, 492, 534, 557, 591, 600, 601, 626, 642, 645, 664, 666, 668, 688, 691, 703, 751, 783, 843, 846, 875, 937, 941, 956, 968, 969, 1014, 1058, 1105, 1163, 1186 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이; 또는 (c) 아미노산 214 및 215 사이에 EPE의 아미노산 서열을 갖는 트리펩티드의 삽입;으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 갖는 S 단백질을 함유하는 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 교차-중화 항체를 유도하며, 여기서 상기 CoV S 당단백질의 아미노산은 서열번호 2의 서열을 갖는 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다.

[0399] 구현예에서, 상기 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 선택되는 하나 이상의 변형을 갖는 S 단백질을 함유하는 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 교차-중화 항체를 유도하며,

여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다.

[0400] 구현예에서, 상기 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 선택되는 하나 이상의 변형을 갖는 S 단백질을 함유하는 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 교차-중화 항체를 유도하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다.

[0401] 구현예에서, 상기 CoV S 단백질 또는 CoV S 단백질을 포함하는 나노입자는 D67A, D202G, L229H, K404N, E471K, N488Y, D601G, 및 A688V로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 갖는 S 단백질을 함유하는 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 교차-중화 항체를 유도하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다.

[0402] 구현예에서, 상기 CoV S 단백질 또는 CoV S 단백질을 포함하는 나노입자는 아미노산 229-231의 결실, D67A, D202G, K404N, E471K, N488Y, D601G, 및 A688V로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 갖는 S 단백질을 함유하는 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 교차-중화 항체를 유도하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다.

[0403] 구현예에서, 상기 CoV S 단백질 또는 CoV S 단백질을 포함하는 나노입자는 아미노산 229-231의 결실, L5F, D67A, D202G, K404N, E471K, N488Y, D601G, 및 A688V 로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 갖는 S 단백질을 함유하는 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 교차-중화 항체를 유도하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다.

[0404] 구현예에서, 상기 CoV S 단백질 또는 CoV S 단백질을 포함하는 나노입자는 L5F, T7N, P13S, D125Y, R177S, K404T, E471K, N488Y, D601G, H642Y, T1014I, 및 V1163F로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 갖는 S 단백질을 함유하는 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 교차-중화 항체를 유도하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다.

[0405] 구현예에서, 상기 CoV S 단백질 또는 CoV S 단백질을 포함하는 나노입자는 W139C 및 L439R로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 포함하는 S 단백질을 갖는 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 교차-중화 항체를 유도하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, W139C 및 L439R 변형을 포함하는 CoV S 단백질은 서열번호 117 또는 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 신호 펩티드와 함께 발현된다. 구현예에서, 상기 CoV S 단백질 또는 CoV S 단백질을 포함하는 나노입자는 D601G, W139C, 및 L439R로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 갖는 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 교차-중화 항체를 유도하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, D601G, W139C, 및 L439R 변형을 포함하는 CoV S 단백질 또는 나노입자는 서열번호 117 또는 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 신호 펩티드와 함께 발현된다.

[0406] 구현예에서, 상기 CoV S 단백질 또는 CoV S 단백질을 포함하는 나노입자는 D601G, L5F, D67A, D202G, 아미노산 229-231의 결실, R233I, K404N, E471K, N488Y, 및 A688V로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 갖는 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 교차-중화 항체를 유도하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 구현예에서, 상기 CoV S 단백질 또는 CoV S 단백질을 포함하는 나노입자는 L5F, D67A, D202G, 아미노산 229-231의 결실, R233I, K404N, E471K, N488Y, 및 A688V로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 갖는 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 교차-중화 항체를 유도하며, 여기서 상기 아미노산은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다.

[0407] 구현예에서, 본 개시는 하나 이상의 높은 친화도의 항-MERS-CoV, 항-SARS-CoV, 및 항-SARS-CoV-2 바이러스 항체를 생산하는 방법을 제공한다. 본 명세서에 개시된 나노입자를 이용한 면역화에 의해 생산되는 높은 친화도의 항체는 S CoV 폴리펩티드 또는 S CoV 폴리펩티드를 포함하는 나노입자를 포함하는 면역원성 조성물을 동물에게 투여하는 단계, 상기 동물로부터 혈청 및/또는 혈장을 수집하는 단계, 및 상기 혈청 및/또는 혈장으로부터 항체를 정제하는 단계에 의해 생산된다. 한 구현예에서, 상기 동물은 인간이다. 구현예에서, 상기 동물은 닭, 마우스, 기니 피그, 래트, 토끼, 염소, 인간, 말, 양, 또는 소이다. 한 구현예에서, 상기 동물은 소 또는 말이다. 다른 구현예에서, 상기 소 또는 말 동물은 유전자이식된다. 다른 추가 구현예에서, 상기 유전자이식 소 또는 말 동물은 인간 항체를 생산한다. 구현예에서, 상기 동물은 모노클론 항체를 생산한다. 구현예에서, 상기 동물은 폴리클론 항체를 생산한다. 한 구현예에서, 상기 방법은 어주번트 또는 면역 자극 화합물의 투여를 포함한다. 추가 구현예에서, 정제된 높은 친화도의 항체는 인간 대상체에게 투여된다. 한 구현예에서, 상기 인간 대상체는

MERS, SARS, 및 SARS-CoV-2 중 하나 이상을 이용한 감염에 대한 위험성이 있다.

[0408] 구현예에서, 상기 CoV S 단백질 또는 나노입자는 인프루엔자 당단백질 또는 인프루엔자 당단백질 또는 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 융합(F) 당단백질을 포함하는 나노입자와 함께 공동-투여된다. 구현예에서, 상기 CoV S 단백질 또는 나노입자는 RSV F 당단백질, 인프루엔자 당단백질, 또는 이들의 조합과 공동-제형화된다. 적합한 당단백질 및 나노입자는 각각의 전체 내용이 인용에 의해 본 명세서에 통합되는 미국 공개공보 제2018/0133308호 및 미국 공개공보 제2019/0314487호에 기술되어 있다. 구현예에서, 상기 CoV S 단백질 또는 나노입자는 (a) 세제-코어 나노입자; 및 (b) 헤마글루티닌 사포닌 매트릭스 나노입자(HaSMaN);와 공동투여되며, 여기서 상기 세제-코어 나노입자는 B형 인프루엔자 바이러스주로부터의 재조합 인프루엔자 헤마글루티닌(HA) 당단백질을 포함하고, 상기 HaSMaN은 A형 인프루엔자 바이러스주로부터의 재조합 인프루엔자 HA 당단백질 및 이스콤 매트릭스 어주번트를 포함한다. 구현예에서, 상기 CoV S 단백질 또는 나노입자는 비이온성 세제 코어 및 인프루엔자 HA 당단백질을 포함하는 나노입자와 공동투여되며, 여기서 상기 인프루엔자 HA 당단백질은 비이온성 세제 코어로부터 바깥으로 돌출되는 헤드 영역 및 비이온성 세제 코어와 회합되는 막통과 도메인을 함유하고, 상기 인프루엔자 HA 당단백질은 HA0 당단백질이고, 상기 인프루엔자 HA 당단백질의 아미노산 서열은 자연형 인프루엔자 HA 단백질의 아미노산 서열과 100% 동일성을 갖는다. 구현예에서, 상기 인프루엔자 당단백질 또는 나노입자는 상기 CoV S 단백질 또는 나노입자와 공동제형화된다.

[0409] 일부 구현예에서, 본 개시는 CoV S 당단백질 및 어주번트(예컨대, 사포닌 어주번트)를 포함하는 면역원성 조성물을 위한 공동-제형물(즉, 사전충진된 주사기 또는 프리-믹스) 전략을 제공한다. 현재 이용되고 있는 전형적인 백신 투여 전략은 베드사이드(bedside) 믹스 제형물이다. 즉, 백신 조성물 및 어주번트는 별도로 보관되고, 투여 전에 혼합된다. 백신을 위한 프리-믹스, 공동-제형물, 또는 사전충진된 주사기 전략은 항원(예컨대, CoV S 당단백질)의 안정성 및 후속적인 그의 면역원성 역량의 우려로 인해 덜 일반적이다. 본 개시는 앞서 사전-혼합 및 보관될 수 있는 면역원성 조성물을 제공한다. 본 개시의 백신화 전략 및 제형물은 전체적인 안전성 및 면역원성을 유지하면서 백신화의 효율을 개선할 수 있고, 베드사이드 혼합 오차의 위험성을 감소시킬 수 있다.

[0410] 단일 투여용 주사기 및 플라스틱 앰풀(ampule)을 포함하는 다양한 용기가 프리-믹스 제형물을 보관 및 운송하기 위해 사용될 수 있다. 일부 경우에서, 플라스틱 앰풀은 성형-충진-밀봉(blow-fill-seal) 제조 기술 또는 방법을 이용해 제조될 수 있다. 일반적으로, 상기 성형-충진-밀봉(BFS) 제조 방법은 플라스틱 물질(예컨대, 수지)을 압출하여 패리손(parison)을 형성한 후, 이를 주형 내에 두고 크기로 절단하는 단계를 포함한다. 이후, 충진 바늘 또는 맨드릴(mandrel)을 사용하여 플라스틱을 부풀리고, 이어서 주형의 형태와 실질적으로 일치하는 중공 앰플을 생성한다. 일단 부풀려지면, 원하는 부피의 액체가 앰풀 내로 주사될 수 있고, 충진 바늘 또는 맨드릴은 제거될 수 있고, 앰풀은 밀봉될 수 있다. 따라서, BFS는 직접적인 인간의 개입없이 멸균 환경에서 수행될 수 있는 자동화 공정일 수 있다.

[0411] 일부 경우에서, 원하는 액체를 함유하는 멸균 앰풀을 무균적으로 제조하는 능력은 BFS 제조된 앰풀을 제약 산업용으로 특히 매우 적합하게 할 수 있다. 그러나, BFS 기술은 모든 약학적 액체, 생성물 등과 호환성인 것은 아니다. 예를 들면, 일부 알려진 BFS 제조 방법은 플라스틱이 여전히 상대적으로 뜨거운 동안에 액체 또는 생성물을 앰풀 내로 운반하는 단계를 포함하는데, 이것은 온도 민감성 액체 및/또는 생성물, 예컨대 백신, 생물의약품(biologics) 등에 부정적인 영향을 야기할 수 있다. 그러나, 냉각 BFS 기술에서의 진보는 적합한 생성물, 액체 등의 다양성을 증가시켜서, 일부 백신, 생물의약품, 및/또는 다른 온도 민감성 의약품이 BFS 앰풀 내에 함유되게 한다.

[0412] 일부 경우에서, BFS 앰풀은 적어도 부분적으로 원하는 용도 및/또는 앰풀이 이를 함유하도록 구성된 원하는 약학적 액체 또는 복용량에 기반하는 크기, 형태, 및/또는 형상을 가질 수 있다. 예를 들면, 일부 알려진 BFS 앰풀은 관통형 상부(pierce through top), 트위스트-오프(twist-off) 상부, 남성 또는 여성 루어(luer)를 포함하는 상부, 등을 포함할 수 있다. 일부 알려진 BFS 앰풀은 그 내부에 배치되도록 구성된 액체의 부피 또는 복용량에 기반하여 크기 및/또는 형태를 가질 수 있다. 게다가, 일부 알려진 BFS 앰풀은 다수의 일시적으로 연결된 앰풀의 스트립으로 제조될 수 있으며, 이는 제조, 포장, 및/또는 보관 효율 등을 증가시킬 수 있다.

[0413] 구현예에서, 본 명세서에 기술된 면역원성 조성물은 사전-충진된 주사기로 제공된다. 상기 면역원성 조성물이 사전-충진된 주사기로 제조될 때, 항원 및 어주번트는 투여에 앞서서 조합된다. 구현예에서, 상기 사전-충진된 주사기는 CoV S 당단백질 및 어주번트(예컨대, 사포닌 어주번트)를 함유한다. 구현예에서, 상기 사전-충진된 주사기는 CoV S 당단백질 및 사포닌 어주번트를 함유하고, 상기 어주번트는 적어도 2 종의 이스콤 입자를 포함하며, 여기서 제1 이스콤 입자는 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A는 포함하지만 퀼라자 사포나리아 몰리나의

분획 C는 포함하지 않는다; 제2 이스콤 입자는 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 포함하지만 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A는 포함하지 않는다; 상기 어주번트에서 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 각각 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량의 합의 약 85 중량% 및 약 15 중량%를 차지한다. 구현예에서, 상기 사전-충진된 주사기는 CoV S 당단백질 및 사포닌 어주번트를 함유하고, 상기 어주번트는 적어도 2 종의 이스콤 입자를 포함하며, 여기서 제1 이스콤 입자는 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A는 포함하지만 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 포함하지 않는다; 제2 이스콤 입자는 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 포함하지만 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A는 포함하지 않는다; 상기 어주번트에서 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 각각 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량의 합의 약 92 중량% 및 약 8 중량%를 차지한다. 구현예에서, 상기 사전-충진된 주사기는 CoV S 당단백질 및 사포닌 어주번트를 함유하고, 상기 어주번트는 적어도 2 종의 이스콤 입자를 포함하며, 여기서 제1 이스콤 입자는 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A는 포함하지만 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 포함하지 않는다; 제2 이스콤 입자는 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 포함하지만 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A는 포함하지 않는다; 상기 어주번트에서, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량의 합 중, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A가 적어도 약 75 중량%를 차지하고, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C가 나머지를 차지한다.

[0414] **실시예**

[0415] **실시예 1**

[0416] **코로나바이러스 스파이크(S) 폴리펩티드 나노입자의 발현 및 정제**

[0417] 자연형 코로나바이러스 스파이크(S) 폴리펩티드(서열번호 1 및 서열번호 2) 및 서열번호 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, 174-176, 186, 188, 190, 195, 217-228, 233-236에 해당하는 아미노산 서열을 갖는 CoV 스파이크 폴리펩티드를 바큘로바이러스 발현 시스템에서 발현시켰고, 코로나바이러스 스파이크(S) 폴리펩티드를 발현하는 재조합 플라크를 선택 및 확인하였다. 각각의 경우에, 신호 펩티드는 서열번호 5이다. **도 4** 및 **도 9**는 상기 CoV 스파이크 폴리펩티드 BV2364, BV2365, BV2366, BV2367, BV2368, BV2369, BV2373, BV2374, 및 BV2375의 성공적인 정제를 보여준다. 표 9는 전술한 CoV 스파이크 폴리펩티드의 서열 특징을 보여준다.

표 9

[0418] **선택된 CoV 스파이크 폴리펩티드**

CoV S 폴리펩티드	서열번호
BV2364	48
BV2365	4
BV2361 / BV2366	2
BV2367	63
BV2368	65
BV2369	67
BV2373, 본 명세서에서 "NVX-CoV2373"로 나타낸 조성물로 제형화됨	87
BV2374	85
BV2374	58
BV2384	110
BV2425	114
BV2426	115
BV2438	132
BV2423	133
BV2425	114
BV2425-2	138
BV2439	141
BV2441	144
BV2442	147

BV2443	151
BV2448	153
BV1.526NY-1	156
BV1.526NY-2	158
BV2508	174
BV2509	175
BV2465	176
BV2457	181
BV2472	182
BV2480	183
BV2481	184
BV2523	195
BV2540	192
BV2541	190
BV2515	188
BV2542	186
BV2515-1	217
BV2523-1	218
BV2540-1	222
BV2541-1	221
BV2549	219
BV2542-2	220
BV2562	225
BV2559	223
BV2577	224
BV2578	226
BV2589	227
BV2590	228
BV2592	233
XBB.1	234
BV2591	235
BN.1	236
델타크론	243

[0419] 부가적으로, 서열번호 161, 162, 163, 164, 165, 166, 168, 169, 171, 172, 196-199, 201, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 및 237-241 중 어느 하나의 핵산에 의해 암호화되는 CoV S 폴리펩티드를 생산한다. 부가적으로, 서열번호 5, 154, 193, 또는 117 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 신호 펩티드의 C-말단에 서열번호 87, 159, 167, 160, 170, 174, 175, 186, 188, 190, 195, 217-228, 233-236, 및 243의 폴리펩티드 서열을 포함하는 CoV S 폴리펩티드를 생산한다.

[0420] 상기 야생형 BV2361 단백질(서열번호 2)은 인간 안지오텐신-전환 효소 2 전구체(hACE2)에 결합한다. 바이오-층간섭계법 및 ELISA를 수행하여 상기 CoV S 폴리펩티드의 결합을 평가하였다.

[0421] ***바이오-층 간섭계법(BLI)***

[0422] Octet QK384 시스템(Pall Forte Bio, Fremont, CA)을 이용해 BLI 실험을 수행하였다. His-태그된 인간 ACE2(2 ㎍/㎖)를 니켈-충전된(charged) Ni-NTA 바이오센서 끝 부분에 고정하였다. 기준선 후, 샘플을 함유하는 SARS-CoV-2 S 단백질을 2배 연속적으로 희석하였고, 600초 동안 회합하게 둔 후, 부가적으로 900초 동안 해리시켰다. Octet 소프트웨어 HT 101:1 글로벌 커브 핏(global curve fit)을 이용해 데이터를 분석하였다.

[0423] CoV S 폴리펩티드 BV2361, BV2365, BV2369, BV2365, BV2373, BV2374, 및 BV2509는 hACE2에 결합하는 능력을 유지한다(**도 5**, **도 11a** 내지 **도 11c**, **도 65a** 및 **도 65b**). 해리 동역학은 유체상(fluid phase) S 단백질의 부재시에 관찰되는 900초에 걸쳐 해리가 없거나 최소인 것에 의해 분명한 것과 같이 S-단백질이 단단히 결합해 남아 있음을 보여주었다(**도 11a** 내지 **도 11c**).

[0424] 아울러, 결합은 특이적이다. 야생형 CoV S 단백질인 BV2361 및 CoV S 폴리펩티드 BV2365 및 BV2373은 MERS-CoV 수용체, 디펩티드성 펩티다아제 IV(DPP4)에 결합하지 않는다. 부가적으로, MERS S 단백질은 인간 안지오텐신-전

환 효소 2 전구체(hACE2)에 결합하지 않는다(**도 6** 및 **도 11d** 내지 **도 11f**).

[0425] *ELISA*

[0426] hACE2에 대한 CoV S 폴리펩티드의 특이성을 ELISA에 의해 확인하였다. 96-웰 플레이트를 100 ㎕의 SARS-CoV-2 스파이크 단백질(2 ㎍/㎖)로 4℃에서 밤새 코팅하였다. 플레이트를 0.05% Tween을 갖는 포스페이트 버퍼화 식염수(PBS-T) 버퍼로 세척하였고, TBS 스타트블록(Startblock) 차단 버퍼(ThermoFisher, Scientific)로 차단하였다. His-태그된 hACE2 및 hDPP4 수용체를 3배 연속적으로 희석하였고(5-0.0001 ㎍/㎖), 실온에서 2시간 동안 코팅된 웰에 첨가하였다. 상기 플레이트를 PBS-T로 세척하였다. 최적으로 희석된 서양고추냉이 퍼옥시다아제(HRP)가 접합된 항-히스티딘을 첨가하였고, 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 퍼옥시다아제 기질(TMB, T0440-IL, Sigma, St. Louis, MO, USA)을 첨가함으로써 색상을 현상하였다. SpectraMax Plus 플레이트 판독기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용해 450 nm의 OD에서 플레이트를 판독하였고, SoftMax 소프트웨어로 데이터를 분석하였다. GraphPad Prism 7.05 소프트웨어를 이용하는 4-파라미터 핏팅(fitting)에 의해 EC50 값을 계산하였다.

[0427] 상기 ELISA 값은 야생형 CoV S 폴리펩티드(BV2361), BV2365, 및 BV2373 단백질은 hACE2에 특이적으로 결합하였지만, MERS-CoV에 의해 사용된 hDPP-4 수용체에 결합하는데는 실패하였음을 보여주었다(IC_{50} >5000 ng/㎖). 야생형 CoV S 폴리펩티드 및 BV2365는 유사한 친화도로 hACE2에 결합하였지만(IC_{50} = 36-38 ng/㎖), BV2373은 2배 더 낮은 농도에서 hACE2 결합의 50% 포화를 유지하였다(IC_{50} = 18 ng/㎖)(**도 7**, **도 11d** 내지 **도 11f**).

[0428] ***단백질 및 나노입자 생산***

[0429] 재조합 바이러스를 Sf9 곤충 세포의 감염에 의해 증폭한다. 곤충 세포의 배양물을 바큘로바이러스를 이용해 ~0.6 MOI(감염의 다중도 = 바이러스 ffu 또는 pfu/세포)로 감염시킨다. 상기 배양물 및 상등액을 감염-후 48-72시간에 수확한다. 대략 30 ㎖의 미정제 세포 수확물을 대략 800×g에서 15분 동안 원심분리함으로써 투명하게 한다. 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질을 함유하는 생성된 미정제 세포 수확물을 아래에 기술한 것과 같이 나노입자로서 정제한다.

[0430] 나노입자를 생산하기 위하여, 비이온성 계면활성제인 TERGITOL® 노닐페놀 에톡실레이트 NP-9를 막 단백질 추출 프로토콜에 사용한다. 미정제 추출물을 음이온 교환 크로마토그래피, 렌틸 렉틴 친화도/HIC 및 양이온 교환 크로마토그래피를 통해 통과시킴으로써 추가로 정제한다. 세척된 세포를 세제 처리에 의해 용해한 후, 낮은 pH 처리를 거쳐서 BV 및 Sf9 숙주 세포 DNA 및 단백질의 침전을 유도한다. 중화된 낮은 pH 처리 용해물을 투명하게 하고, 음이온 교환 및 친화성 크로마토그래피 상에서 추가로 정제한 후, 제2 낮은 pH 처리를 수행한다.

[0431] 친화성 크로마토그래피를 사용하여 Sf9/BV 단백질, DNA 및 NP-9를 제거하고, 또한 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질을 농축한다. 간략하게, 렌틸 렉틴은 폴리사카라이드 및 글루코오스 또는 만노오스를 함유하는 글리코실화 단백질에 가역적으로 결합하는 칼슘 및 망간을 함유하는 금속단백질이다. 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질-함유 음이온 교환 통과 분획을 렌틸 렉틴 친화성 크로마토그래피 수지(Capto Lentil Lectin, GE Healthcare)에 로딩한다. 글리코실화 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질은 상기 수지에 선택적으로 결합하지만, 비-글리코실화 단백질 및 DNA는 컬럼 통과시에 제거된다. 약하게 결합된 당단백질은 높은 염 및 낮은 몰 농도의 메틸 알파-D-만노피라노시드(MMP)를 함유하는 버퍼에 의해 제거된다.

[0432] 또한, 컬럼 세척물을 사용하여 NP-9 세제를 계면활성제 폴리소르베이트 80(PS80)으로 세제 교환한다. 코로나바이러스 스파이크(S) 폴리펩티드는 고농도의 MMP를 이용한 렌틸 렉틴 컬럼으로부터 나노입자 구조로 용출된다. 용출 후, 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질 3량체는 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질 3량체 및 세제 코어 내에 함유된 PS80으로 구성된 나노입자로 조립된다.

[0433] **실시예 2**

[0434] **마우스에서 코로나바이러스 스파이크(S) 폴리펩티드 나노입자 백신의 면역원성**

[0435] 실시예 1에 기술된 것과 같은 서열번호 87의 CoV S 폴리펩티드를 포함하는 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질 조성물("BV2373"으로도 불림)을 암컷 BALB/c 마우스(7-9주령; Harlan Laboratories Inc., Frederick, MD)를 이용하는 뮤린(murine) 모델에서 면역원성 및 독성에 대해 평가하였다. 상기 조성물을 사포닌 어주번트, 예컨대, 매트릭스-M™의 존재시 및 부재시에 평가하였다. 매트릭스-M™을 함유하는 조성물은 5 ㎍의 매트릭스-M™을 함유하였다. 0.01 ㎍, 0.1 ㎍, 1 ㎍, 및 10 ㎍을 포함하는 다양한 용량의 코로나바이러스 스파이크(S) 폴리펩티드

를 함유하는 백신을 단일 용량으로(단일 프라임 용량으로도 나타냄)(연구 14일) 또는 14일의 간격(연구 0일 및 14일)으로 떨어진 2 용량으로(프라임/부스트 요법으로도 나타냄) 근육내로 투여하였다. 위약 그룹은 비-면역화된 대조군으로 기능하였다. 연구 -1, 13, 21, 및 28일에 혈청을 수집해 분석하였다. 백신화된 및 대조군 동물을 1회(단일 용량) 또는 2회(2 용량)면역화 42일 후에 SARS-CoV-2로 비강내 챌린지하였다.

[0436] ***백신 면역원성***

[0437] 단일 프라임 용량의 0.1-10 ㎍의 BV2373 및 매트릭스-M™으로 면역화된 동물은 단일 면역화 후 21-28일에 상승된 항-S IgG 역가가 검출되었다(**도 13b**). 10 ㎍ 용량의 BV2373 및 매트릭스-M™으로 면역화된 마우스는 단일 프라임 용량 후 21-28일에 CoV S 단백질에 대한 hACE2 수용체 결합을 차단하는 항체 및 바이러스 중화 항체의 생산이 검출되었다(**도 14** 및 **도 15**). 프라임/부스트 요법(2 용량)으로 면역화된 동물은 모든 용량 레벨에 걸쳐서 부스터 면역화 후 7-16일에 현저하게 상승된 항-S IgG 역가가 검출되었다(**도 13a**). BV2373(1 ㎍ 및 10 ㎍) 및 매트릭스-M™으로 면역화된 동물은 면역화 후 유사하게 높은 항-S IgG 역가를 가졌다(각각 GMT = 139,000 및 84,000). BV2373(0.1 ㎍, 1 ㎍, 또는 10 ㎍) 및 매트릭스-M™으로 면역화된 마우스는 어주번트없이 10 ㎍의 BV2373으로 면역화된 마우스와 비교하여 현저하게($p \leq 0.05$ 및 $p \leq 0.0001$) 더 높은 항-S IgG 역가를 가졌다(**도 13a**). 상기 결과는 매트릭스-M™ 어주번트에 의해 10 내지 100배 용량 절약을 제공할 가능성을 시사한다. 아울러, 2 용량의 BV2373 및 매트릭스-M™을 이용한 면역화는 모든 용량 레벨에 걸쳐서 S-단백질에 대한 hACE2 수용체 결합을 차단하는 높은 역가 항체(IC50 = 218 - 1642)를 일으켰고, Vero E6 세포에 대한 SARS-CoV-2의 세포변성 효과(CPE)를 중화시켰다(CPE의 100% 차단 = 7680 - 20,000)(**도 14 및 도 15**).

[0438] ***SARS CoV-2 챌린지***

[0439] 보호성 면역력의 유도를 평가하기 위하여, 면역화된 마우스를 SARS-CoV-2로 챌린지하였다. 마우스는 야생형 SARS-CoV-2 바이러스의 복제를 지원하지 못하기 때문에, 초기 백신화 52일 후에, hACE2(Ad/hACE2)를 발현하는 아데노바이러스를 이용해 마우스를 비강으로 감염시켜 이들이 허용적으로 되게 하였다. 1.5×10^5 pfu의 SARS-CoV-2를 50 ㎕로 나누어 마우스의 콧구멍에 비강으로 접종하였다. 챌린지된 마우스의 체중을 감염일에 재었고, 감염 후 최대 7일 동안 매일 재었다. 감염 후 4 및 7일에, 각각의 백신화 그룹 및 대조군으로부터 5마리 마우스를 희생시켰고, 폐를 수확하였고, 폐 조직학을 위해 준비하였다.

[0440] 바이러스 역가를 플라크 에세이에 의해 정량하였다. 간략하게, 수확된 폐를 1.0 ㎜ 유리 비드(Sigma Aldrich) 및 비드파쇄기(Beadruptor)(Omini International Inc.)를 이용해 PBS 중에 균질화하였다. 균질화물을 거의 가득 찬 Vero E6 배양물에 첨가하였고, 6-점 희석 곡선을 이용해 플라크 형성 단위(pfu)를 계수함으로써 SARS-CoV-2 바이러스의 역가를 결정하였다.

[0441] 감염 후 4일에, 위약-처리된 마우스는 10^4 SARS-CoV-2 pfu/폐를 가졌지만, 매트릭스-M™ 없이 BV2363으로 면역화된 마우스는 10^3 pfu/폐를 가졌다(**도 16**). 매트릭스-M™ 프라임-단독과 함께 BV2373으로 면역화된 마우스의 그룹은 바이러스 역가에서 용량 의존적인 감소를 나타내었고, 10 ㎍의 BV2373 용량을 받은 수용자는 감염 후 4일에 검출가능한 바이러스가 없었다. 1 ㎍, 0.1 ㎍ 및 0.01 ㎍ BV2373 용량을 받은 마우스는 모두 위약-백신화된 마우스와 비교하여 역가에 있어서 두드러진 감소를 보였다. 프라임/부스트 그룹에서, 10 ㎍, 1 ㎍ 및 0.1 ㎍ 용량으로 면역화된 마우스는 거의 검출불가능한 폐 바이러스 부하를 가졌지만, 0.01 ㎍ 그룹은 위약 동물과 비교하여 1 log 감소의 감소를 나타내었다.

[0442] 체중 손실은 상기 바이러스 부하 소견과 유사하였다. 단일 용량의 BV2373(0.1 ㎍, 1 ㎍, 및 10 ㎍) 및 매트릭스-M™을 받은 동물은 백신화되지 않은 위약 동물과 비교하여 체중 손실로부터 두드러진 보호를 보여주었다(**도 17a**). 어주번트와 함께 프라임 및 부스트 용량을 받은 마우스는 또한 모든 용량 레벨에서 체중 손실에 대한 현저한 보호를 실증하였다(**도 17b** 및 **도 17c**). 체중 손실의 보호에 대한 어주번트의 존재의 효과를 평가하였다. 어주번트와 함께 프라임/부스트(2 용량)를 받은 마우스는 위약과 비교하여 체중 손실로부터 현저하게 보호되었지만, 어주번트 없이 면역화된 그룹은 그렇지 않았다(**도 17c**). 상기 결과는 BV2373이 SARS-CoV-2에 대한 보호를 부여하고, 낮은 혈청학적 반응과 연관되는 낮은 용량의 백신은 체중 손실을 악화시키거나 질병의 악화를 실증하지 않음을 보여주었다.

[0443] 폐 조직병리학을 감염 후 4일 및 7일에 평가하였다(**도 18a** 및 **도 18b**). 감염 후 4일에, 위약-면역화된 마우스는 혼합된 염증 세포 개체군에 의해 둘러싸인 폐포 격막의 비후화와 함께 대기도에서 상피 세포의 노출을 보였다. 주로 호중구 및 대식세포로 이루어진 염증 세포와 함께 폐 전반에 걸쳐서 세동맥주위 커핑(periarteriolar

cuffing)이 관찰되었다. 감염 후 7일에, 위약-처리된 마우스는 증가된 세동맥주위 커핑과 함께 세기관지주위 염증을 나타내었다. 두꺼워진 폐포 격막은 폐포 격막 전반에 걸쳐서 증가된 미만성 간질성 염증이 유지되었다(**도 18b**).

[0444] 상기 BV2373 면역화된 마우스는 감염 후 4일 및 7일 모두에서 용량-의존적 방식으로 폐 병리학에서 현저한 감소를 보였다. 프라임 단독 그룹은 위약 마우스와 비교하여 10 ㎍ 및 1 ㎍ 용량에서 기관지 및 세동맥 주위의 염증의 감소와 함께 감소된 염증을 보였다. 더 낮은 용량의 프라임-단독 그룹에서, 폐 염증은 위약 그룹의 경우와 닮았고, 체중 손실 및 폐 바이러스 역가가 연관되었다. 프라임/부스트 면역화된 그룹은 테스트된 모든 용량의 경우에 폐 염증에서 현저한 감소를 나타내었고, 이것은 다시 폐 바이러스 역가 및 체중 손실 데이터와 연관되었다. 4일 및 7일에 큰 및 작은 기관지 내의 상피 세포는 실질적으로 최소의 세기관지 탈리(sloughing) 및 바이러스 감염의 기색이 보존되었다. 10 ㎍, 1 ㎍ 및 0.1 ㎍ 용량으로 면역화된 동물의 세동맥은 최소의 염증을 가졌고, 0.01 ㎍ 용량의 경우에는 위약과 유사하게 단지 중간의 커핑이 보였다. 폐포 염증은 더 높은 용량을 받은 동물에서 감소되었고, 더 낮은 0.01 ㎍ 용량의 경우에만 염증과 연관되었다(**도 18a** 및 **도 18b**). 상기 데이터는 챌린지 후에 BV2373이 폐 염증을 감소시키고, 최소의 또는 검출가능하지 않은 중화 활성을 일으키는 BV2373의 용량 및 요법 조차도 바이러스에 대한 염증 반응의 악화와 연관되지 않음을 실증한다. 아울러, 상기 백신은 챌린지된 마우스에서 백신과 연관된 향상된 호흡기 질환(VAERD)을 유발하지 않는다.

[0445] ***T 세포 반응***

[0446] T 세포 반응에 대한 서열번호 87의 CoV S 폴리펩티드를 포함하는 백신 조성물의 효과를 평가하였다. BALB/c 마우스(그룹 당 N = 6)를 21일의 간격으로 떨어진 2 용량으로 5 ㎍ 매트릭스-M™이 있거나 없이 10 ㎍ BV2373을 이용해 근육내로 면역시켰다. 제2 면역화 후 7일(연구 28일)에 비장을 수집하였다. 백신화되지 않은 그룹(N = 3)은 대조군으로 기능하였다.

[0447] 제2 면역화 후 7일(연구 28일)에 수집된 비장으로부터 항원-특이적 T 세포 반응을 ELISPOT™ 효소 결합 면역흡착 에세이 및 세포내 사이토카인 염색(ICCS)에 의해 측정하였다. ELISPOT™ 에세이에 의해 측정될 때 생체외 자극 후 IFN-γ 분비 세포의 수는 BV2373 단독과 비교하여 BV2373 및 매트릭스-M™으로 면역화된 마우스의 비장에서 20배 증가하였다(p = 0.002)(**도 19**). CD4+ 및 CD8+ T 세포 반응을 별도로 조사하기 위하여, 표면 마커 염색과 함께 ICCS 에세이를 수행하였다. 나타낸 데이터는 CD44hi CD62L-이펙터 메모리(effector memory) T 세포 개체군에 대해 게이트화한다. IFN-γ+, TNF-α+, 및 IL-2+ 사이토카인-분비 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 빈도는 어주번트가 없이 면역화된 마우스와 비교할 때 BV2373으로 면역화된 마우스로부터의 비장에서 현저하게 더 높았다(p <0.0001)(**도 20a** 내지 **도 20c** 및 **도 21a** 내지 **도 21c**). 또한, 적어도 2가지 또는 3가지 사이토카인을 동시에 생산하는 다기능성 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 빈도는 또한 어주번트가 없이 면역화된 마우스와 비교할 때 BV2373/_매트릭스-M™으로 면역화된 마우스로부터의 비장에서 현저하게 증가되었다(p <0.0001)(**도 20d** 및 **도 20e** 및 **도 21d** 및 **도 21e**). BV2373/매트릭스-M™을 이용한 면역화는 CD4+ 및 CD8+ T 세포 개체군 모두에서 다기능성 표현형(예컨대, IFN-γ, TNF-α, 및 IL-2 중 하나 초과를 분비하는 T 세포)을 더 높은 비율로 야기하였다. 메모리 CD4+ T 세포에서 검출되는 다기능성 표현형의 비율은 CD8+ T 세포의 경우보다 더 높았다(**도 22**).

[0448] 또한, CD4+ T 세포로부터 타입 2 사이토카인인 IL-4 및 IL-5 분비를 각각 ICCS 및 ELISPOT™에 의해 결정하였다. BV2373/매트릭스-M™을 이용한 면역화는 또한 BV2373 단독을 이용한 면역화와 비교하여 타입 2 사이토카인인 IL-4 및 IL-5 분비를 증가시켰지만(2배), 타입 1 사이토카인 생산의 향상보다 그 정도가 덜하였다(예컨대, IFN-γ는 20배 증가됨)(**도 23a** 내지 **도 23c**). 상기 결과는 매트릭스-M™ 어주번트의 투여가 CD4+ T 세포의 발생을 Th1 반응 쪽으로 편향시켰음을 시사한다.

[0449] 배 중심 형성에 대한 면역화의 효과를 비장에서 CD4+ T 여포 보조(TFH) 세포 및 배 중심(GC) B 세포의 빈도를 측정함으로써 평가하였다. 매트릭스-M™의 투여는 비장에서 TFH 세포(CD4+ CXCR5+ PD-1+)의 빈도(p = 0.01)뿐만 아니라, GC B 세포(CD19+GL7+CD95+)의 빈도(p = 0.0002)를 현저하게 증가시켰다(**도 24a** 및 **도 24b** 및 **도 25a** 및 **도 25b**).

[0450] **실시예 3**

[0451] **올리브 개코원숭이에서 코로나바이러스 스파이크(S) 폴리펩티드 나노입자 백신의 면역원성**

[0452] 개코원숭이에서 BV2373을 포함하는 백신 조성물의 면역원성을 평가하였다. 성체 올리브 개코원숭이를 21일의 간격으로 떨어진 2 용량으로 근육내(IM) 주사에 의해 투여되는 BV2373의 용량 범위(1 ㎍, 5 ㎍ 및 25 ㎍) 및 50 ㎍ 매트릭스-M™ 어주번트로 면역시켰다. 비-인간 영장류에서 매트릭스-M™의 어주번트 활성을 평가하기

위하여, 다른 그룹의 동물을 매트릭스-M™이 없이 25 ㎍의 BV2373으로 면역시켰다. BV2373/매트릭스-M™으로 면역화된 동물에서 항-S 단백질 IgG 역가는 모든 용량 레벨에 걸쳐서 단일 프라이머 면역화의 21일 이내에 검출되었다(GMT = 1249-19,000). 항-S 단백질 IgG 역가는 모든 용량 레벨에 걸쳐서 부스터 면역화(28일 및 35일) 후 1 내지 2주 내에 log 이상 증가하였다(GMT = 33,000-174,000)(**도 26a**).

[0453] BV2373(5 ㎍ 또는 25 ㎍) 및 매트릭스-M™으로 단일 면역화한 후 낮은 레벨의 hACE2 수용체 차단 항체가 동물에서 검출되었다(GMT = 22-37). BV2373/매트릭스-M™으로 면역화된 모든 그룹에 걸쳐서 수용체 차단 항체 역가는 부스터 면역화의 1 내지 2주 이내에 현저하게 증가되었다(GMT = 150-600)(**도 26b**). BV2373/매트릭스-M™으로 단일 면역화한 후 바이러스 중화 항체는 모든 용량 그룹에 걸쳐서 상승되었다(GMT = 190-446). 25 ㎍의 BV2373 단독으로 면역화된 동물은 hACE2에 대한 S-단백질 결합을 차단하는 검출가능한 항체가 없었다(**도 26c**). 중화 역가는 부스터 면역화 후 1주에 6 내지 8배 증가되었다(GMT = 1160-3846). 중화 역가는 제2 면역화 후에 추가로 25 내지 38배 증가되었다(GMT = 6400-17,000)(**도 26c**). 항-S IgG 레벨 및 중화 항체 역가 사이에 현저한 연관성이 있었다($p < 0.0001$)(**도 27**). 비-인간 영장류에서 어주번트화 백신의 면역원성은 실시예 2의 결과와 일치하며, 중화 항체 및 용량 절약의 생성을 촉진함에 있어서 매트릭스-M™의 역할을 추가로 지원한다.

[0454] 제2 면역화 후 7일(28일)에 PBMC를 수집하였고, ELISPOT 에세이에 의해 T 세포 반응을 측정하였다. BV2373(5 ㎍ 또는 25 ㎍) 및 매트릭스-M™으로 면역화된 동물로부터의 PBMC는 가장 높은 수의 IFN-γ 분비 세포를 가졌으며, 이것은 25 ㎍의 BV2373 단독 또는 BV2373(1 ㎍) 및 매트릭스-M™으로 면역화된 동물과 비교하여 5배 더 컸다(**도 28**). ICCS 분석에 의해, BV2373(5 ㎍) 및 매트릭스-M™을 이용한 면역화는 가장 높은 빈도의 IFN-γ+, IL-2+, 및 TNF-α+ CD4+ T 세포를 보였다(**도 29a** 내지 **도 29c**). 이러한 경향은 또한 적어도 2 또는 3가지 타입 1 사이토카인이 동시에 생산되는 다기능성 CD4+ T 세포의 경우에도 마찬가지였다(**도 29d** 및 **도 29e**).

[0455] **실시예 4.**

[0456] **코로나바이러스 스파이크(S) 폴리펩티드 나노입자 백신의 구조적 특징분석**

[0457] 투과 전자 현미경(TEM) 및 2차원(2D) 클래스 평균화를 사용하여 BV2373의 울트라구조를 결정하였다. 음성적으로 염색된 BV2373의 고배율(67,000× 및 100,000×) TEM 이미지는 S-단백질의 호모3량체에 해당하는 입자를 보여주었다.

[0458] 자동화 선택 프로토콜을 사용하여 2D 클래스 평균 이미지를 구축하였다(Lander G.C. et al. *J Struct Biol.* 166, 95-102 (2009); Sorzano C.O. et al., *J Struct Biol.* 148, 194-204 (2004)). 2 라운드의 호모3량체성 구조의 2D 클래스 평균화는 15 nm 길이 및 13 nm 폭을 갖는 삼각형 입자 외형을 밝혔다(**도 10, 왼쪽 위**). 최근에 밝혀진 SARS-CoV-2 스파이크 단백질(EMD ID: 21374)의 저온-EM 구조를 2D BV2373 이미지 위에 겹치면 왕관 형태의 S1(NTD 및 RBD) 및 S2 스템(stem)과 잘 맞음을 보여주었다(**도 10, 왼쪽 아래**). 또한, NTD/RBD 크라운 반대편의 3량체성 구조의 끝 부분으로부터 돌출하는 희미한 돌출부가 2D 이미지에서 명확하였다(**도 10, 오른쪽 위**). 더 큰 박스 크기를 이용한 2D 클래스 평균화는 상기 희미한 돌출부가 S-3량체 및 비결정형 구조 사이의 연결부를 형성함을 보여주었다(**도 10, 오른쪽 아래**).

[0459] 동적 광 산란(DLS)은 야생형 CoV S 단백질이 BV2365(33.4 nm) 및 BV2373(27.2 nm)의 2배 더 작은 입자 크기와 비교하여 69.53 nm의 Z-avg 입자 직경을 가짐을 보여준다. 다분산도 지수(PDI)는 BV2365 및 BV2373 입자가 야생형 스파이크-단백질(PDI = 0.46)과 비교하여 일반적으로 크기, 형상, 및 질량(PDI = 0.25-0.29)에서 균일함을 시사하였다(표 10).

표 10

[0460] **SARS-CoV-2의 3량체성 스파이크 단백질의 입자 크기 및 열안전성**

SARS-CoV-2 S 단백질	시차 주사 열량측정법(DSC)		동적 광 산란(DLS)	
	T_{max} (℃)[1]	ΔHcal (kJ/mol)	Z- avg 직경[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}: 융해 온도

[2] Z-avg: Z-average 입자 크기

[3] PDI: 다분산도 지수

[0461] 상기 S-3량체의 열적 안전성을 시차 주사 열량측정법(DSC)에 의해 결정하였다. 야생형 CoV S-단백질의 열적 전이 온도(T_{max} = 58.6℃)는 각각 T_{max} = 61.3℃ 및 60.4℃를 갖는 BV2365 및 BV2373과 유사하였다(표 10). 더 많이 중요한 것은, WT 스파이크 단백질을 펴기 위해 필요한 낮은 엔탈피(ΔHcal = 153 kJ/mol)와 비교하여 BV2365 및 BV2373 변이체를 펴기 위해 필요한 전이 엔탈피(각각 ΔHcal = 466 및 732 kJ/mol)가 3 내지 5배 증가된 것이었다. 상기 결과는 WT 스파이크 단백질의 경우와 비교하여 BV2365 및 BV2373의 개선된 열적 안전성과 일치한다(표 10).

[0462] CoV 스파이크(S) 폴리펩티드 나노입자 백신의 안전성을 동적 광 산란에 의해 평가하였다. 다양한 pH, 온도, 염 농도, 및 프로테아제를 사용하여 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드 나노입자 백신의 안정성을 자연형 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드를 함유하는 나노입자 백신과 비교하였다.

[0463] **실시예 5.**

[0464] **코로나바이러스 스파이크(S) 폴리펩티드 나노입자 백신의 안전성**

[0465] CoV 스파이크(S) 폴리펩티드 나노입자 백신의 안전성을 동적 광 산란에 의해 평가하였다. 다양한 pH, 온도, 염 농도, 및 프로테아제를 사용하여 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드 나노입자 백신의 안정성을 자연형 CoV 스파이크(S) 폴리펩티드를 함유하는 나노입자 백신과 비교하였다. 2-프롤린 치환이 없는 BV2365 및 2개의 프롤린 치환을 갖는 BV2373의 안전성을 상이한 환경 스트레스 조건 하에 hACE2 포획 ELISA를 이용해 평가하였다. 극단적 pH(pH 4 및 pH 9에서 48시간)에서, 장시간의 교반(48시간)으로, 냉동/해동(2 사이클), 및 상승된 온도(25℃ 및 37℃에서 48시간)에서 BV2373을 인큐베이션 하는 것은 hACE2 수용체 결합에 영향을 미치지 않았다(IC50 = 14.0 - 18.3 ng/㎖).

[0466] 과산화수소를 이용한 산화 조건은 BV2373에 대한 hACE2 결합을 8배 감소시켰다(IC50 = 120 ng/㎖)(**도 12a**). 2-프롤린 치환이 없는 BV2365는 다수의 조건 하에 hACE2 결합의 현저한 상실에 의해 밝혀진 것과 같이 덜 안정하였다(**도 12b**).

[0467] BV2384(서열번호 110) 및 BV2373(서열번호 87)의 안전성을 비교하였다. BV2384는 GSAS(서열번호 97)의 퓨린 절단 부위 서열을 갖지만, BV2373는 QQAQ(서열번호 7)의 퓨린 절단 부위를 갖는다. SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯(Western Blot)에 의해 실증되는 것과 같이, BV2384는 BV2373과 비교하여 대규모의 분해를 보였다(**도 32**). 아울러, 주사 농도계 및 회수 데이터는 BV2373(**도 34**)과 비교하여 전장 CoV S 단백질 BV2384의 더 낮은 순도, 및 회수의 예상하지 못한 손실을 실증한다(**도 33**).

[0468] **실시예 6**

[0469] **시노몰구스 마카크에서의 면역 반응**

[0470] 본 발명자들은 SARS-CoV-2 감염의 시노몰구스 마카크 모델에서 BV2373에 의해 유도되는 면역 반응을 평가하였다. 그룹 1-6을 표 11에 나타낸 것과 같이 처리하였다.

표 11

[0471] **시노몰구스 마카크 연구의 그룹 1-6**

그룹 (N=4)	BV2373 용량	매트릭스-M™ 용량	면역화 (일)	채혈 (일)	챌린지 (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

[0472] BV2373을 포함하는 백신의 투여는 중화 항체(**도 35b**)를 포함하는 항-CoV-S 항체(**도 35a**)의 유도를 야기하였다. 항-CoV-S 항체는 1 용량(**도 38a**) 또는 2 용량(**도 38b**)의 BV2373의 투여 후에 유도되었다. BV2373을 포함하는 백신의 투여는 또한 hACE2에 대한 CoV S 단백질의 결합을 차단하는 항체의 생산을 야기하였다(**도 38c** 및 **도 38d**). BV2373의 투여 후 시노몰구스 마카크에서 항-CoV S 폴리펩티드 IgG 역가 및 hACE2 억제 역가 사이에 현저한 연관성이 있었다(**도 38e**). 중화 항체의 생산을 유도하는 BV2373의 능력을 세포변성 효과(CPE)(**도 40a**) **및** 플라크 감소 중화 테스트(PRNT)(**도 40b**)에 의해 평가하였다. 상기 데이터는 표 11의 백신 제형물이 대조군과 대조적으로 SARS-CoV-2 중화 역가를 생성하였음을 밝혔다.

[0473] 시노몰구스 마카크에서 BV2373을 포함하는 백신이 항-CoV-S 항체 및 CoV S 단백질에 대한 hACE2의 결합을 차단하는 항체를 유도하는 능력을 인간 회복기 혈청과 비교하였다. 상기 데이터는 BV2373 백신 제형물이 인간 회복기 혈청과 비교할 때 더 뛰어난 항-CoV S 폴리펩티드 및 hACE2 억제 역가를 유도하였음을 밝혔다(**도 39**).

[0474] 상기 BV2373 백신 제형물은 또한 SARS-CoV-2 바이러스 복제의 감소를 유발하였다(**도 36a** 및 **도 36b**). 바이러스 RNA(**도 36a**, 존재하는 총 RNA에 해당함) 및 바이러스 서브-게놈 RNA(sgRNA)(**도 36b**, 복제하는 바이러스에 해당함) 레벨을 감염성 바이러스로 챌린지-후 2일 및 4일(d2pi 및 d4pi)에 기관지폐포 세척(BAL)에서 평가하였다. 대부분의 대상체는 바이러스 RNA를 보이지 않았다. 2일에 소량의 RNA가 일부 대상체에서 측정되었다. 4일까지, 2.5 ㎍의 가장 낮은 용량에서 2마리 대상체의 경우를 제외하고는 RNA가 측정되지 않았다. 다시 가장 낮은 용량에서 1마리 대상체의 경우를 제외하고는 2일 또는 4일에 서브-게놈 RNA가 검출되지 않았다. 바이러스 RNA(**도 37a**) 및 바이러스 서브-게놈(sg) RNA(**도 37b**)를 감염-후 2일 및 4일(d2pi 및 d4pi)에 코 면봉에 의해 평가하였다. 대부분의 대상체는 바이러스 RNA를 보이지 않았다. 2일 및 4일에 소량의 RNA가 일부 대상체에서 측정되었다. 서브-게놈 RNA는 2일 또는 4일에 검출되지 않았다. 대상체를 0일에, 그리고 2 용량의 그룹에서는 0일 및 21일에 면역시켰다. 상기 데이터는 백신이 코의 총 바이러스 RNA를 100-1000배까지, 그리고 sgRNA를 검출 불가능한 레벨로 감소시킴을 보여주고, 백신에 대한 면역 반응이 바이러스 복제를 차단하고 바이러스 확산을 방지할 것임을 확인한다.

[0475] **실시예 7**

[0476] **인간에서 CoV S 폴리펩티드 나노입자 백신의 평가**

[0477] 본 발명자들은 18-59세 연령의 131명의 건강한 참가자에서 무작위, 관찰자-맹검, 위약-제어 임상 1상 시험에서 BV2373을 포함하는 백신의 안전성 및 효능을 평가하였다. 참가자를 21일 떨어진 2회 근육내 주사로 면역시켰다. 참가자는 매트릭스-M™이 있거나 없는 BV2373(n=106) 또는 위약(n=25)을 받았다. 그룹 A-E는 표 12에 나타낸 것과 같이 처리하였다. **도 41**은 임상 종료점의 평가의 시간선을 보여준다.

표 12

[0478] **1상 인간 연구의 그룹 A-E**

그룹 (N=25)	참가자		0일		21일 (+ 5일)	
	무작위	감시 (Sentinel)	BV2373 용량	매트릭스-M™ 용량	BV2373 용량	매트릭스-M™ 용량
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 ㎍

[0479] 전체적인 반응원성은 약하였고, 백신화는 내성이 좋았다. 국소 반응원성은 BV2373 및 매트릭스-M™으로 처리된 환자에서 보다 빈번하였다(**도 42a 및 도 42b**).

[0480] 매트릭스-M™이 있거나 없는 BV2373의 면역원성을 평가하였다. 백신화 후 21일에, 항-CoV-S 항체는 모든 백신 요법의 경우에 검출되었다(**도 43a**). 매트릭스-M™을 포함하는 백신 요법에서 기하 평균 배수 상승(GMFR)은 어주번트가 없는 BV2373에 의해 유도된 것을 상회하였다. 제2 백신화 후 7일(28일)에, 항-CoV-S 역가는 제1 백신화에서 보인 반응보다 추가로 8배 증가하였고, 14일(35일) 이내에 반응은 다시 2배 이상이 되어서, BV2373 단독으

로 관찰된 경우보다 대략 100배 이상의 GMFR을 달성하였다. BV2373/매트릭스-M™을 이용한 단일 백신화는 무증상(노출됨) COVID-19 환자에서의 경우와 유사한 항-CoV-S 역가 레벨을 달성하였다. 제2 백신화는 외래환자-처리된 COVID-19 환자로부터의 회복기 혈청을 6배까지 상회하는 GMEU 레벨을 달성하였고, COVID-19로 입원한 환자로부터의 회복기 혈청과 유사한 레벨을 달성하였으며, 전체적인 회복기 혈청 항-CoV-S 항체를 거의 6배까지 상회하였다. 2-용량의 5-㎍ 및 25-㎍의 BV2373/매트릭스-M™ 요법에서의 반응은 유사하였다. 이것은 용량을 절약할 수 있는 어주번트(매트릭스-M™)의 능력을 강조한다.

[0481] BV2373로 처리된 모든 그룹에서 중화 항체가 유도되었다(**도 43b**). BV2373 및 매트릭스-M™ 요법으로 처리된 그룹은 BV2373 단독으로 처리된 그룹보다 대략 5배의 GMFR을 나타내었다(**도 43b**). 어주번트를 이용한 제2 백신화는 중화 항체 역가에 대한 고도의 효과를 가졌고, 어주번트가 없는 단일 백신화보다 >100배 증가를 유도하였다. 회복기 혈청과 비교할 때, BV2373/매트릭스-M™을 이용한 제2 백신화는 COVID-19로 입원한 환자의 경우에 걸치는 레벨인, 외래환자-처리된 COVID-19 환자보다 4배 큰 GMT 레벨을 달성하였고, 전체적인 회복기 혈청 GMT를 4배까지 상회하였다.

[0482] 의학적 돌봄을 필요로 하는 임상 징후를 갖는 COVID-19 환자로부터 입수된 회복기 혈청은 질병 증세에 따라 증가하는 비례적인 항-CoV-S IgG 및 중화 역가를 실증하였다(**도 43a** 및 **도 43b**).

[0483] 회복기 혈청으로 처리된 환자에서 관찰되는 것과 유사하게(r=0.958)(**도 44a**), BV2373 및 매트릭스-M™으로 처리된 환자에서 중화 항체 역가 및 항-CoV-S IgG 사이에 강한 연관성이 관찰되었다(r=0.9466, **도 44c**). 상기 연관성은 어주번트 없이 BV2373로 투여된 대상체에서는 관찰되지 않았다(r=0.7616)(**도 44b**). 5 ㎍ 및 25 ㎍의 BV2373/매트릭스-M™ 그룹(표 12의 그룹 C-E)은 모두 유사한 크기의 2-용량 반응을 실증하였고, 모든 참가자는 2-용량 요법이 이용될 때 에세이 측정법을 이용하여 혈청전환되었다.

[0484] 16명의 참가자(그룹 A부터 D까지 각각 4명의 참가자)에서의 T-세포 반응은 BV2373/매트릭스-M™ 요법이 BV2373로 자극시에 IFN-γ, IL-2, 및 TNF-α 생산의 측면에서 항원-특이적 다중기능성 CD4+ T-세포 반응을 유도하였음을 보였다. Th1 사이토카인의 생산을 향한 강한 성향이 있었다(**도 45a** 내지 **도 45d**).

[0485] **실시예 8**

[0486] **차세대 CoV S 폴리펩티드 나노입자의 발현, 정제, 및 평가**

[0487] 서열번호 186; 서열번호 188, 서열번호 190, 서열번호 192, 및 서열번호 195의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드를 바큘로바이러스 발현 시스템에서 발현시켰고, 코로나바이러스 스파이크(S) 폴리펩티드를 발현하는 재조합 플라크를 선택 및 확인하였다. 상기 단백질을 포함하는 나노입자를 실시예 1에 기술된 방법에 따라 정제하였다. 서열번호 186; 서열번호 188; 서열번호 190; 및 서열번호 192의 서열을 갖는 정제된 SARS-CoV-2 S 단백질의 Tris-아세테이트 겔은 **도 75a**에 나타나 있다. 정제된 BV2373(서열번호 87)의 Tris-아세테이트 겔은 **도 75b**에 나타나 있다. **도 76a** 내지 **도 76e**는 동적 광 산란(DLS)에 의해 결정될 때 서열번호 188(**도 76a**); 서열번호 186(**도 76b**); 서열번호 190(**도 76c**); 서열번호 192(**도 76d**), 및 서열번호 87(**도 76e**)의 아미노산 서열을 갖는 단백질의 입자 크기 분포를 보여준다. DLS 파라미터는 아래의 표 13에서 발견된다.

표 13

[0488]

서열번호	Z-Avg (크기, d.nm)	PDI	농도 (mg/mℓ)
188	40.42±1.067	0.2103±0.0068	0.1
186	39.01±0.684	0.2158±0.00819	0.1
190	33.0±0.421	0.225±0.00287	0.1
192	36.84±0.6845	0.258±0.008192	0.1
87	32±1.0	0.17±0.04	0.1

[0489] **도 77a** 내지 **도 77e**는 서열번호 188(**도 77a**); 서열번호 186(**도 77b**); 서열번호 190(**도 77c**); 서열번호 192(**도 77d**), 및 서열번호 87(**도 77e**)의 아미노산 서열을 갖는 SARS-CoV-2 S 단백질의 HPLC-SEC 자취를 보여준다. 각각의 단백질의 농도 및 각각의 단백질에 대한 머무름 시간은 아래의 표 14에 나타나 있다.

표 14

[0490]

서열번호	단백질의 농도 (mg/mℓ)	머무름 시간 (분)
188	0.492	8.281
186	1.0	8.181
190	0.99	8.040
192	1.04	8.054
87	0.484	7.913

[0491] **도 78a** 내지 **도 78e**는 서열번호 188(**도 78a**); 서열번호 186(**도 78b**); 서열번호 190(**도 78c**); 서열번호 192(**도 78d**), 및 서열번호 87(**도 78e**)의 아미노산 서열을 갖는 SARS-CoV-2 S 단백질의 결합 동역학을 보여준다.

[0492] **도 79a** 내지 **도 79e**는 서열번호 188(**도 79a**); 서열번호 186(**도 79b**); 서열번호 190(**도 79c**); 서열번호 192(**도 79d**), 및 서열번호 87(**도 79e**)의 아미노산 서열을 갖는 SARS-CoV-2 S 단백질의 hACE2에 대한 결합을 보여준다. **도 80a 내지 도 80e는** 서열번호 188(**도 80a**); 서열번호 186(**도 80b**); 서열번호 190(**도 80c**); 서열번호 192(**도 80d**), 및 서열번호 87(**도 80e**)의 아미노산 서열을 갖는 SARS-CoV-2 S 단백질의 열적 안전성을 보여준다.

표 15

[0493]

서열번호	실험에 사용된 단백질 농도 (mg/mℓ)	T_{m1}	T_{m2}	ΔH1	ΔH2
188	0.95	59.89	63.75	352.3	886.0
186	1.0	55.67	62.07	180.	950.4
190	0.99	59.46	64.10	517.8	1525
192	1.04	58.87℃	63.28℃	106.4	1367.0
87	0.83	56.75	63.08	517.0	1330.0

[0494] 각각의 단백질의 특징의 요약은 아래의 표 16에서 발견된다.

표 16

[0495]

변이체	순도 %	수율 (mg/L)	수율 mg rS/ (g WCW)	hACE2 결합 동역학 (k_a) (1/Ms)	hACE2 결합 ELISA EC50: ng/mℓ	DSC Tm-1(℃) ΔH_1(kJ/mol)	DLS Z-평균 (nm) PDI
서열번호 188	97.9	6.01	0.34	4.33E+04	8.28ng/mℓ	Tm_2 63.28℃ ΔH_2 1332.0	53.19±0.2679 0.2355±0.01124
서열번호 195	97.6	4.1	0.264	2.70E+04	16.7ng/mℓ	Tm_2 62.65 ΔH_2 1172	40.54±0.8775 0.2501±0.000906
서열번호 186	93.3	4.6	0.295	1.62E+04	29.2ng/mℓ	Tm_2 62.07 ΔH_2 950.4	39.01±0.6845 0.2158±0.008192
서열번호 190	97.8	6.32	0.322	1.35E+04	14.1ng/mℓ	Tm_2 64.10 ΔH_2 1525	33.3±0.303 0.207±0.0121
서열번호 192	98.92	5.7	0.359	3.76E+04	5.78ng/mℓ	Tm_2 63.28 ΔH_2 1367	36.84±0.6845 0.258±0.008192

[0496] 서열번호 112, 서열번호 113, 서열번호 114, 서열번호 115, 및 서열번호 175의 아미노산 서열을 갖는 SARS-CoV-2 S 폴리펩티드를 바큘로바이러스 발현 시스템에서 발현시키고, 코로나바이러스 스파이크(S) 폴리펩티드를 발현하는 재조합 플라크를 선택 및 확인한다. 서열번호 112, 서열번호 113, 서열번호 114, 서열번호 115, 및 서열번호 175의 서열을 갖는 SARS-CoV-2 S 폴리펩티드를 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 N-말단 신호 펩티드를 이

용해 발현시킨다.

[0497] 서열번호 112의 서열을 갖는 SARS-CoV-2 S 폴리펩티드는 티로신으로의 Asn-488의 돌연변이, 프롤린으로의 Lys-973 및 Val-974의 돌연변이, 및 QQAQ(서열번호 7)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 포함한다.

[0498] 서열번호 113의 서열을 갖는 SARS-CoV-2 S 폴리펩티드는 글리신으로의 Asp-601의 돌연변이, 티로신으로의 Asn-488의 돌연변이, 프롤린으로의 Lys-973 및 Val-974의 돌연변이, 및 QQAQ(서열번호 7)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 포함한다.

[0499] 서열번호 114의 서열을 갖는 SARS-CoV-2 S 폴리펩티드는 아미노산 56, 57, 및 131의 결실, 티로신으로의 Asn-488의 돌연변이, 아스파테이트로의 Ala-557의 돌연변이, 글리신으로의 Asp-601의 돌연변이, 히스티딘으로의 Pro-668의 돌연변이, 이소루이신으로의 Thr-703의 돌연변이, 알라닌으로의 Ser-969의 돌연변이, 히스티딘으로의 Asp-1105의 돌연변이, 프롤린으로의 Lys-973 및 Val-974의 돌연변이, 및 QQAQ(서열번호 7)의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 포함한다.

[0500] 서열번호 115의 서열을 갖는 SARS-CoV-2 S 폴리펩티드는 티로신으로의 Asn-488의 돌연변이, 알라닌으로의 Asp-67의 돌연변이, 히스티딘으로의 Leu-229의 돌연변이, 글리신으로의 Asp-202의 돌연변이, 아스파라긴으로의 Lys-404의 돌연변이, 리신으로의 Glu-471의 돌연변이, 발린으로의 Ala-688의 돌연변이, 글리신으로의 Asp-601의 돌연변이, 프롤린으로의 Lys-973 및 Val-974의 돌연변이, 및 QQAQ의 아미노산 서열을 갖는 불활성화된 퓨린 절단 부위를 포함한다.

[0501] SARS-CoV-2 S 폴리펩티드 나노입자는 실시예 1에서와 같이 생성한다. 전술한 SARS-CoV-2 S 폴리펩티드의 안전성 및 면역원성은 실시예 2 내지 실시예 7에서와 같이 평가한다.

[0502] **실시예 9**

[0503] **BV2373 및 사포닌 어주번트는 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주에 대한 보호성 면역 반응을 유도한다.**

[0504] **목적**: 본 발명자들은 영국의 33 장소에 걸쳐서 21일 간격으로 5-㎍ 용량의 BV2373 및 사포닌 어주번트(분획 A 및 분획 C 이스콤 매트릭스, 본 실시예에서 매트릭스-M™으로도 나타냄) 또는 위약(1:1)을 2회 근육내 받은 18-84세 연령의 성인에서 무작위, 관찰자-맹검, 위약-제어 3상 시험을 수행하였다. 1차적인 효능 종료점은 제2 백신화 후 7일에 발병된 바이러스학적으로 확인된 경증, 중간, 또는 중증 COVID-19였다.

[0505] 총 15,187명의 참가자를 무작위로 나누었으며, 이들 중 7569명의 참가자는 BV2373 및 매트릭스-M™을 받았고, 및 7570명은 위약을 받았다; 27.8%는 65세 이상이었고, 4%는 SARS-CoV-2 감염의 기준선 혈청학적 증거를 가졌다. BV2373 및 매트릭스-M™ 수용자 중에서 10 증례의 COVID-19 및 위약 수용자 중에서 96 증례가 제2 백신화 후 적어도 7일에 징후가 발병하였다; BV2373 및 매트릭스-M™은 COVID-19를 예방함에 있어서 89.7%(95% 신뢰구간, 80.2 내지 94.6) 효과적이었다. 5 증례의 중증 COVID-19가 있었으며, 이들 모두는 위약 그룹에서 보고되었다. 사후 분석은 원형(prototype) SARS-CoV-2 바이러스주 및 B.1.1.7 변이체에 대해 각각 96.4%(73.8 내지 99.5) 및 86.3%(71.3 내지 93.5) 효능을 밝혔다. 상기 원형 SARS-CoV-2 바이러스주는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 단백질을 포함한다. 상기 B.1.1.7 변이체는 아미노산 56, 57, 및 131의 결실 및 N488Y, A557D, D601G, P668H, T703I, S969A, 및 D1105H의 돌연변이를 갖는 CoV S 단백질을 포함하며, 여기서 상기 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 백신 효능은 동반질환(comorbidity)을 갖는 참가자 및 ≥65세 이상 연령을 포함하여 하위그룹에 걸쳐서 유사하였다. 반응원성은 일반적으로 약하고 일시적이었으며, BV2373 및 매트릭스-M™이 투여된 그룹에서 보다 빈번하게 일어났다. 심각한 부작용 사건의 발병은 2가지 그룹에서 낮고 유사하였다. BV2373 및 매트릭스-M™의 2-용량 요법은 원형 및 B.1.1.7 변이체의 블렌드에 대해 89.7% 효능을 부여하였고, 다른 공인된 COVID-19 백신의 경우와 유사한 안전성 프로필을 가졌다.

[0506] **방법**: 시험 디자인 및 참가자: 본 발명자들은 21일 간격으로 근육내로 2회 투여된 5-㎍ 용량의 BV2373 및 매트릭스-M™ 또는 위약의 안전성 및 효능을 평가하였다. 상기 3상 시험은 영국의 33 곳의 모집 장소에서 수행하였다. 적격인 참가자는 건강하거나 인간 면역결핍 바이러스 및 심장 및 호흡기 질환을 비제한적으로 포함하는 안정한 만성 의학적 증상을 갖는 18세 내지 81세(포함) 연령의 남성 및 비-임신 여성이었다. 스크리닝시 평가된 건강 상태는 의료 이력, 활력 징후, 및 물리적 조사에 기반하였다.

[0507] 핵심 포함 기준은 문서화된 COVID-19의 이력, 면역억제 치료법의 처리, 또는 면역결핍 증상의 진단을 포함하였

다.

[0508] 참가자는 블록 무작위화를 통해 1:1 비로 무작위로 할당하였고, 사전-생성된 무작위화 일정에 따라 중앙집권화된 상호 반응 기술(Interactive Response Technology) 시스템을 이용하여 21일 간격으로 2 용량의 BV2373 및 매트릭스-M™ 또는 위약(보통의 식염수)을 받았다. 무작위화는 장소 및 ≥65세의 연령에 의해 계측화하였다. 400명의 하위-연구에서, 참가자는 제1 용량과 동반하는 용량의 계절성 인프루엔자 백신을 받았다. 이것은 관찰자-맹검 연구였다.

[0509] 각각의 백신화 후, 참가자는 임의의 급성 반응의 존재를에 대해 모니터링하기 위하여 적어도 30분 동안 연구 장소에서 관찰 하에 남아 있었다. 참가자의 하위그룹에서 각각의 용량 후 7일 동안 전자 일기를 통해 응답된(solicited) 국소 및 전신 부작용 사건을 수집하였다(응답된 부작용 사건 하위그룹). 모든 참가자는 제1 용량으로부터 제2 용량의 28일까지 응답되지 않은 부작용 사건에 대해 평가하였다; 제1 용량으로부터 제2 용량의 1년 후까지 심각한 부작용 사건, 특별한 관심이 있는 부작용 사건, 및 의료진이 검진한 부작용 사건을 평가하였다. 적어도 한 용량의 백신 또는 위약을 받은 모든 참가자에 대해 안전성 데이터가 기록되었다.

[0510] **안전성 및 효능:** 1차적 종료점은 기준선에서 혈청음성이었던 참가자에서 2차 백신화 후 적어도 7일에 발병한 바이러스학적으로 확인된 징후가 있는 경증, 중간, 또는 중증 COVID-19의 첫번째 발생에 대한 BV2373 및 매트릭스-M™의 효능이었다. 징후가 있는 COVID-19는 미국 식품의약품청(FDA) 기준에 따라 정의되었다.

[0511] 의심되는 COVID-19의 징후를 시험 전반에 걸쳐서 모니터링하였고, 적어도 10일 동안 COVID-19 전자 징후 일기(InFLUenza Patient-Reported Outcome [FLU-PRO©] 설문지)를 이용해 수집하였다. COVID-19의 의심되는 징후의 발병시, 코 및 목구멍으로부터의 호흡기 검체를 3일의 기간에 걸쳐 매일 수집하여 SARS-CoV-2 감염을 확인하였다. 바이러스학적 확인은 Thermo TaqPath™ 시스템(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)으로 중합효소 연쇄 반응(PCR) 테스트(UK DHSC laboratories)를 이용해 수행하였다.

[0512] 적어도 한 용량의 BV2373 및 매트릭스-M™ 또는 위약을 받은 모든 참가자에서 안전성을 분석하였고, 기술적으로 요약하였다. 응답된 국소 및 전신 부작용 사건을 또한 FDA 독성 등급화 기준 및 각각의 주사 후 기간에 의해 요약하였다. 응답되지 않은 부작용 사건은 선호하는 기간 및 [*Medical Dictionary for Regulatory Activities* (MedDRA), version 23.1]을 이용한 시스템 기관 분류에 의해 코드화하였고, 증세 및 연구 백신과의 상관관계에 의해 요약하였다.

[0513] 상기 시험은 1차 종료점에 대해 통계적 유의성을 달성하기 위해 예상된 사건의 총 수에 의해 디자인 및 추진되었다 - 100명의 경증, 중간, 또는 중증 Covid-19 증례의 표적. 최종 분석을 위한 100 증례의 표적 수는 70% 또는 더 높은 백신 효능에 대한 >95% 파워를 제공하도록 선택되었다. Pocock 경계 증상을 이용하여 총 예상되는 1차적 종료점의 대략 50%(50 사건)의 누적에 기반하여 효능의 단일 임시 분석을 수행하였다. 1차적 목표의 임시 및 최종 분석을 위한 주된(가설 테스트) 사건-주도 분석을 1차적 종료점에 대한 0.025의 전체적인 1-측 타입 I 오차율에서 수행하였다. 상기 1차적 종료점은 기준선에서 혈청음성이었고, 양쪽 용량의 연구 백신 또는 위약을 받았고, 1차적 종료점에 영향을 미치는 주요 프로토콜 편차가 없고, 제2 주사 후 6일 내에 징후가 있는 Covid-19의 확인된 증례를 갖지 않는 참가자에서 분석하였다(프로토콜-대로의(per-protocol) 효능 개체군). 백신 효능은 E (%) = (1 - RR) × 100으로 정의되었고, 여기서 RR = 2가지 연구 그룹(BV2373 및 매트릭스-M™ 또는 위약) 사이의 발병률의 상대적 위험성이다. 평균 질환 발병률은 1000명의 사람에서의 연간 발병률로 기록하였다. 추정된 RR 및 그 신뢰 구간(CI)은 강력한 오차 변동을 갖는 Poisson 회귀를 이용해 도출하였다. 1차적 종료점의 가설 테스트는 부재(null) 가설에 대해 수행하였다: H0: 백신 효능 ≤30%. 성공적인 기준은 통계학적으로 현저한 백신 효능을 실증하기 위하여 부재 가설의 거부를 필요로 하였다.

[0514] 2020년 9월 28일과 11월 28일 사이에, 총 16,645명의 참가자를 스크리닝하였고, 15,187명의 참가자를 무작위호 분류하였다(**도 47**). 총 15,139명의 참가자는 적어도 한 용량의 BV2373 및 매트릭스-M™(7569) 또는 위약(7570)을 받았고, 14,039명의 참가자(BV2373 및 매트릭스-M™ 그룹에서 7020명 및 위약 그룹에서 7019명)는 프로토콜-대로의 효능 개체군에 대한 기준을 충족하였다. 기준선 인구통계는 프로토콜-대로의 효능 개체군에서 BV2373 및 매트릭스-M™ 및 위약 그룹 사이에 균형이 잘 맞았으며, 여기서 48.4%는 여성이었고, 94.5%는 백인이었고, 0.4%는 흑인 또는 아프리카계 미국인이었고, 0.8%는 히스패닉 또는 라틴계였으며, 44.6%는 적어도 하나의 동반질환 증상(질환 제어 및 예방 센터[CDC]의 정의에 기반함)을 가졌다. 상기 참가자의 중앙값 연령은 56세였고, 27.9%는 ≥65세 연령이었다. 표 17은 임상 시험 참가자의 기준선 인구통계의 요약을 제공한다.

표 17

[0515] 임상 시험 참가자의 인구통계 및 기준선 특징

	BV2373 및 매트릭스-M™ n=7020	위약 n=7019	합계 N=14,039
연령, y			
중앙값	56.0	56.0	56.0
범위	18, 84	18, 84	18, 84
연령 그룹, n (%)			
18-64 y	5067 (72.2)	5062 (72.1)	10129 (72.1)
≥65 y	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 민족 그룹, n (%)			
백인	6625 (94.4)	6635 (94.5)	13260 (94.5)
흑인 또는 아프리카계 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 또는 다른 태평양 섬의 원주민	1 (<0.1)	0	1 (<0.1
다중	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)
누락	4	2	8
히스패닉 또는 라틴계	63 (0.9)	51 (0.7)	114 (0.8)
SARS-CoV-2 혈청상태, n (%)			
음성	6964 (99.2%)	6944 (98.9)	13908 (99.1)
양성	0	0	0
누락	56	75	131
BMI, kg/㎡, n (%)			
> 30.0: 비만	313 (4.5)	323 (4.6)	636 (4.5)
동반질환 상태*			
있음	3117 (44.4)	3143 (44.8)	6260 (44.6)
없음	3903 (55.6)	3876 (55.2)	7779 (55.4)

[0516] SD, 표준 편차; 신체 질량 지수(BMI)는 체중(kg)을 키(m)의 제곱으로 나눈 것으로 계산된다. 백분율은 각각의 처리 및 전체 내의 프로토콜-대로의 효능 분석 세트에 기반한다. *동반질환 대상체는 의학적 이력으로 보고된 적어도 하나의 동반질환 증상을 갖거나 30 kg/㎡ 초과의 BMI 값으로 스크리닝된 사람이다.

[0517] 응답된 부작용 사건 하위그룹은 2714명의 참가자를 포함하였다. 전체적으로, BV2373 및 매트릭스-M™ 수용자는 제1 용량(59.4% 대 20.9%) 및 제2 용량(80.2% 대 17.0%) 이후에 모두 위약 수용자보다 응답된 국소 부작용 사건의 빈도가 더 높은 것으로 보고되었다(**도 50**).

[0518] BV2373 및 매트릭스-M™ 수용자 중에서, 가장 흔하게 보고된 국소 부작용 사건은 제1 용량(54.9% 및 30.7%) 및 제2 용량(76.6% 및 51.9%) 후에 모두 주사 부위 압통(tenderness) 및 통증이었고, 대부분의 사건은 증세에서 등급 1(경증) 또는 2(중간)이고, 짧은 평균 기간(제1 용량 후 2.3 및 1.7일 및 제2 용량 후 2.8 및 2.2일)이었다. 응답된 국소 부작용 사건은 나이 많은 BV2373 및 매트릭스-M™ 수용자(≥65세)보다 더 젊은 BV2373 및 매트릭스-M™ 수용자(18 내지 64세)에서 보다 빈번하게 보고되었다.

[0519] 전체적으로, BV2373 및 매트릭스-M™ 수용자는 제1 용량(47.6% 대 37.9%) 및 제2 용량(64.6% 대 30.8%) 후에 모두 위약 수용자보다 응답된 전신 부작용 사건의 빈도가 더 높게 보고되었다(**도 50**). BV2373 및 매트릭스-M™ 수용자 중에서, 가장 흔하게 보고된 전신 부작용 사건은 제1 용량(24.5%, 22.3%, 및 20.5%) 및 제2 용량(40.7%, 41.1%, 및 41.0%) 후에 모두 두통, 근육 통증, 및 피로였고, 대부분의 사건은 증세에서 등급 1 또는 2였고, 짧

은 평균 기간(제1 용량 후 1.6, 1.5, 및 1.9일 및 제2 용량 후 1.9, 1.8, 및 1.9일)이었다. 등급 4 전신 부작용 사건은 제1 용량 후에 2명의 BV2373 및 매트릭스-M™ 참가자 및 제1 용량 후에 1명의 BV2373 및 매트릭스-M™ 참가자에서 보고되었다. 전신 부작용 사건은 나이 많은 백신 수용자보다 더 젊은 백신 수용자에서 보다 자주 보고되었고, 용량 1보다 용량 2 후에 더 자주 보고되었다. 특히, 열(온도 ≥38℃)은 각각 제1 및 제2 용량 후 BV2373 및 매트릭스-M™ 참가자의 2.3% 및 5.1%에서 보고되었고, 등급 3의 열(39-40℃)은 제1 및 제2 용량 후 0.4% 및 0.6%의 참가자에서 보고되었다; 1명의 등급 4 열(>40℃)은 각각의 용량의 백신 후에 보고되었다.

[0520] 최종 효능 분석의 데이터 컷오프일까지 적어도 한 용량의 백신 또는 위약을 받은 모든 15,139명의 참가자에 대해 응답되지 않은 부작용 사건을 평가하였다. 응답되지 않은 부작용 사건의 빈도는 위약 수용자에서보다 BV2373 및 매트릭스-M™ 수용자에서 더 높았고(25.3% 대 20.5%), 중증 부작용 사건(1.0% 대 0.8%), 심각한 부작용 사건(0.5% 대 0.5%), 의료진이 검진한 부작용 사건(3.8% 대 3.9%), 백신(0.3% 대 0.3%) 또는 연구(0.2% 대 0.2%) 중단을 유도하는 부작용 사건, 잠재적인 면역-매개 의학적 증상(<0.1 대 <0.1%), 및 COVID-19와 관련하여 특별한 관심이 있는 부작용 사건(0.1% 대 0.3%)의 빈도는 유사하였다. 연관된 한 심각한 부작용 사건은 BV2373 및 매트릭스-M™ 수용자(심근염)에서 보고되었고, 이것은 잠재적으로 면역-매개 증상으로 간주되었다; 독립적 SMC는 상기 사건이 바이러스 심근염일 가능성이 가장 높은 것으로 간주하였다. 상기 참가자는 회복되었다. 아나필락시스(anaphylaxis)의 에피소드는 없었고, 백신-연관 강화 질환의 증거도 없었다. 2명의 COVID-19-연관 사망이 보고되었으며, 1명은 단일 백신 용량을 받은 후 7일에 징후가 발병한 BV2373 및 매트릭스-M™ 그룹이었고, 2명은 위약 그룹이었다.

[0521] 프로토콜-대로의 효능 개체군의 14,039명의 참가자 중, 백신 수용자 중에서 제2 용량 후 적어도 7일에 발병한 바이러스학적으로 확인된, 징후가 있는 경증, 중간 또는 중증 COVID-19가 10 증례 있었고(1000명/연 당 6.53명; 95% CI: 3.32 내지 12.85), 위약 수용자 중에서 96 증례(1000명/연 당63.43명; 95% CI: 45.19 내지 89.03)가 있었으며, 백신 효능은 89.7%(95% CI, 80.2 내지 94.6; **도 49**)였다. 경증, 중간, 또는 중증 Covid-19를 갖는 ≥65세 연령의 10 증례 중에서, 1명은 BV2373 및 매트릭스-M™을 받았고, 9명은 위약을 받았다. 중증 COVID-19는 5명의 참가자에서 일어났고, 이들 중 BV2373 및 매트릭스-M™을 받은 사람은 없었고, 5명이 위약을 받았다. 프로토콜-대로의 백신 수용자 중에서 입원 또는 사망한 사람은 없었다. ≥65세의 참가자의 백신 효능은 88.9%(95% CI, 12.8 내지 98.6)였고, 용량 1 후 14일로부터의 효능은 83.4%(95% CI, 73.6 내지 89.5)였다(**도 49**). 상기 1차적 종료점의 사후 분석은 단리된 바이러스주가 SARS CoV-2 원형 바이러스주, SARS-CoV-2 B.1.1.7 변이체, 또는 미상인 Covid-19가 각각 29, 66, 및 11 증례 확인되었다. 미상 샘플은 PCR 테스트가 비-DHSC PCR 테스트(예컨대, 지방 병원 실험실)로 수행되었고, 변이체 결정이 수행되지 않은 샘플이었다. 원형 바이러스주에 대한 백신 효능은 96.4%(95% CI, 73.8 내지 99.4)였고, B.1.1.7 변이체에 대한 효능은 86.3%(95% CI, 71.3 내지 93.5)였다(**도 49**).

[0522] **논의**: 21일 간격으로 제공되는 BV2373 및 매트릭스-M™의 2-용량 요법은 안전하고, 원형 및 B.1.1.7 변이체 모두에 의해 유발되는 징후가 있는 COVID-19에 대해 89.7% 효과적인 것으로 밝혀졌다. 본 연구에서 누적 증례의 타이밍은 지금 영국 바깥에서 널리 순환되고 미국에서 곧 가장 우세한 바이러스주가 될 것으로 예상되는 B.1.1.7 변이체를 포함하는 상이한 바이러스주에 대한 백신 효능의 사후 평가를 허용하였다. 상기 변이체는 이전의 바이러스주보다 더 전파가능하고, 더 높은 증례 치사율과 연관되는 것으로 알려져 있으며, 효과적인 백신에 대한 필요성을 강조한다. 이것은 3상 시험에서 B.1.1.7 변이체에 대한 높은 백신 효능(86.3%)을 실증하는 첫 번째 백신이다. 상기 연구는 개별 SARS-CoV-2 바이러스주에 대한 효능을 평가하기 위한 능력은 없지만, BV2373 및 사포닌 어주번트는 시험 참가자에서 검출된 모든 바이러스주에 대한 현저한 효능을 실증하였다. 특히, 원형 바이러스주에 대해 결정된 96.4% 포인트의 추정 효능은 BNT161b2 mRNA 백신(95.0%) 및 mRNA-1273 백신(94.1%)의 경우에 상기 바이러스주에 대해 보고된 것과 유사하고, 아데노바이러스 벡터 백신에 의해 실증된 것보다 더 컸다.

[0523] 마지막으로, 상기 BV2373 및 사포닌 어주번트 조성물은 또한 B.1.351 변이체에 대한 효능을 보였다.

[0524] (입원, 집중 돌봄 승인, 및 사망을 포함하는) 중증 질환의 예방은 백신화 프로그램의 중요한 목적이고, BV2373 및 사포닌 어주번트의 2-용량 요법은 다른 허가된 Covid-19 백신에 대해 보고된 것과 유사한 매우 높은 효능을 실증하였다. 게다가, BV2373 및 사포닌 어주번트는 제1 용량 후에 다른 COVID-19 백신의 경우와 유사한 범위로 보호 레벨을 제공하였다. BV2373 및 사포닌 어주번트의 1/2 상 연구 동안에 관찰된 유리한 안전성 프로필은 본 3상 시험에서 확인되었다. 반응원성은 일반적으로 약하거나 중간이었고, 반응은 나이 많은 대상체에서 덜 흔하고 더 약하였으며, 제2 용량 후에 더 흔하였다. 주사 부위 압통 및 통증, 피로, 두통 및 근육 통증은 가능 흔하게 보고된 국소 및 전신 부작용 사건이었고, 위약보다는 백신의 경우에 더 흔하였다. 심각한 부작용 사건의 발

병은 백신 및 위약 그룹에서 유사하였고(각각 0.5%), 백신을 받은 것으로부터 기인하는 사망은 없었다.

[0525] 본 시험의 결과는 원형 SARS-CoV-2 및 SARS-CoV-2 변이체 B.1.1.7에 의해 유발되는 COVID-19가 면역화에 의해 예방될 수 있다는 추가적인 증거를 제공하고, 단백질-기반의 어주번트화 백신에 대한 첫번째 증거를 제공한다. 상기 데이터는 BV2373 및 사포닌 어주번트가 표준 냉장고 온도에 보관될 수 있고, 또한 스파이크 단백질 항원에 대한 넓은 에피토프 반응을 유도할 수 있음을 확인한다. 상기 넓은 반응은 다양한 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주에 대한 보호 효능을 제공한다.

[0526] **실시예 10**

[0527] **BV2438 및 사포닌 어주번트는 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주에 대한 보호성 면역 반응을 유도한다.**

[0528] **목적**: 사포닌 어주번트와 조합한 재조합 CoV 스파이크(rS) 단백질 BV2438(서열번호 132), BV2373(서열번호 87), 또는 이들 모두를 함유하는 조성물의 면역원성 및 생체내 보호를 평가하였다. 상기 사포닌 어주번트는 2 종의 이스콤 입자를 함유하며, 여기서 제1 이스콤 입자는 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A는 포함하지만 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 포함하지 않는다; 제2 이스콤 입자는 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 포함하지만 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A는 포함하지 않는다. 상기 어주번트에서 분획 A 및 분획 C는 각각 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량의 합의 85% 및 15 중량%를 차지한다.

[0529] SARS-CoV-2/WA1, SARS-CoV-2/B.1.1.7 및 SARS-CoV-2/B.1.351 바이러스주에 대한 BV2438 및 BV2373 면역화 요법 단독 또는 전술한 사포닌 어주번트와 조합한 효능을 평가하였다. 상기 SARS-CoV-2/WA1 바이러스주는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 폴리펩티드를 갖는다. 상기 SARS-CoV-2/B.1.1.7 바이러스주는 아미노산 69, 70, 및 144의 결실 및 N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, 및 D1118H의 돌연변이를 포함하는 CoV S 폴리펩티드를 가지며, 여기서 상기 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다. 상기 SARS-CoV-2/B.1.351 바이러스주는 D80A, L242H, R246I, A701V, N501Y, K417N, E484K, 및 D614G의 돌연변이를 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 CoV S 폴리펩티드를 가지며, 여기서 상기 CoV S 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형 SARS-CoV-2 S 폴리펩티드에 관해 번호가 지정된다.

[0530] **방법**:

[0531] *세포 및 바이러스:* 바이러스 및 세포는 이전에 기술된 것과 같이 처리하였다(18). 간략하게, Vero E6 세포(ATCC# CRL 1586)를 10% (v/v) 소 태아 혈청(Gibco), 1% (v/v) 페니실린/스트렙토마이신(Gemini Bio-제품) 및 1% (v/v) L-글루타민(2 mM 최종 농도, Gibco)(Vero 배지)으로 보충된 DMEM(Quality Biological)에서 배양하였다. 세포를 37℃ 및 5% CO_2에서 유지하였다. SARS-CoV-2/WA1은 CDC(BEI #NR-52281)에 의해 제공되었다. SARS-CoV-2/B.1.17 및 SARS-CoV-2/B.1.351은 존스 홉킨스 대학의 앤디 페코츠(Andy Pekosz) 박사에 의해 호의적으로 제공되었다. 양쪽 바이러스에 대한 스톡(stock)은 CPE가 가시적으로 되기 시작할 때 2일 동안 Vero E6 세포에 감염시킴으로써 제조하였다. 배지를 수집하고, 원심분리에 의해 투명하게 한 후, -80℃에 보관하기 위해 분취하였다. 이전에 기술된 것과 같이 Vero E6 세포를 이용한 플라크 에세이에 의해 스톡의 역가를 결정하였다.

[0532] *SARS-CoV-2 단백질 발현:* SARS-CoV-2 구조체(construct)는 전장 S 당단백질 유전자 서열(GenBank MN908947 뉴클레오티드 21563-25384)로부터 합성적으로 생산하였다. 스포도프테라 프루기페르다(Sf9) 세포에서 발현하기 위해 전장 S-유전자를 코돈 최적화하였고, GenScript(Piscataway, NJ, USA)에 의해 합성적으로 생산하였다. QuikChange Lightning 위치-지정 돌연변이유발 키트(Agilent)를 사용하여 2가지 스파이크 단백질 변이체를 생산하였다: 프로테아제 저항성이 되도록 퓨린 절단 부위(682-RRAR-685)를 682-QQAQ-685로 돌연변이시켰고, 위치 K986P 및 V987P에서 2개의 프롤린 치환(2P)을 도입하여 이중 돌연변이체 BV2373을 생산하였다. B.1.351 변이체에 기반한 재조합 스파이크 구조체를 생성하기 위하여, 다음의 점 돌연변이를 또한 도입하였다: D60A, D215G, L242H, K417N, E484K, N501Y, D614G, 및 A701V. 전장 S-유전자를 Autographa 캘리포니아 폴리헤드론 프로모터의 전사 제어 하에 pFastBac 바큘로바이러스 전달 벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA) 내의 BamHI - HindIII 부위 사이에 클로닝하였다. 재조합 바큘로바이러스 구조체를 플라크 정제하였고, 마스터 시드 스톡을 제조하였고, 작업(working) 바이러스 스톡을 생산하기 위해 사용하였다. 상기 바큘로바이러스 마스터 및 작업 스톡 역가는 신속 역가 키트(Clontech, Mountain View, CA)를 이용해 결정하였다. 세포 당 ≤0.01 플라크 형성 단위(pfu)의 감염의 다중도(MOI)로 Sf9 세포를 감염시킴으로써 재조합 바큘로바이러스 스톡을 제조하였다.

[0533] 발현 및 정제: SARS-CoV-2 S 단백질은 이전에 기술된 것과 같이 Sf9 세포에서 생산하였다. 간략하게, 세포를 혈

청-부재 배지에서 확장시켰고, 재조합 바큘로바이러스로 감염시켰다. 세포를 27±2℃에서 배양하였고, 감염-후 68-72시간에 원심분리(4000×g에서 15분 동안)에 의해 수확하였다. 세포 펠렛(pellet)을 25 mM Tris HCl(pH 8.0), 50 mM NaCl 및 0.5-1.0% (v/v) 폴리옥시에틸렌 노닐페놀(NP-9, TERGITOL®) 류펩틴(leupeptin)을 갖는 NP-9에 현탁시켰다. S-단백질을 NP-9 세제를 함유하는 Tris 버퍼를 이용해 원형질 막으로부터 추출하였고, 10,000×g에서 30분 동안 원심분리함으로써 투명하게 하였다. S-단백질을 TMAE 음이온 교환 및 렌틸 렉틴 친화성 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 중공 섬유 접선 유동 여과를 사용하여 25 mM 인산나트륨(pH 7.2), 300 mM NaCl, 0.02% (v/v) 폴리소르베이트 80(PS 80)에서 100-150 ㎍/㎖로 정제된 스파이크 단백질을 제형화하였다. 정제된 S-단백질을 Gel-Code Blue 시약(Pierce, Rockford, IL)으로 염색된 4-12% 구배의 SDS-PAGE에 의해 평가하였고, OneDscan 시스템(BD Biosciences, Rockville, MD)을 이용한 주사 농도계에 의해 순도를 결정하였다.

[0534] *시차 주사 열량측정법:* 샘플(각각 BV2426 Lot 01Feb21 및 BV2373 Lot 15Dec20; rS-B.1.351BV2438 및 rS-WU1BV2373) 및 해당 버퍼를 분 당 1℃로 4℃에서 120℃로 가열하였고, 차등 열 용량 변화를 NanoDSC(TA Instruments, New Castle, DE)로 측정하였다. 별도의 버퍼 스캔을 수행해 샘플 스캔으로부터 뺀 기준선을 입수하여 기준선-교정 프로필을 생성하였다. 피크 정점이 위치하는 온도는 전이 온도(Tmax)이고, 피크 아래 면적은 전이 엔탈피(ΔHcal)를 제공한다.

[0535] *투과 전자 현미경 및 2D 클래스 평균화:* FEI Eagle 4k × 4k CCD 카메라가 장착되고 120 keV에서 구동되는 FEI Tecani T12 전자 현미경으로 NanoImaging Services(San Diego, CA)에 의해 전자 현미경사진을 수행하였다. SARS-CoV-2 S 단백질을 제형물 버퍼에서 2.5 ㎍/㎖로 희석하였다. 샘플(3 ㎕)을 니트로셀룰로오스-지원 400-메쉬 구리 격자에 적용하였고, 우라닐 포맷으로 염색하였다. 각각의 격자의 이미지를 다수의 규모로 획득하여 샘플의 전체적인 분포를 평가하였다. 150,000×(X nm/픽셀) 및 92,000×(0.16 nm/픽셀)의 명목 배율에서 고배율 이미지를 획득하였다. -2.0 ㎛ 내지 -1.5 ㎛의 명목 디포커스(110,000×) 및 ~25 e/Å^{2}의 전자 용량에서 이미지를 획득하였다.

[0536] 클래스 평균화를 위하여, 이전에 기술된 것과 같이 92,000× 고배율 이미지로부터 입자를 확인하고, 이어서 정렬 및 분류하였다.

[0537] 생물발광 이미징(BLI)에 의한 hACE2 수용체에 대한 SARS-CoV-2 S 결합의 동역학: Octet QK384 시스템(Pall Forte Bio, Fremont, CA)을 이용하는 바이오-층 간섭계법(BLI)에 의해 S-단백질 수용체 결합 동역학을 결정하였다. His-태그된 인간 ACE2(2 ㎍/㎖)를 니켈-충전된 Ni-NTA 바이오센서 끝 부분에 고정하였다. 기준선 후, SARS-CoV-2 rS 단백질 용액을 300 nM 내지 4.7 nM 범위에 걸친 동역학 버퍼에서 2배 연속적으로 희석하였고, 600초 동안 회합하게 둔 후, 부가적으로 600-900초 동안 해리시켰다. 1:1 글로벌 커브 핏에 의해 Octet 소프트웨어 HT 10.0을 이용해 데이터를 분석하였다.

[0538] 마우스 연구 디자인: 암컷 BALB/c 마우스(7-9주령, 17-22 그램, 군 당 N = 20)를 14일 간격으로 떨어진(연구 0일 및 14일) 2 용량의 rS-WU1BV2373, rS-B.1.351BV2438로 5 ㎍ 사포닌-기반 매트릭스-M™ 어주번트(Novavax, AB, Uppsala, SE)와 함께 단독으로 또는 조합하여, 또는 이질적(heterologous) 프라임/부스트로서 근육내(IM) 주사에 의해 면역시켰다. 위약 그룹은 음성 대조군으로서 백신 제형물 버퍼로 주사하였다. -1, 14, 21, 및 32일에 분석을 위한 혈청을 수집하였다. 백신화 및 대조군 동물을 연구 46일에 SARS-CoV-2로 비강내로 챌린지하였다.

[0539] (a) 매트릭스-M사포닌 어주번트에 의해 매개되는 세포성 반응을 평가하기 위하여, 암컷 BALB/c 마우스(군 당 N = 8)의 그룹을 상기 기술된 것과 동일한 요법으로 21일 간격으로 떨어져서 IM 면역시켰다. 제2 면역화 후 7일(연구 28일)에 비장을 수집하였다. 비-백신화 그룹(N = 5)은 대조군으로 작용하였다.

[0540] *개코원숭이 연구 디자인:* 9마리 성체 개코원숭이(연구 시작시 10-16세 연령)를 2-3마리/그룹의 4개 그룹으로 무작위로 나누었고, 50 ㎍의 매트릭스-M사포닌 어주번트와 함께 1, 5, 또는 25 ㎍의 rS에서 rS-WU1BV2373로 IM 주사에 의해 면역시켰다. 별도의 그룹을 어주번트 없이 25 ㎍의 rS로 면역시켰다. 본 1차 면역화 시리즈에서 동물을 21일 간격으로 떨어진 2 용량으로 면역시켰다. 1차 면역화 시리즈 후 면역원성 결과는 이전에 기술되어 있다(15). 대략 1년 후(45주), 모든 동물을 50 ㎍ 매트릭스-M사포닌 어주번트와 함께 3 ㎍ 용량의 rS-B.1.351BV2438로 1회 또는 2회 부스트하였다. 부스트 전후에 혈청 및 PBMC를 수집하여 항체- 및 세포-매개성 면역 반응을 측정하였다.

[0541] *마우스에서 SARS-CoV-2 챌린지:* 포스페이트 버퍼화 식염수(PBS)에 희석된 자일라진(0.38 mg/마우스) 및 케타민

(1.3 mg/마우스)의 혼합물 50 ㎕를 복강내 주사함으로써 마우스를 마취시켰다. 마우스를 50 ㎕ 중의 SARS-CoV-2의 7×10^{4} pfu의 B.1.117 또는 1×10^{5} pfu의 B.1.351 바이러스주로 비강내 접종하였다. 챌린지된 마우스를 감염일에, 그리고 감염 후 4일 동안 매일 무게를 재었다. 감염 후 2일 및 4일에, 각각의 백신화 그룹 및 대조군으로부터 5마리 마우스를 희생시켰고, 폐를 수확한 후, 플라크 에세이에 의한 바이러스 역가 및 qRT-PCR에 의한 바이러스 RNA 레벨을 결정하였다.

[0542] *SARS-CoV-2 플라크 에세이:* 수확된 폐를 1.0 ㎜ 유리 비드(Sigma Aldrich) 및 비드파쇄기(Omini International Inc.)를 이용해 PBS(Quality Biological Inc) 중에 균질화함으로써 SARS-CoV-2 폐 역가를 정량하였다. 균질화물을 거의 가득 찬 Vero E6 배양물에 첨가하였고, 6-점 희석 곡선을 이용해 플라크 형성 단위(pfu)를 계수함으로써 SARS-CoV-2 바이러스의 역가를 결정하였다.

[0543] *ELISA에 의한 항-SARS-CoV-2 스파이크 IgG:* ELISA를 사용하여 항-SARS-CoV-2 S IgG 역가를 결정하였다. 간략하게, 96 웰 미세적정 플레이트(ThermoFischer Scientific, Rochester, NY, USA)를 1.0 ㎍/㎖의 SARS-CoV-2 스파이크 단백질로 코팅하였다. 플레이트를 PBS-T로 세척하였고, TBS 스타트블록 차단 버퍼(ThermoFisher, Scientific)로 차단하였다. 마우스, 개코원숭이 또는 인간 혈청 샘플을 연속적으로 희석하였고(10^{-2} 내지 10^{-8}), 차단된 플레이트에 첨가한 후, 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 플레이트를 PBS-T로 세척하였고, 및 HRP-접합된 염소 항-마우스 IgG 또는 염소 항-인간 IgG(Southern Biotech, Birmingham, AL, USA)를 1시간 동안 첨가하였다. 플레이트를 PBS-T로 세척하였고, 및 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 퍼옥시다아제 기질(TMB, TO440-IL, Sigma, St Louis, MO, USA)을 첨가하였다. TMB 중단 용액(ScyTek Laboratories, Inc. Logan, UT)으로 반응을 중단시켰다. SpectraMax Plus 플레이트 판독기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 OD 450 nm에서 플레이트를 판독하였고, SoftMax 소프트웨어로 데이터를 분석하였다. SoftMax Pro 6.5.1 GxP 소프트웨어를 이용한 4-파라미터 핏팅에 의해 EC50 값을 계산하였다. 개별 동물의 항-SARS-CoV-2 S IgG 역가 및 그룹 기하 평균 역가(GMT) 및 95% 신뢰 구간(±95% CI)을 GraphPad Prism 7.05 소프트웨어로 플롯팅하였다.

[0544] *hACE2 수용체 차단 항체:* 인간 ACE2 수용체 차단 항체를 ELISA에 의해 결정하였다. 96-웰 플레이트를 1.0 ㎍/㎖의 SARS-CoV-2 S 단백질로 4℃에서 밤새 코팅하였다. PBS-T로 세척하고 StartingBlock(TBS) 차단 버퍼(ThermoFisher Scientific)로 차단한 후, 면역화된 마우스, 개코원숭이 또는 인간의 그룹으로부터 연속적으로 희석된 혈청을 코팅된 웰에 첨가하였고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 30 ng/㎖의 히스티딘-태그된 hACE2(Sino Biologics, Beijing, CHN)를 실온에서 1시간 동안 웰에 첨가하였다. 세척 후, HRP-접합된 항-히스티딘 IgG(Southern Biotech, Birmingham, AL, USA)를 첨가하였고, 이어서 세척 및 TMB 기질을 첨가하였다. SpectraMax Plus 플레이트 판독기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 OD 450 nm에서 플레이트를 판독하였고, SoftMax Pro 6.5.1 GxP 소프트웨어로 데이터를 분석하였다. 각각의 샘플의 경우에 각각의 희석에 대한 억제 %를 다음의 방정식을 이용해 SoftMax Pro 프로그램으로 계산하였다: 100-[(평균 결과/양성 대조군에서의 대조군 값)*100].

[0545] (b) 혈청 희석 대 억제 플롯 %를 생성하였고, 데이터에 대한 4 파라미터 로지스틱(4PL) 곡선 핏팅에 의해 곡선 핏팅을 수행하였다. SARS-CoV-2 S 단백질(BV2373 또는 BV2438)에 대한 hACE2의 50% 억제(IC50)에서의 혈청 항체 역가를 SoftMax Pro 프로그램으로 결정하였다.

[0546] *플라크 감소 중화 역가 에세이(PRNT)에 의한 SARS-CoV-2 중화 역가:* 이전에 기술된 것과 같이 PRNT를 처리하였다(20). 간략하게, 혈청 샘플을 초기의 1:40 희석에서 1:2의 연속 희석으로 총 11회 희석하는 동안 DMEM(Quality Biological)로 희석하였다. 혈청이 없는 대조군을 각각의 플레이트에 포함시켰다. 이후, SARS-CoV-2를 플라크 에세이 웰 당 50 PFU의 표적에 대해 1:1로 각각의 희석액에 첨가하였고, 37℃(5.0% CO_2)에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이후, 샘플 역가를 플라크 에세이에 의해 결정하였고, 중화 역가를 비처리 대조군과 비교하여 결정하였다. 4-파라미터 로지스틱 곡선은 PRISM(GraphPad, San Diego, CA)에서 상기 중화 데이터와 잘 맞았고, 50%의 바이러스를 중화하기 위해 필요한 희석(PRNT50)을 상기 곡선 핏에 기반해 계산하였다.

[0547] *표면 및 세포내 사이토카인 염색:* 표면 염색을 위하여, 뮤린 비장세포를 먼저 항-CD16/32 항체로 인큐베이션하여 Fc 수용체를 차단하였다. T 여포 보조 세포(Tfh)를 특징분석하기 위하여, 비장세포를 다음의 항체 또는 염료로 인큐베이션하였다: BV650-접합된 항-CD3, APC-H7-접합된 항-CD4, FITC-접합된 항-CD8, Percp-cy5.5-접합된 항-CXCR5, APC-접합된 항-PD-1, Alexa Fluor 700-접합된 항-CD19, PE-접합된 항-CD49b(BD Biosciences, San Jose, CA) 및 황색 LIVE/DEAD® 염료(Life Technologies, NY). 배 중심(GC) B 세포를 염색하기 위하여, 비장세

포를 FITC-접합된 항-CD3, PerCP-Cy5.5-접합된 항-B220, APC-접합된 항-CD19, PE-cy7-접합된 항-CD95, 및 BV421-접합된 항-GL7(BD Biosciences) 및 황색 생존력 염료(LIVE/DEAD®)(Life Technologies, NY)로 표지하였다.

[0548] 뮤린 비장세포의 세포내 사이토카인 염색(ICCS)을 위하여, 세포를 웰 당 2×10^6 세포로 96-웰 U-바닥 플레이트에서 배양하였다. 세포를 rS-WU1BV2373 또는 rS-B.1.351BV2438 스파이크 단백질로 자극하였다. 상기 플레이트를 BD GolgiPlug™의 존재시에 37℃에서 6시간 동안 인큐베이션하였고, BD GolgiStop™(BD Biosciences)의 존재시에 마지막 4시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 CD3(BV650), CD4(APC-H7), CD8(FITC), CD44(Alexa Fluor 700), 및 CD62L(PE)(BD Pharmingen, CA)에 대한 뮤린 항체 및 황색 LIVE/DEAD® 염료로 표지하였다. Cytofix/Cytoperm(BD Biosciences)으로 고정한 후, 세포를 PerCP-Cy5.5-접합된 항-IFN-γ, BV421-접합된 항-IL-2, PE-cy7-접합된 항-TNF-α, 및 APC-접합된 항-IL-4(BD Biosciences)로 인큐베이션하였다. 모든 염색된 샘플은 LSR-Fortessa 또는 FACSymphony 유세포 분석기(Becton Dickinson, San Jose, CA)를 이용해 획득하였고, 데이터는 FlowJo 소프트웨어 버전 Xv10(Tree Star Inc., Ashland, OR)으로 분석하였다.

[0549] 개코원숭이 PBMC의 ICS를 위하여, 도 5a에 열거된 시점에서 수집된 PBMC를 rS-WU1BV2373 또는 rS-B.1.351BV2438로 상기 기술된 것과 같이 자극하였다. 세포를 인간/NHP 항체 BV650-접합된 항-CD3, APC-H7-접합된 항-CD4, FITC-접합된 항-CD8, BV421-접합된 항-IL-2, PerCP-Cy5.5-접합된 항-IFN-γ, PE-cy7-접합된 항-TNF-α, APC-접합된 항-IL-15, BV711-접합된 항-IL-13(BD Biosciences), 및 황색 LIVE/DEAD® 생존력 염료로 표지하였다.

[0550] *효소 결합 면역흡착 에세이(ELISA):* 마우스 IFN-γ 및 IL-5 ELISpot 키트(3321-2H 및 3321-2A, Mabtech, Cincinnati, OH)에 대한 제조사의 절차에 따라 뮤린 IFN-γ 및 IL-5 ELISpot 에세이를 수행하였다. 간략하게, 항-IFN-γ 또는 항-IL-5 항체로 사전-코팅된 플레이트에서 200 ㎕ 부피 중의 4×10^5 비장세포를 rS-WU1BV2373 또는 rS-B.1.351BV2438로 자극하였다. 검출 2차 항체는 클론 RS-6A2 IFN-γ 및 클론 TRFK4였다. 각각의 자극 조건을 3중으로 수행하였다. 에세이 플레이트를 5% CO_2 인큐베이트에서 37℃에서 24-48시간 동안 인큐베이션하였고, BD ELISpot AEC 기질 세트(BD Biosciences, San Diego, CA)를 이용해 현상하였다. 스팟을 계수하였고, ELISpot 판독기 및 ImmunoSpot 소프트웨어 v6(Cellular Technology, Ltd., Shaker Heights, OH)를 이용해 분석하였다. IFN-γ- 또는 IL-5-분비 세포의 수는 배지 대조군에서의 배경 수를 뺌으로써 입수하였다. 그래프에 나타낸 데이터는 3중 웰의 평균이다.

[0551] 유사하게, 개코원숭이의 IFN-γ 및 IL-4 에세이를 Mabtech로부터의 NHP IFN-γ 및 인간 IL-4 에세이 키트를 이용해 수행하였다. IFN-γ의 경우, 코팅 항체인 인간 IFN-γ 3420-2H 및 검출 항체인 클론 7-B6-1을 사용하였다. IL-4의 경우, 코팅 항체인 인간 IL-43410-2H(클론 IL4-I) 및 검출 항체인 클론 IL4-II를 사용하였다. 에세이는 3중으로 수행하였다.

[0552] 통계적 분석: 통계적 분석은 GraphPad Prism 8.0 소프트웨어(La Jolla, CA)로 수행하였다. 혈청 항체 역가를 개별 동물에 대해 플롯팅하였고, 및 기하 평균 역가(GMT) 및 95% 신뢰 구간(95% CI) 또는 평균±SEM을 도면에 표기하였다. $\log_{10}$으로 변환된 데이터에 대해 Tukey의 다수의 비교 사후 검정을 이용하는 보통의 일원ANOVA를 수행하여 그룹 간의 차이점의 통계적 유의성을 평가하였다. P-값 ≤0.05를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0553] **BV2438 항원의 생물물리학적 특성, 구조, 및 기능**: 정제된 BV2438은, 환원 및 SDS-PAGE를 거칠 때, 대략 170 kDa의 예상된 분자량으로 이동하였다(**도 52a**). BV2438의 열적 안전성을 시차 주사 열량측정법(DSC)에 의해 BV2373의 경우와 비교하였다; BV2438의 주된 피크는 원형 BV2373 단백질과 비교하여 열적 전이 온도(T_{max})에서 4℃ 증가 및 1.3배 더 높은 전이 엔탈피(ΔHCal)를 보였으며, 이는 BV2438의 증가된 안전성을 시사한다(**도 52b**, 표 18). 투과 전자 현미경(TEM)을 16,049 입자의 2 라운드의 2차원(2D) 클래스 평균화와 조합해 사용하여 BV2438의 울트라구조를 확인하였다. 고배율(92,000× 및 150,000×) TEM 이미지는 15 nm 길이 및 11nm 폭을 갖는 전구-형상 입자 외형을 밝혔고, 이는 SARS-CoV-2 스파이크 3량체(PDB ID 6VXX; **도 52c**)의 융합전 형태와 일치하였다. 이것은 본 발명자들이 원형 BV2373 단백질에 대해 이전에 관찰한 것과 일치한다.

[0554] 변이체 스파이크 단백질 구조체 BV2438의 기능적 특성을 확인하기 위하여, hACE2 수용체에 대한 상기 rS 단백질의 결합을 이전에 기술된 것과 같은 바이오-층 간섭계법(BLI)을 이용해 결정하였다. BV2438은 hACE2에 3.94×10^4의 회합 상수(Ka)로 단단하고 안정하게 결합하는 것으로 밝혀졌으며, 이는 원형 단백질 BV2373($Ka = 1.08\times10^4$)과 비교하여 hACE2에 대해 3.6배 더 큰 회합을 나타낸다. 상기 2가지 단백질의 해리 상수는 본질적으로 동

일하였다(BV2438 및 BV2373에 대해 각각 1.46×10^{-7} 및 1.56×10^{-7}). 본 발명자들은 부가적으로 이전에 기술된 것과 같이 ELISA로 hACE2에 대한 BV2438 결합을 평가하였다. 상기 에세이에서, BV2438은 원형 구조체 BV2373(EC_{50} = 9.4 ng/㎖)보다 약간 낮은(EC_{50} = 8.0 ng/㎖)에서 hACE2의 50% 포화에 도달하였으며, 이는 BV2438이 BV2373의 경우와 비교하여 hACE2에 대해 약간 더 높은 친화도를 나타냄을 확인한다(표 18).

표 18

[0555] **SARS-CoV-2 재조합 스파이크 단백질의 열안전성 및 hACE2 결합**

SARS-CoV-2 rS 단백질	시차 주사 열량측정법(DSC)		hACE2 결합		
	T_{max} (℃)	ΔHcal (kJ mol^{-1})	바이오-층 간섭계법에 의한 hACE2 결합 동역학		hACE2 ELISA (EC_{50}, ng/㎖)
			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

[0556] T_{max}, 융해 온도; K_a, 결합 상수; K_{dis}, 해리 상수; EC_{50}, 절반-최대 결합.

[0557] **마우스에서 BV2438 면역원성**: 본 발명자들은 사포닌 어주번트와 제형화된 BV2438 및 BV2373의 항체- 및 세포-매개성 면역원성을 평가하였다. 항체-매개성 면역원성을 평가하기 위하여, 마우스의 그룹(n = 20)을 프라임 및 부스트 모두 BV2373 또는 BV2438로, 프라임으로 BV2373 및 부스트로 BV2438, 또는 프라임 및 부스트 백신화를 위한 2가의 제형물로 조합된 백신으로 면역시켰다. 위약 그룹은 음성 대조군으로 백신 제형물 버퍼를 받았다. 1가의 면역화 그룹에서, 1 ㎍의 rS 및 5 ㎍의 사포닌 어주번트를 0일 및 14일에 근육내로 주사하였다. 2가의 면역화를 위하여, 1 ㎍의 각각의 rS 구조체를 총 2 ㎍ rS로 5 ㎍의 사포닌 어주번트와 함께 각각의 면역화에 투여하였다. 상기 연구 디자인은 **도 53**에 나타나 있다. 상기 4가지 백신 요법 중 하나로 면역화된 마우스는 백신화 후 21일에 ELISA에 의해 B.2 스파이크 및 B.1.351 스파이크 모두에 대해 상승된 항체 역가를 나타내었다. BV2373 또는 BV2438를 이용한 1가의 백신화는 2가의 백신화 또는 이질적 백신화보다 현저하게 더 낮은 항-S(WU1) IgG 역가를 생성하였지만, 어느 것도 2배 이상 IgG 역가가 감소되지는 않았다(**도 54a**, **도 54b**). 반대로, BV2373 단독을 이용한 면역화는 모든 다른 면역화 요법과 비교하여 B.1.351 스파이크에 대해 현저하게 더 낮은 역가를 야기하였다; 1가의 BV2438 또는 2가의 rS를 이용한 면역화는 테스트된 요법 중에서 가장 높은 항-B.1.351 스파이크 IgG 역가를 야기하였고, 이들 요법 사이에 현저한 차이는 없었다(**도 54a**, **도 54b**). 위약 그룹의 동물은 예상된 것과 같이 검출불가능한 항-B.2 스파이크 및 항-B.1.351 스파이크 IgG 역가를 나타내었다.

[0558] 마우스로부터의 혈청이 스파이크가 hACE2에 결합하는 것을 억제하는 능력을 또한 평가하였다. 모든 면역화 요법은 CoV 스파이크 폴리펩티드에 대한 hACE2 결합을 차단하는 항체의 생산을 야기하였고, 21일에 임의의 그룹 사이에 현저한 차이는 없었다(**도 54c**, **도 54d**). 또한, BV2373 단독을 이용한 면역화는 B.1.351 스파이크 및 hACE2 사이의 결합을 파괴할 수 있는 현저하게 더 낮은 혈청 역가를 야기하였다; BV2373 단독 면역화 그룹에서의 역가는 BV2438 단독 면역화 그룹에서의 역가보다 4.6배 더 낮았고($p < 0.0001$), 2가의 rS를 받은 그룹에서의 역가보다 3.1배 더 낮았다($p < 0.0001$).

[0559] 다음으로 본 발명자들은 상이한 백신화 요법 사이의 중화 항체 역가를 평가하였다. 백신화 후 32일에 백신화된 동물로부터 수집한 혈청을 플라크 감소 중화 역가 에세이($PRNT_{50}$)에서 SARS-CoV-2/WA1, SARS-CoV-2/B.1.1.7 및 SARS-CoV-2/B.1.351 바이러스주를 이용해 평가하였다. 1가의 BV2373 그룹으로부터의 혈청은 각각의 3가지 바이러스 바이러스주에 대해 유사한 중화 항체 역가를 나타내었다. 1가의 BV2438로 면역화된 마우스로부터의 혈청은 B.2 바이러스주와 비교하여 B.1.351 및 B.1.1.7 바이러스주에 대해 상승된 중화 항체 역가를 생성하였다(**도 54e**). 이질적 백신 그룹은 B.2 바이러스주와 비교하여 B.1.351 및 B.1.17 바이러스주에 대해 유사하게 상승된 중화 항체 역가를 생성하였고, 2가의 BV2373/BV2438 백신화 요법도 마찬가지였다.

[0560] **BALB/c 마우스에서 SARS-CoV-2에 대한 BV2438 보호**: **도 53**에 기술된 것과 같이 백신화된 마우스를 B.1.1.7 또는 B.1.351를 이용한 챌린지에 대해 보호성 면역력을 생성하기 위한 그 능력에 대해 평가하였다. SARS-CoV-2/우한 1(B.2) 바이러스주는 야생형 마우스에서 복제하지 못하지만, 상기 B.1.1.7 및 B.1.351 바이러스주는 스파이크 ORF에 501Y 돌연변이가 있어서 스파이크 단백질이 마우스 ACE2에 결합해 세포에 들어가게 한다. 백신화 후

46일에, 마우스를 7×10^4 PFU의 B.1.17(군 당 n = 10마리 마우스) 또는 1×10^5 PFU의 B.1.351(군 당 n = 10마리 마우스)로 비강내로 접종하였다. 챌린지-후 기간에 걸쳐서 마우스를 매일 체중을 재었고, 감염 후 2일 및 4일(연구 48일 및 50일)에, 군 당 5마리 마우스를 이소플루란 흡입에 의해 마취시켰다. 이후, 각각의 마우스의 폐를 플라크 형성 에세이에 의한 바이러스 부하 및 RT-PCR에 의한 바이러스 RNA에 대해 평가하였다. B.1.1.7로 감염된 위약 BALB/c 마우스는 체중 손실이 없었고, 상기 SARS-CoV-2 바이러스주로 감염된 임의의 백신화된 그룹에서 체중 손실이 관찰되지 않았다. B.1.351 감염된 마우스의 경우, B.1.351로 감염 후 4일까지 위약 백신화 그룹에서20% 체중 손실이 관찰되었다(**도 55a**, **도 55b**). 양쪽 요법으로 백신화된 모든 마우스는 B.1.351로 감염된 후 체중 손실로부터 보호되었는데, 이는 상기 모델에서 보호가 임상적 관련성이 있음을 실증한다.

[0561] 감염 후 2일에, 위약 그룹에서 B.1.1.7 감염된 마우스는 4×10^4 pfu/g 폐를 나타내었고, 이것은 위약 백신화 그룹에서 감염 후 4일까지 검출불가능한 레벨로 떨어졌다. 임의의 BV2373 또는 BV2438 요법으로 면역화시, 감염 후 2일 또는 4일에 검출가능한 살아있는 바이러스가 없었는데, 이는 백신화 후 바이러스 부하에서 5-log 이상의 감소 및 감염으로부터의 보호를 실증한다(**도 55c**, **도 55d**). 감염 후 2일에, 샴(sham) 백신화 그룹에서 B.1.351 감염된 마우스는 8×10^8 pfu/g 폐를 나타내었고, 이는 감염 후 4일까지 2×10^5 pfu/g 폐로 떨어졌다. 임의의 rS 요법으로 면역화시, B.1.351 감염된 마우스에서 감염 후 2일 또는 4일에 검출가능한 살아있는 바이러스가 없었다. 이것은 샴 백신화된 마우스로부터 감염 후 2일까지 바이러스 부하에서 > 5 log 감소로 바이러스 역가에서의 극적인 감소를 실증한다(**도 55c**, **도 55d**). 또한, 챌린지 후 서브게놈(sgRNA) SARS-CoV-2 mRNA 생산에 대해 폐 RNA를 분석하였다. 해당 위약 그룹에서의 레벨과 비교하여, 본 발명자들은 양쪽 바이러스주로 감염 후 2일 및 4일에 면역화된 마우스에서 폐 sgRNA 레벨에서 >99% 감소를 발견하였다(**도 55e**, **도 55f**).

[0562] 상기 결과는 사포닌 어주번트로 제형화되고 1가, 2가, 또는 이질적 요법으로 투여된 BV2373 및 BV2438이 마우스에서 SARS-CoV-2, B.1.1.7 및 B.1.351의 양쪽 바이러스주에 대한 보호를 부여함을 확인한다. 체중 손실에서의 감소, 높은 중화 항체 역가, 및 마우스의 폐에서 바이러스 복제의 제거와 함께, 본 발명자들은 변이체 스파이크 표적화 백신에 의한 높은 보호성 백신 반응을 실증한다.

[0563] **마우스에서 BV2438의 세포-매개성 면역원성**: BALB/c 마우스(n = 8/그룹)의 그룹을 상기 언급한 것과 동일하지만 21일의 간격으로 BV2373 또는 BV2438 요법으로 면역시켰다(**도 56a**). 음성 대조군(n = 4)은 백신 제형물 버퍼로 주사하였다. 부스트 면역화 후 연구 28일 및 7일에 비장을 수확하였다. 비장세포를 수집하였고, ELISpot 및 세포내 사이토카인 염색(ICS)을 거쳐 BV2373 또는 BV2438로 자극시 사이토카인 분비를 조사하였다. 효소 결합 면역흡착 에세이(ELISA)는 모든 백신화 요법시에 IL-5 생산 세포의 수와 비교하여 IFN-γ 생산 세포의 수가 더 컸음을 보여주었고, 이는 Th1-편향 반응을 나타낸다(**도 56b** 내지 **도 56d**). 양쪽 rS로 자극시, IFN-γ, IL-2, 또는 TNF-α를 발현하는 CD4+ T 세포, 및 모든 3가지 사이토카인을 발현하는 다기능성 CD4+ T 세포의 존재에 의해 측정될 때 강한 Th1 반응이 ICS에 의해 관찰되었다(**도 56e**, **도 57a** 내지 **도 57e**). Th2 사이토카인인 IL-4는 발현하지만 IL-2 및 TNF-α에 대해서는 음성인 CD4+ T 세포가 또한 존재하였지만, Th1 사이토카인에 대해 관찰된 것보다 낮은 비율이었다(**도 57a** 내지 **도 57e**). BV2373 또는 BV2438로 자극시 테스트된 임의의 사이토카인에 대해 백신화 그룹들 사이에 사이토카인-양성 세포 수에서 현저한 차이는 관찰되지 않았다.

[0564] T 여포 보조 세포(CSCR5+PD-1+CD4+)는 더 큰 백분율의 CD4+ T 세포를 나타내는 경향이 있지만, 위약 동물과 비교하여 백신화된 동물에서 통계적으로 현저한 상승은 관찰되지 않았다(**도 56f**). 유사하게, 유세포 분석을 이용해 CD19+ B 세포 중에서 GL7+CD95+ 세포의 백분율을 결정함으로써 배 중심 형성을 평가하였고, 더 높은 백분율의 배 중심 B 세포 쪽으로의 경향이 위약 그룹과 비교하여 백신화 그룹에서 관찰되었지만, 1가의 BV2438 요법으로 면역화된 동물에서만 현저하게 더 높은 비율을 보였다(위약과 비교하여 p = 0.049; **도 56g**).

[0565] **개코원숭이에서 BV2373로 1차 면역화 후 1년에 BV2373으로 부스트함으로써 유도된 면역기억 반응(anamnestic response)**: 작은 코호트의 개코원숭이(총 n = 9)를 BV2373(50 ㎍ 사포닌 어주번트와 함께 1 ㎍, 5 ㎍, 또는 25 ㎍ rS, 또는 어주번트 없이 25 ㎍ rS)으로 1차 면역화 시리즈를 거쳤다. 대략 1년 후, 모든 동물을 50 ㎍ 사포닌 어주번트와 함께 1 또는 2 용량의 3 ㎍의 BV2438로 부스트하여 생성된 면역 반응을 조사하였다(**도 58a**). 제1 BV2438 부스트 후 7일에, 원래 어주번트화 BV2373을 받았던 동물은 1차 면역화 시리즈 동안에 피크 면역 반응에서 원래 관찰되었던 것보다 더 높은항-S(WU1) IgG 역가의 레벨에 의해 나타내는 것과 같이 강한 면역기억 반응을 나타내었다(**도 58b**). 본 연구에서 이용된 작은 샘플 크기는 의미있는 정량적 분석을 할 수 없게 하였지만, 상기 반응은 BV2438의 제2 부스터 용량에 의해 추가로 강화되는 것으로 보이지는 않았다. 1차 면역화 시리즈 동안 어주번트 없이 BV2373을 받은 동물은 BV2438를 이용한 부스트에 더 약한 반응을 나타내었지만, 여전히 상승된 항-S(WU1) IgG 반응을 나타내었다. 상기 BV2438 부스트는 원래 어주번트 없이 BV2373을 받아 더 약한 반응을

나타내었던 동물에서 BV2373 및 BV2438에 대한 필적할 만한 항체 역가를 일으켰다(**도 58c**, **도 58d**).

[0566] 부스트 전, 및 1 또는 2 용량의 BV2438로 부스트 후 7, 21, 35, 및 89일에 야생형 CoV S 단백질(서열번호 2) 또는 B.1.351 rS 및 hACE2 사이의 상호작용을 파괴할 수 있는 혈청 항체 역가를 또한 평가하였다. 항-S IgG 역가에 대해 관찰된 것과 유사하게, 1차 면역화 시리즈 동안에 어주번트화 백신을 받은 동물은, 비록 부스트 전에는 검출불가능한 역가를 가졌지만, BV2438 부스트 후 7일에 강한 hACE2-억제 항체 반응을 나타내었다. 작은 샘플 크기는 의미있는 정량적 분석을 할 수 없게 하였지만, BV2438-hACE2 차단 항체의 레벨과 비교하여 BV2373-hACE2 차단 항체의 경우에 역가가 약간 더 높았다. 1차 면역화 시리즈 동안에 어주번트 없는 백신을 받은 동물은 BV2438 부스트 후에 더 낮은 hACE2 차단 역가를 나타내었다(**도 58e**).

[0567] WA1, B.1.351 및 B.1.1.7를 중화하는 능력에 대해 혈청을 테스트함으로써 살아있는 바이러스 미세중화 에세이에 의해 중화 항체 역가를 분석하였다. BV2438 부스트 전에 수집된 혈청은 모든 상기 바이러스에 대해 검출불가능한 중화 항체 레벨을 가졌다. 백신화 후 7일까지, 모든 3가지 바이러스주를 중화시키는 높은 역가 항체가 검출되었고, 상기 항체 반응은 백신화 후 35일까지 높게 유지되었다. 1차 시리즈에서 어주번트 없이 BV2373으로 면역화된 동물은 훨씬 더 넓은 범위의 중화 역가와 함께 현저하게 더 낮은 항체 레벨을 나타내었다(**도 58f**). 함께, 상기 데이터는 1차 백신화 시리즈 후 1년까지도 강력하고 오래가는 항체 반응을 실증한다.

[0568] (c) 3가지 Th1 사이토카인을 발현하는 다기능성 T 세포는 또한 개코원숭이에서 제1 BV2438 부스터 용량 후 7일에 관찰되었고, 상기 반응은 제1 부스터 용량 후 35일에 유지되었다(**도 58g** 및 **도 59a** 내지 **도 59g**).

[0569] **BV2373 백신화된 성인으로부터의 혈청에 의한 SARS-CoV-2 변이체의 중화:** BV2373 및 사포닌 어주번트를 함유하는 백신은 장소들을 포함하여 현재 전세계적으로 임상 시험 중이며, B.1.1.7 및 B.1.351이 우세하다. 본 발명자들은 본 시험에서 USA-WA1, B.1.1.7 및 B.1.351을 중화시키기 위한 개체로부터의 혈청의 능력을 평가하였다. 미세중화 에세이를 $PRNT_{50}$ 해독정보(readout)를 이용해 수행하였다(**도 60a**, **도 60b**). 그 제2 용량의 백신 후에 임상 시험 참가자로부터 30개의 무작위로 선택된 혈청 샘플을 분석하였다. WA1 대 B.1.1.7을 비교할 때, 대부분의 혈청 샘플에 걸쳐서 중화 활성에서의 변화는 없었다; 1개 샘플만이 B.1.1.7에 대한 중화 항체 역가에서 통계학적으로 현저한 변화를 가졌다. WA1 대 B.1.351 중화 역가는 30개 샘플 중 5개에서 증가된 범위의 중화 역가를 보였으며, $PRNT_{50}$ 에세이에서 평균으로 1 표준 편차 떨어진 감소된 중화를 보였다. 상기 데이터는 B.1.1.7과 비교하여 BV2373 및 사포닌 어주번트를 받은 백신의 작은 백분율에서 B.1.351의 감소된 중화를 실증한다.

[0570] **논의:** 본 발명자들은 사포닌 어주번트에 의해 어주번트화된 B.1.351 스파이크 변이체를 이용하는 전장의 안정화된 융합전 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질 백신이 높은 레벨의 기능적 면역력을 유도할 수 있고 B.1.1.7 및 B.1.351 SARS-CoV-2 바이러스주 모두에 대해 마우스를 보호함을 보였다. 마우스 또는 비-인간 영장류를 BV2438로 면역시키면 항-S 항체, hACE2-수용체 억제 항체, 및 SARS-CoV-2 중화 항체를 유도하였다. 게다가, 상기 BV2438 백신은 $CD4^+$ T 세포 반응을 유도하였고, 배 중심 형성을 유도하였고, B.1.351 및 B.1.1.7 챌린지에 대한 보호를 제공하였다.

[0571] 마우스에서, B.1.351 변이체-지향성 백신으로 백신화한 후 생산된 항체는 hACE2 및 변이체 스파이크 또는 선조형 스파이크 사이의 결합을 도일한 정도로 억제할 수 있었고, 이는 상기 변이체-지향성 백신이 선조형 SARS-CoV-2 바이러스주에 대해 "거꾸로" 효율적으로 보호할 수 있었음을 시사한다.

[0572] 본 발명의 시험으로부터의 인간 백신 혈청의 분석은 강력한 항체 반응 및 중화의 최소 손실을 실증한다. 본 발명자들은, 남아프리카 공화국의 WA1 시험 참가자에서 돌파 감염(breakthrough infection)의 증거가 있기는 하지만, B.1.351 바이러스가 B.1.1.7 및 WA1과 비교하여 중화를 현저하게 감소시키지 않음을 관찰하였다. 모든 돌파 감염은 B.1.351이었다. 따라서, 단일 또는 다수의 변이체 rS 백신을 함유하는 부스터 백신화는 본 연구에서 나타낸 것과 같이 항체 레벨을 증가시킬 뿐만 아니라 변이체에 대한 커버리지(coverage)를 넓힐 것이다.

[0573] **실시예 11**

[0574] **BV2373 및 사포닌 어주번트는 단일 부스트 용량 후 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주에 대한 보호성 면역 반응을 유도한다.**

[0575] 참가자: ≥ 18 내지 ≤ 84세 연령의 건강한 남성 및 여성 참가자를 본 연구에 등록하기 위해 모집하였다. 17 내지 35 kg/m^2의 신체 질량 지수를 갖는다면 참가자는 적격이었으며, 등록 전에 공지된 동의서를 제공할 수 있었고, (여성 참가자의 경우) 이성애적으로 비활성으로 남거나 승인된 형태의 피임을 이용하는 것에 동의하였다. 중증 급성 호흡기 증후군(SARS) 또는 COVID-19의 확증 진단, 심각한 만성 의학적 증상(예컨대, 진성 당뇨병, 울

혈성 심부전, 자가면역 증상, 악성물)의 이력을 갖거나, 또는 새로운 진단을 유도할 수 있는 진단되지 않은 질병에 대해 현재 평가되고 있는 참가자는 연구로부터 배제되었다. 임신하거나 수유중인 여성도 또한 배제되었다.

[0576] 무작위화: 환자를 무작위로 5개 그룹으로 할당하였다. 5개 처리 그룹 중, 1개는 위약 대조군(그룹 A)이었고, 2개는 부스터를 이용한 부가적인 백신화에 대해 고려되는 활성 백신 그룹(그룹 B 및 그룹 C)이었다. 대략 6개월 후, 0일 및 21일에 2 용량의 BV2373(5 μg) 및 사포닌 어주번트(50 μg)(그룹 B) 또는 0일에 1 용량의 BV2373(5 μg) 및 사포닌 어주번트(50 μg) 및 21일에 위약(그룹 C)의 1차 백신화 시리즈를 무작위로 받은 동의한 참가자를 1:1로 다시 무작위화하여 189일에 동일한 용량 레벨로 단일 부스터 용량의 BV2373 및 사포닌 어주번트(그룹 B2 및 C2) 또는 위약(그룹 B1 또는 C1)을 받았다. 그룹 B 참가자는 본 실시예의 주된 초점이다.

[0577] 목적 및 방법: 본 발명자들은 5 μg 용량의 BV2373 및 50 μg 사포닌 어주번트(분획 A 및 분획 C 이스콤 매트릭스, 본 실시예에서 매트릭스-M™으로도 나타냄) 또는 위약(1:1)을 근육내로 3회 받은 18 내지 84세 연령의 건강한 성인에서 무작위, 관찰자-맹검, 위약-제어 2상 시험을 수행하였다. 제1 및 제2 용량은 21일 간격으로 투여하였다. 상기 제1 및 제2 용량은 "1차 백신화 시리즈"로 나타낸다. 제3 용량("부스트" 용량)은 1차 백신화 시리즈 이후 약 6개월에 투여하였다. 모든 3가지 용량의 주사 부피는 0.5 mℓ였다. IgG, MN_{50}, 및 선조형 SARS-CoV-2 바이러스주 및 선택된 변이체(B.1.351[베타], B.1.1.7[알파], B.1.617.2[델타], 및 B.1.1.529[오미크론])에 대한 hACE2 억제에 대한 에세이를 포함하는 안전성 및 면역원성 파라미터를 평가하였다.

[0578] 참가자는 백신화한 날 및 그 이후의 추가적인 6일 동안 반응원성을 기록하기 위한 전자 일기를 이용하였다. 부스터를 받은 후 28일에 면역원성 분석을 위한 혈액 샘플을 수집하였고, 이 기간에 안정성 후속 조사를 또한 수행하였다. 면역 반응의 측정은 혈청 면역글로불린 G(IgG) 항체, 중화 항체 활성(억제 농도 >50%[MN_{50}]에서의 미세중화 에세이), 및 인간 안지오텐신-전환 효소 2(hACE2) 수용체 결합 억제에 대한 에세이를 포함하였다. 적격인(qualified) IgG 효소 결합 면역흡착 에세이(ELISA)를 이용해 SARS-CoV-2 rS 단백질 항원에 특이적인 혈청 IgG 항체 레벨를 검출하였다. 적격인 야생형 바이러스 MN 에세이를 이용해 SARS-CoV-2 바이러스에 특이적인 중화 항체를 측정하였다. 선조형 및 베타 변이체 SARS-CoV-2 바이러스주 모두에 대한 혈청 IgG 및 MN_{50} 에세이 데이터를 수집하였다. 목적-맞춤(fit-for-purpose) 기능적 hACE2 억제 에세이 및 항-rS(항-재조합 스파이크) IgG 활성 에세이를 모두 사용하여 SARS-CoV-2의 선조형, B.1.351(베타), B.1.1.7(알파), B.1.617.2(델타), 및 B1.1.529(오미크론) 변이체 바이러스주에 대한 반응을 분석하였다.

[0579] 안전성 결과는 부스터 후 7일 동안 참가자가 기록한 반응원성 사건뿐만 아니라 부스터-후 28일 동안 일어난 응답되지 않은 부작용 사건도 포함하였다. 부스터 반응원성은 응답된 국소 및 전신 부작용 사건에 의해 별도로 문서화하였다. 부스터 백신화로부터 부스터-후 28일까지 응답되지 않은 부작용 사건을 기록하였다. 부작용 사건이 심각하였는지, 백신화와 연관되었는지, COVID-19와 연관되었는지, 잠재적으로 면역-매개성 의학적 증상(PIMMC)인지, 또는 중단 또는 계획에 없던 의료 종사자 방문을 유도하였는지 여부에 대한 데이터를 또한 수집하였다. 부스터 직전 또는 이후 28일에 면역원성 분석을 위한 참가자 샘플을 수집하였다.

[0580] 통계: 분석은 부스터 용량을 받은 후 28일(217일)에 그룹 B2로부터 수집한 데이터와 비교하기 위하여 1차 백신화 시리즈(0일, 21일, 35일, 105일, 및 189일) 동안 및 그 이후에 입수한 그룹 B의 참가자로부터의 안전성 및 면역원성 데이터를 포함하였다. 또한, 참가자 연령 그룹에 의한 결과를 분석하였다: ≥ 18 내지 ≤ 84세 연령, ≥ 18 내지 ≤ 59세 연령, 및 ≥ 60 내지 ≤ 84세 연령.

[0581] 안전성 분석은 BV2373 및 사포닌 어주번트(그룹 B2) 또는 위약(그룹 B1)의 단일 부스터 주사를 받은 모든 참가자를 포함하였다. 안전성 분석은 각각의 백신화 후 7일 동안 분석된 응답된 국소 및 전신 부작용 사건 및 부스터 후 28일 동안 응답되지 않은 부작용 사건을 갖는 참가자의 수 및 백분율로 제공하였다.

[0582] 결과: 총 1610명의 참가자를 스크리닝하였다. 3명을 제외한 모든 참가자는 그룹 B(n=257)로 무작위로 배정되어 1차 백신화 시리즈에서 양쪽 용량의 BV2373 및 사포닌 어주번트를 받았고, 동일한 용량 레벨에서 단일 부스터 용량의 조사를 고려하였다(**도 68**). 그룹 B 참가자의 재-무작위화는 189일에 행하였고, 210명의 동의한 참가자를 1:1로 할당하여 그룹 B2(n=104)에서 BV2373 및 사포닌 어주번트 또는 그룹 B1(n=106)에서 위약의 단일 부스터를 받았다. 그룹 B2에서, 1명을 제외한 모든 참가자는 부스터로서 활성 백신을 받았다. 그룹 B1에서 6명을 제외한 모든 참가자는 부스터로서 위약을 받았다; 나머지 6명의 참가자 중, 4명은 어떠한 부스터도 받지 않았고(이들 중 1명은 진행 중인 부작용 사건으로 인한 안전성을 위해 그룹 B1에 포함됨), 2명은 실수로 부스터로서 활성 백신을 받아 그룹 B2에서 안전성에 대해 평가하였다. 그룹 A에서 1명을 제외한 모두는 모든 3가지 용량에 대해 위약을 받았고, 나머지 참가자는 부스터 용량으로 활성 백신을 받았다.

[0583] 인구통계 및 기준선 특징은 그룹 B2(45%)보다 그룹 B1(58%)에서 여성 참가자의 비율이 더 높은 것을 제외하고는 일반적으로 활성(그룹 B2) 및 위약(그룹 B1) 부스터 그룹 사이에 균형이 맞았다(표 19). 그룹 A, B1, 및 B2에 걸쳐서, 중앙값 연령은 대략 57세였고, 45%의 참가자는 ≥ 60 내지 ≤ 84세 연령이었다. 대부분의 참가자는 백인(87%)이었고, 히스패닉 또는 라틴계가 아니었다(95%). 기준선 SARS-CoV-2 혈청상태는 우세하게 열성이었다(98%).

[0584] 응답된 국소 및 전신 반응원성 사건의 안전성 보고는 모든 3가지 용량의 BV2373 및 사포닌 어주번트에 걸쳐서 증가하는 경향을 보여주었다(**도 69a** 및 **도 69b**). 부스터 후, 그룹 B2의 참가자는 1차 백신화 시리즈 이후의 70.0%(5.2% ≥ 등급 3)와 비교하여 82.5%(13.4% ≥ 등급 3)의 임의의 국소 반응(압통, 통증, 종창, 및 홍반)에 대한 발병률을 보고하였다. 등급 4 국소 반응은 드물었으며, 1차 백신화 시리즈 후에는 참가자가 없었던 것과 대조적으로 그룹 B2에서 1명의 참가자에 의해 2개 사건(통증 및 압통)이 보고되었다. 부스터 후, 국소 반응은 홍반(2.5일)을 제외하고는 모든 사건의 경우에 2.0일이 중앙값 기간으로 짧았다. 국소 반응은 또한 1차 백신화 시리즈 후에 짧았으며, 중앙값 기간은 통증 및 압통의 경우 2.0일, 홍반 및 종창의 경우 1.0일이었다.

[0585] 전신 반응은 1차 백신화 시리즈 후의 52.8%(5.6% ≥ 등급 3)와 비교하여 76.5%(15.3% ≥ 등급 3)의 임의의 사건(피로, 두통, 근육 통증, 병감, 관절 통증, 구역질/구토, 및 열)에 대한 발병률로 유사한 패턴을 보였다. 등급 4 전신 반응은 드물었으며, 1차 백신화 시리즈 후에는 참가자가 없었던 것과 대조적으로 그룹 B2에서 1명의 참가자에 의해 3개 사건(두통, 병감, 및 근육 통증)이 보고되었다. 부스터 후, 전신 반응은 본질적으로 일시적이었으며, 2.0일의 기간을 갖는 근육 통증을 제외하고는 모든 사건의 경우에 1.0일의 중앙값 기간을 가졌다. 모든 전신 반응은 또한 1차 백신화 시리즈 후에 짧았고, 모든 사건의 경우에 1.0일의 중앙값 기간을 가졌다.

[0586] 국소 및 전신 반응원성 사건은 1차 백신화 시리즈 또는 부스터 용량 이후 더 젊은 성인(≥ 18 내지 ≤ 59세 연령)과 비교하여 나이 많은 어른(≥ 60 내지 ≤ 84세 연령)에서 덜 빈번하고 덜 심각하였다. 더 젊은 코호트에서, 부스터-후 국소 및 전신 반응은 각각 참가자의 84.9%(18.9% ≥ 등급 3) 및 84.9%(26.4% ≥ 등급 3)에서 보고되었고, 나이 많은 코호트에서는 각각 참가자의 79.5%(6.8% ≥ 등급 3) 및 66.7%(2.2% ≥ 등급 3)에서 보고되었다.

[0587] 응답되지 않은 부작용 사건은 활성-부스트된 참가자(그룹 B2), 위약-부스트된 참가자(그룹 B1), 및 연구 전반에 3가지 용량의 위약을 받은 참가자(그룹 A)에 걸쳐서 요약되었다. 부스터 후 28일 동안, 처음에 1차 백신화 시리즈에서 활성 백신을 받은참가자(그룹 B2 및 B1)는 위약만을 받은 참가자(그룹 A)보다 응답되지 않은 부작용 사건의 발병을 더 많이 경험하였고, 각각 12.4%, 12.7%, 및 11.0%의 참가자가 이러한 사건을 보고하였다. 유사한 경향이 응답되지 않은 중증 부작용 사건에 대해서도 보였다(각가 5.7%, 3.9%, 및 2.4%). 보고된 다른 타입의 AE는 의료진이 검진한 AE(건강돌봄 방문을 필요로 하는 사건; MAAE), 잠재적인 면역-매개성 의학적 증상(PIMMC), COVID 19와 관련된 사건, 및 심각한 부작용 사건(SAE)을 포함하였다.

[0588] 전체적으로, MAAE는 3가지 그룹에 걸쳐서 활성 부스트된 참가자에서 약간 더 높은 빈도로 일어났고(그룹 B2, B1, 및 A에 대해 각각 30.5%, 26.1%, 및 23.2%), 관련 사건이 일부 참가자에서 보고되었다(각각 1.9%, 0%, 및 1.2%). PIMMC로 간주되는 사건은 연구에 걸쳐서 드물었고, 그룹 B2 및 그룹 A에서 1명의 참가자가 각각 단일 사건을 보고하였다; 양쪽 사건은 연구 치료와 무관한 것으로 평가되었다. COVID-19와 연관된 부작용 사건을 보고한 참가자는 없었다.

[0589] SAE는 또한 연구에 걸쳐서 빈번하지 않았으며, 그룹 B2, B1, 및 A에서 각각 5.7%, 3.3%, 및 1.6%의 참가자에서 일어났고, 모든 사건은 연구 치료와 무관한 것으로 평가되었다.

[0590] 그룹 B2 및 B1 참가자에 대한 SAE의 평가는 활성 부스트와 상관관계를 보이지 않았는데, 그 이유는 SAE는 용량 1, 용량 2, 및 부스터 이후에 각각 그룹 B2에서 참가자의 0%, 4.8%, 및 1.0% 및 그룹 B1에서 참가자의 0%, 2.0%, 및 2.0%에서 일어났기 때문이다.

[0591] 그룹 B에서 IgG 및 MN50 기하 평균 역가(GMT)의 하락이 1차 백신화 시리즈(35일) 이후 189일까지 관찰되었다(각각 IgG의 경우 43,905 ELISA 유닛[EU]에서 6,064 EU으로, 그리고 MN50의 경우 1,470에서 63으로). 부스터 후 28일(217일)에, IgG 및 MN50 역가는 1차 시리즈에 의해 생성된 부스터-전 역가 및 35일 역가 모두와 비교하여 강하게 증가되었다(**도 70**, **도 71**).

[0592] 선조형 SARS-CoV-2 바이러스주의 경우, 혈청 IgG GMT는 1차 백신화 시리즈(35일) 후 43,905 EU로부터 부스터(217일) 후 204,367 EU로 ~4.7배 증가하였다. 더 젊은 성인(4.1배)과 비교하여 나이 많은 성인(5.1배)에서 부스트 후 더 높은 배수 증가가 보였다. 유사하게, 선조형 SARS-CoV-2 바이러스주에 특이적인 MN50 에세이 GMT는

동일한 해당 시점에 걸쳐서 1,470에서 6,023으로 ~4.1배 증가하였고, 나이 많은 및 더 젊은 어른에서의 증가는 각각 4.0배 및 3.8배였다.

[0593] 베타 변이체의 경우, IgG GMT는 부스터-전 189일에 4,317 EU로부터 부스터-후 217일에 175,190 EU로 증가하였으며, 이는 ~40.6배 증가를 나타낸다. 상기 역가는 선조형 바이러스주에 대해 35일에 관찰된 것보다 4배 더 높았다(GMT 175,190 EU 대 43,905 EU). 베타 변이체 MN50 에세이 데이터는 부스터-전(189일)에서 부스터-후(217일)로 역가에서 ~50.1배(GMT 13 대 661)의 유사한 배수 증가를 보였지만, 역가는 35일에 선조형 바이러스주에 대해 보인 것보다 더 낮았다(GMT 661 대 1,470)(표 20, 표 21).

[0594] 35일(그룹 B) 및 217일(그룹 B2)의 참가자 혈청을 이용하여 추가로 SARS-CoV-2 변이체에 대한 면역 반응을 평가하기 위한 2가지 에세이를 개발하였다. 기능적 hACE2 억제 에세이를 이용하여 SARS-CoV-2의 선조형 바이러스주(서열번호 1과 비교하여 D614G 돌연변이를 갖는 CoV S 폴리펩티드를 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스) 및 델타, 베타, 알파, 및 오미크론 변이체에 대한 활성을 비교하였다. 해당 순서로, hACE2 억제 역가에서 6배, 6.6배, 10.8배, 8.1배, 및 19.9배 증가가 관찰되었다(표 24, 표 25, **도 67a** 내지 **도 67d**). **도 67d**는 청소년에서 hACE2 억제 역가를 보여준다. SARS-CoV-2의 동일한 바이러스주에 걸친 항-rS IgG 활성을 포함하는 2번째 에세이는 5.4배(선조형), 11.1배(델타), 6.5배(베타), 9.7배(알파), 및 9.34배(오미크론) 더 높은 역가가 부스터 후에 관찰되었음을 밝혔다(표 22, 표 23, **도 66a** 및 **도 66b**).

[0595] 결과: 1차 2-용량 시리즈 후 대략 6개월에 단일 부스터 용량의 백신의 투여는 반응원성 사건에서의 점진적인 증가와 함께 현저하게 향상된 면역원성을 야기하였다.

[0596] 189일에 부스트하기 전에, 면역화된 참가자에서 항-SARS-CoV-2 항체 역가는 35일에 1차 백신화 시리즈 후 취한 샘플과 비교할 때 두드러지게 더 낮았다(그룹 B IgG 및 MN_{50} GMT는 각각 43,905 EU로부터 6,064 EU로, 및 1,470으로부터 63으로 낮아짐). 중화 항체의 존재는 징후가 있는 COVID-19에 대한 보호를 강하게 시사한다.

[0597] 본 연구에서, 상기 부스터에 대한 항체 반응을 선조형 백신 바이러스주뿐만 아니라 알파, 베타, 및 델타를 포함하는 보다 최근의 SARS-CoV-2 변이체에 대해 평가하였다. 선조형 바이러스주의 경우, 217일에 IgG 역가는 부스터-전인 189일의 역가보다 대략 34배 더 높았지만, 중화 항체 역가는 부스터 후 대략 96배 증가하였다. 부스터 후 IgG 및 MN 역가는 모두 35일에 1차 2-용량 시리즈 후 보이는 것보다 > 4배 더 높았는데, 35일 역가는 UK 3상 연구(89.7%)뿐만 아니라 USA/멕시코 3상 연구(90.4%) 모두에서 높은 레벨의 임상 효능에 해당하기 때문에 주목할만하다. 연령 그룹으로 나눌 때, 더 젊은 성인(≥ 18 내지 ≤ 59세 연령)과 비교하여 나이 많은 성인(≥ 60 내지 ≤ 84세 연령)의 경우에 더 높은 배수 증가가 보였다. 상기 소견은 1차 2-용량 백신화 시리즈 후 그 항체 반응이 더 젊은 성인에서 보이는 것보다 더 낮기 때문에, 나이 많은 성인에서 부스터 용량을 추가하는 것이 이점이 있을 수 있음을 제시한다.

[0598] 베타 변이체의 경우, 부스터 후 IgG 및 MN 항체 역가에서 40 내지 50배 증가가 보였으며, IgG 역가는 1차 백신화 시리즈 후 선조형 바이러스주의 경우에 보이는 것보다 대략 4배 더 높았다. IgG에서의 관찰과 달리, 베타 변이체에 대한 MN_{50} GMT는 상기 변이체에 대해 알려진 감소된 중화 반응과 동일선 상에서 1차 백신화 시리즈 후 선조형 바이러스주에 대한 경우보다 부스터 후에 더 낮았다(GMT 661 대 1,470).

[0599] SARS-CoV-2의 델타 및 오미크론 변이체의 경우, 부스터-후 217일 역가와 35일 역가를 비교하였을 때 기능적 hACE2 억제 역가에서6.6배(델타) 및 19.9배(오미크론) 증가를 보였다. 상기 동일 시점에서 비교한 항-rS IgG 활성은 부스터와 연관되어 9.7배(델타) 및 9.34배(오미크론) 더 높은 역가가 나타났다.

[0600] 국소 및 전신 반응원성 모두의 발병은 이전의 용량과 비교하여 4개월 부스터 용량 후에 더 높았으며, 이는 제3 용량에서 보인 증가된 면역원성을 반영한다. 그러나, 등급 3 또는 더 높은 사건의 발병은 상대적으로 낮게 남아 있었고, 단지 피로(12.2%)만 참가자의 10% 이상에서 기록되었다. 종합적으로, 5 건의 (잠재적으로 생명을 위협하는) 등급 4의 응답된 국소 및 전신 부작용 사건이 보고되었다. 상기 5 건의 사건(통증, 압통, 두통, 병감, 및 근육 통증)은 모두 활성 부스터 그룹의 동일한 참가자에 의해 보고되었고, 백신과 연관된 약물 과민반응의 부작용 사건과 함께였다. 상기 약물 과민반응 사건은 증세가 약한 것으로 평가되었다. 상기 참가자는 상기 사건에 대해 어떠한 의학적 주의도 추구하지 않았고, 모든 참가자의 징후는 6일의 기간 동안 해결되었다.

[0601] 표 26은 서열번호 1, SARS-CoV-2 델타 변이체, 또는 SARS-CoV-2 오미크론 변이체와 비교하여 D614G 돌연변이를 갖는 SARS-CoV-2 바이러스의 99%의 중화에 대한 기하 평균 역가를 보여준다. 도 72는 D614G 돌연변이를 함유하는 SARS-CoV-2 바이러스주, B.1.617.2(델타 변이체), 및 B. 1.1.529(오미크론 변이체)에 대한 실시예 11의

BV2373 및 사포닌 어주번트를 포함하는 면역원성 조성물의 중화 항체 99(neut99) 값을 보여준다.

[0602] 전체적으로, 1차 시리즈 후 대략 6개월에 투여된 BV2373 및 사포닌 어주번트의 단일 부스터 용량은 2개의 3상 연구에서 높은 레벨의 효능과 연관된 항체 역가보다 > 4배 더 높은 체액성 항체에서의 상당한 증가를 유도하였면서, 또한 허용가능한 안전성 프로필을 나타내었다. 상기 소견은 부스터 프로그램에 상기 백신을 사용하는 것을 뒷받침한다.

표 19

[0603] **그룹 A, B1, 및 B2에 대한 인구통계 및 기준선 특징**

파라미터	**그룹 A** **N = 172**	**그룹 B1** **N = 102**	**그룹 B2** **N = 105**
연령 (년)			
평균 (SD)	51.9 (17.23)	52.0 (16.99)	51.7 (17.12)
중앙값	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 아프리카계 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)
다중	2 (1.2)	1 (1.0)	1 (1.0)
누락	0	1 (1.0)	0
민족 (n [%])			
히스패닉 또는 라틴계	11 (6.4)	3 (2.9)	1 (1.0)
비-히스패닉 또는 라틴계	161 (93.6)	97 (95.1)	104 (99.0)
미상	0	2 (2.0)	0
기준선 BMI (kg/m²)			
평균 (SD)	27.29 (4.207)	26.69 (4.060)	27.43 (4.040)
중앙값	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

[0604] BMI = 신체 질량 지수; SARS-CoV-2 = 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2; SD = 표준 편차

[0605] A = 0일, 21일, 및 189일에 위약

[0606] B1 = 0일 및 21일에 5 ㎍의 BV2373 + 50 ㎍ 사포닌 어주번트 및 189일에 위약

[0607] B2 = 0일, 21일, 및 189일에 5 ㎍의 BV2373 + 50 ㎍ 사포닌 어주번트

[0608] 1 안전성 분석 세트에서의 참가자는 치료 오차를 수용하기 위하여 받은 치료에 따라 계수된다.

표 20

[0609] **BV2373 및 사포닌 어주번트를 받은 참가자에 대해 연구일까지 선조형 및 베타 변이체 SARS-CoV-2 바이러스주에 대한 1차 및 부스터 백신화 후의 혈청 IgG 기하 평균 역가**

연령 그룹	혈청 IgG GMT (EU [95% CI])				
	35일 선조형 바이러스주	189일 선조형 바이러스주	217일 선조형 바이러스주	189일 베타 변이체	217일 베타 변이체
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)

[0610] CI = 신뢰 구간; ELISA = 효소-결합 면역흡착 에세이; EU = ELISA 단위; GMT = 기하 평균 역가

표 21

[0611] **BV2373 및 사포닌 어주번트를 받은 참가자에 대해 연구일까지 선조형 및 베타 변이체 SARS-CoV-2 바이러스주에 대한 1차 및 부스터 백신화 후 중화 항체 활성**

연령 그룹	MN_{50} GMT (95% CI)				
	35일 선조형 바이러스주	189일 선조형 바이러스주	217일 선조형 바이러스주	189일 베타 변이체	217일 베타 변이체
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)

[0612] CI = 신뢰 구간; GMT = 기하 평균 역가; MN_{50} = 억제 농도 >50%에서 미세중화 에세이

표 22

[0613] **시간에 따른 항-CoV S IgG**

	항-rS BV2373 역가 (EC50) (서열번호 1과 비교하여 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)				항-rS BV2509 (EC50) (오미크론)	
	D0	D35	D189	D217	D0	D35	D189	D217	D0	D35	D189	D217	D0	D35	D189	D217	D35	D217
GMT	166	60742	5361	327758	156	26097	3143	290782	161	40416	4066	264321	156	24333	2739	235145	111119	103800
낮은 95%CI	134	42176	3782	225862	144	17501	1952	195349	139	28091	2767	177965	143	15234	1777	152897	7668	67398
낮은 95%CI	206	87481	7599	475623	169	38916	5059	432836	188	58147	5975	392582	171	38865	4223	361636	16121	159860

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: 9.34 (CI - 8.79 - 9.91)
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)	GMFR: 73.5 (CI-38.5-140.2)

표 23

[0614] BV2373 및 사포닌 어주번트를 받은 참가자에 대해 연구일까지 선조형 및 변이체 SARS-CoV-2 바이러스주에 대한 1차 및 부스터 백신화 후의 항-rS IgG 기하 평균 역가

파라미터	항-rS IgG 활성 (EC_{50})									
	선조형		델타		베타		알파		오미크론	
	35일	217일	35일	217일	35일	217일	35일	217일	35일	217일
GMT (95% CI)	60,742 (42,176, 87,481)	327,758 (225,862, 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)	11,119 (7,668, 16,121)	103,800 (67,398, 159,860)
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)		9.34 (8.79, 9.91)	

[0615] 항-rS IgG = 항-재조합 스파이크 면역글로불린 G 항체; CI = 신뢰 구간; GMFR = 기하 평균 배수 상승; GMT = 기하 평균 역가; SARS-CoV-2 = 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2

표 24

[0616] 시간에 따른 50% hACE2 억제 역가

	항-rS BV2373 RI 역가 (서열번호 1과 비교하여 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)				항-rS BV2509 RI 역가 (EC50) (오미크론)		
	D0	D35	D189	D217	D0	D35	D189	D217	D0	D35	D189	D217	D0	D35	D189	D217	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	14.5	10.66	214
낮은 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	11.2	9.52	140.2
낮은 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	18.7	11.93	326.8
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 : 14.8 (CI - 7.74 - 21.37)		
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)				GMFR : 20.1 (CI - 10.56 - 29.25)		

표 25

[0617] BV2373 및 사포닌 어주번트를 받은 참가자에 대해 연구일까지 선조형 및 변이체 SARS-CoV-2 바이러스주에 대한

1차 및 부스터 백신화 후의 hACE2 억제 기하 평균 역가

파라미터	hACE2 억제 역가 (IC_{50})									
	선조형		델타		베타		알파		오미크론	
	35일	217일	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)	9.35 (6.326, 13.83)	186.6 (116.4, 299.2)
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)		19.95 (18.4, 21.6)	

[0618] CI = 신뢰 구간; GMFR = 기하 평균 배수 상승; GMT = 기하 평균 역가; hACE2 = 인간 안지오텐신-전환 효소 2; SARS-CoV-2 = 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2

표 26

[0619] **D614G 돌연변이를 갖는 SARS-CoV-2 바이러스, B.1.617-2 델타 변이체, 및 SARS-CoV-2 오미크론 변이체를 이용한 중화에 대한 기하 평균 역가**

	D614G 돌연변이를 갖는 SARS-CoV-2 바이러스 Neut99 역가		델타 Neut99 역가 (B.617.2)		오미크론 Neut99 역가 (B.1.529)	
	D35	D217	D35	D217	D35	D217
GMT	853	13123	331.6	4629	231.9	823.2
낮은 95%CI	490.2	7619	212	2961	169.4	530.8
높은 95%CI	1484	22603	518.5	7236	317.7	1277
GMFR (D35-D217)	GMFR : 15.4 (CI - 15.5 - 15.2)		GMFR : 13.9 (CI - 13.95 - 13.96)		GMFR : 3.6 (CI - 3.13 - 4.0)	

[0620] **실시예 12**

[0621] **(i) BV2373, BV2509, 또는 이들의 조합 및 (ii) 사포닌 어주번트를 함유하는 조성물은 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주에 대한 보호성 면역 반응을 유도한다.**

[0622] *목적 및 방법:* 사포닌 어주번트와 조합하여 재조합 CoV 스파이크(rS) 단백질 BV2509(서열번호 175), BV2373(서열번호 87), 또는 이들 모두를 함유하는 조성물의 면역원성 및 생체내 보호를 평가하였다. 상기 사포닌 어주번트는 2 종의 이스콤 입자를 함유하였으며, 여기서 제1 이스콤 입자는 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A는 포함하지만 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 포함하지 않는다; 제2 이스콤 입자는 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 포함하지만 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A는 포함하지 않는다. 상기 어주번트에서 분획 A 및 분획 C는 각각 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량의 합의 85% 및 15 중량%를 차지한다. 각각의 조성물은 5 ㎍의 사포닌 어주번트를 함유하였다. 마우스를 0일 및 14일에 전술한 조성물로 면역시켰다. 상기 rS 단백질을 0.1 ㎍의 용량 또는 1 ㎍의 용량으로 투여하였다.

[0623] 면역화 후 28일에, 미세중화 에세이를 위해 마우스로부터 혈청을 수집하였다. 혈청 중화 에세이를 위한 프로토콜은 아래에 있다.

[0624] *혈청 미세중화 에세이.* 혈청 샘플을 56℃에서 30분 동안 열 불활성화시켜 보체를 제거하였고, 중화 역가를 위한 처리 전에 실온으로 평형화되게 하였다. 샘플을 10% (v/v) 소 태아 혈청(열 불활성화됨, Sigma), 1% (v/v) 페니실린/스트렙토마이신(Gemini Bio-제품), 및 1% (v/v) L-글루타민(2 mM 최종 농도, Gibco)로 보충된 DMEM(Quality Biological)에서 연속적으로 희석하였다. 이후, 희석 플레이트를 BSL-3 실험실로 운송하였고, 100 ㎕의 SARS CoV-2 변이체(즉, 오미크론 BA1 변이체, 델타 변이체, 또는 WA1 변이체)를 각각의 웰에 첨가하여 96-웰 적정 플레이트로 전달시 0.01의 감염의 다중도(MOI)를 야기하였다. 비-처리된 바이러스-단독 대조군을 모든

플레이트에 포함시켰다. 이후, 샘플/바이러스 혼합물을 37℃(5.0% CO_2)에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 가득 찬 VeroE6 세포를 갖는 96-웰 적정 플레이트로 전달하였다. 적정 플레이트를 37℃(5.0% CO_2)에서 72시간 동안 인큐베이션하였고, 이어서 플레이트 내의 각각의 웰에 대한 세포변성 효과(CPE)를 결정하였다. CPE를 보여주는 첫번째 샘플 희석은 테스트된 SARS-CoV-2의 농도의 > 99%를 중화시키기 위해 필요한 최소 샘플 희석(neut99)으로 기록하였고, 도면에 100%로 표현하였다.

[0625] *결과:* 도 73은 대조군 조성물과 비교하여, rS 단백질을 함유하는 조성물이 오미크론 BA1 변이체, 델타 변이체, 및 WA1 변이체를 중화시켰음을 보여준다. (i) BV2509 및 BV2373의 조합 또는 (ii) BV2509 단독을 함유하는 조성물은 (iii) BV2373 단독을 함유하는 조성물보다 뛰어나게 오미크론 바이러스주를 중화시켰다. (i) BV2509 및 BV2373의 조합 또는 (ii) BV2373 단독을 함유하는 조성물은 (iii) BV2509 단독을 함유하는 조성물보다 뛰어나게 델타 바이러스주를 중화시켰다.

[0626] 면역화 후 28일에, 마우스를 SARS-CoV-2 오미크론 BA1 변이체 또는 SARS-CoV-2 WA1 변이체로 챌린지하였다. 도 74a 및 도 74b는 SARS CoV-2 오미크론 BA1 변이체(도 74a) 또는 WA1 변이체(도 74b)로 챌린지한 후 2일에 마우스 폐에서의 바이러스 부하를 보여준다. 각각의 조성물은 위약과 비교하여 바이러스 부하를 감소시켰다.

[0627] **실시예 13**

[0628] **SARS-CoV-2 S 단백질 발현 및 정제 방법의 평가**

[0629] 목적: SARS-CoV-2 S 단백질 발현 및 정제의 상이한 방법을 평가한다. 각각의 방법에 의해 생산된 SARS-CoV-2 S 단백질의 순도 및 수율을 평가한다. 임의적으로, 정제된 S-단백질은 Gel-Code Blue 시약(Pierce, Rockford, IL)으로 염색된 4-12% 구배 SDS-PAGE에 의해 평가하고, 순도는 OneDscan 시스템(BD Biosciences, Rockville, MD)을 이용한 주사 농도계에 의해 결정한다.

[0630] 방법 1: SARS-CoV-2 S 단백질을 Sf9 세포에서 생산한다. 간략하게, 세포를 혈청-부재 배지에서 확장하고, 재조합 바큘로바이러스로 감염시킨다. 세포를 27±2℃에서 배양하고, 감염-후 68-72시간에 원심분리(4000×g에서 15분 동안)에 의해 수확한다. 세포 펠렛을 25 mM Tris HCl(pH 8.0), 50 mM NaCl 및 0.5-1.0% (v/v) 폴리옥시에틸렌 노닐페놀(NP-9, TERGITOL®) 류펩틴을 갖는 NP-9에 현탁시킨다. S-단백질을 NP-9 세제를 함유하는 Tris 버퍼를 이용해 원형질 막으로부터 추출하고, 10,000×g에서 30분 동안 원심분리함으로써 투명하게 한다. S-단백질을 TMAE 음이온 교환 및 렌틸 렉틴 친화성 크로마토그래피에 의해 정제한다. 중공 섬유 접선 유동 여과를 사용하여 25 mM 인산나트륨(pH 7.2), 300 mM NaCl, 0.02% (v/v) 폴리소르베이트 80(PS 80)에서 100-150 ㎍/㎖로 정제된 SARS-CoV-2 S 단백질을 제형화한다.

[0631] 방법 2: SARS-CoV-2 S 단백질을 발현하는 재조합 바이러스를 Sf9 곤충 세포의 감염에 의해 증폭한다. 곤충 세포의 배양물을 바큘로바이러스를 이용해 ~3.0 MOI(감염의 다중도 = 바이러스 ffu 또는 pfu/세포)로 감염시킨다. 상기 배양물 및 상등액을 감염-후 48-72시간에 수확한다. 대략 30 ㎖의 미정제 세포 수확물을 대략 800×g에서 15분 동안 원심분리함으로써 투명하게 한다. 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질을 함유하는 생성된 미정제 세포 수확물을 나노입자로서 정제한다. 나노입자를 생산하기 위하여, 비이온성 계면활성제인 TERGITOL® 노닐페놀 에톡실레이트 NP-9를 막 단백질 추출 프로토콜에 사용한다. 미정제 추출물을 음이온 교환 크로마토그래피, 렌틸 렉틴 친화도/HIC 및 양이온 교환 크로마토그래피를 통해 통과시킴으로써 추가로 정제한다. 세척된 세포를 세제 처리에 의해 용해한 후, 낮은 pH 처리를 거쳐서 BV 및 Sf9 숙주 세포 DNA 및 단백질의 침전을 유도한다. 중화된 낮은 pH 처리 용해물을 투명하게 하고, 음이온 교환 및 친화성 크로마토그래피 상에서 추가로 정제한 후, 제2 낮은 pH 처리를 수행한다. 친화성 크로마토그래피를 사용하여 Sf9/BV 단백질, DNA 및 NP-9를 제거하고, 또한 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질을 농축한다. 간략하게, 렌틸 렉틴은 폴리사카라이드 및 글루코오스 또는 만노오스를 함유하는 글리코실화 단백질에 가역적으로 결합하는 칼슘 및 망간을 함유하는 금속단백질이다. 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질-함유 음이온 교환 통과 분획을 렌틸 렉틴 친화성 크로마토그래피 수지(Capto Lentil Lectin, GE Healthcare)에 로딩한다. 글리코실화 코로나바이러스 스파이크(S) 단백질은 상기 수지에 선택적으로 결합하지만, 비-글리코실화 단백질 및 DNA는 컬럼 통과시에 제거된다. 약하게 결합된 당단백질은 높은 염 및 낮은 몰 농도의 메틸 알파-D-만노피라노시드(MMP)를 함유하는 버퍼에 의해 제거된다

[0632] 또한, 컬럼 세척물을 사용하여 NP-9 세제를 계면활성제 폴리소르베이트 80(PS80)으로 세제 교환한다. 코로나바이러스 스파이크(S) 폴리펩티드는 고농도의 MMP를 이용한 렌틸 렉틴 컬럼으로부터 나노입자 구조로 용출된다.

[0633] 방법 3: SARS-CoV-2 S 단백질을 발현하는 재조합 바이러스를 Sf9 곤충 세포의 감염에 의해 증폭한다. 곤충 세포

의 배양물을 바큘로바이러스를 이용해 ~0.6 MOI(감염의 다중도 = 바이러스 ffu 또는 pfu/세포)로 감염시킨다. 상기 배양물 및 상등액을 감염-후 48-72시간에 수확한다. 세포 펠렛을 25 mM Tris HCl(pH 8.0), 50 mM NaCl 및 0.5-1.0% (v/v) 폴리옥시에틸렌 노닐페놀(NP-9, TERGITOL®) 류퀍틴을 갖는 NP-9에 현탁시킨다. 상기 배양물 및 상등액을 감염-후 48-72시간에 수확한다. 대략 30 mℓ의 미정제 세포 수확물을 대략 800×g에서 20분 동안 원심분리함으로써 투명하게 한다. S-단백질을 TMAE 음이온 교환 및 렌틸 렉틴 친화성 크로마토그래피에 의해 정제한다. TMAE 음이온 교환 크로마토그래피를 위한 부하 pH는 8.0이고, 전도도는 7.4 mS/㎝이다. 렌틸 렉틴 크로마토그래피를 위한 평형 버퍼는 25 mM Tris, 50 mM NaCl, 0.02% NP-9, pH 8이다. 상기 SARS-CoV-2 S 단백질을 1.2 M MMP에 용출한다.

[0634] 방법 4: SARS-CoV-2 S 단백질을 발현하는 재조합 바이러스를 Sf9 곤충 세포의 감염에 의해 증폭한다. 곤충 세포의 배양물을 바큘로바이러스를 이용해 ~0.6 MOI(감염의 다중도 = 바이러스 ffu 또는 pfu/세포)로 감염시킨다. 상기 배양물 및 상등액을 감염-후 48-72시간에 수확한다. 세포 펠렛을 50 mM Tris HCl(pH 8.0), 50 mM NaCl 및 1.5% (v/v) 폴리옥시에틸렌 노닐페놀(NP-9, TERGITOL®) 류퀍틴을 갖는 NP-9에 현탁시킨다. 상기 배양물 및 상등액을 감염-후 48-72시간에 수확한다. 대략 30 mℓ의 미정제 세포 수확물을 대략 800×g에서 20분 동안 원심분리함으로써 투명하게 한다. S-단백질을 TMAE 음이온 교환 및 렌틸 렉틴 친화성 크로마토그래피에 의해 정제한다. TMAE 음이온 교환 크로마토그래피를 위한 부하 pH는 7.9이고, 전도도는 7.3 mS/㎝이다. 렌틸 렉틴 크로마토그래피를 위한 평형 버퍼는 25 mM Tris, 50 mM NaCl, 0.02% NP-9, pH 8이다. 상기 SARS-CoV-2 S 단백질을 1.2 M MMP에 용출한다.

[0635] **구현예의 번호**

[0636] 1. (i) 불활성화된 퓨린 절단 부위를 갖는 S1 서브유닛; 및

[0637] (ii) 아미노산 973 및 974가 프롤린인 S2 서브유닛;을 포함하는 코로나바이러스(CoV) 스파이크(S) 당단백질로서,

[0638] 상기 S1 서브유닛은 N-말단 도메인(NTD), 수용체 결합 도메인(RBD), 하위도메인 1 및 2(SD1/2)를 포함하고, 상기 불활성화된 퓨린 절단 부위는 QQAQ(서열번호 7)의 아미노산 서열을 갖고;

[0639] 여기서, 상기 NTD는 임의적으로

[0640] (a) 아미노산 11-14, 56, 57, 130, 131, 132, 144, 145, 198, 199, 228, 229, 230, 231, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 결실;

[0641] (b) 아미노산 5, 6, 7, 11, 12, 13, 14, 51, 53, 54, 56, 57, 62, 63, 67, 70, 82, 125, 129, 131, 132, 133, 134, 139, 143, 144, 145, 170, 177, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 209, 229, 233, 239, 240, 244, 245, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이; 및

[0642] (c) 아미노산 214 및 215 사이에 EPE의 아미노산 서열을 갖는 트리퍱티드의 삽입;으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 포함하고;

[0643] 상기 RBD는 임의적으로 아미노산 326, 333, 355, 358, 360, 362, 363, 392, 395, 404, 419, 426, 427, 431, 432, 433, 439, 440, 447, 464, 465, 471, 473, 477, 480, 481, 483, 485, 488, 492, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이를 포함하고;

[0644] 상기 SD1/2 도메인은 임의적으로 534, 557, 591, 600, 601, 626, 642, 645, 664, 666, 668, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이를 포함하고; 및

[0645] 상기 S2 서브유닛은 임의적으로

[0646] (a) 676-685, 676-702, 702-711, 775-793, 806-815 및 이들의 조합으로부터의 하나 이상의 아미노산의 결실;

[0647] (b) 688, 691, 703, 751, 783, 843, 846, 875, 937, 941, 956, 968, 969, 1014, 1058, 1105, 1163, 1186 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이; 및

[0648] (c) TMCT로부터의 하나 이상의 아미노산의 결실;로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변형을 포함하고;

[0649] 여기서, 상기 CoV S 당단백질의 아미노산은 서열번호 2의 서열을 갖는 폴리퍱티드에 관해 번호가 지정되는 코로나바이러스 S 당단백질.

[0650] 2. 구현예 1에 있어서, 아미노산 676-685의 결실을 포함하는 코로나바이러스 S 당단백질.

[0651] 3. 구현예 1에 있어서, 아미노산 702-711의 결실을 포함하는 코로나바이러스 S 당단백질.

[0652] 4. 구현예 1에 있어서, 아미노산 806-815의 결실을 포함하는 코로나바이러스 S 당단백질.

[0653] 5. 구현예 1에 있어서, 아미노산 775-793의 결실을 포함하는 코로나바이러스 S 당단백질.

[0654] 6. 구현예 1에 있어서, 상기 NTD의 아미노산 1-292의 결실을 포함하는 코로나바이러스 S 당단백질.

[0655] 7. 구현예 1에 있어서, 상기 막통과 및 세포질 꼬리(TMCT)의 아미노산 1201-1260의 결실을 포함하는 코로나바이러스 S 당단백질.

[0656] 8. 구현예 1에 있어서, 서열번호 85-89, 105, 106, 및 112-115로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 코로나바이러스 S 당단백질.

[0657] 9. 구현예 1 내지 구현예 8 중 어느 하나에 있어서, 신호 펩티드를 포함하고, 임의적으로 상기 신호 펩티드는 서열번호 5 또는 서열번호 117의 아미노산 서열을 포함하는 코로나바이러스 S 당단백질.

[0658] 10. 구현예 1 내지 구현예 9 중 어느 하나에 있어서, C-말단 융합 단백질을 포함하는 코로나바이러스 S 당단백질.

[0659] 11. 구현예 10에 있어서, 상기 C-말단 융합 단백질은 헥사히스티딘 태그인 코로나바이러스 S 당단백질.

[0660] 12. 구현예 10에 있어서, 상기 C-말단 융합 단백질은 폴돈인 코로나바이러스 S 당단백질.

[0661] 13. 구현예 12에 있어서, 상기 폴돈은 서열번호 68에 해당하는 아미노산 서열을 갖는 코로나바이러스 S 당단백질.

[0662] 14. 구현예 1 내지 구현예 13 중 어느 하나에 있어서, 상기 ΔHca1은 야생형 CoV S 당단백질(서열번호 2)의 ΔHca1보다 적어도 2배 더 큰 코로나바이러스 S 당단백질.

[0663] 15. 구현예 1 내지 구현예 14 중 어느 하나에 있어서, 각각의 S2 서브유닛, NTD, RBD, 및 SD1/2는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 당단백질의 해당 서브유닛 또는 도메인과 95% 동일한 코로나바이러스 S 당단백질.

[0664] 16. 구현예 1 내지 구현예 14 중 어느 하나에 있어서, 각각의 S2 서브유닛, NTD, RBD, 및 SD1/2는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 당단백질의 해당 서브유닛 또는 도메인과 97% 동일한 코로나바이러스 S 당단백질.

[0665] 17. 구현예 1 내지 구현예 14 중 어느 하나에 있어서, 각각의 S2 서브유닛, NTD, RBD, 및 SD1/2는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 당단백질의 해당 서브유닛 또는 도메인과 99% 동일한 코로나바이러스 S 당단백질.

[0666] 18. 구현예 1 내지 구현예 14 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 S2 서브유닛, NTD, RBD, 및 SD1/2는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CoV S 당단백질의 해당 서브유닛 또는 도메인과 99.5% 동일한 코로나바이러스 S 당단백질.

[0667] 19. 구현예 1 내지 구현예 18 중 어느 하나의 S 당단백질을 암호화하는 단리된 핵산.

[0668] 20. 구현예 19의 핵산을 포함하는 벡터.

[0669] 21. 구현예 1 내지 구현예 18 중 어느 하나의 코로나바이러스 S 당단백질을 포함하는 나노입자.

[0670] 22. 구현예 21에 있어서, 상기 나노입자는 약 20 nm 내지 약 35 nm의 Zavg 직경을 갖는 나노입자.

[0671] 23. 구현예 21에 있어서, 상기 나노입자는 약 0.2 내지 약 0.45의 다분산도 지수를 갖는 나노입자.

[0672] 24. 구현예 1 내지 구현예 18 또는 구현예 76 내지 구현예 78 중 어느 하나의 코로나바이러스 S 당단백질을 발현하는 세포.

[0673] 25. 구현예 1 내지 구현예 18 또는 구현예 76 내지 구현예 78의 하나 이상의 코로나바이러스 S 당단백질 및 약학적으로 허용가능한 버퍼를 포함하는 면역원성 조성물.

[0674] 26. 구현예 25에 있어서, 어주번트를 포함하는 면역원성 조성물.

[0675] 27. 구현예 26에 있어서, 상기 어주번트는 적어도 2 종의 이스콤 입자를 포함하며, 여기서

[0676] 제1 이스콤 입자는 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A는 포함하지만 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 포

함하지 않고; 및

[0677] 제2 이스콤 입자는 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 포함하지만 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A는 포함하지 않는 면역원성 조성물.

[0678] 28. 구현예 27에 있어서,

[0679] 상기 어주번트에서 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 각각 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량의 합의 약 85 중량% 및 약 15 중량%를 차지하거나; 또는

[0680] 상기 어주번트에서 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 각각 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량의 합의 약 92 중량% 및 약 8 중량%를 차지하는 면역원성 조성물.

[0681] 29. 구현예 27에 있어서, 상기 어주번트에서 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 각각 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량의 합의 약 92 중량% 및 약 8 중량%를 차지하는 면역원성 조성물.

[0682] 30. 구현예 27에 있어서, 상기 어주번트에서, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량의 합 중, 각각, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A가 적어도 약 85 중량%를 차지하고, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C가 나머지를 차지하는 면역원성 조성물.

[0683] 31. 구현예 25 내지 구현예 30 중 어느 하나에 있어서, 1 내지 약 10가지 코로나바이러스 S 당단백질, 예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10가지 코로나바이러스 S 당단백질을 포함하는 면역원성 조성물.

[0684] 32. 구현예 27에 있어서, 서열번호 87의 아미노산 서열을 갖는 제1 CoV S 당단백질을 포함하는 면역원성 조성물.

[0685] 33. 구현예 25 내지 구현예 32 중 어느 하나에 있어서, 서열번호 186, 188, 190, 192, 195, 174, 및 175 중 어느 하나와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CoV S 당단백질을 포함하는 면역원성 조성물.

[0686] 34. 구현예 26에 있어서, 상기 어주번트는 약 50 ㎍의 용량으로 투여되는 면역원성 조성물.

[0687] 35. 구현예 25 내지 구현예 30 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물은 (i) 서열번호 87의 폴리펩티드와 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 제1 코로나바이러스 S 당단백질, 및 (ii) 서열번호 175의 폴리펩티드와 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 제2 코로나바이러스 S 당단백질을 포함하는 면역원성 조성물.

[0688] 36. 구현예 25 내지 구현예 30 중 어느 하나의 백신 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 SARS-CoV-2에 대한 면역 반응을 자극하는 방법.

[0689] 37. 구현예 31에 있어서, 상기 대상체는 0일에 제1 용량 및 21일에 부스트 용량이 투여되는 방법.

[0690] 38. 구현예 31에 있어서, 상기 대상체는 약 5 ㎍ 내지 약 25 ㎍의 코로나바이러스 S 당단백질이 투여되는 방법.

[0691] 39. 구현예 31에 있어서, 상기 대상체는 약 5 ㎍의 코로나바이러스 S 당단백질이 투여되는 방법.

[0692] 40. 구현예 31 내지 구현예 34 중 어느 하나에 잇어서, 상기 백신 조성물은 근육내로 투여되는 방법.

[0693] 41. 구현예 31, 구현예 33, 구현예 34, 및 구현예 35 중 어느 하나에 있어서, 단일 용량의 백신 조성물이 투여되는 방법.

[0694] 42. 구현예 31 내지 구현예 35 중 어느 하나에 있어서, 다수 용량의 백신 조성물이 투여되는 방법.

[0695] 43. 구현예 31 내지 구현예 37 중 어느 하나에 있어서, 상기 백신 조성물은 인프루엔자 당단백질과 공동투여되는 방법.

[0696] 44. (i) 서열번호 87의 아미노산 서열을 갖는 코로나바이러스 S(CoV S) 당단백질, 및 비이온성 세제 코어를 포함하는 나노입자;

[0697] (ii) 약학적으로 허용가능한 버퍼; 및

[0698] (iii) 어주번트;를 포함하는 면역원성 조성물.

[0699] 45. 구현예 44에 있어서, 약 3 ㎍ 내지 약 25 ㎍의 CoV S 당단백질을 포함하는 면역원성 조성물.

[0700] 46. 구현예 45에 있어서, 약 5 ㎍의 CoV S 당단백질을 포함하는 면역원성 조성물.

[0701] 47. 구현예 44에 있어서, 상기 어주번트는 사포닌 어주번트인 면역원성 조성물.

[0702] 48. 구현예 47에 있어서, 상기 사포닌 어주번트는 적어도 2 종의 이스콤 입자를 포함하며, 여기서

[0703] 제1 이스콤 입자는 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A는 포함하지만 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 포함하지 않고; 및

[0704] 제2 이스콤 입자는 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 포함하지만 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A는 포함하지 않는 면역원성 조성물.

[0705] 49. 구현예 48에 있어서, 상기 어주번트에서, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량의 합 중, 각각, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A가 50-96중량%를 차지히고, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C가 나머지를 차지하는 면역원성 조성물.

[0706] 50. 구현예 48에 있어서, 상기 어주번트에서 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 각각 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량의 합의 약 85 중량% 및 약 15 중량%를 차지하는 면역원성 조성물.

[0707] 51. 구현예 48에 있어서, 상기 어주번트에서 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 각각 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량의 합의 약 92 중량% 및 약 8 중량%를 차지하는 면역원성 조성물.

[0708] 52. 구현예 48에 있어서, 상기 어주번트에서, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량의 합 중, 각각 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A가 적어도 약 85 중량%를 차지하고, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C가 나머지를 차지하는 면역원성 조성물.

[0709] 53. 구현예 47에 있어서, 약 50 ㎍의 사포닌 어주번트를 포함하는 면역원성 조성물.

[0710] 54. 구현예 44에 있어서, 상기 비이온성 세제 코어는 폴리소르베이트-20(PS20), 폴리소르베이트-40(PS40), 폴리소르베이트-60(PS60), 폴리소르베이트-65(PS65), 및 폴리소르베이트-80(PS80)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 면역원성 조성물.

[0711] 55. 구현예 44 내지 구현예 54 중 어느 하나에 있어서, 부가적인 SARS-CoV-2 S 당단백질을 추가로 포함하는 면역원성 조성물.

[0712] 56. 구현예 44 내지 구현예 54 중 어느 하나에 있어서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10가지 부가적인 SARS-CoV-2 S 당단백질을 추가로 포함하는 면역원성 조성물.

[0713] 57. 구현예 44 내지 구현예 56 중 어느 하나에 있어서, 상기 부가적인 SARS-CoV-2 S 당단백질은 서열번호 186, 188, 190, 192, 195, 174, 및 175 중 어느 하나와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 하나 이상의 당단백질로부터 선택되는 면역원성 조성물.

[0714] 58. 구현예 25 내지 구현예 35 또는 구현예 44 내지 구현예 57 중 어느 하나의 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 SARS-CoV-2 또는 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주에 대한 면역 반응을 자극하는 방법.

[0715] 59. 구현예 58에 있어서, 약 3 ㎍ 내지 약 25 ㎍의 CoV S 당단백질을 포함하는 방법.

[0716] 60. 구현예 59에 있어서, 5 ㎍의 CoV S 당단백질을 포함하는 방법.

[0717] 61. 구현예 58에 있어서, 상기 면역원성 조성물은 사포닌 어주번트를 포함하는 방법.

[0718] 62. 구현예 61에 있어서, 상기 사포닌 어주번트는 적어도 2 종의 이스콤 입자를 포함하며, 여기서

[0719] 제1 이스콤 입자는 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A는 포함하지만 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 포함하지 않고; 및

[0720] 제2 이스콤 입자는 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 포함하지만 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A는 포함하지 않는 방법.

[0721] 63. 구현예 62에 있어서, 상기 어주번트에서, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량의 합 중, 각각, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A가 50-96중량%를 차지하고, 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C가 나머지를 차지하는 방법.

[0722] 64. 구현예 62에 있어서, 상기 어주번트에서 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C는 각각 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 A 및 퀼라자 사포나리아 몰리나의 분획 C의 중량의 합의 약 85 중량% 및 약 15 중량%를 차지하는 방법.

[0723] 65. 구현예 58에 있어서, 약 50 ㎍의 사포닌 어주번트를 포함하는 방법.

[0724] 66. 구현예 58에 있어서, 상기 비이온성 세제는 폴리소르베이트-20(PS20), 폴리소르베이트-40(PS40), 폴리소르베이트-60(PS60), 폴리소르베이트-65(PS65), 및 폴리소르베이트-80(PS80)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

[0725] 67. 구현예 58에 있어서, 상기 대상체는 0일에 제1 용량 및 21일에 부스트 용량이 투여되는 방법.

[0726] 68. 구현예 58에 있어서, 단일 용량의 면역원성 조성물이 투여되는 방법.

[0727] 69. 구현예 58에 있어서, 제1 면역원성 조성물과 상이한 제2 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

[0728] 70. 구현예 69에 있어서, 상기 제2 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 방법.

[0729] 71. 구현예 58에 있어서, 상기 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주는 Cal.20C SARS-CoV-2 바이러스주, P.1 SARS-CoV-2 바이러스주, B.1.351 SARS-CoV-2 바이러스주, B.1.1.7 SARS-CoV-2 바이러스주, 및 B.1.1.529 SARS-CoV-2 바이러스주로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

[0730] 72. 구현예 47에 있어서, 코로나바이러스 질환-19(COVID-19)를 예방하기 위한 면역원성 조성물의 효능은 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99% 이상인 방법.

[0731] 73. 구현예 47에 있어서, 코로나바이러스 질환-19(COVID-19)를 예방하기 위한 면역원성 조성물의 효능은 약 50% 내지 약 99%; 약 50% 내지 약 95%; 약 75% 내지 약 95%, 약 75% 내지 약 99%; 약 90% 내지 약 99%; 약 80% 내지 약 99%; 및 약 80% 내지 약 95%인 방법.

[0732] 74. 서열번호 87의 아미노산 서열을 갖는 코로나바이러스 S(CoV S) 당단백질, 및 비이온성 세제 코어를 포함하는 나노입자, 약학적으로 허용가능한 버퍼, 및 (iii) 사포닌 어주번트를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주에 대한 보호성 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 상기 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주는 서열번호 1의 스파이크 폴리펩티드를 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스주와 비교하여 약 1 내지 약 35개의 변형을 갖는 방법.

[0733] 75. 구현예 74에 있어서, 상기 이종성 SARS-CoV-2 바이러스주는 서열번호 1의 스파이크 폴리펩티드를 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스주와 비교하여 약 1 내지 약 20개 변형; 약 1 내지 약 10개 변형; 약 10 내지 약 20개 변형; 약 5 내지 약 15개 변형; 약 5 내지 약 10개 변형을 갖는 방법.

[0734] 76. 구현예 1 내지 구현예 18 중 어느 하나에 있어서, 서열번호 159, 167, 160, 170, 174, 175, 176, 또는 181-184, 186, 188, 190, 192, 또는 195 중 어느 하나와 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 코로나바이러스 S 당단백질.

[0735] 77. 구현예 1 내지 구현예 18 중 어느 하나에 있어서, 서열번호 174, 175, 186, 188, 190, 192, 또는 195 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 코로나바이러스 S 당단백질.

[0736] 78. 구현예 1 내지 구현예 18 중 어느 하나에 있어서, 상기 당단백질은 서열번호 161, 162, 163, 164, 165, 166, 168, 169, 171, 및 172 중 어느 하나의 핵산에 의해 암호화되는 코로나바이러스 S 당단백질.

[0737] 79. 코로나바이러스 S 당단백질을 암호화하는 핵산으로서, 상기 핵산은 서열번호 161, 162, 163, 164, 165, 166, 168, 169, 171, 및 172 중 어느 하나의 핵산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는 핵산.

[0738] 80. 서열번호 159, 167, 160, 170, 174, 175, 176, 또는 181-184, 186, 188, 190, 192, 또는 195 중 어느 하나와 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일성인 아미노산 서열을 갖는 코로나바이러스 S 당단백질을 암호화하는 핵산.

[0739] 81. 구현예 79 또는 구현예 80의 핵산을 포함하는 벡터 또는 세포.

[0740] 82. 서열번호 186, 188, 190, 192, 195, 174, 및 175 중 어느 하나와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 코로나바이러스 S 당단백질.

[0741] 83. 구현예 82의 CoV S 당단백질 및 약학적으로 허용가능한 버퍼를 포함하는 면역원성 조성물.

[0742] 84. 서열번호 186, 188, 190, 192, 174, 및 175 중 어느 하나와 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성인 아미노산 서열을 갖는 제1 CoV S 당단백질; 및 서열번호 87과 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 제2 CoV S 당단백질; 및 약학적으로 허용가능한 버퍼;를 포함하는 면역원성 조성물.

[0743] 85. 구현예 83 또는 구현예 84에 있어서, 어주번트를 포함하는 면역원성 조성물.

[0744] 86. 구현예 83 내지 구현예 85 중 어느 하나에 있어서, 사포닌 어주번트를 포함하는 면역원성 조성물.

[0745] **인용에 의한 통합**

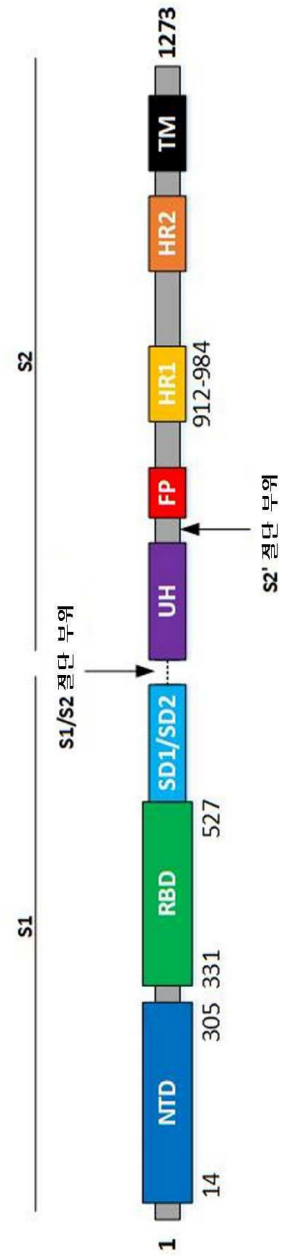
[0746] 본 명세서에서 인용된 모든 참고문헌, 논문, 공개문헌, 특허, 특허 공개, 및 특허 출원은 모든 목적을 위하여 그 전체 내용이 인용에 의해 통합된다. 그러나, 본 명세서에서 인용된 임의의 참고문헌, 논문, 공개문헌, 특허, 특허 공개, 및 특허 출원을 인용하는 것이, 이들이 유효한 선행 기술을 구성하거나 세계의 임의의 국가에서 보통의 일반적인 지식의 일부를 형성하는 것임을 인정하거나 임의의 형태로 이를 제시하는 것으로 간주되는 것은 아니고 그렇게 되어서도 안된다. 본 출원은 이로써 모든 목적을 위하여 미국 특허 제10,729,764호, 미국 특허 제9,821,046호, 및 미국 특허 제8,821,881호에 개시된 전체 내용이 인용에 의해 통합된다. 다음의 특허 문서는 모든 목적을 위하여 그 전체 내용이 인용에 의해 본 명세서에 통합된다: 국제 공개 제2021/154812호; 국제 공개 제2022/203963호; 국제 공개 제2022/235663호; 국제 공개 제2004/004762호; 국제 공개 제2019/183063호; 및 국제 공개 제2017/041100호.

도면

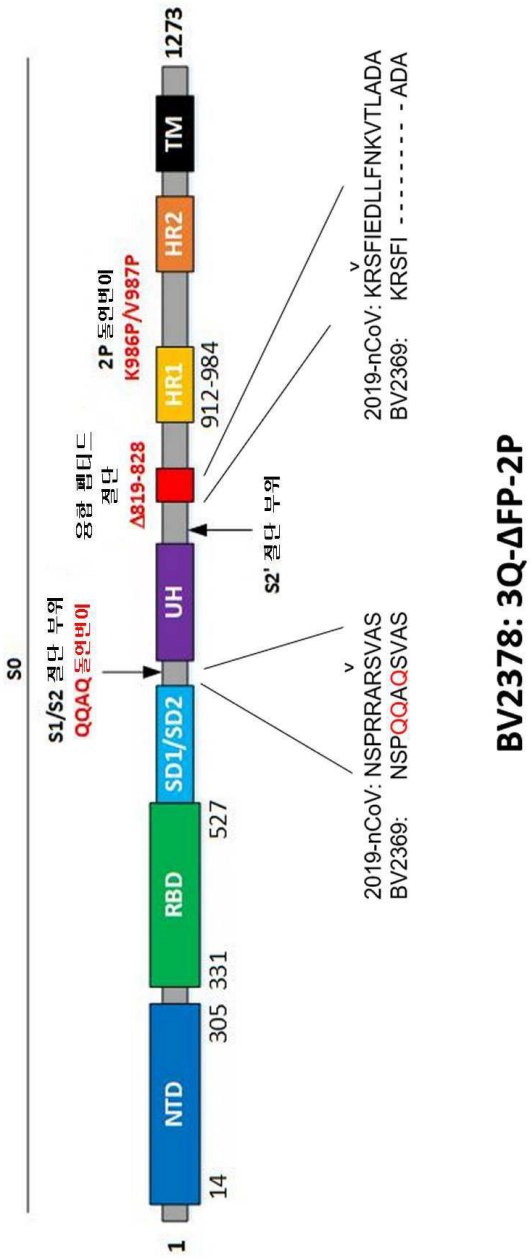
도면1

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

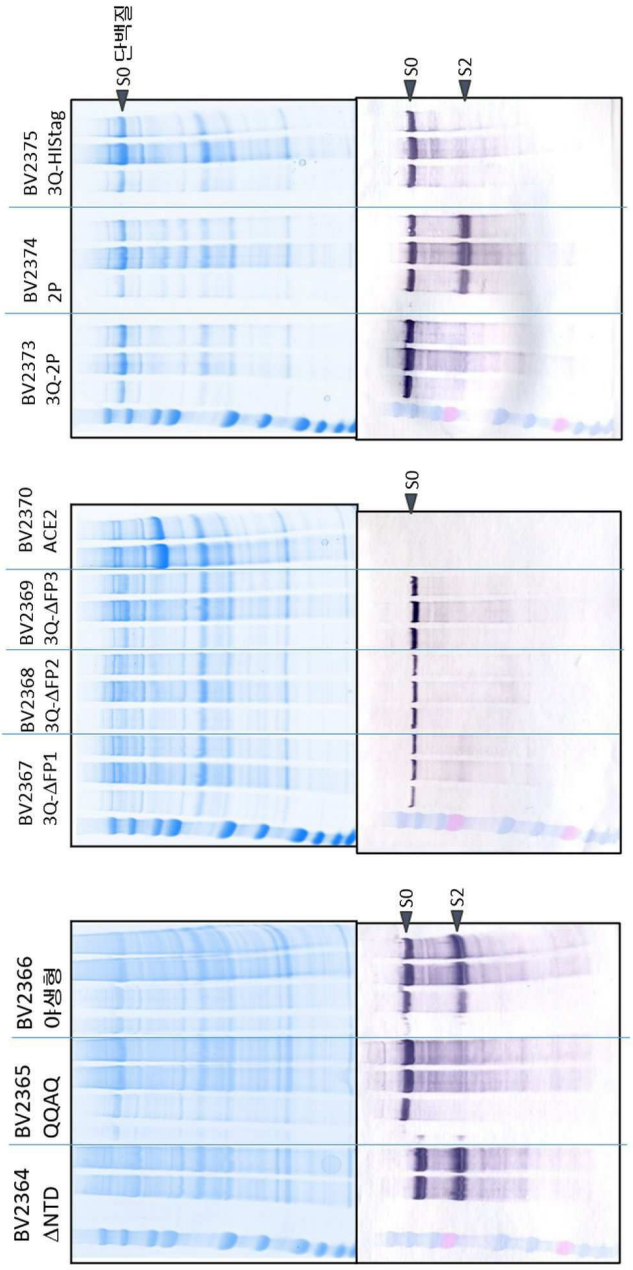
도면2


1273
TM
HR2
912-984
HR1
FP
S2' 절단 부위
UH
S1/S2 절단 부위
SD1/SD2
527
RBD
331
305
NTD
14
1
S1
S2

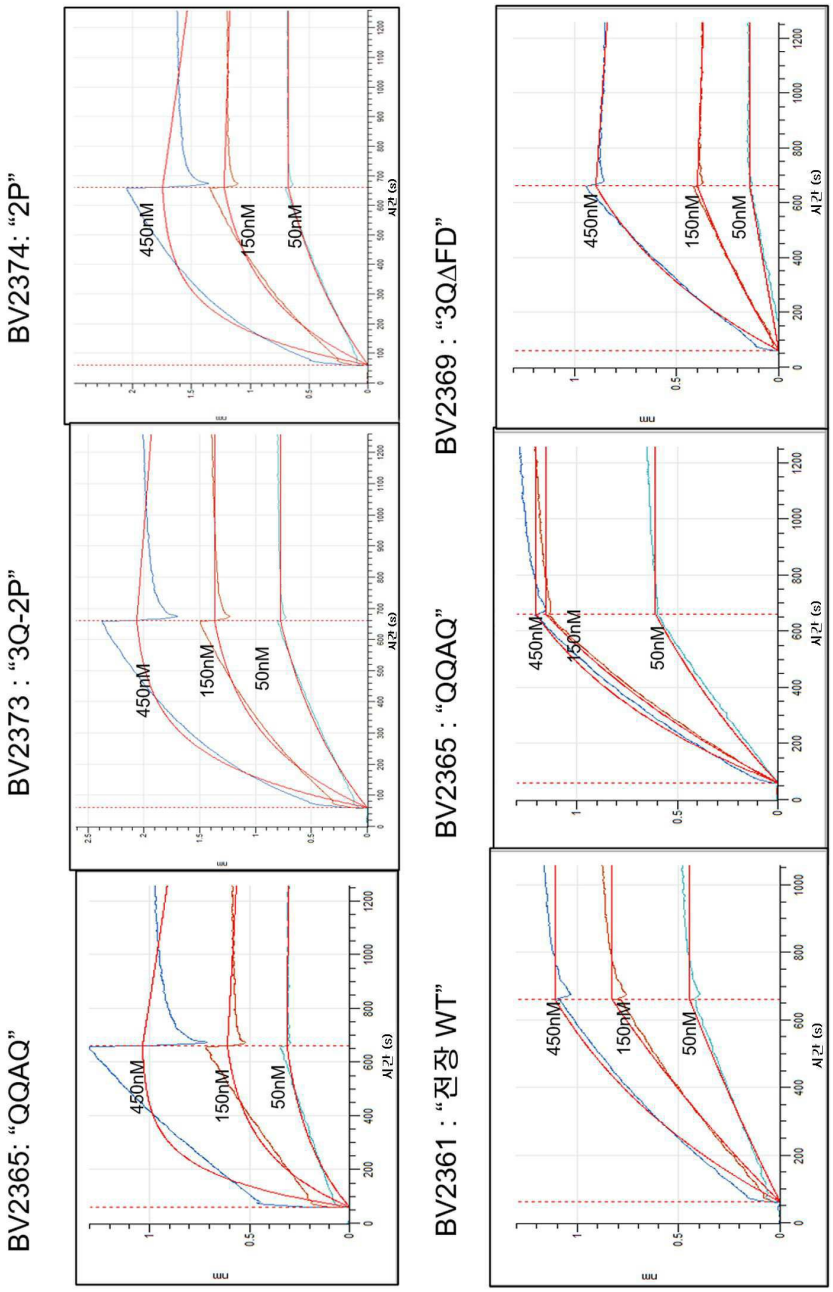
도면3


S0
S1/S2 절단 부위
QQAQ 돌연변이
융합 펩티드
절단
Δ819-828
2P 돌연변이
K986P/V987P
S2' 절단 부위
1
14
305
331
527
912-984
1273
NTD
RBD
SD1/SD2
UH
HR1
HR2
TM
2019-nCoV: NSPRRARSVAS
BV2369: NSPQQAQSVAS
2019-nCoV: KRSFIEDLLFNKVTLADA
BV2369: KRSFI - - - - - - - - - ADA
BV2378: 3Q-ΔFP-2P

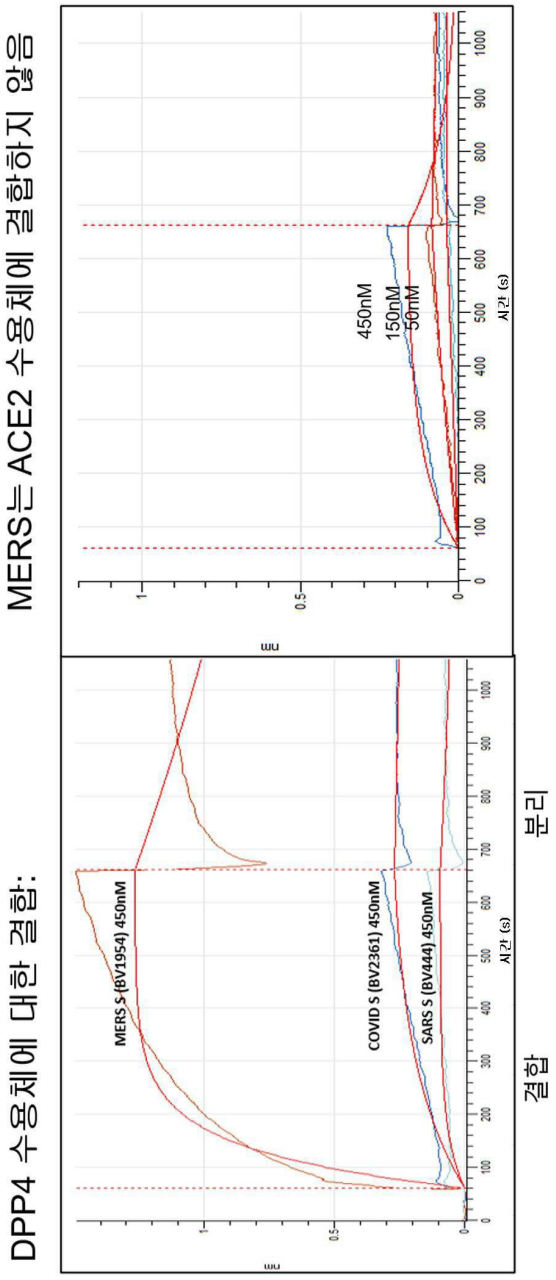
도면4


S0 단백질
S0
S2
BV2375 3Q-HIStag
BV2374 2P
BV2373 3Q-2P
S0
BV2370 ACE2
BV2369 3Q-ΔFP3
BV2368 3Q-ΔFP2
BV2367 3Q-ΔFP1
S0
S2
BV2366 야생형
BV2365 QQAQ
BV2364 ΔNTD

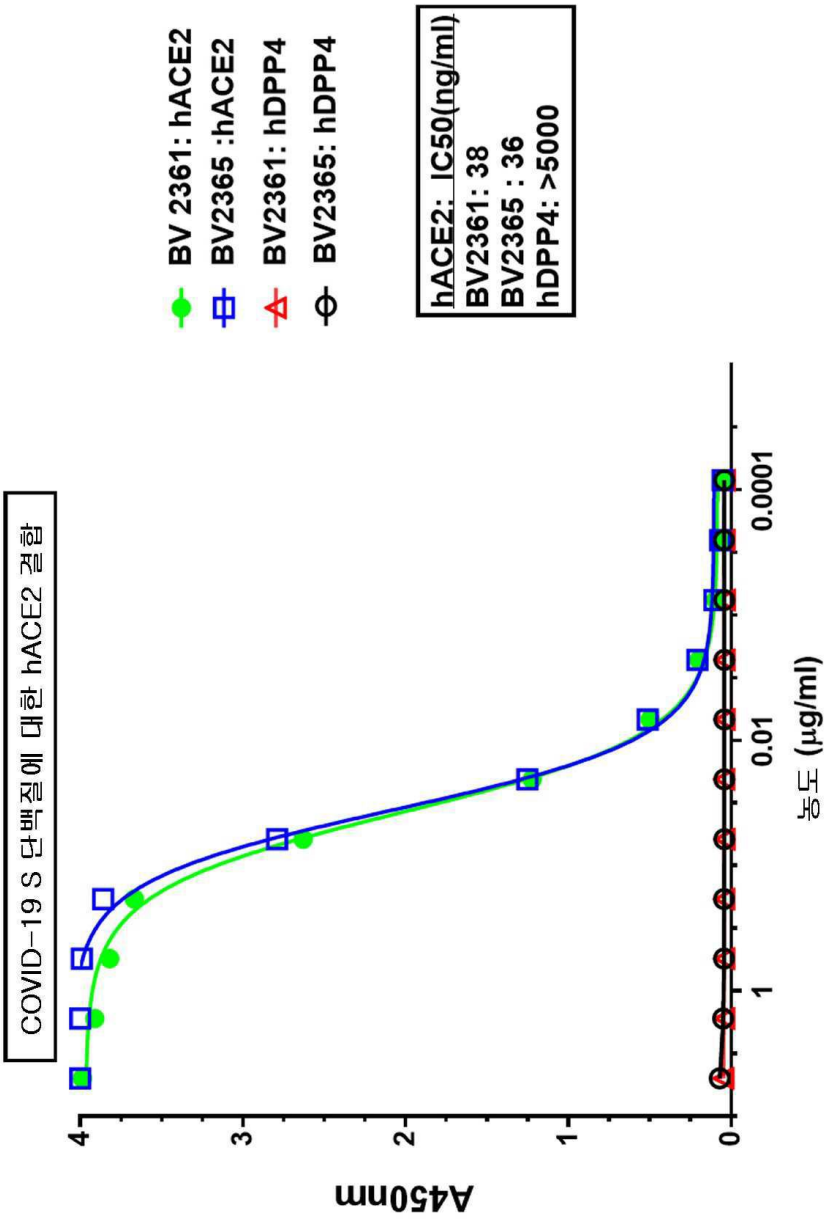
도면5


BV2365: "QQAQ"
BV2373 : "3Q-2P"
BV2374: "2P"
BV2361 : "전장 WT"
BV2365 : "QQAQ"
BV2369 : "3QΔFD"
450nM
150nM
50nM
시간 (s)
nm

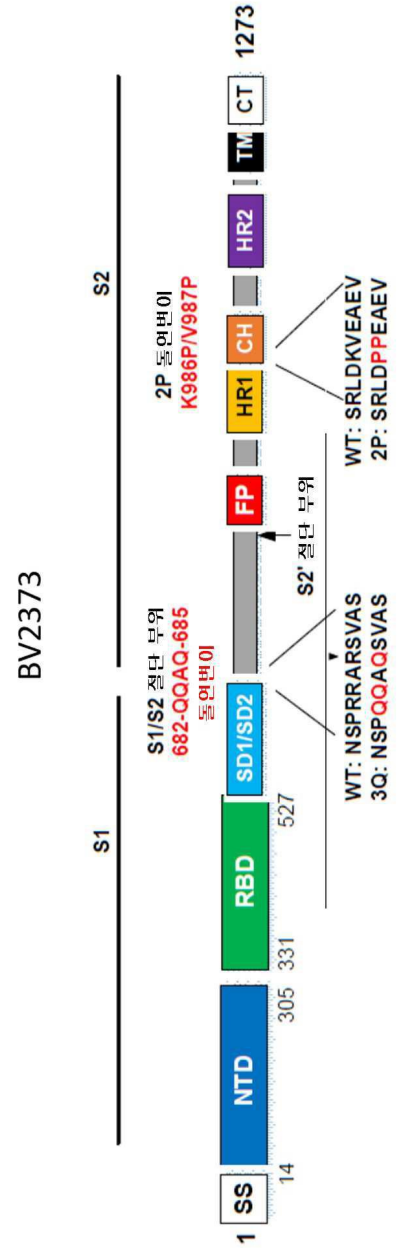
도면6


MERS는 ACE2 수용체에 결합하지 않음
450nM
150nM
50nM
nm
시간 (s)
DPP4 수용체에 대한 결합:
MERS S (BV1954) 450nM
COVID S (BV2361) 450nM
SARS S (BV444) 450nM
결합
분리

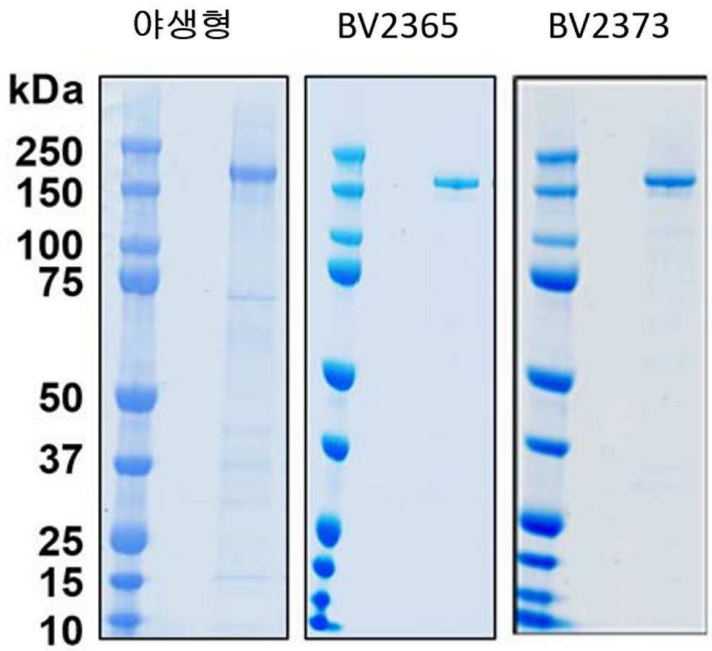
도면7


COVID-19 S 단백질에 대한 hACE2 결합
A450nm
농도 (μg/ml)
BV 2361: hACE2
BV2365 :hACE2
BV2361: hDPP4
BV2365: hDPP4
hACE2: IC50(ng/ml)
BV2361: 38
BV2365 : 36
hDPP4: >5000

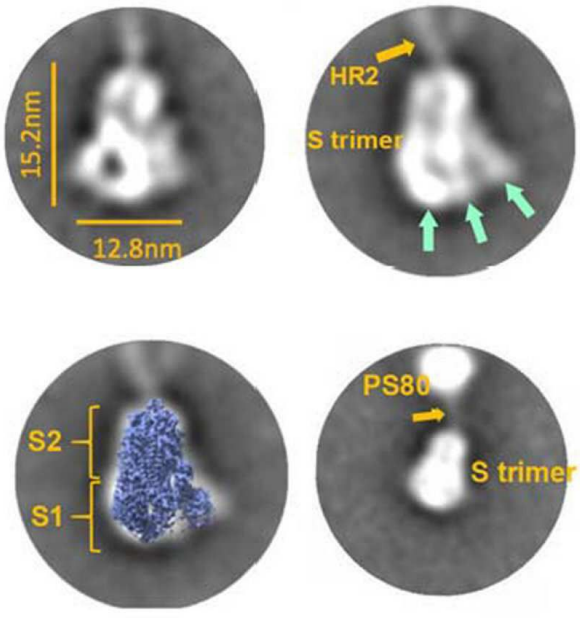
도면8


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

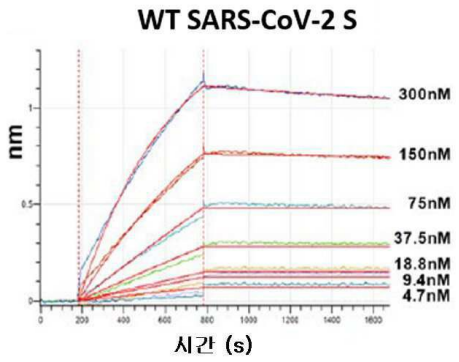
도면9


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

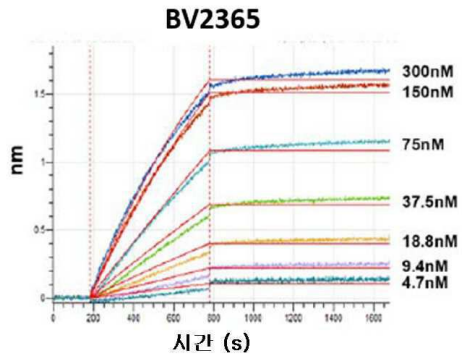
도면10


15.2nm
12.8nm
HR2
S trimer
S2
S1
PS80
S trimer

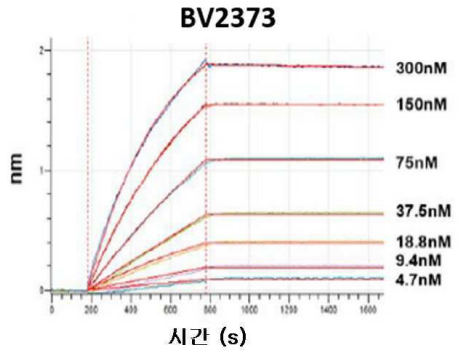
도면11a



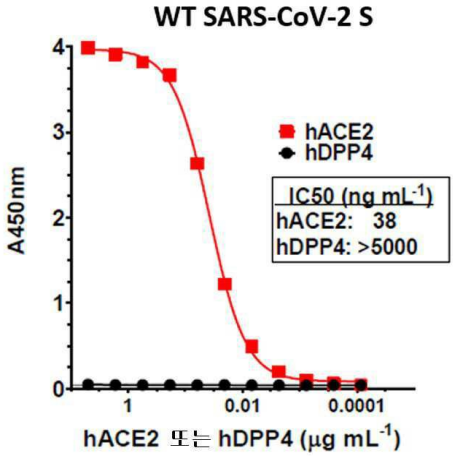
도면11b



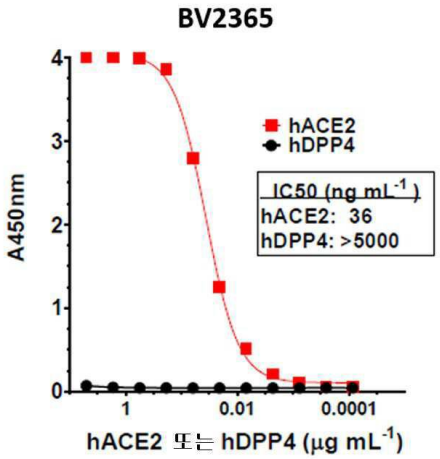
도면11c



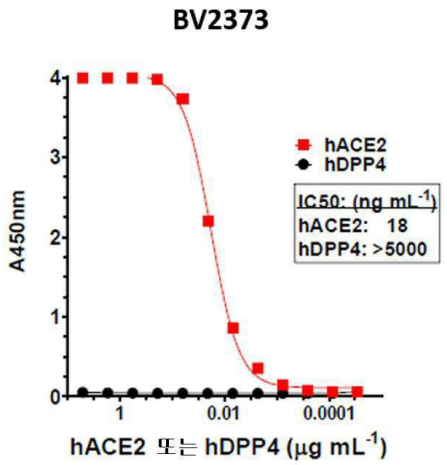
도면11d



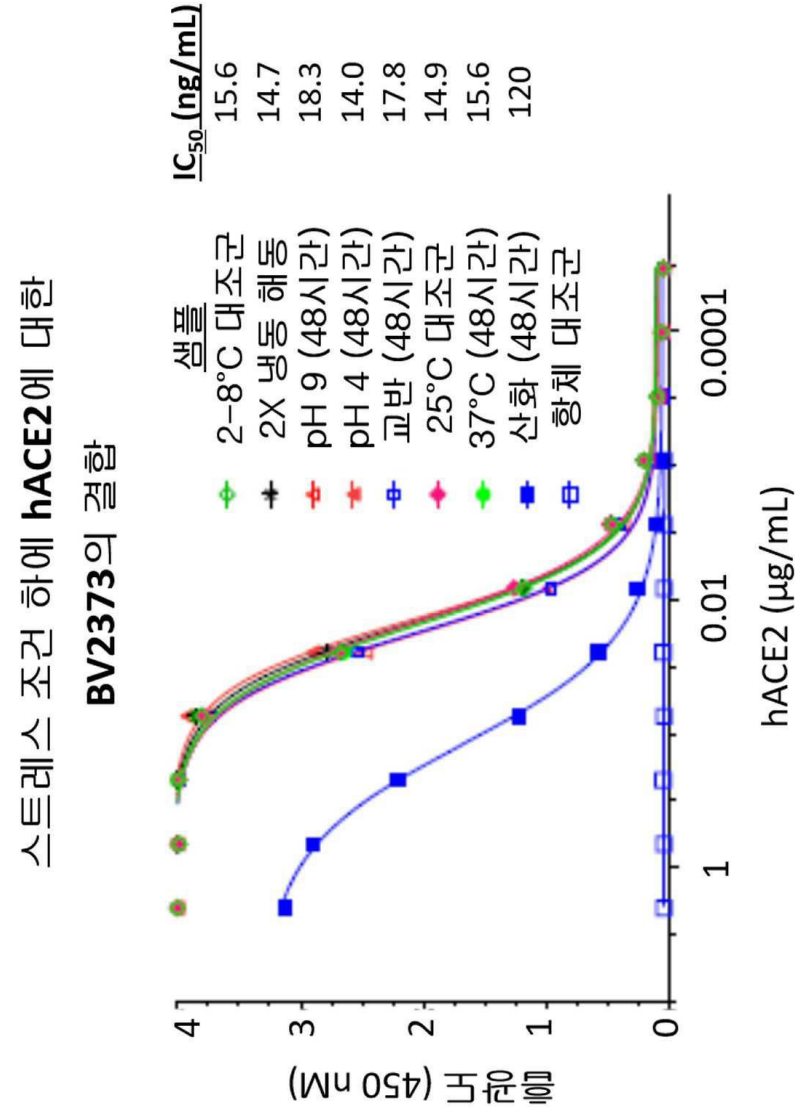
도면11e



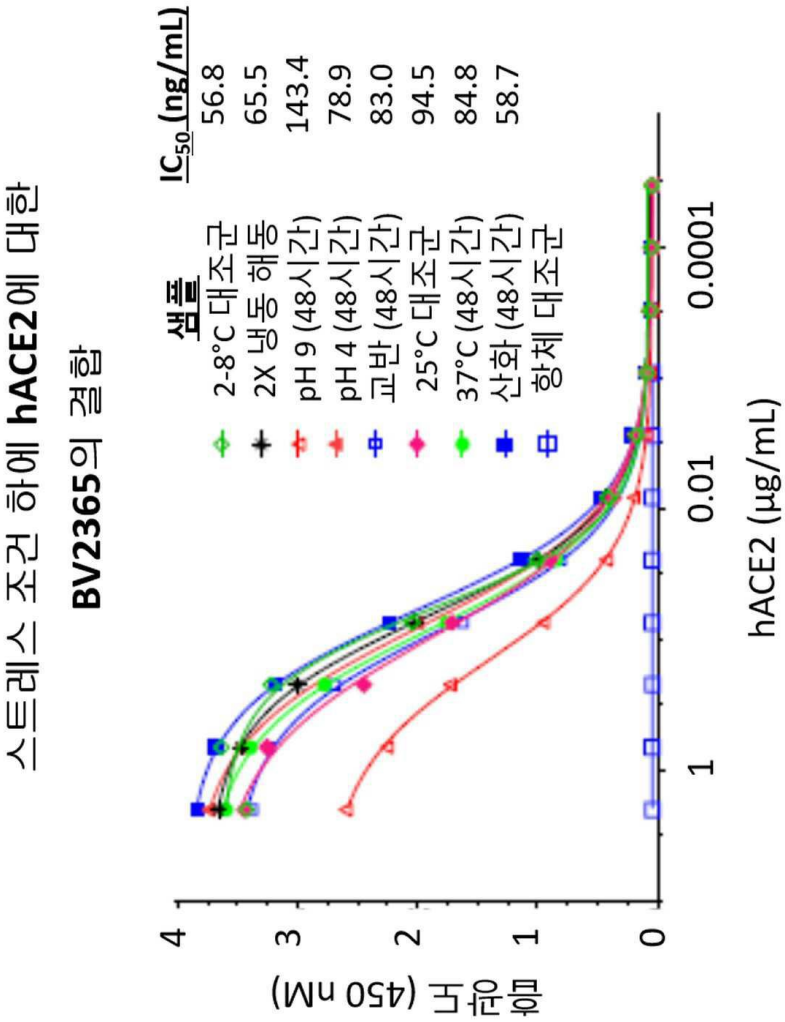
도면11f



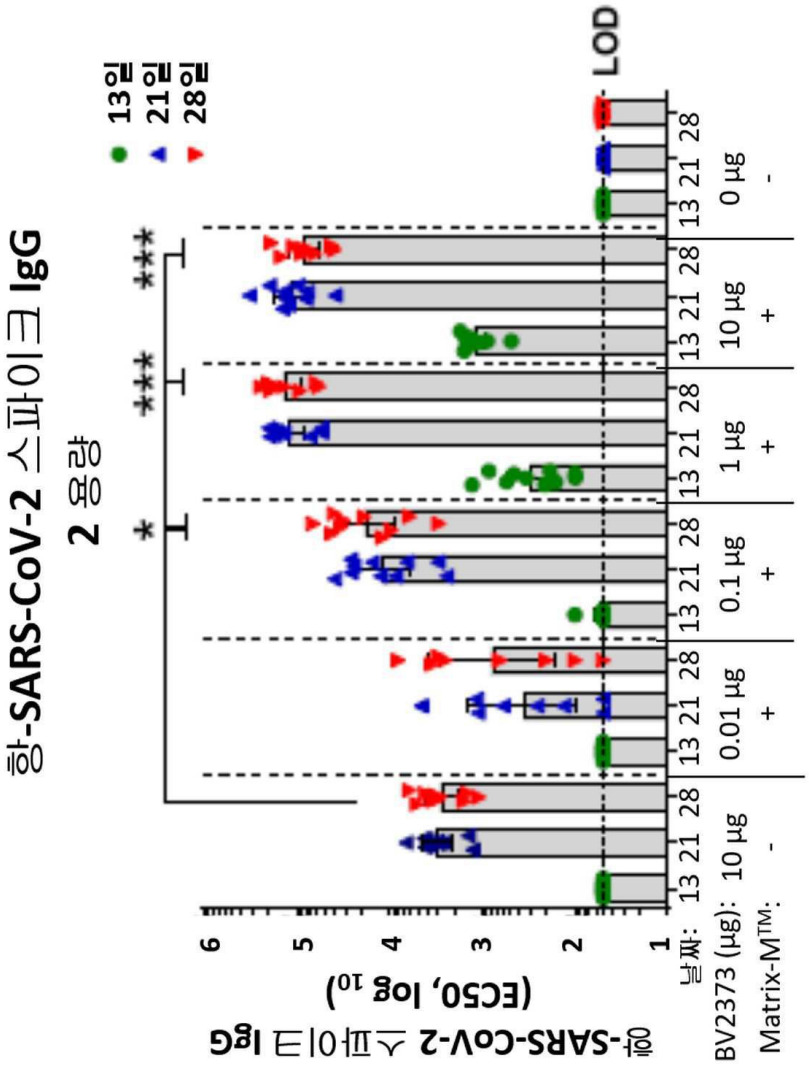
도면12a


스트레스 조건 하에 hACE2에 대한
BV2373의 결합
흡광도 (450 nM)
hACE2 (μg/mL)
0
1
2
3
4
1
0.01
0.0001
샘플
IC50 (ng/mL)
2-8°C 대조군 15.6
2X 냉동 해동 14.7
pH 9 (48시간) 18.3
pH 4 (48시간) 14.0
교반 (48시간) 17.8
25°C 대조군 14.9
37°C (48시간) 15.6
산화 (48시간) 120
항체 대조군

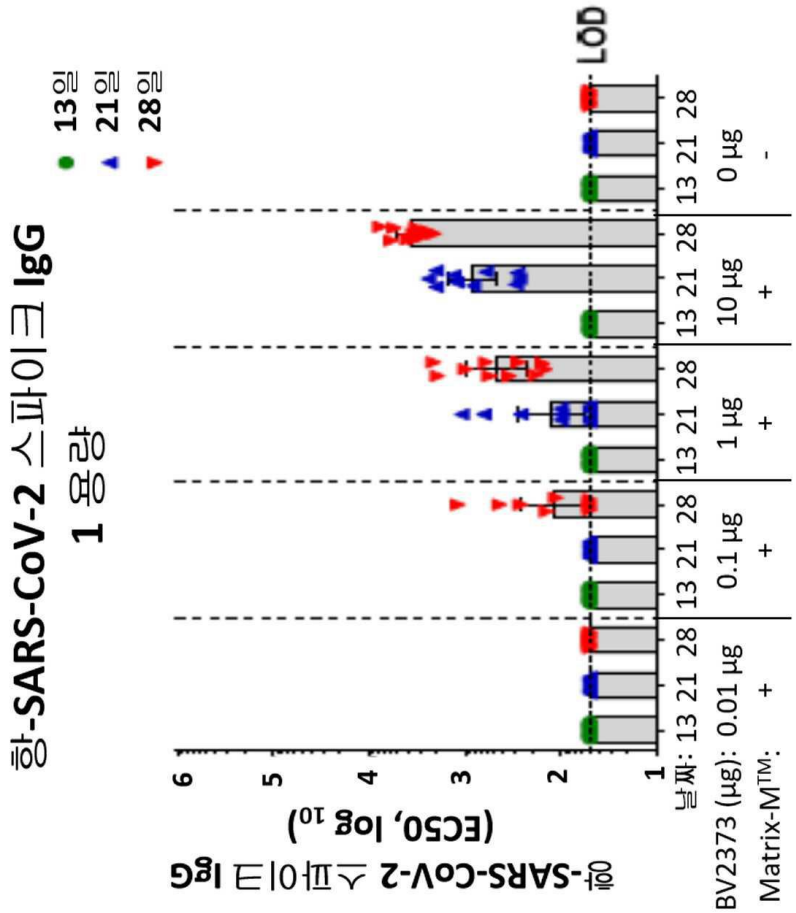
도면12b


스트레스 조건 하에 hACE2에 대한
BV2365의 결합
샘플
IC50 (ng/mL)
2-8°C 대조군 56.8
2X 냉동 해동 65.5
pH 9 (48시간) 143.4
pH 4 (48시간) 78.9
교반 (48시간) 83.0
25°C 대조군 94.5
37°C (48시간) 84.8
산화 (48시간) 58.7
항체 대조군
흡광도 (450 nM)
0
1
2
3
4
0.0001
0.01
1
hACE2 (µg/mL)

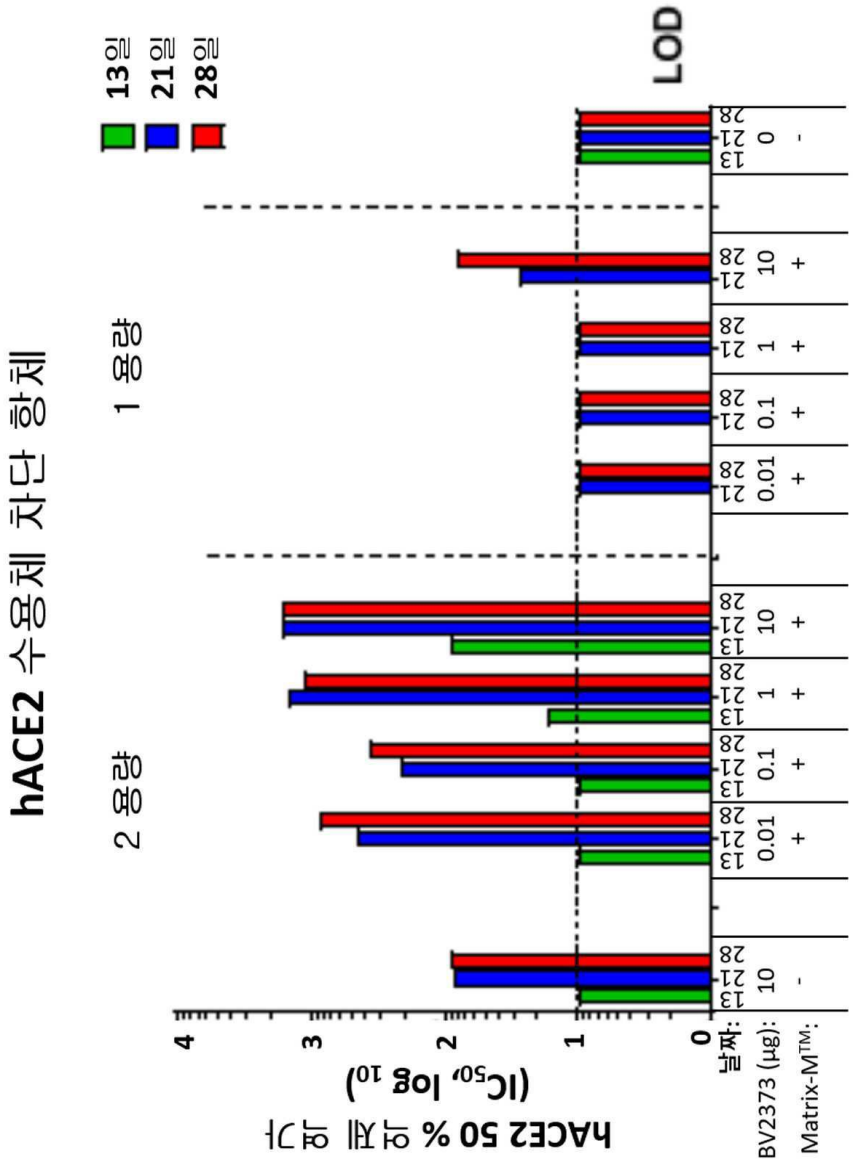
도면13a


항-SARS-CoV-2 스파이크 IgG
2 용량
13일
21일
28일
LOD
*
***
***
***
항-SARS-CoV-2 스파이크 IgG
(EC50, log 10)
1
2
3
4
5
6
날짜: 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™: - + + + + -

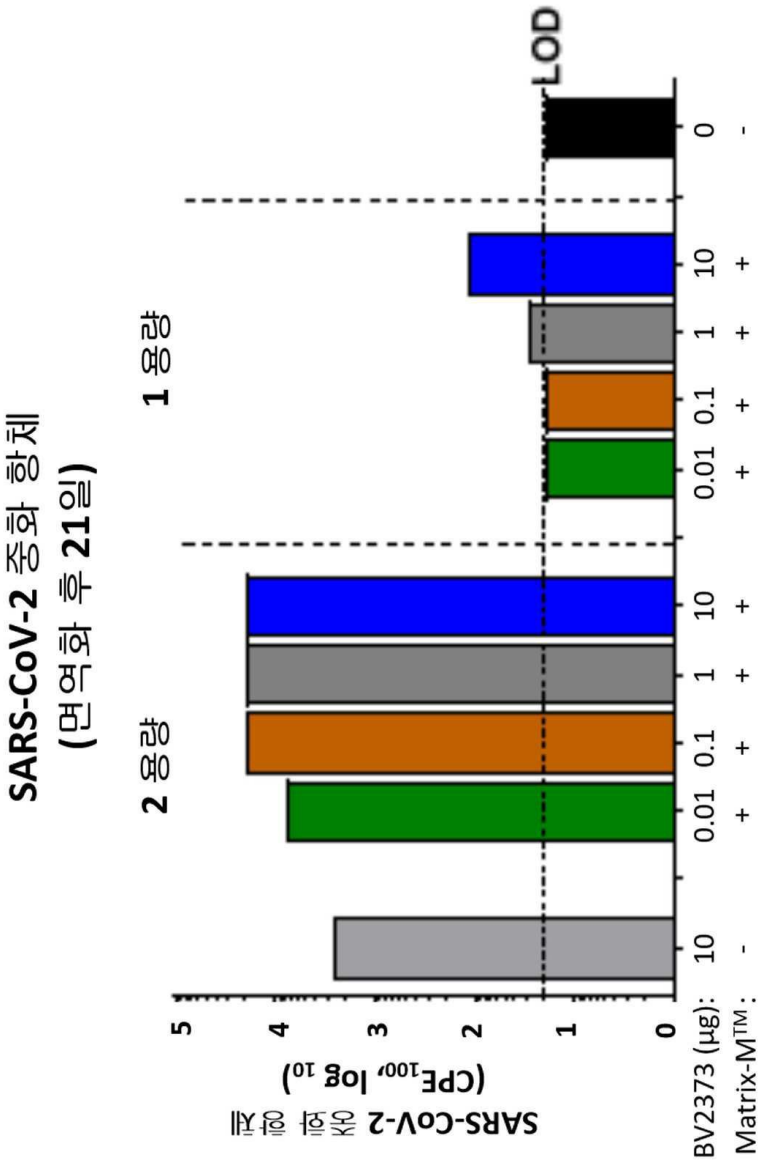
도면13b


항-SARS-CoV-2 스파이크 IgG
1 용량
13일
21일
28일
LOD
항-SARS-CoV-2 스파이크 IgG
(EC50, log 10)
1
2
3
4
5
6
날짜: 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™: + + + + -

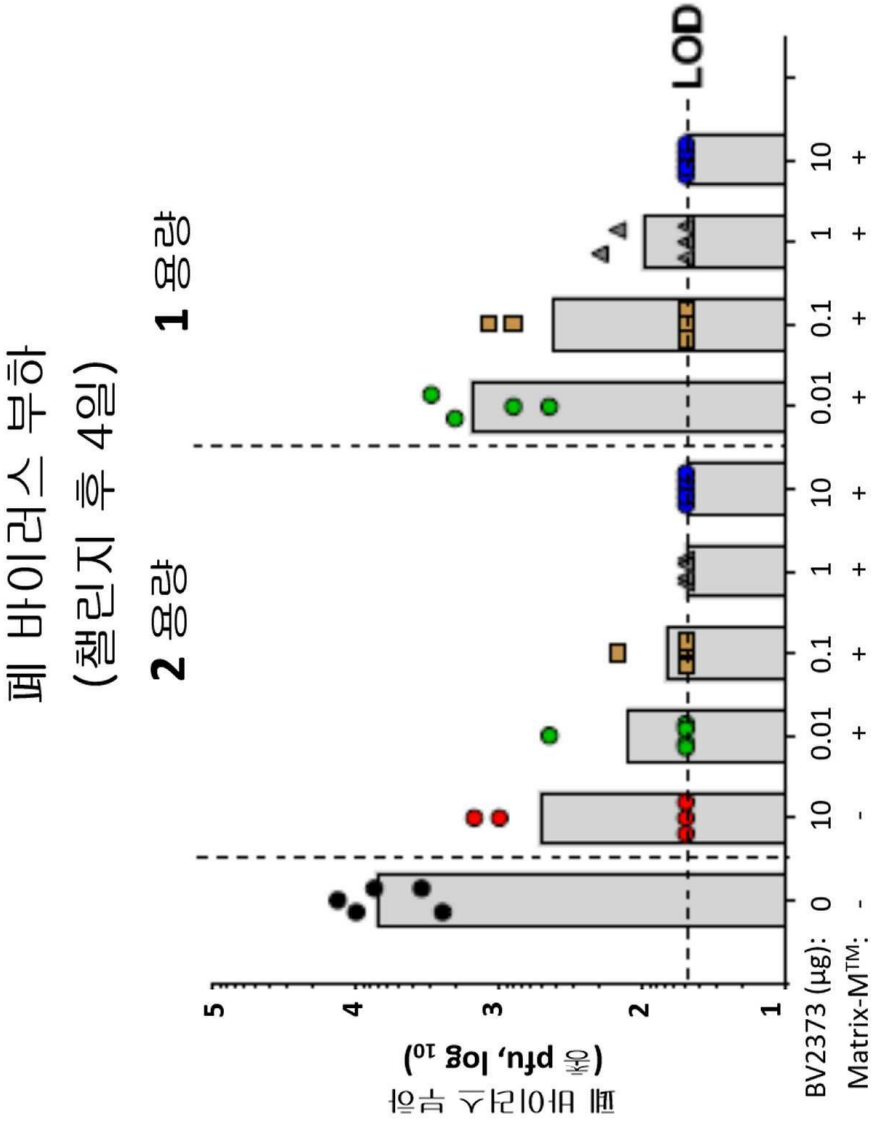
도면14


hACE2 수용체 차단 항체
2 용량
1 용량
13일
21일
28일
LOD
hACE2 50 % 억제 농도
(IC50, log 10)
날짜:
BV2373 (μg):
Matrix-M™:

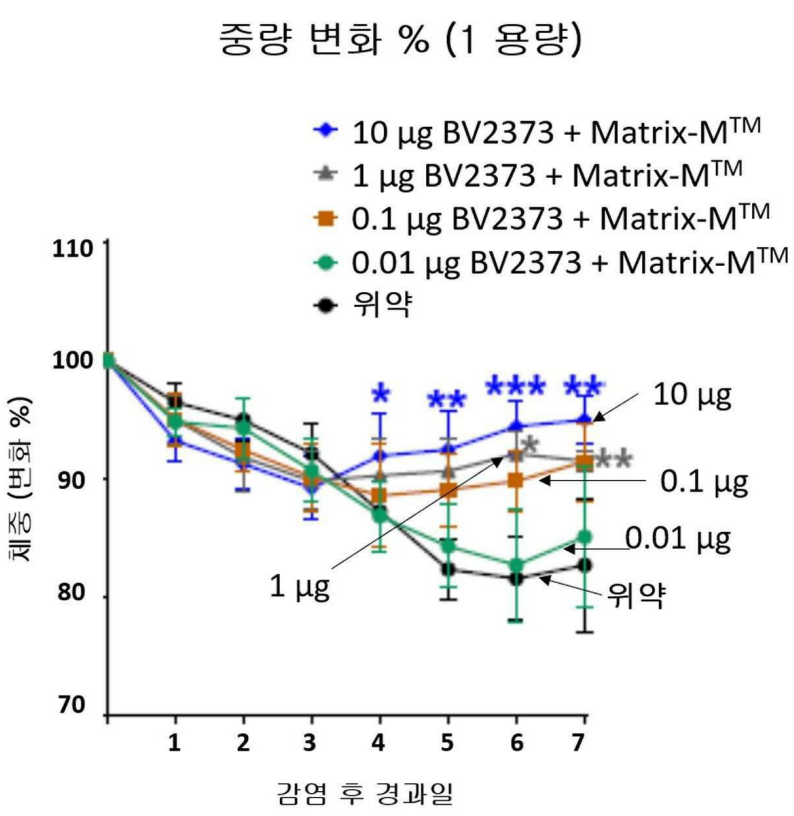
도면15


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

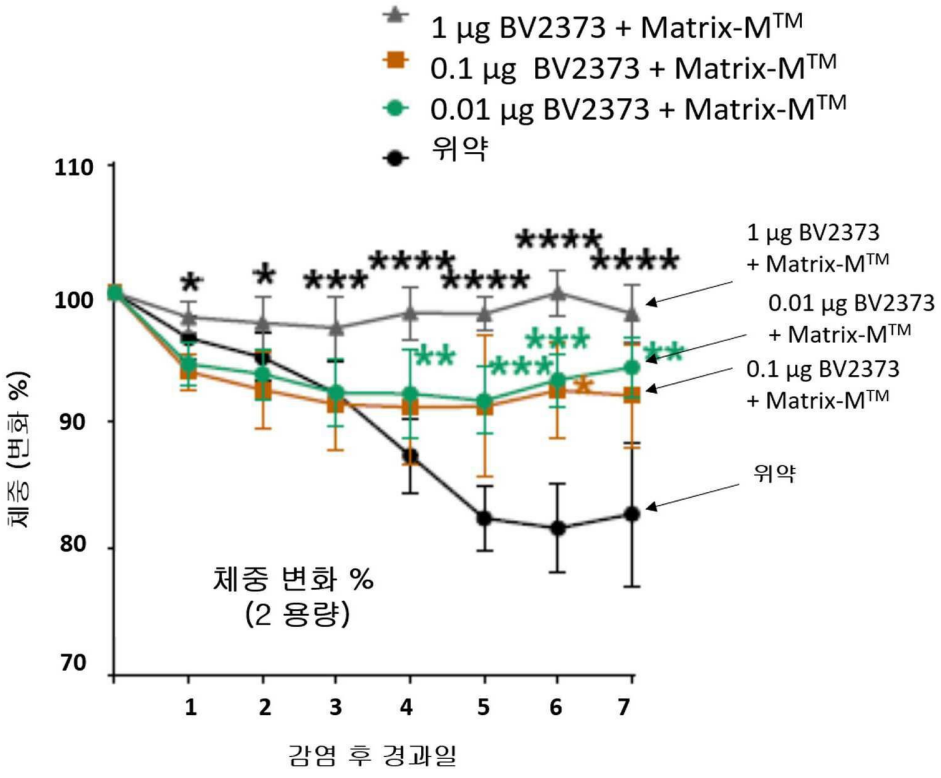
도면16


폐 바이러스 부하
(챌린지 후 4일)
1 용량
2 용량
LOD
폐 바이러스 부하
(㎖ pfu, log 10)
5
4
3
2
1
BV2373 (μg): 0 10 0.01 0.1 1 10 0.01 0.1 1 10
Matrix-M™: - - + + + + + + + +

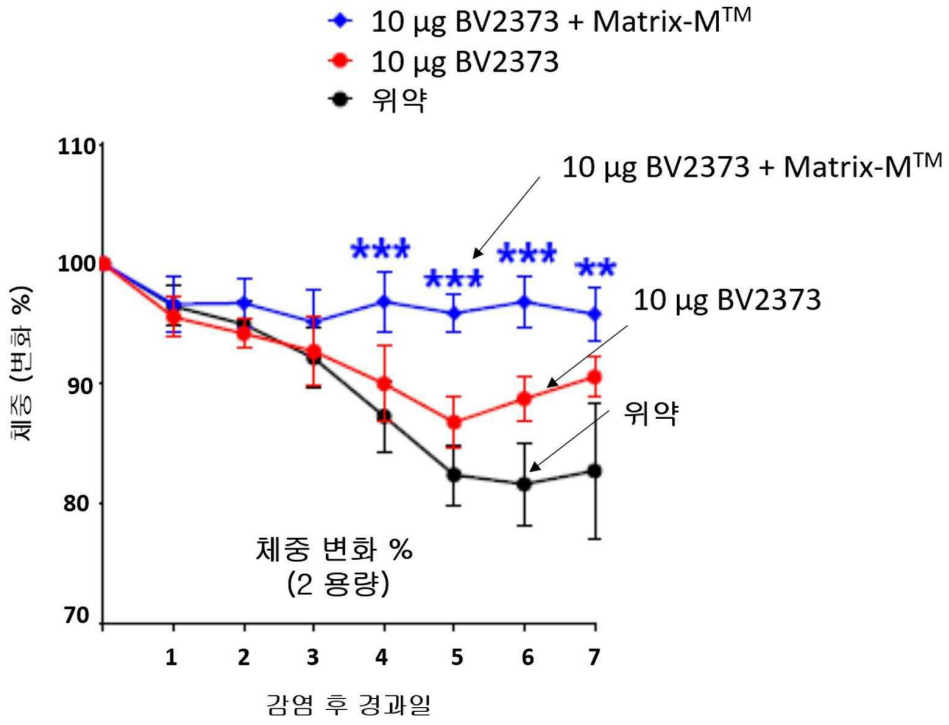
도면17a


중량 변화 % (1 용량)
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 %)
감염 후 경과일
10 μg
0.1 μg
0.01 μg
1 μg
위약

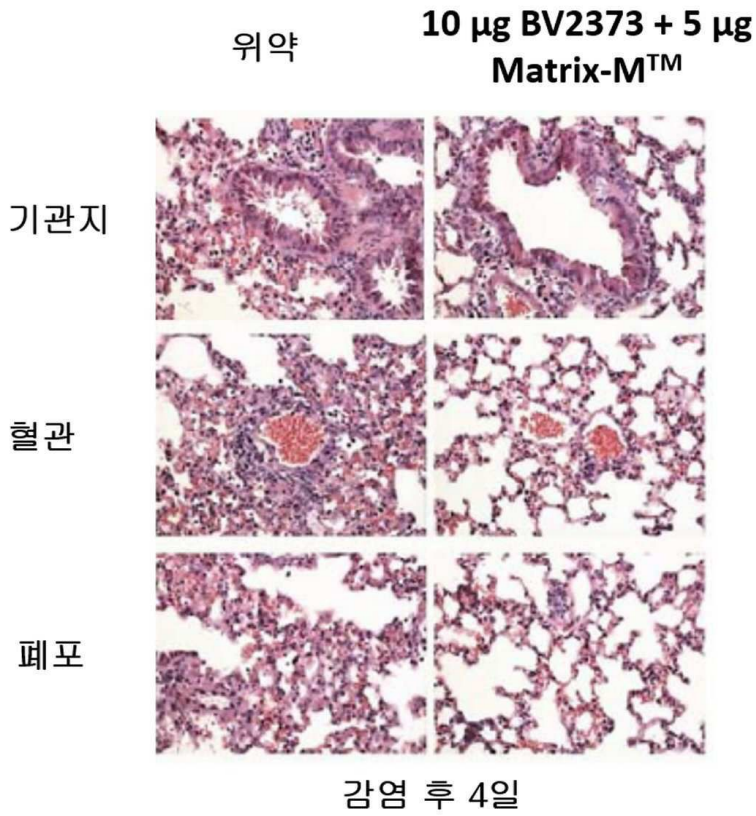
도면17b


1 μg BV2373 + Matrix-M™
0.1 μg BV2373 + Matrix-M™
0.01 μg BV2373 + Matrix-M™
위약
체중 (변화 %)
감염 후 경과일
체중 변화 %
(2 용량)
1 μg BV2373
+ Matrix-M™
0.01 μg BV2373
+ Matrix-M™
0.1 μg BV2373
+ Matrix-M™
위약

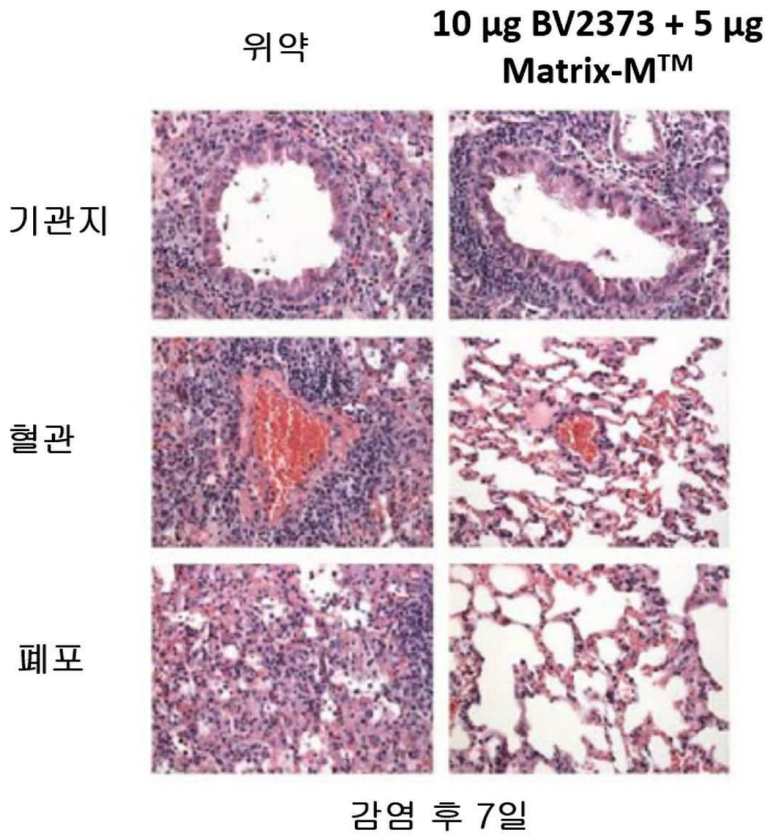
도면17c


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

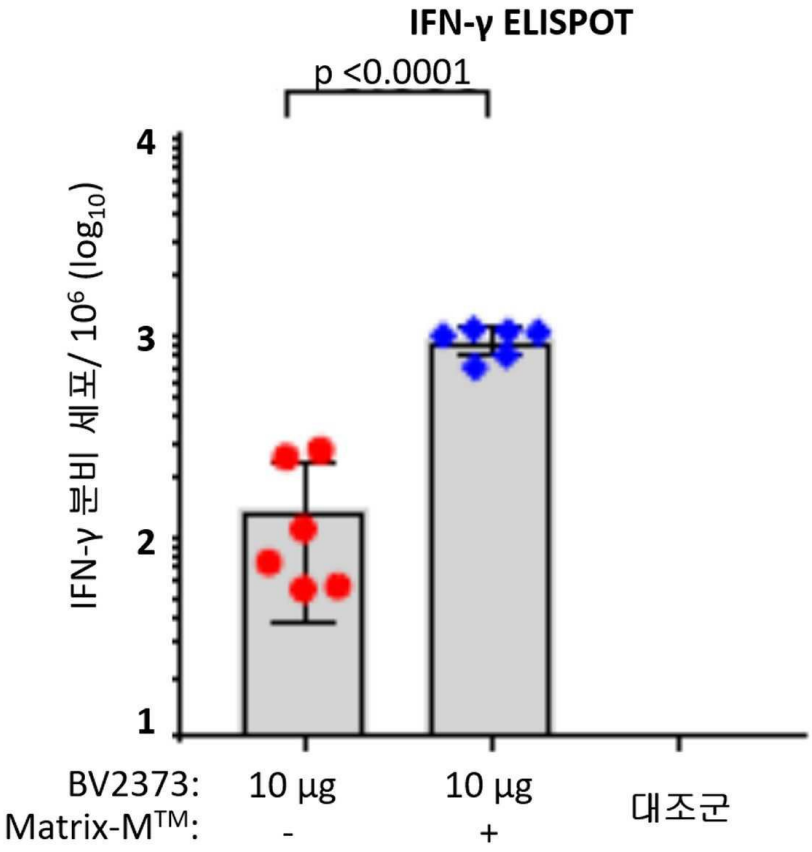
도면18a


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

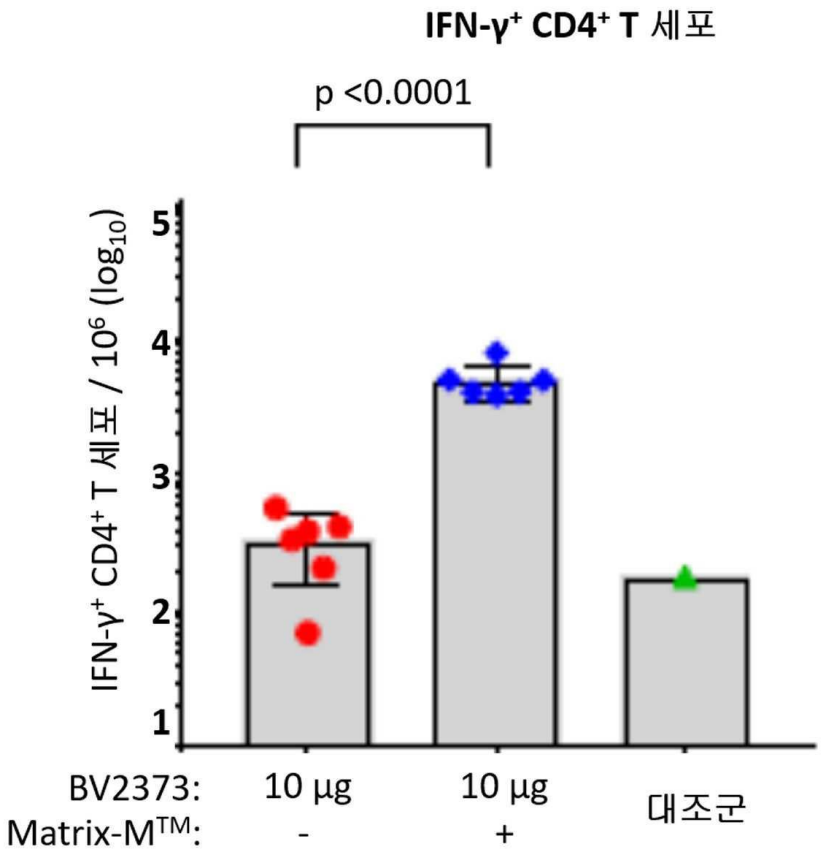
도면18b



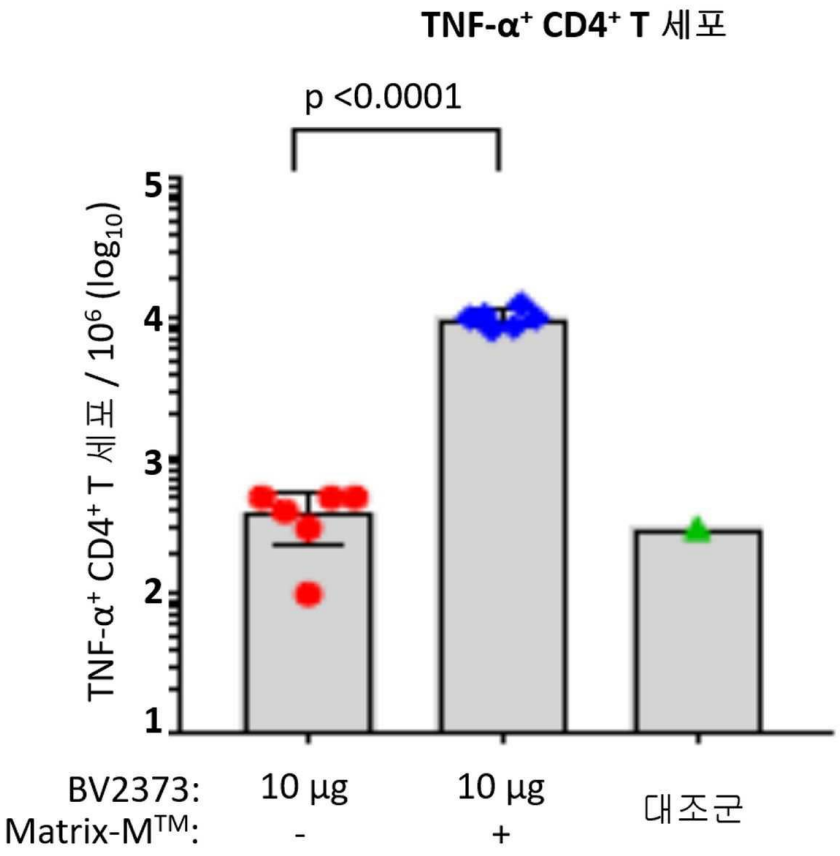
도면19


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

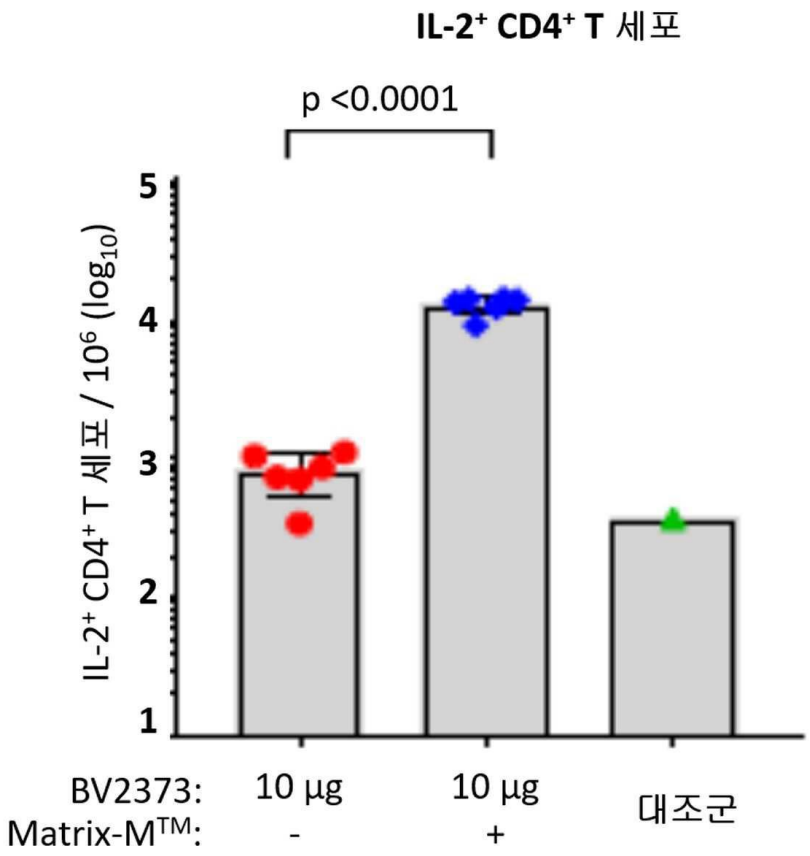
도면20a


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

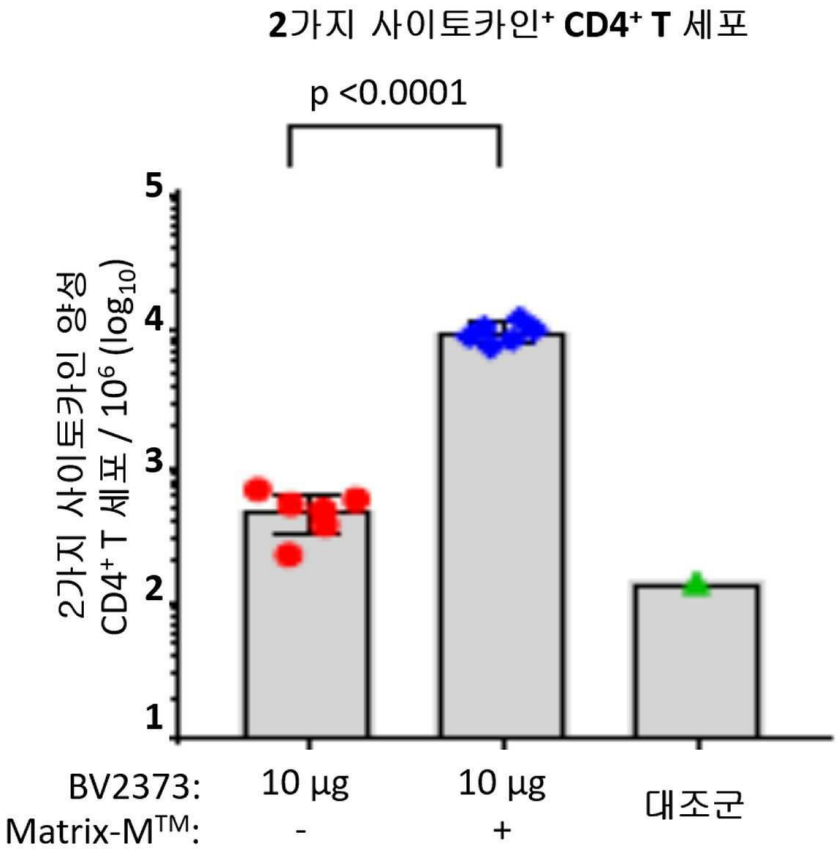
도면20b


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

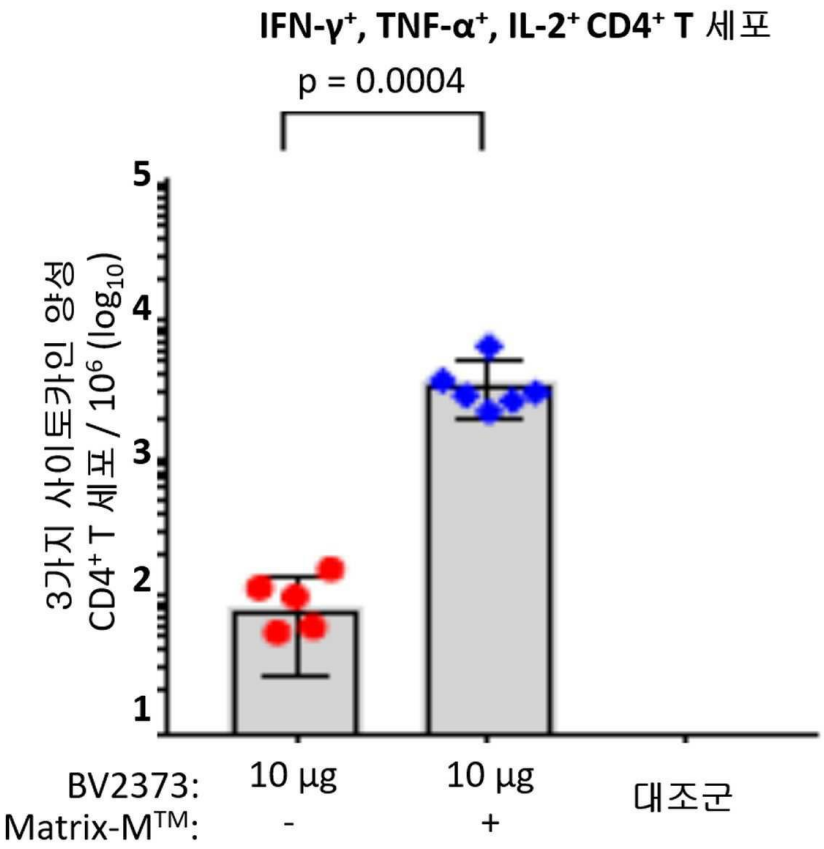
도면20c


IL-2⁺ CD4⁺ T 세포
p <0.0001
IL-2⁺ CD4⁺ T 세포 / 10⁶ (log10)
5
4
3
2
1
BV2373:
Matrix-M™:
10 µg
-
10 µg
+
대조군

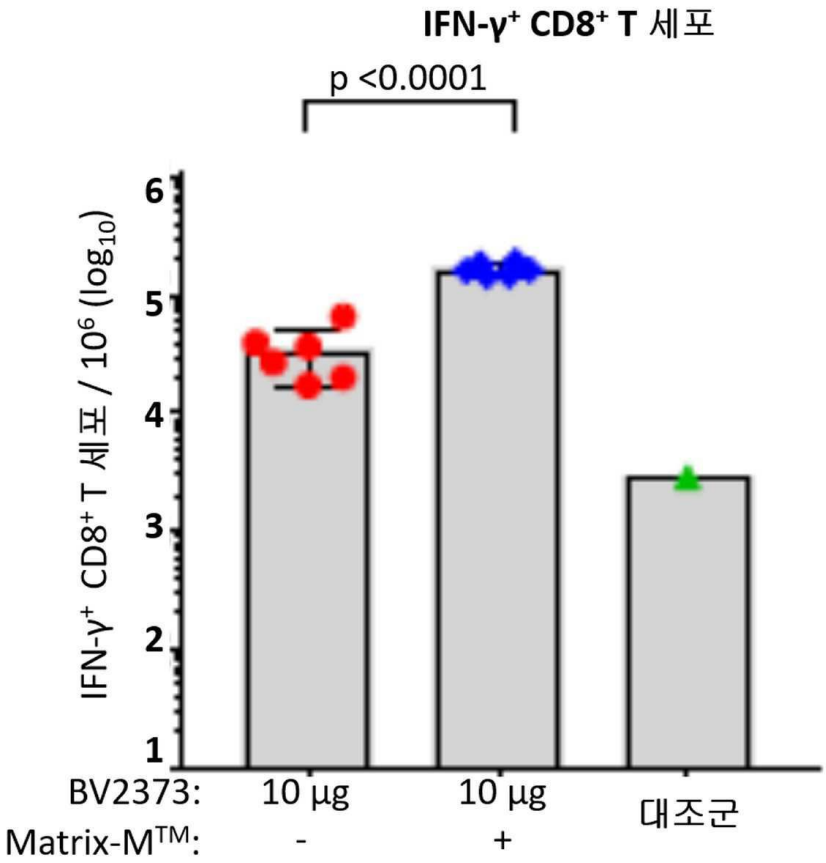
도면20d


2가지 사이토카인+ CD4+ T 세포
p <0.0001
2가지 사이토카인 양성 CD4+ T 세포 / 10^6 (log10)
5
4
3
2
1
BV2373:
Matrix-M™:
10 µg
-
10 µg
+
대조군

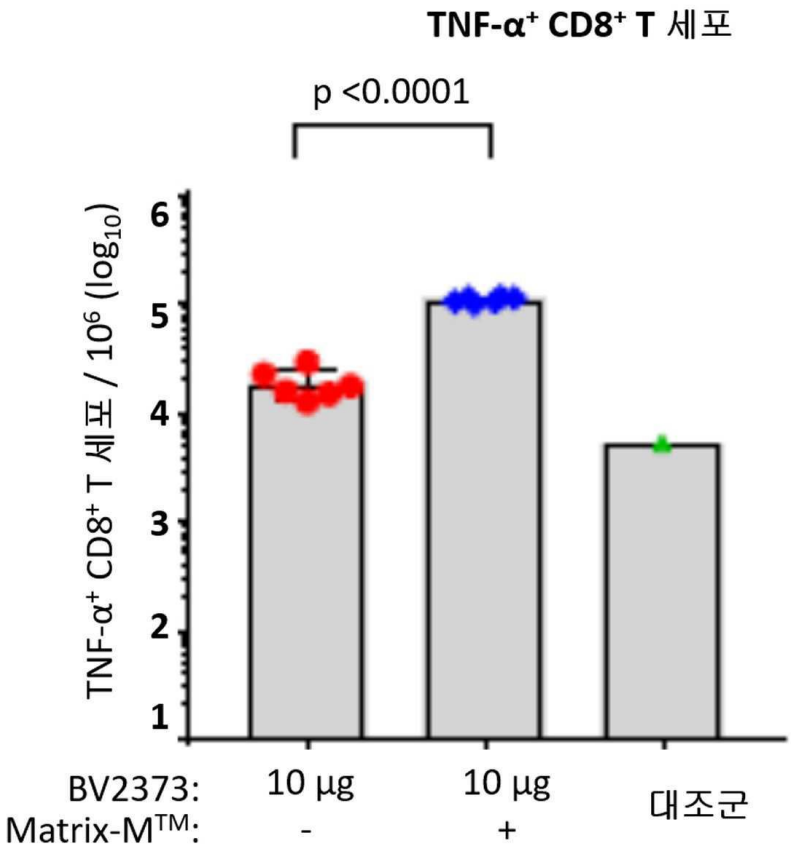
도면20e


IFN-γ+, TNF-α+, IL-2+ CD4+ T 세포
p = 0.0004
3가지 사이토카인 양성 CD4+ T 세포 / 10^6 (log10)
5
4
3
2
1
BV2373:
Matrix-M™:
10 µg
-
10 µg
+
대조군

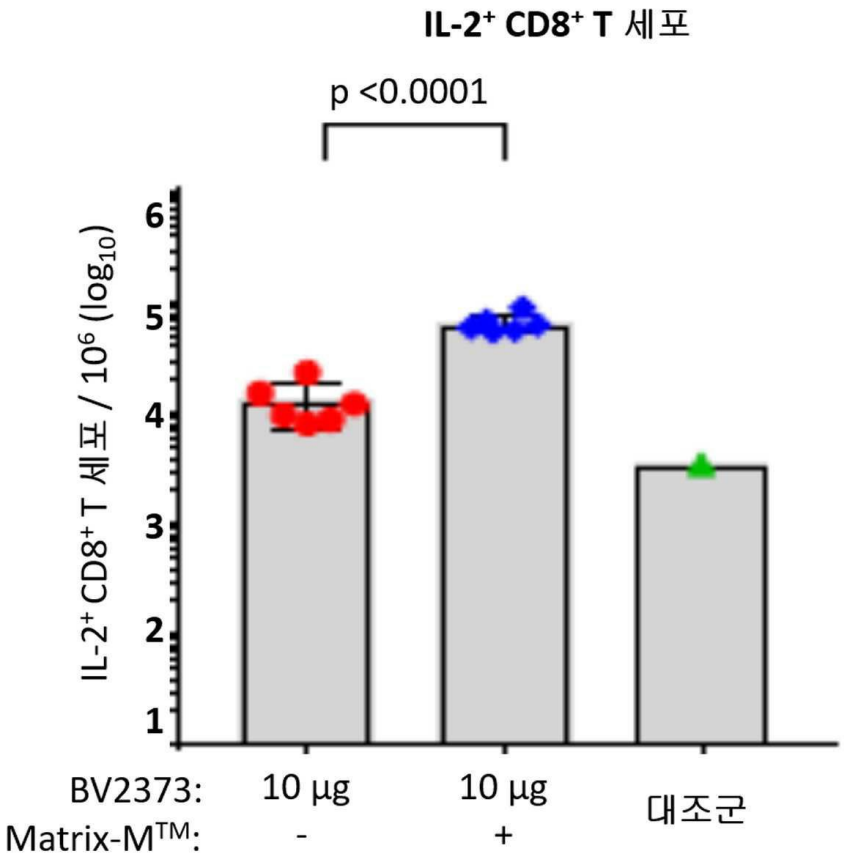
도면21a


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

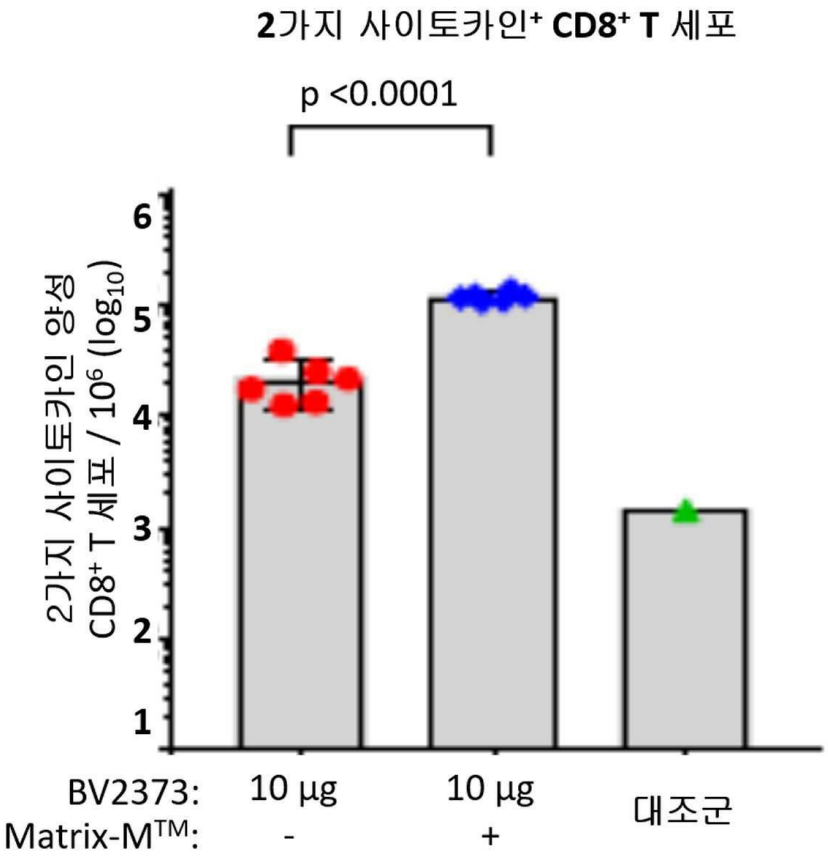
도면21b


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

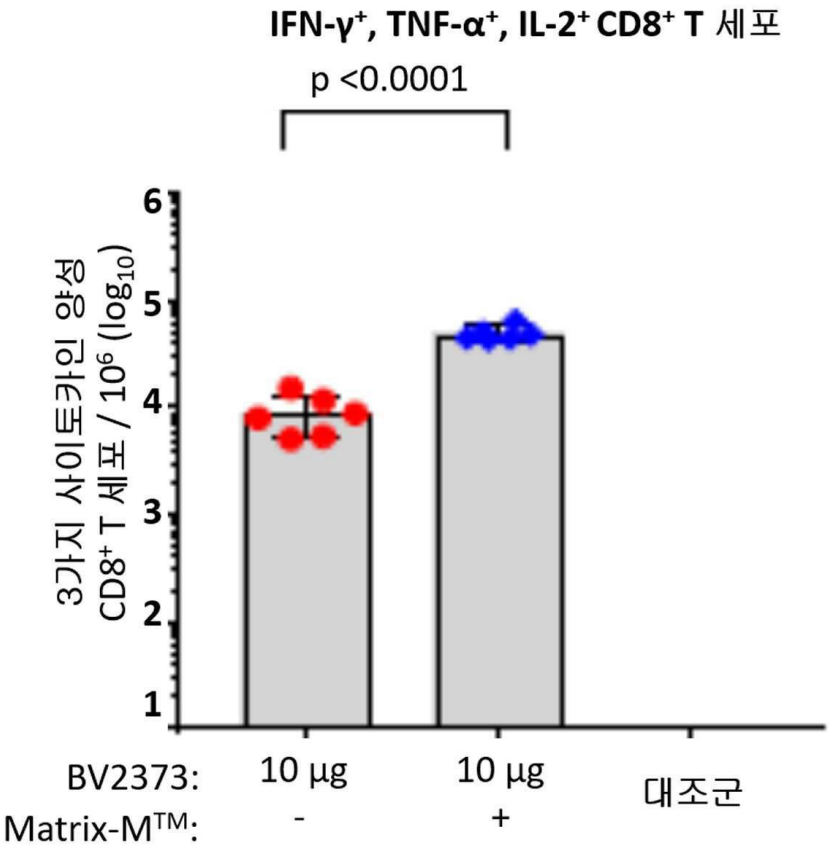
도면21c


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

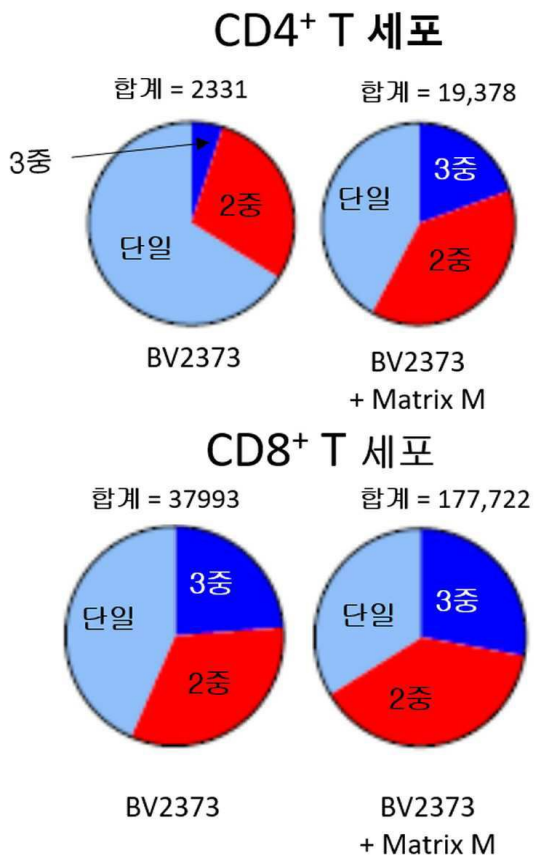
도면21d


2가지 사이토카인+ CD8+ T 세포
p <0.0001
2가지 사이토카인 양성 CD8+ T 세포 / 10^6 (log10)
6
5
4
3
2
1
BV2373:
Matrix-M™:
10 µg
-
10 µg
+
대조군

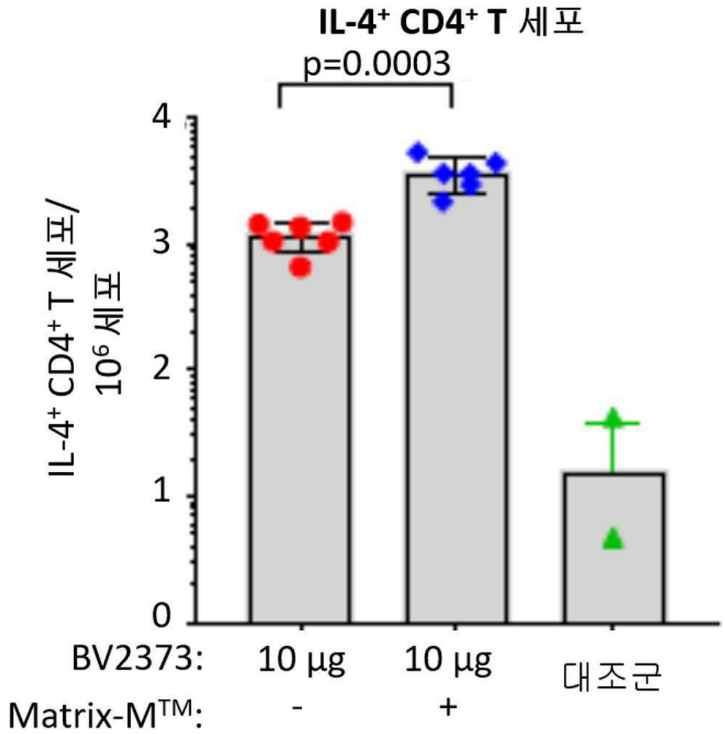
도면21e


IFN-γ+, TNF-α+, IL-2+ CD8+ T 세포
p <0.0001
3가지 사이토카인 양성 CD8+ T 세포 / 10^6 (log10)
6
5
4
3
2
1
BV2373:
Matrix-M™:
10 µg
-
10 µg
+
대조군

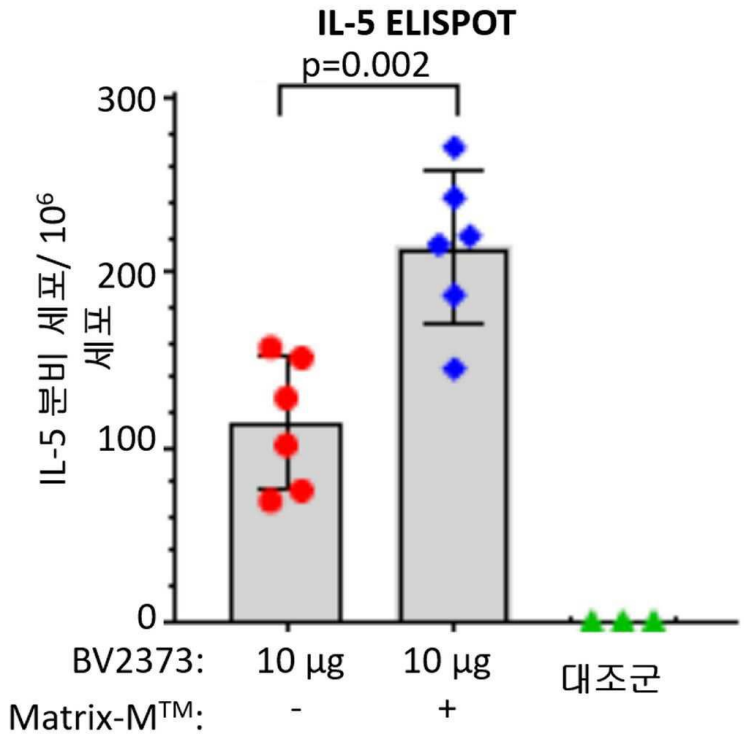
도면22


CD4+ T 세포
합계 = 2331
합계 = 19,378
3중
2중
단일
3중
단일
2중
BV2373
BV2373
+ Matrix M
CD8+ T 세포
합계 = 37993
합계 = 177,722
단일
3중
2중
단일
3중
2중
BV2373
BV2373
+ Matrix M

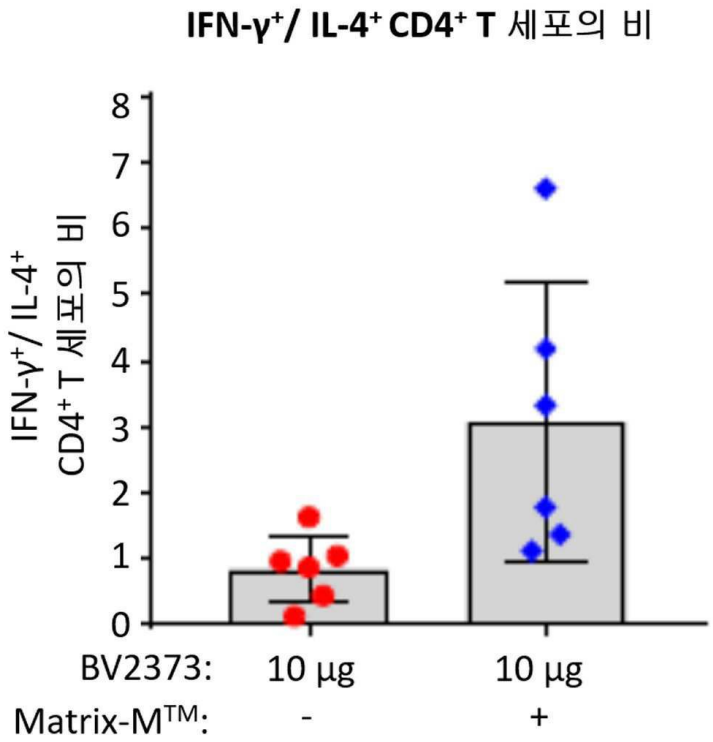
도면23a


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

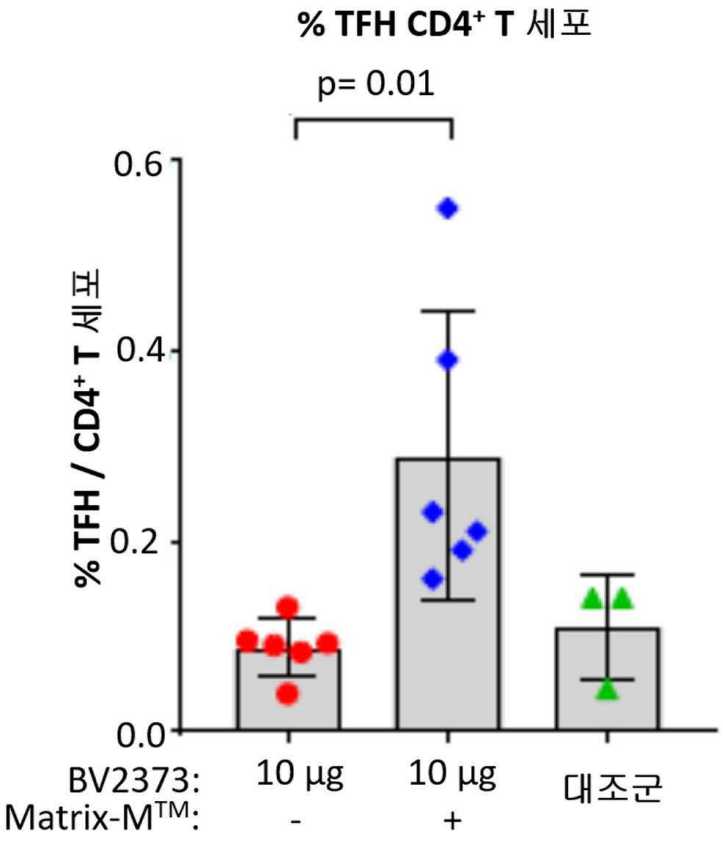
도면23b


IL-5 ELISPOT
p=0.002
300
200
100
0
IL-5 분비 세포/ 10⁶ 세포
BV2373:
10 μg
10 μg
대조군
Matrix-M™:
-
+

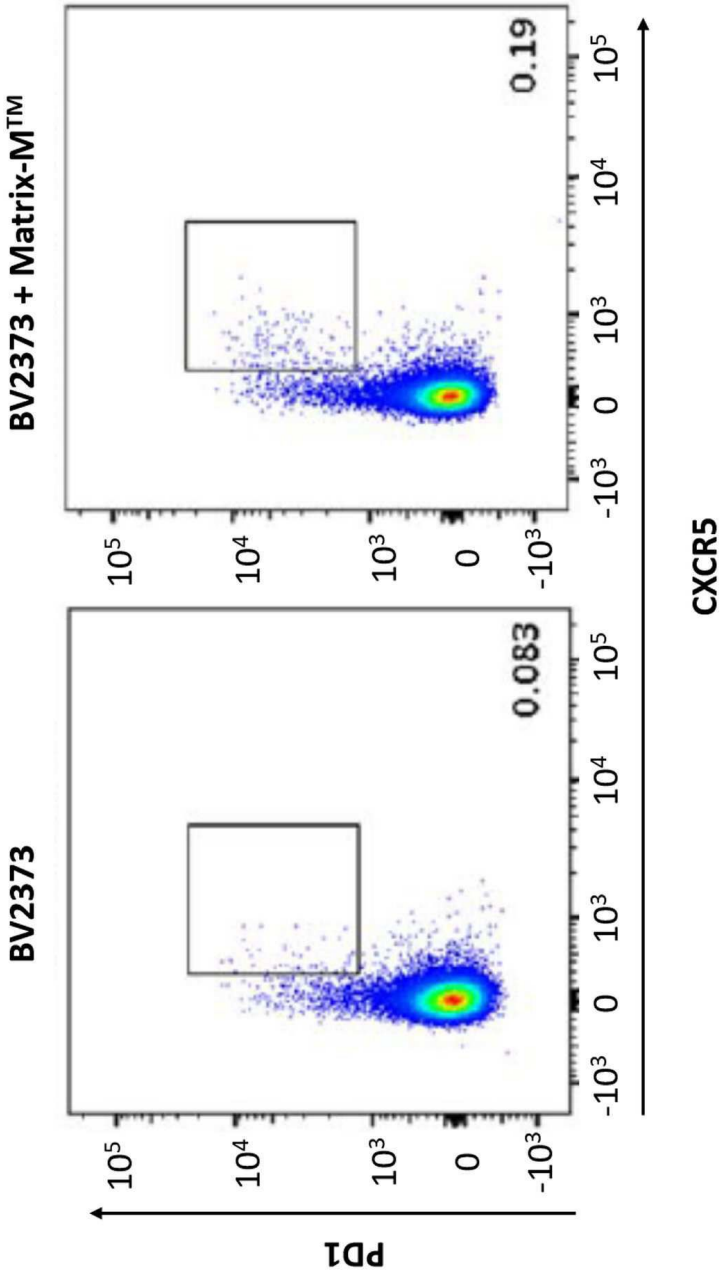
도면23c


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

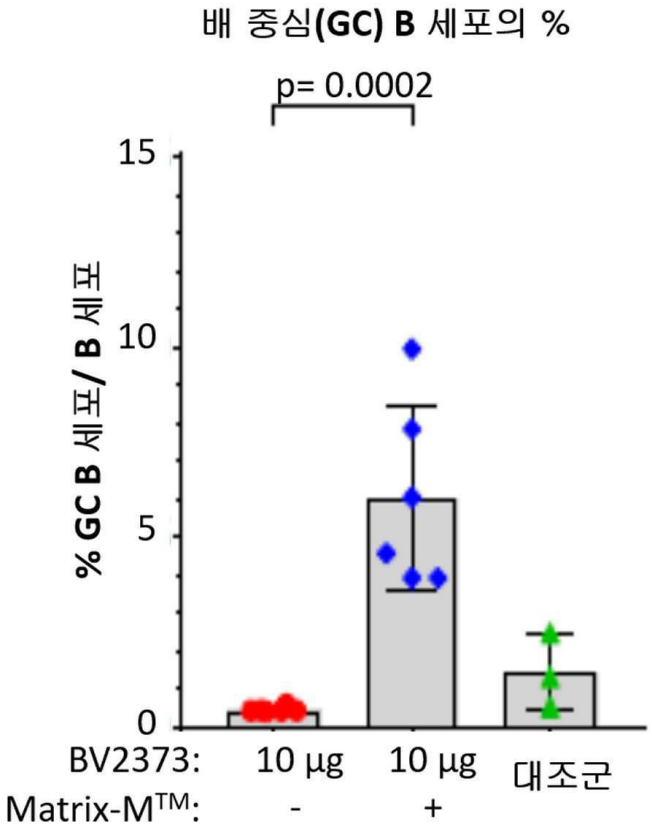
도면24a


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

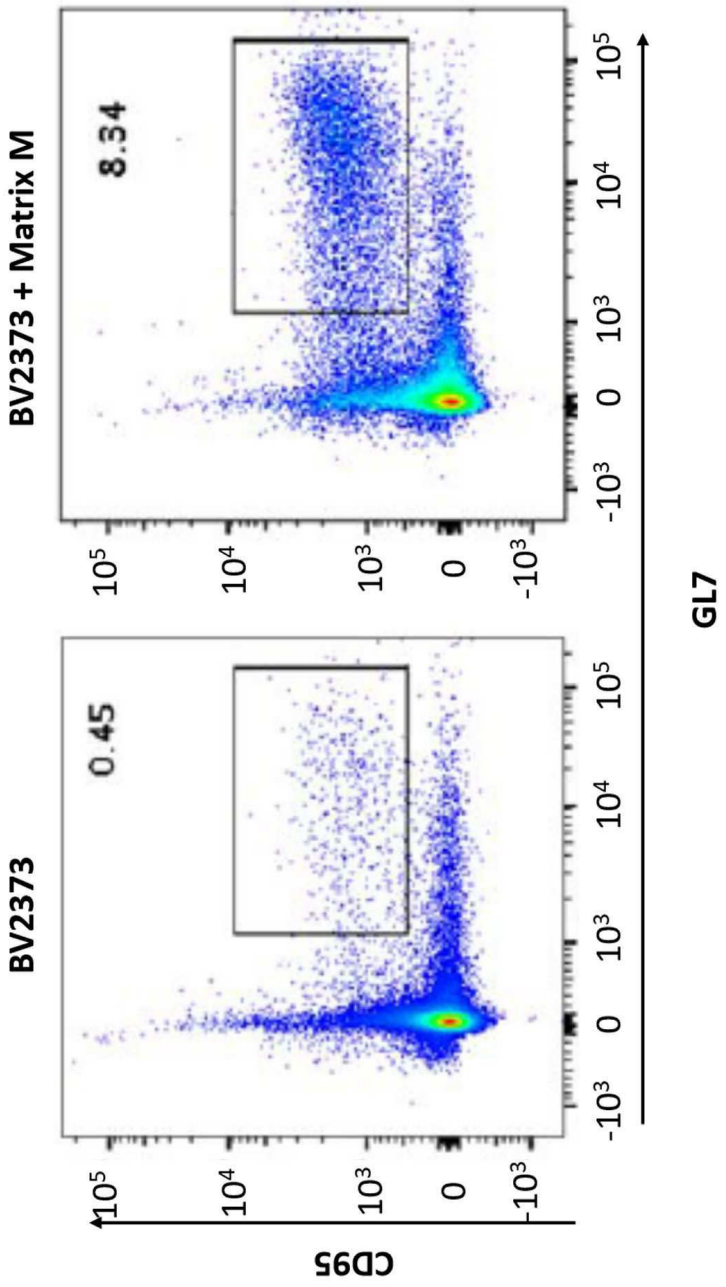
도면24b



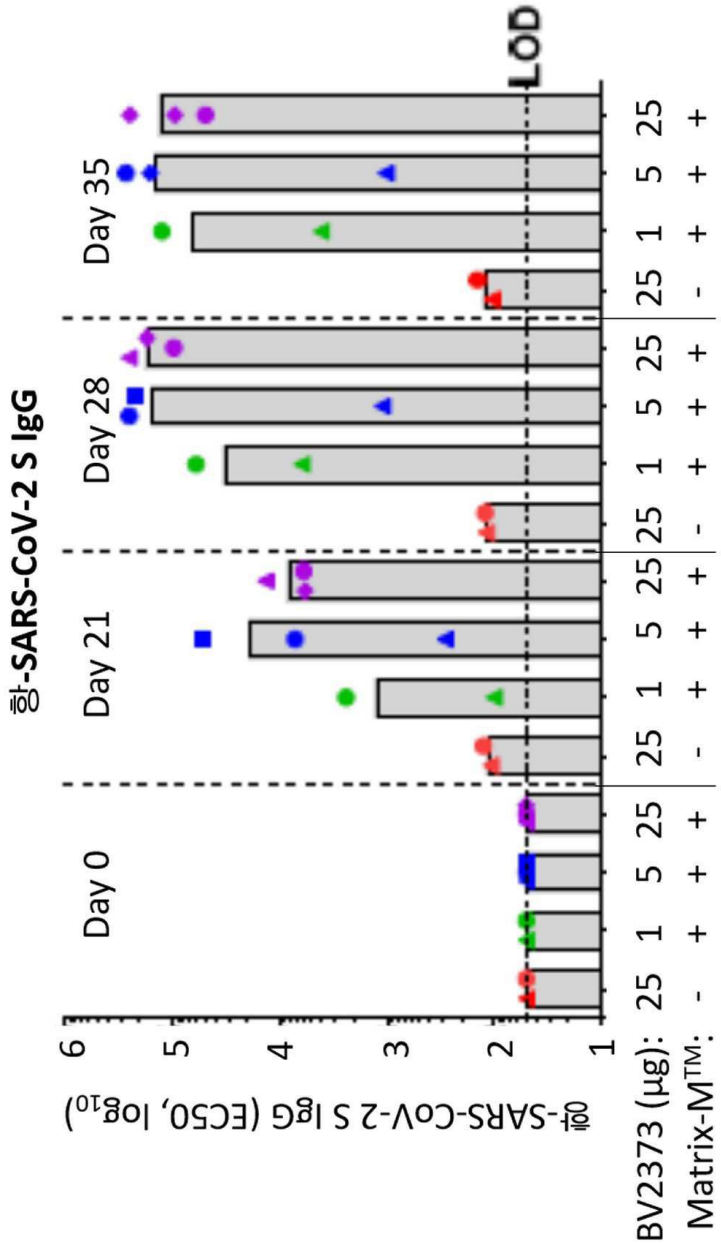
도면25a


배 중심(GC) B 세포의 %
p= 0.0002
% GC B 세포/ B 세포
15
10
5
0
BV2373:
10 µg
10 µg
대조군
Matrix-M™:
-
+

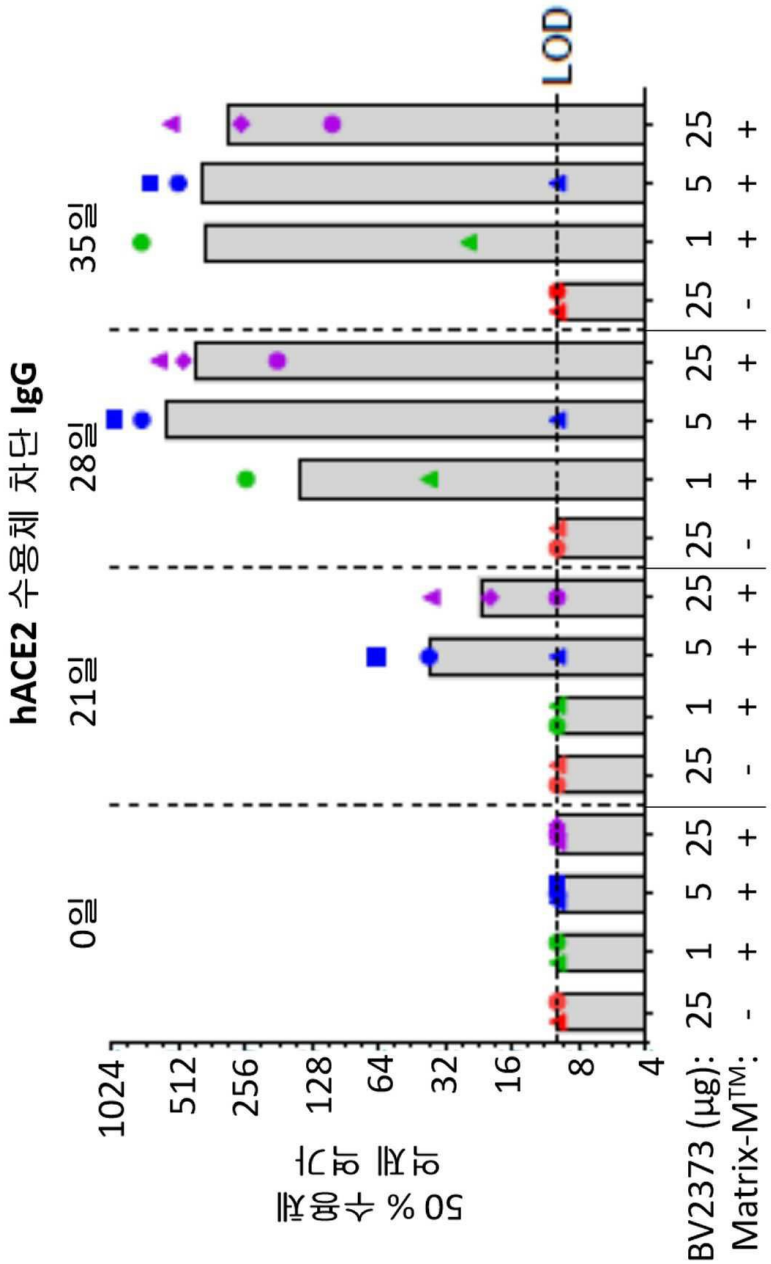
도면25b



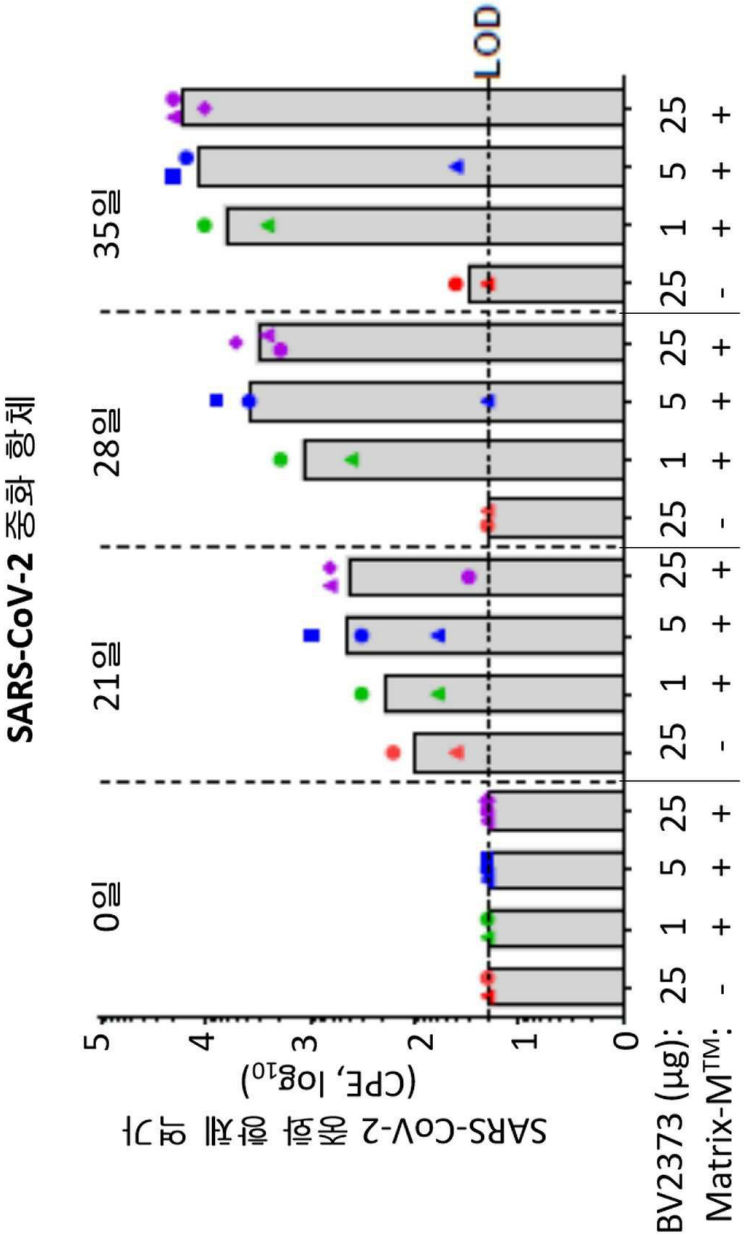
도면26a


LOD
Day 35
Day 28
Day 21
Day 0
항-SARS-CoV-2 S IgG
항-SARS-CoV-2 S IgG (EC50, log10)
6
5
4
3
2
1
BV2373 (μg): 25 1 5 25 25 1 5 25 25 1 5 25 25 1 5 25
Matrix-M™: - + + + - + + + - + + + - + + +

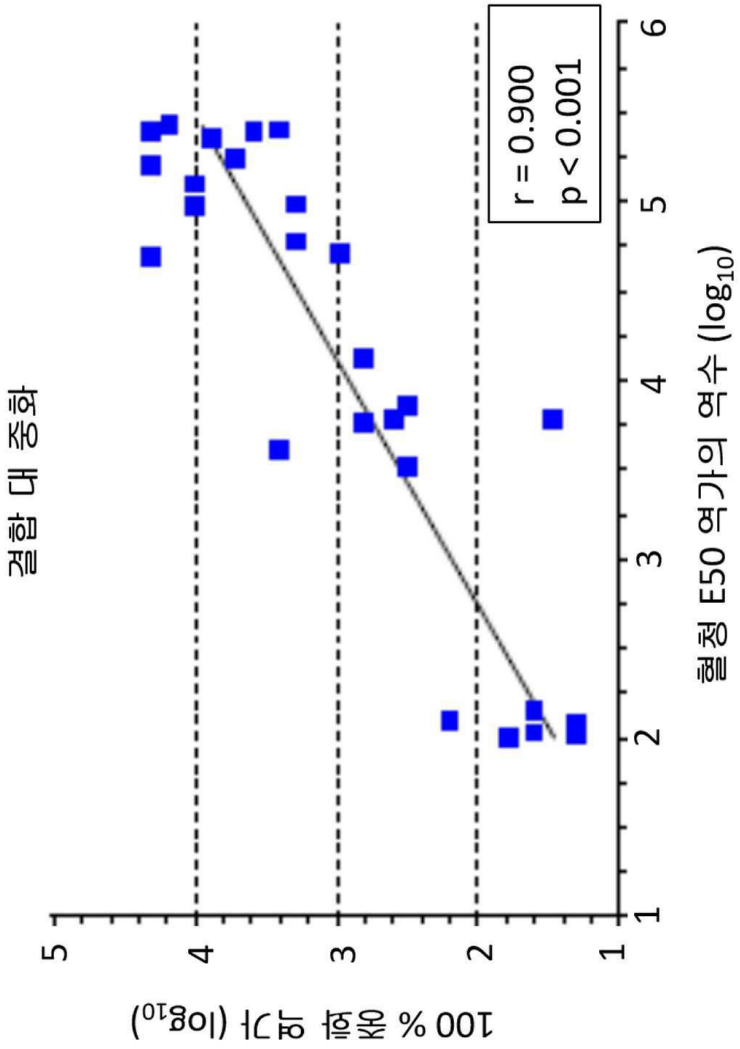
도면26b


hACE2 수용체 차단 IgG
0일
21일
28일
35일
LOD
50 % 수용체 차단 역가
1024
512
256
128
64
32
16
8
4
BV2373 (μg): 25 1 5 25 25 1 5 25 25 1 5 25 25 1 5 25
Matrix-M™: - + + + - + + + - + + + - + + +

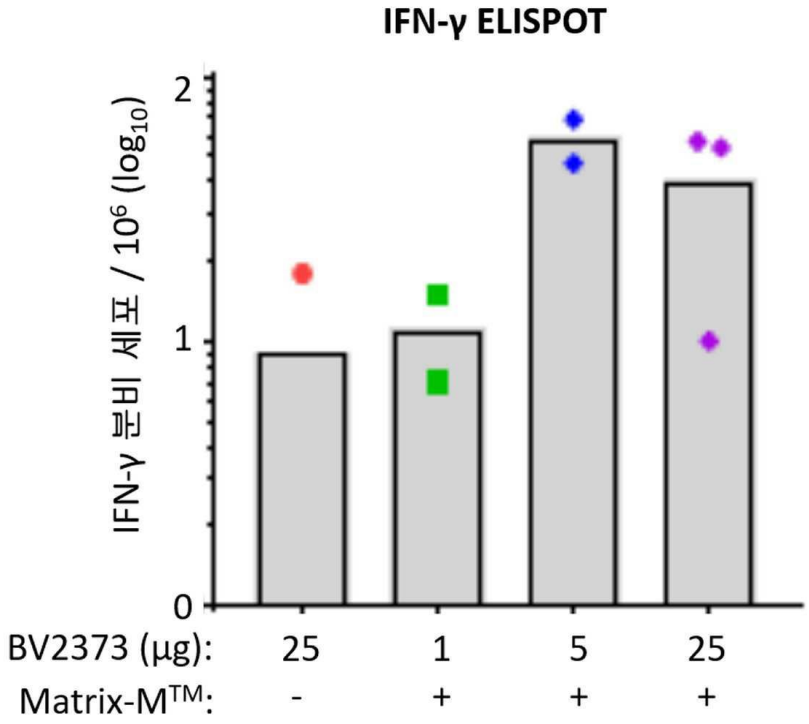
도면26c


SARS-CoV-2 중화 항체
SARS-CoV-2 중화 역가 (CPE, log10)
0
1
2
3
4
5
LOD
0일
21일
28일
35일
BV2373 (μg): 25 1 5 25 25 1 5 25 25 1 5 25 25 1 5 25
Matrix-M™: - + + + - + + + - + + + - + + +

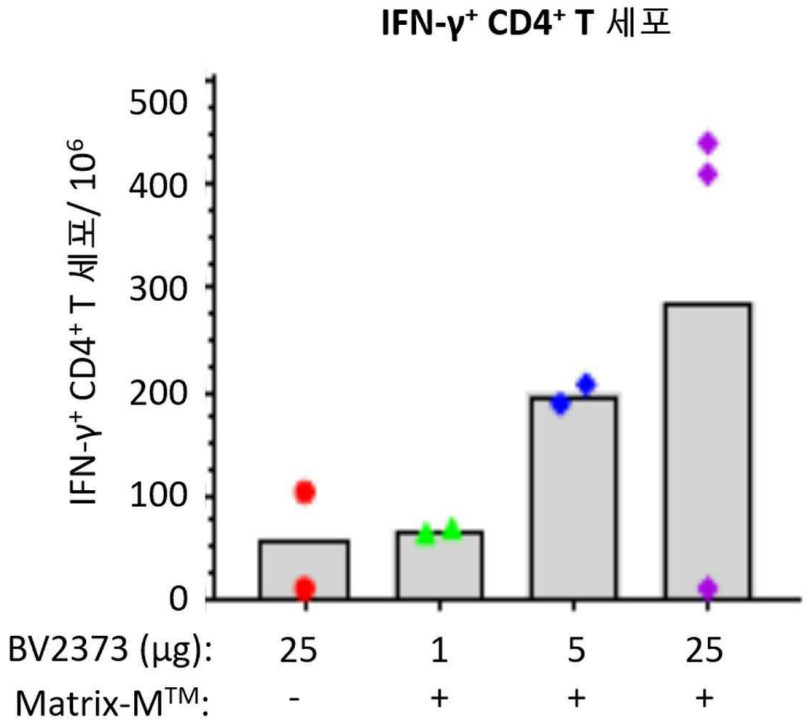
도면27



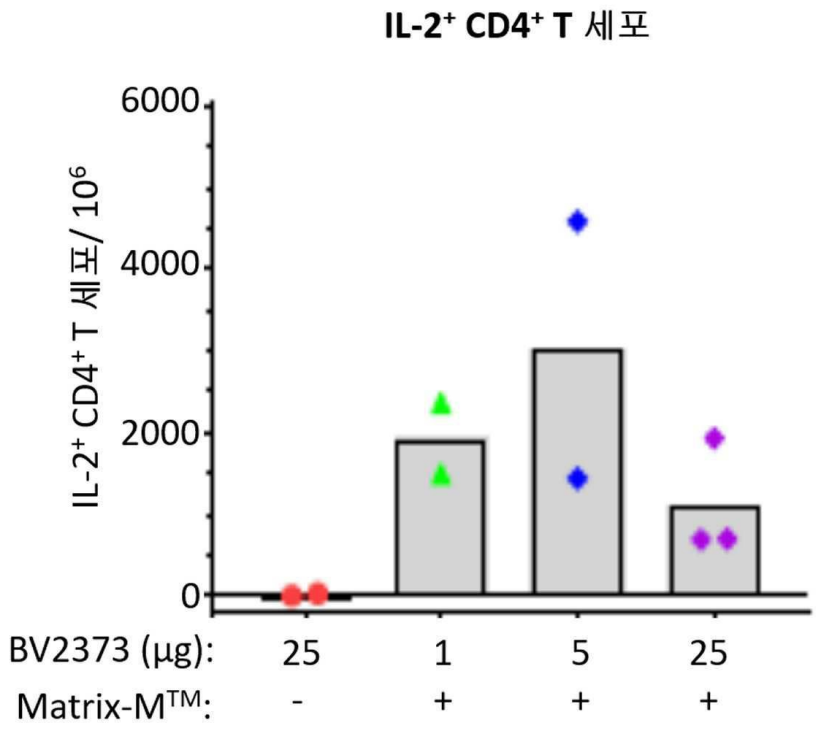
도면28


IFN-γ ELISPOT
IFN-γ 분비 세포 / 10⁶ (log₁₀)
2
1
0
BV2373 (μg):
25
1
5
25
Matrix-M™:
-
+
+
+

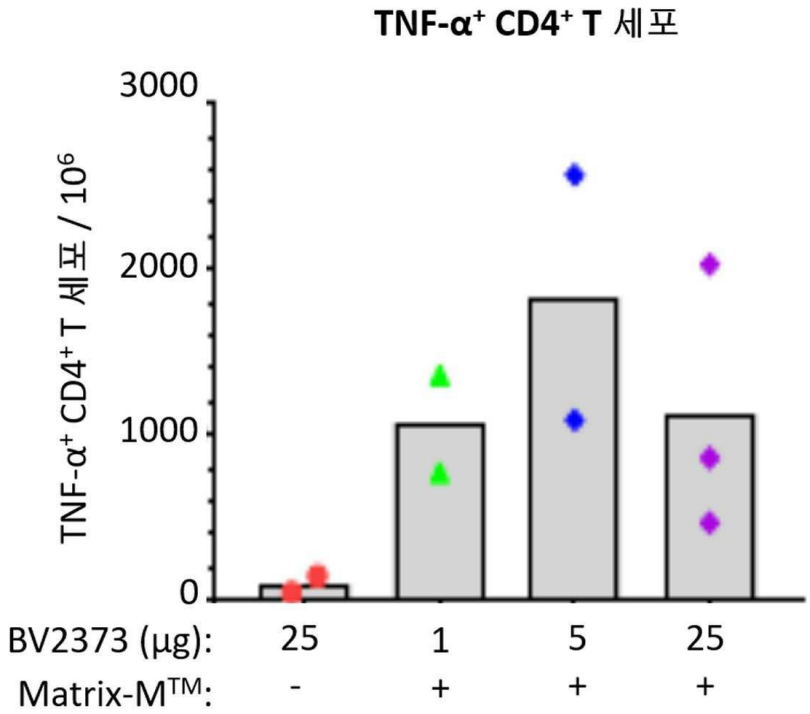
도면29a


IFN-γ⁺ CD4⁺ T 세포
IFN-γ⁺ CD4⁺ T 세포/ 10⁶
500
400
300
200
100
0
BV2373 (μg):
25
1
5
25
Matrix-M™:
-
+
+
+

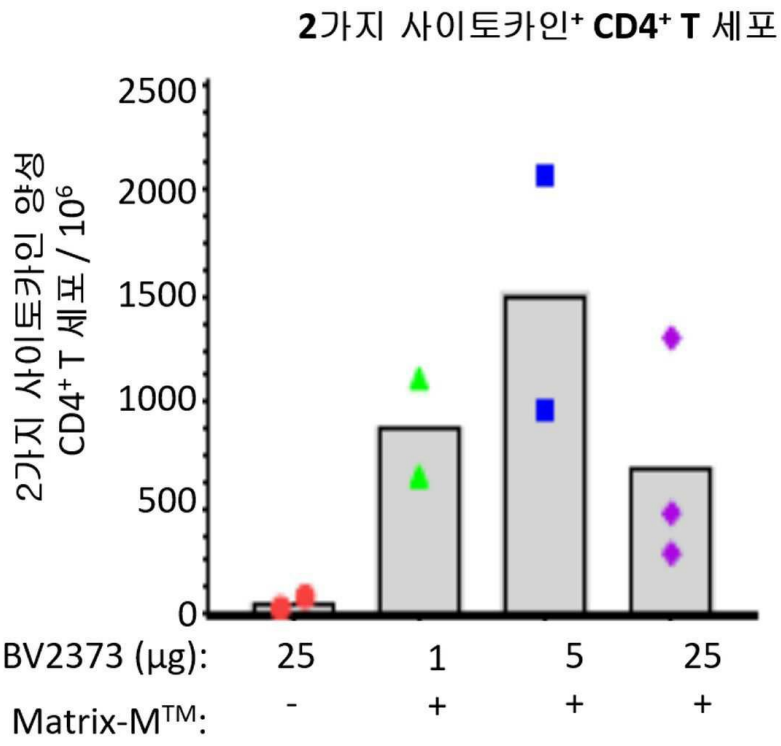
도면29b


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

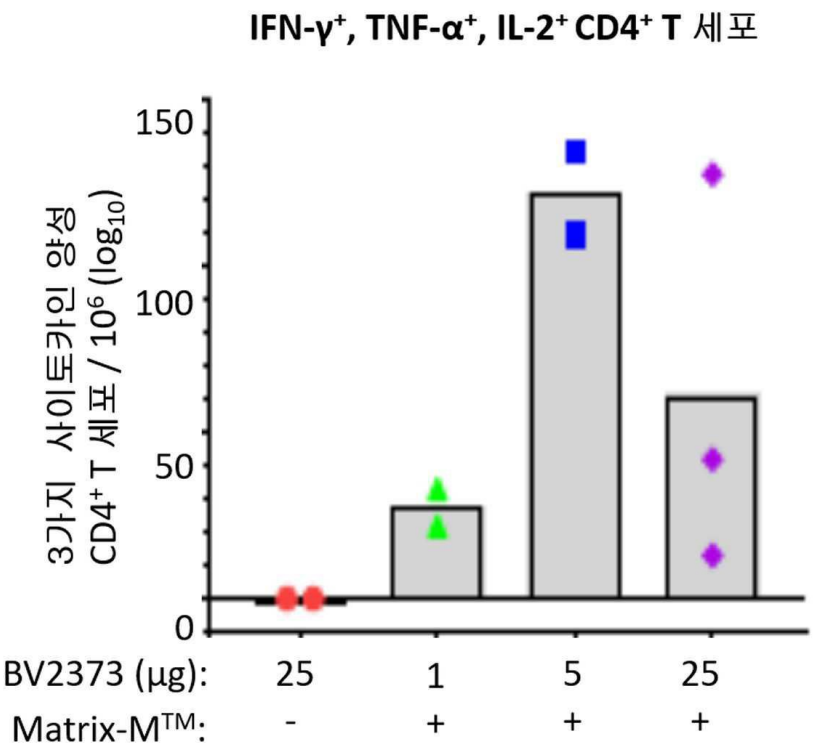
도면29c


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

도면29d


2가지 사이토카인+ CD4+ T 세포
2가지 사이토카인 양성 CD4+ T 세포 / 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 세포
3가지 사이토카인 양성 CD4+ T 세포 / 10^6 (log10)
150
100
50
0
BV2373 (μg): 25 1 5 25
Matrix-M™: - + + +

도면30

BV2384: CoV-2019/GSAS/K986P/V987P (서열번호 109)

등전점 Pt (pI) 5.89

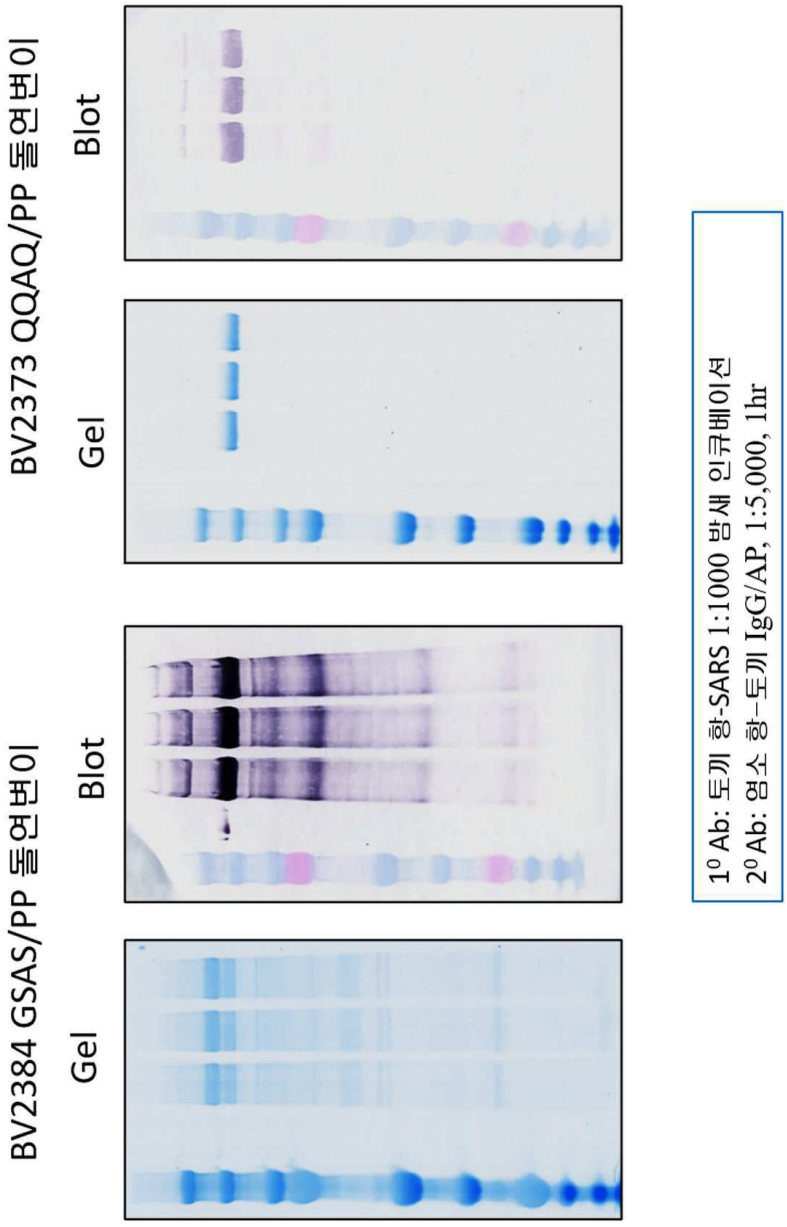
신호 펩티드

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

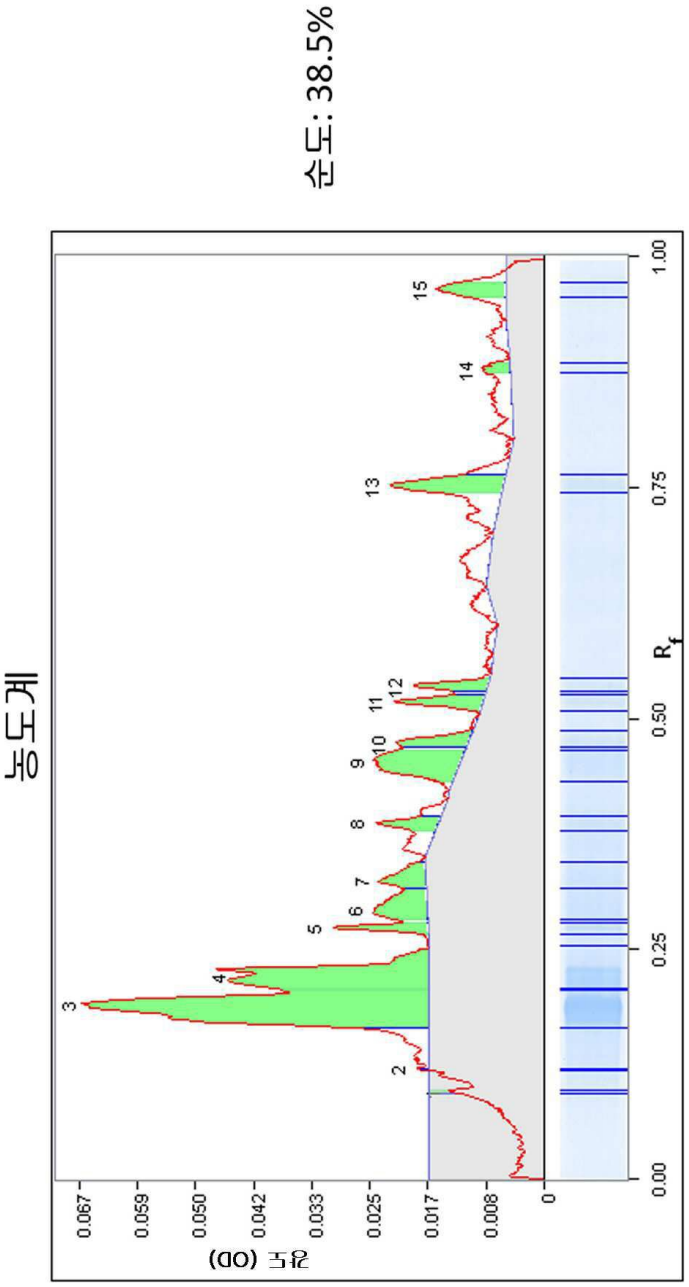
도면31

BV2373 (서열번호 86)
CoV-2019/QQAQ/K986P/V987P
불활성 퓨린
절단 부위
신호 펩티드
MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGT
NGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYH
KNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQG
FSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCA
LDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADY
SVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNS
NNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVV
VLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEI
LDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVN
NSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPQQAQSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVS
MTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFS
QILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSA
LLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQ
DVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDPPEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASA
NLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVF
VSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGD
ISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCC
SCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT

도면32


BV2384 GSAS/PP 돌연변이
Gel
Blot
BV2373 QQAQ/PP 돌연변이
Gel
Blot
1⁰ Ab: 토끼 항-SARS 1:1000 밤새 인큐베이션
2⁰ Ab: 염소 항-토끼 IgG/AP, 1:5,000, 1hr

도면33



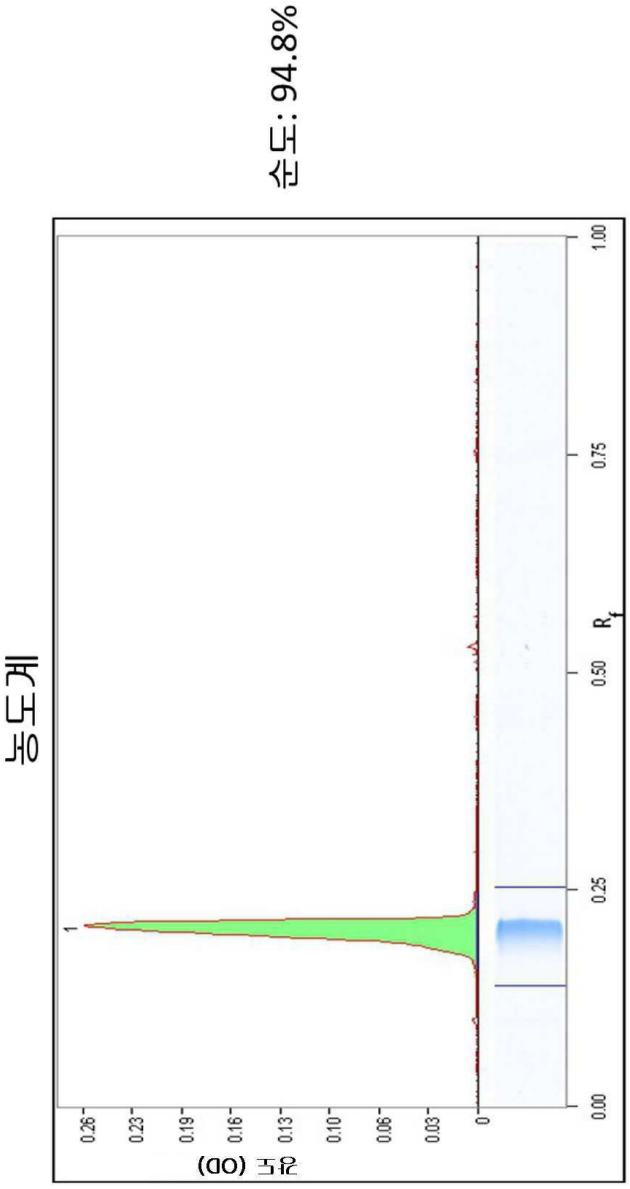
단백질 농도:

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

총 부피: 19.0mL X 0.6894 mg/mL = 13.098 mg

수율: 13.098mg/4.8 리터 = 2.728 mg/L

도면34



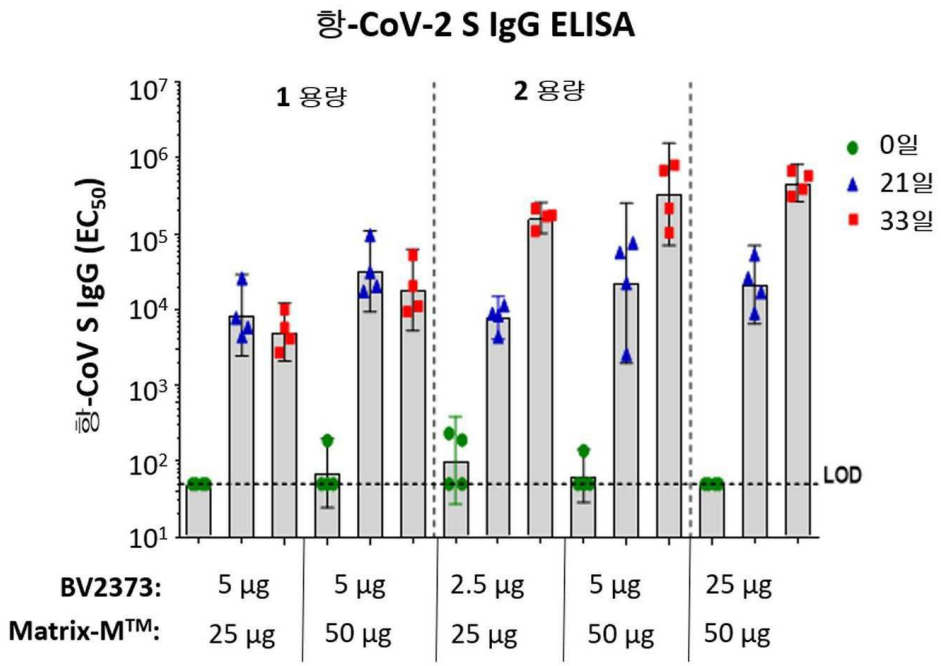
단백질 농도:

A280(0.8368) - A340(0.0248) = 0.8142 /1.067 = 0.761 mg/mL

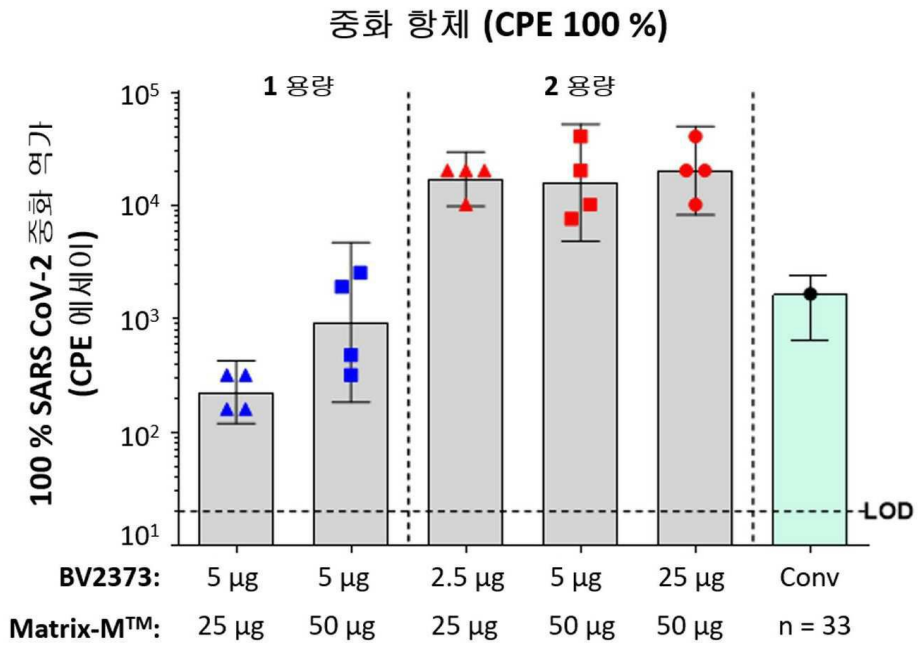
총 부피: 42.47mL X 0.761 mg/mL = 42.32 mg

수율: 42.32mg/5 리터 = 6.4 mg/L

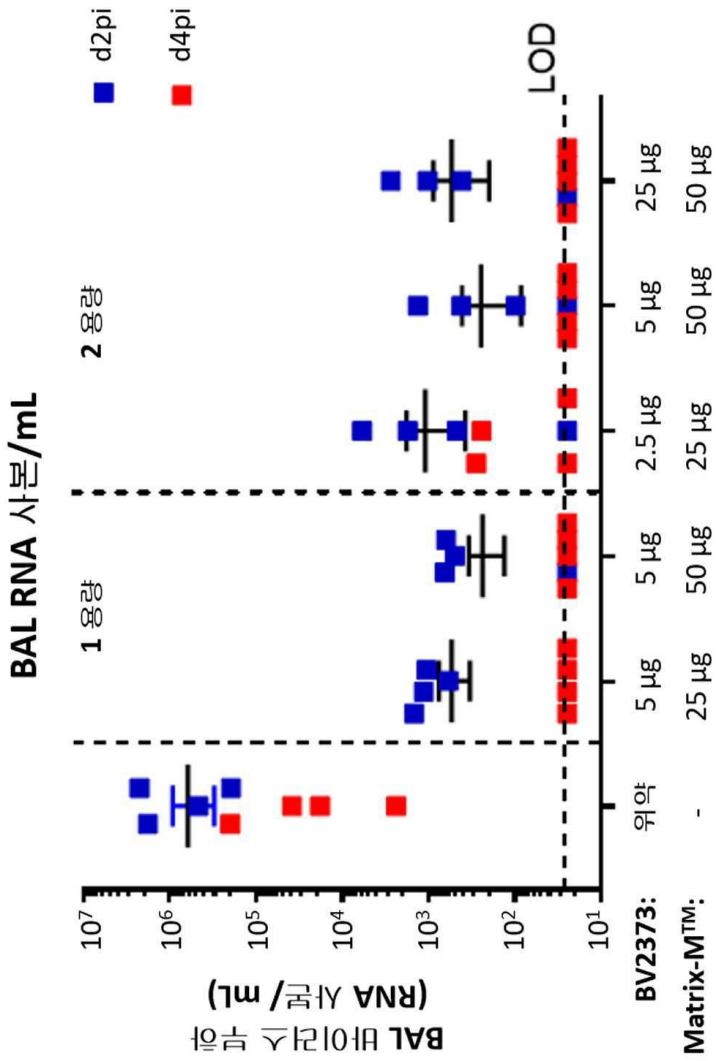
도면35a


항-CoV-2 S IgG ELISA
1 용량
2 용량
항-CoV S IgG (EC50)
0일
21일
33일
LOD
BV2373:
Matrix-M™:
5 µg
25 µg
5 µg
50 µg
2.5 µg
25 µg
5 µg
50 µg
25 µg
50 µg

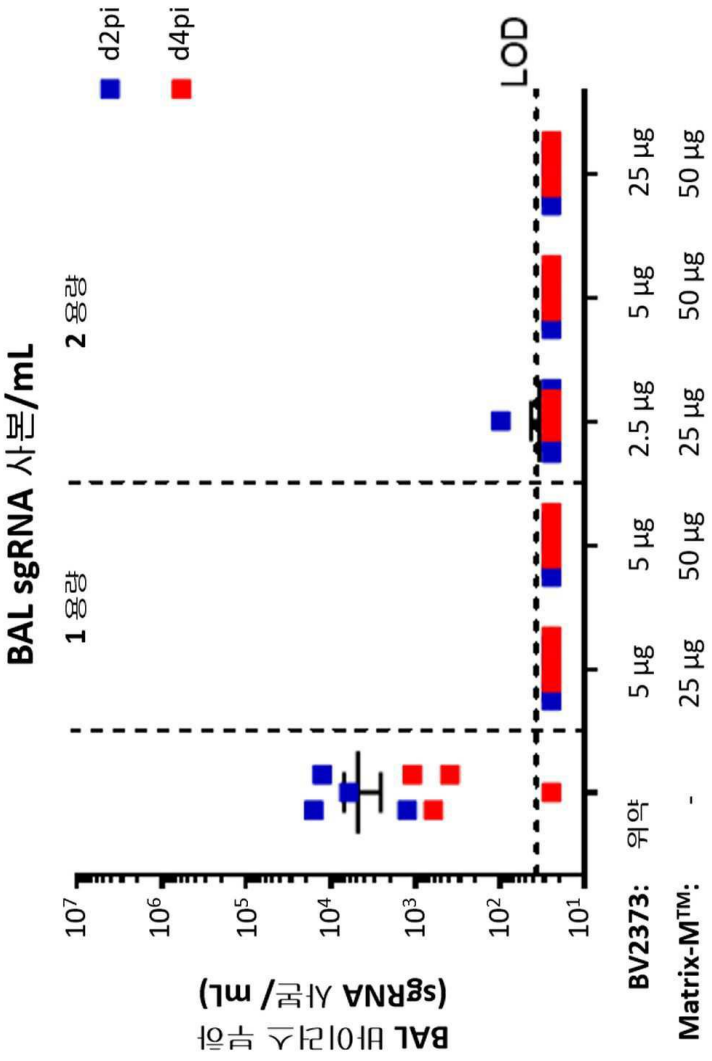
도면35b


중화 항체 (CPE 100 %)
1 용량
2 용량
100 % SARS CoV-2 중화 역가
(CPE 에세이)
LOD
BV2373:
Matrix-M™:
5 µg
25 µg
5 µg
50 µg
2.5 µg
25 µg
5 µg
50 µg
25 µg
50 µg
Conv
n = 33

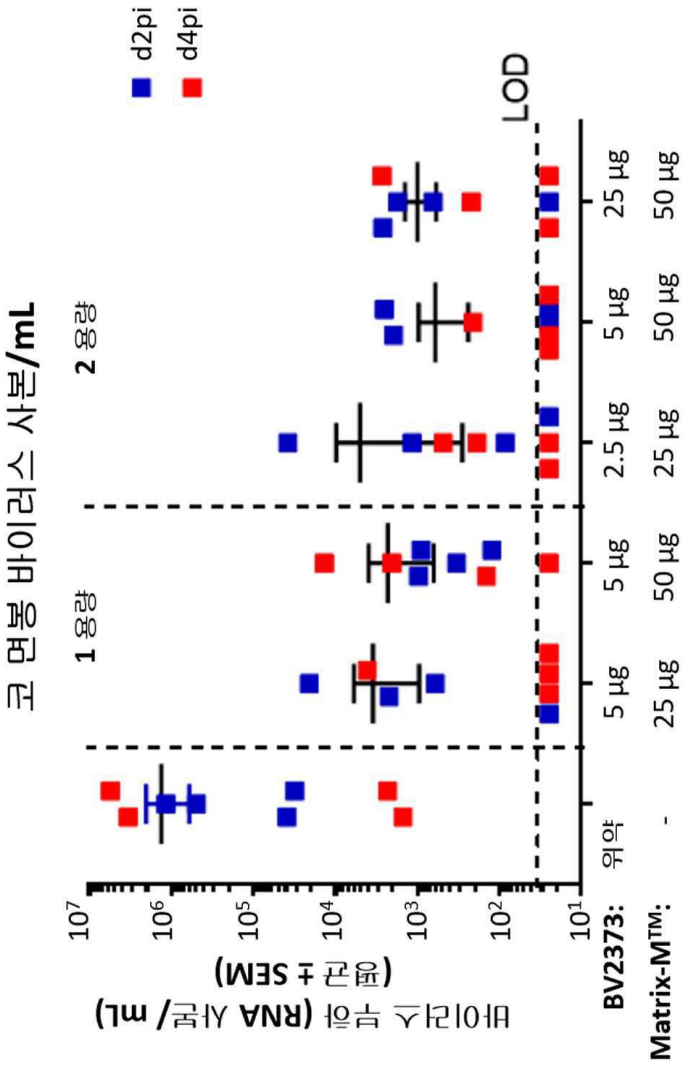
도면36a


BAL RNA 사본/mL
BAL 바이러스 부하
(RNA 사본/ mL)
d2pi
d4pi
LOD
1 용량
2 용량
BV2373:
Matrix-M™:
위약
-
5 µg
25 µg
5 µg
50 µg
2.5 µg
25 µg
5 µg
50 µg
25 µg
50 µg

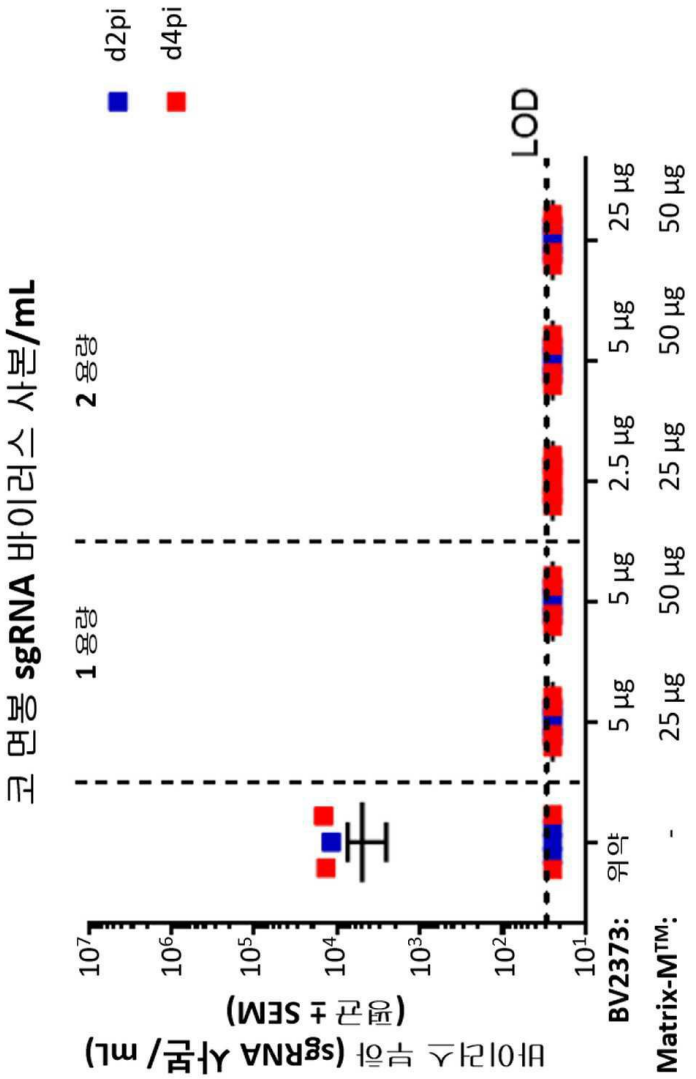
도면36b


BAL sgRNA 사본/mL
1 용량
2 용량
d2pi
d4pi
LOD
BAL 바이러스 부하
(sgRNA 사본/ mL)
BV2373:
Matrix-M™:
위약
-
5 µg
25 µg
5 µg
50 µg
2.5 µg
25 µg
5 µg
50 µg
25 µg
50 µg

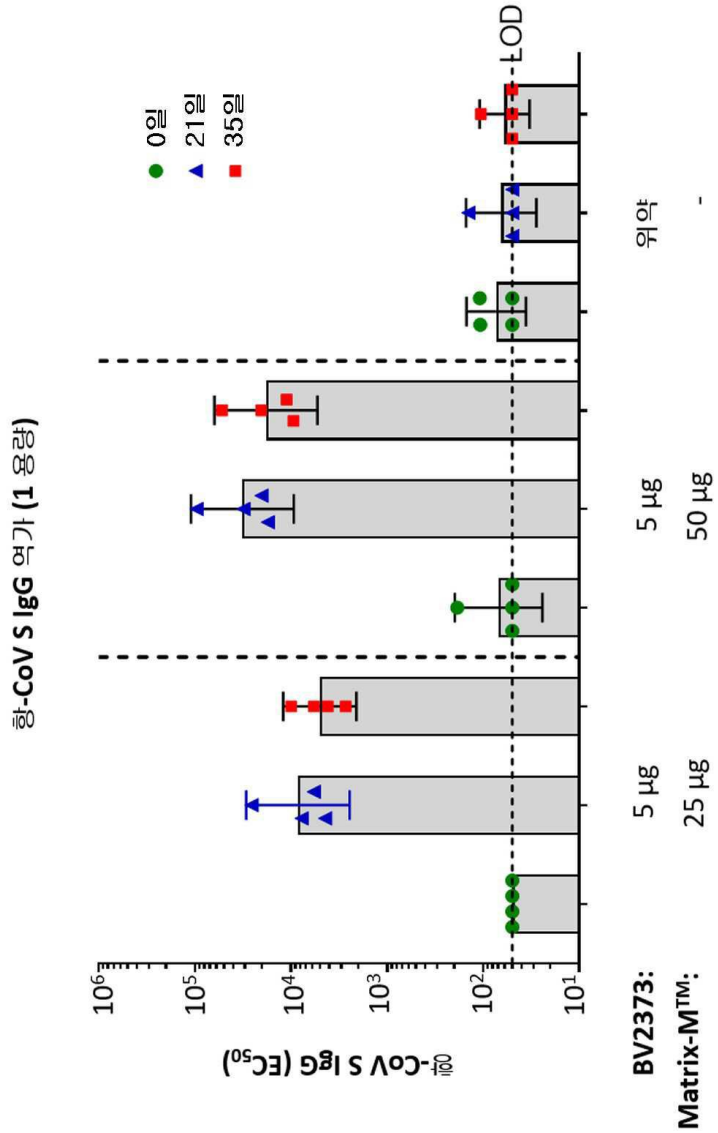
도면37a


코 면봉 바이러스 사본/mL
d2pi
d4pi
1 용량
2 용량
LOD
바이러스 부하 (RNA 사본/ mL)
(평균 ± SEM)
BV2373:
Matrix-M™:
위약
-
5 µg
25 µg
50 µg
2.5 µg
5 µg
25 µg
50 µg

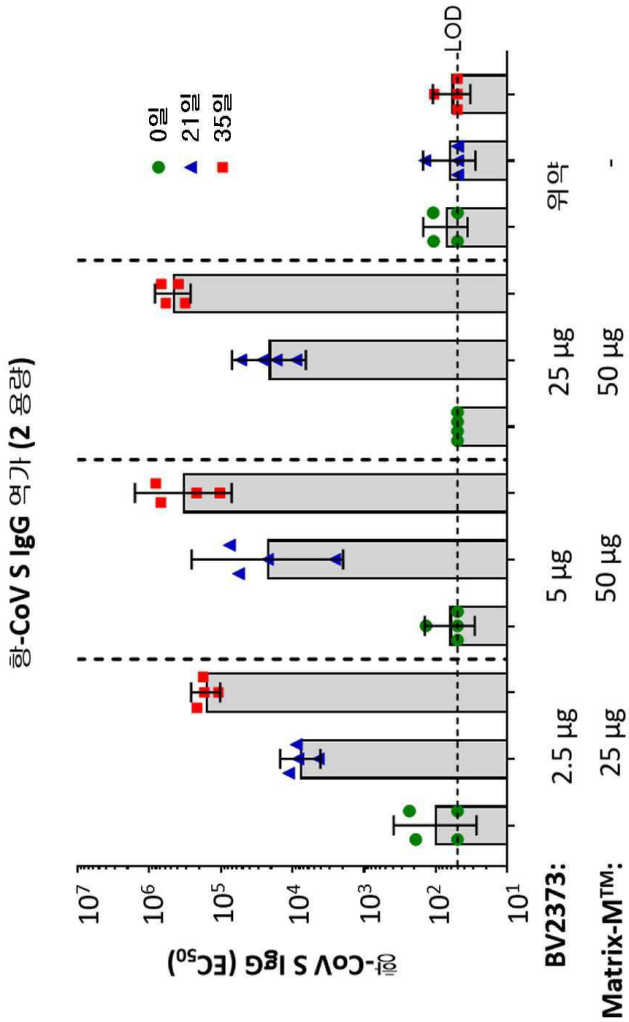
도면37b


코 면봉 sgRNA 바이러스 사본/mL
d2pi
d4pi
1 용량
2 용량
LOD
바이러스 부하 (sgRNA 사본/ mL)
(평균 ± SEM)
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

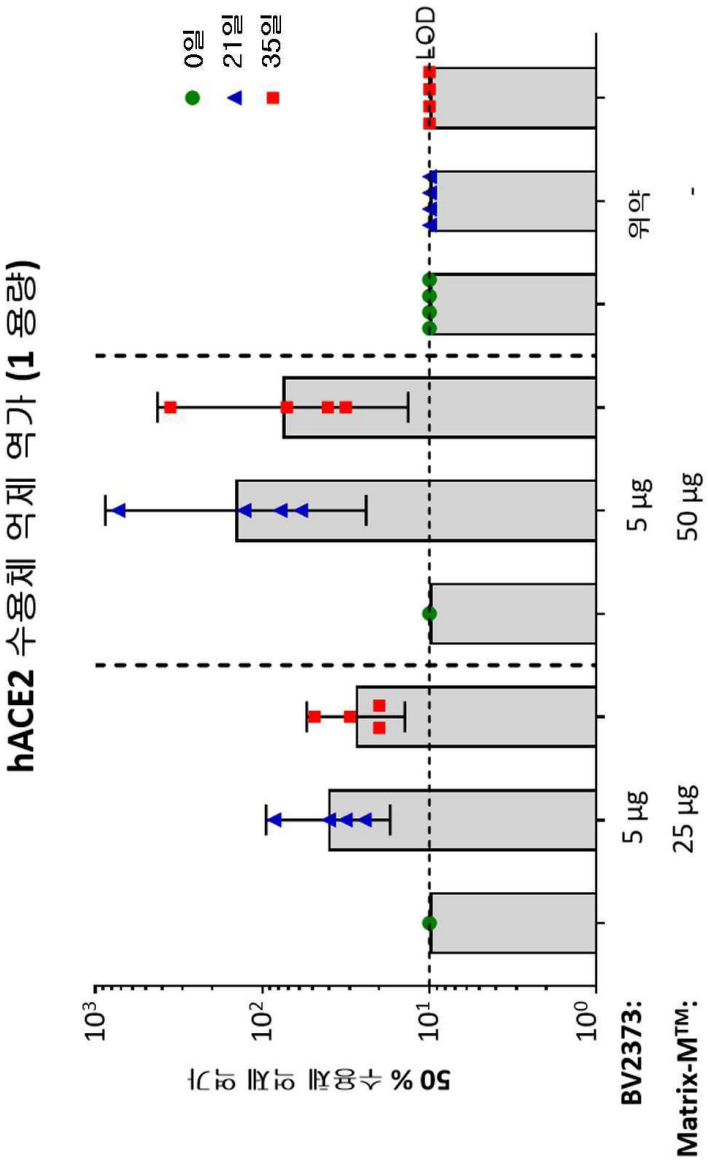
도면38a


항-CoV S IgG 역가 (1 용량)
0일
21일
35일
LOD
항-CoV S IgG (EC50)
BV2373:
Matrix-M™:
5 μg
25 μg
5 μg
50 μg
위약
-

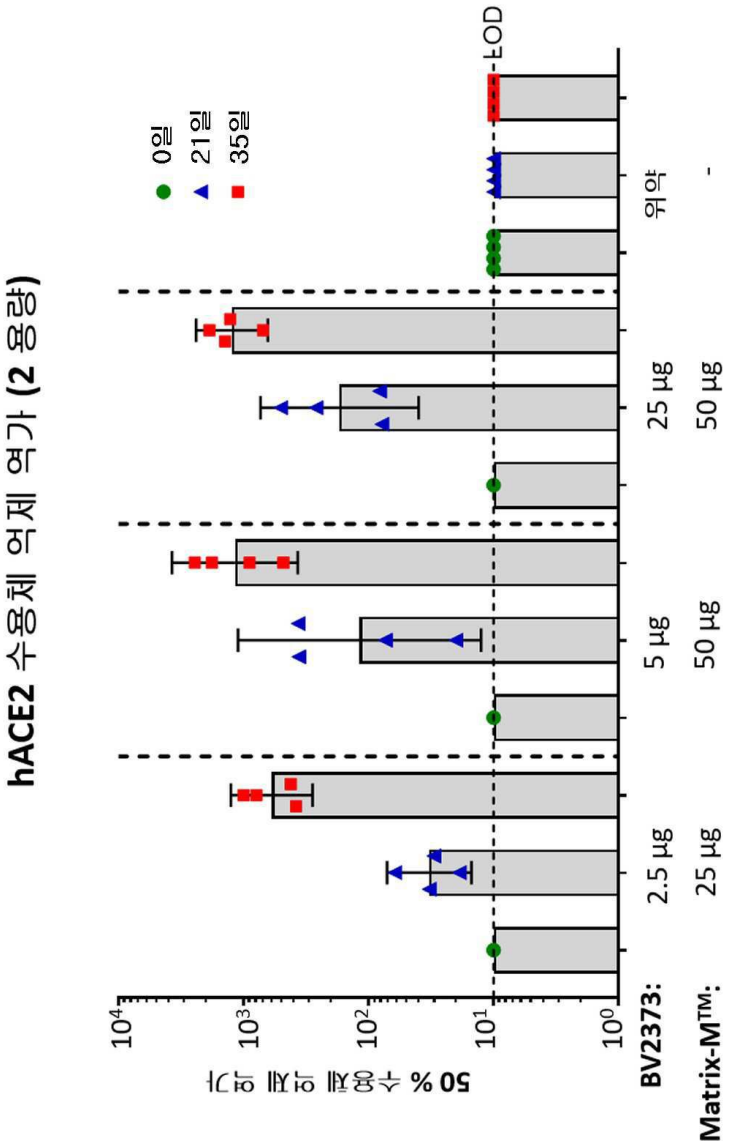
도면38b


항-CoV S IgG 역가 (2 용량)
항-CoV S IgG (EC50)
0일
21일
35일
LOD
BV2373:
Matrix-M™:
2.5 µg
25 µg
5 µg
50 µg
25 µg
50 µg
위약
-

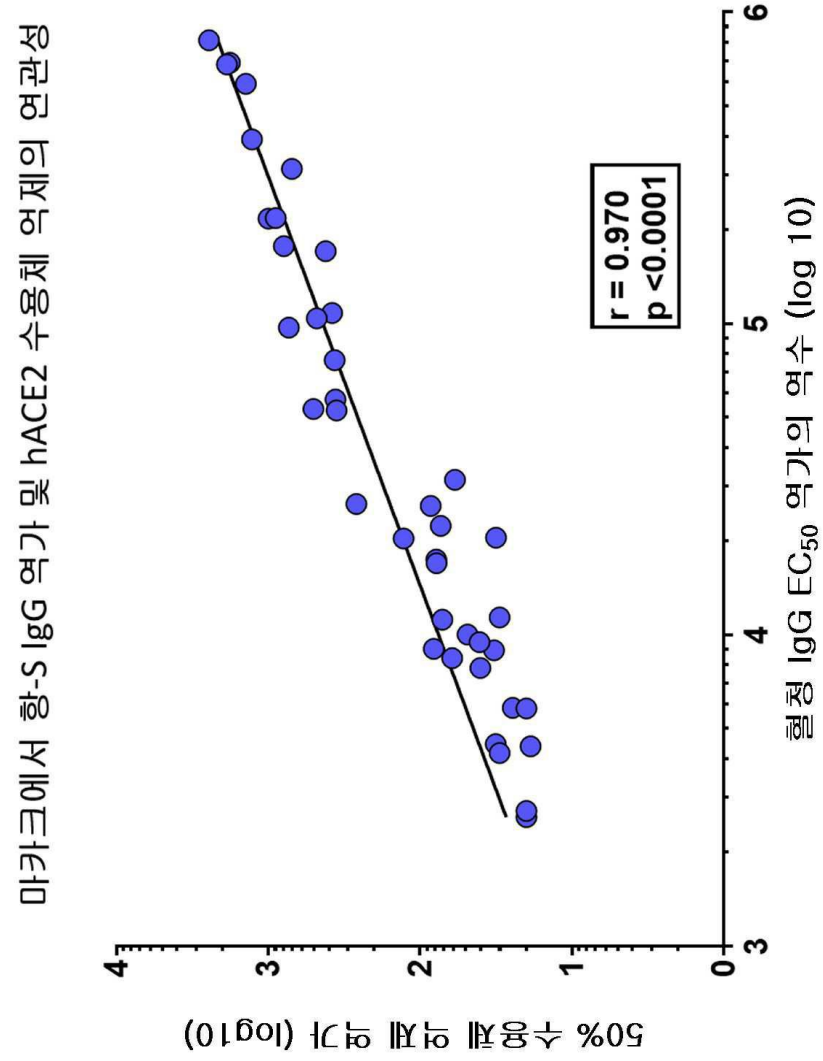
도면38c


hACE2 수용체 억제 역가 (1 용량)
50 % 수용체 억제 역가
0일
21일
35일
LOD
위약
5 µg
50 µg
5 µg
25 µg
BV2373:
Matrix-M™:
-

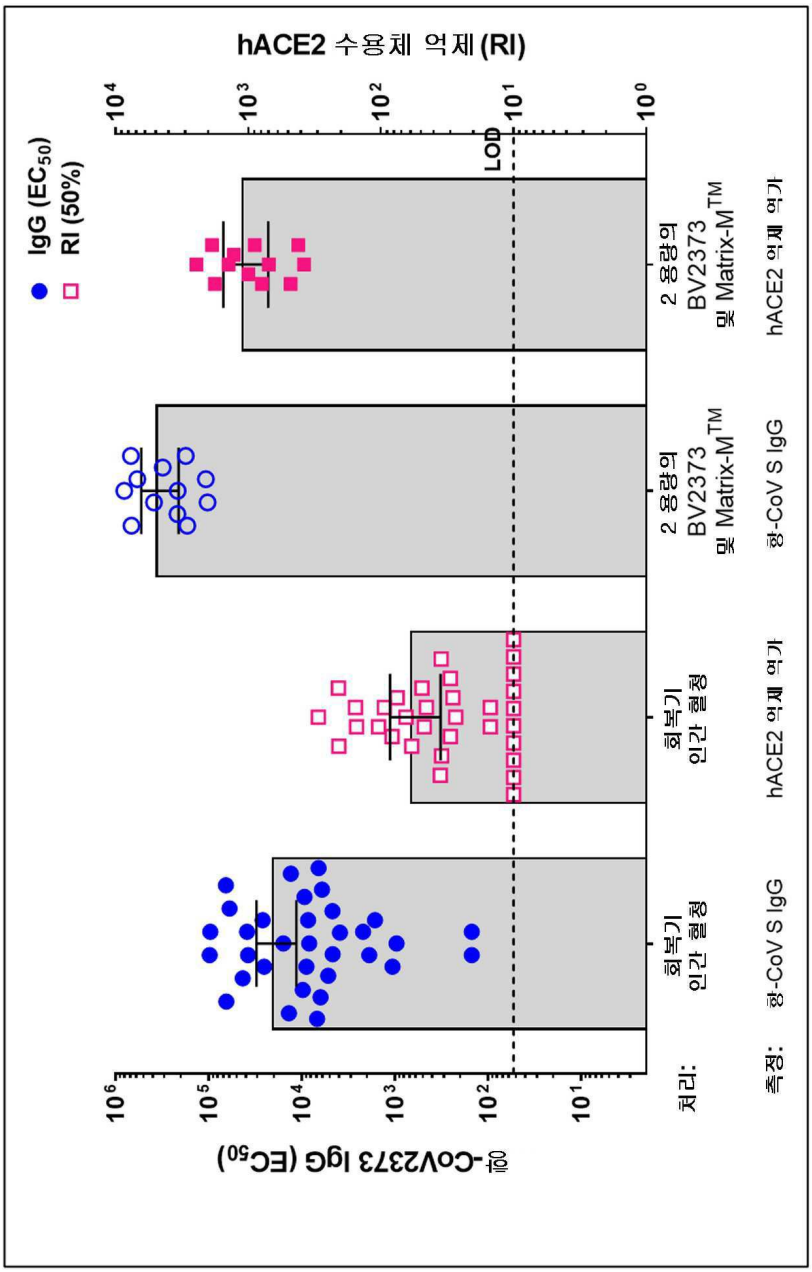
도면38d


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

도면38e

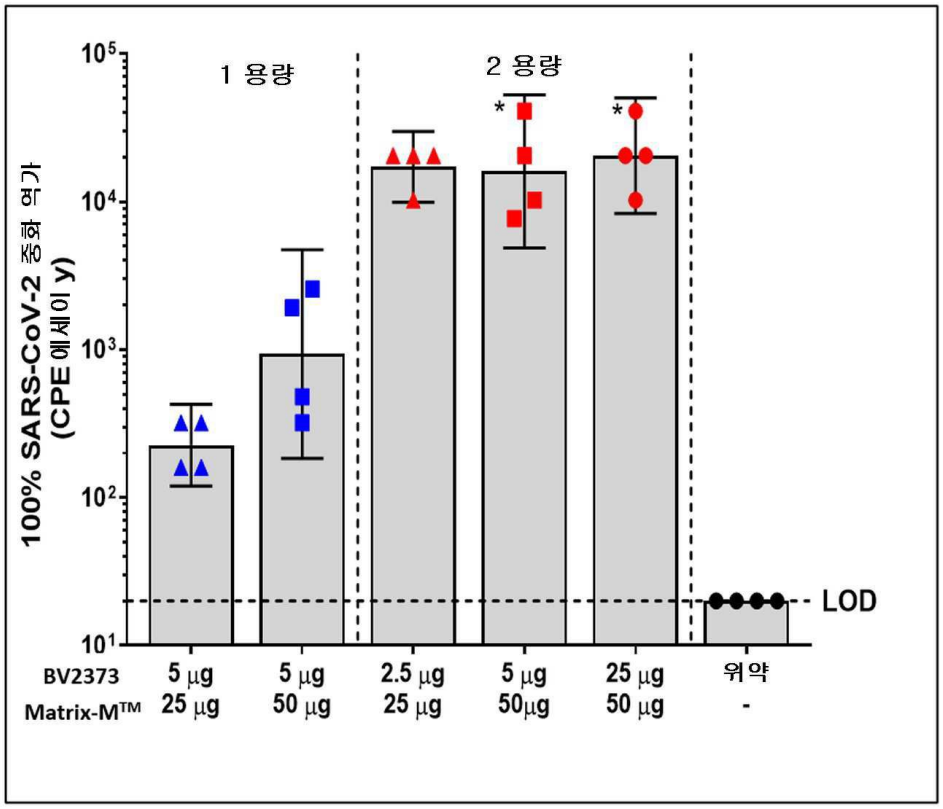

마카크에서 항-S IgG 역가 및 hACE2 수용체 억제의 연관성
50% 수용체 억제 역가 (log10)
혈청 IgG EC_{50} 역가의 역수 (log 10)
r = 0.970
p <0.0001
0
1
2
3
4
3
4
5
6

도면39


hACE2 수용체 억제 (RI)
IgG (EC50)
RI (50%)
LOD
항-CoV2373 IgG (EC50)
처리:
회복기 인간 혈청
2 용량의 BV2373 및 Matrix-M™
측정:
항-CoV S IgG
hACE2 억제 역가

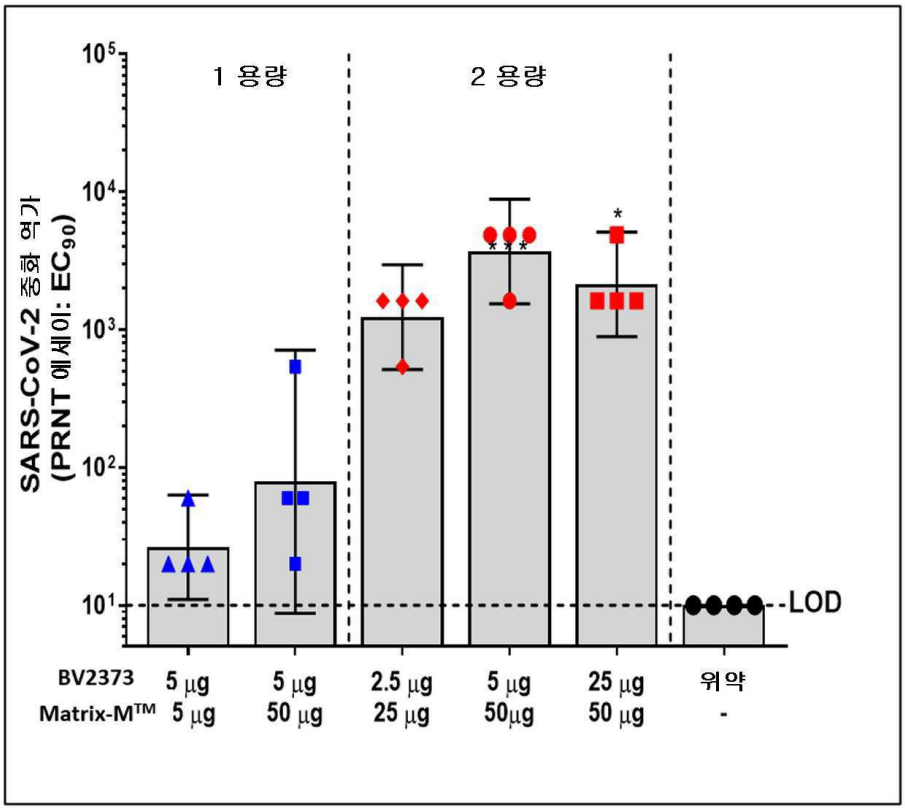
도면40a

CPE에 의한 SARS-CoV-2 중화 역가 (100% 중화)

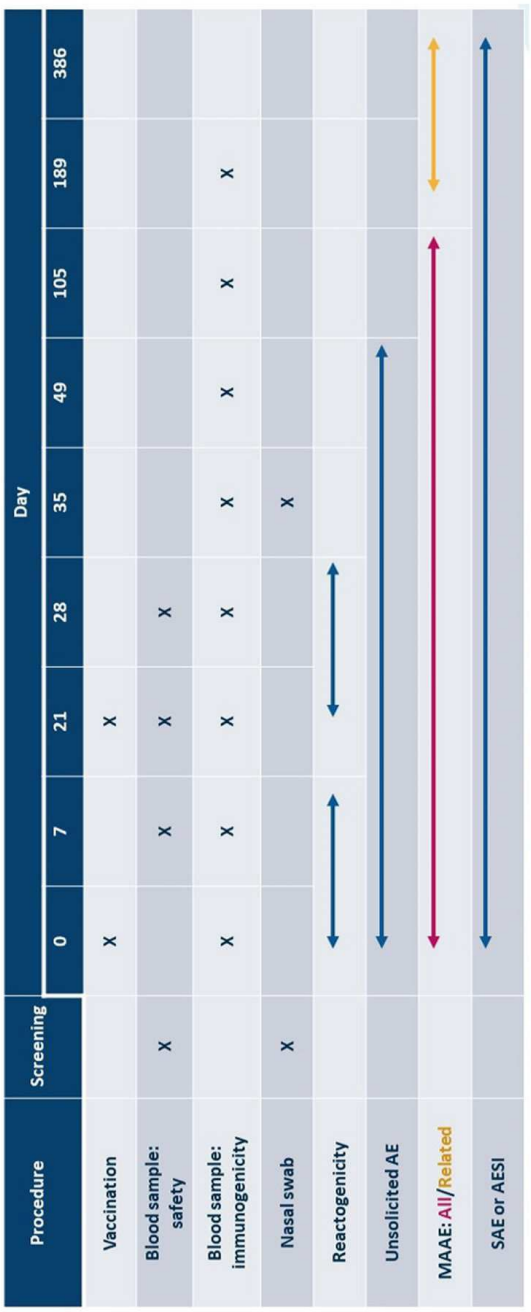


도면40b

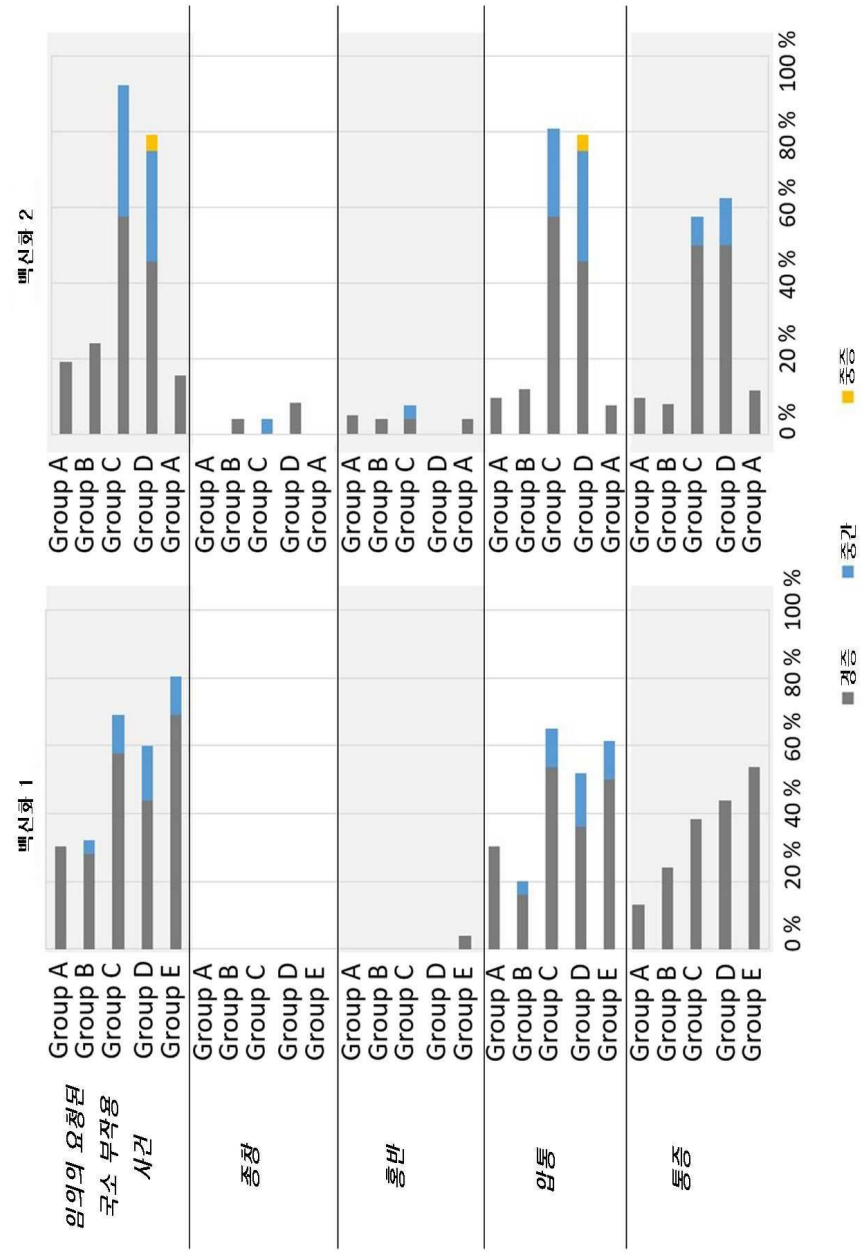
PRNT에 의한 SARS-CoV-2 중화 역가 (EC90 역가)



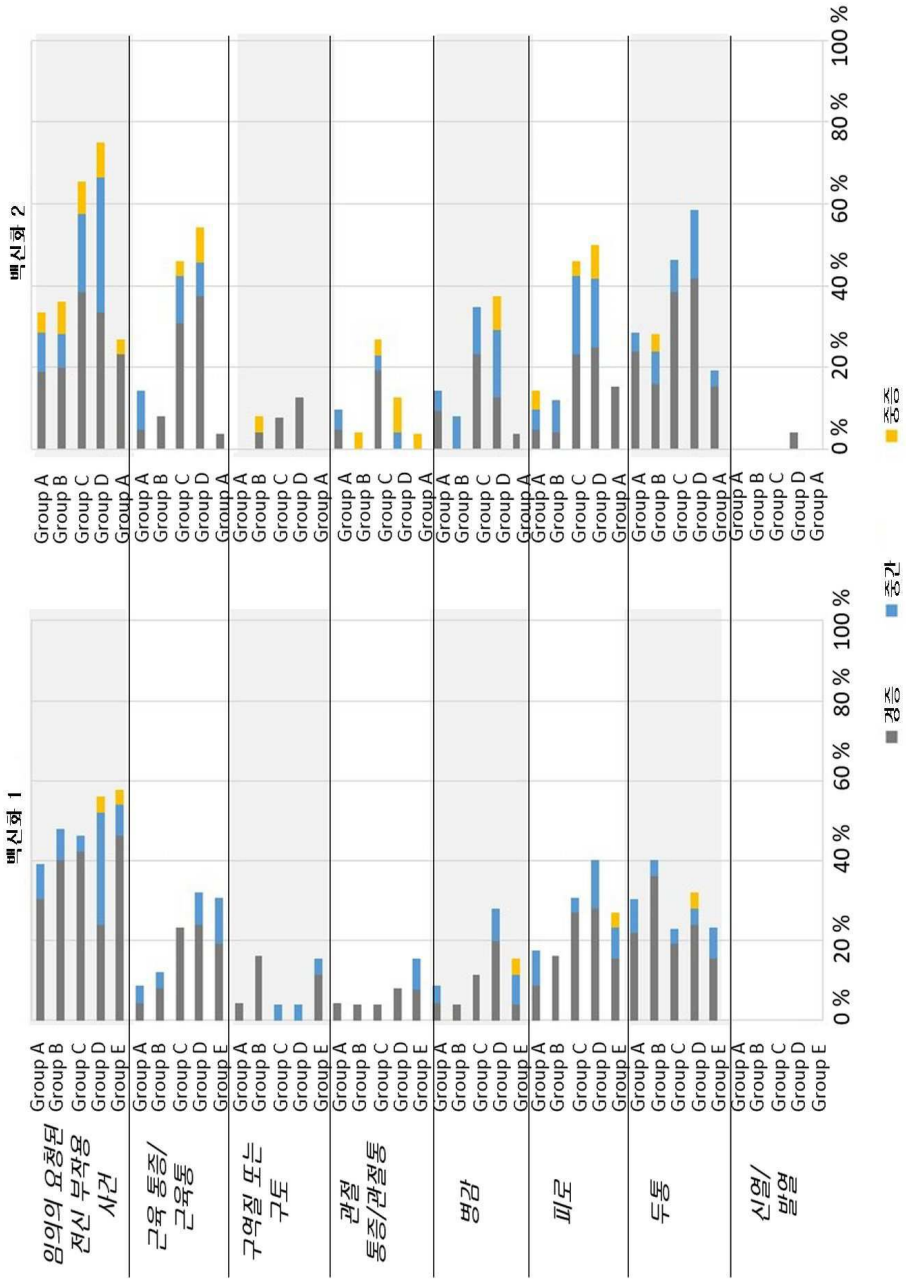
도면41


Procedure
Screening
Day
0
7
21
28
35
49
105
189
386
Vaccination
X
X
Blood sample: safety
X
X
X
X
Blood sample: immunogenicity
X
X
X
X
X
X
X
Nasal swab
X
X
Reactogenicity
Unsolicited AE
MAAE: All/Related
SAE or AESI

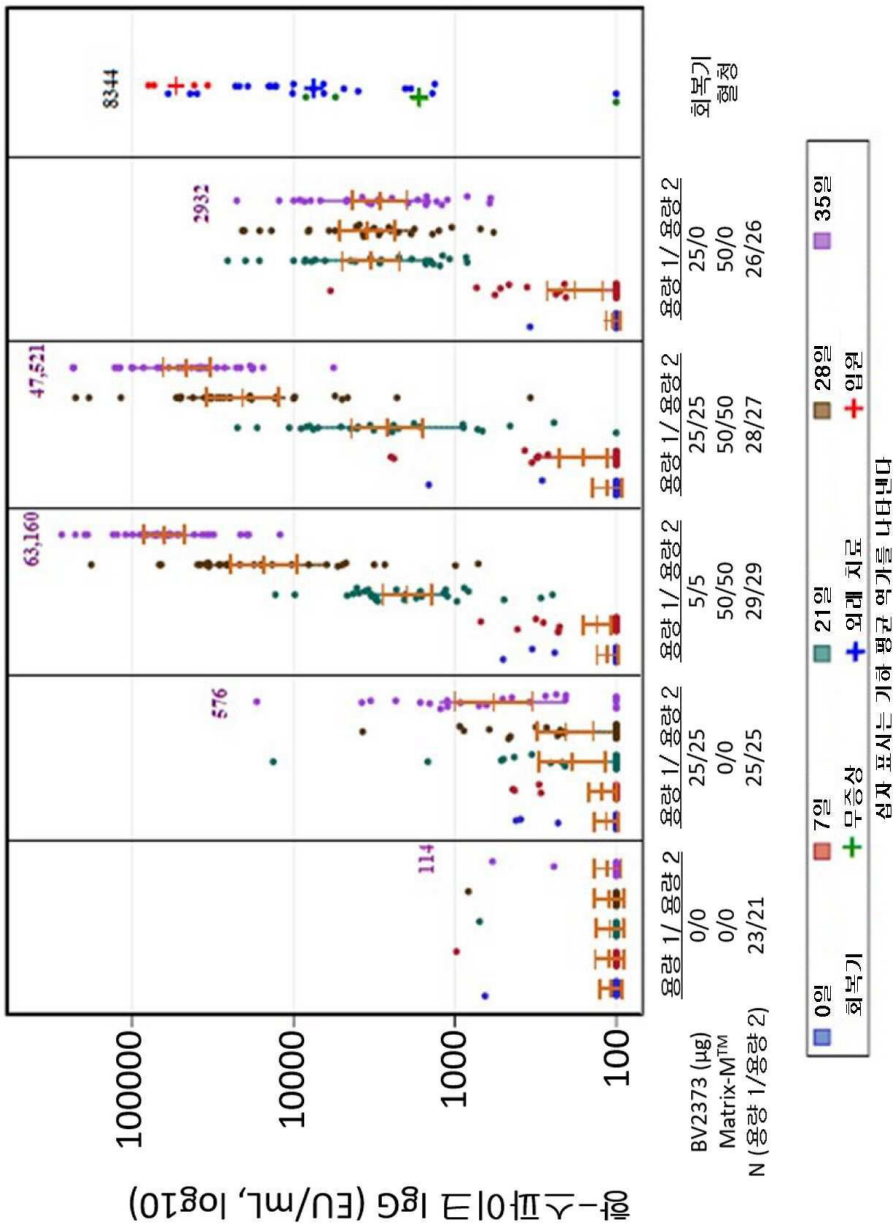
도면42a


백신화 1
백신화 2
임의의 요청됨
국소 부작용
사건
종창
홍반
압통
통증
Group A
Group B
Group C
Group D
Group E
0 %
20 %
40 %
60 %
80 %
100 %
경증
중간
중증

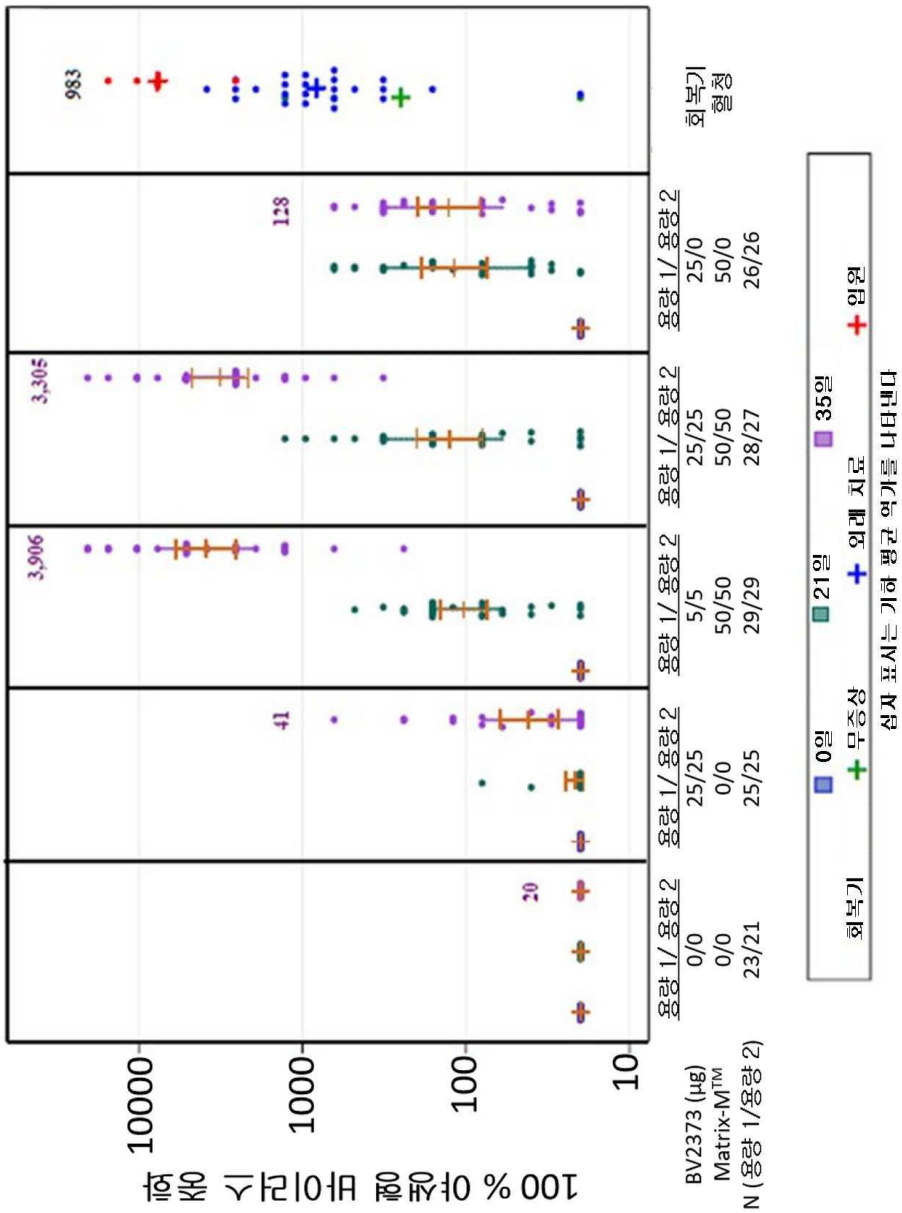
도면42b


백신형 1
백신형 2
0 %
20 %
40 %
60 %
80 %
100 %
Group A
Group B
Group C
Group D
Group E
임의의 요청된 전신 부작용 사건
근육 통증/ 근육통
구역질 또는 구토
관절 통증/관절통
변감
피로
두통
신열/ 발열
경증
중간
중증

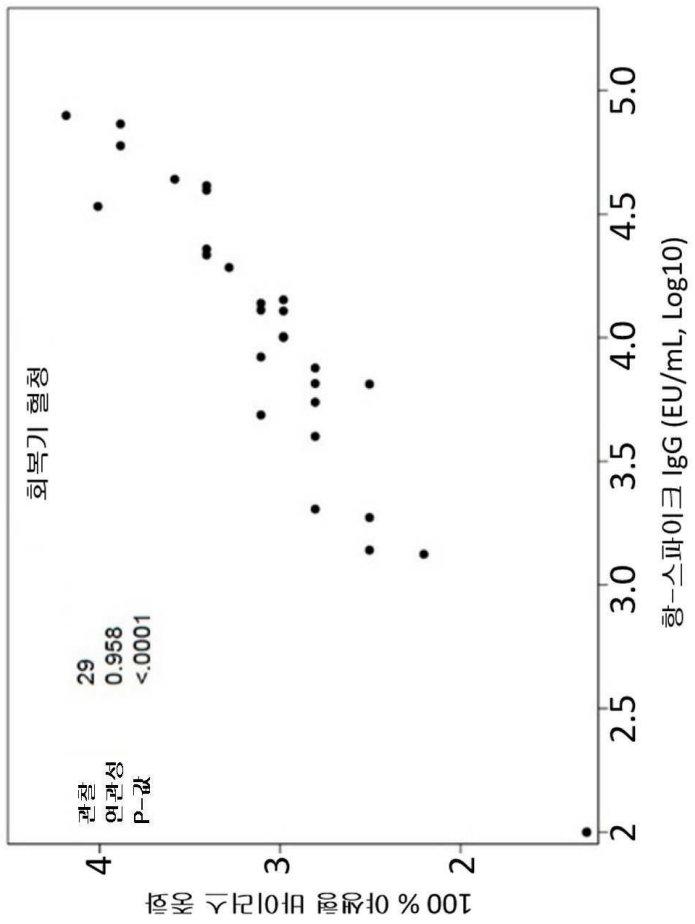
도면43a


항-스파이크 IgG (EU/mL, log10)
100000
10000
1000
100
114
576
63,160
47,521
2932
8344
BV2373 (μg)
Matrix-M™
N (용량 1/용량 2)
용량 1/ 용량 2
0/0
0/0
23/21
용량 1/ 용량 2
25/25
0/0
25/25
용량 1/ 용량 2
5/5
50/50
29/29
용량 1/ 용량 2
25/25
50/50
28/27
용량 1/ 용량 2
25/0
50/0
26/26
회복기 혈청
0일
7일
21일
28일
35일
회복기
무증상
외래 치료
입원
점자 표시는 기하 평균 역가를 나타낸다

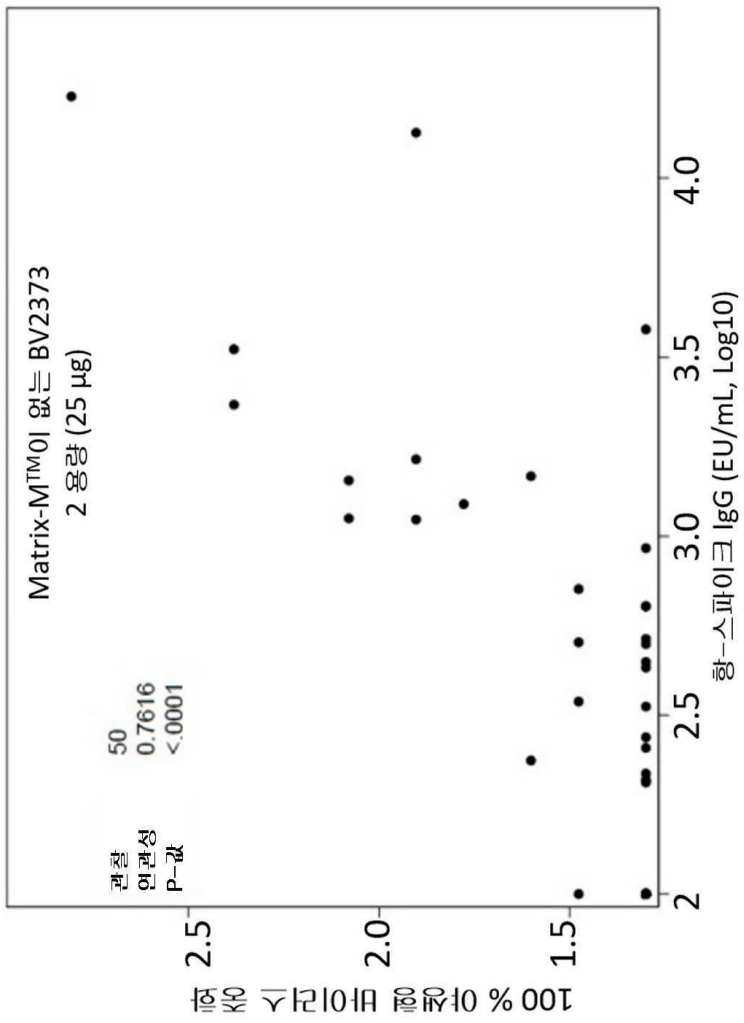
도면43b


100 % 약성예 바이러스 역화
10000
1000
100
10
983
128
3,305
3,906
41
20
BV2373 (μg)
Matrix-M™
N (용량 1/용량 2)
용량 1/ 용량 2
0/0
0/0
23/21
용량 1/ 용량 2
25/25
0/0
25/25
용량 1/ 용량 2
5/5
50/50
29/29
용량 1/ 용량 2
25/25
50/50
28/27
용량 1/ 용량 2
25/0
50/0
26/26
회복기
혈청
회복기
0일
21일
35일
무증상
외래 치료
입원
선과 표시는 기하 평균 역가를 나타냅니다

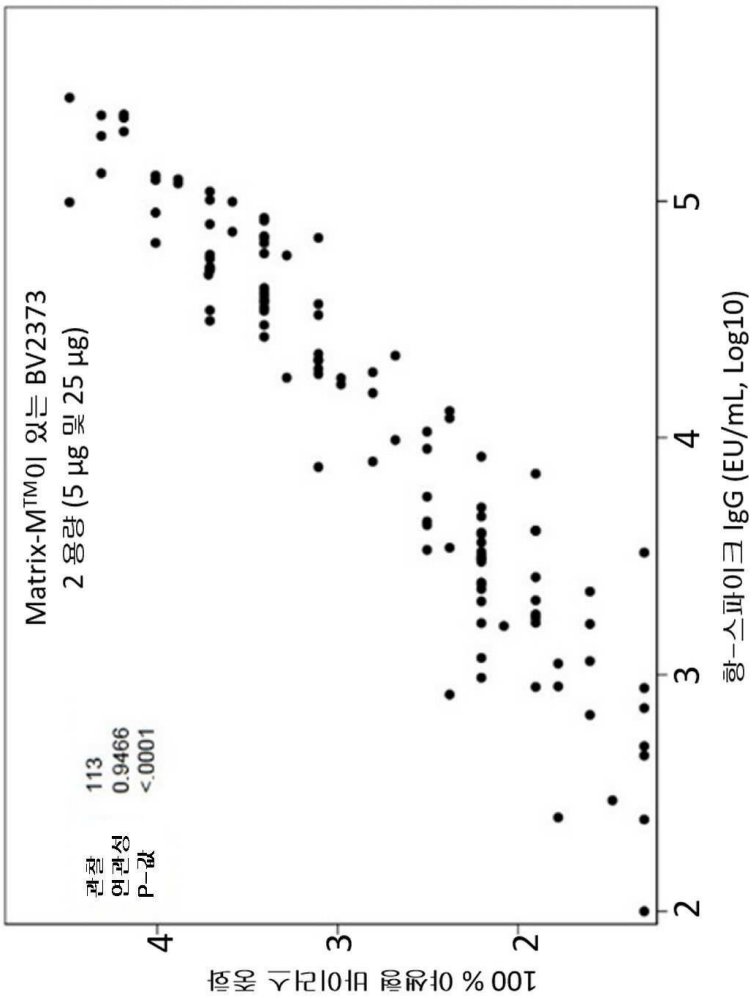
도면44a


회복기 혈청
관찰 29
연관성 0.958
P-값 <.0001
100 % 약화형 바이러스 역가
항-스파이크 IgG (EU/mL, Log10)
2
3
4
2
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
5.0

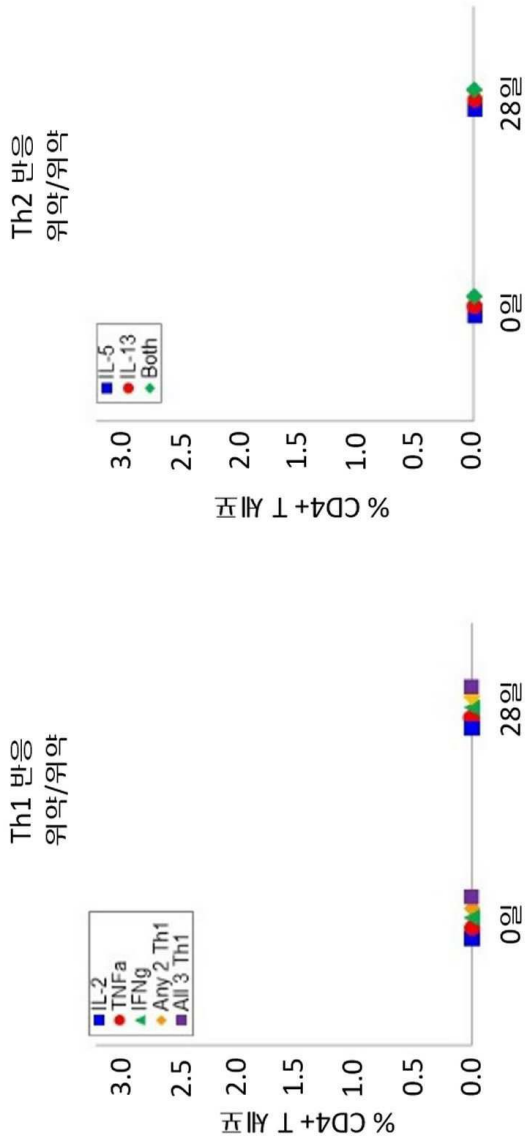
도면44b


Matrix-M™이 없는 BV2373
2 용량 (25 µg)
관찰 50
연관성 0.7616
P-값 <.0001
100 % 약화 바이러스 중화 역가
항-스파이크 IgG (EU/mL, Log10)
2.5
2.0
1.5
2
2.5
3.0
3.5
4.0

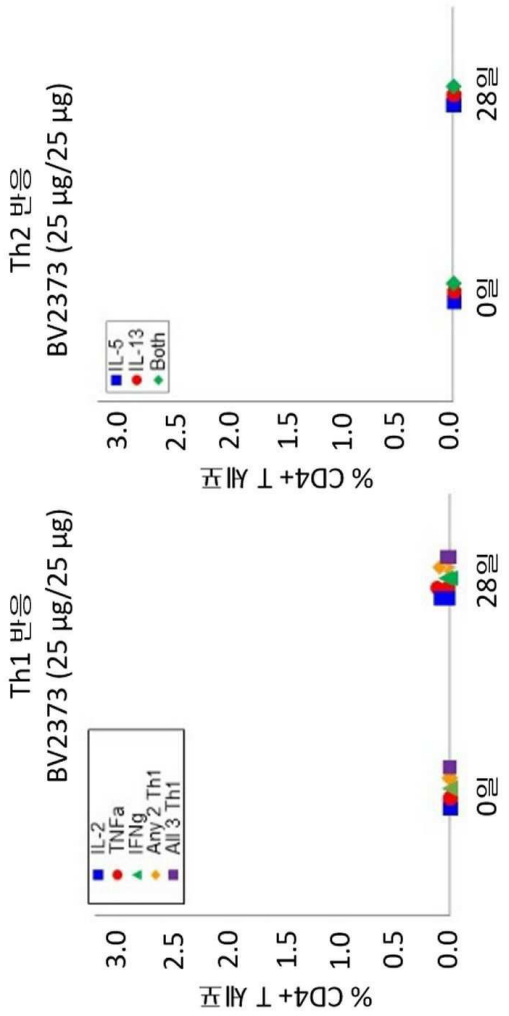
도면44c


Matrix-M™이 있는 BV2373
2 용량 (5 µg 및 25 µg)
관찰 113
연관성 0.9466
P-값 <.0001
100 % 바이러스 억제 바이러스 항체 응답
항-스파이크 IgG (EU/mL, Log10)
2
3
4
5

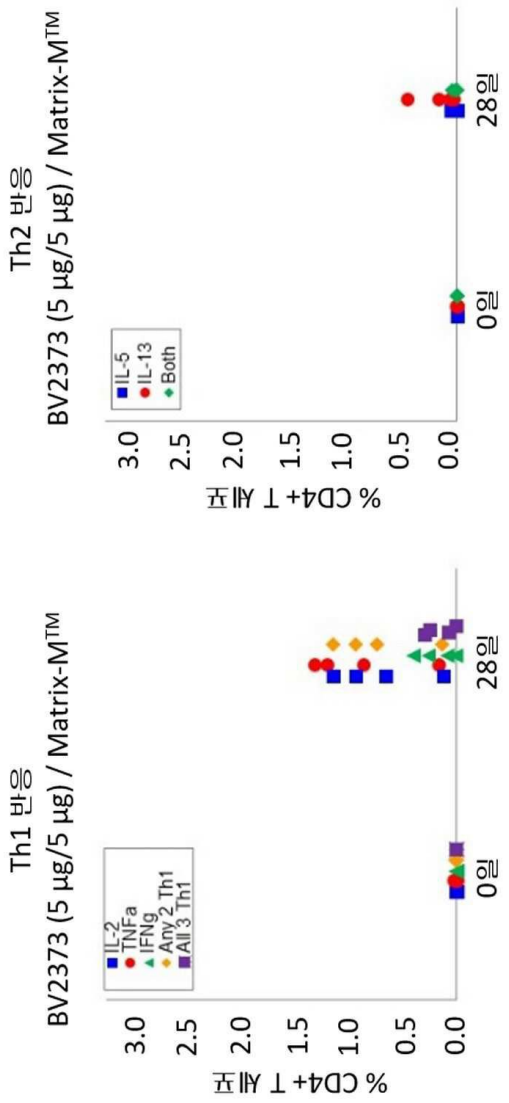
도면45a


Th2 반응
위약/위약
IL-5
IL-13
Both
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
% CD4+ T 세포
0일
28일
Th1 반응
위약/위약
IL-2
TNFa
IFNg
Any 2 Th1
All 3 Th1
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
% CD4+ T 세포
0일
28일

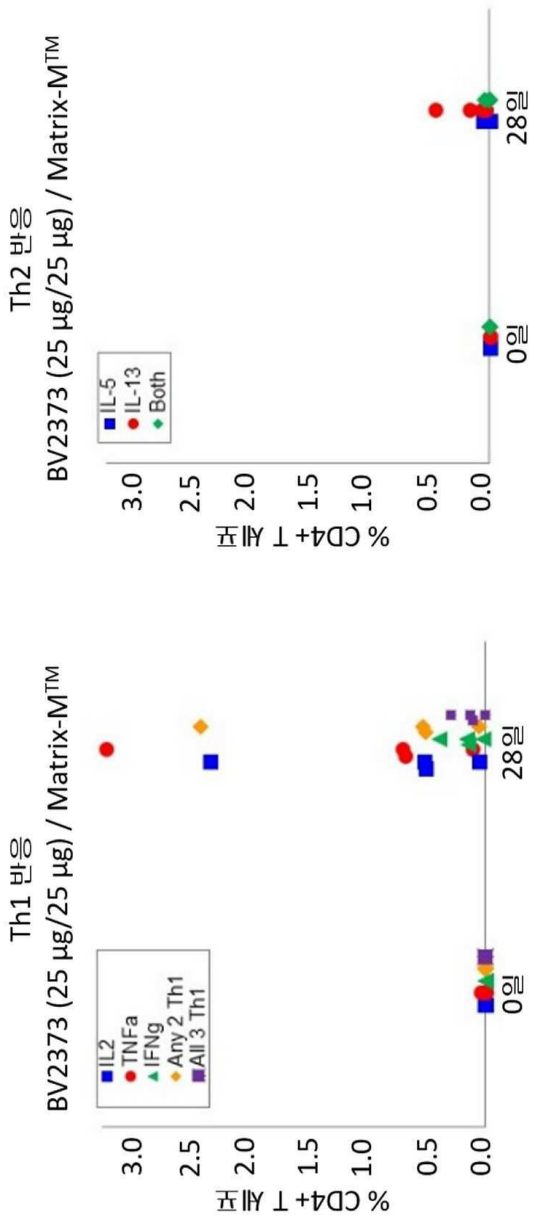
도면45b


Th2 반응
BV2373 (25 μg/25 μg)
IL-5
IL-13
Both
% CD4+ T 세포
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0일
28일
Th1 반응
BV2373 (25 μg/25 μg)
IL-2
TNFa
IFNg
Any 2 Th1
All 3 Th1
% CD4+ T 세포
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0일
28일

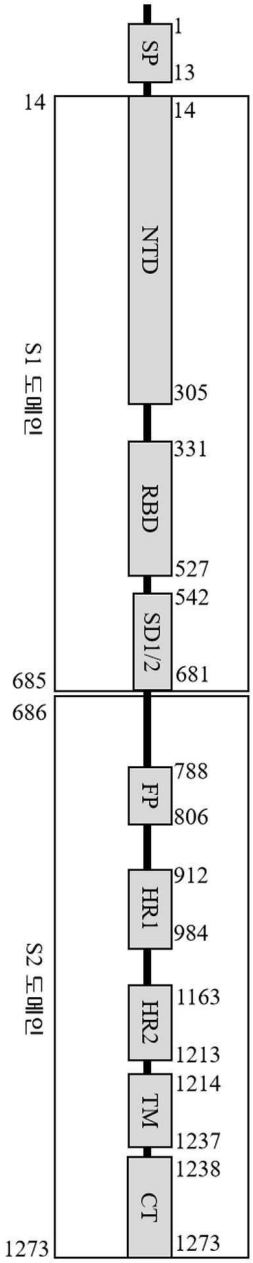
도면45c


Th2 반응
BV2373 (5 μg/5 μg) / Matrix-M™
% CD4+ T 세포
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
IL-5
IL-13
Both
0일
28일
Th1 반응
BV2373 (5 μg/5 μg) / Matrix-M™
% CD4+ T 세포
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
IL-2
TNFa
IFNg
Any 2 Th1
All 3 Th1
0일
28일

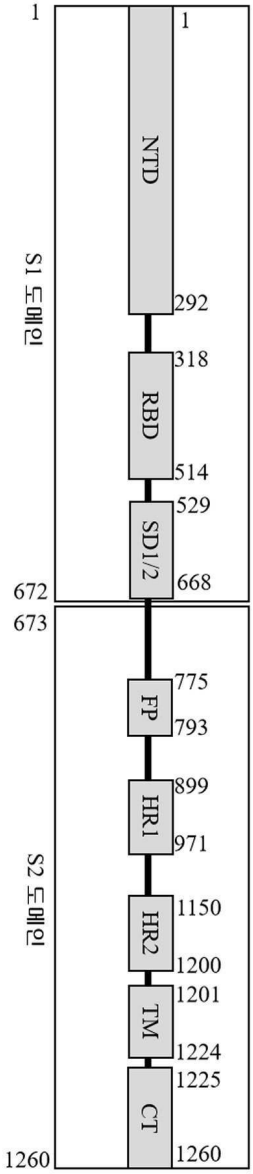
도면45d


Th2 반응
BV2373 (25 μg/25 μg) / Matrix-M™
IL-5
IL-13
Both
% CD4+ T 세포
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0일
28일
Th1 반응
BV2373 (25 μg/25 μg) / Matrix-M™
IL2
TNFa
IFNg
Any 2 Th1
All 3 Th1
% CD4+ T 세포
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0일
28일

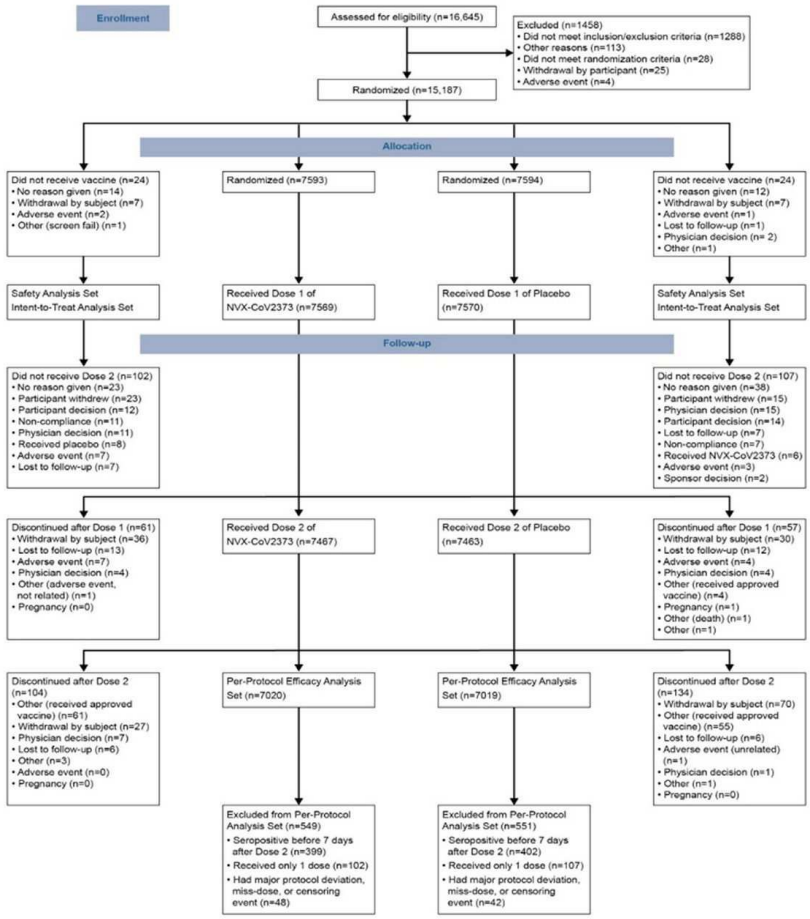
도면46a


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

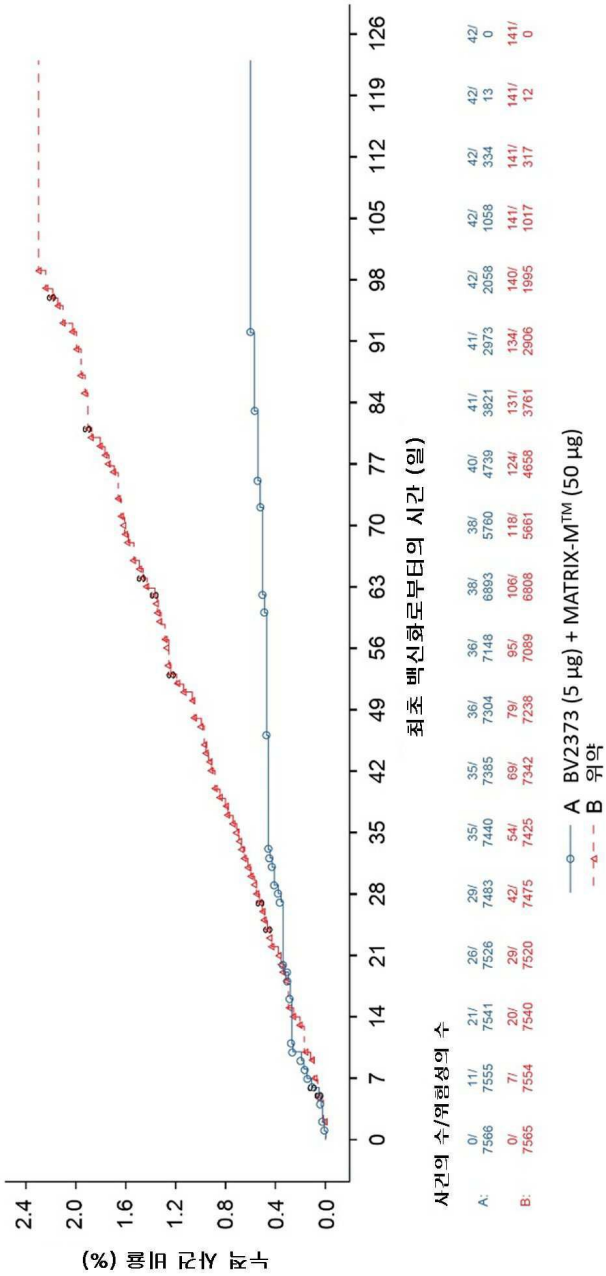
도면46b


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

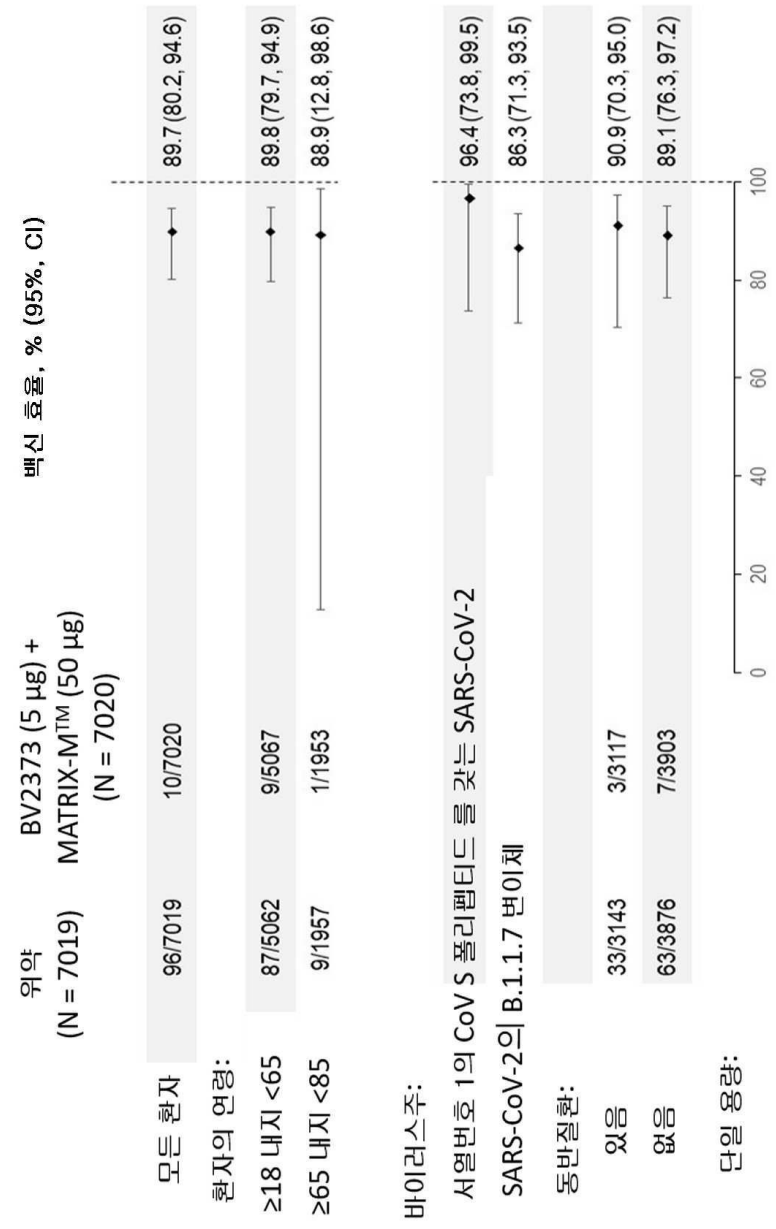
도면47


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 withdrew (n=23)
• Participant decision (n=12)
• Non-compliance (n=11)
• Physician decision (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 withdrew (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=36)
• 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=57)
• 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)

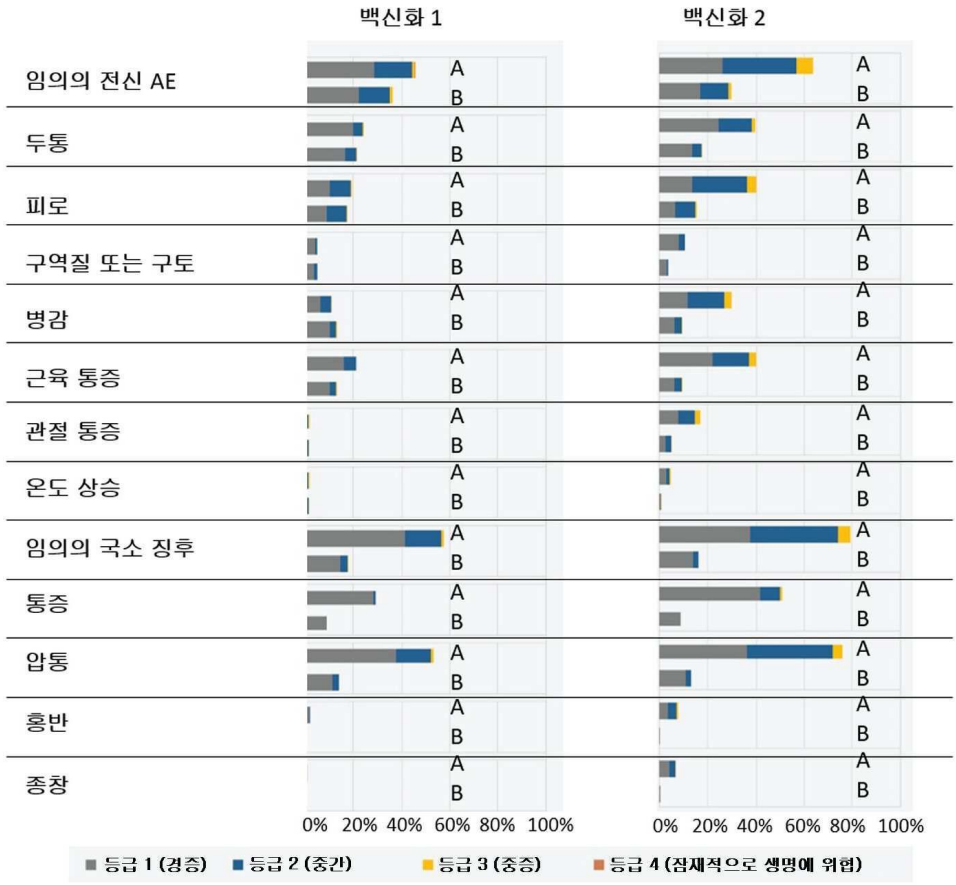
도면48


누적 사건 비율 (%)
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
최초 백신화로부터의 시간 (일)
사건의 수/위험성의 수
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 69/7342 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 위약

도면49

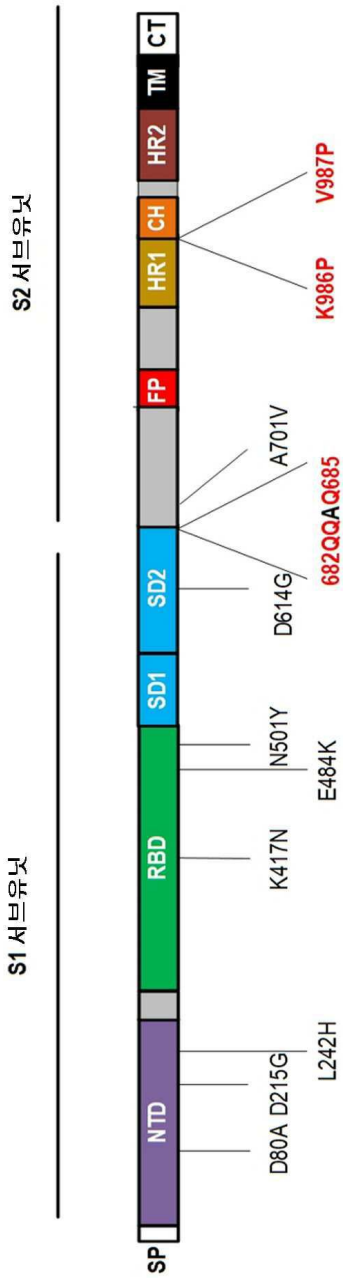

위약
(N = 7019)
BV2373 (5 μg) +
MATRIX-M™ (50 μg)
(N = 7020)
백신 효율, % (95%, CI)
모든 환자
96/7019
10/7020
89.7 (80.2, 94.6)
환자의 연령:
≥18 내지 <65
87/5062
9/5067
89.8 (79.7, 94.9)
≥65 내지 <85
9/1957
1/1953
88.9 (12.8, 98.6)
바이러스주:
서열번호 1의 CoV S 폴리펩티드 를 갖는 SARS-CoV-2
96.4 (73.8, 99.5)
SARS-CoV-2의 B.1.1.7 변이체
86.3 (71.3, 93.5)
동반질환:
있음
33/3143
3/3117
90.9 (70.3, 95.0)
없음
63/3876
7/3903
89.1 (76.3, 97.2)
단일 용량:
0
20
40
60
80
100

도면50

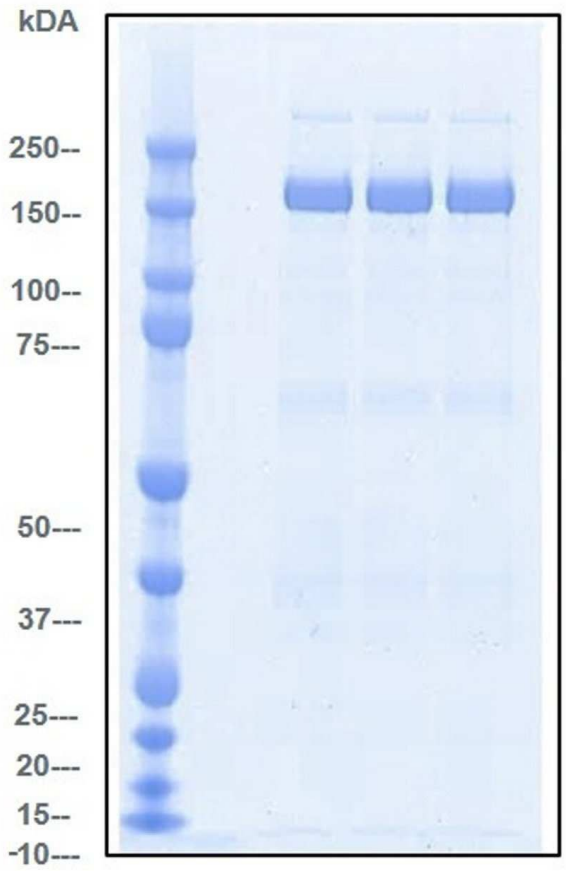


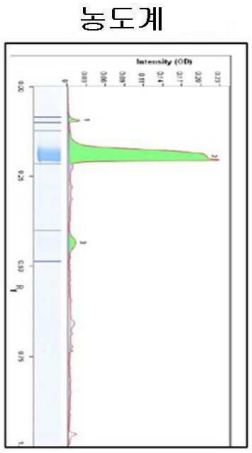
A: BV2373 (5 μg) + MATRIX-M™ (50 μg) B: 위약

도면51

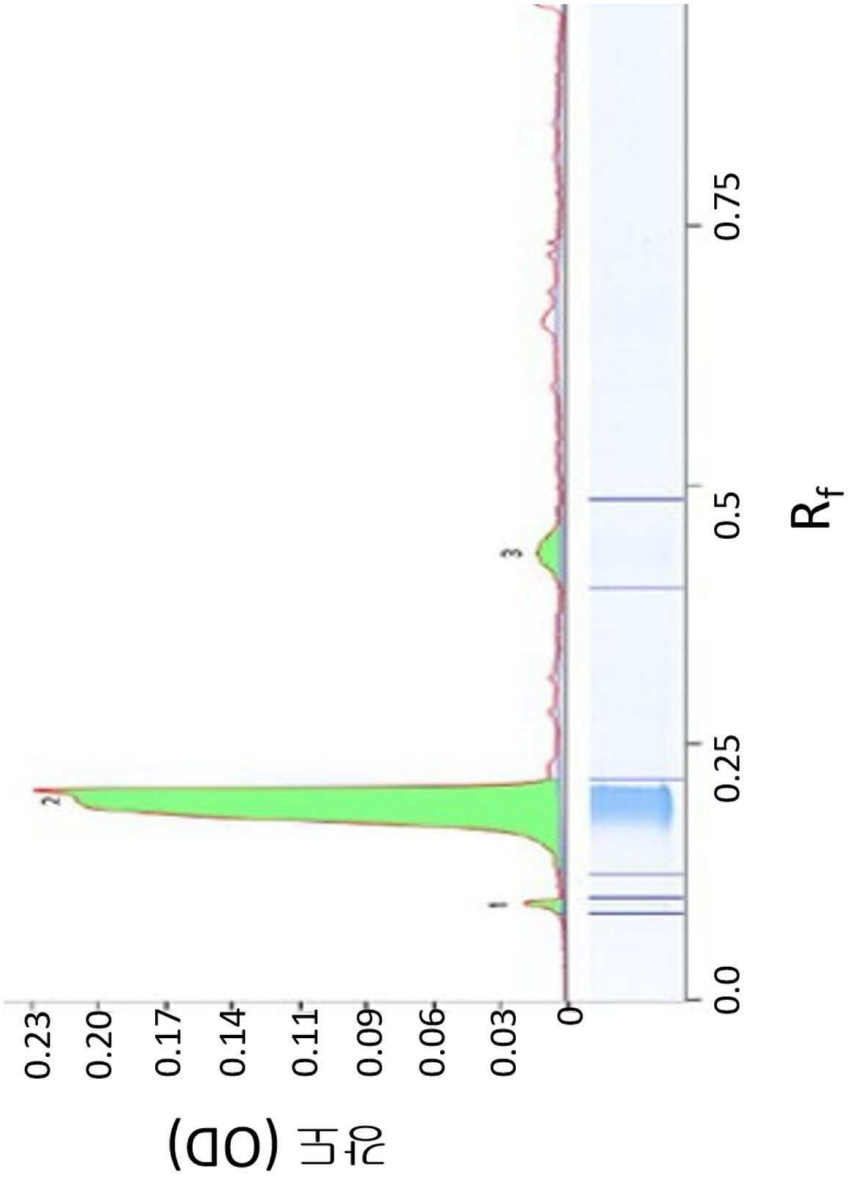

S1 서브유닛
S2 서브유닛
SP
NTD
RBD
SD1
SD2
FP
HR1
CH
HR2
TM
CT
D80A
D215G
L242H
K417N
N501Y
E484K
D614G
A701V
682QQAQ685
K986P
V987P

도면52a

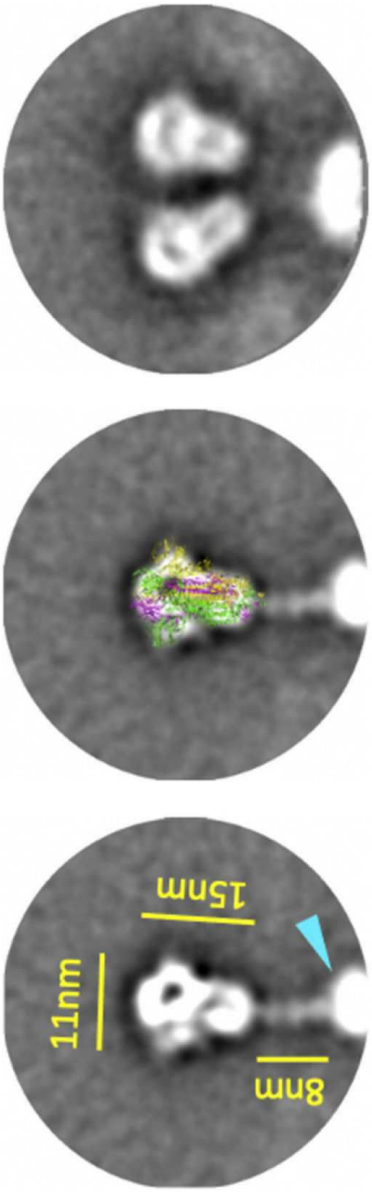




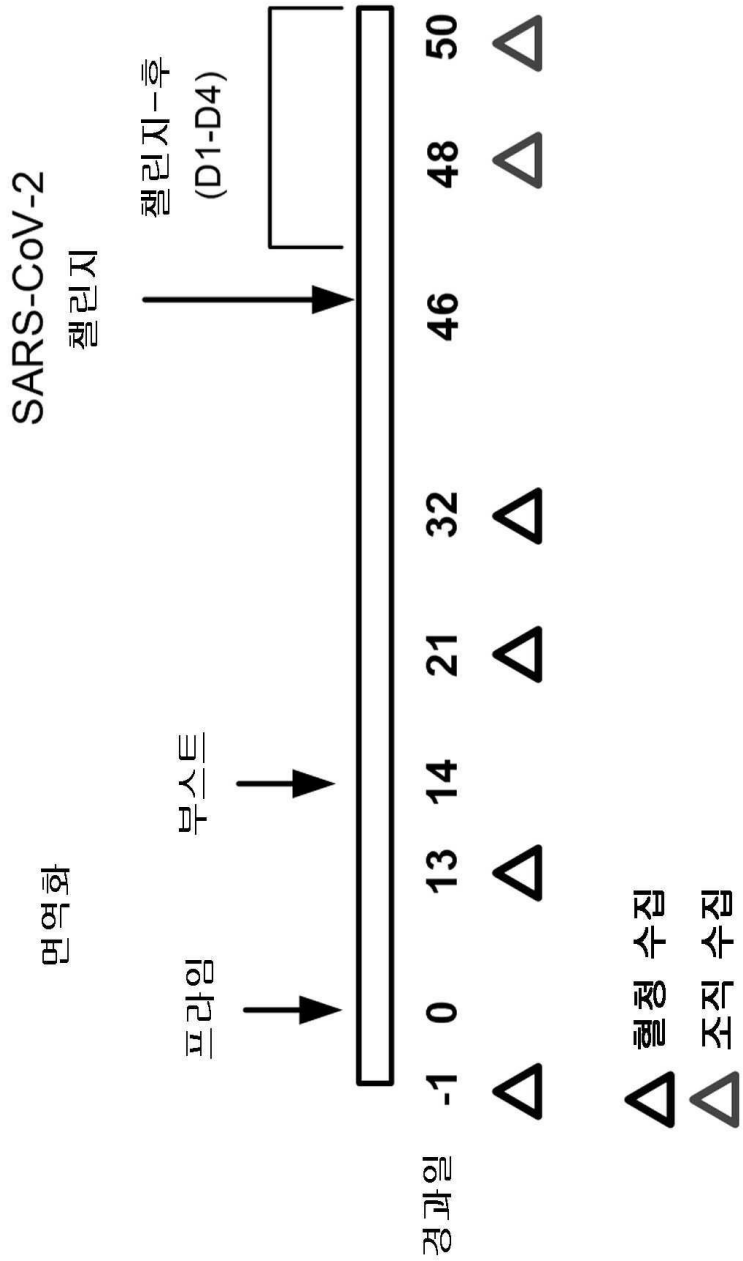
도면52b



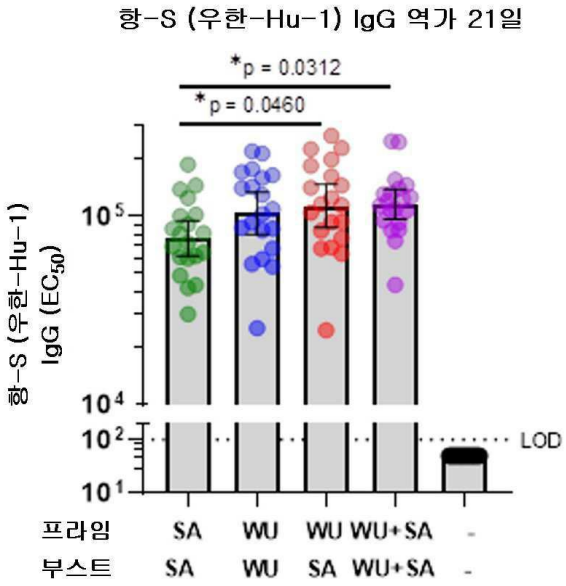
도면52c



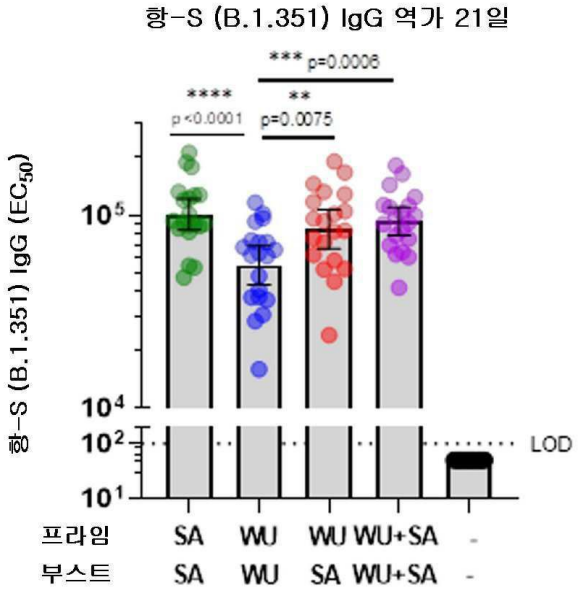
도면53


SARS-CoV-2
챌린지
면역화
프라임
부스트
챌린지-후
(D1-D4)
경과일
-1
0
13
14
21
32
46
48
50
혈청 수집
조직 수집

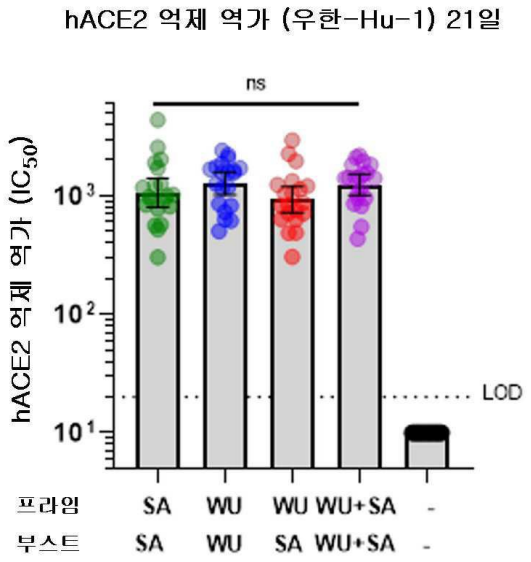
도면54a


항-S (우한-Hu-1) IgG 역가 21일
*p = 0.0312
*p = 0.0460
항-S (우한-Hu-1) IgG (EC50)
10^5
10^4
10^2
10^1
LOD
프라임 SA WU WU WU+SA -
부스트 SA WU SA WU+SA -

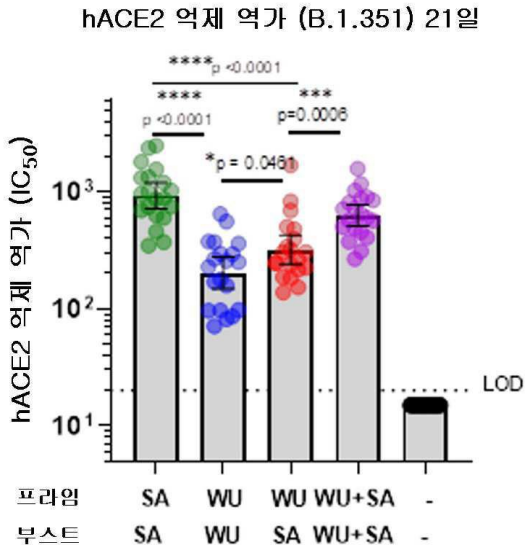
도면54b


항-S (B.1.351) IgG 역가 21일
*** p=0.0006
****
**
p <0.0001
p=0.0075
항-S (B.1.351) IgG (EC50)
10^5
10^4
10^2
10^1
LOD
프라임 SA WU WU WU+SA -
부스트 SA WU SA WU+SA -

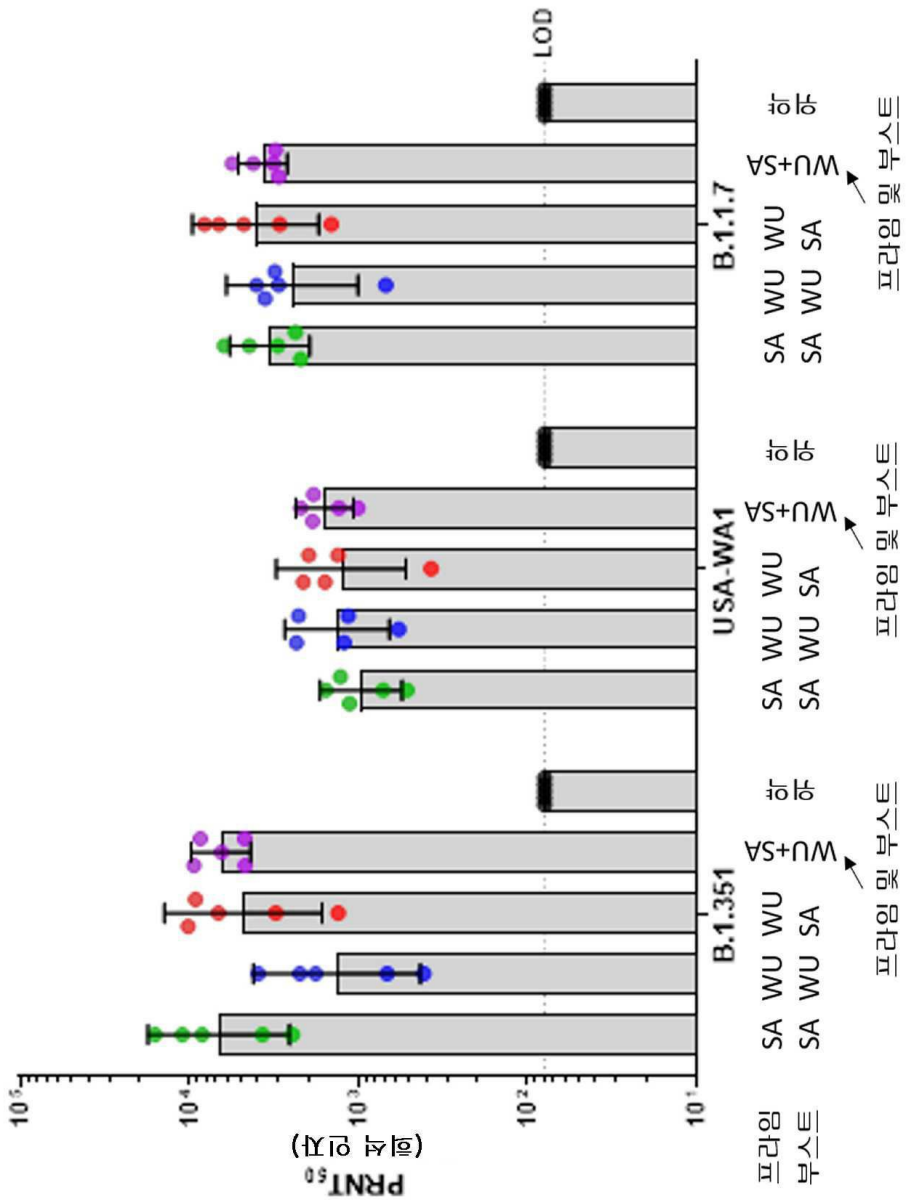
도면54c


hACE2 억제 역가 (우한-Hu-1) 21일
ns
hACE2 억제 역가 (IC50)
10^3
10^2
10^1
LOD
프라임 SA WU WU WU+SA -
부스트 SA WU SA WU+SA -

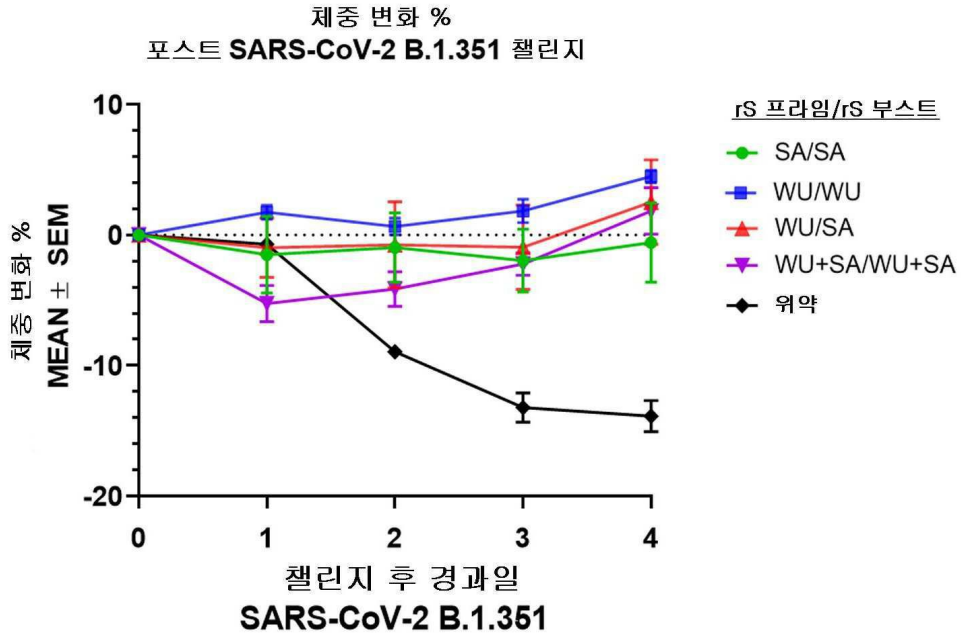
도면54d


hACE2 억제 역가 (B.1.351) 21일
****p <0.0001
****
p <0.0001
***
p=0.0006
*p = 0.0461
hACE2 억제 역가 (IC50)
10^3
10^2
10^1
LOD
프라임 SA WU WU WU+SA -
부스트 SA WU SA WU+SA -

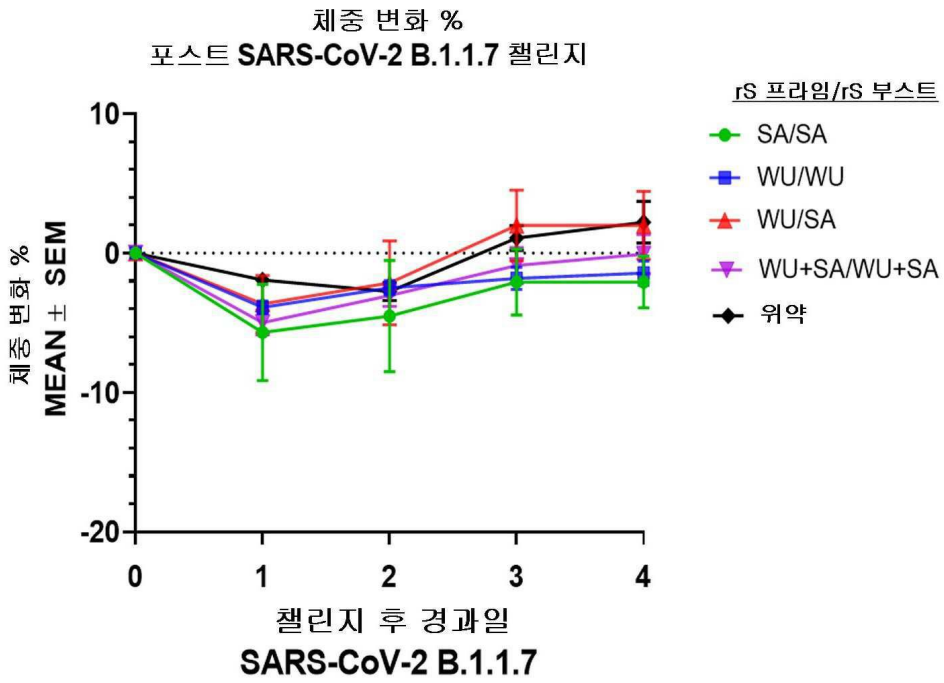
도면54e


LOD
B.1.1.7
USA-WA1
B.1.351
위약
WU+SA
프라임 및 부스트
SA WU WU
SA WU SA
프라임
부스트
PRNT50
(희석 인자)
10⁵
10⁴
10³
10²
10¹

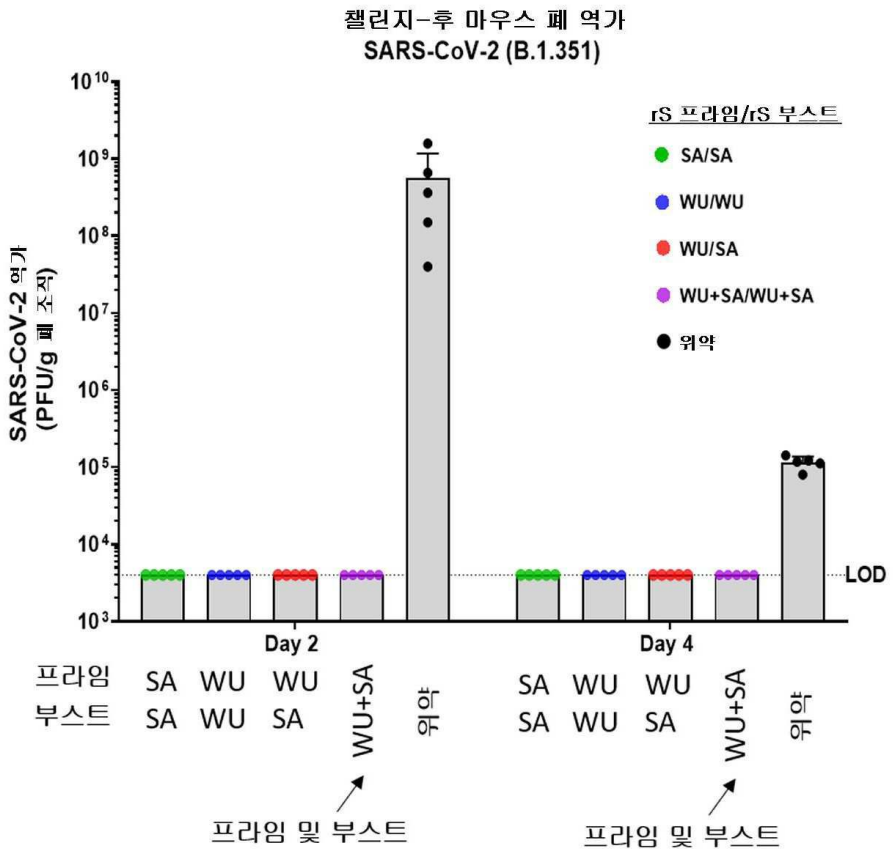
도면55a


체중 변화 %
포스트 SARS-CoV-2 B.1.351 챌린지
체중 변화 % MEAN ± SEM
10
0
-10
-20
0
1
2
3
4
챌린지 후 경과일
SARS-CoV-2 B.1.351
rS 프라임/rS 부스트
SA/SA
WU/WU
WU/SA
WU+SA/WU+SA
위약

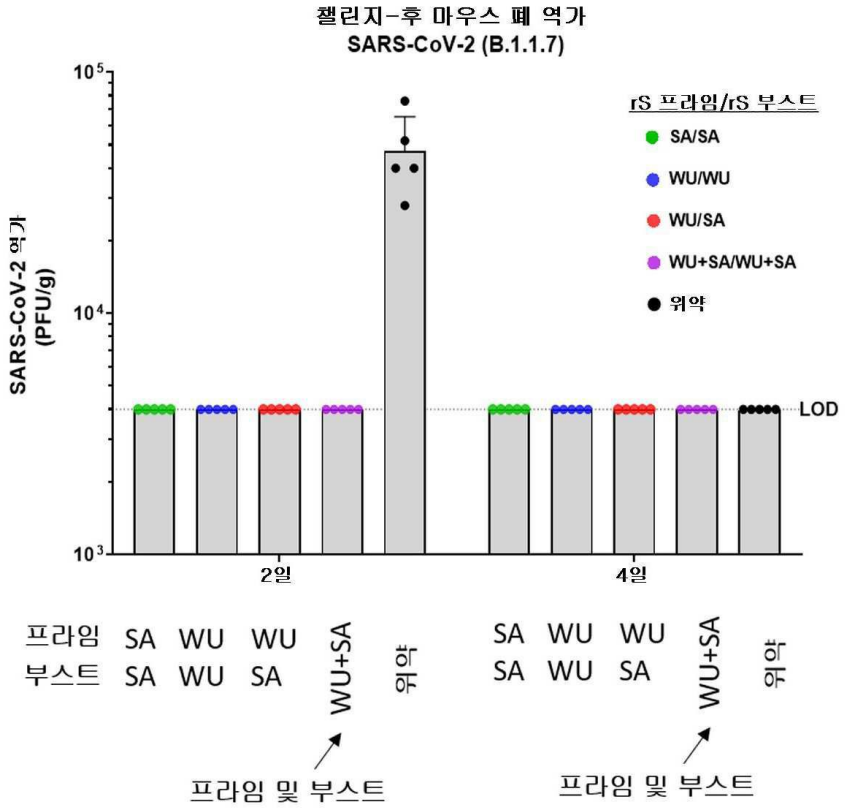
도면55b


체중 변화 %
포스트 SARS-CoV-2 B.1.1.7 챌린지
체중 변화 % MEAN ± SEM
10
0
-10
-20
0
1
2
3
4
챌린지 후 경과일
SARS-CoV-2 B.1.1.7
rS 프라임/rS 부스트
SA/SA
WU/WU
WU/SA
WU+SA/WU+SA
위약

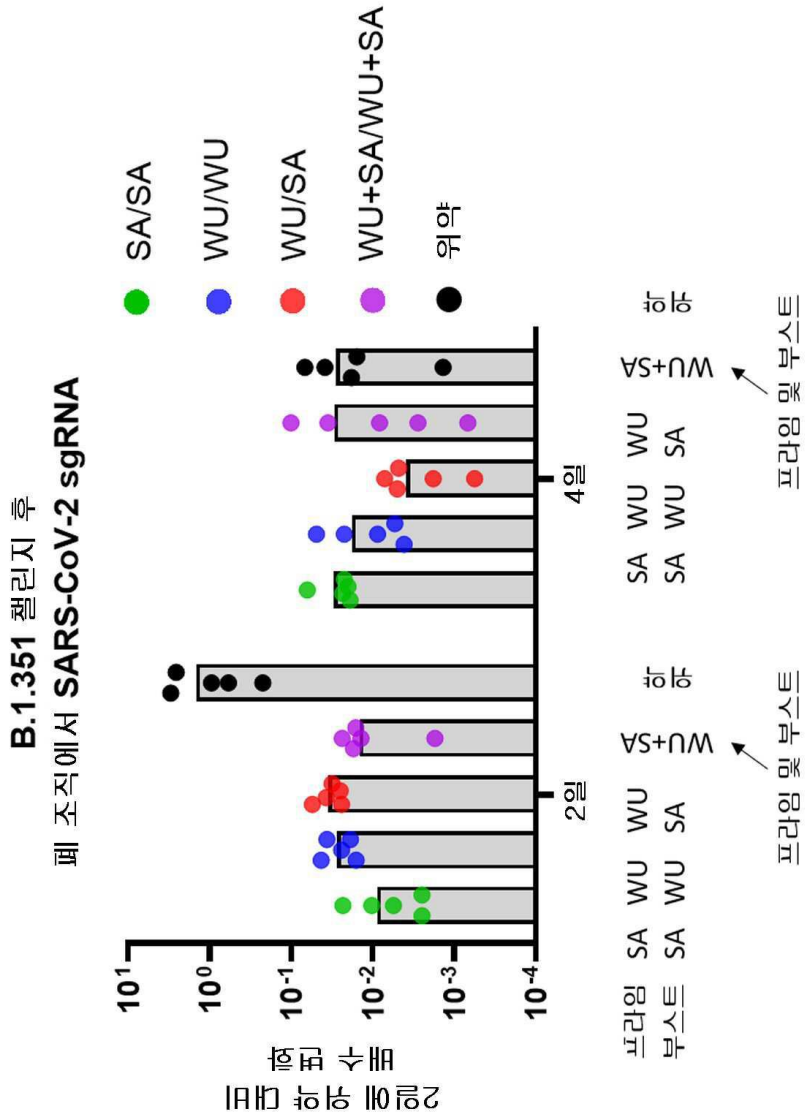
도면55c


챌린지-후 마우스 폐 역가
SARS-CoV-2 (B.1.351)
SARS-CoV-2 역가 (PFU/g 폐 조직)
rS 프라임/rS 부스트
SA/SA
WU/WU
WU/SA
WU+SA/WU+SA
위약
LOD
Day 2
Day 4
프라임 SA WU WU WU+SA 위약
부스트 SA WU SA
프라임 및 부스트
프라임 및 부스트

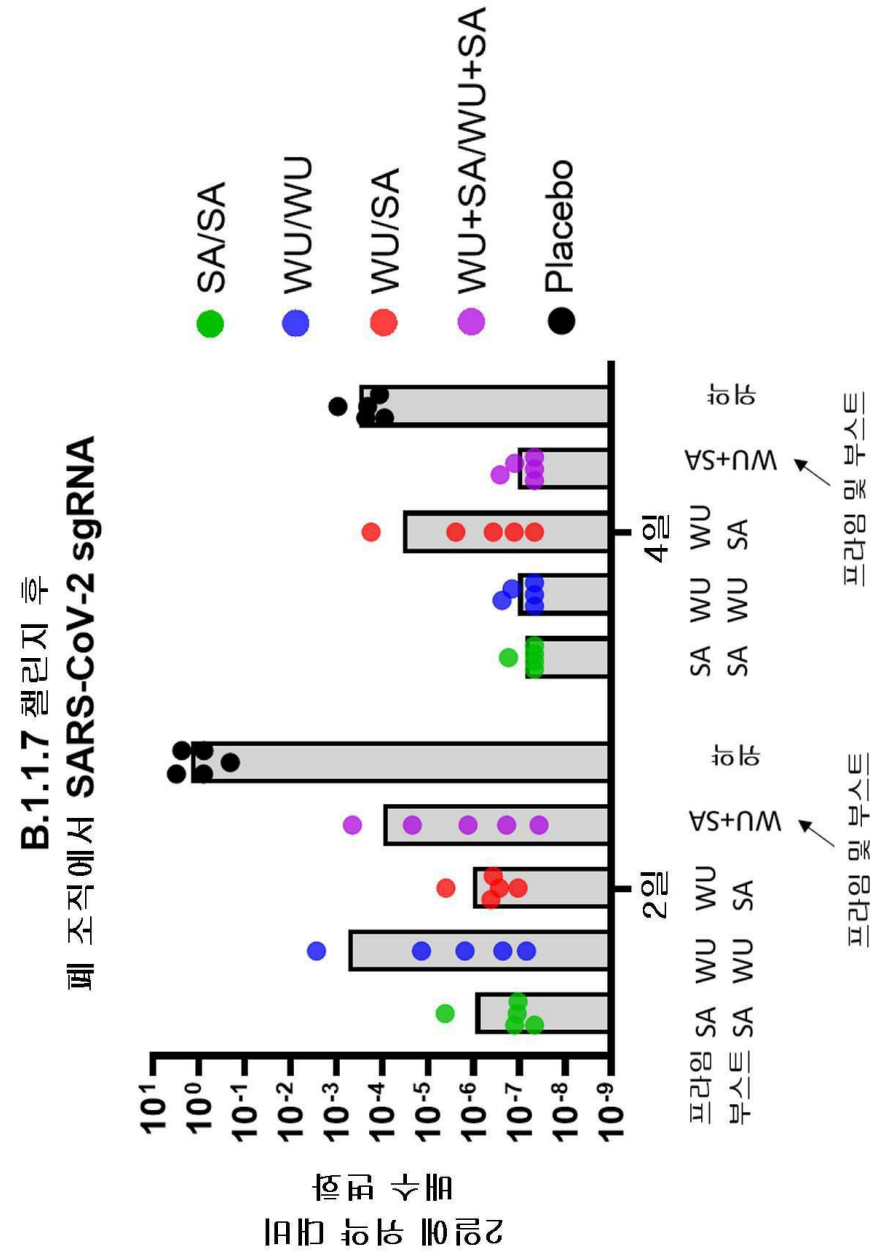
도면55d


챌린지-후 마우스 폐 역가
SARS-CoV-2 (B.1.1.7)
SARS-CoV-2 역가 (PFU/g)
rS 프라임/rS 부스트
SA/SA
WU/WU
WU/SA
WU+SA/WU+SA
위약
LOD
2일
4일
프라임 SA WU WU WU+SA 위약
부스트 SA WU SA
프라임 및 부스트
프라임 및 부스트

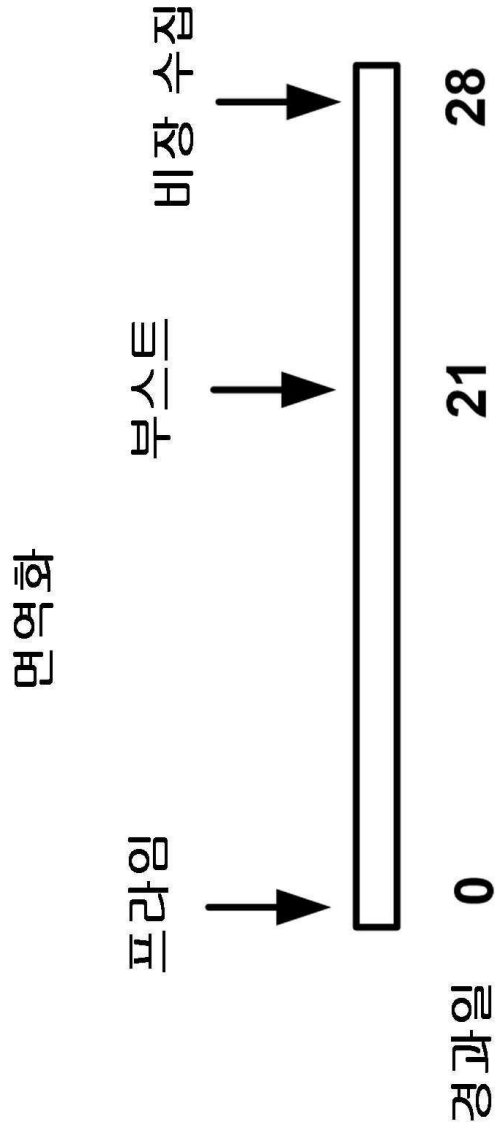
도면55e


B.1.351 챌린지 후
폐 조직에서 SARS-CoV-2 sgRNA
SA/SA
WU/WU
WU/SA
WU+SA/WU+SA
위약
2일에 위약 대비
배수 변화
10^{1}
10^{0}
10^{-1}
10^{-2}
10^{-3}
10^{-4}
2일
4일
프라임 SA SA WU WU
부스트 SA WU SA WU
위약
WU+SA
프라임 및 부스트

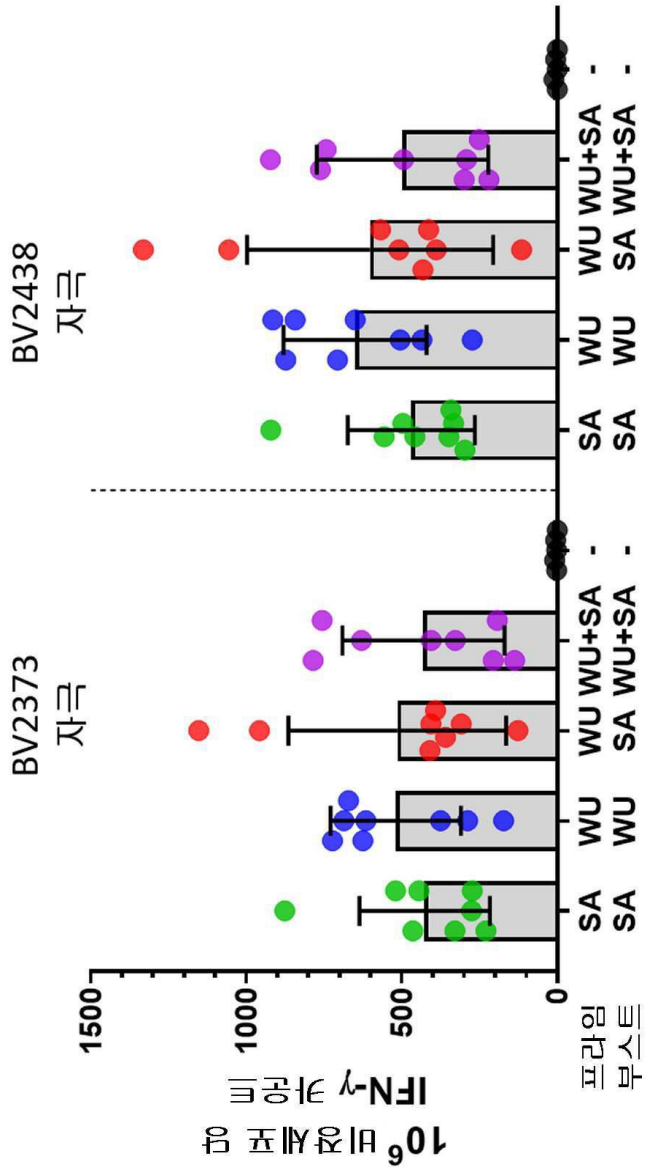
도면55f


B.1.1.7 챌린지 후
폐 조직에서 SARS-CoV-2 sgRNA
SA/SA
WU/WU
WU/SA
WU+SA/WU+SA
Placebo
2일에 위약 대비
배수 변화
10^{1}
10^{0}
10^{-1}
10^{-2}
10^{-3}
10^{-4}
10^{-5}
10^{-6}
10^{-7}
10^{-8}
10^{-9}
2일
4일
프라임 SA WU WU SA
부스트 SA WU SA WU
위약
WU+SA
프라임 및 부스트
SA WU WU SA
SA WU SA WU
위약
WU+SA
프라임 및 부스트

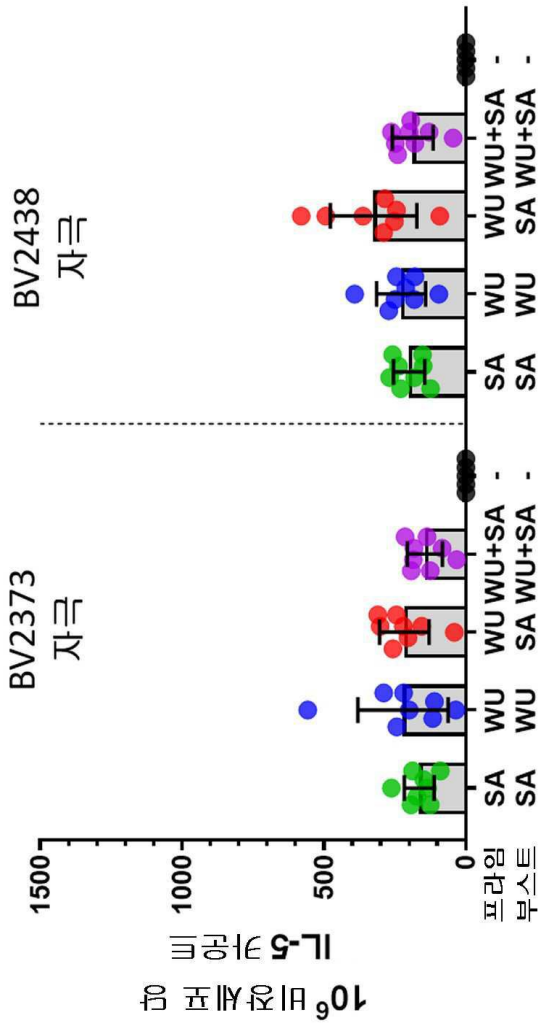
도면56a



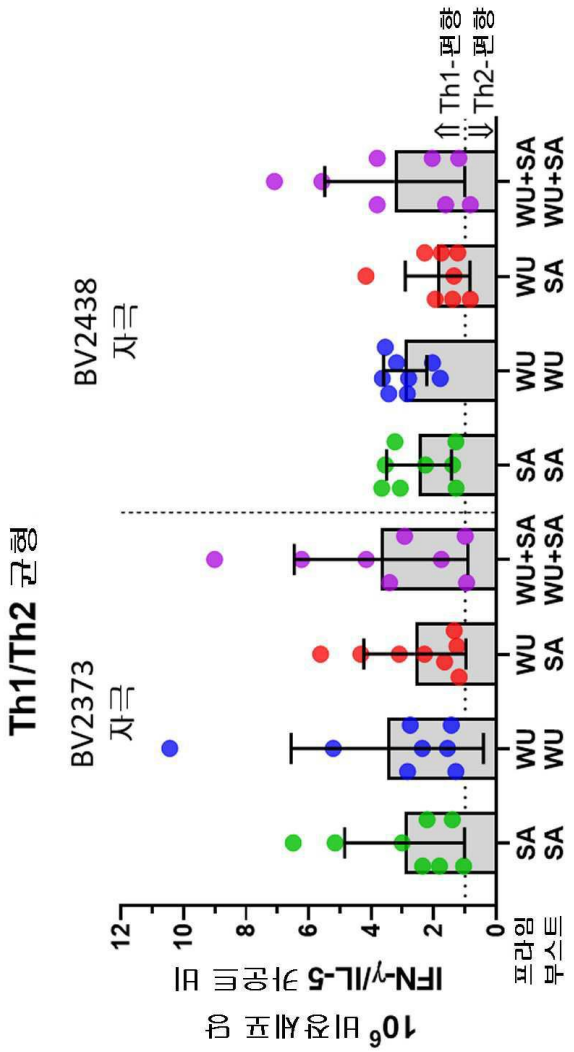
도면56b


BV2438
자극
BV2373
자극
SA
SA
WU
WU
WU
SA
WU+SA
WU+SA
-
-
0
500
1000
1500
10^6 비장세포 당
IFN-γ 카운트
프라임
부스트

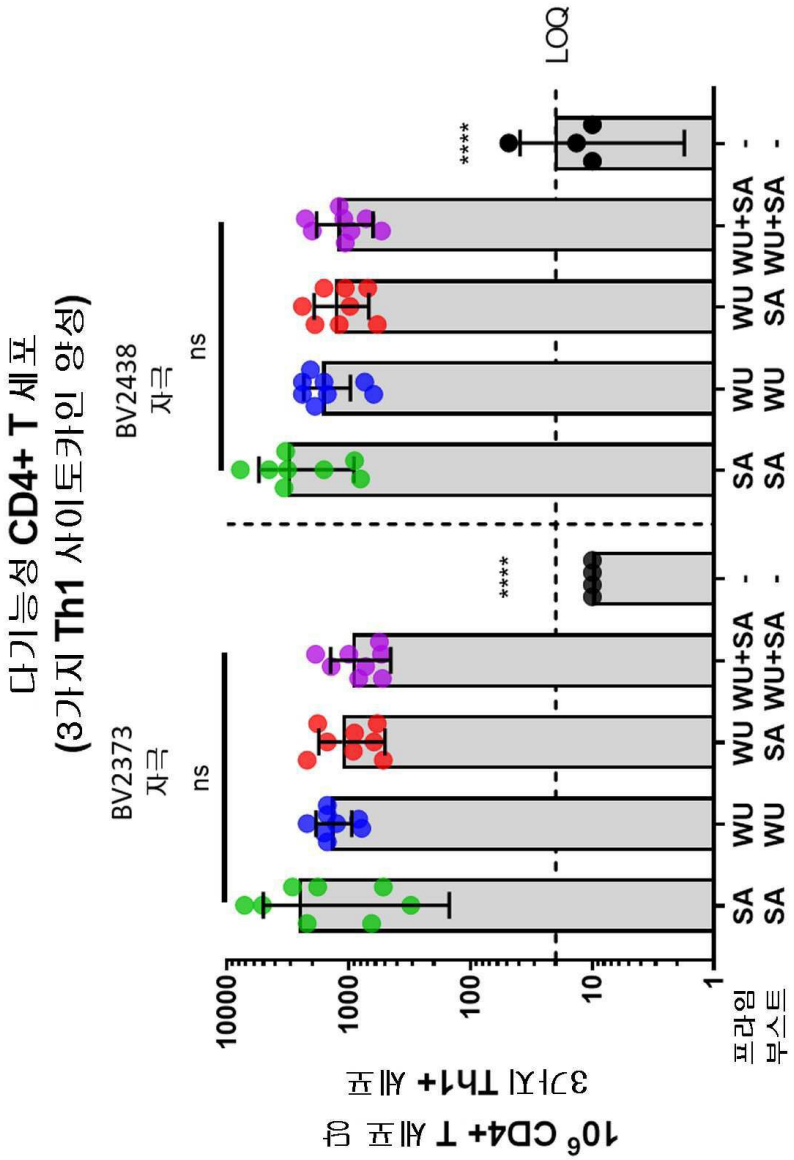
도면56c


BV2373
자극
BV2438
자극
프라임
부스트
SA SA WU WU SA SA WU WU - -
SA SA WU WU SA SA WU WU - -
0
500
1000
1500
IL-5 카운트
10^6 비장세포 당

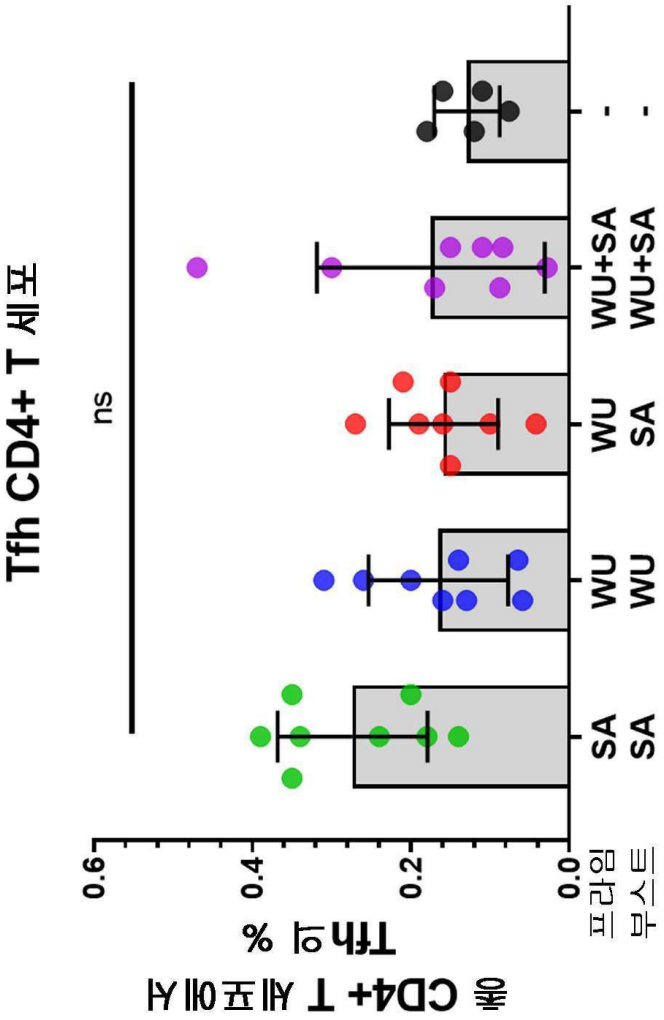
도면56d


Th1/Th2 균형
BV2373
자극
BV2438
자극
⇑ Th1-편향
⇓ Th2-편향
프라임
부스트
SA SA
WU WU
WU SA
WU+SA WU+SA
SA SA
WU WU
WU SA
WU+SA WU+SA
0
2
4
6
8
10
12
IFN-γ/IL-5 카운트 비
10^6 비장세포 양

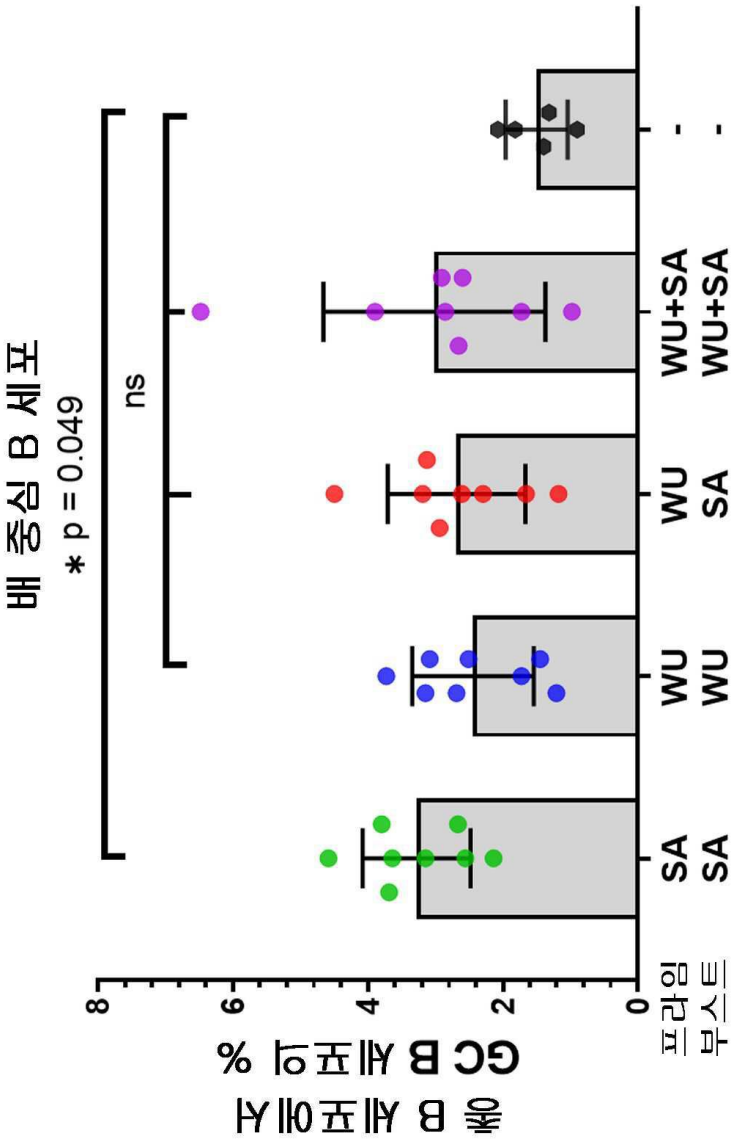
도면56e


다기능성 CD4+ T 세포
(3가지 Th1 사이토카인 양성)
BV2373
자극
ns
BV2438
자극
ns
****
****
LOQ
10^6 CD4+ T 세포 당
3가지 Th1+ 세포
10000
1000
100
10
1
프라임
부스트
SA
WU
WU+SA
-

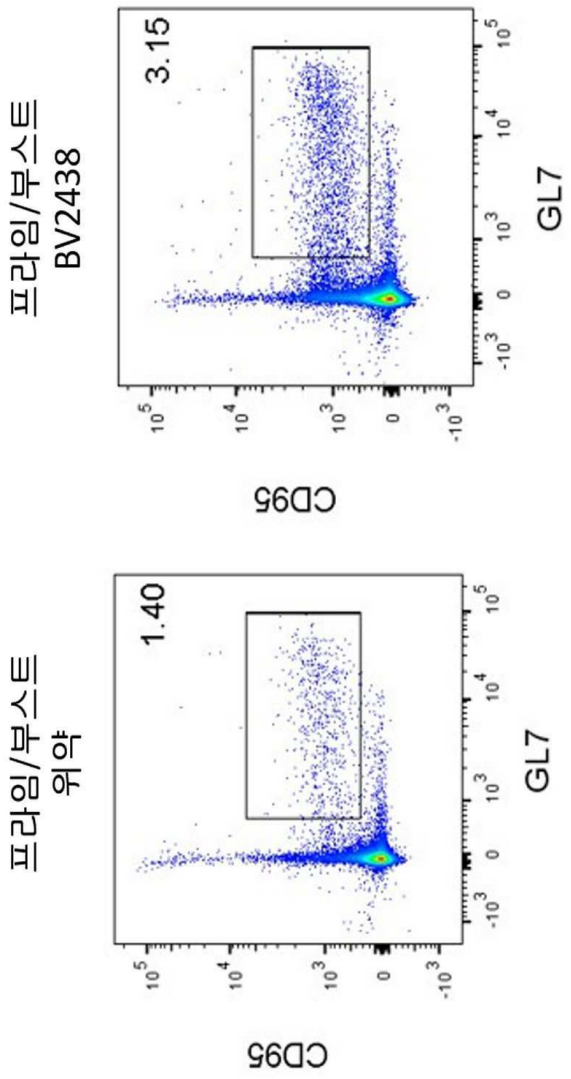
도면56f


Tfh CD4+ T 세포
ns
0.6
0.4
0.2
0.0
% Tfh 의 총 CD4+ T 세포에서
프라임 부스트
SA SA
WU WU
WU SA
WU+SA WU+SA
- -

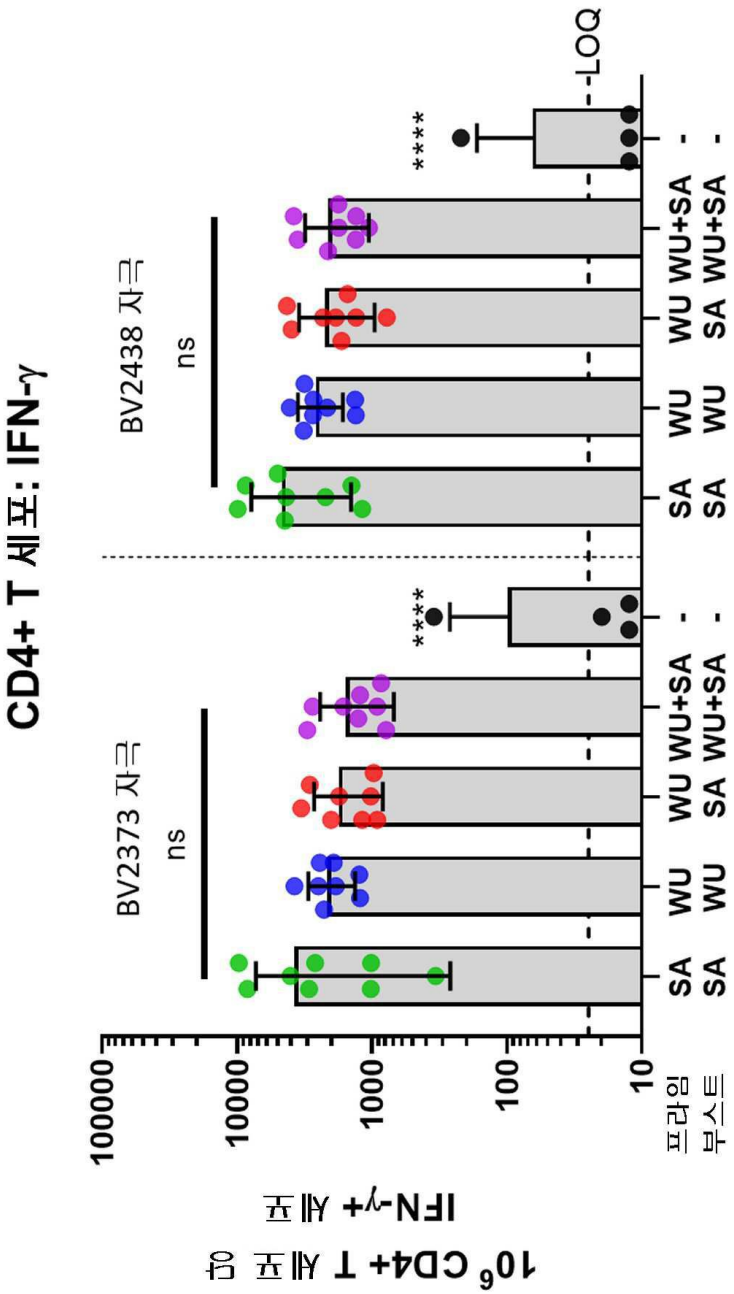
도면56g


배 중심 B 세포
* p = 0.049
ns
SA
SA
WU
WU
WU
SA
WU+SA
WU+SA
- -
프라임
부스트
0
2
4
6
8
GC B 세포의 %
총 B 세포에서

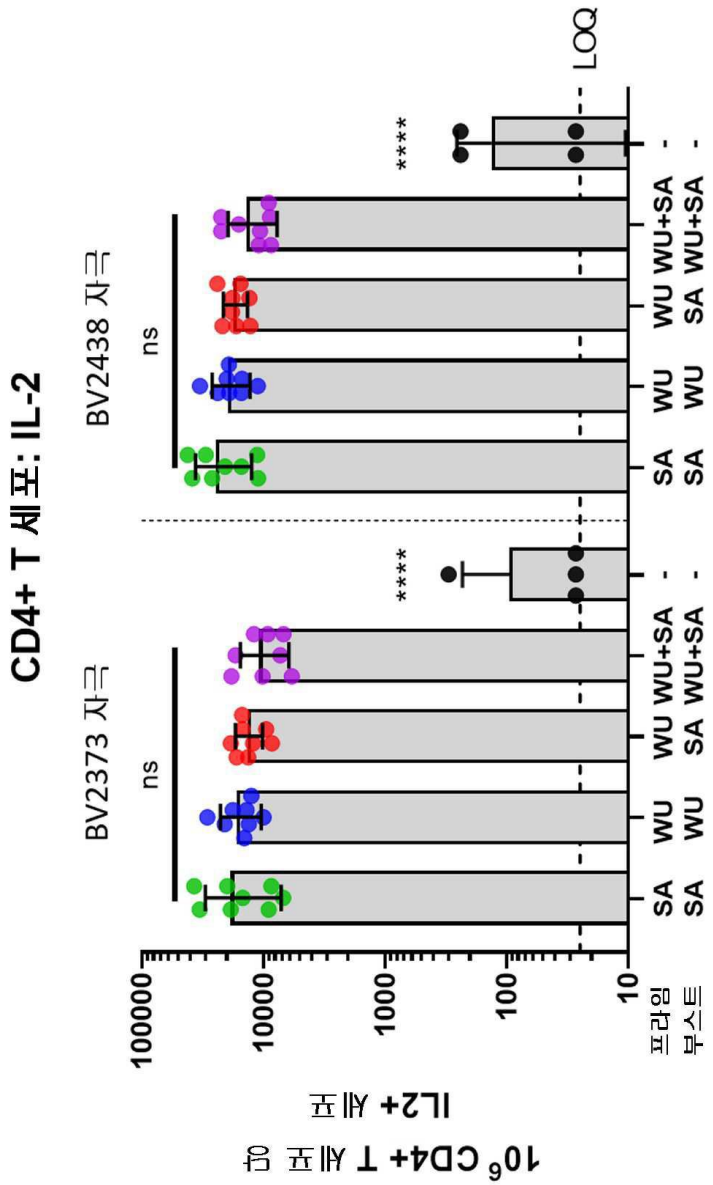
도면56h



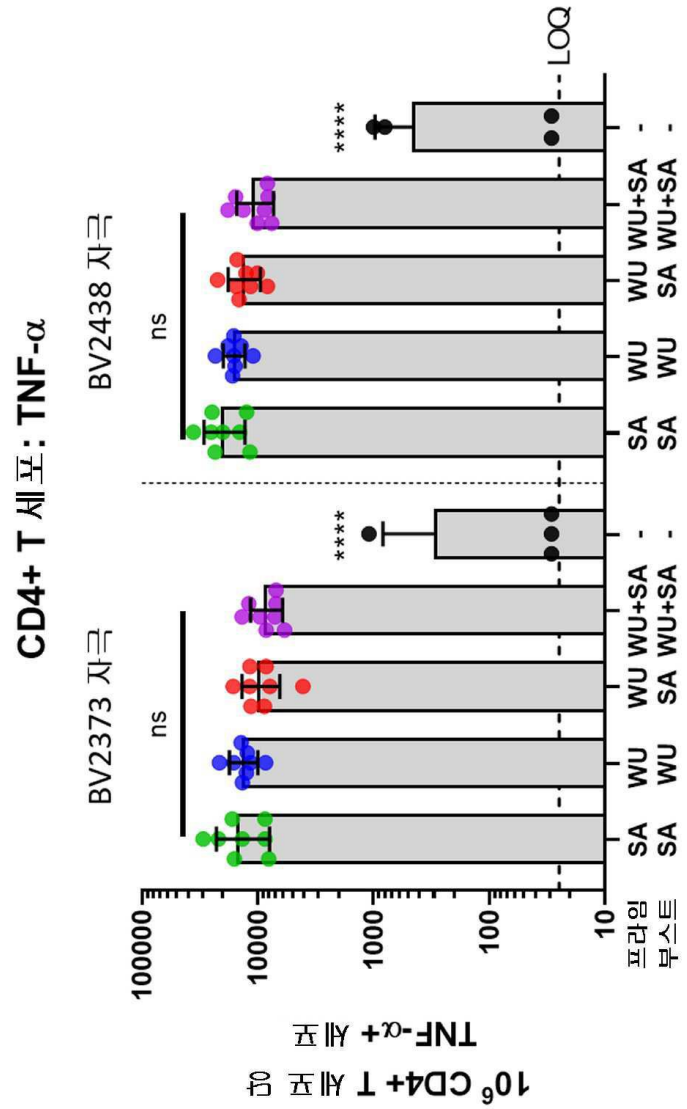
도면57a


CD4+ T 세포: IFN-γ
BV2373 자극
ns
BV2438 자극
ns
****
****
LOQ
100000
10000
1000
100
10
프라임
부스트
SA WU WU+SA -
SA WU SA WU+SA -
SA WU WU+SA -
SA WU SA WU+SA -
10^6 CD4+ T 세포 당
IFN-γ+ 세포

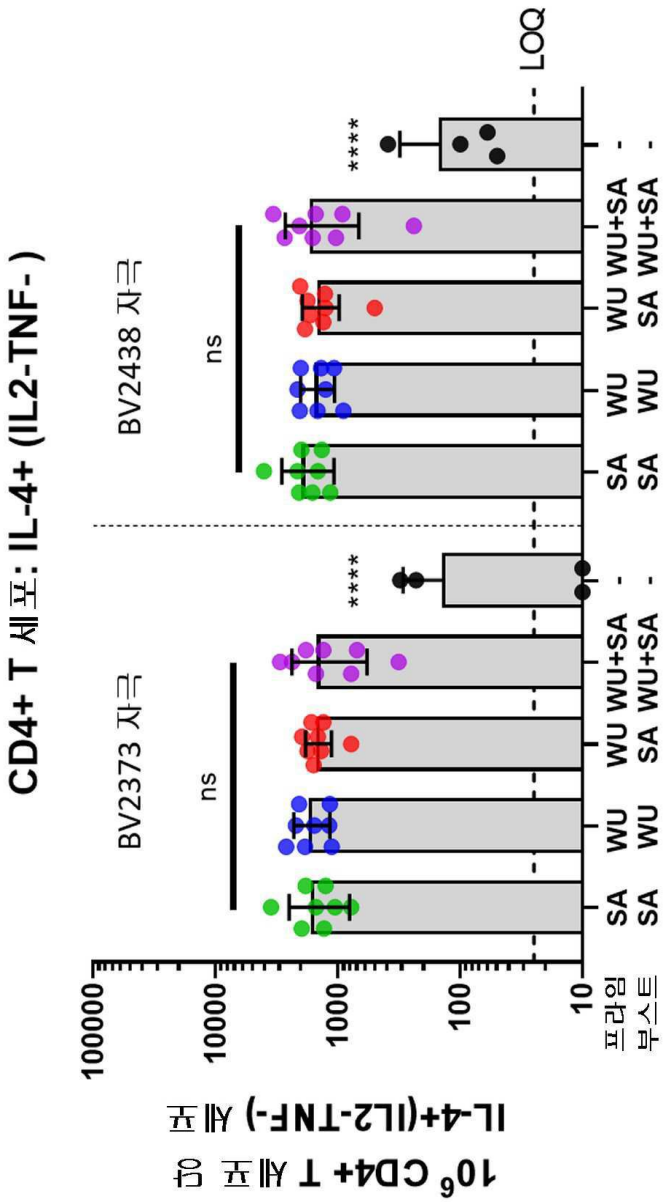
도면57b


CD4+ T 세포: IL-2
BV2373 자극
BV2438 자극
ns
ns
****
****
LOQ
SA
WU
WU
SA
WU+SA
WU+SA
-
-
프라임
부스트
10
100
1000
10000
100000
IL2+ 세포
10^6 CD4+ T 세포 당

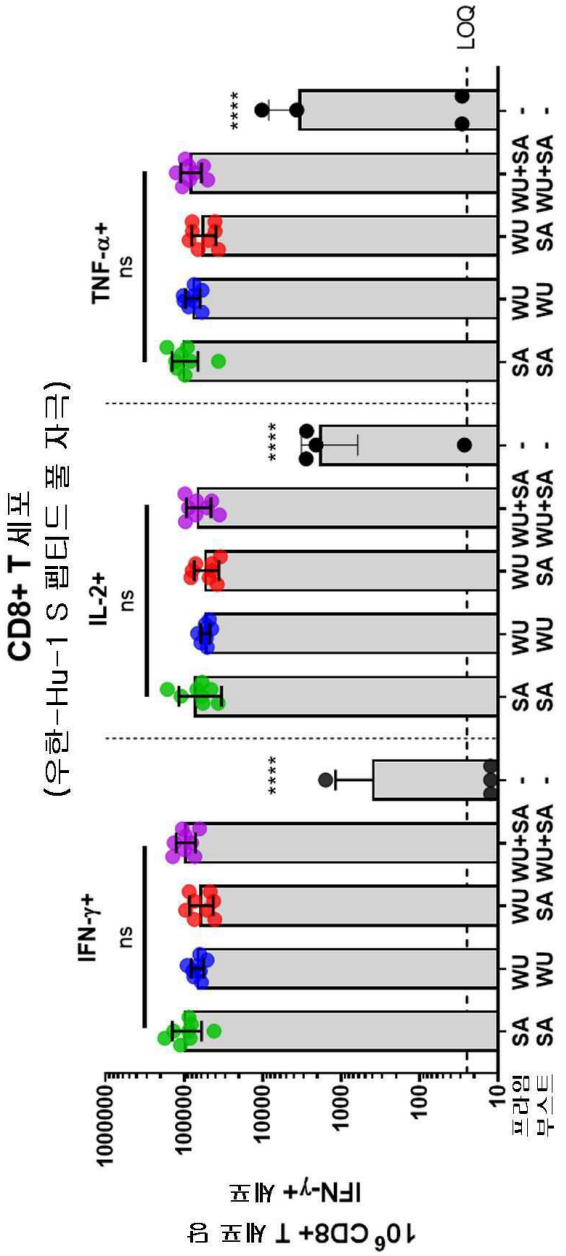
도면57c


CD4+ T 세포 : TNF-α
BV2373 자극
BV2438 자극
ns
ns
****
****
LOQ
프라임
부스트
SA SA
WU WU
WU SA
WU+SA WU+SA
- -
10
100
1000
10000
100000
TNF-α+ 세포
10^6 CD4+ T 세포 당

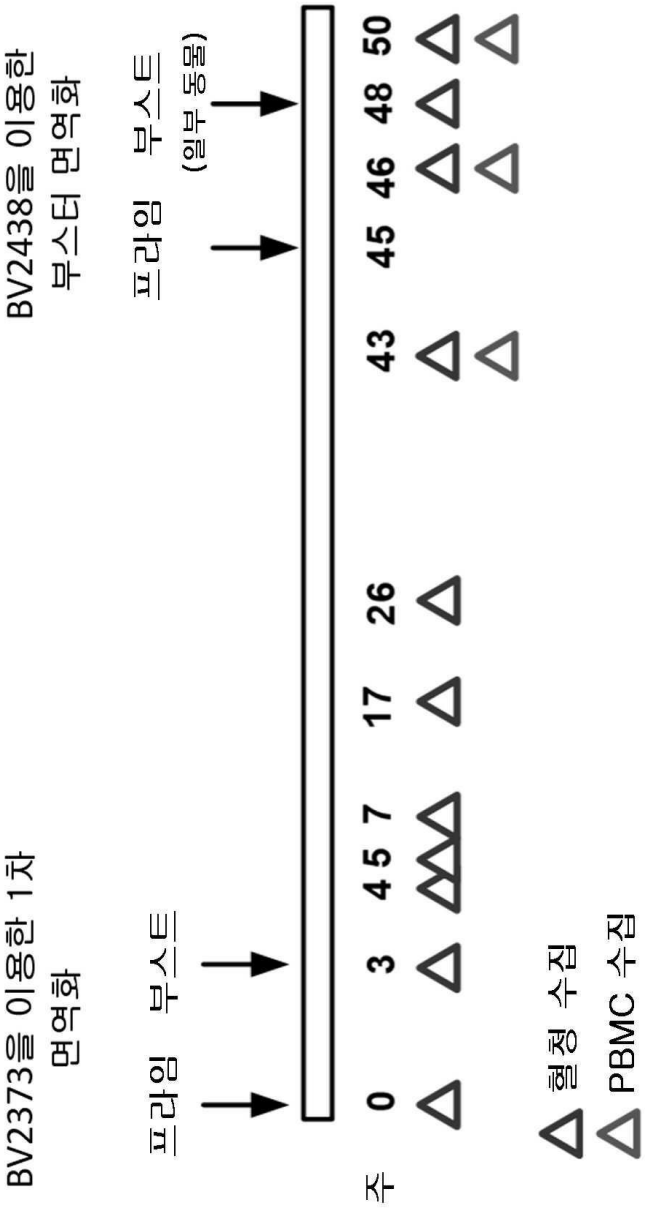
도면57d


CD4+ T 세포: IL-4+ (IL2-TNF-)
BV2373 자극
BV2438 자극
ns
ns
****
****
LOQ
100000
10000
1000
100
10
프라임
부스트
SA WU
SA WU
WU WU+SA
SA WU+SA
- -
- -
10^6 CD4+ T 세포 당
IL-4+(IL2-TNF-) 세포

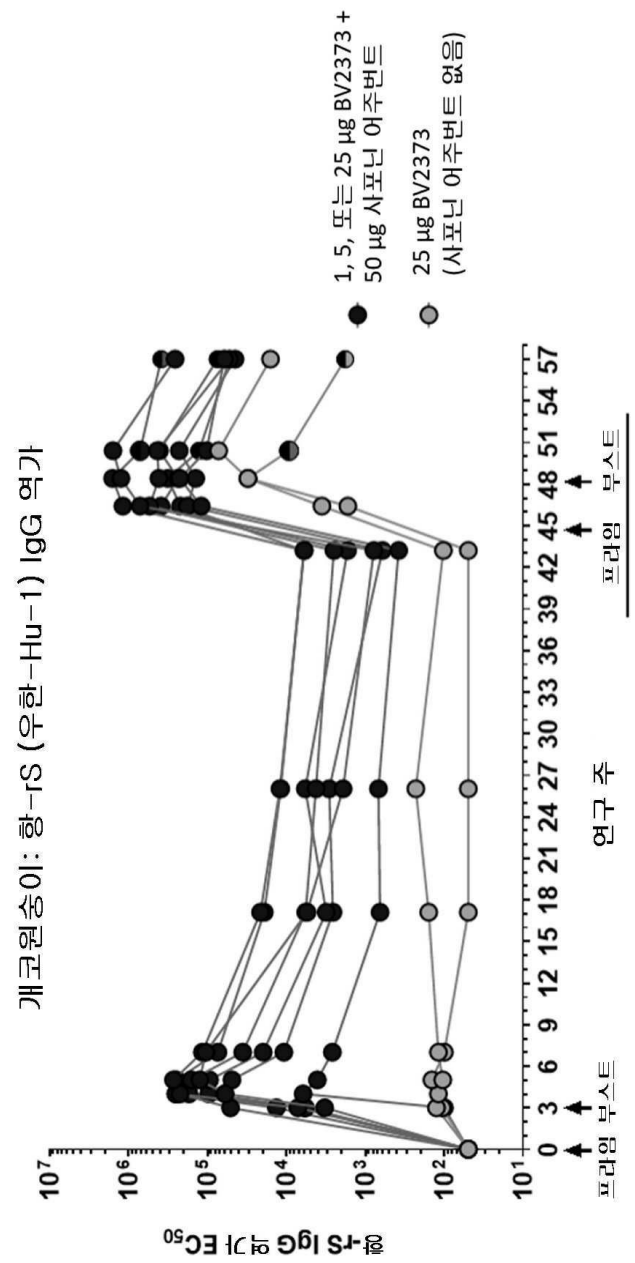
도면57e


CD8+ T 세포
(우한-Hu-1 S 펩티드 풀 자극)
IFN-γ+
IL-2+
TNF-α+
ns
****
LOQ
프라임
부스트
SA
WU
WU+SA
-
10^6 CD8+ T 세포 당
IFN-γ+ 세포
1000000
100000
10000
1000
100
10

도면58a

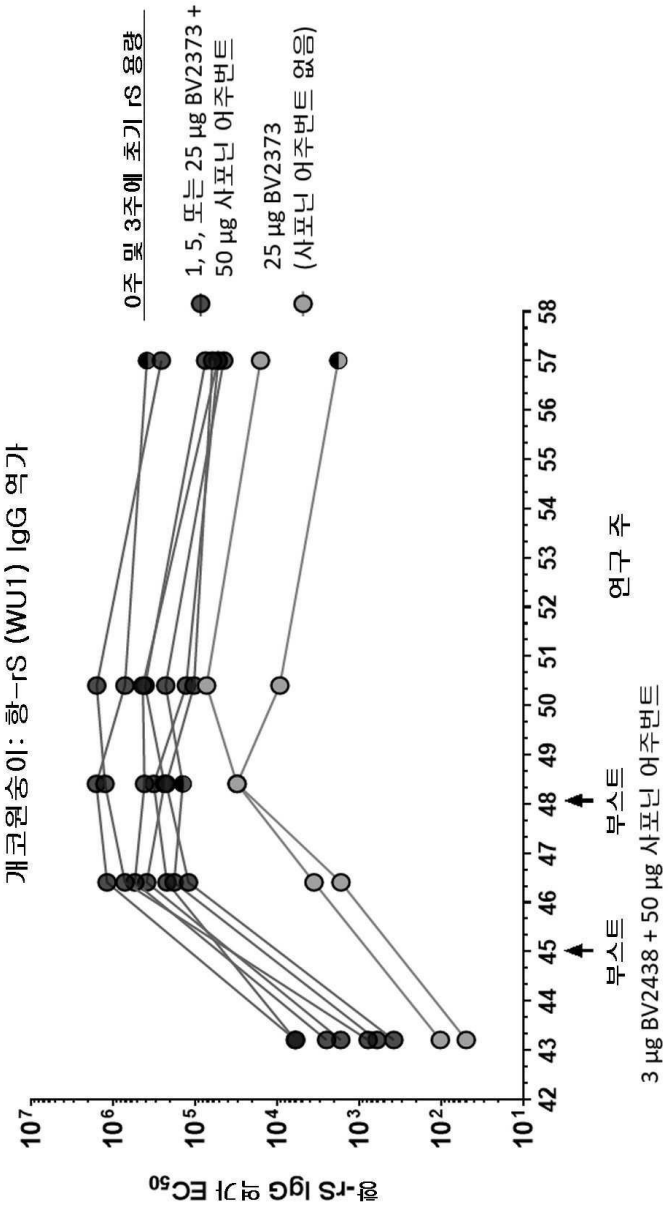

BV2373을 이용한 1차
면역화
프라임
부스트
BV2438을 이용한
부스터 면역화
프라임
부스트
(일부 동물)
주
0
3
4 5 7
17
26
43
45
46
48
50
혈청 수집
PBMC 수집

도면58b

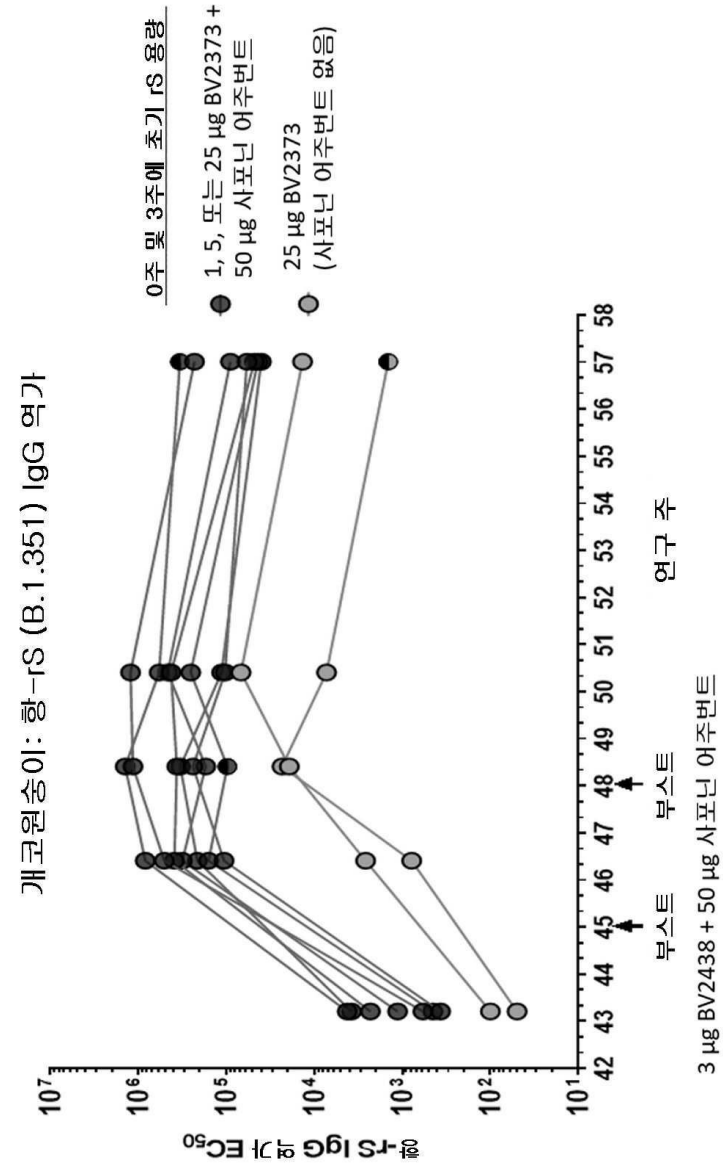


BV2373
(도면 범례에 나열된
용량)

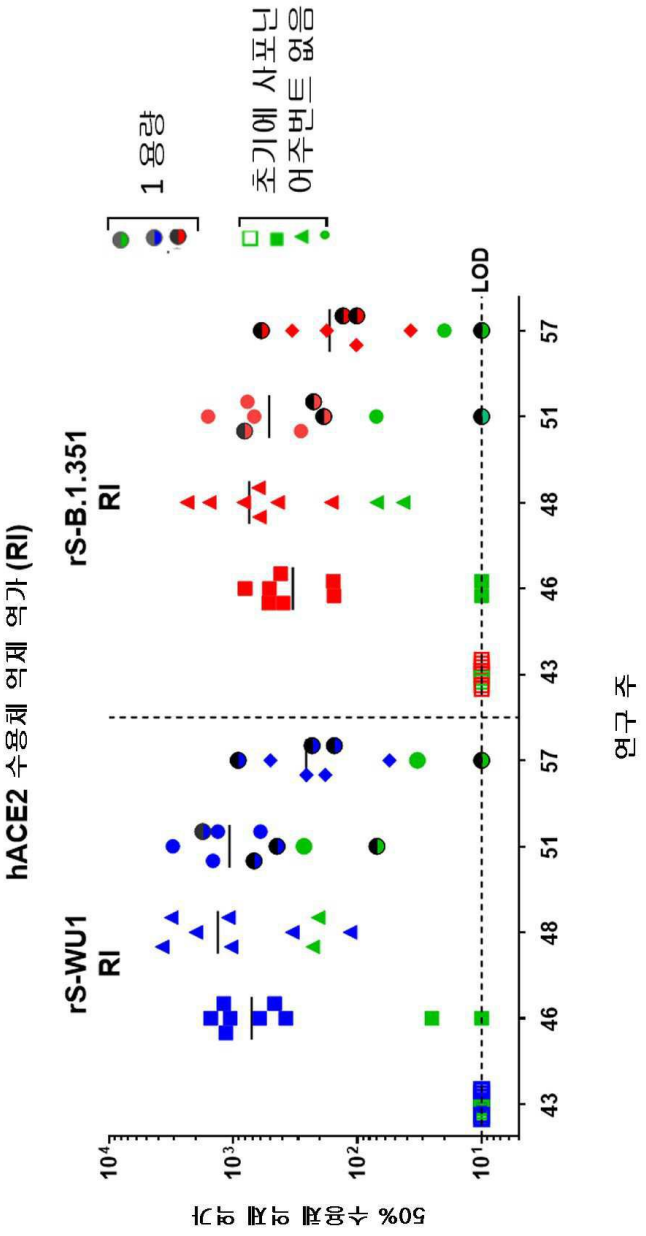
도면58c


개코원숭이: 항-rS (WU1) IgG 역가
0주 및 3주에 초기 rS 용량
1, 5, 또는 25 μg BV2373 +
50 μg 사포닌 어주번트
25 μg BV2373
(사포닌 어주번트 없음)
항-rS IgG 역가 EC50
부스트
부스트
연구 주
3 μg BV2438 + 50 μg 사포닌 어주번트

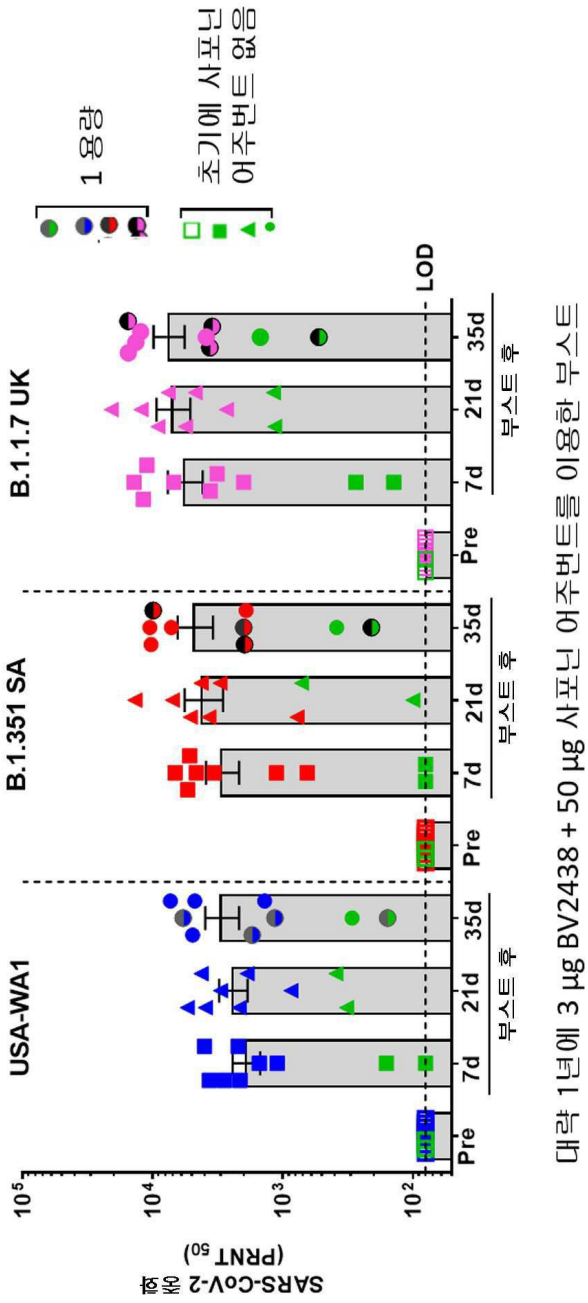
도면58d


개코원숭이: 항-rS (B.1.351) IgG 역가
0주 및 3주에 초기 rS 용량
1, 5, 또는 25 μg BV2373 +
50 μg 사포닌 어주번트
25 μg BV2373
(사포닌 어주번트 없음)
역 rS IgG 농가 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
부스트
부스트
연구 주
3 μg BV2438 + 50 μg 사포닌 어주번트

도면58e

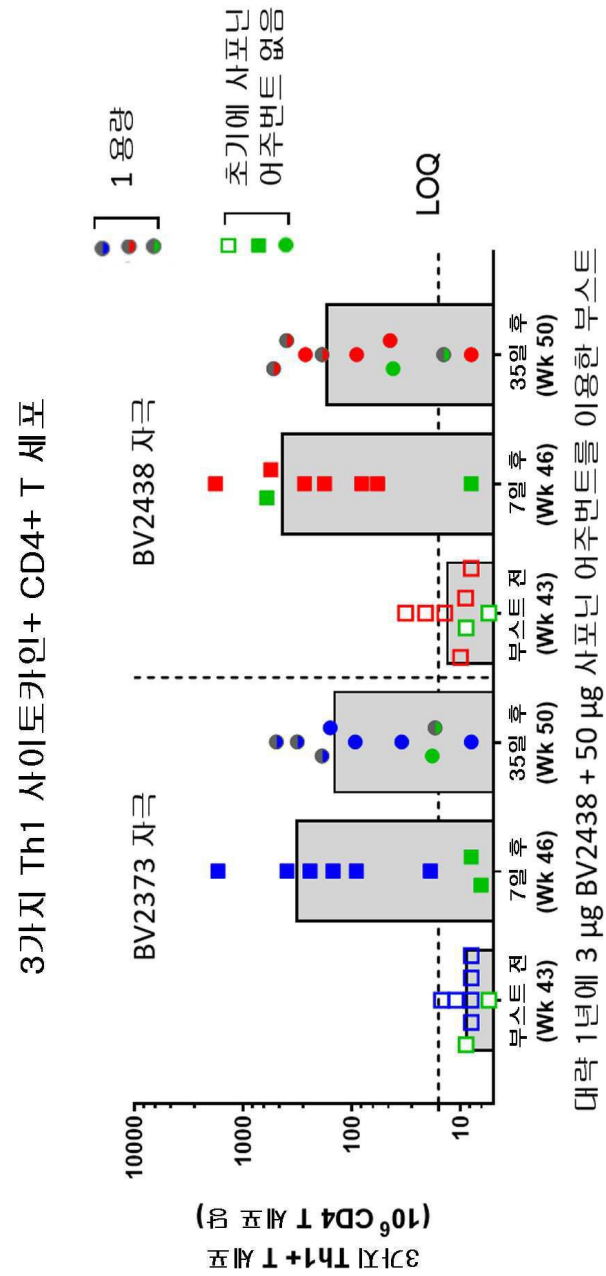

hACE2 수용체 억제 역가 (RI)
rS-WU1
RI
rS-B.1.351
RI
1 용량
초기에 사포닌
어주번트 없음
LOD
50% 수용체 억제 역가
연구 주

도면58f

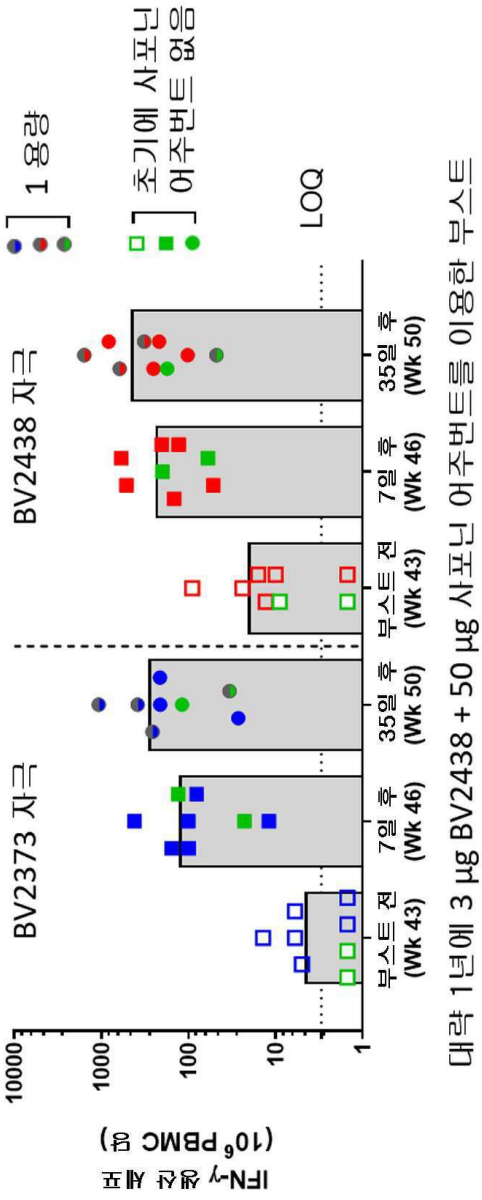


대략 1년에 3 μg BV2438 + 50 μg 사포닌 어주번트를 이용한 부스트

도면58g

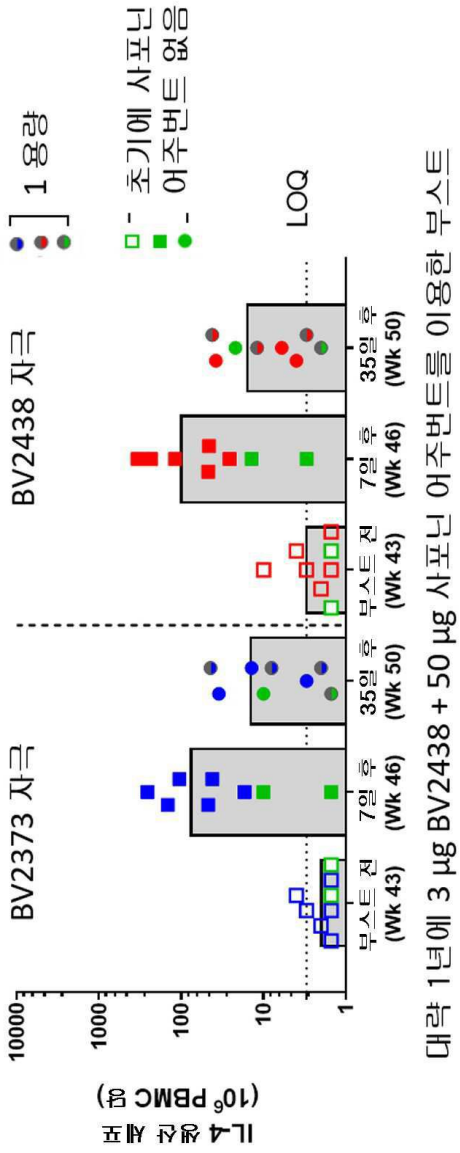

3가지 Th1 사이토카인+ CD4+ T 세포
BV2373 자극
BV2438 자극
1 용량
초기에 사포닌 아주번트 없음
LOQ
3가지 Th1+ T 세포
(10^6 CD4 T 세포 당)
10000
1000
100
10
부스트 전 (Wk 43)
7일 후 (Wk 46)
35일 후 (Wk 50)
부스트 전 (Wk 43)
7일 후 (Wk 46)
35일 후 (Wk 50)
대략 1년에 3 µg BV2438 + 50 µg 사포닌 아주번트를 이용한 부스트

도면59a



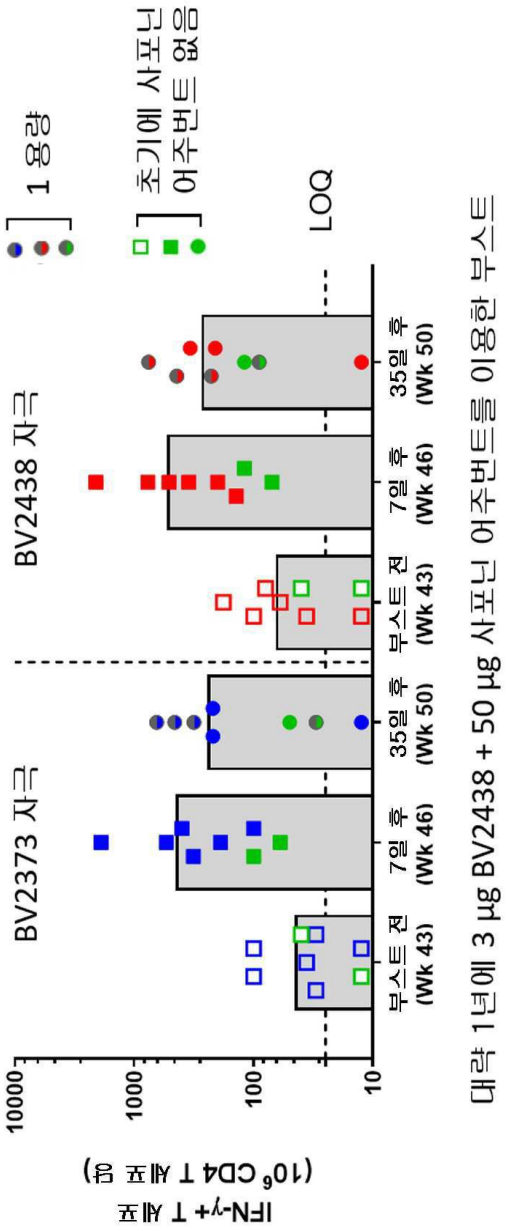
대략 1년에 3 μg BV2438 + 50 μg 사포닌 어주번트를 이용한 부스트

도면59b



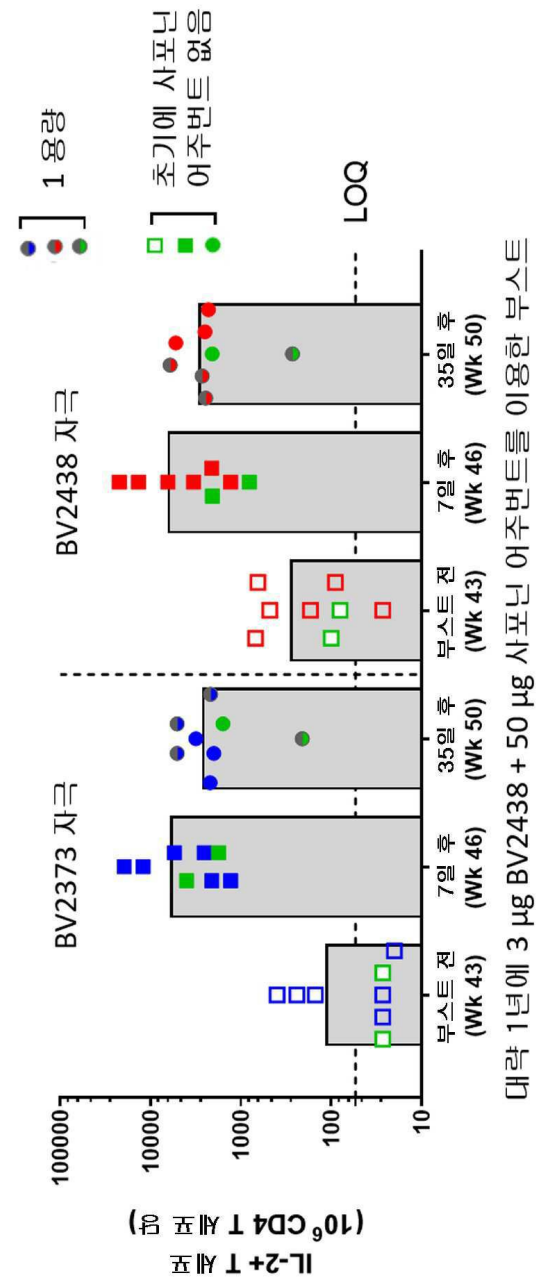
대략 1년에 3 μg BV2438 + 50 μg 사포닌 어주번트를 이용한 부스트

도면59c

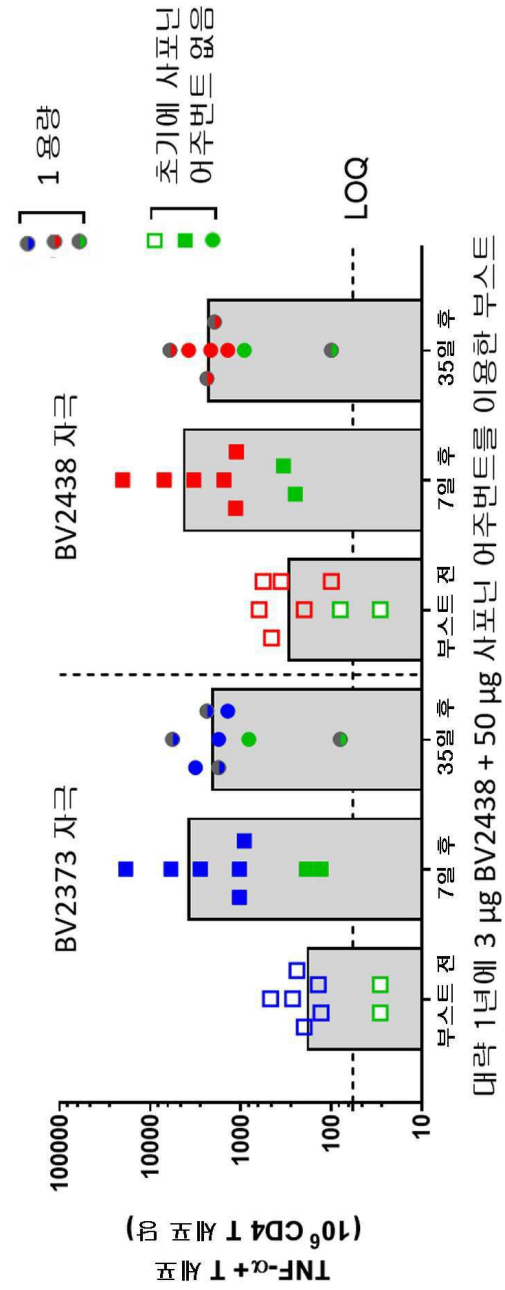


대략 1년에 3 μg BV2438 + 50 μg 사포닌 어주번트를 이용한 부스트

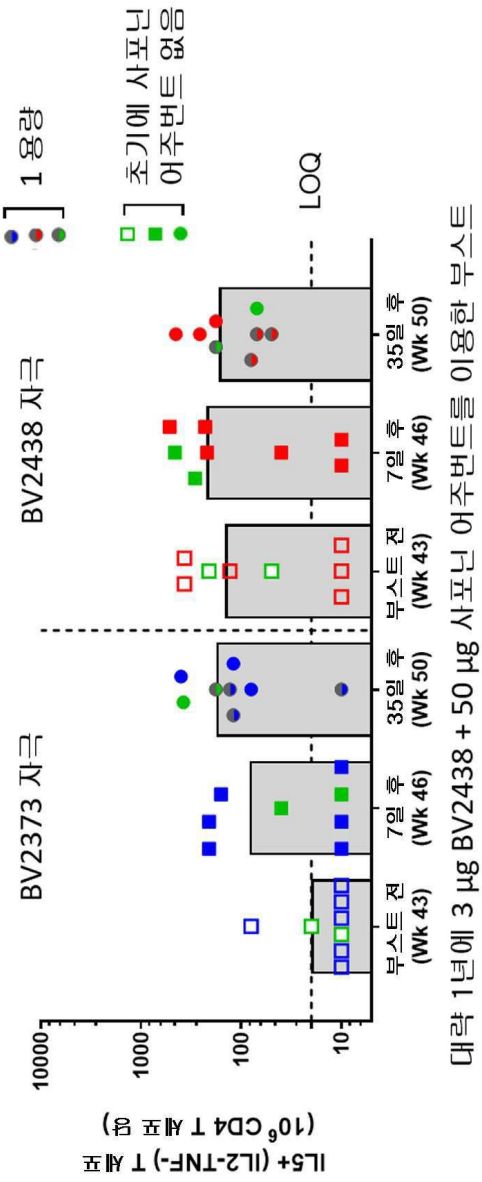
도면59d


1 용량
초기에 사포닌 어주번트 없음
LOQ
BV2373 자극
BV2438 자극
부스트 전 (Wk 43)
7일 후 (Wk 46)
35일 후 (Wk 50)
부스트 전 (Wk 43)
7일 후 (Wk 46)
35일 후 (Wk 50)
100000
10000
1000
100
10
IL-2+ T 세포 (10^6 CD4 T 세포 양)
대략 1년에 3 µg BV2438 + 50 µg 사포닌 어주번트를 이용한 부스트

도면59e

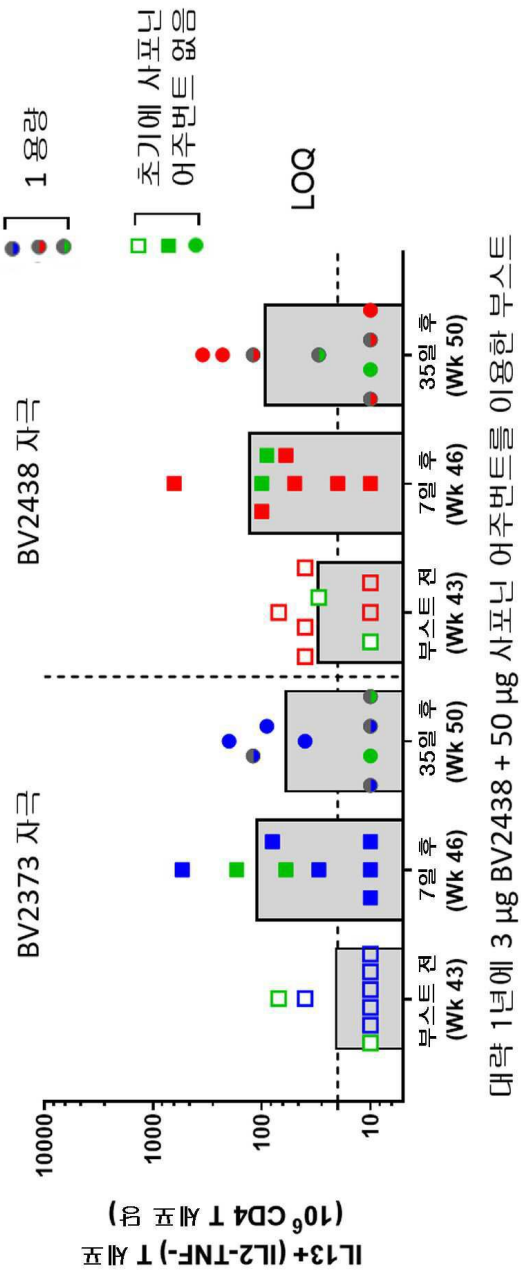

1 용량
초기에 사포닌 아주번트 없음
LOQ
BV2438 자극
BV2373 자극
부스트 전
7일 후
35일 후
부스트 전
7일 후
35일 후
대략 1년에 3 μg BV2438 + 50 μg 사포닌 아주번트를 이용한 부스트
TNF-α+ T 세포
(10^6 CD4 T 세포 당)
100000
10000
1000
100
10

도면59f



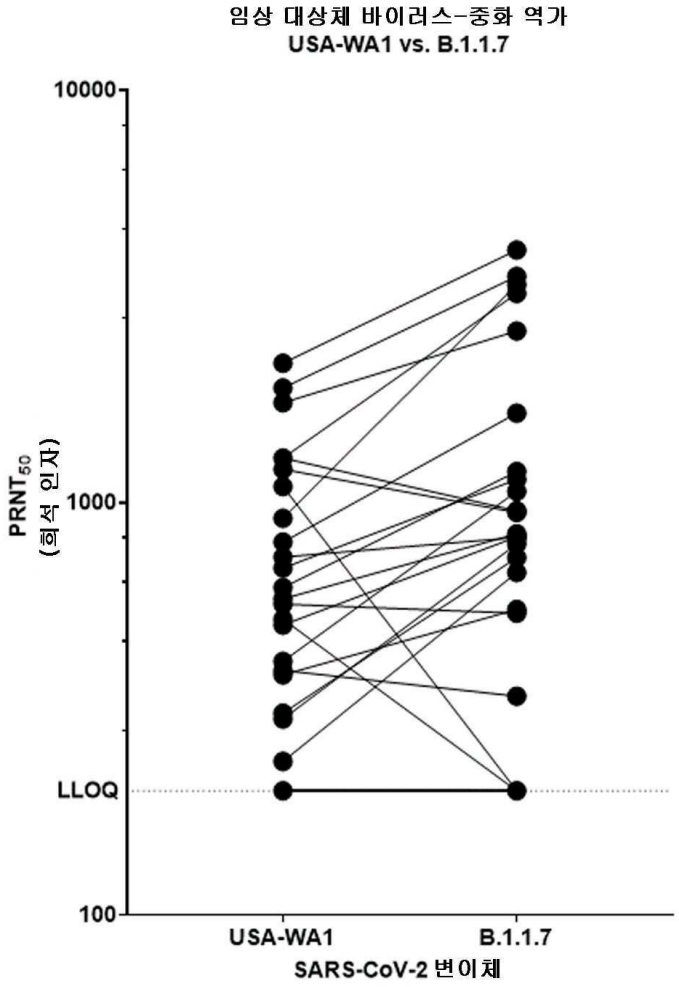
대략 1년에 3 μg BV2438 + 50 μg 사포닌 어주번트를 이용한 부스트

도면59g

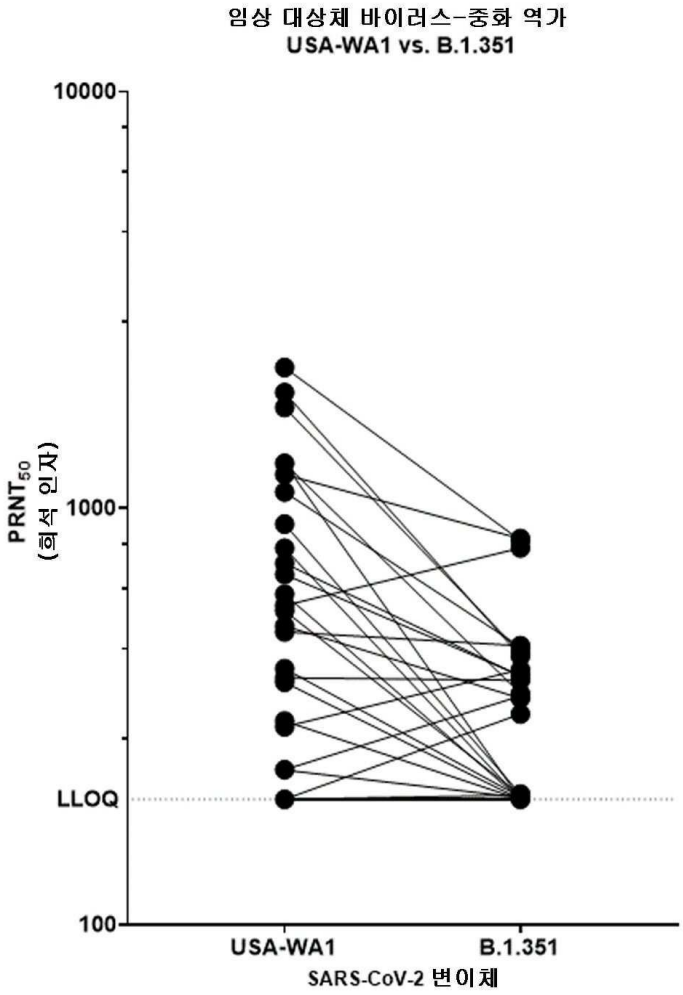


대략 1년에 3 μg BV2438 + 50 μg 사포닌 어주번트를 이용한 부스트

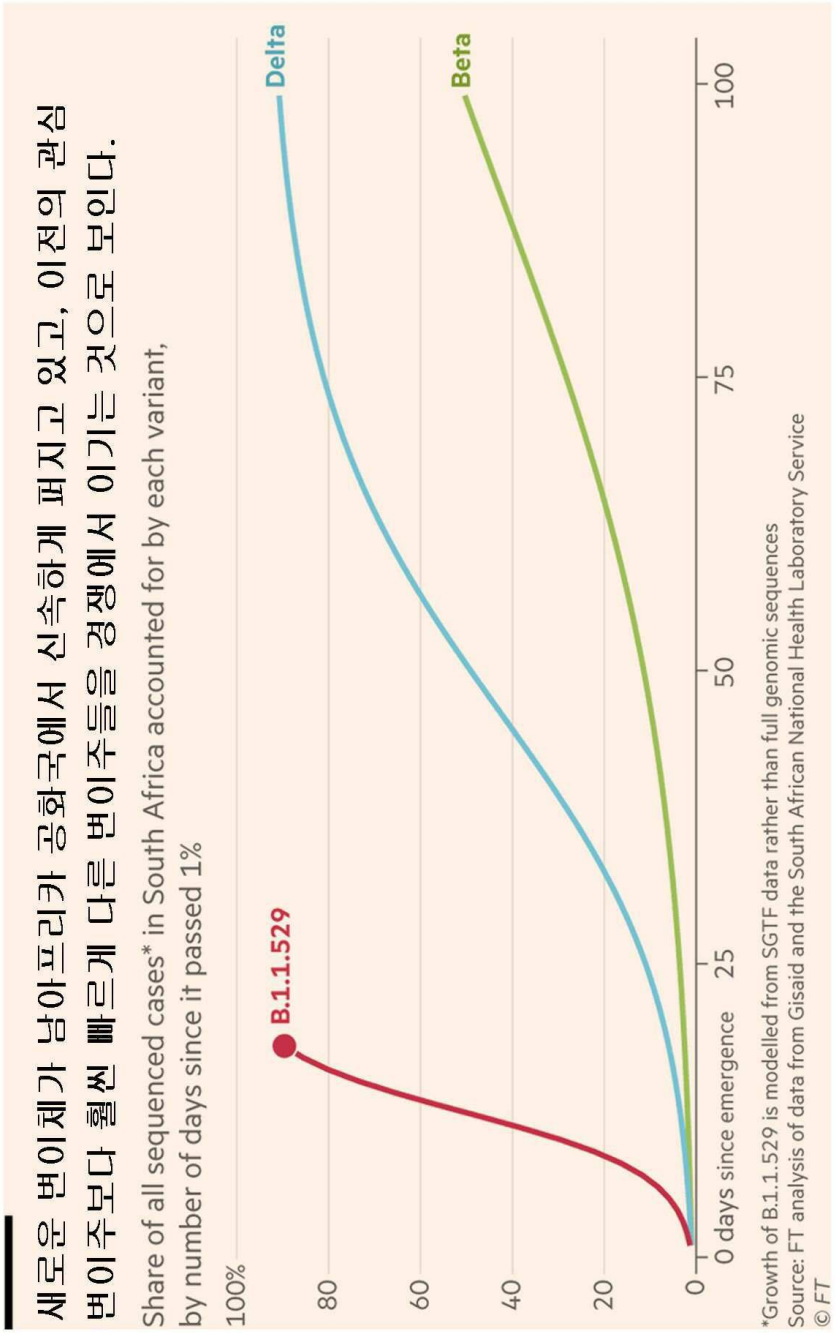
도면60a


임상 대상체 바이러스-중화 역가
USA-WA1 vs. B.1.1.7
10000
1000
LLOQ
100
PRNT50
(희석 인자)
USA-WA1
B.1.1.7
SARS-CoV-2 변이체

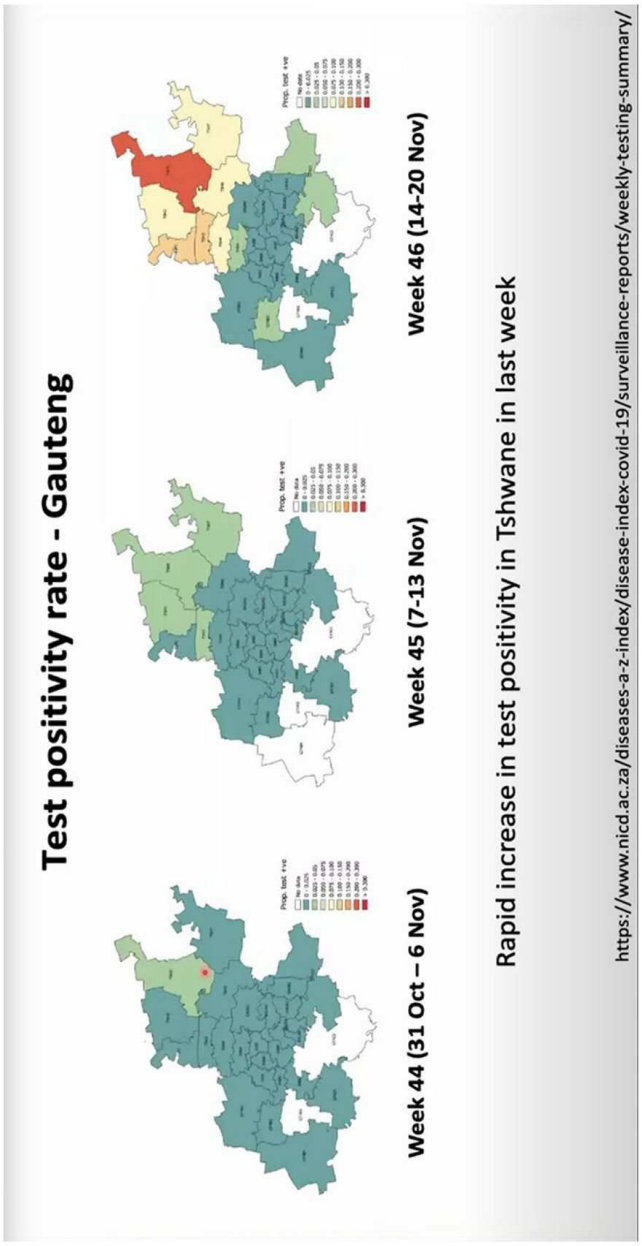
도면60b


임상 대상체 바이러스-중화 역가
USA-WA1 vs. B.1.351
10000
1000
LLOQ
100
PRNT50
(희석 인자)
USA-WA1
B.1.351
SARS-CoV-2 변이체

도면61


새로운 변이체가 남아프리카 공화국에서 신속하게 퍼지고 있고, 이전의 관심 변이주보다 훨씬 빠르게 다른 변이주들을 경쟁에서 이기는 것으로 보인다.
Share of all sequenced cases* in South Africa accounted for by each variant, by number of days since it passed 1%
100%
80
60
40
20
0
B.1.1.529
Delta
Beta
0 days since emergence
25
50
75
100
*Growth of B.1.1.529 is modelled from SGTF data rather than full genomic sequences
Source: FT analysis of data from Gisaid and the South African National Health Laboratory Service
© FT

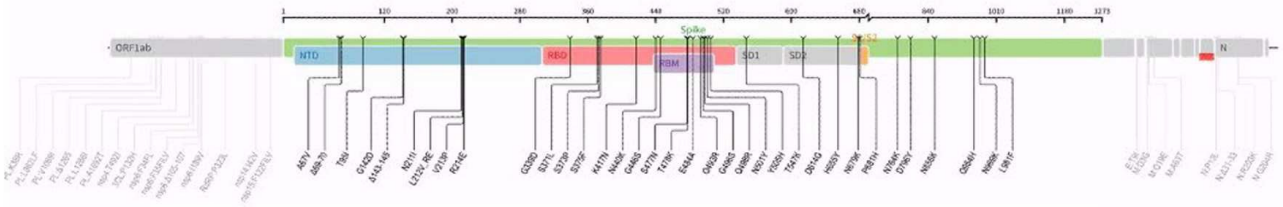
도면62


Test positivity rate - Gauteng
Week 44 (31 Oct – 6 Nov)
Week 45 (7-13 Nov)
Week 46 (14-20 Nov)
Rapid increase in test positivity in Tshwane in last week
https://www.nicd.ac.za/diseases-a-z-index/disease-index-covid-19/surveillance-reports/weekly-testing-summary/

도면63

A67V - B.1.525 et al.
Δ69-70 — S-gene target failure, Alpha
T95I - Delta
G142D/Δ143-145 - Delta
Δ211/L212I
ins214EPE
G339D — near mab binding
S371L - near mab binding
S373P - near mab binding
S375F - near mab binding
K417N - Beta
N440K - B.1.628
G446S
S477N — predicted ACE2 binding
T478K - Delta
E484A — key RBD site
Q493K
G496S
Q498R - predicted ACE2 binding
N501Y — Alpha, Beta, Gamma RBD
Y505H
T547K
D614G - everywhere
H655Y - Gamma
N679K - Gamma sub-lineage
P681H - Alpha furin cleavage
N764K
D796Y
N856K
Q954H
N969K
L981F

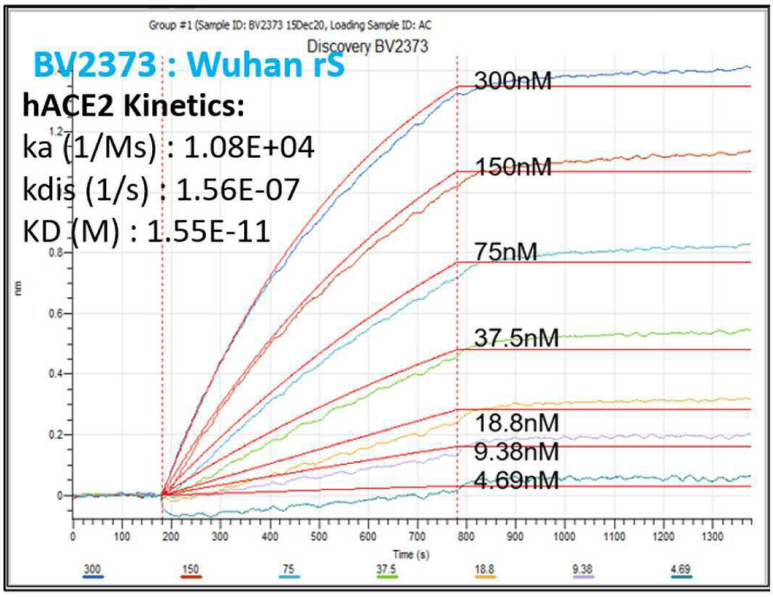
B.1.1.529 – 돌연변이의 잠재적 영향



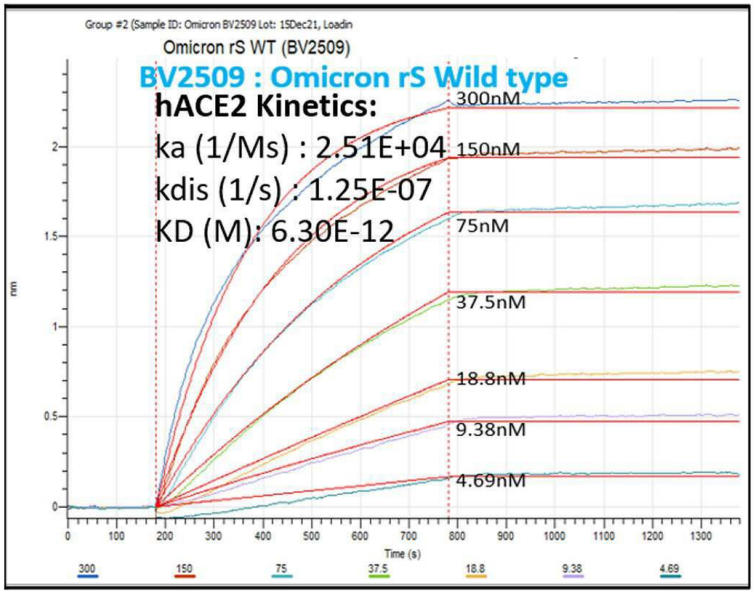
- 다수의 RBD 및 NTD 돌연변이는 중화 항체(및 치료적 모노클론 항체) 에 대한 저항성과 연관됨
- S1/S2 퓨린 절단 부위 인근의 돌연변이의 클러스터(H655Y + N679K + P681H) – 보다 효율적인 세포 진입 ⇒ 향상된 전파성과 연관됨
- nsp6 결실(Δ105-107) – 알파, 베타, 감마, 람다에 대한 결실과 유사함 – 선천적 면역력(인터페론 길항성)의 회피와 연관됨 ⇒ 전파성을 또한 향상시킬 수 있음
- 뉴클레오캡시드에서 R203K+G204R 돌연변이 – 알파, 감마, 람다에서 보임 – 증가된 감염성과 연관됨

공개특허 10-2024-0125935

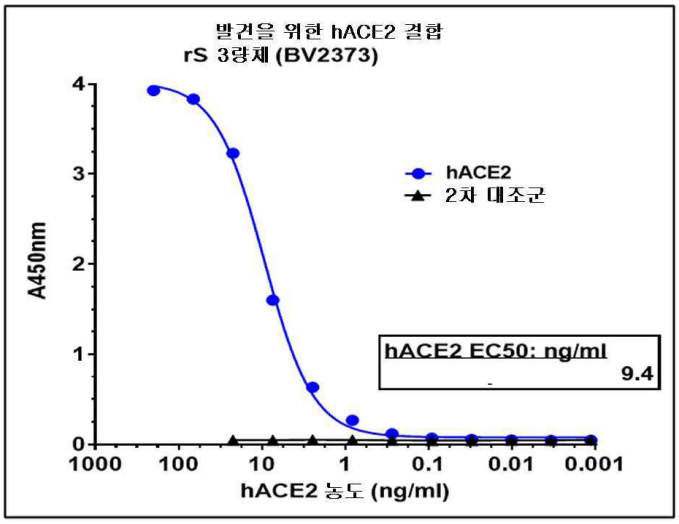
도면65a


Group #1 (Sample ID: BV2373 15Dec20, Loading Sample ID: AC
Discovery BV2373
BV2373 : Wuhan rS
hACE2 Kinetics:
ka (1/Ms) : 1.08E+04
kdis (1/s) : 1.56E-07
KD (M) : 1.55E-11
300nM
150nM
75nM
37.5nM
18.8nM
9.38nM
4.69nM
nm
Time (s)
300
150
75
37.5
18.8
9.38
4.69

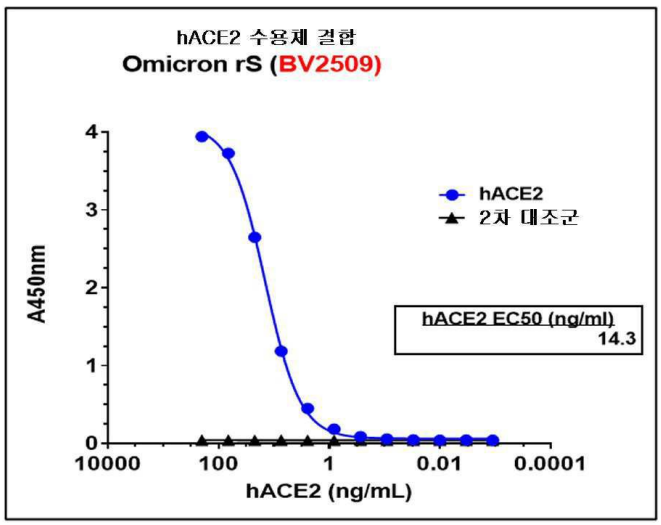
도면65b


Group #2 (Sample ID: Omicron BV2509 Lot: 15Dec21, Loadin
Omicron rS WT (BV2509)
BV2509 : Omicron rS Wild type
hACE2 Kinetics:
ka (1/Ms) : 2.51E+04
kdis (1/s) : 1.25E-07
KD (M): 6.30E-12
300nM
150nM
75nM
37.5nM
18.8nM
9.38nM
4.69nM
nm
Time (s)
300
150
75
37.5
18.8
9.38
4.69

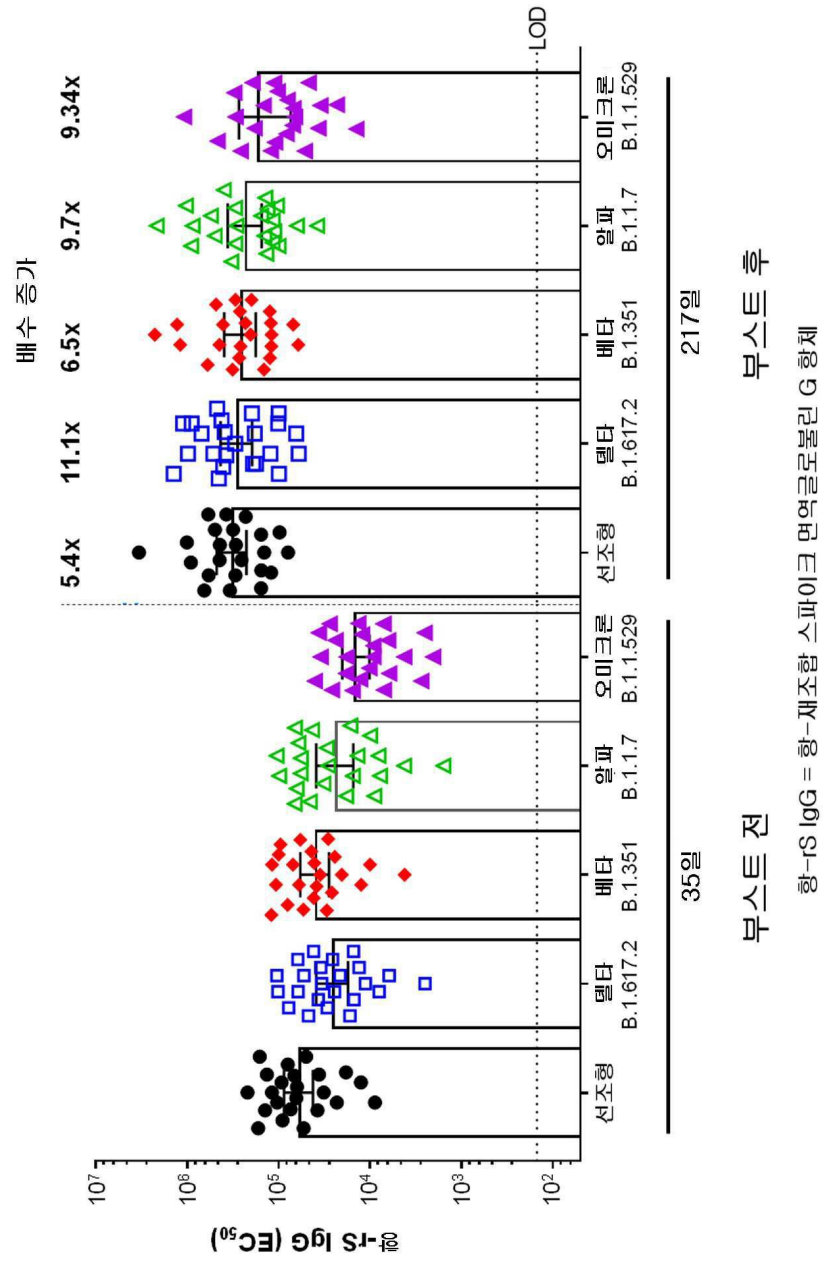
도면65c


발견을 위한 hACE2 결합
rS 3량체 (BV2373)
A450nm
hACE2
2차 대조군
hACE2 EC50: ng/ml
9.4
hACE2 농도 (ng/ml)

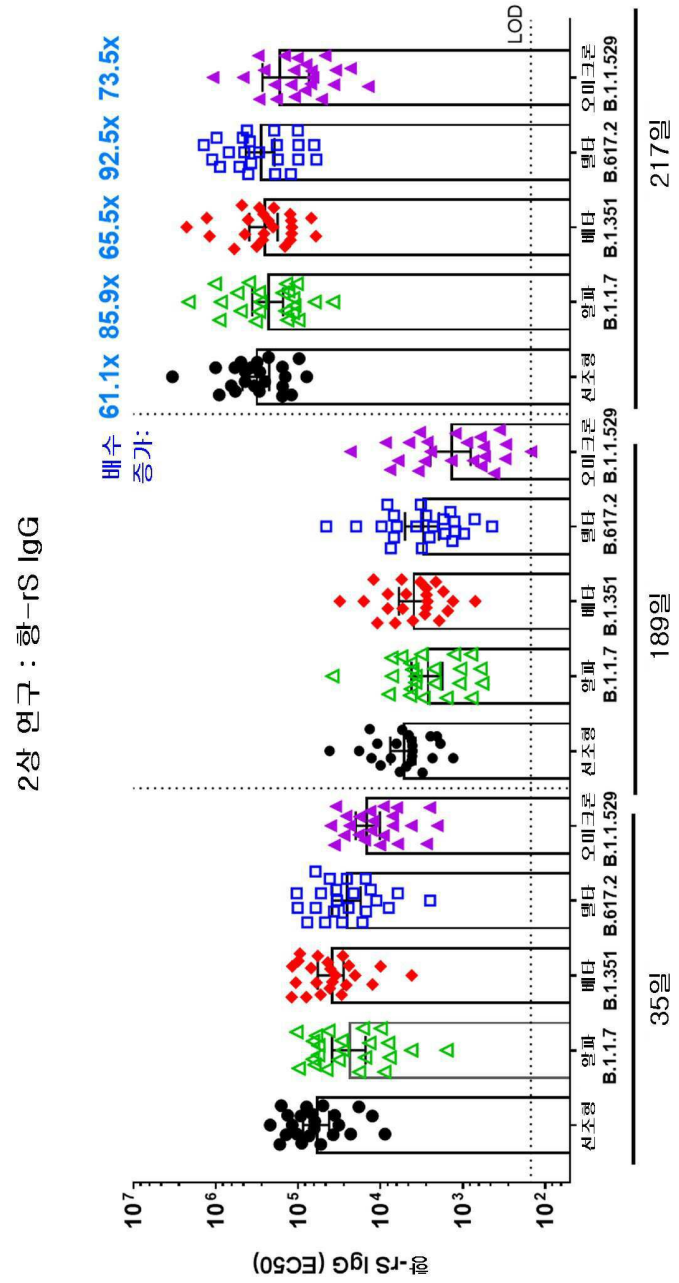
도면65d


hACE2 수용체 결합
Omicron rS (BV2509)
A450nm
hACE2
2차 대조군
hACE2 EC50 (ng/ml)
14.3
hACE2 (ng/mL)

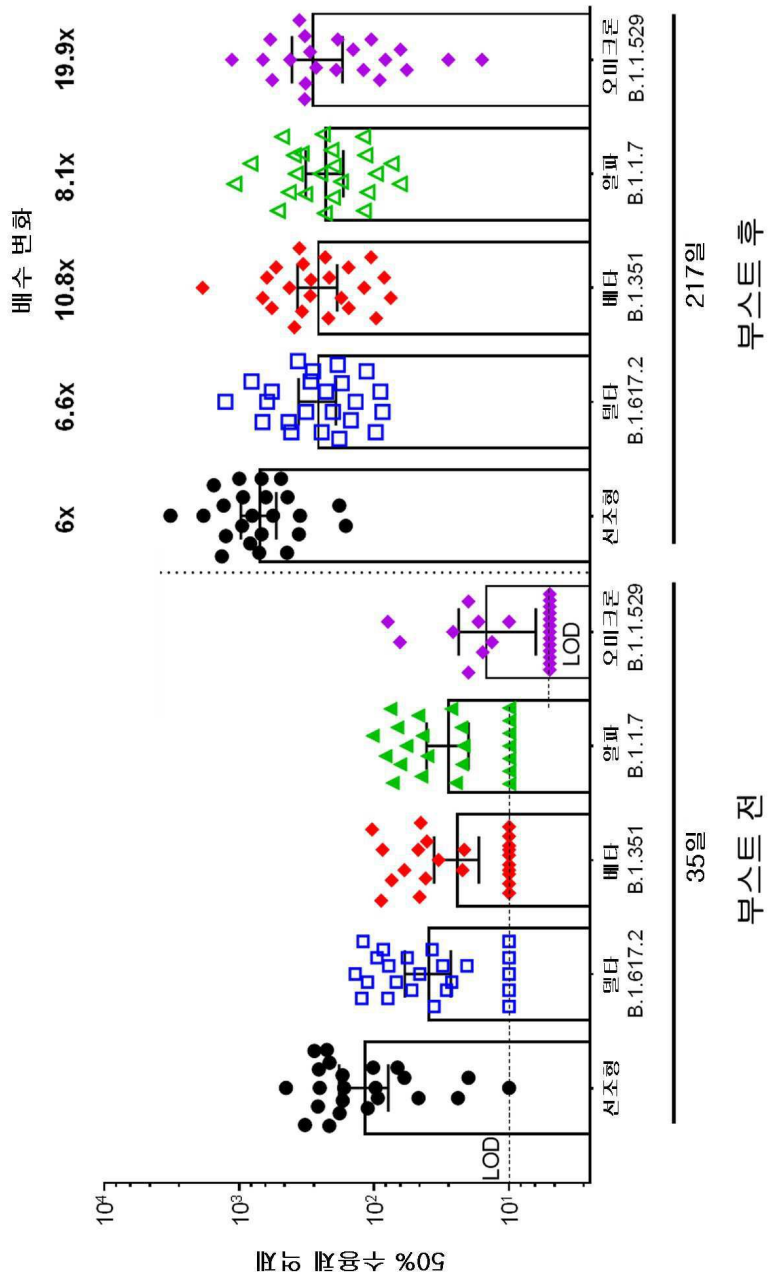
도면66a


항-rS IgG (EC50)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
LOD
배수 증가
5.4x
11.1x
6.5x
9.7x
9.34x
선조형
델타 B.1.617.2
베타 B.1.351
알파 B.1.1.7
오미크론 B.1.1.529
35일
217일
부스트 전
부스트 후
항-rS IgG = 항-재조합 스파이크 면역글로불린 G 항체

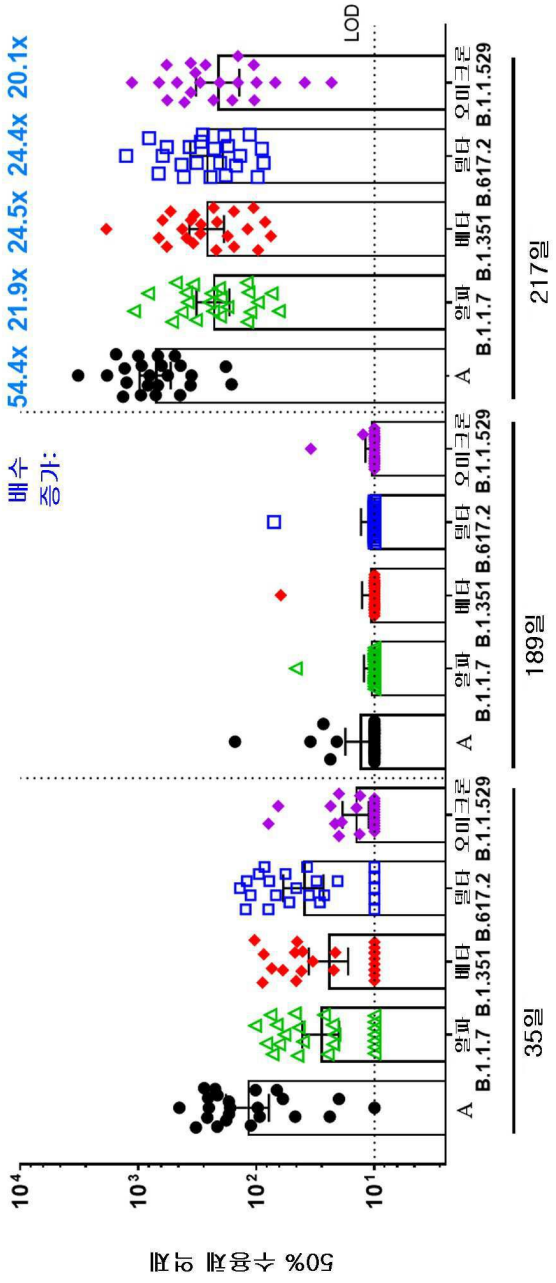
도면66b


2상 연구 : 항-rS IgG
항-rS IgG (EC50)
LOD
배수 증가:
61.1x
85.9x
65.5x
92.5x
73.5x
35일
189일
217일
선조형
알파 B.1.1.7
베타 B.1.351
델타 B.617.2
오미크론 B.1.1.529

도면67a

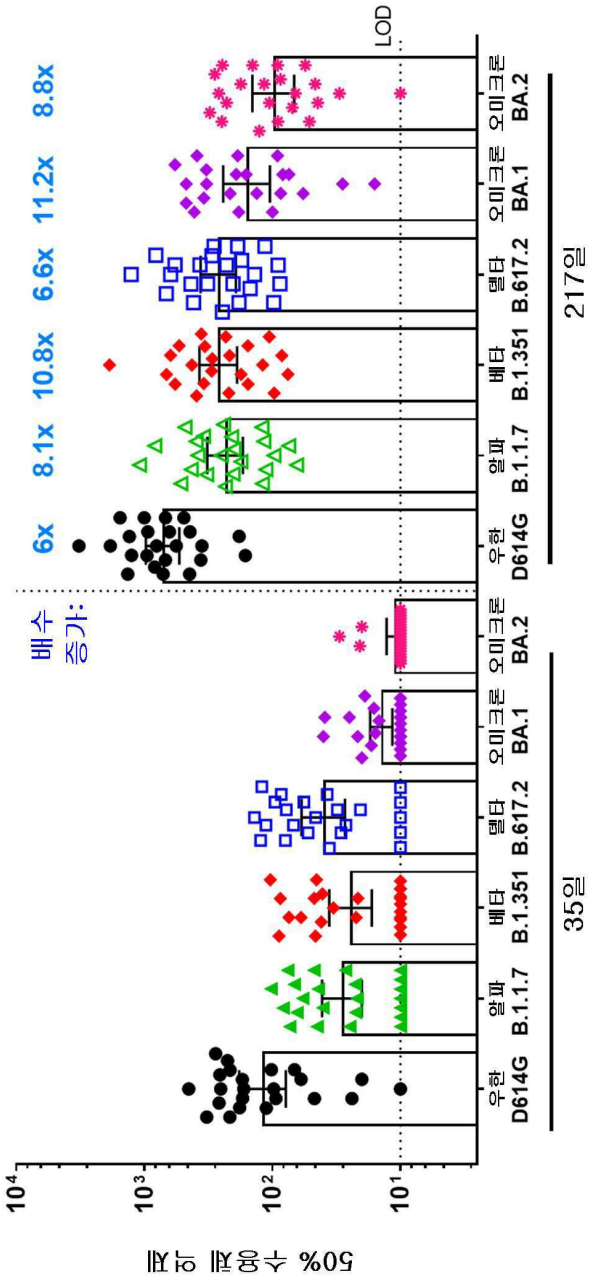

50% 수용체 억제
10^4
10^3
10^2
10^1
LOD
LOD
배수 변화
6x
6.6x
10.8x
8.1x
19.9x
선조형
델타 B.1.617.2
베타 B.1.351
알파 B.1.1.7
오미크론 B.1.1.529
선조형
델타 B.1.617.2
베타 B.1.351
알파 B.1.1.7
오미크론 B.1.1.529
35일
217일
부스트 전
부스트 후

도면67b

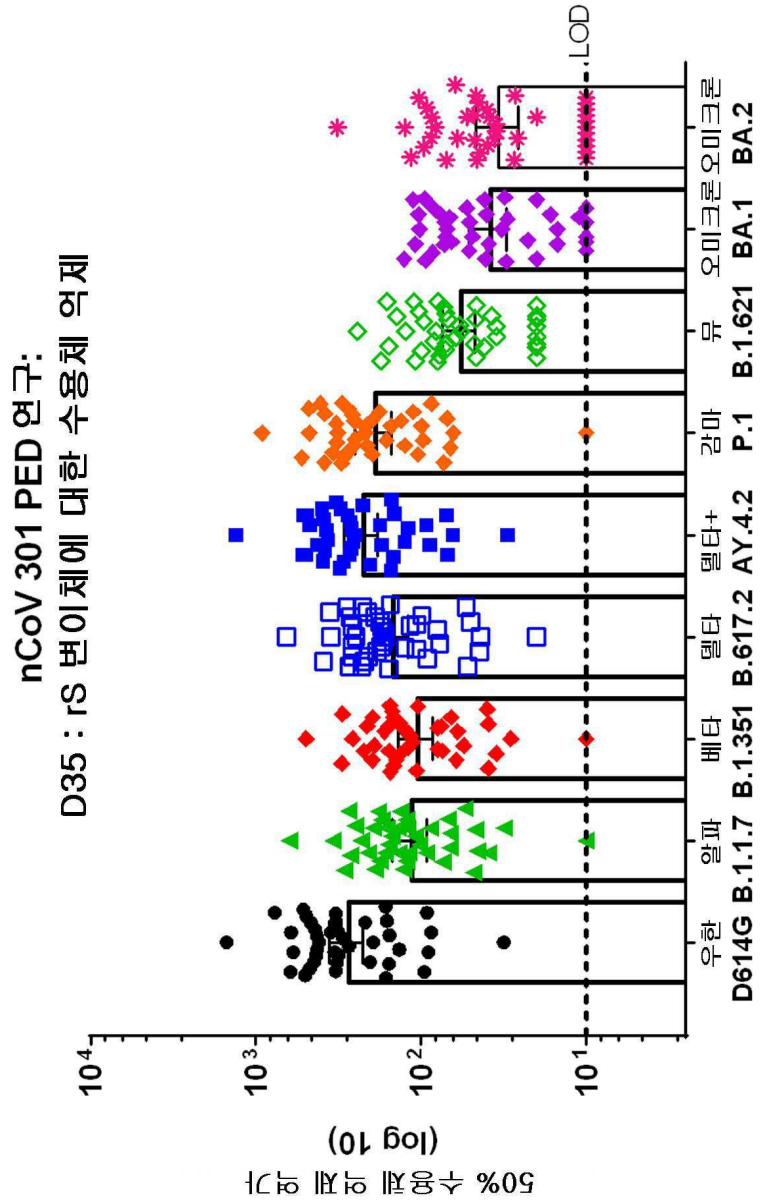


A= 선조형 바이러스주

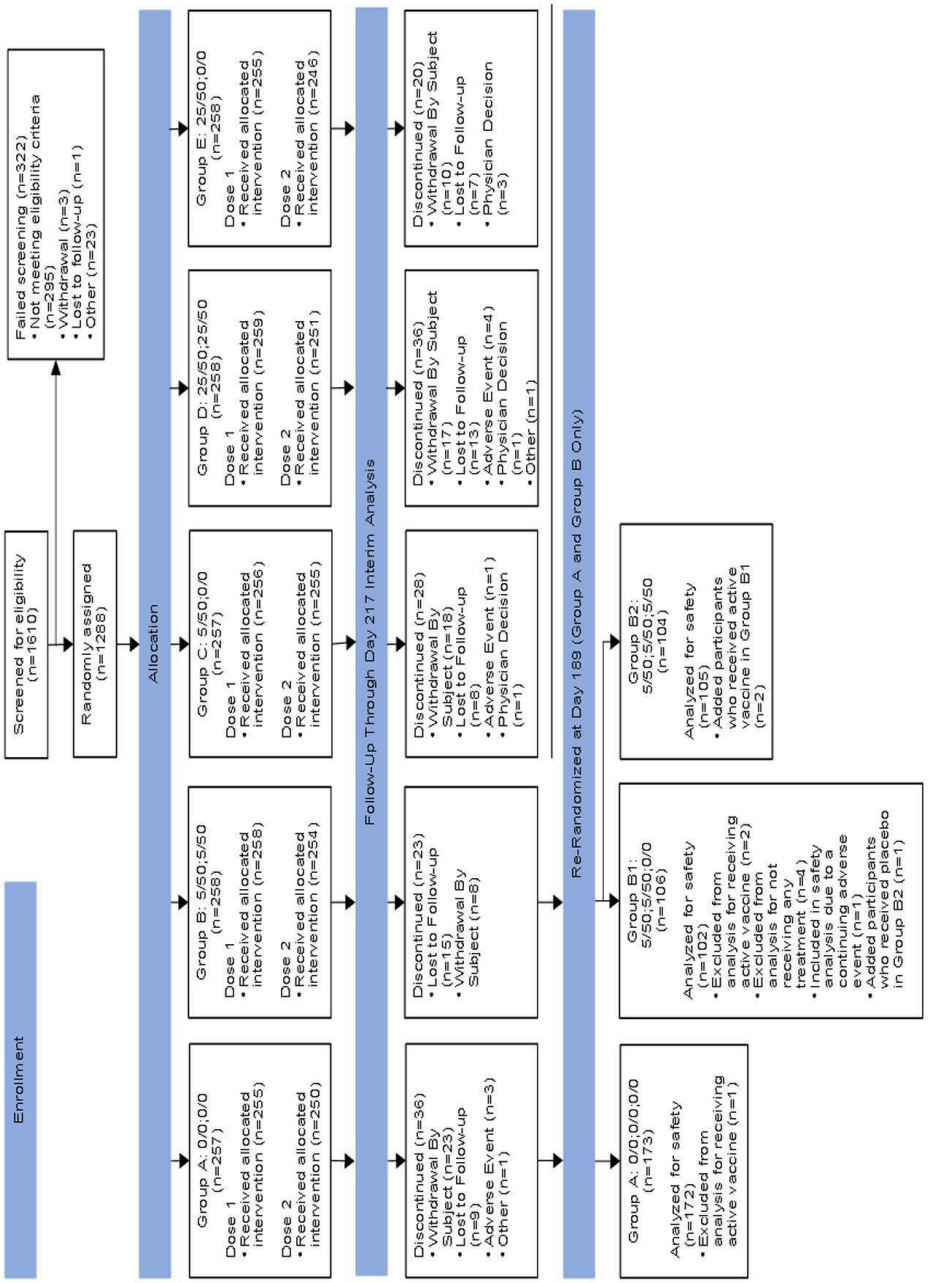
도면67c


50% 수용체 억제
10^4
10^3
10^2
10^1
LOD
배수 증가:
6x
8.1x
10.8x
6.6x
11.2x
8.8x
우한 D614G
알파 B.1.1.7
베타 B.1.351
델타 B.617.2
오미크론 BA.1
오미크론 BA.2
우한 D614G
알파 B.1.1.7
베타 B.1.351
델타 B.617.2
오미크론 BA.1
오미크론 BA.2
35일
217일

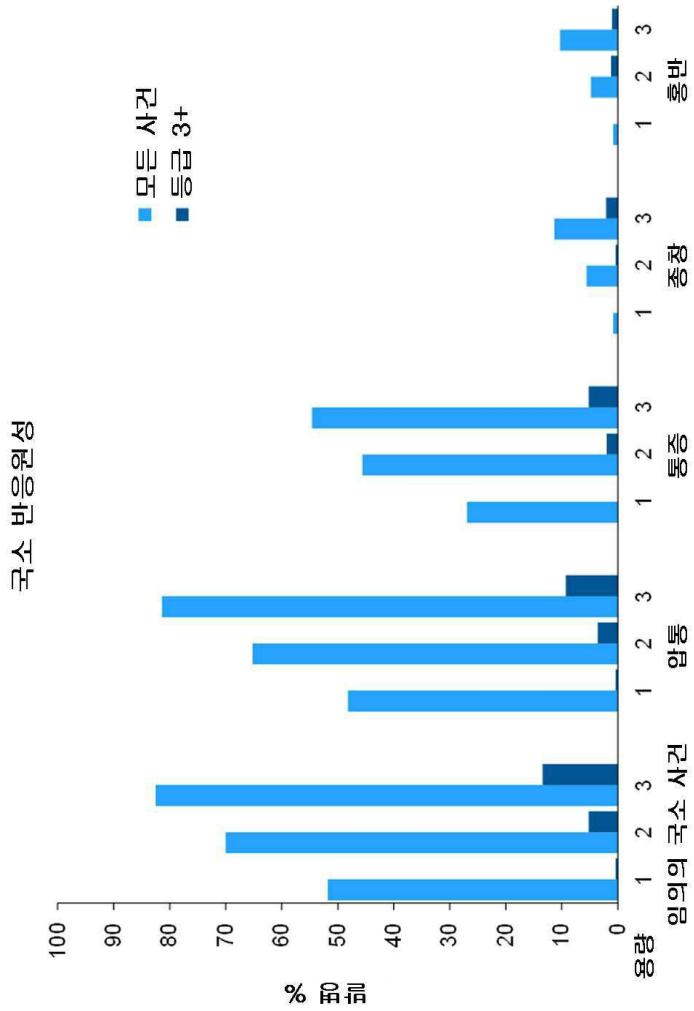
도면67d


nCoV 301 PED 연구:
D35 : rS 변이체에 대한 수용체 억제
50% 수용체 억제 역가
(log 10)
10^4
10^3
10^2
10^1
LOD
우한 D614G
알파 B.1.1.7
베타 B.1.351
델타 B.617.2
델타+ AY.4.2
감마 P.1
뮤 B.1.621
오미크론 BA.1
오미크론 BA.2

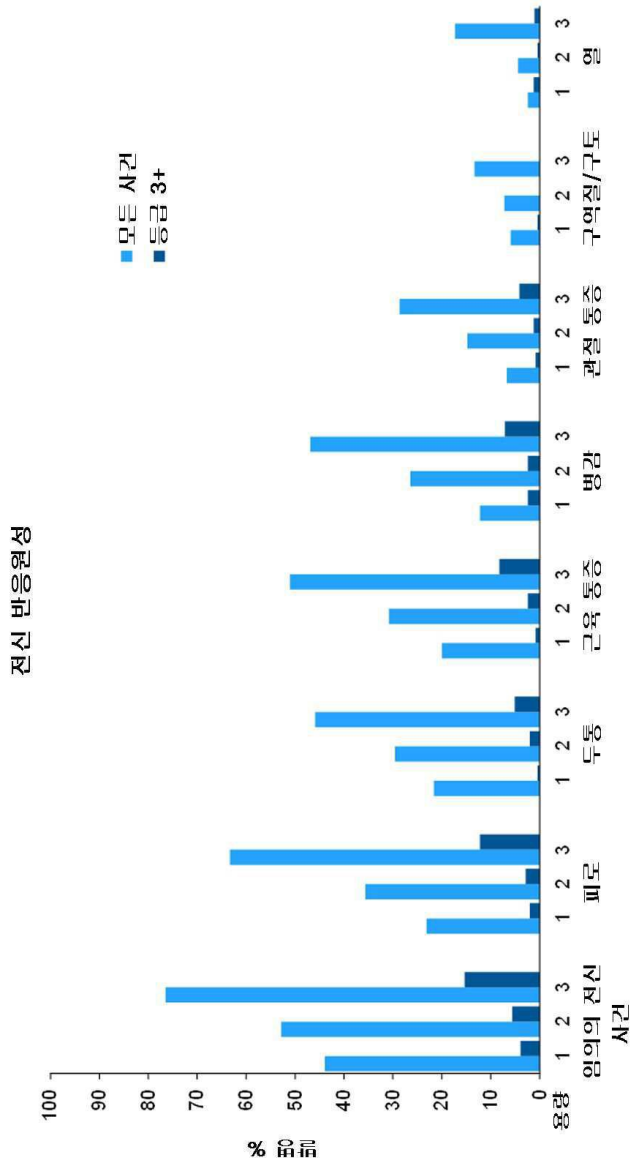
도면68


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)

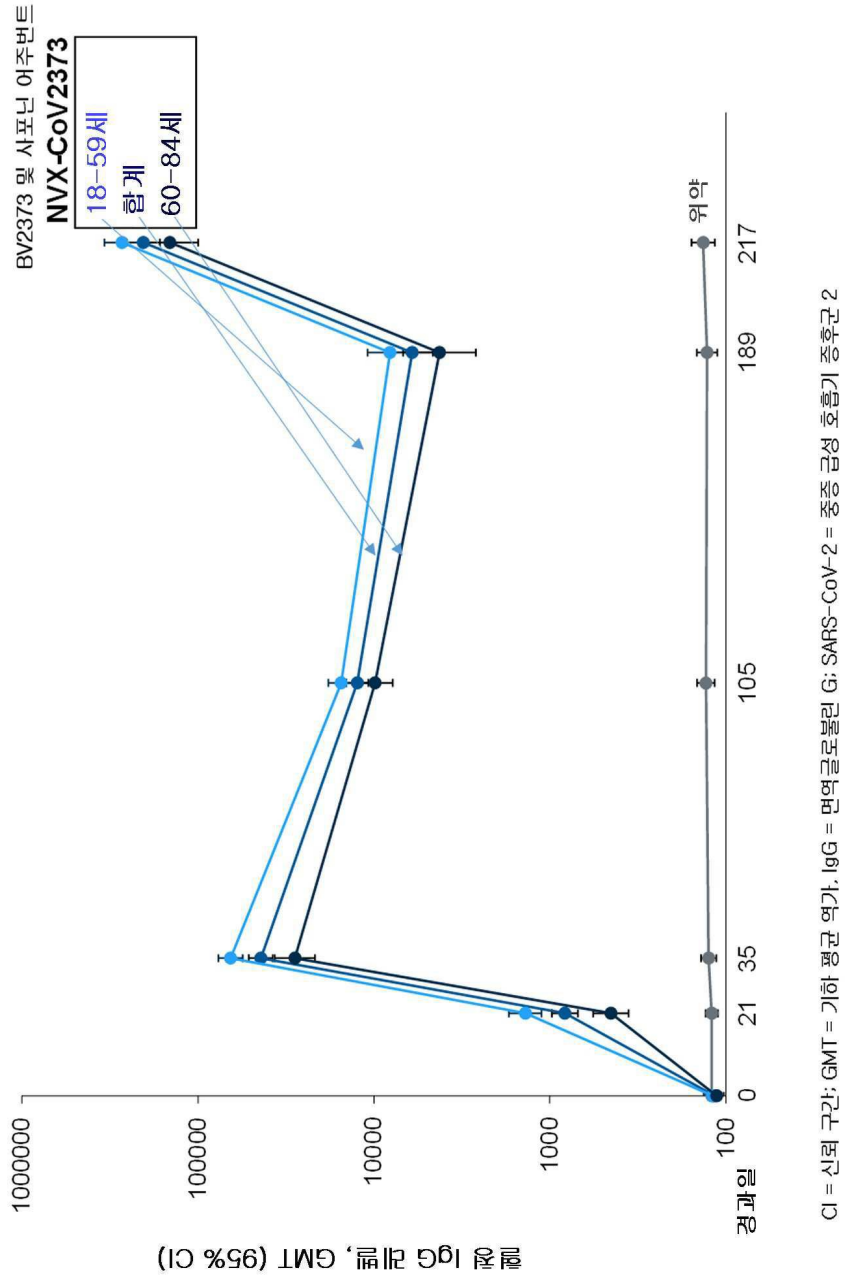
도면69a


모든 사건
등급 3+
국소 반응원성
% 빈도
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
용량
1
2
3
임의의 국소 사건
1
2
3
압통
1
2
3
통증
1
2
3
종창
1
2
3
홍반

도면69b

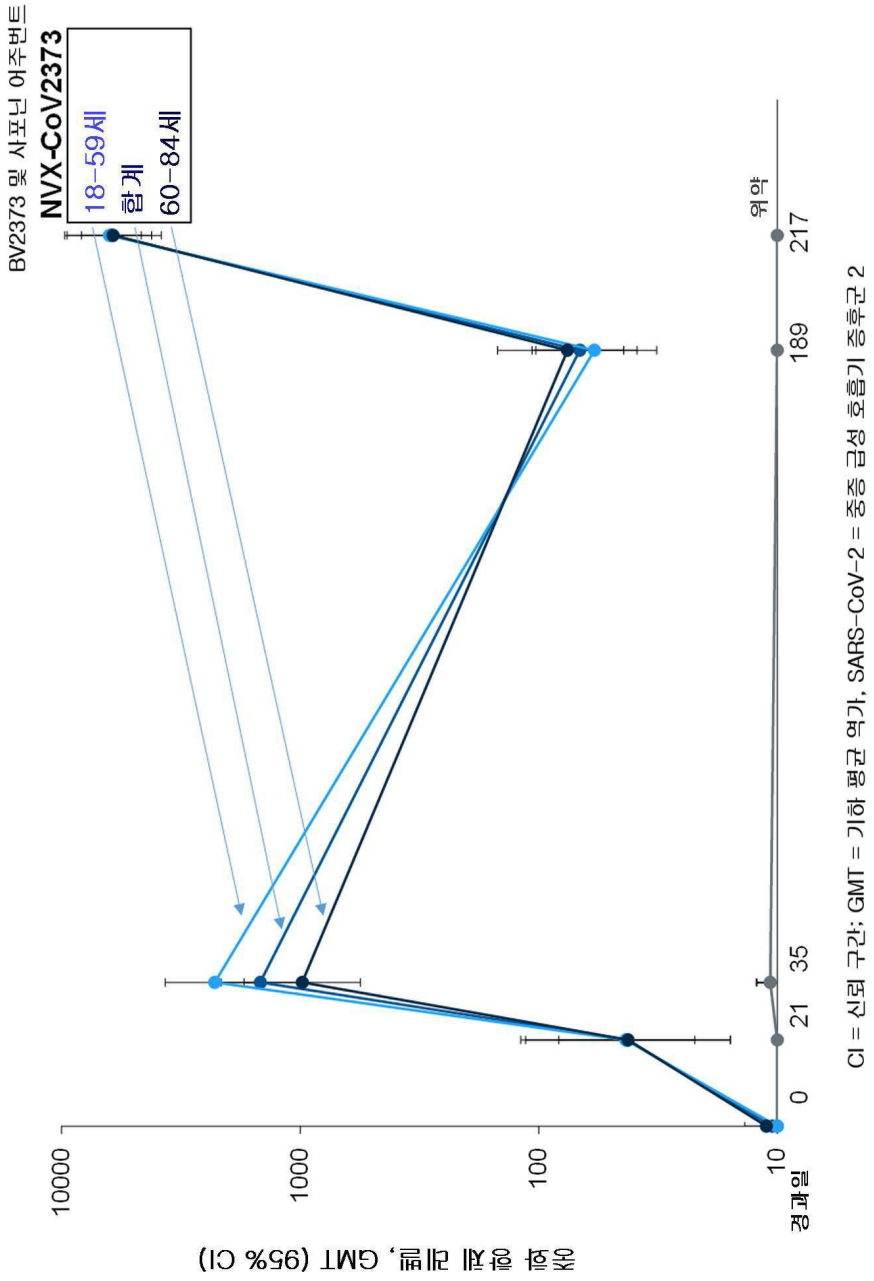

전신 반응원성
모든 사건
등급 3+
% 응답
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
용량
1 2 3
임의의 전신
사건
피로
두통
근육 통증
병감
관절 통증
구역질/구토
열

도면70



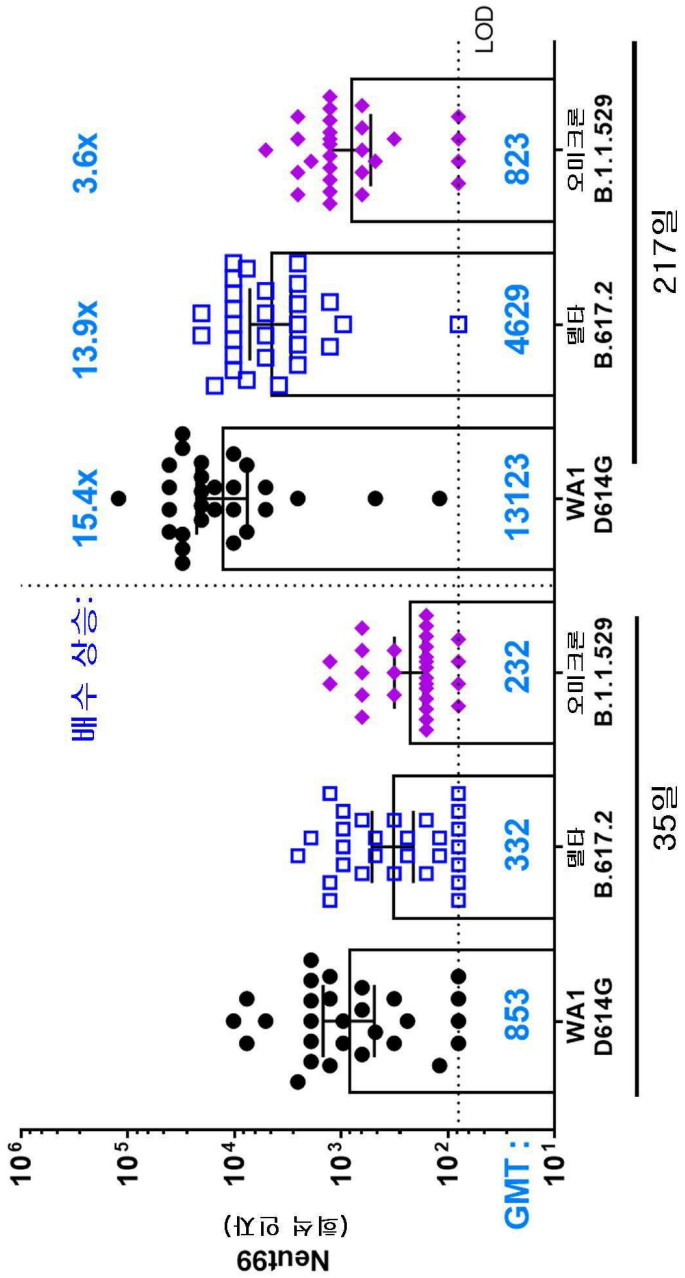
CI = 신뢰 구간; GMT = 기하 평균 역가, IgG = 면역글로불린 G; SARS-CoV-2 = 중증 급성 호흡기 증후군 2

도면71

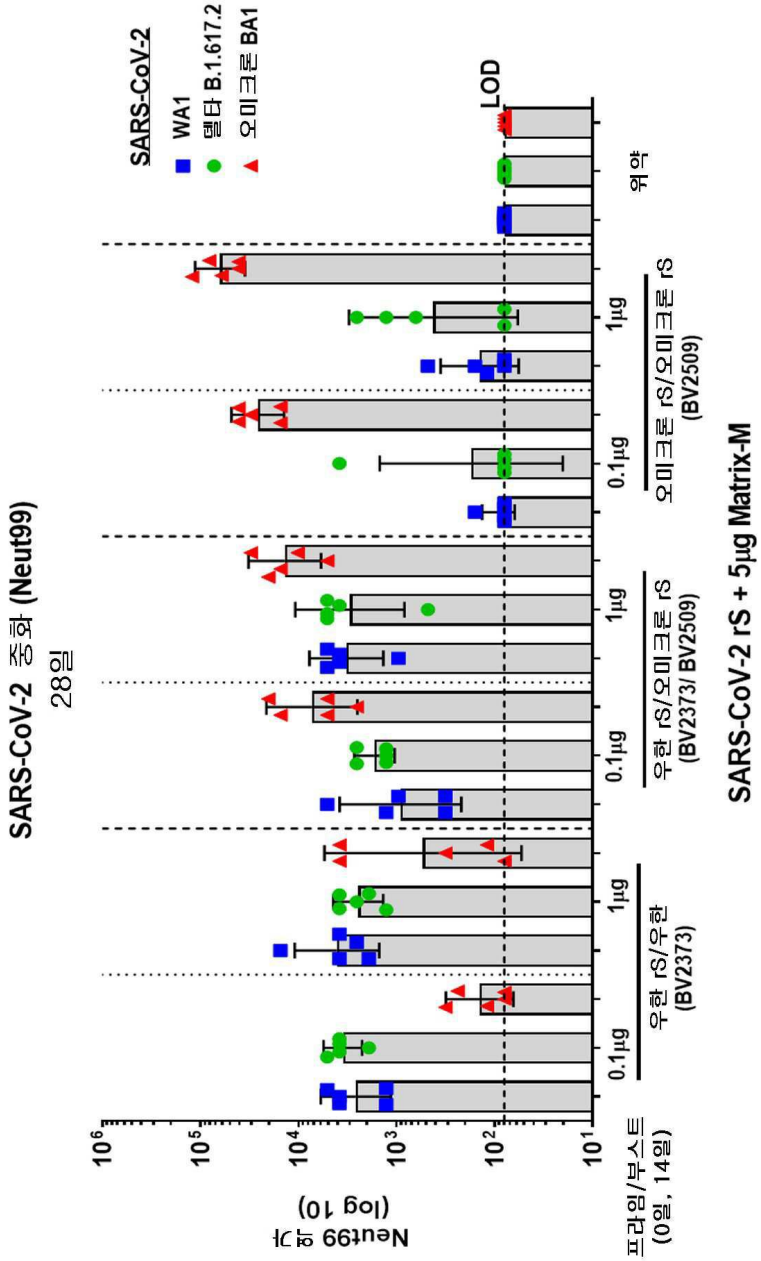


CI = 신뢰 구간; GMT = 기하 평균 역가, SARS-CoV-2 = 중증 급성 호흡기 증후군 2

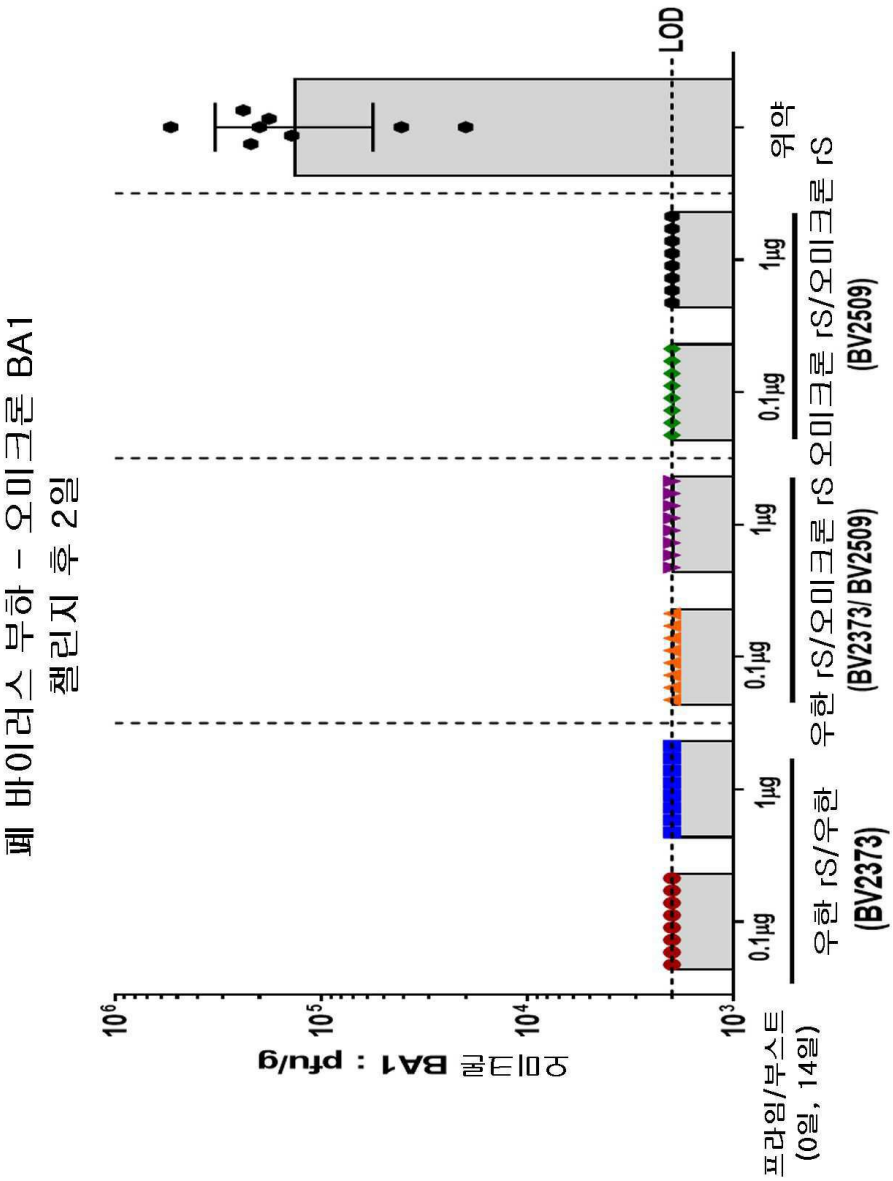
도면72


Neut99
(희석 인자)
GMT :
853
332
232
13123
4629
823
배수 상승:
15.4x
13.9x
3.6x
WA1
D614G
델타
B.617.2
오미크론
B.1.1.529
35일
217일
LOD

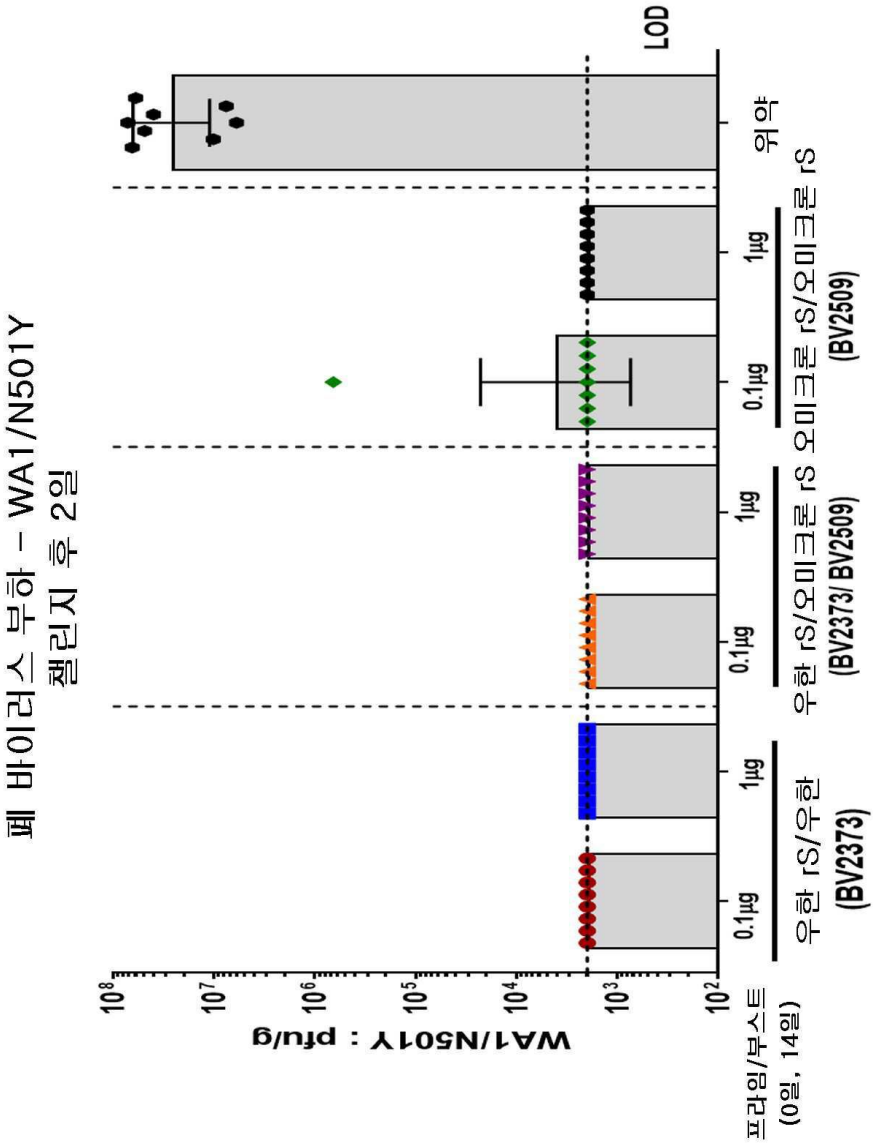
도면73


SARS-CoV-2 중화 (Neut99)
28일
SARS-CoV-2
WA1
델타 B.1.617.2
오미크론 BA1
LOD
Neut99 역가 (log 10)
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
위약
0.1μg
1μg
0.1μg
1μg
0.1μg
1μg
프라임/부스트 (0일, 14일)
우한 rS/우한 (BV2373)
우한 rS/오미크론 rS (BV2373/ BV2509)
오미크론 rS/오미크론 rS (BV2509)
SARS-CoV-2 rS + 5μg Matrix-M

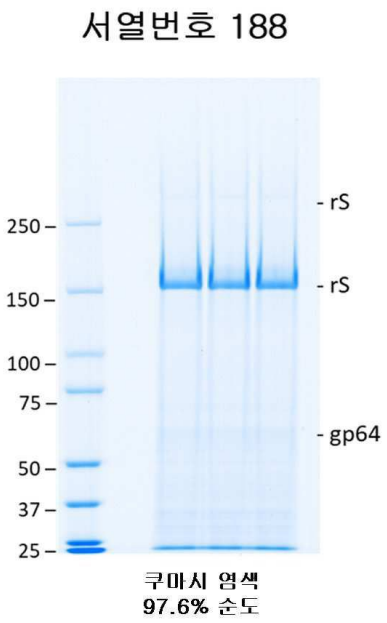
도면74a


폐 바이러스 부하 - 오미크론 BA1
챌린지 후 2일
오미크론 BA1 : pfu/g
10^6
10^5
10^4
10^3
LOD
위약
0.1μg
1μg
0.1μg
1μg
0.1μg
1μg
우한 rS/우한
(BV2373)
우한 rS/오미크론 rS
(BV2373/ BV2509)
오미크론 rS/오미크론 rS
(BV2509)
프라임/부스트
(0일, 14일)

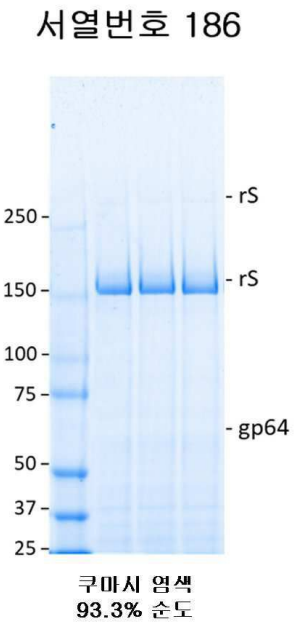
도면74b


폐 바이러스 부하 - WA1/N501Y
챌린지 후 2일
WA1/N501Y : pfu/g
LOD
위약
1μg
0.1μg
우한 rS/오미크론 rS 오미크론 rS/오미크론 rS
(BV2373/ BV2509)
(BV2509)
우한 rS/우한
(BV2373)
프라임/부스트
(0일, 14일)

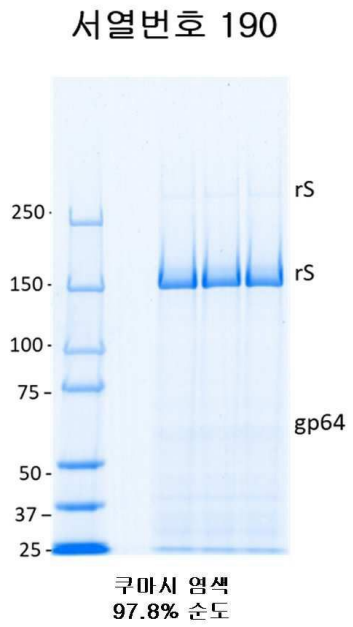
도면75a


서열번호 188
250
150
100
75
50
37
25
rS
rS
gp64
쿠마시 염색
97.6% 순도

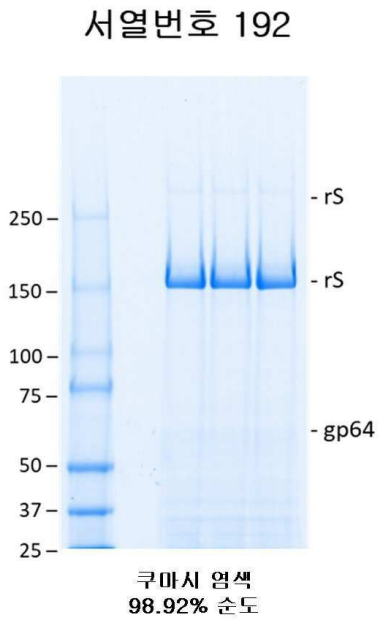
도면75b


서열번호 186
250
150
100
75
50
37
25
rS
rS
gp64
쿠마시 염색
93.3% 순도

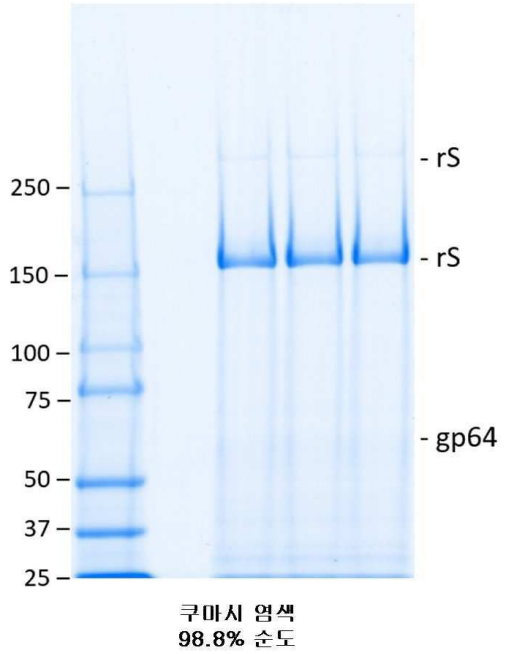
도면75c


서열번호 190
250
150
100
75
50
37
25
rS
rS
gp64
쿠마시 염색
97.8% 순도

도면75d

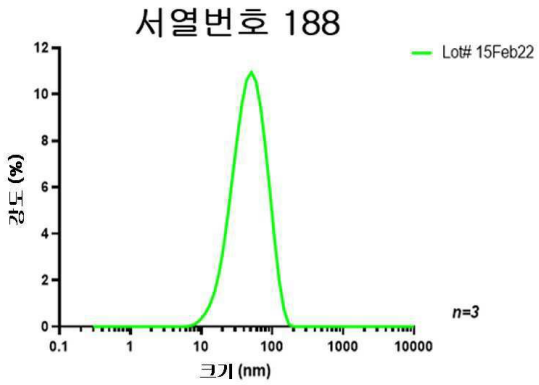

서열번호 192
250
150
100
75
50
37
25
- rS
- rS
- gp64
쿠마시 염색
98.92% 순도

도면75e

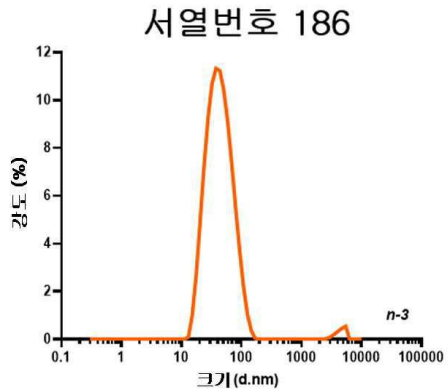


쿠마시 염색
98.8% 순도

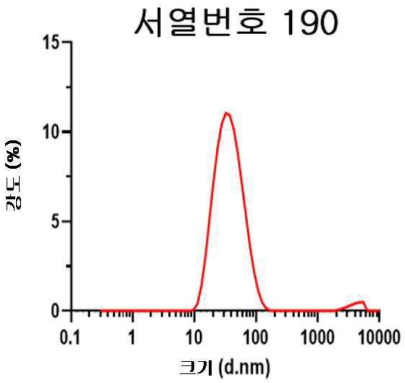
도면76a



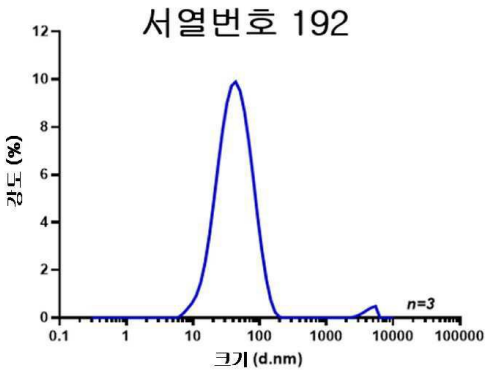
도면76b



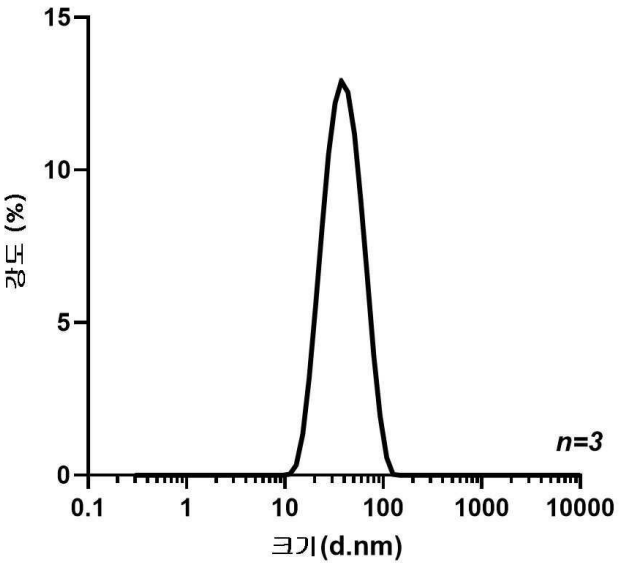
도면76c



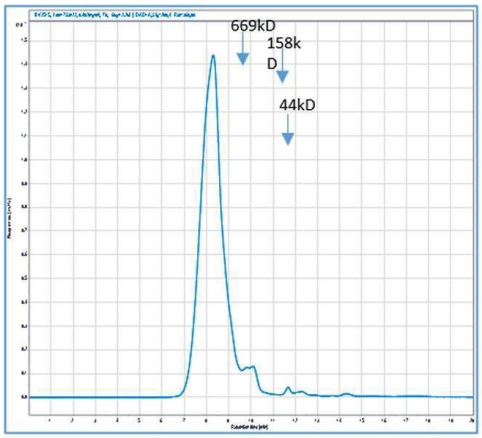
도면76d



도면76e

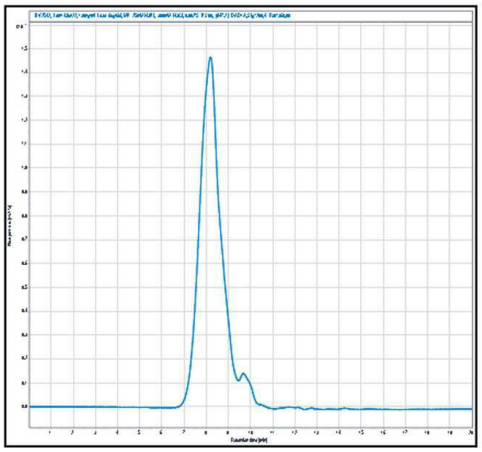


도면77a



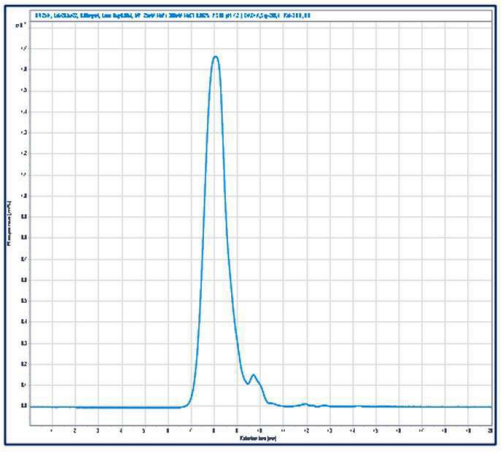
서열번호 188

도면77b



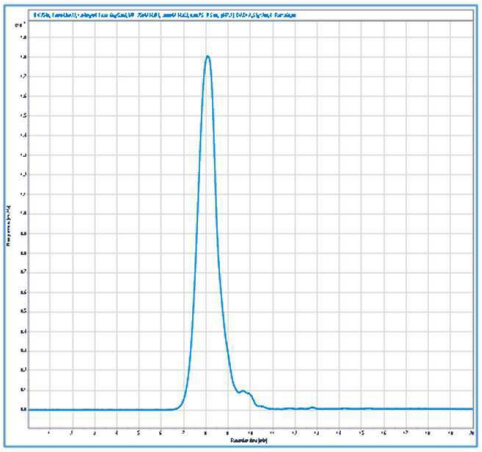
서열번호 186

도면77c



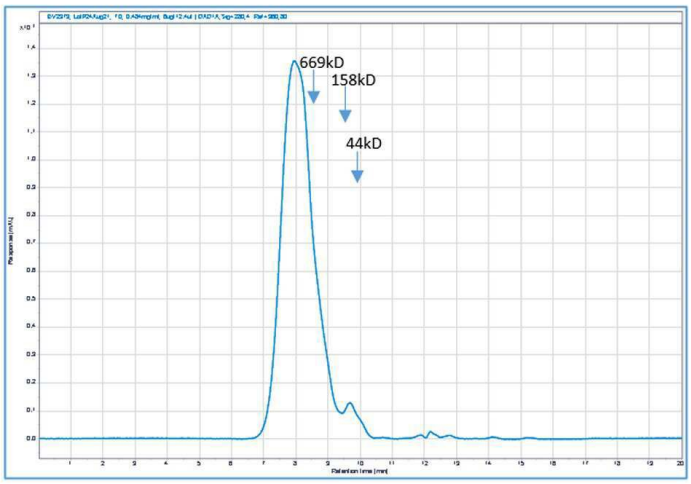
서열번호 190

도면77d



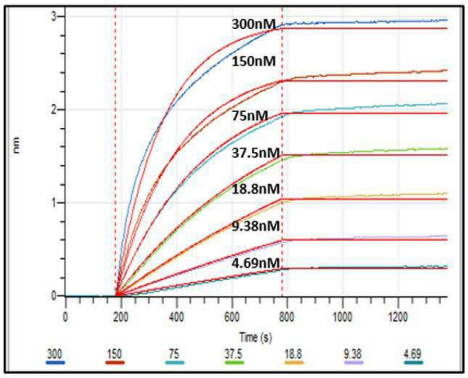
서열번호 192

도면77e



서열번호 87

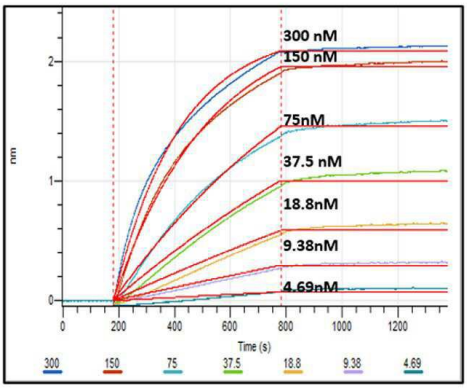
도면78a



hACE2 동역학:
ka (1/Ms) : 4.02E+04
kdis (1/s) : 1.48E-07
KD (M): 3.86E-12

서열번호 188

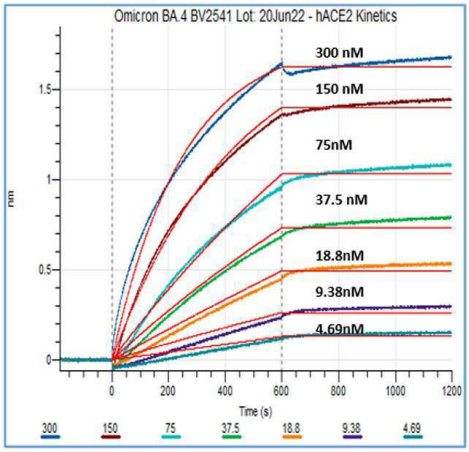
도면78b



hACE2 동역학:
Ka (1/Ms): 1.62E+04
Kdis (1/M): <1.0E-07
KD (M): 3.04E-12

서열번호 186

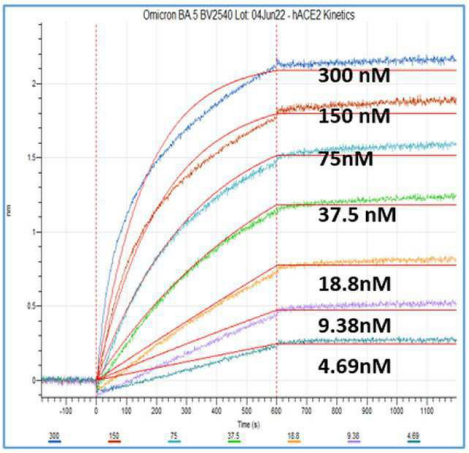
도면78c



hACE2 동역학:
Ka (1/Ms): 1.35E+04
Kdis (1/M): <1.0E-07
KD (M): 3.81E-12

서열번호 190

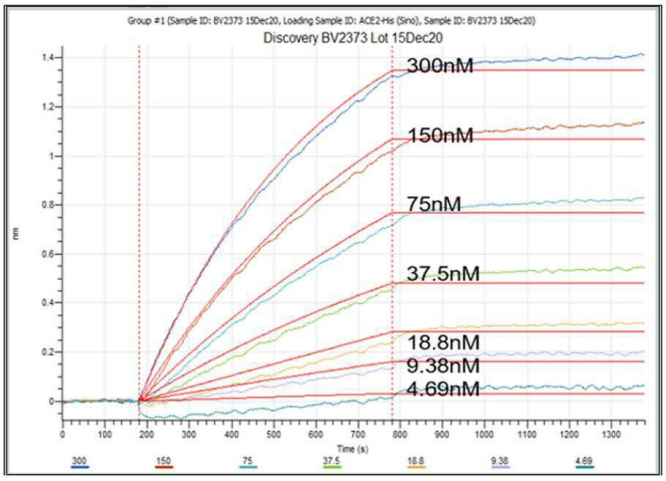
도면78d



hACE2 동역학:
Ka (1/Ms): 3.76E+04
Kdis (1/M): 1.70E-07
KD (M): 4.46E-12

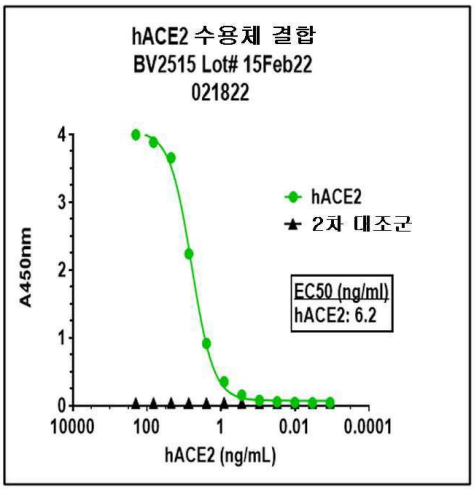
서열번호 192

도면78e



서열번호 87

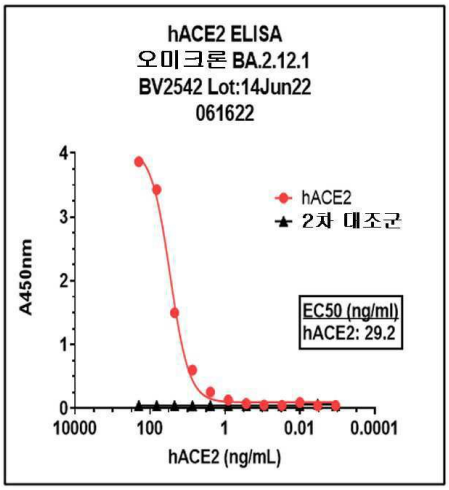
도면79a



서열번호 188

6.2 ng/ml

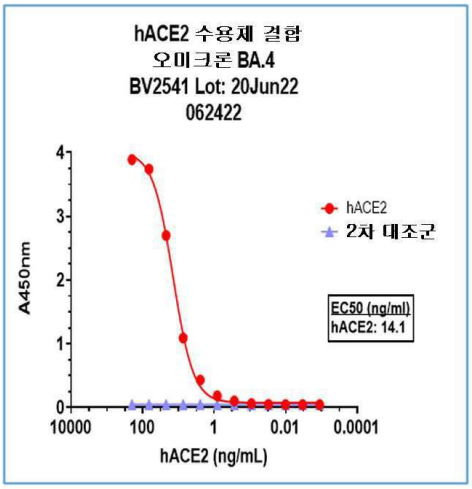
도면79b



서열번호 186

29 ng/ml

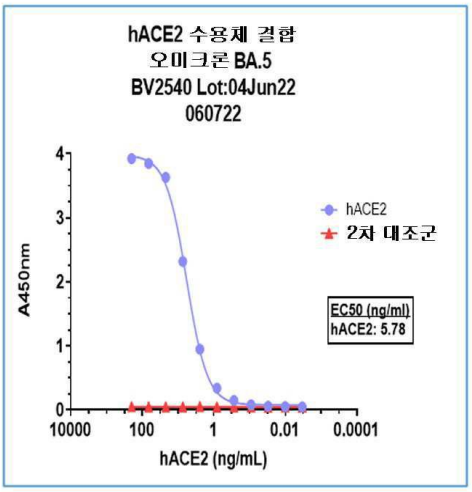
도면79c



14.1 ng/ml

서열번호 190

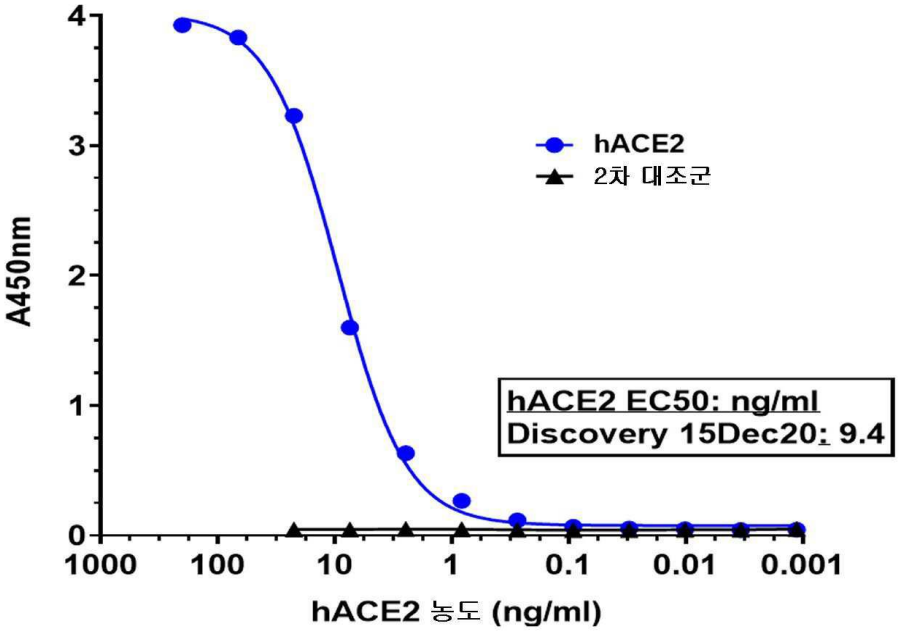
도면79d



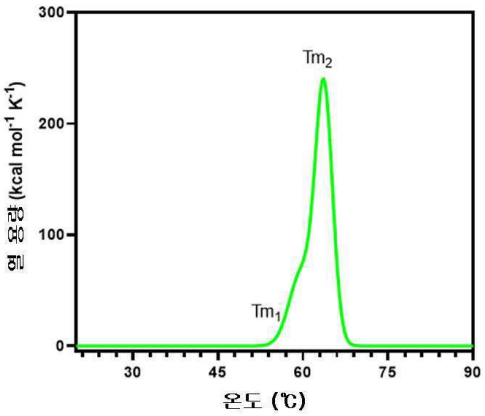
5.78ng/ml

서열번호 192

도면79e

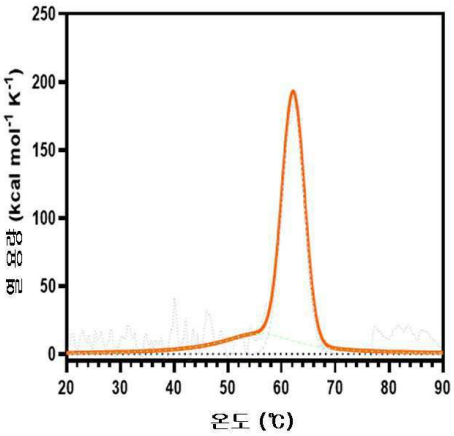


도면80a



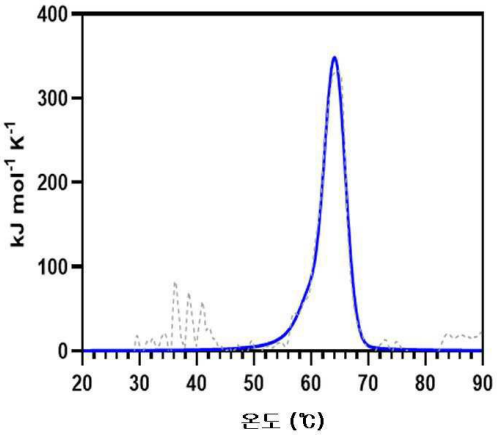
서열번호 188

도면80b



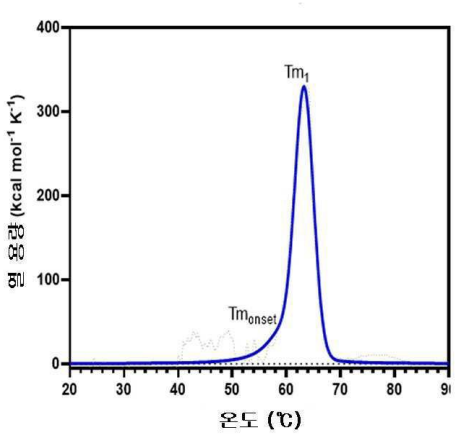
서열번호 186

도면80c



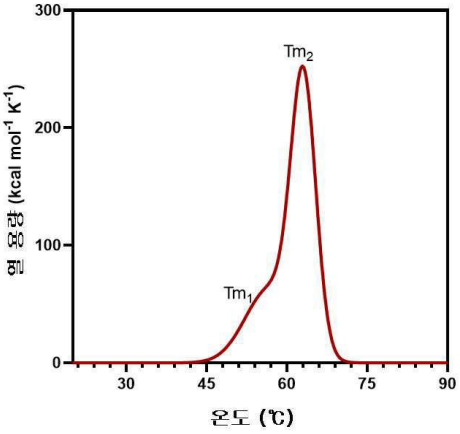
서열번호 190

도면80d

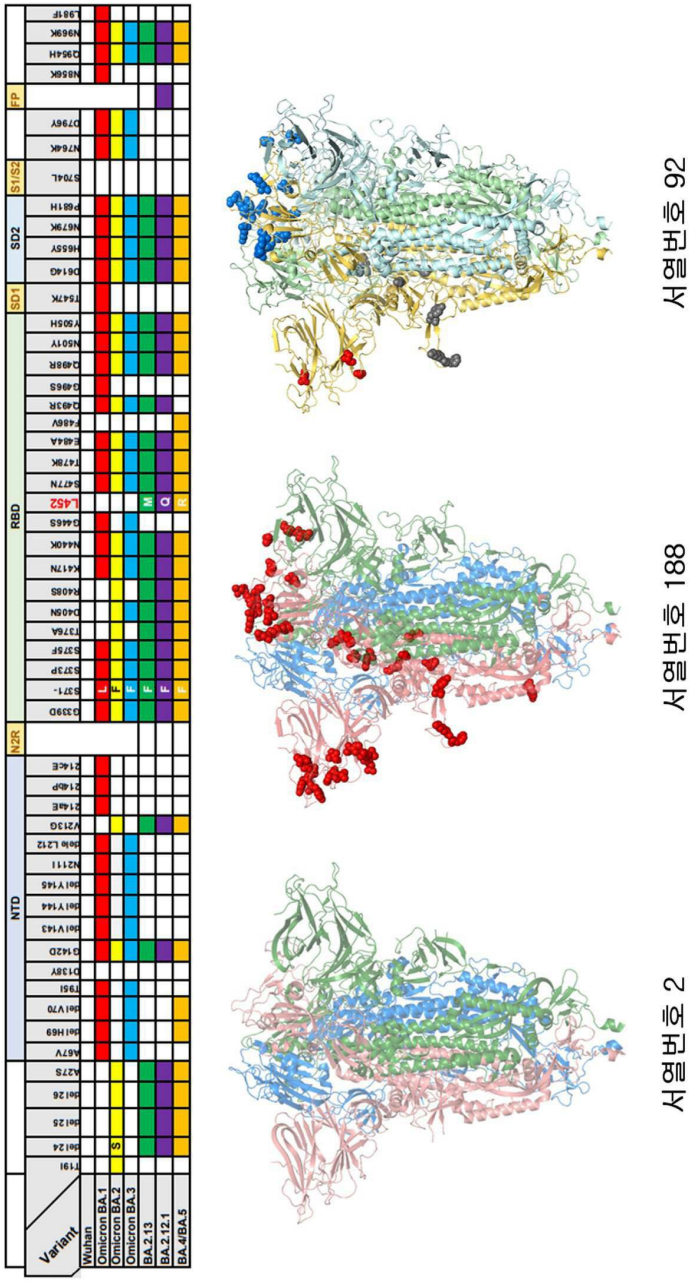


서열번호 192

도면80e



도면81


Variant
Wuhan
Omicron BA.1
Omicron BA.2
Omicron BA.3
BA.2.13
BA.2.12.1
BA.4/BA.5
NTD
RBD
SD1
SD2
S1/S2
FP
N2R
서열번호 2
서열번호 188
서열번호 92

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.