

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-511412
(P2024-511412A)

(43)公表日 令和6年3月13日(2024.3.13)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/50 (2006.01)	C 1 2 N	15/50	4 B 0 6 5	
A 6 1 K	39/215 (2006.01)	A 6 1 K	39/215	4 C 0 7 6	
A 6 1 K	39/39 (2006.01)	A 6 1 K	39/39	4 C 0 8 5	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	4 H 0 4 5	
A 6 1 P	31/14 (2006.01)	A 6 1 P	31/14		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全187頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2023-558130(P2023-558130)	(71)出願人	507301246
(86)(22)出願日	令和4年3月18日(2022.3.18)		ノバボックス、インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和5年11月21日(2023.11.21)		アメリカ合衆国、メリーランド州 2 0
(86)国際出願番号	PCT/US2022/020974		8 7 8 , ゲイザースバーグ、ファースト
(87)国際公開番号	WO2022/203963		フィールド ロード 2 1
(87)国際公開日	令和4年9月29日(2022.9.29)	(74)代理人	100079108
(31)優先権主張番号	63/164,487		弁理士 稲葉 良幸
(32)優先日	令和3年3月22日(2021.3.22)	(74)代理人	100109346
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 大貫 敏史
(31)優先権主張番号	63/176,825	(74)代理人	100117189
(32)優先日	令和3年4月19日(2021.4.19)		弁理士 江口 昭彦
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100134120
(31)優先権主張番号	63/177,059		弁理士 内藤 和彦
		(72)発明者	スミス、ゲイル
			アメリカ合衆国、メリーランド州 2 0
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 コロナウイルスワクチン製剤

(57)【要約】

ワクチンでの使用に適しているコロナウイルススパイク（S）タンパク質及びそれを含むナノ粒子が本明細書に開示される。ナノ粒子は、界面活性剤コアを取り囲み、及びそれに会合された病原体からの抗原を提示し、向上した安定性及び良好な免疫原性をもたらす。ワクチン及びナノ粒子を調製するための用量、製剤及び方法も開示される。

Fig. 1

MFVFLMLLLYSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFSSN
VWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIRGWIPGTTLDSTQSLIIVNN
ATNVVVKVCEPQCNDFPLGVYVHKNNKSWMESEPRVYSSANNCITFEVVSQPFMDLEG
KQCNFKNLREFVFNIDGYFKYSHKTPNLRDLPGQSALEPLVDLPIGNITRQTLAL
HRSYLPDSSSGWTAGAAAYVYVGYLQPRIFYLLKYNENGTTIDAVDCALDPLSETKCTLK
SFTVEKGIVQTSNFRVQPTESIVREPNTNLCPFGEVIRNATRFASVYAWNRRKRSNCVADYS
VLYNSASFSTFKCYGVSPITKINDLCFTNVYADSFVRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLP
DDFTGCVIAWNSNLDKVGNGYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIIYQAGSTPCNGVEGF
NCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELHAPATVCGPKKSTNLVKNKCNVNFNG
LIGTGVLTESNKKFLPFQGFGRDIADTTDAVRDPQTLIILDITPCSEGGVSVITPGTNTSNQ
VAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLIPTWRVYSTGNSVFPQTRAGCLIGAEHVNNNSYECDIPG
AGICASYQTQTNSPRRARSVASQILAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNTISTVTTEILPVS
MIKTSVDCTMYICGDSITECSNLLQYGSFCTQINRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYK
TPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTADAGFIKQYGDCLGDIAARDLCA
QKFNGLIVLPLITDEMAIQAQYTSALLAGTTTSGWTFGAGAAALQIPFAMQMAVRFNGIGVT
QNVLYENQKLLANQFNSAKKIQDSLSSTASALQKLDQVNVNQNAQALNTLVKQLSSNFGA
ISSVINDLSRLDKVEAEVQDRLITGRLOSQTYYVTQOLRAAEIRASANLAATKMSFCV
LGQSKRVDFCGKGYHLMSEFQSAHPGVVFLHVTYVPAQEKNTTAPAICHDKGAHFPRE
GVFVSNGTHWFTVQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVGIVNNNTVYDPLQPELDSFKEEL
DKYFKNHTSPDVLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWP
WYIWLGIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCCLKGCSCGSCCKFDEDDSEPVKLGVKLHYT

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

コロナウイルス（C o V）スパイク（S）糖タンパク質であって、

（i）不活性化フーリン切断部位を有する S 1 サブユニットであって、前記 S 1 サブユニットは、N 末端ドメイン（N T D）、受容体結合ドメイン（R B D）、サブドメイン 1 及び 2（S D 1 / 2）を含み、前記不活性化フーリン切断部位は、Q Q A Q のアミノ酸配列を有し；

前記 N T D は、

（a）アミノ酸 5 6、5 7、1 3 1、1 3 2、1 4 4、1 4 5、2 2 8、2 2 9、2 3 0、2 3 1、2 3 4、2 3 5、2 3 6、2 3 7、2 3 8、2 3 9、2 4 0 及びこれらの組み合わせからなる群から選択される 1 つ又は複数のアミノ酸の欠失；

（b）アミノ酸 1 3 2 の後の 1 個、2 個、3 個又は 4 個のアミノ酸の挿入；及び

（c）アミノ酸 5、6、7、1 3、5 1、5 3、5 6、5 7、6 2、6 3、6 7、8 2、1 2 5、1 2 9、1 3 1、1 3 2、1 3 3、1 3 9、1 4 3、1 4 4、1 4 5、1 7 7、2 0 0、2 0 1、2 0 2、2 0 9、2 2 9、2 3 3、2 4 0、2 4 5 及びこれらの組み合わせからなる群から選択される 1 つ又は複数のアミノ酸の変異からなる群から選択される 1 つ又は複数の改変を任意選択により含み；

前記 R B D は、アミノ酸 3 3 3、4 0 4、4 1 9、4 2 6、4 3 9、4 4 0、4 6 4、4 6 5、4 7 1、4 7 7、4 8 1、4 8 8 及びこれらの組み合わせからなる群から選択される 1 つ又は複数のアミノ酸の変異を任意選択により含み；

前記 S D 1 / 2 ドメインは、5 5 7、6 0 0、6 0 1、6 4 2、6 6 4、6 6 8 及びこれらの組み合わせからなる群から選択される 1 つ又は複数のアミノ酸の変異を任意選択により含む、S 1 サブユニットと；

（i i）S 2 サブユニットであって、アミノ酸 9 7 3 及び 9 7 4 は、プロリンであり、

前記 S 2 サブユニットは、

（a）6 7 6 ~ 6 8 5、6 7 6 ~ 7 0 2、7 0 2 ~ 7 1 1、7 7 5 ~ 7 9 3、8 0 6 ~ 8 1 5 及びこれらの組み合わせからの 1 つ又は複数のアミノ酸の欠失；

（b）6 8 8、7 0 3、8 4 6、8 7 5、9 3 7、9 6 9、1 0 1 4、1 0 5 8、1 1 0 5 及び 1 1 6 3 並びにこれらの組み合わせからなる群から選択される 1 つ又は複数のアミノ酸の変異；及び

（c）T M C T からの 1 つ又は複数のアミノ酸の欠失からなる群から選択される 1 つ又は複数の改変を任意選択により含む、S 2 サブユニットとを含み、

前記 C o V S 糖タンパク質のアミノ酸は、配列番号 2 の配列を有するポリペプチドに対して付番されている、コロナウイルス（C o V）スパイク（S）糖タンパク質。

【請求項 2】

アミノ酸 6 7 6 ~ 6 8 5 の欠失を含む、請求項 1 に記載のコロナウイルス S 糖タンパク質。

【請求項 3】

アミノ酸 7 0 2 ~ 7 1 1 の欠失を含む、請求項 1 に記載のコロナウイルス S 糖タンパク質。

【請求項 4】

アミノ酸 8 0 6 ~ 8 1 5 の欠失を含む、請求項 1 に記載のコロナウイルス S 糖タンパク質。

【請求項 5】

アミノ酸 7 7 5 ~ 7 9 3 の欠失を含む、請求項 1 に記載のコロナウイルス S 糖タンパク質。

【請求項 6】

前記 N T D のアミノ酸 1 ~ 2 9 2 の欠失を含む、請求項 1 に記載のコロナウイルス S 糖タンパク質。

10

20

30

40

50

【請求項 7】

前記膜貫通及び細胞質尾部（TMCCT）のアミノ酸 1201～1260 の欠失を含む、請求項 1 に記載のコロナウイルス S 糖タンパク質。

【請求項 8】

配列番号 85～89、105、106 及び 112～115、164～168 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか又はそれからなる、請求項 1 に記載のコロナウイルス S 糖タンパク質。

【請求項 9】

シグナルペプチドを含み、任意選択により、前記シグナルペプチドは、配列番号 5 又は配列番号 117 のアミノ酸配列を含む、請求項 1～8 のいずれか一項に記載のコロナウイルス S 糖タンパク質。

10

【請求項 10】

C 末端融合タンパク質を含む、請求項 1～9 のいずれか一項に記載のコロナウイルス S 糖タンパク質。

【請求項 11】

前記 C 末端融合タンパク質は、ヘキサヒスチジンタグである、請求項 10 に記載のコロナウイルス S 糖タンパク質。

【請求項 12】

前記 C 末端融合タンパク質は、フォルドンである、請求項 10 に記載のコロナウイルス S 糖タンパク質。

20

【請求項 13】

前記フォルドンは、配列番号 68 に対応するアミノ酸配列を有する、請求項 12 に記載のコロナウイルス S 糖タンパク質。

【請求項 14】

ΔHcal は、野生型 CoV S 糖タンパク質（配列番号 2）の ΔHcal よりも少なくとも 2 倍大きい、請求項 1～13 のいずれか一項に記載のコロナウイルス S 糖タンパク質。

【請求項 15】

前記 S2 サブユニット、NTD、RBD 及び SD1／2 のそれぞれは、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する前記 CoV S 糖タンパク質の対応するサブユニット又はドメインと 95% 同一である、請求項 1～14 のいずれか一項に記載のコロナウイルス S 糖タンパク質。

30

【請求項 16】

前記 S2 サブユニット、NTD、RBD 及び SD1／2 のそれぞれは、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する前記 CoV S 糖タンパク質の対応するサブユニット又はドメインと 97% 同一である、請求項 1～14 のいずれか一項に記載のコロナウイルス S 糖タンパク質。

【請求項 17】

前記 S2 サブユニット、NTD、RBD 及び SD1／2 のそれぞれは、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する前記 CoV S 糖タンパク質の対応するサブユニット又はドメインと 99% 同一である、請求項 1～14 のいずれか一項に記載のコロナウイルス S 糖タンパク質。

40

【請求項 18】

前記 S2 サブユニット、NTD、RBD 及び SD1／2 のそれぞれは、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する前記 CoV S 糖タンパク質の対応するサブユニット又はドメインと 99.5% 同一である、請求項 1～14 のいずれか一項に記載のコロナウイルス S 糖タンパク質。

【請求項 19】

請求項 1～18 のいずれか一項に記載の S 糖タンパク質をコードする単離された核酸。

【請求項 20】

50

請求項 19 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 21】

請求項 1 ～ 18 のいずれか一項に記載のコロナウイルス S 糖タンパク質を含むナノ粒子。

【請求項 22】

約 20 nm ～ 約 35 nm の Z - a v g 直径を有する、請求項 21 に記載のナノ粒子。

【請求項 23】

約 0.2 ～ 約 0.45 の多分散指数を有する、請求項 21 に記載のナノ粒子。

【請求項 24】

請求項 1 ～ 18 のいずれか一項に記載のコロナウイルス S 糖タンパク質を発現する細胞。

【請求項 25】

請求項 1 ～ 18 のいずれか一項に記載のコロナウイルス S 糖タンパク質及び薬学的に許容される緩衝液を含むワクチン組成物。

【請求項 26】

アジュバントを含む、請求項 25 に記載のワクチン組成物。

【請求項 27】

前記アジュバントは、少なくとも 2 つの i s c o m 粒子を含み、

第 1 の i s c o m 粒子は、キラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 A を含み、キラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 C を含まず；及び

第 2 の i s c o m 粒子は、キラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 C を含み、キラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 A を含まない、請求項 26 に記載のワクチン組成物。

【請求項 28】

キラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 A 及びキラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 C は、前記アジュバント中のキラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 A 及びキラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 C の重量の合計の約 85 重量% 及び約 15 重量% をそれぞれ占める、請求項 27 に記載のワクチン組成物。

【請求項 29】

キラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 A 及びキラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 C は、前記アジュバント中のキラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 A 及びキラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 C の重量の合計の約 92 重量% 及び約 8 重量% をそれぞれ占める、請求項 27 に記載のワクチン組成物。

【請求項 30】

前記アジュバントが、約 50 µg の用量で投与される、請求項 26 に記載のワクチン組成物。

【請求項 31】

対象における S A R S - C o V - 2 に対する免疫応答を刺激する方法であって、請求項 25 ～ 30 のいずれか一項に記載のワクチン組成物を投与することを含む方法。

【請求項 32】

前記対象は、0 日目に初回用量を投与され、及び 21 日目に追加用量を投与される、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記対象は、約 3 µg ～ 約 25 µg のコロナウイルス S 糖タンパク質を投与される、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 34】

前記対象は、約 5 µg のコロナウイルス S 糖タンパク質を投与される、請求項 31 に記

10

20

30

40

50

載の方法。

【請求項 3 5】

前記ワクチン組成物が、筋肉内投与される、請求項 3 1～3 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

単回用量の前記ワクチン組成物が、投与される、請求項 3 1、3 3、3 4 又は 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 7】

複数用量の前記ワクチン組成物が、投与される、請求項 3 1～3 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記ワクチン組成物が、インフルエンザ糖タンパク質と共に同時投与される、請求項 3 1～3 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 9】

免疫原性組成物であって、

(i) 請求項 1～1 8 のいずれか一項に記載のコロナウイルス S (C o V S) 糖タンパク質及び非イオン性界面活性剤コアを含むナノ粒子と；

(i i) 薬学的に許容される緩衝液と、

(i i i) サポニンアジュバントと

を含む免疫原性組成物。

【請求項 4 0】

約 3 μ g～約 2 5 μ g の C o V S 糖タンパク質を含む、請求項 3 9 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 4 1】

約 5 μ g の C o V S 糖タンパク質を含む、請求項 4 0 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 4 2】

前記サポニンアジュバントは、少なくとも 2 つの i s c o m 粒子を含み、

第 1 の i s c o m 粒子は、キラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 A を含み、キラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 C を含まず；及び

第 2 の i s c o m 粒子は、キラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 C を含み、キラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 A を含まない、請求項 3 9 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 4 3】

キラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 A は、前記アジュバント中のキラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 A 及びキラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 C の重量の合計の 5 0～9 6 重量%を占め、及びキラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 C は、前記合計の残りの部分をそれぞれ占める、請求項 4 2 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 4 4】

キラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 A 及びキラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 C は、前記アジュバント中のキラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 A 及びキラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 C の重量の合計の約 8 5 重量%及び約 1 5 重量%をそれぞれ占める、請求項 4 2 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 4 5】

約 5 0 μ g のサポニンアジュバントを含む、請求項 3 9 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 4 6】

前記非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート-2 0 (P S 2 0)、ポリソルベート-

10

20

30

40

50

40 (PS40)、ポリソルベート-60 (PS60)、ポリソルベート-65 (PS65) 及びポリソルベート-80 (PS80) からなる群から選択される、請求項39に記載の免疫原性組成物。

【請求項47】

対象におけるSARS-CoV-2又は異種SARS-CoV-2株に対する免疫応答を刺激する方法であって、請求項39～46のいずれか一項に記載の免疫原性組成物を投与することを含む方法。

【請求項48】

約3 µg～約25 µgのCoV S糖タンパク質が、投与される、請求項47に記載の方法。

【請求項49】

約5 µgのCoV S糖タンパク質が、投与される、請求項47又は48に記載の方法。

【請求項50】

前記サポニンアジュバントは、少なくとも2つのiscm粒子を含み、

第1のiscm粒子は、キラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分Aを含み、キラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分Cを含まず；及び

第2のiscm粒子は、キラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分Cを含み、キラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分Aを含まない、請求項47～49のいずれか一項に記載の方法。

【請求項51】

キラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分Aは、前記アジュバント中のキラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分A及びキラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分Cの重量の合計の50～96重量%を占め、及びキラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分Cは、前記合計の残りの部分をそれぞれ占める、請求項50に記載の方法。

【請求項52】

キラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分A及びキラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分Cは、前記アジュバント中のキラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分A及びキラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分Cの重量の合計の約85重量%及び約15重量%をそれぞれ占める、請求項50又は51に記載の方法。

【請求項53】

約50 µgの前記サポニンアジュバントを投与することを含む、請求項47～52のいずれか一項に記載の方法。

【請求項54】

前記非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート-20 (PS20)、ポリソルベート-40 (PS40)、ポリソルベート-60 (PS60)、ポリソルベート-65 (PS65) 及びポリソルベート-80 (PS80) からなる群から選択される、請求項47～53のいずれか一項に記載の方法。

【請求項55】

前記対象は、0日目に初回用量を投与され、及び21日目に追加用量を投与される、請求項47～54のいずれか一項に記載の方法。

【請求項56】

単回用量の前記免疫原性組成物が、投与される、請求項47～55のいずれか一項に記載の方法。

【請求項57】

請求項47に記載の免疫原性組成物と異なる第2の免疫原性組成物を投与することをさらに含む、請求項47～56のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 58】

前記第2の免疫原性組成物は、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質をコードするmRNA、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質をコードするプラスミドDNA、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質をコードするウイルスベクター又は不活性化SARS-CoV-2ウイルスを含む、請求項57に記載の方法。

【請求項 59】

前記異種SARS-CoV-2株は、B.1.1.7 SARS-CoV-2株、B.1.351 SARS-CoV-2株、P.1 SARS-CoV-2株、B.1.617.2 SARS-CoV-2株、B.1.525 SARS-CoV-2株、B.1.526 SARS-CoV-2株、B.1.617.1 SARS-CoV-2株、C.37 SARS-CoV-2株、B.1.621 SARS-CoV-2株及びCal.20C SARS-CoV-2株からなる群から選択される、請求項47～58のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 60】

コロナウイルス感染症-19 (COVID-19)を予防するための前記免疫原性組成物の有効性は、前記免疫原性組成物の投与後、最大で約2ヶ月、最大で約2.5ヶ月、最大で約3ヶ月、最大で約3.5ヶ月、最大で約4ヶ月、最大で約4.5ヶ月、最大で約5ヶ月、最大で約5.5ヶ月、最大で約6ヶ月、最大で約6.5ヶ月、最大で約7ヶ月、最大で約7.5ヶ月、最大で約8ヶ月、最大で約8.5ヶ月、最大で約9ヶ月、最大で約9.5ヶ月、最大で約10ヶ月、最大で約10.5ヶ月、最大で約11ヶ月、最大で約11.5ヶ月又は最大で約12ヶ月にわたり、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%又は約100%である、請求項47～59のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 61】

コロナウイルス感染症-19 (COVID-19)を予防するための前記免疫原性組成物の前記有効性は、前記免疫原性組成物の投与後、最大で約2ヶ月、最大で約2.5ヶ月、最大で約3ヶ月、最大で約3.5ヶ月、最大で約4ヶ月、最大で約4.5ヶ月、最大で約5ヶ月、最大で約5.5ヶ月、最大で約6ヶ月、最大で約6.5ヶ月、最大で約7ヶ月、最大で約7.5ヶ月、最大で約8ヶ月、最大で約8.5ヶ月、最大で約9ヶ月、最大で約9.5ヶ月、最大で約10ヶ月、最大で約10.5ヶ月、最大で約11ヶ月、最大で約11.5ヶ月又は最大で約12ヶ月にわたり、約50%～約99%、約50%～約95%、約50%～約90%、約50%～約85%、約50%～約80%、約60%～約99%、約60%～約95%、約60%～約90%、約60%～約85%、約60%～約80%、約40%～約99%、約40%～約95%、約40%～約90%、約40%～約85%、約40%～約80%、約40%～約75%、約40%～約70%、約40%～約65%、約40%～約55%又は約40%～約50%である、請求項47～60のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 62】

前記COVID-19は、軽度のCOVID-19である、請求項47～61のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 63】

前記COVID-19は、中程度のCOVID-19である、請求項47～61のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 64】

前記COVID-19は、重度のCOVID-19である、請求項47～61のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 65】

10

20

30

40

50

異種 S A R S - C o V - 2 株に対する防御免疫応答を誘導する方法であって、配列番号 87 のアミノ酸配列を有するコロナウイルス S (C o V S) 糖タンパク質及び非イオン性界面活性剤コアを含むナノ粒子、薬学的に許容される緩衝液、及び (i i i) サポニンアジュバントを対象に投与することを含み、前記異種 S A R S - C o V - 2 株は、配列番号 1 の S A R S - C o V - 2 糖タンパク質と比較して約 1 ～約 60 個の改変を有する S A R S - C o V - 2 S 糖タンパク質を有する、方法。

【請求項 66】

前記異種 S A R S - C o V - 2 株は、配列番号 1 の S A R S - C o V - 2 糖タンパク質と比較して約 1 ～約 20 個の改変、約 1 ～約 10 個の改変、約 10 ～約 20 個の改変、10 ～約 30 個の改変、約 10 ～約 40 個の改変、10 ～約 50 個の改変、10 ～約 60 個の改変、20 ～約 60 個の改変、20 ～約 50 個の改変、約 20 ～約 40 個の改変、約 5 ～約 15 個の改変又は約 5 ～約 10 個の改変を有する S A R S - C o V - 2 S 糖タンパク質を有する、請求項 65 に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

【0001】 本出願は、2021年3月22日に出願された米国仮特許出願第 63 / 164, 487 号；2021年4月19日に出願された米国仮特許出願第 63 / 176, 825 号；2021年4月20日に出願された米国仮特許出願第 63 / 177, 059 号；2021年6月2日に出願された米国仮特許出願第 63 / 195, 986 号；2021年11月17日に出願された米国仮特許出願第 63 / 280, 395 号；2021年12月16日に出願された米国仮特許出願第 63 / 290, 439 号；2021年12月21日に出願された米国仮特許出願第 63 / 292, 196 号；及び2021年12月23日に出願された米国仮特許出願第 63 / 293, 468 号に対する優先権を主張する。前述の出願のそれぞれの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。本出願は、国際公開第 2021 / 0154812 号及び米国特許第 10, 953, 089 号の全体も参照により本明細書に組み込む。

20

【0002】

電子的に提出されるテキストファイルの説明

【0002】 本明細書と共に電子的に提出されるテキストファイルの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる：配列表のコンピューター可読形式のコピー（ファイル名：NOVV_092_01WO_SeqList_ST25.txt、記録日：2022年3月9日、ファイルサイズ：974キロバイト）。

30

【0003】

分野

【0003】 本開示は、概して、免疫応答を刺激するのに有用である、天然に存在しないコロナウイルス (C o V) スパイク (S) ポリペプチド及びナノ粒子並びにそれを含むワクチンに関する。ナノ粒子は、任意選択により界面活性剤コアと会合され、典型的には組換えアプローチを使用して作製される抗原、例えば糖タンパク質抗原を提供する。ナノ粒子は、向上した安定性及び強化されたエピトープの提示を有する。本開示は、ナノ粒子を含む組成物、それを製造する方法及び免疫応答を刺激する方法も提供する。

40

【背景技術】

【0004】

発明の背景

【0004】 感染症は、世界中で依然として問題である。一部の病原体に対するワクチンの開発が進歩しているが、多くは、依然として人間の健康に対する脅威である。突発性急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (S A R S - C o V - 2) の大流行により、米国のみで 7, 900 万人超が感染し、少なくとも 960, 000 人が死亡している。世界中で死者数は、600 万人を超えた。S A R S - C o V - 2 コロナウイルスは、過去 17 年間に何

50

百人もの人々を死亡させた重症急性呼吸器症候群コロナウイルス（SARS-CoV）及び中東呼吸器症候群コロナウイルス（MERS-CoV）と同じウイルスの科に属している。SARS-CoV-2は、疾患COVID-19を引き起こす。世界保健機関は、2020年3月にCOVID-19を世界的パンデミックとして分類した。パンデミックは、依然として続いている。これを制御する取り組みは、SARS-CoV-2の変異体の出現によって妨げられている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

【0005】 SARS-CoV-2及びその変異体によって引き起こされる、生命を脅かす感染症の重症度を予防又は軽減するワクチンの開発が望まれている。しかしながら、病原体の非常に洗練された回避メカニズム及びワクチンの安定化が困難であることを理由として、ヒトワクチンの開発は、依然として課題である。好ましくは、ワクチンは、感染病原体をブロック又は中和する抗体を誘導する必要があり、さらに冷蔵できない環境を含む様々な環境で安定性を維持する必要がある。

10

【課題を解決するための手段】

【0006】

発明の概要

【0006】 本開示は、SARS-CoV-2及びSARS-CoV-2変異体に対する免疫応答を誘発するのに適している、天然に存在しないCoV Sポリペプチドを提供する。本開示は、糖タンパク質を含むナノ粒子及び免疫応答を刺激する方法も提供する。

20

【0007】

【0007】 本開示は、SARS-CoV-2及びその変異体、中東呼吸器症候群（MERS）並びに重症急性呼吸器症候群（SARS）を含む複数のコロナウイルスに対する免疫応答を誘発するのに適したCoV Sポリペプチドも提供する。

【0008】

【0008】 CoV Sポリペプチドであって、

（i）不活性化フーリン切断部位を有するS1サブユニットであって、前記S1サブユニットは、N末端ドメイン（NTD）、受容体結合ドメイン（RBD）、サブドメイン1及び2（SD1/2）を含み、不活性化フーリン切断部位は、QQAQのアミノ酸配列を有し；

30

NTDは、

（a）アミノ酸56、57、131、132、144、145、228、229、230、231、234、235、236、237、238、239、240及びこれらの組み合わせからなる群から選択される1つ又は複数のアミノ酸の欠失；

（b）アミノ酸132の後の1個、2個、3個又は4個のアミノ酸の挿入；及び

（c）アミノ酸5、6、7、13、39、51、53、54、56、57、62、63、67、82、125、129、131、132、133、139、143、144、145、177、200、201、202、209、229、233、240、245及びこれらの組み合わせからなる群から選択される1つ又は複数のアミノ酸の変異

40

からなる群から選択される1つ又は複数の改変を任意選択により含み；

RBDは、アミノ酸333、404、419、426、439、440、464、465、471、477、481、488及びこれらの組み合わせからなる群から選択される1つ又は複数のアミノ酸の変異を任意選択により含み；

SD1/2ドメインは、557、600、601、642、664、668及びこれらの組み合わせからなる群から選択される1つ又は複数のアミノ酸の変異を任意選択により含む、S1サブユニットと；

（ii）S2サブユニットであって、アミノ酸973及び974は、プロリンであり、

S2サブユニットは、

（a）676～685、676～702、702～711、775～793、806～8

50

15及びこれらの組み合わせからの1つ又は複数のアミノ酸の欠失；

(b) 688、703、846、875、937、969、973、974、1014、1058、1105及び1163並びにこれらの組み合わせからなる群から選択される1つ又は複数のアミノ酸の変異；及び

(c) TMC Tからの1つ又は複数のアミノ酸の欠失

からなる群から選択される1つ又は複数の改変を任意選択により含む、S2サブユニットと

を含み、CoV S糖タンパク質のアミノ酸は、配列番号2の配列を有するポリペプチドに対して付番されている、CoV Sポリペプチドが本明細書で提供される。

【0009】

【0009】 実施形態では、コロナウイルスS糖タンパク質は、アミノ酸676～685の欠失を含む。実施形態では、コロナウイルスS糖タンパク質は、アミノ酸702～711の欠失を含む。実施形態では、コロナウイルスS糖タンパク質は、アミノ酸806～815の欠失を含む。実施形態では、コロナウイルスS糖タンパク質は、アミノ酸775～793の欠失を含む。実施形態では、コロナウイルスS糖タンパク質は、NTDのアミノ酸1～292の欠失を含む。実施形態では、コロナウイルスS糖タンパク質は、TMC Tのアミノ酸1201～1260の欠失を含む。実施形態では、コロナウイルスS糖タンパク質は、配列番号85～89、105、106及び112～115、164～168からなる群から選択されるアミノ酸配列又は配列番号85～89、105、106及び112～115、164～168のいずれか1つに対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか又はそれからなる。実施形態では、コロナウイルスS糖タンパク質は、シグナルペプチドを含み、任意選択により、シグナルペプチドは、配列番号5又は配列番号117のアミノ酸配列を含む。実施形態では、コロナウイルスS糖タンパク質は、C末端融合タンパク質を含む。実施形態では、C末端融合タンパク質は、ヘキサヒスチジンタグである。実施形態では、C末端融合タンパク質は、フォルドンである。実施形態では、フォルドンは、配列番号68に対応するアミノ酸配列を有する。実施形態では、コロナウイルスS糖タンパク質は、野生型CoV S糖タンパク質（配列番号2）の $\Delta Hc a l$ よりも少なくとも2倍大きい $\Delta Hc a l$ を有する。実施形態では、配列番号2のアミノ酸配列を有するCoV S糖タンパク質の対応するサブユニット又はドメインと少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は少なくとも99.5%同一である、S2サブユニット、NTD、RBD及びSD1/2を有するコロナウイルスS糖タンパク質が本明細書に示される。

【0010】

【0010】 本明細書では、本明細書に記載のCoV S糖タンパク質をコードする単離された核酸が提供される。

【0011】

【0011】 本明細書では、本明細書に記載のCoV S糖タンパク質をコードする単離された核酸を含むベクターが提供される。

【0012】

【0012】 本明細書では、本明細書に記載のCoV S糖タンパク質を含むナノ粒子が提供される。実施形態では、ナノ粒子は、約20nm～約35nmのZ-avg直径を有する。実施形態では、ナノ粒子は、約0.2～約0.45の多分散指数を有する。本明細書では、本明細書に記載のCoV S糖タンパク質を発現する細胞が提供される。

【0013】

【0013】 本明細書では、本明細書に記載のCoV S糖タンパク質を含むナノ粒子を含むワクチン組成物が提供される。実施形態では、ワクチン組成物は、アジュバントを含

10

20

30

40

50

む。実施形態では、アジュバントは、少なくとも2つの *i s c o m* 粒子を含み、第1の *i s c o m* 粒子は、キラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja Saponaria Molina*) の画分Aを含み、キラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja Saponaria Molina*) の画分Cを含まず；及び第2の *i s c o m* 粒子は、キラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja Saponaria Molina*) の画分Cを含み、キラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja Saponaria Molina*) の画分Aを含まない。実施形態では、キラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja Saponaria Molina*) の画分A及びキラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja Saponaria Molina*) の画分Cは、アジュバント中のキラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja Saponaria Molina*) の画分A及びキラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja Saponaria Molina*) の画分Cの重量の合計の約85重量%及び約15重量%をそれぞれ占める。実施形態では、キラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja Saponaria Molina*) の画分A及びキラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja Saponaria Molina*) の画分Cは、アジュバント中のキラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja Saponaria Molina*) の画分A及びキラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja Saponaria Molina*) の画分Cの重量の合計の約92重量%及び約8重量%をそれぞれ占める。実施形態では、ワクチン組成物は、約50 μg のアジュバントを含む。

10

20

30

40

50

【0014】

【0014】 対象における *SARS-CoV-2* に対する免疫応答を刺激する方法であって、本明細書に記載のワクチン組成物を投与することを含む方法が本明細書に示される。実施形態では、対象は、0日目に初回用量を投与され、及び21日目に追加用量を投与される。実施形態では、対象は、約3 μg ～約25 μg のコロナウイルスS糖タンパク質を投与される。実施形態では、対象は、約5 μg のコロナウイルスS糖タンパク質を投与される。実施形態では、ワクチン組成物は、筋肉内投与される。実施形態では、単回用量のワクチン組成物が投与される。実施形態では、複数回用量のワクチン組成物が投与される。実施形態では、ワクチン組成物は、インフルエンザ糖タンパク質と同時に投与される。

【0015】

【0015】 本明細書では、(i) 本明細書に記載の *CoV S* 糖タンパク質を含むナノ粒子及び非イオン性界面活性剤コア；(ii) 薬学的に許容される緩衝液；及び(iii) サポニンアジュバントを含む免疫原性組成物が提供される。実施形態では、免疫原性組成物は、約3 μg ～約25 μg の *CoV S* 糖タンパク質を含む。実施形態では、免疫原性組成物は、約5 μg の *CoV S* 糖タンパク質を含む。実施形態では、サポニンアジュバントは、少なくとも2つの *i s c o m* 粒子を含み、第1の *i s c o m* 粒子は、キラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja Saponaria Molina*) の画分Aを含み、キラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja Saponaria Molina*) の画分Cを含まず；及び第2の *i s c o m* 粒子は、キラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja Saponaria Molina*) の画分Cを含み、キラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja Saponaria Molina*) の画分Aを含まない。実施形態では、キラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja Saponaria Molina*) の画分Aは、アジュバント中のキラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja Saponaria Molina*) の画分A及びキラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja Saponaria Molina*) の画分Cの重量の合計の50～96重量%を占め、及びキラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja Saponaria Molina*) の画分Cは、合計の残りの部分をそれぞれ占める。実施形態では、キラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja Saponaria Molina*) の画分A及びキラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja Saponaria Molina*) の画分Cは、アジュバント中のキラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja Saponaria Molina*) の画分A及びキラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja Saponaria Molina*) の画分Cの重量の合計の約85重量%及び約15重量%をそれぞれ占める。実施形態では、免疫原性組成物は、約50 μg のサポニンアジュバントを含む。実施形態では、非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート-20 (PS20)、ポリソルベート-40 (PS40)、ポリソルベート-60 (PS60)、ポリソルベート-65 (PS65) 及びポリソルベート-80 (PS80) からなる群から選択される。

【0016】

[0016] 実施形態では、対象におけるSARS-CoV-2又は異種SARS-CoV-2株に対する免疫応答を刺激する方法であって、本明細書に提供される免疫原性組成物又はワクチン組成物を投与することを含む方法が本明細書に提供される。実施形態では、方法は、約3 μ g～約25 μ gのCoV S糖タンパク質を投与することを含む。実施形態では、方法は、約5 μ gのCoV S糖タンパク質を投与することを含む。実施形態では、サポニンアジュバントは、少なくとも2つのisc om粒子を含み、第1のisc om粒子は、キラヤ・サポナリア・モリナ(Quillaja Saponaria Molina)の画分Aを含み、キラヤ・サポナリア・モリナ(Quillaja Saponaria Molina)の画分Cを含み、キラヤ・サポナリア・モリナ(Quillaja Saponaria Molina)の画分Aを含み、キラヤ・サポナリア・モリナ(Quillaja Saponaria Molina)の画分Cを含み、キラヤ・サポナリア・モリナ(Quillaja Saponaria Molina)の画分Aを含まない。実施形態では、キラヤ・サポナリア・モリナ(Quillaja Saponaria Molina)の画分Aは、アジュバント中のキラヤ・サポナリア・モリナ(Quillaja Saponaria Molina)の画分A及びキラヤ・サポナリア・モリナ(Quillaja Saponaria Molina)の画分Cの重量の合計の50～96重量%を占め、及びキラヤ・サポナリア・モリナ(Quillaja Saponaria Molina)の画分Cは、合計の残りの部分をそれぞれ占める。実施形態では、キラヤ・サポナリア・モリナ(Quillaja Saponaria Molina)の画分A及びキラヤ・サポナリア・モリナ(Quillaja Saponaria Molina)の画分Cは、キラヤ・サポナリア・モリナ(Quillaja Saponaria Molina)の画分A及びキラヤ・サポナリア(Quillaja Saponaria)の画分Cの重量の合計の約85重量%及び約15重量%をそれぞれ占める。実施形態では、方法は、約50 μ gのサポニンアジュバントを投与することを含む。実施形態では、非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート-20(PS20)、ポリソルベート-40(PS40)、ポリソルベート-60(PS60)、ポリソルベート-65(PS65)及びポリソルベート-80(PS80)からなる群から選択される。実施形態では、対象は、0日目に初回用量を投与され、及び21日目に追加用量を投与される。実施形態では、単回用量の免疫原性組成物が投与される。実施形態では、方法は、第2の免疫原性組成物を投与することを含む。実施形態では、第2の免疫原性組成物は、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質をコードするmRNA、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質をコードするプラスミドDNA、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質をコードするウイルスベクター又は不活性化SARS-CoV-2ウイルスを含む。実施形態では、異種SARS-CoV-2株は、B.1.1.7 SARS-CoV-2株、B.1.351 SARS-CoV-2株、P.1 SARS-CoV-2株、B.1.617.2 SARS-CoV-2株、B.1.525 SARS-CoV-2株、B.1.526 SARS-CoV-2株、B.1.617.1 SARS-CoV-2株、C.37 SARS-CoV-2株、B.1.621 SARS-CoV-2株及びCal.20C SARS-CoV-2株からなる群から選択される。実施形態では、コロナウイルス感染症-19(COVID-19)を予防するための免疫原性組成物の有効性は、免疫原性組成物の投与後、最大で約2ヶ月、最大で約2.5ヶ月、最大で約3ヶ月、最大で約3.5ヶ月、最大で約4ヶ月、最大で約4.5ヶ月、最大で約5ヶ月、最大で約5.5ヶ月、最大で約6ヶ月、最大で約6.5ヶ月、最大で約7ヶ月、最大で約7.5ヶ月、最大で約8ヶ月、最大で約8.5ヶ月、最大で約9ヶ月、最大で約9.5ヶ月、最大で約10ヶ月、最大で約10.5ヶ月、最大で約11ヶ月、最大で約11.5ヶ月又は最大で約12ヶ月にわたり、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%又は約100%である。実施形態では、コロナウイルス感染症-19(COVID-19)を予防するための免疫原性組成物の有効性は、免疫原性組成物の投与後、最大で約2ヶ月、最大で約2.5ヶ月、最大で約3ヶ月、最大で約3.5ヶ月、最

10

20

30

40

50

大で約4ヶ月、最大で約4.5ヶ月、最大で約5ヶ月、最大で約5.5ヶ月、最大で約6ヶ月、最大で約6.5ヶ月、最大で約7ヶ月、最大で約7.5ヶ月、最大で約8ヶ月、最大で約8.5ヶ月、最大で約9ヶ月、最大で約9.5ヶ月、最大で約10ヶ月、最大で約10.5ヶ月、最大で約11ヶ月、最大で約11.5ヶ月又は最大で約12ヶ月にわたり、約50%～約99%、約50%～約95%、約50%～約90%、約50%～約85%、約50%～約80%、約60%～約99%、約60%～約95%、約60%～約90%、約60%～約85%、約60%～約80%、約40%～約99%、約40%～約95%、約40%～約90%、約40%～約85%、約40%～約80%、約40%～約75%、約40%～約70%、約40%～約65%、約40%～約55%又は約40%～約50%である。実施形態では、COVID-19は、軽度のCOVID-19である。実施形態では、COVID-19は、中程度のCOVID-19である。実施形態では、COVID-19は、重度のCOVID-19である。実施形態では、異種SARS-CoV-2株に対する防御免疫応答を誘導する方法が本明細書に提供され、方法は、配列番号87のアミノ酸配列を有するコロナウイルスS(CoV S)糖タンパク質及び非イオン性界面活性剤コアを含むナノ粒子、薬学的に許容される緩衝液、及び(iii)サポニンアジュバントを対象に投与することを含み、異種SARS-CoV-2株は、配列番号1のSARS-CoV-2糖タンパク質と比較して約1～約60個の改変を有するSARS-CoV-2 S糖タンパク質を有する。実施形態では、異種SARS-CoV-2株は、配列番号1のSARS-CoV-2糖タンパク質と比較して約1～約20個の改変、約1～約10個の改変、約10～約20個の改変、10～約30個の改変、約10～約40個の改変、10～約50個の改変、10～約60個の改変、20～約60個の改変、20～約50個の改変、約20～約40個の改変、約5～約15個の改変又は約5～約10個の改変を有するSARS-CoV-2 S糖タンパク質を有する。

10

20

【0017】

図面の簡単な説明

【0017】 特許又は出願ファイルは、カラーで作成された少なくとも1つの図面を含む。カラー図面を含む本特許又は特許出願公開のコピーは、要求及び必要な手数料の支払いに応じて特許庁によって提供される。

【図面の簡単な説明】

【0018】

30

【図1】【0018】SARS-CoV-2スパイク(S)タンパク質の野生型アミノ酸配列(配列番号1)の概略図を示す。フーリン切断部位RRAR(配列番号6)は、太字でハイライトされ、シグナルペプチドには下線が引かれている。

【図2】【0019】SARS-CoV-2 Sポリペプチドの一次構造を示し、この一次構造は、不活性フーリン切断部位、融合ペプチドの欠失並びにK986P及びV987P変異を有する。ドメイン位置は、シグナルペプチドを含むSARS-CoV-2由来の野生型CoV Sポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号1)に対して付番されている。

【図3】【0020】不活性フーリン切断部位、アミノ酸819～828の融合ペプチドの欠失並びにK986P及びV987P変異を有する、BV2378CoV Sポリペプチドの一次構造を示す。ドメイン位置は、シグナルペプチドを含むSARS-CoV-2由来の野生型CoV Sポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号1)に対して付番されている。

40

【図4】【0021】CoV SポリペプチドBV2364、BV2365、BV2366、BV2367、BV2368、BV2369、BV2373、BV2374及びBV2375の精製を示す。データは、BV2365(配列番号4)及びQQAQ(配列番号7)のアミノ酸配列を有する不活性フーリン切断部位を有するBV2373(配列番号87)が一本鎖(S0)として発現されることを明らかにしている。対照的に、無傷のフーリン切断部位を含むCoV Sポリペプチド(例えば、BV2364、BV2366及びBV2374)は、切断産物S2の存在によって明らかのように切断されている。

【図5】【0022】CoV SポリペプチドBV2361、BV2365、BV2369、BV2365、BV2373及びBV2374がヒトアンジオテンシン変換酵素2前駆体

50

(hACE2)に結合することをバイオレイヤー干渉法によって示す。

【図6】[0023]SARS-CoV-2由来のBV2361が、MERS-CoV受容体であるジペプチジルペプチダーゼIV(DPP4)に結合せず、MERS-Sタンパク質がヒトアンジオテンシン変換酵素2前駆体(hACE2)に結合しないことをバイオレイヤー干渉法によって示す。

【図7】[0024]BV2361がhACE2に結合することを酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によって示す。

【図8】[0025]BV2373 CoV Sポリペプチドの一次構造及びフーリン切断部位、K986P及びV987Pに対する改変を示す。

【図9】[0026]野生型CoV Sポリペプチド並びにCoV SポリペプチドBV2365及びBV2373の精製を示す。

【図10】[0027]SARS-CoV-2スパイクタンパク質(EMB ID:21374)のcryoEM構造上に重ねられたBV2373CoV Sポリペプチドの低温電子顕微鏡法(cryoEM)による構造を示す。

【図11A】[0028]CoV SスパイクポリペプチドBV2365及びBV2373がhACE2に結合することを示す。バイオレイヤー干渉法は、BV2365(図11B)及びBV2373(図11C)が野生型CoV Sポリペプチド(図11A)と同様の解離速度でhACE2に結合することを明らかにする。

【図11B】[0028]CoV SスパイクポリペプチドBV2365がhACE2に結合することを示す。バイオレイヤー干渉法は、BV2365が野生型CoV Sポリペプチド(図11A)と同様の解離速度でhACE2に結合することを明らかにする。

【図11C】[0028]CoV SスパイクポリペプチドBV2373がhACE2に結合することを示す。バイオレイヤー干渉法は、BV2373が野生型CoV Sポリペプチド(図11A)と同様の解離速度でhACE2に結合することを明らかにする。

【図11D】[0028]CoV SスパイクポリペプチドBV2365及びBV2373がhACE2に結合することを示す。ELISAは、野生型CoV Sポリペプチド(図11D)及びBV2365(図11E)が同様の親和性でhACE2に結合するが、BV2373(図11F)がより高い親和性でhACE2に結合することを示す。

【図11E】[0028]CoV SスパイクポリペプチドBV2365及びBV2373がhACE2に結合することを示す。ELISAは、野生型CoV Sポリペプチド(図11D)及びBV2365(図11E)が同様の親和性でhACE2に結合するが、BV2373(図11F)がより高い親和性でhACE2に結合することを示す。

【図11F】[0028]CoV SスパイクポリペプチドBV2365及びBV2373がhACE2に結合することを示す。ELISAは、野生型CoV Sポリペプチド(図11D)及びBV2365(図11E)が同様の親和性でhACE2に結合するが、BV2373(図11F)がより高い親和性でhACE2に結合することを示す。

【図12A】[0029]CoV SポリペプチドBV2373のhACE2への結合に対する、温度、2回の凍結／解凍サイクル、酸化、攪拌及び極端なpHなどのストレス条件の影響を示す。

【図12B】[0029]CoV SポリペプチドBV2365のhACE2への結合に対する、温度、2回の凍結／解凍サイクル、酸化、攪拌及び極端なpHなどのストレス条件の影響を示す。

【図13A】[0030]画分A及び画分C iscomマトリックス(即ちMATRIX-M(商標))を伴う又は伴わない、0.1μg~10μgのBV2373の2回の投与でのマウスの免疫の13日後、21日後及び28日後の抗CoV SポリペプチドIgG力価を示す。

【図13B】[0030]画分A及び画分C iscomマトリックス(即ちMATRIX-M(商標))を伴う又は伴わない、0.1μg~10μgのBV2373の1回の投与でのマウスの免疫の13日後、21日後及び28日後の抗CoV SポリペプチドIgG力価を示す。

10

20

30

40

50

【図14】[0031]MATRIX-M（商標）を伴う又は伴わない、 $0.1\mu\text{g} \sim 10\mu\text{g}$ のBV2373の1回の投与又は2回の投与で免疫されたマウスにおけるhACE2の相互作用をブロックする抗体の誘導を示す。

【図15】[0032]MATRIX-M（商標）を伴う又は伴わない、 $0.1\mu\text{g} \sim 10\mu\text{g}$ のBV2373の1回の投与又は2回の投与で免疫されたマウスで検出されたウイルス中和抗体を示す。

【図16】[0033]MATRIX-M（商標）を伴う又は伴わないBV2373の単回投与又は14日間隔のBV2373の2回の投与のいずれかで免疫したAd／CMV／hACE2マウスの肺におけるウイルス量（SARS-CoV-2）を示す。

【図17A】[0034]BV2373による免疫後にマウスによって示された体重減少を示す。単回の $0.01\mu\text{g}$ 、 $0.1\mu\text{g}$ 、 $1\mu\text{g}$ 又は $10\mu\text{g}$ のBV2373+MATRIX-M（商標）による体重減少に対する免疫の効果を示す。

【図17B】[0034]BV2373による免疫後にマウスによって示された体重減少を示す。2回のBV2373（ $0.01\mu\text{g}$ 、 $0.1\mu\text{g}$ 、 $1\mu\text{g}$ ）+MATRIX-M（商標）の投与による体重減少に対する免疫の効果を示す。

【図17C】[0034]BV2373による免疫後にマウスによって示された体重減少を示す。MATRIX-M（商標）の存在下又は非存在下での2回のBV2373（ $10\mu\text{g}$ ）の投与による体重減少に対する免疫の効果を示す。

【図18A】[0035]SARS-CoV-2による感染の4日後のマウスの肺組織病理に対するBV2373の効果を示す。

【図18B】[0035]SARS-CoV-2による感染の7日後のマウスの肺組織病理に対するBV2373の効果を示す。

【図19】[0036]MATRIX-M（商標）の存在下においてBV2373で免疫したマウスと比較した、アジュバントの非存在下においてBV2373で免疫したマウスの脾臓におけるエキスピボ刺激後のIFN- γ 分泌細胞の数を示す。

【図20A】[0037]MATRIX-M（商標）の存在下又は非存在下においてBV2373で免疫したマウスの脾臓におけるサイトカイン分泌CD4+ T細胞の頻度を示す。IFN- γ 分泌CD4+ T細胞の頻度を示す。

【図20B】[0037]MATRIX-M（商標）の存在下又は非存在下においてBV2373で免疫したマウスの脾臓におけるサイトカイン分泌CD4+ T細胞の頻度を示す。TNF- α 分泌CD4+ T細胞の頻度を示す。

【図20C】[0037]MATRIX-M（商標）の存在下又は非存在下においてBV2373で免疫したマウスの脾臓におけるサイトカイン分泌CD4+ T細胞の頻度を示す。IL-2分泌CD4+ T細胞の頻度を示す。

【図20D】[0037]MATRIX-M（商標）の存在下又は非存在下においてBV2373で免疫したマウスの脾臓におけるサイトカイン分泌CD4+ T細胞の頻度を示す。IFN- γ 、TNF- α 及びIL-2から選択される2つのサイトカインを分泌するCD4+ T細胞の頻度を示す。

【図20E】[0037]MATRIX-M（商標）の存在下又は非存在下においてBV2373で免疫したマウスの脾臓におけるサイトカイン分泌CD4+ T細胞の頻度を示す。IFN- γ 、TNF- α 及びIL-2を発現するCD4+ T細胞の頻度を示す。

【図21A】[0038]MATRIX-M（商標）の存在下又は非存在下においてBV2373で免疫したマウスの脾臓におけるサイトカイン分泌CD8+ T細胞の頻度を示す。IFN- γ 分泌CD8+ T細胞の頻度を示す。

【図21B】[0038]MATRIX-M（商標）の存在下又は非存在下においてBV2373で免疫したマウスの脾臓におけるサイトカイン分泌CD8+ T細胞の頻度を示す。TNF- α 分泌CD8+ T細胞の頻度を示す。

【図21C】[0038]MATRIX-M（商標）の存在下又は非存在下においてBV2373で免疫したマウスの脾臓におけるサイトカイン分泌CD8+ T細胞の頻度を示す。IL-2分泌CD8+ T細胞の頻度を示す。

10

20

30

40

50

【図 2 1 D】[0038]MATRIX-M（商標）の存在下又は非存在下においてBV2373で免疫したマウスの脾臓におけるサイトカイン分泌CD8⁺ T細胞の頻度を示す。IFN- γ 、TNF- α 及びIL-2から選択される2つのサイトカインを分泌するCD8⁺ T細胞の頻度を示す。

【図 2 1 E】[0038]MATRIX-M（商標）の存在下又は非存在下においてBV2373で免疫したマウスの脾臓におけるサイトカイン分泌CD8⁺ T細胞の頻度を示す。IFN- γ 、TNF- α 及びIL-2を発現するCD8⁺ T細胞の頻度を示す。

【図 2 2】[0039]MATRIX-M（商標）の存在下又は非存在下においてBV2373で免疫したマウスの脾臓において、IFN- γ 、TNF- α 及びIL-2から選択される1つ（単一）、2つ（二重）又は3つ（三重）のサイトカインを発現するCD4⁺又はCD8⁺細胞の頻度を例示する。

【図 2 3 A】[0040]CD4⁺ T細胞からの2型サイトカイン分泌に対する、MATRIX-M（商標）の存在下又は非存在下でのBV2373による免疫の効果を例示する。IL-4分泌細胞の頻度を示す。

【図 2 3 B】[0040]CD4⁺ T細胞からの2型サイトカイン分泌に対する、MATRIX-M（商標）の存在下又は非存在下でのBV2373による免疫の効果を例示する。IL-5 CD4⁺分泌細胞の頻度を示す。

【図 2 3 C】[0040]CD4⁺ T細胞からの2型サイトカイン分泌に対する、MATRIX-M（商標）の存在下又は非存在下でのBV2373による免疫の効果を例示する。IL-4分泌CD4⁺ T細胞に対するIFN- γ 分泌CD4⁺ T細胞の比率を示す。

【図 2 4 A】[0041]CD4⁺ T濾胞ヘルパー細胞（TFH）の存在を評価することにより、胚中心形成に対するMATRIX-M（商標）の存在下又は非存在下でのBV2373によるマウス免疫の効果を例示する。脾臓におけるCD4⁺ T濾胞ヘルパー細胞の頻度を示す。

【図 2 4 B】[0041]CD4⁺ T濾胞ヘルパー細胞（TFH）の存在を評価することにより、胚中心形成に対するMATRIX-M（商標）の存在下又は非存在下でのBV2373によるマウス免疫の効果を例示する。CD4⁺ T濾胞ヘルパー細胞の表現型（例えば、CD4⁺ CXCR5⁺ PD-1⁺）を示す。

【図 2 5 A】[0042]胚中心（GC）B細胞の存在を評価することにより、胚中心形成に対するMATRIX-M（商標）の存在下又は非存在下でのBV2373によるマウス免疫の効果を示す。脾臓におけるGC B細胞の頻度を示す。

【図 2 5 B】[0042]胚中心（GC）B細胞の存在を評価することにより、胚中心形成に対するMATRIX-M（商標）の存在下又は非存在下でのBV2373によるマウス免疫の効果を示す。CD4⁺ T濾胞ヘルパー細胞の表現型（例えば、CD19⁺ GL7⁺ CD-95⁺）を明らかにする。

【図 2 6 A】[0043]アヌビスヒヒにおける抗体応答に対する、MATRIX-M（商標）の存在下又は非存在下でのBV2373による免疫の効果を示す。BV2373による免疫後のヒヒにおける抗SARS-CoV-2 SポリペプチドIgG力価を示す。

【図 2 6 B】[0043]アヌビスヒヒにおける抗体応答に対する、MATRIX-M（商標）の存在下又は非存在下でのBV2373による免疫の効果を示す。MATRIX-M（商標）の存在下における、5 μ g又は25 μ gのBV2373での単回免疫後のヒヒにおけるhACE2受容体ブロック抗体の存在を示す。

【図 2 6 C】[0043]アヌビスヒヒにおける抗体応答に対する、MATRIX-M（商標）の存在下又は非存在下でのBV2373による免疫の効果を示す。BV2373及びMATRIX-M（商標）での単回免疫後のウイルス中和抗体力価を示す。

【図 2 7】[0044]BV2373による免疫後のアヌビスヒヒにおける抗SARS-CoV-2 SポリペプチドIgGと中和抗体力価との間の有意な相関を示す。

【図 2 8】[0045]MATRIX-M（商標）の存在下又は非存在下においてBV2373で免疫したアヌビスヒヒの末梢血単核細胞（PBMC）におけるIFN- γ 分泌細胞の頻度を示す。

10

20

30

40

50

【図 2 9 A】[0046] MATRIX-M (商標) の存在下又は非存在下において B V 2 3 7 3 で免疫したアヌビスヒヒの P B M C におけるサイトカイン分泌 C D 4 + T 細胞の頻度を示す。I F N - γ 分泌 C D 4 + T 細胞の頻度を示す。

【図 2 9 B】[0046] MATRIX-M (商標) の存在下又は非存在下において B V 2 3 7 3 で免疫したアヌビスヒヒの P B M C におけるサイトカイン分泌 C D 4 + T 細胞の頻度を示す。I L - 2 分泌 C D 4 + T 細胞の頻度を示す。

【図 2 9 C】[0046] MATRIX-M (商標) の存在下又は非存在下において B V 2 3 7 3 で免疫したアヌビスヒヒの P B M C におけるサイトカイン分泌 C D 4 + T 細胞の頻度を示す。T N F - α 分泌 C D 4 + T 細胞の頻度を示す。

【図 2 9 D】[0046] MATRIX-M (商標) の存在下又は非存在下において B V 2 3 7 3 で免疫したアヌビスヒヒの P B M C におけるサイトカイン分泌 C D 4 + T 細胞の頻度を示す。I F N - γ 、T N F - α 及び I L - 2 から選択される 2 つのサイトカインを分泌する C D 4 + T 細胞の頻度を示す。

10

【図 2 9 E】[0046] MATRIX-M (商標) の存在下又は非存在下において B V 2 3 7 3 で免疫したアヌビスヒヒの P B M C におけるサイトカイン分泌 C D 4 + T 細胞の頻度を示す。I F N - γ 、T N F - α 及び I L - 2 を発現する C D 4 + T 細胞の頻度を示す。

【図 3 0】[0047] コロナウイルススパイク (S) タンパク質 (配列番号 1 0 9) (B V 2 3 8 4) の概略図を示す。フーリン切断部位 G S A S (配列番号 9 7) には 1 本の下線が引かれ、K 9 8 6 P 及び V 9 8 7 P 変異には 2 本の下線が引かれている。

【図 3 1】[0048] コロナウイルススパイク (S) タンパク質 (配列番号 8 6) (B V 2 3 7 3) の概略図を示す。フーリン切断部位 Q Q A Q (配列番号 7) には 1 本の下線が引かれ、K 9 8 6 P 及び V 9 8 7 P 変異には 2 本の下線が引かれている。

20

【図 3 2】[0049] C o V S ポリペプチド B V 2 3 7 3 (配列番号 8 7) 及び B V 2 3 8 4 (配列番号 1 0 9) の精製を示す。

【図 3 3】[0050] 精製後の B V 2 3 8 4 (配列番号 1 0 9) 純度の走査デンストメトリープロットを示す。

【図 3 4】[0051] 精製後の B V 2 3 7 3 (配列番号 8 7) 純度の走査デンストメトリープロットを示す。

【図 3 5 A】[0052] B V 2 3 7 3 及び MATRIX-M (商標) の投与に应答した抗 S 抗体の誘導を例示する。カニクイザル (Cynomolgus macaques) に 2 . 5 μ g、5 μ g 又は 2 5 μ g の B V 2 3 7 3 を 2 5 μ g 又は 5 0 μ g の MATRIX-M (商標) アジュバントと共に 1 回又は 2 回 (0 日目及び 2 1 日目) 投与した。対照には、B V 2 3 7 3 も MATRIX-M (商標) も投与しなかった。2 1 日目及び 3 3 日目に抗体を測定した。

30

【図 3 5 B】[0052] B V 2 3 7 3 及び MATRIX-M (商標) の投与に应答した中和抗体の誘導を例示する。カニクイザル (Cynomolgus macaques) に 2 . 5 μ g、5 μ g 又は 2 5 μ g の B V 2 3 7 3 を 2 5 μ g 又は 5 0 μ g の MATRIX-M (商標) アジュバントと共に 1 回又は 2 回 (0 日目及び 2 1 日目) 投与した。対照には、B V 2 3 7 3 も MATRIX-M (商標) も投与しなかった。2 1 日目及び 3 3 日目に抗体を測定した。

【図 3 6 A】[0053] カニクイザル (Cynomolgus macaques) における気管支肺胞洗浄 (B A L) で評価された、本明細書に開示されるワクチン製剤による S A R S - C o V - 2 ウイルス複製の減少を示す。示されているように、カニクイザル (Cynomolgus macaques) に B V 2 3 7 3 及び MATRIX-M (商標) を投与した。対象は、0 日目に免疫し、2 回投与群では 0 日目及び 2 1 日目に免疫した。対象動物を 3 7 日目に 1×10^4 p f u の S A R S - C o V - 2 ウイルスに曝露した。ウイルス RNA (存在する全 RNA に対応する) レベルを感染性ウイルス (d 2 p i 及び d 4 p i) の曝露の 2 日後及び 4 日後に気管支洗浄 (B A L) で評価した。ほとんどの対象は、ウイルス RNA を示さなかった。2 日目に一部の対象で少量の RNA が測定された。4 日目までに、最低用量 2 . 5 μ g の 2 匹の対象を除いて、RNA は、測定されなかった。サブゲノム RNA は、最低用量で再び、1 匹の対象を除いて、2 日目にも 4 日目にも検出されなかった。

40

【図 3 6 B】[0053] カニクイザル (Cynomolgus macaques) における気管支肺胞洗

50

浄（BAL）で評価された、本明細書に開示されるワクチン製剤によるSARS-CoV-2ウイルス複製の減少を示す。示されているように、カニクイザル（*Cynomolgus macaques*）にBV2373及びMATRIX-M（商標）を投与した。対象は、0日目に免疫し、2回投与群では0日目及び21日目に免疫した。対象動物を37日目に 1×10^4 pfuのSARS-CoV-2ウイルスに曝露した。ウイルスサブゲノムRNA（複製するウイルスに対応する）レベルを感染性ウイルス（dpi及びdpi）の曝露の2日後及び4日後に気管支洗浄（BAL）で評価した。ほとんどの対象は、ウイルスRNAを示さなかった。2日目に一部の対象で少量のRNAが測定された。4日目までに、最低用量 $2.5 \mu\text{g}$ の2匹の対象を除いて、RNAは、測定されなかった。サブゲノムRNAは、最低用量で再び、1匹の対象を除いて、2日目にも4日目にも検出されなかった。

10

【図37A】[0054]カニクイザル（*Cynomolgus macaques*）の鼻スワブで評価された、本明細書に開示されるワクチン製剤によるSARS-CoV-2ウイルス複製の減少を例示する。示されているように、カニクイザル（*Cynomolgus macaques*）にBV2373をMATRIX-M（商標）と共に投与した。対象は、0日目に免疫し、2回投与群では0日目及び21日目に免疫した。対象動物を37日目に 1×10^4 個のSARS-CoV-2ウイルスに曝露した。ウイルスRNAは、感染の2日後及び4日後（dpi及びdpi）に鼻スワブによって評価した。ほとんどの対象は、ウイルスRNAを示さなかった。2日目及び4日目に一部の対象で少量のRNAが測定された。サブゲノムRNAは、2日目でも4日目でも検出されなかった。対象は、0日目に免疫し、2回投与群では0日目及び21日目に免疫した。これらのデータは、ワクチンが鼻の総ウイルスRNAを100～1000分の1に減少させ、sgRNAを検出不可能なレベルまで減少させ、及びワクチンに対する免疫応答がウイルスの複製をブロックしてウイルスの拡散を防止することが確かであることを示している。

20

【図37B】[0054]カニクイザル（*Cynomolgus macaques*）の鼻スワブで評価された、本明細書に開示されるワクチン製剤によるSARS-CoV-2ウイルス複製の減少を例示する。示されているように、カニクイザル（*Cynomolgus macaques*）にBV2373をMATRIX-M（商標）と共に投与した。対象は、0日目に免疫し、2回投与群では0日目及び21日目に免疫した。対象動物を37日目に 1×10^4 個のSARS-CoV-2ウイルスに曝露した。ウイルスサブゲノム（sg）RNAは、感染の2日後及び4日後（dpi及びdpi）に鼻スワブによって評価した。ほとんどの対象は、ウイルスRNAを示さなかった。2日目及び4日目に一部の対象で少量のRNAが測定された。サブゲノムRNAは、2日目でも4日目でも検出されなかった。対象は、0日目に免疫し、2回投与群では0日目及び21日目に免疫した。これらのデータは、ワクチンが鼻の総ウイルスRNAを100～1000分の1に減少させ、sgRNAを検出不可能なレベルまで減少させ、及びワクチンに対する免疫応答がウイルスの複製をブロックしてウイルスの拡散を防止することが確かであることを示している。

30

【図38A】[0055]BV2373の1回投与及び $25 \mu\text{g}$ 又は $50 \mu\text{g}$ のMATRIX-M（商標）によるカニクイザル（*Cynomolgus macaques*）の免疫の21日後及び35日後の抗CoV SポリペプチドIgG力価を示す。

【図38B】[0055]BV2373の2回投与及び $25 \mu\text{g}$ 又は $50 \mu\text{g}$ のMATRIX-M（商標）によるカニクイザル（*Cynomolgus macaques*）の免疫の21日後及び35日後の抗CoV SポリペプチドIgG力価を示す。

40

【図38C】[0056]BV2373（ $5 \mu\text{g}$ ）及びMATRIX-M（商標）（ $25 \mu\text{g}$ 又は $50 \mu\text{g}$ ）の1回投与によるカニクイザル（*Cynomolgus macaques*）の免疫の21日後及び35日後のカニクイザル（*Cynomolgus macaques*）のhACE2阻害力価を示す。

【図38D】[0056]BV2373（ $5 \mu\text{g}$ ）及びMATRIX-M（商標）（ $25 \mu\text{g}$ 又は $50 \mu\text{g}$ ）の2回投与によるカニクイザル（*Cynomolgus macaques*）の免疫の21日後及び35日後のカニクイザル（*Cynomolgus macaques*）のhACE2阻害力価を示す。

50

【図38E】[0057]BV2373及びMATRIX-M（商標）の投与後のカニクイザル（*Cynomolgus macaques*）における抗CoV SポリペプチドIgG力価とhACE2阻害力価との間の有意な相関を示す。表4の群2～6のデータを示す。

【図39】[0058]表4のBV2373及びMATRIX-M（商標）の2回投与による免疫又は回復期ヒト血清（群2、4及び6）による免疫の35日後のカニクイザル（*Cynomolgus macaques*）の抗CoV Sポリペプチド力価及びhACE2阻害力価を示す。これらのデータは、BV2373及びMATRIX-M（商標）で免疫したカニクイザル（*Cynomolgus macaques*）の抗CoV Sポリペプチド力価及びhACE2阻害力価が、回復期血清で免疫したカニクイザル（*Cynomolgus macaques*）よりも優れていることを示している。

10

【図40A】[0059]細胞変性効果（CPE）によって決定された、BV2373及びMATRIX-M（商標）で免疫したカニクイザル（*Cynomolgus macaques*）のSARS-CoV-2中和力価を示す。

【図40B】[0059]プラーク減少中和試験（PRNT）によって決定された、BV2373及びMATRIX-M（商標）で免疫したカニクイザル（*Cynomolgus macaques*）のSARS-CoV-2中和力価を示す。

【図41】[0060]BV2373及び任意選択によるMATRIX-M（商標）を含むワクチンの安全性及び有効性を評価した臨床試験の投与タイミングを示す。AESIは、特に関心のある有害事象を示す。MAEEは、医学的に付随する有害事象を表し、SAEは、重篤な有害事象を表す。

20

【図42A】[0061]BV2373及びMATRIX-M（商標）を含むワクチンを評価した臨床試験において患者が経験した局所有害事象を示す。群A～Eを表5に示す。データは、ワクチンが十分に許容され、安全であることを示している。

【図42B】[0061]BV2373及びMATRIX-M（商標）を含むワクチンを評価した臨床試験において患者が経験した全身有害事象を示す。群A～Eを表5に示す。データは、ワクチンが十分に許容され、安全であることを示している。

【図43A】[0062]BV2373及びMATRIX-M（商標）を含むワクチンを評価した臨床試験における参加者の免疫の21日後及び35日後の抗CoV SポリペプチドIgGを示す。水平のバーは、それぞれ四分位範囲（IRQ）及び曲線下の中央値面積を表す。ひげの終点は、中央値 $\pm 1.5 \times \text{IRQ}$ よりも低い又は高い最大値及び最小値に等しい。回復期血清パネルには、Baylor College of MedicineのPCRで確認されたCOVID-19参加者からの検体が含まれている（ELISAのために29検体、マイクロ中和のために32検体（MN IC >99 ））。COVID-19の重症度は、入院患者（集中治療室を含む）について赤いマーク、外来治療を受けた患者（救急部門で採取された試料）について青いマーク、無症状の（暴露された）患者（接触／曝露評価で採取された試料）について緑のマークで示される。

30

【図43B】[0062]BV2373及びMATRIX-M（商標）を含むワクチンを評価した臨床試験における参加者の免疫の21日後及び35日後の中和力価を示す。水平のバーは、それぞれ四分位範囲（IRQ）及び曲線下の中央値面積を表す。ひげの終点は、中央値 $\pm 1.5 \times \text{IRQ}$ よりも低い又は高い最大値及び最小値に等しい。回復期血清パネルには、Baylor College of MedicineのPCRで確認されたCOVID-19参加者からの検体が含まれている（ELISAのために29検体、マイクロ中和のために32検体（MN IC >99 ））。COVID-19の重症度は、入院患者（集中治療室を含む）について赤いマーク、外来治療を受けた患者（救急部門で採取された試料）について青いマーク、無症状の（暴露された）患者（接触／曝露評価で採取された試料）について緑のマークで示される。

40

【図44A】[0063]回復期血清を投与された患者における抗CoV SポリペプチドIgGと中和抗体力価との間の相関を示す。回復期血清又はアジュバントBV2373で処置された患者では、中和抗体力価と抗CoV-S IgG力価との間に強い相関が観察されたが、アジュバントの非存在下においてBV2373で処置された患者では観察されな

50

かった。

【図 4 4 B】[0063] B V 2 3 7 3 の 2 回 の 2 5 μ g の用量を投与された患者における抗 C o V S ポリペプチド I g G と中和抗体力価との間の相関を示す。回復期血清又はアジュバント B V 2 3 7 3 で処置された患者では、中和抗体力価と抗 C o V - S I g G 力価との間に強い相関が観察されたが、アジュバントの非存在下において B V 2 3 7 3 で処置された患者では観察されなかった。

【図 4 4 C】[0063] MATRIX-M (商標) と合わせた B V 2 3 7 3 の 2 回 の用量 (5 μ g 及び 2 5 μ g) を投与された患者における抗 C o V S ポリペプチド I g G と中和抗体力価との間の相関を示す。回復期血清又はアジュバント B V 2 3 7 3 で処置された患者では、中和抗体力価と抗 C o V - S I g G 力価との間に強い相関が観察されたが、アジュバントの非存在下において B V 2 3 7 3 で処置された患者では観察されなかった。

10

【図 4 5 A】[0064] B V 2 3 7 3 で刺激した後の群 A (プラセボ) の参加者からのサイトカインを示した T ヘルパー 1 (T h 1) サイトカインであるインターフェロン γ (I F N - γ) 、腫瘍壊死因子 α (T N F - α) 及びインターロイキン (I L) - 2 並びに T ヘルパー 2 (T h 2) サイトカインである I L - 5 及び I L - 1 3 を産生する抗原特異的 C D 4 $^{+}$ T 細胞の頻度を示す。T h 1 サイトカインパネルの「任意の 2 つ」は、2 種類の T h 1 サイトカインを同時に産生できる C D 4 $^{+}$ T 細胞を意味する。「3 つすべて」は、I F N - γ 、T N F - α 及び I L - 2 を同時に産生する C D 4 $^{+}$ T 細胞を示す。T h 2 パネルの「両方」は、T h 2 サイトカイン I L - 5 及び I L - 1 3 を同時に産生できる C D 4 $^{+}$ T 細胞を意味する。

20

【図 4 5 B】[0064] B V 2 3 7 3 で刺激した後の群 B (2 5 μ g の B V 2 3 7 3) の参加者からのサイトカインを示した T ヘルパー 1 (T h 1) サイトカインであるインターフェロン γ (I F N - γ) 、腫瘍壊死因子 α (T N F - α) 及びインターロイキン (I L) - 2 並びに T ヘルパー 2 (T h 2) サイトカインである I L - 5 及び I L - 1 3 を産生する抗原特異的 C D 4 $^{+}$ T 細胞の頻度を示す。T h 1 サイトカインパネルの「任意の 2 つ」は、2 種類の T h 1 サイトカインを同時に産生できる C D 4 $^{+}$ T 細胞を意味する。「3 つすべて」は、I F N - γ 、T N F - α 及び I L - 2 を同時に産生する C D 4 $^{+}$ T 細胞を示す。T h 2 パネルの「両方」は、T h 2 サイトカイン I L - 5 及び I L - 1 3 を同時に産生できる C D 4 $^{+}$ T 細胞を意味する。

【図 4 5 C】[0064] B V 2 3 7 3 で刺激した後の群 C (5 μ g の B V 2 3 7 3 及び 5 0 μ g の MATRIX-M (商標)) の参加者からのサイトカインを示した T ヘルパー 1 (T h 1) サイトカインであるインターフェロン γ (I F N - γ) 、腫瘍壊死因子 α (T N F - α) 及びインターロイキン (I L) - 2 並びに T ヘルパー 2 (T h 2) サイトカインである I L - 5 及び I L - 1 3 を産生する抗原特異的 C D 4 $^{+}$ T 細胞の頻度を示す。T h 1 サイトカインパネルの「任意の 2 つ」は、2 種類の T h 1 サイトカインを同時に産生できる C D 4 $^{+}$ T 細胞を意味する。「3 つすべて」は、I F N - γ 、T N F - α 及び I L - 2 を同時に産生する C D 4 $^{+}$ T 細胞を示す。T h 2 パネルの「両方」は、T h 2 サイトカイン I L - 5 及び I L - 1 3 を同時に産生できる C D 4 $^{+}$ T 細胞を意味する。

30

【図 4 5 D】[0064] B V 2 3 7 3 で刺激した後の群 D (2 5 μ g の B V 2 3 7 3 及び 5 0 μ g の MATRIX-M (商標)) の参加者からのサイトカインを示した T ヘルパー 1 (T h 1) サイトカインであるインターフェロン γ (I F N - γ) 、腫瘍壊死因子 α (T N F - α) 及びインターロイキン (I L) - 2 並びに T ヘルパー 2 (T h 2) サイトカインである I L - 5 及び I L - 1 3 を産生する抗原特異的 C D 4 $^{+}$ T 細胞の頻度を示す。T h 1 サイトカインパネルの「任意の 2 つ」は、2 種類の T h 1 サイトカインを同時に産生できる C D 4 $^{+}$ T 細胞を意味する。「3 つすべて」は、I F N - γ 、T N F - α 及び I L - 2 を同時に産生する C D 4 $^{+}$ T 細胞を示す。T h 2 パネルの「両方」は、T h 2 サイトカイン I L - 5 及び I L - 1 3 を同時に産生できる C D 4 $^{+}$ T 細胞を意味する。

40

【図 4 6 A】[0065] 配列番号 1 に対して付番された、シグナルペプチドを含む野生型 S A R S - C o V - 2 S ポリペプチドの一次構造を示す。

【図 4 6 B】[0065] 配列番号 2 に対して付番された、シグナルペプチドを含まない野生

50

型 S A R S - C o V - 2 S ポリペプチドの一次構造を示す。

【図 4 7】[0066]画分 A 及び画分 C i s c o m マトリックス (MATRIX-M (商標)) アジュバントと組み合わせた B V 2 3 7 3 の有効性、免疫原性及び安全性を評価する第 3 相臨床試験における対象の無作為化を示す。

【図 4 8】[0067]画分 A 及び画分 C i s c o m マトリックス (MATRIX-M (商標)) 又はプラセボと組み合わせた B V 2 3 7 3 によるワクチン接種後に対象が経験した症候性 C O V I D - 1 9 の発生率 (累積事象率 (%)) を示す Kaplan-Meier プロットである。

【図 4 9】[0068]配列番号 1 のアミノ酸配列を有する C o V S ポリペプチドを含む S A R S - C o V - 2 又はアミノ酸 6 9、7 0 及び 1 4 4 の欠失並びに N 5 0 1 Y、A 5 7 0 D、D 6 1 4 G、P 6 8 1 H、T 7 1 6 I、S 9 8 2 A 及び D 1 1 1 8 H の変異を有する C o V S ポリペプチドを含む異種 B . 1 . 1 . 7 S A R S - C o V - 2 株に対する、画分 A 及び画分 C i s c o m マトリックス (MATRIX-M (商標)) と組み合わせた B V 2 3 7 3 のワクチン有効性を示す。

【図 5 0】[0069]画分 A 及び画分 C i s c o m マトリックス (MATRIX-M (商標)) (「A」と表示) 又はプラセボ (「B」と表示) と組み合わせた B V 2 3 7 3 による最初のワクチン接種用量 (「1 回目のワクチン接種」と表示) 及び 2 回目のワクチン接種用量 (「2 回目のワクチン接種」と表示) 後に対象が経験した有害事象を示すグラフである。

【図 5 1】[0070] B V 2 4 3 8 C o V S ポリペプチドの図を示す。構造要素には、切断可能シグナルペプチド (S P)、N 末端ドメイン (N T D)、受容体結合ドメイン (R B D)、サブドメイン 1 及び 2 (S D 1 及び S D 2)、S 2 切断部位 (S 2')、融合ペプチド (F P)、7 残基反復 1 (H R 1)、中央ヘリックス (C H)、7 残基反復 2 (H R 2)、膜貫通ドメイン (T M) 及び細胞質尾部 (C T) が含まれる。配列番号 1 のアミノ酸配列を有する C o V S ポリペプチドからのアミノ酸変化は、線図の下で黒字で示される。

【図 5 2 A】[0071]精製された全長 B V 2 4 3 8 のクマシーブルー染色による還元 S D S - P A G E ゲルを示し、約 1 7 0 k D の予想分子量での主なタンパク質産物を示す。

【図 5 2 B】[0071]走査電子顕微鏡のグラフを示す。

【図 5 2 C】[0071] B V 2 4 3 8 のネガティブ染色透過電子顕微鏡写真を示す。B V 2 4 3 8 は、長さ 1 5 n m、幅 1 1 n m の明確な電球形の粒子を形成する (左パネル)。三量体は、P S - 8 0 ミセルに接続された 8 n m の柔軟なリンカーを示した (左パネル)。クラス平均画像は、r S - B . 1 . 3 5 1 三量体と、2 D 画像に重ねた融合前 S A R S - C o V - 2 三量体スパイクタンパク質細胞外ドメイン (P D B I D 6 V X X) の低温 E M 溶液構造との良好なフィットを示した (中央パネル)。右パネルは、P S - 8 0 ミセルに固定された 2 つの B V 2 4 3 8 三量体を示す。

【図 5 3】[0072]実施例 1 0 のマウス試験デザインを示す。マウスの群 (n = 2 0 / 群) を、試験 0 日目及び 1 4 日目に、組換え S (r S) B V 2 4 3 8 (S A) 又は B V 2 3 7 3 (W U) タンパク質の様々な組み合わせを用いて一次 / 追加投与計画で免疫した。マウスに B V 2 4 3 8 を初回投与及び追加投与するか、B V 2 3 7 3 を初回投与及び追加投与するか、B V 2 3 7 3 を初回投与し、B V 2 4 3 8 を追加投与するか、又は二価 B V 2 3 7 3 + B V 2 4 3 8 を初回投与及び追加投与するかのいずれかを行った。抗原用量は、各一価免疫について 1 µ g r S 又は二価免疫時に各構築物について 1 µ g r S (合計 2 µ g r S) であった。すべての抗原用量は、5 µ g のサポニンアジュバントと共に投与された。対照群には、製剤緩衝液を投与した (プラセボ)。血清及び組織は、図に記載されている時点で採取した。

【図 5 4 A】[0073]実施例 1 0 のマウス試験の 2 1 日目に採取された血清中の抗 S A R S - C o V - 2 S I g G 血清力価を示す。E L I S A を使用して、Wuhan-Hu-1 スパイクタンパク質に対する抗体力価を測定した。バーは、幾何平均力価 (G M T) を示し、エラーバーは、各群の 9 5 % 信頼区間 (C I) を表す。個々の動物の力価は、色付きの

10

20

30

40

50

記号で示される。

【図54B】[0073]実施例10のマウス試験の21日目に採取された血清中の抗SARS-CoV-2 S IgG血清力価を示す。ELISAを使用して、B.1.351スパイクタンパク質に対する抗体力価を測定した。バーは、幾何平均力価（GMT）を示し、エラーバーは、各群の95%信頼区間（CI）を表す。個々の動物の力価は、色付きの記号で示される。

【図54C】[0073]SARS-CoV-2受容体hACE2とWuhan-Hu-1スパイクタンパク質との間の結合を破壊することができる、21日目に採取された血清中の機能的抗体力価（ELISAによって測定）を示す。バーは、幾何平均力価（GMT）を示し、エラーバーは、各群の95%信頼区間（CI）を表す。個々の動物の力価は、色付きの記号で示される。

10

【図54D】[0073]SARS-CoV-2受容体hACE2とB.1.351スパイクタンパク質との間の結合を破壊することができる、21日目に採取された血清中の機能的抗体力価（ELISAによって測定）を示す。バーは、幾何平均力価（GMT）を示し、エラーバーは、各群の95%信頼区間（CI）を表す。個々の動物の力価は、色付きの記号で示される。

【図54E】[0073]32日目にn=5匹/群から採取した血清中のSARS-CoV-2中和抗体力価がPRNTアッセイを使用して決定されたことを示す。血清は、SARS-CoV-2 USA-WA1、B.1.351変異体又はB.1.1.7変異体を中和する能力について評価した。バーは、幾何平均力価（GMT）を示し、エラーバーは、各群の95%信頼区間（CI）を表す。個々の動物の力価は、色付きの記号で示される。統計的有意性は、 $\log_{10}$ 変換されたデータに対してテューキーの事後検定により一元配置分散分析を行うことによって計算された。

20

【図55A】[0074]生SARS-CoV-2 B.1.351又はB.1.1.7ウイルスへの曝露に対する、Wuhan-Hu-1又はB.1.351に基づくSARS-CoV-2 rSによる免疫化の防御効果を示す。試験デザインを図53に示す。免疫マウス（n=10/群）を生SARS-CoV-2 B.1.351（左パネル）又はB.1.1.7（右パネル）に曝露した。曝露後4日間、マウスの体重を毎日測定し、曝露日の体重と比較して体重減少率を計算した。図55Aは、平均体重減少率を記号で示す。エラーバーは、平均値の標準誤差を表す。

30

【図55B】[0074]生SARS-CoV-2 B.1.351又はB.1.1.7ウイルスへの曝露に対する、Wuhan-Hu-1又はB.1.351に基づくSARS-CoV-2 rSによる免疫化の防御効果を示す。試験デザインを図53に示す。免疫マウス（n=10/群）を生SARS-CoV-2 B.1.351（左パネル）又はB.1.1.7（右パネル）に曝露した。曝露後4日間、マウスの体重を毎日測定し、曝露日の体重と比較して体重減少率を計算した。図55Bは、平均体重減少率を記号で示す。エラーバーは、平均値の標準誤差を表す。

【図55C】[0074]生SARS-CoV-2 B.1.351又はB.1.1.7ウイルスへの曝露に対する、Wuhan-Hu-1又はB.1.351に基づくSARS-CoV-2 rSによる免疫化の防御効果を示す。試験デザインを図53に示す。免疫マウス（n=10/群）を生SARS-CoV-2 B.1.351（左パネル）又はB.1.1.7（右パネル）に曝露した。曝露後4日間、マウスの体重を毎日測定し、曝露日の体重と比較して体重減少率を計算した。マウスの半数を曝露から2日後に殺し、肺組織をプラーク形成アッセイに供して、肺ウイルス力価を測定した。残りのマウスは、曝露の4日後に殺した。

40

【図55D】[0074]生SARS-CoV-2 B.1.351又はB.1.1.7ウイルスへの曝露に対する、Wuhan-Hu-1又はB.1.351に基づくSARS-CoV-2 rSによる免疫化の防御効果を示す。試験デザインを図53に示す。免疫マウス（n=10/群）を生SARS-CoV-2 B.1.351（左パネル）又はB.1.1.7（右パネル）に曝露した。曝露後4日間、マウスの体重を毎日測定し、曝露日の体重と比

50

較して体重減少率を計算した。マウスの半数を曝露から2日後に殺し、肺組織をプラーク形成アッセイに供して、肺ウイルス力価を測定した。残りのマウスは、曝露の4日後に殺した。

【図55E】[0074]生SARS-CoV-2 B.1.351又はB.1.1.7ウイルスへの曝露に対する、Wuhan-Hu-1又はB.1.351に基づくSARS-CoV-2 rSによる免疫化の防御効果を示す。試験デザインを図53に示す。免疫マウス(n=10/群)を生SARS-CoV-2 B.1.351(左パネル)又はB.1.1.7(右パネル)に曝露した。曝露後4日間、マウスの体重を毎日測定し、曝露日の体重と比較して体重減少率を計算した。図55Eは、肺組織におけるSARS-CoV-2サブゲノムRNAのレベルを示し、曝露後2日目のそれぞれのプラセボ群における平均に対するRNAの変化倍率として表される。水平のバーは、各時点におけるn=5匹のマウスからの群平均倍率変化を表し、エラーバーは、標準偏差を表す。

10

【図55F】[0074]生SARS-CoV-2 B.1.351又はB.1.1.7ウイルスへの曝露に対する、Wuhan-Hu-1又はB.1.351に基づくSARS-CoV-2 rSによる免疫化の防御効果を示す。試験デザインを図53に示す。免疫マウス(n=10/群)を生SARS-CoV-2 B.1.351(左パネル)又はB.1.1.7(右パネル)に曝露した。曝露後4日間、マウスの体重を毎日測定し、曝露日の体重と比較して体重減少率を計算した。図55Fは、肺組織におけるSARS-CoV-2サブゲノムRNAのレベルを示し、曝露後2日目のそれぞれのプラセボ群における平均に対するRNAの変化倍率として表される。水平のバーは、各時点におけるn=5匹のマウスからの群平均倍率変化を表し、エラーバーは、標準偏差を表す。

20

【図56A】[0075]マウスにおけるBV2373又はBV2438投与計画による免疫で誘導される細胞性免疫を示す。図56Aは、マウスの試験デザインを示す。マウスの群(n=8/群)を、BV2373又はBV2438に基づくSARS-CoV-2 rSの様々な組み合わせを用いて0日目及び21日目に初回/追加投与計画で免疫した。マウスにBV2438を初回投与及び追加投与するか、BV2373を初回投与及び追加投与するか、BV2373を初回投与し、BV2438を追加投与するか、又は二価BV2373及びBV2438を初回投与及び追加投与するかのいずれかを行った。抗原用量は、各一価免疫について1 µg rS又は二価免疫時に各構築物について1 µg rS(合計2 µg rS)であった。すべての免疫は、5 µg Matrix-M1アジュバントと共に投与された。対照群には、製剤緩衝液を投与した(プラセボ、n=5)。細胞収集のために、28日目に脾臓を採取した。

30

【図56B】[0075]マウスにおけるBV2373又はBV2438投与計画による免疫で誘導される細胞性免疫を示す。脾細胞をBV2373又はBV2438で刺激し、次いでELISAに供して、代表的なTh1サイトカインとしてIFN-γ陽性細胞を決定した。

【図56C】[0075]マウスにおけるBV2373又はBV2438投与計画による免疫で誘導される細胞性免疫を示す。脾細胞をBV2373又はBV2438で刺激し、次いでELISAに供して、代表的なTh2サイトカインとしてIL-5陽性細胞を決定した。

40

【図56D】[0075]マウスにおけるBV2373又はBV2438投与計画による免疫で誘導される細胞性免疫を示す。図56B及び図56Cからのデータを使用して、免疫に対する応答のTh1/Th2バランスを計算した。

【図56E】[0075]マウスにおけるBV2373又はBV2438投与計画による免疫で誘導される細胞性免疫を示す。図56Eは、細胞内サイトカイン染色を使用して3つのTh1サイトカイン(IFN-γ、IL-2及びTNF-α)について陽性に染色された多機能性CD4+T細胞の数が定量され、CD4+T細胞10⁶個当たりの三重サイトカイン陽性細胞の数として表されたことを示す。

【図56F】[0075]マウスにおけるBV2373又はBV2438投与計画による免疫で誘導される細胞性免疫を示す。図56Fは、T濾胞ヘルパー細胞の定量を示す。濾胞性

50

ヘルパー T 細胞は、すべての CD 4 + T 細胞中の PD - 1 + CXCR 5 + 細胞の割合を測定することによって定量された。

【図 5 6 G】[0075] マウスにおける BV 2 3 7 3 又は BV 2 4 3 8 投与計画による免疫で誘導される細胞性免疫を示す。図 5 6 G は、胚中心形成を示す。フローサイトメトリーを使用して、CD 1 9 + B 細胞中の GL 7 + CD 9 5 + 細胞の割合を決定することにより、胚中心形成を評価した。灰色のバーは、平均を表し、エラーバーは、標準偏差を表す。個々の動物のデータは、色付きの記号で示される。

【図 5 6 H】[0075] マウスにおける BV 2 3 7 3 又は BV 2 4 3 8 投与計画による免疫で誘導される細胞性免疫を示す。ゲーティング戦略の一例を図 5 6 H に示す。実験群間の差異は、チューキーの事後検定による一元配置分散分析によって評価された（図 5 6 B のデータは、分析前に $\log_{10}$ 変換された）。 P 値 < 0.05 は、統計的に有意であるとみなされた。 $**** = p < 0.0001$ 。

【図 5 7 A】[0076] BV 2 3 7 3 又は BV 2 4 3 8 による免疫からの CD 4 + 及び CD 8 + T 細胞応答を示す。マウスの群 ($n = 8$ / 群) を、BV 2 3 7 3 又は BV 2 4 3 8 の様々な組み合わせを用いて 0 日目及び 21 日目に初回 / 追加投与計画で免疫した。マウスに BV 2 4 3 8 を初回投与及び追加投与するか、BV 2 3 7 3 を初回投与及び追加投与するか、BV 2 3 7 3 を初回投与し、BV 2 4 3 8 を追加投与するか、又は二価 BV 2 3 7 3 及び BV 2 4 3 8 を初回投与及び追加投与するかのいずれかを行った。抗原用量は、各一価免疫について $1 \mu\text{g}$ rS 又は二価免疫時に各構築物について $1 \mu\text{g}$ rS (合計 $2 \mu\text{g}$ rS) であった。すべての抗原用量は、 $5 \mu\text{g}$ のサポニンアジュバントと共に投与された。対照群には、製剤緩衝液を投与した（プラセボ、 $n = 5$ ）。細胞収集のために、28 日目に脾臓を採取した。単離された脾細胞を rS - WU1 又は rS - B. 1. 351 のいずれかで刺激し、次いで細胞内サイトカイン染色に供して、CD 4 + T 細胞が IFN - γ について陽性であるかを決定した。

【図 5 7 B】[0076] BV 2 3 7 3 又は BV 2 4 3 8 による免疫からの CD 4 + 及び CD 8 + T 細胞応答を示す。マウスの群 ($n = 8$ / 群) を、BV 2 3 7 3 又は BV 2 4 3 8 の様々な組み合わせを用いて 0 日目及び 21 日目に初回 / 追加投与計画で免疫した。マウスに BV 2 4 3 8 を初回投与及び追加投与するか、BV 2 3 7 3 を初回投与及び追加投与するか、BV 2 3 7 3 を初回投与し、BV 2 4 3 8 を追加投与するか、又は二価 BV 2 3 7 3 及び BV 2 4 3 8 を初回投与及び追加投与するかのいずれかを行った。抗原用量は、各一価免疫について $1 \mu\text{g}$ rS 又は二価免疫時に各構築物について $1 \mu\text{g}$ rS (合計 $2 \mu\text{g}$ rS) であった。すべての抗原用量は、 $5 \mu\text{g}$ のサポニンアジュバントと共に投与された。対照群には、製剤緩衝液を投与した（プラセボ、 $n = 5$ ）。細胞収集のために、28 日目に脾臓を採取した。単離された脾細胞を rS - WU1 又は rS - B. 1. 351 のいずれかで刺激し、次いで細胞内サイトカイン染色に供して、CD 4 + T 細胞が IL - 2 について陽性であるかを決定した。

【図 5 7 C】[0076] BV 2 3 7 3 又は BV 2 4 3 8 による免疫からの CD 4 + 及び CD 8 + T 細胞応答を示す。マウスの群 ($n = 8$ / 群) を、BV 2 3 7 3 又は BV 2 4 3 8 の様々な組み合わせを用いて 0 日目及び 21 日目に初回 / 追加投与計画で免疫した。マウスに BV 2 4 3 8 を初回投与及び追加投与するか、BV 2 3 7 3 を初回投与及び追加投与するか、BV 2 3 7 3 を初回投与し、BV 2 4 3 8 を追加投与するか、又は二価 BV 2 3 7 3 及び BV 2 4 3 8 を初回投与及び追加投与するかのいずれかを行った。抗原用量は、各一価免疫について $1 \mu\text{g}$ rS 又は二価免疫時に各構築物について $1 \mu\text{g}$ rS (合計 $2 \mu\text{g}$ rS) であった。すべての抗原用量は、 $5 \mu\text{g}$ のサポニンアジュバントと共に投与された。対照群には、製剤緩衝液を投与した（プラセボ、 $n = 5$ ）。細胞収集のために、28 日目に脾臓を採取した。単離された脾細胞を rS - WU1 又は rS - B. 1. 351 のいずれかで刺激し、次いで細胞内サイトカイン染色に供して、CD 4 + T 細胞が TNF - α について陽性であるかを決定した。

【図 5 7 D】[0076] BV 2 3 7 3 又は BV 2 4 3 8 による免疫からの CD 4 + 及び CD 8 + T 細胞応答を示す。マウスの群 ($n = 8$ / 群) を、BV 2 3 7 3 又は BV 2 4 3 8 の

様々な組み合わせを用いて0日目及び21日目に初回／追加投与計画で免疫した。マウスにBV2438を初回投与及び追加投与するか、BV2373を初回投与及び追加投与するか、BV2373を初回投与し、BV2438を追加投与するか、又は二価BV2373及びBV2438を初回投与及び追加投与するかのいずれかを行った。抗原用量は、各一価免疫について1 μ g rS又は二価免疫時に各構築物について1 μ g rS（合計2 μ g rS）であった。すべての抗原用量は、5 μ gのサポニンアジュバントと共に投与された。対照群には、製剤緩衝液を投与した（プラセボ、n=5）。細胞収集のために、28日目に脾臓を採取した。単離された脾細胞をrS-WU1又はrS-B.1.351のいずれかで刺激し、次いで細胞内サイトカイン染色に供して、CD4+T細胞がIL-4について陽性であるかを決定した。

10

【図57E】[0076]BV2373又はBV2438による免疫からのCD4+及びCD8+T細胞応答を示す。CD8+T細胞応答を調べるために、Wuhan-Hu-1スパイクタンパク質配列全体に対応するペプチドプールで細胞を刺激し、次いでIFN- γ 、IL-2及びTNF- α についてICSに供した。

【図58A】[0077]ヒヒにおけるBV2373による免疫からおおよそ1年後の1回又は2回の追加BV2438投与の免疫原性を示す。図58Aは、試験デザインを示す。ヒヒの小コホート（n=2~3/群）を最初に0日目及び21日目（それぞれ0週目及び3週目）に、サポニンアジュバントを含む1 μ g、5 μ g又は25 μ gのBV2373又はアジュバントなしの25 μ gのBV2373で免疫した。おおよそ1年後、318日目及び339日目（それぞれ45週目及び48週目）にすべての動物に、50 μ gのサポニンアジュバントを含む3 μ gのBV2438を1回又は2回追加投与した。

20

【図58B】[0077]ヒヒにおけるBV2373による免疫からおおよそ1年後の1回又は2回の追加BV2438投与の免疫原性を示す。図58Bは、試験期間中の抗CoV S IgG力価を示す。個々の動物の力価が経時的に示され、異なる色の記号及び線は、最初のrS-WU1免疫シリーズの異なる用量群を表す。

【図58C】[0077]ヒヒにおけるBV2373による免疫からおおよそ1年後の1回又は2回の追加BV2438投与の免疫原性を示す。BV2438追加投与前（303日目）並びに追加投与後7、21、35及び81日目に採取した血清を分析して、ELISAによる抗rS-WU1 IgG力価（横線は、平均値を表す）を決定した。

【図58D】[0077]ヒヒにおけるBV2373による免疫からおおよそ1年後の1回又は2回の追加BV2438投与の免疫原性を示す。BV2438追加投与前（303日目）並びに追加投与後7、21、35及び81日目に採取した血清を分析して、ELISAによるrS-B.1.351 IgG力価（横線は、平均値を表す）を決定した。

30

【図58E】[0077]ヒヒにおけるBV2373による免疫からおおよそ1年後の1回又は2回の追加BV2438投与の免疫原性を示す。BV2438追加投与前（303日目）並びに追加投与後7、21、35及び81日目に採取した血清を分析して、ELISAによるrS-WU1又はrS-B.1.351とhACE2受容体との間の相互作用を破壊することができる抗体力価（横線は、平均値を表す）を決定した。

【図58F】[0077]ヒヒにおけるBV2373による免疫からおおよそ1年後の1回又は2回の追加BV2438投与の免疫原性を示す。BV2438追加投与前（303日目）並びに追加投与後7、21、35及び81日目に採取した血清を分析して、PRNTアッセイによるSARS-CoV-2株USA-WA1、B.1.351及びB.1.1.7を中和することができる抗体力価（灰色のバーは、幾何平均を表し、エラーバーは、95%信頼区間を表す）を決定した。

40

【図58G】[0077]ヒヒにおけるBV2373による免疫からおおよそ1年後の1回又は2回の追加BV2438投与の免疫原性を示す。3つのTh1サイトカイン（IFN- γ 、IL-2及びTNF- α ）について陽性の多機能CD4+T細胞の存在をBV2373又はBV2438での刺激後の細胞内サイトカイン染色で評価した。灰色のバーは、平均を表し、色付きの記号は、個々の動物のデータを表す。

【図59A】[0078]ヒヒにおけるBV2438追加に対する個々のサイトカイン応答を

50

示す。ヒヒの小コホート ($n = 2 \sim 3$ / 群) を 0 日目及び 21 日目 (それぞれ 0 週目及び 3 週目) に、 $50 \mu\text{g}$ のサポニンアジュバントを含む $1 \mu\text{g}$ 、 $5 \mu\text{g}$ 又は $25 \mu\text{g}$ の BV 2373 又はアジュバントなしの $25 \mu\text{g}$ の BV 2373 で免疫した。およそ 1 年後、318 日目及び 339 日目 (それぞれ 45 週目及び 48 週目) に、すべての動物に、 $50 \mu\text{g}$ のサポニンアジュバントを含む $3 \mu\text{g}$ の BV 2438 を 1 回又は 2 回追加投与した。PBMC は、追加投与前 (303 日目; 43 週)、最初の rS-B. 1. 351 追加投与の 7 日後 (325 日目; 46 週) 及び最初の rS-B. 1. 351 追加投与の 35 日後 (353 日目; 50 週) に収集した。PBMC を BV 2373 又は BV 2438 で刺激し、ELISA に供して、Th1 サイトカインとしての IFN- γ 産生細胞を測定した。

【図 59B】[0078] ヒヒにおける BV 2438 追加に対する個々のサイトカイン応答を示す。ヒヒの小コホート ($n = 2 \sim 3$ / 群) を 0 日目及び 21 日目 (それぞれ 0 週目及び 3 週目) に、 $50 \mu\text{g}$ のサポニンアジュバントを含む $1 \mu\text{g}$ 、 $5 \mu\text{g}$ 又は $25 \mu\text{g}$ の BV 2373 又はアジュバントなしの $25 \mu\text{g}$ の BV 2373 で免疫した。およそ 1 年後、318 日目及び 339 日目 (それぞれ 45 週目及び 48 週目) に、すべての動物に、 $50 \mu\text{g}$ のサポニンアジュバントを含む $3 \mu\text{g}$ の BV 2438 を 1 回又は 2 回追加投与した。PBMC は、追加投与前 (303 日目; 43 週)、最初の rS-B. 1. 351 追加投与の 7 日後 (325 日目; 46 週) 及び最初の rS-B. 1. 351 追加投与の 35 日後 (353 日目; 50 週) に収集した。PBMC を BV 2373 又は BV 2438 で刺激し、ELISA に供して、Th2 サイトカインとしての IL-4 産生細胞を測定した。

【図 59C】[0078] ヒヒにおける BV 2438 追加に対する個々のサイトカイン応答を示す。CD4+T 細胞も BV 2373 又は BV 2438 で刺激し、次いで ICS に供して、IFN- γ を産生する細胞を測定した。

【図 59D】[0078] ヒヒにおける BV 2438 追加に対する個々のサイトカイン応答を示す。CD4+T 細胞も BV 2373 又は BV 2438 で刺激し、次いで ICS に供して、IL-2 を産生する細胞を測定した。

【図 59E】[0078] ヒヒにおける BV 2438 追加に対する個々のサイトカイン応答を示す。CD4+T 細胞も BV 2373 又は BV 2438 で刺激し、次いで ICS に供して、TNF- α を産生する細胞を測定した。

【図 59F】[0078] ヒヒにおける BV 2438 追加に対する個々のサイトカイン応答を示す。CD4+T 細胞も BV 2373 又は BV 2438 で刺激し、次いで ICS に供して、IL-5 を産生する細胞を測定した。

【図 59G】[0078] ヒヒにおける BV 2438 追加に対する個々のサイトカイン応答を示す。CD4+T 細胞も BV 2373 又は BV 2438 で刺激し、次いで ICS に供して、IL-13 を産生する細胞を測定した。

【図 60A】[0079] BV 2373 で免疫したヒト対象からの SARS-CoV-2 変異体中和力価を示す。臨床試験参加者 ($n = 30$) からの血清試料を PRNT アッセイに供し、B. 1. 1. 7 と比較して、USA-WA1 に対する中和抗体の存在を決定した。個々の対象の力価は、黒丸で示され、線は、USA-WA1 に対する個人の力価とそれぞれの変異体に対する力価と結ぶ。

【図 60B】[0079] BV 2373 で免疫したヒト対象からの SARS-CoV-2 変異体中和力価を示す。臨床試験参加者 ($n = 30$) からの血清試料を PRNT アッセイに供し、B. 1. 351 と比較して、USA-WA1 に対する中和抗体の存在を決定した。個々の対象の力価は、黒丸で示され、線は、USA-WA1 に対する個人の力価とそれぞれの変異体に対する力価と結ぶ。

【図 61A】[0080] 以下の SARS-CoV-2 変異体に対する BV 2373 及びサポニンアジュバントの追加投与の前及び後の抗 S タンパク質 IgG 力価を示す：(i) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するタンパク質と比較した、D614G 変異を有する CoV S ポリペプチドを有する SARS-CoV-2 ウイルス；(ii) SARS-CoV-2 アルファ株、SARS-CoV-2 ベータ株及び SARS-CoV-2 デルタ株。図 61A は、35 日目～217 日目の増加倍率を示す。

10

20

30

40

50

【図 6 1 B】[0080]以下の S A R S - C o V - 2 変異体に対する B V 2 3 7 3 及びサポニンアジュバントの追加投与の前及び後の抗 S タンパク質 I g G 力価を示す：(i) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するタンパク質と比較した、D 6 1 4 G 変異を有する C o V S ポリペプチドを有する S A R S - C o V - 2 ウイルス；(ii) S A R S - C o V - 2 アルファ株、S A R S - C o V - 2 ベータ株及び S A R S - C o V - 2 デルタ株。図 6 1 B は、1 8 9 日目～2 1 7 日目の増加倍率を示す。

【図 6 2 A】[0081]以下の S A R S - C o V - 2 変異体に対する B V 2 3 7 3 及びサポニンアジュバントの追加投与の前及び後の機能的 h A C E 2 阻害を示す：(i) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するタンパク質と比較した、D 6 1 4 G 変異を有する C o V S ポリペプチドを有する S A R S - C o V - 2 ウイルス；(ii) S A R S - C o V - 2 アルファ株、S A R S - C o V - 2 ベータ株及び S A R S - C o V - 2 デルタ株。図 6 2 A は、3 5 日目～2 1 7 日目の増加倍率を示す。

【図 6 2 B】[0081]以下の S A R S - C o V - 2 変異体に対する B V 2 3 7 3 及びサポニンアジュバントの追加投与の前及び後の機能的 h A C E 2 阻害を示す：(i) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するタンパク質と比較した、D 6 1 4 G 変異を有する C o V S ポリペプチドを有する S A R S - C o V - 2 ウイルス；(ii) S A R S - C o V - 2 アルファ株、S A R S - C o V - 2 ベータ株及び S A R S - C o V - 2 デルタ株。図 6 2 B は、1 8 9 日目～2 1 7 日目の増加倍率を示す。

【図 6 3】[0082]実施例 1 1 に記載の試験の参加者に対する追加投与の図を示す。

【図 6 4 A】[0083]実施例 1 1 に記載の試験の群 B 2 における患者の局所の反応原性を示す。

【図 6 4 B】[0083]実施例 1 1 に記載の試験の群 B 2 における患者の全身の反応原性を示す。

【図 6 5】[0084]実施例 1 1 に記載された患者の試験日別の祖先 S A R S - C o V - 2 株に対する血清 I g G 力価を示す。

【図 6 6】[0085]実施例 1 1 に記載の患者の試験日別の祖先 S A R S - C o V - 2 株に対する中和抗体活性を示す。

【図 6 7】[0086]D 6 1 4 G 変異を含む S A R S - C o V - 2 株及び B . 1 . 6 1 7 . 2 (デルタ変異体)に対する、実施例 1 1 の B V 2 3 7 3 及びサポニンアジュバントを含む免疫原性組成物の中和抗体 9 9 (n e u t 9 9) 値を示す。

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 9】

発明の詳細な説明

定義

【0087】 本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」及び「その」は、文脈が明確に別の指示をしない限り、複数の指示対象を含む。従って、例えば、「タンパク質」への言及は、1つのタンパク質又はそのようなタンパク質の混合物を指し、「方法」への言及は、当業者に公知の均等な工程及び／又は方法への言及を含むなどである。

【0 0 2 0】

【0088】 本明細書で使用される場合、「アジュバント」という用語は、免疫原と組み合わせて使用すると、免疫原に対して誘発される免疫応答を増強するか又は他に変更若しくは改変する化合物を指す。免疫応答の改変には、抗体及び細胞性免疫応答のいずれか又は両方の特異性の強化又は拡大が含まれ得る。

【0 0 2 1】

【0089】 本明細書で使用される場合、数値の前にある「約」又は「およそ」という用語は、プラス又はマイナス 1 0 % の範囲の値を示す。例えば、「約 1 0 0」は、9 0 及び 1 1 0 を包含する。

【0 0 2 2】

【0090】 本明細書で使用される場合、「免疫原」、「抗原」及び「エピトープ」とい

10

20

30

40

50

う用語は、糖タンパク質を含むタンパク質及び免疫応答を誘発することができるペプチドなどの物質を指す。

【0023】

【0091】 本明細書で使用される場合、「免疫原性組成物」は、抗原を含む組成物であって、この組成物の対象への投与は、抗原に対する体液性及び／又は細胞性免疫応答の進行をこの対象にもたらず、組成物である。

【0024】

【0092】 本明細書で使用される場合、「サブユニット」組成物、例えばワクチンは、病原体由来のすべての抗原ではなく、1つ又は複数の選択された抗原を含む。そのような組成物は、無傷のウイルス又はそのような細胞若しくは粒子の溶解物を実質的に含まず、典型的には少なくとも部分的に精製され、多くの場合、実質的に精製された病原体由来の免疫原性ポリペプチドから調製される。本明細書に開示されるサブユニット組成物中の抗原は、典型的には、多くの場合、バキュロウイルス系を使用して組換えにより調製される。

10

【0025】

【0093】 本明細書で使用される場合、「実質的に」とは、物質が含まれる試料の大部分の割合を物質が構成するような物質（例えば、化合物、ポリヌクレオチド又はポリペプチド）の単離を指す。例えば、試料において、実質的に精製された成分は、この試料の85%、好ましくは85%～90%、より好ましくは少なくとも95%～99.5%、最も好ましくは少なくとも99%を含む。成分が実質的に置換される場合、試料中に残存する量は、約0.5%～約10%以下、好ましくは約0.5%～約1.0%未満である。

20

【0026】

【0094】 本明細書で使用される場合、「処置する」、「処置」及び「処置すること」という用語は、有益な又は所望の結果、例えば臨床結果を得るためのアプローチを指す。本開示の目的のために、有益な又は望ましい結果は、感染若しくは疾患の開始若しくは進行を阻害若しくは抑制すること；感染若しくは疾患の発症若しくは症状を改善若しくは軽減すること；又はこれらの組み合わせを含み得る。

【0027】

【0095】 本明細書で使用される場合、「予防（prevention）」は、「予防（prophylaxis）」と互換的に使用され、及び感染若しくは疾患の完全な予防又はその感染若しくは疾患の症状の発症の予防；感染若しくは疾患又はその症状の発症の遅延；或いはその後発症した感染若しくは疾患又はその症状の重症度の低下を意味し得る。

30

【0028】

【0096】 本明細書で使用される場合、「有効用量」又は「有効量」は、病原体感染の少なくとも1つの症状を軽減する免疫応答を誘発するのに十分な免疫原の量を指す。有効用量又は有効量は、例えば、プラーク中和、補体固定、酵素結合免疫吸着（ELISA）又はマイクロ中和アッセイにより、例えば中和分泌及び／又は血清抗体の量を測定することによって決定することができる。

【0029】

【0097】 本明細書で使用される場合、「ワクチン」という用語は、病原体に対する免疫応答を誘発するために使用される、病原体に由来する免疫原などの免疫原性組成物を指す。免疫応答は、抗体の形成及び／又は細胞性応答を含み得る。文脈に応じて、「ワクチン」という用語は、免疫応答をもたらすために対象に投与される免疫原の懸濁液又は溶液を指すこともある。好ましくは、ワクチンは、SARS-CoV-2又はその変異体からの感染を防ぐのに有効な免疫応答を誘導する。

40

【0030】

【0098】 本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、ヒト及び他の動物を含む。典型的には、対象は、ヒトである。例えば、対象は、成人、ティーンエイジャー、子供（2歳～14歳）、幼児（誕生～2歳）又は新生児（2ヶ月まで）であり得る。特定の態様では、対象は、生後4ヶ月又は生後6ヶ月までである。態様では、成人は、約65歳

50

以上又は約60歳以上の高齢者である。態様では、対象は、妊婦又は妊娠を希望する女性である。他の態様では、対象は、ヒトではなく；例えばヒト以外の霊長類；例えばヒヒ、チンパンジー、ゴリラ又はマカクである。特定の態様では、対象は、イヌ又はネコなどのペットであり得る。

【0031】

【0099】 態様では、対象は、免疫無防備状態にある。実施形態では、免疫無防備状態の対象には、免疫抑制を引き起こす薬剤が投与される。免疫抑制を引き起こす薬剤の非限定的な例には、コルチコステロイド（例えば、プレドニゾン）、アルキル化剤（例えば、シクロホスファミド）、代謝拮抗剤（例えば、アザチオプリン又は6-メルカプトプリン）、移植関連免疫抑制薬（例えば、シクロスポリン、タクロリムス、シロリムス又はミコフェノール酸モフェチル）、ミトキサントロン、化学療法剤、メトトレキサート、腫瘍壊死因子（TNF）ブロック剤（例えば、エタネルセプト、アダリムマブ、インフリキシマブ）が含まれる。実施形態では、免疫無防備状態の対象は、ウイルス（例えば、ヒト免疫不全ウイルス又はエプスタイン・バーウイルス）に感染している。実施形態では、ウイルスは、呼吸器合胞体ウイルス、インフルエンザ、パラインフルエンザ、アデノウイルス又はピコルナウイルスなどの、呼吸器ウイルスである。実施形態では、免疫無防備状態の対象は、後天性免疫不全症候群（AIDS）を有する。実施形態では、免疫無防備状態の対象は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）を有する人である。実施形態では、免疫無防備状態の対象は、炎症を防止するか、又は移植片の拒絶反応を防止するように設計された処置計画により、免疫無防備状態にある。実施形態では、免疫無防備状態の対象は、移植を受けた対象である。実施形態では、免疫無防備状態の対象は、放射線療法又は脾臓摘出術を受けている。実施形態では、免疫無防備状態の対象は、癌、自己免疫疾患、結核、薬物使用障害（例えば、アルコール、オピオイド又はコカイン使用障害）、脳卒中又は脳血管疾患、実質臓器又は血液幹細胞移植、鎌状赤血球症、サラセミア、自己免疫性リンパ増殖症候群（ALPS）、多腺性自己免疫症候群1型（APS-1）、NF-κB及びT細胞アネルギーによる細胞増殖（BENTA）疾患、カスパーゼ8欠損状態（CEDS）、慢性肉芽腫症（CGD）、分類不能型免疫不全症（CVID）、先天性好中球減少症候群、細胞傷害性Tリンパ球関連抗原4（CTLA-4）の欠損、DOCK8欠損、GATA2欠損、免疫不全を伴うグリコシル化障害、高免疫グロブリンE症候群（HIES）、高免疫グロブリンM症候群、糖尿病、1型糖尿病、2型糖尿病、インターフェロンガンマ欠損、インターロイキン12欠損、インターロイキン23欠損、白血球接着欠損、リポ多糖応答性ベージュ様アンカー（LRBA）欠損、PI3キナーゼ疾患、PLCG2関連抗体欠損及び免疫調節不全（PLAID）、重症複合型免疫不全（SCID）、STAT3ドミナントネガティブ疾患、STAT3機能獲得型疾患、いぼ、低ガンマグロブリン血症、感染症及び骨髄性細胞貯留（WHIM）症候群、ウィスコット・アルドリッチ症候群（WAS）、X連鎖無ガンマグロブリン血症（XLA）、X連鎖リンパ増殖性疾患（XLP）、尿毒症、栄養失調又はXMEN疾患と診断されている。実施形態では、免疫無防備状態の対象は、現在又は以前の喫煙者である。実施形態では、免疫無防備状態の対象は、B細胞欠損、T細胞欠損、マクロファージ欠損、サイトカイン欠損、食細胞欠損、食細胞機能不全、補体欠損又はそれらの組み合わせを有する。

【0032】

【0100】 実施形態では、対象は、過体重又は肥満である。実施形態では、過体重の対象は、 25 kg/m^2 以上 30 kg/m^2 未満の肥満度指数（BMI）を有する。実施形態では、肥満の対象は、 30 kg/m^2 以上のBMIを有する。実施形態では、対象は、精神的健康状態を有する。実施形態では、精神的健康状態は、抑うつ、統合失調症又は不安である。

【0033】

【0101】 本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される」という用語は、米国連邦政府又は州政府の規制機関によって承認されていること又は米国薬局方、欧州薬局方若しくは哺乳動物、より具体的にはヒトでの使用について一般的に認められている他の薬局

10

20

30

40

50

方にリストされていることを意味する。これらの組成物は、脊椎動物において防御免疫応答を誘発するためのワクチン及び／又は抗原組成物として有用であり得る。

【0034】

【0102】 本明細書で使用される場合、「約」という用語は、示された数値のプラス又はマイナス10%を意味する。

【0035】

【0103】 本明細書で使用される場合、「NVX-COV2373」という用語は、BV2373スパイク糖タンパク質（配列番号87）並びに画分A及び画分Cのiscmマトリックス（例えば、MATRIX-M（商標））を含むワクチン組成物を指す。

【0036】

【0104】 本明細書で使用される場合、COV Sポリペプチドを指すときの「改変」という用語は、COV Sポリペプチドの1つ又は複数のアミノ酸の変異、欠失又は付加を指す。COV Sポリペプチド内の改変の位置は、配列番号1（シグナルペプチドを含むCOV Sポリペプチド）又は配列番号2（シグナルペプチドを欠く成熟COV Sポリペプチド）へのポリペプチドの配列のアラインメントに基づいて決定することができる。

【0037】

【0105】 本明細書において「異種SARS-COV-2株」と互換的に使用されるSARS-COV-2の変異体という用語は、配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列を有するCOV Sポリペプチドと比較して、少なくとも約2個、少なくとも約3個、少なくとも約4個、少なくとも約5個、少なくとも約6個、少なくとも約7個、少なくとも約8個、少なくとも約9個、少なくとも約10個、少なくとも約11個、少なくとも約12個、少なくとも約13個、少なくとも約14個、少なくとも約15個、少なくとも約16個、少なくとも約17個、少なくとも約18個、少なくとも約19個、少なくとも約20個、少なくとも約21個、少なくとも約22個、少なくとも約23個、少なくとも約24個、少なくとも約25個、少なくとも約26個、少なくとも約27個、少なくとも約28個、少なくとも約29個、少なくとも約30個、少なくとも約31個、少なくとも約32個、少なくとも約33個、少なくとも約34個又は少なくとも約35個の改変、約2個～約35個の改変、約5個～約10個の改変、約5個～約20個の改変、約10個～約20個の改変、約15個～約25個の改変、約20個～30個の改変、約20～約40個の改変、約25個～45個の改変を有するCOV Sポリペプチドを含む、SARS-COV-2ウイルスである。実施形態では、異種SARS-COV-2株は、配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列を有するCOV Sポリペプチドに対して少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%又は少なくとも約99%の同一性を有するCOV Sポリペプチドを含む、SARS-COV-2ウイルスである。実施形態では、異種SARS-COV-2株は、配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列を有するCOV Sポリペプチドに対して約70%～約99.9%の同一性を有するCOV Sポリペプチドを含む、SARS-COV-2ウイルスである。実施形態では、異種SARS-COV-2株は、配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列を有するCOV Sポリペプチドに対して約90%～約99.9%の同一性を有するCOV Sポリペプチドを含む、SARS-COV-2ウイルスである。実施形態では、異種SARS-COV-2株は、配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列を有するCOV Sポリペプチドに対して約90%～約99.8%の同一性を有するCOV Sポリペプチドを含む、SARS-COV-2ウイルスである。実施形態では、異種SARS-COV-2株は、配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列を有するCOV Sポリペプチドに対して約95%～約99.9%の同一性を有するCOV Sポリペプチドを含む、SARS-COV-2

10

20

30

40

50

V-2 ウイルスである。実施形態では、異種 SARS-CoV-2 株は、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列を有する CoV S ポリペプチドに対して約 95%~約 99.8% の同一性を有する CoV S ポリペプチドを含む、SARS-CoV-2 ウイルスである。実施形態では、異種 SARS-CoV-2 株は、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列を有する CoV S ポリペプチドに対して約 95%~約 99% の同一性を有する CoV S ポリペプチドを含む、SARS-CoV-2 ウイルスである。

【0038】

【0106】 「B. 1. 1. 7 SARS-CoV-2 株」 (「アルファ」株とも呼ばれる) という用語は、アミノ酸 69、70 及び 144 の欠失並びに N501Y、A570D、D614G、P681H 又は P681R、T716I、S982A 及び D1118H の変異を含む CoV S ポリペプチドを有する異種 SARS-CoV-2 株を指し、CoV S ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する野生型 SARS-CoV-2 S ポリペプチドに対して付番されている。B. 1. 1. 7 SARS-CoV-2 株の CoV S ポリペプチドは、任意選択により、アミノ酸 145 の欠失、E484K、L432R 若しくは S494P の変異又はそれらの組み合わせを含み得る。

10

【0039】

【0107】 「B. 1. 351 SARS-CoV-2 株」 (「ベータ」株とも呼ばれる) という用語は、D80A、K417N、E484K、N501Y、D614G 及び A701V の変異を含む CoV S ポリペプチドを有する異種 SARS-CoV-2 株を指し、CoV S ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する野生型 SARS-CoV-2 S ポリペプチドに対して付番されている。B. 1. 617. 2 SARS-CoV-2 株の CoV S ポリペプチドは、任意選択により、変異 D215G; L242H; R246I の 1 つ若しくは複数; 又は 241~243 のアミノ酸の 1 個、2 個若しくは 3 個の欠失を含み得、CoV S ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する野生型 SARS-CoV-2 S ポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、ベータ株の CoV S ポリペプチドは、D80A、D215G、L242H、K417N、E484K、N501Y、D614G 及び A701V の変異を含み、CoV S ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する野生型 SARS-CoV-2 S ポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、ベータ株の CoV S ポリペプチドは、D80A、D215G、アミノ酸 241~243 の 1 個、2 個又は 3 個のアミノ酸の欠失、K417N、E484K、N501Y、D614G 及び A701V の変異を含み、CoV S ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する野生型 SARS-CoV-2 S ポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、ベータ株は、D80A、L242H、R246I、N501Y、K417N、E484K、D614G 及び A701V の変異を含み、CoV S ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する野生型 SARS-CoV-2 S ポリペプチドに対して付番されている。

20

30

【0040】

【0108】 「P. 1 SARS-CoV-2 株」 (「ガンマ」株とも呼ばれる) という用語は、変異 L18F、T20N、P26S、D138Y、R190S、K417T、E484K、N501Y、D614G、H655Y、T1027I 及び V1176F を含む CoV S ポリペプチドを有する異種 SARS-CoV-2 株を指し、CoV S ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する野生型 SARS-CoV-2 S ポリペプチドに対して付番されている。

40

【0041】

【0109】 「CaL. 20C SARS-CoV-2 株」という用語は、変異 S13I、W152C 及び L452R を含む CoV S ポリペプチドを有する異種 SARS-CoV-2 株を指し、CoV S ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する野生型 SARS-CoV-2 S ポリペプチドに対して付番されている。

【0042】

【0110】 「B. 1. 617. 2 株」 (「デルタ」株とも呼ばれる) という用語は、ア

50

ミノ酸 157 及び 158 の欠失並びに T19R、E156G、L452R、T478K、D614G、P681R 及び D950N の変異を含む CoV S ポリペプチドを有する異種 SARS-CoV-2 株を指し、CoV S ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する野生型 SARS-CoV-2 S ポリペプチドに対して付番されている。B. 1. 617. 2 SARS-CoV-2 株の CoV S ポリペプチドは、任意選択により、変異 G142D; W64H; H66W; V70F; T95I; Y145H; D213V; L214R; A222V; W258I 又は W258L; K417N; N439K; E484K 又は E484Q; N501Y; 及び Q613H の 1 つ又は複数を含み得、CoV S ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する野生型 SARS-CoV-2 S ポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、デルタ株は、アミノ酸 157 及び 158 の欠失並びに T19R、G142D、E156G、L452R、T478K、D614G、P681R 及び D950N の変異を含む CoV S ポリペプチドを含む。実施形態では、デルタ株は、アミノ酸 157 及び 158 の欠失並びに T19R、T95I、G142D、Y145H、E156G、A222V、K417N、L452R、T478K、D614G、P681R 及び D950N の変異を含む CoV S ポリペプチドを含み、CoV S ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する野生型 SARS-CoV-2 S ポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、デルタ株は、アミノ酸 157 及び 158 の欠失並びに T19R、G142D、E156G、W258I、K417N、N439K、L452R、T478K、E484K、N501Y、D614G、P681R 及び D950N の変異を含む CoV S ポリペプチドを含み、CoV S ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する野生型 SARS-CoV-2 S ポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、デルタ株は、アミノ酸 157 及び 158 の欠失並びに T19R、W64H、H66W、G142D、E156G、D213V、L214R、W258I、K417N、N439K、L452R、T478K、E484K、N501Y、D614G、P681R 及び D950N の変異を含む CoV S ポリペプチドを含み、CoV S ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する野生型 SARS-CoV-2 S ポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、デルタ株は、アミノ酸 157 及び 158 の欠失並びに T19R、G142D、E156G、K417N、L452R、T478K、E484Q、D614G、P681R 及び D950N の変異を含む CoV S ポリペプチドを含み、CoV S ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する野生型 SARS-CoV-2 S ポリペプチドに対して付番されている。

【0043】

【0111】 「B. 1. 525 株」 (「イータ」株とも呼ばれる) という用語は、変異 Q52R; A67V; E484K; D614G; Q677H; F888L; 及びアミノ酸 69、70、144、145 の 1 個、2 個、3 個又は 4 個の欠失を含む CoV S ポリペプチドを有する異種 SARS-CoV-2 株を指し、CoV S ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する野生型 SARS-CoV-2 S ポリペプチドに対して付番されている。

【0044】

【0112】 「B. 1. 526 株」 (「イオタ」株とも呼ばれる) という用語は、変異 L5F; T95I; D253G; E484K; D614G; 及び A701V を含む CoV S ポリペプチドを有する異種 SARS-CoV-2 株を指し、CoV S ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する野生型 SARS-CoV-2 S ポリペプチドに対して付番されている。

【0045】

【0113】 「B. 1. 617. 1 株」 (「カップ」株とも呼ばれる) という用語は、変異 L452R; E484Q; D614G; P681R; 及び Q1071H を含む CoV S ポリペプチドを有する異種 SARS-CoV-2 株を指し、CoV S ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する野生型 SARS-CoV-2 S ポリペプチドに対して付番されている。

【0046】

【0114】 「C. 37株」（「ラムダ」株とも呼ばれる）という用語は、変異G75V；T76I；R246N；L452Q；F490S；D614G；T859N；及びアミノ酸247～253の1個、2個、3個、4個、5個又は6個の欠失を含むCoV Sポリペプチドを有する異種SARS-CoV-2株を指し、CoV Sポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列を有する野生型SARS-CoV-2 Sポリペプチドに対して付番されている。

【0047】

【0115】 「B. 1. 621株」（「ミュー」株とも呼ばれる）という用語は、変異T95I；Y144S；Y145N；R346K；E484K；N501Y；D614G；P681H；及びD950Nを含むCoV Sポリペプチドを有する異種SARS-CoV-2株を指し、CoV Sポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列を有する野生型SARS-CoV-2 Sポリペプチドに対して付番されている。

【0048】

【0116】 本明細書に記載される免疫原性組成物又はワクチン組成物の「有効性」という用語は、免疫原性組成物を投与されなかった群と比較した、免疫原性組成物を投与された群における疾患（例えば、COVID-19）の減少率を指す。実施形態では、有効性（E）は、以下の方程式を使用して計算される： $E(\%) = (1 - RR) \times 100$ 。式中、RR＝免疫原性組成物を投与された群と免疫原性組成物を投与されなかった群の間の発生率の相対リスク。実施形態では、本明細書に記載の免疫原性組成物は、SARS-CoV-2ウイルス又は異種SARS-CoV-2株に対して、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、約50%～約99%、約50%～約98%、約60%～約99%、約60%～約98%、約70%～約98%、約70%～約95%、約70%～約99%、約80%～約99%、約80%～約98%、約80%～約95%、約85%～約99%、約85%～約98%、約85%～約95%、約90%～約95%、約90%～98%又は約90%～約99%の有効性を有する。

【0049】

【0117】 SARS-CoV-2又はその変異体について「陽性」である対象は、SARS-CoV-2又はその変異体に対するPCR試験又は血清学的試験が陽性である。陽性のPCR試験は、SARS-CoV-2又はその変異体からの遺伝物質を検出する。陽性の血清学的試験は、SARS-CoV-2タンパク質、典型的にはSARS-CoV-2又はその変異体からのヌクレオカプシドタンパク質に対する抗体の存在を示す。

【0050】

【0118】 「無症候性」という用語は、SARS-CoV-2又はそのSARS-CoV-2変異体について陽性であるが、いずれのCOVID-19の症状も経験しない対象を指す。

【0051】

【0119】 COVID-19を指す場合の「軽度」という用語は、SARS-CoV-2又はその変異体のPCR又は血清学的試験が陽性であり、以下の症状の1つ又は複数に有する対象を指す：（i）発熱；（ii）新たに発症した咳；（iii）又は息切れ又は呼吸困難の新たな発症若しくは悪化；倦怠感；全身の筋肉若しくは体の痛み；頭痛；味覚若しくは嗅覚の喪失；喉の痛み、うっ血若しくは鼻水；又は悪心、嘔吐若しくは下痢から選択される2つのさらなるCOVID-19の症状。

【0052】

【0120】 COVID-19を指す場合の「中程度」という用語は、SARS-CoV-2又はその変異体のPCR又は血清学的試験が陽性であり、以下の症状の1つ又は複数

10

20

30

40

50

を有する対象を指す：(i) 3日以上にわたる38.4℃以上の高熱；(ii) 重大な下気道感染症（LRTI）のエビデンスであって、(a) 労作の有無にかかわらず息切れ；(b) 頻呼吸（安静時、毎分24～29回の呼吸）；(c) 94%～95%のSpO₂；(d) 肺炎若しくはLRTIと一致する異常な胸部X線又はコンピューター断層撮影（CT）；又は(e) 肺の聴診での副雑音（例えば、捻髪音／ラ音、喘鳴（wheeze）、類鼾音、胸膜摩擦音、喘鳴（stridor））から選択される、エビデンス。

【0053】

【0121】 COVID-19を指す場合の「重度」という用語は、SARS-CoV-2又はその変異体のPCR又は血清学的試験が陽性であり、以下の症状の1つ又は複数を有する対象を指す：(i) 安静時、毎分30回以上の頻呼吸；(ii) 安静時、毎分125拍以上の心拍数；(iii) 93%以下のSpO₂又は300mmHg未満のPaO₂/FiO₂；(iv) 高流量酸素療法又は非侵襲的換気、非侵襲的陽圧換気（例えば、持続気道陽圧（CPAP）又は二段階気道陽圧（BiPAP））の要件；(v) 機械換気又は体外式膜型人工肺（ECMO）の要件；(vi) (a) 急性呼吸窮迫症候群（ARDS）を含む急性呼吸不全；(b) 急性腎不全；(c) 急性肝不全；(d) 急性右心若しくは左心不全；(e) 敗血症性若しくは心原性ショック（収縮期血圧（SBP）が90mmHg未満又は拡張期血圧（DBP）が60mmHg未満として定義されるショックを伴う）；(f) 急性脳卒中（虚血性又は出血性）；(g) 急性心筋梗塞（AMI）、深部静脈血栓症（DVT）若しくは肺塞栓症（PE）などの急性血栓性事象；(h) 昇圧剤、全身性コルチコステロイド若しくは血液透析の要件；(vii) 集中治療室への入院；又は(viii) 死亡から選択される、1つ又は複数の主要臓器系の機能障害又は不全。

10

20

【0054】

コロナウイルス（CoV）スパイク（S）タンパク質を含むワクチン組成物

【0122】 本開示は、天然に存在しないコロナウイルス（CoV）スパイク（S）ポリペプチド、CoV Sポリペプチドを含むナノ粒子並びに天然に存在しないCoV Sポリペプチド又はCoV Sポリペプチドを含むナノ粒子のいずれかを含む免疫原性組成物及びワクチン組成物を提供する。実施形態では、CoV Sポリペプチド、ナノ粒子、免疫原性組成物及びワクチン組成物を使用して免疫応答を刺激する方法が本明細書に示される。

【0055】

【0123】 ナノ粒子及びワクチン組成物を製造する方法も本明細書に示される。有利には、この方法は、昆虫細胞におけるタンパク質の組換え発現に関連するタンパク質などの他のタンパク質による汚染を実質的に含まないナノ粒子を提供する。実施形態では、発現は、バキュロウイルス／Sf9系で起こる。

30

【0056】

CoV Sポリペプチド抗原

【0124】 本開示のワクチン組成物は、天然に存在しないCoV Sポリペプチドを含む。CoV Sポリペプチドは、限定されるものではないが、SARS-CoV-2を含むコロナウイルス、例えばSARS-CoV-2、MERS-CoV及びSARS-CoVに由来し得る。実施形態では、CoV Sポリペプチドは、SARS-CoV-2の変異体に由来する。実施形態では、SARS-CoV-2の変異体は、SARS-CoV-2 VUI 202012/01、B.1.1.7（「501Y.V1」及び「アルファ」とも呼ばれる）、B.1.351（「501Y.V2」及び「ベータ」とも呼ばれる）、B.1.617.2（「デルタ」とも呼ばれる）、Cal.20C（「イプシロン」とも呼ばれる）又はP.1（「ガンマ」とも呼ばれる）である。SARS-CoV-2の変異体は、世界保健機関（WHO）のラベル（例えば、アルファ、ベータ、ガンマ、デルタなど）、Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak（PANGO）系統、GISAIDクレード又はそのNextstrainクレードによって命名される。

40

【0057】

【0125】 以下の表は、変異体SARS-CoV-2株のリストを提供する。

50

【 0 0 5 8 】
【 表 1 】

WHO ラベル	Pango 系統*	GISAID クレード	Nextstrain クレード	配列番号 1 と 比較した改変	配列番号 1 と 比較した 任意選択に よる改変
アルファ	B.1.1.7	GRY	20I (V1)	アミノ酸 69 及び 70 の欠失; アミノ酸 144 の 欠失; N501Y; A570D; D614G; P681H 又は P681R, T716I; S982A; 及び D1118H	アミノ酸 145 の 欠失; E484K; L432R; S494P

10

【 0 0 5 9 】

20

30

40

50

【表 2】

ベータ	B.1.351	GH/501Y.V2	20H (V2)	D80A; K417N; E484K; N501Y; D614G; A701V;	D215G; L242H; R246I; 241-243 の 1 個、2 個、 又は 3 個の アミノ酸の欠失	10
ガンマ	P.1	GR/501Y.V3	20J (V3)	L18F; T20N; P26S; D138Y; R190S; K417T; E484K; N501Y; D614G; H655Y; T1027I; 及び V1176F		20
デルタ	B.1.617.2	G/478K.V1	21A, 21I, 21J	T19R; E156G; アミノ酸 157 及び 158 の 欠失; L452R; T478K; D614G; P681R; D950N	G142D; W64H; H66W; V70F; T95I; Y145H; D213V; L214R; A222V; W258I 又は W258L; K417N; N439K; E484K 又は E484Q; N501Y; Q613H	30

【 0 0 6 0 】

【表 3】

エータ	B.1.525			Q52R; A67V; アミノ酸 69-70 の 欠失; アミノ酸 144-145 の欠失; E484K; D614G; Q677H; F888L	
イオタ	B.1.526			L5F, T95I, D253G; E484K; D614G; A701V	
カッパ	B.1.617.1			L452R; E484Q; D614G; P681R; Q1071H	
ラムダ	C.37			G75V, T76I, R246N, 247-253 の 1 個、2 個、 3 個、4 個、 5 個、又は 6 個の アミノ酸の欠失; L452Q; F490S; D614G; T859N	
ミュー	B.1.621			T95I; Y144S; Y145N; R346K; E484K; N501Y; D614G; P681H; D950N	

10

20

30

40

【0061】

【0126】 実施形態では、SARS-CoV-2 ウイルスは、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する CoV S ポリペプチドを有し、SARS-CoV-2 の変異体は、配列番号 1 と比較して少なくとも約 1 個、少なくとも約 2 個、少なくとも約 3 個、少なくとも約 4 個、少なくとも約 5 個、少なくとも約 6 個、少なくとも約 7 個、少なくとも約 8 個、少なくとも約 9 個、少なくとも約 10 個、少なくとも約 11 個、少なくとも約 12 個、少なくとも約 13 個、少なくとも約 14 個、少なくとも約 15 個、少なくとも約 16 個、少なくとも約 17 個、少なくとも約 18 個、少なくとも約 19 個、少なくとも約 20 個、少なくとも約 21 個、少なくとも約 22 個、少なくとも約 23 個、少なくとも約 24 個、少なくとも約 25 個、少なくとも約 26 個、少なくとも約 27 個、少なくとも約 28 個、少なく

50

とも約 29 個、少なくとも約 30 個、少なくとも約 31 個、少なくとも約 32 個、少なくとも約 33 個、少なくとも約 34 個、少なくとも約 35 個の改変、少なくとも約 36 個、少なくとも約 37 個、少なくとも約 38 個、少なくとも約 39 個、少なくとも約 40 個、少なくとも約 41 個、少なくとも約 42 個、少なくとも約 43 個、少なくとも約 44 個、少なくとも約 45 個、少なくとも約 46 個、少なくとも約 47 個、少なくとも約 48 個、少なくとも約 49 個、少なくとも約 50 個、少なくとも約 51 個、少なくとも約 52 個、少なくとも約 53 個、少なくとも約 54 個、少なくとも約 55 個、少なくとも約 56 個、少なくとも約 57 個、少なくとも約 58 個、少なくとも約 59 個又は少なくとも約 60 個の改変を有する C o V S ポリペプチドを含む。

【0062】

【0127】 S A R S - C o V S タンパク質とは対照的に、S A R S - C o V - 2 S タンパク質は、S 1 / S 2 切断部位において、多塩基性 R R A R フーリン様切断モチーフとなる 4 つのアミノ酸が挿入されている。S A R S - C o V - 2 S タンパク質は、不活性前駆体 (S 0) として合成され、この前駆体は、フーリン切断部位でタンパク質分解的に切断されて S 1 及び S 2 サブユニットになり、これらのサブユニットは、非共有結合のまま融合前三量体を形成する。S A R S - C o V - 2 S タンパク質の S 2 ドメインには、融合ペプチド (F P)、2 つのヘプタッドリピート (H R 1 及び H R 2)、膜貫通 (T M) ドメイン及び細胞質尾部 (C T) が含まれる。S A R S - C o V - 2 S タンパク質の S 1 ドメインは、4 つの異なるドメイン: N 末端ドメイン (N T D) 及び受容体結合ドメイン (R B D) を含む C 末端ドメイン並びに 2 つのサブドメイン S D 1 及び S D 2 に折り畳まれる。融合前の S A R S - C o V - 2 S タンパク質三量体は、S タンパク質受容体の結合及び切断時、融合前コンフォメーションから融合後コンフォメーションへの構造的再編成を受ける。

【0063】

【0128】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、翻訳後のグリコシル化による糖タンパク質である。糖タンパク質は、シグナルペプチド、S 1 サブユニット、S 2 サブユニット、N T D、R B D、2 つのサブドメイン (図 46 A ~ 46 B では S D 1 / 2 と表示され、本明細書では「S D 1 / 2」と呼ばれる S D 1 及び S D 2)、無傷又は改変された融合ペプチド、H R 1 ドメイン、H R 2 ドメイン、T M 及び C D の 1 つ又は複数を含む。実施形態では、各ドメインのアミノ酸が図 2 及び図 46 A (配列番号 1 に従って示される)、図 46 B (配列番号 2 に従って示される) 並びに図 3 (配列番号 1 に対応して示される) に示されている。実施形態では、各ドメインは、配列番号 1 又は配列番号 2 にある各ドメインの配列に対して少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % 又は少なくとも 99.5 % の同一性を有し得る。各ドメインは、配列番号 1 又は配列番号 2 に示されるものと比較して、最大約 1 個、最大約 2 個、最大約 3 個、最大約 4 個、最大約 5 個、最大約 10 個、最大約 20 個、最大約 30 個、最大約 35 個、最大約 40 個、最大約 45 個、最大約 50 個、最大約 55 個、最大約 60 個、最大約 65 個又は最大約 70 個のアミノ酸の欠失、挿入又は変異を有し得る。各ドメインは、配列番号 1 又は配列番号 2 に示されるものと比較して、約 1 ~ 約 5 個のアミノ酸、約 3 ~ 約 10 個のアミノ酸、約 5 ~ 約 10 個のアミノ酸、約 8 ~ 約 12 個のアミノ酸、約 10 ~ 約 15 個のアミノ酸、約 12 ~ 約 17 個のアミノ酸、約 15 ~ 約 20 個のアミノ酸、約 18 ~ 約 23 個のアミノ酸、約 20 ~ 約 25 個のアミノ酸、約 22 ~ 約 27 個のアミノ酸、約 25 ~ 約 30 個のアミノ酸、約 30 ~ 約 35 個のアミノ酸、約 35 ~ 約 40 個のアミノ酸、約 40 ~ 約 45 個のアミノ酸又は約 45 ~ 約 50 個のアミノ酸、約 50 ~ 約 55 個のアミノ酸又は約 55 ~ 約 60 個のアミノ酸の欠失、挿入又は変異を有し得る。図 2 及び図 3 は、成熟ペプチドに存在しない 13 個のアミノ酸の N 末端シグナルペプチドを例示することに留意されたい。C o V S ポリペプチドを使用して、天然 C o V スパイク (S) ポリペプチドに対する免疫応答を刺激することができる。

【0064】

【0129】 実施形態では、天然 C o V スパイク (S) ポリペプチド (配列番号 2) が改変されて、天然に存在しない C o V スパイク (S) ポリペプチドが得られる (図 1)。実施形態では、C o V スパイク (S) 糖タンパク質は、S 1 サブユニット及び S 2 サブユニットを含み、この S 1 サブユニットは、NTD、RBD、SD 1 / 2 及び不活性フーリン切断部位 (アミノ酸 669 ~ 672) を含み、この S 2 サブユニットは、アミノ酸 973 及び 974 の変異を含み；

この NTD (アミノ酸 1 ~ 318) は、任意選択により、

(a) アミノ酸 56、57、131、132、144、145、228、229、230、231、234、235、236、237、238、239、240 及びこれらの組み合わせからなる群から選択される 1 つ又は複数のアミノ酸の欠失；

(b) アミノ酸 132 の後の 1 個、2 個、3 個又は 4 個のアミノ酸の挿入；及び

(c) アミノ酸 5、6、7、13、39、51、53、54、56、57、62、63、67、82、125、129、131、132、133、139、143、144、145、177、200、201、202、209、229、233、240、245 及びこれらの組み合わせからなる群から選択される 1 つ又は複数のアミノ酸の変異

からなる群から選択される 1 つ又は複数の改変を含み；

RBD は、アミノ酸 333、404、419、426、439、440、464、465、471、477、481、488 及びこれらの組み合わせからなる群から選択される 1 つ又は複数のアミノ酸の変異を任意選択により含み；

SD 1 / 2 ドメインは、557、600、601、642、664、668 及びこれらの組み合わせからなる群から選択される 1 つ又は複数のアミノ酸の変異を任意選択により含み；

S 2 サブユニットは、

(a) 676 ~ 685、676 ~ 702、702 ~ 711、775 ~ 793、806 ~ 815 及びこれらの組み合わせからの 1 つ又は複数のアミノ酸の欠失；

(b) 688、703、846、875、937、969、973、974、1014、1058、1105 及び 1163 並びにこれらの組み合わせからなる群から選択される 1 つ又は複数のアミノ酸の変異；及び

(c) 膜貫通及び細胞質ドメイン (TMCT) (アミノ酸 1201 ~ 1260) からの 1 つ又は複数のアミノ酸の欠失

からなる群から選択される 1 つ又は複数の改変を任意選択により含み、C o V S 糖タンパク質のアミノ酸は、配列番号 2 に対して付番されている。

【0065】

【0130】 図 3 は、BV 2378 と呼ばれる C o V S ポリペプチドを示し、この C o V S ポリペプチドは、不活性フーリン切断部位、欠失した融合ペプチド (例えば、アミノ酸 819 ~ 828 の欠失)、K 986P 及び V 987 変異を有し、これらのアミノ酸は、配列番号 1 に対して付番されている。成熟 BV 2378 ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 13 であるシグナルペプチドの 1 つ又は複数のアミノ酸を欠いている。

【0066】

【0131】 実施形態では、本明細書に記載の C o V S ポリペプチドは、融合前のコンフォメーションで存在する。実施形態では、本明細書に記載の C o V S ポリペプチドは、柔軟な HR 2 ドメインを含む。特に明記しない限り、ドメインの柔軟性は、遷移電子顕微鏡 (TEM) 及び 2D クラス平均化によって決定される。電子密度の減少は、柔軟なドメインに対応する。

【0067】

C o V S ポリペプチド抗原 - S 1 サブユニットに対する改変

【0132】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、配列番号 121 のアミノ酸配列を有する S 1 サブユニットに対する 1 つ又は複数の改変を含む。

【0068】

【0133】 S 1 サブユニットのアミノ酸配列 (配列番号 121) を以下に示す。

【化 1】

QCVNLTTIRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGT
NGIKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSTQSLIVNNATNVVIKVCEF
QFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLRE
FVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGD
SSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTTTDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGI
YQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRRKRISNCVADYSVLYNSA
SFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPPDDFTGC
VIAWNSNNLDSKVGGNYNLYLYRLFRKSNLKPFERDISTEYQAGSTPCNGVEGEFNCYFP
LQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGT
GVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSUITPGTNTSNQVAV
LYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGI
CASYQTQTNSPRRAR

10

【0069】

20

【0134】 配列番号121の下線を引いた領域は、改変され得るS1サブユニット内のアミノ酸を表す。

【0070】

【0135】 実施形態では、本明細書に記載のCoV Sポリペプチドは、配列番号1又は配列番号2のS1サブユニットに対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は少なくとも99.5%の同一性を有するS1サブユニットを含む。S1サブユニットは、配列番号1又は配列番号2のS1サブユニットのアミノ酸配列と比較して、最大約1個、最大約2個、最大約3個、最大約4個、最大約5個、最大約10個、最大約15個、最大約20個、最大約25個又は最大約30個のアミノ酸の欠失、挿入又は変異を有し得る。S1サブユニットは、配列番号1又は配列番号2のS1サブユニットと比較して、約1～約5個のアミノ酸、約3～約10個のアミノ酸、約5～10個のアミノ酸、約8～12個のアミノ酸、約10～15個のアミノ酸、約12～17個のアミノ酸、約15～20個のアミノ酸、約18～23個のアミノ酸、約20～25個のアミノ酸、約22～約27個のアミノ酸又は約25～30個のアミノ酸の欠失、挿入又は変異を有し得る。

30

【0071】

【0136】 実施形態では、S1サブユニットは、表1Aに示される改変の任意の組み合わせを含み得る。

【0072】

40

50

【 表 4 】

表 1A

S1 (配列番号 121) に対する改変			
*配列番号 1 のアミノ酸 14-685 及び配列番号 2 のアミノ酸 1-672			
配列番号 1 内の 位置	配列番号 2 内の 位置	配列番号 121 内の 位置	潜在的な改変
14-305	1-292	1-292	• 最大約 1 個、最大約 2 個、最大約 3 個、最大約 4 個、最大約 5 個、最大約 10 個、最大約 20 個、最大約 30 個、最大約 40 個、最大約 50 個、最大約 60 個、最大約 70 個、最大約 80 個、最大約 90 個、最大約 100 個、最大約 110 個、最大約 120 個、最大約 130 個、最大約 140 個、最大約 150 個、最大約 160 個、最大約 170 個、最大約 180 個、最大約 190 個、最大約 200 個、最大約 210 個、最大約 220 個、最大約 230 個、最大約 240 個、最大約 250 個、最大約 260 個、最大約 270 個、最大約 280 個又は最大約 290 個、最大約 292 個のアミノ酸の欠失

【 0 0 7 3 】

【表 5】

18	5	5	- フェニルアラニンへの変異 - チロシンへの変異 - トリプトファンへの変異
19	6	6	- アルギニンへの変異 - リジンへの変異 - ヒスチジンへの変異
20	7	7	- アスパラギンへの変異 - グルタミンへの変異 - イソロイシンへの変異 - バリンへの変異
26	13	13	- セリンへの変異 - スレオニンへの変異
52	39	39	- アルギニンへの変異 - リジンへの変異 - ヒスチジンへの変異
64	51	51	- ヒスチジンへの変異 - リジンへの変異 - アルギニンへの変異
66	53	53	- トリプトファンへの変異 - チロシンへの変異 - フェニルアラニンへの変異
67	54	54	- バリンへの変異 - イソロイシンへの変異 - ロイシンへの変異
69	56	56	アミノ酸の欠失
70	57	57	- アミノ酸の欠失 - フェニルアラニンへの変異 - チロシンへの変異 - トリプトファンへの変異
75	62	62	- バリンへの変異 - ロイシンへの変異 - イソロイシンへの変異
76	63	63	- イソロイシンへの変異 - バリンへの変異 - ロイシンへの変異
80	67	67	- アラニンへの変異 - グリシンへの変異
95	82	82	β 分岐アミノ酸への変異 - イソロイシンへの変異 - バリンへの変異

【 0 0 7 4 】

10

20

30

40

50

【表 6】

138	125	125	・ チロシンへの変異 ・ フェニルアラニンへの変異 ・ トリプトファンへの変異
142	129	129	・ アスパラギン酸への変異 ・ グルタミン酸への変異
144	131	131	・ アミノ酸の欠失 ・ セリンへの変異
145	132	132	・ アミノ酸の欠失 ・ ヒスチジンへの変異 ・ アスパラギンへの変異 ・ グルタミンへの変異 ・ アミノ酸 132 (例えば、アスパラギン) の後に 1 個、2 個、3 個、又は 4 個のアミノ酸の挿入
146	133	133	・ 芳香族アミノ酸への変異 ・ チロシンへの変異 ・ フェニルアラニンへの変異 ・ トリプトファンへの変異
152	139	139	・ システインへの変異 ・ メチオニンへの変異 ・ セリンへの変異 ・ スレオニンへの変異
156	143	143	・ グリシンへの変異 ・ アラニンへの変異
157	144	144	・ アミノ酸の欠失
158	145	145	・ アミノ酸の欠失
190	177	177	・ セリンへの変異 ・ スレオニンへの変異 ・ システインへの変異
213	200	200	・ バリンへの変異 ・ ロイシンへの変異 ・ イソロイシンへの変異 ・ β 分岐アミノ酸への変異
214	201	201	・ アルギニンへの変異 ・ リジンへの変異 ・ ヒスチジンへの変異
215	202	202	・ グリシンへの変異 ・ アラニンへの変異
222	209	209	・ バリンへの変異 ・ ロイシンへの変異 ・ イソロイシンへの変異
241-244	228-231	228-231	・ 1 個、2 個、3 個、又は 4 個のアミノ酸の欠失 ・
242	229	229	・ ヒスチジンへの変異 ・ リジンへの変異 ・ アルギニンへの変異

10

20

30

40

【0075】

50

【表 7】

246	233	233	・ β 分岐アミノ酸への変異 ・ イソロイシンへの変異 ・ バリンへの変異 ・ スレオニンへの変異 ・ アスパラギンへの変異
247	234	234	・ アミノ酸の欠失
248	235	235	・ アミノ酸の欠失
249	236	236	・ アミノ酸の欠失
250	237	237	・ アミノ酸の欠失
251	238	238	・ アミノ酸の欠失
252	239	239	・ アミノ酸の欠失
253	240	240	・ グリシンへの変異 ・ アミノ酸の欠失
258	245	245	・ イソロイシンへの変異 ・ バリンへの変異 ・ ロイシンへの変異 ・ β 分岐アミノ酸への変異
346	333	333	・ リジンへの変異 ・ アルギニンへの変異 ・ ヒスチジンへの変異
417	404	404	・ アスパラギンへの変異 ・ スレオニンへの変異 ・ イソロイシンへの変異 ・ バリンへの変異 ・ セリンへの変異 ・ グルタミンへの変異 ・ β 分岐アミノ酸への変異
432	419	419	・ リジンへの変異 ・ アルギニンへの変異 ・ ヒスチジンへの変異
439	426	426	・ リジンへの変異 ・ アルギニンへの変異 ・ ヒスチジンへの変異 ・
452	439	439	・ アルギニンへの変異 ・ リジンへの変異 ・ ヒスチジンへの変異 ・ グルタミンへの変異 ・ アスパラギンへの変異

【 0 0 7 6 】

10

20

30

40

50

【表 8】

453	440	440	- フェニルアラニンへの変異 - トリプトファンへの変異	10
477	464	464	- アスパラギンへの変異 - グルタミンへの変異	
478	465	465	- リジンへの変異 - アルギニンへの変異 - ヒスチジンへの変異	
484	471	471	- リジンへの変異 - アルギニンへの変異 - ヒスチジンへの変異 - グルタミンへの変異 - アスパラギンへの変異	
490	477	477	- セリンへの変異 - スレオニンへの変異	
494	481	481	プロリンへの変異	20
501	488	488	- チロシンへの変異 - フェニルアラニンへの変異 - トリプトファンへの変異	
570	557	557	- アスパラギン酸への変異 - グルタミン酸への変異	
613	600	600	- ヒスチジンへの変異 - リジンへの変異 - アルギニンへの変異	
614	601	601	- グリシンへの変異 - アラニンへの変異	
655	642	642	- チロシンへの変異 - フェニルアラニンへの変異 - トリプトファンへの変異	30
677	664	664	ヒスチジンへの変異	
681	668	668	- ヒスチジンへの変異 - リジンへの変異 - アルギニンへの変異	
682-685	669-672	669-672	不活性なフーリン切断部位 (表 1E を参照)	

【0077】

C o V S ポリペプチド抗原 – S 1 サブユニットに対する改変 – N T D

【0137】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、N T D に対する 1 つ又は複数の改変を含む。実施形態では、N T D は、配列番号 1 のアミノ酸 1 4 ~ 3 0 5 又は配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 2 9 2 に対応する配列番号 1 1 8 のアミノ酸配列を有する。

【0078】

【0138】 N T D のアミノ酸配列 (配列番号 1 1 8) を以下に示す。

10

20

30

40

50

【化 2】

QCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVS
GTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLIVNNATNVVIK
VCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNF
KNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLAL
HRSYLTTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTTDAVDCALDPLSETKCT
LKSS

【0079】

【0139】 実施形態では、NTDは、配列番号1のアミノ酸14～331又は配列番号2のアミノ酸1～318に対応する配列番号45のアミノ酸配列を有する。NTDのアミノ酸配列（配列番号45）を以下に示す。

【0140】

【化 3】

QCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFH
AIHVS
GTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLIVNNATNV
VIK
VCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGN
FKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLAL
HRSYLTTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTTDAVDCALDPLSETKCT
LKSS
FTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPN

【0080】

【0141】 実施形態では、NTD及びRBDは、最大約1個のアミノ酸、最大約5個のアミノ酸、最大約10個のアミノ又は最大約20個のアミノ酸が重複する。

【0081】

【0142】 実施形態では、本明細書で提供されるNTDは、C末端において、最大5個、最大10個、最大15個、最大20個、最大25個又は最大30個のアミノ酸が伸長され得る。

【0082】

【0143】 実施形態では、本明細書に記載のCoV Sポリペプチドは、配列番号1又は配列番号2のNTDに対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は少なくとも99.5%の同一性を有するNTDを含む。NTDは、配列番号1又は配列番号2のNTDのアミノ酸配列と比較して、最大約1個、最大約2個、最大約3個、最大約4個、最大約5個、最大約10個、最大約15個、最大約20個、最大約25個又は最大約30個のアミノ酸の欠失、挿入又は変異を有し得る。NTDは、配列番号1又は配列番号2のNTDと比較して、約1～約5個のアミノ酸、約3～約10個のアミノ酸、約5～10個のアミノ酸、約8～12個のアミノ酸、約10～15個のアミノ酸、約12～17個のアミノ酸、約15～20個のアミノ酸、約18～23個のアミノ酸、約20～25個のアミノ酸、約22～約27個のアミノ酸又は約25～30個のアミノ酸の欠失、挿入又は変異を有し得る。

【0083】

【0144】 実施形態では、CoV Sポリペプチドは、N末端ドメイン（NTD）（配列番号2のアミノ酸1～292に対応する）からの1つ又は複数のアミノ酸の欠失を含む。実施形態では、CoV Sポリペプチドは、NTDの最大約10個、最大約20個、最大約30個、最大約40個、最大約50個、最大約60個、最大約70個、最大約80個、最大約90個、最大約100個、最大約110個、最大約120個、最大約130個、

最大約 140 個、最大約 150 個、最大約 160 個、最大約 170 個、最大約 180 個、最大約 190 個、最大約 200 個、最大約 210 個、最大約 220 個、最大約 230 個、最大約 240 個、最大約 250 個、最大約 260 個、最大約 270 個、最大約 280 個、最大約 290 個又は最大約 292 個のアミノ酸の欠失を含む。

【0084】

[0145] 実施形態では、CoV S ポリペプチドは、NTD（配列番号 2 のアミノ酸 1～318 に対応する）からの 1 つ又は複数のアミノ酸の欠失を含む。実施形態では、CoV S ポリペプチドは、配列番号 2 の NTD のアミノ酸 1～318 の欠失を含む。実施形態では、NTD の欠失は、CoV スパイク（S）ポリペプチドのタンパク質発現を促進する。実施形態では、NTD の欠失を有する CoV S ポリペプチドは、配列番号 46、48、49、51、52 及び 54 によって表されるアミノ酸配列を有する。実施形態では、NTD の欠失を有する CoV S ポリペプチドは、配列番号 47、配列番号 50 及び配列番号 53 からなる群から選択される単離された核酸配列によってコードされる。

10

【0085】

[0146] 実施形態では、NTD は、表 1 B に示される改変の任意の組み合わせを含み得る。改変は、参照のための成熟 S ポリペプチド配列である配列番号 2 に関して示されている。

【0086】

20

30

40

50

【表 9】

表 1B

NTD (配列番号 118) に対する改変			
*配列番号 1 のアミノ酸 14-305 及び配列番号 2 のアミノ酸 1-292			
配列番号 1 内の位置	配列番号 2 の残基	配列番号 121 又は 配列番号 45 の残基	改変
18	5	5	・ フェニルアラニンへの変異 ・ チロシンへの変異 ・ トリプトファンへの変異
19	6	6	・ アルギニンへの変異 ・ リジンへの変異 ・ ヒスチジンへの変異
20	7	7	・ アスパラギンへの変異 ・ グルタミンへの変異 ・ イソロイシンへの変異 ・ バリンへの変異
26	13	13	・ セリンへの変異 ・ スレオニンへの変異
64	51	51	・ ヒスチジンへの変異 ・ リジンへの変異 ・ アルギニンへの変異
66	53	53	・ トリプトファンへの変異 ・ チロシンへの変異 ・ フェニルアラニンへの変異
69	56	56	・ アミノ酸の欠失
70	57	57	・ アミノ酸の欠失 ・ フェニルアラニンへの変異 ・ チロシンへの変異 ・ トリプトファンへの変異
75	62	62	・ バリンへの変異 ・ ロイシンへの変異 ・ イソロイシンへの変異
76	63	63	・ イソロイシンへの変異 ・ バリンへの変異 ・ ロイシンへの変異

【 0 0 8 7 】

【表 1 0】

80	67	67	・ アラニンへの変異 ・ グリシンへの変異
95	82	82	・ β 分岐アミノ酸への変異 ・ イソロイシンへの変異 ・ バリンへの変異
138	125	125	・ チロシンへの変異 ・ フェニルアラニンへの変異 ・ トリプトファンへの変異
142	129	129	・ アスパラギン酸への変異 ・ グルタミン酸への変異
144	131	131	・ アミノ酸の欠失 ・ セリンへの変異
145	132	132	・ アミノ酸の欠失 ・ ヒスチジンへの変異 ・ アスパラギンへの変異 ・ グルタミンへの変異 ・ この位置の後に 1 個、2 個、3 個、又は 4 個の アミノ酸の挿入
146	133	133	・ 芳香族アミノ酸への変異 ・ チロシンへの変異 ・ フェニルアラニンへの変異 ・ トリプトファンへの変異
152	139	139	・ システインへの変異 ・ メチオニンへの変異 ・ セリンへの変異 ・ スレオニンへの変異 ・ アルギニンへの変異
156	143	143	・ グリシンへの変異 ・ アラニンへの変異
157	144	144	・ アミノ酸の欠失
158	145	145	・ アミノ酸の欠失
190	177	177	・ セリンへの変異 ・ スレオニンへの変異 ・ システインへの変異
213	200	200	・ バリンへの変異 ・ ロイシンへの変異 ・ イソロイシンへの変異 ・ β 分岐アミノ酸への変異
214	201	201	・ アルギニンへの変異 ・ リジンへの変異 ・ ヒスチジンへの変異
215	202	202	・ グリシンへの変異 ・ アラニンへの変異
222	209	209	・ バリンへの変異 ・ ロイシンへの変異 ・ イソロイシンへの変異

【 0 0 8 8 】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

242	229	229	・ ヒスチジンへの変異 ・ リジンへの変異 ・ アルギニンへの変異
241-244	228-231	228-231	・ 1 個、2 個、3 個、又は 4 個のアミノ酸の欠失
246	233	233	・ β 分岐アミノ酸への変異 ・ イソロイシンへの変異 ・ バリンへの変異 ・ スレオニンへの変異 ・ アスパラギンへの変異
247	234	234	・ アミノ酸の欠失
248	235	235	・ アミノ酸の欠失
249	236	236	・ アミノ酸の欠失
250	237	237	・ アミノ酸の欠失
251	238	238	・ アミノ酸の欠失
252	239	239	・ アミノ酸の欠失
253	240	240	・ グリシンへの変異 ・ アミノ酸の欠失
258	245	245	・ イソロイシンへの変異 ・ バリンへの変異 ・ ロイシンへの変異 ・ β 分岐アミノ酸への変異

10

20

【0089】

C o V S ポリペプチド抗原 - S 1 サブユニットに対する改変 - R B D

【0147】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、R B D に対する 1 つ又は複数の改変を含む。

【0090】

【0148】 実施形態では、R B D は、配列番号 1 のアミノ酸 3 3 1 ~ 5 2 7 又は配列番号 2 のアミノ酸 3 1 8 ~ 5 1 4 に対応する配列番号 1 2 6 のアミノ酸配列を有する。

30

【0091】

【0149】 R B D のアミノ酸配列（配列番号 1 2 6）を以下に示す。

【化 4】

NITNLCPFGEVFENATRFASVYAWNRRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSP TKLND
 LCFTNVYADSFVIRGDEV RQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGN
 YNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPY
 RVVVLSFELLHAPATVCGP

40

実施形態では、R B D は、配列番号 1 のアミノ酸 3 3 5 ~ 5 3 0 又は配列番号 2 のアミノ酸 3 2 2 ~ 5 1 7 に対応する配列番号 1 1 6 のアミノ酸配列を有する。

【0092】

【0150】 R B D のアミノ酸配列（配列番号 1 1 6）を以下に示す。

50

【化 5】

LCPFGEVFNATRFASVYAWNRRKRISNCVADYSVLVNSASFSTFKCYGVSP TKLNDLCFT
NVYADSFVIRGDEV RQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNY
LYRLFRKSNLKPFERDISTEYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVV
VLSFELLHAPATVCGPKKS

【0093】

【0151】 実施形態では、本明細書で提供される R B D は、N 末端又は C 末端において、最大 1 個のアミノ酸、最大 5 個のアミノ酸、最大 10 個のアミノ酸、最大 15 個のアミノ酸、最大 20 個のアミノ酸、最大 25 個のアミノ酸又は最大 30 個のアミノ酸によって伸長され得る。

10

【0094】

【0152】 実施形態では、本明細書に記載の C o V S ポリペプチドは、配列番号 1 又は配列番号 2 の R B D に対して少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% 又は少なくとも 99.5% の同一性を有する R B D を含む。R B D は、配列番号 1 又は配列番号 2 の R B D のアミノ酸配列と比較して、最大約 1 個、最大約 2 個、最大約 3 個、最大約 4 個、最大約 5 個、最大約 10 個、最大約 15 個、最大約 20 個、最大約 25 個又は最大約 30 個のアミノ酸の欠失、挿入又は変異を有し得る。R B D は、配列番号 1 又は配列番号 2 の R B D と比較して、約 1 ～ 約 5 個のアミノ酸、約 3 ～ 約 10 個のアミノ酸、約 5 ～ 10 個のアミノ酸、約 8 ～ 12 個のアミノ酸、約 10 ～ 15 個のアミノ酸、約 12 ～ 17 個のアミノ酸、約 15 ～ 20 個のアミノ酸、約 18 ～ 23 個のアミノ酸、約 20 ～ 25 個のアミノ酸、約 22 ～ 約 27 個のアミノ酸又は約 25 ～ 30 個のアミノ酸の欠失、挿入又は変異を有し得る。

20

【0095】

【0153】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、少なくとも 1 個、少なくとも 2 個、少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、少なくとも 6 個、少なくとも 7 個、少なくとも 8 個、少なくとも 9 個、少なくとも 10 個、少なくとも 11 個、少なくとも 12 個、少なくとも 13 個、少なくとも 14 個、少なくとも 15 個、少なくとも 16 個、少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個又は少なくとも 20 個の変異を R B D に有する。実施形態では、R B D は、表 1 C に示される改変の任意の組み合わせを含み得る。

30

【0096】

40

50

【表 1 2】

表 1C

RBD (配列番号 126) に対する改変			
*配列番号 1 のアミノ酸 331-527 及び配列番号 2 のアミノ酸 318-514			
配列番号 1 内の位置	配列番号 2 内 の位置	配列番号 126 内の位置	潜在的な改変
346	333	16	・ リジンへの変異 ・ アルギニンへの変異 ・ ヒスチジンへの変異
417	404	87	・ アスパラギンへの変異 ・ スレオニンへの変異 ・ イソロイシンへの変異 ・ バリンへの変異 ・ セリンへの変異 ・ グルタミンへの変異 ・ β 分岐アミノ酸への変異
432	419	102	・ リジンへの変異 ・ アルギニンへの変異 ・ ヒスチジンへの変異
439	426	109	・ リジンへの変異 ・ アルギニンへの変異 ・ ヒスチジンへの変異
452	439	122	・ アルギニンへの変異 ・ リジンへの変異 ・ ヒスチジンへの変異 ・ グルタミンへの変異 ・ アスパラギンへの変異
453	440	123	・ フェニルアラニンへの変異 ・ トリプトファンへの変異
477	464	147	・ アスパラギンへの変異 ・ グルタミンへの変異
478	465	148	・ リジンへの変異 ・ アルギニンへの変異 ・ ヒスチジンへの変異
484	471	154	・ リジンへの変異 ・ アルギニンへの変異 ・ ヒスチジンへの変異 ・ グルタミンへの変異 ・ アスパラギンへの変異
490	477	160	・ セリンへの変異 ・ スレオニンへの変異
494	481	164	・ プロリンへの変異
501	488	171	・ チロシンへの変異 ・ フェニルアラニンへの変異 ・ トリプトファンへの変異

【0097】

C o V S ポリペプチド抗原 - S D 1 / 2 に対する改変

【0154】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸 542～681 又は配列番号 2 のアミノ酸 529～668 に対応する配列番号 122 のアミノ酸配列を有する S D 1 / 2 ドメインに対する 1 つ又は複数の改変を含む。

【0098】

【0155】 S D 1 / 2 のアミノ酸配列（配列番号 122）ドメインを以下に示す。

10

20

30

40

50

【化 6】

NFENGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGT
NTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAHEHVNNSY
ECDIPIGAGICASYQTQTNSP

【0099】

【0156】 実施形態では、本明細書に記載のC o V Sポリペプチドは、配列番号1又は配列番号2のSD1／2に対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は少なくとも99.5%の同一性を有するSD1／2ドメインを含む。SD1／2ドメインは、配列番号1又は配列番号2のSD1／2のアミノ酸配列と比較して、最大約1個、最大約2、最大約3個、最大約4個、最大約5個、最大約10個、最大約15個、最大約20個、最大約25個又は最大約30個のアミノ酸の欠失、挿入又は変異を有し得る。SD1／2ドメインは、配列番号1又は配列番号2のSD1／2ドメインと比較して、約1～約5個のアミノ酸、約3～約10個のアミノ酸、約5～10個のアミノ酸、約8～12個のアミノ酸、約10～15個のアミノ酸、約12～17個のアミノ酸、約15～20個のアミノ酸、約18～23個のアミノ酸、約20～25個のアミノ酸、約22～約27個のアミノ酸又は約25～30個のアミノ酸の欠失、挿入又は変異を有し得る。

10

【0100】

【0157】 実施形態では、C o V Sポリペプチドは、少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個又は少なくとも20個の変異をSD1／2ドメインに有する。実施形態では、SD1／2ドメインは、表1Dに示される改変の任意の組み合わせを含み得る。

20

【0101】

30

40

50

【表 1 3】

表 1D

SD1/2 (配列番号 122) に対する改変			
*配列番号 1 のアミノ酸 542-681 又は配列番号 2 のアミノ酸 529-668			
配列番号 1 内の位置	配列番号 2 内の位置	配列番号 122 内の位置	潜在的な改変
570	557	29	・ アスパラギン酸への変異 ・ グルタミン酸への変異
613	600	600	・ ヒスチジンへの変異 ・ リジンへの変異 ・ アルギニンへの変異
614	601	73	・ グリシンへの変異 ・ アラニンへの変異
655	642	114	・ チロシンへの変異 ・ フェニルアラニンへの変異 ・ トリプトファンへの変異
677	664	664	・ ヒスチジンへの変異
681	668	140	・ ヒスチジンへの変異 ・ リジンへの変異 ・ アルギニンへの変異

10

20

【0102】

C o V S ポリペプチド抗原 - フーリン切断部位に対する改変

【0158】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、1つ又は複数の変異によって不活性化される、配列番号 1 のアミノ酸 682～685 又は配列番号 2 のアミノ酸 669～672 に対応するフーリン部位（RRAR）を含む。フーリン切断部位の不活性化は、フーリンが C o V S ポリペプチドを切断することを防止する。実施形態では、不活性化フーリン切断部位を含む本明細書に記載の C o V S ポリペプチドは、単鎖として発現される。

30

【0103】

【0159】 実施形態では、天然フーリン切断部位を構成するアミノ酸の 1つ又は複数の任意の天然アミノ酸に変異している。実施形態では、アミノ酸は、L-アミノ酸である。アミノ酸の非限定的な例には、アラニン、アルギニン、グリシン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、セリン、スレオニン、ヒスチジン、リジン、メチオニン、プロリン、バリン、イソロイシン、ロイシン、チロシン、トリプトファン及びフェニルアラニンが含まれる。

【0104】

【0160】 実施形態では、天然フーリン切断部位を構成するアミノ酸の 1つ又は複数のグルタミンに変異している。実施形態では、1個、2個、3個又は4個のアミノ酸がグルタミンに変異され得る。実施形態では、天然フーリン切断部位を構成するアルギニンの 1つがグルタミンに変異している。実施形態では、天然フーリン切断部位を構成するアルギニンの 2つがグルタミンに変異している。実施形態では、天然フーリン切断部位を構成するアルギニンの 3つがグルタミンに変異している。

40

【0105】

【0161】 実施形態では、天然フーリン切断部位を構成するアミノ酸の 1つ又は複数のアラニンに変異している。実施形態では、1個、2個、3個又は4個のアミノ酸がアラニンに変異され得る。実施形態では、天然フーリン切断部位を含むアルギニンの 1つがアラニンに変異している。実施形態では、天然フーリン切断部位を構成するアルギニンの 2つ

50

がアラニンに変異している。実施形態では、天然フーリン切断部位を構成するアルギニンの3つがアラニンに変異している。

【0106】

【0162】 実施形態では、天然フーリン切断部位におけるアミノ酸の1つ又は複数グリシンに変異している。実施形態では、1個、2個、3個又は4個のアミノ酸がグリシンに変異され得る。実施形態では、天然フーリン切断部位のアルギニンの1つがグリシンに変異している。実施形態では、天然フーリン切断部位におけるアルギニンの2つがグリシンに変異している。実施形態では、天然フーリン切断部位を構成するアルギニンの3つがグリシンに変異している。

【0107】

【0163】 実施形態では、天然フーリン切断部位におけるアミノ酸の1つ又は複数アスパラギンに変異している。例えば、1個、2個、3個又は4個のアミノ酸がアスパラギンに変異され得る。実施形態では、天然フーリン切断部位におけるアルギニンの1つがアスパラギンに変異している。実施形態では、天然フーリン切断部位におけるアルギニンの2つがアスパラギンに変異している。実施形態では、天然フーリン切断部位におけるアルギニンの3つがアスパラギンに変異している。

【0108】

【0164】 C o V S ポリペプチド内に含まれる不活性化フーリン部位のアミノ酸配列の非限定的な例が表1Eに示される。

【0109】

10

20

30

40

50

【表 1 4】

表 1E

フーリン切断部位のアミノ酸配列	活性又は不活性フーリン切断部位
RAR (配列番号 6)	活性
QQAQ (配列番号 7)	不活性
QRAR (配列番号 8)	不活性
RQAR (配列番号 9)	不活性
RRAQ (配列番号 10)	不活性
QQAR (配列番号 11)	不活性
RQAQ (配列番号 12)	不活性
QRAQ (配列番号 13)	不活性
NNAN (配列番号 14)	不活性
NRAR (配列番号 15)	不活性
RNAR (配列番号 16)	不活性
RRAN (配列番号 17)	不活性
NNAR (配列番号 18)	不活性
RNAN (配列番号 19)	不活性
NRAN (配列番号 20)	不活性
AAAA (配列番号 21)	不活性
ARAR (配列番号 22)	不活性
RAAR (配列番号 23)	不活性
RRAA (配列番号 24)	不活性
AAAR (配列番号 25)	不活性
RAAA (配列番号 26)	不活性
ARAA (配列番号 27)	不活性

【 0 1 1 0 】

10

20

30

40

【表 1 5】

GGAG (配列番号 28)	不活性
GRAR (配列番号 29)	不活性
RGAR (配列番号 30)	不活性
RRAG (配列番号 31)	不活性
GGAR (配列番号 32)	不活性
RGAG (配列番号 33)	不活性
GRAG (配列番号 34)	不活性
GSAS (配列番号 97)	不活性
GSGA (配列番号 111)	不活性

【0 1 1 1】

【0165】 実施形態では、活性フーリン切断部位（配列番号 6）の代わりに、本明細書に記載の C o V S ポリペプチドは、不活性化フーリン切断部位を含む。実施形態では、不活性化フーリン切断部位のアミノ酸配列は、配列番号 7 ～ 3 4 又は配列番号 9 7 のいずれか 1 つによって表される。実施形態では、不活性化フーリン切断部位のアミノ酸配列は、Q Q A Q（配列番号 7）である。実施形態では、不活性化フーリン切断部位のアミノ酸配列は、G S A S（配列番号 9 7）である。実施形態では、不活性化フーリン切断部位のアミノ酸配列は、G S G A（配列番号 1 1 1）である。実施形態では、不活性化フーリン切断部位のアミノ酸配列は、G G、G G G（配列番号 1 2 7）、G G G G（配列番号 1 2 8）又は G G G G G（配列番号 1 2 9）である。

【0 1 1 2】

C o V S ポリペプチド抗原 – S 2 サブユニットに対する改変

【0166】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸 6 8 6 ～ 1 2 7 3 又は配列番号 2 のアミノ酸 6 7 3 ～ 1 2 6 0 に対応する配列番号 1 2 0 のアミノ酸配列を有する S 2 サブユニットに対する 1 つ又は複数の改変を含む。

【0 1 1 3】

【0167】 S 2 サブユニットのアミノ酸配列（配列番号 1 2 0）を以下に示す。

10

20

30

40

50

【化 7】

SVASQSIHAYTMSLGAENSVAYSNNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDST
ECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILP
DPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDE
MIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQF
NSAIGKIQDSLSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDLKV
EAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKG
YHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHGDKAHFPREGVFVSNGTHWVF
TQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDV
DLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEYIKWPWYIWLGFIAGLI
AIVMVTIMLCCMTSCCSCCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT

10

【0114】

【0168】 実施形態では、本明細書に記載のC o V Sポリペプチドは、配列番号1又は配列番号2のS2サブユニットに対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は少なくとも99.5%の同一性を有するS2サブユニットを含む。S2サブユニットは、配列番号1又は配列番号2のS2サブユニットのアミノ酸配列と比較して、最大約1個、最大約2個、最大約3個、最大約4個、最大約5個、最大約10個、最大約15個、最大約20個、最大約25個又は最大約30個のアミノ酸の欠失、挿入又は変異を有し得る。S2サブユニットは、配列番号1又は配列番号2のS2サブユニットと比較して、約1～約5個のアミノ酸、約3～約10個のアミノ酸、約5～10個のアミノ酸、約8～12個のアミノ酸、約10～15個のアミノ酸、約12～17個のアミノ酸、約15～20個のアミノ酸、約18～23個のアミノ酸、約20～25個のアミノ酸、約22～約27個のアミノ酸又は約25～30個のアミノ酸の欠失、挿入又は変異を有し得る。

20

【0115】

【0169】 実施形態では、S2サブユニットは、表1Fに示される改変の任意の組み合わせを含み得る。

30

【0116】

40

50

【表 1 6】

表 1F

S2 (配列番号 120) に対する改変			
*配列番号 1 のアミノ酸 686-1273 及び配列番号 2 のアミノ酸 673-1260			
配列番号 1 内の 位置	配列番号 2 内の 位置	配列番号 120 内の 位置	潜在的な改変
689-698	676-685	4-13	最大約 1 個、最大約 2 個、最大約 3 個、最大約 4 個、最大約 5 個、最大約 6 個、最大約 7 個、最大約 8 個、最大約 9 個、又は最大約 10 個のアミノ酸の欠失
701	688	16	- β 分岐アミノ酸への変異 - バリンへの変異 - イソロイシンへの変異 - スレオニンへの変異
715-724	702-711	30-39	最大約 1 個、最大約 2 個、最大約 3 個、最大約 4 個、最大約 5 個、最大約 6 個、最大約 7 個、最大約 8 個、最大約 9 個、又は最大約 10 個のアミノ酸の欠失
716	703	31	- β 分岐アミノ酸への変異 - バリンへの変異 - イソロイシンへの変異
788-806	775-793	103-121	最大約 1 個、最大約 2 個、最大約 3 個、最大約 4 個、最大約 5 個、最大約 6 個、最大約 7 個、最大約 8 個、最大約 9 個、最大約 10 個、最大約 11 個、最大約 12 個、最大約 13 個、最大約 14 個、最大約 15 個、最大約 16 個、最大約 17 個、最大約 18 個、又は最大約 19 個のアミノ酸の欠失
819-828	806-815	134-143	最大約 1 個、最大約 2 個、最大約 3 個、最大約 4 個、最大約 5 個、最大約 6 個、最大約 7 個、最大約 8 個、最大約 9 個、又は最大約 10 個のアミノ酸の欠失
859	846	174	- アスパラギンへの変異 - グルタミンへの変異

【 0 1 1 7 】

10

20

30

40

50

【表 17】

888	875	203	- ロイシンへの変異 - イソロイシンへの変異 - バリンへの変異	10
950	937	265	- アスパラギンへの変異 - グルタミンへの変異	
982	969	297	- アラニンへの変異 - グリシンへの変異 - スレオニンへの変異	
986	973	301	- プロリンへの変異 - グリシンへの変異	
987	974	302	- プロリンへの変異 - グリシンへの変異	
1027	1014	342	- イソロイシンへの変異 - バリンへの変異 - セリンへの変異	20
1071	1058	386	- ヒスチジンへの変異 - アルギニンへの変異 - リジンへの変異	
1118	1105	433	- ヒスチジンへの変異 - リジンへの変異 - アルギニンへの変異 - アスパラギンへの変異 - グルタミンへの変異	
1176	1163	491	- フェニルアラニンへの変異 - チロシンへの変異 - トリプトファンへの変異	30
1214-1237	1201-1224	1-24	TM の 1 つ以上のアミノ酸の欠失	
1238-1273	1225-1260	1-36	CD の 1 つ以上のアミノ酸の欠失	

【0118】

40

【0170】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、天然 C o V スパイク (S) ポリペプチド (配列番号 2) のアミノ酸 676 ~ 685 内の 1 つ又は複数の欠失に対応する欠失を含む。実施形態では、天然 C o V スパイク (S) ポリペプチド (配列番号 2) のアミノ酸 676 ~ 685 の 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個又は 10 個のアミノ酸が欠失している。実施形態では、アミノ酸 676 ~ 685 内のアミノ酸の欠失は、連続的であり、例えばアミノ酸 676 及び 677 が欠失しているか、又はアミノ酸 680 及び 681 が欠失している。実施形態では、アミノ酸 676 ~ 685 内のアミノ酸の欠失は、非連続的であり、例えばアミノ酸 676 及び 680 が欠失しているか、又はアミノ酸 677 及び 682 が欠失している。実施形態では、アミノ酸 676 ~ 685 内の 1 つ又は複数の欠失に対応する欠失を含む C o V S ポリペプチドは、配列番号 62 及び配

50

列番号 63 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

【0119】

【0171】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、天然 C o V スパイク (S) ポリペプチド (配列番号 2) のアミノ酸 702 ~ 711 内の 1 つ又は複数の欠失に対応する欠失を含む。実施形態では、天然 S A R S - C o V - 2 スパイク (S) ポリペプチド (配列番号 2) のアミノ酸 702 ~ 711 の 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個又は 10 個のアミノ酸が欠失している。実施形態では、アミノ酸 702 ~ 711 内のアミノ酸の 1 つ又は複数の欠失は、連続的であり、例えばアミノ酸 702 及び 703 が欠失しているか、又はアミノ酸 708 及び 709 が欠失している。実施形態では、アミノ酸 702 ~ 711 内のアミノ酸の欠失は、非連続的であり、例えばアミノ酸 702 及び 704 が欠失しているか、又はアミノ酸 707 及び 710 が欠失している。実施形態では、アミノ酸 702 ~ 711 内の 1 つ又は複数の欠失に対応する欠失を含む C o V S ポリペプチドは、配列番号 64 及び配列番号 65 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

10

【0120】

【0172】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、天然 C o V S ポリペプチド (配列番号 2) のアミノ酸 775 ~ 793 内の 1 つ又は複数の欠失に対応する欠失を含む。実施形態では、天然 S A R S - C o V - 2 スパイク (S) ポリペプチド (配列番号 2) のアミノ酸 775 ~ 793 の最大約 1 個、最大約 2 個、最大約 3 個、最大約 4 個、最大約 5 個、最大約 6 個、最大約 7 個、最大約 8 個、最大約 9 個、最大約 10 個、最大約 11 個、最大約 12 個、最大約 13 個、最大約 14 個、最大約 15 個、最大約 16 個、最大約 17 個、最大約 18 個又は最大約 19 個のアミノ酸が欠失している。実施形態では、アミノ酸 775 ~ 793 内のアミノ酸の 1 つ又は複数の欠失は、連続的であり、例えばアミノ酸 776 及び 777 が欠失しているか、又はアミノ酸 780 及び 781 が欠失している。実施形態では、アミノ酸 775 ~ 793 内のアミノ酸の欠失は、非連続的であり、例えばアミノ酸 775 及び 790 が欠失しているか、又はアミノ酸 777 及び 781 が欠失している。

20

【0121】

【0173】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸 806 ~ 815 に対応する融合ペプチド (配列番号 104) の欠失を含む。実施形態では、C o V スパイク (S) ポリペプチド (配列番号 2) の融合ペプチドの 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個又は 10 個のアミノ酸が欠失している。実施形態では、融合ペプチド内のアミノ酸の欠失は、連続的であり、例えばアミノ酸 806 及び 807 が欠失しているか、又はアミノ酸 809 及び 810 が欠失している。実施形態では、融合ペプチド内のアミノ酸の欠失は、非連続的であり、例えばアミノ酸 806 及び 808 が欠失しているか、又はアミノ酸 810 及び 813 が欠失している。実施形態では、融合ペプチドの 1 つ又は複数のアミノ酸に対応する欠失を含む C o V S ポリペプチドは、配列番号 66、77 及び 105 ~ 108 から選択されるアミノ酸配列を有する。

30

【0122】

【0174】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、天然 C o V スパイク (S) ポリペプチド (配列番号 2) の L y s - 973 に変異を含む。実施形態では、L y s - 973 は、任意の天然アミノ酸に変異している。実施形態では、L y s - 973 は、プロリンに変異している。実施形態では、L y s - 973 は、グリシンに変異している。実施形態では、アミノ酸 973 に変異を含む C o V S ポリペプチドは、配列番号 84 ~ 89、105 ~ 106 及び 109 ~ 110 からなる群から選択される。

40

【0123】

【0175】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、天然 C o V スパイク (S) ポリペプチド (配列番号 2) の V a l - 974 に変異を含む。実施形態では、V a l - 974 は、任意の天然アミノ酸に変異している。実施形態では、V a l - 974 は、プロリンに変異している。実施形態では、V a l - 974 は、グリシンに変異している。実施形態で

50

は、アミノ酸 974 に変異を含む C o V S ポリペプチドは、配列番号 84 ～ 89、105 ～ 106 及び 109 ～ 110 からなる群から選択される。

【0124】

【0176】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、天然 C o V スパイク (S) ポリペプチド (配列番号 2) の L y s - 973 及び V a l - 974 に変異を含む。実施形態では、L y s - 973 及び V a l - 974 は、任意の天然アミノ酸に変異している。実施形態では、L y s - 973 及び V a l - 974 は、プロリンに変異している。実施形態では、アミノ酸 973 及び 974 に変異を含む C o V S ポリペプチドは、配列番号 84 ～ 89、105 ～ 106 及び 109 ～ 110 から選択される。

【0125】

C o V S ポリペプチド抗原 - S2 サブユニットに対する改変 - HR1 ドメイン

【0177】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸 912 ～ 984 又は配列番号 2 のアミノ酸 889 ～ 971 に対応する配列番号 119 のアミノ酸配列を有する HR1 ドメインに対する 1 つ又は複数の改変を含む。

【0126】

【0178】 HR1 ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 119) を以下に示す。

M A Y R F N G I G V T Q N V L Y E N Q K L I A N Q F N S A I G K I Q D S L S S T
A S A L G K L Q D V V N Q N A Q A L N T L V K Q L S S N F G A I S S V L N D I L
S R L

【0127】

【0179】 実施形態では、本明細書に記載の C o V S ポリペプチドは、配列番号 1 又は配列番号 2 の HR1 ドメインに対して少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % 又は少なくとも 99.5 % の同一性を有する HR1 ドメインを含む。HR1 ドメインは、配列番号 1 又は配列番号 2 の HR1 ドメインのアミノ酸配列と比較して、最大約 1 個、最大約 2 個、最大約 3 個、最大約 4 個、最大約 5 個、最大約 10 個、最大約 15 個、最大約 20 個、最大約 25 個又は最大約 30 個のアミノ酸の欠失、挿入又は変異を有し得る。HR1 ドメインは、配列番号 1 又は配列番号 2 の HR1 ドメインと比較して、約 1 ～ 約 5 個のアミノ酸、約 3 ～ 約 10 個のアミノ酸、約 5 ～ 10 個のアミノ酸、約 8 ～ 12 個のアミノ酸、約 10 ～ 15 個のアミノ酸、約 12 ～ 17 個のアミノ酸、約 15 ～ 20 個のアミノ酸、約 18 ～ 23 個のアミノ酸、約 20 ～ 25 個のアミノ酸、約 22 ～ 約 27 個のアミノ酸又は約 25 ～ 30 個のアミノ酸の欠失、挿入又は変異を有し得る。

【0128】

【0180】 実施形態では、HR1 ドメインは、表 1G に示される改変の任意の組み合わせを含み得る。

【0129】

【表 18】

表 1G

HR1 (配列番号 119)に対する改変			
*配列番号 1 のアミノ酸 912-984 及び配列番号 2 のアミノ酸 889-971)			
配列番号 1 内の位置	配列番号 2 内の位置	配列番号 119 内の位置	潜在的な改変
982	969	81	- アラニンへの変異 - グリシンへの変異 - スレオニンへの変異

【0130】

C o V S ポリペプチド抗原 - S2 サブユニットに対する改変 - HR2 ドメイン

【0181】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸 1 1 6 3 ~ 1 2 1 3 又は配列番号 2 のアミノ酸 1 1 5 0 ~ 1 2 0 0 に対応する配列番号 1 2 5 のアミノ酸配列を有する H R 2 ドメインに対する 1 つ又は複数の改変を含む。

【0131】

【0182】 H R 2 ドメインのアミノ酸配列（配列番号 1 2 5）を以下に示す。

D V D L G D I S G I N A S V V N I Q K E I D R L N E V A K N L N E S L I D L Q E
L G K Y E Q Y I K W P

【0132】

【0183】 実施形態では、本明細書に記載の C o V S ポリペプチドは、配列番号 1 又は配列番号 2 の H R 2 ドメインに対して少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 % 又は少なくとも 9 9 . 5 % の同一性を有する H R 2 ドメインを含む。H R 2 ドメインは、配列番号 1 又は配列番号 2 の H R 2 ドメインのアミノ酸配列と比較して、最大約 1 個、最大約 2 個、最大約 3 個、最大約 4 個、最大約 5 個、最大約 1 0 個、最大約 1 5 個、最大約 2 0 個、最大約 2 5 個又は最大約 3 0 個のアミノ酸の欠失、挿入又は変異を有し得る。H R 2 ドメインは、配列番号 1 又は配列番号 2 の H R 2 ドメインと比較して、約 1 ~ 約 5 個のアミノ酸、約 3 ~ 約 1 0 個のアミノ酸、約 5 ~ 1 0 個のアミノ酸、約 8 ~ 1 2 個のアミノ酸、約 1 0 ~ 1 5 個のアミノ酸、約 1 2 ~ 1 7 個のアミノ酸、約 1 5 ~ 2 0 個のアミノ酸、約 1 8 ~ 2 3 個のアミノ酸、約 2 0 ~ 2 5 個のアミノ酸、約 2 2 ~ 約 2 7 個のアミノ酸又は約 2 5 ~ 3 0 個のアミノ酸の欠失、挿入又は変異を有し得る。

【0133】

C o V S ポリペプチド抗原 - T M ドメインに対する改変

【0184】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸 1 2 1 4 ~ 1 2 3 7 又は配列番号 2 のアミノ酸 1 2 0 1 ~ 1 2 2 4 に対応する配列番号 1 2 3 のアミノ酸配列を有する T M ドメインに対する 1 つ又は複数の改変を含む。

【0134】

【0185】 T M ドメインのアミノ酸配列（配列番号 1 2 3）を以下に示す。

W Y I W L G F I A G L I A I V M V T I M L C C M

【0135】

【0186】 実施形態では、本明細書に記載の C o V S ポリペプチドは、配列番号 1 又は配列番号 2 の T M ドメインに対して少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 % 又は少なくとも 9 9 . 5 % の同一性を有する T M ドメインを含む。T M ドメインは、配列番号 1 又は配列番号 2 の T M ドメインのアミノ酸配列と比較して、最大約 1 個、最大約 2 個、最大約 3 個、最大約 4 個、最大約 5 個、最大約 1 0 個、最大約 1 5 個、最大約 2 0 個、最大約 2 5 個又は最大約 3 0 個のアミノ酸の欠失、挿入又は変異を有し得る。T M ドメインは、配列番号 1 又は配列番号 2 の T M ドメインと比較して、約 1 ~ 約 5 個のアミノ酸、約 3 ~ 約 1 0 個のアミノ酸、約 5 ~ 1 0 個のアミノ酸、約 8 ~ 1 2 個のアミノ酸、約 1 0 ~ 1 5 個のアミノ酸、約 1 2 ~ 1 7 個のアミノ酸、約 1 5 ~ 2 0 個のアミノ酸、約 1 8 ~ 2 3 個のアミノ酸、約 2 0 ~ 2 5 個のアミノ酸、約 2 2 ~ 約 2 7 個のアミノ酸又は約 2 5 ~ 3 0 個のアミノ酸の欠失、挿入又は変異を有し得る。

【0136】

【0187】 実施形態では、本明細書に記載の C o V S ポリペプチドは、全 T M ドメインを欠いている。実施形態では、C o V S ポリペプチドは、T M ドメインを含む。

【0137】

C o V S ポリペプチド抗原 - C T に対する改変

【0188】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸 1 2 3 8 ~ 1 2 7 3 又は配列番号 2 のアミノ酸 1 2 2 5 ~ 1 2 6 0 に対応する配列番号 1 2 4 のアミノ酸配列を有する C T に対する 1 つ又は複数の改変を含む。

【0138】

10

20

30

40

50

【0189】 C Tのアミノ酸配列（配列番号124）を以下に示す。

T S C C S C L K G C C S C G S C C K F D E D D S E P V L K G V K L H Y T

【0139】

【0190】 実施形態では、本明細書に記載のC o V Sポリペプチドは、配列番号1又は配列番号2のC Tに対して少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は少なくとも99.5%の同一性を有するC Tを含む。C Tは、配列番号1又は配列番号2のC Tのアミノ酸配列と比較して、最大約1個、最大約2個、最大約3個、最大約4個、最大約5個、最大約10個、最大約15個、最大約20個、最大約25個又は最大約30個のアミノ酸の欠失、挿入又は変異を有し得る。C Tは、配列番号1又は配列番号2のC Tと比較して、約1～約5個のアミノ酸、約3～約10個のアミノ酸、約5～10個のアミノ酸、約8～12個のアミノ酸、約10～15個のアミノ酸、約12～17個のアミノ酸、約15～20個のアミノ酸、約18～23個のアミノ酸、約20～25個のアミノ酸、約22～約27個のアミノ酸又は約25～30個のアミノ酸の欠失、挿入又は変異を有し得る。

10

【0140】

【0191】 実施形態では、本明細書に記載のC o V Sポリペプチドは、C Tを欠いている。実施形態では、C o V Sポリペプチドは、C Tを含む。

【0141】

【0192】 実施形態では、C o V Sポリペプチドは、T M及びC Tを含む。実施形態では、C o Vスパイク（S）ポリペプチドは、膜貫通及び細胞質尾部（T M C T）（アミノ酸1201～1260に対応する）からの1つ又は複数のアミノ酸の欠失を含む。T M C Tのアミノ酸配列は、配列番号39によって表される。実施形態では、T M C Tの1つ又は複数の残基の欠失を有するC o V Sポリペプチドは、増強されたタンパク質発現を有する。実施形態では、T M C Tからの1つ又は複数の欠失を有するC o Vスパイク（S）ポリペプチドは、配列番号40、41、42、52、54、59、61、88及び89からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。実施形態では、T M-C Dからの1つ又は複数の欠失を有するC o V Sポリペプチドは、配列番号39、43、53及び60からなる群から選択される単離された核酸配列によってコードされる。

20

【0142】

C o V Sポリペプチド抗原 — 非限定的な変異の組み合わせ

30

【0193】 実施形態では、C o V Sポリペプチドは、天然C o Vスパイク（S）ポリペプチド（配列番号2）のアミノ酸56及び57の欠失を含む。

【0143】

【0194】 実施形態では、C o V Sポリペプチドは、天然C o Vスパイク（S）ポリペプチド（配列番号2）のアミノ酸131及び132の欠失を含む。

【0144】

【0195】 実施形態では、C o V Sポリペプチドは、天然C o Vスパイク（S）ポリペプチド（配列番号2）のアミノ酸56及び131の欠失を含む。実施形態では、C o V Sポリペプチドは、天然C o Vスパイク（S）ポリペプチド（配列番号2）のアミノ酸57及び131の欠失を含む。

40

【0145】

【0196】 実施形態では、C o V Sポリペプチドは、天然C o Vスパイク（S）ポリペプチド（配列番号2）のアミノ酸56、57及び131の欠失を含む。

【0146】

【0197】 実施形態では、C o V Sポリペプチドは、天然C o Vスパイク（S）ポリペプチド（配列番号2）のアミノ酸56及び132の欠失を含む。

【0147】

【0198】 実施形態では、C o V Sポリペプチドは、天然C o Vスパイク（S）ポリペプチド（配列番号2）のアミノ酸57及び132の欠失を含む。

【0148】

50

【0199】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、天然C o V スパイク (S) ポリペプチド (配列番号 2) のアミノ酸 5 6、5 7 及び 1 3 2 の欠失を含む。

【0149】

【0200】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、天然C o V スパイク (S) ポリペプチド (配列番号 2) のアミノ酸 5 6、5 7、1 3 1 及び 1 3 2 の欠失を含む。

【0150】

【0201】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、C o V S ポリペプチドの融合前コンフォメーションを安定化させる変異を含む。実施形態では、C o V S ポリペプチドは、融合前コンフォメーションを安定化させるプロリン又はグリシン置換を含む。この戦略は、それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み入れられる以下の文献に記載されているように、融合前に安定化されたMER S-C o V S タンパク質を開発するために利用されている：Proc Natl Acad Sci USA, 2017 Aug 29; 114 (35): E7348-E7357; Sci Rep, 2018 Oct 24; 8 (1):15701; 米国特許出願公開第 2 0 2 0 / 0 0 6 1 1 8 5 号; 及び P C T 出願 P C T / 米国特許出願公開第 2 0 1 7 / 0 5 8 3 7 0 号。

10

【0151】

【0202】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、L y s-9 7 3 及び V a l-9 7 4 での変異並びに不活性化フーリン切断部位を含む。実施形態では、C o V S ポリペプチドは、L y s-9 7 3 及び V a l-9 7 4 のプロリンへの変異並びに Q Q A Q (配列番号 7) 又は G S A S (配列番号 9 6) のアミノ酸配列を有する不活性化フーリン切断部位を含む。L y s-9 7 3 及び V a l-9 7 4 における変異並びに不活性化フーリン切断部位を含む例示的なC o V S ポリペプチドを図 8 に示す。実施形態では、L y s-9 7 3 及び V a l-9 7 4 のプロリンへの変異並びに不活性化フーリン切断部位を含むC o V S ポリペプチドは、配列番号 8 6 又は 8 7 のアミノ酸配列及び配列番号 9 6 の核酸配列を有する。

20

【0152】

【0203】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、L y s-9 7 3 及び V a l-9 7 4 における変異、不活性化フーリン切断部位及び融合ペプチドの 1 つ又は複数のアミノ酸の欠失を含む。実施形態では、C o V S ポリペプチドは、L y s-9 7 3 及び V a l-9 7 4 のプロリンへの変異、Q Q A Q (配列番号 7) 又は G S A S (配列番号 9 6) のアミノ酸配列を有する不活性化フーリン切断部位及び融合ペプチドの 1 つ又は複数のアミノ酸の欠失を含む。実施形態では、L y s-9 7 3 及び V a l-9 7 4 のプロリンへの変異、不活性化フーリン切断部位並びに融合ペプチドの 1 つ又は複数のアミノ酸の欠失を含むC o V S ポリペプチドは、配列番号 1 0 5 又は配列番号 1 0 6 のアミノ酸配列を有する。実施形態では、C o V S ポリペプチドは、天然C o V スパイク (S) ポリペプチド (配列番号 2) と比較して、L e u-5 のフェニルアラニンへの変異、T h r-7 のアスパラギンへの変異、P r o-1 3 のセリンへの変異、A s p-1 2 5 のチロシンへの変異、A r g-1 7 7 のセリンへの変異、L y s-4 0 4 のスレオニンへの変異、G l u-4 7 1 のリジンへの変異、A s n-4 8 8 のチロシンへの変異、H i s-6 4 2 のチロシンへの変異、T h r-1 0 1 4 のイソロイシンへの変異、L y s-9 7 3 及び V a l-9 7 4 のプロリンへの変異及び Q Q A Q (配列番号 7) 又は G S A S (配列番号 9 6) のアミノ酸配列を有する不活性化フーリン切断部位を含む。

30

40

【0153】

【0204】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、天然C o V スパイク (S) ポリペプチド (配列番号 2) と比較して、T r p-1 3 9 のシステインへの変異、L e u-4 3 9 のアルギニンへの変異、L y s-9 7 3 及び V a l-9 7 4 のプロリンへの変異並びに Q Q A Q (配列番号 7) 又は G S A S (配列番号 9 6) のアミノ酸配列を有する不活性化フーリン切断部位を含む。実施形態では、C o V S ポリペプチドは、天然C o V スパイク (S) ポリペプチド (配列番号 1) と比較して、T r p-1 5 2 のシステインへの変異、L e u-4 5 2 のアルギニンへの変異、S e r-1 3 のイソロイシンへの変異、L y s-9 8 6 及び V a l-9 8 7 のプロリンへの変異並びに Q Q A Q (配列番号 7) 又は G

50

S A S（配列番号 96）のアミノ酸配列を有する不活性化フーリン切断部位を含む。

【0154】

【0205】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、天然 C o V スパイク（S）ポリペプチド（配列番号 2）と比較して、L y s - 404 のスレオニン又はアスパラギンへの変異、G l u - 471 のリジンへの変異、A s n - 488 のチロシンへの変異、L e u - 5 のフェニルアラニンへの変異、A s p - 67 のアラニンへの変異、A s p - 202 のグリシンへの変異、アミノ酸 229 ~ 231 の 1 つ又は複数の欠失、A r g - 233 のイソロイシンへの変異、L y s - 973 及び V a l - 974 のプロリンへの変異並びに Q Q A Q（配列番号 7）又は G S A S（配列番号 96）のアミノ酸配列を有する不活性化フーリン切断部位を含む。

10

【0155】

【0206】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、天然 C o V スパイク（S）ポリペプチド（配列番号 2）と比較して、A s n - 488 のチロシンへの変異、L y s - 973 及び V a l - 974 のプロリンへの変異並びに Q Q A Q（配列番号 7）又は G S A S（配列番号 96）のアミノ酸配列を有する不活性化フーリン切断部位を含む。実施形態では、A s n - 488 のチロシンへの変異、L y s - 973 及び V a l - 974 のプロリンへの変異並びに Q Q A Q（配列番号 7）又は G S A S（配列番号 96）のアミノ酸配列を有する不活性化フーリン切断部位を有する C o V S ポリペプチドは、配列番号 112 のアミノ酸配列を含む。

20

【0156】

【0207】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、天然 C o V スパイク（S）ポリペプチド（配列番号 2）と比較して、A s p - 601 のグリシンへの変異、A s n - 488 のチロシンへの変異、L y s - 973 及び V a l - 974 のプロリンへの変異並びに Q Q A Q（配列番号 7）又は G S A S（配列番号 96）のアミノ酸配列を有する不活性化フーリン切断部位を含む。実施形態では、A s n - 488 のチロシンへの変異、L y s - 973 及び V a l - 974 のプロリンへの変異並びに Q Q A Q（配列番号 7）又は G S A S（配列番号 96）のアミノ酸配列を有する不活性化フーリン切断部位を有する C o V S ポリペプチドは、配列番号 113 のアミノ酸配列を含む。

30

【0157】

【0208】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、天然 C o V スパイク（S）ポリペプチド（配列番号 2）と比較して、アミノ酸 56、57 及び 131 の欠失、A s n - 488 のチロシンへの変異、A l a - 557 のアスパラギン酸への変異、A s p - 601 のグリシンへの変異、P r o - 668 のヒスチジンへの変異、T h r - 703 のイソロイシンへの変異、S e r - 969 のアラニンへの変異、A s p - 1105 のヒスチジンへの変異、L y s - 973 及び V a l - 974 のプロリンへの変異並びに Q Q A Q（配列番号 7）、G S A S（配列番号 96）又は G G のアミノ酸配列を有する不活性化フーリン切断部位を含む。実施形態では、アミノ酸 56、57 及び 131 の欠失、A s n - 488 のチロシンへの変異、A l a - 557 のアスパラギン酸への変異、A s p - 601 のグリシンへの変異、P r o - 668 のヒスチジンへの変異、T h r - 703 のイソロイシンへの変異、S e r - 969 のアラニンへの変異、A s p - 1105 のヒスチジンへの変異、L y s - 973 及び V a l - 974 のプロリンへの変異及び Q Q A Q（配列番号 7）又は G S A S（配列番号 96）のアミノ酸配列を有する不活性化フーリン切断部位を有する C o V S ポリペプチドは、配列番号 114 のアミノ酸配列を含む。実施形態では、アミノ酸 56、57 及び 131 の欠失、A s n - 488 のチロシンへの変異、A l a - 557 のアスパラギン酸への変異、A s p - 601 のグリシンへの変異、P r o - 668 のヒスチジンへの変異、T h r - 703 のイソロイシンへの変異、S e r - 969 のアラニンへの変異、A s p - 1105 のヒスチジンへの変異、L y s - 973 及び V a l - 974 のプロリンへの変異及び Q Q A Q（配列番号 7）又は G S A S（配列番号 96）又は G S のアミノ酸配列を有する不活性化フーリン切断部位を有する C o V S ポリペプチドは、配列番号 136 のアミノ酸配列を含む。実施形態では、アミノ酸 56、57 及び 131 の欠失、A s

30

40

50

n-488のチロシンへの変異、Ala-557のアスパラギン酸への変異、Asp-601のグリシンへの変異、Pro-668のヒスチジンへの変異、Thr-703のイソロイシンへの変異、Ser-969のアラニンへの変異、Asp-1105のヒスチジンへの変異、Lys-973及びVal-974のプロリンへの変異及びGGのアミノ酸配列を有する不活性化フーリン切断部位を有するCoV Sポリペプチドは、配列番号137又は配列番号138のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、配列番号114又は配列番号136のアミノ酸配列を有するCoV Sポリペプチドは、配列番号135の核酸配列を有する核酸によってコードされる。いくつかの実施形態では、配列番号137又は配列番号138のアミノ酸配列を有するCoV Sポリペプチドは、配列番号139の配列を有する核酸によってコードされる。

10

【0158】

【0209】 実施形態では、CoV Sポリペプチドは、天然CoVスパイク(S)ポリペプチド(配列番号2)と比較して、アミノ酸56、57及び132の欠失、Asn-488のチロシンへの変異、Ala-557のアスパラギン酸への変異、Asp-601のグリシンへの変異、Pro-668のヒスチジンへの変異、Thr-703のイソロイシンへの変異、Ser-969のアラニンへの変異、Asp-1105のヒスチジンへの変異、Lys-973及びVal-974のプロリンへの変異並びにQQAQ(配列番号7)又はGSAS(配列番号96)のアミノ酸配列を有する不活性化フーリン切断部位を含む。実施形態では、アミノ酸56、57及び132の欠失、Asn-488のチロシンへの変異、Ala-557のアスパラギン酸への変異、Asp-601のグリシンへの変異、Pro-668のヒスチジンへの変異、Thr-703のイソロイシンへの変異、Ser-969のアラニンへの変異、Asp-1105のヒスチジンへの変異、Lys-973及びVal-974のプロリンへの変異並びにQQAQ(配列番号7)又はGSAS(配列番号96)のアミノ酸配列を有する不活性化フーリン切断部位を有するCoV Sポリペプチドは、配列番号114のアミノ酸配列を含む。

20

【0159】

【0210】 実施形態では、CoV Sポリペプチドは、天然CoVスパイク(S)ポリペプチド(配列番号2)と比較して、Asn-488のチロシンへの変異、Asp-67のアラニンへの変異、Leu-229のヒスチジンへの変異、Asp-202のグリシンへの変異、Lys-404のアスパラギンへの変異、Glu-471のリジンへの変異、Ala-688のバリンへの変異、Asp-601のグリシンへの変異、Lys-973及びVal-974のプロリンへの変異並びにQQAQ(配列番号7)又はGSAS(配列番号96)のアミノ酸配列を有する不活性化フーリン切断部位を含む。実施形態では、Asn-488のチロシンへの変異、Asp-67のアラニンへの変異、Leu-229のヒスチジンへの変異、Asp-202のグリシンへの変異、Lys-404のアスパラギンへの変異、Glu-471のリジンへの変異、Ala-688のバリンへの変異、Asp-601のグリシンへの変異、Lys-973及びVal-974のプロリンへの変異並びにQQAQ(配列番号7)又はGSAS(配列番号96)のアミノ酸配列を有する不活性化フーリン切断部位を有するCoV Sポリペプチドは、配列番号115のアミノ酸配列を含む。

30

40

【0160】

【0211】 実施形態では、CoV Sポリペプチドは、K973P、V974P、不活性化フーリン切断部位、アミノ酸56の欠失、アミノ酸57の欠失、アミノ酸131の欠失、N488Y、A557D、D601G、P668H、T703I、S969A及びD1105Hから選択される1つ又は複数の改変を含み、アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するCoV Sポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、不活性化フーリン切断部位は、QQAQ(配列番号7)のアミノ酸配列を有する。実施形態では、不活性化フーリン切断部位は、GGのアミノ酸配列を有する。

【0161】

【0212】 実施形態では、CoV Sポリペプチドは、K973P、V974P、不活

50

性化フーリン切断部位、D 6 7 A、D 2 0 2 G、L 2 2 9 H、K 4 0 4 N、E 4 7 1 K、N 4 8 8 Y、D 6 0 1 G 及び A 6 8 8 V から選択される1つ又は複数の改変を含み、アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するC o V S ポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、不活性化フーリン切断部位は、Q Q A Q (配列番号7)のアミノ酸配列を有する。実施形態では、不活性化フーリン切断部位は、G Gのアミノ酸配列を有する。

【0162】

[0213] 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、不活性化フーリン切断部位、アミノ酸229～231の欠失、D 6 7 A、D 2 0 2 G、K 4 0 4 N、E 4 7 1 K、N 4 8 8 Y、D 6 0 1 G 及び A 6 8 8 V から選択される1つ又は複数の改変を含み、アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するC o V S ポリペプチドに対して付番されている。

10

【0163】

[0214] 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、Q Q A Q (配列番号7)のアミノ酸配列を有する不活性化フーリン切断部位、アミノ酸229～231の欠失；L 5 F、D 6 7 A、D 2 0 2 G、K 4 0 4 N、E 4 7 1 K、N 4 8 8 Y、D 6 0 1 G 及び A 6 8 8 V から選択される1つ又は複数の改変を含み、アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するC o V S ポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、Q Q A Q (配列番号7)のアミノ酸配列を有する不活性化フーリン切断部位、アミノ酸229～231の欠失；L 5 F、D 6 7 A、D 2 0 2 G、K 4 0 4 N、E 4 7 1 K、N 4 8 8 Y、D 6 0 1 G 及び A 6 8 8 V から選択される1つ又は複数の改変を含むC o V S ポリペプチド (アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するC o V S ポリペプチドに対して付番されている) は、配列番号144のアミノ酸配列を含む。実施形態では、配列番号144のアミノ酸配列を有するC o V S ポリペプチドは、配列番号145の配列を有する核酸によってコードされる。

20

【0164】

[0215] 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、G Gのアミノ酸配列を有する不活性化フーリン切断部位、アミノ酸229～231の欠失；L 5 F、D 6 7 A、D 2 0 2 G、K 4 0 4 N、E 4 7 1 K、N 4 8 8 Y、D 6 0 1 G 及び A 6 8 8 V から選択される1つ又は複数の改変を含み、アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するC o V S ポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、G Gのアミノ酸配列を有する不活性化フーリン切断部位、アミノ酸229～231の欠失；L 5 F、D 6 7 A、D 2 0 2 G、K 4 0 4 N、E 4 7 1 K、N 4 8 8 Y、D 6 0 1 G 及び A 6 8 8 V から選択される1つ又は複数の改変を含むC o V S ポリペプチド (アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するC o V S ポリペプチドに対して付番されている) は、配列番号144のアミノ酸配列を含む。実施形態では、配列番号144のアミノ酸配列を有するC o V S ポリペプチドは、配列番号145の配列を有する核酸によってコードされる。

30

【0165】

[0216] 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、不活性化フーリン切断部位、L 5 F、T 7 N、P 1 3 S、D 1 2 5 Y、R 1 7 7 S、K 4 0 4 T、E 4 7 1 K、N 4 8 8 Y、D 6 0 1 G、H 6 4 2 Y、T 1 0 1 4 I 及び V 1 1 6 3 F から選択される1つ又は複数の改変を含み、アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するC o V S ポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、不活性化フーリン切断部位、L 5 F、T 7 N、P 1 3 S、D 1 2 5 Y、R 1 7 7 S、K 4 0 4 T、E 4 7 1 K、N 4 8 8 Y、D 6 0 1 G、H 6 4 2 Y、T 1 0 1 4 I 及び V 1 1 6 3 F から選択される1つ又は複数の改変を含むC o V S ポリペプチド (アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するC o V S ポリペプチドに対して付番されている) は、配列番号151のアミノ酸配列を有する。実施形態では、配列番号151のアミノ酸配列を有するC o V S ポリペプチドは、配列番号150の配列を有する核酸によっ

40

50

てコードされる。

【0166】

【0217】 実施形態では、C o V Sポリペプチドは、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、不活性化フーリン切断部位、アミノ酸 2 2 9 ~ 2 3 1 の欠失、L 5 F、D 6 7 A、D 2 0 2 G、L 2 2 9 H、K 4 0 4 N、E 4 7 1 K、N 4 8 8 Y、D 6 0 1 G 及び A 6 8 8 V から選択される1つ又は複数の改変を含み、アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するC o V Sポリペプチドに対して付番されている。

【0167】

【0218】 実施形態では、C o V Sポリペプチドは、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、不活性化フーリン切断部位、K 4 0 4 N、E 4 7 1 K、N 4 8 8 Y、L 5 F、D 6 7 A、D 2 0 2 G、L 2 2 9 H、D 6 0 1 G、A 6 8 8 V 及びアミノ酸 2 2 9 ~ 2 3 1 の欠失から選択される1つ又は複数の改変を含み、アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するC o V Sポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、不活性化フーリン切断部位は、Q Q A Q（配列番号7）のアミノ酸配列を有する。実施形態では、不活性化フーリン切断部位は、G Gのアミノ酸配列を有する。

【0168】

【0219】 実施形態では、C o V Sポリペプチドは、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、不活性化フーリン切断部位、K 4 0 4 N、E 4 7 1 K 及び N 4 8 8 K から選択される1つ又は複数の改変を含み、アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するC o V Sポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、C o V Sポリペプチドは、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、不活性化フーリン切断部位、K 4 0 4 N、E 4 7 1 K 及び N 4 8 8 Y から選択される1つ又は複数の改変を含み、実施形態では、C o V Sポリペプチドは、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、不活性化フーリン切断部位、K 4 0 4 N、E 4 7 1 K 及び N 4 8 8 K から選択される1つ又は複数の改変を有するC o V SポリペプチドのRBDであり、アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するC o V Sポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、C o V Sポリペプチドは、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、不活性化フーリン切断部位、K 4 0 4 N、E 4 7 1 K 及び N 4 8 8 Y から選択される1つ又は複数の改変を有するC o V SポリペプチドのRBDであり、アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するC o V Sポリペプチドに対して付番されている。

【0169】

【0220】 実施形態では、C o V Sポリペプチドは、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、G Gのアミノ酸配列を有する不活性化フーリン切断部位、D 6 0 1 G、E 4 0 4 N、E 4 7 1 K 及び N 4 8 8 Y から選択される1つ又は複数の改変を含む。実施形態では、C o V Sポリペプチドは、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、G Gのアミノ酸配列を有する不活性化フーリン切断部位及びD 6 0 1 G変異から選択される1つ又は複数の改変を含み、アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するC o V Sポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、G Gのアミノ酸配列を有する不活性化フーリン切断部位及びD 6 0 1 G変異から選択される1つ又は複数の改変を含む、C o V Sポリペプチドは、配列番号133のアミノ酸配列を有する。

【0170】

【0221】 実施形態では、C o V Sポリペプチドは、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、不活性化フーリン切断部位（任意選択により、不活性化フーリン切断部位は、Q Q A Q（配列番号7）又はG Gである）、K 4 0 4 N、E 4 7 1 K、N 4 8 8 K、D 6 7 A、D 2 0 2 G、L 2 2 9 H、D 6 0 1 G 及び A 6 8 8 V から選択される1つ又は複数の改変を含み、アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するC o V Sポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、不活性化フーリン切断部位（任意選択により、不活性化フーリン切断部位は、Q Q A Q（配列番号7）又はG Gである）、K 4 0 4 N、E 4 7 1 K、N 4 8 8 K、D 6 7 A、D 2 0 2 G、L 2 2 9 H、D 6 0 1 G 及び A 6 8 8 V から選択される1つ又は複数の改変を含む、C o V Sポリペプチドは、配列番号132又は配列番号141のアミノ酸配列を有する。実施形態では、配列番号13

【0222】 実施形態では、C o V Sポリペプチドは、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、不活性化フーリン切断部位、W 1 3 9 C及びL 4 3 9 Rから選択される1つ又は複数の改変を含み、アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するC o V Sポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、不活性化フーリン切断部位、W 1 3 9 C及びL 4 3 9 R改変を含む、C o V Sポリペプチドは、配列番号117又は配列番号5のアミノ酸配列を有するシグナルペプチドと共に発現される。実施形態では、C o V Sポリペプチドは、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、不活性化フーリン切断部位、D 6 0 1 G、W 1 3 9 C及びL 4 3 9 Rから選択される1つ又は複数の改変を含み、アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するC o V Sポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、C o V Sポリペプチドは、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、不活性化フーリン切断部位、D 6 0 1 G、W 1 3 9 C及びL 4 3 9 R改変を含み、配列番号117又は配列番号5のアミノ酸配列を有するシグナルペプチドと共に発現される。

10

【 0 1 7 2 】
 [0 2 2 3] 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、不活性化フーリン切断部位、D 6 0 1 G、L 5 F、D 6 7 A、D 2 0 2 G、アミノ酸 2 2 9 ~ 2 3 1 の欠失、R 2 3 3 I、K 4 0 4 N、E 4 7 1 K、N 4 8 8 Y 及び A 6 8 8 V から選択される 1 つ又は複数の改変を含み、アミノ酸は、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する C o V S ポリペプチドに対して付番されている。

20

【0173】
[0224] 実施形態では、C o V Sポリペプチドは、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、不活性化フーリン切断部位（任意選択により、不活性化フーリン切断部位は、Q Q A Q（配列番号7）である）、W 1 3 9 C、S 4 8 1 P、D 6 0 1 G及びL 4 3 9 Rから選択される1つ又は複数の改変を含み、アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するC o V Sポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、C o V Sポリペプチドは、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、不活性化フーリン切断部位（任意選択により、不活性化フーリン切断部位は、Q Q A Q（配列番号7）である）、W 1 3 9 C、D 6 0 1 G及びL 4 3 9 Rから選択される1つ又は複数の改変を含み、アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するC o V Sポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、C o V Sポリペプチドは、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、不活性化フーリン切断部位（任意選択により、不活性化フーリン切断部位は、Q Q A Q（配列番号7）である）、W 1 3 9 C、S 4 8 1 P及びD 6 0 1 Gから選択される1つ又は複数の改変を含み、アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するC o V Sポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、不活性化フーリン切断部位（任意選択により、不活性化フーリン切断部位は、Q Q A Q（配列番号7）である）、W 1 3 9 C、S 4 8 1 P、D 6 0 1 G及びL 4 3 9 Rから選択される1つ又は複数の改変を含む、C o V Sポリペプチドは、配列番号153のアミノ酸配列を有する。実施形態では、配列番号153のアミノ酸配列を有するC o V Sポリペプチドは、配列番号117のアミノ酸配列を有するシグナルペプチドを含む。実施形態では、配列番号153のアミノ酸配列を有するC o V Sポリペプチドは、配列番号5のアミノ酸配列を有するシグナルペプチドを含む。

30

40

【0174】
[0225] 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、不活性化フーリン切断部位（任意選択により、不活性化フーリン切断部位は、Q Q A Q（配列番号7）である）、T 8 2 I、D 2 4 0 G、E 4 7 1 K、D 6 0 1 G及びA 6 8 8 Vから選択される1つ又は複数の改変を含み、アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するC o V S ポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、K 9 7 3 P、V 9 7 4 P、不活性化フーリン切断部位（任意選択により、不活性化フーリン切断部位は、O O A

50

Q（配列番号7）である）、T82I、D240G、E471K、D601G及びA688Vから選択される1つ又は複数の改変を含む、CoV Sポリペプチド（アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するCoV Sポリペプチドに対して付番されている）は、配列番号156のアミノ酸配列を有する。実施形態では、K973P、V974P、不活性化フーリン切断部位（任意選択により、不活性化フーリン切断部位は、QQAQ（配列番号7）である）、T82I、D240G、E471K、D601G及びA688Vから選択される1つ又は複数の改変を含む、CoV Sポリペプチド（アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するCoV Sポリペプチドに対して付番されている）は、配列番号154又は配列番号5のアミノ酸配列を有するシグナルペプチドを含む。

【0175】

【0226】 実施形態では、CoV Sポリペプチドは、K973P、V974P、不活性化フーリン切断部位（任意選択により、不活性化フーリン切断部位は、QQAQ（配列番号7）である）、T82I、D240G、S464N、D601G及びA688Vから選択される1つ又は複数の改変を含む、アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するCoV Sポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、K973P、V974P、不活性化フーリン切断部位（任意選択により、不活性化フーリン切断部位は、QQAQ（配列番号7）である）、T82I、D240G、S464N、D601G及びA688Vから選択される1つ又は複数の改変を含む、CoV Sポリペプチド（アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するCoV Sポリペプチドに対して付番されている）は、配列番号158のアミノ酸配列を有する。実施形態では、K973P、V974P、不活性化フーリン切断部位（任意選択により、不活性化フーリン切断部位は、QQAQ（配列番号7）である）、T82I、D240G、S464N、D601G及びA688Vから選択される1つ又は複数の改変を含む、CoV Sポリペプチド（アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するCoV Sポリペプチドに対して付番されている）は、配列番号154のシグナルペプチドを含む。

【0176】

【0227】 実施形態では、CoV Sポリペプチドは、K973P、V974P、不活性化フーリン切断部位（任意選択により、不活性化フーリン切断部位は、QQAQ（配列番号7）である）、アミノ酸56の欠失、アミノ酸57の欠失、アミノ酸131の欠失、N488Y変異、A557D変異、D601G変異、P668H変異、T703I変異、S969A変異及びD1105H変異から選択される1つ又は複数の改変を含む、CoV Sポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列を有する野生型SARS-CoV-2 Sポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、CoV Sポリペプチドは、K973P、V974P、不活性化フーリン切断部位（任意選択により、不活性化フーリン切断部位は、QQAQ（配列番号7）である）、アミノ酸56の欠失、アミノ酸57の欠失、アミノ酸132の欠失、N488Y変異、A557D変異、D601G変異、P668H変異、T703I変異、S969A変異及びD1105H変異から選択される1つ又は複数の改変を含む、CoV Sポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列を有する野生型SARS-CoV-2 Sポリペプチドに対して付番されている。

【0177】

【0228】 実施形態では、CoV Sポリペプチドは、K973P、V974P、不活性化フーリン切断部位（任意選択により、不活性化フーリン切断部位は、QQAQ（配列番号7）である）、D67A変異、L229H変異、R233I変異、A688V変異、N488Y変異、K404N変異、E471K変異及びD601G変異から選択される1つ又は複数の改変を含む、CoV Sポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列を有する野生型SARS-CoV-2 Sポリペプチドに対して付番されている。

【0178】

【0229】 実施形態では、CoV Sポリペプチドは、K973P、V974P、不活性化フーリン切断部位（任意選択により、不活性化フーリン切断部位は、QQAQ（配列番号7）である）、L5F変異、T7N変異、P13S変異、D125Y変異、R177

10

20

30

40

50

S変異、K404T変異、E471K変異、N488Y変異、D601G変異、H642Y変異、T1014I変異及びT1163F変異から選択される1つ又は複数の改変を含み、CoV Sポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列を有する野生型SARS-CoV-2 Sポリペプチドに対して付番されている。

【0179】

【0230】 実施形態では、CoV Sポリペプチドは、K986P、V987P、不活性化フーリン切断部位（任意選択により、不活性化フーリン切断部位は、QQAQ（配列番号7）である）、S13I変異、W152C変異及びL452R変異から選択される1つ又は複数の改変を含み、CoV Sポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列を有する野生型SARS-CoV-2 Sポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、CoV Sポリペプチドは、K986P、V987P、不活性化フーリン切断部位（任意選択により、不活性化フーリン切断部位は、QQAQ（配列番号7）である）、S13I変異、W152C変異及びL452R変異から選択される1つ又は複数の改変を含み、CoV Sポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列を有する野生型SARS-CoV-2 Sポリペプチドに対して付番されており、N末端シグナルペプチドを欠く。

10

【0180】

【0231】 実施形態では、CoVスパイク（S）ポリペプチドは、ポリペプチドリンカーを含む。実施形態では、ポリペプチドリンカーは、グリシン及びセリンを含む。実施形態では、リンカーは、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%又は約100%のグリシンを有する。

20

【0181】

【0232】 実施形態では、ポリペプチドリンカーは、(SGGG)_n（配列番号91）の反復を有し、式中、nは、1～50の整数（例えば、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又は50）である。実施形態では、ポリペプチドリンカーは、配列番号90に対応するアミノ酸配列を有する。

【0182】

【0233】 実施形態では、ポリペプチドリンカーは、(GGGS)_n（配列番号93）の反復を有し、式中、nは、1～50の整数（例えば、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又は50）である。

30

【0183】

【0234】 実施形態では、ポリペプチドリンカーは、(GGGS)_n（配列番号92）の反復を有し、式中、nは、1～50の整数（例えば、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又は50）である。

40

【0184】

【0235】 態様では、ポリペプチドリンカーは、ポリー(Gly)_nリンカーであり、式中、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、16、17、18、19又は20である。他の実施形態では、リンカーは、ジペプチド、トリペプチド及びクアドリペプチドからなる群から選択される。実施形態では、リンカーは、アラニン-セリン(AS)、ロイシン-グルタミン酸(LE)及びセリン-アルギニン(SR)からなる群から選択されるジペプチドである。

【0185】

50

【0236】 実施形態では、ポリペプチドリinkerは、天然に存在するC o V Sポリペプチド又は本明細書に開示されるC o V Sポリペプチドの1～100個の連続するアミノ酸を含む。実施形態では、ポリペプチドリinkerは、配列番号94に対応するアミノ酸配列を有する。

【0186】

【0237】 実施形態では、C o Vスパイク(S)ポリペプチドは、フォルドン(foldon)を含む。実施形態では、TMCTは、フォルドンに置き換えられる。実施形態では、フォルドンは、C o Vスパイク(S)ポリペプチドの三量体化を引き起こす。実施形態では、フォルドンは、当技術分野で公知のアミノ酸配列である。実施形態では、フォルドンは、配列番号68のアミノ酸配列を有する。実施形態では、フォルドンは、T4フィブリチン三量体化モチーフである。実施形態では、T4フィブリチン三量体化ドメインは、配列番号103のアミノ酸配列を有する。実施形態では、フォルドンは、アミノ酸配列において、ポリペプチドリinkerによってC o Vスパイク(S)ポリペプチドから分離されている。ポリペプチドリinkerの非限定的な例は、本開示全体を通して見られる。

10

【0187】

【0238】 実施形態では、本開示は、コロナウイルスSタンパク質の断片及びナノ粒子を含むC o V Sポリペプチド並びにそれを含むワクチンを提供する。実施形態では、コロナウイルスSタンパク質の断片は、10～1500アミノ酸長(例えば、約10、約20、約30、約40、約50、約60、約70、約80、約90、約100、約150、約200、約250、約300、約350、約400、約450、約500、約550、約600、約650、約700、約750、約800、約850、約900、約950、約1000、約1050、約1100、約1150、約1200、約1250、約1300、約1350、約1400、約1450又は約1500アミノ酸長)である。実施形態では、コロナウイルスSタンパク質の断片は、受容体結合ドメイン(RBD)、サブドメイン1、サブドメイン2、上部ヘリックス、融合ペプチド、結合領域、7残基反復1、中央ヘリックス、7残基反復2、NTD及びTMCTからなる群から選択される。

20

【0188】

【0239】 実施形態では、C o V Sポリペプチドは、RBD及びサブドメイン1を含む。実施形態では、RBD及びサブドメイン1を含むC o V Sポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸319～591である。

30

【0189】

【0240】 実施形態では、C o V Sポリペプチドは、コロナウイルスSタンパク質の断片を含み、このコロナウイルスSタンパク質の断片は、RBDである。RBDの非限定的な例には、SARS-C o V-2のRBD(アミノ酸配列=配列番号69)、SARSのRBD(アミノ酸配列=配列番号70)及びMERSのRBD(アミノ酸配列=配列番号71)が含まれる。

【0190】

【0241】 実施形態では、C o V Sポリペプチドは、ポリペプチドリinkerによって連結された2つ以上のRBDを含む。実施形態では、ポリペプチドリinkerは、配列番号90又は配列番号94のアミノ酸配列を有する。

40

【0191】

【0242】 実施形態では、C o V Sポリペプチドは、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個又は20個のRBDを含む。

【0192】

【0243】 いくつかの実施形態では、C o V Sポリペプチドは、ポリペプチドリinkerによって連結された2つ以上のSARS-C o V-2 RBDを含む。実施形態では、2つ以上のSARS-C o V-2 RBDを含む抗原は、配列番号72～75の1つに対応するアミノ酸配列を有する。

【0193】

50

【0244】 実施形態では、C o V Sポリペプチドは、S A R S - C o V - 2 R B D及びS A R S R B Dを含む。実施形態では、C o V Sポリペプチドは、S A R S - C o V - 2 R B D及びS A R S R B Dを含み、各R B Dは、ポリペプチドリンカーによって分離されている。実施形態では、S A R S - C o V - 2 R B D及びS A R S R B Dを含むC o V Sポリペプチドは、配列番号76～79からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

【0194】

【0245】 実施形態では、C o V Sポリペプチドは、S A R S - C o V - 2 R B D及びM E R S R B Dを含む。実施形態では、C o V Sポリペプチドは、S A R S - C o V - 2 R B D及びM E R S R B Dを含み、各R B Dは、ポリペプチドリンカーによって分離されている。

10

【0195】

【0246】 実施形態では、C o V Sポリペプチドは、S A R S R B D及びM E R S R B Dを含む。実施形態では、C o V Sポリペプチドは、S A R S R B D及びM E R S R B Dを含み、各R B Dは、ポリペプチドリンカーによって分離されている。

【0196】

【0247】 実施形態では、C o V Sポリペプチドは、S A R S - C o V - 2 R B D、S A R S R B D及びM E R S R B Dを含む。実施形態では、C o V Sポリペプチドは、S A R S - C o V - 2 R B D、S A R S R B D及びM E R S R B Dを含み、各R B Dは、ポリペプチドリンカーによって分離されている。実施形態では、S A R S - C o V - 2 R B D、S A R S R B D及びM E R S R B Dを含むC o V Sポリペプチドは、配列番号80～83からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

20

【0197】

【0248】 実施形態では、本明細書に記載のC o V Sポリペプチドは、N末端シグナルペプチドと共に発現される。実施形態では、N末端シグナルペプチドは、配列番号5のアミノ酸配列(M F V F L V L L P L V S S)を有する。実施形態では、N末端シグナルペプチドは、配列番号117のアミノ酸配列(M F V F L V L L P L V S I)を有する。実施形態では、N末端シグナルペプチドは、配列番号154のアミノ酸配列(M F V F F V L L P L V S S)を有する。実施形態では、シグナルペプチドは、C o V Sタンパク質の発現を可能にする任意のシグナルペプチドで置換され得る。実施形態では、C o V Sタンパク質シグナルペプチドのアミノ酸の1つ又は複数が欠失又は変異し得る。開始メチオニン残基は、発現を開始するために維持される。実施形態では、C o V Sポリペプチドは、配列番号35、配列番号37、配列番号95、配列番号43、配列番号47、配列番号50、配列番号53、配列番号55、配列番号57、配列番号96、配列番号60、配列番号131、配列番号135、配列番号142、配列番号145、配列番号148及び配列番号150からなる群から選択される核酸配列によってコードされる。実施形態では、C o V SポリペプチドのN末端シグナルペプチドは、天然C o Vスパイク(S)シグナルポリペプチド(配列番号5)と比較して、S e r - 13に変異を含む。実施形態では、S e r - 13は、任意の天然アミノ酸に変異している。実施形態では、S e r - 13は、アラニン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、スレオニン又はバリンに変異している。実施形態では、S e r - 13は、イソロイシンに変異している。

30

40

【0198】

【0249】 宿主細胞におけるC o V Sタンパク質の発現に続いて、N末端シグナルペプチドが切断されて成熟C o Vタンパク質配列(配列番号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及び158、164～168)が得られる。実施形態では、シグナルペプチドは、宿主細胞プロテアーゼによって切断される。態様では、完全長タンパク質を宿主細胞から単離し、続いてシグナルペプチドを切断することができる。

50

【0199】

【0250】 発現及び精製中の、配列番号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、159～163に対応するアミノ酸配列を有するC o Vスパイク(S)ポリペプチドからのシグナルペプチドの切断後、配列番号2、4、38、41、44、48、51、54、58、61、63、65、67、73、75、78、79、82、83、85、106、108、89及び110、112～115、132、133、114、138、141、144、147、151、153、156及び158、164～168からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する成熟ポリペプチドが得られ、この成熟ポリペプチドは、C o V Sナノ粒子ワクチン又はC o V Sナノ粒子を生成するために使用される。

10

【0200】

【0251】 有利には、開示されるC o V Sポリペプチドは、天然C o Vスパイク(S)タンパク質と比較して、タンパク質発現及び安定性が増強され得る。

【0201】

【0252】 実施形態では、本明細書に記載のC o V Sポリペプチドは、天然コロナウイルスSタンパク質(配列番号2)からのさらなる改変を含む。実施形態では、本明細書に記載のコロナウイルスSタンパク質は、天然コロナウイルスSタンパク質に対して少なくとも80%、又は少なくとも90%、又は少なくとも95%、又は少なくとも97%、又は少なくとも99%の同一性を示す。当業者は、既知の技術を使用して、天然タンパク質又は本明細書に記載の任意のC o V Sポリペプチドに対する組換えコロナウイルスSタンパク質の同一性パーセントを計算することになる。例えば、パーセンテージ同一性は、オンラインで入手できるツールCLUSTALW2又はBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)を使用して計算することができる。CLUSTALW2ペアワイズアライメントには、以下のデフォルトパラメータを使用することができる: Protein Weight Matrix=Gonnet; Gap Open=10; Gap Extension=0.1。

20

【0202】

【0253】 実施形態では、本明細書に記載のC o V Sポリペプチドは、配列番号87のアミノ酸配列を有するC o V Sポリペプチドと少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は少なくとも99.5%同一である。C o V Sポリペプチドは、配列番号87のアミノ酸配列を有するC o V Sポリペプチドと比較して、最大約1個、最大約2個、最大約3個、最大約4個、最大約5個、最大約10個、最大約15個、最大約20個、最大約25個、最大約30個、最大約35個、最大約40個、最大約45個又は最大約50個のアミノ酸の欠失、挿入又は変異を有し得る。C o V Sポリペプチドは、配列番号87のアミノ酸配列を有するC o V Sポリペプチドと比較して、約1～約5個のアミノ酸、約3～約10個のアミノ酸、約5～10個のアミノ酸、約8～12個のアミノ酸、約10～15個のアミノ酸、約12～17個のアミノ酸、約15～20個のアミノ酸、約18～23個のアミノ酸、約20～25個のアミノ酸、約22～約27個のアミノ酸、約25～30個のアミノ酸、約30～35個のアミノ酸、約35～40個のアミノ酸、約40～45個のアミノ酸又は約45～50個のアミノ酸の欠失、挿入又は変異を有し得る。実施形態では、本明細書に記載のC o V Sポリペプチドは、コロナウイルスSタンパク質(配列番号87)と比較して、約1個、約2個、約3個、約4個、約5個、約6個、約7個、約8個、約9個、約10個、約11個、約12個、約13個、約14個、約15個、約16個、約17個、約18個、約19個、約20個、約21個、約22個、約23個、約24個又は約25個の置換を含む。

30

40

【0203】

【0254】 実施形態では、本明細書に記載のC o V Sポリペプチドは、配列番号2、4、38、41、44、48、51、54、58、61、63、65、67、73、75

50

、78、79、82、83、85、106、108、89及び110、112～115、132、133、114、138、141、144、147、151、153、156及び158、164～168のいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を有するCoV Sポリペプチドと少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は少なくとも99.5%同一である。CoV Sポリペプチドは、配列番号2、4、38、41、44、48、51、54、58、61、63、65、67、73、75、78、79、82、83、85、106、108、89及び110、112～115、132、133、114、138、141、144、147、151、153、156及び158、164～168のいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を有するCoV Sポリペプチドのアミノ酸配列と比較して、最大約1個、最大約2個、最大約3個、最大約4個、最大約5個、最大約10個、最大約15個、最大約20個、最大約25個、最大約30個、最大約35個、最大約40個、最大約45個又は最大約50個のアミノ酸の欠失、挿入又は変異を有し得る。CoV Sポリペプチドは、配列番号2、4、38、41、44、48、51、54、58、61、63、65、67、73、75、78、79、82、83、85、106、108、89及び110、112～115、132、133、114、138、141、144、147、151、153、156及び158、164～168のいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を有するCoV Sポリペプチドと比較して、約1～約5個のアミノ酸、約3～約10個のアミノ酸、約5～10個のアミノ酸、約8～12個のアミノ酸、約10～15個のアミノ酸、約12～17個のアミノ酸、約15～20個のアミノ酸、約18～23個のアミノ酸、約20～25個のアミノ酸、約22～約27個のアミノ酸、約25～30個のアミノ酸、約30～35個のアミノ酸、約35～40個のアミノ酸、約40～45個のアミノ酸又は約45～50個のアミノ酸の欠失、挿入又は変異を有し得る。実施形態では、本明細書に記載のCoV Sポリペプチドは、コロナウイルスSタンパク質（配列番号87）と比較して、約1個、約2個、約3個、約4個、約5個、約6個、約7個、約8個、約9個、約10個、約11個、約12個、約13個、約14個、約15個、約16個、約17個、約18個、約19個、約20個、約21個、約22個、約23個、約24個又は約25個の置換を含む。

10

20

30

40

50

【0204】

【0255】 実施形態では、コロナウイルスSポリペプチドは、N末端、C末端又はN末端及びC末端の両方で伸長される。態様では、伸長は、精製又は検出などの機能に有用なタグである。態様では、タグは、エピトープを含む。例えば、タグは、ポリグルタミン酸タグ、FLAGタグ、HAタグ、ポリHisタグ（約5～10個のヒスチジンを有する）（配列番号101）、ヘキサヒスチジントグ（配列番号100）、8X-Hisタグ（8個のヒスチジンを有する）（配列番号102）、Mycタグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼタグ、緑色蛍光タンパク質タグ、マルトース結合タンパク質タグ、チオレドキシンタグ又はFcタグであり得る。他の態様では、伸長は、発現を促進するためにタンパク質に融合されたN末端シグナルペプチドであり得る。このようなシグナルペプチドは、多くの場合、細胞内での発現中に切断されるが、一部のナノ粒子には、無傷のシグナルペプチドを含む抗原が含まれ得る。従って、ナノ粒子が抗原を含む場合、抗原は、伸長を含み得るため、ナノ粒子に組み込まれると、融合タンパク質であり得る。配列に対する同一性を計算する目的では、伸長は含まれない。実施形態では、タグは、プロテアーゼ切断部位である。プロテアーゼ切断部位の非限定的な例には、HRV3Cプロテアーゼ切断部位、キモトリプシン、トリプシン、エラスターゼ、エンドペプチダーゼ、カスパーゼ-1、カスパーゼ-2、カスパーゼ-3、カスパーゼ-4、カスパーゼ-5、カスパーゼ-6、カスパーゼ-7、カスパーゼ-8、カスパーゼ-9、カスパーゼ-10、エンテロキナーゼ、Xa因子、グランザイムB、TEVプロテアーゼ及びトロンピンが含まれる。実施形態では、プロテアーゼ切断部位は、HRV3Cプロテアーゼ切断部位である。実施形態では、プロテアーゼ切断部位は、配列番号98のアミノ酸配列を含む。

【0205】

【0256】 実施形態では、C o V S糖タンパク質は、融合タンパク質を含む。実施形態では、C o V S糖タンパク質は、N末端融合タンパク質を含む。実施形態では、C o V S糖タンパク質は、C末端融合タンパク質を含む。実施形態では、融合タンパク質は、タンパク質の発現、精製又は検出に有用なタグを包含する。実施形態では、タグは、ポリH i sタグ（約5～10個のヒスチジンを有する）、M y cタグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼタグ、緑色蛍光タンパク質タグ、マルトース結合タンパク質タグ、チオレドキシントグ、Strepタグ、Twin-Strepタグ又はF cタグである。実施形態では、タグは、F cタグである。実施形態では、F cタグは、単量体、二量体又は三量体である。実施形態では、タグは、ヘキサヒスチジントグ、例えば6つのヒスチジンを含むポリH i sタグ（配列番号100）である。実施形態では、タグは、配列番号99のアミノ酸配列を有するTwin-Strepタグである。

10

【0206】

【0257】 実施形態では、C o V Sポリペプチドは、別のコロナウイルスタンパク質を含む融合タンパク質である。実施形態では、他のコロナウイルスタンパク質は、同じコロナウイルスに由来する。実施形態では、他のコロナウイルスタンパク質は、異なるコロナウイルスに由来する。

【0207】

【0258】 態様では、C o V Sタンパク質は、切断され得る。例えば、N末端は、約10個のアミノ酸、約30個のアミノ酸、約50個のアミノ酸、約75個のアミノ酸、約100個のアミノ酸又は約200個のアミノ酸によって切断され得る。C末端は、N末端の代わりに切断するか、又はN末端に加えて切断することができる。例えば、C末端は、約10個のアミノ酸、約30個のアミノ酸、約50個のアミノ酸、約75個のアミノ酸、約100個のアミノ酸又は約200個のアミノ酸によって切断され得る。切断を有するタンパク質に対する同一性を計算する目的では、タンパク質の残りの部分について同一性を測定する。

20

【0208】

C o Vスパイク（S）ポリペプチドを含むナノ粒子

【0259】 実施形態では、成熟C o V Sポリペプチド抗原を使用して、コロナウイルスSナノ粒子を含むワクチンを作製する。実施形態では、本開示のナノ粒子は、本明細書に記載のC o V Sポリペプチドを含む。実施形態では、本開示のナノ粒子は、界面活性剤コアに会合したC o V Sポリペプチドを含む。界面活性剤の存在により、抗原をまとめて提示するコアを形成することによってナノ粒子の形成が促進される。実施形態では、ナノ粒子は、頭部領域が外側に突出し、疎水性領域及びP S 80界面活性剤が糖タンパク質に囲まれた中心コアを形成する、マルチオリゴマー糖タンパク質-界面活性剤（例えば、P S 80）ナノ粒子に組み込まれたC o V Sポリペプチドを含み得る。実施形態では、C o V Sポリペプチドは、界面活性剤コアへのタンパク質の会合を促進する膜貫通ドメインを本質的に含むか又は含むように適合される。実施形態では、C o V Sポリペプチドは、頭部ドメインを含む。図10は、本開示のC o V Sポリペプチドの例示的な構造を示す。主に、C o V Sポリペプチド三量体の膜貫通ドメインは、界面活性剤に会合しているが；ポリペプチドの他の部分も相互作用し得る。有利には、ナノ粒子は、環境ストレスに対する耐性が改善されるため、界面活性剤の周りにタンパク質の複数のコピーがまとめられることにより、安定性が向上し、及び／又は免疫系への提示が改善される。

30

40

【0209】

【0260】 実施形態では、界面活性剤コアは、非イオン性界面活性剤コアである。実施形態では、C o V Sポリペプチドは、非イオン性界面活性剤コアと会合している。実施形態では、界面活性剤は、ポリソルベート-20（P S 20）、ポリソルベート-40（P S 40）、ポリソルベート-60（P S 60）、ポリソルベート-65（P S 65）及びポリソルベート-80（P S 80）からなる群から選択される。

【0210】

【0261】 実施形態では、界面活性剤は、P S 80である。

50

【0211】

【0262】 実施形態では、C o V S ポリペプチドは、三量体を形成する。実施形態では、C o V S ポリペプチドナノ粒子は、非イオン性界面活性剤コアを取り囲む複数のポリペプチド三量体から構成される。実施形態では、ナノ粒子は、少なくとも約1個の三量体又はそれを超えるものを含む。実施形態では、ナノ粒子は、スパイクタンパク質の少なくとも約5～約30個の三量体を含む。実施形態では、各ナノ粒子は、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個又は15個、20個、25個又は30個（これらの間のすべての値及び範囲を含む）の三量体を含み得る。本明細書に開示される組成物は、異なる数の三量体を有するナノ粒子を含み得る。例えば、組成物は、三量体の数が2～9個の範囲であるナノ粒子を含み得る；実施形態では、組成物中のナノ粒子は、2～6個の三量体を含み得る。実施形態では、組成物は、1ナノ粒子当たり2～6個の三量体又は1ナノ粒子当たり2～9個の三量体を有するナノ粒子の異種集団を含む。実施形態では、組成物は、ナノ粒子の実質的に均一な集団を含み得る。例えば、集団は、5個の三量体を有する約95%のナノ粒子を含み得る。

10

【0212】

【0263】 本明細書に開示されるナノ粒子は、粒径が様々である。実施形態では、本明細書に開示されるナノ粒子は、Z-averageサイズが約20nm～約60nm、約20nm～約50nm、約20nm～約45nm、約20nm～約35nm、約20nm～約30nm、約25nm～約35nm又は約25nm～約45nmの範囲である。特に明記しない限り、粒径（Z-average）は、Zetasizer NanoZS（Malvern, UK）を使用する動的光散乱（DLS）によって測定される。

20

【0213】

【0264】 実施形態では、本明細書に開示されるC o V S ポリペプチドを含むナノ粒子は、野生型C o V S ポリペプチドを含むナノ粒子と比較して粒径が小さい。実施形態では、C o V S ポリペプチドは、粒径が少なくとも約40%小さい、例えば粒径が少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%又は少なくとも約85%小さい。

【0214】

【0265】 本明細書に開示されるC o V S ポリペプチドを含むナノ粒子は、野生型C o V S ポリペプチドを含むナノ粒子よりもサイズ、形状及び質量が均一である。不均一性の尺度である多分散性指数（PDI）は、特に明記しない限り、Malvern Setasizerを使用する動的光散乱によって測定される。実施形態では、本明細書で測定される粒子は、約0.2～約0.45、例えば約0.2、約0.25、約0.29、約0.3、約0.35、約0.40又は約0.45のPDIを有する。実施形態では、本明細書で測定されるナノ粒子は、野生型C o V S ポリペプチドを含むナノ粒子のPDIよりも少なくとも約25%小さいPDI、例えば少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%又は少なくとも約60%小さいPDIを有する。

30

【0215】

【0266】 C o V S ポリペプチド及びそれを含むナノ粒子は、野生型C o V S ポリペプチド又はそのナノ粒子と比較して熱安定性が改善されている。C o V S ポリペプチドの熱安定性は、特に明記しない限り、示差走査熱量測定（DSC）を使用して測定される。転移エンタルピー（ ΔH_{cal} ）は、C o V S ポリペプチドを展開するために必要なエネルギーである。実施形態では、C o V S ポリペプチドは、野生型C o V S ポリペプチドと比較して増加した ΔH_{cal} を有する。実施形態では、C o V S ポリペプチドの ΔH_{cal} は、野生型C o V S ポリペプチドの ΔH_{cal} よりも約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍又は約10倍大きい。

40

【0216】

【0267】 本明細書に開示されるワクチン組成物は、いくつかのナノ粒子タイプを含み

50

得る。態様では、ナノ粒子タイプは、二量体又は単量体であり得る異方性ロッドの形態である。他の態様では、ナノ粒子タイプは、球状オリゴマーである。さらに他の態様では、ナノ粒子は、最初の2つのタイプの中間の沈降特性を有する中間ナノ粒子として説明することができる。ナノ粒子タイプの形成は、製造プロセス中に界面活性剤及びタンパク質の濃度を制御することによって調節することができる。沈降係数を測定することによってナノ粒子タイプを決定することができる。

【0217】

C o V S ポリペプチド抗原を含むナノ粒子の製造

【0268】 本開示のナノ粒子は、天然に存在しない生成物であり、その成分は、自然界では一緒に存在しない。一般に、本明細書に開示される方法は、界面活性剤交換アプローチを使用し、このアプローチでは、第1の界面活性剤を使用してタンパク質を単離し、次いでその第1の界面活性剤を第2の界面活性剤と交換してナノ粒子を形成する。

【0218】

【0269】 ナノ粒子に含まれる抗原は、典型的には、宿主細胞における組換え発現によって産生される。標準的な組換え技術を使用することができる。実施形態では、C o V S ポリペプチドは、バキュロウイルス系を使用して昆虫宿主細胞で発現される。実施形態では、バキュロウイルスは、カテプシンL ノックアウトバキュロウイルス、キチナーゼ ノックアウトバキュロウイルスである。任意選択により、バキュロウイルスは、カテプシンL 及びキチナーゼの両方についてダブルノックアウトのバキュロウイルスである。高レベルの発現は、昆虫細胞発現系で達成され得る。昆虫細胞の非限定的な例は、ツマジロクサヨトウ (*Spodoptera frugiperda*) (S f) 細胞、例えばS f 9、S f 21、イラクサギヌワバ (*Trichoplusia ni*) 細胞、例えばハイファイブ (High Five) 細胞及びショウジョウバエ (*Drosophila*) S 2 細胞である。実施形態では、本明細書に記載のC o V S ポリペプチドは、任意の適切な宿主細胞で産生される。実施形態では、宿主細胞は、昆虫細胞である。実施形態では、昆虫細胞は、S f 9 細胞である。

【0219】

【0270】 典型的なトランスフェクション及び細胞増殖法を使用して、細胞を培養することができる。ベクター、例えば融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターは、当技術分野で周知の方法に従って宿主細胞にトランスフェクトすることができる。例えば、核酸の真核細胞への導入は、リン酸カルシウム共沈、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション及びポリアミントランスフェクション試薬を使用するトランスフェクションによって達成することができる。一実施形態では、ベクターは、組換えバキュロウイルスである。

【0220】

【0271】 宿主細胞を増殖させる方法には、限定されるものではないが、バッチ培養技術、流加培養技術、連続及び灌流細胞培養技術が含まれる。細胞培養とは、精製及び分離のための、細胞が増殖してタンパク質（例えば、組換えタンパク質）を発現するバイオリアクター（発酵チャンバー）内での細胞の成長及び増殖を意味する。典型的には、細胞培養は、滅菌され、制御された温度及び大気条件下においてバイオリアクター内で行われる。バイオリアクターは、細胞培養に使用されるチャンバーであり、温度、雰囲気、攪拌及び／又はpHなどの環境条件を監視することができる。一実施形態では、バイオリアクターは、ステンレス鋼チャンバーである。別の実施形態では、バイオリアクターは、滅菌済みのプラスチックバッグ（例えば、Cellbag（登録商標）、Wave Biotech, Bridgewater, N.J.）である。他の実施形態では、滅菌済みプラスチックバッグは、約50L～3500Lのバッグである。

【0221】

C o V スパイク (S) タンパク質抗原を含むナノ粒子の抽出及び精製

【0272】 宿主細胞の増殖後、界面活性剤及び精製プロトコルを使用して宿主細胞からタンパク質を回収することができる。宿主細胞を48～96時間増殖させたら、細胞を培地から単離し、界面活性剤を含む溶液を加えて細胞膜を可溶化し、タンパク質を界面活性

剤抽出物に放出させる。Triton X-100及びTERGITOL（登録商標）ノニルフェノールエトキシレート（NP-9としても知られる）は、それぞれ抽出に適した界面活性剤である。界面活性剤は、約0.1%～約1.0%の最終濃度まで添加することができる。例えば、濃度は、約0.1%、約0.2%、約0.3%、約0.5%、約0.7%、約0.8%又は約1.0%であり得る。濃度範囲は、約0.1%～約0.3%であり得る。態様では、濃度は、約0.5%である。

【0222】

【0273】 他の態様では、異なる第1の界面活性剤を使用して、タンパク質を宿主細胞から単離することができる。例えば、第1の界面活性剤は、ビス（ポリエチレングリコールビス[イミダゾイルカルボニル]）、ノノキシノール-9、ビス（ポリエチレングリコールビス[イミダゾイルカルボニル]）、BRIJ（登録商標）ポリエチレングリコールドデシルエーテル35、BRIJ（登録商標）ポリエチレングリコール（3）セチルエーテル56、BRIJ（登録商標）アルコールエトキシレート72、BRIJ（登録商標）ポリオキシル2ステアリルエーテル76、BRIJ（登録商標）ポリエチレングリコールモノオレイルエーテル92V、BRIJ（登録商標）ポリオキシエチレン（10）オレイルエーテル97、BRIJ（登録商標）ポリエチレングリコールヘキサデシルエーテル58P、CREMOPHOR（登録商標）ELマクロゴルグリセロールリシノレート、デカエチレングリコールモノドデシルエーテル、N-デカノイル-N-メチルグルカミン、n-デシル α -D-グルコピラノシド、デシル β -D-マルトピラノシド、n-ドデカノイル-N-メチルグルカミド、n-ドデシル α -D-マルトシド、n-ドデシル β -D-マルトシド、n-ドデシル β -D-マルトシド、ヘプタエチレングリコールモノデシルエーテル、ヘプタエチレングリコールモノドデシルエーテル、ヘプタエチレングリコールモノテトラデシルエーテル、n-ヘキサデシル β -D-マルトシド、ヘキサエチレングリコールモノドデシルエーテル、ヘキサエチレングリコールモノヘキサデシルエーテル、ヘキサエチレングリコールモノオクタデシルエーテル、ヘキサエチレングリコールモノテトラデシルエーテル、Igepal CA-630、Igepal CA-630、メチル-6-0-（N-ヘプチルカルバモイル）- α -D-グルコピラノシド、ノナエチレングリコールモノドデシルエーテル、N-ノナノイル-N-メチルグルカミン、N-ノナノイル-N-メチルグルカミン、オクタエチレングリコールモノデシルエーテル、オクタエチレングリコールモノドデシルエーテル、オクタエチレングリコールモノヘキサデシルエーテル、オクタエチレングリコールモノオクタデシルエーテル、オクタエチレングリコールモノテトラデシルエーテル、オクチル- β -D-グルコピラノシド、ペンタエチレングリコールモノデシルエーテル、ペンタエチレングリコールモノドデシルエーテル、ペンタエチレングリコールモノヘキサデシルエーテル、ペンタエチレングリコールモノヘキシルエーテル、ペンタエチレングリコールモノオクタデシルエーテル、ペンタエチレングリコールモノオクチルエーテル、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテル、ポリエチレングリコールエーテルW-1、ポリオキシエチレン10トリデシルエーテル、ポリオキシエチレン100ステアレート、ポリオキシエチレン20イソヘキサデシルエーテル、ポリオキシエチレン20オレイルエーテル、ポリオキシエチレン40ステアレート、ポリオキシエチレン50ステアレート、ポリオキシエチレン8ステアレート、ポリオキシエチレンビス（イミダゾリルカルボニル）、ポリオキシエチレン25プロピレングリコールステアレート、キラヤ樹皮由来サポニン、SPAN（登録商標）20ソルビタンラウレート、SPAN（登録商標）40ソルビタンモノパルミテート、SPAN（登録商標）60ソルビタンステアレート、SPAN（登録商標）65ソルビタントリスステアレート、SPAN（登録商標）80ソルビタンモノオレエート、SPAN（登録商標）85ソルビタントリオレエート、TERGITOL（登録商標）第2級アルコールエトキシレート15-S-12型、TERGITOL（登録商標）第2級アルコールエトキシレート15-S-30型、TERGITOL（登録商標）第2級アルコールエトキシレート15-S-5型、TERGITOL（登録商標）第2級アルコールエトキシレート15-S-7型、TERGITOL（登録商標）第2級アルコールエトキシレート15-S-9型、TERGITOL（登録商標）ノニルフェノールエトキシレートNP-10型、TERGITOL（登録商標）ノニルフ

10

20

30

40

50

エノールエトキシレートNP-4型、TERGITOL（登録商標）ノニルフェノールエトキシレートNP-40型、TERGITOL（登録商標）ノニルフェノールエトキシレートNP-7型、TERGITOL（登録商標）ノニルフェノールエトキシレートNP-9型、TERGITOL（登録商標）分岐第2級アルコールエトキシレートTMN-10型、TERGITOL（登録商標）分岐第2級アルコールエトキシレートTMN-6型、TRITON（商標）X-100ポリエチレングリコールtert-オクチルフェニルエーテル又はこれらの組み合わせであり得る。

【0223】

【0274】 次いで、ナノ粒子を、遠心分離を使用して細胞破片から単離することができる。実施形態では、塩化セシウム、スクロース及びイオジキサノールを使用するなどの勾配遠心分離を使用することができる。例えば、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー及びゲル濾過クロマトグラフィーを含む標準的な精製技術などの他の技術を代替として又は追加で使用するすることができる。

10

【0224】

【0275】 例えば、第1のカラムは、FRACTOGEL（登録商標）EMDメタクリレートベースのポリマービーズTMAE（EMD Millipore）などのイオン交換クロマトグラフィー樹脂であり得、第2のカラムは、レンチル（レンズマメ（*Lens culinaris*））レクチン親和性樹脂であり得、及び第3のカラムは、FRACTOGEL（登録商標）EMDメタクリレートベースのポリマービーズSO3（EMD Millipore）樹脂などの陽イオン交換カラムであり得る。他の態様では、陽イオン交換カラムは、MMCカラム又はNuvia C Primeカラム（Bio-Rad Laboratories, Inc）であり得る。好ましくは、本明細書に開示される方法は、界面活性剤抽出カラム；例えば疎水性相互作用カラムを使用しない。そのようなカラムは、多くの場合、精製中に界面活性剤を除去するために使用されるが、本明細書に開示される方法に悪影響を与え得る。

20

【0225】

C o V S ポリペプチド抗原を含むナノ粒子の界面活性剤交換

【0276】 ナノ粒子を形成するために、宿主細胞からタンパク質を抽出するために使用される第1の界面活性剤は、ナノ粒子構造に到達するように第2の界面活性剤で実質的に置き換えられる。NP-9は、好ましい抽出界面活性剤である。典型的には、ナノ粒子は、HPLCで測定すると検出可能なNP-9を含まない。第2の界面活性剤は、典型的には、PS20、PS40、PS60、PS65及びPS80からなる群から選択される。好ましくは、第2の界面活性剤は、PS80である。

30

【0226】

【0277】 特定の態様では、界面活性剤交換を、アフィニティークロマトグラフィーを使用して行って、これらの炭水化物部分を介して糖タンパク質を結合させる。例えば、アフィニティークロマトグラフィーは、マメ科レクチンカラムを使用することができる。マメ科レクチンは、元々植物で同定されたタンパク質であり、炭水化物残基と特異的及び可逆的に相互作用することが分かっている。例えば、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を参照されたい。適切なレクチンには、コンカナバリンA（con A）、エンドウレクチン、イガマメレクチン（sainfoin lect）及びレンチルレクチンが含まれる。レンチルレクチンは、その結合特性により界面活性剤交換に好ましいカラムである。レクチンカラムは、市販されており；例えば、Capto Lentil Lectinは、GE Healthcareから入手可能である。いくつかの態様では、レンチルレクチンカラムは、組換えレクチンを使用することができる。分子レベルでは、炭水化物部分がレンチルレクチンに結合し、タンパク質のアミノ酸を遊離させて界面活性剤の周りに合体させ、抗原の複数のコピーを有するナノ粒子、例えば界面活性剤に固定された二量体、三量体又は四量体であり得る糖タンパク質オリゴマーを提供する界面活性剤コアの形成をもたらすと考えられている。実施形態では、C o V S ポリペプチドは、三量体を形

40

50

成する。実施形態では、C o V S ポリペプチド三量体は、界面活性剤に固定される。実施形態では、各C o V S ポリペプチドナノ粒子は、非イオン性コアに会合した少なくとも1つの三量体を含む。

【0227】

【0278】 界面活性剤は、界面活性剤交換中にナノ粒子を形成するためにタンパク質と共にインキュベートされると、初期の精製工程中に最大約0.1% (w/v) 存在する可能性があり、この量は、最適な安定性を有する最終ナノ粒子を達成するために低減される。例えば、非イオン性界面活性剤（例えば、PS80）は、約0.005% (v/v) ~ 約0.1% (v/v)、例えば約0.005% (v/v)、約0.006% (v/v)、約0.007% (v/v)、約0.008% (v/v)、約0.009% (v/v)、約0.01% (v/v)、約0.015% (v/v)、約0.02% (v/v)、約0.025% (v/v)、約0.03% (v/v)、約0.035% (v/v)、約0.04% (v/v)、約0.045% (v/v)、約0.05% (v/v)、約0.055% (v/v)、約0.06% (v/v)、約0.065% (v/v)、約0.07% (v/v)、約0.075% (v/v)、約0.08% (v/v)、約0.085% (v/v)、約0.09% (v/v)、約0.095% (v/v) 又は約0.1% (v/v) のPS80であり得る。実施形態では、ナノ粒子は、約0.03% ~ 約0.05% のPS80を含む。実施形態では、ナノ粒子は、約0.01% (v/v) のPS80を含む。

10

【0228】

【0279】 実施形態では、精製されたC o V S ポリペプチドは、透析される。実施形態では、透析は、精製後に行われる。実施形態では、C o V S ポリペプチドは、リン酸ナトリウム、NaCl及びPS80を含む溶液中で透析される。実施形態では、リン酸ナトリウムを含む透析溶液は、約5mM ~ 約100mMのリン酸ナトリウム、例えば約5mM、約10mM、約15mM、約20mM、約25mM、約30mM、約35mM、約40mM、約45mM、約50mM、約55mM、約60mM、約65mM、約70mM、約75mM、約80mM、約85mM、約90mM、約95mM又は約100mMのリン酸ナトリウムを含む。実施形態では、リン酸ナトリウムを含む溶液のpHは、約6.5、約6.6、約6.7、約6.8、約6.9、約7.0、約7.1、約7.2、約7.3、約7.4又は約7.5である。実施形態では、塩化ナトリウムを含む透析溶液は、約50mM ~ 約500mMのNaCl、例えば約50mM、約60mM、約70mM、約80mM、約90mM、約100mM、約110mM、約120mM、約130mM、約140mM、約150mM、約160mM、約170mM、約180mM、約190mM、約200mM、約210mM、約220mM、約230mM、約240mM、約250mM、約260mM、約270mM、約280mM、約290mM、約300mM、約310mM、約320mM、約330mM、約340mM、約350mM、約360mM、約370mM、約380mM、約390mM、約400mM、約410mM、約420mM、約430mM、約440mM、約450mM、約460mM、約470mM、約480mM、約490mM又は約500mMのNaClを含む。実施形態では、PS80を含む透析溶液は、約0.005% (v/v)、約0.006% (v/v)、約0.007% (v/v)、約0.008% (v/v)、約0.009% (v/v)、約0.01% (v/v)、約0.015% (v/v)、約0.02% (v/v)、約0.025% (v/v)、約0.03% (v/v)、約0.035% (v/v)、約0.04% (v/v)、約0.045% (v/v)、約0.05% (v/v)、約0.055% (v/v)、約0.06% (v/v)、約0.065% (v/v)、約0.07% (v/v)、約0.075% (v/v)、約0.08% (v/v)、約0.085% (v/v)、約0.09% (v/v)、約0.095% (v/v) 又は約0.1% (v/v) のPS80を含む。実施形態では、透析溶液は、約25mMのリン酸ナトリウム (pH 7.2)、約300mMのNaCl及び約0.01% (v/v) のPS80を含む。

20

30

40

【0229】

【0280】 界面活性剤交換は、上記のように精製され、貯蔵のために凍結され、次いで

50

界面活性剤交換のために解凍されたタンパク質で行うことができる。

【0230】

【0281】 本明細書に開示される組成物の安定性は、様々な方法で測定することができる。1つのアプローチでは、過酷な保管条件を模倣することによってナノ粒子にストレスを与えるように設計された様々な処理後、抗原タンパク質の完全性を決定するためにペプチドマップを作成することができる。従って、安定性の尺度は、対照試料と比較した、ストレスを受けた試料中の抗原ペプチドの相対的存在量である。例えば、C o V S ポリペプチドを含むナノ粒子の安定性は、ナノ粒子を様々なpH、プロテアーゼ、塩、限定されるものではないが、過酸化水素を含む酸化剤、様々な温度に曝露し、凍結／解凍サイクルに供し、及び攪拌することによって評価することができる。図12A及び図12Bは、B V 2 3 7 3（配列番号87）及びB V 2 3 6 5（配列番号4）が様々なストレス条件下でh A C E 2への結合を維持することを示す。界面活性剤コアに固定された糖タンパク質の位置は、望ましくない相互作用を減らすことによって安定性を高めると考えられている。例えば、プロテアーゼベースの分解に対する保護の改善は、本明細書に開示されるモル比で糖タンパク質をコアに固定して、立体障害がプロテアーゼのアクセスをブロックする遮蔽効果によって達成することができる。安定性も、無傷のタンパク質をモニタリングすることによって測定することができる。図33及び図34は、配列番号109及び87それぞれのアミノ酸配列を有するC o V ポリペプチドを含むナノ粒子を比較する。図34は、配列番号87のアミノ酸配列を有するC o V ポリペプチドが精製中に特に良好な安定性を示すことを示している。図34のポリペプチドは、Q Q A Qのアミノ酸配列（配列番号7）を有するフーリン切断部位を含む。

10

20

【0231】

C o V S ポリペプチド抗原を含むワクチン組成物

【0282】 本開示は、例えば、ナノ粒子中における、C o V S ポリペプチドを含むワクチン組成物を提供する。態様では、ワクチン組成物は、同じ種のウイルスに由来する2つ以上のウイルス株に由来する抗原を含むナノ粒子を含み得る。別の実施形態では、本開示は、ワクチン組成物の成分の1つ又は複数で満たされた1つ又は複数の容器を含む医薬品パック又はキットを提供する。

【0232】

【0283】 本明細書に開示される組成物は、予防的又は治療的のいずれか、典型的には予防的に使用することができる。従って、本開示は、感染を処置又は予防する方法を含む。この方法は、治療量又は予防量の本開示の免疫原性組成物を対象に投与することを含む。好ましくは、医薬組成物は、防御効果を提供するワクチン組成物である。他の態様では、防御効果には、曝露された集団の割合での感染に関連する症状の改善が含まれ得る。例えば、組成物は、未処置の対象と比較して、熱疲労、筋肉痛、頭痛、喉の痛み、嘔吐、下痢、発疹、腎臓及び肝機能障害の症状、内出血及び外出血から選択される1つ又は複数のウイルス病の症状を予防又は軽減することができる。

30

【0233】

【0284】 ナノ粒子は、様々な賦形剤及び緩衝剤などの存在下でワクチンとして投与するために製剤化することができる。例えば、ワクチン組成物は、リン酸ナトリウム、塩化ナトリウム及び／又はヒスチジンを含み得る。リン酸ナトリウムは、約10mM～約50mM、約15mM～約25mM又は約25mMで存在し得；特定の例では、約22mMのリン酸ナトリウムが存在する。ヒスチジンは、約0.1%（w／v）、約0.5%（w／v）、約0.7%（w／v）、約1%（w／v）、約1.5%（w／v）、約2%（w／v）又は約2.5%（w／v）存在し得る。塩化ナトリウムは、存在する場合、約150mMであり得る。特定の組成物では、塩化ナトリウムは、例えば、約200mM～約500mMのより高い濃度で存在し得る。実施形態では、塩化ナトリウムは、限定されるものではないが、約200mM、約250mM、約300mM、約350mM、約400mM、約450mM又は約500mMを含む高濃度で存在する。

40

【0234】

50

【0285】 実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子は、特定のpHレベルで改善された安定性を有する。実施形態では、ナノ粒子は、わずかに酸性のpHレベルで安定である。例えば、ナノ粒子は、わずかに酸性のpH、例えばpH 5.8～pH 7.0で安定である。実施形態では、ナノ粒子及びナノ粒子を含む組成物は、約pH 5.9～約pH 6.8、約pH 6.0～約pH 6.5、約pH 6.1～約pH 6.4、約pH 6.1～約pH 6.3又は約pH 6.2を含む約pH 5.8～約pH 7.0の範囲のpHで安定であり得る。実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子及び組成物は、約pH 7.0～約pH 7.4を含む中性pHで安定である。実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子及び組成物は、わずかにアルカリ性のpH、例えば約pH 7.0～約pH 8.5、約pH 7.0～約pH 8.0又は約pH 7.0～約pH 7.5（これらの間のすべての値及び範囲を含む）で安定である。

10

【0235】

アジュバント

【0286】 特定の実施形態では、本明細書に開示される組成物は、免疫応答を増強するために1つ又は複数のアジュバントと組み合わせることができる。他の実施形態では、組成物は、アジュバントなしで調製されるため、アジュバントを含まない組成物として投与することができる。有利には、本明細書に開示されるアジュバントを含まない組成物は、単回投与として投与される場合、防御免疫応答を提供し得る。強力な免疫応答を誘発するミョウバンを含まない組成物は、約60歳以上の成人に特に有用である。

20

【0236】

アルミニウムベースのアジュバント

【0287】 実施形態では、アジュバントは、ミョウバン（例えば、 $AlPO_4$ 又は $Al(OH)_3$ ）であり得る。典型的には、ナノ粒子は、ミョウバンに実質的に結合している。例えば、ナノ粒子は、ミョウバンに少なくとも80%結合、少なくとも85%結合、少なくとも90%結合又は少なくとも95%結合し得る。多くの場合、ナノ粒子は、組成物中でミョウバンに92%～97%結合している。投与量当たり存在するミョウバンの量は、典型的には、約400 μg ～約1250 μg の範囲である。例えば、ミョウバンは、投与量当たり約300 μg ～約900 μg 、約400 μg ～約800 μg 、約500 μg ～約700 μg 、約400 μg ～約600 μg 又は約400 μg ～約500 μg の量で存在し得る。典型的には、ミョウバンは、120 μg のタンパク質ナノ粒子の投与量に約400 μg 存在する。

30

【0237】

サポニンアジュバント

【0288】 サポニンを含むアジュバントも、本明細書に開示される免疫原と組み合わせることができる。サポニンは、キラヤ・サポナリア・モリナ（*Quillaja saponaria* Molina）の木の樹皮に由来するグリコシドである。典型的には、サポニンは、多段階の精製プロセスを使用して調製され、複数の画分が得られる。本明細書で使用される場合、「キラヤ・サポナリア・モリナ（*Quillaja saponaria* Molina）由来のサポニン画分」という用語は、キラヤ・サポナリア（*Quillaja saponaria*）の半精製された若しくは定義されたサポニン画分又はその実質的に純粋な画分を表すために一般的に使用される。

40

【0238】

サポニン画分

【0289】 いくつかのアプローチは、サポニン画分を生成するのに適している。画分A、B及びCは、米国特許第6,352,697号に記載されており、以下のように調製することができる。粗水性キラヤ・サポナリア・モリナ（*Quillaja saponaria* Molina）抽出物であるQuil Aからの親油性画分をクロマトグラフィーによって分離し、水中の70%アセトニトリルで溶出して親油性画分を回収する。次いで、この親油性画分を、酸性水中で25%～60%アセトニトリルの勾配を使用して溶出するセミ分取HPLCによって分離する。本明細書で「画分A」又は「QH-A」と呼ばれる画分は、約39%アセトニトリルで溶出される画分であるか、又はその画分に対応する。本明細書で「画分

50

B」又は「QH-B」と呼ばれる画分は、約47%アセトニトリルで溶出される画分であるか、又はその画分に対応する。本明細書で「画分C」又は「QH-C」と呼ばれる画分は、約49%アセトニトリルで溶出される画分であるか、又はその画分に対応する。画分の精製に関する追加の情報は、米国特許第5,057,540号に見られる。本明細書に記載のように調製すると、キラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja saponaria* Molina) の画分A、B及びCは、定義可能な特性を有する化学的に密接に関連する分子の群又はファミリーをそれぞれ表す。画分A、B及びCが得られるクロマトグラフィー条件は、溶出プロファイル及び生物学的活性に関するバッチ間の再現性が非常に一貫するような条件である。

【0239】

【0290】 他のサポニン画分も記載されている。画分B3、B4及びB4bは、欧州特許第0436620号に記載されている。画分QA1～QA22は、欧州特許第03632279B2号、Q-VAC (Nor-Feed, AS Denmark)、*Quillaja saponaria* Molina Spikoside (Isconova AB, Ultunaallen 2B, 756 51 Uppsala, Sweden) に記載されている。欧州特許第03632279B2号の画分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及びQA-22、特にQA-7、QA-17、QA-18及びQA-21を使用することができる。これらは、欧州特許第03632279B2号、特に6ページ並びに8ページ及び9ページの実施例1に記載されているように得られる。

【0240】

【0291】 本明細書に記載され、アジュバントを形成するために使用されるサポニン画分は、多くの場合、実質的に純粋な画分であり；即ち、画分は、他の物質の汚染が実質的に存在しない。特定の態様では、実質的に純粋なサポニン画分は、他のサポニン又は他のアジュバント物質などの他の化合物を最大40重量%、最大30重量%、最大25重量%、最大20重量%、最大15重量%、最大10%、最大7重量%、最大5重量%、最大2重量%、最大1重量%、最大0.5重量%又は最大0.1重量%含み得る。

【0241】

ISCOMの構造

【0292】 サポニン画分は、ISCOM (免疫刺激複合体) と呼ばれるケージ様粒子の形態で投与することができる。ISCOMは、欧州特許第0109942B1号、同第0242380B1号、同第0180546B1号に記載のように調製することができる。特定の実施形態では、欧州特許第9600647-3号 (PCT/スウェーデン特許第97/00289号) に記載のように、トランスポート抗原及び／又はパッセンジャー抗原を使用することができる。

【0242】

マトリックスアジュバント

【0293】 実施形態では、ISCOMは、ISCOMマトリックス複合体である。ISCOMマトリックス複合体は、少なくとも1つのサポニン画分及び脂質を含む。脂質は、少なくともコレステロールなどのステロールである。特定の態様では、ISCOMマトリックス複合体は、リン脂質も含む。ISCOMマトリックス複合体は、必ずしもグリコシドではない1つ又は複数の他の免疫調節 (アジュバント活性) 物質も含み得、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる欧州特許第0436620B1号に記載されているように生成され得る。

【0243】

【0294】 他の態様では、ISCOMは、ISCOM複合体である。ISCOM複合体は、少なくとも1つのサポニン、少なくとも1つの脂質及び少なくとも1種類の抗原又はエピトープを含む。ISCOM複合体は、抗原の一部が粒子に組み込まれるように界面活性剤処理によって会合した抗原を含む。対照的に、ISCOMマトリックスは、抗原との

混合物として処方され、ISCOMマトリックス粒子と抗原との間の会合は、静電相互作用及び／又は疎水性相互作用によって媒介される。

【0244】

【0295】 一実施形態によると、ISCOMマトリックス複合体若しくはISCOM複合体に組み込まれるサポニン画分又はISCOM若しくはISCOMマトリックス複合体に同様に組み込まれるか又はこれらと混合される少なくとも1つの追加のアジュバントは、キラヤ・サポナリア (*Quillaja saponaria*)、キラヤ・サポナリア (*Quillaja saponaria*) の半精製調製物、キラヤ・サポナリア (*Quillaja saponaria*) の精製調製物の画分A、画分B若しくは画分C又は任意の精製サブ画分、例えばQA1～21から選択される。

10

【0245】

【0296】 特定の態様では、各ISCOM粒子は、少なくとも2つのサポニン画分を含み得る。異なるサポニン画分の重量%の任意の組み合わせを使用することができる。任意の2つの画分の重量%の任意の組み合わせを使用することができる。例えば、粒子は、任意の重量%の画分A及び任意の重量%の別のサポニン画分、例えばそれぞれ粗サポニン画分又は画分Cを含み得る。従って、特定の態様では、各ISCOMマトリックス粒子又は各ISCOM複合体粒子は、0.1～99.9重量%、5～95重量%、10～90重量%、15～85重量%、20～80重量%、25～75重量%、30～70重量%、35～65重量%、40～60重量%、45～55重量%、40～60重量%又は50重量%の1つのサポニン画分、例えば画分A及び別の画分、例えば任意の粗画分又は任意の他の画分、例えば画分Cのそれぞれの場合における100%までの残りを含み得る。重量は、サポニン画分の総重量として計算される。ISCOMマトリックス複合体及びISCOM複合体アジュバントの例は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2013/0129770号に開示されている。

20

【0246】

【0297】 特定の実施形態では、ISCOMマトリックス又はISCOM複合体は、5～99重量%の1つの画分、例えば画分A及び100重量%までの残り、例えば粗サポニン画分又は画分Cを含む。重量は、サポニン画分の総重量として計算される。

【0247】

【0298】 別の実施形態では、ISCOMマトリックス又はISCOM複合体は、40～99重量%の1つの画分、例えば画分A及び1～60重量%の別の画分、例えば粗サポニン画分又は画分Cを含む。重量は、サポニン画分の総重量として計算される。

30

【0248】

【0299】 さらに別の実施形態では、ISCOMマトリックス又はISCOM複合体は、70～95重量%の1つの画分、例えば画分A及び30～5重量%の別の画分、例えば粗サポニン画分又は画分Cを含む。重量は、サポニン画分の総重量として計算される。他の実施形態では、キラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja saponaria Molina*) 由来のサポニン画分は、QA1～21のいずれか1つから選択される。

【0249】

【0300】 サポニン画分の混合物を含む粒子に加えて、ISCOMマトリックス粒子及びISCOM複合体粒子は、それぞれ1つのみのサポニン画分を使用して形成され得る。本明細書に開示される組成物は、各粒子が1つのみのサポニン画分を含む複数の粒子を含み得る。即ち、特定の組成物は、1つ若しくは複数の異なるタイプのISCOMマトリックス複合体粒子及び／又は1つ若しくは複数の異なるタイプのISCOM複合体粒子を含み得、個々の粒子は、それぞれキラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja saponaria Molina*) 由来の1つのサポニン画分を含み、1つの複合体中のサポニン画分は、他の複合体粒子中のサポニン画分と異なる。

40

【0250】

【0301】 特定の態様では、1つのタイプのサポニン画分又は粗サポニン画分を1つのISCOMマトリックス複合体又は粒子に組み込むことができ、別のタイプの実質的に純

50

粋なサポニン画分又は粗サポニン画分を別のISCOMマトリックス複合体又は粒子に組み込むことができる。組成物又はワクチンは、少なくとも2つのタイプの複合体又は粒子を含むことができ、各タイプは、物理的に異なる粒子に組み込まれた1つのタイプのサポニンを有する。

【0251】

【0302】 本組成物では、1つのサポニン画分キラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja saponaria* Molina) 及び別のサポニン画分キラヤ・サポナリア・モリナ (*Quillaja saponaria* Molina) が異なるISCOMマトリックス複合体粒子及び／又はISCOM複合体粒子に別々に組み込まれている、ISCOMマトリックス複合体粒子及び／又はISCOM複合体粒子の混合物を使用することができる。

10

【0252】

【0303】 それぞれ1つのサポニン画分を有するISCOMマトリックス又はISCOM複合体粒子は、任意の組み合わせの重量%で組成物中に存在し得る。特定の態様では、組成物は、0.1～99.9重量%、5～95重量%、10～90重量%、15～85重量%、20～80重量%、25～75重量%、30～70重量%、35～65重量%、40～60重量%、45～55重量%、40～60重量%又は50重量%の第1のサポニン画分を含むISCOMマトリックス又は複合体を含み得、残りの部分は、異なるサポニン画分を含むISCOMマトリックス又は複合体によって構成されている。態様では、残りの部分は、各マトリックス又は複合体粒子が1つのみのサポニン画分を含む、1つ又は複数のISCOMマトリックス又は複合体である。他の態様では、ISCOMマトリックス又は複合体粒子は、2つ以上のサポニン画分を含み得る。

20

【0253】

【0304】 特定の組成物では、第1のISCOMマトリックス又はISCOM複合体粒子中のサポニン画分のみが画分Aであり、第2のISCOMマトリックス又はISCOM複合体粒子中のサポニン画分のみが画分Cである。

【0254】

【0305】 好ましい組成物は、画分Aを含む第1のISCOMマトリックス及び画分Cを含む第2のISCOMマトリックスを含み、画分A ISCOMマトリックスは、全サポニンアジュバントの重量当たり約70%を構成し、画分C ISCOMマトリックスは、全サポニンアジュバントの重量当たり約30%を構成する。別の好ましい組成物では、画分A ISCOMマトリックスは、全サポニンアジュバントの重量当たり約85%を構成し、画分C ISCOMマトリックスは、全サポニンアジュバントの重量当たり約15%を構成する。従って、特定の組成物では、画分A ISCOMマトリックスは、組成物中のサポニンアジュバントの総重量の約70%～約85%の範囲で存在し、画分C ISCOMマトリックスは、組成物中のサポニンアジュバントの総重量の約15%～約30%の範囲で存在する。実施形態では、画分A ISCOMマトリックスは、アジュバント中の画分A ISCOMマトリックス及び画分C ISCOMの重量の合計の50～96重量%を構成し、画分C ISCOMマトリックスは残りを構成する。本明細書でMATRIX-M（商標）と呼ばれる特に好ましい組成物では、画分A ISCOMマトリックスは、組成物中のサポニンアジュバントの総重量の約85%で存在し、画分C ISCOMマトリックスは、組成物中のサポニンアジュバントの総重量の約15%で存在する。MATRIX-M（商標）は、Matrix-M1と互換的に呼ぶことができる。

30

40

【0255】

【0306】 例示的なQS-7及びQS-21画分、これらの製造及びこれらの使用は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,057,540号；同第6,231,859号；同第6,352,697号；同第6,524,584号；同第6,846,489号；同第7,776,343号；及び同第8,173,141号に記載されている。

【0256】

【0307】 実施形態では、他のアジュバントを追加又は代替として使用することができる。あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれるVogel et al.,

50

“A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients (2nd Edition)”に記載されている任意のアジュバントを含めることは、本開示の範囲内で想定される。他のアジュバントには、完全フロイントアジュバント（死んだ結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）を含む免疫応答の非特異的刺激物質）、不完全フロイントアジュバント及び水酸化アルミニウムアジュバントが含まれる。他のアジュバントには、GMCSP、BCG、MDP化合物、例えば th |ur-MDP及び no |r-MDP、CGP（MTP-PE）、脂質A及びモノホスホリル脂質A（MPL）、MF-59、RIBI（細菌から抽出される3成分を含む）、MPL、トレハロースジミコレート（TDM）及び細胞壁骨格（CWS）（2%スクアレン／TWEEN（登録商標）ポリソルベート80エマルジョン中）が含まれる。実施形態では、アジュバントは、少重膜脂質小胞；例えばNOVASOMES（登録商標）であり得る。NOVASOMES（登録商標）は、約100nm～約500nmの範囲の少重膜非リン脂質小胞である。NOVASOMES（登録商標）には、BRIJ（登録商標）アルコールエトキシレート72、コレステロール、オレイン酸及びスクアレンが含まれる。NOVASOMES（登録商標）は、有効なアジュバントであることが示されている（米国特許第5,629,021号、同第6,387,373号及び同第4,911,928号を参照されたい）。

10

【0257】

投与及び用量

【0308】実施形態では、本開示は、1つ又は複数のコロナウイルスに対する免疫応答を誘発する方法を提供する。実施形態では、免疫応答は、SARS-CoV-2ウイルス、MERS及びSARSの1つ又は複数に対するものである。実施形態では、応答は、異種SARS-CoV-2株に対するものである。異種SARS-CoV-2株の非限定的な例には、CaL.20C SARS-CoV-2株、P.1 SARS-CoV-2株、B.1.351 SARS-CoV-2株及びB.1.1.7 SARS-CoV-2株が含まれる。この方法は、免疫学的に有効な量の、ナノ粒子を含むか、又は組換えCoVスパイク（S）ポリペプチドを含む組成物を対象に投与することを含む。有利には、本明細書に開示されるタンパク質は、特に有用な抗コロナウイルス応答の1つ又は複数を誘発する。

20

【0258】

【0309】実施形態では、ナノ粒子又はCoV Sポリペプチドは、アジュバントと共に投与される。態様では、ナノ粒子又はCoV Sポリペプチドは、アジュバントなしで投与される。態様では、アジュバントは、非共有相互作用などによってナノ粒子に結合され得る。他の態様では、アジュバントは、ナノ粒子と同時に投与されるが、アジュバントとナノ粒子とは、実質的に相互作用しない。

30

【0259】

【0310】実施形態では、ナノ粒子又はCoV Sポリペプチドは、SARS-CoV-2感染、異種SARS-CoV-2株感染、SARS感染又はMERS感染の1つ又は複数の予防及び／又は処置のために使用され得る。従って、本開示は、SARS-CoV-2ウイルス、異種SARS-CoV-2ウイルス、MERS及びSARSの1つ又は複数に対する免疫応答を誘発する方法を提供する。この方法は、免疫学的に有効な量の、ナノ粒子又はCoV Sポリペプチドを含む組成物を対象に投与することを含む。有利には、本明細書に開示されるタンパク質は、特に有用な抗コロナウイルス応答を誘発する。

40

【0260】

【0311】実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子又はCoV Sポリペプチドを含む組成物は、対象において、ナノ粒子又はCoV Sポリペプチドの最後の用量後、最大で約3ヶ月、最大で約4ヶ月、最大で約5ヶ月、最大で約6ヶ月、最大で約7ヶ月、最大で約8ヶ月、最大で約9ヶ月、最大で約10ヶ月、最大で約11ヶ月、最大で約12ヶ月、最大で約13ヶ月、最大で約14ヶ月、最大で約15ヶ月、最大で約16ヶ月、最大で約17ヶ月、最大で約18ヶ月、最大で約19ヶ月、最大で約20ヶ月、最大で約21ヶ月、最大で約22ヶ月、最大で約23ヶ月、最大で約24ヶ月、最大で約2.5年、最大

50

で約3年、最大で約3.5年、最大で約4年、最大で約4.5年、最大で約5年にわたり、SARS-CoV-2又は異種SARS-CoV-2株に対する防御反応を誘導する。実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子又はCoV Sポリペプチドは、対象において、少なくとも6ヶ月にわたり、防御反応を誘導する。

【0261】

【0312】 実施形態では、防御反応は、SARS-CoV-2又は異種SARS-CoV-2株によって引き起こされる無症候性感染に対するものである。実施形態では、防御反応は、SARS-CoV-2又は異種SARS-CoV-2株によって引き起こされる症候性感染に対するものである。

【0262】

【0313】 実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子又はCoV Sポリペプチドを含む組成物は、本明細書に記載のナノ粒子又はCoV Sポリペプチドの最後の用量の投与後、最大で約1ヶ月、最大で約2ヶ月、最大で約2.5ヶ月、最大で約3ヶ月、最大で約3.5ヶ月、最大で約4ヶ月、最大で約4.5ヶ月、最大で約5ヶ月、最大で約5.5ヶ月、最大で約6ヶ月、最大で約6.5ヶ月、最大で約7ヶ月、最大で約7.5ヶ月、最大で約8ヶ月、最大で約8.5ヶ月、最大で約9ヶ月、最大で約9.5ヶ月、最大で約10ヶ月、最大で約10.5ヶ月、最大で約11ヶ月、最大で約11.5ヶ月、最大で約12ヶ月、最大で約12.5ヶ月、最大で約13ヶ月、最大で約13.5ヶ月、最大で約14ヶ月、最大で約14.5ヶ月、最大で約15ヶ月、最大で約15.5ヶ月、最大で約16ヶ月、最大で約16.5ヶ月、最大で約17ヶ月、最大で約17.5ヶ月、最大で約18ヶ月、最大で約18.5ヶ月、最大で約19ヶ月、最大で約19.5ヶ月、最大で約20ヶ月、最大で約20.5ヶ月、最大で約21ヶ月、最大で約21.5ヶ月、最大で約22ヶ月、最大で約22.5ヶ月、最大で約23ヶ月、最大で約23.5ヶ月、最大で約24ヶ月、最大で約2.1年、最大で約2.2年、最大で約2.3年、最大で約2.4年、最大で約2.5年、最大で約2.6年、最大で約2.7年、最大で約2.8年、最大で約2.9年、最大で約3年又はそれを超える期間にわたり、SARS-CoV-2ウイルス又は異種SARS-CoV-2株（例えば、B.1.1.7 SARS-CoV-2株、B.1.351 SARS-CoV-2株、P.1 SARS-CoV-2株、B.1.617.2 SARS-CoV-2株、B.1.525 SARS-CoV-2株、B.1.526 SARS-CoV-2株、B.1.617.1 SARS-CoV-2株、C.37 SARS-CoV-2株、B.1.621 SARS-CoV-2株又はCaL.20C SARS-CoV-2株）からのコロナウイルス感染症-19（COVID-19）の予防に、約50%～約99%、約80%～約99%、約75%～約99%、約80%～約95%、約90%～約98%、約75%～約95%、約80%～約90%、約85%～約95%、約80%～約95%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%又は少なくとも約99%の有効性を有する。実施形態では、COVID-19は、軽度のCOVID-19である。実施形態では、COVID-19は、中程度のCOVID-19である。実施形態では、COVID-19は、重度のCOVID-19である。実施形態では、COVID-19は、無症状のCOVID-19である。

【0263】

【0314】 実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子又はCoV Sポリペプチドを含む組成物は、本明細書に記載のナノ粒子又はCoV Sポリペプチドの最後の用量の投与後、最大で約7.5ヶ月にわたり、SARS-CoV-2ウイルス又は異種SARS-CoV-2株に対して少なくとも82%の有効性を有する。実施形態では、本明細書に記載のナノ粒子又はCoV Sポリペプチドを含む組成物は、本明細書に記載のナノ粒子又はCoV Sポリペプチドの最後の用量の投与後、最大で約7.5ヶ月にわたり、SARS

10

20

30

40

50

ーC o Vー2ウイルス又は異種S A R SーC o Vー2株に対して80%～約90%の有効性を有する。

【0264】

【0315】実施形態では、ナノ粒子又はC o V Sポリペプチドを含む組成物は、無症候性疾患に対して少なくとも75%の有効性を有する。実施形態では、ナノ粒子又はC o V Sポリペプチドは、最大で約1ヶ月、最大で約2ヶ月、最大で約2.5ヶ月、最大で約3ヶ月、最大で約3.5ヶ月、最大で約4ヶ月、最大で約4.5ヶ月、最大で約5ヶ月、最大で約5.5ヶ月、最大で約6ヶ月、最大で約6.5ヶ月、最大で約7ヶ月、最大で約7.5ヶ月、最大で約8ヶ月、最大で約8.5ヶ月、最大で約9ヶ月、最大で約9.5ヶ月、最大で約10ヶ月、最大で約10.5ヶ月、最大で約11ヶ月、最大で約11.5ヶ月、最大で約12ヶ月、最大で約12.5ヶ月、最大で約13ヶ月、最大で約13.5ヶ月、最大で約14ヶ月、最大で約14.5ヶ月、最大で約15ヶ月、最大で約15.5ヶ月、最大で約16ヶ月、最大で約16.5ヶ月、最大で約17ヶ月、最大で約17.5ヶ月、最大で約18ヶ月、最大で約18.5ヶ月、最大で約19ヶ月、最大で約19.5ヶ月、最大で約20ヶ月、最大で約20.5ヶ月、最大で約21ヶ月、最大で約21.5ヶ月、最大で約22ヶ月、最大で約22.5ヶ月、最大で約23ヶ月、最大で約23.5ヶ月若しくは最大で約24ヶ月又はそれを超える期間にわたり、症候性C O V I Dー19に対し、80%～90%、80%～99%、82%～99%、82%～95%、85%～95%、85%～99%、85%～97%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の有効性を有する。

10

20

【0265】

【0316】実施形態では、ナノ粒子又はC o V Sポリペプチドを含む組成物は、最大で約1ヶ月、最大で約2ヶ月、最大で約2.5ヶ月、最大で約3ヶ月、最大で約3.5ヶ月、最大で約4ヶ月、最大で約4.5ヶ月、最大で約5ヶ月、最大で約5.5ヶ月、最大で約6ヶ月、最大で約6.5ヶ月、最大で約7ヶ月、最大で約7.5ヶ月、最大で約8ヶ月、最大で約8.5ヶ月、最大で約9ヶ月、最大で約9.5ヶ月、最大で約10ヶ月、最大で約10.5ヶ月、最大で約11ヶ月、最大で約11.5ヶ月、最大で約12ヶ月、最大で約12.5ヶ月、最大で約13ヶ月、最大で約13.5ヶ月、最大で約14ヶ月、最大で約14.5ヶ月、最大で約15ヶ月、最大で約15.5ヶ月、最大で約16ヶ月、最大で約16.5ヶ月、最大で約17ヶ月、最大で約17.5ヶ月、最大で約18ヶ月、最大で約18.5ヶ月、最大で約19ヶ月、最大で約19.5ヶ月、最大で約20ヶ月、最大で約20.5ヶ月、最大で約21ヶ月、最大で約21.5ヶ月、最大で約22ヶ月、最大で約22.5ヶ月、最大で約23ヶ月、最大で約23.5ヶ月若しくは最大で約24ヶ月又はそれを超える期間にわたり、重度のC O V I Dー19に対して95%～97%、95%～99%、95%～98%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の有効性を有する。

30

40

【0266】

【0317】実施形態では、ナノ粒子又はC o V Sポリペプチドを含む組成物は、最大で約1ヶ月、最大で約2ヶ月、最大で約2.5ヶ月、最大で約3ヶ月、最大で約3.5ヶ月、最大で約4ヶ月、最大で約4.5ヶ月、最大で約5ヶ月、最大で約5.5ヶ月、最大で約6ヶ月、最大で約6.5ヶ月、最大で約7ヶ月、最大で約7.5ヶ月、最大で約8ヶ月、最大で約8.5ヶ月、最大で約9ヶ月、最大で約9.5ヶ月、最大で約10ヶ月、最大で約10.5ヶ月、最大で約11ヶ月、最大で約11.5ヶ月、最大で約12ヶ月、最大で約12.5ヶ月、最大で約13ヶ月、最大で約13.5ヶ月、最大で約14ヶ月、最大で約14.5ヶ月、最大で約15ヶ月、最大で約15.5ヶ月、最大で約16ヶ月、最大で約16.5ヶ月、最大で約17ヶ月、最大で約17.5ヶ月、最大で約18ヶ月、最

50

大で約 18.5 ヶ月、最大で約 19 ヶ月、最大で約 19.5 ヶ月、最大で約 20 ヶ月、最大で約 20.5 ヶ月、最大で約 21 ヶ月、最大で約 21.5 ヶ月、最大で約 22 ヶ月、最大で約 22.5 ヶ月、最大で約 23 ヶ月、最大で約 23.5 ヶ月若しくは最大で約 24 ヶ月又はそれを超える期間にわたり、中程度の COVID-19 に対し、75%～95%、75%～90%、75%～85%、75%～98%、80%～98%、80%～95%、80%～90%、85%～98%、85%～95%、少なくとも 75%、少なくとも 76%、少なくとも 77%、少なくとも 78%、少なくとも 79%、少なくとも 80%、少なくとも 81%、少なくとも 82%、少なくとも 83%、少なくとも 84%、少なくとも 85%、少なくとも 86%、少なくとも 87%、少なくとも 88%、少なくとも 89%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% 又は 100% の有効性を有する。

10

【0267】

【0318】 実施形態では、ナノ粒子又は CoV S ポリペプチドを含む組成物は、最大で約 1 ヶ月、最大で約 2 ヶ月、最大で約 2.5 ヶ月、最大で約 3 ヶ月、最大で約 3.5 ヶ月、最大で約 4 ヶ月、最大で約 4.5 ヶ月、最大で約 5 ヶ月、最大で約 5.5 ヶ月、最大で約 6 ヶ月、最大で約 6.5 ヶ月、最大で約 7 ヶ月、最大で約 7.5 ヶ月、最大で約 8 ヶ月、最大で約 8.5 ヶ月、最大で約 9 ヶ月、最大で約 9.5 ヶ月、最大で約 10 ヶ月、最大で約 10.5 ヶ月、最大で約 11 ヶ月、最大で約 11.5 ヶ月、最大で約 12 ヶ月、最大で約 12.5 ヶ月、最大で約 13 ヶ月、最大で約 13.5 ヶ月、最大で約 14 ヶ月、最大で約 14.5 ヶ月、最大で約 15 ヶ月、最大で約 15.5 ヶ月、最大で約 16 ヶ月、最大で約 16.5 ヶ月、最大で約 17 ヶ月、最大で約 17.5 ヶ月、最大で約 18 ヶ月、最大で約 18.5 ヶ月、最大で約 19 ヶ月、最大で約 19.5 ヶ月、最大で約 20 ヶ月、最大で約 20.5 ヶ月、最大で約 21 ヶ月、最大で約 21.5 ヶ月、最大で約 22 ヶ月、最大で約 22.5 ヶ月、最大で約 23 ヶ月、最大で約 23.5 ヶ月若しくは最大で約 24 ヶ月又はそれを超える期間にわたり、軽度の COVID-19 に対し、40%～95%、40%～90%、40%～85%、40%～80%、40%～75%、40%～70%、40%～65%、40%～60%、50%～95%、50%～90%、50%～85%、50%～80%、50%～75%、50%～70%、50%～65%、50%～60%、少なくとも 40%、少なくとも 41%、少なくとも 42%、少なくとも 43%、少なくとも 44%、少なくとも 45%、少なくとも 46%、少なくとも 47%、少なくとも 48%、少なくとも 49%、少なくとも 50%、少なくとも 51%、少なくとも 52%、少なくとも 53%、少なくとも 54%、少なくとも 55%、少なくとも 56%、少なくとも 57%、少なくとも 58%、少なくとも 59%、少なくとも 60%、少なくとも 61%、少なくとも 62%、少なくとも 63%、少なくとも 64%、少なくとも 65%、少なくとも 66%、少なくとも 67%、少なくとも 68%、少なくとも 69%、少なくとも 70%、少なくとも 71%、少なくとも 72%、少なくとも 73%、少なくとも 74%、少なくとも 75%、少なくとも 76%、少なくとも 77%、少なくとも 78%、少なくとも 79%、少なくとも 80%、少なくとも 81%、少なくとも 82%、少なくとも 83%、少なくとも 84%、少なくとも 85%、少なくとも 86%、少なくとも 87%、少なくとも 88%、少なくとも 89%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% 又は 100% の有効性を有する。

20

30

40

【0268】

【0319】 本明細書に開示される組成物は、全身経路、若しくは粘膜経路、若しくは経皮経路を介して又は特定の組織に直接投与され得る。本明細書で使用される場合、「全身投与」という用語は、非経口投与経路を含む。特に、非経口投与には、皮下、腹腔内、静脈内、動脈内、筋肉内又は胸骨内注射、静脈内又は腎臓透析注入技術が含まれる。典型的には、全身非経口投与は、筋肉内注射である。本明細書で使用される場合、「粘膜投与」という用語は、経口、鼻腔内、膣内、直腸内、気管内、腸内及び眼内投与が含まれる。好

50

ましくは、投与は、筋肉内である。

【0269】

【0320】 組成物は、単回投与スケジュール又は複数回投与スケジュールで投与することができる。複数回投与は、一次免疫スケジュール又は追加免疫スケジュールで実施形態では、約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又は30用量が投与される。複数回投与スケジュールでは、様々な用量が同じ又は異なる経路、例えば非経口初回及び粘膜追加、粘膜初回及び非経口追加などによって投与され得る。態様では、追加用量は、初回用量から約2週間、約3週間、約4週間、約5週間、約6週間、約2ヶ月、約3ヶ月、約4ヶ月、約5ヶ月、約6ヶ月、約7ヶ月、約8ヶ月、約9ヶ月、約10ヶ月、約11ヶ月、約12ヶ月（1年）、約2年、約3年、約4年、約5年、約6年、約7年、約8年、約9年又は約10年後に投与される。実施形態では、追加用量は、初回用量の投与後に毎年投与される。実施形態では、後続追加用量は、前の投与の3週間後又は4週間後に投与される。実施形態では、初回用量は、0日目に投与され、及び追加用量は、21日目に投与される。実施形態では、初回用量は、0日目に投与され、及び追加用量は、28日目に投与される。実施形態では、初回用量は、0日目に投与され、追加用量は、21日目に投与され、及び第2の追加用量は、初回用量の投与の約6ヶ月後に投与される。実施形態では、初回用量は、0日目に投与され、追加用量は、28日目に投与され、及び第2の追加用量は、初回用量の投与の約6ヶ月後に投与される。実施形態では、初回用量は、0日目に投与され、追加用量は、21日目に投与され、及び第2の追加用量は、2回目の用量の投与の約6ヶ月後に投与される。実施形態では、初回用量は、0日目に投与され、追加用量は、28日目に投与され、及び第2の追加用量は、2回目の用量の投与の約6ヶ月後に投与される。

【0270】

【0321】 実施形態では、追加用量は、初回用量と同じ免疫学的組成物を含む。実施形態では、追加用量は、初回用量とは異なる免疫学的組成物を含む。実施形態では、異なる免疫学的組成物は、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質をコードするmRNA、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質をコードするプラスミドDNA、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質をコードするウイルスベクター又は不活性化SARS-CoV-2ウイルスである。実施形態では、追加用量は、初回の組成物を含む。実施形態では、初回用量は、SARS-CoV-2 S糖タンパク質（例えば、配列番号87のアミノ酸配列を有するSARS-CoV-2 S糖タンパク質）を含み、追加用量は、同じSARS-CoV-2 S糖タンパク質（例えば、配列番号87のアミノ酸配列を有するSARS-CoV-2 S糖タンパク質）を含む。実施形態では、初回用量は、SARS-CoV-2 S糖タンパク質（例えば、配列番号87のアミノ酸配列を有するSARS-CoV-2 S糖タンパク質）を含み、追加用量は、異なるSARS-CoV-2 S糖タンパク質（例えば、配列番号132のアミノ酸配列を有するSARS-CoV-2 S糖タンパク質）を含む。実施形態では、初回用量は、SARS-CoV-2 S糖タンパク質の組み合わせ（例えば、配列番号87のアミノ酸配列を有するSARS-CoV-2 S糖タンパク質と、配列番号132のアミノ酸配列を有するSARS-CoV-2 S糖タンパク質）を含む。実施形態では、追加用量は、SARS-CoV-2 S糖タンパク質の組み合わせ（例えば、配列番号87のアミノ酸配列を有するSARS-CoV-2 S糖タンパク質と、配列番号132のアミノ酸配列を有するSARS-CoV-2 S糖タンパク質）を含む。実施形態では、初回用量は、SARS-CoV-2 S糖タンパク質、SARS-CoV-2 S糖タンパク質をコードするプラスミドDNA、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質をコードするウイルスベクター又は不活性化SARS-CoV-2ウイルスを含む。実施形態では、初回用量は、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質をコードするプラスミドDNA、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質をコードするウイルスベクター又は不活性化SARS-CoV-2ウイルスを含

み、追加用量は、1つ又は複数のSARS-CoV-2 S糖タンパク質を含む。

【0271】

【0322】 実施形態では、 μg 単位で測定される用量は、溶質を含む用量の総重量、又はCoV Sポリペプチドナノ粒子の重量、又はCoV Sポリペプチドの重量であり得る。用量は、A280又はELISAのいずれかのタンパク質濃度アッセイを使用して測定される。

【0272】

【0323】 小児への投与を含む抗原の用量は、約 $5\mu\text{g}$ ～約 $25\mu\text{g}$ 、約 $1\mu\text{g}$ ～約 $300\mu\text{g}$ 、約 $90\mu\text{g}$ ～約 $270\mu\text{g}$ 、約 $100\mu\text{g}$ ～約 $160\mu\text{g}$ 、約 $110\mu\text{g}$ ～約 $150\mu\text{g}$ 、約 $120\mu\text{g}$ ～約 $140\mu\text{g}$ 又は約 $140\mu\text{g}$ ～約 $160\mu\text{g}$ の範囲であり得る。実施形態では、用量は、約 $120\mu\text{g}$ であり、ミョウバンと共に投与される。態様では、小児用量は、約 $1\mu\text{g}$ ～約 $90\mu\text{g}$ の範囲であり得る。実施形態では、CoVスパイク(S)ポリペプチドの用量は、約 $1\mu\text{g}$ 、約 $2\mu\text{g}$ 、約 $3\mu\text{g}$ 、約 $4\mu\text{g}$ 、約 $5\mu\text{g}$ 、約 $6\mu\text{g}$ 、約 $7\mu\text{g}$ 、約 $8\mu\text{g}$ 、約 $9\mu\text{g}$ 、約 $10\mu\text{g}$ 、約 $11\mu\text{g}$ 、約 $12\mu\text{g}$ 、約 $13\mu\text{g}$ 、約 $14\mu\text{g}$ 、約 $15\mu\text{g}$ 、約 $16\mu\text{g}$ 、約 $17\mu\text{g}$ 、約 $18\mu\text{g}$ 、約 $19\mu\text{g}$ 、約 $20\mu\text{g}$ 、約21、約22、約23、約24、約 $25\mu\text{g}$ 、約 $26\mu\text{g}$ 、約 $27\mu\text{g}$ 、約 $28\mu\text{g}$ 、約 $29\mu\text{g}$ 、約 $30\mu\text{g}$ 、約 $40\mu\text{g}$ 、約50、約60、約70、約80、約90、約 $100\mu\text{g}$ 、約 $110\mu\text{g}$ 、約 $120\mu\text{g}$ 、約 $130\mu\text{g}$ 、約 $140\mu\text{g}$ 、約 $150\mu\text{g}$ 、約 $160\mu\text{g}$ 、約 $170\mu\text{g}$ 、約 $180\mu\text{g}$ 、約 $190\mu\text{g}$ 、約 $200\mu\text{g}$ 、約 $210\mu\text{g}$ 、約 $220\mu\text{g}$ 、約 $230\mu\text{g}$ 、約 $240\mu\text{g}$ 、約 $250\mu\text{g}$ 、約 $260\mu\text{g}$ 、約 $270\mu\text{g}$ 、約 $280\mu\text{g}$ 、約 $290\mu\text{g}$ 又は約 $300\mu\text{g}$ （これらの間のすべての値及び範囲を含む）である。実施形態では、CoV Sポリペプチドの用量は、 $5\mu\text{g}$ である。実施形態では、CoV Sポリペプチドの用量は、 $25\mu\text{g}$ である。実施形態では、CoV Sポリペプチドの用量は、初回用量と追加用量で同じである。実施形態では、CoV Sポリペプチドの用量は、初回用量と追加用量で異なる。

【0273】

【0324】 特定の集団は、アジュバントの有無にかかわらず投与することができる。特定の態様では、組成物は、添加されるアジュバントを含まなくてもよい。このような場合、用量を約10%増加させ得る。

【0274】

【0325】 実施形態では、天然に存在しないCoV Sポリペプチドと共に投与されるアジュバントの用量は、約 $1\mu\text{g}$ ～約 $100\mu\text{g}$ 、例えば約 $1\mu\text{g}$ 、約 $2\mu\text{g}$ 、約 $3\mu\text{g}$ 、約 $4\mu\text{g}$ 、約 $5\mu\text{g}$ 、約 $6\mu\text{g}$ 、約 $7\mu\text{g}$ 、約 $8\mu\text{g}$ 、約 $9\mu\text{g}$ 、約 $10\mu\text{g}$ 、約 $11\mu\text{g}$ 、約 $12\mu\text{g}$ 、約 $13\mu\text{g}$ 、約 $14\mu\text{g}$ 、約 $15\mu\text{g}$ 、約 $16\mu\text{g}$ 、約 $17\mu\text{g}$ 、約 $18\mu\text{g}$ 、約 $19\mu\text{g}$ 、約 $20\mu\text{g}$ 、約21、約22、約23、約24、約 $25\mu\text{g}$ 、約 $26\mu\text{g}$ 、約 $27\mu\text{g}$ 、約 $28\mu\text{g}$ 、約 $29\mu\text{g}$ 、約 $30\mu\text{g}$ 、約 $31\mu\text{g}$ 、約 $32\mu\text{g}$ 、約 $33\mu\text{g}$ 、約 $34\mu\text{g}$ 、約 $35\mu\text{g}$ 、約 $36\mu\text{g}$ 、約 $37\mu\text{g}$ 、約 $38\mu\text{g}$ 、約 $39\mu\text{g}$ 、約 $40\mu\text{g}$ 、約 $41\mu\text{g}$ 、約 $42\mu\text{g}$ 、約 $43\mu\text{g}$ 、約 $44\mu\text{g}$ 、約 $45\mu\text{g}$ 、約 $46\mu\text{g}$ 、約 $47\mu\text{g}$ 、約 $48\mu\text{g}$ 、約 $49\mu\text{g}$ 、約 $50\mu\text{g}$ 、約 $51\mu\text{g}$ 、約 $52\mu\text{g}$ 、約 $53\mu\text{g}$ 、約 $54\mu\text{g}$ 、約 $55\mu\text{g}$ 、約 $56\mu\text{g}$ 、約 $57\mu\text{g}$ 、約 $58\mu\text{g}$ 、約 $59\mu\text{g}$ 、約 $60\mu\text{g}$ 、約 $61\mu\text{g}$ 、約 $62\mu\text{g}$ 、約 $63\mu\text{g}$ 、約 $64\mu\text{g}$ 、約 $65\mu\text{g}$ 、約 $66\mu\text{g}$ 、約 $67\mu\text{g}$ 、約 $68\mu\text{g}$ 、約 $69\mu\text{g}$ 、約 $70\mu\text{g}$ 、約 $71\mu\text{g}$ 、約 $72\mu\text{g}$ 、約 $73\mu\text{g}$ 、約 $74\mu\text{g}$ 、約 $75\mu\text{g}$ 、約 $76\mu\text{g}$ 、約 $77\mu\text{g}$ 、約 $78\mu\text{g}$ 、約 $79\mu\text{g}$ 、約 $80\mu\text{g}$ 、約 $81\mu\text{g}$ 、約 $82\mu\text{g}$ 、約 $83\mu\text{g}$ 、約 $84\mu\text{g}$ 、約 $85\mu\text{g}$ 、約 $86\mu\text{g}$ 、約 $87\mu\text{g}$ 、約 $88\mu\text{g}$ 、約 $89\mu\text{g}$ 、約 $90\mu\text{g}$ 、約 $91\mu\text{g}$ 、約 $92\mu\text{g}$ 、約 $93\mu\text{g}$ 、約 $94\mu\text{g}$ 、約 $95\mu\text{g}$ 、約 $96\mu\text{g}$ 、約 $97\mu\text{g}$ 、約 $98\mu\text{g}$ 、約 $99\mu\text{g}$ 又は約 $100\mu\text{g}$ である。実施形態では、アジュバントの用量は、約 $50\mu\text{g}$ である。実施形態では、アジュバントは、サポニンアジュバント、例えばMATRIX-M（商標）である。

【0275】

【0326】 実施形態では、用量は、約0.1mL～約1.5mL、例えば約0.1mL、約0.2mL、約0.25mL、約0.3mL、約0.4mL、約0.5mL、約0.6mL、約0.7mL、約0.8mL、約0.9mL、約1.0mL、約1.1mL、約1.2mL、約1.3mL、約1.4mL又は約1.5mLの量で投与される。実施形態では、用量は、0.25mLの量で投与される。実施形態では、用量は、0.5mLの量で投与される。実施形態では、用量は、0.6mLの量で投与される。

【0276】

【0327】 MERS、SARS又はSARS-CoV-2コロナウイルスに対するワクチンの特定の実施形態では、用量は、約1μg/mL～約50μg/mL、10μg/mL～約100μg/mL、約10μg/mL～約50μg/mL、約175μg/mL～約325μg/mL、約200μg/mL～約300μg/mL、約220μg/mL～約280μg/mL又は約240μg/mL～約260μg/mLの濃度のCoV Sポリペプチドを含み得る。

10

【0277】

【0328】 別の実施形態では、本開示は、有効用量のナノ粒子又はCoV Sポリペプチドを組成物に添加することを含む、哺乳動物の感染又はその少なくとも1つの疾患症状に対する免疫を誘発するワクチン組成物を製剤化する方法を提供する。開示されるCoV Sポリペプチド及びナノ粒子は、感染病原体に対する免疫又は実質的な免疫を付与する免疫応答を刺激する組成物の調製に有用である。従って、一実施形態では、本開示は、ナノ粒子及び／又はCoV Sポリペプチドの少なくとも1つの有効用量を投与することを含む、対象における感染症又はその少なくとも1つの疾患症状に対する免疫を誘発する方法を提供する。

20

【0278】

【0329】 実施形態では、CoV Sポリペプチド又はそれを含むナノ粒子は、追加の免疫原性組成物と組み合わせて投与される。実施形態では、追加の免疫原性組成物は、SARS-CoV-2に対する免疫応答を誘発する。実施形態では、追加の免疫原性組成物は、開示されるCoV Sポリペプチド又はそれを含むナノ粒子の約1分以内、約5分以内、約10分以内、約20分以内、約30分以内、約40分以内、約50分以内、約1時間以内、約2時間以内、約3時間以内、約4時間以内、約5時間以内、約6時間以内、約7時間以内、約8時間以内、約9時間以内、約10時間以内、約11時間以内、約12時間以内、約13時間以内、約14時間以内、約15時間以内、約16時間以内、約17時間以内、約18時間以内、約19時間以内、約20時間以内、約21時間以内、約22時間以内、約23時間以内、約1日以内、約2日以内、約3日以内、約4日以内、約5日以内、約6日以内、約7日以内、約8日以内、約9日以内、約10日以内、約11日以内、約12日以内、約13日以内、約14日以内、約15日以内、約16日以内、約17日以内、約18日以内、約19日以内、約20日以内、約21日以内、約22日以内、約23日以内、約24日以内、約25日以内、約26日以内、約27日以内、約28日以内、約29日以内、約30日以内又は約31日以内に投与される。実施形態では、追加の組成物は、CoV Sポリペプチド又はそれを含むナノ粒子を含む組成物の初回用量と共に投与される。実施形態では、追加の組成物は、CoV Sポリペプチド又はそれを含むナノ粒子を含む組成物の追加用量と共に投与される。

30

40

【0279】

【0330】 実施形態では、追加の免疫原性組成物は、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質をコードするmRNA、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質をコードするプラスミドDNA、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質をコードするウイルスベクター又は不活性化SARS-CoV-2ウイルスを含む。

【0280】

【0331】 実施形態では、追加の免疫原性組成物は、CoV SポリペプチドをコードするmRNAを含む。実施形態では、mRNAは、配列番号1の986位及び987位におけるプロリン置換を含むCoV Sポリペプチドをコードする。実施形態では、mRNA

50

Aは、無傷のフーリン切断部位を含むC o V Sポリペプチドをコードする。実施形態では、mRNAは、配列番号1の986位及び987位におけるプロリン置換及び無傷のフーリン切断部位を含むC o V Sポリペプチドをコードする。実施形態では、mRNAは、配列番号1の986位及び987位におけるプロリン置換及び不活性フーリン切断部位を含むC o V Sポリペプチドをコードする。実施形態では、mRNAは、配列番号87のアミノ酸配列を有するC o V Sポリペプチドをコードする。C o V SポリペプチドをコードするmRNAは、脂質ナノ粒子内に封入されている。C o V SポリペプチドをコードするmRNAを含む免疫原性組成物の例は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるJackson et al. N. Eng. J. Med. 2020. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2- preliminary reportに記載されている。実施形態では、C o V SポリペプチドをコードするmRNAを含む組成物は、25 µg、100 µg又は250 µgの用量で投与される。

10

【0281】

【0332】 実施形態では、追加の免疫原性組成物は、C o V Sポリペプチドをコードするアデノウイルスベクターを含む。実施形態では、AAVベクターは、野生型C o V Sポリペプチドをコードする。実施形態では、AAVベクターは、配列番号1の986位及び987位におけるプロリン置換及び無傷のフーリン切断部位を含むC o V Sポリペプチドをコードする。実施形態では、AAVベクターは、配列番号1の986位及び987位におけるプロリン置換及び不活性フーリン切断部位を含むC o V Sポリペプチドをコードする。実施形態では、AAVベクターは、配列番号87のアミノ酸配列を有するC o V Sポリペプチドをコードする。以下の刊行物は、それぞれが参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、C o V Sポリペプチドをコードするアデノウイルスベクターを含む免疫原性組成物を記載している：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)。

20

【0282】

【0333】 実施形態では、追加の免疫原性組成物は、デオキシリボ核酸（DNA）を含む。実施形態では、追加の免疫原性組成物は、プラスミドDNAを含む。実施形態では、プラスミドDNAは、C o V Sポリペプチドをコードする。実施形態では、DNAは、配列番号1の986位及び987位におけるプロリン置換及び無傷のフーリン切断部位を含むC o V Sポリペプチドをコードする。実施形態では、DNAは、配列番号1の986位及び987位におけるプロリン置換及び不活性フーリン切断部位を含むC o V Sポリペプチドをコードする。実施形態では、DNAは、配列番号87のアミノ酸配列を有するC o V Sポリペプチドをコードする。

30

【0283】

【0334】 実施形態では、追加の免疫原性組成物には、不活性化ウイルスワクチンが含まれる。

【0284】

【0335】 実施形態では、C o V Sポリペプチド又はC o V Sポリペプチドを含むナノ粒子は、SARS-CoV-2又は異種SARS-CoV-2株によって引き起こされる感染が確認されたか、又は以前に確認された患者に投与される。SARS-CoV-2又は異種SARS-CoV-2株による感染は、核酸増幅（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応）又は血清学的試験（例えば、SARS-CoV-2ウイルス抗原に対する抗体の試験）によって確認され得る。実施形態では、C o V Sポリペプチド又はC o V Sポリペプチドを含むナノ粒子は、患者がCOVID-19と診断されてから少なくとも約3日、少なくとも約1週間、少なくとも約2週間、少なくとも約3週間、少なくとも約4週間後に患者に投与される。実施形態では、C o V Sポリペプチド又はC o V Sポリペプチドを含むナノ粒子は、患者がCOVID-19と診断されてから1週間～1年後、例えば、約1週間、約2週間、約3週間、約4週間、約5週間、約6週間、約1ヶ月、約2ヶ月

40

50

月、約3ヶ月、約4ヶ月、約5ヶ月、約6ヶ月、約7ヶ月、約8ヶ月、約9ヶ月、約10ヶ月、約11ヶ月又は約1年後に患者に投与される。実施形態では、C o V Sポリペプチド又はC o V Sポリペプチドを含むナノ粒子は、患者がC O V I D - 1 9と診断されてから1週間～20年後、例えば、約1週間、約2週間、約3週間、約4週間、約5週間、約6週間、約1ヶ月、約2ヶ月、約3ヶ月、約4ヶ月、約5ヶ月、約6ヶ月、約7ヶ月、約8ヶ月、約9ヶ月、約10ヶ月、約11ヶ月、約1年、約2年、約3年、約4年、約5年、約6年、約7年、約8年、約9年、約10年、約11年、約12年、約13年、約14年、約15年、約16年、約17年、約18年、約19年又は約20年後に患者に投与される。

【0285】

【0336】 実施形態では、C o V Sポリペプチド又はそれを含むナノ粒子は、患者に第1の免疫原性組成物が投与された後に投与される。第1の免疫原性組成物の非限定的な例には、S A R S - C o V - 2スパイク糖タンパク質、S A R S - C o V - 2スパイク糖タンパク質をコードするmRNA、S A R S - C o V - 2スパイク糖タンパク質をコードするプラスミドDNA、S A R S - C o V - 2スパイク糖タンパク質をコードするウイルスベクター又は不活性化S A R S - C o V - 2ウイルスが含まれる。実施形態では、C o V Sポリペプチド又はそれを含むナノ粒子は、第1の免疫原性組成物の投与から約1週間～約1年、約1週間～1ヶ月、約3週間～4週間、約1週間～5年、約1年～約5年、約1年～約3年、約3年～約5年、約5年～約10年、約1年～約10年又は約1年～約2年後に投与される。実施形態では、C o V Sポリペプチド又はそれを含むナノ粒子は、第1の免疫原性組成物の投与から約1週間～約1年後、例えば、第1の免疫原性組成物の投与から約1週間、約2週間、約3週間、約4週間、約5週間、約6週間、約7週間、約8週間、約9週間、約10週間、約1ヶ月、約2ヶ月、約3ヶ月、約4ヶ月、約5ヶ月、約6ヶ月、約7ヶ月、約8ヶ月、約9ヶ月、約10ヶ月、約11ヶ月又は約1年後に投与される。

【0286】

【0337】 実施形態では、C o V Sタンパク質又はC o V Sタンパク質を含むナノ粒子は、M E R S、S A R S、S A R S - C o V - 2及び異種S A R S - C o V - 2株の1つ又は複数に対する免疫又は実質的な免疫を付与する免疫応答を刺激する免疫原性組成物を調製するのに有用である。粘膜免疫及び細胞性免疫の両方は、感染症及び疾患に対する免疫に寄与し得る。上気道で局所的に分泌される抗体は、自然感染に対する耐性の主な要因である。分泌型免疫グロブリンA (s I g A) は、上気道の保護に関与し、血清I g Gは下気道の保護に関与している。感染によって誘発される免疫応答は、同じウイルス又は抗原的に類似したウイルス株による再感染から保護する。本明細書に開示されるナノ粒子での免疫後に宿主で産生される抗体は、他にも投与することができるため、対象に受動的投与を提供する。

【0287】

【0338】 実施形態では、C o V Sタンパク質又はC o V Sタンパク質を含むナノ粒子は、

(a) N T Dの1つ又は複数のアミノ酸の欠失であって、この1つ又は複数のアミノ酸は、アミノ酸56、57、131、132、229、230、231又はこれらの組み合わせからなる群から選択される、欠失；及び

(b) N T Dの1つ又は複数のアミノ酸の変異であって、この1つ又は複数の変異は、アミノ酸67、82、133、229、202、209、240、139、5、233、7、13、125、177又はこれらの組み合わせからなる群から選択される、変異；

(c) R B Dの1つ又は複数のアミノ酸の変異であって、この1つ又は複数の変異は、アミノ酸488、404、471、464、439、481、426、440及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、変異；

(d) S D 1 / 2の1つ又は複数のアミノ酸への変異であって、この1つ又は複数のアミノ酸は、601、557、668、642及びこれらの組み合わせからなる群から選択

10

20

30

40

50

される、変異；

(e) 不活性フーリン切断部位（アミノ酸 669～672 の 1 つ又は複数の変異に対応する）；

(f) S2 サブユニットの 1 つ又は複数のアミノ酸の欠失であって、このアミノ酸は、676～702、702～711、775～793、806～815；及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、欠失；

(g) S2 サブユニットの 1 つ又は複数のアミノ酸の変異であって、このアミノ酸は、973、974、703、1105、688、969、1014 及び 1163；及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、変異；

(h) TMCT（アミノ酸 1201～1260）からの 1 つ又は複数のアミノ酸の欠失であって、CoV S 糖タンパク質のアミノ酸は、配列番号 2 に対して付番されている、欠失

から選択される 1 つ又は複数の改変を有する S タンパク質を含む SARS-CoV-2 ウイルスに対する交差中和抗体を誘導する。

【0288】

【0339】 実施形態では、CoV S タンパク質又は CoV S タンパク質を含むナノ粒子は、アミノ酸 56 の欠失、アミノ酸 57 の欠失、アミノ酸 131、N488Y、A557D、D601G、P668H、T703I、S969A、D1105H、N426K 及び Y440F の欠失から選択される 1 つ又は複数の改変を有する S タンパク質を含む SARS-CoV-2 ウイルスに対する交差中和抗体を誘導し、これらのアミノ酸は、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する CoV S ポリペプチドに対して付番されている。

【0289】

【0340】 実施形態では、CoV S タンパク質又は CoV S タンパク質を含むナノ粒子は、アミノ酸 56 の欠失、アミノ酸 57 の欠失、アミノ酸 131、N488Y、A557D、D601G、P668H、T703I、S969A 及び D1105H の欠失から選択される 1 つ又は複数の改変を有する S タンパク質を含む SARS-CoV-2 ウイルスに対する交差中和抗体を誘導し、アミノ酸は、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する CoV S ポリペプチドに対して付番されている。

【0290】

【0341】 実施形態では、CoV S タンパク質又は CoV S タンパク質を含むナノ粒子は、D67A、D202G、L229H、K404N、E471K、N488Y、D601G 及び A688V から選択される 1 つ又は複数の改変を有する S タンパク質を含む SARS-CoV-2 ウイルスに対する交差中和抗体を誘導し、アミノ酸は、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する CoV S ポリペプチドに対して付番されている。

【0291】

【0342】 実施形態では、CoV S タンパク質又は CoV S タンパク質を含むナノ粒子は、アミノ酸 229～231 の欠失、D67A、D202G、K404N、E471K、N488Y、D601G 及び A688V から選択される 1 つ又は複数の改変を有する S タンパク質を含む SARS-CoV-2 ウイルスに対する交差中和抗体を誘導し、アミノ酸は、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する CoV S ポリペプチドに対して付番されている。

【0292】

【0343】 実施形態では、CoV S タンパク質又は CoV S タンパク質を含むナノ粒子は、アミノ酸 229～231 の欠失、L5F、D67A、D202G、K404N、E471K、N488Y、D601G 及び A688V から選択される 1 つ又は複数の改変を有する S タンパク質を含む SARS-CoV-2 ウイルスに対する交差中和抗体を誘導し、アミノ酸は、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する CoV S ポリペプチドに対して付番されている。

【0293】

【0344】 実施形態では、CoV S タンパク質又は CoV S タンパク質を含むナノ

粒子は、L 5 F、T 7 N、P 1 3 S、D 1 2 5 Y、R 1 7 7 S、K 4 0 4 T、E 4 7 1 K、N 4 8 8 Y、D 6 0 1 G、H 6 4 2 Y、T 1 0 1 4 I 及び V 1 1 6 3 F から選択される1つ又は複数の改変を有するSタンパク質を含むSARS-CoV-2ウイルスに対する交差中和抗体を誘導し、アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するCoV Sポリペプチドに対して付番されている。

【0294】

【0345】 実施形態では、CoV Sタンパク質又はCoV Sタンパク質を含むナノ粒子は、W 1 3 9 C 及び L 4 3 9 R から選択される1つ又は複数の改変を含むSタンパク質を有するSARS-CoV-2ウイルスに対する交差中和抗体を誘導し、アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するCoV Sポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、W 1 3 9 C 及び L 4 3 9 R 改変を含むCoV Sタンパク質は、配列番号117又は配列番号5のアミノ酸配列を有するシグナルペプチドと共に発現される。実施形態では、CoV Sタンパク質又はCoV Sタンパク質を含むナノ粒子は、D 6 0 1 G、W 1 3 9 C 及び L 4 3 9 R から選択される1つ又は複数の改変を有するSARS-CoV-2ウイルスに対する交差中和抗体を誘導し、アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するCoV Sポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、D 6 0 1 G、W 1 3 9 C 及び L 4 3 9 R 改変を含むCoV Sタンパク質又はナノ粒子は、配列番号117又は配列番号5のアミノ酸配列を有するシグナルペプチドと共に発現される。

【0295】

【0346】 実施形態では、CoV Sタンパク質又はCoV Sタンパク質を含むナノ粒子は、D 6 0 1 G、L 5 F、D 6 7 A、D 2 0 2 G、アミノ酸229～231の欠失、R 2 3 3 I、K 4 0 4 N、E 4 7 1 K、N 4 8 8 Y 及び A 6 8 8 V から選択される1つ又は複数の改変を有するSARS-CoV-2ウイルスに対する交差中和抗体を誘導し、アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するCoV Sポリペプチドに対して付番されている。実施形態では、CoV Sタンパク質又はCoV Sタンパク質を含むナノ粒子は、L 5 F、D 6 7 A、D 2 0 2 G、アミノ酸229～231の欠失、R 2 3 3 I、K 4 0 4 N、E 4 7 1 K、N 4 8 8 Y 及び A 6 8 8 V から選択される1つ又は複数の改変を有するSARS-CoV-2ウイルスに対する交差中和抗体を誘導し、アミノ酸は、配列番号2のアミノ酸配列を有するCoV Sポリペプチドに対して付番されている。

【0296】

【0347】 実施形態では、本開示は、高親和性抗MERS-CoV、抗SARS-CoV 及び抗SARS-CoV-2ウイルス抗体の1つ又は複数を生産する方法を提供する。本明細書に開示されるナノ粒子を用いた免疫によって産生される高親和性抗体は、S CoVポリペプチド又はS CoVポリペプチドを含むナノ粒子を含む免疫原性組成物を動物に投与すること、動物から血清及び／又は血漿を採取すること並びに血清及び／又は血漿からの抗体を精製することによって作製される。一実施形態では、動物は、ヒトである。実施形態では、動物は、ニワトリ、マウス、モルモット、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒト、ウマ、ヒツジ又はウシである。一実施形態では、動物は、ウシ又はウマである。別の実施形態では、ウシ又はウマ動物は、トランスジェニックである。さらに別の実施形態では、トランスジェニックウシ又はウマ動物は、ヒト抗体を生産する。実施形態では、動物は、モノクローナル抗体を生産する。実施形態では、動物は、ポリクローナル抗体を生産する。一実施形態では、方法は、アジュバント又は免疫刺激化合物の投与をさらに含む。さらなる実施形態では、精製された高親和性抗体は、ヒト対象に投与される。一実施形態では、ヒト対象は、MERS、SARS 及び SARS-CoV-2 の1つ又は複数に感染するリスクがある。

【0297】

【0348】 実施形態では、CoV Sタンパク質又はナノ粒子は、インフルエンザ糖タンパク質又はインフルエンザ糖タンパク質を含むナノ粒子と同時に投与される。適切な糖タンパク質及びナノ粒子は、それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2018/0133308号及び同第2019/0314487号に記載さ

10

20

30

40

50

れている。実施形態では、C o V Sタンパク質又はナノ粒子は、(a) B型インフルエンザ株由来の組換えインフルエンザヘマグルチニン(HA)糖タンパク質を含む界面活性剤コアナノ粒子；及び(b) A型インフルエンザ株由来の組換えインフルエンザHA糖タンパク質及びI S C O Mマトリックスアジュバントを含むヘマグルチニンサポニンマトリックスナノ粒子(H a S M a N)と同時投与される。実施形態では、C o V Sタンパク質又はナノ粒子は、非イオン性界面活性剤コア及びインフルエンザHA糖タンパク質を含むナノ粒子と同時投与され、このインフルエンザHA糖タンパク質は、非イオン性界面活性剤コアから外側に突出する頭部領域及び非イオン性界面活性剤コアに関連する膜貫通ドメインを含み、インフルエンザHA糖タンパク質は、H A O糖タンパク質であり、インフルエンザHA糖タンパク質のアミノ酸配列は、天然インフルエンザHAタンパク質のアミノ酸配列に対して100%の同一性を有する。実施形態では、インフルエンザ糖タンパク質又はナノ粒子は、C o V Sタンパク質又はナノ粒子と共製剤化される。

10

【0298】

【0349】 本開示で引用されたすべての特許、特許出願、参考文献及び雑誌記事は、あらゆる目的のために参照によりその全体が本明細書に明示的に組み込まれる。

【実施例】

【0299】

実施例

実施例 1

コロナウイルススパイク(S)ポリペプチドナノ粒子の発現及び精製

20

【0350】 天然コロナウイルススパイク(S)ポリペプチド(配列番号1及び配列番号2)並びに配列番号3、4、38、41、44、48、51、54、58、61、63、65、67、73、75、78、79、82、83、85、87、106、108、89、112～115、132、133、114、138、141、144、147、151、153、156、158、164～168に対応するアミノ酸配列を有するC o Vスパイクポリペプチドをバキュロウイルス発現系で発現させ、コロナウイルススパイク(S)ポリペプチドを発現する組換えプラークを採取し、確認した。いずれの場合にも、シグナルペプチドは、配列番号5である。図4及び図9は、C o VスパイクポリペプチドB V 2 3 6 4、B V 2 3 6 5、B V 2 3 6 6、B V 2 3 6 7、B V 2 3 6 8、B V 2 3 6 9、B V 2 3 7 3、B V 2 3 7 4及びB V 2 3 7 5の成功した精製を示す。表2は、前述のC o

30

【0300】

40

50

【表 19】

表 2: 選択された CoV スパイクポリペプチド

CoV S ポリペプチド	改変	配列番号
BV2364	N 末端ドメインの欠失	48
BV2365	不活性フーリン切断部位	4
BV2361 / BV2366	野生型	2
BV2367	アミノ酸 676-685 の欠失、不活性フーリン切断部位	63
BV2368	アミノ酸 702-711 の欠失、不活性フーリン切断部位	65
BV2369	アミノ酸 806-815 の欠失、不活性フーリン切断部位	67
BV2373、本明細書で「NVX-CoV2373」と呼ばれる組成物に製剤化	不活性フーリン切断部位、K973P の変異、V974P の変異	87
BV2374	K973P の変異、V974P の変異	85
BV2374	不活性なフーリン切断部位及び His タグ	58
BV2384	不活性フーリン切断部位 (GSAS)、K973P、V974P の変異	110
BV2425	不活性フーリン切断部位、K973P、V974P の変異、アミノ酸 56 の欠失、アミノ酸 57 の欠失、アミノ酸 131 の欠失、N488Y の変異、A557D の変異、D601G の変異、P668H の変異、T703I の変異、S969A の変異、D1105H の変異	114
BV2426	不活性フーリン切断部位、K973P の変異、V974P の変異、D67A の変異、D202G の変異、L229H の変異、K404N の変異、E471K の変異、N488Y の変異、D601G の変異、及び A688V の変異	115

【0301】

10

20

30

40

50

【表 2 0】

BV2438	不活性フーリン切断部位 (QQAQ: 配列番号 7)、K973P の変異、V974P の変異、K404N の変異、E471K の変異、N488Y の変異、D67A の変異、D202G の変異、L229H の変異、D601G の変異、A688V の変異	132	10
BV2423	不活性フーリン切断部位 (GG)、K973P の変異、V974P の変異、D601G の変異	133	
BV2425	不活性フーリン切断部位 (QQAQ: 配列番号 7)、K973P の変異、V974P の変異、アミノ酸 56、57、131 の欠失、N488Y の変異、A557D の変異、D601G の変異、P668H の変異、T703I の変異、S969A の変異、D1105H の変異	114	
BV2425-2	不活性フーリン切断部位 (GG)、K973P の変異、V974P の変異、アミノ酸 56、57、131 の欠失、N488Y の変異、A557D の変異、D601G の変異、P668H の変異、T703I の変異、S969A の変異、D1105H の変異	138	20
BV2439	不活性フーリン切断部位 (GG)、K973P の変異、V974P の変異、K404N の変異、E471K の変異、N488K の変異、D67A の変異、D202G の変異、L229H の変異、D601G の変異、A688V の変異	141	30

【 0 3 0 2】

【表 2 1】

BV2441	不活性フーリン切断部位 (QQAQ: 配列番号 7)、K973P の変異、V974P の変異、K404N の変異、E471K の変異、N488Y の変異、D67A の変異、D202G の変異、D601G の変異、A688V の変異、アミノ酸 229-231 の欠失	144
BV2442	不活性フーリン切断部位 (GG)、K973P の変異、V974P の変異、K404N の変異、E471K の変異、N488Y の変異、D67A の変異、D202G の変異、D601G の変異、A688V の変異、アミノ酸 229-231 の欠失	147
BV2443	不活性フーリン切断部位 (QQAQ: 配列番号 7)、K973P の変異、V974P の変異、T7N の変異、P13S の変異、D125Y の変異、R177S の変異、K404T の変異、E471K の変異、N488Y の変異、D601G の変異、H642Y の変異、T1014Y の変異、V1163F の変異	151
BV2448	不活性フーリン切断部位 (QQAQ: 配列番号 7)、K973P の変異、V974P の変異、W139C の変異、S481P の変異、D601G の変異、L439R の変異	153
BV1.526NY-1	不活性フーリン切断部位 (QQAQ: 配列番号 7)、K973P の変異、V974P の変異、T82I の変異、D240G の変異、E471K の変異、D601G の変異、A688V の変異	156

10

20

30

【0 3 0 3】

40

50

【表 2 2】

BV1.526NY-2	不活性フーリン切断部位 (QQAQ: 配列番号 7)、K973P の変異、V974P の変異、T82I の変異、D240G の変異、E464K の変異、D601G の変異、A688V の変異	158
BV2465	変異: T6R、G129D、R145G、L439R、T465K、D601G、P668R、D937G、K973P、V974P、不活性フーリン切断部位 (QQAQ: 配列番号 7) 欠失: 143, 144	164
BV2457	T82I、G129D、E141K、L439R、T471Q、D601G、P668R、Q1058H、K973P、V974P、不活性フーリン切断部位 (QQAQ: 配列番号 7)	165
BV2472	変異: T6R、G129D、R145G、K404N、L439R、T465K、D601G、P668R、D937G、W245I、K973P、V974P、不活性フーリン切断部位 (QQAQ: 配列番号 7) 欠失: 143, 144	166
BV2480	T82I、Y131S、Y132N、R333K、E471K、N488Y、D601G、P668H、D937N、不活性フーリン切断部位 (QQAQ: 配列番号 7)、K973P の変異、V974P の変異	167
BV2481	T82I、Y131T、Y132S、R333K、E471K、N488Y、D601G、P668H、D937N、不活性フーリン切断部位 (QQAQ: 配列番号 7)、K973P の変異、V974P の変異 アミノ酸 132 の後にアスパラギンの挿入	168

10

20

30

40

【0304】

【0351】 野生型 BV2361 タンパク質 (配列番号 2) は、ヒトアンジオテンシン変換酵素 2 前駆体 (hACE2) に結合する。CoV S ポリペプチドの結合を評価するために、バイオレイヤー干渉法及び ELISA を行った。

【0305】

バイオレイヤー干渉法 (BLI)

【0352】 BLI 実験は、Octet QK384 システム (Pall Forte Bio, Fremont, CA) を使用して行った。His タグ付きヒト ACE2 ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$) をニッケル荷電 Ni-NTA バイオセンサーチップに固定した。ベースライン後、SARS-CoV-2 S タンパク質を含む試料を 2 倍連続希釈し、600 秒間会合させた後、さらに 900 秒間

50

解離させた。OctetソフトウェアHT 101:1グローバルカーブフィットを使用してデータを分析した。

【0306】

【0353】 CoV SポリペプチドBV2361、BV2365、BV2369、BV2365、BV2373、BV2374は、hACE2に結合する能力を保持している（図5、図11A～図11C）。解離速度は、液相Sタンパク質の非存在下において、900秒間の観察で解離がほとんど又は全くないことから明かなように、Sタンパク質が強く結合したままであることを示した（図11A～図11C）。

【0307】

【0354】 さらに、結合は、特異的である。野生型CoV Sタンパク質BV2361及びCoV SポリペプチドBV2365及びBV2373は、MERS-CoV受容体であるジペプチジルペプチダーゼIV（DPP4）に結合しない。加えて、MERS Sタンパク質は、ヒトアンジオテンシン変換酵素2前駆体（hACE2）に結合しない（図6及び図11D～図11F）。

【0308】

E L I S A

【0355】 hACE2に対するCoV Sポリペプチドの特異性をELISAによって確認した。96ウェルプレートを100 μ LのSARS-CoV-2スパイクタンパク質（2 μ g/mL）で4℃において一晚コーティングした。プレートを、0.05%Tween（PBS-T）緩衝液を含むリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、TBS Startblockブロッキング緩衝液（ThermoFisher, Scientific）でブロックした。Hisタグ付きhACE2及びhDPP4受容体を3倍連続希釈し（5～0.0001 μ g mL⁻¹）、室温で2時間、コーティングしたウェルに添加した。プレートをPBS-Tで洗浄した。最適に希釈された西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）結合抗ヒスチジンを添加し、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジンペルオキシダーゼ基質（TMB, T0440-IL, Sigma, St. Louis, MO, USA）の添加により発色させた。SpectraMax Plusプレートリーダー（Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA）を使用して450nmのODでプレートを読み取り、SoftMaxソフトウェアでデータを分析した。EC50値を、GraphPad Prism 7.05ソフトウェアを使用して4パラメーターフィッティングによって計算した。

【0309】

【0356】 ELISAの結果は、野生型CoV Sポリペプチド（BV2361）、BV2365及びBV2373タンパク質がhACE2に特異的に結合するが、MERS-CoVによって使用されるhDPP-4受容体に結合できないことを示した（IC₅₀>5000 ng mL⁻¹）。野生型CoV Sポリペプチド及びBV2365は、同様の親和性（IC₅₀=36～38 ng/mL）でhACE2に結合したが、BV2373は、2分の1の濃度（IC₅₀=18 ng/mL）でhACE2結合の50%飽和を達成した（図7、図11D～図11F）。

【0310】

タンパク質及びナノ粒子の製造

【0357】 組換えウイルスをSf9昆虫細胞の感染によって増幅させる。昆虫細胞の培養物を約3MOI（感染多重度＝ウイルスffu又はpfu/細胞）でバキュロウイルスに感染させる。感染の48～72時間後に培養物及び上清を回収する。約30mLの粗細胞回収物を約800×gで15分間遠心分離することによって清澄化する。得られたコロナウイルススパイク（S）タンパク質を含む粗細胞回収物を、以下に説明するようにナノ粒子として精製する。

【0311】

【0358】 ナノ粒子を製造するために、非イオン性界面活性剤TERGITOL（登録商標）ノニルフェノールエトキシレートNP-9を膜タンパク質抽出プロトコルで使用する。粗抽出物を、陰イオン交換クロマトグラフィー、レンチルレクチンアフィニティー/HIC

10

20

30

40

50

及び陽イオン交換クロマトグラフィーを通過させることによってさらに精製する。洗浄した細胞を界面活性剤処理によって溶解し、BV及びSf9宿主細胞のDNA及びタンパク質の沈殿をもたらす低pH処理を行う。中和された低pH処理溶解物を清澄化し、陰イオン交換及びアフィニティークロマトグラフィーでさらに精製してから、2回目の低pH処理を行う。

【0312】

【0359】 アフィニティークロマトグラフィーを使用して、Sf9／BVタンパク質、DNA及びNP-9を除去し、さらにコロナウイルススパイク（S）タンパク質を濃縮する。簡単に述べると、レンチルレクチンは、カルシウム及びマンガンを含む金属タンパク質であり、多糖類及びグルコース又はマンノースを含むグリコシル化タンパク質に可逆的に結合する。コロナウイルススパイク（S）タンパク質を含む陰イオン交換フロースルー画分をレンチルレクチンアフィニティークロマトグラフィー樹脂（Capto Lentil Lectin, GE Healthcare）にロードする。グリコシル化コロナウイルススパイク（S）タンパク質を選択的に樹脂に結合させ、非グリコシル化タンパク質及びDNAをカラムフロースルーで除去する。弱く結合した糖タンパク質を、高塩濃度及び低モル濃度のメチル α -D-マンノピラノシド（MMP）を含む緩衝液によって除去する。

【0313】

【0360】 カラム洗浄液も使用して、NP-9界面活性剤を界面活性剤ポリソルベート80（PS80）と界面活性剤交換する。コロナウイルススパイク（S）ポリペプチドを、高濃度のMMPを含むレンチルレクチンカラムからナノ粒子構造で溶出させる。溶出後、コロナウイルススパイク（S）タンパク質三量体を、界面活性剤コアに含まれるコロナウイルススパイク（S）タンパク質三量体及びPS80から構成されるナノ粒子に組み込む。

【0314】

実施例 2

マウスにおけるコロナウイルススパイク（S）ポリペプチドナノ粒子ワクチンの免疫原性

【0361】 実施例 1 に記載の配列番号 87 のCoV S ポリペプチド（「BV2373」とも呼ばれる）を含むコロナウイルススパイク（S）タンパク質組成物を、雌BALB／cマウス（7～9週齢；Harlan Laboratories Inc., Frederick, MD）を使用してマウスモデルにおける免疫原性及び毒性について評価した。この組成物をサポニンアジュバント、例えばMATRIX-M（商標）の存在下及び非存在下で評価した。MATRIX-M（商標）を含む組成物には、5 μ g のMATRIX-M（商標）が含まれていた。0.01 μ g、0.1 μ g、1 μ g 及び10 μ g を含む様々な用量のコロナウイルススパイク（S）ポリペプチドを含むワクチンを単回投与（単回初回投与とも呼ばれる）（試験14日目）又は14日間間隔をあけた2回投与（初回／追加投与計画とも呼ばれる）として筋肉内投与した（試験0日目及び14日目）。プラセボ群は、非免疫対照としての役割を果たした。試験の1日目、13日目、21日目及び28日目に分析のために血清を採取した。ワクチン接種動物及び対照動物を1回（単回投与）又は2回（2回投与）の免疫の42日後にSARS-CoV-2に鼻腔曝露した。

【0315】

ワクチンの免疫原性

【0362】 0.1～10 μ g のBV2373及びMATRIX-M（商標）の単回初回投与で免疫した動物は、単回免疫の21～28日後に検出された抗S IgG力価が上昇していた（図13B）。10 μ g の用量のBV2373及びMATRIX-M（商標）で免疫したマウスは、hACE2受容体のCoV Sタンパク質への結合をブロックする抗体及び単回初回投与の21～28日後に検出されたウイルス中和抗体を産生した（図14及び図15）。初回／追加投与計画（2回投与）で免疫した動物は、すべての用量レベルで追加免疫の7～16日後に検出された抗S IgG力価が有意に上昇していた（図13A）。BV2373（1 μ g 及び10 μ g）及びMATRIX-M（商標）で免疫した動物は、免疫後、同様に高い抗S IgG力価を有した（それぞれGMT＝139, 000及び84, 0

00)。BV2373 (0.1 μ g、1 μ g又は10 μ g) 及びMATRIX-M (商標) で免疫したマウスは、アジュバントなしで10 μ gのBV2373で免疫したマウスと比較して抗S IgG力価が有意に高かった ($p \leq 0.05$ 及び $p \leq 0.0001$) (図13A)。これらの結果は、MATRIX-M (商標) アジュバントにより、用量を10分の1～100分の1に節約できる可能性を示している。さらに、BV2373 及びMATRIX-M (商標) の2回の投与による免疫は、hACE2受容体のSタンパク質への結合をブロックする高力価抗体 (IC50 = 218～1642) を誘発し、Vero E6細胞に対するSARS-CoV-2の細胞変性効果 (CPE) をすべての用量レベルで中和した (CPEの100%ブロックング = 7, 680～20, 000) (図14及び図15)。

【0316】

10

SARS-CoV-2 曝露

【0363】 防御免疫の誘発を評価するために、免疫マウスをSARS-CoV-2に曝露した。マウスは、野生型SARS-CoV-2ウイルスの複製を支持しないため、初回ワクチン接種の52日後、hACE2を発現するアデノウイルス (Ad/hACE2) をマウスに鼻腔内感染させて許容性にした。マウスに、鼻孔間で分割した50 μ L中の 1.5×10^5 pfuのSARS-CoV-2を鼻腔内接種した。曝露されたマウスは、感染当日及び感染の7日後まで毎日体重を量った。感染の4日後及び7日後、各ワクチン接種群と対照群から5匹のマウスを殺し、肺を採取して肺組織学のために準備した。

【0317】

【0364】 ウイルス力価をブランクアッセイによって定量した。簡単に述べると、採取した肺を、1.0mmガラスビーズ (Sigma Aldrich) 及びBeadruptor (Omini International Inc.) を使用してPBSでホモジナイズした。ホモジネートをコンフルエント培養に近いベロE6に添加し、SARS-CoV-2ウイルス力価を、6点希釈曲線を使用してブランク形成単位 (pfu) をカウントすることによって決定した。

20

【0318】

【0365】 感染の4日後、プラセボ処理マウスは、 10^4 のSARS-CoV-2 pfu/lungを有したが、MATRIX-M (商標) を伴わないBV2363で免疫したマウスは、 10^3 pfu/lungを有した (図16)。MATRIX-M (商標) を伴うBV2373での初回のみマウスの群は、ウイルス力価の用量依存的な低下を示し、10 μ gのBV2373用量のレシピエントは、感染の4日後に検出可能なウイルスを有していなかった。1 μ g、0.1 μ g及び0.01 μ gのBV2373用量を投与したマウスのすべては、プラセボワクチン接種マウスと比較して力価の顕著な低下を示した。初回/追加群では、10 μ g、1 μ g及び0.1 μ gの用量で免疫したマウスは、肺ウイルス量がほとんど検出されなかったが、0.01 μ g群ではプラセボ動物と比較して1logの低下が見られた。

30

【0319】

【0366】 体重減少は、ウイルス量の所見と一致した。BV2373 (0.1 μ g、1 μ g及び10 μ g) 及びMATRIX-M (商標) の単回投与を受けた動物は、ワクチン接種していないプラセボ動物と比較して体重減少の顕著な予防を示した (図17A)。アジュバントと共に初回及び追加投与を受けたマウスは、すべての用量レベルで体重減少の有意な予防も実証した (図17B及び図17C)。体重減少の予防に対するアジュバントの存在の効果を評価した。初回/追加 (2回接種) 及びアジュバントを投与されたマウスは、プラセボと比較して体重減少を有意に予防したが、アジュバントなしで免疫された群は、そうではなかった (図17C)。これらの結果は、BV2373がSARS-CoV-2から防御すること及び低い血清学的反応に関連する低用量のワクチンが体重減少を悪化させることも、疾患の悪化を実証することもないことを示した。

40

【0320】

【0367】 感染の4日後及び7日後に肺の組織病理学を評価した (図18A及び図18B)。感染の4日後、プラセボ免疫マウスは、混合炎症細胞集団に囲まれた肺胞中隔の肥厚を伴う太い気道の上皮細胞の露出を示した。主に好中球及びマクロファージからなる炎

50

症細胞による細動脈周囲の細胞浸潤が肺全体で観察された。感染の7日後までに、プラセボで処置したマウスは、細気管支周囲の炎症を示し、細動脈周囲の細胞浸潤が増加した。肥厚した肺胞中隔は、肺胞中隔全体にびまん性間質性炎症が増加したままであった（図18B）。

【0321】

【0368】 BV2373で免疫したマウスは、感染の4日後及び7日後の両方で用量依存的に肺病変の有意な減少を示した。初回のみ群は、プラセボマウスと比較して、10 μ g 及び1 μ g の用量で炎症の減少を示し、気管支及び細動脈の周囲の炎症が減少している。低用量の初回のみ群では、肺炎症は、プラセボ群の肺炎症に似ており、体重減少及び肺ウイルス力価と相関している。初回／追加免疫群は、試験したすべての用量で肺炎症の有意な減少を示し、これも肺ウイルス力価及び体重減少のデータと相関していた。4日目及び7日目の大気管支及び小気管支の上皮細胞は、実質的に維持され、細気管支の剥離及びウイルス感染の徴候は、最小限であった。10 μ g、1 μ g 及び0.1 μ g の用量で免疫した動物の細動脈は、プラセボと同様に、0.01 μ g の用量で見られる中程度の細胞浸潤のみを伴う最小限の炎症を有する。肺胞の炎症は、炎症に関連した用量がわずかに0.01 μ g と低い、高用量が投与された動物で減少した（図18A及び図18B）。これらのデータは、BV2373が曝露後の肺の炎症を軽減し、検出できる中和活性をほとんど又は全く誘発しないBV2373の用量及び投与計画でも、ウイルスに対する炎症反応の悪化と関連していないことを実証している。さらに、このワクチンは、曝露されたマウスにおいて、ワクチンに関連した呼吸器疾患（VAERD）の促進をもたらさない。

10

20

【0322】

T細胞応答

【0369】 配列番号87のCoV Sポリペプチドを含むワクチン組成物のT細胞応答に対する効果を評価した。BALB/cマウス（1群当たりN=6）を、5 μ g のMATRIX-M（商標）を伴う又は伴わない10 μ g のBV2373で21日の間隔において2回の投与で筋肉内免疫した。2回目の免疫の7日後（試験の28日目）に脾臓を採取した。ワクチン接種を受けていない群（N=3）は、対照としての役割を果たした。

【0323】

【0370】 抗原特異的T細胞応答を、2回目の免疫の7日後（試験の28日目）に採取した脾臓から、ELISPOT（商標）酵素結合免疫吸着アッセイ及び細胞内サイトカイン染色（ICCS）によって測定した。エキスピボ刺激後のIFN- γ 分泌細胞の数は、BV2373及びMATRIX-M（商標）で免疫したマウスの脾臓で、ELISPOT（商標）アッセイで測定したBV2373単独と比較して20倍増加した（ $p=0.002$ ）（図19）。CD4+ T細胞応答とCD8+ T細胞応答を別々に調べるために、ICCSアッセイを表面マーカー染色と組み合わせて行った。示されているデータは、CD44hi CD62L-エフェクターメモリーT細胞集団でゲートされている。IFN- γ +、TNF- α + 及びIL-2 + サイトカイン分泌CD4+ 及びCD8+ T細胞の頻度は、アジュバントなしで免疫したマウスと比較して、BV2373で免疫したマウスの脾臓で有意に高かった（ $p<0.0001$ ）（図20A～図20C及び図21A～図21C）。さらに、少なくとも2つ又は3つのサイトカインを同時に産生する多機能CD4+ 及びCD8+ T細胞の頻度も、アジュバントの非存在下で免疫したマウスと比較して、BV2373/MATRIX-M（商標）で免疫したマウスの脾臓で有意に増加した（ $p<0.0001$ ）（図20D及び図20E並びに図21D及び図21E）。BV2373/MATRIX-M（商標）による免疫により、CD4+ 及びCD8+ T細胞集団の両方で多機能表現型（例えば、IFN- γ 、TNF- α 及びIL-2の2つ以上を分泌するT細胞）の割合が増加した。メモリーCD4+ T細胞で検出された多機能表現型の割合は、CD8+ T細胞での割合よりも高かった（図22）。

30

40

【0324】

【0371】 CD4+ T細胞からの2型サイトカインIL-4及びIL-5の分泌もそれぞれICCS及びELISPOT（商標）によって測定した。BV2373/MATRIX-M

50

(商標)での免疫は、BV2373単独による免疫と比較して、2型サイトカインIL-4及びIL-5の分泌も増加した(2倍)が、1型サイトカイン産生の増強(例えば、IFN- γ が20倍に増加)ほどではなかった(図23A~図23C)。これらの結果は、MATRIX-M(商標)アジュバントの投与により、CD4+ T細胞発生がTh1応答に偏ったことを示している。

【0325】

[0372] 胚中心形成に対する免疫の効果を、脾臓中のCD4+ T濾胞ヘルパー(TFH)細胞及び胚中心(GC)B細胞の頻度を測定することによって評価した。MATRIX-M(商標)の投与により、脾臓中のTFH細胞(CD4+ CXCR5+ PD-1+)の頻度($p=0.01$)及びGC B細胞(CD19+ GL7+ CD95+)の頻度が有意に増加した($p=0.0002$) (図24A及び図24B並びに図25A及び図25B)。

10

【0326】

実施例3

アヌビスヒヒにおけるコロナウイルススパイク(S)ポリペプチドナノ粒子ワクチンの免疫原性

[0373] ヒヒにおけるBV2373を含むワクチン組成物の免疫原性を評価した。成体アヌビスヒヒを、用量範囲(1 μ g、5 μ g及び25 μ g)のBV2373及び50 μ gのMATRIX-M(商標)アジュバントを筋肉内(IM)注射によって21日間隔で2回投与して免疫した。非ヒト霊長類におけるMATRIX-M(商標)のアジュバント活性を評価するために、動物の別の群を、MATRIX-M(商標)を伴わない25 μ gのBV2373で免疫した。BV2373/MATRIX-M(商標)で免疫した動物では、1回の初回免疫から21日以内にすべての用量レベルで抗Sタンパク質IgG力価が検出された(GMT=1, 249~19,000)。抗Sタンパク質IgG力価は、追加免疫から1~2週間以内(28日目及び35日目)にすべての用量レベルで対数的に増加した(GMT=33, 000~174,000) (図26A)。

20

【0327】

[0374] BV2373(5 μ g又は25 μ g)及びMATRIX-M(商標)による単回免疫後、低レベルのhACE2受容体ブロック抗体が動物で検出された(GMT=22~37)。BV2373/MATRIX-M(商標)で免疫したすべての群で追加免疫から1~2週間以内に受容体ブロック抗体力価が有意に増加した(GMT=150~600) (図26B)。ウイルス中和抗体は、BV2373/MATRIX-M(商標)での1回の免疫後、すべての用量群で増加した(GMT=190~446)。25 μ gのBV2373単独で免疫した動物は、Sタンパク質のhACE2への結合をブロックする抗体を検出できなかった(図26C)。中和力価は、追加免疫の1週間後に6倍から8倍に増加した(GMT=1, 160~3,846)。中和力価は、2回目の免疫後にさらに25倍~38倍に増加した(GMT=6, 400~17,000) (図26C)。抗S IgGレベルと中和抗体力価との間に有意な相関が存在した($p<0.0001$) (図27)。非ヒト霊長類におけるアジュバント添加ワクチンの免疫原性は、実施例2の結果と一致し、中和抗体の作製及び用量節約の促進におけるMATRIX-M(商標)の役割をさらに促進する。

30

40

【0328】

[0375] 2回目の免疫の7日後(28日目)にPBMCを採取し、T細胞応答をELISPOTアッセイによって測定した。BV2373(5 μ g又は25 μ g)及びMATRIX-M(商標)で免疫した動物のPBMCは、IFN- γ 分泌細胞の数が最も多く、25 μ gのBV2373単独又はBV2373(1 μ g)とMATRIX-M(商標)で免疫した動物と比較して5倍であった(図28)。ICCS分析により、BV2373(5 μ g)及びMATRIX-M(商標)による免疫は、IFN- γ +、IL-2 +及びTNF- α + CD4+ T細胞の頻度が最も高いことを示した(図29A~図29C)。この傾向は、少なくとも2つ又は3つの1型サイトカインが同時に産生された多機能CD4+ T細胞にも当ては

50

まった（図 29 D 及び図 29 E）。

【0329】

実施例 4

コロナウイルススパイク（S）ポリペプチドナノ粒子ワクチンの構造の特性評価

【0376】透過型電子顕微鏡（TEM）及び二次元（2D）クラス平均化を使用して、BV2373の超微細構造を決定した。ネガティブ染色されたBV2373の高倍率（67,000倍及び100,000倍）TEM画像は、Sタンパク質ホモ三量体に対応する粒子を示した。

【0330】

【0377】自動ピッキングプロトコルを使用して、2Dクラス平均画像を構築した（Lander G.C. et al. J Struct Biol. 166, 95-102 (2009); Sorzano C.O. et al., J Struct Biol. 148, 194-204 (2004)）。ホモ三量体構造の2回の2Dクラス平均化により、長さ15 nm、幅13 nmの三角形の粒子の外観が明らかになった（図10、左上）。最近解明されたSARS-CoV-2スパイクタンパク質（EMD ID: 21374）のcryoEM構造を2D BV2373画像に重ねると、クラウン形状のS1（NTD及びRBD）及びS2ステムに良好に適合することを示した（図10、左下）。また、2D画像では、NTD/RBDクラウンの反対側の三量体構造の先端から突出したかすかな突起が明らかであった（図10、右上）。より大きいボックスサイズを使用した2Dクラスの平均化により、これらのかすかな突起がS三量体と非晶質構造との間の連結を形成することが示された。（図10、右下）。

【0331】

【0378】動的光散乱（DLS）は、野生型CoV Sタンパク質が、BV2365（33.4 nm）及びBV2373（27.2 nm）の2分の1の粒径と比較して、69.53 nmのZ-avg粒径を有したことを示している。多分散指数（PDI）は、BV2365及びBV2373の粒子が、野生型スパイクタンパク質（PDI=0.46）と比較して、サイズ、形状及び質量（PDI=0.25~0.29）が一般的に均一であることを示した（表3）。

【0332】

【表23】

表 3: SARS-CoV-2 三量体スパイクタンパク質の粒径及び熱安定性

SARS-CoV-2 S タンパク質	示差走査熱量測定(DSC)		動的光散乱(DLS)	
	T _{max} (°C) ¹	ΔHcal (kJ/mol)	Z-avg 直径 ² (nm)	PDI ³
野生型	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} : 融解温度 ² Z-avg: Z 平均粒径 ³ PDI: 多分散指数				

【0333】

【0379】 S三量体の熱安定性を示差走査熱量測定（DSC）によって決定した。野生型CoV Sタンパク質の熱転移温度（ $T_{max} = 58.6^{\circ}\text{C}$ ）は、それぞれ $T_{max} = 61.3^{\circ}\text{C}$ 及び 60.4°C であるBV2365及びBV2373と同様であった（表3）。極めて重要なことは、BV2365及びBV2373変異体をアンフォールドするのに必要な転移エンタルピー（それぞれ $\Delta H_{cal} = 466$ 及び 732 kJ/mol ）が、WTスパイクタンパク質をアンフォールドするのに必要な低いエンタルピー（ $\Delta H_{cal} = 153 \text{ kJ/mol}$ ）と比較して3～5倍増加したことであった。これらの結果は、WTスパイクタンパク質と比較して、BV2365及びBV2373の熱安定性が向上していることに一致している（表3）。

【0334】

【0380】 CoVスパイク（S）ポリペプチドナノ粒子ワクチンの安定性を動的光散乱によって評価した。様々なpH、温度、塩濃度及びプロテアーゼを使用して、CoVスパイク（S）ポリペプチドナノ粒子ワクチンの安定性を、天然CoVスパイク（S）ポリペプチドを含むナノ粒子ワクチンと比較した。

【0335】

実施例5

コロナウイルススパイク（S）ポリペプチドナノ粒子ワクチンの安定性

【0381】 CoVスパイク（S）ポリペプチドナノ粒子ワクチンの安定性を動的光散乱によって評価した。様々なpH、温度、塩濃度及びプロテアーゼを使用して、CoVスパイク（S）ポリペプチドナノ粒子ワクチンの安定性を、天然CoVスパイク（S）ポリペプチドを含むナノ粒子ワクチンと比較した。2-プロリン置換のないBV2365及び2つのプロリン置換を含むBV2373の安定性を、hACE2キャプチャーELISAを使用して様々な環境ストレス条件下で評価した。長時間の攪拌（48時間）、凍結／解凍（2サイクル）及び高温（ 25°C 及び 37°C で48時間）、極端なpHでのBV2373のインキュベーション（pH4及びpH9で48時間）は、hACE2受容体結合に影響を与えなかった（ $\text{IC}_{50} = 14.0 \sim 18.3 \text{ ng mL}^{-1}$ ）。

【0336】

【0382】 過酸化水素による酸化条件は、hACE2のBV2373への結合を8分の1に減少させた（ $\text{IC}_{50} = 120 \text{ ng mL}^{-1}$ ）（図12A）。2-プロリン置換のないBV2365は、複数の条件下でのhACE2結合の有意な減少によって決定されたように安定性が低かった（図12B）。

【0337】

【0383】 BV2384（配列番号110）及びBV2373（配列番号87）の安定性を比較した。BV2384は、GSASのフーリン切断部位配列（配列番号97）を有するのに対して、BV2373は、QQAQのフーリン切断部位（配列番号7）を有する。SDS-PAGE及びウェスタンブロットによって実証されたように、BV2384は、BV2373と比較して広範な分解を示した（図32）。さらに、走査デンストメトリー及び回収データは、BV2373（図34）と比較して完全長CoV Sタンパク質BV2384の予想外の減少、低い純度及び回収率（図33）を実証している。

【0338】

実施例6

カニクイザル（*Cynomolgus macaques*）における免疫応答

【0384】 本発明者らは、SARS-CoV-2感染のカニクイザル（*Cynomolgus macaques*）モデルにおいてBV2373によって誘発される免疫応答を評価した。群1～6を表4に示すように処置した。

【0339】

10

20

30

40

50

【表 2 4】

表 4: カニクイザル(*Cynomolgus macaque*)試験の群 1-6

群 (N=4)	BV2373 の用量	MATRIX- M TM の用量	免疫(日目)	採血 (日目)	曝露 (日目)
1	プラセボ	-	0, 21	0, 21, 33	35
2	2.5 µg	25 µg	0, 21	0, 21, 33	35
3	5 µg	25 µg	0	0, 21, 33	35
4	5 µg	50 µg	0, 21	0, 21, 33	35
5	5 µg	50 µg	0	0, 21, 33	35
6	25 µg	50 µg	0, 21	0, 21, 33	35

【0340】

【0385】 BV2373を含むワクチンの投与により、中和抗体（図35B）を含む抗CoV-S抗体（図35A）が誘導された。抗CoV-S抗体は、BV2373の1回投与（図38A）又は2回投与（図38B）後に誘導された。BV2373を含むワクチンの投与により、CoV-Sタンパク質のhACE2への結合をブロックする抗体も産生された（図38C及び図38D）。BV2373の投与後のカニクイザル（*Cynomolgus macaques*）において、抗CoV-SポリペプチドIgG力価とhACE2阻害力価との間に有意な相関が存在した（図38E）。中和抗体の産生を誘導するBV2373の能力を細胞変性効果（CPE）（図40A）及びプラーク低減中和試験（PRNT）（図40B）によって評価した。このデータは、表4のワクチン製剤が、対照と比較してSARS-CoV-2中和力価をもたらすことを明らかにした。

【0341】

【0386】 カニクイザル（*Cynomolgus macaques*）において抗CoV-S抗体及びhACE2のCoV-Sタンパク質への結合をブロックする抗体を誘導するBV2373の能力を含むワクチンをヒト回復期血清と比較した。このデータは、BV2373ワクチン製剤が、ヒト回復期血清と比較して優れた抗CoV-Sポリペプチド及びhACE2阻害力価を誘導したことを明らかにした（図39）。

【0342】

【0387】 BV2373ワクチン製剤は、SARS-CoV-2ウイルス複製も減少させた（図36A及び図36B）。ウイルスRNA（図36A、存在する全RNAに対応する）及びウイルスサブゲノムRNA（sgRNA）（図36B、複製するウイルスに対応する）レベルを感染性ウイルスの曝露の2日後及び4日後に気管支洗浄（BAL）で評価した（d2pi及びd4pi）。ほとんどの対象は、ウイルスRNAを示さなかった。2日目に一部の対象で少量のRNAが測定された。4日目までに、最低用量の2.5 µgの2匹の対象を除いて、RNAは、測定されなかった。サブゲノムRNAは、最低用量では、1匹の対象を除いて2日目にも4日目にも検出されなかった。ウイルスRNA（図37A）及びウイルスサブゲノム（sg）RNA（図37B）を感染の2日後及び4日後に鼻スワブによって評価した（d2pi及びd4pi）。ほとんどの対象は、ウイルスRNA

を示さなかった。2日目及び4日目に一部の対象で少量のRNAが測定された。サブゲノムRNAは、2日目にも4日目にも検出されなかった。対象を0日目に免疫し、2回投与群では0日目及び21日目に免疫した。これらのデータは、ワクチンが鼻の全ウイルスRNAを100分の1～1000分の1に減少させ、sgRNAを検出できないレベルまで減少させることを示し、ワクチンに対する免疫応答がウイルスの複製をブロックし、ウイルスの拡散を防止することを明らかにしている。

【0343】

実施例7

ヒトにおけるCoV-Sポリペプチドナノ粒子ワクチンの評価

【0388】 本発明者らは、BV2373を含むワクチンの安全性及び有効性を、18～59歳の健康な参加者131人における無作為化観察者盲検プラセボ対照第1相臨床試験で評価した。参加者は、21日間隔で2回の筋肉内注射で免疫した。参加者に、MATRIX-M（商標）（n=106）又はプラセボ（n=25）を含む又は含まないBV2373を投与した。群A～Eを表5に示すように処置した。図41は、臨床エンドポイントの評価のタイムラインを示す。

【0344】

【表25】

表5: 第1相ヒト試験の群A-E

群 (N=25)	参加者		0日目		21日目 (+5日間)	
	無作為	センチネル	BV2373 の用量	MATRIX- M TM の 用量	BV2373 の用量	MATRIX- M TM の用量
A	25	-	0 µg	0 µg	0 µg	0 µg
B	25	-	25 µg	0 µg	25 µg	0 µg
C	25	3	5 µg	50 µg	5 µg	50 µg
D	25	3	25 µg	50 µg	25 µg	50 µg
E	25	-	25 µg	50 µg	0 µg	0 µg

【0345】

【0389】 全体的な反応原性は、軽度であり、ワクチン接種は、十分に許容された。部位反応原性は、BV2373及びMATRIX-M（商標）で処置された患者でより頻度が高かった（図42A及び図42B）。

【0346】

【0390】 MATRIX-M（商標）を伴う及び伴わないBV2373の免疫原性を評価した。ワクチン接種の21日後、抗CoV-S抗体がすべてのワクチン投与計画で検出された（図43A）。MATRIX-M（商標）を含むワクチン投与計画における幾何平均増加倍率（GMFR）は、アジュバントなしのBV2373によって誘導されたものを上回った。2回目のワクチン接種の7日後（28日目）、抗CoV-S力価は、BV2373単独で観察されたものに対して、最初のワクチン接種で見られた反応よりさらに8倍を超えて増加し、14日以内（35日目）の反応は、さらに2倍を超えて増加し、約100倍の

GMFRを達成した。BV2373/MATRIX-M（商標）による単回ワクチン接種は、無症状の（曝露された）COVID-19患者と同様の抗CoV-S力価レベルを達成した。2回目のワクチン接種は、外来処置されたCOVID-19患者の回復期血清を6倍上回るGMEUレベルを達成し、COVID-19で入院した患者の回復期血清と同様のレベルを達成し、全体の回復期血清抗CoV-S抗体をほぼ6倍上回った。5 μ g及び25 μ gの2回投与のBV2373/MATRIX-M（商標）投与計画における応答は、同様であった。これは、用量を節約できるアジュバント（MATRIX-M（商標））の能力を強調している。

【0347】

【0391】 BV2373で処置したすべての群で中和抗体が誘導された（図43B）。BV2373及びMATRIX-M（商標）投与計画で処置された群は、BV2373単独で処置された群よりも約5倍のGMFRを示した（図43B）。アジュバントを使用した2回目のワクチン接種は、中和抗体力価に大きい影響を及ぼし、アジュバントを使用しない1回のワクチン接種に対して100倍を超えて増加させた。回復期血清と比較すると、BV2373/MATRIX-M（商標）による2回目のワクチン接種は、外来処置されたCOVID-19患者よりも4倍高いGMTレベルを達成し、レベルがCOVID-19で入院した患者のレベルに及び、全体の回復期血清GMTが4倍を超えた。

【0348】

【0392】 医療を必要とする臨床症状を有するCOVID-19患者から得られた回復期血清は、疾患重症度に比例して増加する抗CoV-S IgG及び中和力価を実証した（図43A及び図43B）。

【0349】

【0393】 回復期血清で処置された患者で観察されたもの（ $r=0.958$ ）（図44A）と同様に、BV2373及びMATRIX-M（商標）で処置された患者における中和抗体力価と抗CoV-S IgGとの間に強い相関（ $r=0.9466$ 、図44C）が観察された。この相関は、アジュバントなしのBV2373を投与された対象では観察されなかった（ $r=0.7616$ ）（図44B）。5 μ g及び25 μ gのBV2373/MATRIX-M（商標）群（表5の群C～E）の両方が同程度の2用量応答を実証し、2用量投与計画を利用した場合、いずれかのアッセイ測定を使用してすべての参加者をセロコンバージョンした。16人の参加者（群A～Dのそれぞれから4人の参加者）のT細胞応答は、BV2373/MATRIX-M（商標）投与計画が、BV2373による刺激時のIFN- γ 、IL-2及びTNF- α の産生に関して抗原特異的な多機能CD4+ T細胞応答を誘発したことを示した。Th1サイトカインの産生に強い偏りが存在した（図45A～図45D）。

【0350】

実施例 8

次世代CoV Sポリペプチドナノ粒子の発現、精製及び評価

【0394】 配列番号112、配列番号113、配列番号114又は配列番号115のアミノ酸配列を有するCoV Sポリペプチドをバキュロウイルス発現系で発現させ、コロナウイルススパイク（S）ポリペプチドを発現する組換えプラークを選択して確認する。配列番号112、配列番号113、配列番号114及び配列番号115の配列を有するCoV Sポリペプチドを、配列番号5のアミノ酸配列を有するN末端シグナルペプチドを使用して発現させる。

【0351】

【0395】 配列番号112の配列を有するCoV Sポリペプチドは、Asn-488のチロシンへの変異、Lys-973及びVal-974のプロリンへの変異並びにアミノ酸配列QQAQ（配列番号7）を有する不活性化フーリン切断部位を含む。

【0352】

【0396】 配列番号113の配列を有するCoV Sポリペプチドは、Asp-601のグリシンへの変異、Asn-488のチロシンへの変異、Lys-973及びVal-

974のプロリンへの変異並びにアミノ酸配列QQAQ（配列番号7）を有する不活性化フーリン切断部位を含む。

【0353】

【0397】 配列番号114の配列を有するCoV Sポリペプチドは、アミノ酸56、57及び131の欠失、Asn-488のチロシンへの変異、Ala-557のアスパラギン酸への変異、Asp-601のグリシンへの変異、Pro-668のヒスチジンへの変異、Thr-703のイソロイシンへの変異、Ser-969のアラニンへの変異、Asp-1105のヒスチジンへの変異、Lys-973及びVal-974のプロリンへの変異並びにアミノ酸配列QQAQ（配列番号7）を有する不活性化フーリン切断部位を含む。

10

【0354】

【0398】 配列番号115の配列を有するCoV Sポリペプチドは、Asn-488のチロシンへの変異、Asp-67のアラニンへの変異、Leu-229のヒスチジンへの変異、Asp-202のグリシンへの変異、Lys-404のアスパラギン酸への変異、Glu-471のリジンへの変異、Ala-688のバリンへの変異、Asp-601のグリシンへの変異、Lys-973及びVal-974のプロリンへの変異並びにアミノ酸配列QQAQを有する不活性化フーリン切断部位を含む。

【0355】

【0399】 CoV Sポリペプチドナノ粒子を実施例1と同様に作製する。配列番号112、配列番号112、配列番号113及び配列番号115のアミノ酸配列を有するCoV Sポリペプチドの安定性及び免疫原性を実施例2～7と同様に評価する。

20

【0356】

実施例9

BV2373及びサポニンアジュバントは、異種SARS-CoV-2株に対する防御免疫応答を誘導する

【0400】 目的：本発明者らは、英国の33施設で、18～84歳の成人において、21日間隔で5µg用量のBV2373及びサポニンアジュバント（画分A及び画分C i s c o mマトリックス、この例ではMATRIX-M（商標）とも呼ばれる）又はプラセボ（1：1）を2回筋肉内投与する無作為化観察者盲検プラセボ対照第3相試験を実施した。主要有効性エンドポイントは、2回目のワクチン接種から7日後に発症する、ウイルス学的に確認された、軽度、中程度又は重度のCOVID-19であった。

30

【0357】

【0401】 合計15,187人の参加者が無作為化され、そのうち7,569人の参加者がBV2373及びMATRIX-M（商標）の投与を受け、7,570人がプラセボの投与を受けた。27.8%は65歳以上であり、4%はSARS-CoV-2感染のベースライン血清学的エビデンスを有していた。BV2373及びMATRIX-M（商標）のレシピエントでは、COVID-19は、10例あり、プラセボのレシピエントでは96例あり、2回目のワクチン接種後少なくとも7日後に症状が発現した。BV2373及びMATRIX-M（商標）は、COVID-19の予防において89.7%（95%信頼区間、80.2～94.6）有効であった。重症のCOVID-19は5例あり、いずれもプラセボ群で報告された。事後分析により、プロトタイプSARS-CoV-2株とB.1.1.7変異体に対してそれぞれ96.4%（73.8～99.5）と86.3%（71.3～93.5）の有効性が明らかになった。プロトタイプSARS-CoV-2株は、配列番号2のアミノ酸配列を有するCoV Sタンパク質を含む。B.1.1.7変異体は、アミノ酸56、57及び131の欠失並びにN488Y、A557D、D601G、P668H、T703I、S969A及びD1105Hの変異を有するCoV Sタンパク質を含み、CoV Sポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列を有する野生型SARS-CoV-2 Sポリペプチドに対して付番されている。ワクチンの有効性は、併存疾患を有する参加者及び65歳以上の参加者を含むサブグループ全体で同様であった。反応原性は、一般に、軽度及び一過性であり、BV2373及びMATRIX-M（商標）を投与し

40

50

た群でより頻繁に発生した。重篤な有害事象の発生率は低く、2つの群で同様であった。BV2373及びMATRIX-M（商標）の2回投与計画は、プロトタイプ及びB.1.1.7変異体のブレンドに対して89.7%の有効性をもたらし、他の認可されたCOVID-19ワクチンと同様の安全性プロファイルを示した。

【0358】

【0402】 方法：治験デザイン及び参加者：本発明者らは、21日間隔で2回筋肉内投与したBV2373及びMATRIX-M（商標）又はプラセボの2回の5 µg用量の安全性及び有効性を評価した。この第3相試験は英国の33のリクルート施設で行われた。適格な参加者は、健康であるか、又はヒト免疫不全ウイルス並びに心臓及び呼吸器疾患を含むが、これらに限定されない、安定した慢性病状を有する18～84歳の男性及び妊娠していない女性であった。スクリーニング時に評価される健康状態は、病歴、バイタルサイン及び身体検査に基づいていた。主な除外基準には、COVID-19の病歴の記録、免疫抑制療法による処置又は免疫不全状態の診断が含まれる。

10

【0359】

【0403】 参加者は、事前に作成された無作為化スケジュールに従って集中型Interactive Response Technologyシステムを使用して、21日間隔でBV2373及びMATRIX-M（商標）又はプラセボ（生理食塩水）の2回投与を受けるブロック無作為化により、1：1の比率で無作為に割り当てられた。無作為化は、施設及び65歳以上の年齢によって層別化した。400人のサブ試験では、参加者は、初回投与と共に季節性インフルエンザワクチンの同時投与を受けた。これは観察者盲検試験であった。

20

【0360】

【0404】 各ワクチン接種後、参加者は急性反応の存在を監視するために少なくとも30分間試験施設で観察下に置かれた。参加者の部分群（非自発的な有害事象部分群）において、各投与後7日間、非自発的な局所的及び全身的有害事象を電子日記によって収集した。すべての参加者は、初回投与から2回目の投与後28日まで、自発的な有害事象について評価された。重篤な有害事象、特に注目すべき有害事象及び診療を要した有害事象が、初回投与から2回目の投与後1年まで評価された。安全性データは、少なくとも1用量のワクチン又はプラセボを投与されたすべての参加者について報告される。

【0361】

【0405】 安全性及び有効性：主要エンドポイントは、ベースラインで血清陰性であった参加者における2回目のワクチン接種から少なくとも7日後に発症する、ウイルス学的に確認された軽度、中程度又は重度の症候性COVID-19の最初の発生に対するBV2373及びMATRIX-M（商標）の有効性であった。症候性COVID-19は、米国食品医薬品局（FDA）の基準に従って定義された。

30

【0362】

【0406】 COVID-19が疑われる症状は、試験期間を通じてモニタリングされ、少なくとも10日間、COVID-19電子症状日記（InFLUenza Patient-Reported Outcome [FLU-PRO（著作権）] アンケート）を使用して収集された。COVID-19の疑いのある症状の発症時、SARS-CoV-2感染を確認するために、鼻及び喉からの呼吸器検体を3日間にわたって毎日採取した。ウイルス学的確認は、Thermo TaqPath（商標）システム（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）によるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）試験（英国DHSC試験所）を使用して行った。

40

【0363】

【0407】 BV2373及びMATRIX-M（商標）又はプラセボを少なくとも1回投与されたすべての参加者において安全性を分析し、まとめて記述した。非自発的な局所的及び全身的有害事象は、FDAの毒性等級付け基準及び各注射後の期間によっても要約した。自発的な有害事象は、Medical Dictionary for Regulatory Activities（MedDRA）バージョン23.1を使用して、基本語及び器官別大分類によってコード化され、重症度及び試験ワクチンとの関係によって要約された。

【0364】

50

【0408】 この試験は、軽度、中程度又は重度のC o v i d - 1 9の100症例を標的とする主要エンドポイントについて統計的有意性を達成すると予想される事象の総数によって設計され、推進された。100例という最終分析の標的数は、70%以上のワクチン有効性について95%超の検出力を提供するために選択された。有効性の単回中間解析は、Pocock境界条件を使用して、予想される主要エンドポイントの合計のおよそ50%（50件）の蓄積に基づいて実施された。主要目的の中間及び最終分析の主な（仮説検定）事象駆動分析は、主要エンドポイントの全体的な片側タイプI過誤率0.025で実行された。主要エンドポイントは、ベースラインで血清陰性であり、試験ワクチン又はプラセボの両方の投与を受け、主要エンドポイントに影響を与える主要なプロトコル逸脱がなく、2回目の注射後6日以内に症候性C o v i d - 1 9の確認症例を有しなかった参加者（プロトコルごとの有効性集団）において分析された。ワクチンの有効性は、 $E(\%) = (1 - RR) \times 100$ として定義された。式中、 $RR = 2$ つの試験群（BV2373及びMATRIX-M（商標）又はプラセボ）間の発生率の相対リスク。平均疾患発生率は、1000人当たりの年間発生率として報告された。推定RR及びその信頼区間（CI）は、ロバストな誤差分散を備えたポアソン回帰を使用して導出された。主要エンドポイントの仮説検定は、帰無仮説 H_0 ：ワクチン有効性 $\leq 30\%$ に対して実行された。成功基準は、統計的に有意なワクチンの有効性を実証する帰無仮説の否定を要した。

10

【0365】

【0409】 2020年9月28日から11月28日までに、合計16,645人の参加者がスクリーニングされ、15,187人の参加者が無作為化された（図47）。合計15,139人の参加者がBV2373及びMATRIX-M（商標）（7569）又はプラセボ（7570）の少なくとも1回の投与を受け、14,039人の参加者（BV2373及びMATRIX-M（商標）群の7020人、プラセボ群の7019人）が、プロトコルごとの有効性集団の基準を満たした。ベースライン人口統計は、プロトコルごとの有効性集団におけるBV2373及びMATRIX-M（商標）群とプラセボ群の間でバランスが取れており、48.4%が女性、94.5%が白人、0.4%が黒人又はアフリカ系アメリカ人、0.8%がヒスパニック又はラテン系で、44.6%が少なくとも1つの併存状態を有していた（疾病管理予防センター〔CDC〕の定義に基づく）。これらの参加者の年齢中央値は56歳であり、27.9%が65歳以上であった。表6は、臨床試験の参加者のベースライン人口統計の概要を提供する。

20

30

【0366】

40

50

【表 2 6】

表 6: 臨床試験参加者の人口統計及びベースライン特性

	BV2373 及び MATRIX- M TM n=7020	プラセボ n=7019	合計 N=14,039
年齢, y			
中央値	56.0	56.0	56.0
範囲	18, 84	18, 84	18, 84
年齢群, n (%)	5067 (72.2)	5062 (72.1)	10129 (72.1)
18-64 y	1953 (27.8)	1957 (27.9)	3910 (27.9)
≥65 y			
性別, n (%)			
男性	3609 (51.4)	3629 (51.7)	7238 (51.6)
女性	3411 (48.6)	3390 (48.3)	6801 (48.4)
人種又は民族, n (%)	6625 (94.4)	6635 (94.5)	13260 (94.5)
白人	26 (0.4)	26 (0.4)	52 (0.4)
黒人又はアフリカ系アメリカ人	201 (2.9)	212 (2.9)	413 (2.9)
アジア人	4 (<0.1)	0	4 (<0.1)
アメリカインディアン又はアラスカ先住民	1 (<0.1)	0	1 (<0.1)
ハワイ先住民又はその他の太平洋島民	70 (1.0)	59 (0.8)	136 (0.9)
複数	85 (1.2)	79 (1.1)	176 (1.2)
報告なし	4 (<0.1)	6 (<0.1)	11 (<0.1)
その他	4	2	8
不明	63 (0.9)	51 (0.7)	114 (0.8)
ヒスパニック又はラテン系			
SARS-CoV-2 血清状態, n (%)			
陰性	6964 (99.2%)	6944 (98.9)	13908 (99.1)
陽性	0	0	0
不明	56	75	131
BMI, kg/m ² , n (%)			
> 30.0: 肥満	313 (4.5)	323 (4.6)	636 (4.5)
併存症状態*	3117 (44.4)	3143 (44.8)	6260 (44.6)
あり	3903 (55.6)	3876 (55.2)	7779 (55.4)
なし			

10

20

30

40

【0 3 6 7】

【0410】SD、標準偏差；肥満度指数（BMI）は、体重（kg）を身長（m）の二乗で割ったものとして計算される。パーセンテージは、各処置及び全体で設定されたプロトコルごとの有効性分析に基づいている。＊併存対象は、病歴として報告された併存疾患の少なくとも1つを有するか、又はスクリーニングBMI値が30 kg/m²を超えると特定された対象である。

【0 3 6 8】

【0411】非自発的な有害事象サブグループには、2, 714人の参加者が含まれていた。全体として、BV2373及びMATRIX-M（商標）のレシピエントは、初回投与（

50

59.4%対20.9%)及び2回目の投与(80.2%対17.0%)の両方後にプラセボのレシピエントよりも高い頻度で非自発的な局所的有害事象を報告した(図50)。

【0369】

【0412】BV2373及びMATRIX-M(商標)のレシピエントの間で最も一般的に報告された局所的有害事象は、初回投与後(54.9%及び30.7%)及び2回目の投与後(76.6%及び51.9%)の両方の注射部位の圧痛及び疼痛であり、ほとんどの事象はグレード1(軽度)又は2(中程度)の重症度であり、平均持続期間は短かった(初回投与後2.3日間及び1.7日間、2回目の投与後2.8日間及び2.2日間)。非自発的な局所的有害事象は、高齢のBV2373及びMATRIX-M(商標)のレシピエント(65歳以上)よりも若いBV2373及びMATRIX-M(商標)のレシピエント(18~64歳)でより頻繁に報告された。

10

【0370】

【0413】全体として、BV2373及びMATRIX-M(商標)のレシピエントは、初回投与(47.6%対37.9%)及び2回目の投与(64.6%対30.8%)の両方後にプラセボのレシピエントよりも高い頻度で非自発的な全身的有害事象を報告した(図50)。BV2373及びMATRIX-M(商標)のレシピエントの間で最も一般的に報告された全身的有害事象は、初回投与後(24.5%、22.3%、20.5%)及び2回目の投与後(40.7%、41.1%及び41.0%)の両方の頭痛、筋肉痛及び疲労であり、ほとんどの事象はグレード1又は2の重症度であり、平均持続期間は短かった(初回投与後1.6日間、1.5日間及び1.9日間、2回目の投与後1.9日間、1.8日間及び1.9日間)。グレード4の全身的有害事象は、初回投与後に2人のBV2373及びMATRIX-M(商標)の参加者で報告され、2回目の投与後に1人のBV2373及びMATRIX-M(商標)の参加者で報告された。全身的有害事象は、高齢のワクチンレシピエントよりも若いワクチンレシピエントで多く報告され、1回目よりも2回目の接種後に報告されることが多かった。注目すべきことに、1回目及び2回目の投与後に発熱(体温38℃以上)がBV2373及びMATRIX-M(商標)参加者の2.3%及び5.1%で報告され、それぞれ1回目及び2回目の投与後にグレード3の発熱(39~40℃)が0.4%及び0.6%の参加者で報告された。ワクチンの各投与後にグレード4の発熱(40℃以上)が1件報告された。

20

【0371】

【0414】最終有効性分析のデータカットオフ日までにワクチン又はプラセボを少なくとも1回投与された参加者15,139人全員を、自発的な有害事象について評価した。自発的な有害事象の頻度は、プラセボレシピエントよりもBV2373及びMATRIX-M(商標)レシピエントの方が高く(25.3%対20.5%)、重篤な有害事象(1.0%対0.8%)、重症な有害事象(0.5%対0.5%)、診療を要した有害事象(3.8%対3.9%)、ワクチン(0.3%対0.3%)又は試験(0.2%対0.2%)の中止につながる有害事象、潜在的な免疫介在性の病状(0.1未満対0.1%未満)及びCOVID-19に関連する特に注目すべき有害事象(0.1%対0.3%)の頻度は同様であった。1例の関連する重症な有害事象がBV2373及びMATRIX-M(商標)レシピエントで報告され(心筋炎)、これは免疫介在性状態の可能性があると考えられた。独立したSMCは、事象がウイルス性心筋炎である可能性が最も高いと考えられた。参加者は回復した。アナフィラキシーのエピソードはなく、ワクチン関連の疾患増強のエビデンスもなかった。COVID-19関連の死亡は2例報告されており、そのうち1人はBV2373及びMATRIX-M(商標)群であり、単回ワクチン摂取を受けた7日後に症状が発現し、もう1人はプラセボ群であった。

30

40

【0372】

【0415】プロトコルごとの有効性集団における参加者14,039人のうち、ワクチンレシピエントの中で2回目の投与から少なくとも7日後に発症した、ウイルス学的に確認された軽度、中程度又は重度の症候性COVID-19が10例あり(1000人年当たり6.53;95%CI:3.32~12.85)、プラセボレシピエントでは96例

50

(1000人年当たり63.43; 95%CI: 45.19~89.03)、ワクチン有効性は89.7%(95%CI、80.2~94.6; 図49)であった。軽度、中程度又は重度のC o v i d - 19を有する65歳以上の10例のうち、1人はBV2373及びMATRIX-M(商標)の投与を受け、9人はプラセボの投与を受けていた。重度のC O V I D - 19が5人の参加者で発生し、そのうちBV2373及びMATRIX-M(商標)の投与を受けた人はおらず、5人はプラセボの投与を受けていた。プロトコルごとのワクチンレシピエントに入院又は死亡はなかった。65歳以上の参加者におけるワクチンの有効性は88.9%(95%CI、12.8~98.6)であり、1回目の投与後14日からの有効性は83.4%(95%CI、73.6~89.5)であった(図49)。主要エンドポイントの事後分析により、分離株がそれぞれSARS-CoV-2プロトタイプ株、SARS-CoV-2 B.1.1.7変異体又は未知である、29、66及び11例のC o v i d - 19の症例が特定された。未知の試料は、PCR試験が非DHSC PCR試験(例えば、現地病院の検査室)で行われ、変異体の決定が行われなかった試料であった。プロトタイプ株に対するワクチンの有効性は、96.4%(95%CI、73.8~99.4)であったが、B.1.1.7変異体に対する有効性は86.3%(95%CI、71.3~93.5)であった。(図49)。

10

20

30

40

50

【0373】

【0416】 考察: 21日間隔で投与されるBV2373及びMATRIX-M(商標)の2回投与計画は安全であり、プロトタイプ及びB.1.1.7変異体の両方によって引き起こされる症候性C O V I D - 19に対して89.7%有効であることが見出された。この試験で症例が蓄積されたタイミングにより、B.1.1.7変異株を含む、異なる株に対するワクチンの有効性を事後評価することが可能になった。B.1.1.7変異体は、現在英国国外で広く流行しており、間もなく米国で最も顕著な株になると予想されている。この変異体は、以前の株よりも感染力が高く、致死率の高さと関連付けられることが知られており、効果的なワクチンの必要性が強調される。これは、第3相試験においてB.1.1.7変異体に対して高いワクチン有効性(86.3%)を示した最初のワクチンである。この試験は個々のSARS-CoV-2株に対する有効性を評価することはできなかったが、BV2373及びサポニンアジュバントは、試験参加者において検出されたすべての株に対して有意な有効性を示した。特に、プロトタイプ株に対して決定された有効性の点推定値96.4%は、BNT161b2 mRNAワクチン(95.0%)及びmRNA-1273ワクチン(94.1%)についてこの株に対して報告されたものと同様であり、アデノベクターワクチンによって実証されたものよりも優れている。

【0374】

【0417】 最後に、BV2373及びサポニンアジュバント組成物も、B.1.351変異体に対して有効性を示した。

【0375】

【0418】 重症疾患(入院、集中治療室への入院及び死亡を含む)の予防は、ワクチン接種プログラムの重要な目的であり、BV2373及びサポニンアジュバントの2回投与計画は、他の認可されたC o v i d - 19ワクチンについて報告されているものと同様に、非常に高い有効性を示した。さらに、BV2373及びサポニンアジュバントは、初回投与後に他のC O V I D - 19ワクチンと同様の範囲の防御のレベルを提供した。BV2373及びサポニンアジュバントの第1/2相試験中に観察された好ましい安全性プロファイルは、この第3相試験で確認された。反応原性は、一般に軽度又は中程度であり、反応は高齢対象ではあまり一般的ではなく、より軽度であり、2回目の投与後により一般的であった。注射部位の圧痛及び疼痛、疲労、頭痛並びに筋肉痛は、局所的及び全身的な有害事象として最も多く報告されており、プラセボよりもワクチンでより一般的であった。重篤な有害事象の発生率は、ワクチン群とプラセボ群で同様であり(それぞれ0.5%)、ワクチン接種による死亡はなかった。

【0376】

【0419】 この試験の結果は、プロトタイプSARS-CoV-2及びSARS-Co

V-2 変異体 B. 1. 1. 7 によって引き起こされる COVID-19 が免疫によって予防できるというさらなるエビデンスを提供し、タンパク質ベースのアジュバント添加ワクチンの最初のエビデンスを提供する。これらのデータは、BV2373 及びサポニンアジュバントが標準的な冷蔵庫温度で保存でき、さらにスパイクタンパク質抗原に対する広範なエピトープ応答を誘導できることを確認する。この幅広い反応は、多様な異種 SARS-CoV-2 株に対する防御効果を提供する。

【0377】

実施例 10

BV2438 及びサポニンアジュバントは、異種 SARS-CoV-2 株に対する防御免疫応答を誘導する

【0420】 目的：組換えCoVスパイク (rS) タンパク質 BV2438 (配列番号 132)、BV2373 (配列番号 87) 又はその両方をサポニンアジュバントと組み合わせて含む組成物の免疫原性及びインビボ保護を評価した。サポニンアジュバントは、2つの iscom 粒子を含み、第1の iscom 粒子は、キラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 A を含み、キラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 C を含まず；及び第2の iscom 粒子は、キラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 C を含み、キラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 A を含まない。画分 A 及び画分 C は、アジュバント中のキラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 A 及びキラヤ・サポナリア・モリナ (Quillaja Saponaria Molina) の画分 C の重量の合計の 85 重量% 及び 15 重量% をそれぞれ占める。

【0378】

【0421】 SARS-CoV-2/WA1、SARS-CoV-2/B. 1. 1. 7 及び SARS-CoV-2/B. 1. 351 株に対する BV2438 及び BV2373 免疫計画単独又は前述のサポニンアジュバントと組み合わせた有効性が評価された。SARS-CoV-2/WA1 株は、配列番号 2 のアミノ酸配列を有するCoV Sポリペプチドを有する。SARS-CoV-2/B. 1. 1. 7 株は、アミノ酸 69、70 及び 144 の欠失並びに N501Y、A570D、D614G、P681H、T716I、S982A 及び D1118H の変異を含む、CoV Sポリペプチドを有し、CoV Sポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する野生型 SARS-CoV-2 Sポリペプチドに対して付番されている。SARS-CoV-2/B. 1. 351 株は、D80A、L242H、R246I、A701V、N501Y、K417N、E484K 及び D614G の変異を含むポリペプチドを含む、CoV Sポリペプチドを有し、CoV Sポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する野生型 SARS-CoV-2 Sポリペプチドに対して付番されている。

【0379】

【0422】 方法：

【0423】 細胞及びウイルス：ウイルス及び細胞は、以前に記載されているように処理した (18)。簡単に述べると、Vero E6 細胞 (ATCC # CRL 1586) を、10% (v/v) ウシ胎児血清 (Gibco)、1% (v/v) ペニシリン/ストレプトマイシン (Gemini Bio-products) 及び 1% (v/v) L-グルタミン (最終濃度 2 mM、Gibco) を添加した DMEM (Quality Biological) で培養した (Vero 培地)。細胞は、37°C、5% CO₂ で維持された。SARS-CoV-2/WA1 は、CDC によって提供された (BEI # NR-52281)。SARS-CoV-2/B. 1. 1. 7 及び SARS-CoV-2/B. 1. 351 は、寛大にもジョンス・ホプキンス大学の Andy Pekosz 博士から提供していただいた。両方のウイルスのストックは、CPE が確認され始めたときに、2 日間の Vero E6 細胞の感染によって調製した。培地を収集し、-80°C での保存用に分割する前に遠心分離によって清澄化した。ストックの力価は、以前に記載されているように、Vero E6 細胞を使用したブラークアッセイによって決定した。

【0380】

[0424] SARS-CoV-2 タンパク質の発現：SARS-CoV-2 構築物は、全長S糖タンパク質遺伝子配列（GenBank MN908947ヌクレオチド21563-25384）から合成的に産生した。全長S遺伝子は、ツマジロクサヨトウ（*Spodoptera frugiperda*）（Sf9）細胞における発現のためにコドン最適化され、GenScript（米国ニュージャージー州ピスカタウェイ）によって合成的に産生した。QuikChange Lightning部位特異的変異誘発キット（Agilent）を使用して、2つのスパイクタンパク質変異体を産生した。フーリン切断部位（682-RRAR-685）は、プロテアーゼ耐性であるように682-QQAQ-685に変異させ、位置K986P及びV987Pで2つのプロリン置換（2P）を導入して二重変異体BV2373を産生した。B. 1. 351変異体に基づいて組換えスパイク構築物を生成するために、D60A、D215G、L242H、K417N、E484K、N501Y、D614G及びA701Vの点変異も導入した。全長S遺伝子を、キンウワバ（*Autographa californica*）多面体プロモーターの転写制御下で、pFastBacバキュロウイルス導入ベクター（Invitrogen, Carlsbad, CA）のBamHI-HindIII部位の間にクローニングした。組換えバキュロウイルス構築物をプラーク精製し、マスターシードストックを調製し、ワーキングウイルスストックを産生するために使用した。バキュロウイルスマスター及びワーキングストック力価は、迅速力価キット（Clontech, Mountain View, CA）を使用して決定した。組換えバキュロウイルスストックは、細胞当たり0.01プラーク形成単位（pfu）以下の感染多重度（MOI）で、Sf9細胞を感染させることによって調製した。

10

20

【0381】

[0425] 発現及び精製：SARS-CoV-2 Sタンパク質は、以前に記載されているようにSf9細胞で産生された。簡単に述べると、細胞を無血清培地で増殖させ、組換えバキュロウイルスに感染させた。細胞を $27 \pm 2^\circ\text{C}$ で培養し、感染の68~72時間後に遠心分離（ $4000 \times g$ で15分間）により回収した。細胞ペレットを、ロイペプチンを含む25mMトリスHCl（pH8.0）、50mM NaCl及び0.5~1.0%（v/v）ポリオキシエチレンノニルフェノール（NP-9、TERGITOL（登録商標））NP-9中に懸濁した。NP-9界面活性剤を含むTris緩衝液でSタンパク質を原形質膜から抽出し、 $10,000 \times g$ で30分間の遠心分離によって清澄化した。Sタンパク質を、TMAE陰イオン交換及びレンチルレクチンアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。中空線維接線流濾過を使用して、25mMリン酸ナトリウム（pH7.2）、300mM NaCl、0.02%（v/v）ポリソルベート80（PS80）中で $100 \sim 150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ の精製スパイクタンパク質を製剤化した。精製したSタンパク質は、Gel-Code Blue試薬（Pierce, Rockford, IL）で染色した4~12%勾配のSDS-PAGEによって評価し、OneDscanシステム（BD Biosciences, Rockville, MD）を使用した走査デンシトメトリーによって純度を決定した。

30

【0382】

[0426] 示差走査熱量測定：試料（それぞれBV2426 Lot01Feb21及びBV2373 Lot15Dec20；rS-B. 1. 351BV2438及びrS-WU1BV2373）及び対応する緩衝液を1分当たり 1°C で 4°C から 120°C まで加熱し、示差熱容量の変化をNanoDSC（TA Instruments, New Castle, DE）で測定した。別のバッファースキャンを行ってベースラインを取得し、それを試料スキャンから差し引いて、ベースライン補正プロファイルを作成した。ピークの頂点が位置する温度は転移温度（ T_{max} ）であり、ピーク下面積は転移エンタルピー（ ΔH_{cal} ）を提供する。

40

【0383】

[0427] 透過型電子顕微鏡及び2Dクラス平均化：電子顕微鏡法は、NanoImaging Services（San Diego, CA）により、FEI Eagle 4kx4k CCDカメラを備えた、120keVで動作するFEI Tecani T12電子顕微鏡を用いて行った。SARS-CoV-2 Sタンパク質を製剤緩衝液で $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ に希釈した。試料（ $3 \mu\text{L}$ ）

50

をニトロセルロース支持400メッシュ銅グリッドに適用し、ウラニル形式で染色した。各グリッドの画像は、試料の全体的な分布を評価するために複数のスケールで取得された。高倍率画像は、公称倍率150,000倍($X_{nm}/\text{ピクセル}$)及び92,000倍($0.16\text{ nm}/\text{ピクセル}$)で取得された。画像は、デフォーカス公称値 $-2.0\text{ }\mu\text{m}\sim-1.5\text{ }\mu\text{m}$ (110,000倍)、電子線量約 $25\text{ e}/\text{\AA}^2$ で取得された。

【0384】

【0428】 クラス平均化では、92,000倍の高倍率画像から粒子が識別され、その後、以前に記載されるように、アラインメント及び分類が行われた。

【0385】

【0429】 生物発光イメージング(BLI)によるSARS-CoV-2 SのhACE2受容体への結合の動態：Sタンパク質受容体の結合動態は、Octet QK384システム(Pall Forte Bio, Fremont, CA)を使用したバイオレイヤー干渉法(BLI)によって決定された。Hisタグ付きヒトACE2($2\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$)をニッケル荷電Ni-NTAバイオセンサーチップに固定した。ベースライン後、SARS-CoV-2 rSタンパク質溶液を300nM~4.7nMの範囲で、動態緩衝液で2倍連続希釈し、600秒間会合させた後、さらに600~900秒間解離させた。OctetソフトウェアHT10.0を使用して、1:1グローバルカーブフィットでデータを分析した。

【0386】

【0430】 マウス試験デザイン：雌のBALB/cマウス(7~9週齢、17~22グラム、群当たりN=20匹)に、14日間隔で2回(試験0日目及び14日目)のrS-B.1.351BV2438、rS-WU1BV2373と5 μg サポニンベースのMatrix-M(商標)アジュバント(Novavax, AB, Uppsala, SE)を単独で、組み合わせて又は異種初回/追加投与で筋肉内(IM)注射によって免疫した。プラセボ群には、陰性対照としてワクチン製剤緩衝液を注射した。試験の-1日目、14日目、21日目及び32日目に分析のために血清を採取した。ワクチン接種動物及び対照動物を試験46日目にSARS-CoV-2に鼻腔曝露した。

【0387】

【0431】 Matrix-Mサポニンアジュバントによって媒介される細胞応答を評価するために、雌のBALB/cマウスの群(群当たりN=8)に、上記と同じ計画で、21日の間隔をあけてIM免疫した。2回目の免疫の7日後(試験の28日目)に脾臓を採取した。ワクチン接種を受けていない群(N=5)は、対照としての役割を果たした。

【0388】

【0432】 ヒヒ試験デザイン：9匹の成体ヒヒ(試験開始時の年齢10~16歳)を2~3匹/群の4群に無作為化し、1、5又は25 μg のrSで、rS-WU1BV2373を、50 μg のMatrix-MサポニンアジュバントとIM注射することによって免疫した。別の群をアジュバントなしで、25 μg のrSで免疫した。この一次免疫シリーズでは、動物に21日間隔の2回でワクチン接種を行った。一次免疫シリーズ後の免疫原性の結果は以前に記載されている(15)。およそ1年後(45週間)、すべての動物に、50 μg のMatrix-Mサポニンアジュバントを含む3 μg の用量のrS-B.1.351BV2438を1回又は2回追加投与した。抗体性及び細胞性免疫応答を測定するために、追加投与の前及び後に、血清及びPBMCを採取した。

【0389】

【0433】 マウスのSARS-CoV-2曝露：リン酸緩衝食塩水(PBS)で希釈したキシラジン($0.38\text{ mg}/\text{マウス}$)とケタミン($1.3\text{ mg}/\text{マウス}$)との混合物50 μL を腹腔内注射することによってマウスを麻酔した。マウスに50 μL 中の $7\times 10^4\text{ pfu}$ のB.1.117株又は $1\times 10^5\text{ pfu}$ のB.1.351株のSARS-CoV-2を鼻腔内接種した。曝露されたマウスは、感染当日及び感染後4日間毎日体重を量った。感染後2日目及び4日目に、各ワクチン接種群と対照群から5匹のマウスを殺し、肺を採取して、ブランクアッセイによってウイルス力価を決定し、qRT-PCRによってウイルスRNAレベルを決定した。

10

20

30

40

50

【0390】

【0434】 SARS-CoV-2 プラークアッセイ：SARS-CoV-2 肺力価は、1.0mmガラスビーズ (Sigma Aldrich) 及び Beadruptor (Omini International Inc.) を使用して、採取した肺を PBS (Quality Biological Inc.) 中でホモジナイズすることによって定量した。ホモジネートをコンフルエント培養に近いベロ E 6 に添加し、SARS-CoV-2 ウイルス力価を、6 点希釈曲線を使用してプラーク形成単位 (pfu) をカウントすることによって決定した。

【0391】

【0435】 ELISA による抗 SARS-CoV-2 スパイク IgG：ELISA を使用して、抗 SARS-CoV-2 S IgG 力価を決定した。簡単に述べると、96 ウェルマイクロタイタープレート (ThermoFisher Scientific, Rochester, NY, USA) を $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ の SARS-CoV-2 スパイクタンパク質でコーティングした。プレートを PBS-T で洗浄し、TBS Startblock ブロッキング緩衝液 (ThermoFisher, Scientific) でブロックした。マウス、ヒビ又はヒトの血清試料を段階的に希釈し ($10^{-2} \sim 10^{-8}$)、ブロックしたプレートに添加した後、室温で 2 時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを PBS-T で洗浄し、HRP 結合ヤギ抗マウス IgG 又はヤギ抗ヒト IgG (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) を 1 時間添加した。プレートを PBS-T で洗浄し、3', 5', 5'-テトラメチルベンジジンペルオキシダーゼ基質 (TMB, T0440-IL, Sigma, St Louis, MO, USA) を添加した。反応を TMB 停止液 (ScyTek Laboratories, Inc. Logan, UT) で停止した。SpectraMax Plus プレートリーダー (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) を使用して OD 450 nm でプレートを読み取り、SoftMax ソフトウェアでデータを分析した。EC50 値を、SoftMax Pro 6.5.1 GxP ソフトウェアを使用して 4 パラメーターフィッティングによって計算した。個々の動物の抗 SARS-CoV-2 S IgG 力価、群幾何平均力価 (GMT) 及び 95% 信頼区間 ($\pm 95\% \text{ CI}$) を、GraphPad Prism 7.05 ソフトウェアでプロットした。

【0392】

【0436】 hACE2 受容体ブロッキング抗体：ヒト ACE2 受容体ブロッキング抗体は、ELISA によって決定された。96 ウェルプレートを $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ の SARS-CoV-2 S タンパク質で 4°C において一晚コーティングした。PBS-T で洗浄し、StartingBlock (TBS) ブロッキング緩衝液 (ThermoFisher Scientific) でブロッキングした後、免疫マウス、ヒビ又はヒトの群からの連続希釈血清を、コーティングされたウェルに添加し、室温で 1 時間インキュベートした。洗浄後、室温で 1 時間、 $30 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ のヒスチジンタグ付き hACE2 (Sino Biologics, Beijing, CHN) をウェルに添加した。洗浄後、HRP 結合抗ヒスチジン IgG (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) を添加し、続いて洗浄し、TMB 基質を添加した。SpectraMax plus プレートリーダー (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) を使用して OD 450 nm でプレートを読み取り、SoftMax Pro 6.5.1 GxP ソフトウェアでデータを分析した。各試料の各希釈の阻害%は、SoftMax Pro プログラムの次の方程式を使用して計算された： $100 - [(MeanResults/ControlValue@PositiveControl) * 100]$ 。

【0393】

【0437】 血清希釈対阻害 (%) プロットを生成し、データへの 4 パラメーターロジスティック (4PL) カーブフィッティングにより、カーブフィッティングを行った。SARS-CoV-2 S タンパク質 (BV2373 又は BV2438) に対する hACE2 の 50% 阻害 (IC50) における血清抗体力価は、SoftMax Pro プログラムで決定された。

【0394】

【0438】 プラーク減少中和力価アッセイ (PRNT) による SARS-CoV-2 中和力価：PRNT を以前に記載されているように処理した (20)。簡単に述べると、血

10

20

30

40

50

清試料をDMEM (Quality Biological) 中、最初に1:40希釈で希釈し、その後、1:2段階希釈で合計11回の希釈を行った。血清を含まない対照を各プレートに含めた。次に、ブラックアッセイウェル当たり50PFUを標的に、SARS-CoV-2を各希釈物に1:1で添加し、37℃ (5.0%CO₂) で1時間インキュベートした。次いで、試料の力価をブラックアッセイによって決定し、中和力価を非処置対照と比較して決定した。4パラメーターロジスティック曲線をPRISM (GraphPad, San Diego, CA) でこれらの中和データにフィッティングし、ウイルスの50%の中和に必要な希釈率 (PRNT₅₀) をそのカーブフィットに基づいて計算した。

【0395】

[0439] 表面及び細胞内サイトカイン染色：表面染色では、マウス脾細胞を最初に抗CD16/32抗体と共にインキュベートしてFc受容体をブロックした。濾胞性ヘルパーT細胞 (Tfh) を特徴付けるために、脾細胞を次の抗体又は色素とインキュベートした：BV650結合抗CD3、APC-H7結合抗CD4、FITC結合抗CD8、PerCP-Cy5.5結合抗CXCR5、APC結合抗PD-1、Alexa Fluor 700結合抗CD19、PE結合抗CD49b (BD Biosciences, San Jose, CA) 及び黄色のLIVE/DEAD (登録商標) 色素 (Life Technologies, NY)。胚中心 (GC) B細胞を染色するために、脾細胞を、FITC結合抗CD3、PerCP-Cy5.5結合抗B220、APC結合抗CD19、PE-Cy7結合抗CD95及びBV421-結合抗GL7 (BD Biosciences) 並びに黄色の生存率測定色素 (LIVE/DEAD (登録商標)) (Life Technologies, NY) で標識した。

【0396】

[0440] マウス脾細胞の細胞内サイトカイン染色 (ICCS) では、細胞を96ウェルU底プレートで、1ウェル当たり2×10⁶個の細胞で培養した。細胞をrS-WU1BV2373又はrS-B.1.351BV2438スパイクタンパク質で刺激した。プレートを、BD GolgiPlug (商標) の存在下、37℃で6時間インキュベートし、インキュベーションの最後の4時間にわたり、BD GolgiStop (商標) (BD Biosciences) の存在下でインキュベートした。細胞は、CD3 (BV650)、CD4 (APC-H7)、CD8 (FITC)、CD44 (Alexa Fluor 700) 及びCD62L (PE) (BD Pharmingen, CA) に対するマウス抗体及び黄色のLIVE/DEAD (登録商標) 色素で標識した。Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) で固定した後、細胞をPerCP-Cy5.5結合抗IFN-γ、BV421結合抗IL-2、PE-Cy7結合抗TNF-α及びAPC結合抗IL-4 (BD Biosciences) と共にインキュベートした。すべての染色試料は、LSR-Fortessa又はFACSymphonyフローサイトメーター (Becton Dickinson, San Jose, CA) を使用して取得し、データはFlowJoソフトウェアバージョンXv10 (Tree Star Inc., Ashland, OR) で分析した。

【0397】

[0441] ヒヒPBMCのICSでは、図5Aに挙げた時点で採取したPBMCを、上記のようにrS-WU1BV2373又はrS-B.1.351BV2438で刺激した。細胞を、ヒト/NHP抗体BV650結合抗CD3、APC-H7結合抗CD4、FITC結合抗CD8、BV421結合抗IL-2、PerCP-Cy5.5結合抗IFN-γ、PE-Cy7結合抗TNF-α、APC結合抗IL-15、BV711結合抗IL-13 (BD Biosciences) 及び黄色のLIVE/DEAD (登録商標) 生存率測定色素で標識した。

【0398】

[0442] 酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)：マウスIFN-γ及びIL-5 ELISpotアッセイは、マウスIFN-γ及びIL-5 ELISpotキット (3321-2H及び3321-2A、Mabtech, Cincinnati, OH) の製造元の手順に従って行った。簡単に述べると、抗IFN-γ抗体又は抗IL-5抗体であらかじめコーティングされたプレートにおいて、200μLの体積中の4×10⁵個の脾細胞をrS-WU1BV2373又はrS-B.1.351BV2438で刺激した。検出二次抗体は、クローンR

S-6A2 IFN- γ 及びクローンTRFK4であった。各刺激条件を3回実行した。アッセイプレートに5%CO₂インキュベーター内で、37℃で24~48時間インキュベートし、BD ELISpot AEC基質セット (BD Biosciences, San Diego, CA) を使用して展開した。スポットは、ELISpotリーダー及びImmunoSpotソフトウェアv6 (Cellular Technology, Ltd., Shaker Heights, OH) を使用して計数及び分析された。IFN- γ 又はIL-5分泌細胞の数は、培地対照におけるバックグラウンド数を差し引くことによって得られた。グラフに示されるデータは、3回のウェルの平均である。

【0399】

【0443】 同様に、ヒヒIFN- γ 及びIL-4アッセイを、MabtechのNHPIF N- γ 及びヒトIL-4アッセイキットを使用して実行した。IFN- γ については、コーティング抗体ヒトIFN- γ 3420-2H及び検出抗体クローン7-B6-1を使用した。IL-4については、コーティング抗体ヒトIL-43410-2H (クローンIL4-I) 及び検出抗体クローンIL4-IIを使用した。アッセイは3回行った。

【0400】

【0444】 統計分析：統計分析は、GraphPad Prism 8.0ソフトウェア (La Jolla, CA) によって行われた。血清抗体力価を個々の動物についてプロットし、図に示すように幾何平均力価 (GMT) 及び95%信頼区間 (95%CI) 又は平均値 $\pm$ SEMをプロットした。群間の差異の統計的有意性を評価するために、log₁₀変換されたデータに対してテューキーの多重比較事後検定による通常の一元配置分散分析を行った。p値 $\leq$ 0.05は、統計的に有意であるとみなされた。

【0401】

【0445】 BV2438抗原の生物物理学的特性、構造及び機能：精製されたBV2438は、還元され、SDS-PAGEに供されると、約170kDaの予想分子量で移動した (図52A)。BV2438の熱安定性は、示差走査熱量測定 (DSC) によってBV2373と比較した。BV2438の主なピークは、プロトタイプBV2373タンパク質と比較して、熱転移温度 (T_{max}) の4℃上昇及び1.3倍高い転移エンタルピー (ΔH_{cal}) を示し、BV2438の安定性の増加を示していた (図52B、表7)。16,049粒子の2回の2次元 (2D) クラス平均化と組み合わせた透過型電子顕微鏡 (TEM) を使用して、BV2438の超微細構造を確認した。高倍率 (92,000倍及び150,000倍) のTEM画像では、長さ15nm、幅11nmの電球型の粒子の外観が明らかになった。これは、SARS-CoV-2スパイク三量体の融合前の形態と一致していた (PDB ID 6VXX; 52C)。これは、プロトタイプBV2373タンパク質について本発明者らが以前に観察したものと一致している。

【0402】

【0446】 変異体スパイクタンパク質構築物BV2438の機能的特性を確認するために、以前に記載したようにバイオレイヤー干渉法 (BLI) を使用して、このrSタンパク質のhACE2受容体への結合を決定した。BV2438は、結合定数 (K_a) 3.94×10^4 でhACE2に堅固に安定して結合することが見出された。これは、プロトタイプタンパク質BV2373 ($K_a = 1.08 \times 10^4$) と比較して、hACE2との会合が3.6倍大きいことを表す。これら2つのタンパク質の解離定数は、本質的に同一であった (BV2438及びBV2373についてそれぞれ 1.46×10^{-7} 及び 1.56×10^{-7})。本発明者らはさらに、以前に記載されているようにELISAによってBV2438のhACE2への結合を評価した。このアッセイでは、BV2438は、プロトタイプ構築物BV2373 ($EC_{50} = 9.4 \text{ ng/mL}$) よりわずかに低い濃度 ($EC_{50} = 8.0 \text{ ng/mL}$) で、hACE2の50%飽和を達成し、BV2438がBV2373と比較してわずかに高いhACE2に対する親和性を示すことが確認された (表7)。

【0403】

10

20

30

40

50

【表 2 7】

表 7: SARS-CoV-2 組換えスパイクタンパク質の熱安定性及び hACE2 結合

SARS-CoV-2 rS タンパク質	示差走査熱量測定 (DSC)		hACE2 結合 バイオレイヤー干渉法による hACE2 結合動態		hACE2 ELISA (EC ₅₀ , ng/mL)
	T _{max} (°C)	ΔHcal (kJ mol ⁻¹)	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
T _{max} , 融解温度; K _a , 結合定数; K _{dis} , 解離定数; EC ₅₀ , 50%結合。					

10

【0 4 0 4】

【0447】 B V 2 4 3 8 マウスの免疫原性：本発明者らは、サポニンアジュバントを配合した B V 2 4 3 8 及び B V 2 3 7 3 の抗体性及び細胞性免疫原性を評価した。抗体媒介免疫原性を評価するために、マウスの群（n = 20）を、初回及び追加投与の両方として B V 2 3 7 3 又は B V 2 4 3 8 のいずれかで、初回投与として B V 2 3 7 3 及び追加投与として B V 2 4 3 8 で又は両方のワクチンを初回及び追加ワクチン接種用に二価製剤で組み合わせ免疫した。プラセボ群には、陰性対照としてワクチン製剤緩衝液を投与した。一価免疫群では、0 日目及び 1 4 日目に 1 μg の r S 及び 5 μg のサポニンアジュバントを筋肉内注射した。二価免疫の場合、1 μg の各 r S 構築物を各免疫時に投与し、合計 2 μg の r S を 5 μg のサポニンアジュバントと共に投与した。試験デザインを図 5 3 に示す。4 つのワクチン計画のいずれかで免疫したマウスは、ワクチン接種後 2 1 日目の E L I S A で、B . 2 スパイク及び B . 1 . 3 5 1 スパイクの両方に対する抗体力価の上昇を示した。B V 2 3 7 3 又は B V 2 4 3 8 のいずれかを用いた一価ワクチン接種は、二価ワクチン接種又は異種ワクチン接種よりも有意に低い抗 S (W U 1) I g G 力価を生じたが、いずれも 2 倍を超えて I g G 力価を低下させることはなかった（図 5 4 A、図 5 4 B）。逆に、B V 2 3 7 3 単独による免疫は、他のすべての免疫計画と比較して、有意に低い B . 1 . 3 5 1 スパイクに対する力価を生じ；一価 B V 2 4 3 8 又は二価 r S による免疫は、試験した投与計画の中で最も高い抗 B . 1 . 3 5 1 スパイク I g G 力価を生じ、これらの計画間に有意差はなかった（図 5 4 A、図 5 4 B）。プラセボ群の動物は、予想どおり、検出不可能な抗 B . 2 スパイク及び抗 B . 1 . 3 5 1 スパイク I g G 力価を示した。

20

30

【0 4 0 5】

【0448】 マウスからの血清がスパイクと h A C E 2 の結合を阻害する能力も評価した。すべての免疫計画は、2 1 日目にどの群間にも有意差がなく、C o V スパイクポリペプチドへの h A C E 2 の結合をブロックする抗体の産生をもたらした（図 5 4 C、図 5 4 D）。しかし、B V 2 3 7 3 単独による免疫では、B . 1 . 3 5 1 スパイクと h A C E 2 の間の結合を破壊できる血清力価が有意に低下し；B V 2 3 7 3 単独免疫群の力価は、B V 2 4 3 8 単独免疫群の力価より 4 . 6 倍低く（p < 0 . 0 0 0 1）、二価 r S を投与された群の力価より 3 . 1 倍低かった（p < 0 . 0 0 0 1）。

40

【0 4 0 6】

【0449】 本発明者らは、次に、異なるワクチン接種計画間の中和抗体力価を評価した。ワクチン接種後 3 2 日目にワクチン接種動物から採取した血清を、S A R S - C o V - 2 / W A 1、S A R S - C o V - 2 / B . 1 . 1 . 7 及び S A R S - C o V - 2 / B . 1 . 3 5 1 株を使用してプラーク減少中和力価アッセイ（P R N T₅₀）で評価した。一価 B V 2 3 7 3 群からの血清は、3 つのウイルス株のそれぞれに対して同様の中和抗体力価を示した。一価 B V 2 4 3 8 で免疫したマウスからの血清は、B . 2 株と比較して、B . 1 . 3 5 1 及び B . 1 . 1 . 7 株に対する中和抗体力価の上昇を生じた（図 5 4 E）。異種ワクチン群は、二価 B V 2 3 7 3 / B V 2 4 3 8 ワクチン接種計画と同様に、B . 2 株と比較して、B . 1 . 3 5 1 及び B . 1 . 1 7 株に対して高い中和抗体力価を生じた。

50

【0407】

【0450】 BALB/cマウスにおけるSARS-CoV-2に対するBV2438防御：図53に記載されるようにワクチン接種したマウスを、B.1.1.7又はB.1.351のいずれかによる曝露に対する防御免疫を生成する能力について評価した。SARS-CoV-2/Wuhan 1 (B.2)株は、野生型マウスでは複製しないが、B.1.1.7及びB.1.351株は、スパイクORFに501Y変異を有し、スパイクタンパク質がマウスACE2に結合して細胞に侵入できるようにする。ワクチン接種後46日目に、マウスに 7×10^4 PFUのB.1.1.7 (n=10マウス/群)又は 1×10^5 PFUのB.1.351 (n=10マウス/群)を鼻腔内接種した。曝露後の期間を通じてマウスの体重を毎日測定し、感染後2日目及び4日目(試験48日目及び50日目)に、群当たり5匹のマウスをイソフルラン吸入によって安楽死させた。次いで、各マウスの肺を、ブラック形成アッセイによってウイルス量について評価し、RT-PCRによってウイルスRNAについて評価した。B.1.1.7に感染したプラセボBALB/cマウスは体重が減少せず、このSARS-CoV-2株に感染したワクチン接種群でも体重減少は観察されなかった。B.1.351感染マウスでは、B.1.351感染後4日目までにプラセボワクチン接種群で20%の体重減少が観察された(図55A、図55B)。いずれかの計画でワクチン接種されたすべてのマウスは、B.1.351感染後の体重減少から保護され、このモデルにおける保護の臨床相関が実証された。

10

【0408】

【0451】感染後2日目、プラセボ群のB.1.1.7感染マウスは 4×10^4 pfu/g肺を示したが、これはプラセボワクチン接種群では感染後4日目までに検出不可能なレベルまで低下した。任意のBV2373又はBV2438投与計画で免疫すると、感染後2日目又は4日目には検出可能な生ウイルスは存在せず、ワクチン接種後のウイルス量及び感染からの保護において5 logを超える減少を示した(図55C、図55D)。感染後2日目に、偽ワクチン接種群のB.1.351感染マウスは 8×10^8 pfu/g肺を示したが、感染後4日目には 2×10^5 pfu/g肺に低下した。いずれのrs計画で免疫した場合も、B.1.351感染マウスにおいて感染後2日目又は4日目に生ウイルスは検出されなかった。これは、ウイルス力価の劇的な減少を示しており、偽ワクチン接種マウスの感染後2日目までにウイルス量が5 logを超えて減少した(図55C、図55D)。肺RNAも、曝露後のサブゲノム(sgRNA)SARS-CoV-2 mRNA産生についてアッセイした。半発明者らは、それぞれのプラセボ群のレベルと比較して、両株による感染後2日目及び4日目に、免疫したマウスの肺sgRNAレベルが99%を超えて低下することを見出した(図55E、図55F)。

20

30

【0409】

【0452】これらの結果は、サポニンアジュバントと製剤化され、一価、二価又は異種投与計画として投与されたBV2373及びBV2438が、マウスにおいてSARS-CoV-2の両株、B.1.1.7及びB.1.351に対する防御を与えることを確認する。体重減少の低下、高い中和抗体力価及びマウスの肺におけるウイルス複製の排除と共に、本発明者らは、変異体スパイク標的ワクチンによる高度な防御ワクチン反応を実証する。

40

【0410】

【0453】マウスにおけるBV2438の細胞性免疫原性：BALB/cマウスの群(n=8/群)を、上記と同じBV2373又はBV2438の投与計画で、ただし21日間隔で、免疫した(図56A)。陰性対照群(n=4)には、ワクチン製剤緩衝液を注射した。追加免疫の7日後、試験28日目に脾臓を採取した。脾細胞を採取し、ELISpot及び細胞内サイトカイン染色(ICS)に供して、BV2373又はBV2438による刺激時のサイトカイン分泌を検査した。酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)は、すべてのワクチン接種計画において、IL-5産生細胞の数と比較してより多くのIFN- γ 産生細胞の数を示し、Th1に偏った応答を示した(図56B~D)。いずれかのrsで刺激すると、IFN- γ 、IL-2又はTNF- α を発現するCD4+T細胞及び3つ

50

のサイトカインすべてを発現する多機能性CD4+T細胞の存在によって測定されるように、ICSによって強いTh1応答が観察された(図56E、図57A~E)。Th2サイトカインIL-4を発現するがIL-2及びTNF- α について陰性であるCD4+T細胞も存在したが、その割合はTh1サイトカインについて観察されたものよりも低かった(図57A~E)。BV2373又はBV2438のいずれかで刺激した場合、試験したサイトカインのいずれについても、ワクチン接種群間でサイトカイン陽性細胞数の有意差は観察されなかった。

【0411】

【0454】 濾胞性ヘルパーT細胞(CSSCR5+PD-1+CD4+)は、CD4+T細胞のより大きい割合を表す傾向にあったが、プラセボ動物と比較してワクチン接種動物では、統計的に有意な上昇は、観察されなかった(図56F)。同様に、フローサイトメトリーを使用して、CD19+B細胞中のGL7+CD95+細胞の割合を決定することにより、胚中心形成を評価し、胚中心B細胞の割合がプラセボ群と比較してワクチン接種群でより高い傾向が観察されたが、一価BV2438投与計画で免疫した動物のみが有意に高い割合を示した(プラセボと比較して $p=0.049$; 図56G)。

【0412】

【0455】 ヒヒにおけるBV2373による一次免疫の1年後にBV2373による追加免疫によって誘導される既往反応：ヒヒの小コホート(合計 $n=9$)を、BV2373(50 μ gサポニンアジュバントを含む1 μ g、5 μ g若しくは25 μ g rS又はアジュバントなしの25 μ g rS)による一次免疫シリーズに供した。およそ1年後、結果として生じる免疫応答を調べるために、すべての動物を、50 μ gのサポニンアジュバントを含む3 μ gのBV2438を1回又は2回追加投与した(図58A)。最初のBV2438追加投与から7日後、最初にアジュバント添加BV2373を投与された動物は、一次免疫シリーズ中のピーク免疫応答で最初に観察されたものよりも高い抗S(WU1)IgG力価レベルによって示されるように、強力な既往反応を示した(図58B)。この試験で利用した試料サイズが小さいため有意な定量分析はできなかったが、この反応は、BV2438の2回目の追加投与によってさらに強化されるようではなかった。一次免疫シリーズ中にアジュバントなしのBV2373を投与された動物は、BV2438の追加投与に対して弱い応答を示したが、依然として抗S(WU1)IgG応答の上昇を示した。BV2438追加投与は、BV2373及びBV2438に対して同等の抗体力価を誘発し、最初にアジュバントなしのBV2373を投与された動物はより弱い応答を示した(図58C、図58D)。

【0413】

【0456】 野生型CoV Sタンパク質(配列番号2)又はB.1.351 rSとhACE2の間の相互作用を破壊できる血清抗体力価も、追加投与前並びにBV2438の1回又は2回の追加投与から7、21、35及び89日後に評価した。抗S IgG力価について観察されたものと同様に、一次免疫シリーズ中にアジュバント添加ワクチンを投与された動物は、追加投与前には検出不可能な力価を有していたにもかかわらず、BV2438追加投与から7日後に強いhACE2阻害抗体反応を示した。試料サイズが小さいため有意な定量分析はできなかったが、BV2373-hACE2ブロック抗体の力価は、BV2438-hACE2ブロック抗体のレベルと比較してわずかに高かった。一次免疫シリーズ中にアジュバントなしのワクチンを投与された動物は、BV2438追加投与後に、より低いhACE2ブロック力価を示した(図58E)。

【0414】

【0457】 中和抗体力価は、WA1、B.1.351及びB.1.1.7を中和する能力について血清を試験することによる生ウイルスマイクロ中和アッセイによって分析した。BV2438追加投与前に採取した血清は、これらすべてのウイルスに対する検出不可能なレベルの中和抗体を有していた。ワクチン接種後7日までに、3株すべてを中和する高力価抗体が検出され、この抗体反応はワクチン接種後35日まで高いままであった。一次シリーズにおいてアジュバントなしのBV2373で免疫した動物は、有意に低い抗体

レベルを示し、より広い範囲の中和力価を示した（図 5 8 F）。総合すると、これらのデータは、一次ワクチン接種シリーズから 1 年後であっても、強力な持久性のある抗体反応を示す。

【0415】

【0458】 3つのTh1サイトカインを発現する多機能性T細胞は、ヒトにおける最初のBV2438追加投与の7日後にも観察され、これらの応答は最初の追加投与の35日後も維持された（図 5 8 G 及び 図 5 9 A～G）。

【0416】

【0459】 BV2373 ワクチンを接種した成人からの血清による SARS-CoV-2 変異体の中和：BV2373 及びサポニンアジュバントを含むワクチンは、現在、B.1.1.7 及び B.1.351 が蔓延している地域を含む世界中で臨床試験中である。本発明者らは、これらの試験における個体からの血清が USA-WA1, B.1.1.7 及び B.1.351 を中和する能力を評価した。マイクロ中和アッセイは、PRNT₅₀ の読み取りによって行われた（図 6 0 A、図 6 0 B）。ワクチンの2回目の投与後の臨床試験参加者から無作為に選択された30の血清試料がアッセイされた。WA1とB.1.1.7を比較すると、大部分の血清試料にわたって中和活性に変化はなかった。1つの試料のみがB.1.1.7に対する中和抗体力価において統計的に有意な変化を有していた。WA1対B.1.351中和力価は中和力価の範囲の増加を示し、30試料中5試料でPRNT₅₀アッセイの平均から1標準偏差離れた中和の減少が示された。このデータは、B.1.1.7と比較して、BV2373 及びサポニンアジュバントの投与を受けたワクチン接種者の少数において、B.1.351の中和が減少していることを示す。

【0417】

【0460】 考察：本発明者らは、サポニンアジュバントでアジュバント添加したB.1.351スパイク変異体を使用した、完全長の安定化融合前 SARS-CoV-2 スパイク糖タンパク質ワクチンが、高レベルの機能的免疫を誘導し、B.1.1.7 及び B.1.351 SARS-CoV-2 株の両方に対しマウスを保護できることを示した。マウス又は非ヒト霊長類をBV2438で免疫すると、抗S抗体、hACE2受容体阻害抗体及びSARS-CoV-2中和抗体が誘導された。さらに、BV2438ワクチンは、CD4⁺T細胞応答を誘導し、胚中心形成を誘導し、B.1.351 及び B.1.1.7 曝露に対する防御を提供した。

【0418】

【0461】 マウスでは、B.1.351変異体指向性ワクチンでのワクチン接種後に産生された抗体は、hACE2と変異体スパイク又は祖先スパイクとの間の結合を同程度に阻害することができ、この変異体指向性ワクチンが祖先SARS-CoV-2株から「後方」を効果的に防御できることを示した。

【0419】

【0462】 本発明者らの試験のヒトワクチン血清の分析は、強力な抗体反応及び最小限の中和の損失が実証されている。南アフリカのWA1試験参加者にブレイクスルー感染のエビデンスがあるにもかかわらず、B.1.351ウイルスは、B.1.1.7 及び WA1と比較して、中和を有意に減少させないことを観察した。すべてのブレイクスルー感染は、B.1.351であった。したがって、単一又は複数の変異体rSワクチンを含む追加ワクチン接種は、抗体レベルを増加させるだけでなく、この研究で示されているように変異体へ適用範囲を拡大する。

【0420】

実施例 11

BV2373 及びサポニンアジュバントは、単回追加投与後に異種SARS-CoV-2株に対する防御免疫応答を誘導する

【0463】 参加者：この試験への登録には、18歳以上84歳以下の健康な男性及び女性の参加者が募集された。参加者は、肥満度指数が17～35 kg/m²であり、登録前にインフォームドコンセントを提供でき、（女性参加者の場合）異性愛を行わないこと又

は承認された避妊方法を使用することに同意した場合に適格であった。重症急性呼吸器症候群（SARS）の病歴若しくはCOVID-19、重度の慢性病状（例えば、糖尿病、うっ血性心不全、自己免疫疾患、悪性腫瘍）の確定診断を有する参加者又は新たな診断につながり得る未診断の疾病について現在評価中の患者は、試験から除外された。妊娠中又は授乳中の女性も除外された。

【0421】

【0464】 無作為化：患者を無作為に5つの群に割り当てた。5つの治療群のうち、1つはプラセボ対照（群A）、2つは追加投与によるさらなるワクチン接種が考慮された活性ワクチン群（群B及び群C）であった。およそ6ヶ月後、0日目及び21日目にBV2373（5 µg）及びサポニンアジュバント（50 µg）の2回投与（群B）又は0日目にBV2373（5 µg）及びサポニンアジュバント（50 µg）の1回投与と21日目にプラセボ（群C）のいずれかの一次ワクチン接種シリーズを受けるよう無作為化された、同意した参加者を、189日目に、同じ用量レベルでBV2373及びサポニンアジュバントの単回追加投与（群B2及びC2）又はプラセボ（群B1又はC1）のいずれかを投与されるように、1：1で再無作為化した。群Bの参加者がこの実施例の主な焦点である。

10

【0422】

【0465】 目的及び方法：本発明者らは、18～84歳の健康な成人において、5 µg 用量のBV2373及び50 µgのサポニンアジュバント（画分A及び画分C i s c o mマトリックス、この例ではMATRIX-M（商標）とも呼ばれる）又はプラセボ（1：1）を3回筋肉内投与する無作為化観察者盲検プラセボ対照第2相試験を実施した。初回及び2回目の用量は21日間隔で投与された。初回及び2回目の用量は、「一次ワクチン接種シリーズ」と呼ばれる。3回目の用量（「追加」用量）は、一次ワクチン接種シリーズから約6ヶ月後に投与された。3回の用量の注入量は、すべて0.5 mLであった。祖先SARS-CoV-2株及び選択された変異体（B.1.351 [ベータ]、B.1.1.7 [アルファ]、B.1.617.2 [デルタ]）に対する、IgG、MN50及びhACE2阻害のアッセイを含む安全性及び免疫原性パラメーターが評価された。

20

【0423】

【0466】 参加者は、電子日記を利用して、ワクチン接種当日及びその後、さらに6日間の反応原性を記録した。免疫原性分析のための血液試料は、追加投与を受けた後28日目に採取され、この時点で安全性フォローアップも行われた。免疫応答の測定には、血清免疫グロブリンG（IgG）抗体のアッセイ、中和抗体活性（阻害濃度>50% [MN50]でのマイクロ中和アッセイ）及びヒトアンジオテンシン変換酵素2（hACE2）受容体結合阻害が含まれる。SARS-CoV-2 rSタンパク質抗原に特異的な血清IgG抗体レベルは、適格なIgG酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）を使用して検出された。SARS-CoV-2ウイルスに特異的な中和抗体は、適格な野生型ウイルスMNアッセイを使用して測定された。血清IgG及びMN50アッセイデータは、祖先及びベータ変異体SARS-CoV-2株の両方について収集された。目的に適した機能的hACE2阻害アッセイ及び抗rS（抗組換えスパイク）IgG活性アッセイを両方使用して、SARS-CoV-2の祖先、B.1.351（ベータ）、B.1.1.7（アルファ）、SARS-CoV-2のB.1.617.2（デルタ）変異株に対する応答を分析した。

30

40

【0424】

【0467】 安全性アウトカムには、追加投与後7日間の参加者報告の反応原性事象及び追加投与後28日間を通じて発生した自発的な有害事象が含まれていた。追加投与の反応原性は、非自発的な局所的有害事象及び全身的有害事象によって別に記録された。追加ワクチン接種から追加接種後28日までの自発的な有害事象が記録された。有害事象が重篤なものであるか、ワクチン接種に関連するものであるか、COVID-19に関連するものであるか、免疫介在性疾患（PIMMC）に関連するものであるか、又は中止若しくは医療従事者への予定外の受診につながるものかについてのデータも収集された。免疫原性

50

分析のための参加者の試料は、追加投与の直前及び追加投与の28日後に採取した。

【0425】

【0468】 統計：分析には、追加用量（217日目）を投与されてから28日後に群B2から収集されたデータと比較するために、群Bの参加者からの一次ワクチン接種シリーズ（0日目、21日目、35日目、105日目、189日目）中及びその後得られた安全性及び免疫原性データが含まれていた。結果は、参加者の年齢群別でも分析された：18歳以上84歳以下、18歳以上59歳以下及び60歳以上84歳以下。

【0426】

【0469】 安全性分析には、BV2373及びサポニンアジュバント（群B2）又はプラセボ（群B1）の単回追加投与の注射を受けたすべての参加者が含まれていた。安全性分析は、各ワクチン接種から7日後までに分析された局所的及び全身的有害事象並びに追加投与から28日後までの非自発的な有害事象が発生した参加者の数及び割合として提示した。

【0427】

【0470】 結果：合計1610人の参加者をスクリーニングした。3人を除くすべての群Bに無作為化された参加者（ $n=257$ ）は、一次ワクチン接種シリーズでBV2373及びサポニンアジュバントの両方の投与を受け、同じ用量レベルでの単回追加投与の調査に考慮された（図63）。群B参加者の再無作為化は189日目に行われ、同意した210人の参加者が、群B2（ $n=104$ ）でBV2373及びサポニンアジュバントの単回追加投与を受けるか、又は群B1（ $n=106$ ）でプラセボを投与されるように1：1で割り当てられた。群B2では、1人を除くすべての参加者が追加投与として活性ワクチンを投与された。6人を除くすべての群B1の参加者は、追加投与としてプラセボを投与された。残りの6人の参加者のうち、4人は追加投与を受けず（うち1人は進行中の有害事象により、安全性のために群B1に含まれた）、2人は追加投与として誤って活性ワクチンを投与され、群B2で安全性が評価された。群Aの参加者は1人を除き全員が3回の投与すべてでプラセボを投与され、残りの参加者は追加投与として活性ワクチンが投与された。

【0428】

【0471】 群B2（45%）よりも群B1（58%）で女性参加者の割合が高かったことを除いて、人口統計及びベースライン特性は、活性ワクチン（群B2）及びプラセボ（群B1）追加群の間で概してバランスが取れていた（表8）。群A、B1及びB2全体で、年齢中央値は約57歳であり、参加者の45%が60歳以上84歳以下であった。ほとんど参加者は白人（87%）であり、ヒスパニック又はラテン系ではなかった（95%）。ベースラインSARS-CoV-2血清状態は、大部分が陰性（98%）であった。

【0429】

【0472】 非自発的な局所的及び全身的な反応原性事象の安全性報告は、BV2373及びサポニンアジュバントの3つの用量すべてにわたって増加傾向を示した（図64A～B）。追加投与後、群B2の参加者が報告した局所反応（圧痛、疼痛、腫脹、紅斑）の発生率は、一次ワクチン接種シリーズ後は70.0%（5.2% $\geq$ グレード3）であったのに対し、82.5%（13.4% $\geq$ グレード3）であった。グレード4の局所反応はまれであり、一次ワクチン接種シリーズ後に報告した参加者はいなかったのに対し、群B2の参加者1人は2つの事象（疼痛及び圧痛）を報告した。追加投与後、局所反応は短期間であり、紅斑（2.5日間）を除くすべての事象の持続期間中央値は2.0日間であった。一次ワクチン接種シリーズ後の局所反応も短期間であり、持続期間中央値は疼痛及び圧痛が2.0日間、紅斑及び腫脹が1.0日間であった。

【0430】

【0473】 全身反応も同様のパターンを示し、すべての事象（疲労、頭痛、筋肉痛、倦怠感、関節痛、悪心／嘔吐、発熱）の発生率は、一次ワクチン接種シリーズ後は52.8%（5.6% $\geq$ グレード3）であったのに対し、76.5%（15.3% $\geq$ グレード3）であった。グレード4の全身反応はまれであり、一次ワクチン接種シリーズ後に報告した

患者はいなかったのに対し、群 B 2 の参加者 1 人が 3 つの事象（頭痛、倦怠感、筋肉痛）を報告した。追加投与後、全身反応は本質的に一過性であり、2.0 日間の持続期間があった筋肉痛を除き、すべての事象の持続期間中央値は 1.0 日間であった。また、一次ワクチン接種シリーズ後の全身反応は、すべて短期間であり、すべての事象の持続期間中央値は、1.0 日間であった。

【0431】

【0474】 一次ワクチン接種シリーズ又は追加投与後の若年成人（18 歳以上 59 歳以下）と比較した場合、高齢者（60 歳以上 84 歳以下）では、局所的及び全身的な反応原性事象は発生頻度が低く、重症度も低かった。若年コホートでは、追加投与後の局所及び全身反応は、高齢コホートの参加者のそれぞれ 79.5%（6.8% ≥ グレード 3）及び 66.7%（2.2% ≥ グレード 3）に対し、それぞれ、参加者の 84.9%（18.9% ≥ グレード 3）及び 84.9%（26.4% ≥ グレード 3）で報告された。

【0432】

【0475】 自発的な有害事象は、活性ワクチンを追加投与された参加者（群 B 2）、プラセボを追加投与された参加者（群 B 1）及び試験全体を通じてプラセボを 3 回投与された参加者（群 A）にわたって要約した。追加投与から 28 日後までに、一次ワクチン接種シリーズで最初に活性ワクチンを投与された参加者（群 B 2 及び B 1）は、プラセボのみを投与された参加者（群 A）よりも自発的な有害事象の発生率が高く、それぞれ参加者の 12.4%、12.7% 及び 11.0% がそのような事象を報告した。自発的な重篤な有害事象について、同様の傾向が見られた（それぞれ 5.7%、3.9% 及び 2.4%）。報告された他のタイプの A E には、診療を要した A E（医療機関の受診を必要とする事象；M A A E）、潜在的な免疫介在性病状（P I M M C）、C O V I D 19 に関連する事象及び重症な有害事象（S A E）が含まれていた。

【0433】

【0476】 全体として、M A A E は 3 群全体で活性ワクチンの追加投与を受けた参加者においてわずかに高い頻度で発生し（群 B 2、B 1 及び A でそれぞれ 30.5%、26.1% 及び 23.2%）、関連事象は少数の参加者で報告された（それぞれ 1.9%、0% 及び 1.2%）。P I M M C と考えられる事象は、試験全体を通じてまれであり、群 B 2 と群 A の参加者 1 名がそれぞれ単一の事象を報告したが、いずれの事象も試験処置に関連しないと評価された。C O V I D - 19 に関連する有害事象を報告した参加者はいなかった。

【0434】

【0477】 S A E も試験全体で低頻度であり、群 B 2、B 1 及び A の参加者のそれぞれ 5.7%、3.3%、1.6% に発生し、すべての事象は、試験処置に関連しないと評価された。

【0435】

【0478】 S A E は、それぞれ 1 回目の投与、2 回目の投与及び追加投与後、群 B 2 の参加者の 0%、4.8% 及び 1.0% に発生し、群 B 1 の参加者の 0%、2.0% 及び 2.0% に発生し、群 B 2 及び B 1 の参加者に対する S A E の評価では、活性ワクチンの追加投与との関係は示されなかった。

【0436】

【0479】 群 B の I g G 及び M N 50 幾何平均力価（G M T）の低下は、一次ワクチン接種シリーズ（35 日目）から 189 日目まで観察された（それぞれ、I g G については 43,905 E L I S A 単位 [E U] ~ 6,064 E U、M N 50 については 1,470 ~ 63）。追加投与の 28 日後（217 日目）、I g G 及び M N 50 力価は、追加免疫前の力価及び一次シリーズによって生じた 35 日目の力価の両方と比較して強力に増加した（図 65、図 66）。

【0437】

【0480】 祖先 S A R S - C o V - 2 株では、血清 I g G G M T は、一次ワクチン接種シリーズ（35 日目）後の 43,905 E U から、追加投与（217 日目）後の 204,

10

20

30

40

50

367 EUまで約4.7倍増加した。追加投与後のより高い増加倍率は、若年成人（4.1倍）と比較して、高齢者（5.1倍）で見られた。同様に、祖先SARS-CoV-2株に特異的なMN50アッセイGMTは、同じそれぞれの時点で1,470から6,023まで約4.1倍増加し、高齢者と若年成人ではそれぞれ4.0倍と3.8倍増加した。
【0438】

【0481】 ベータ変異体について、IgG GMTは、追加投与前189日目の4,317 EUから、追加投与後の約40.6倍の増加を反映して、217日目の175,190 EUに増加した。これらの力価は、祖先株について35日目に観察された力価よりも4倍高かった（GMT 175,190 EU対43,905 EU）。ベータ変異体MN50アッセイデータは、追加投与前（189日目）から追加投与後（217日目）にかけて、約50.1倍（GMT 13対661）という、同様の力価の増加倍率を示したが、力価は祖先株で35日目に見られたものよりも低かった（GMT 661 vs 1,470）。（表9、表10）。

10

【0439】

【0482】 35日目（群B）及び217日目（群B2）からの参加者の血清を使用して、追加のSARS-CoV-2変異体に対する免疫応答を評価する2つのアッセイが開発された。機能的hACE2阻害アッセイを利用して、祖先株（配列番号1と比較してD614G変異を有するCoV Sポリペプチドを含むSARS-CoV-2ウイルス）並びにSARS-CoV-2のデルタ、ベータ及びアルファ変異体に対する活性を比較した。それぞれの順序で、hACE2阻害力価の6倍、6.6倍、10.8倍、8.1倍及び19.9倍の増加が観察された（表12A、表12B、図62A～B）。SARS-CoV-2の同じ株間で抗rSIgG活性を比較した第2のアッセイでは、追加投与後に5.4倍（祖先）、11.1倍（デルタ）、6.5倍（ベータ）、9.7倍（アルファ）高い力価が観察されることがわかった（表11A、表11B、図61A～B）。

20

【0440】

【0483】 結果：一次シリーズの2回投与のおよそ6ヶ月後にワクチンの単回追加用量を投与すると、免疫原性が有意に向上すると共に反応原性事象が漸増した。

【0441】

【0484】 189日目の追加投与前、免疫された参加者の抗SARS-CoV-2抗体力価は、一次ワクチン接種シリーズ後の35日目に採取された試料と比較すると著しく低かった（群BIgG及びMN50GMTは、それぞれ43,905 EUから6,064 EU、1,470から63に低下した）。中和抗体の存在は、症候性COVID-19に対する防力を強く示す。

30

【0442】

【0485】 本試験では、追加投与に対する抗体反応を、祖先ワクチン株並びにアルファ、ベータ及びデルタを含む最近のSARS-CoV-2変異体について評価した。祖先株では、217日目のIgG力価は追加投与前の189日目の力価よりもおよそ34倍高い一方、中和抗体力価は追加投与後におよそ96倍増加した。追加投与後のIgG力価及びMN力価はいずれも、35日目の一次シリーズの2回投与後に見られた値よりも4倍を超えて高かった。これは、英国の第3相試験（89.7%）及び米国／メキシコの第3相試験（90.4%）の両方で35日目の力価が高レベルの臨床有効性に相当したことから注目に値する。年齢群別に分類すると、より高い増加倍率は、若年成人（18歳以上59歳以下）と比較して、高齢者（60歳以上84歳以下）で見られた。この知見は、初回の2回ワクチン接種シリーズ後の抗体反応が若年成人に見られる反応よりも低かったため、追加投与が高齢者にさらなる利益を有し得ることを示唆している。

40

【0443】

【0486】 ベータ変異体では、追加投与後にIgG及びMN抗体力価の40～50倍の増加が見られ、一次ワクチン接種シリーズ後のIgG力価は、祖先株で見られたものよりもおよそ4倍高かった。IgGでの観察とは異なり、追加投与後のベータ変異体のMN50GMTは、この変異体に対する既知の中和反応の減少と一致して、一次ワクチン接種シ

50

リーズ後の祖先株よりも低かった（GMT 661対1，470）。

【0444】

【0487】 SARS-CoV-2のデルタ変異体については、追加投与後の217日目の力価を35日目の力価と比較すると、機能的hACE2阻害力価において6.6倍の増加が見られた。これらの同じ時点で比較した抗rS IgG活性は、追加投与に関連して9.7倍（デルタ）高い力価を示した。

【0445】

【0488】 局所及び全身反応原性の発生率は、3回目の投与で見られた免疫原性の増加を反映して、以前の投与と比較して6ヶ月の追加投与後に高かった。しかし、グレード3以上の事象の発生率は比較的低いままであり、参加者の10%超が疲労（12.2%）のみを記録した。合計で5件のグレード4（生命を脅かす可能性がある）の非自発的な局所的及び全身的有害事象が報告された。これらの5つの事象（疼痛、圧痛、頭痛、倦怠感及び筋肉痛）のすべては、ワクチンに関連する薬物過敏症の有害事象と同時に、活性ワクチン追加投与群の同じ参加者によって報告された。薬物過敏症事象の重症度は、軽度であると評価された。参加者は、この事象について医師の診察を受けず、参加者のすべての症状は、6日間で解消された。

【0446】

【0489】 表13は、配列番号1又はSARS-CoV-2デルタ変異体と比較した、D614G変異を有するSARS-CoV-2ウイルスの99%の中和に対する幾何平均力価を示す。図67は、D614G変異を含むSARS-CoV-2株及びB.1.617.2（デルタ変異体）に対する、実施例11のBV2373及びサポニンアジュバントを含む免疫原性組成物の中和抗体99（neut99）値を示す。

【0447】

【0490】 全体として、一次シリーズのおよそ6ヶ月後に投与されたBV2373及びサポニンアジュバントの単回追加投与により、体液性抗体の大幅な増加が誘導された。これは、2つの第3相試験における高レベルの有効性に関連する抗体力価よりも4倍を超えて高く、同時に許容可能な安全性プロファイルを示した。これらの知見は、追加投与プログラムにおけるワクチンの使用を支持する。

【0448】

10

20

30

40

50

表 8: 群 A、B1、及びB2 の人口統計及びベースライン特性

パラメータ	群 A N = 172	群 B1 N = 102	群 B2 N = 105
年齢 (歳)			
平均値 (SD)	51.9 (17.23)	52.0 (16.99)	51.7 (17.12)
中央値	56.0	57.5	58.0
最小, 最大	18, 83	19, 80	19, 82
年齢群 (n [%])			
18-59 歳	95 (55.2)	55 (53.9)	57 (54.3)
60-84 歳まで	77 (44.8)	47 (46.1)	48 (45.7)
性別 (n [%])			
男性	100 (58.1)	43 (42.2)	58 (55.2)
女性	72 (41.9)	59 (57.8)	47 (44.8)
人種 (n [%])			
白人	151 (87.8)	86 (84.3)	93 (88.6)
黒人又はアフリカ系アメリカ人	2 (1.2)	3 (2.9)	3 (2.9)
アジア人	15 (8.7)	10 (9.8)	7 (6.7)
アメリカインディアン又はアラスカ先住民	2 (1.2)	1 (1.0)	1 (1.0)
複数	2 (1.2)	1 (1.0)	1 (1.0)
不明	0	1 (1.0)	0
民族 (n [%])			
ヒスパニック又はラテン系	11 (6.4)	3 (2.9)	1 (1.0)
ヒスパニック系でもラテン系でもない	161 (93.6)	97 (95.1)	104 (99.0)
不明	0	2 (2.0)	0
ベースライン BMI (kg/m2)			
平均値 (SD)	27.29 (4.207)	26.69 (4.060)	27.43 (4.040)
中央値	27.40	26.50	27.10
最小, 最大	17.7, 35.0	17.3, 34.9	18.2, 34.9
ベースライン SARS-CoV-2 状態 (n [%])			
陰性	169 (98.3)	101 (99.0)	102 (97.1)
陽性	2 (1.2)	1 (1.0)	3 (2.9)

【表 2 9】

群 B2
N = 105
0

群 B1
N = 102
0

群 A
N = 172
1 (0.6)

パラメータ
不確定

BMI = 肥満指数; SARS-CoV-2 = 重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2; SD = 標準偏差
A = 0 日目、21 日目、及び 189 日目にプラセボ
B1 = 0 日目及び 21 日目に 5 µg の BV2373 + 50 µg のサボニンアジュバント、189 日目にプラセボ
B2 = 0 日目、21 日目、及び 189 日目に 5 µg の BV2373 + 50 µg のサボニンアジュバント
1 安全性解析集団の参加者は、処置エラーに対応するために受けた処置に応じてカウントされる。

【 0 4 5 0 】

10

20

30

40

50

表 9: BV2373 及びサボニンアジュバントを投与された参加者の試験日別の祖先及びベータ変異体 SARS-CoV-2 株の一次及び追加ワクチン接種後の血清 IgG 幾何平均力価

年齢群	血清 IgG GMT (EU [95% CI])					
	35 日目 祖先株	189 日目 祖先株	217 日目 祖先株	189 日目 ベータ変異体	217 日目 ベータ変異体	217 日目 ベータ変異体
全参加者、 18-84 歳	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)	
参加者 18-59 歳	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)	
参加者 60-84 歳まで	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)	

CI = 信頼区間; ELISA = 酵素結合免疫吸着アッセイ; EU = ELISA 単位; GMT = 幾何平均力価

表 10: BV2373 及びサポニンアジュバントを投与された参加者の試験日別の祖先及びベータ変異体 SARS-CoV-2 株の一次及び追加ワクチン接種後の中和抗体活性

年齢群	MN ₅₀ GMT (95% CI)					
	35 日目 祖先株	189 日目 祖先株	217 日目 祖先株	189 日目 ベータ変異体	217 日目 ベータ変異体	217 日目 ベータ変異体
全参加者、 18-84 歳	1,470 (1,008, 2,145)	63 (49, 81)	6,023 (4,542, 7,988)	13 (11, 15)	661 (493, 886)	661 (493, 886)
参加者 18-59 歳	2,281 (1,414, 3,678)	80 (56, 114)	8,568 (6,646, 11,046)	14 (11, 18)	871 (656, 1,156)	871 (656, 1,156)
参加者 60-84 歳まで	981 (560, 1,717)	47 (33, 65)	3,936 (2,341, 6,620)	12 (10, 15)	469 (270, 816)	469 (270, 816)

CI = 信頼区間, GMT = 幾何平均力価; MN₅₀ = 阻害濃度>50%でのマイクロ中和アッセイ

表 11A: 経時的な抗 CoV S IgG

	抗 rS BV2373 力価 (EC50) (配列番号 1 と比較した D614G の 変異を有するスパイクタンパク質を 含む SARS-CoV 2 ウイルス)				抗 rS BV2465 力価 (EC50) (デルタ)				抗 rS BV2438 力価 (EC50) (ベータ)				抗 rS BV2425 力価 (EC50) (アルファ)			
	D0	D35	D189	D217	D0	D35	D189	D217	D0	D35	D189	D217	D0	D35	D189	D217
GMT	166	60742	5361	327758	156	26097	3143	290782	161	40416	4066	264321	156	24333	2739	235145
95%CI 下限	134	42176	3782	225862	144	17501	1952	195349	139	28091	2767	177965	143	15234	1777	152897
95%CI 下限	206	87481	7599	475623	169	38916	5059	432836	188	58147	5975	392582	171	38865	4223	361636
GMFR (D35- D217)	GMFR : 5.4 (CI - 3.34 - 8.71)				GMFR : 11.1 (CI - 6.5 - 19.1)				GMFR : 6.54 (CI - 3.97 - 10.8)				GMFR : 9.7 (CI - 5.56 - 11.9)			
GMFR (D189- D217)	GMFR : 61.2 (CI - 38.9 - 96.4)				GMFR : 92.6 (CI - 52.8 - 162.4)				GMFR : 65.0 (CI - 40.0 - 105.4)				GMFR : 85.9 (CI - 50.4 - 146.1)			

表 11B: BV2373 及びサポニンアジュバントを投与された参加者の試験日別の祖先及び変異体 SARS-CoV-2 株の一次及び追加ワケチン接
種後の抗 rS IgG 幾何平均力価

パラメータ	祖先		デルタ		ベータ		アルファ	
	35 日目	217 日目	35 日目	217 日目	35 日目	217 日目	35 日目	217 日目
GMT	60,742	327,758	26,097	290,782	40,416	264,321	24,333	235,145
(95% CI)	(42,176, 87,481)	(225,862, 475,623)	(17,501, 38,916)	(195,349, 432,836)	(28,091, 58,147)	(177,965, 392,582)	(15,234, 38,865)	(152,897, 361,636)
GMFR	5.4	11.1	6.54	9.7	6.54	9.7	6.54	9.7
(95% CI)	(3.34, 8.71)	(6.5, 19.1)	(3.97, 10.8)	(5.56, 11.9)	(3.97, 10.8)	(5.56, 11.9)	(3.97, 10.8)	(5.56, 11.9)

【表 3 4】

表 12A: 経時的な 50 % hACE2 阻害力価

	抗 rS BV2373 RI 力価 (配列番号 1 と比較した D614G の変異を有するスパイクタンパク質を含む SARS-CoV 2 ウイルス)				抗 rS BV2465 RI 力価 (デルタ)				抗 rS BV2438 RI 力価 (ベータ)				抗 rS BV2425 RI 力価 (アルファ)			
	D0	D35	D189	D217	D0	D35	D189	D217	D0	D35	D189	D217	D0	D35	D189	D217
GMT	10	119.6	13.3	723.1	10	40.0	10.9	265.3	10	24.6	10.8	265.2	10	28.7	10.7	234.4
95%CI 下限	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
95%CI 下限	10	181.9	17.6	980.0	10	59.5	12.99	364.7	10	36.04	12.8	371.5	10	41.05	12.3	322.8
GMFR (D35-D217)	GMFR : 6.1 (CI - 3.79 - 9.89)				GMFR : 6.61 (CI - 4.34 - 10.09)				GMFR : 10.8 (CI - 7.1 - 16.4)				GMFR : 8.1 (CI - 5.56 - 11.9)			
GMFR (D189-D217)	GMFR : 54.4 (CI - 37.0 - 79.8)				GMFR : 24.4 (CI - 16.6- 35.7)				GMFR : 24.5 (CI - 16.5 - 36.4)				GMFR : 21.9 (CI - 15.07- 31.9)			

【 0 4 5 5 】

10

20

30

40

50

表 12B: BV2373 及びサポニンアジュバントを投与された参加者の試験日別の祖先及び変異体 SARS-CoV-2 株の一次及び追加ワクチン接種後の hACE2 阻害幾何平均力価

パラメータ	祖先		デルタ		ベータ		アルファ	
	35 日目	217 日目	35 日目	217 日目	35 日目	217 日目	35 日目	217 日目
GMT	119.6	723.1	40.0	265.3	24.6	265.2	28.7	234.4
(95% CI)	(78.7, 181.9)	(533.5, 980.0)	(27.03, 59.5)	(192.9, 364.7)	(16.7, 36.04)	(189.3, 371.5)	(20.0, 41.05)	(170.2, 322.8)
GMFR	6.1		6.61		10.8		8.1	
(95% CI)	(3.79, 9.89)		(4.34, 10.09)		(7.1, 16.4)		(5.56, 11.9)	

【表 3 6】

表 13: D614G の変異を有する SARS-CoV-2 ウイルス及び B.1.617-2 デルタ変異体の中和に対する幾何平均力価

	D614G の変異を有する SARS-CoV-2 ウイルス Neut99 力価		デルタ Neut99 力価 (B.617.2)	
	D35	D217	D35	D217
	GMT	853	331.6	4629
	95%CI 下限	490.2	212	2961
	95%CI 上限	1484	518.5	7236
GMFR (D35-D217)	GMFR : 15.4 (CI – 15.5 – 15.2)		GMFR : 13.9 (CI – 13.95 – 13.96)	

【 0 4 5 7 】

参照による組み込み

[0491] 本明細書で引用されるすべての参考文献、記事、刊行物、特許、特許公報及び特許出願は、あらゆる目的のために参照によりそれらの全体が組み込まれる。しかしながら、本明細書で引用される任意の参考文献、記事、刊行物、特許、特許公報及び特許出願の言及は、これらが、有効な先行技術を構成するか、又は世界のいずれの国でも共通の一般的な知識の一部を形成することの承認又は何らかの形式の示唆ではなく、そのように解釈されるべきものでもない。

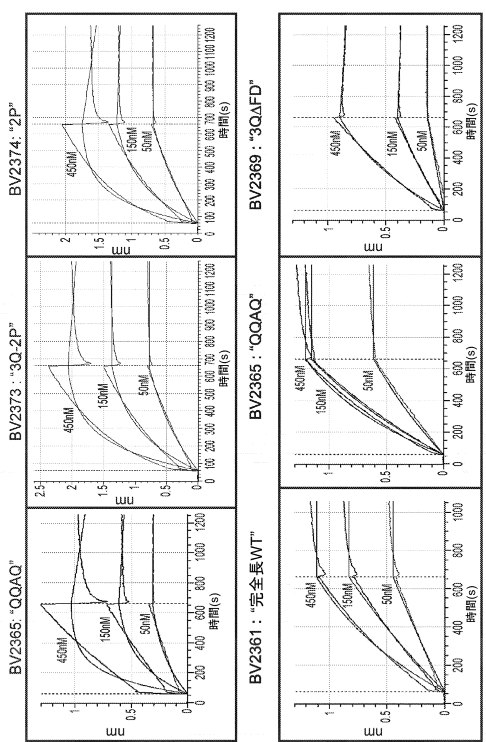
10

20

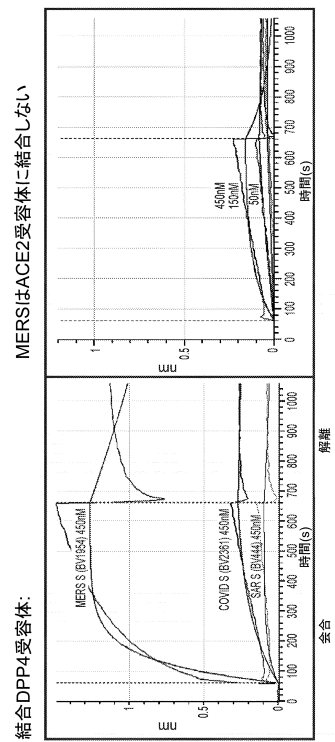
30

40

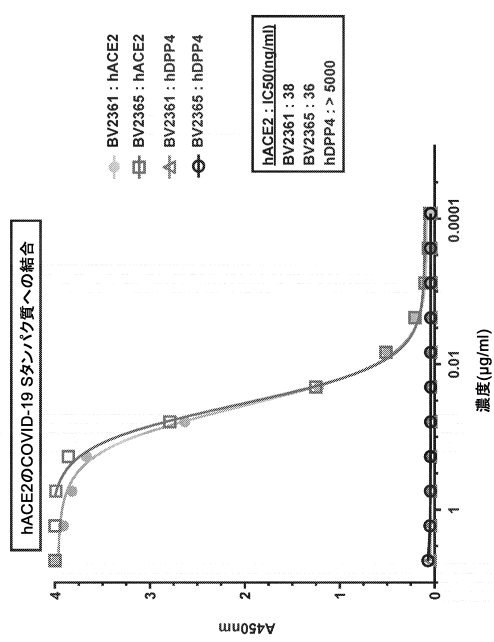
【図 5】



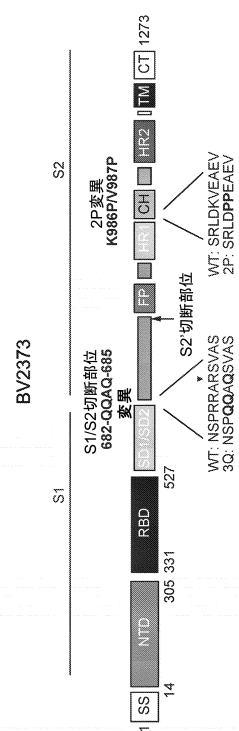
【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

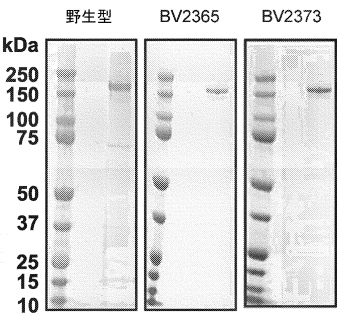
20

30

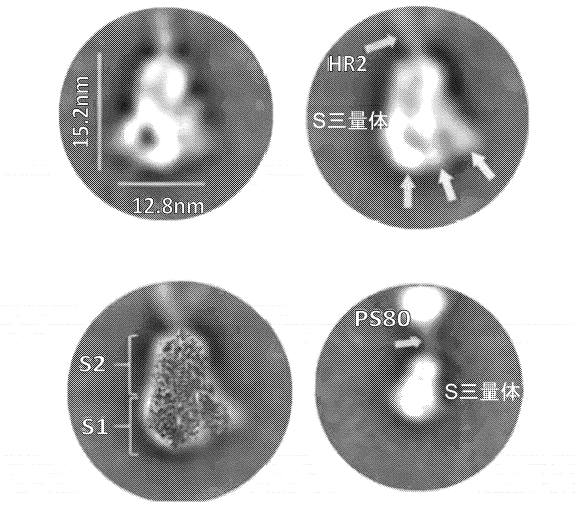
40

50

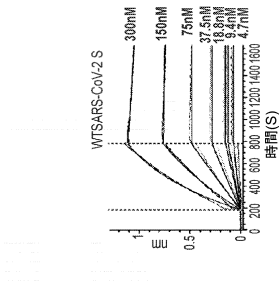
【図 9】



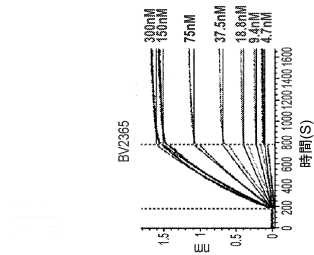
【図 10】



【図 11 A】



【図 11 B】



10

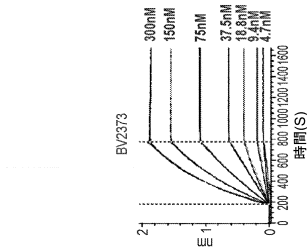
20

30

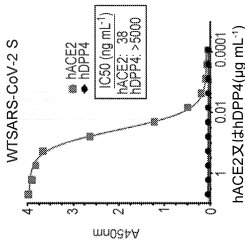
40

50

【図 1 1 C】

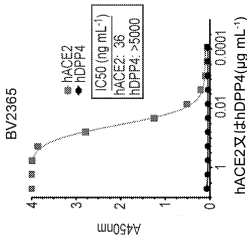


【図 1 1 D】

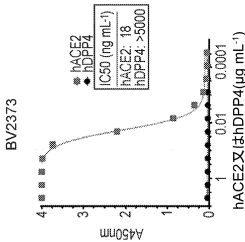


10

【図 1 1 E】



【図 1 1 F】

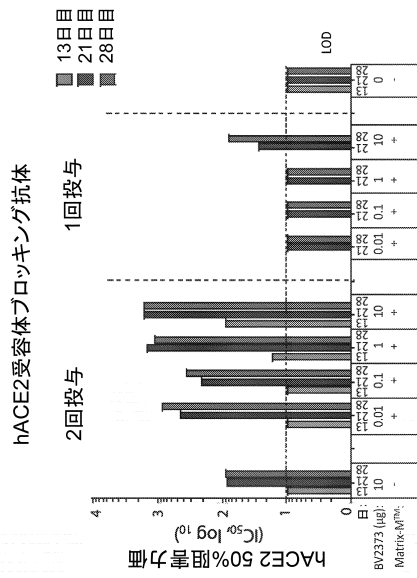


30

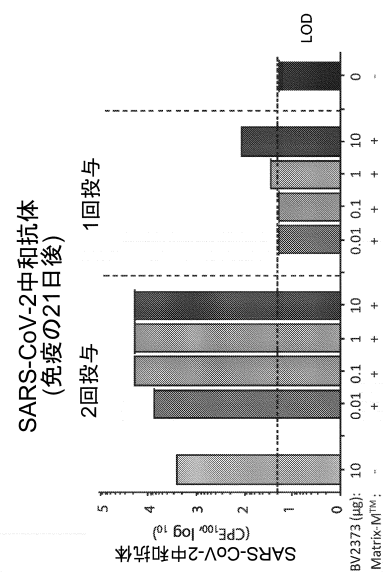
40

50

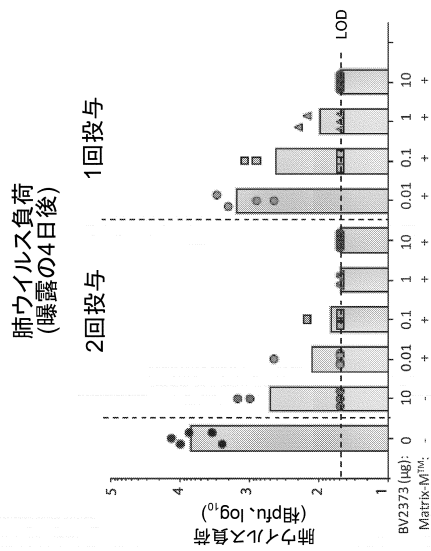
【図 1 4】



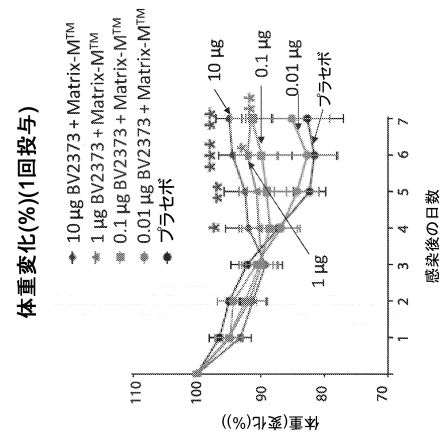
【図 1 5】



【図 1 6】



【図 1 7 A】



10

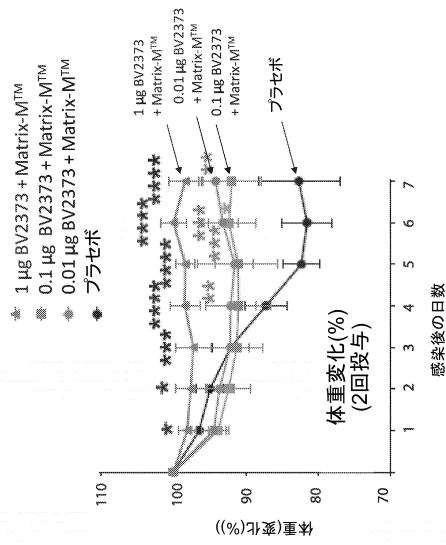
20

30

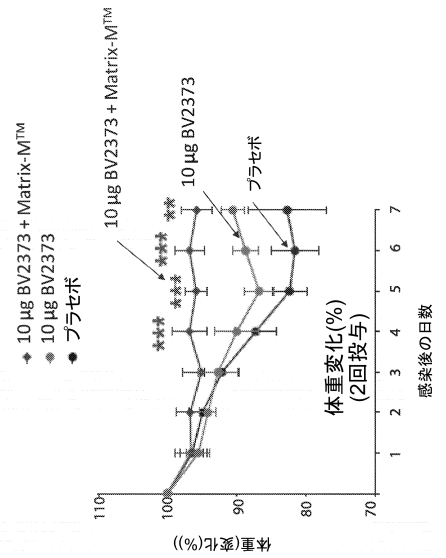
40

50

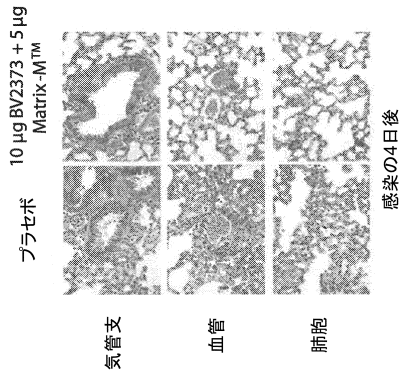
【図 17 B】



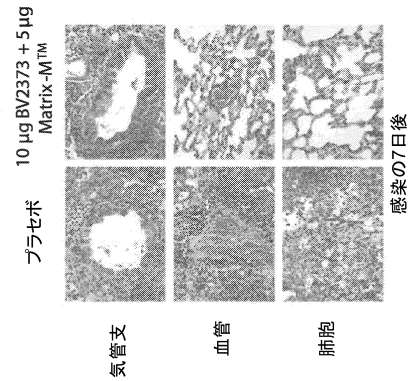
【図 17 C】



【図 18 A】



【図 18 B】



10

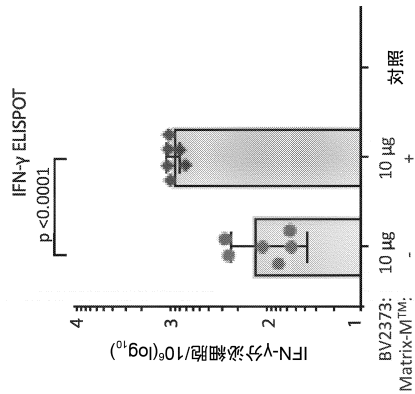
20

30

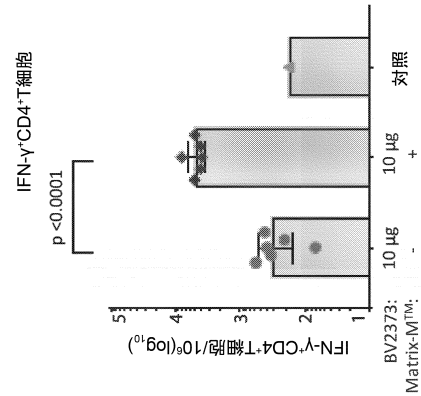
40

50

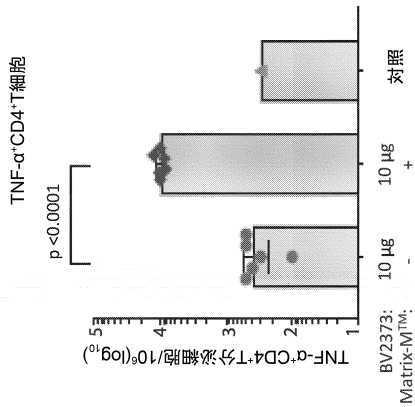
【図 1 9】



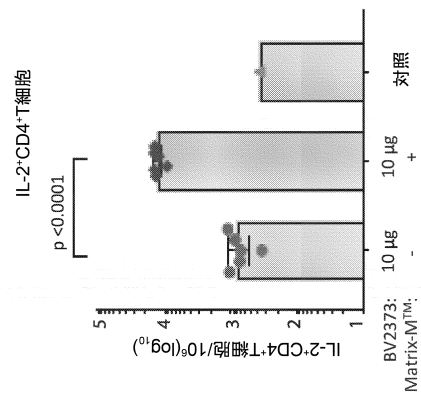
【図 2 0 A】



【図 2 0 B】



【図 2 0 C】



10

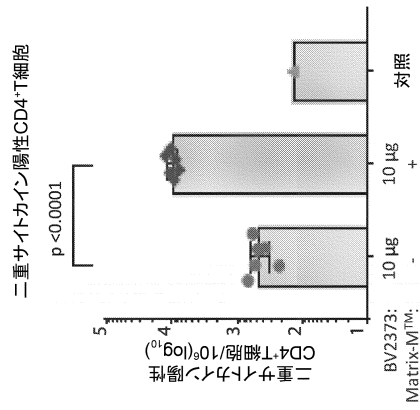
20

30

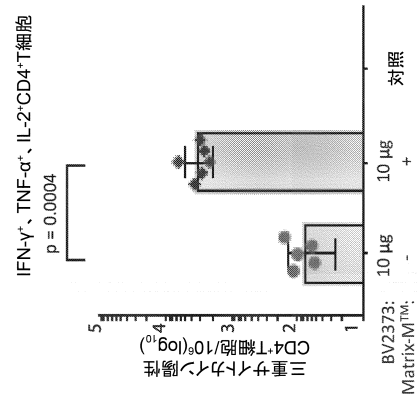
40

50

【図 2 0 D】

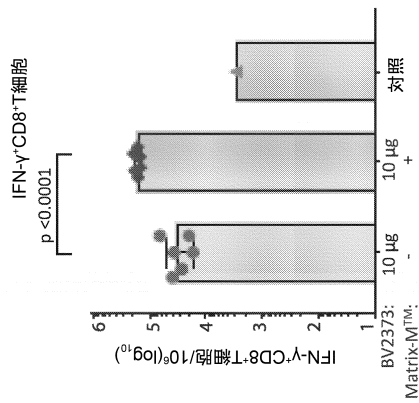


【図 2 0 E】

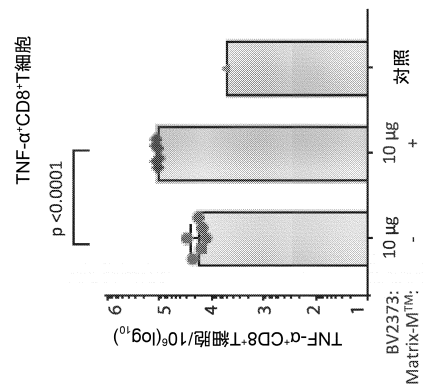


10

【図 2 1 A】



【図 2 1 B】



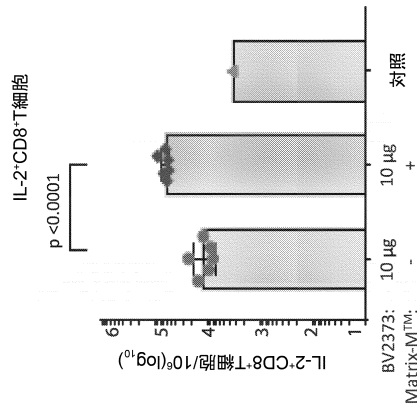
20

30

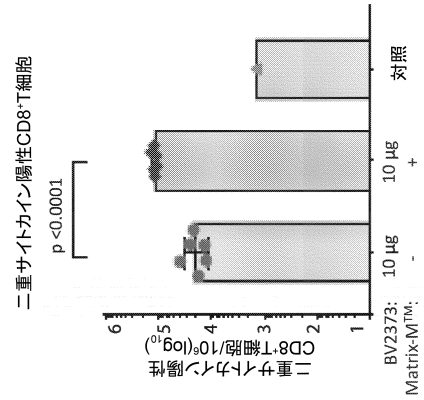
40

50

【図 2 1 C】

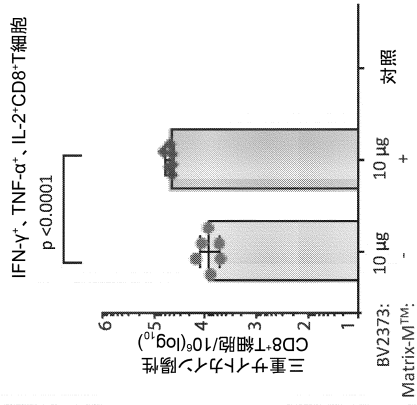


【図 2 1 D】

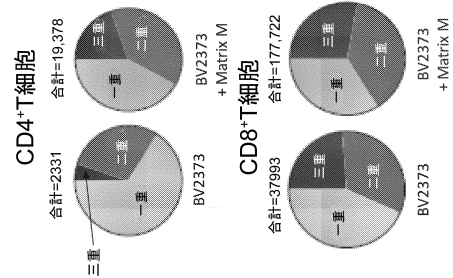


10

【図 2 1 E】



【図 2 2】

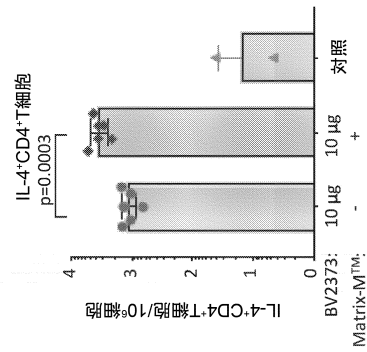


30

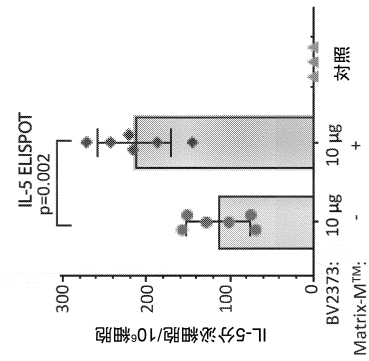
40

50

【図 2 3 A】

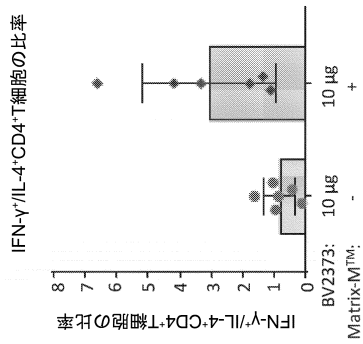


【図 2 3 B】

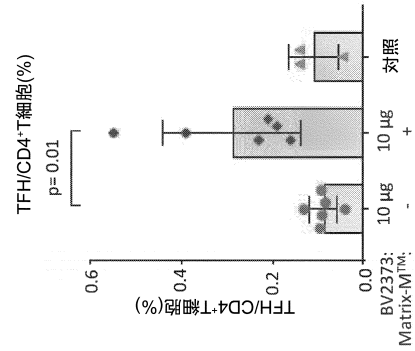


10

【図 2 3 C】



【図 2 4 A】



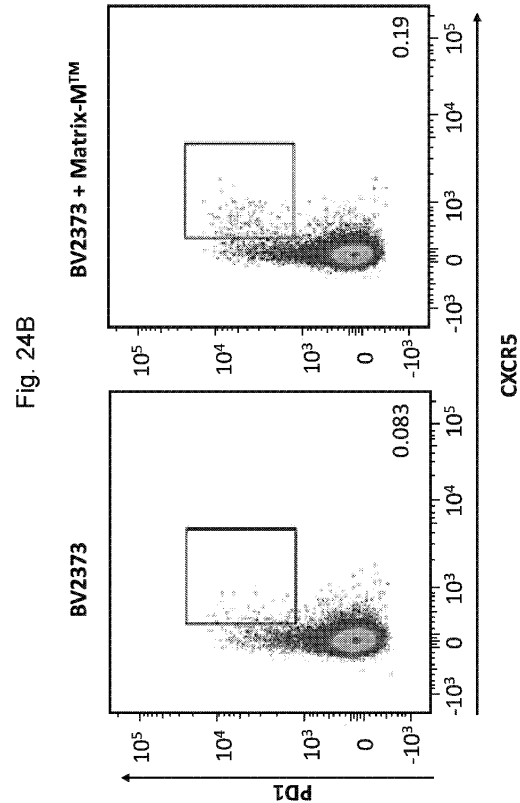
20

30

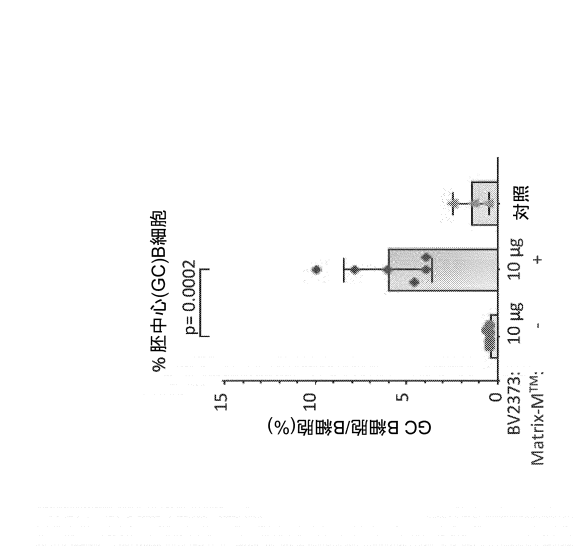
40

50

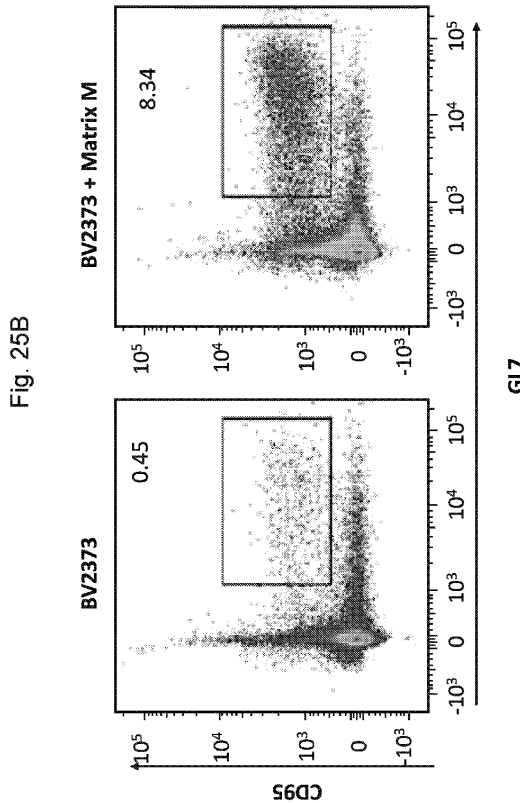
【 図 2 4 B 】



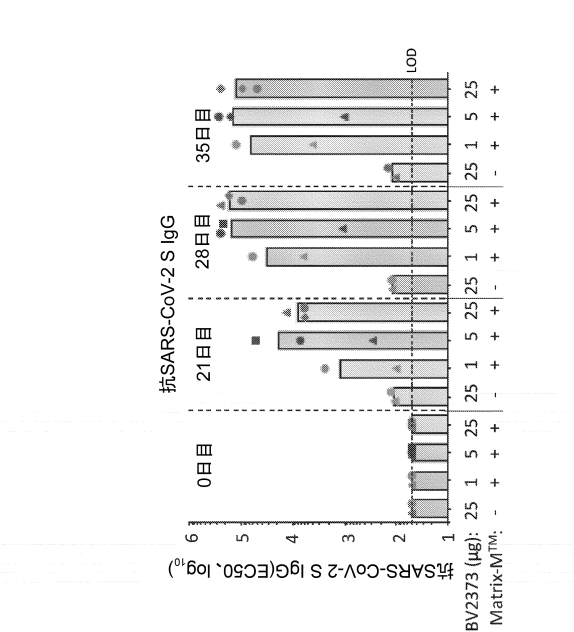
【 図 2 5 A 】



【 図 2 5 B 】



【 図 2 6 A 】



10

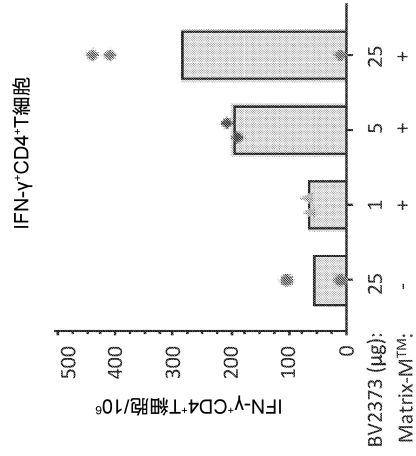
20

30

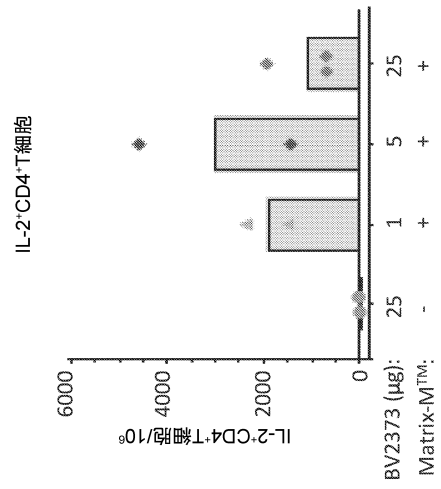
40

50

【図 2 9 A】



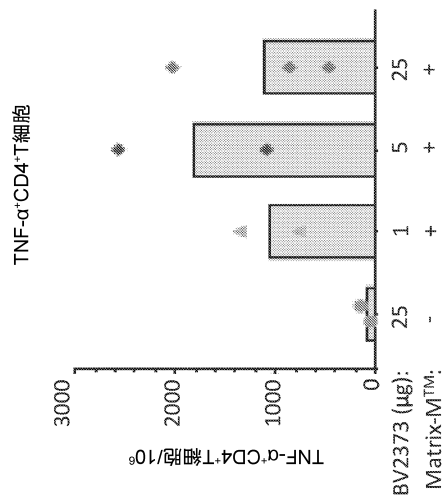
【図 2 9 B】



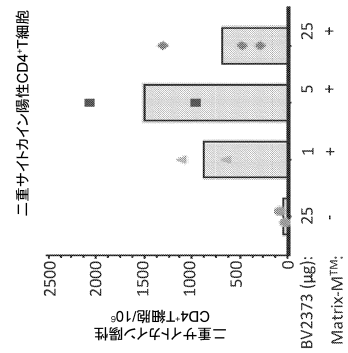
10

20

【図 2 9 C】



【図 2 9 D】

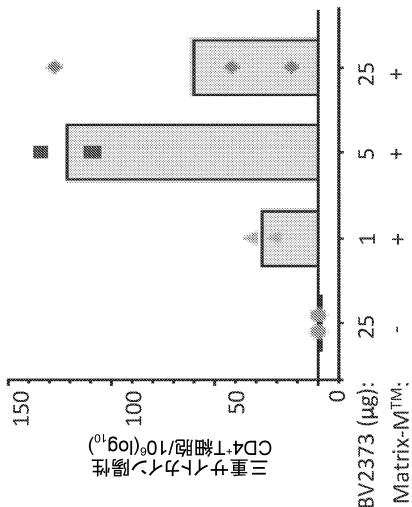


30

40

50

IFN- γ 、TNF- α 、IL-2⁺CD4⁺T細胞



BV2373(配列番号86)

不活性フーリン
切断部位

Cov-2019/QQAAQ/K986P/V987P

シグナル
ペプチド

MEFVLVLLPLVSSQC VNLTRTQLP PPA YTNSTFRGVYYPDKVFRS SVLHSTQDLFLPFFSNVTFWFAIHVSQT
NGTKRFDPVLPNDGVYFAS TEKSN I IRGWI FGTTLD SKTQSL I VNNATNVV I KVCFOFNDPFLGVYH
KNNKSWSEFRVYSANNC TFEYV SQPFLMDLGRGQGNFKNLRE FVKNI DG YFKI YSKHTP INLVRDLPOG
FSALEPLVDLP IGINITRFOTLLALHRSYLPDGS SSGW TAGAAA YVGYLQPRTEFLKYNNENGTITDAVDCAL
LDPLSEKCTLKSFTEVKEGIYOTSNEFVQPTESI VRFENI TNLCPGEVFNATREASVYAMNKRISNCVADY
SVLYNSASFTEKCYGVSTKNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQGIADYNYKLPDFTGCVIWNNS
NNLDSVGGNINILTRFKRNLAFERDISEI IQAGSTFCNGEVEGNCFFELQSYGQFNGVGQYIRVV
VLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGIGVLTESNKKELPPQQGRNDIADTDAVRDPQLEL
LDITFCSGFVSVITPGTINISNQAVLIQDVNCTEVPAIHADQLPTWRVYSTGNSVFTAGCLIGAEHVN
NSTYEDDPIGAGICASYQTQNS:QQAAQSVASQSLIAYTMSLGAENSVASNNSTAIPTNFTISVITEI LPVS
MTKTSVDCTMYICGDETECNLLIYQSGSECTQLNRALTGIAEQDNTQEVFAQVKQIYKTPPEIKDFFGNFS
QILPDPKSKRSFTEDLLFNKVTIADAGFIKQYDCLGDIYAARDLICAQFNGITVILPPLTIDEMIAQYTSAL
LLAGTITTSWTEGAGAAALQIPFAMQAYRFNGI GVTQNVLYENQKLIANFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQ
DVYNOQAALNTLVKQLSNFGAISVINDILSLRLDPEAEVQIDRLITGRLSQIQT VYTQQI I RAABEIRASA
NLAATKMSCEVLGQS KRVDFCGYGLMSFPQSAHPGVFLHVTVVPAQEKNF TAPAI CHDGAHFRGEGVF
VSNGTWFTQRNFYEQIITTDNTFVSGNCDVIGI VNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFNKHTSPDVLGD
ISGINASVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQIKWPWYIWLGTIAGLIAI VNVITIMLCOMTSOC
SCLKGCSCGSCCKFDEDDSEPVLGKVLHYT

BV2384:CoV-2019/GSAS/K986P/V987P(配列番号109)

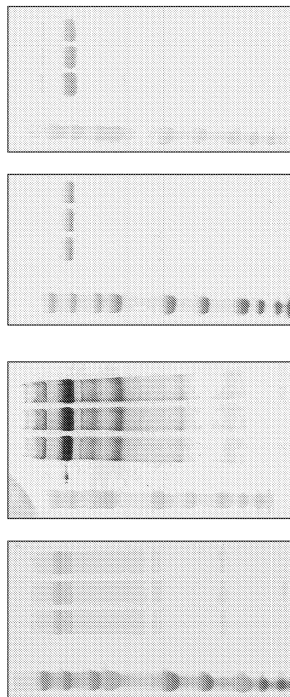
等電点(pI)5.89

シグナル
ペプチド

MEFVLVLLPLVSSQC VNLTRTQLP PPA YTNSTFRGVYYPDKVFRS SVLHSTQDLFLPFFSNVTFWFAIHVSQT
NGTKRFDPVLPNDGVYFAS TEKSN I IRGWI FGTTLD SKTQSL I VNNATNVV I KVCFOFNDPFLGVYH
KNNKSWSEFRVYSANNC TFEYV SQPFLMDLGRGQGNFKNLRE FVKNI DG YFKI YSKHTP INLVRDLPOG
FSALEPLVDLP IGINITRFOTLLALHRSYLPDGS SSGW TAGAAA YVGYLQPRTEFLKYNNENGTITDAVDCAL
LDPLSEKCTLKSFTEVKEGIYOTSNEFVQPTESI VRFENI TNLCPGEVFNATREASVYAMNKRISNCVADY
SVLYNSASFTEKCYGVSTKNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQGIADYNYKLPDFTGCVIWNNS
NNLDSVGGNINILTRFKRNLAFERDISEI IQAGSTFCNGEVEGNCFFELQSYGQFNGVGQYIRVV
VLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGIGVLTESNKKELPPQQGRNDIADTDAVRDPQLEL
LDITFCSGFVSVITPGTINISNQAVLIQDVNCTEVPAIHADQLPTWRVYSTGNSVFTAGCLIGAEHVN
NSTYEDDPIGAGICASYQTQNS:GSASVASQSLIAYTMSLGAENSVASNNSTAIPTNFTISVITEI LPVS
MTKTSVDCTMYICGDETECNLLIYQSGSECTQLNRALTGIAEQDNTQEVFAQVKQIYKTPPEIKDFFGNFS
QILPDPKSKRSFTEDLLFNKVTIADAGFIKQYDCLGDIYAARDLICAQFNGITVILPPLTIDEMIAQYTSAL
LLAGTITTSWTEGAGAAALQIPFAMQAYRFNGI GVTQNVLYENQKLIANFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQ
DVYNOQAALNTLVKQLSNFGAISVINDILSLRLDPEAEVQIDRLITGRLSQIQT VYTQQI I RAABEIRASA
NLAATKMSCEVLGQS KRVDFCGYGLMSFPQSAHPGVFLHVTVVPAQEKNF TAPAI CHDGAHFRGEGVF
VSNGTWFTQRNFYEQIITTDNTFVSGNCDVIGI VNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFNKHTSPDVLGD
ISGINASVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQIKWPWYIWLGTIAGLIAI VNVITIMLCOMTSOC
SCLKGCSCGSCCKFDEDDSEPVLGKVLHYT

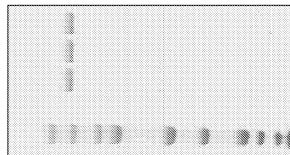
BV2384 GSAS/PP 変異

ゲル



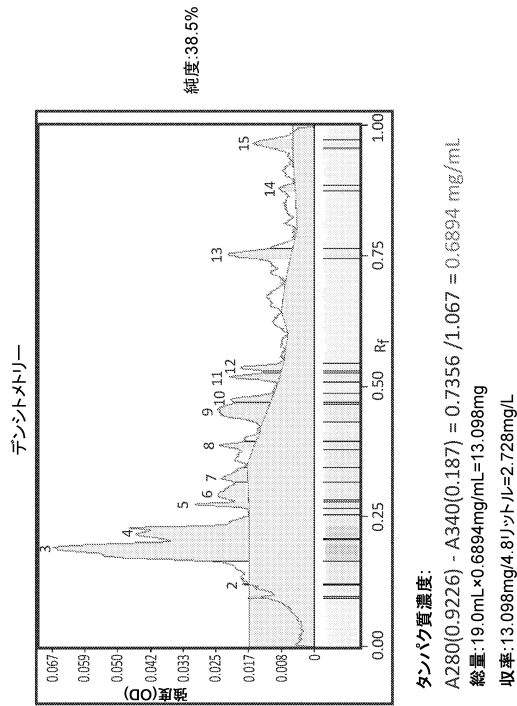
BV2373 QQAAQ/PP 変異

ゲル

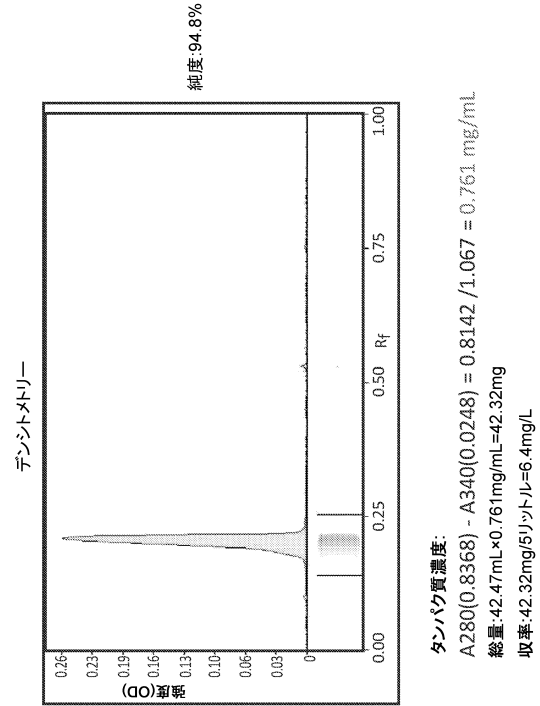


1°Ab:ウサギ抗SARS 1:1000 一晚
2°Ab:ヤギ抗ウサギIgG/AP、1:5,000、1hr

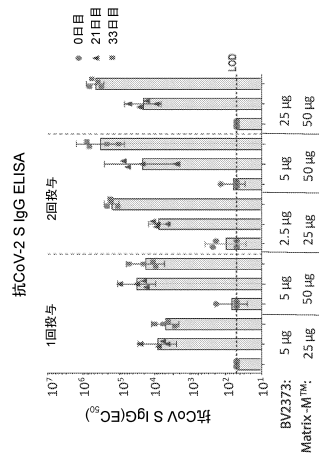
【図 3 3】



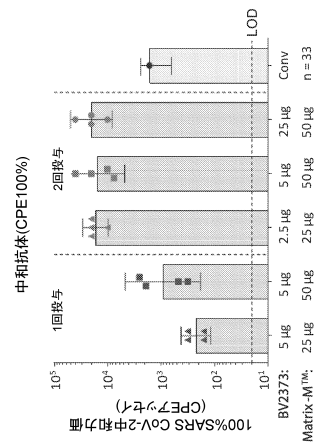
【図 3 4】



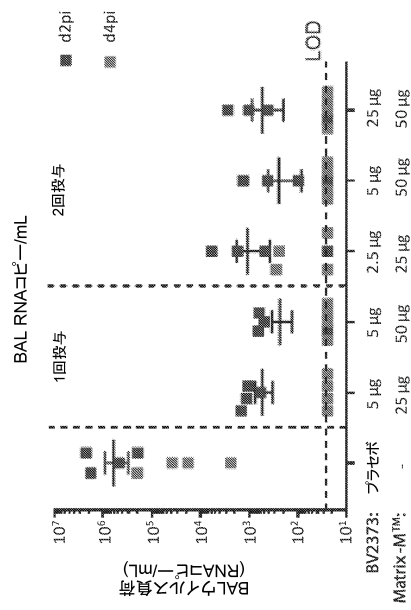
【図 3 5 A】



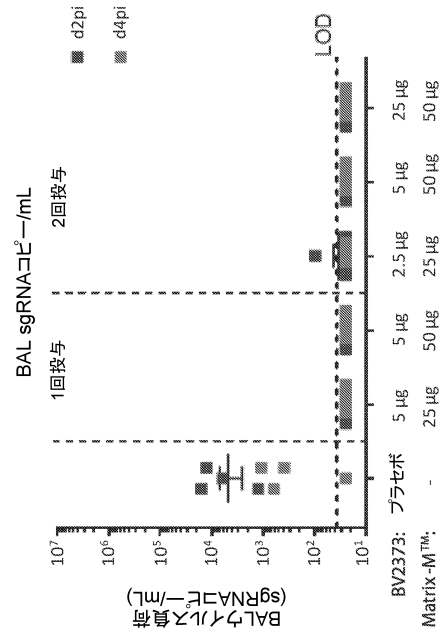
【図 3 5 B】



【図 3 6 A】



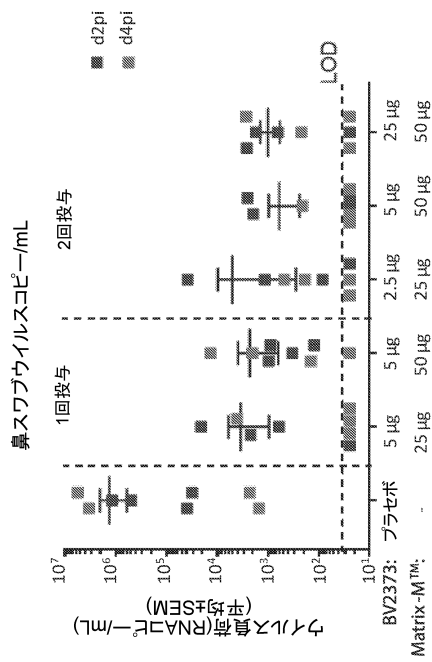
【図 3 6 B】



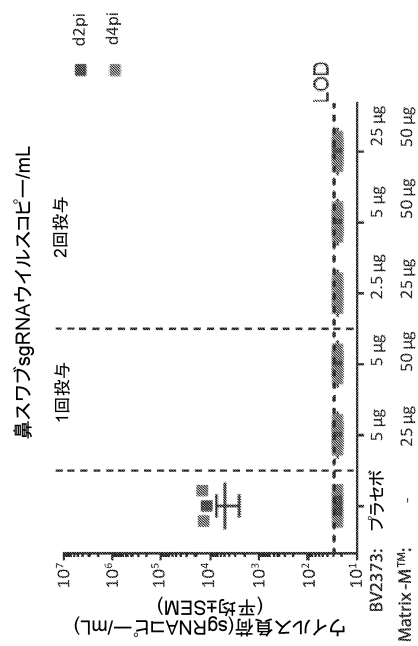
10

20

【図 3 7 A】



【図 3 7 B】

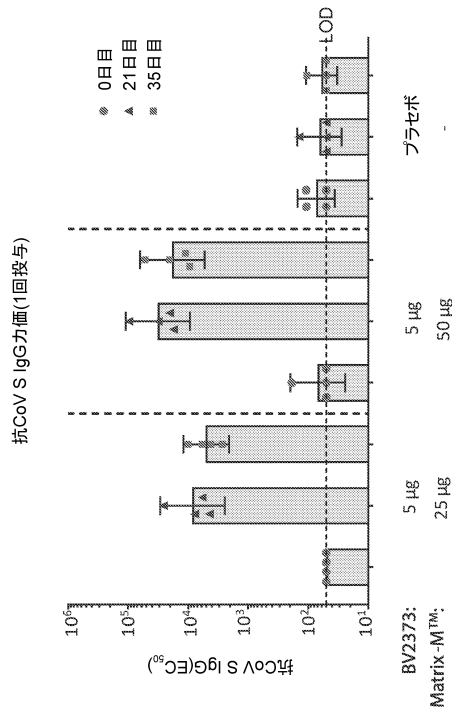


30

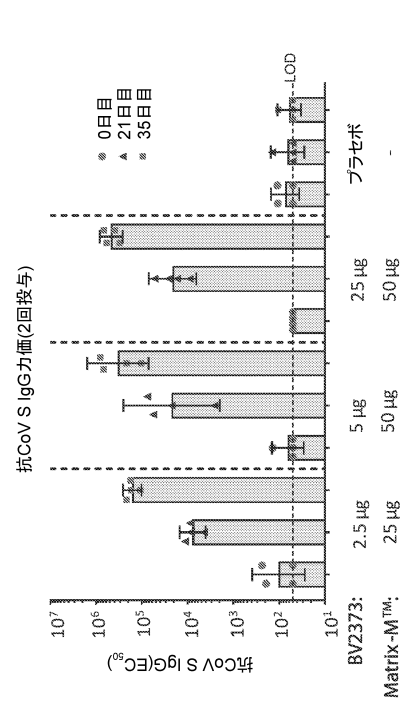
40

50

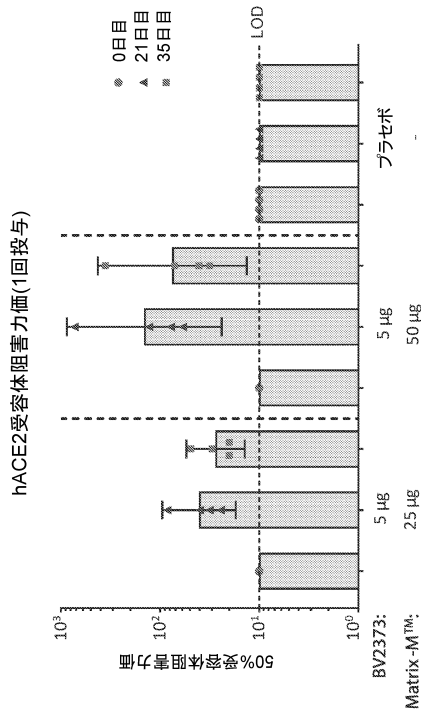
【図 3 8 A】



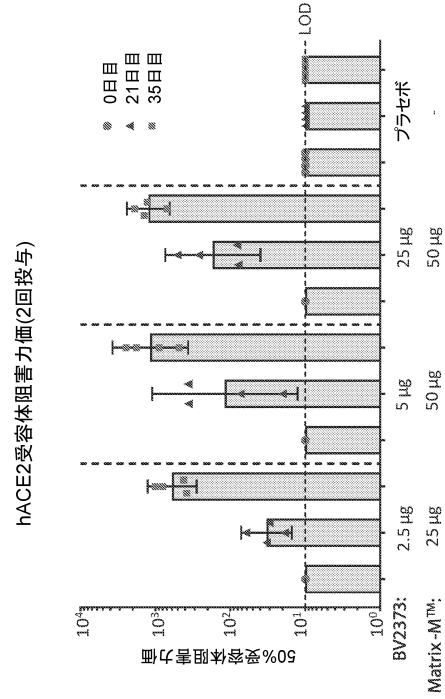
【図 3 8 B】



【図 3 8 C】



【図 3 8 D】



10

20

30

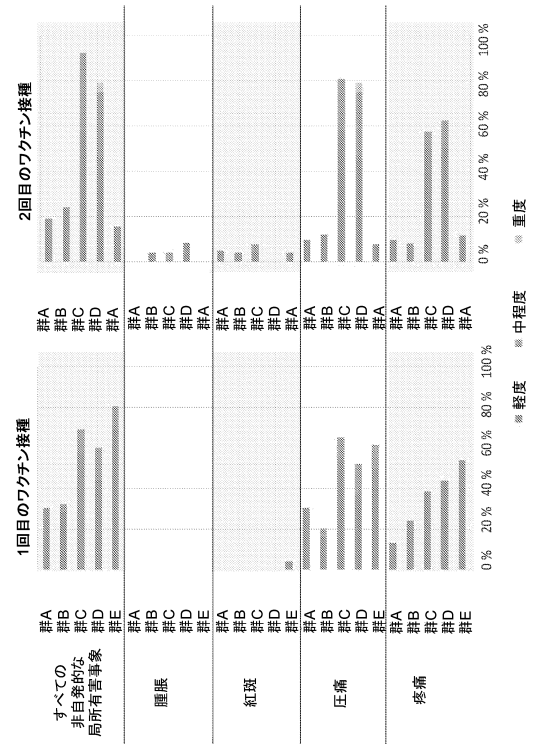
40

50

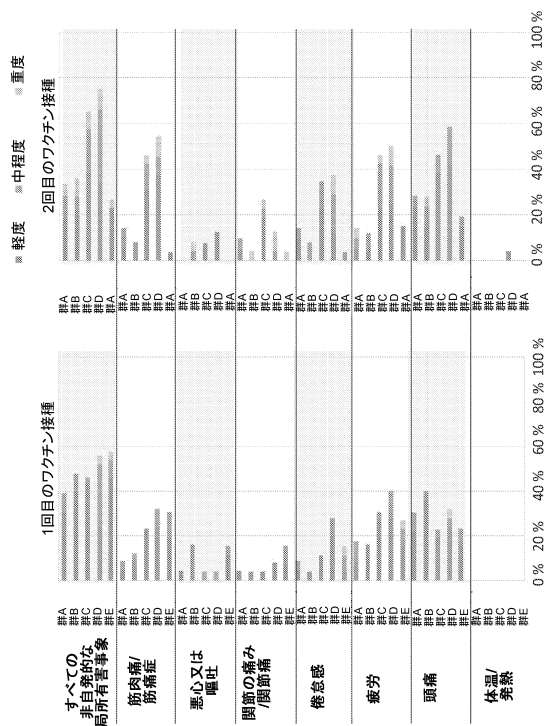
【図 4 1】

処置	スクリーニング	日数									
		0	7	21	28	35	49	105	189	366	
ワクチン接種		X		X							
血液検査・安全性	X		X	X	X						
市販薬・免疫原性		X	X	X	X	X	X	X	X		
鼻スワブ	X					X					
反応原性											
自発的なAE											
MAAE: すべて関連											
SAEXはAESI											

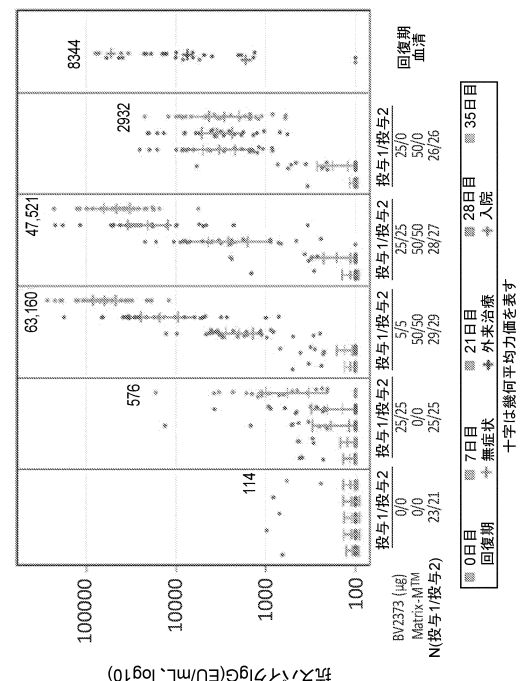
【図 4 2 A】



【図 4 2 B】



【図 4 3 A】



10

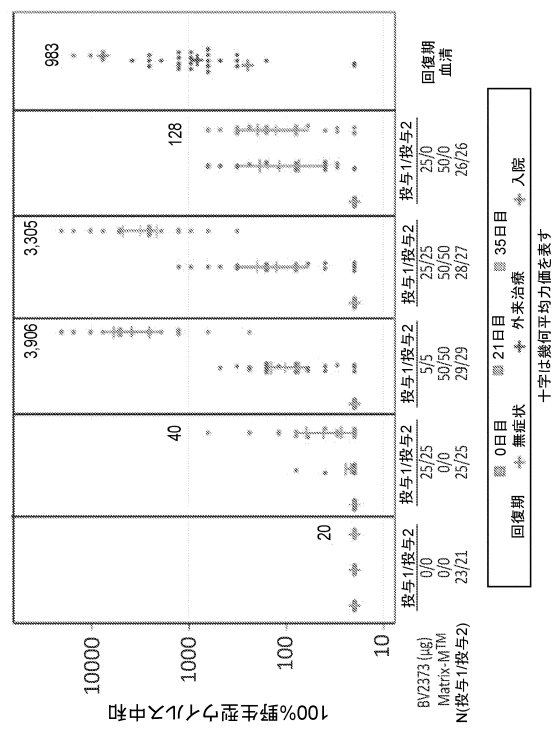
20

30

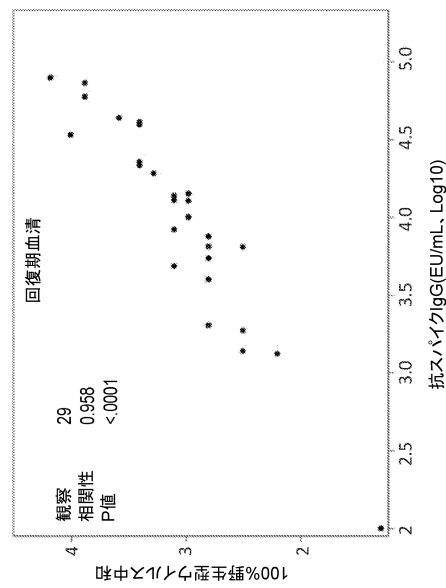
40

50

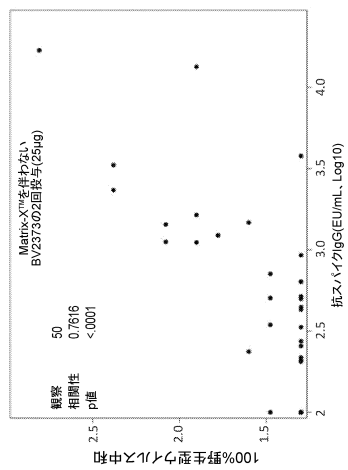
【図 4 3 B】



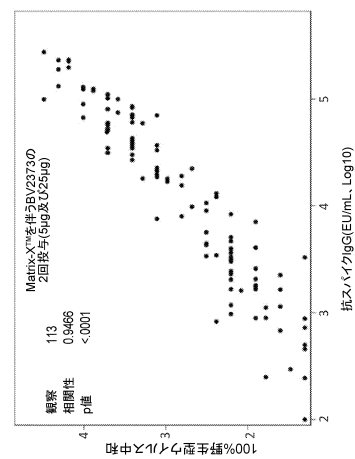
【図 4 4 A】



【図 4 4 B】



【図 4 4 C】



10

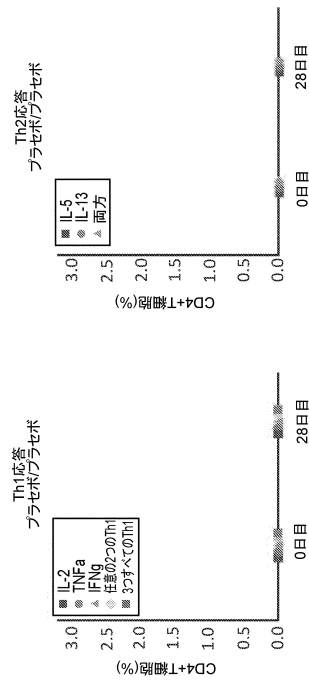
20

30

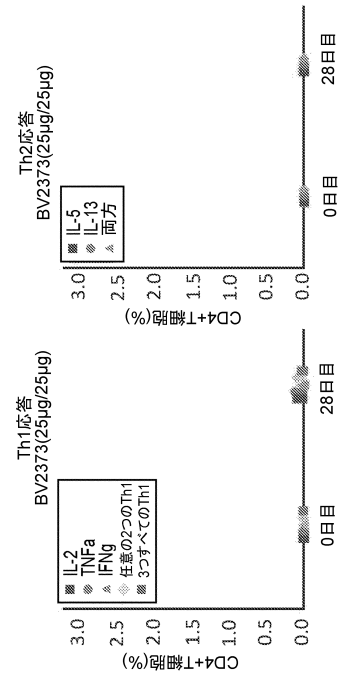
40

50

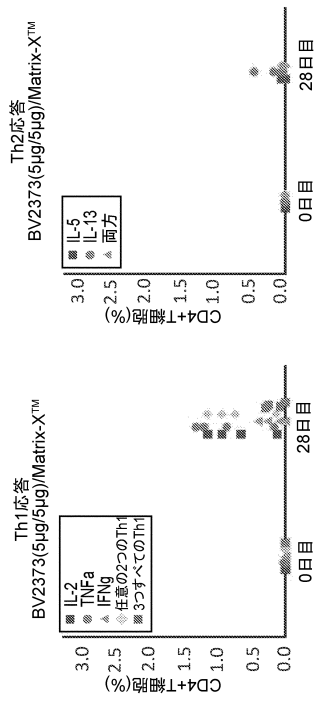
【図 4 5 A】



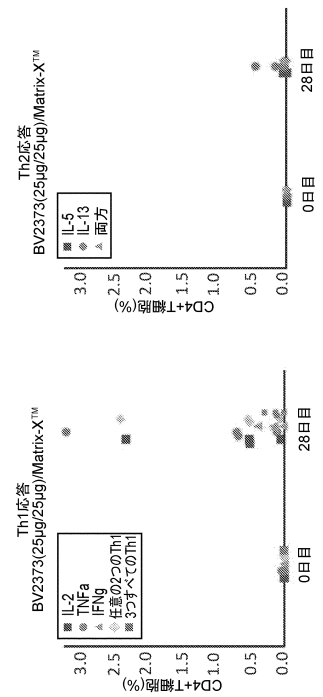
【図 4 5 B】



【図 4 5 C】



【図 4 5 D】



10

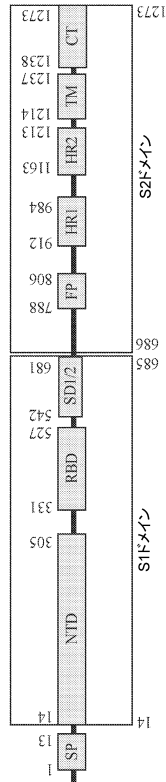
20

30

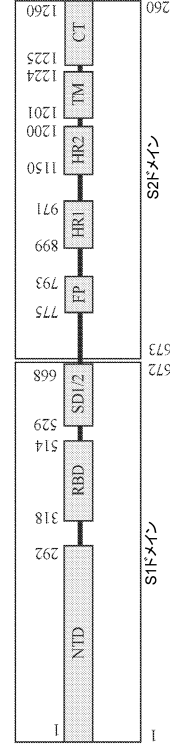
40

50

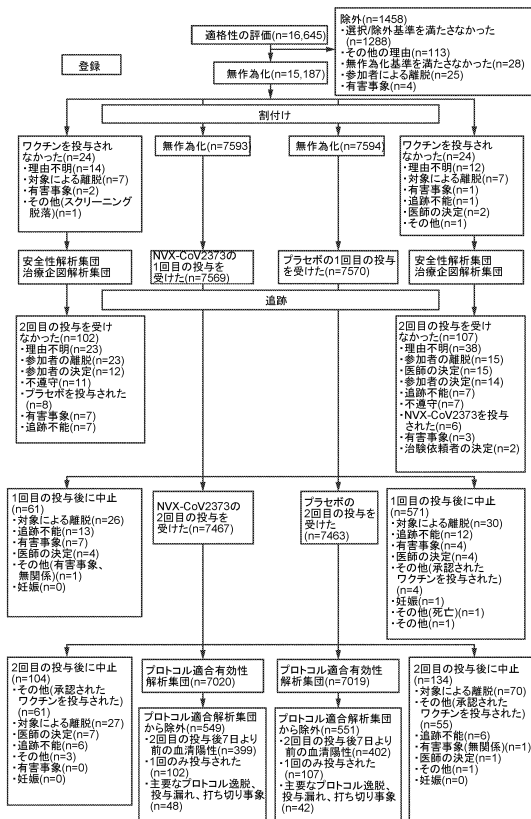
【図 4 6 A】



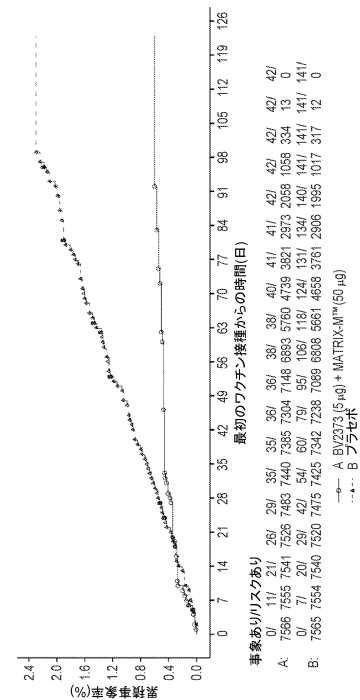
【図 4 6 B】



【図 4 7】



【図 4 8】



10

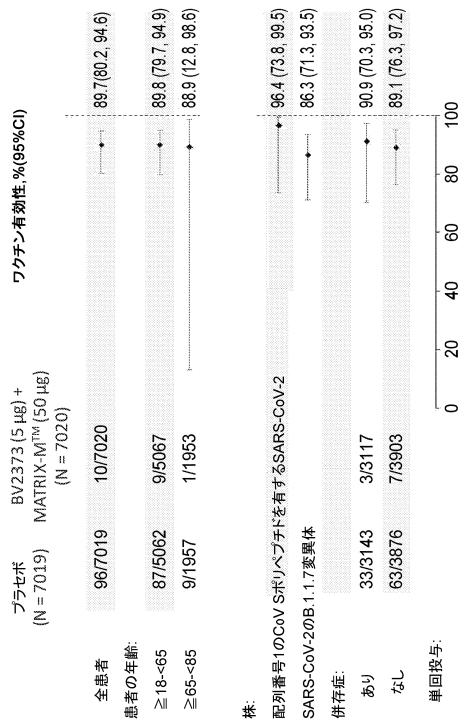
20

30

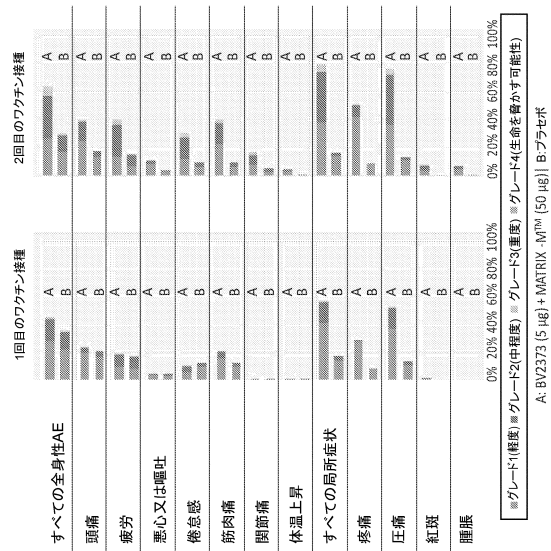
40

50

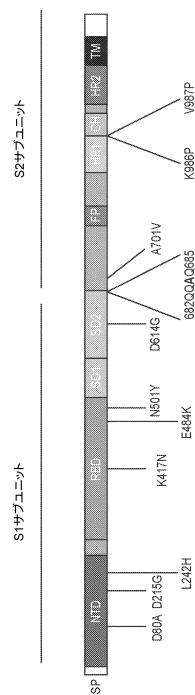
【図 4 9】



【図 5 0】

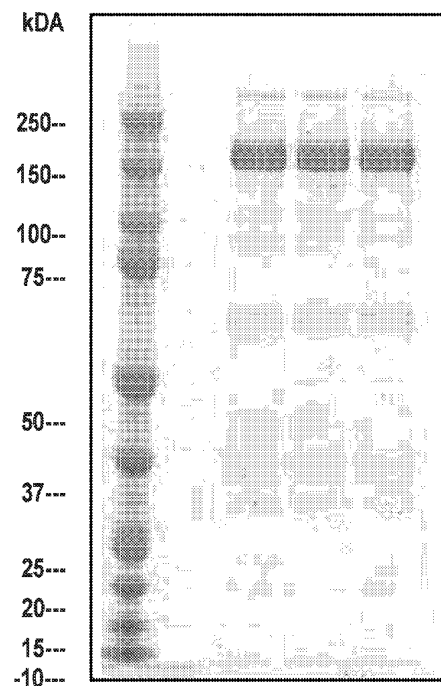


【図 5 1】



【図 5 2 A】

Fig. 52A



10

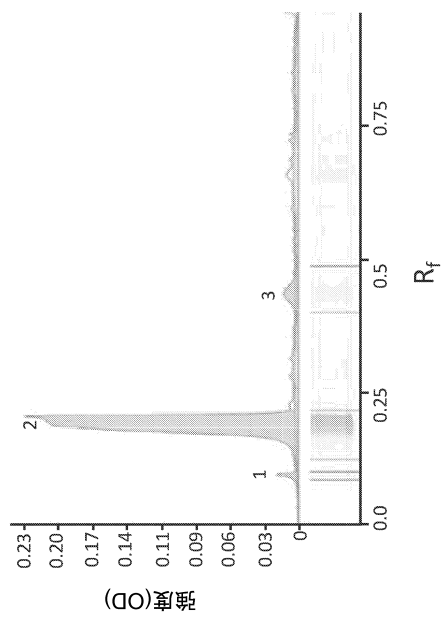
20

30

40

50

【図 5 2 B】



【図 5 2 C】

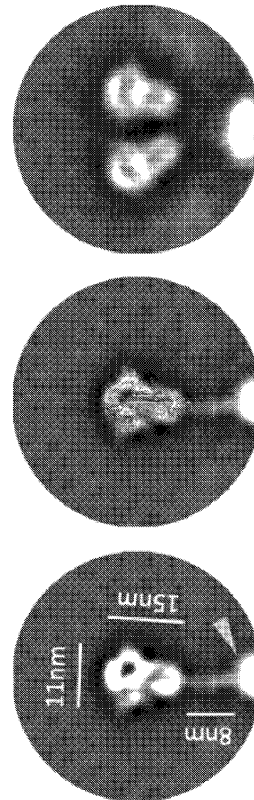
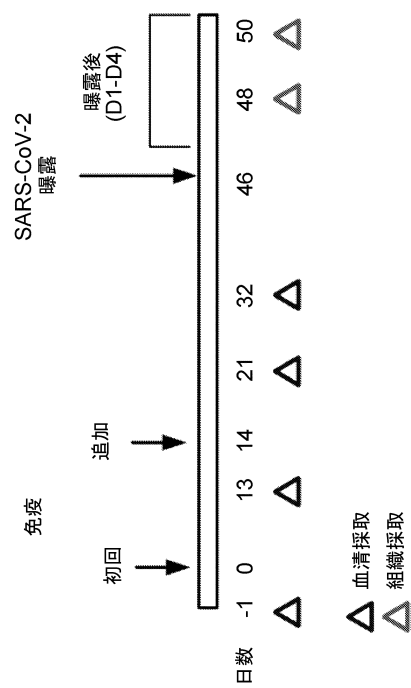


Fig. 52C

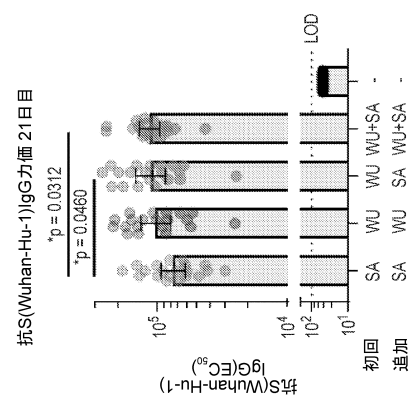
10

20

【図 5 3】



【図 5 4 A】

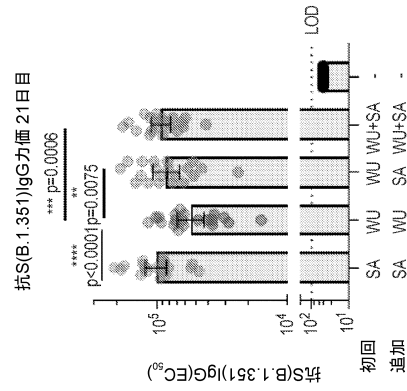


30

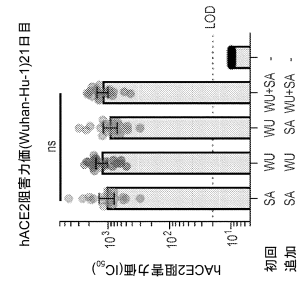
40

50

【図 5 4 B】



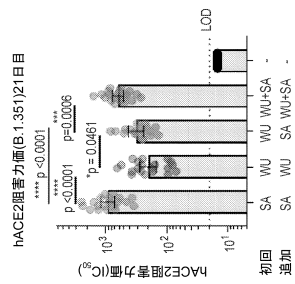
【図 5 4 C】



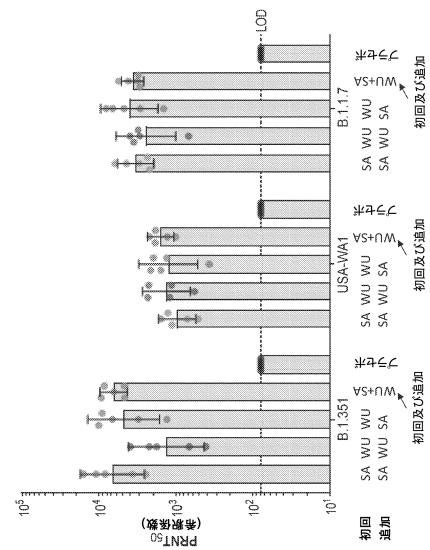
10

20

【図 5 4 D】



【図 5 4 E】

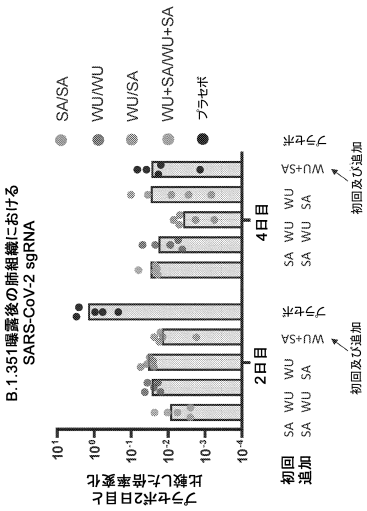


30

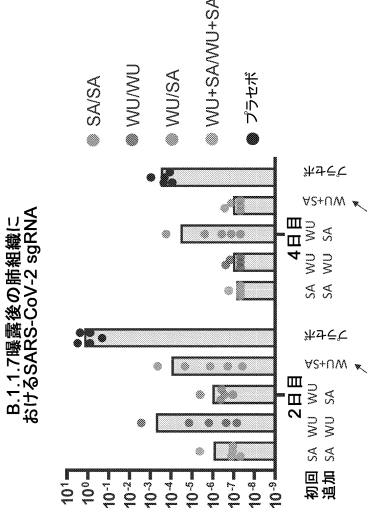
40

50

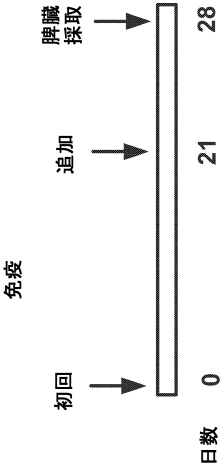
【図 5 5 E】



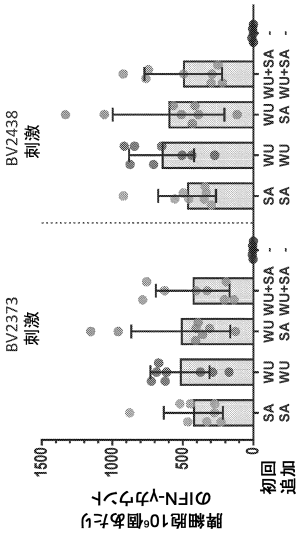
【図 5 5 F】



【図 5 6 A】



【図 5 6 B】



10

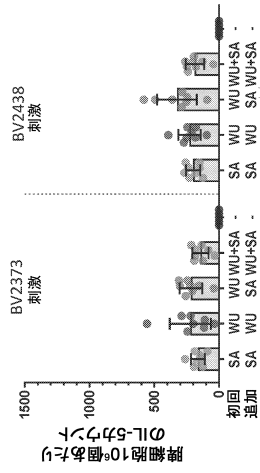
20

30

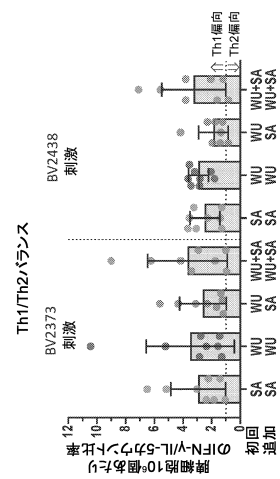
40

50

【図 5 6 C】



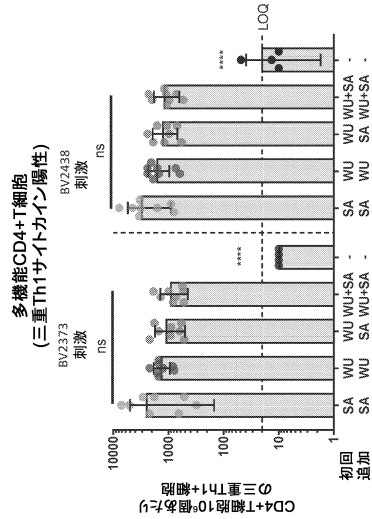
【図 5 6 D】



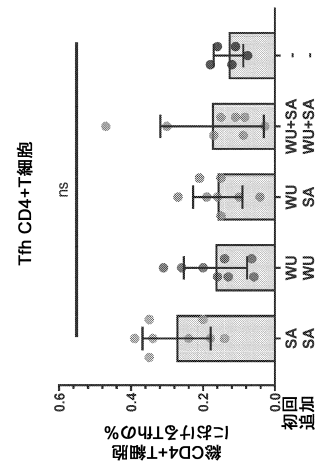
10

20

【図 5 6 E】



【図 5 6 F】

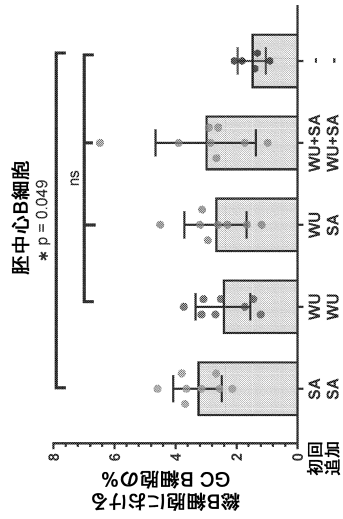


30

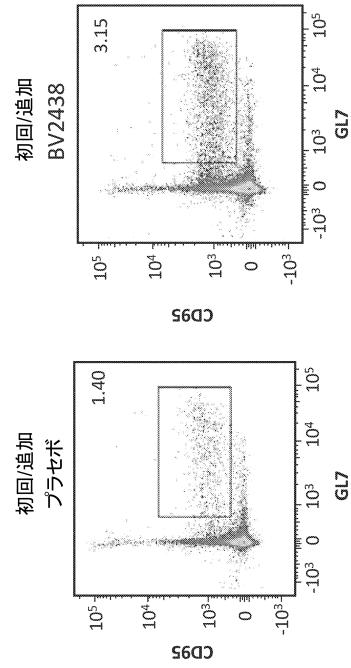
40

50

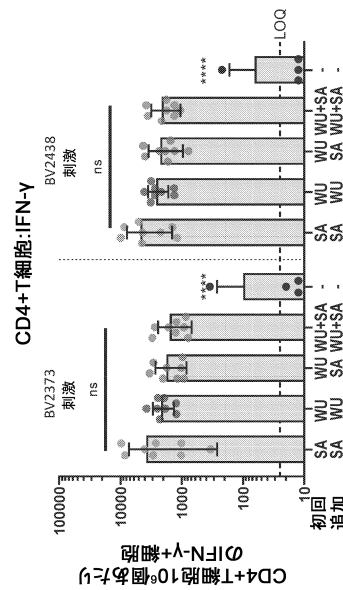
【図 5 6 G】



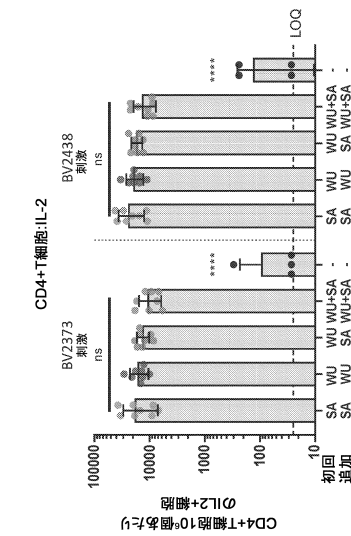
【図 5 6 H】



【図 5 7 A】



【図 5 7 B】



10

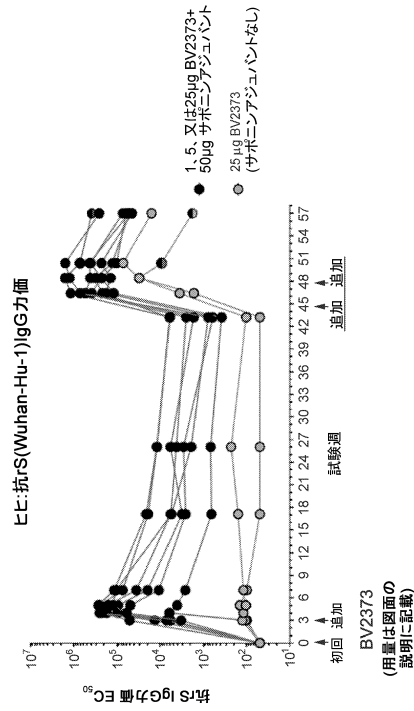
20

30

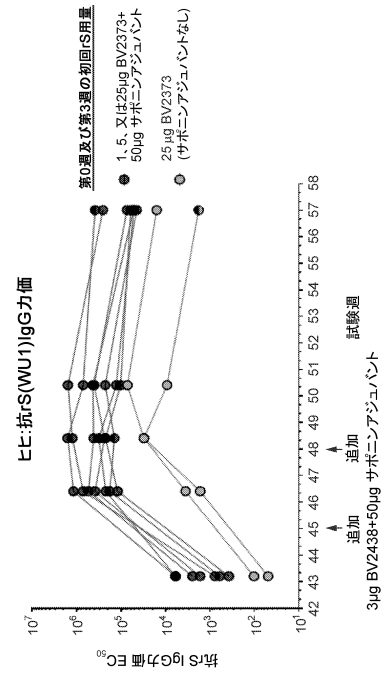
40

50

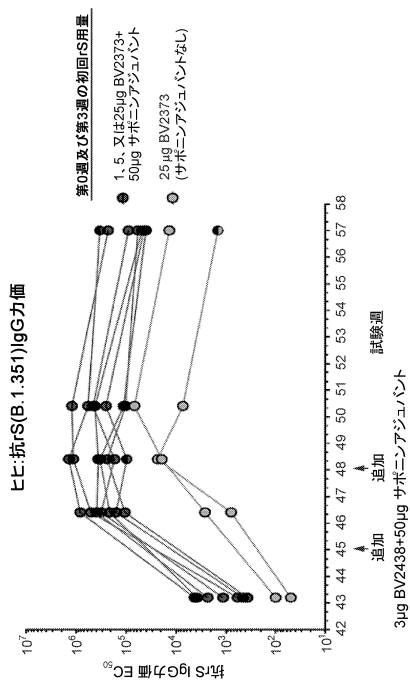
【図 5 8 B】



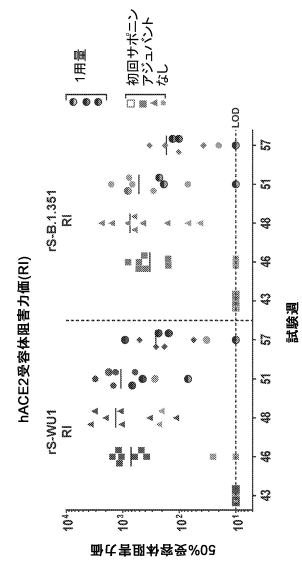
【図 5 8 C】



【図 5 8 D】



【図 5 8 E】



10

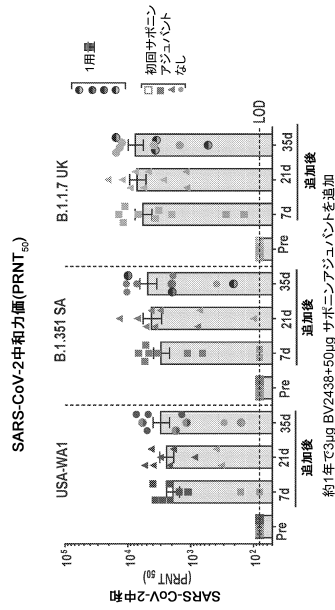
20

30

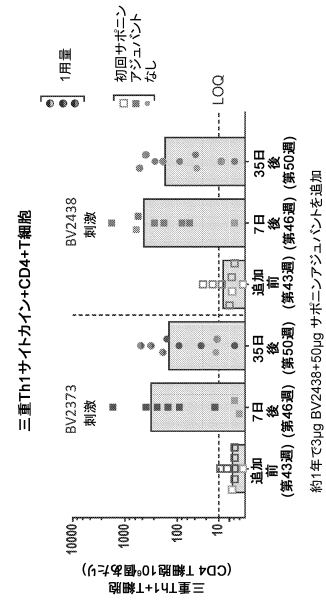
40

50

【図 5 8 F】



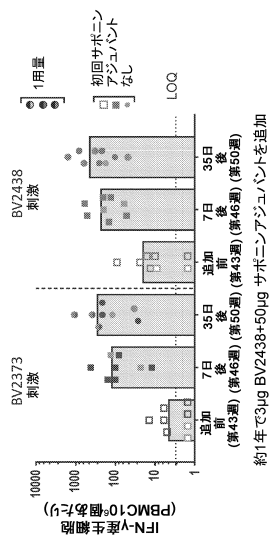
【図 5 8 G】



10

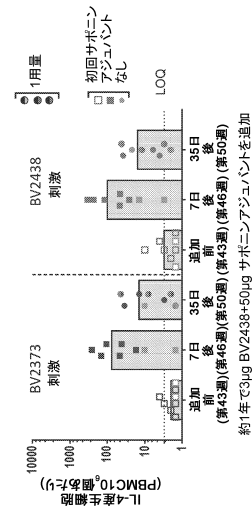
20

【図 5 9 A】



30

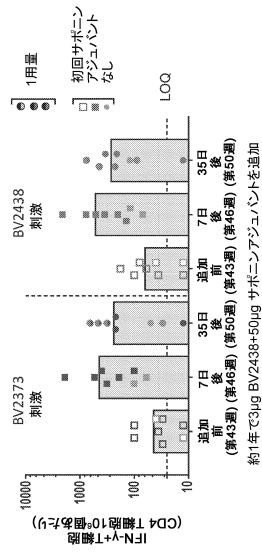
【図 5 9 B】



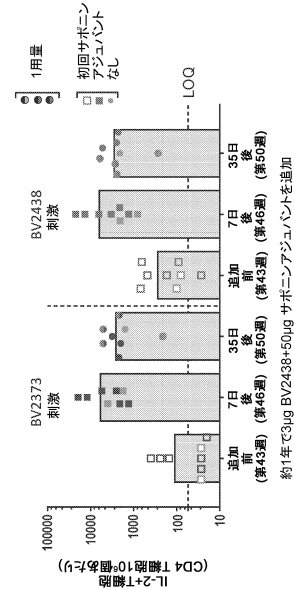
40

50

【図 5 9 C】



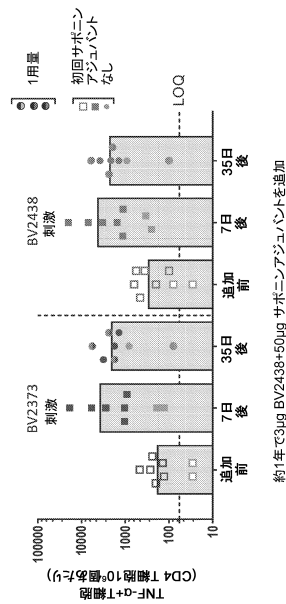
【図 5 9 D】



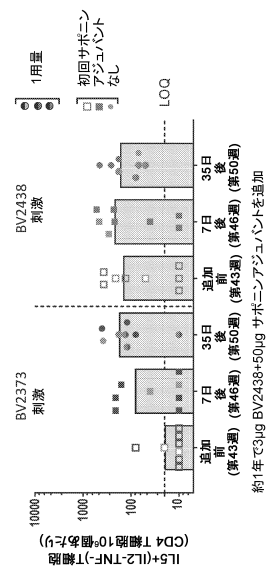
10

20

【図 5 9 E】



【図 5 9 F】

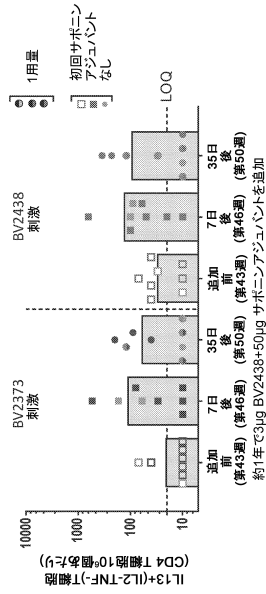


30

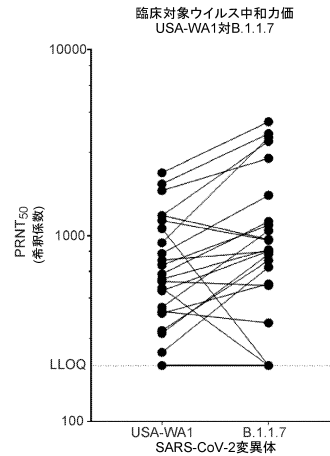
40

50

【図 5 9 G】



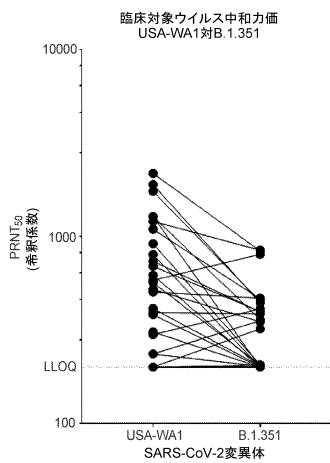
【図 6 0 A】



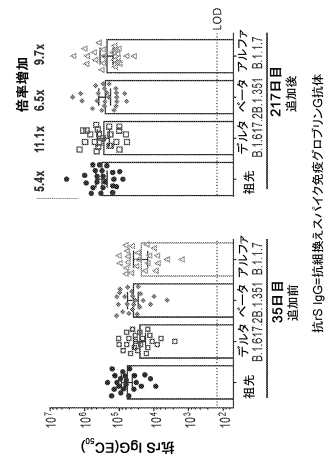
10

20

【図 6 0 B】



【図 6 1 A】

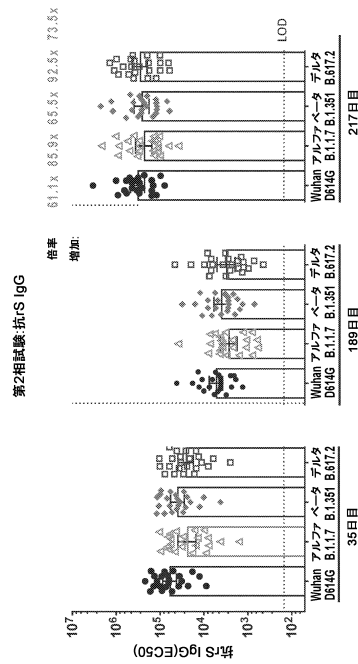


30

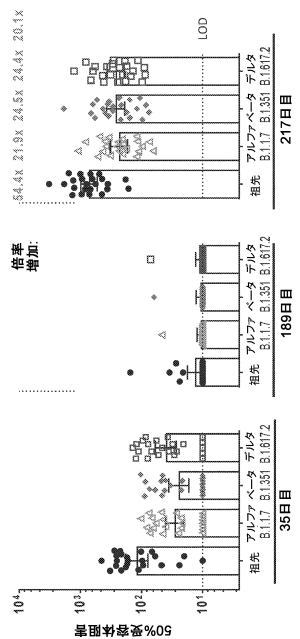
40

50

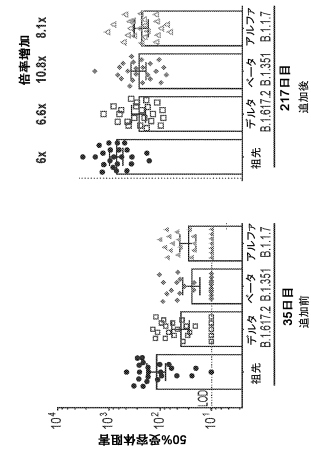
【図 6 1 B】



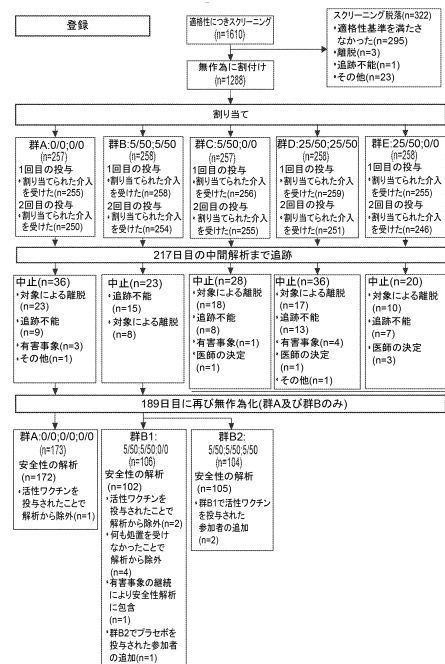
【図 6 2 B】



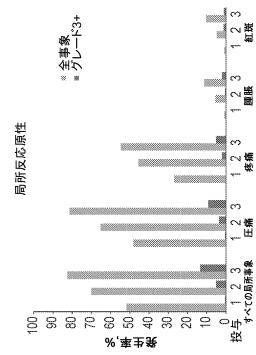
【図 6 2 A】



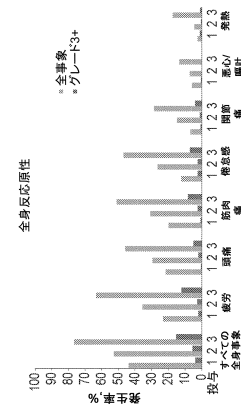
【図 6 3】



【図 6 4 A】



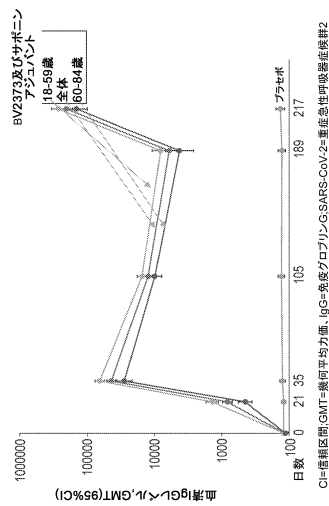
【図 6 4 B】



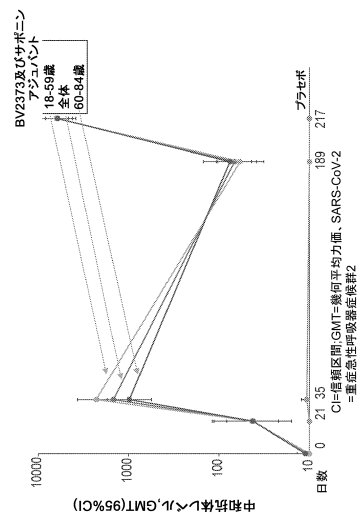
10

20

【図 6 5】



【図 6 6】

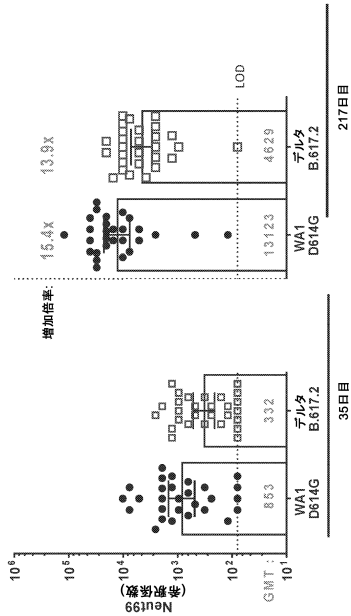


30

40

50

【図 67】



10

20

【配列表】

2024511412000001.app

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2022/020974
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/215; A61P 31/14; C07K 14/165 (2022.01) CPC - A61K 39/215; A61K 2039/55555; A61P 31/14; C07K 14/165; C12N 2770/20021; C12N 2770/20034 (2022.05)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) see Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched see Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) see Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	TIAN et al., "SARS-CoV-2 spike glycoprotein vaccine candidate NVX-CoV2373 Immunogenicity in baboons and protection in mice," Nature Communications, 14 January 2021 (14.01.2021), Vol. 12, Art. No. 327, Pgs. 1-14, entire document	1, 8, 9 — 2-7
X	SHINDE et al., "Preliminary Efficacy of the NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine Against the B.1.351 Variant," medRxiv, 03 March 2021, doi: https://doi.org/10.1101/2021.02.25.21252477 , [retrieved on 26 May 2022]. Retrieved from the Internet: <URL: https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.02.25.21252477v1.full-text >. entire document	65, 66
Y	AMANAT et al., "Introduction of Two Prolines and Removal of the Polybasic Cleavage Site Lead to Higher Efficacy of a Recombinant Spike-Based SARS-CoV-2 Vaccine in the Mouse Model," mBio, 02 March 2021 (02.03.2021), Vol. 12, No. 2, Pgs. 1-10, entire document	2
Y	YU et al., "DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques," Science, 20 May 2020 (20.05.2020), Vol. 369, Iss. 6505, Pgs. 806-811, entire document	3-5, 7
Y	WANG et al., "Subunit Vaccines Against Emerging Pathogenic Human Coronaviruses," Frontiers in Microbiology, 28 February 2020 (28.02.2020), Vol. 11, Art. No. 298, Pgs. 1-19, entire document	6
A	WU et al., "Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, complete genome," GenBank MN908947.3, 18 March 2020 [retrieved on 03 June 2022]. Retrieved from the Internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN908 >. entire document	1-9, 65, 66
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 06 June 2022		Date of mailing of the international search report JUN 27 2022
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Taina Matos Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

International application No.
PCT/US2022/020974

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	US 2021/0246170 A1 (JANSSEN PHARMACEUTICALS INC. et al) 12 August 2021 (12.08.2021) entire document	1-9, 65, 66
P, X	US 2021/0228707 A1 (MODERNATX INC.) 29 July 2021 (29.07.2021) entire document	1-9, 65, 66
P, X	US 10,953,089 B1 (NOVAVAX INC.) 23 March 2021 (23.03.2021) entire document	1-9, 65, 66

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/020974

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 1, 2, 5, 85, 87, and 117 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/020974

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 10-64
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/145 (2006.01)	A 6 1 K 39/145	Z N A
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/26	Z
C 0 7 K 14/165 (2006.01)	C 0 7 K 14/165	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 15/86 (2006.01)	C 1 2 N 15/86	
(32)優先日 令和3年4月20日(2021.4.20)		
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		
(31)優先権主張番号 63/195,986		
(32)優先日 令和3年6月2日(2021.6.2)		
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		
(31)優先権主張番号 63/280,395		
(32)優先日 令和3年11月17日(2021.11.17)		
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		
(31)優先権主張番号 63/290,439		
(32)優先日 令和3年12月16日(2021.12.16)		
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		
(31)優先権主張番号 63/292,196		
(32)優先日 令和3年12月21日(2021.12.21)		
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		
(31)優先権主張番号 63/293,468		
(32)優先日 令和3年12月23日(2021.12.23)		
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		
(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW 8 7 8 , ゲイザースバーグ , ファーストフィールド ロード 2 1 , ノバボックス , インコーポレイテッド内		
(72)発明者 マサレ , マイケル ジェイ . アメリカ合衆国 , メリーランド州 2 0 8 7 8 , ゲイザースバーグ , ファーストフィールド ロード 2 1 , ノバボックス , インコーポレイテッド内		
(72)発明者 ティアン , ジン-ファイ アメリカ合衆国 , メリーランド州 2 0 8 7 8 , ゲイザースバーグ , ファーストフィールド ロード 2 1 , ノバボックス , インコーポレイテッド内		

Fターム (参考)	4B065	AA01X AA01Y AA57X AA57Y AA72X AA72Y AA83X AA83Y AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA45
	4C076	AA12 BB15 CC07 DD09 EE23 FF11
	4C085	AA03 BA55 BA71 BB12 EE01 EE06 FF18 GG03
	4H045	AA10 AA11 AA30 BA41 CA01 DA50 DA86 EA20 EA31 FA72 FA74