



공개특허 10-2022-0157969

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0157969
(43) 공개일자 2022년11월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/005 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/005 (2013.01)
A61K 39/215 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7032752
- (22) 출원일자(국제) 2021년02월25일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년09월21일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2021/019662
- (87) 국제공개번호 WO 2021/173829
국제공개일자 2021년09월02일
- (30) 우선권주장
62/981,451 2020년02월25일 미국(US)
(뒷면에 계속)

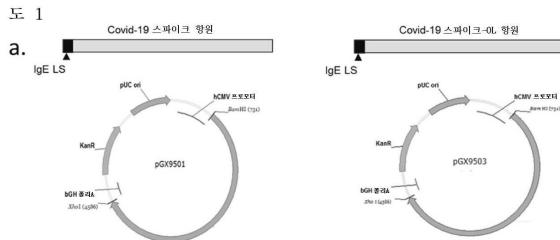
- (71) 출원인
이노비오 파마수티컬즈, 임크.
미국 19462 펜실베니아주 플리머스 미팅 스위트
110 저먼타운 파이크 660
더 워스타 인스티튜트 오브 아나토미 앤드 바이올
로지
미국 펜실바니아 19104 필라델피아 스프루스 스트
리트 3601
- (72) 발명자
안, 지안
미국 펜실베이니아주 19086, 월링포드 셰필드 드
라이브 503
브로데릭, 케이트
미국 캘리포니아주 92120, 샌디에이고 럿지무어
드라이브 5806
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인엠에이피에스, 특허법인차

전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) 발명의 명칭 코로나바이러스 백신 및 사용 방법

(57) 요약

중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2) 스파이크 항원을 암호화하는 핵산 분자, SARS-CoV-2 스파이크 항원, 면역원성 조성물 및 백신, 그리고 대상체에서 SARS-CoV-2 감염에 대해서 면역 반응을 유도하고 이러한 감염을 방지 또는 치료함에 있어서의 이들의 용도가 본 명세서에 개시된다.

대 표 도

(52) CPC특허분류

A61P 31/14 (2018.01)
A61K 2039/53 (2013.01)
A61K 2039/54 (2013.01)
A61K 2039/545 (2013.01)
A61K 2039/572 (2013.01)
A61K 2039/575 (2013.01)
C12N 2770/20021 (2013.01)
C12N 2770/20034 (2013.01)
C12N 2770/20044 (2013.01)

(72) 발명자

웨이너, 데이비드

미국 펜실베이니아주 19066, 메리온 비콤 레인 717

무투마니, 칼

미국 뉴저지주 08002, 체리 헬 아이비 레인 52

파텔, 아미미국 펜실베이니아주 19146, 필라델피아 캐서린 스
트리트 2642

(30) 우선권주장

62/981,168	2020년02월25일	미국(US)
63/004,380	2020년04월02일	미국(US)
63/022,032	2020년05월08일	미국(US)
63/028,404	2020년05월21일	미국(US)
63/033,349	2020년06월02일	미국(US)
63/040,865	2020년06월18일	미국(US)
63/046,415	2020년06월30일	미국(US)
63/056,996	2020년07월27일	미국(US)
63/062,762	2020년08월07일	미국(US)
63/063,157	2020년08월07일	미국(US)
63/114,858	2020년11월17일	미국(US)
63/130,593	2020년12월24일	미국(US)
63/136,973	2021년01월13일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus 2: SARS-CoV-2) 스파이크 항원을 암호화하는 핵산 분자로서, 상기 핵산 분자는

서열번호 2의 55번 내지 3837번 뉴클레오타이드에 제시된 핵산 서열의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열;

서열번호 2의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열;

서열번호 2의 55번 내지 3837번 뉴클레오타이드의 핵산 서열;

서열번호 2의 핵산 서열;

서열번호 3의 전체 길이에 대한 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열;

서열번호 3의 핵산 서열;

서열번호 5의 55번 내지 3837번 뉴클레오타이드의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열;

서열번호 5의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열;

서열번호 5의 55번 내지 3837번 뉴클레오타이드의 핵산 서열;

서열번호 5의 핵산 서열;

서열번호 6의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열; 또는

서열번호 6의 핵산 서열

을 포함하는, 핵산 분자.

청구항 2

발현 벡터로서, 제1항에 따른 핵산 분자를 포함하는, 발현 벡터.

청구항 3

면역원성 조성물로서, 유효량의 제2항에 따른 발현 벡터 및 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 완충액, 선택적으로 식염수-시트르산나트륨 완충액을 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 조성물은 식염수-시트르산나트륨 완충액의 밀리리터당 10mg의 상기 벡터를 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 6

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 보조제를 추가로 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 7

중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)에 대한 면역 반응의 유도를 필요로 하는 대상체에서 SARS-CoV-2에 대한 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 유효량의 제3항 내지 제6항 중 어느 한 항의 면역원성 조

성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 8

증증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2) 감염으로부터의 보호를 필요로 하는 대상체를 SARS-CoV-2 감염으로부터 보호하는 방법으로서, 유효량의 제3항 내지 제6항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 9

증증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2) 감염에 대한 치료를 필요로 하는 대상체를 SARS-CoV-2 감염에 대해 치료하는 방법으로서, 유효량의 제3항 내지 제6항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하되, 상기 대상체는 이에 의해 1종 이상의 SARS-CoV-2 균주에 저항성이 있는, 방법.

청구항 10

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 전기천공법 및 주사 중 적어도 하나를 포함하는, 방법.

청구항 11

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 비경구 투여에 이어 전기천공법을 포함하는, 방법.

청구항 12

제7항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 약 0.5mg 내지 약 2.0mg의 상기 백터의 초기 용량이 상기 대상체에게 투여되고, 선택적으로 상기 초기 용량은 0.5mg, 1.0mg 또는 2.0mg의 상기 백터인, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 약 0.5mg 내지 약 2.0mg의 상기 백터의 후속 용량이 상기 초기 용량 후 약 4주에 상기 대상체에게 투여되고, 선택적으로 상기 후속 용량은 0.5mg, 1.0mg 또는 2.0mg의 상기 백터인, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 약 0.5mg 내지 약 2.0mg의 상기 백터의 1회 이상의 추가 후속 용량이 상기 초기 용량의 투여 후 적어도 12주에 상기 대상체에게 투여되고, 선택적으로 상기 추가 후속 용량은 0.5mg, 1.0mg 또는 2.0mg의 상기 백터인, 방법.

청구항 15

제7항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역원성 조성물은 INO-4800 또는 이의 바이오시밀러인, 방법.

청구항 16

제7항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, SARS-CoV-2 감염의 치료 또는 SARS-CoV-2 감염과 관련된 질환 또는 장애의 치료 또는 예방을 위한 적어도 1종의 추가적인 작용제를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 면역원성 조성물은 상기 추가적인 작용제 이전, 이와 동시에 또는 이후에 상기 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 18

증증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)에 대한 면역 반응의 유도를 필요로 하는 대상체에서 SARS-CoV-2에 대한 면역 반응을 유도하는 방법에 서의, 제3항 내지 제6항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물의 용도.

청구항 19

중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)에 의한 감염으로부터 대상체를 보호하는 방법에서의, 제3항 내지 제6항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물의 용도.

청구항 20

중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2) 감염에 대한 치료를 필요로 하는 대상체를 SARS-CoV-2에 대해 치료하는 방법에서의, 제3항 내지 제6항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물의 용도.

청구항 21

제18항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, SARS-CoV-2 감염의 치료 또는 SARS-CoV-2 감염과 관련된 질환 또는 장애의 치료 또는 예방을 위한 적어도 1종의 추가적인 작용제와 조합된, 용도.

청구항 22

제18항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역원성 조성물은 전기천공법 및 주사 중 적어도 하나에 의해 상기 대상체에게 투여되는, 용도.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 면역원성 조성물은 상기 대상체에게 비경구로 투여된 후 전기천공법에 의해 투여되는, 용도.

청구항 24

제18항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 약 0.5mg 내지 약 2.0mg의 벡터의 초기 용량이 상기 대상체에게 투여되고, 선택적으로 상기 초기 용량은 0.5mg, 1.0mg 또는 2.0mg의 상기 벡터인, 용도.

청구항 25

제24항에 있어서, 약 0.5mg 내지 약 2.0mg의 벡터의 후속 용량이 상기 초기 용량 후 약 4주에 상기 대상체에게 투여되고, 선택적으로 상기 후속 용량은 0.5mg, 1.0mg 또는 2.0mg의 상기 벡터인, 용도.

청구항 26

제25항에 있어서, 약 0.5mg 내지 약 2.0mg의 벡터의 추가 후속 용량이 상기 초기 용량 후 적어도 12주에 상기 대상체에게 투여되고, 선택적으로 상기 추가 후속 용량은 0.5mg, 1.0mg 또는 2.0mg의 상기 벡터인, 용도.

청구항 27

제18항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역원성 조성물은 INO-4800 또는 이의 바이오시밀러인, 용도.

청구항 28

약제의 제조에서의, 제2항의 벡터의 용도.

청구항 29

중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)에 의한 감염을 치료 또는 방지하기 위한 약제의 제조에서의, 제2항의 벡터의 용도.

청구항 30

대상체에서 지속적인 세포성 면역 반응을 검출하는 방법으로서,

SARS-CoV-2 항원에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 면역원성 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계;

상기 대상체로부터 말초 단핵 세포(peripheral mononuclear cell: PBMC)를 단리하는 단계;

상기 단리된 PBMC를 서열번호 1의 19번 내지 1279번 잔기의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 서열번호 1의 19번 내지 1279번 잔기에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 1의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 서열번호 1의 아미노산 서열, 서열번호 4의 19번 내지 1279번 잔기의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 서열번호 4의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 서열번호 4의 19번 내지 1279번 잔기에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 4의 아미노산 서열 및 적어도 20개의 아미노산을 포함하는 이들의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 SARS-CoV-2 스파이크 항원으로 자극하는 단계; 및

사이토카인 발현 세포 수 및 사이토카인 발현 수준 중 적어도 하나를 검출하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 사이토카인 발현 세포 수 및 사이토카인 발현 수준 중 적어도 하나를 검출하는 단계는 효소-결합 면역점(Enzyme-linked immunospot: ELISpot) 및 유세포 분석을 사용하는 세포내 사이토카인 염색 (Intracellular Cytokine Staining: ICS) 분석으로 이루어진 군으로부터 선택되는 검정을 사용하여 수행되는, 방법.

청구항 32

제30항에 있어서, 상기 대상체에는 핵산 분자를 포함하는 면역원성 조성물이 투여되되, 상기 핵산 분자는,

서열번호 2의 55번 내지 3837번 뉴클레오타이드에 제시된 핵산 서열의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열;

서열번호 2의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열;

서열번호 2의 55번 내지 3837번 뉴클레오타이드의 핵산 서열;

서열번호 2의 핵산 서열;

서열번호 3의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열;

서열번호 3의 핵산 서열;

서열번호 5의 55번 내지 3837번 뉴클레오타이드의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열;

서열번호 5의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열;

서열번호 5의 55번 내지 3837번 뉴클레오타이드의 핵산 서열;

서열번호 5의 핵산 서열;

서열번호 6의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열; 및

서열번호 6의 핵산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

본 출원은 2020년 2월 25일자로 출원된 미국 특허 출원 제62/981,451호; 2020년 4월 2일자로 출원된 미국 특허 출원 제63/004,380호; 2020년 5월 21일자로 출원된 미국 특허 출원 제63/028,404호; 2020년 6월 2일자로 출원된 미국 특허 출원 제63/033,349호; 2020년 6월 18일자로 출원된 미국 특허 출원 제63/040,865호; 2020년 6월 30일자로 출원된 미국 특허 출원 제63/046,415호; 2020년 8월 7일자로 출원된 미국 특허 출원 제63/062,762호; 2020년 11월 17일자로 출원된 미국 특허 출원 제63/114,858호; 2020년 12월 24일자로 출원

된 미국 특허 출원 제63/130,593호; 2021년 1월 13일자로 출원된 미국 특허 출원 제63/136,973호; 2020년 2월 25일자로 출원된 미국 특허 출원 제62/981,168호; 2020년 5월 8일자로 출원된 미국 특허 출원 제63/022,032호; 2020년 7월 27일자로 출원된 미국 특허 출원 제63/056,996호; 및 2020년 8월 7일자로 출원된 미국 특허 출원 제63/063,157호에 대한 우선권을 주장한다. 이들 출원 각각의 내용은 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 원용된다.

[0003] 서열 목록

본 출원은 2021년 2월 24일자로 생성되고 크기가 58,410바이트인 "104409_000596_SL.txt"라는 이름의 텍스트 파일로 전자적으로 제출된 서열 목록을 포함한다. 서열 목록은 참조에 의해 본 명세서에 원용된다.

[0005] 기술 분야

본 발명은 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus 2: SARS-CoV-2)에 대한 백신 및 백신 투여 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 이전에 2019-nCoV 폐렴 또는 질환으로 알려진 COVID-19는 동물에서 사람으로 넘어온 점점 더 많은 수의 코로나 바이러스-관련 질병에서 중증 급성 호흡기 증후군(severe acute respiratory syndrome: SARS) 및 중동 호흡기 증후군(Middle East respiratory syndrome: MERS)과 함께 공중 보건에 대한 세계적인 위협으로 빠르게 부상하였다. 이러한 신종 코로나바이러스의 확산을 막기 위한 백신과 같은 의학적 대응책이 절박하게 필요하다. MERS-CoV 및 SARS-CoV를 포함하여 인간을 감염시키는 적어도 7개의 확인된 코로나바이러스가 있다.

[0008] 2019년 12월, 중국 우한시는 신규한 코로나바이러스의 세계적 발병의 진원지가 되었다. 이러한 코로나바이러스 SARS-CoV-2는 감염된 환자로부터의 인간 기도 상피 세포로부터 단리되고 시원성되었다(Zhu, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020; Wu, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature.* 2020). 질환의 증상은 범위가 가벼운 독감과 유사한 사례에서 생명을 위협하는 폐렴을 동반한 중증의 사례까지 이른다(Huang, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020). 세계적 상황은 역동적으로 진화하고 있으며, 2020년 1월 30일 세계보건기구(World Health Organization)는 COVID-19를 국제적 공중보건 비상사태(public health emergency of international concern: PHEIC)로 선언하였다.

발명의 내용

[0009] SARS-CoV-2 스파이크 항원을 암호화하는 핵산 문자가 본 명세서에 제공된다. 일부 실시형태에 따르면, 암호화된 SARS-CoV-2 스파이크 항원은 컨센서스 항원이다. 일부 실시형태에서, 핵산 문자는 서열번호 2의 55번 내지 3837 번 뉴클레오타이드에 제시된 핵산 서열의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열; 서열번호 2의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열; 서열번호 2의 55번 내지 3837번 뉴클레오타이드의 핵산 서열; 서열번호 2의 핵산 서열; 서열번호 3의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열; 서열번호 3의 핵산 서열; 서열번호 5의 55번 내지 3837번 뉴클레오타이드의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열; 서열번호 5의 55번 내지 3837번 뉴클레오타이드의 핵산 서열; 서열번호 5의 핵산 서열; 서열번호 6의 55번 내지 3837번 뉴클레오타이드의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열; 서열번호 6의 핵산 서열; 서열번호 6의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열; 또는 서열번호 6의 핵산 서열을 포함한다. 또한, SARS-CoV-2 스파이크 항원을 암호화하는 핵산 문자가 본 명세서에 제공되며, SARS-CoV-2 스파이크 항원은 서열번호 1의 19번 내지 1279번 잔기의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열; 서열번호 1의 19번 내지 1279 번 잔기에 제시된 아미노산 서열; 서열번호 1의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열; 서열번호 1의 아미노산 서열; 서열번호 4의 19번 내지 1279번 잔기의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열; 서열번호 4의 19번 내지 1279번 잔기에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함한다.

[0010] 일부 실시형태에서, SARS-CoV-2 항원을 암호화하는 핵산 문자는 바이러스 입자에 혼입된다.

[0011] SARS-CoV-2 항원을 암호화하는 핵산 문자를 포함하는 벡터가 추가로 제공된다. 일부 실시형태에서, 벡터는 발현 벡터이다. 핵산 문자는 프로모터 및 폴리-아데닐화 신호로부터 선택되는 조절 요소에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 발현 벡터 플라스미드 또는 바이러스 벡터일 수 있다.

- [0012] 유효량의 벡터 또는 바이러스 입자를 포함하는 면역원성 조성물이 개시된다. 면역원성 조성물은 완충액과 같지만 이로 제한되지 않는 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함할 수 있다. 완충액은 선택적으로 식염수-시트르산나트륨 완충액일 수 있다. 일부 실시형태에서, 면역원성 조성물은 보조제를 포함한다.
- [0013] 또한, SARS-CoV-2 스파이크 항원이 본 명세서에 제공된다. 일부 실시형태에 따르면, SARS-CoV-2 스파이크 항원은 컨센서스 항원이다. 일부 실시형태에서, SARS-CoV-2 스파이크 항원은 서열번호 1의 19번 내지 1279번 잔기의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열; 서열번호 1의 19번 내지 1279번 잔기에 제시된 아미노산 서열; 서열번호 1의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열; 서열번호 1의 아미노산 서열; 서열번호 4의 19번 내지 1279번 잔기의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열; 서열번호 4의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열; 서열번호 4의 19번 내지 1279번 잔기에 제시된 아미노산 서열; 또는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0014] 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2) 감염의 예방 또는 치료를 위한 백신이 본 명세서에 추가로 제공된다. 백신은 유효량의 전술한 핵산 분자, 벡터 또는 항원 중 어느 하나 또는 이들의 조합물을 포함한다. 일부 실시형태에 따르면, 백신은 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 포함한다. 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 완충액, 선택적으로 식염수-시트르산나트륨 완충액일 수 있다. 일부 실시형태에 따르면, 백신은 보조제를 추가로 포함한다.
- [0015] 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)에 대한 면역 반응을 이를 필요로 하는 대상체에서 유도하는 방법이 추가로 제공된다. 일부 실시형태에서, 면역 반응을 유도하는 방법은 유효량의 전술한 핵산 분자, 벡터, 면역원성 조성물, 항원 또는 백신 중 어느 하나 또는 이들의 조합물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 또한, SARS-CoV-2 감염으로부터의 보호(protecting)를 필요로 하는 대상체를 SARS-CoV-2 감염으로부터 보호하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 방법은 유효량의 전술한 핵산 분자, 벡터, 면역원성 조성물, 항원 또는 백신 중 어느 하나 또는 이들의 조합물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. SARS-CoV-2 감염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 SARS-CoV-2 감염을 치료하는 방법이 추가로 제공되며, 방법은 유효량의 전술한 핵산 분자, 벡터, 면역원성 조성물, 항원 또는 백신 중 어느 하나 또는 이들의 조합물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 임의의 이러한 방법에서, 투여는 전기천공법 및 주사 중 적어도 하나를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에 따르면, 투여는, 예를 들어, 피내, 근육내 또는 피하 주사에 의한 비경구 투여를 포함하며, 선택적으로 전기천공법이 뒤따른다. 개시된 방법의 일부 실시형태에서, 약 0.5mg 내지 약 2.0mg의 핵산 분자의 초기 용량이 대상체에게 투여되며, 선택적으로 초기 용량은 0.5mg, 1.0mg 또는 2.0mg의 핵산 분자이다. 방법은 초기 용량 후 약 4주에 대상체에게 약 0.5mg 내지 약 2.0mg의 핵산 분자의 후속 용량을 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 선택적으로 후속 용량은 0.5mg, 1.0mg 또는 2.0mg의 핵산 분자이다. 또 다른 추가 실시형태에서, 방법은 초기 용량 후 적어도 12주에 대상체에게 약 0.5mg 내지 약 2.0mg의 핵산 분자의 1회 이상의 추가 후속 용량을 투여하는 단계를 포함할 수 있으며, 선택적으로 추가 후속 용량은 0.5mg, 1.0mg 또는 2.0mg의 핵산 분자이다. 임의의 이러한 실시형태에서, INO-4800 또는 이의 바이오시밀러가 투여된다.
- [0016] 또한, 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)에 대한 면역 반응을 필요로 하는 대상체에서 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)에 대한 면역 반응을 유도하는 방법에서의 개시된 핵산 분자, 벡터, 면역원성 조성물, 항원 또는 백신 중 어느 하나 또는 이들의 조합물의 용도가 본 명세서에 제공된다. 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)에 대한 감염으로부터 대상체를 보호하는 방법에서의 개시된 핵산 분자, 벡터, 면역원성 조성물, 항원 또는 백신 중 어느 하나 또는 이들의 조합물의 용도가 추가로 제공된다. 또한, SARS-CoV-2 감염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 SARS-CoV-2 감염을 치료하는 방법에서의 개시된 핵산 분자, 벡터, 면역원성 조성물, 항원 또는 백신 중 어느 하나 또는 이들의 조합물의 용도가 본 명세서에 제공된다. 임의의 이러한 용도에 따라, 핵산 분자, 벡터, 면역원성 조성물, 항원 또는 백신은 전기천공법 및 주사 중 적어도 하나에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 핵산 분자, 벡터, 면역원성 조성물, 항원 또는 백신은 대상체에게 비경구로 투여되고 이어서 전기천공법에 의해 투여된다. 개시된 용도의 일부 실시형태에서, 약 0.5mg 내지 약 2.0mg의 핵산 분자의 초기 용량이 대상체에게 투여되며, 선택적으로 초기 용량은 0.5mg, 1.0mg 또는 2.0mg의 핵산 분자이다. 용도는 초기 용량 후 약 4주에 약 0.5mg 내지 약 2.0mg의 핵산 분자의 후속 용량을 대상체에게 투여하는 단계를 더 포함할 수 있으며, 선택적으로 후속 용량은 0.5mg, 1.0mg 또는 2.0mg의 핵산 분자이다. 또 다른 추가 실시형태에서, 용도는 초기 용량 후 적어도 12주에 약 0.5mg 내지 약 2.0mg의 핵산 분자의 1회 이상의 추가 후속 용량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 선택적으로 추가 후속 용량은 0.5mg, 1.0mg 또는 2.0mg의 핵산 분자이다. 임의의 이러한 실시형태에서, INO-4800 또는 이의 바이오시밀러가 투여된다.

[0017]

약제의 제조에 있어서의 개시된 핵산 분자, 백터, 면역원성 조성물, 항원 또는 백신 중 어느 하나 또는 이들의 조합물의 용도가 본 명세서에 추가로 제공된다. 일부 실시형태에서, 약제는 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2) 감염을 치료 또는 방지(protecting against)하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 약제는 SARS-CoV-2 감염과 관련된 질환 또는 장애를 치료 또는 방지하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, 약제는 코로나바이러스 질환 2019(COVID-19), 성인 다기관 염증 증후군(Multisystem inflammatory syndrome in adult: MIS-A) 또는 소아 다기관 염증 증후군(Multisystem inflammatory syndrome in children: MIS-C)을 치료 또는 방지하기 위한 것이다.

[0018]

본 발명은 추가로 대상체에서 지속적인 세포성 면역 반응을 검출하는 방법에 관한 것이며, 방법은 SARS-CoV-2 항원에 대한 면역 반응 유도하기 위한 면역원성 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계; 대상체로부터 말초 단핵 세포(peripheral mononuclear cell: PBMC)를 단리하는 단계; 단리된 PBMC를 서열번호 1의 19번 내지 1279번 잔기에 제시된 아미노산 서열; 서열번호 1의 아미노산 서열; 서열번호 4의 19번 내지 1279번 잔기에 제시된 아미노산 서열; 또는 서열번호 4의 아미노산 서열; 또는 적어도 20개의 아미노산을 포함하는 이들의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 스파이크 항원으로 자극하는 단계; 및 사이토카인 발현 세포 수 및 사이토카인 발현 수준 중 적어도 하나를 검출하는 단계를 포함한다. 일 실시형태에서, 사이토카인 발현 세포 수 및 사이토카인 발현 수준 중 적어도 하나를 검출하는 단계는 효소-결합 면역점(Enzyme-linked immunospot: ELISpot) 또는 유세포 분석을 사용하는 세포내 사이토카인 염색 (Intracellular Cytokine Staining: ICS) 분석을 사용하여 수행된다.

[0019]

일 실시형태에서, 대상체에는 핵산 분자를 포함하는 면역원성 조성물이 투여되어, 핵산 분자는 서열번호 1의 19번 내지 1279번 잔기의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열; 서열번호 1의 19번 내지 1279번 잔기에 제시된 아미노산 서열; 서열번호 1의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열; 서열번호 1의 아미노산 서열; 서열번호 4의 19번 내지 1279번 잔기의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열; 서열번호 4의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열; 서열번호 4의 19번 내지 1279번 잔기에 제시된 아미노산 서열; 또는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 웨타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0020]

도 1a, 도 1b, 도 1c 및 도 1d는 SARS-CoV-2 합성 DNA 백신 작제물의 설계 및 발현을 도시한다. **도 1a**는 IgE 리더 서열 및 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 삽입물("Covid-19 스파이크 항원" 또는 "Covid-19 스파이크-OL 항원")을 포함하는 SARS-CoV-2 합성 DNA 백신 작제물 pGX9501(일치) 및 pGX9503(이상치(outlier: OL))의 개략도를 보여준다. **도 1b**는 pGX9501 또는 pGX9503으로 이중으로 형질감염된 COS-7 세포로부터의 RNA 추출물의 RT-PCR 검정의 결과를 보여준다. 추출된 RNA는 각 표적에 대해 설계된 PCR 검정을 사용하여 RT-PCR로 분석되었고, 내부 발현 정규화 유전자로서 사용되는 COS-7 β -액틴 mRNA에 대해 분석되었다. 웨타 C_t (ΔC_t)는 표적의 C_t 에서 각 형질감염 농도에 대한 β -액틴의 C_t 를 뺀 값으로 계산되었으며, 형질감염된 pDNA의 질량 로그에 대해 플로팅되었다(평균±SD로 플로팅됨). **도 1c**는 웨스턴 블로트에 의한 pGX9501, pGX9503 또는 MOCK 플라스미드로 293T 세포의 형질감염 후 스파이크 단백질의 시험관내 발현의 분석을 보여준다. 293T 세포 용해물은 젤에서 분리되고, 다중클론 항-SARS 스파이크 단백질로 프로빙되었다. 그런 다음, 블로트는 세제되어 항- β -액틴 로딩 대조군으로 프로빙되었다. **도 1d**는 3 μ g/웰의 pGX9501, pGX9503 또는 pVax(빈 대조군 백터)로 형질감염된 293T 세포의 시험관내 면역형광 염색을 보여준다. 스파이크 단백질의 발현은 다중클론 항-SARS 스파이크 단백질 IgG 및 2차 항-IgG로 측정되었다. 세포 핵은 DAPI로 대조염색되었다. 이미지는 ImageXpress™ Pico 자동화 세포 이미징 시스템을 사용하여 캡쳐되었다.

도 2는 INO-4800-처리된 마우스로부터의 혈청을 사용하는 SARS-CoV-2 및 SARS-CoV 항원 패널의 IgG 결합 스크리닝을 도시한다. BALB/c 마우스는 방법에 기재된 바와 같이 제0일에 25 μ g의 INO-4800 또는 pVAX-빈 백터(대조군)로 면역화되었다. 제14일에 마우스로부터의 1:50 및 1:250 혈청 희석액에서 IgG의 단백질 항원 결합. 표시된 데이터는 4마리 마우스의 각 그룹에 대한 평균 OD450nm 값(평균±SD)을 나타낸다.

도 3a, 도 3b, 도 3c 및 도 3d는 INO-4800의 단일 투여 후 BALB/c 마우스에서 SARS-CoV-2 S 1+2 및 S 수용체 결합 도메인 receptor binding domain: RBD) 단백질 항원에 대한 체액성 반응을 보여준다. BALB/c 마우스는 제0일에 실시예 1에 기재된 바와 같이 표시된 용량의 INO-4800 또는 pVAX-빈 백터로 면역화되었다. 제14일에 마우스로부터의 연속 혈청 희석액에서 IgG의 SARS-CoV-2 S1+2(**도 3a**) 또는 SARS-CoV-2 RBD(**도 3b**) 단백질 항원 결

합이 도시되어 있다. 표시된 데이터는 8마리 마우스(도 3a 및 도 3b) 및 5마리 마우스(도 3c 및 도 3d)의 각 그룹에 대한 평균 OD450nm 값(평균+SD)을 나타낸다. SARS-CoV-2 S1+2(도 3b) 및 SARS-CoV-2 RBD(도 3d) 단백질에 대한 혈청 IgG 결합 종말점 역가. 2개의 독립적인 실험을 나타내는 데이터이다.

도 4a 및 도 4b는 INO-4800으로 면역화한 후 중화 항체 반응을 도시한다. BALB/c 마우스(그룹당 n=5)는 제0일 및 제14일에 10 μ g의 INO-4800으로 2차 면역화되었다. 혈청은 2차 면역화 후 제7일에 수집되었으며, 연속 희석액은 SARS-CoV-2 스파이크를 디스플레이 하는 슈도바이러스와 함께 인큐베이션되고, ACE2-293T 세포와 함께 공동 인큐베이션되었다. 도 4a는 미경험 및 INO-4800 면역화된 마우스에서의 중화 ID50(평균±SD)을 보여준다. 도 4b는 미경험 마우스 및 방법에 기재된 바와 같이 INO-4800으로 백신이 접종된 마우스로부터의 혈청에 대한 상대 발광 단위(relative luminescence unit: RLU)를 보여준다.

도 5a 및 도 5b는 INO-4800의 단일 투여 후 Hartley 기니피그에서 SARS-CoV-2에 대한 체액성 반응을 보여준다. Hartley 기니피그 마우스는 실시예 1에 기재된 바와 같이 제0일에 100 μ g의 INO-4800 또는 pVAX-빈 벡터로 면역화되었다. 도 5a는 제0일 및 제14일에 연속 혈청 희석액에서 IgG의 SARS-CoV-2 S 단백질 항원 결합을 보여준다. 표시된 데이터는 5마리의 기니피그에 대한 평균 OD450nm 값(평균±SD)을 나타낸다. 도 5b는 제14일에 SARS-CoV-2 S 단백질에 대한 혈청 IgG 결합 역가(평균±SD)를 보여준다. P 값은 Mann-Whitney 검정에 의해 결정된다.

도 6a 내지 도 6f는 INO-4800으로 면역화된 마우스 및 기니피그 혈청이 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 결합에 대해 ACE2 수용체와 경쟁함을 보여준다. 도 6a는 가용성 ACE2 수용체가 0.025 μ g/ml의 EC50으로 CoV-2 전장 스파이크에 결합함을 도시한다. 도 6b는 INO-4800으로 2차 면역화 후 BALB/c 마우스(그룹당 n=5)로부터의 정제된 혈청 IgG가 ACE2 수용체에 대한 상당한 경쟁을 나타냄을 도시한다. 동물로부터의 혈청 IgG 샘플은 3회 반복 채취되었다. 도 6c는 INO-4800으로 2차 면역화 후 제7일에 n=5의 마우스로부터 정제된 IgG가 SARS-CoV-2 S 1+2 단백질에 결합하는 ACE2 수용체에 대해 상당한 경쟁을 나타냄을 도시한다. 경쟁 검정에 대한 가용성 ACE2 농도는 약 0.1 μ g/ml이다. 막대는 AUC의 평균 및 표준 편차를 나타낸다. 도 6d는 제0일 및 제14일에 방법에 기재된 바와 같이 100 μ g의 INO-4800 또는 pVAX-빈 벡터로 면역화된 Hartley 기니피그를 도시한다. 제28일에 수집된 혈청(1:20으로 희석됨)은 ACE2 단백질의 연속 희석액의 첨가 전에 SARS-CoV-2 코팅된 웰에 첨가되었다. SARS-CoV-2 S 단백질에 대한 ACE2 결합의 검출이 측정되었다. 5마리의 INO-4800-처리된 동물 및 3마리의 pVAX-처리된 동물로부터 수집된 혈청이 이 실험에 사용되었다. 도 6e는 제21일에 수집된 기니피그 혈청의 연속 희석액이 ACE2 단백질의 첨가 전에 SARS-CoV-2 코팅된 웰에 첨가되었음을 도시한다. SARS-CoV-2 S 단백질에 대한 ACE2 결합의 검출이 측정되었다. 4마리의 INO-4800-처리된 기니피그 및 5마리의 pVAX-처리된 기니피그로부터 수집된 혈청이 이 실험에 사용되었다. 도 6f는 INO-4800으로 2차 면역화 후 제14일에 n=5의 마우스로부터 정제된 IgG가 풀링된 미경험 마우스 IgG와 비교하여 SARS-CoV-2 스파이크 단백질에 결합하는 ACE2 수용체에 대한 경쟁을 나타냄을 도시한다. 미경험 마우스는 단일 칼럼에서 실행되었다. 백신이 접종된 마우스는 2회 반복으로 실행되었다. 오차 막대가 보이지 않으면, 오차는 데이터 포인트보다 작다.

도 7a 내지 도 7d는 INO-4800 면역화된 동물의 BAL에서 SARS-CoV-2 S 단백질-반응성 항체의 검출을 도시한다. BALB/c 마우스(그룹당 n=5)는 제0일 및 제14일에 INO-4800 또는 pVAX로 면역화되었고, BAL은 제21일에 수집되었다(도 7a 및 도 7b). Hartley 기니피그(그룹당 n=5)는 제0일, 제14일 및 제21일에 INO-4800 또는 pVAX로 면역화되었고, BAL은 제42일에 수집되었다(도 7c 및 도 7d). 기관지폐포 세척액은 ELISA에 의해 SARS-CoV-2 스파이크 단백질-특이적 IgG 항체에 대해 2회 반복으로 측정되었다. 데이터는 종말점 역가(도 7a 및 도 7c) 및 미가공(raw) OD 450nm 값(도 7b 및 도 7d)을 갖는 BAL 희석 곡선으로 표시된다. 도 7a 및 도 7c에서, 막대는 각 그룹의 평균을 나타내고, 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다. **Mann-Whitney U 검정에 의한 p<0.01.

도 8a 내지 도 8c는 INO-4800의 투여 후 BALB/c 마우스에서 T 세포 반응의 유도를 보여준다. BALB/c 마우스(n=5/그룹)는 2.5 μ g 또는 10 μ g의 INO-4800으로 면역화되었다. T 세포 반응은 제4일, 제7일, 제10일(도 8a 및 도 8b) 및 제14일(도 8c)에 동물에서 분석되었다. T 세포 반응은 SARS-CoV-2(도 8a), SARS-CoV(도 8b) 또는 MERS-CoV(도 8c) 스파이크 단백질에 걸쳐 중첩되는 펩타이드 풀로 20시간 동안 자극된 비장세포에서 IFN- γ ELISpot에 의해 측정되었다. 막대는 평균+SD를 나타낸다.

도 9 및 도 10은 INO-4800-처리된 뉴질랜드 화이트(New Zealand White: NZW) 토끼에서 측정된 세포 및 체액성 면역 반응을 도시한다. 제0일 및 제28일에 pDNA의 피내 전달. PBMC IFN- γ ELISpot(도 9); 혈청 IgG 결합 ELISA(도 10).

도 11a 내지 도 11e는 INO-4800 처리된 레서스 원숭이에서 측정된 SARS-CoV-2 스파이크 단백질에 대한 체액성

면역 반응을 도시한다. 제0일 및 제28일에 pDNA의 피내 전달. 혈청 IgG 결합 ELISA.

도 12a 내지 **도 12g**는 INO-4800 처리된 레서스 원숭이에서 측정된 SARS 및 MERS 스파이크 단백질에 대한 체액성 면역 반응을 도시한다. 제0일 및 제28일에 pdNA의 피내 전달. 혈청 IgG 결합 ELISA(**도 12a** 내지 **도 12g**; 왼쪽 패널, 1mg INO-4800; 오른쪽 패널, 2mg INO-4800).

도 13a 내지 **도 13c**는 제0일 및 제28일 피내 pDNA의 피내 전달 후 INO-4800-처리된 레서스 원숭이에서 PBMC IFN- γ ELISpot에 의해 측정된 세포성 면역 반응을 도시한다. 결과는 **도 13a**(SARS CoV-2 스파이크 웹타이드); **도 13b**(SARS CoV 스파이크 웹타이드); 및 **도 13c**(MERS CoV 스파이크 웹타이드)에 도시되어 있다.

도 14a 및 **도 14b**는 BALB/c 마우스에 INO-4800 투여 후 T 세포 에피토프 매핑을 보여준다. 비장세포는 SARS-CoV-2 웹타이드 매트릭스 매핑 풀로 20시간 동안 자극되었다. **도 14a**는 매트릭스 매핑 SARS-CoV-2 웹타이드 풀로 자극한 후 T 세포 반응을 보여준다. 막대는 5마리의 마우스의 평균+SD를 나타낸다. **도 14b**는 BALB/c 마우스에서 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 맵 및 면역우세 웹타이드의 확인을 보여준다. 비교를 위해 공지된 면역우세 SARS-CoV HLA-A2 에피토프가 포함되었다. **도 14b**는 출현 순서대로 각각 서열번호 26 내지 35를 개시한다.

도 15a 내지 **도 15h**는 인후 및 비강 구획에서 보호의 체액성 상관관계를 도시한다. (**도 15a** 내지 **도 15d**) 미세 중화 역가(**도 15a**, **도 15c**) 및 RBD IgG 결합 종말점 역가(**도 15b**, **도 15d**)를 사용한 SARS-CoV-2 시험투여 후 제1일(**도 15a**, **도 15b**) 및 제3일(**도 15c**, **도 15d**)에 인후 바이러스 부하 로그10 cDNA 카피 ml-1 의 상관관계. (**도 15e** 내지 **도 15h**) 비강 바이러스 부하에 대한 동일한 분석. P 값 및 R 값은 양측 비모수 Spearman 순위-상관관계 분석(two-sided non-parametric Spearman rank-correlation analysis)을 위해 제공되었다. 대조군 동물 - 적색으로 채워진 원, INO-4800 X1 - 녹색으로 채워진 원 및 INO-4800 X2 - 청색으로 채워진 원.

도 16은 I상 연구 흐름도를 도시한다.

도 17a, **도 17b**, **도 17c** 및 **도 17d**는 I상 임상 연구의 체액성 항체 반응을 도시한다. 1.0mg 용량 그룹 및 2.0mg 용량 그룹에서의 체액성 반응은 살아있는 바이러스를 중화하는 능력($n=18$, 1.0mg; $n=19$, 2.0mg)(**도 17a**); RBD 영역에 대한 결합(**도 17b**); 및 전체 스파이크 단백질(S1 및 S2)에 대한 결합(**도 17c**)에 대해 평가되었다. 종말점 역가는 기준선보다 위의 OD 3.0 SD를 나타내는 역가로서 계산되었으며, 기준선에서의 역가는 1로 설정되었다. **도 17d**에서, 1.0mg 용량 그룹 및 2.0mg 용량 그룹에서의 체액성 반응은 전체 스파이크 단백질(S1 및 S2)에 결합하는 능력에 대해 평가되었다($n=19$, 1.0mg; $n=19$, 2.0mg). 종말점 역가는 기준선보다 위의 OD 3.0 SD를 나타내는 역가로서 계산되었으며, 기준선에서의 역가는 1로 설정되었다. 살아있는 바이러스 중화에 대한 반응은 PRNT IC50이 10 이상이었다. 모든 그래프에서, 수평선은 중앙값을 나타내고, 막대는 사분위수 범위를 나타낸다.

도 18a 내지 **도 18g**는 I상 임상 연구 세포성 면역 반응 분석 결과를 도시한다. 백신이 접종된 개체로부터 단리된 PBMC는 시험관내에서 SARS-CoV-2 스파이크 항원으로 자극되었다. IFN-감마를 분비할 수 있는 세포의 수는 1.0mg 용량 그룹 및 2.0mg 용량 그룹에 대한 표준 ELISpot 검정에서 측정되었다(**도 18a**). 수평선은 중앙값을 나타내고, 막대는 사분위수 범위를 나타낸다. **도 18b**에 도시된 바와 같이, 스파이크 항원 전체에 걸쳐 있는 웹타이드는 풀로 나뉘지고, 항원의 특정 영역에 대해 매핑된 풀과 함께 ELISpot에서 개별적으로 테스트되었다. 3마리의 대상체가 풀 반응의 다양성 및 대상체 전반에 걸친 관련 규모를 예시하는 것으로 나타나 있다. 파이 차트(Pie chart)는 2.0mg 용량 그룹 전체의 다양성을 나타낸다. **도 18c**에 도시된 바와 같이, SARS-CoV-2 스파이크 특이적 사이토카인 생성은 유세포 분석을 통해 CD4+ 및 CD8+ T 세포로부터 측정되었다. 막대는 평균 반응을 나타낸다. 사이토카인 생성은 CCR7 및 CD45RA를 사용하여 **도 18d**에서 중심 기억(Central Memory: CM), 효과기 기억(Effecter Memory: EM) 또는 효과기(E) 분화 상태로 추가적으로 발생되었으며, 데이터는 전체 사이토카인 반응의 몇 퍼센트가 어떤 분화된 그룹으로부터 기원하는지 전달한다. 파이 차트는 각 용량 코호트에 대한 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 다작용성을 나타내며, **도 18e**에 제공되어 있다. 각 용량 코호트에 대한 CD4+ T 세포에 의한 IL-4 생성은 **도 18f**에 도시되어 있다. 수평선은 평균 반응을 나타낸다. 그래프는 평가 가능한 모든 대상체를 나타낸다. 통계적 분석은 모든 쌍을 이루는 데이터세트에 대해 수행되었다. 유의한 것은 도면 내에 표기되어 있으며, 도면에 표기가 없는 것은 통계적 유의성이 부족함을 나타낸다. **도 18g**는 2.0mg 용량 그룹의 각 대상체의 히트 맵 및 SARS-CoV-2 스파이크 항원을 포함하는 각 풀에 대한 ELISpot 반응의 백분율을 제공한다.

도 19는 경증(1등급), 중등도(2등급), 중증(3등급) 및 생명을 위협하는(4등급) 중증도의 I상 관련 전신 및 국부 이상 반응(이상 반응)을 도시한다.

도 20은 체액성 면역 반응에 대한 보충 데이터를 제공한다. ELISpot 검정에 의해 테스트된 3개의 회복기 샘플(3

명 모두 증상이 있지만 입원하지 않음)은 8주차에 2.0mg 용량 그룹보다 중앙값 33으로 더 낮은 T 세포 반응을 보였다.

도 21은 보충 효소-결합 면역점(ELISpot) 데이터를 제공한다.

도 22a 내지 **도 22f**는 INO-4800으로 백신이 접종된 레서스 마카크에서의 체액성 및 세포 반응을 도시한다. 연구 개요(**도 22a**). 1차 또는 2회 투여의 INO-4800을 투여받았거나 또는 백신이 접종되지 않은(대조군) 레서스 마카크로부터의 혈청에서 측정된 스파이크-특이적 IgG(**도 22b**), RBD(**도 22c**) 및 살아있는 바이러스-중화 항체(**도 22d**). 선은 기하 평균을 나타낸다. INO-4800으로 백신이 접종된 레서스 마카크에서의 세포성 면역 반응. PBMC로부터의 SARS-CoV-2 스파이크-특이적 인터페론 감마(IFN) 분비는 시험투여 전(**도 22e**) 및 시험투여 후(**도 22f**) 1차 또는 2회 투여의 INO-4800을 투여받았거나 또는 백신이 접종되지 않은(대조군) 레서스 마카크에서 측정되었다. PBMC는 스파이크 단백질에 걸쳐 있는 5개의 개별 웹타이드 풀 및 합산된 각 풀에 대한 반응으로 측정된 SFU 빙도로 자극되었다. 선은 평균을 나타낸다.

도 23a 내지 **도 23c**는 연구 기간 동안 동물의 체중, 온도 및 혼모글로빈의 변화를 도시한다. 동물은 1회(INO-4800X1) 또는 2회(INO-4800X2) 용량의 INO-4800을 투여받았거나 또는 백신이 접종되지 않았다(대조군). 개별 동물의 체중(**도 23a**), 온도(**도 23b**) 및 혼모글로빈 수(**도 23c**)의 백분율 변화는 시험투여 전후의 시점에서 기록되고 플로팅되었다. 선은 각 그룹에 대해 평균(**도 23a**) 및 기하 평균(**도 23b** 및 **도 23c**) 값이 나타낸다.

도 24a 내지 **도 24f**는 SARS-CoV-2의 시험투여 후 RT-qPCR에 의해 검출된 상기도 바이러스 부하를 도시한다. 동물은 1회(INO-4800X1) 또는 2회(INO-4800X2) 용량의 INO-4800을 투여받았거나 또는 백신이 접종되지 않았다(대조군). 바이러스 부하는 인후 면봉(**도 24a** 내지 **도 24c**) 및 비강 면봉(**도 24d** 내지 **도 24f**)에서 각 동물에 대한 로그10 cDNA 카피/ μ l로 플로팅되었다. (**도 24a** 및 **도 24d**) 선은 95% CI로 그룹 기하 평균을 나타낸다. 각 실험 그룹에 대한 인후 면봉(**도 24b**) 및 비강 면봉(**도 24e**)에 대한 바이러스 부하의 곡선 아래 면적(area under curve: AUC). 인후 면봉(**도 24c**) 및 비강 면봉(**도 24f**)에 대한 시험투여 기간 동안 각 동물에서 측정된 피크 바이러스 부하. LLOQ(정량 하한(lower limit of quantification), 3.80 로그 카피/ μ l) 및 LLOD(검출 하한(lower limit of detection), 3.47 로그 카피/ μ l). LLOQ 미만으로 검출된 양성 샘플에는 3.80 로그 카피/ μ l의 값이 할당되었다. *Mann-Whitney t 검정에서 $p \leq 0.05$.

도 25a 내지 **도 25f**는 SARS-CoV-2로 시험투여 후 RT-qPCR에 의해 검출된 상기도 서브게놈 바이러스 부하를 도시한다. 동물은 1회(INO-4800X1) 또는 2회(INO-4800X2) 용량의 INO-4800을 투여받았거나 또는 백신이 접종되지 않았다(대조군). 바이러스 부하는 인후 면봉(**도 25a** 내지 **도 25c**) 및 비강 면봉(**도 25d** 내지 **도 25f**)에서 각 동물에 대해 로그10 cDNA 카피/ μ l로 플로팅되었다. (**도 25a** 및 **도 25d**) 선은 95% CI로 그룹 기하 평균을 나타낸다. 각 실험 그룹에 대한 인후 면봉(**도 25b**) 및 비강 면봉(**도 25e**)에 대한 바이러스 부하의 곡선 아래 면적(AUC). 인후 면봉(**도 25c**) 및 비강 면봉(**도 25f**)에 대해 시험투여 기간 동안 각 동물에서 측정된 피크 바이러스 부하. LLOQ(4.11 로그 카피/ μ l) 및 LLOD(3.06 로그 카피/ μ l). LLOQ 미만으로 검출된 양성 샘플에는 3.81 로그 카피/ μ l의 값이 할당되었다.

도 26a 내지 **도 26d**는 SARS-CoV-2로 시험투여 후 RT-qPCR에 의해 검출된 하기도 바이러스 부하를 도시한다. 동물은 1회(INO-4800X1) 또는 2회(INO-4800X1) 용량의 INO-4800을 투여받았거나 또는 백신이 접종되지 않았다(대조군). SARS-CoV-2 계놈 및 서브계놈 바이러스 부하는 부검(시험투여 후 제6일 내지 제8일)에서 수집된 기관지 폐포 세척액(BAL(**도 26a** 및 **도 26b**)) 및 폐 조직(**도 26c** 및 **도 26d**) 샘플에서 개별 동물에 대해 측정되었다. 막대는 그룹 중앙값을 나타낸다. 검정 LLOQ 및 LLOD는 방법 부문에 제공되어 있다.

도 27은 시험투여 후 동물 조직에서의 바이러스 RNA를 도시한다. 동물은 1회(INO-4800X1) 또는 2회(INO-4800X2) 용량의 INO-4800을 투여받았거나 또는 백신이 접종되지 않았다(대조군). SARS-CoV-2 바이러스 부하는 부검(6 내지 8 DPC) 시 수집된 조직 샘플에서 개별 동물에 대해 측정되었다. 막대는 95% CI로 그룹 중앙값을 나타낸다. 4.76 로그 카피/ μ l의 정량 한계(limit of quantification: LoQ) 미만으로 검출된 양성 조직 샘플에는 5 카피/ μ l의 값이 할당되었으며 이는 4.46 로그 카피/g에 해당하는 반면, 검출되지 않은 샘플은 4.76 로그 카피/g에 해당하는 검정의 검출 하한(LoD)에 해당하는 2.3 카피/ μ l 미만의 값이 할당되었다.

도 28은 1회 투여(상부), 2회 투여(중간)으로 백신이 접종되거나 또는 백신이 접종되지 않은(하부) 동물에서의 대표적인 조직병리학(H&E 염색) 및 SARS-CoV-2 바이러스 RNA의 존재(ISH RNAScope 염색)를 보여준다. 1회 투여로 백신이 접종된 동물은 다병소성(multifocal)의 최소 내지 경증의 폐포 및 간질성 폐렴(*)을 보였으며, 동물 10A에서 중증도가 더 높았다. 그룹 1의 나머지 동물은 최소/경증의 염증성 침윤(*)을 보였다. 경미한 혈관주위

커핑(cuffing)이 또한 관찰되었고(화살촉), 바이러스 RNA는 병변 내에서 ISH에 의해 나타나 있으며(화살표), 동물 10A에서 풍부하며 동물 30A, 24A, 21A 및 38A에서는 소량이었다(화살표). 2회 투여로 백신이 접종된 동물은 최소 혈관주위 커핑(화살촉)과 함께 다병소성의 최소 내지 경증의 폐포 및 간질성 폐렴(*)을 보였다. 소량의 바이러스 RNA가 동물 9A, 45A, 33A 및 13A(화살표)로부터의 병변 내에서 ISH에 의해 관찰되었다. 백신이 접종되지 않은 동물은 중등도의 다병소성 폐포 및 간질성 폐렴(*)을 보였으며, 모든 동물로부터의 병변 내에 풍부한 바이러스 RNA가 존재하였다(화살표).

도 29a 내지 **도 29g**는 SARS-CoV-2의 시험투여 후 조직병리학 및 CT 스캔에 의해 측정된 폐 질환 부담을 도시한다. 바이러스 RNA에 대해 ISH RNAscope 표지된 절편에서 양성으로 염색된 영역의 총 조직병리학 점수(**도 29a**) 및 이미지 분석(**도 29b**). **도 29c**는 개별 동물에 대한 각 매개변수에 대한 조직병리학 스코어링의 히트 맵 예시를 제공한다. 총 CT 점수(**도 29e**). 개별 동물에 대한 CT 방사선학 점수(**도 29d** 내지 **도 29g**). **도 29d**: 영향을 받은 폐의 백분율로서 이상의 정도. **도 29e**: 결절, 고립성 폐결절(ground glass opacity) 및 폐경화(consolidation)의 존재를 기반으로 한 스코어링을 갖는 COVID 질환 패턴. **도 29f**: 구역 분류(폐는 12개의 구역으로 나뉘며, 이상을 보이는 각 구역은 1점으로 귀속됨). **도 29g**: 총 누적 CT 점수(패턴 + 구역 점수). 그래프상의 선은 그룹의 중앙값을 나타낸다. *Mann-Whitney t 검정에서 $p \leq 0.05$.

도 30은 CT 스캔으로부터 구축된 이미지에서 확인된 폐 이상의 대표적인 예를 도시한다. 이미지는 백신 접종을 받지 않은 동물(대조군): 8A [A], 25A [B], 28A [C], 14A [D], 50A [E]; 단일 투여의 INO-4800 백신이 접종된 동물: 10A [F], 21A [G], 38A [H]; 2회 투여의 INO-4800 백신이 접종된 동물: 21A [I], 33A [J]을 나타낸다. 화살표는 고립성 폐결절의 영역 및 폐경화 영역을 나타낸다. 비정상적인 특징이 없는 마카크로부터의 이미지는 도시하지 않았다.

도 31a 내지 **도 31f**는 SARS-CoV-2 및 SARS 항원으로의 자극 후 IFN- γ + 마우스 비장세포의 ELISpot 이미지를 도시한다. 마우스는 제0일에 면역화되었으며, 비장세포는 표시된 시점에서 수확되었다. 면역화된 동물의 비장의 IFN γ -분비 세포는 ELISpot 검정을 통해 계수되었다. 대표적인 이미지는 면역화 후 제4일, 제7일 및 제10일에 비장세포 집단에서의 SARS-CoV-2 특이적(**도 31a** 내지 **도 31c**) 및 SARS-CoV-특이적(**도 31d** 내지 **도 31f**) IFN γ 반점 형성 단위를 보여준다. 이미지는 면역점 CTL 판독기에 의해 캡처되었다.

도 32a 및 **도 32b**는 SARS-CoV-2 S 단백질 자극 시 IFN- γ 를 생성하는 T 세포 집단의 유세포 분석을 도시한다. pVAX 또는 INO-4800 처리 후 제14일에 BALB/c 및 C57BL/6 마우스로부터 수확된 비장세포는 단일 세포 현탁액으로 만들었다. 세포는 SARS-CoV-2 중첩 웹타이드 풀로 6시간 동안 자극되었다. **도 32a**: CD4+ 및 CD8+ T 세포 게이팅 전략; 단일 세포(singlet)(i)가 게이팅된 다음, 럼프구(ii)에 이어 살아있는 CD45+ 세포(iii)가 게이팅되었다. 다음으로 CD3+ 세포(iv)가 게이팅되고, 해당 집단으로부터 CD4+(v) 및 CD8+(vi) T-세포가 게이팅되었다. IFN γ + 세포가 CD4+(vii) 및 CD8+(viii) T-세포 집단 각각으로부터 게이팅되었다. **도 32b**: IFN γ 를 생산하는 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 백분율이 도시되어 있다. 막대는 평균+SD를 나타낸다. 4마리의 BALB/c 및 4마리의 C57BL/6 마우스가 이 연구에 사용되었다. * $p < 0.05$, Mann Whitney 검정.

도 33a 내지 **도 33h**는 레서스 마카크에서의 체액성 및 세포성 면역 반응을 도시한다. **도 33a**: 백신 접종 양생법 및 혈액 수집 시점을 보여주는 연구 개요. **도 33b**: SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 개략도. **도 33c**: 0주, 2주, 6주, 12주 및 15주차에 수집된 연속 희석된 NHP 혈청에서 IgG의 SARS-CoV-2 S1+S2 ECD, S1, RBD 및 S2 단백질 항원 결합. 데이터는 각 개별 NHP에 대한 평균 종말점 역가를 나타낸다. (d 및 e) SARS-CoV-2의 D614(**도 33d**) 및 G614(**도 33e**) 변이체에 대한 SARS-CoV-2 특이적 중화 항체의 존재를 보여주는 NHP 혈청을 사용한 슈도중화(pseudoneutralization) 검정. **도 33f** 및 **도 33g**: INO-4800 백신이 접종된 NHP로부터 6주차에 수집된 혈청은 ACE2 결합을 저해하였다. **도 33f**: 플레이트-기반 ACE2 경쟁 검정. **도 33g**: 연속 희석된 NHP 혈청에서 ACE2 결합의 저해를 보여주는 흐름-기반 ACE2 저해 검정. **도 33h**: T 세포 반응은 0주, 2주, 6주 및 15주차에 수확되고 SARS-CoV-2 스파이크 단백질에 걸쳐 있는 중첩 웹타이드 풀로 20시간 동안 자극된 PBMC에서 IFN- γ ELISpot에 의해 측정되었다. 막대는 평균+SD를 나타낸다.

도 34는 SARS-CoV 및 MERS-CoV 스파이크 단백질에 대한 혈청 IgG 교차-반응성을 도시한다. IgG 결합은 INO-4800 백신이 접종된 레서스 마카크로부터의 혈청에서 SARS-CoV S1 및 MERS-CoV S1 단백질 항원에 대해 측정되었다.

도 35는 SARS-CoV-2 S 단백질 항원에 반응성인 기관지폐포 세척액(BAL) IgG를 도시한다. 백신이 접종된 동물로부터 수집된 BAL 샘플은 전장 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 및 RBD 도메인에 대한 SARS-CoV-2 반응성 IgG 결합에 대해 평가되었다.

도 36a 및 도 36b는 SARS-CoV 및 MERS-CoV 스파이크 단백질에 대한 세포 반응 교차-반응성을 보여주는 예시적인 실험 데이터를 도시한다. PBMC 반응은 SARS-CoV-1 스파이크 단백질(도 36a) 및 MERS-CoV 스파이크 단백질(도 36b)에 걸쳐 있는 중첩 웹타이드 풀로 자극 후 IFN γ ELISpot에 의해 분석되었다. 막대는 평균+SD를 나타낸다.

도 37a 내지 **도 37c**는 바이러스 시험투여 후 체액성 면역 반응의 회상(recall)을 보여주는 예시적인 실험을 도시한다. **도 37a**: 연구 개요. **도 37b**: IgG 결합 ELISA. 시험투여 전, 시험투여 동안 및 시험투여 후에 수집된 회색된 NHP 혈청에서 IgG의 SARS-CoV-2 S1+S2 및 SARS-CoV-2 RBD 단백질 항원 결합. **도 37c**: INO-4800 백신이 접종된 동물(상부 패널) 및 미경험 동물(하부 패널)에서 바이러스 시험투여 전후에 SARS-CoV-2의 D614 및 G614 변이체에 대한 SARS-CoV-2 특이적 중화 항체의 존재를 보여주는 NHP 혈청을 사용한 슈도-중화 검정.

도 38은 바이러스 시험투여 후 세포성 면역 반응의 회상을 보여주는 예시적인 실험을 도시한다. T 세포 반응은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질에 걸쳐 있는 중첩 웹타이드 풀로 자극된 PBMC에서 IFN γ ELISpot에 의해 분석되었다. 막대는 평균+SD를 나타낸다. T 세포 반응은 SARS-CoV-2 바이러스를 시험투여하기 전후에 단리된 PBMC에서 IFN γ ELISpot에 의해 분석되었다. 왼쪽 패널은 미경험 동물, 오른쪽 패널은 INO-4800 백신이 접종된 동물.

도 39는 개별 레서스 마카크에서 바이러스 시험투여 후 세포성 면역 반응의 회상을 보여주는 예시적인 실험을 도시한다. 세포 반응은 바이러스 시험투여 전후에 SARS-CoV-2 스파이크 단백질에 걸쳐 있는 중첩 웹타이드 풀로 자극된 PBMC에서 IFN γ ELISpot에 의해 분석되었다. 오른쪽 패널은 미경험 동물, 왼쪽 패널은 INO-4800 백신이 접종된 동물.

도 40a 내지 **도 40f**는 바이러스 시험투여 후 BAL액 및 비강 면봉에서의 바이러스 부하를 도시한다. 17주차에 미경험 레서스 마카크 및 INO-4800으로 면역화된(그룹당 5마리) 레서스 마카크에 1.1×10^4 PFU SARS-CoV-2(US-WA1 단리물)를 비강내 및 기관내 투여에 의해 시험투여하였다. **도 40a** 및 **도 40d**: BAL의 로그 sgmRNA 카피/ml(도 40a) 및 NS 카피/면봉(도 40d)은 미경험 동물(왼쪽 패널) 및 INO-4800 백신이 접종된(오른쪽 패널) 동물에서 시험투여 후 여러 시점에서 측정되었다. **도 40b** 및 **도 40e**: 시험투여 후 BAL(도 40b) 및 NS(도 40e)에서 피크 바이러스 부하(1일 내지 7일 사이). **도 40c** 및 **도 40f**: 시험투여 후 제7일에 BAL 및 NS에서의 바이러스 RNA. 청색 및 적색 선은 중간 바이러스 부하를 반영한다. Mann-Whitney 검정 P 값이 제공된다(도 40b 및 도 40c).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021]

정의

[0022]

달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 상충되는 경우, 정의를 포함하는 본 문서가 우선할 것이다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 등가인 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 테스트에서 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질이 아래에 기재되어 있다. 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특히 출원, 특히 및 기타 참고 문헌은 그 전문이 참조에 의해 원용된다. 본 명세서에 개시된 물질, 방법 및 예는 예시일 뿐이며 제한하려는 의도가 아니다.

[0023]

용어 "포함하는(comprising)"은 용어 "~로 본질적으로 이루어진(consisting essentially of)" 및 "~로 이루어진(consisting of)"에 포함되는 예를 포함하도록 의도되고; 유사하게는, 용어 "~로 본질적으로 이루어진"은 용어 "~로 이루어진"에 포함되는 예를 포함하도록 의도된다. 본 개시내용은 또한 명시적으로 제시되는지 여부에 관계없이 본 명세서에 제시된 실시형태 또는 요소를 "포함하는", 이로 "이루어진" 및 이로 "본질적으로 이루어진" 다른 실시형태를 상정한다.

[0024]

명확성을 위해, 별도의 실시형태의 맥락에서 본 명세서에 개시된 물질 및 방법의 소정의 특징은 또한 단일 실시 형태에서 조합하여 제공될 수도 있음을 이해하여야 한다. 반대로, 간결함을 위해, 단일 실시형태의 맥락에서 기재된 개시된 물질 및 방법의 다양한 특징은 또한 개별적으로 또는 임의의 하위조합으로 제공될 수도 있다.

[0025]

"단수 형태"는 문맥이 달리 명백하게 지시하지 않는 한 복수 참조를 포함한다.

[0026]

수치 범위, 컷오프 또는 특정 값과 관련하여 사용될 때 용어 "약"은 인용된 값이 열거된 값으로부터 최대 10%까지 변할 수 있음을 나타내는 데 사용된다. 따라서, 용어 "약"은 명시된 값으로부터 ±10% 이하의 변동, ±5% 이하의 변동, ±1% 이하의 변동, ±0.5% 이하의 변동 또는 ±0.1% 이하의 변동을 포함하는 데 사용된다. 값이 "약"을 사용하여 근사치로 표현될 때, 특정 값이 또 다른 실시형태를 형성함을 이해할 것이다. 특정 수치 값에 대한 언급은 문맥이 달리 명시하지 않는 한 적어도 해당 특정 값을 포함한다.

[0027]

본 명세서에서 사용되는 "보조제"는 항원의 면역원성을 향상시키기 위해 본 명세서에 개시된 백신에 첨가되는

임의의 문자를 의미한다.

- [0028] 본 명세서에서 사용되는 "항체"는 바와 같이 클래스 IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE의 항체 또는 단편, Fab, F(ab')₂, Fd 및 단일쇄 항체, 다이어바디, 이중특이성 항체, 이중작용성 항체 및 이들의 파생물을 포함하는 이들의 단편 또는 파생물을 의미한다. 항체는 포유동물의 혈청 샘플로부터 단리된 항체, 다중클론 항체, 친화성 정제된 항체 또는 목적하는 에피토프 또는 이로부터 유래되는 서열에 충분한 결합 특이성을 나타내는 이들의 혼합물일 수 있다.
- [0029] 용어 (승인된 참조 의약품(reference product)/생물학적 약물, 즉, 참조 목록에 있는 약물의) "바이오시밀러"는 (a) 생물학적 제제가 임상적으로 불활성인 성분의 사소한 차이에도 불구하고 참조 의약품과 매우 유사함을 입증하는 분석 연구; (b) 동물 연구(독성의 평가를 포함); 및/또는 (c) 하나 이상의 적절한 조건에서 안전성, 순도 및 효능을 입증하기에 충분한 임상 연구 또는 참조 의약품이 허가되고 사용되도록 의도되었으며 바이오시밀러에 대한 허가가 필요한 연구(면역원성 및 약동학 또는 약력학의 평가를 포함)로부터 유래된 데이터를 기반으로 바이오시밀러와 참조 의약품 사이에 안전성, 순도 및 효능(potency)의 측면에서 임상적으로 의미 있는 차이가 없고 임상적으로 불활성인 성분의 사소한 차이에도 불구하고 참조 의약품과 매우 유사한 생물학적 제제를 지칭한다. 바이오시밀러는 처방 의료 전문가의 개입 없이 약국에서 참조 의약품을 대체할 수 있는 상호교환 가능한 제품일 수 있다. "상호교환 가능한"이라는 추가적인 표준을 충족하기 위하여, 바이오시밀러는 임의의 주어진 환자에서 참조 의약품과 동일한 임상 결과를 얻을 것으로 예상되며, 바이오시밀러가 개체에게 1회 이상 투여될 경우, 바이오시밀러와 참조 의약품을 교체 또는 전환하여 사용하는 것에 의한 안전성 또는 효능 감소의 측면에서의 위험이 이러한 교체 또는 전환 없이 참조 의약품을 사용하는 위험보다 크지 않아야 한다. 바이오시밀러는 참조 의약품에 대해 메커니즘이 알려진 범위 내에서 제안된 사용 조건에 대해 동일한 작용 메커니즘을 이용한다. 바이오시밀러에 대해 제안된 라벨에서 규정, 권장 또는 제안된 사용 조건 또는 조건들은 참조 의약품에 대해 이전에 승인되었다. 바이오시밀러의 투여 경로, 투여 형태 및/또는 강도(strength)는 참조 의약품과 동일하며, 바이오시밀러는 바이오시밀러가 안전성, 순도 및 효능을 계속 유지하도록 보장하는 설계된 표준을 충족하는 시설에서 제조, 가공, 포장 또는 보관된다. 바이오시밀러는 바이오시밀러 성능을 변경할 것으로 예상되지 않는 N-말단 또는 C-말단 절단과 같은 참조 의약품과 비교할 때 아미노산 서열에 사소한 변형을 포함할 수 있다.
- [0030] 본 명세서에서 사용되는 "코딩 서열" 또는 "암호화 핵산"은 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산(RNA 또는 DNA 분자)을 의미한다. 코딩 서열은 핵산이 투여되는 개체 또는 포유동물의 세포에서 발현을 지시할 수 있는 프로모터 및 폴리아데닐화 신호를 포함하는 조절 요소에 작동 가능하게 연결된 개시 및 종결 신호를 추가로 포함할 수 있다.
- [0031] 본 명세서에서 사용되는 "상보체(Complement)" 또는 "상보성(complementary)"은 핵산 분자의 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유사체 간의 Watson-Crick(예를 들어, A-T/U 및 C-G) 또는 Hoogsteen 염기 페어링을 의미한다.
- [0032] 본 명세서에서 사용되는 "컨센서스" 또는 "컨센서스 서열"은 특정 항원의 여러 하위유형의 정렬 분석에 기초하여 구성된 합성 핵산 서열 또는 상응하는 폴리펩타이드 서열을 의미할 수 있다. 서열은 특정 항원의 여러 하위유형, 혈청형 또는 균주에 대한 광범위한 면역을 유도하는 데 사용될 수 있다. 융합 단백질과 같은 합성 항원은 컨센서스 서열(또는 컨센서스 항원)을 생성하도록 조작될 수 있다.
- [0033] 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되는 "전기천공법(Electroporation)", "전기-투과화(electro-permeabilization)" 또는 "동전기 향상(electro-kinetic enhancement)"("EP")은 생체막에서 미세한 경로(기공)를 유도하기 위한 막관통 전기장 펄스의 사용을 의미하며; 이들의 존재는 플라스미드, 올리고뉴클레오타이드, siRNA, 약물, 이온 및 물과 같은 생체분자가 세포막의 한 쪽에서 다른 쪽으로 통과할 수 있게 한다.
- [0034] 본 명세서에서 사용되는 "단편"은 바와 같이 포유동물에서 면역 반응을 유도할 수 있는 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열 또는 이의 일부를 의미한다. 단편은 아래에 제시된 단백질 단편을 암호화하는 다양한 뉴클레오타이드 서열 중 적어도 하나로부터 선택되는 DNA 단편일 수 있다.
- [0035] 폴리펩타이드 서열과 관련하여 "단편" 또는 "면역원성 단편"은 전장 야생형 균주 SARS-CoV-2 항원과 교차 반응하는 포유동물에서 면역 반응을 유도할 수 있는 폴리펩타이드를 의미한다. 컨센서스 단백질의 단편은 컨센서스 단백질의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도

80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 컨센서스 단백질의 단편은 컨센서스 단백질의 적어도 20개 이상의 아미노산, 적어도 30개 이상의 아미노산, 적어도 40개 이상의 아미노산, 적어도 50개 이상의 아미노산, 적어도 60개 이상의 아미노산, 적어도 70개 이상의 아미노산, 적어도 80개 이상의 아미노산, 적어도 90개 이상의 아미노산, 적어도 100개 이상의 아미노산, 적어도 110개 이상의 아미노산, 적어도 120개 이상의 아미노산, 적어도 130개 이상의 아미노산, 적어도 140개 이상의 아미노산, 적어도 150개 이상의 아미노산, 적어도 160개 이상의 아미노산, 적어도 170개 이상의 아미노산, 적어도 180개 이상의 아미노산, 적어도 190개 이상의 아미노산, 적어도 200개 이상의 아미노산, 적어도 210개 이상의 아미노산, 적어도 220개 이상의 아미노산, 적어도 230개 이상의 아미노산 또는 적어도 240개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0036] 본 명세서에서 사용되는 용어 "유전자 작제물"은 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 DNA 또는 RNA 분자를 지칭한다. 코딩 서열은 핵산 분자가 투여되는 개체의 세포에서 발현을 지시할 수 있는 프로모터 및 폴리아데닐화 신호를 포함하는 조절 요소에 작동 가능하게 연결된 개시 및 종결 신호를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "발현 가능한 형태"는 개체의 세포에 존재할 때 코딩 서열이 발현될 수 있도록 단백질을 암호화하는 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 필수 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 지칭한다.

[0037] 2개 이상의 핵산 또는 폴리펩타이드 서열의 맥락에서 본 명세서에서 사용되는 "동일한" 또는 "동일성" 서열이 지정된 영역에 대해 동일한 지정된 백분율의 잔기를 가짐을 의미한다. 백분율은 두 서열을 최적으로 정렬하고, 지정된 영역에 대해 두 서열을 비교하고, 두 서열에서 동일한 잔기가 발생하는 위치의 수를 결정하여 일치하는 위치의 수를 산출하고, 일치하는 위치의 수를 지정된 영역에서 총 위치의 수로 나누고, 결과에 100을 곱함으로써 서열 동일성의 백분율을 산출할 수 있다. 두 서열의 길이가 상이하거나 또는 정렬이 하나 이상의 엇갈린 말단을 생성하고, 지정된 비교 영역이 단일 서열만을 포함하는 경우, 단일 서열의 잔기는 계산의 분자가 아닌 분모에 포함된다. DNA와 RNA를 비교할 때, 티민(T)과 우라실(U)은 동등한 것으로 간주될 수 있다. 동일성은 수동으로 또는 BLAST 또는 BLAST 2.0과 같은 컴퓨터 서열 알고리즘을 사용하여 수행될 수 있다.

[0038] 본 명세서에서 사용되는 "면역 반응"은 항원의 도입에 반응하여 숙주의 면역계, 예를 들어, 포유동물의 면역계의 활성화를 의미한다. 면역 반응은 세포 또는 체액성 반응 또는 둘 다의 형태일 수 있다.

[0039] 본 명세서에서 사용되는 "핵산" 또는 "올리고뉴클레오타이드" 또는 "폴리뉴클레오타이드" 또는 "핵산 분자"는 함께 공유적으로 연결된 적어도 2개의 뉴클레오타이드를 의미한다. 단일 가닥의 기술은 또한 상보적 가닥의 서열을 정의한다. 따라서, 핵산은 또한 기술된 단일 가닥의 상보적 가닥도 포함한다. 핵산의 많은 변이체가 주어진 핵산과 동일한 목적으로 사용될 수 있다. 따라서, 핵산은 또한 실질적으로 동일한 핵산 및 이의 상보체를 포함한다. 단일 가닥은 염격한 혼성화 조건하에 표적 서열에 혼성화할 수 있는 프로브를 제공한다. 따라서, 핵산은 또한 염격한 혼성화 조건하에 혼성화하는 프로브를 포함한다.

[0040] 핵산은 단일 가닥 또는 이중-가닥일 수 있거나 또는 이중-가닥 및 단일-가닥 서열 모두의 부분을 포함할 수 있다. 핵산은 DNA, 게놈 및 cDNA 모두, RNA 또는 하이브리드일 수 있되, 핵산은 테옥시리보- 및 리보-뉴클레오타이드의 조합 및 우라실, 아데닌, 티민, 사이토신, 구아닌, 이노신, 잔틴 하이포잔틴, 아이소사이토신 및 아이소구아닌을 포함하는 염기의 조합을 포함할 수 있다. 핵산은 화학적 합성 방법 또는 제조합 방법에 의해 얻을 수 있다.

[0041] 본 명세서에서 사용되는 "작동 가능하게 연결된"은 유전자의 발현이 공간적으로 연결된 프로모터의 제어하에 있음을 의미한다. 프로모터는 이의 제어하에 유전자의 5'(상류) 또는 3'(하류)에 위치할 수 있다. 프로모터와 유전자 사이의 거리는 해당 프로모터와 그 프로모터가 유래된 유전자에서 이를 제어하는 유전자 사이의 거리와 거의 동일할 수 있다. 당업계에 공지되어 있는 바와 같이, 이러한 거리의 변화는 프로모터 기능의 손실 없이 수용될 수 있다.

[0042] 본 명세서에서 사용되는 "펩타이드", "단백질" 또는 "폴리펩타이드"는 아미노산의 연결된 서열을 의미할 수 있고, 천연, 합성 또는 천연 및 합성의 변형 또는 조합일 수 있다.

[0043] 본 명세서에서 사용되는 "프로모터"는 세포에서 핵산의 발현을 부여, 활성화 또는 향상시킬 수 있는 합성 또는 천연 유래 분자를 의미한다. 프로모터는 발현을 추가로 향상시키고/시키거나 이의 공간적 발현 및/또는 시간적 발현을 변경하기 위해 하나 이상의 특정 전사 조절 서열을 포함할 수 있다. 프로모터는 또한 전사의 시작 부위로부터 수천 염기쌍만큼 위치할 수 있는 말단 인핸서 또는 리프레서 요소를 포함할 수 있다. 프로모터는 바이러스, 세균, 진균, 식물, 곤충 및 동물을 포함하는 공급원으로부터 유래될 수 있다. 프로모터는 발현이 일어나는 세포, 조직 또는 기관과 관련하여 또는 발현이 일어나는 발달 단계와 관련하여 또는 생리학적 스트레스,

병원체, 금속 이온 또는 유도제와 같은 외부 자극에 대한 반응으로 구성적으로 또는 차등적으로 유전자 성분의 발현을 조절할 수 있다. 프로모터의 대표적인 예는 박테리오파지 T7 프로모터, 박테리오파지 T3 프로모터, SP6 프로모터, lac 작동자-프로모터, tac 프로모터, SV40 후기 프로모터, SV40 초기 프로모터, RSV-LTR 프로모터 및 CMV IE 프로모터를 포함한다.

[0044] "신호 웨타이드" 및 "리더 서열"은 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되며, 본 명세서에 제시된 SARS-CoV-2 단백질의 아미노 말단에 연결될 수 있는 아미노산 서열을 지칭한다. 신호 웨타이드/리더 서열은 전형적으로 단백질의 국부화를 지시한다. 본 명세서에서 사용된 신호 웨타이드/리더 서열은 바람직하게는 단백질이 생산되는 세포로부터 단백질의 분비를 촉진한다. 신호 웨타이드/리더 서열은 종종 세포로부터 분비될 때 성숙 단백질로 지칭되는 나머지 단백질로부터 절단된다. 신호 웨타이드/리더 서열은 단백질의 N 말단에 연결된다.

[0045] 본 명세서에서 사용되는 "대상체"는 본 명세서에 기재된 면역원성 조성물 또는 백신으로 면역화되기를 원하거나 또는 이를 필요로 하는 포유동물을 의미할 수 있다. 포유동물 인간, 침팬지, 기니피그, 개, 고양이, 말, 소, 마우스, 토끼 또는 래트일 수 있다.

[0046] 본 명세서에서 사용되는 "실질적으로 동일한"은 제1 및 제2 아미노산 서열이 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 55개, 60개, 65개, 70개, 75개, 80개, 85개, 90개, 95개, 100개, 200개, 300개, 400개, 500개, 600개, 700개, 800개, 900개, 1000개, 1100개 이상의 아미노산의 영역에 대해 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%인 것을 의미할 수 있다. 실질적으로 동일한은 또한 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열이 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 55개, 60개, 65개, 70개, 75개, 80개, 85개, 90개, 95개, 100개, 200개, 300개, 400개, 500개, 600개, 700개, 800개, 900개, 1000개, 1100개 이상의 뉴클레오타이드에 대해 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%인 것을 의미할 수 있다.

[0047] 본 명세서에서 사용되는 "치료" 또는 "치료하는"은 질환을 예방, 억제, 억압 또는 완전히 제거하는 수단을 통해 질환으로부터 동물을 보호하는 것을 의미할 수 있다. 질환을 예방하는 것은 질환의 발병 이전에 동물에게 본 발명의 면역원성 조성물 또는 백신을 투여하는 것을 포함한다. 질환을 억제하는 것은 질환의 유도 후 그러나 임상적 출현 전에 동물에게 본 발명의 면역원성 조성물 또는 백신을 투여하는 것을 포함한다. 질환을 억압하는 것은 질환의 임상적 출현 후 동물에게 본 발명의 면역원성 조성물 또는 백신을 투여하는 것을 포함한다.

[0048] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 달리 언급되지 않는 한, 용어 "임상적으로 입증된"(독립적으로 사용되거나 또는 용어 "안전한" 및/또는 "효과적인"을 수정하기 위해 사용됨)은 임상 시험이 미국 식품의약국, EMA 또는 해당 국가 규제 기관의 승인 기준을 충족한 임상 시험에 의해 입증되었음을 의미한다. 예를 들어, 증거는 본 명세서에 제공된 실시예에 기재된 임상 시험(들)에 의해 제공될 수 있다.

[0049] SARS-CoV-2 항원(예를 들어, pGX9501 또는 INO-4800 또는 이의 바이오시밀러로 투여되는 SARS-CoV-2 스파이크 항원)을 사용한 용량, 투여 양생법, 치료 또는 방법과 관련이 있는 용어 "임상적으로 입증된 안전성"은 치료 표준 또는 또 다른 대조약(comparator)과 비교하여 허용 가능한 빈도 및/또는 허용 가능한 중증도의 치료-발생 이상 반응(AE 또는 TEAE로 지칭됨)을 갖는 유리한 위험:이익 비를 지칭한다. 이상 반응은 의약품을 투여받은 환자에서의 예기치 않은 의학적 발생이다. 안전성의 한 지표는 이상 반응에 대한 공통 독성 기준 CTCAE v4.03에 따라 등급이 매겨진 국립 암 연구소(NCI)의 이상 반응(AE) 발생률이다.

[0050] 용량, 투여 양생법, 치료 또는 방법의 맥락에서, 본 명세서에서 사용되는 용어 "임상적으로 입증된 효능" 및 "임상적으로 입증된 효과"는 특정 용량, 투여량 또는 치료 양생법의 효과를 지칭한다. 효능은 본 발명의 작용제에 반응하는 질환 경과의 변화에 기초하여 측정될 수 있다. 예를 들어, SARS-CoV-2 항원(예를 들어, pGX9501 또는 INO-4800 또는 이의 바이오시밀러로 투여되는 SARS-CoV-2 스파이크 항원)은 치료 중인 장애의 중증도를 반영하는 적어도 하나의 지표의 개선, 바람직하게는 지속적인 개선을 유도하기에 충분한 양 및 시간 동안 환자에게 투여된다. 치료의 양 및 시간이 충분한지 결정하기 위해 대상체의 질병, 질환 또는 병태의 정도를 반영하는 다양한 지표가 평가될 수 있다. 이러한 지표는, 예를 들어, 해당 장애의 질환 중증도, 증상 또는 정후의 임상적으로 인정되는 지표를 포함한다. 개선의 정도는 일반적으로 정후, 증상, 생검 또는 다른 테스트 결과에 기초하여 이러한 결정을 내릴 수 있으며 주어진 질환에 대해 개발된 삶의 질 설문지와 같이 대상체에게 시행되는 설문지를 사용할 수 있는 의사에 의해 결정된다. 예를 들어, SARS-CoV-2 항원(예를 들어, pGX9501 또는 INO-4800 또는

이들의 바이오시밀러로 투여되는 SARS-CoV-2 스파이크 항원)은 SARS-CoV-2 감염과 관련된 환자의 병태의 개선을 달성하기 위해 투여될 수 있다. 개선은 질환 활성도 지수의 개선, 임상 증상의 개선 또는 질환 활성도의 임의의 다른 측정에 의해 표시될 수 있다.

[0051] 핵산과 관련하여 본 명세서에서 사용되는 "변이체"는 (i) 참조 뉴클레오타이드 서열의 부분 또는 단편; (ii) 참조 뉴클레오타이드 서열의 상보체 또는 이의 일부; (iii) 참조 핵산 또는 이의 상보체와 실질적으로 동일한 핵산; 또는 (iv) 염격한 조건하에 참조 핵산, 이의 상보체, 또는 이와 실질적으로 동일한 서열에 혼성화하는 핵산을 의미한다.

[0052] 변이체는 아미노산의 삽입, 결실, 또는 보존적 치환에 의해 아미노산 서열이 다르지만, 적어도 하나의 생물학적 활성을 유지하는 웨타이드 또는 폴리웨타이드로 추가로 정의될 수 있다. "생물학적 활성"의 대표적인 예는 특정 항체에 의해 결합되거나 또는 면역 반응을 촉진하는 능력을 포함한다. 변이체는 또한 적어도 하나의 생물학적 활성을 유지하는 아미노산 서열을 갖는 참조 단백질과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 단백질을 의미 할 수 있다. 아미노산의 보존적 치환, 즉, 아미노산을 유사한 특성(예를 들어, 친수성, 하전된 영역의 정도 및 분포)의 아미노산으로 대체하는 것은 전형적으로 사소한 변화를 수반하는 것으로 당업계에서 인식된다. 이러한 사소한 변화는 부분적으로는 당업계에서 이해되는 바와 같이 아미노산의 소수성 지수를 고려함으로써 확인될 수 있다(Kyte et al., J. Mol. Biol. 157:105-132 (1982)). 아미노산의 소수성 지수는 소수성 및 전하를 고려하여 결정된다. 유사한 소수성 지수의 아미노산이 치환될 수 있으며 여전히 단백질 기능을 유지할 수 있다는 것이 당업계에 공지되어 있다. 일 양태에서, 소수성 지수가 ±2인 아미노산이 치환된다. 아미노산의 친수성은 또한 단백질이 생물학적 기능을 유지하도록 하는 치환을 밝히는 데 사용될 수 있다. 웨타이드의 맥락에서 아미노산의 친수성을 고려하면, 해당 웨타이드의 최대 국부 평균 친수성을 계산할 수 있으며, 이는 항원성 및 면역원성과 상관관계가 있는 것으로 보고된 유용한 척도이다. 유사한 친수성 값을 갖는 아미노산의 치환은 당업계에서 이해되는 바와 같이 생물학적 활성, 예를 들어 면역원성을 유지하는 웨타이드를 생성할 수 있다. 치환은 서로 ±2 이내의 친수성을 갖는 아미노산으로 수행될 수 있다. 아미노산의 소수성 지수 및 친수성 값은 모두 해당 아미노산의 특정 측쇄에 의해 영향을 받는다. 관찰과 일치하게, 생물학적 기능과 양립할 수 있는 아미노산 치환은 소수성, 친수성, 전하, 크기 및 다른 특성에 의해 밝혀진 바와 같이 아미노산, 특히 해당 아미노산의 측쇄의 상대적 유사성에 의존하는 것으로 이해된다.

[0053] 변이체는 전체 유전자 서열의 전장 또는 이의 단편에 대해 실질적으로 동일한 핵산 서열일 수 있다. 핵산 서열은 전장 유전자 서열 또는 이의 단편에 대해 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일할 수 있다. 변이체는 전장 아미노산 서열 또는 이의 단편에 대해 실질적으로 동일한 아미노산 서열일 수 있다. 아미노산 서열은 전장 아미노산 서열 또는 이의 단편에 대해 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일할 수 있다.

[0054] 본 명세서에서 사용되는 "벡터"는 복제 기점을 포함하는 핵산 서열을 의미한다. 벡터는 바이러스 벡터, 박테리 오파지, 세균 인공 염색체 또는 효모 인공 염색체일 수 있다. 벡터는 DNA 또는 RNA 벡터일 수 있다. 벡터는 자가-복제 염색체의 벡터일 수 있으며, 바람직하게는 DNA 플라스미드이다.

[0055] 본 명세서에서 수치 범위의 인용을 위해, 동일한 정밀도로 그 사이의 각각의 개재 숫자가 명시적으로 상정된다. 예를 들어, 6 내지 9의 범위의 경우, 숫자 7 및 8이 6 및 9에 추가로 상정되고, 6.0 내지 7.0의 범위의 경우, 숫자 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9 및 7.0이 명시적으로 상정된다.

핵산 분자, 항원 및 면역원성 조성물

[0056] SARS-CoV-2 항원, 이의 단편, 이의 변이체 또는 이들의 조합을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 백신과 같은 면역원성 조성물이 본 명세서에 제공된다. 또한, SARS-CoV-2 항원, 이의 단편, 이의 변이체 또는 이들의 조합을 포함하는 백신과 같은 면역원성 조성물이 본 명세서에 제공된다. 면역원성 조성물은 임의의 수의 SARS-CoV-2 균주를 방지하고 치료함으로써, SARS-CoV-2-기반 병리를 치료, 예방 및/또는 방지하는 데 사용될 수 있다. 면역원성 조성물은 면역원성 조성물이 투여된 대상체의 면역 반응을 유의하게 유도함으로써, SARS-CoV-2 감염을 방지하고 치료할 수 있다.

[0058] 면역원성 조성물은 DNA 백신, 웨타이드 백신 또는 조합 DNA 및 웨타이드 백신일 수 있다. DNA 백신은 SARS-CoV-2 항원을 암호화하는 핵산 분자를 포함할 수 있다. 핵산 분자는 DNA, RNA, cDNA, 이의 변이체, 이의 단편 또는 이들의 조합일 수 있다. 핵산 분자는 또한 웨타이드 결합에 의해 SARS-CoV-2 항원을 암호화하는 핵산 분자에 연

결된 링커, 리더 또는 태그 서열을 암호화하는 추가적인 서열을 포함할 수 있다. 웹타이드 백신은 SARS-CoV-2 항원성 웹타이드, SARS-CoV-2 항원성 단백질, 이의 변이체, 이의 단편 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 조합 DNA 및 웹타이드 백신은 SARS-CoV-2 항원 및 SARS-CoV-2 항원성 웹타이드 또는 단백질을 암호화하는 위에 기재된 핵산 분자를 포함할 수 있으며, 여기서 SARS-CoV-2 항원성 웹타이드 또는 단백질 및 암호화된 SARS-CoV-2 항원은 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0059] 개시된 면역원성 조성물은 면역원성 조성물이 투여된 대상체에서 SARS-CoV-2 항원을 표적으로 하는 체액성 및 세포성 면역 반응 모두를 유도할 수 있다. 개시된 면역원성 조성물은 SARS-CoV-2 스파이크 항원과 반응성인 중화 항체 및 면역글로불린 G(IgG) 항체를 유도할 수 있다. 면역원성 조성물은 또한 SARS-CoV-2 항원에 반응성이며 인터페론-감마(IFN- γ), 종양 괴사 인자 알파(TNF- α) 및 인터류킨-2(IL-2)를 생성하는 CD8+ 및 CD4+ T 세포 반응을 유도할 수 있다.

[0060] 면역원성 조성물은 면역원성 조성물이 투여된 대상체에서 체액성 면역 반응을 유도할 수 있다. 유도된 체액성 면역 반응은 SARS-CoV-2 항원에 특이적일 수 있다. 유도된 체액성 면역 반응은 SARS-CoV-2 항원과 반응성일 수 있다. 체액성 면역 반응은 백신이 투여된 대상체에서 약 1.5-배 내지 약 16-배, 약 2-배 내지 약 12-배 또는 약 3-배 내지 약 10-배까지 유도될 수 있다. 체액성 면역 반응은 백신이 투여된 대상체에서 적어도 약 1.5-배, 적어도 약 2.0-배, 적어도 약 2.5-배, 적어도 약 3.0-배, 적어도 약 3.5-배, 적어도 약 4.0-배, 적어도 약 4.5-배, 적어도 약 5.0-배, 적어도 약 5.5-배, 적어도 약 6.0-배, 적어도 약 6.5-배, 적어도 약 7.0-배, 적어도 약 7.5-배, 적어도 약 8.0-배, 적어도 약 8.5-배, 적어도 약 9.0-배, 적어도 약 9.5-배, 적어도 약 10.0-배, 적어도 약 10.5-배, 적어도 약 11.0-배, 적어도 약 11.5-배, 적어도 약 12.0-배, 적어도 약 12.5-배, 적어도 약 13.0-배, 적어도 약 13.5-배, 적어도 약 14.0-배, 적어도 약 14.5-배, 적어도 약 15.0-배, 적어도 약 15.5-배 또는 적어도 약 16.0-배까지 유도될 수 있다.

[0061] 면역원성 조성물에 의해 유도된 체액성 면역 반응은 면역원성 조성물이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 면역원성 조성물이 투여된 대상체와 관련된 중화 항체의 증가된 수준을 포함할 수 있다. 중화 항체는 SARS-CoV-2 항원에 특이적일 수 있다. 중화 항체는 SARS-CoV-2 항원과 반응성일 수 있다. 중화 항체는 면역원성 조성물이 투여된 대상체에서 SARS-CoV-2 감염 및 이의 관련 병리에 대한 보호 및/또는 치료를 제공할 수 있다.

[0062] 면역원성 조성물에 의해 유도된 체액성 면역 반응은 면역원성 조성물이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 면역원성 조성물이 투여된 대상체와 관련된 IgG 항체의 증가된 수준을 포함할 수 있다. 이러한 IgG 항체는 SARS-CoV-2 항원에 특이적일 수 있다. 이러한 IgG 항체는 SARS-CoV-2 항원과 반응성일 수 있다. 면역원성 조성물이 투여된 대상체와 관련된 IgG 항체의 수준은 면역원성 조성물이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 약 1.5-배 내지 약 16-배, 약 2-배 내지 약 12-배 또는 약 3-배 내지 약 10-배까지 증가될 수 있다. 면역원성 조성물이 투여된 대상체와 관련된 IgG 항체의 수준은 면역원성 조성물이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 적어도 약 1.5-배, 적어도 약 2.0-배, 적어도 약 2.5-배, 적어도 약 3.0-배, 적어도 약 3.5-배, 적어도 약 4.0-배, 적어도 약 4.5-배, 적어도 약 5.0-배, 적어도 약 5.5-배, 적어도 약 6.0-배, 적어도 약 6.5-배, 적어도 약 7.0-배, 적어도 약 7.5-배, 적어도 약 8.0-배, 적어도 약 8.5-배, 적어도 약 9.0-배, 적어도 약 9.5-배, 적어도 약 10.0-배, 적어도 약 10.5-배, 적어도 약 11.0-배, 적어도 약 11.5-배, 적어도 약 12.0-배, 적어도 약 12.5-배, 적어도 약 13.0-배, 적어도 약 13.5-배, 적어도 약 14.0-배, 적어도 약 14.5-배, 적어도 약 15.0-배, 적어도 약 15.5-배 또는 적어도 약 16.0-배까지 증가될 수 있다.

[0063] 면역원성 조성물은 면역원성 조성물이 투여된 대상체에서 세포성 면역 반응을 유도할 수 있다. 유도된 세포성 면역 반응은 SARS-CoV-2 항원에 특이적일 수 있다. 유도된 세포성 면역 반응은 SARS-CoV-2 항원에 반응성일 수 있다. 유도된 세포성 면역 반응은 CD8+ T 세포 반응을 유도하는 것을 포함할 수 있다. 유도된 CD8+ T 세포 반응은 SARS-CoV-2 항원과 반응성일 수 있다. 유도된 CD8+ T 세포 반응은 다작용성일 수 있다. 유도된 세포성 면역 반응은 CD8+ T 세포 반응을 유도하는 것을 포함할 수 있고, 여기서 CD8+ T 세포는 인터페론-감마(IFN- γ), 종양 괴사 인자 알파(TNF- α), 인터류킨-2(IL-2) 또는 IFN- γ 와 TNF- α 의 조합을 생성한다.

[0064] 유도된 세포성 면역 반응은 면역원성 조성물이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 면역원성 조성물이 투여된 대상체와 관련된 증가된 CD8+ T 세포 반응을 포함할 수 있다. 면역원성 조성물이 투여된 대상체와 관련된 CD8+ T 세포 반응은 면역원성 조성물이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 약 2-배 내지 약 30-배, 약 3-배 내지 약 25-배 또는 약 4-배 내지 약 20-배까지 증가될 수 있다. 면역원성 조성물이 투여된 대상체와 관련된 CD8+ T 세포 반응은 면역원성 조성물이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 적어도 약 1.5-배, 적어도 약 2.0-배, 적어도 약 3.0-배, 적어도 약 4.0-배, 적어도 약 5.0-배, 적어도 약 6.0-배, 적어도 약 6.5-배, 적어도 약 7.0-배, 적어도 약 7.5-배, 적어도 약 8.0-배, 적어도 약 8.5-배, 적어도 약 9.0-배, 적어도 약 9.5-배, 적어도 약 10.0-배, 적어도 약 10.5-배, 적어도 약 11.0-배, 적어도 약 11.5-배, 적어도 약 12.0-배, 적어도 약 12.5-배, 적어도 약 13.0-배, 적어도 약 13.5-배, 적어도 약 14.0-배, 적어도 약 14.5-배, 적어도 약 15.0-배, 적어도 약 15.5-배 또는 적어도 약 16.0-배까지 증가될 수 있다.

도 약 7.5-배, 적어도 약 8.0-배, 적어도 약 8.5-배, 적어도 약 9.0-배, 적어도 약 9.5-배, 적어도 약 10.0-배, 적어도 약 10.5-배, 적어도 약 11.0-배, 적어도 약 11.5-배, 적어도 약 12.0-배, 적어도 약 12.5-배, 적어도 약 13.0-배, 적어도 약 13.5-배, 적어도 약 14.0-배, 적어도 약 14.5-배, 적어도 약 15.0-배, 적어도 약 16.0-배, 적어도 약 17.0-배, 적어도 약 18.0-배, 적어도 약 19.0-배, 적어도 약 20.0-배, 적어도 약 21.0-배, 적어도 약 22.0-배, 적어도 약 23.0-배, 적어도 약 24.0-배, 적어도 약 25.0-배, 적어도 약 26.0-배, 적어도 약 27.0-배, 적어도 약 28.0-배, 적어도 약 29.0-배 또는 적어도 약 30.0-배까지 증가될 수 있다.

[0065] 유도된 세포성 면역 반응은 IFN- γ 를 생성하는 CD3+CD8+ T 세포의 증가된 빈도를 포함할 수 있다. 면역원성 조성물이 투여된 대상체와 관련된 CD3+CD8+IFN- γ + T 세포의 빈도는 면역원성 조성물이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 적어도 약 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 6-배, 7-배, 8-배, 9-배, 10-배, 11-배, 12-배, 13-배, 14-배, 15-배, 16-배, 17-배, 18-배, 19-배 또는 20-배까지 증가될 수 있다.

[0066] 유도된 세포성 면역 반응은 TNF- α 를 생성하는 CD3+CD8+ T 세포의 증가된 빈도를 포함할 수 있다. 면역원성 조성물이 투여된 대상체와 관련된 CD3+CD8+TNF- α + T 세포의 빈도는 면역원성 조성물이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 적어도 약 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 6-배, 7-배, 8-배, 9-배, 10-배, 11-배, 12-배, 13-배 또는 14-배까지 증가될 수 있다.

[0067] 유도된 세포성 면역 반응은 IL-2를 생성하는 CD3+CD8+ T 세포의 증가된 빈도를 포함할 수 있다. 면역원성 조성물이 투여된 대상체와 관련된 CD3+CD8+IL-2+ T 세포의 빈도는 면역원성 조성물이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 적어도 약 0.5-배, 1.0-배, 1.5-배, 2.0-배, 2.5-배, 3.0-배, 3.5-배, 4.0-배, 4.5-배 또는 5.0-배까지 증가될 수 있다.

[0068] 유도된 세포성 면역 반응은 IFN- γ 및 TNF- α 둘 다를 생성하는 CD3+CD8+ T 세포의 증가된 빈도를 포함할 수 있다. 면역원성 조성물이 투여된 대상체와 관련된 CD3+CD8+IFN- γ +TNF- α + T 세포의 빈도는 면역원성 조성물이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 적어도 약 25-배, 30-배, 35-배, 40-배, 45-배, 50-배, 55-배, 60-배, 65-배, 70-배, 75-배, 80-배, 85-배, 90-배, 95-배, 100-배, 110-배, 120-배, 130-배, 140-배, 150-배, 160-배, 170-배 또는 180-배까지 증가될 수 있다.

[0069] 면역원성 조성물에 의해 유도된 세포성 면역 반응은 CD4+ T 세포 반응을 유도하는 것을 포함할 수 있다. 유도된 CD4+ T 세포 반응은 SARS-CoV-2 항원과 반응성일 수 있다. 유도된 CD4+ T 세포 반응은 다작용성일 수 있다. 유도된 세포성 면역 반응은 CD4+ T 세포 반응을 유도하는 것을 포함할 수 있으며, 여기서 CD4+ T 세포는 IFN- γ , TNF- α , IL-2 또는 IFN- γ 와 TNF- α 의 조합을 생성한다.

[0070] 유도된 세포성 면역 반응은 IFN- γ 를 생성하는 CD3+CD4+ T 세포의 증가된 빈도를 포함할 수 있다. 면역원성 조성물이 투여된 대상체와 관련된 CD3+CD4+IFN- γ + T 세포의 빈도는 면역원성 조성물이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 적어도 약 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 6-배, 7-배, 8-배, 9-배, 10-배, 11-배, 12-배, 13-배, 14-배, 15-배, 16-배, 17-배, 18-배, 19-배 또는 20-배까지 증가될 수 있다.

[0071] 유도된 세포성 면역 반응은 TNF- α 를 생성하는 CD3+CD4+ T 세포의 증가된 빈도를 포함할 수 있다. 면역원성 조성물이 투여된 대상체와 관련된 CD3+CD4+TNF- α + T 세포의 빈도는 면역원성 조성물이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 적어도 약 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 6-배, 7-배, 8-배, 9-배, 10-배, 11-배, 12-배, 13-배, 14-배, 15-배, 16-배, 17-배, 18-배, 19-배, 20-배, 21-배 또는 22-배까지 증가될 수 있다.

[0072] 유도된 세포성 면역 반응은 IL-2를 생성하는 CD3+CD4+ T 세포의 증가된 빈도를 포함할 수 있다. 면역원성 조성물이 투여된 대상체와 관련된 CD3+CD4+IL-2+ T 세포의 빈도는 면역원성 조성물이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 적어도 약 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 6-배, 7-배, 8-배, 9-배, 10-배, 11-배, 12-배, 13-배, 14-배, 15-배, 16-배, 17-배, 18-배, 19-배, 20-배, 21-배, 22-배, 23-배, 24-배, 25-배, 26-배, 27-배, 28-배, 29-배, 30-배, 31-배, 32-배, 33-배, 34-배, 35-배, 36-배, 37-배, 38-배, 39-배, 40-배, 45-배, 50-배, 55-배 또는 60-배까지 증가될 수 있다.

[0073] 유도된 세포성 면역 반응은 IFN- γ 및 TNF- α 둘 다를 생성하는 CD3+CD4+ T 세포의 증가된 빈도를 포함할 수 있다. 면역원성 조성물이 투여된 대상체와 관련된 CD3+CD4+IFN- γ +TNF- α + T 세포의 빈도는 면역원성 조성물이 투여되지 않은 대상체와 비교하여 적어도 약 2-배, 2.5-배, 3.0-배, 3.5-배, 4.0-배, 4.5-배, 5.0-배, 5.5-배, 6.0-배, 6.5-배, 7.0-배, 7.5-배, 8.0-배, 8.5-배, 9.0-배, 9.5-배, 10.0-배, 10.5-배, 11.0-배, 11.5-배, 12.0-배, 12.5-배, 13.0-배, 13.5-배, 14.0-배, 14.5-배, 15.0-배, 15.5-배, 16.0-배, 16.5-배, 17.0-배, 17.5-배, 18.0-배, 18.5-배, 19.0-배, 19.5-배, 20.0-배, 21-배, 22-배, 23-배, 24-배, 25-배, 26-배, 27-배,

28-배, 29-배, 30-배, 31-배, 32-배, 33-배, 34-배 또는 35-배까지 증가될 수 있다.

[0074] 본 발명의 면역원성 조성물은 면역원성 조성물 자체가 질병 또는 사망을 일으키지 않도록 안전하고; 바이러스 또는 세균과 같은 살아있는 병원체에 대한 노출로 인한 질병을 방지하고; 세포의 침입을 방지하기 위해 중화 항체를 유도하고; 세포내 병원체에 대해 보호 T 세포를 유도하며; 그리고 투여의 용이성, 적은 부작용, 생물학적 안정성 및 낮은 용량당 비용을 제공하는 것과 같은 효과적인 면역원성 조성물에 요구되는 특징을 가질 수 있다.

[0075] 면역원성 조성물은 근육 또는 피부와 같은 상이한 조직에 투여될 때 면역 반응을 추가로 유도할 수 있다. 면역원성 조성물은, 예를 들어, 전기천공법 또는 주사를 통해 또는 피하, 피내 또는 근육내 주사에 의해 비경구적으로 투여될 때 면역 반응을 추가로 유도할 수 있고, 선택적으로 본 명세서에 기재된 바와 같이 전기천공법이 뒤따를 수 있다.

[0076] a. SARS-CoV-2 항원 및 이를 암호화하는 핵산 분자

[0077] 위에 기재된 바와 같이, SARS-CoV-2 항원, 이의 단편, 이의 변이체 또는 이들의 조합을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 면역원성 조성물이 본 명세서에 제공된다. 또한, SARS-CoV-2 항원, 이의 단편, 이의 변이체 또는 이들의 조합을 포함하는 면역원성 조성물이 본 명세서에 제공된다.

[0078] 결합 세포 표면 단백질 및 막 융합에 결합 시, 코로나바이러스가 세포에 들어가고, 이의 단일-가닥 RNA 게놈이 감염된 세포의 세포질로 방출된다. 단일-가닥 RNA 게놈은 양성 가닥이므로 RNA 폴리머레이스로 번역될 수 있으며, 이는 마이너스 가닥인 추가적인 바이러스 RNA를 생성한다. 따라서, SARS-CoV-2 항원은 또한 SARS-CoV-2 RNA 폴리머레이스일 수 있다.

[0079] 바이러스 마이너스 RNA 가닥은 다른 바이러스 단백질, 예를 들어, 뉴클레오팝시드(N) 단백질, 외피(E) 단백질 및 매트릭스(M) 단백질을 번역하는 데 사용되는 더 작은 서브게놈 양성 RNA 가닥으로 전사된다. 따라서, SARS-CoV-2 항원은 SARS-CoV-2 뉴클레오팝시드 단백질, SARS-CoV-2 외피 단백질 또는 SARS-CoV-2 매트릭스 단백질을 포함할 수 있다.

[0080] 바이러스 마이너스 RNA 가닥은 또한 뉴클레오팝시드 단백질에 의해 결합된 바이러스 게놈을 복제하는 데 사용될 수 있다. 매트릭스 단백질은 스파이크 단백질과 함께 감염된 세포의 소포체에 통합된다. 함께, 바이러스 게놈에 결합된 뉴클레오팝시드 단백질 및 막-내장 매트릭스 및 스파이크 단백질은 소포체의 내강으로 밟아되어 바이러스 게놈을 막에 감싼다. 그런 다음, 바이러스 자손은 골지 소포에 의해 감염된 세포의 세포막으로 수송되고, 세포내이입에 의해 세포외 공간으로 방출된다.

[0081] SARS-CoV-2를 비롯한 코로나바이러스는 막으로 캡슐화되며, 코로나바이러스의 표면에 돌출된 스파이크를 형성하는 스파이크(S) 단백질로 알려진 유형 1 막 당단백질을 갖는다. SARS-CoV-2 S 단백질은 코로나바이러스의 표면상의 주요 외피 단백질인 클래스 I 막 융합 단백질이다. 스파이크 단백질은 코로나바이러스가 세포 표면에 위치한 단백질, 예를 들어, 메탈로프로테이스 아미노 펩티데이스 N에 결합하는 것을 촉진하며, 세포-바이러스 막 융합을 매개한다. 특히, 스파이크 단백질은 세포 표면 단백질에 대한 코로나바이러스의 결합을 촉진하는 S1 서브유닛을 포함한다. 따라서, 스파이크 단백질의 S1 서브유닛은 세포가 코로나바이러스에 감염되는 것을 제어한다. 스파이크 단백질은 또한 바이러스 및 세포막 융합을 촉진하는 막관통 서브유닛인 S2 서브유닛을 포함한다. 따라서, SARS-CoV-2 항원은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질, SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 S1 서브유닛, SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 S2 서브유닛 또는 SARS-CoV-2 스파이크 수용체 결합 도메인을 포함하는 S1 서브유닛의 단편을 포함할 수 있다.

[0082] 일부 실시형태에서, SARS-CoV-2 항원은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질, SARS-CoV-2 RNA 폴리머레이스, SARS-CoV-2 뉴클레오팝시드 단백질, SARS-CoV-2 외피 단백질, SARS-CoV-2 매트릭스 단백질, 이의 단편, 이의 변이체 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0083] SARS-CoV-2 항원은 SARS-CoV-2 스파이크 항원, 이의 단편, 이의 변이체 또는 이들의 조합일 수 있다. SARS-CoV-2 스파이크 항원은 1종 이상의 SARS-CoV-2 균주에 대해 포유동물에서 면역 반응을 유도할 수 있다. SARS-CoV-2 스파이크 항원은 항-SARS-CoV-2 면역 반응이 유도될 수 있는 면역원으로서 특히 효과적이게 하는 에피토프(들)를 포함할 수 있다.

[0084] SARS-CoV-2 항원은 SARS-CoV-2의 2종 이상의 균주로부터 유래되는 컨센서스 항원일 수 있다. 일부 실시형태에서, SARS-CoV-2 항원은 SARS-CoV-2 컨센서스 스파이크 항원이다. SARS-CoV-2 컨센서스 스파이크 항원은 SARS-CoV-2의 균주로부터의 스파이크 항원의 서열로부터 유래될 수 있으므로, SARS-CoV-2 컨센서스 스파이크

항원은 고유하다. 일부 실시형태에서, SARS-CoV-2 컨센서스 스파이크 항원은 다른 SARS-CoV-2 스파이크 단백질과 아미노산 서열 차이가 더 큰 이상치 스파이크 항원일 수 있다. 따라서, 본 발명의 면역원성 조성물은 SARS-CoV-2 컨센서스 스파이크 항원의 독특한 서열로 인해 SARS-CoV-2의 여러 균주에 널리 적용 가능하다. 이러한 독특한 서열을 통해 백신은 SARS-CoV-2의 유전적으로 다양한 변이체를 포함하여 SARS-CoV-2의 여러 균주에 대해 보편적으로 보호할 수 있다. SARS-CoV-2 항원을 암호화하는 핵산 분자는 개선된 발현을 위해 변형될 수 있다. 변형은 코돈 최적화, RNA 최적화, 증가된 번역 개시를 위한 코자(kozak) 서열의 추가 및/또는 SARS-CoV-2 항원의 면역원성을 증가시키기 위한 면역글로불린 리더 서열의 추가를 포함할 수 있다. SARS-CoV-2 스파이크 항원은, 예를 들어, 면역글로불린 E(IgE) 또는 면역글로불린(IgG) 신호 펩타이드이지만 이들로 제한되지 않는 면역글로불린 신호 펩타이드와 같은 신호 펩타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, SARS-CoV-2 스파이크 항원은 헤마글루티닌(hemagglutinin: HA) 태그를 포함할 수 있다. SARS-CoV-2 스파이크 항원은 상응하는 코돈 최적화된 스파이크 항원보다 더 강하고 더 광범위한 세포 및/또는 체액성 면역 반응을 유도하도록 설계될 수 있다.

[0085] 일부 실시형태에서, SARS-CoV-2 항원은 서열번호 1의 19번 내지 1279번 잔기의 전체 길이에 대해 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, SARS-CoV-2 항원은 서열번호 1의 19번 내지 1279번 잔기에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, SARS-CoV-2 항원은 서열번호 1의 전체 길이에 대해 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, SARS-CoV-2 항원은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, SARS-CoV-2 항원을 암호화하는 핵산 분자는 서열번호 2의 55번 내지 3837번 뉴클레오타이드, 서열번호 2 또는 서열번호 3에 제시된 서열과 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0086] 일부 실시형태에서, SARS-CoV-2 항원은 서열번호 4의 19번 내지 1279번 잔기의 전체 길이에 대해 또는 서열번호 4의 전체 길이에 대해 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, SARS-CoV-2 항원은 서열번호 4의 19번 내지 1279번 잔기에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, SARS-CoV-2 항원은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, SARS-CoV-2 항원을 암호화하는 핵산 분자는 서열번호 5의 55번 내지 3837번 뉴클레오타이드의 전체 길이에 대해 또는 서열번호 5의 전체 길이에 대해 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 핵산 서열; 서열번호 5의 55번 내지 3837번 뉴클레오타이드의 핵산 서열; 서열번호 5의 핵산 서열; 서열번호 6의 전체 길이에 대해 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 핵산 서열; 또는 서열번호 6의 핵산 서열을 포함한다.

[0087] 일부 실시형태에서, SARS-CoV-2 항원은 IgE 리더 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일부 이러한 실시형태에서, SARS-CoV-2 항원은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, SARS-CoV-2 항원은 서열번호 2 또는 서열번호 3에 제시된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된다. SARS-CoV-2 항원이 IgE 리더를 포함하는 일부 실시형태에서, SARS-CoV-2 항원은 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 이러한 실시형태에서, SARS-CoV-2 항원은 서열번호 5 또는 서열번호 6에 제시된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된다.

[0088] 서열번호 1의 면역원성 단편이 제공될 수 있다. 면역원성 단편은 서열번호 1의 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 면역원성 단편은, 예를 들어, 면역글로불린 리더, 예컨대, IgE 리더와 같은 리더 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역원성 단편은 리더 서열이 없다.

[0089] 서열번호 1의 면역원성 단편에 대해 상동성인 아미노산 서열을 갖는 단백질의 면역원성 단편이 제공될 수 있다. 이러한 면역원성 단편은 서열번호 1에 대해 95% 상동성인 단백질의 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%를 포함할 수 있다. 일부 실시형태는 본 명세서의 컨센서스 단백질 서열의 면역원성 단편에 대해 96% 상동성을 갖는 면역원성 단편에 관한 것이다. 일부 실시형태는 본 명세서의 컨센서스 단백질 서열의 면역원성 단편에 대해 97% 상동성을 갖는 면역원성 단편에 관한 것이다. 일부 실시형태는 본 명세서의 컨센서스 단백질 서열의 면역원성 단편에 대해 98% 상동성을 갖는 면역원성 단편에 관한 것이다. 일부 실시형태는 본 명세서의 컨센서스

단백질 서열의 면역원성 단편에 대해 99% 상동성을 갖는 면역원성 단편에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 면역원성 단편은, 예를 들어, 면역글로불린 리더, 예컨대, IgE 리더와 같은 리더 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역원성 단편은 리더 서열이 없다.

[0090] 일부 실시형태는 서열번호 1의 면역원성 단편에 관한 것이다. 면역원성 단편은 서열번호 1의 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%일 수 있다. 면역원성 단편은 서열번호 1의 단편에 대해 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97% 적어도 98% 또는 적어도 99% 상동성일 수 있다. 일부 실시형태에서, 면역원성 단편은, 예를 들어, 면역글로불린 리더, 예컨대, IgE 리더와 같은 리더 서열을 암호화하는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단편은 리더 서열을 암호화하는 코딩 서열이 없다.

[0091] 서열번호 4의 면역원성 단편이 제공될 수 있다. 면역원성 단편은 서열번호 4의 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 면역원성 단편은, 예를 들어, 면역글로불린 리더, 예컨대, IgE 리더와 같은 리더 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역원성 단편은 리더 서열이 없다.

[0092] 서열번호 4와 상동인 아미노산 서열을 갖는 단백질의 면역원성 단편이 제공될 수 있다. 이러한 면역원성 단편은 서열번호 4에 대해 95% 상동성이 단백질의 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%를 포함할 수 있다. 일부 실시형태는 본 명세서의 컨센서스 단백질 서열의 면역원성 단편에 대해 96% 상동성을 갖는 면역원성 단편에 관한 것이다. 일부 실시형태는 본 명세서의 컨센서스 단백질 서열의 면역원성 단편에 대해 97% 상동성을 갖는 면역원성 단편에 관한 것이다. 일부 실시형태는 본 명세서의 컨센서스 단백질 서열의 면역원성 단편에 대해 98% 상동성을 갖는 면역원성 단편에 관한 것이다. 일부 실시형태는 본 명세서의 컨센서스 단백질 서열의 면역원성 단편에 대해 99% 상동성을 갖는 면역원성 단편에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 면역원성 단편은, 예를 들어, 면역글로불린 리더, 예컨대, IgE 리더와 같은 리더 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역원성 단편은 리더 서열이 없다.

[0093] 일부 실시형태는 서열번호 4의 면역원성 단편에 관한 것이다. 면역원성 단편은 서열번호 4의 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%일 수 있다. 면역원성 단편은 서열번호 4의 단편에 대해 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97% 적어도 98% 또는 적어도 99% 상동성일 수 있다. 일부 실시형태에서, 면역원성 단편은, 예를 들어, 면역글로불린 리더, 예컨대, IgE 리더와 같은 리더 서열을 암호화하는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단편은 리더 서열을 암호화하는 코딩 서열이 없다.

[0094] b. 벡터

[0095] 면역원성 조성물은 SARS-CoV-2항원을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 하나 이상의 벡터를 포함할 수 있다. 하나 이상의 벡터는 항원을 발현할 수 있다. 벡터는 복제 기점을 포함하는 핵산 서열을 가질 수 있다. 벡터는 플라스미드, 박테리오파지, 세균 인공 염색체 또는 효모 인공 염색체일 수 있다. 벡터는 자가-복제 염색체외 벡터 또는 숙주 게놈에 통합되는 벡터일 수 있다.

[0096] 하나 이상의 벡터는 일반적으로 특정 유전자를 표적 세포에 도입하는 데 사용되는 플라스미드인 발현 작제를 일 수 있다. 일단 발현 벡터가 세포 내부에 있으면, 유전자에 의해 암호화되는 단백질이 세포-전사 및 번역 기구 리보솜 복합체에 의해 생성된다. 플라스미드는 자주 인핸서 및 프로모터 영역으로 작용하며 발현 벡터에 운반되는 유전자의 효율적인 전사를 유도하는 조절 서열을 포함하도록 조작된다. 본 발명의 벡터는 다량의 안정적인 메신저 RNA 및 따라서 단백질을 발현한다.

[0097] 벡터는 강한 프로모터, 강한 종결 코돈, 프로모터와 클로닝된 유전자 사이의 거리 조절 및 전사 종결 서열과 PTIS(portable translation initiation sequence; 포터블 번역 개시 서열)의 삽입 등과 같은 발현 신호를 가질 수 있다.

[0098] (1) 발현 벡터

[0099] 벡터는 원형 플라스미드 또는 선형 핵산일 수 있다. 원형 플라스미드 및 선형 핵산은 적절한 대상체 세포에서 특정 뉴클레오타이드 서열의 발현을 지시할 수 있다. 벡터는 종결 신호에 작동 가능하게 연결될 수 있는 항원-암호화 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 가질 수 있다. 벡터는 또한 뉴클레오타이드 서열의 적절한 번역에 필요한 서열을 포함할 수 있다. 관심 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터는 키메라일 수

있으며, 이는 이의 성분 중 적어도 하나가 이의 다른 성분 중 적어도 하나에 대해 이종성이라는 것을 의미할 수 있다. 발현 카세트에서 뉴클레오타이드 서열의 발현은 구성적 프로모터 또는 유도성 프로모터의 제어하에 있을 수 있으며, 이는 숙주 세포가 일부 특정 외부 자극에 노출될 때에만 전사를 개시한다. 다세포 유기체의 경우, 프로모터는 또한 특정 조직 또는 기관 또는 발달 단계에 특이적일 수 있다.

[0100] (2) 원형 및 선형 벡터

벡터는 세포 계놈 내로의 통합에 의해 표적 세포를 형질전환시키거나 또는 염색체외에 존재할 수 있는(예를 들어, 복제 기점을 갖는 플라스미드를 자율적으로 복제함) 원형 플라스미드일 수 있다.

벡터는 pVAX, pcDNA3.0, pGX-0001 또는 프로박스(provax) 또는 항원을 암호화하는 DNA를 발현할 수 있으며 세포가 서열을 면역계에 의해 인식되는 항원으로 변역할 수 있게 하는 임의의 다른 발현 벡터일 수 있다.

또한, 전기천공법을 통해 대상체에게 효율적으로 전달되고 하나 이상의 목적하는 항원을 발현할 수 있는 선형 핵산 면역원성 조성물 또는 선형 발현 카세트("LEC(linear expression cassette)")가 본 명세서에 제공된다. LEC는 임의의 포스페이트 백본이 없는 임의의 선형 DNA일 수 있다. DNA는 하나 이상의 항원을 암호화할 수 있다. LEC는 프로모터, 인트론, 종결 코돈 및/또는 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다. 항원의 발현은 프로모터에 의해 제어될 수 있다. LEC는 임의의 항생제 저항성 유전자 및/또는 포스페이트 백본을 포함하지 않을 수 있다. LEC는 목적하는 항원 유전자 발현과 관련이 없는 다른 핵산 서열을 포함하지 않을 수 있다.

LEC는 선형화될 수 있는 임의의 플라스미드로부터 유래될 수 있다. 플라스미드는 항원을 발현할 수 있다. 플라스미드는 pNP(푸에르토리코/34) 또는 pM2(뉴칼레도니아/99)일 수 있다. 플라스미드는 WLV009, pVAX, pcDNA3.0 또는 프로박스 또는 항원을 암호화하는 DNA를 발현할 수 있으며 세포가 서열을 면역계에 의해 인식되는 항원으로 변역할 수 있게 하는 임의의 다른 발현 벡터일 수 있다.

LEC는 perM2일 수 있다. LEC는 perNP일 수 있다. perNP 및 perMR은 각각 pNP(푸에르토리코/34) 및 pM2(뉴칼레도니아/99)로부터 유래될 수 있다.

[0106] (3) 프로모터, 인트론, 종결 코돈 및 폴리아데닐화 신호

벡터는 프로모터를 가질 수 있다. 프로모터는 유전자 발현을 유도하고 단리된 핵산의 발현을 조절할 수 있는 임의의 프로모터일 수 있다. 이러한 프로모터는 본 명세서에 개시된 항원 서열을 전사하는 DNA 의존적 RNA 폴리머레이스를 통한 전사에 필요한 시스-작용성 서열 요소이다. 이종성 핵산의 발현을 지시하는 데 사용되는 프로모터의 선택은 특정 적용에 의존한다. 프로모터는 자연환경에서 전사 시작 부위로부터와 마찬가지로 벡터의 전사 시작으로부터 거의 동일한 거리에 위치할 수 있다. 그러나, 이 거리의 변화는 프로모터 기능의 손실 없이 수용될 수 있다.

프로모터는 항원을 암호화하는 핵산 서열 및 전사체의 효율적인 폴리아데닐화, 리보솜 결합 부위 및 번역 종결에 필요한 신호에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 프로모터는 CMV 프로모터, SV40 초기 프로모터, SV40 후기 프로모터, 메탈로티오네인 프로모터, 뮤린 유방 종양 바이러스 프로모터, 라우스 육종 바이러스 프로모터, 폴리헵트린 프로모터 또는 진핵세포 세포에서의 발현에 효과적인 것으로 나타난 또 다른 프로모터일 수 있다.

벡터는 기능성 스플라이스 공여체 및 수용체(acceptor) 부위를 갖는 인핸서 및 인트론을 포함할 수 있다. 벡터는 효율적인 종결을 제공하기 위해 구조적 유전자 하류에 전사 종결 영역을 포함할 수 있다. 종결 영역은 프로모터 서열과 동일한 유전자로부터 얻을 수 있거나 또는 상이한 유전자로부터 얻을 수 있다.

[0110] c. 면역원성 조성물의 부형제 및 다른 성분

면역원성 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 비히클, 담체, 완충액 또는 희석제와 같은 기능성 분자일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "완충액"은 산-염기 접합체 성분의 작용에 의한 pH의 변화에 저항하는 완충 용액을 지칭한다. 완충액은 일반적으로 약 4.0 내지 약 8.0, 예를 들어, 약 5.0 내지 약 7.0의 pH를 갖는다. 일부 실시형태에서, 완충액은 식염수-시트르산나트륨(saline-sodium citrate: SSC) 완충액이다. 면역원성 조성물이 위에 기재된 바와 같이 SARS-CoV-2 스파이크 항원을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 일부 실시형태에서, 면역원성 조성물은, 예를 들어, SSC 완충액이지만 이로 제한되지 않는 완충액 중 10 mg/ml의 벡터를 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역원성 조성물은 완충액 중 10 mg/ml의 DNA 플라스미드 pGX9501 또는 pGX9503을 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역원성 조성물은 약 2°C 내지 약 8°C에서 보관된다. 일부 실시형태에서, 면역원성 조성물은 실온에서 보관된다. 면역원성 조성물은 실온에서 적어도 1년 동안 보관될 수 있다. 일부 실시형태에서, 면역원성 조성물은 적어도 1년 동안 실온에서 안정

적이며, 여기서 안정성은 적어도 약 80%의 초나선형 플라스미드 백분율로 정의된다. 일부 실시형태에서, 초나선형 플라스미드 백분율은 실온에서 적어도 1년 동안 보관 후 적어도 약 85%이다.

[0112] 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 표면 활성제, 예컨대, 면역-자극 복합체(immune-stimulating complexes: ISCOMS), 프로인트 불완전 보조제, 모노포스포릴 지질 A를 포함하는 LPS 유사체, 뮤라밀 웨타이드, 퀴논 유사체, 소포, 예컨대, 스쿠알렌 및 스쿠알렌, 하이알루론산, 지질, 리포솜, 칼슘 이온, 바이러스 단백질, 다중 음이온, 다중 양이온 또는 나노입자 또는 다른 공지된 형질감염 촉진제를 포함할 수 있는 형질감염 촉진제일 수 있다.

[0113] 형질감염 촉진제는 폴리-L-글루타메이트(LGS) 또는 지질을 포함하는 다중 음이온, 다중 양이온일 수 있다. 형질감염 촉진제는 폴리-L-글루타메이트이며, 폴리-L-글루타메이트는 6 mg/ml 미만의 농도로 면역원성 조성물에 존재할 수 있다. 형질감염 촉진제는 또한 면역-자극 복합체(ISCOMS), 프로인트 불완전 보조제, 모노포스포릴 지질 A를 포함하는 LPS 유사체, 뮤라밀 웨타이드, 퀴논 유사체 및 소포, 예컨대, 스쿠알렌 및 스쿠알렌과 같은 표면 활성제를 포함할 수 있으며, 하이알루론산이 또한 유전자 작제물과 함께 투여되는 데 사용될 수 있다. DNA 플라스미드 면역원성 조성물은 또한 지질, 레시틴 리포솜 또는 DNA-리포솜 혼합물(예를 들어, WO9324640 참조)로 당업계에 공지된 다른 리포솜을 비롯한 리포솜, 칼슘 이온, 바이러스 단백질, 다중 음이온, 다중 양이온 또는 나노입자와 같은 형질감염 촉진제 또는 다른 공지된 형질감염 촉진제를 포함할 수 있다. 형질감염 촉진제는 폴리-L-글루타메이트(LGS) 또는 지질을 포함하는 다중 음이온, 다중 양이온이다. 면역원성 조성물 중 형질감염제의 농도는 4 mg/ml 미만, 2 mg/ml 미만, 1 mg/ml 미만, 0.750 mg/ml 미만, 0.500 mg/ml 미만, 0.250 mg/ml 미만, 0.100 mg/ml 미만, 0.050 mg/ml 또는 0.010 mg/ml 미만이다.

[0114] 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 보조제일 수 있다. 보조제는 대체 플라스미드에서 발현되거나 또는 면역원성 조성물에서 위의 플라스미드와 조합하여 단백질로서 전달되는 다른 유전자일 수 있다. 보조제는 α-인터페론(IFN-α), β-인터페론(IFN-β), γ-인터페론, 혈소판 유래 성장 인자(platelet derived growth factor: PDGF), TNF α, TNF β, GM-CSF, 상피 성장 인자(epidermal growth factor: EGF), 피부 T 세포-유인 케모카인(epidermal growth factor: CTACK), 상피 흉선-발현 케모카인(epithelial thymus-expressed chemokine: TECK), 점막-관련 상피 케모카인(mucosae-associated epithelial chemokine: MEC), IL-12, IL-15, MHC, CD80, 신호 서열이 결실된 IL-15를 포함하며 선택적으로 IgE로부터의 신호 웨타이드를 포함하는 CD86으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 보조제는 IL-12, IL-15, IL-28, CTACK, TECK, 혈소판 유래 성장 인자(PDGF), TNF α, TNF β, GM-CSF, 상피 성장 인자(EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0115] 보조제로서 유용할 수 있는 다른 유전자는 MCP-1, MIP-1a, MIP-1p, IL-8, RANTES, L-셀렉틴, P-셀렉틴, E-셀렉틴, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, IL-18의 돌연변이체 형태, CD40, CD40L, 혈관 성장 인자, 섬유아세포 성장 인자, IL-7, IL-22, 신경 성장 인자, 혈관 내피 성장 인자, Fas, TNF 수용체, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, 카스페이스 ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, IκB, 불활성 NIK, SAP K, SAP-1, JNK, 인터페론 반응 유전자, NFkB, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, OX40, OX40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 및 이들의 기능성 단편을 암호화하는 것들을 포함한다.

[0116] 면역원성 조성물은 참조에 의해 완전히 원용되어 있는 1994년 4월 1일자로 출원된 미국 특허 제021,579호에 기술되어 있는 유전자 백신 촉진제를 추가로 포함할 수 있다.

[0117] 면역원성 조성물은 사용될 투여 방식에 따라 제형화될 수 있다. 일부 실시형태에 따르면, 면역원성 조성물은 완충액, 선택적으로 식염수-시트르산나트륨 완충액에 제형화된다. 예를 들어, 면역원성 조성물은 시트르산나트륨 염 완충액 밀리리터당 10mg의 농도로 제형화될 수 있다. 주사 가능한 면역원성 약제학적 조성물은 멸균될 수 있고, 밀폐성이 있고 미립자가 없을 수 있다. 등장성 제형 또는 용액이 사용될 수 있다. 등장성을 위한 첨가제는 소듐 클로라이드, 텍스트로스, 만니톨, 소르비톨 및 라토스를 포함할 수 있다. 면역원성 조성물은 혈관수축제를 포함할 수 있다. 등장성 용액은 인산 완충 식염수를 포함할 수 있다. 면역원성 조성물은 젤라틴 및 알부민을 포함하는 안정화제를 추가로 포함할 수 있다. 안정화제는 LGS 또는 다중 양이온 또는 다중 음이온을 포함하여 장기간 동안 실온 또는 주위 온도에서 제형이 안정하도록 할 수 있다.

[0118] 또한, 면역원성 조성물을 포함하는 제조 물품이 본 명세서에 제공된다. 일부 실시형태에서, 제조 물품은 면역원

성 조성물을 담고 있는 용기이다. 용기는, 예를 들어, 주사기 또는 바이알일 수 있지만 이들로 제한되지 않는다. 바이알은 주사기로 뚫을 수 있는 마개가 있을 수 있다.

[0119] 면역원성 조성물은 다중-용량 또는 단위 투여 형태로 앰풀, 병 또는 바이알과 같은 적절하게 멸균된 용기에 패키징될 수 있다. 용기는 백신 제제로 채워진 후 기밀하게(hermetically) 밀봉되는 것이 바람직하다. 바람직하게는, 백신은 라벨이 부착된 용기에 패키징되어 있으며, 라벨은 백신을 식별하고 적절한 법률에 따른 백신의 승인, 복용량, 정보 등을 반영하는 미국 식품의약국과 같은 정부 기관에 의해 규정된 형식으로 통지한다. 라벨은 바람직하게는 환자에게 백신을 투여하는 의료 전문가에게 유용한 백신에 대한 정보를 포함한다. 패키지는 또한 바람직하게는 백신의 투여, 지침, 적응증 및 임의의 필요한 필수 경고와 관련된 인쇄된 정보 자료를 포함한다.

백신 접종 방법

[0120] 또한, 면역원성 조성물을 대상체에게 투여함으로써 이를 필요로 하는 대상체에서 질환을 치료, 방지 및/또는 예방하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 대상체에 대한 면역원성 조성물의 투여는 대상체에서 면역 반응을 유도하거나 또는 이끌어낼 수 있다. 유도된 면역 반응은 질환, 예를 들어, SARS-CoV-2 감염과 관련된 병리를 치료, 예방 및/또는 방지하는 데 사용될 수 있다. 면역원성 조성물이 투여된 대상체에서 유도된 면역 반응은 1종 이상의 SARS-CoV-2 균주에 대한 저항성을 제공할 수 있다.

[0121] 유도된 면역 반응은 유도된 체액성 면역 반응 및/또는 유도된 세포성 면역 반응을 포함할 수 있다. 체액성 면역 반응은 약 1.5-배 내지 약 16-배, 약 2-배 내지 약 12-배 또는 약 3-배 내지 약 10-배까지 유도될 수 있다. 유도된 체액성 면역 반응은 IgG 항체 및/또는 항원에 대해 반응성인 중화 항체를 포함할 수 있다. 유도된 세포성 면역 반응은 CD8+ T 세포 반응을 포함할 수 있으며, 이는 약 2-배 내지 약 30-배, 약 3-배 내지 약 25-배 또는 약 4-배 내지 약 20-배까지 유도된다.

[0122] 백신 용량은 $1\mu\text{g}$ 내지 10mg 활성 성분/kg 체중/시간일 수 있고, $20\mu\text{g}$ 내지 10mg 성분/kg 체중/시간일 수 있다. 백신은 21일, 22일, 23일, 24일, 25일, 26일, 27일, 28일, 29일, 30일, 31일, 32일, 33일, 34일, 35일, 36일, 37일, 38일, 39일, 40일 이상마다 또는 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 11주, 12주, 13주, 14주, 15주, 16주, 17주, 18주, 19주, 20주 이상마다 투여될 수 있다. 효과적인 치료를 위한 백신 투여의 횟수는 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회 이상일 수 있다.

[0123] 일 실시형태에서, 총 백신 용량은 1.0mg 의 핵산이다. 일 실시형태에서, 총 백신 용량은 2.0mg 의 핵산이며, $2 \times 1.0\text{mg}$ 핵산으로 투여된다.

a. 투여

[0124] 면역원성 조성물은 약학 분야의 당업자에게 잘 알려진 표준 기법에 따라 제형화될 수 있다. 이러한 조성물은 특정 대상체의 연령, 성별, 체중 및 병태 및 투여 경로와 같은 인자를 고려하여 의학 분야의 당업자에게 잘 알려진 투여량 및 기법에 의해 투여될 수 있다. 백신은, 예를 들어, 1회, 2회, 3회, 4회 이상의 주사로 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 약 0.5mg 내지 약 2.0mg 의 핵산 분자의 초기 용량이 대상체에게 투여될 수 있다. 초기 용량은 1회, 2회, 3회 이상의 주사로 투여될 수 있다. 초기 용량은 직전 투여 후 약 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 10주, 12주 이상에 약 0.5mg 내지 약 2.0mg 의 핵산 분자의 1회, 2회, 3회, 4회 이상의 후속 용량의 투여가 뒤따를 수 있다. 각 후속 용량은 1회, 2회, 3회 이상의 주사로 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 면역원성 조성물은 추가적인 작용제 이전, 이와 함께 또는 이후에 대상체에 투여된다. 일부 실시형태에서, 면역원성 조성물은 SARS-CoV-2 감염의 치료 또는 SARS-CoV-2 감염과 관련된 질환 또는 장애의 치료 또는 예방을 위한 작용제의 투여 후에 부스터로서 투여된다. 일 실시형태에서, SARS-CoV-2 감염과 관련된 질환 또는 장애는 코로나바이러스 질환 2019(COVID-19)를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, SARS-CoV-2 감염과 관련된 질환 또는 장애는 성인의 다계통 염증성 증후군(MIS-A) 또는 어린이의 다계통 염증성 증후군(MIS-C)이다.

[0125] 대상체는 인간, 말, 비인간 영장류, 소, 돼지, 양, 고양이, 개, 기니피그, 토끼, 래트 또는 마우스와 같은 포유동물일 수 있다.

[0126] 백신은 예방적으로 또는 치료적으로 투여될 수 있다. 예방적 투여에서, 백신은 면역 반응을 유도하기에 충분한 양으로 투여될 수 있다. 치료적 적용에서, 백신은 치료적 효과를 이끌어내기에 충분한 양으로 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 이를 달성하기에 적절한 양은 "치료학적 유효량"으로 정의된다. 이러한 용도에 효과적인 양은, 예를 들어, 투여된 백신 양생법의 특정 조성, 투여 방식, 질환의 단계 및 중증도, 환자의 일반적인 건강

상태 및 처방 의사의 판단에 따를 것이다.

[0129] 백신은 이들 모두의 전체의 내용이 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 Donnelly 등(Ann. Rev. Immunol. 15:617-648 (1997)); Felgner 등(1996년 12월 3일자로 허여된 미국 특허 제5,580,859호); Felgner(1997년 12월 30일자로 허여된 미국 특허 제5,703,055호); 및 Carson 등(1997년 10월 21일자로 허여된 미국 특허 제 5,679,647호)에 기술되어 있는 바와 같은 당업계에 잘 알려진 방법에 의해 투여될 수 있다. 백신의 DNA는, 예를 들어, 백신 총을 사용하여 개체에게 투여될 수 있는 입자 또는 비드와 복합체화될 수 있다. 당업자는 생리학적으로 허용 가능한 화합물을 포함하는 약제학적으로 허용 가능한 담체의 선택이, 예를 들어, 발현 벡터 투여 경로에 의존한다는 것을 알 것이다.

[0130] 백신은 다양한 경로를 통해 전달될 수 있다. 전형적인 전달 경로는 비경구 투여, 예를 들어, 근육내 또는 피하 전달을 포함한다. 다른 경로는 경구 투여, 비강내 및 질내 경로를 포함한다. 특히 백신의 DNA의 경우, 백신은 개체 조직의 간질 공간으로 전달될 수 있다(Felgner 등, 미국 특허 제5,580,859호 및 제5,703,055호, 이들 모두의 내용은 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 원용됨). 백신은 또한 근육에 투여될 수 있거나 또는 피내 또는 피하 주사를 통해 또는 이온삼투요법에 의해서와 같이 경피로 투여될 수 있다. 백신의 표피 투여가 또한 사용될 수 있다. 표피 투여는 표피의 가장 바깥층을 기계적으로 또는 화학적으로 자극하여 자극물에 대한 면역 반응을 자극하는 것을 포함할 수 있다(Carson 등, 미국 특허 제5,679,647호, 이의 내용은 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 원용됨). 비경구 투여는 선택적으로 본 명세서에 기재된 바와 같이 전기천공법이 뒤따를 수 있다.

[0131] 백신은 또한 비강을 통한 투여를 위해 제형화될 수 있다. 담체가 고체인 비강 투여에 적합한 제형은 코를 킁킁 거리는(snuff) 방식으로, 즉, 코 가까이에 든 분말 용기로부터 비강을 통해 바르게 흡입함으로써 투여되는, 예를 들어, 약 10마이크론 내지 약 500마이크론 범위의 입자 크기를 갖는 거친 분말을 포함할 수 있다. 제형은 비강 스프레이, 비강 점적제 또는 네뷸라이저에 의한 에어로졸 투여일 수 있다. 제형은 백신의 수성 또는 유성 용액을 포함할 수 있다.

[0132] 백신은 혼탁액, 시럽 또는 엘릭서와 같은 액체 제제일 수 있다. 백신은 또한 멸균 혼탁액 또는 에멀션과 같은 비경구, 피하, 피내, 근육내 또는 정맥내 투여(예를 들어, 주사 가능한 투여)를 위한 제제일 수 있다.

[0133] 백신은 리포솜, 마이크로스피어 또는 다른 중합체 매트릭스에 혼입될 수 있다(Felgner 등, 미국 특허 제 5,703,055호; 문헌[Gregoriadis, Liposome Technology, Vols. I to III (2nd ed. 1993)], 이들의 내용은 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 원용됨). 리포솜은 인지질 또는 다른 지질로 이루어질 수 있으며, 상대적으로 제조가 및 투여가 간단한 무독성의 생리학적으로 허용 가능하고 대사 가능한 담체일 수 있다

[0134] 백신은 그 내용이 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 미국 특허 제7,664,545호에 기술되어 있는 방법에 의해서와 같이 전기천공법을 통해 투여될 수 있다. 전기천공법은 그 전체 내용이 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 미국 특허 제6,302,874호; 제5,676,646호; 제6,241,701호; 제6,233,482호; 제6,216,034호; 제6,208,893호; 제6,192,270호; 제6,181,964호; 제6,150,148호; 제6,120,493호; 제6,096,020호; 제6,068,650호; 및 제5,702,359호에 기술되어 있는 방법 및/또는 기구에 의해 이루어질 수 있다. 전기천공법은 최소 침습 장치를 통해 수행될 수 있다.

[0135] 최소 침습 전기천공 장치("MID(minimally invasive electroporation device)")는 위에 기재된 백신 및 관련 유체를 신체 조직으로 주사하기 위한 기구일 수 있다. 장치는 중공 바늘, DNA 카세트 및 유체 전달 수단을 포함할 수 있되, 장치는 바늘을 상기 신체 조직으로 삽입하는 동안 DNA를 신체 조직에 동시 발생적으로(예를 들어, 자동으로) 주입하기 위해 사용 중인 유체 전달 수단을 작동시키기 위해 적합화된다. 이는 바늘이 삽입되는 동안 점차적으로 DNA 및 관련 유체를 주입하는 능력이 신체 조직을 통해 유체가 보다 균질하게 분포되도록 하는 이점이 있다. 주사하는 동안 경험하는 통증은 더 넓은 영역에 주사되는 DNA의 분포로 인해 감소될 수 있다.

[0136] MID는 바늘을 사용하지 않고 조직에 백신을 주사할 수 있다. MID는 백신이 조직의 표면을 뚫고 그 밑에 있는 조직 및/또는 근육으로 들어가도록 하는 힘을 사용하여 작은 스트림(stream) 또는 제트(jet)로 백신을 주입할 수 있다. 작은 스트림 또는 제트 뒤의 힘은 몇 분의 1초 이내에 마이크로-오리피스(micro-orifice)를 통한 이산화탄소와 같은 압축 가스의 팽창에 의해 제공될 수 있다. 최소 침습 전기천공 장치 및 이의 사용 방법의 예는 이들 각각의 내용이 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 공개된 미국 특허 제20080234655호; 미국 특허 제6,520,950호; 제7,171,264호; 제6,208,893호; 제6,009,347호; 제6,120,493호; 제7,245,963호; 제7,328,064호; 및 제6,763,264호에 기술되어 있다.

- [0137] MID는 통증 없이 조직을 관통하는 액체의 고속 제트를 생성하는 주입기를 포함할 수 있다. 이러한 무바늘 주입기는 상업적으로 이용 가능하다. 본 명세서에서 사용될 수 있는 무바늘 주입기의 예는 이를 각각의 내용이 참조에 의해 원용되어 있는 미국 특허 제3,805,783호; 제4,447,223호; 제5,505,697호; 및 제4,342,310호에 기술되어 있는 것들을 포함한다.
- [0138] 직접 또는 간접 전기수송에 적합한 형태의 목적하는 백신은 일반적으로 백신이 조직에 침투하도록 하기에 충분한 힘으로 작용제 제트의 전달을 작동시키기 위해 조직 표면을 주입기와 접촉시킴으로써 무바늘 주입기를 사용하여 치료될 조직으로 도입(예를 들어, 주사)될 수 있다. 예를 들어, 치료될 조직이 점막, 피부 또는 근육인 경우, 작용제는 작용제가 각질층을 통해 진피층으로 또는 그 밑에 있는 조직 및 근육으로 각각 침투하도록 하기에 충분한 힘으로 점막 또는 피부 표면을 향해 투사된다.
- [0139] 무바늘 주입기는 모든 유형의 조직, 특히 피부 및 점막에 백신을 전달하는 데 매우 적합하다. 일부 실시형태에서, 무바늘 주입기는 백신을 포함하는 액체가 대상체의 피부 또는 점막의 표면 및 그 안으로 나아가게 하는 데 사용될 수 있다. 본 발명의 방법을 사용하여 치료될 수 있는 다양한 유형의 조직의 대표적인 예는 췌장, 후두, 비인두, 하인두, 구인두, 입술, 인후, 폐, 심장, 신장, 근육, 유방, 결장, 전립선, 흉선, 고환, 피부, 점막 조직, 난소, 혈관 또는 임의의 이들의 조합을 포함한다.
- [0140] MID는 조직을 천공하는 바늘 전극을 가질 수 있다. 예를 들어, 직사각형 또는 정사각형 패턴으로 설정된 다중 전극 어레이에서 다중 전극 쌍 사이의 펄스에 의해, 전극 쌍 사이의 펄스보다 개선된 결과를 제공한다. 예를 들어, "Needle Electrodes for Mediated Delivery of Drugs and Genes"라는 명칭의 미국 특허 제5,702,359호에 치료적 치료 동안 복수의 바늘의 쌍이 펄스될 수 있는 바늘의 어레이가 개시되어 있다. 충분히 제시된 바와 같이 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 해당 출원에서, 바늘은 원형 어레이로 배치되었지만, 바늘 전극의 대향하는 쌍 사이에서 펄스를 가능하게 하는 커넥터 및 스위칭 기구를 갖는다. 재조합 발현 벡터를 세포로 전달하기 위한 한 쌍의 바늘 전극이 사용될 수 있다. 이러한 장치 및 시스템은 그 내용이 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 미국 특허 제6,763,264호에 기술되어 있다. 대안적으로, 일반 주사 바늘과 유사한 단일 바늘로 DNA의 주입 및 전기천공법을 가능하게 하고, 현재 사용되는 장치에 의해 전달되는 것보다 더 낮은 전압의 펄스를 적용하여 환자가 경험하는 전기 감각을 감소시키는 단일 바늘 장치가 사용될 수 있다.
- [0141] MID는 하나 이상의 전극 어레이를 포함할 수 있다. 어레이는 동일한 직경 또는 상이한 직경의 2개 이상의 바늘을 포함할 수 있다. 바늘은 균일하거나 또는 불균일하게 이격되어 있을 수 있다. 바늘은 직경이 0.005인치 내지 0.03인치, 0.01인치 내지 0.025인치; 또는 0.015인치 내지 0.020인치일 수 있다. 바늘은 0.0175인치일 수 있다. 바늘은 0.5mm, 1.0mm, 1.5mm, 2.0mm, 2.5mm, 3.0mm, 3.5mm, 4.0mm 이상 이격되어 있을 수 있다.
- [0142] MID는 펄스 발생기 및 단일 단계에서 백신 및 전기천공법 펄스를 전달하는 2개 이상의 바늘 백신 주입기로 이루어질 수 있다. 펄스 발생기는 플래시 카드로 작동되는 개인용 컴퓨터를 통해 펄스 및 주사 매개변수의 유연한 프로그래밍뿐만 아니라 전기천공법 및 환자 데이터의 포괄적인 기록 및 보관을 가능하게 할 수 있다. 펄스 발생기는 짧은 시간 동안 다양한 볼트의 펄스를 전달할 수 있다. 예를 들어, 펄스 발생기는 지속 시간이 100ms인 15 볼트 펄스 3개를 전달할 수 있다. 이러한 MID의 예는 그 내용이 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 미국 특허 제7,328,064호에 기술되어 있는 이노비오 바이오메디칼 코포레이션(Inovio Biomedical Corporation)의 Elgen 1000 시스템이다.
- [0143] MID는 DNA와 같은 거대분자의 신체 또는 식물의 선택된 조직의 세포 내로의 도입을 용이하게 하는 모듈형 전극 시스템인 CELLECTRA®(이노비오 파마슈티칼스(Inovio Pharmaceuticals), 펜실베니아주 블루 벨 소재) 장치 및 시스템일 수 있다. 모듈형 전극 시스템은 복수의 바늘 전극; 피하주사 바늘; 프로그램 가능한 정전류 펄스 제어 기로부터 복수의 바늘 전극으로 전도성 링크를 제공하는 전기 커넥터; 및 전력 공급원을 포함할 수 있다. 작동자는 지지 구조물에 장착된 복수의 바늘 전극을 잡고 이를 신체 또는 식물의 선택된 조직에 견고하게 삽입할 수 있다. 그런 다음, 거대분자는 피하주사 바늘을 통해 선택된 조직으로 전달된다. 프로그램 가능한 정전류 펄스 제어기가 활성화되고, 정전류 전기 펄스가 복수의 바늘 전극에 인가된다. 인가된 정전류 전기 펄스는 복수의 전극 사이의 세포 내로의 거대분자의 도입을 용이하게 한다. 세포의 과열로 인한 세포 사멸은 정전류 펄스로 인한 조직의 전력 손실을 제한함으로써 최소화된다. Cellectra® 장치 및 시스템은 그 내용이 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 미국 특허 제7,245,963호에 기술되어 있다. CELLECTRA® 장치는 CELLECTRA® 2000 장치 또는 CELLECTRA® 3PSP 장치일 수 있다.
- [0144] MID는 Elgen 1000 시스템(이노비오 파마슈티칼스)일 수 있다. Elgen 1000 시스템은 중공 바늘; 및 유체 전달 수단을 제공하는 장치를 포함할 수 있되, 기구는 상기 신체 조직에 바늘을 삽입하는 동안 본 명세서에 기재된 백

신인 유체를 신체 조직에 동시 발생적으로(예를 들어, 자동으로) 주사하기 위해 사용 중인 유체 전달 수단을 작동시키도록 적합화된다. 장점은 바늘이 삽입되는 동안 유체를 점진적으로 주입할 수 있어 신체 조직을 통해 유체가 보다 고르게 분포된다는 것이다. 또한, 주사하는 동안 경험하는 통증이 더 넓은 영역에 걸쳐 주사되는 유체의 부피 분포로 인해 감소된다고 여겨진다.

[0145] 또한, 유체의 자동 주사는 주사된 유체의 실제 용량의 자동 모니터링 및 등록을 용이하게 한다. 이 데이터는 원하는 경우 문서화 목적으로 제어 장치에 의해 저장될 수 있다.

[0146] 주사 속도는 선형 또는 비선형일 수 있고, 주사는 바늘이 치료될 대상체의 피부를 통해 삽입된 후 그리고 바늘이 신체 조직에 추가로 삽입되는 동안 수행될 수 있음이 이해될 것이다.

[0147] 본 발명의 기구에 의해 유체가 주사될 수 있는 적합한 조직은 종양 조직, 피부 또는 간 조직을 포함하지만, 근육 조직일 수 있다.

[0148] 기구는 신체 조직 내로 바늘의 삽입을 안내하기 위한 바늘 삽입 수단을 추가로 포함한다. 유체 주사 속도는 바늘 삽입의 속도에 의해 제어된다. 이는 바늘 삽입 및 유체 주입이 모두 제어될 수 있어 삽입 속도가 목적하는 바와 같이 주사 속도와 일치될 수 있다는 점에서 이점이 있다. 이는 또한 사용자가 기구를 더 쉽게 조작할 수 있게 한다. 원하는 경우, 바늘을 신체 조직에 자동으로 삽입하는 수단이 제공될 수 있다.

[0149] 사용자는 유체 주사를 시작할 때를 선택할 수 있다. 그러나, 이상적으로는 바늘의 끝이 근육 조직에 도달했을 때 주사가 시작되며, 기구는 유체의 주사를 시작하기에 충분한 깊이로 삽입되었을 때 감지하는 수단을 포함할 수 있다. 이는 바늘이 목적하는 깊이(일반적으로 근육 조직이 시작되는 깊이일 것임)에 도달하면 유체 주사가 자동으로 시작되도록 촉발될 수 있음을 의미한다. 근육 조직이 시작되는 깊이는, 예를 들어, 바늘이 피부층을 통과하기에 충분한 것으로 간주될 수 있는 4mm의 값과 같은 사전 설정된 바늘 삽입 깊이로 취해질 수 있다.

[0150] 감지 수단은 초음파 프로브를 포함할 수 있다. 감지 수단은 임피던스 또는 저항성의 변화를 감지하기 위한 수단을 포함할 수 있다. 이 경우에, 수단은 신체 조직에서 이러한 바늘의 깊이를 기록하지 않을 수 있지만, 바늘이 다른 유형의 신체 조직에서 근육으로 이동할 때 임피던스 또는 저항성의 변화를 감지하도록 적합화될 것이다. 이러한 대안 중 하나는 주사가 시작될 수 있음을 감지하는 비교적 정확하고 간단한 작동 수단을 제공한다. 바늘 삽입의 깊이는 원하는 경우 추가로 기록될 수 있으며, 이는 주사될 유체의 부피가 바늘 삽입의 깊이가 기록될 때 결정되도록 유체의 주사를 제어하는 데 사용될 수 있다.

[0151] 기구는 바늘을 지지하기 위한 베이스; 및 내부에 베이스를 수용하기 위한 하우징을 추가로 포함할 수 있되, 베이스는 베이스가 하우징에 대해 제1 후방 위치에 있을 때 바늘이 하우징 안으로 들어가고, 베이스가 하우징 내에서 제2 전방 위치에 있을 때 바늘이 하우징 외부로 연장되도록 하우징에 대해 이동 가능하다. 이는 하우징이 환자의 피부에 정렬될 수 있고, 그런 다음 베이스에 대해 하우징을 이동시킴으로써 바늘이 환자의 피부에 삽입될 수 있으므로 사용자에게 유리하다.

[0152] 위에 언급된 바와 같이, 유체가 피부에 삽입될 때 바늘의 길이에 걸쳐 균일하게 분포되도록 유체 주사의 제어된 속도를 달성하는 것이 바람직하다. 유체 전달 수단은 제어된 속도로 유체를 주사하도록 적합화된 피스톤 구동 수단을 포함할 수 있다. 피스톤 구동 수단은, 예를 들어, 서보 모터(servo motor)에 의해 활성화될 수 있다. 그러나, 피스톤 구동 수단은 하우징에 대해 축 방향으로 이동함으로써 작동될 수 있다. 유체 전달을 위한 대체 수단이 제공될 수 있음이 이해될 것이다. 따라서, 예를 들어, 제어되거나 또는 제어되지 않은 속도로의 유체 전달을 위해 압착될 수 있는 밀폐된 용기가 주사기 및 피스톤 시스템 대신 제공될 수 있다.

[0153] 위에 기재된 기구는 임의의 유형의 주사에 사용될 수 있다. 그러나, 이는 전기천공법 분야에서 특히 유용한 것으로 예상되므로 바늘에 전압을 인가하기 위한 수단을 추가로 포함할 수 있다. 이는 바늘이 주사뿐만 아니라 전기천공법 동안 전극으로도 사용될 수 있게 한다. 이는 전기장이 주입된 유체와 동일한 영역에 적용된다는 것을 의미하므로 특히 유리하다. 전통적으로, 전기천공법은 이전에 주입된 유체와 정확하게 정렬하는 것이 매우 어렵기 때문에 사용자는 더 넓은 영역에 필요한 것보다 더 많은 부피의 유체를 주입하고 주입된 물질과 전기장 사이의 중첩을 보장하기 위해 더 높은 영역에 전기장을 적용해야 한다는 점에서 문제가 있었다. 본 발명을 사용하면, 전기장과 유체 사이에 양호한 적합성을 달성하면서 주입되는 유체의 부피 및 인가되는 전기장의 크기가 모두 감소될 수 있다.

조합의 사용

[0155] 일부 실시형태에서, 본 발명은 SARS-CoV-2 감염의 치료 또는 SARS-CoV-2 감염과 관련된 질환 또는 장애의 치료

또는 예방을 위한 하나 이상의 추가적인 작용제와 조합된 SARS-CoV-2 항원을 암호화하는 핵산 분자 또는 단편 또는 이의 변이체의 조합을 투여함으로써 이를 필요로 하는 대상체에서 SARS-CoV-2 감염을 치료하거나, 또는 SARS-CoV-2 감염과 관련된 질환 또는 장애를 치료, 방지 및/또는 예방하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, SARS-CoV-2 감염과 관련된 질환 또는 장애는 코로나바이러스 질환 2019(COVID-19), 성인의 다계통 염증성 증후군(MIS-A) 또는 어린이의 다계통 염증성 증후군(MIS-C)이다.

[0156] SARS-CoV-2 항원을 암호화하는 핵산 분자 및 추가적인 작용제는 SARS-CoV-2 항원을 암호화하는 핵산 분자 및 추가적인 작용제의 조합이 둘 다 대상체에 존재하도록 임의의 적합한 방법을 사용하여 투여될 수 있다. 일 실시형태에서, 방법은 SARS-CoV-2 감염의 치료 또는 SARS-CoV-2 감염과 관련된 질환 또는 장애의 치료 또는 예방을 위한 작용제를 포함하는 제1 조성물의 투여 및 SARS-CoV-2 감염의 치료 또는 SARS-CoV-2 감염과 관련된 질환 또는 장애의 치료 또는 예방을 위한 작용제를 포함하는 제1 조성물의 투여 후 1일 미만, 2일 미만, 3일 미만, 4일 미만, 5일 미만, 6일 미만, 7일 미만, 8일 미만, 9일 미만 또는 10일 미만에 SARS-CoV-2 항원을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 제2 조성물의 투여를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 방법은 SARS-CoV-2 항원을 암호화하는 핵산 분자의 투여 후 1일 미만, 2일 미만, 3일 미만, 4일 미만, 5일 미만, 6일 미만, 7일 미만, 8일 미만, 9일 미만 또는 10일 미만에 SARS-CoV-2 감염의 치료 또는 SARS-CoV-2 감염과 관련된 질환 또는 장애의 치료 또는 예방을 위한 작용제를 포함하는 제2 조성물의 투여를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 방법은 SARS-CoV-2 감염의 치료 또는 SARS-CoV-2 감염과 관련된 질환 또는 장애의 치료 또는 예방을 위한 작용제를 포함하는 제1 조성물 및 SARS-CoV-2 항원을 동시에 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 제2 조성물의 투여를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 방법은 SARS-CoV-2 감염의 치료 또는 SARS-CoV-2 감염과 관련된 질환 또는 장애의 치료 또는 예방을 위한 작용제 및 SARS-CoV-2 항원을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 단일 조성물의 투여를 포함할 수 있다.

[0157] 일부 실시형태에서, SARS-CoV-2 감염의 치료 또는 SARS-CoV-2 감염과 관련된 질환 또는 장애의 치료 또는 예방을 위한 작용제는 치료제이다. 일 실시형태에서, 치료제는 항바이러스제이다. 일 실시형태에서, 치료제는 항생제이다.

[0158] 본 발명의 SARS-CoV-2 항원을 암호화하는 핵산 분자와 조합하여 사용될 수 있는 항생제의 비제한적인 예는 아미노글리코시드(예를 들어, 젠타마이신, 아미카신, 토브라마이신), 퀴놀론(예를 들어, 시프로플록사신, 레보플록사신), 세팔로스포린(예를 들어, 세프타지덤, 세페넴, 세포페라준, 세프피롬, 세프토비프롤), 항슈도모나스 페니실린: 카복시페니실린(예를 들어, 카베니실린 및 티카르실린) 및 우레이도페니실린(예를 들어, 메즐로실린, 아즐로실린 및 피페라실린), 카바페넴(예를 들어, 메로페넴, 이미페넴, 도리페넴), 폴리믹신(예를 들어, 폴리믹신 B 및 콜리스틴) 및 모노박탐(예를 들어, 아스트레오남)을 포함한다.

부스터로서의 투여

[0160] 일 실시형태에서, 면역원성 조성물은 COVID-19, 성인의 다계통 염증성 증후군(MIS-A) 또는 어린이의 다계통 염증성 증후군(MIS-C)을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 SARS-CoV-2 감염의 치료 또는 SARS-CoV-2 감염과 관련된 질환 또는 장애의 치료 또는 예방을 위한 초기 작용제 또는 백신의 투여 후 부스터 백신으로서 투여된다. 일 실시형태에서, 부스터 백신은 COVID-19, 성인의 다계통 염증성 증후군(MIS-A) 또는 어린이의 다계통 염증성 증후군(MIS-C)을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 SARS-CoV-2 감염의 치료 또는 SARS-CoV-2 감염과 관련된 질환 또는 장애의 치료 또는 예방을 위한 초기 작용제 또는 백신의 투여 후 적어도 1회, 적어도 2회, 적어도 3회, 적어도 4회 또는 적어도 5회 투여된다. 일 실시형태에서, 부스터 백신은 COVID-19, 성인의 다계통 염증성 증후군(MIS-A) 또는 어린이의 다계통 염증성 증후군(MIS-C)을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 SARS-CoV-2 감염의 치료 또는 SARS-CoV-2 감염과 관련된 질환 또는 장애의 치료 또는 예방을 위한 초기 작용제 또는 백신의 투여 후 적어도 8시간, 적어도 12시간, 적어도 16시간, 적어도 20시간, 적어도 24시간, 적어도 36시간, 적어도 48시간, 적어도 60시간, 적어도 72시간, 적어도 4일, 적어도 5일, 적어도 6일, 적어도 1주 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 4개월, 적어도 5개월, 적어도 6개월, 적어도 7개월, 적어도 8개월, 적어도 9개월, 적어도 10개월, 적어도 11개월, 적어도 1년 또는 1년 이상에 투여된다.

검정에서의 사용

[0162] 일부 실시형태에서, 본 발명의 핵산 분자 또는 암호화된 항원은 생체내 또는 시험관내 검정에 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 핵산 분자 또는 암호화된 항원은 항-SARS-CoV-2 스파이크 항체의 존재를 검출하기 위한 검정에 사용될 수 있다. 핵산 분자 또는 암호화된 항원이 통합될 수 있는 예시적인 검정은 웨스턴 블롯, 점 블롯, 표면 플라즈몬 공명 방법, 유세포 분석 방법, 다양한 면역검정, 예를 들어, 면역조직화학 검정, 면역세포화학

검정, ELISA, 포획 ELISA, 효소-결합 면역점(ELISpot) 검정, 샌드위치 검정, 효소 면역검정, 방사선 면역검정, 형광 면역검정 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않으며, 이들 모두는 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Harlow et al., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Harlow et al., 1999, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY] 참조.

[0163] 일 실시형태에서, 본 발명의 SARS-CoV-2 스파이크 항원 또는 이의 단편은 T-세포성 면역 반응을 평가하기 위해 유세포 분석과 조합된 세포내 사이토카인 염색에 대한 검정에 사용될 수 있다. 이 검정은 T-세포에 반응하는 것과 관련된 여러 표현형, 분화 및 기능적 매개변수, 특히, 다중 효과기 사이토카인의 발현을 동시에 평가할 수 있다. 이러한 속성은 본 발명의 백신에 의해 유도되는 T-세포성 면역 반응의 평가에 특히 적합하게 만든다.

[0164] 일 실시형태에서, 본 발명의 SARS-CoV-2 스파이크 항원 또는 이의 단편은 ELISpot 검정에서 사용될 수 있다. ELISpot 검정은 단일-세포 수준에서 사이토카인-분비 세포의 빈도를 측정하는 매우 민감한 면역검정이다. 이 검정에서, 세포는 자극의 존재 또는 부재하에 특정 포획 항체로 코팅된 표면에서 배양된다. 일 실시형태에서, 본 발명의 SARS-CoV-2 스파이크 항원 또는 이의 단편은 ELISpot 검정에서 자극으로서 사용될 수 있다.

진단 방법

[0166] 일부 실시형태에서, 본 발명은 SARS-CoV-2 감염이 있거나 또는 SARS-CoV-2 항체를 갖는 대상체를 진단하는 방법에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 방법은 대상체로부터의 샘플을 본 발명의 SARS-CoV-2 항원 또는 SARS-CoV-2 항원의 발현을 위한 핵산 분자를 포함하는 세포와 접촉시키는 단계 및 본 발명의 SARS-CoV-2 항원에 대한 항-SARS-CoV-2 스파이크 항체의 결합을 검출하는 단계를 포함한다. 이러한 실시형태에서, 본 발명의 항원 또는 이의 단편에 대한 대상체의 샘플에 존재하는 항-SARS-CoV-2 스파이크 항체의 결합은 대상체가 현재 감염되었거나 또는 이전에 SARS-CoV-2에 감염된 적이 있음을 나타낼 것이다.

키트 및 제조 물품

[0168] 위에 기재된 백신 접종 방법을 사용하여 대상체를 치료하는 데 사용될 수 있는 키트가 본 명세서에 제공된다. 키트는 본 명세서에 개시된 면역원성 조성물을 포함할 수 있다.

[0169] 키트는 또한 위에 기재된 백신 접종 방법 및/또는 키트 사용 방법을 수행하기 위한 지침을 포함할 수 있다. 키트에 포함된 지침은 패키징 물질에 부착될 수 있거나 또는 패키지 삽입물로 포함될 수 있다. 지침은 전형적으로 서면 또는 인쇄된 자료이지만, 이로 제한되지 않는다. 지침을 저장하고 최종 사용자에게 이를 전달할 수 있는 임의의 매체가 본 개시내용에 의해 상정된다. 이러한 매체는 전자 저장 매체(예를 들어, 자기 디스크, 테이프, 카트리지), 광학 매체(예를 들어, CD ROM) 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "지침"은 지침을 제공하는 인터넷 사이트의 주소를 포함할 수 있다.

[0170] 본 명세서에 개시된 면역원성 조성물을 포함하는 제조 물품이 본 명세서에 추가로 제공된다. 일부 실시형태에서, 제조 물품은 용기, 예컨대, 바이알, 선택적으로 일회용 바이알이다. 일 실시형태에서, 제조 물품은 투여될 본 명세서에 개시된 면역원성 조성물을 포함하는 마개가 장착된 일회용 유리 바이알이다. 일부 실시형태에서, 바이알은 주사기로 뚫을 수 있는 마개 및 밀봉부를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제조 물품은 주사기이다.

[0171] 본 발명은 하기 비제한적인 예에 의해 예시되는 여러 양태를 갖는다.

실시예

실시예 1

물질 및 방법:

[0175] 세포주. 인간 배아 신장(HEK)-293T(ATCC® CRL-3216™) 및 아프리카 녹색 원숭이 신장 COS-7(ATCC® CRL-1651™) 세포주를 ATCC(버지니아주 올드 타운 머내서스 소재)로부터 얻었다. 모든 세포주를 10% 소 태아 혈청(FBS) 및 페니실린-스트렙토마이신이 보충된 DMEM에 유지하였다.

[0176] 시험관내 단백질 발현(웨스턴 블롯). 인간 배아 신장 세포인 293T를 배양하고, 이전에 설명된 바와 같이 형질감염시켰다(Yan, et al. Enhanced cellular immune responses elicited by an engineered HIV-1 subtype B consensus-based envelope DNA vaccine. *Mol Ther.* 2007;15(2):411-421). 293T 세포를 제조업체의 프로토콜에 따라 TurboFectin8.0(오리젠(Origen)) 형질감염 시약을 사용하여 pDNA로 형질감염시켰다. 48시간 후, 세포 용해물을 변형된 RIPA 세포 용해 완충액을 사용하여 수확하였다. 단백질을 4% 내지 12% BIS-TRIS 겔(씨모피셔 사

이언티픽(ThermoFisher Scientific))에서 분리하였다. 옮긴 후, 블롯을 항-SARS-CoV 스파이크 단백질 다중클론 항체(노부스 바이올로지칼스(Novus Biologicals))와 함께 인큐베이션한 다음, 서양고추냉이 과산화효소(HRP)-접합 항-마우스 IgG(지이 아머샴(GE Amersham))로 시각화하였다.

[0177] 형질감염된 293T 세포의 면역형광. 스파이크 단백질 발현의 시험관내 염색을 위해, 293T 세포를 4-웰 유리 슬라이드(랩-텍(Lab-Tek))에서 배양하고, 제조업체의 프로토콜에 따라 TurboFect in8.0(오리젠) 형질감염 시약을 사용하여 3 μ g/웰의 pDNA로 형질감염시켰다. 세포를 실온(실온)에서 10분 동안 10% 중성-완충 포르말린(비비씨 바이오케미칼(BBC Biochemical), 워싱턴 스테이트 소재)으로 형질감염시킨 후 48시간 동안 고정시킨 다음, PBS로 세척하였다. 염색 전, 캠버 슬라이드를 0.3%(v/v) Triton-X(시그마(Sigma)), PBS 중 2%(v/v) 당나귀 혈청으로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 세포를 PBS 중 1%(w/v) BSA(시그마), 2%(v/v) 당나귀 혈청, 0.3%(v/v) Triton-X(시그마) 및 0.025%(v/v) 1 g/ml 소듐 아자이드(시그마)에 희석된 토끼 항-SARS-CoV 스파이크 단백질 다중클론 항체(노부스 바이올로지칼스)로 실온에서 2시간 동안 염색하였다. 슬라이드를 PBS로 5분 동안 3회 세척한 다음, 당나귀 항-토끼 IgG AF488(라이프 테크놀로지스(Life Technologies), A21206)로 실온에서 1시간 동안 염색하였다. 슬라이드를 다시 세척하고, 고정시키고, DAPI-플로오로마운트(서던바이오텍(SouthernBiotech))로 덮었다.

[0178] 시험관내 RNA 발현(qRT-PCR). 연속 희석된 플라스미드로 COS-7을 형질감염시킨 후 역전사 및 PCR을 사용하여 세포로부터 추출된 총 RNA를 분석함으로써 플라스미드의 시험관내 mRNA 발현을 입증하였다. FuGENE® 6 형질감염 시약(프로메가(Promega))을 사용하여 4가지 농도의 플라스미드의 형질감염을 수행하였으며, 그 결과 최종 질량은 80 ng/웰 내지 10 ng/웰의 범위였다. 형질감염을 2회 반복하여 수행하였다. 인큐베이션 18시간 내지 26시간 후, 세포를 RLT 완충액(퀴아젠)으로 용해시켰다. 총 RNA를 키트 지침에 따라 퀴아젠 RNeasy 키트를 사용하여 각 웰로부터 단리하였다. 생성된 RNA 농도를 OD_{260/280}에 의해 결정하였으며, RNA 샘플을 10 ng/ μ l로 희석하였다. 그런 다음, 100나노그램의 RNA를 키트 지침에 따라 고용량 cDNA 역전사(RT) 키트(어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems))를 사용하여 cDNA로 전환하였다. RNA는 포함하지만 역전사효소는 포함하지 않는 RT 반응(마이너스 RT)을 플라스미드 DNA 또는 세포 게놈 DNA 샘플 오염에 대한 대조군으로 포함하였다. 그런 다음, 8 μ l의 샘플 cDNA를 표적 서열에 특이적인 프라이머 및 프로브(pGX9501 정방향 - CAGGACAAGAACACACAGGAA(서열번호 7); pGX9501 역방향 - CAGGCAGGATTGGGAGAAA(서열번호 8); pGX9501 프로브 - ACCCATCAAGGACTTGGAGG(서열번호 9); 및 pGX9503 정방향 - AGGACAAGAACACACAGGAAG(서열번호 10); pGX9503 역방향 - CAGGATCTGGAGAAGTTGAAG(서열번호 11); pGX9503 프로브 - ACACCACCCATCAAGGACTTGGG(서열번호 12))를 사용하여 PCR을 수행하였다. 별도의 반응에서, 동일한 양의 샘플 cDNA를 COS-7 세포주 β -액틴 서열용으로 설계된 프라이머 및 프로브(β -액틴 정방향 - GTGACGTGGACATCCGTAAA(서열번호 13); β -액틴 역방향 - CAGGGCAGTAATCTCCTTCTG(서열번호 14); β -액틴 프로브 - TACCTGGCATTGCTGACAGGATG(서열번호 15))를 사용하여 PCR을 수행하였다. 프라이머 및 프로브는 인테그레이티드 디엔에이 테크놀로지스 인크.(Integrated DNA Technologies, Inc.)에서 합성하였고, 프로브는 56-FAM 및 Black Hole Quencher 1로 표지하였다. 반응은 ABI Fast Advance 2X(Cat. No. 4444557)를 사용하였으며, 최종 정방향 및 역방향 프라이머 농도는 1 μ M이었고, 프로브 농도는 0.3 μ M이었다. QuantStudio™ 7 Flex 실시간 PCR 스튜디오 시스템(어플라이드 바이오시스템즈)을 사용하여, 샘플을 먼저 95°C에서 1분 동안 유지한 다음, 95°C에서 1초 및 60°C에서 20초로 이루어진 각 주기로 PCR을 40회 수행하였다. PCR 후, 증폭 결과를 다음과 같이 분석하였다. 음성 형질감염 대조군(negative transfection control: NTC), 마이너스 RT 대조군 및 NTC를 각각의 적응증에 대해 자세히 조사하였다. INO-4800 SARS-CoV-2 표적 mRNA 및 β -액틴 mRNA에 대한 각 형질감염 농도의 임계 사이클(threshold cycle: C_T)를 자동 역치 설정을 사용하여 QuantStudio™ 소프트웨어로부터 생성하였다. 음성 형질감염 대조군과 비교하여 임의의 플라스미드-형질감염된 웰에서의 발현이 5 C_T보다 큰 경우, 플라스미드는 mRNA 발현에 대해 활성인 것으로 간주하였다. 동물. 암컷 6주령 C57/BL6 및 BALB/c 마우스는 찰스 리버 래보래토리즈(Charles River Laboratories)(펜실베니아주 멜번 소재) 및 잭슨 래보래토리(Jackson Laboratory)(메인주 바 하버 소재)로부터 구입하였다. 암컷 8주령 Hartley 기니피그는 엘름 힐 랩스(Elm Hill Labs)(매사추세츠주 첼름스퍼드 소재)로부터 구입하였다. 모든 동물은 위스타 연구소 동물 시설 또는 애큐랩 라이프 사이언시스(Acculab Life Sciences)(캘리포니아주 샌디에고 소재)의 동물 시설에 수용하였다. 모든 동물 시험 및 연구는 모든 관련 윤리 규정을 준수하였으며, 연구는 위스타 연구소 또는 애큐랩 기관 동물 관리 및 사용 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee: IACUC)의 윤리적 승인을 받았다. 마우스 연구의 경우, 제0일에, 2.5 μ g, 10 μ g 또는 25 μ g의 pDNA의 용량을 바늘 주사에 의해 전방 경골(tibialis anterior: TA) 근육에 투여한 후 CELLECTRA® 생체내 전기천공법(EP)을 수행하였다. CELLECTRA® EP 전달은 0.2 Amp 정전류의 2 세트의 펄스로 이루어진다. 2차 펄스 세트는 3초 지연된다. 각 세트 내에는 펄스 사이에 198ms 지연이 있는 2개

의 52ms 펄스가 있다. 제0일 및 제14일에, 혈액을 수집하였다. 세포성 면역 반응의 분석을 위해, 면역화 후 제4일, 제7일 및 제10일에 병행 그룹의 마우스를 연속으로 희생시켰다. 기니피그 연구의 경우, 제0일에, 100 μ g의 pDNA를 Mantoux 주사에 의해 피부에 투여한 후 CELLECTRA® 생체내 EP를 수행하였다.

[0179] 항원 결합 ELISA. ELISA를 수행하여 혈청 항체 결합 역가를 결정하였다. Nunc ELISA 플레이트를 Dulbecco의 포스페이트-완충 식염수(DPBS) 중 1 μ g/ml 재조합 단백질 항원으로 4°C에서 밤새 코팅하였다. 플레이트를 3회 세척한 다음, 0.05% Tween 20이 포함된 PBS 중 3% 소 혈청 알부민(BSA)으로 37°C에서 2시간 동안 차단하였다. 그런 다음, 플레이트를 세척하고, 마우스 또는 기니피그 혈청의 연속 희석액과 함께 인큐베이션하고, 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 다시 세척한 다음, 서양고추냉이 과산화효소(HRP)-접합 항-기니피그 IgG 2차 항체(시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), cat. A7289) 또는 HRP-접합 항-마우스 IgG 2차 항체(시그마-알드리치)의 1:10,000 희석액과 함께 인큐베이션하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 최종 세척 후, 플레이트를 SureBlue™ TMB 1-성분 과산화효소 기질(케이피엘(KPL), cat. 52-00-03)을 사용하여 발색시키고, 반응을 TMB 정지 용액(케이피엘, cat. 50-85-06)으로 중단시켰다. Synergy™ HTX 플레이트 판독기(바이오텍 인스트루먼츠(BioTek Instruments), 베몬트주 하이랜드 파크 소재)를 사용하여 30분 내에 450nm 파장에서 플레이트를 판독하였다. 결합 항체 종말점 역가(EPT)를 이전에 설명된 바와 같이 계산하였다(Bagarazzi ML, Yan J, Morrow MP, et al. Immunotherapy against HPV16/18 generates potent TH1 and cytotoxic cellular immune responses. Sci Transl Med. 2012;4(155):155ra138). 테스트된 결합 항원은 SARS-CoV-2 항원: S1 스파이크 단백질(시노 바이올로지컬(Sino Biological) 40591-V08H), S1+S2 ECD 스파이크 단백질(시노 바이올로지컬 40589-V08B1), RBD(텍사스 대학, 오스틴 소재(맥렐란 랩.(McLellan Lab.))); SARS-CoV 항원: 스파이크 S1 단백질(시노 바이올로지컬 40150-V08B1), S(1-1190)(이뮨 테크(면역 Tech) IT-002-001P) 및 스파이크 C-말단(메리디안 라이프 사이언스(Meridian Life Science) R18572)을 포함하였다.

[0180] ACE2 경쟁 ELISA. 마우스 연구의 경우, ELISA를 수행하여 인간 Fc 태그를 갖는 인간 ACE2에 대한 혈청 IgG 항체 경쟁을 결정하였다. Nunc ELISA 플레이트를 1X PBS 중 1 μ g/ml 토키 항-His6X로 실온(RT)에서 4시간 내지 6시간 동안 코팅하고, 세척 완충액(1X PBS 및 0.05% Tween® 20)으로 4회 세척하였다. 플레이트를 차단 완충액(1X PBS, 0.05% Tween® 20, 5% 연유 및 1% FBS)으로 4°C에서 밤새 차단하였다. 플레이트를 세척 완충액으로 4회 세척한 다음, 10 μ g/ml-1로 C-말단 His 태그(시노 바이오로직스(Sino Biologics), cat. 40589-V08B1)를 포함하는 전장(S1+S2) 스파이크 단백질과 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척한 다음, 인간 Fc 태그(ACE2-IgHu)를 갖는 0.1 μ g/ml-1 재조합 인간 ACE2와 혼합된 정제된 마우스 IgG의 연속 희석액을 실온에서 1시간 내지 2시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 다시 세척한 다음, 서양고추냉이 과산화효소(HRP) 접합 항-인간 IgG 2차 항체(베틸(Bethyl), cat. A80-304P)의 1:10,000 희석액과 함께 인큐베이션하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 최종 세척 후, 플레이트를 1-단계 울트라 TMB-ELISA 기질(써모(Thermo), cat. 34029)을 사용하여 발색시키고, 1M 황산으로 반응을 중단시켰다. SpectraMax Plus 384 마이크로플레이트 판독기(몰리큘러 디바이시스(Molecular Devices), 캘리포니아주 서니베일 소재)를 사용하여 30분 내에 450nm 파장에서 플레이트를 판독하였다. 경쟁 곡선을 플로팅하고, 다중 t-검정과 함께 Prism 8 분석 소프트웨어를 사용하여 곡선 아래 면적(AUC)을 계산하여 통계적 유의성을 결정하였다.

[0181] 기니피그 연구의 경우, 96웰 절반 면적 검정 플레이트(코스터(Costar))를 1x DPBS(써모피셔)에 희석된 5 μ g/ml의 SARS-CoV-2 스파이크 S1+S2 단백질(시노 바이올로지컬)의 웰당 25 μ l로 4°C에서 밤새 코팅하였다. 플레이트를 0.05% TWEEN® 20(시그마)이 포함된 1xPBS 완충액으로 세척하였다. 0.05% TWEEN® 20이 포함된 1x PBS 중 3%(w/v) BSA(시그마)의 웰당 100 μ l를 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 혈청 샘플을 0.05% TWEEN이 포함된 1x PBS 중 1%(w/v) BSA에 1:20으로 희석하였다. 검정 플레이트를 세척한 후, 25 μ l/웰의 희석된 혈청을 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인간 재조합 ACE2-Fc-태그(시노바이올로지컬)를 희석된 혈청에 직접 첨가한 후, 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척하고, 웰당 25 μ l의 1:10,000 희석된 염소 항-hu Fc 단편 항체 HRP(베틸, A80-304P)를 검정 플레이트에 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 발색을 위해 SureBlue/TMB 정지 용액(케이피엘, MD)을 사용하였고, O.D.를 450nm에서 기록하였다.

[0182] SARS-CoV-2 슈도바이러스 중화 검정. SARS-CoV-2 슈도형 바이러스는 IgE-SARS-CoV-2 S 플라스미드(진스크립트(Genscript)) 및 pNL4-3.Luc.R-E-플라스미드(NIH AIDS 시약)를 1:1의 비로 사용하여 GeneJammer(애질런트(Agilent))로 형질감염된 HEK293T 세포를 사용하여 생산하였다. 형질감염 48시간 후, 형질감염 상청액을 수집하고, FBS로 12% 최종 부피로 농축시키고, 멸균 여과하고(밀리포어 시그마(Millipore Sigma)), -80°C에서 보관하기 위해 분취하였다. SARS-CoV-2 슈도형 바이러스의 역가를 측정하였으며, 감염 72시간 후 세포 단독에 비해 50

배 이상의 상대 발광 단위(RLU)를 산출하였다. INO-4800 백신이 접종된 그룹 및 미경험 그룹으로부터의 마우스 혈청을 56°C에서 15분 동안 열 불활성화시키고, 검정을 위해 1:10 희석액에서 시작하여 3배로 연속 희석하였다. 혈청을 고정된 양의 SARS-CoV-2 슈도형 바이러스와 함께 90분 동안 인큐베이션하였다. ACE2를 안정적으로 발현하는 HEK293T 세포를 90분 후에 첨가하고, 표준 인큐베이터(37% 습도, 5% CO₂)에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. 감염 후, 세포를 britelite™ 및 발광 리포터 유전자 검정 시스템(퍼킨 엘머(Perkin Elmer) 카탈로그 번호 6066769)을 사용하여 용해시키고, 바이오텍 플레이트 판독기를 사용하여 상대 발광 단위(RLU)를 측정하였다. 중화 역가(ID₅₀) 세포 대조군 웰에서 배경 RLU를 뺀 후 바이러스 대조군 웰의 RLU와 비교하여 RLU가 50% 감소한 혈청 희석액으로 계산하였다.

[0183]

SARS-CoV-2 야생형 바이러스 중화 검정. SARS-CoV-2/오스트레일리아/VIC01/2020 단리주 중화 검정을 영국 공중 보건국(Public Health England)(영국 포튼 다운 소재)에서 수행하였다. 56°C에서 30분 동안 열-불활성화된 혈청 샘플에서 중화 바이러스 역가를 측정하였다. SARS-CoV-2(오스트레일리아/VIC01/2020 단리주)(Caly et al., Isolation and rapid sharing of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) from the first patient diagnosed with COVID-19 in Australia. *Med. J. Aust.* (2020) doi: 10.5694/mja2.50569; 온라인 공개: 2020년 4월 13일)를 933 pfu/ml의 농도로 희석하고, 96-웰 V형-바닥 플레이트에서 1:10에서 1:320의 2배 혈청 희석액과 함께 25mM HEPES 완충액을 포함하는 1% FCS/MEM에 50:50으로 혼합하였다. 플레이트를 1시간 동안 가습된 상자에서 37°C에서 인큐베이션한 후, 바이러스를 10% FCS/MEM에 웰당 1.5×10^5 개 Vero E6 세포가 전날 시딩된 2회 DPBS-세척된 24-웰 플레이트의 웰로 옮겼다. 바이러스를 37°C에서 추가의 시간 동안 흡착시키고, 플라크 검정 오버레이 배지(1X MEM/1.5% CMC/4% FCS 최종)로 오버레이하였다. 가습된 상자에서 37°C에서 5일 인큐베이션 후, 플레이트를 고정하고 염색하여 플라크를 계수하였다. 바이러스 단독 대조군 웰에 대해 Spearman-Karber 공식을 사용하여 중화 역가 중앙값(ND50)을 결정하였다.

[0184]

SARS-CoV-2/WH-09/인간/2020 단리주 중화 검정을 중화인민공화국 국가위생건강위원회(National Health Commission)의 승인을 받은 중국 의과대학(Chinese Academy of Medical Sciences: CAMS) 실험실 동물 과학 연구소에서 수행하였다. 시드 SARS-CoV-2(SARS-CoV-2/WH-09/인간/2020) 스톡 및 바이러스 단리주 연구를 10% 소태아 혈청(FBS), 100 IU/ml 폐니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신이 보충된 Dulbecco의 변형된 이글 배지(DMEM, 인비트로젠(Invitrogen), 미국 칼즈배드 소재)에 유지하고, 36.5°C, 5% CO₂에서 인큐베이션된 Vero E6 세포에서 수행하였다. 바이러스 역가를 표준 50% 조직 배양 용량(TCID50) 검정을 사용하여 결정하였다. 면역화된 동물로부터 수집된 혈청 샘플을 56°C에서 30분 동안 불활성화시키고, 세포 배양 배지로 2-배 단계로 연속 희석하였다. 희석된 샘플을 96-웰 플레이트에서 100 TCID50의 바이러스 혼탁액과 1:1의 비로 혼합한 후 5% CO₂ 인큐베이터에서 36.5°C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음 $1-2 \times 10^4$ 개 Vero 세포를 혈청-바이러스 혼합물에 첨가하고, 플레이트를 5% CO₂ 인큐베이터에서 36.5°C에서 3일 내지 5일 동안 인큐베이션하였다. 각 웰의 세포변성 효과(Cytopathic effect: CPE)를 현미경으로 기록하고, 중화 역가를 50% 보호 조건의 희석 횟수로 계산하였다.

[0185]

기관지폐포 세척액 수집. 100 µm EDTA, 0.05% 소듐 아자이드, 0.05% Tween® 20 및 1x 프로테이스 저해제(퍼어스(Pierce))(점막 프랩 용액(mucosal prep solution: MPS))를 포함하는 700µl 내지 1000µl의 얼음 냉각된 PBS를 사용하여 끝이 둥툭한 바늘로 안락사시키고 방혈된 마우스의 폐를 세척하여 기관지폐포 세척액(BAL)을 수집하였다. 기관에 삽입된 16G 카테터를 통해 20ml의 MPS로 기니피그의 폐를 세척하였다. 수집된 BAL액을 검정할 때까지 -20°C에서 보관하였다.

[0186]

IFN-γ ELISpot. 마우스: 마우스의 비장을 10% FBS(R10) 및 폐니실린/스트렙토마이신이 보충된 RPMI1640 배지에서 개별적으로 수집하고, 단일 세포 혼탁액으로 처리하였다. 세포 웰릿을 5ml의 ACK 용해 완충액(라이프 테크놀로지스, 캘리포니아주 칼즈배드 소재)으로 실온에서 5분 동안 재현탁시킨 다음, PBS를 첨가하여 반응을 중단시켰다. 샘플을 다시 1,500 g에서 10분 동안 원심분리한 다음, 세포 웰릿을 R10에 재현탁시킨 다음, ELISpot 검정에 사용하기 전에 45µm 나일론 필터에 통과시켰다. ELISpot 검정을 마우스 IFN-γ ELISpot^{PLUS} 플레이트(맵 테크)를 사용하여 수행하였다. 포획 항체로 사전 코팅된 96-웰 ELISpot 플레이트를 R10 배지로 4°C에서 밤새 차단하였다. 200,000개의 마우스 비장세포를 각 웰에 플레이팅하고, SARS-CoV-2, SARS-CoV 또는 MERS-CoV 스파이크 단백질로부터의 9개 아미노산과 중첩되는 15량체 웹타이드 폴(단백질당 5개의 웹타이드 폴)로 20시간 동안 자극하였다. 추가적으로, 면역우세 반응을 확인하도록 설계된 매트릭스에서 웹타이드 폴을 사용하여 매트릭스 매핑을 수행하였다. 세포를 RPMI + 10% FBS(R10)에서 각 웹타이드/웰의 최종 농도 5µl로 자극하였다. 반점은 제

조업체의 지침에 기초하여 개발하였다. R10 및 세포 자극 칵테일(인비트로젠)을 각각 음성 및 양성 대조군으로 사용하였다. 반점은 스캔하고, ImmunoSpot™ CTL 판독기로 정량화하였다. 백만 세포당 반점-형성 단위(SFU)는 음성 대조군 웰을 빼서 계산하였다.

[0187] 유세포 분석. 세포내 사이토카인 염색을 37°C, 5% CO₂에서 6시간 동안 SARS-CoV-2 S 단백질에 걸쳐 있는 중첩 웹타이드로 자극된 BALB/c 및 C57BL/6 마우스로부터 수확된 비장세포에서 수행하였다. 세포는 명시되지 않는 한 비디 사이언시스(BD Biosciences)의 다음 항체로 염색하였으며, 희석은 팔호 안에 명시되어 있다: FITC 항-마우스 CD107a(1:100), PerCP-Cy5.5 항-마우스 CD4(1:100), APC 항-마우스 CD8a(1:100), ViViD 염료(1-40)(LIVE/DEAD® Fixable Violet 사멸 세포 염색 키트; 인비트로젠, L34955), APC-Cy7 항-마우스 CD3e(1:100) 및 BV605 항-마우스 IFN-γ(1:75)(이바이오사이언시스(eBiosciences)). 포볼 미리스테이트 아세테이트(Phorbol Myristate Acetate: PMA)를 양성 대조군으로 사용하였으며, 완전 배지판을 음성 대조군으로 사용하였다. 세포를 세척하여 고정하고, FACS CANTO(비디 사이언시스)에 이어 FlowJo 소프트웨어(플로우조 엘엘씨(FlowJo LLC), 오리건주 애슐랜드 소재) 분석을 사용하여 세포 이벤트를 획득하였다.

[0188] 통계. 모든 통계적 분석은 GraphPad Prism 7 또는 8 소프트웨어(캘리포니아주 라 호야 소재)를 사용하여 수행하였다. 이 데이터는 p < 0.05인 경우 유의미한 것으로 간주하였다. 모든 그래프의 선은 평균값을 나타내고, 오차막대는 표준 편차를 나타낸다. 분석으로부터 제외된 샘플 또는 동물은 없었다. 동물 연구에 대해 무작위화는 수행하지 않았다. 각 실험을 수행하기 전 샘플 및 동물을 맹검하지 않았다.

결과

SARS-CoV-2 DNA 백신 작제물의 설계 및 합성

[0191] GISAID(Global Initiative on Sharing All Influenza Data: 국제 인플루엔자 정보 공유 기구)에 공개된 처음 4 개의 이용 가능한 SARS-CoV-2 완전 게놈 서열로부터 4개의 스파이크 단백질 서열을 검색하였다. 3개의 스파이크 서열이 100% 일치하였고, 하나는 이상치(다른 서열과 98.6% 서열 동일성)로 간주되었다. 서열 정렬을 수행한 후, SARS-CoV-2 스파이크 당단백질 서열("Covid-19 스파이크 항원"; 서열번호 1)을 생성하고, N-말단 IgE 리더 서열을 첨가하였다. 발현 및 면역원성을 향상시키기 위해 SARS-CoV-2 IgE-스파이크를 암호화하는 고도로 최적화된 DNA 서열을 본 명세서의 다른 곳에 기재된 바와 같이 생성하였다. SARS-CoV-2 스파이크 이상치 당단백질 서열("Covid-19 스파이크-OL 항원"; 서열번호 4)을 생성하고, N-말단 IgE 리더 서열을 첨가하였다. 최적화된 DNA 서열을 합성하고, BamHI 및 XhoI로 소화시키고, 인간 사이토메갈로바이러스 극초기 프로모터 및 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호의 제어하에 발현 벡터 pGX0001에 클로닝하였다. 생성된 플라스미드를 각각 3개의 일치 서열 및 이상치 서열로부터 SARS-CoV-2 S 단백질을 암호화하도록 설계된 pGX9501 및 pGX9503으로 명명하였다(도 1a).

합성 DNA 백신 작제물의 시험관내 특성화

[0193] pGX9501 및 pGX9503으로 형질감염된 COS-7 세포에서 RNA 수준에서 암호화된 SARS-CoV-2 스파이크 이식유전자의 발현을 측정하였다. 형질감염된 COS-7 세포로부터 추출된 총 RNA를 사용하여, 스파이크 이식유전자의 발현을 RT-PCR로 확인하였다(도 1b). 293T 세포에서 시험관내 스파이크 단백질 발현을 세포 용해물에서 SARS-CoV S 단백질에 대한 교차-반응성 항체를 사용하여 웨스턴 블로트 분석에 의해 측정하였다. pGX9501 또는 pGX9503 작제물로 형질감염된 HEK-293T 세포 용해물의 웨스턴 블로트는 예측된 S 단백질 분자량이 140kDa 내지 142kDa에 근접한 밴드를 나타내었으며, S 단백질의 22개의 잠재적인 N-연결된 글리칸으로 인한 약간의 이동 가능성이 있다(도 1c). 면역형광 연구에서, S 단백질은 pGX9501 또는 pGX9503으로 형질감염된 293T 세포에서 검출되었다(도 1d). 요약하면, 시험관내 연구는 후보 백신 작제물로 세포주를 형질감염시킨 후 RNA 및 단백질 수준 모두에서 스파이크 단백질의 발현을 보여주었다.

[0194] **마우스의 체액성 면역 반응.** 이상치인 pGX9503에 비해 더 넓은 범위를 제공할 수 있기 때문에 면역원성 연구를 진행하기 위한 백신 작제물로 pGX9501을 선택하였다. pGX9501은 이후에 INO-4800으로 명명하였다. INO-4800의 면역원성을 CELLECTRA® 전달 장치를 사용하여 전방 경골 근육에 투여 후 BALB/c 마우스에서 평가하였다 (Sardesai & Weiner, Curr. Opin. Immunol., 23, 421-429 (2011)). INO-4800으로 면역화된 마우스 그룹으로부터의 혈청의 반응성을 SARS-CoV-2 및 SARS-CoV 항원 패널에 대해 측정하였다(도 2). 분석은 INO-4800-면역화된 마우스의 혈청에서 SARS-CoV S 단백질 항원에 대한 제한된 교차-반응성과 함께 SARS-CoV-2 S 단백질 항원에 대한 IgG 결합을 보여주었다. 재조합 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 S1+S2 영역(도 3a 및 도 3b) 및 재조합 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 수용체 결합 도메인(RBD)(도 3c 및 도 3d)에 대해 pDNA로 면역화된 마우스에서 혈청 IgG 결합 종말점 역가를 측정하였다. INO-4800의 단일 투여로 면역화한 후 제14일에 마우스의 혈청에서 종말점 역가

가 관찰되었다(도 3b, 도 3c, 도 3d).

[0195]

중화 검정. SARS-CoV-2 스파이크 단백질을 디스플레이 하는 pNL4-3.Luc.R-E-기반 슈도바이러스를 사용한 중화 검정을 개발하였다. 중화 역가를 RLU 신호의 감소가 없는 대조군과 비교하여 상대 루시퍼레이스 단위(RLU)의 감소에 의해 검출하였다. BALB/c 마우스를 제0일 및 제14일에 INO-4800으로 2차 면역화시키고, 2차 면역화 후 제7일에 혈청을 수집하였다. 슈도바이러스를 마우스 혈청의 연속 희석액과 함께 인큐베이션하고, 혈청-바이러스 혼합물을 인간 ACE2 수용체를 안정적으로 발현하는 293T 세포(ACE2-293T)에 72시간 동안 첨가하였다. 92.2의 중화 ID50 평균 역가가 INO-4800 면역화된 마우스에서 관찰되었다(도 4a 및 도 4b). 대조군 동물에 대해서는 RLU의 감소가 관찰되지 않았다. 중화 역가를 플라크 감소 중화 테스트(plaque reduction neutralization test: PRNT) 검정에 의해 2종의 야생형 SARS-CoV-2 바이러스 균주에 대해 추가적으로 측정하였다. INO-4800 면역화된 BALB/c 마우스로부터의 혈청은 SARS-CoV-2/WH-09/인간/2020 및 SARS-CoV-2/오스트레일리아/VIC01/2020 바이러스 균주 모두를 각각 97.5 및 128.1의 평균 ND50 역가로 중화하였다(표 1). 살아있는 바이러스 중화 역가를 또한 동일한 INO-4800 면역화 양생법에 따라 C57BL/6 마우스에서 평가하였다. INO-4800 면역화된 C57BL/6 마우스로부터의 혈청은 야생형 SARS-CoV-2 바이러스를 340의 평균 ND50 역가로 중화하였다(표 1).

표 1

마우스 및 기니피그에 INO-4800 투여 후 혈청 중화 활성.

모델	백신	N	면역화 양생법	샘플 시점	중화 검정	혈청 ND50 (상호 희석)
BALB/ c 마우스	pVAX	4	25 μ g 제 0 일, 제 14 일	제 21 일	SARS-CoV-2 (WH-09/인간/2020)	<20, <20, <20, <20
	INO-4800	4	25 μ g 제 0 일, 제 14 일	제 21 일	SARS-CoV-2 (WH-09/인간/2020)	30, 40, 80, 240
	pVAX	8	25 μ g 제 0 일, 제 14 일	제 21 일	SARS-CoV-2(오스트레일리아/VI C01/2020)	<10, 12, 13, 15, 16, 17, 19, 24
	INO-4800	8	25 μ g 제 0 일, 제 14 일	제 21 일	SARS-CoV-2(오스트레일리아/VI C01/2020)	27, 46, 91, 108, 130, 161, 221, 241
	pVAX	5	10 μ g 제 0 일, 제 14 일	제 21 일	SARS-CoV-2 슈도바이러스	8, 8, 8, 8, 8
	INO-4800	5	10 μ g 제 0 일, 제 14 일	제 21 일	SARS-CoV-2 슈도바이러스	43, 55, 87, 129, 147

[0196]

C57BL/ 6 마우스	pVAX	4	25μg 제 0 일, 제 14 일	제 21 일	SARS-CoV-2 (WH-09/인간/2020)	<20, <20, <20, <20
	INO-4800	4	25μg 제 0 일, 제 14 일	제 21 일	SARS-CoV-2 (WH-09/인간/2020)	240, 240, 240, 640
기니 피그	pVAX	5	100μg 제 0 일, 제 14 일, 28	제 42 일	SARS-CoV- 2(오스트레일리아/VI C01/2020)	<10, 14, 20, 21, 25
	INO-4800	5	100μg 제 0 일, 제 14 일, 28	제 42 일	SARS-CoV- 2(오스트레일리아/VI C01/2020)	>320, >320, >320, >320, >320
	pVAX	5	100μg 제 0 일, 제 14 일, 28	제 35 일	SARS-CoV-2 슈도바이러스	<20, <20, <20, <20
	INO-4800	5	100μg 제 0 일, 제 14 일, 28	제 35 일	SARS-CoV-2 슈도바이러스	527, 532, 579, 614, 616
뉴질랜드 화이트 토끼	SSC	5	제 0 일, 제 28 일	제 42 일	SARS-CoV-2 슈도바이러스	<10, <10, <10, <10, <10
	INO-4800	5	1mg, 제 0 일, 제 28 일	제 42 일	SARS-CoV-2 슈도바이러스	12, 23, 32, 148, 178
	INO-4800	5	2mg, 제 0 일, 제 28 일	제 42 일	SARS-CoV-2 슈도바이러스	202, 237, 252, 455, 995
비인간 영장류	INO-4800	5	1mg, 제 0 일, 제 28 일	제 42 일	SARS-CoV-2 슈도바이러스	15, 27, 55, 61, 1489
	INO-4800	5	2mg, 제 0 일, 제 28 일	제 42 일	SARS-CoV-2 슈도바이러스	78, 23, 13, 48, <10

[0197]

[0198]

피내 백신 전달을 위해 확립된 모델인 Hartley 기니피그 모델(Carter, et al. The adjuvant GLA-AF enhances human intradermal vaccine responses. Sci Adv. 2018;4(9):eaas9930; Schultheis, et al. Characterization of guinea pig T cell responses elicited after EP-assisted delivery of DNA vaccines to the skin. Vaccine. 2017;35(1):61-70)에서 INO-4800의 면역원성을 평가하였다. 100μg의 pDNA를 Mantoux 주사에 의해 피부에 투여한 후, 위의 방법 부문에 설명된 바와 같이 당일에 CELLECTRA® 장치를 사용하여 투여하였다. 제14일에, 혈청 항체의 항-스파이크 단백질 결합을 ELISA에 의해 측정하였다. INO-4800을 이용한 면역화는 혈청 내 SARS-CoV-2 S1+2 단백질 결합 IgG 수준에 대한 면역 반응을 나타내었다(도 5a 및 도 5b). 제14일에 종말점 SARS-CoV-2 S 단백질 결합 역가는 100μg의 INO-4800으로 처리된 기니피그 또는 pVAX(대조군)에서 각각 10,530 및 21이었다(도 5b). 기니피그 모델에서 피내 INO-4800 면역화 후 항체 중화 활성을 평가하였다. 기니피그를 제0일, 제14일 및 제28일에 pVAX 또는 INO-4800으로 처리하고, 혈청 샘플을 제35일 또는 제42일에 수집하여 슈도바이러스 또는 야생형 바이러스 각각에 대한 혈청 중화 활성을 측정하였다. 평균 ND50 역가가 573.5인 SARS-CoV-2 슈도바이러스 중화 활성이 INO-4800 면역화된 기니피그에서 관찰되었다(표 1). 야생형 SARS-CoV-2 바이러스 활성은 모든 동물에서 관찰된 PRNT 검정에 의해 320을 초과하는 ND50 역가를 갖는 INO-4800 면역화된 기니피그에서도 관찰되었다(표 1). 혈청 항체의 기능은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질에 대한 ACE2 결합을 저해하는 능력을 평가함으로써 추가로 측정하였다. 2차 면역화 후 INO-4800 면역화된 기니피그로부터 수집된 혈청(1:20 희석액)은 ACE-2의 농도 범위(0.25 μg/ml 내지 4 μg/ml)에서 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 결합을 저해하였다(도 6e). 또한, 혈청 희석 곡선은 INO-4800 면역화된 기니피그로부터 수집된 혈청이 희석-의존적 방식으로 SARS-CoV-2에 대한 ACE-2의 결합을 차단함을 보여주었다(도 6f). pVAX-처리된 동물로부터 수집된 혈청은 바이러스 단백질에 대한 ACE-2 결합의 저해에서 무시해도 될 정도의 활성을 나타내었고, 혈청의 최고 농도에서 OD 신호의 감소는 검정에서 매트릭스 효과로 간주되었다.

[0199]

ACE2 수용체에 대한 SARS-CoV-2 S 단백질 결합의 저해. INO-4800-유도된 항체 반응의 수용체 억제 기능을 조사하였다. ELISA-기반 ACE2 저해 검정을 중화를 위한 대안으로서 개발하였다. 검정에서 대조군으로서, ACE2는 0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 EC₅₀으로 SARS-CoV-2 스파이크 단백질에 결합하는 것으로 나타났다(도 6a). BALB/c 마우스를 제0일 및 제14일에 10 μg 의 INO-4800으로 면역화시키고, 항체-매개성 저해를 보장하기 위해 면역화 후 제21일에 혈청 IgG를 정제하였다. 미경험 마우스 및 INO-4800 백신이 접종된 마우스로부터의 혈청 IgG를 사용한 스파이크-ACE2 상호작용의 저해를 비교하였다(도 6b). 수용체 저해 검정을 5마리의 면역화된 마우스 그룹에서 반복하였으며, 이는 INO-4800-유도된 항체가 SARS-CoV-2 스파이크 단백질에 결합하는 ACE2와 경쟁함을 보여주었다(도 6c 및 도 6f). ACE2 결합 저해를 기니피그 모델에서 추가로 평가하였다. INO-4800 면역화된 기니피그로부터 수집된 혈청은 ACE2의 농도 범위(0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 내지 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에서 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 결합을 저해하였다(도 6d). 또한, 혈청 희석 곡선은 INO-4800 면역화된 기니피그로부터 수집된 혈청이 희석-의존적 방식으로 SARS-CoV-2에 대한 ACE2의 결합을 차단함을 보여주었다(도 6e). pVAX-처리된 동물로부터 수집된 혈청은 바이러스 단백질에 대한 ACE2 결합의 저해에서 무시해도 될 정도의 활성을 나타내었고, 혈청의 최고 농도에서 OD 신호의 감소는 검정에서 매트릭스 효과로 간주되었다. 도 6f는 INO-4800으로 2차 면역화 후 제14일에 n=5의 마우스로부터 정제된 IgG가 풀링된 미경험 마우스 IgG와 비교하여 SARS-CoV-2 스파이크 단백질에 결합하는 ACE2 수용체와 경쟁함을 나타낸다는 것을 도시하고 있다.

[0200]

요약하면, 마우스 및 기니피그 모두에 대한 면역원성 테스트는 SARS-CoV-2 백신 후보인 INO-4800이 SARS-CoV-2 스파이크 단백질에 대한 항체 반응을 이끌어낼 수 있음을 밝혀내었다. ACE2는 SARS-CoV-2 세포 진입에 대한 1차 수용체로 간주되며, 이러한 상호작용을 차단하는 것은 INO-4800-유도된 항체가 숙주 감염을 예방할 수 있음을 시사한다.

[0201]

폐에 대한 SARS-CoV-2 반응성 IgG의 생체분포. 하기도 질환(LRD)은 COVID-19의 중증 사례와 관련이 있다. SARS-CoV-2를 표적으로 하는 폐 점막에 있는 항체의 존재는 잠재적으로 LRD에 대한 보호를 매개할 수 있다. 면역화된 마우스 및 기니피그의 폐에서 SARS-CoV-2 특이적 항체의 존재를 평가하였다. BALB/c 마우스 및 Hartley 기니피그를 제0일 및 제14일 또는 제0일, 제14일 및 제28일에 INO-4800 또는 pVAX 대조군 pDNA로 각각 면역화시켰다. 기관지폐포 세척액(BAL)을 수집한 후 희생시키고, SARS-CoV-2 S 단백질 ELISA를 수행하였다. INO-4800을 투여받은 BALB/c 및 Hartley 기니피그 모두에서, pVAX 대조군을 투여받은 동물과 비교하여 BAL 유체에서 SARS-CoV-2 S 단백질 결합 IgG의 통계적으로 유의한 증가가 측정되었다(도 7a 내지 도 7d). 종합하면, 이러한 데이터는 INO-4800으로 면역화 후 폐에서의 항-SARS-CoV-2 특이적 항체의 존재를 입증한다.

[0202]

마우스에서 코로나바이러스 교차-반응성 세포성 면역 반응. SARS-CoV-2, SARS-CoV 및 MERS-CoV S 항원에 대한 T 세포 반응을 IFN- γ ELISpot에 의해 검정하였다. BALB/c 마우스 그룹을 INO-4800 투여(2.5 μg 또는 10 μg 의 pDNA) 후 제4일, 제7일 또는 제10일에 희생시키고, 비장세포를 수확하고, 단일-세포 혼탁액을 SARS-CoV-2, SARS-CoV 및 MERS-CoV 스파이크 단백질에 걸쳐 있는 15량체 중첩 웨بت아이드의 풀로 20시간 동안 자극하였다. INO-4800 투여 후 제7일에, SARS-CoV-2에 대한 10⁶개 비장세포당 205 및 552 SFU의 T 세포 반응이 각각 2.5 μg 및 10 μg 의 용량에 대해 측정되었다(도 8a). SARS-CoV-2에 대한 10⁶개 비장세포당 852 및 2,193 SFU의 더 높은 규모의 반응이 INO-4800 투여 후 제10일에 관찰되었다. 추가적으로, SARS-CoV에 대해 INO-4800에 의해 유도된 세포 반응의 교차-반응성을 검정하였으며, 이는 제7일(10⁶개 비장세포당 74[2.5 μg 용량] 및 140[10 μg 용량] SFU) 및 투여 후 제10일(10⁶개 비장세포당 242[2.5 μg 용량] 및 588[10 μg 용량] SFU)에 비록 낮을지라도 검출 가능한 T 세포 반응을 나타내었다(도 8b). 흥미롭게도, MERS-CoV 웨بت아이드에 대한 교차-반응성 T 세포 반응은 관찰되지 않았다(도 8c). IFN- γ ELISpot 플레이트의 대표적인 이미지는 도 31에 제공된다. IFN- γ 를 생성하는 T 세포 집단을 확인하였다. 단일 INO-4800 면역화 후 제14일에 BALB/c 마우스로부터 수확된 비장세포에 대한 유세포 분석은 SARS-CoV-2 항원으로 자극한 후 T 세포 구획이 0.04% CD4+ 및 0.32% CD8+ IFN- γ + T 세포를 포함하는 것으로 나타났다(도 32).

[0203]

BALB/c SARS-CoV-2 에피토프 매핑. 10 μg INO-4800 용량을 투여받은 BALB/c 마우스로부터의 비장세포에 대해 에피토프 매핑을 수행하였다. 30개의 매트릭스 매핑 풀을 사용하여 비장세포를 20시간 동안 자극하였고, 여러 웨بت아이드 풀에서 면역우세 반응을 검출하였다(도 14a). 반응을 디콘볼루션하여(deconvoluted) 수용체 결합 도메인 및 S2 도메인에서 여러 에피토프(H2-Kd) 클러스터링을 확인하였다(도 14b). 흥미롭게도, 하나의 SARS-CoV-2 H2-Kd 에피토프인 PHGVVFLHV(서열번호 16)가 SARS-CoV 인간 HLA-A2 제한 에피토프 VVFLHVTYV(서열번호 17)에 중첩되고 이에 인접한 것으로 관찰되었다.

- [0204] 요약하면, SARS-CoV-2 S 단백질 에피토프에 대한 T 세포 반응이 INO-4800으로 면역화된 마우스에서 검출되었다.
- [0205] 실시예 2 - INO-4800-처리된 뉴질랜드 화이트(NZW) 토끼에서 측정된 세포 및 체액성 면역 반응.
- [0206] 제0일 및 제28일에 pDNA의 피내 전달. PBMC IFN- γ ELISpot(도 9); 혈청 IgG 결합 ELISA(도 10).
- [0207] 실시예 3
- [0208] INO-4800 처리된 레서스 원숭이에서 측정된 SARS-CoV-2 스파이크 단백질에 대한 체액성 면역 반응. 제0일 및 제28일에 pDNA의 피내 전달. 혈청 IgG 결합 ELISA. (도 11a 내지 도 11e)
- [0209] INO-4800 처리된 레서스 원숭이에서 측정된 SARS 및 MERS 스파이크 단백질에 대한 체액성 면역 반응. 제0일 및 제28일에 pDNA의 피내 전달. 혈청 IgG 결합 ELISA. (도 12a 내지 도 12g; 왼쪽 패널, 1mg INO-4800; 오른쪽 패널, 2mg INO-4800). 제0일 및 제28일에 pDNA의 피내 전달 후 INO-4800-처리된 레서스 원숭이에서 PBMC IFN- γ ELISpot에 의해 측정된 세포성 면역 반응. 결과는 도 13a(SARS CoV-2 스파이크 웹타이드); 도 13b(SARS CoV 스파이크 웹타이드); 및 도 13c(MERS CoV 스파이크 웹타이드)에 도시되어 있다.
- [0210] 실시예 4 INO-4800 SARS-CoV-2 스파이크 ELISA 검정
- [0211] SARS-CoV-2 스파이크 단백질을 밤새 또는 최대 3일 동안 인큐베이션하여 96-웰 마이크로플레이트의 웰 상에 코팅하였다. 그런 다음, 차단 완충액을 첨가하여 나머지 자유 결합 부위를 차단하였다. SARS-CoV-2 스파이크 단백질에 대한 항체를 포함하는 인간 혈청 샘플 및 검정 대조군을 차단된 플레이트에 첨가하고, 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 동안, 샘플 및 양성 대조군에 존재하는 항-스파이크 단백질 항체는 플레이트에 고정된 스파이크 단백질에 결합한다. 그런 다음, 플레이트를 세척하여 결합되지 않은 혈청 성분을 제거하였다. 다음으로, 서양고추냉이 과산화효소(HRP)가 표지된 항-인간 IgG 항체를 첨가하여 스파이크 단백질에 결합된 항체를 검출하였다. 1시간 인큐베이션 후, 플레이트를 세척하여 결합되지 않은 HRP 검출 항체를 제거하고, TMB 기질을 플레이트에 첨가하였다. 서양고추냉이 과산화효소의 존재하에, TMB 기질은 웰에 존재하는 HRP의 양에 비례하여 진한 청색으로 변한다. 대략 10분 동안 반응을 진행시킨 후, 산계 정지 용액을 첨가하여 효소 반응을 정지시켜 TMB를 황색으로 변하게 하였다. 황색은 각 웰에 결합된 항-스파이크 단백질 항체의 양에 비례하며, 450nm에서 판독하였다. 검정 반응의 크기는 역가로 표시된다. 역가 값은 검정 신호가 정상 인간 공여자로부터의 혈청 패널에 대한 검정 배경 수준을 기반으로 한 컷오프 값보다 큰 최대 연속 회석으로 정의된다.
- [0212] 정량화를 위한 ELISA 검정 적격성
- [0213] INO-4800 SARS-CoV-2 스파이크 ELISA 검정은 INO-4800과 관련된 임상 시험에 참여하는 대상체에서의 체액성 반응을 측정하기 위한 용도에 적격성이 있으며 이에 적합한 것으로 밝혀졌다. 공식 적격성은 18개의 플레이트로 구성되었으며, 4일 동안 2명의 작동자가 수행하였다. 적격성은 검정 민감도, 특이도, 선택성 및 정밀도를 결정하였다. 검정이 개발될 당시에는 회복기 혈청을 이용할 수 없었다. 따라서, 단일클론 항체를 개발에 사용하였다. 정상 인간 혈청에 회석된 단일클론 항체를 사용하여 이 검정의 모든 매개변수를 테스트하였다. 전체 검정 민감도는 1/20-회석된 혈청의 경우 16.1 ng/ml, 회석되지 않은 혈청의 경우 322 ng/ml인 것으로 나타났다. 특이도는 검정 전에 항-스파이크 단백질 항체를 재조합 스파이크 단백질과 사전 인큐베이션함으로써 평가하였다. 재조합 스파이크 단백질과의 사전 인큐베이션은 60% 초과의 신호 감소를 초래하였으며, 이는 항체가 플레이트에 코팅된 스파이크 단백질에 특이적으로 결합하고 다른 검정 성분에는 결합하지 않았음을 나타낸다. 선택성은 검출 한계에 가까운 농도에서 양성 대조군 항-스파이크 항체와 개별 인간 혈청 샘플을 스파이킹함으로써 조사하였다. 10명 중 7명은 컷오프 이상의 신호를 보였고, 10명 중 8명은 10명에 대한 평균 신호의 20% 이내의 검정 신호를 보였으며, 이는 1/20으로 회석했을 때 대부분의 인간 혈청 샘플에 대한 매트릭스 효과가 미미할 것으로 예상됨을 보여준다. 검정 정밀도는 6개의 플레이트 각각에 대해 고, 저 및 중 항-스파이크 단백질 항체 양성 대조군을 6회 검정함으로써 평가하였다. 결과는 낮은 검정내 미가공 신호 변동을 나타내지만 높은 미가공 신호 검정간 변동을 나타낸다. 각 개별 플레이트 컷오프는 각 플레이트에 대한 음성 대조군의 신호를 기반으로 하기 때문에, 미가공 신호의 검정간 변동은 최종 역가 계산의 정밀도에 영향을 미치지 않을 것으로 예상된다. 이를 테스트하기 위해, 플레이트 컷오프의 정밀도를 총 36개의 역가 평가를 위한 6개의 플레이트 각각에 대해 HPC(높은 양성 대조군)를 6회 역가 결정함으로써 이 적격성에 대해 평가하였다. 36개의 값 중 35개는 동일하였지만(180의 역가), 역가 결정 중 하나는 나머지보다 한 단계 더 낮았다(180 대신 60). 이는 4.6%의 검정간 CV를 초래하였다.
- [0214] 실시예 5 INO-4800 SARS-CoV-2 스파이크 ELISPOT 검정

[0215] 효소-결합 면역점(ELISPOT) 검정은 단일-세포 수준에서 사이토카인-분비 세포의 빈도를 측정하는 매우 민감한 면역검정이다. 이 검정에서, 세포는 자극의 존재 또는 부재하에 특정 포획 항체로 코팅된 표면에서 배양하였다. 적절한 인큐베이션 시간 후, 세포를 제거하고, ELISA에서 사용되는 것과 유사한 절차로 검출 항체를 사용하여 분비된 분자를 검출하였다. 검출 항체를 바이오티닐화하고 이어서 스트렙토바딘-효소 결합체를 바이오티닐화하였다. 가용성 생성물이 아닌 침전물이 있는 기질을 사용함으로써, 최종 결과는 표면에 눈에 띠는 반점이 생긴다. 각 반점은 개별 사이토카인-분비 세포에 해당한다. IFN- γ ELISPOT 검정 적격성은 검정 특이도, 재현성 및 정밀도(검정내 정밀도 및 검정간 정밀도), 동적 범위, 선형성, 상대 정확도, 검출 및 정량화 한계 및 검정 견고성의 평가를 통해 성공적으로 완료하였다. 검정은 GLP/GCLP 실험실 가이드라인에 따라 테스트 및 검증하였다.

[0216] ELISPOT 검정 방법 적격성. 특이성 판독은 검정 음성 대조군(DMSO가 포함된 배지)에 대해 10개 미만의 반점-형성 단위(SFU)의 평균값, 양성 대조군 웨타이드 풀 CEF에 대해 평균 565 SFU 및 미토겐(포볼 미리스테이트 아세테이트 + 로노마이신) 자극에 대한 반응으로 평균 593 SFU를 제공하였다. 검정내 변동에 대해 보고된 가장 높은 CV%는 7.37%였다. 검정간 변동에 대해 보고된 가장 높은 CV%는 17.23%였다. 작동자간 변동성에 대해 관찰된 가장 높은 CV%는 8.11%였다. 이러한 값은 FDA - 권장 표준 허용 기준인 20% 미만이었다.

[0217] 회색 곡선의 선형성은 0.15의 기울기 및 0.99의 R² 값으로 입증되었다. 검정 정확도는 열거된 동적 범위(156개 내지 5000개 세포/웰)에서 90% 초과였으며, 80% 내지 120%의 허용 기준에 속하였다. 검출 한계는 11 SFU/1×10⁶ 개 PBMC로 결정되었으며, 정량화 한계는 20 SFU/1×10⁶ 개 PBMC에서 관찰되었다. 검정의 견고성은 (i) 웨타이드 농도; (ii) 2차 항체 농도; (iii) 인큐베이션시간 및 (iv) 플레이트 막의 건조를 변화시킴으로써 평가하였다.

[0218] 이러한 적격성 결과에 기초하여, IFN- γ ELISPOT은 임상 시험에 사용하기에 자격이 있으며 사용할 준비가 된 것으로 간주하였다.

[0219] 실시예 6 건강한 지원자에게 피내 투여 후 전기천공법으로 투여되는 SARS-CoV-2에 대한 예방 백신인 INO-4800의 안전성, 내약성 및 면역원성을 평가하기 위한 1상 공개-라벨 연구

[0220] 이는 건강한 성인 지원자에서 CELLECTRA® 2000 장치를 사용하여 피내(ID) 주사 후 전기천공법(EP)으로 투여되는 INO-4800(pGX9501)의 안전성, 내약성 및 면역학적 프로파일을 평가하기 위한 1상, 공개-라벨, 다기관 임상시험(clinicaltrials.gov 식별자 NCT04336410)이다. 대략 40명의 건강한 지원자가 표 2에 나타낸 바와 같이 연구 그룹 1 및 연구 그룹 2의 두 가지(2) 용량 수준에 대해 평가될 것이다. 총 20명의 피험자가 각 연구 그룹에 등록될 것이다.

표 2

COVID19-001 기초 연구 용량 그룹

연구 그룹	피험자 의 수	투여 주	투여 방문당 주사 횟수 + EP	주사당 INO-4800(mg)	투여 방문당 INO-4800(mg)	INO-4800(mg)의 총 용량
1	20	0, 4	1	1.0	1.0	2.0
2	20	0, 4	2 ^a	1.0	2.0	4.0
총	40					

^aINO-4800 은 각각의 투여 방문에서 두 개의 다른 팔 다리의 허용 가능한 위치에 ID 주입 후 EP로 주입될 것이다

[0221]

[0222] 모든 피험자는 마지막 투여 후 24주 동안 추적될 것이다. 28주는 연구 종료(End of Study: EOS) 방문일 것이다.

[0223] 1차 목적:

[0224] • 건강한 성인 지원자에서 ID 주사에 이어 EP에 의해 투여된 INO-4800의 내약성 및 안전성 평가

[0225] • ID 주사에 이어 EP에 의해 투여된 INO-4800에 대한 세포 및 체액성 면역 반응의 평가

[0226] 1차 안전성 종말점:

- [0227] • 기관계 분류(system organ class: SOC), 대표 용어(preferred term: PT), 중증도 및 임상시험용 의약품과의 관계에 따른 이상 반응의 발생
- [0228] • 투여(즉, 주사) 부위 반응(빈도 및 중증도로 기재됨)
- [0229] • 특별 관심대상의 이상 반응의 발생
- [0230] 1차 면역원성 종말점:
- [0231] • 결합 검정에 의한 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질 항원-특이적 항체
- [0232] • IFN-γ, ELISpot 및/또는 유세포 분석 검정에 의한 항원-특이적 세포성 면역 반응
- [0233] 탐색적 목적:
- [0234] • T 세포 및 B 세포성 면역 반응을 모두 평가함으로써 확장된 면역학적 프로파일의 평가
- [0235] 탐색적 종말점:
- [0236] • 샘플 이용 가능성에 의해 결정되는 모든 주에 면역학적 단백질 및 관심 유전자의 mRNA 수준을 측정함으로써 T 세포 및 B 세포 수, 중화 반응 및 T 세포 및 B 세포 분자 변화에 대한 추가적인 평가를 포함할 수 있는(그러나 이로 제한되지 않음) 확장된 면역학적 프로파일
- [0237] 안전성 평가:
- [0238] 피험자는 연구 종료(EOS) 또는 피험자의 마지막 방문까지 시험 기간 동안 안전성에 대해 추적될 것이다. 이상 반응은 모든 방문(및 1일차 전화 통화)에서 수집될 것이다. 실험실 혈액 및 소변 샘플은 이벤트 일정에 따라 스크리닝 시, 0일(임신 테스트만), 1주, 4주(임신 테스트만), 6주, 8주, 12주 및 28주에 채취될 것이다(표 3). 관계에 관계없이 모든 이상 반응은 동의 시점부터 EOS까지 수집된다. 모든 중증 이상 반응, 특별 관심대상의 이상 반응 및 치료-관련 이상 반응은 완치(resolution) 또는 안정화를 위해 추적될 것이다.

표 3

사건의 임상시험 스케줄

테스트 및 평가	스크리닝 ^a	제 0 일		제 1 일 (+1 일)	제 1 주 (± 3 일)	제 4 주 (± 5 일)		제 6 주 (± 5 일)	제 8 주 (± 5 일)	제 12 주 (± 5 일)	제 28 주 (± 5 일)
		전	후			전	후				
동의서 작성	X										
포함/제외 기준	X										
병력	X	X									
인구통계	X										
병용 약물	X	X			X	X		X	X	X	X
신체 검사 ^b	X	X			X	X		X	X	X	X
활력 징후	X	X			X	X		X	X	X	X
키 및 체중	X										
감별이 있는 CBC	X				X			X	X	X	X
화학 ^c	X				X			X	X	X	X
혈청학 ^d	X										
12-리드 ECG	X										
일반 소변검사 ^e	X				X			X	X	X	X
임신 테스트 ^f	X	X				X					
INO-4800 + EP ^g		X ^h				X ^h					
다운로드 EP 데이터 ⁱ			X				X				
이상 반응 ^j	X	X	X	X ^k	X	X	X	X	X	X	X
면역학(전혈) ^l	X	X				X		X	X	X	X
면역학(혈청) ^m	X	X				X		X	X	X	X

[0239]

- a. 스크리닝 평가는 제 0 일 ~30 일부터 -1 일 전까지 시행한다.
- b. 스크리닝 및 제 28 주(또는 임의의 다른 연구 중단 방문)에 전체 신체 검사만. 다른 모든 방문에서 대상 신체 검사.
- c. Na, K, Cl, HCO₃, Ca, PO₄, 글루코스, BUN 및 Cr 포함.
- d. HIV 항체 또는 신속 검사. HBsAg, HCV 항체.
- e. 포도당, 단백질, 혈뇨용 딥스티. 딥스티이 비정상인 경우 혈미경 검사를 수행하여야 한다.
- f. 스크리닝 시 혈청 임신 테스트. 다른 방문에서 소변 임신 테스트.
- g. 피내 주사 후 EP를 통해 전달된 모든 용량.
- h. 연구 그룹 1의 경우, 바랄직하게는 제 0 일 및 제 4 주에 삼각근 괴부에 1 회 주사. 연구 그룹 2의 경우, 서로 다른 삼각근 또는 외측 대퇴사두근에: 바랄직하게는 제 0 일 및 제 4 주에 삼각근에 주사할 때마다 괴부에 2 회 주사한다.
- i. INO-4800 투여 후, EP 데이터는 CELLECTRA® 2000 장치에서 다음로드되어 Inovio에 제공된다.
- j. 동의 시점부터의 AE 및 AE 자격을 갖춘 모든 주사 부위 반응을 포함한다.
- k. AE 수집을 위한 후속 전화 통화.
- l. 시점당 10mL 산 시트레이트 텍스트로스(ACD, 엘로우 탑) 뷰브에 4 x 8.5mL(34mL) 전혈. 참고: 1 차 투여 전(스크리닝 및 제 0 일 투여 전) 총 68mL의 전혈을 수집한다.
- m. 시점당 10mL 레드 탑 혈청 수집 뷰브에 1 x 8mL 혈액. 참고: 1 차 투여 전(스크리닝 및 제 0 일 투여 전) 각 시점에서 각 1mL(총 4mL) 혈청의 4 개 분취량을 수집한다.

[0240]

면역원성 평가:

[0242]

면역학 혈액 샘플은 스크리닝 시, 0일(투여 전), 4주(투여 전), 6주, 8주, 12주 및 28주에 수집될 것이다. 면역학적 종말점에 대한 수집된 샘플의 분석 결정은 연구 전반에 걸쳐 지속적으로 결정될 것이다.

[0243]

임상 시험 집단:

[0244]

18세 내지 50세의 건강한 성인 지원자를 포함.

[0245]

포함 기준:

[0246]

a. 18세 내지 50세의 성인을 포함;

[0247]

b. 스크리닝 시 수행된 병력, 신체 검사 및 활력 징후에 근거하여 시험자가 건강한 것으로 판단한 자;

[0248]

c. 모든 연구 절차를 준수할 수 있고 준수할 의사가 있는 자;

[0249]

d. 정상 한계 이내이거나 또는 시험자가 임상적으로 유의하지 않은 것으로 간주한 스크리닝 실험실 결과;

[0250]

e. B형 간염 표면 항원(HBsAg), C형 간염 항체 및 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 항체 스크리닝에 대한 음성 혈청학적 테스트;

[0251]

f. 시험자가 임상적으로 유의한 소견(예를 들어, 울프-파킨슨-화이트 증후군)이 없는 것으로 간주한 스크리닝 심전도(electrocardiogram: ECG);

[0252]

g. 스크리닝으로부터 마지막 투여 후 3개월까지 지속적으로 올바르게 사용하는 경우 실패율이 연간 1% 미만인 의학적으로 효과적인 피임법의 사용, 폐경 후이거나, 외과적으로 불임이거나 또는 불임 상태인 파트너가 있는 자.

[0253]

제외 기준:

[0254]

a. 스크리닝 방문에서부터 시작하여 마지막 투여 후 3개월까지 시험 예상 기간 내에 임신 또는 수유 중이거나 또는 임신을 계획 중이거나 또는 자녀가 있는 아버지;

[0255]

b. 0일 이전 30일 이내에 임상시험용 의약품에 대한 연구에 참여 중이거나 또는 참여한 적이 있는 자;

[0256]

c. SARS-CoV-2에 대한 이전 노출(시험자의 재량에 따른 실험실 테스트) 또는 COVID-19, MERS 또는 SARS의 예방을 위한 연구용 백신 제품의 접종(receipt);

[0257]

d. 다음 의학적 병태의 현재 상태 또는 병력:

[0258]

- 호흡기 질환(예를 들어, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환);

[0259]

- 고혈압, 좌위 수축기 혈압(sitting systolic blood pressure) 150mmHg 초과 또는 이완기 혈압 95mmHg 초과;

[0260]

- 스크리닝 5년 이내의 악성종양;

[0261]

- 심혈관 질환(예를 들어, 심근경색, 울혈성 심부전, 심근병증 또는 임상적으로 유의한 부정맥);

[0262]

- e. 다음을 포함하는 기저 질병 또는 치료의 결과로 인한 면역억제:

- [0263] • 원발성 면역결핍증;
- [0264] • 경구 또는 비경구 글루코코르티코이드의 장기 사용(7일 이상);
- [0265] • 항류마티스 약물 및 생물학적 질환 완화 약물(disease modifying drug)의 질환 완화 용량(disease modifying dose)의 현재 또는 예상 사용;
- [0266] • 고형 장기 또는 골수 이식의 병력;
- [0267] • 다른 임상적으로 유의한 면역억제성 또는 임상적으로 진단된 자가면역 질환의 이전 병력.
- [0268] f. 삼각근 및 전외측 대퇴사두근을 고려하여 ID 주사 및 EP에 이용할 수 있는 허용 가능한 부위가 두 부위 미만임;
- [0269] g. 연구 시험자가 생각하기에 연구 결과를 혼란스럽게 하거나 또는 연구 참여로 인해 환자에게 추가적인 위험을 초래할 수 있는 임의의 신체 검사 소견 및/또는 임의의 질병 병력.
- [0270] 임상 시험 치료: INO-4800 의약품은 1X SSC 완충액(150mM 소듐 클로라이드 및 15mM 시트르산나트륨) 중 10 mg/ml의 DNA 플라스미드 pGX9501을 포함한다. 0.4ml의 부피가 고무 마개와 밀봉된 알루미늄 캡이 장착된 2ml 유리 바이알에 담길 것이다. INO-4800은 2°C 내지 8°C에서 보관된다.
- [0271] 연구 그룹 1에는 제0일 및 제4주에 투여 방문당 1.0밀리그램(mg)의 INO-4800을 1회 피내(ID) 주사 후 CELLECTRA® 2000 장치를 사용하여 전기천공법(EP)에 의해 투여하였다. 연구 그룹 2에는 제0일 및 제4주에 (두 개의 다른 팔다리의 허용 가능한 위치에) 1.0mg의 INO-4800을 2회 ID 주사 후(투여 방문당 총 2.0mg) CELLECTRA® 2000 장치를 사용하여 EP에 의해 투여하였다.
- [0272] 말초 혈액 면역원성 평가
- [0273] 전혈 및 혈청 샘플을 얻었다. 면역학 혈액 및 혈청 샘플은 스크리닝 및 이벤트 일정에 명시된 방문 시에 수집하였다(표 2). 모든 면역학 테스트를 할 수 있으려면 스크리닝 및 제0일의 면역학 샘플이 모두 필요하다. INO-4800에 대한 T 세포 및 B 세포성 면역 반응은 ELISA, 중화, 면역학적 유전자 발현의 평가, 면역학적 단백질 발현의 평가, 유세포 분석 및 ELISPOT을 포함할 수 있지만 이들로 제한되지 않는 검정을 사용하여 측정하였다. ELISA 결합 검정은 96-웰 ELISA 플레이트를 사용하는 표준 플레이트-기반 ELISA이다. 플레이트는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질로 코팅하고 차단하였다. 차단 후, 백신이 접종된 피험자로부터의 혈청을 연속 희석하고, 플레이트에서 인큐베이션하였다. 인간 IgG에 결합할 수 있는 2차 항체를 사용하여 혈청에서 백신 특이적 항체의 수준을 평가하였다. T-세포 반응은 IFN-감마 ELISPOT 검정에 의해 평가하였다. 연구 지원자로부터 단리된 PBMC를 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 웨بت아이드 단편과 함께 인큐베이션하였다. 세포 및 웨بت아이드를 IFN-감마를 포획하는 항체로 코팅된 맵 테크 플레이트에 넣었다. 자극 24시간 후, 세포를 세척하고, IFN-감마에 결합하는 2차 항체를 참가하였다. 각 백신 특이적 세포는 유도된 세포 반응의 수준을 결정하기 위해 계수될 수 있는 반점을 생성한다. 또한, SARS-CoV-2 뉴클레오팝시드 단백질(NP)에 대한 체액성 반응을 또한 평가하여 연구 동안 INO-4800 처리 후 야생형 SARS-CoV-2에 의한 잠재적인 감염을 배제할 수 있었다. 면역학적 종말점에 대한 수집된 샘플의 분석 결정은 연구 전반에 걸쳐 지속적으로 결정하였다.
- [0274] 1차 결과 측정:
- [0275] 1. 이상 반응(AE)이 있는 참가자의 백분율 [기간: 기준일에서 28주까지]
- [0276] 2. 투여(주사) 부위 반응이 있는 환자의 백분율 [기간: 0일에서 28주까지]
- [0277] 3. 특별 관심대상의 이상 반응의 발생(AESI) [기간: 기준일에서 28주까지]
- [0278] 4. 항원-특이적 결합 항체 역가의 기준일로부터의 변화 [기간: 기준일에서 28주까지] 피험자는 백신 접종 후 광학 밀도가 제0일의 광학 밀도보다 2.0 SD 더 높고 ELISA 특이적 컷오프 이상인 경우 양성 항체 반응을 갖는 것으로 간주된다.
- [0279] 5. 항원-특이적 인터페론-감마(IFN- γ) 세포성 면역 반응의 기준일로부터의 변화 [기간: 기준일에서 28주까지] 피험자는 백신 접종 후 IFN-감마 생성 세포(반점)의 수가 제0일의 반점 수보다 2.0 SD 더 높고 검정 LOD 이상인 경우 양성 세포 반응을 갖는 것으로 간주된다.

[0280] INO-4800의 안전성을 2007년 9월에 발행된 "예방 백신 임상 시험에 등록한 건강한 성인 및 청소년 자원자에 대한 독성 등급 척도"(부록 A)에 따라 측정하고 등급을 매겼다. 특별 관심대상의 이상 반응(AESI)(심각하거나 또는 심각하지 않음)은 제품 또는 프로그램에 특이적인 과학적 및 의학적 우려사항 중 하나이다. AESI는 표 4에 열거된 것들을 포함한다.

표 4

신체 체계	AESI
호흡계	급성 호흡곤란 증후군(ARDS) 간질성 폐렴/폐렴
신경계	일반화된 경련 무균성 수막염 길랑-바레 증후군(GBS) 뇌염/척수염 급성 산재성 뇌척수염(ADEM) CNS 혈관병증(뇌졸증)
혈액계	저혈소판증 파동성 혈관내 응고(DIC)
면역계	과민증 혈관염 면역화 후 강화 질환
기타	국부/전신 SAE 급성 심장 손상 급성 신장 손상 폐혈성 쇼크양 증후군

[0281]

[0282] 용량 제한 독성(DOSE LIMITING TOXICITY: DLT)

[0283] 이 임상 시험의 목적을 위해, 용량 제한 독성은 다음과 같다:

[0284] • 3등급 이상의 국부 주사 부위 홍반, 부종 및/또는 경결이 INO-4800 투여 후 1일 이상 관찰됨(표 5 참조);

[0285] • 비마약성 진통제의 적절한 사용에도 불구하고 입원이 필요한 주사 부위의 통증 또는 압통;

[0286] • INO-4800 투여와 관련하여 PI에 의해 평가된 4등급 이상의 비주사 부위 이상 반응;

[0287] • INO-4800 투여와 관련하여 PI에 의해 평가된 4등급 이상의 임상적으로 유의한 실험실 이상.

표 5

주사 부위 반응에 대한 등급 척도

주사제에 대한 국부 반응(등급)	경증(1)	중등도(2)	중증(3)	생명 위협 가능성(4)
통증	활동을 방해하지 않음	24 시간 이상 비마약성 진통제를 반복적으로 사용하거나 활동을 방해함	마약성 진통제를 사용하거나 일상 활동을 방해함	응급실 방문 또는 입원
압통	만지면 약간 불편함	음식임의 불편함	휴식 시 상당히 불편함	응급실 방문 또는 입원
홍반/홍조 ^a	2.5-5 cm	5.1-10 cm	10cm 초과	괴사 또는 박리성 피부염
경화/팽윤 ^b	2.5-5 cm 및 활동을 방해하지 않음	5.1-10 cm 또는 활동을 방해함	10 cm 초과 또는 일상 활동을 방해함	괴사

2007년 9월 "예방 백신 임상 시험에 등록한 건강한 성인 및 청소년 자원자에 대한 산업 독성 등급 척도에 대한 FDA 지침"

^a 최대 단일 직경에서 측정된 국부 반응의 등급을 매기는 것 외에도, 측정은 연속 변수로 기록해야 한다

^b 실제 측정뿐만 아니라 가능 척도를 사용하여 평가하고 등급을 매겨야 한다.

[0288]

분석 집단

[0289]

분석 집단은 다음과 같다:

[0290]

- 치료 의도가 수정된(modified intention to treat: mITT) 집단은 적어도 1회 투여의 INO-4800을 투여받은 모든 피험자를 포함한다. 이 샘플에서 피험자는 INO-4800의 할당된 용량 그룹에 의해 분석되었다. mITT 집단은 공동 1차 및 탐색적 면역학적 종말점을 분석하는 데 사용되었다.

[0291]

- 프로토콜 순응(per-protocol: PP) 집단은 계획된 모든 투여를 받고 의학적 모니터링에 의해 평가된(Medical Monitor-assessed) 중요한 프로토콜 위반을 하지 않은 mITT 피험자로 구성되었다. PP 집단에 대한 분석은 상응하는 mITT 분석을 뒷받침하는 것으로 간주되었다.

[0292]

안전성 분석 집단은 INO 4800을 ID 주사에 의해 적어도 1회 투여받은 모든 대상체를 포함한다. 이 집단의 피험자는 그들이 투여받은 INO-4800의 용량에 따라 그룹화되었다. 이 집단은 연구의 모든 안전성 분석에 사용되었다.

[0293]

1차 안전성 분석

[0294]

이 시험에 대한 1차 분석은 치료 유발 이상 반응(treatment emergent adverse event: TEAE), 투여 부위 반응 및 기준선으로부터 안전성 실험실 매개변수의 임상적으로 유의한 변화에 대한 안전성 분석이다.

[0295]

TEAE는 이 시험에서 IP 투여 후 제0일 또는 그 이후에 발생하는 임의의 이상 반응, 특별 관심대상의 이상 반응 또는 중증 이상 반응으로 정의된다. 모든 TEAE는 빈도, 백분율 및 관련 95% Clopper-Pearson 신뢰 구간으로 요약될 것이다. 빈도는 또한 접종 횟수(dose number)로 별도로 표시되며, 기관계 분류 및 대표 용어로 표시된다. 추가적인 빈도는 최대 중증도 및 IP와의 관계와 관련하여 제공된다. 단일 피험자에서 동일한 AE가 여러 번 발생하는 경우는 중증도 및 IP와의 관계와 관련하여 최악의 경우 접근 방식에 따라 한 번만 계수하였다. 모든 중증

TEAE는 위와 같이 요약된다. AE 기간은 AE 중지 날짜 - AE 시작 날짜 + 1일로 계산하였다. TEAE 또는 중증 TEAE 가 아닌 AE 및 SAE는 목록에 표시되어 있다.

[0297] 이러한 모든 1차 안전성 분석을 안전성 집단의 피험자에 대해 수행하였다.

1차 면역원성 분석

[0299] SARS-CoV-2 스파이크 당단백질 항원 특이적 결합 항체 역가 및 특정 세포성 면역 반응을 연령 계층 내의 연구 그룹에 의해 분석하였다. 결합 항체 역가는 기하 평균 및 관련 95% 신뢰 구간을 사용하여 각 연구 그룹에 대해 분석하였다. 항원 특이적 세포성 면역 반응 증가는 중앙값, 사분위간 범위 및 95% 신뢰 구간을 사용하여 각 연구 그룹에 대해 분석하였다. 결합 항체 역가 및 항원 특이적 세포 반응 증가 모두에 대한 기준선으로부터의 변화는 기하 평균 배수 증가(Geometric Mean Fold Rise) 및 95% 신뢰 구간을 사용하여 분석하였다. 결합 항체 역가는 기하 평균 비 및 관련 95% 신뢰 구간을 사용하여 연령 계층 내의 각 연구 그룹 쌍 사이에서 분석하였다. 항원 특이적 세포성 면역 반응은 중앙값 차이 및 관련 95% 신뢰 구간을 사용하여 연령 계층 내의 각 연구 그룹 쌍 사이에서 분석하였다. 이러한 모든 1차 면역원성 분석은 mITT 및 PP 집단의 피험자에 대해 수행하였다.

탐색적 분석

[0301] 기준선 이후의 T 세포 및 B 세포 수는 평균/중앙값 및 관련 95% 신뢰 구간을 사용하여 연구 그룹에 의해 기술적으로(descriptively) 분석될 것이다. 중화 항체의 백분율은 중앙값, 사분위간 범위 및 95% 신뢰 구간을 사용하여 각 연구 그룹에 대해 분석될 것이다.

[0302] 이전의 2회-투여 양생법에 따른 INO-4800의 선택적 부스터 투여의 안전성 및 면역원성은 아래에 기술되는 바와 같이 분석될 것이다. 살아있는 중화 상호 항체 역가 및 슈도중화 상호 항체 역가는 기하 평균 및 관련 95% 신뢰 구간을 사용하여 연령 계층 내 각 연구 그룹에 대해 분석될 것이다. 기준선으로부터의 증가 비율은 각 면역원성 바이오마커에 대해 표로 작성될 것이다. 분석을 위한 충분한 데이터가 있는 경우, 단 2회 투여를 선택한 피험자와 2회 투여와 부스터 투여를 선택한 피험자 간의 그룹 면역원성 비교 사이의 조사를 수행할 것이다.

[0303] 면역 바이오마커와 INO-4800 용량 사이의 관계에 대한 연령 및 기타 잠재적인 교란 요인의 영향에 대한 추가 조사는 ANCOVA 및/또는 로지스틱 회귀 모델의 사용을 포함할 수 있다.

예비 기초 연구 결과

[0305] 보고된 모든 8가지의 이상 반응은 1등급이었고; 5가지는 국부 주사 부위 반응으로 인한 것이었다. 중증 이상 반응, 특별 관심대상의 이상 반응 또는 용량 제한 독성은 보고되지 않았다.

[0306] 예비 결합 ELISA 분석은 7/9(78%)의 피험자가 양성 항체 반응을 보였음을 입증하였다. 반응자는 역가가 4-배 증가하였다.

[0307] 제6주에, 체액성 및 세포성 면역 반응에 대한 것을 포함한 다중 면역학 검정을 2회 투여 후 1.0mg 및 2.0mg 용량 코호트 모두에 대해 수행하였다. 해당 시점에서의 분석은 체액성(결합 및 중화) 및 T 세포 면역 반응을 평가하는 예비 데이터를 기반으로 94%(36명의 총 시험 참가자 중 34명)가 전반적인 면역학적 반응률을 나타냄을 보여주었다. 1mg 용량 코호트의 1명의 참가자와 2mg 용량 코호트의 2명의 참가자는 연구 시작 시 COVID-19 면역 반응에 대해 양성으로 테스트되어 이전 감염을 나타내어 면역 분석에서 제외하였다. 2mg 용량 코호트의 한 참가자는 안전성 또는 내약성과 관련이 없는 이유로 연구를 중단하였다.

[0308] 8주까지, INO-4800은 두 코호트의 모든 참가자에게 일반적으로 안전하고 내약성이 우수하였다. 보고된 10건의 이상 반응(AE)은 모두 중증도가 1등급이었고, 이들 중 대부분은 주사 부위 발적이었다. 중증 이상 반응(SAE)은 보고되지 않았다.

초기 I상 결과

연구 집단 인구 통계

[0311] 총 55명의 참가자를 스크리닝하였고, 40명의 참가자를 초기 두 그룹에 등록하였다(도 16). 평균 연령은 34.5세 (18세 내지 50세 범위)였다. 참가자는 55%가 남성이었다(표 6). 대부분의 참가자는 백인이었다(82.5%).

표 6

변수	통계	그룹 1, 1mg (N=20)	그룹 2, 2mg (N=20)	전체 (N=40)
성별				
남성	n(%)	11(55.0)	11(55.0)	22(55.0)
여성	n(%)	9(45.0)	9(45.0)	18(45.0)
인종				
백인	n(%)	18(90.0)	15(75.0)	33(82.5)
흑인 또는 아프리카계	n(%)	1(5.0)	1(5.0)	2(5.0)
미국인				
아시아인	n(%)	1(5.0)	4(20.0)	5(12.5)
민족				
히스패닉계 또는 라틴계	n(%)	0	0	0
히스패닉계 또는 라틴계가 아님	n(%)	20(100.0)	20(100.0)	40(100.0)
연령(세)	n	20	20	40
	평균(SD)	35.0(10.69)	35.6(9.18)	35.3(9.84)
	중앙값	33.0	38.0	34.5
	최소, 최대	18, 50	19, 50	18, 50
기준 키(cm)	n	20	19	39
	평균(SD)	172.59(10.853)	172.16(8.631)	172.38(9.707)
	중앙값	169.75	170.10	170.10
	최소, 최대	155.9, 195.6	158.0, 188.0	155.9, 195.6
기준 체중(kg)	n	20	19	39
	평균(SD)	74.13(14.701)	71.35(12.611)	72.77(13.615)
	중앙값	70.45	69.00	69.60
	최소, 최대	58.5, 110.0	55.0, 92.5	55.0, 110.0

[0312]

백신을 0.1mℓ의 피내 주사로 투여한 후 백신 접종 부위에 EP에 의해 투여하였다. EP는 계절당 0.2A(조직 저항성에 따라 40V 내지 200V)에서 4개의 52-msec 펄스로 CELLECTRA® 2000을 사용하여 수행하였다. 처음 두 펄스는 0.2초 간격으로 간격을 두고 이어서 0.2초 간격으로 배치된 마지막 두 펄스 전에 3초 일시 중지하였다. 용량 그룹은 각각에 대한 안전성 준비기간(run-in)을 갖고 순차적으로 등록하였다. 참가자들은 제1일 및 제1주, 제4주(2차 투여), 제6주, 제8주, 제12주, 제28주, 제40주 및 제52주에 임상적으로 그리고 안정성에 대해 평가받았으며, 앞으로도 평가될 것이다. 안전성 실험실 테스트(전체 혈구 수치, 종합적인 대사 패널 및 소변 검사)를 제0일, 제1일 및 제4주를 제외한 모든 추적 방문에 대해 수행하였으며, 앞으로도 수행될 것이다. 면역학 표본을 제1일 및 제1주를 제외하고 1회 투여 후 모든 시점에서 얻었다. 백신과의 관계에 관계없이 국부 및 전신 AE를 기록하고, 시험자가 등급을 매겼다. AE는 2007년 9월 미국 식품의약국에서 발행한 예방 백신 임상 시험 가이드라인에 등록된 건강한 성인 및 청소년 지원자를 위한 독성 등급 척도에 따라 등급을 매겼다.

[0314]

백신 안전성 및 내약성

- [0315] 39명(97.5%)이 2회 투여를 완료하였으며, 2.0mg 그룹의 1명의 피험자는 연구 또는 투여와 관련이 없는 임상 현장으로의 운송 부족으로 인해 2차 투여를 받기 전에 시험 참여를 중단하였다. 나머지 39명의 모든 피험자는 1차 투여 후 제8주에 방문을 완료하였다. 1회 투여 후 8주까지 총 11건의 국부 및 전신 AE가 보고되었으며, 이 중 6 건은 백신과 관련된 것으로 간주되었다. 모든 AE는 경증이거나 또는 중증도가 1등급이었다. 가장 빈번한 AE는 주사 부위 통증(3) 및 홍반(2)을 포함한 주사 부위 반응이었다. 백신과 관련된 한 가지 전신 AE는 메스꺼움이었다. 발열 반응은 없었다. AE로 인해 시험을 중단한 피험자는 없었다. 중증 이상 반응(SAE)이나 AESI는 보고되지 않았다. 초기 8주간의 추적 관찰 기간 동안 임상적으로 우려되는 비정상적인 실험실 값은 없었다. 1.0mg 그룹의 피험자(피험자의 15%)에 비해 2.0mg 그룹(피험자의 10%)에서 백신과 관련된 AE를 경험한 참가자의 수는 증가하지 않았다. 또한, 두 용량 수준 그룹 모두에서 제1 용량에 비해 제2 용량으로 AE의 빈도가 증가하지는 않았다. 따라서, INO-4800 1상 안전성 데이터는 1차 투여와 비교하여 2차 백신 투여 후 부작용의 빈도가 증가하지 않았으므로 안전한 부스터일 가능성이 있음을 시사한다.
- [0316] 면역원성: 38명의 피험자를 면역원성 분석에 포함하였다. 투여를 완료하기 전에 중단한 2.0mg 그룹의 한 명의 피험자 외에, 1.0mg 그룹의 한 명의 피험자는 기준일에 혈청 양성으로 간주되어 제외되었다.
- [0317] 체액성 면역 반응: 혈청 샘플을 사용하여 SARS-CoV-2/오스트레일리아/VIC01/2020 단리주 및 RBD 및 전체 스파이크 S1 +S2 단백질에 대한 결합 항체에 대한 중화 항체 역ガ를 측정하였다.
- [0318] S1+S2 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA): 표준 결합 ELISA를 사용하여 혈청 결합 항-SARS-CoV-2 스파이크 항체를 검출하였다. ELISA 플레이트를 재조합 S1+S2 SARS-CoV-2 스파이크 단백질(시노 바이올로지컬)로 코팅하고, 밤새 인큐베이션하고 차단하였다. 샘플을 연속 희석하고, 차단된 검정 플레이트에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 검정 반응의 크기는 광학 밀도가 제0일의 배경보다 3 SD 이상인 최대 연속 희석으로 정의되는 역가로 나타내었다. 1.0mg 그룹의 68%의 참가자와 2.0mg 그룹의 70%의 참가자가 백신 접종 전 시점(제0일)과 비교할 때 S1+S2 스파이크 단백질에 대한 혈청 IgG 결합 역가가 적어도 증가하였고, 1.0mg 및 2.0mg 그룹에서 반응자 GMT는 각각 320.0(95% CI: 160.5, 638.1) 및 508.0(95% CI: 243.6, 1059.4)이었다(도 17c). 도 17d에서, 1.0mg 용량 그룹 및 2.0mg 용량 그룹에서의 체액성 반응을 전체 스파이크 단백질(S1 및 S2)에 결합하는 능력에 대해 평가하였다(n=19, 1.0mg; n=19, 2.0mg). 종말점 역가는 기준선 이상의 OD 3.0 SD를 나타내는 역가로 계산하였고, 기준선에서의 역가는 1로 설정하였다. 살아있는 바이러스 중화에 대한 반응은 PRNT IC50이 10 이상이었다. 모든 그래프에서, 수평선은 중앙값을 나타내고, 막대는 사분위수 범위를 나타낸다.
- [0319] SARS-CoV-2 야생형 바이러스 중화 검정에서 살아있는 바이러스를 중화시키는 능력에 대해 혈청을 또한 테스트하였다. SARS-CoV-2/오스트레일리아/VIC01/2020 단리주 중화 검정을 영국 공중보건국(영국 포튼 다운 소재)에서 수행하였다. 중화 바이러스 역가는 56°C에서 30분 동안 열-불활성화된 혈청 샘플에서 측정하였다. SARS-CoV-2(오스트레일리아/VIC01/2020 단리주44)를 933 pfu ml⁻¹의 농도로 희석하고, 25mM HEPES 완충액을 포함하는 1% FCS/MEM에 50:50으로 혼합하고 혈청 희석액을 두 배로 늘렸다. 가습된 상자에서 37°C에서 5일 인큐베이션 후, 플레이트를 고정하고, 염색하고, 플라크를 계수하였다. 바이러스 역가를 표준 50% 조직 배양 감염 용량(TCID50) 검정을 사용하여 결정하였다. 제6주에 2차 백신 접종 후, 살아있는 바이러스 PRNT IC50 중화 검정에 의한 반응자의 기하 평균 역가(GMT)는 1.0mg 및 2.0mg 그룹에서 각각 82.4 및 63.5였다. 반응자의 백분율(10 이상의 백신 접종 후 PRNT IC50)은 1.0mg 및 2.0mg 그룹에서 각각 83% 및 84%였다(도 17a 및 표 7).

표 7

살아있는 SARS-CoV-2 중화		
	<u>1.0mg</u> N=18*	<u>2.0mg</u> N=19
전체		
제 6 주 GMT 상호 역가(95% CI)	44.4(14.6, 134.8) 1, 11647	34.9(15.8, 77.2) 1, 652
범위		
반응자**		
n(%)	<u>15(83%)</u>	<u>16(84%)</u>
제 6 주 GMT 상호 역가(95% CI)	<u>82.4(29.1, 233.3)</u> 4, 11647	<u>63.5(39.6, 101.8)</u> 13, 652
범위		

* ELISA 기준선 양성 NP ELISA 가 있는 1 명의 피험자 제외

** 6 주차 PRNT IC₅₀ 10 이상, 또는 결합 ELISA 활성이 보이는 경우 4 이상

[0320]

RBD 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA): MaxiSorp 96-웰 플레이트(씨모피셔, 439454)를 50 μl /웰의 PBS에 희석한 단백질인 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 SARS-CoV-2 RBD(시노바이올로지컬, 40592-V08H)로 코팅하고, 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBST(0.05% Tween-20이 포함된 PBS)로 4회 세척하고, 200 μl /웰의 차단 완충액(5% 무지방 분유 및 0.1% Tween-20이 포함된 PBS)으로 실온에서 2시간 동안 차단하였다. PBST로 세척한 후, 차단 완충액에 연속 희석된 혈청 샘플을 플레이트에 이중으로 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. PBST로 세척한 후, 차단 완충액에 500-배 희석된 50 μl /웰의 항-인간-IgG-HRP 검출 항체(비디 파밍겐(BD Pharmingen), 555788)를 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. PBST로 세척한 후, 50 μl /웰의 1-단계 울트라 TMB(씨모, 34028)를 첨가하고, 실온에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 50 μl /웰의 2M 황산을 첨가하여 색상 변화 반응을 중단시키고, 광학 흡광도를 Synergy 2 마이크로플레이트 판독기(바이오텍)에서 450nm 및 570nm에서 측정하였다. 종말점 역가는 OD450-570 값이 일치하는 제0일의 신호 이상인 3 표준 편차인 최대 연속 희석으로 정의하였다. 제6주에, 반응자 GMT는 1.0mg 및 2.0mg 그룹에서 각각 385.6(95% CI: 69.0, 2154.9) 및 222.1(95% CI: 87.0, 566.8)이었다(도 17b).

[0322]

1.0mg 및 2.0mg 용량 그룹에서 2회 백신 접종 후 전체 혈청전환(S 단백질 또는 RBD에 대한 중화 또는 결합 항체)에 반응하는 참가자로 정의됨)은 각각 89% 및 95%였다.

[0323]

세포 반응: 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 혈액 샘플로부터 단리하고, 후속 분석을 위해 동결시켜 액체 질소에 보관하였다.

[0324]

INO-4800 SARS-CoV-2 스파이크 ELISPOT. 말초 단핵 세포(PBMC)를 백신 접종 전후에 단리하였다. 세포를 전장 컨센서스 스파이크 단백질 서열에 걸쳐 있는 15량체 웹타이드(9개의 잔기로 중첩됨)의 풀로 시험관내에서 자극하였다. 세포를 웹타이드 풀(225 $\mu\text{g}/\text{mL}$), DMSO 단독(0.5%, 음성 대조군) 또는 PMA 및 아이오노마이신(양성 대조군)과 함께 밤새(18시간 내지 22시간, 37°C, 5% CO₂) 인큐ベ이션하였다. 다음날, 세포를 세척하고, 플레이트를 발색시켰다: 검출 항체를 바이오티닐화한 후 스트렙타비딘-효소 접합체를 바이오티닐화하였다. 가용성 생성물이 아닌 침전물이 있는 기질을 사용하여, 눈에 보이는 반점이 생성되었다. 각 반점은 개별 사이토카인-분비 세포에 해당한다. 플레이트를 발색시킨 후, 반점을 스캔하고 ImmunoCapture™ 및 ImmunoSpot™ 소프트웨어가 포함된 CTL S6 마이크로 분석기(CTL)를 사용하여 정량화하였다. 값은 측정된 삼중의 배경 빼기 평균으로 나타내었다.

[0325]

제8주에 반응자의 백분율은 1.0mg 용량 그룹에서 74%였고, 2.0mg 용량 그룹에서 100%였다(표 8). 10⁶개 PBMC당 SFU 중앙값은 1.0mg 및 2.0mg 용량 그룹의 반응자에 대해 각각 46 및 71이었다. 각 그룹에서, 기준선(각각 P=0.001 및 P<0.0001, Wilcoxon 일치-쌍 부호 순위 검정, 사후 분석(post-hoc analysis))에 비해 백만 PBMC당 얻어진 인터페론-γ-분비 세포(SFU)의 수가 통계적으로 유의하게 증가하였다(도 18a). 흥미롭게도, T 세포 ELISpot 검정에 의해 1.0mg 그룹의 5명의 비반응자는 살아있는 바이러스 중화 검정에 의해 강한 반응성을 보였다. ELISpot 검정에 의해 테스트된 3개의 회복기 샘플이 제8주에 2.0mg 용량 그룹보다 더 낮은 T 세포 반응(중앙값 33)을 나타내었다는 점도 흥미롭다. INO-4800은 2.0mg 용량 그룹에서 더 빈번하고 더 높은 반응자 반응 중앙값(45.6 대 71.1)인 강한 T 세포 반응을 생성하였다. 2.0mg 그룹의 T 세포 반응을 도 18b에 도시된 바와 같이

5개의 에피토프 풀에 매핑하였다. 흥미롭게도, 스파이크 단백질의 모든 영역에서 T 세포 반응이 관찰되었다.

표 8

면역 반응

	1.0mg 코호트		2.0mg 코호트		
	면역 검정	결과 값	반응자 [‡] n(%)	결과 값	반응자 [‡] n(%)
중화 제 6 주 GMT 상호 역가 [95% CI](범위)	44.4 [14.6, 134.8](1, 11647)		15/18(83%)	34.9 [15.8, 77.2] (1, 652)	16/19(84%)
RBD 결합 항체 제 6 주 GMT 상호 역가 [95% CI](범위)	27.3 [4.8, 156.8](1, 15625)		10/18(56%)	66.8 [17.4, 257.5] (1, 3125)	14/18(78%)
S1+S2 결합 항체 제 6 주 GMT 상호 역가 [95% CI](범위)	174.4 [59.9, 507.3] (1, 2560)		17/19(89%)	136.8 [34.5, 543.1] (1, 2560)	15/19(79%)
IFN-감마- ELISpot 제 8 주 SFU 중앙값 [95% CI](범위)	26.2 SFU [10- 64] (1, 374.4)		14/19(74%) [¶]	71 SFU [32-194] (8.9, 615.6)	19/19(100%) [¶]

1.0mg 코호트는 기준선 ELISA 역가가 1280 인 피험자 1명을 제외한다.

[‡] 반응 기준: 중화 - 제 6 주 PRNT IC₅₀ 10 이상, 또는 결합 ELISA 활성이 보이는 경우 4

이상, RBD 결합 - 제 6 주 값 1 미만, ELISpot - 제 0 주 동안 값 12 SFU 이상

[¶] - 제 6 주 및 제 8 주 데이터를 사용하여 생성된 반응자

[0326]

[0327] *INO-4800 SARS-CoV-2 스파이크 유세포 분석 검정:* INO-4800에 대한 세포성 면역 반응에 대한 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 기여를 세포내 사이토카인 염색(ICS)에 의해 평가하였다. PBMC를 또한 유세포 분석을 사용한 세포내 사이토카인 염색(ICS) 분석에 사용하였다. 200 μl의 완전 RPMI 배지에서 백만 개의 PMBC를 DMSO(음성 대조군), PMA 및 아이오노마이신(양성 대조군, 각각 100 ng/ml 및 2 μg/ml) 또는 표시된 펩타이드 풀(225 μg/ml)로 6시간(37 °C, 5% CO₂) 동안 자극하였다. 자극 1시간 후, 브레펠딘 A(Brefeldin A) 및 모넨신(Monensin)(비디 골지스탑 앤 골지플러그(BD GolgiStop and GolgiPlug), 각각 0.001% 및 0.0015%)을 첨가하여 발현된 사이토카인의 분비를 차단하였다. 자극 후, 세포를 밤새 4°C로 옮겼다. 다음으로, 세포를 생존/사멸 염색(live/dead staining)(이전에 기재된 바와 같은 라이프 테크놀로지스 Live/Dead aqua fixable 생존력 염료)을 위해 PBS로 세척한 다음, FACS 완충액(0.5% BSA, 2mM EDTA, 20mM HEPES)에 재현탁시켰다. 다음으로, 세포를 세포외 마커에 대해 염색하고, 고정 및 투과화시킨 다음, 유세포 분석에 사용된 항체에 대해 표시된 사이토카인(표 9)에 대해 염색하였다.

표 9

유세포 분석 패널

튜브	채널	마커/사이토카인
1	염색하지 않음	해당없음
2	BV510	살아있는/Dead Fix Aqua
3	BUV737	CD8
4	APC-Cy7	IL-2
5	BV650	CD45RA
6	APC	CD3
7	BV786	CD14/CD16/CD19
8	BV711	IFN- γ
9	BV421	CCR7
10	PE-Cy7	IL-17
11	FITC	FITC
12	PE Dazzle(PE-CF594)	IL-4
13	PE	CD107a
14	PerCP-eFluor710(PerCP-Cy5.5)	CD4

[0328]

[0329] IFN- γ , TNF- α 및/또는 IL-2(임의의 반응)를 생성하는 CD8+ T 세포는 2.0mg 용량 그룹에서 백신 접종 후 통계적으로 유의하게 증가하였다(도 18c, P=0.0181, Wilcoxon 일치-쌍 부호 순위 검정, 사후 분석). TNF- α 를 생성하는 CD4+T 세포도 또한 2.0mg 용량 그룹에서 통계적으로 유의하게 증가하였다(도 18c, P=0.0020, Wilcoxon 일치-쌍 부호 순위 검정, 사후 분석).

[0330]

백신 접종 후 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 조사하였다. 2.0mg 용량 그룹에서 CD8+T 세포의 거의 절반(47%)이 IFN- γ 및 TNF- α 를 이중 생성하였다(도 18e). 1.0mg 용량 그룹에서 사이토카인을 생성하는 CD8+ T 세포는 주로 단일작용성 IFN-생성 세포였다. CD4+ T 세포 구획은 6% 및 9%(각각 1.0mg 및 2.0mg 용량 그룹에서)로 고도로 다작용성이었으며, 3가지 사이토카인 IFN- γ , TNF- α 및 IL-2 모두를 생성하였다.

[0331]

효과기(CCR7-CD45RA+), 효과기 기억(CCR7-CD45RA-) 및 중심 기억(CCR7+CD45RA-) 세포를 특성화하기 위해 표면마커 CCR7 및 CD45RA에 대해 임의의 사이토카인(임의의 반응, 백신 접종 후 IFN- γ 또는 TNF- α 또는 IL-2)을 생성하는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포의 조성을 또한 평가하였다(도 18d). 두 용량 그룹에서, 스파이크 웹타이드에 의한 자극에 반응하여 사이토카인을 만드는 CD8+T 세포는 3개의 집단에 걸쳐 균형을 이룬 반면, CD4+ T 세포는 주로 중심 기억 표현형이었다(도 18d).

[0332]

Th2 반응을 또한 IL-4 생성을 평가함으로써 측정하였으며, 백신 접종 후 어느 그룹에서도 통계적으로 유의한 증가(Wilcoxon 일치-쌍 부호 순위 검정, 사후 분석)는 관찰되지 않았다(도 18f).

[0333]

이 1상 시험에서, INO-4800 백신 접종은 Th1-유형 사이토카인 IFN- γ , TNF- α 및 IL-2의 증가된 발현에 의해 입증된 바와 같이 IFN-ELISpot뿐만 아니라 다중 매개변수 유세포 분석 모두에 의해 입증된 증가된 Th1 표현형과 함께 강력한 T 세포 반응을 유도하였다(도 18c). INO-4800에 의해 유도된 T 세포의 다작용성의 평가는 기억 상태의 특징을 나타내는 SARS-CoV-2 특이적 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 존재를 시사하여, 지속적인 세포 반응이 확립되었음을 시사한다(도 18d). 중요하게는, 이는 원형적(prototypical) Th2 사이토카인인 IL-4의 유도를 최소화하면서 달성되었다(도 18f).

[0334]

1상 업데이트

[0335]

이는 피내로(ID) 투여된 후 CELLECTRA 2000 장치를 사용하여 전기천공법에 의해 투여된 INO-4800의 안전성, 내약성 및 면역원성을 평가하기 위한 1상, 공개-라벨, 다기관 시험(NCT04336410)으로 설계하였다. COVID-19 질병

의 알려진 병력이 없는 18세 내지 50세의 건강한 참가자에게 2회-투여 양생법(0주 및 4주)으로 1.0mg 또는 2.0 mg 용량의 INO-4800을 투여하였다.

[0336] DNA 백신 INO-4800. 백신은 현행 우수 의약품 제조 및 품질관리 기준(Good Manufacturing Practices)에 따라 제조하였다. INO-4800은 식염수 시트르산나트륨 완충액 중 10 mg/ml의 농도로 이전에 설명된 바와 같이 최적화된 SARS-CoV-2 전장 스파이크 당단백질의 최적화된 합성 서열을 발현하는 플라스미드 pGX9501을 포함한다.

[0337] 종말점. 안전성 종말점은 1회 투여 후 최대 8주까지의 전신 및 국부 투여 부위 반응을 포함하였다. 면역학 종말점은 백신의 2회 투여 후 항원-특이적 결합 항체 역가, 중화 역가 및 항원-특이적 인터페론-감마(IFN-g) 세포성 면역 반응을 포함한다. 살아있는 바이러스 중화의 경우, 반응자는 제6주 PRNT IC50이 10 초파 또는 피험자가 ELISA의 반응자인 경우 4 초파인 것으로 정의하였다. S1+S2 ELISA의 경우, 반응자는 제6주 값이 1 초파인 것으로 정의하였다. ELISpot 검정의 경우, 반응자는 제0주 이상에서 10^6 개 PBMC당 12개 초파의 반점 형성 단위인 제6주 또는 제8주 값으로 정의하였다.

[0338] 연구 절차.

[0339] 40명의 참가자를 두 그룹으로 등록하였다: 제0주 및 제4주에 1.0mg 및 2.0mg 용량을 투여받은 1.0mg 및 2.0mg 용량 그룹에 각각 20명의 참가자. 백신은 팔에 0.1ml을 피내 주사한 후 백신 접종 부위에 EP에 의해 투여하였다. 1.0mg 용량 그룹의 피험자는 각 투여 방문 시 1회 주사를 받았다. 백신의 2차 투여는 1차 투여와 비교하여 동일한 팔 또는 다른 팔에 주사될 수 있다. 2.0mg 용량 그룹의 피험자는 각 투여 방문 시 각 팔에 1회 주사를 받았다. EP는 이전에 설명한 바와 같이 CELLECTRA® 2000을 사용하여 수행하였다. 장치는 펄스당 0.2 A 전류 및 40V 내지 200V의 전압의 강도에서 지속 시간이 각각 52ms인 총 4개의 전기 펄스를 전달한다. 용량 그룹은 각각에 대한 안전성 준비기간을 갖고 순차적으로 등록하였다. 1.0mg 용량 그룹은 3일 동안 하루에 한 명의 참가자를 등록하였다. 독립적인 데이터 안전성 모니터링 위원회(Data Safety Monitoring Board: DSMB)는 1주차 안전성 데이터를 검토하고, 유리한 안전성 평가를 기반으로 추가적인 17명의 참가자를 해당 용량 그룹에 등록을 완료하도록 권장하였다. 유사한 방식으로, 2.0mg 용량 그룹을 후속적으로 등록하였다. 참가자는 스크리닝, 0주 (1차 투여), 투여 후 다음날 전화 통화, 1차 투여 후 1주, 4주(2차 투여), 6주, 8주, 12주, 28주, 40주 및 52 주를 포함한 모든 시점에서의 안전성 및 병용 약물에 대해 평가하였다. 백신과의 관계에 관계없이 국부 및 전신 AE를 기록하고, 시험자가 등급을 매겼다. 안전성 실험실 테스트(전혈구 수, 종합적인 대사 폐널 및 소변 검사)는 스크리닝 시, 1차 투여 후 1주, 6주, 8주, 12주, 28주 및 52주에 계속 수행되었으며 앞으로도 계속될 것이다. 면역학 표본은 제1일 및 제1주를 제외하고 1차 투여 후 모든 시점에서 얻었다. AE는 2007년 9월 미국 식품의약국에서 발행한 예방 백신 임상 시험 가이드라인에 등록된 건강한 성인 및 청소년 지원자를 위한 독성 등급 척도에 따라 등급을 매겼다. DSMB는 이 보고서에 포함된 최대 8주 동안의 참가자에 대한 실험실 및 AE 데이터를 검토하였다. 프로토콜에 명시된 안전성 중지 규칙 및 특별 관심대상의 이상 반응(AESI)이 있었다. 이 보고서의 목적을 위해, 1차 투여 후 최대 8주의 임상 및 실험실 안전성 평가를 제공하였다.

[0340] 프로토콜 적격성. 적격한 참가자는 다음 기준을 충족하여야 한다: 18세 내지 50세의 건강한 성인; 모든 연구 절차를 준수할 수 있고 준수할 의사가 있는 자; 스크리닝 시 18 kg/m^2 내지 30 kg/m^2 의 체질량 지수; B형 간염 표면 항원, C형 간염 항체 및 인간 면역결핍 바이러스 항체에 대한 음성 혈청학적 테스트; 시험자가 임상적으로 유의한 소견이 없는 것으로 간주한 스크리닝 심전도(ECG); 지속적으로 사용하는 경우 실패율이 연간 1% 미만인 의학적으로 효과적인 피임법의 사용, 폐경 후이거나 또는 외과적으로 불임이거나 또는 불임 상태인 파트너가 있는 경우. 주요 제외 기준은 다음을 포함하였다: SARS-CoV-2에 노출될 위험이 높은 현재 직업에 있는 개인; SARS-CoV-2에 대한 이전의 알려진 노출 또는 COVID-19의 예방 또는 치료를 위한 임상시험용 의약품의 접종; 기저 질병 또는 치료의 결과로 인한 자가면역 또는 면역억제; 백신 또는 약물에 대한 과민성 또는 중증 알레르기 반응; 중증 COVID-19의 위험을 증가시키는 의학적 병태; 보고된 흡연, 전자담배 또는 활성 약물, 알코올 또는 약물 남용 또는 의존; 및 피내 주사 및 전기천공법에 이용할 수 있는 허용 가능한 부위가 두 부위 미만임.

[0341] 임상 시험 집단:

[0342] 18세 내지 50세의 건강한 성인 지원자를 포함.

[0343] 포함 기준:

[0344] a. 18세 내지 50세의 성인을 포함;

[0345] b. 스크리닝 시 수행된 병력, 신체 검사 및 활력 징후에 근거하여 시험자가 건강한 것으로 판단한 자;

- [0346] c. 모든 연구 절차를 준수할 수 있고 준수할 의사가 있는 자;
- [0347] d. 정상 한계 이내이거나 또는 시험자가 임상적으로 유의하지 않은 것으로 간주한 스크리닝 실험실 결과;
- [0348] e. B형 간염 표면 항원(HBsAg), C형 간염 항체 및 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 항체 스크리닝에 대한 음성 혈청학적 테스트;
- [0349] f. 시험자가 임상적으로 유의한 소견(예를 들어, 울프-파킨슨-화이트 증후군)이 없는 것으로 간주한 스크리닝 심전도(ECG);
- [0350] g. 스크리닝으로부터 마지막 투여 후 3개월까지 지속적으로 올바르게 사용하는 경우 실패율이 연간 1% 미만인 의학적으로 효과적인 피임법의 사용, 폐경 후이거나, 외과적으로 불임이거나 또는 불임 상태인 파트너가 있는 경우.
- [0351] 제외 기준:
- [0352] a. 스크리닝 방문에서부터 시작하여 마지막 투여 후 3개월까지 시험 예상 기간 내에 임신 또는 수유 중이거나 또는 임신을 계획 중이거나 또는 자녀가 있는 아버지;
- [0353] b. 0일 이전 30일 이내에 임상시험용 의약품에 대한 연구에 참여 중이거나 또는 참여한 적이 있는 자;
- [0354] c. SARS-CoV-2에 대한 이전 노출(시험자의 재량에 따른 실험실 테스트) 또는 COVID-19, MERS 또는 SARS의 예방을 위한 연구용 백신 제품의 접종;
- [0355] d. 다음 의학적 병태의 현재 상태 또는 병력:
- 호흡기 질환(예를 들어, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환)
- [0356] • 고혈압, 좌위 수축기 혈압 150mmHg 초과 또는 이완기 혈압 95mmHg 초과;
- [0357] • 스크리닝 5년 이내의 악성종양
- [0358] • 심혈관 질환(예를 들어, 심근경색, 울혈성 심부전, 심근병증 또는 임상적으로 유의한 부정맥);
- [0359] e. 다음을 포함하는 기저 질병 또는 치료의 결과로 인한 면역억제:
- 원발성 면역결핍증
- [0360] • 경구 또는 비경구 글루코코르티코이드의 장기 사용(7일 이상);
- [0361] • 항류마티스 약물 및 생물학적 질환 완화 약물의 질환 완화 용량의 현재 또는 예상 사용;
- [0362] • 고형 장기 또는 줄수 이식의 병력
- [0363] • 다른 임상적으로 유의한 면역억제성 또는 임상적으로 진단된 자가면역 질환의 이전 병력.
- [0364] f. 삼각근 및 전외측 대퇴사두근을 고려하여 ID 주사 및 EP에 이용할 수 있는 허용 가능한 부위가 두 부위 미만임;
- [0365] g. 연구 시험자가 생각하기에 연구 결과를 혼란스럽게 하거나 또는 연구 참여로 인해 환자에게 추가적인 위험을 초래할 수 있는 임의의 신체 검사 소견 및/또는 임의의 질병 병력.
- [0366] 면역원성 평가 방법
- [0367] 스크리닝 시, 0주(투여 전) 및 제6주 및 제8주에 수집된 샘플을 분석하였다. 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 피콜 하이파크(ficoll hypaque)에서 표준 오버레이에 의해 혈액 샘플로부터 단리한 후 원심분리하였다. 단리된 세포를 10% DMSO 및 90% 송아지 태아 혈청에 동결시켰다. 동결된 PBMC를 후속 분석을 위해 액체 질소에 보관하였다. 혈청 샘플을 결합 및 중화 항체 역가를 측정하기 위해 사용할 때까지 -80°C에서 보관하였다.
- [0368] SARS-CoV-2 야생형 바이러스 중화 검정
- [0369] SARS-CoV-2/오스트레일리아/VIC01/2020 단리주 중화 검정을 영국 공중보건국(영국 포튼 다운 소재)에서 수행하

였다. 중화 바이러스 역가를 56°C에서 30분 동안 열-불활성화된 혈청 샘플에서 측정하였다. SARS-CoV-2(오스트레일리아/VIC01/2020 단리주44)를 933 pfu/ml의 농도로 희석하고, 25mM HEPES 완충액을 포함하는 1% FCS/MEM에 50:50으로 혼합하고, 혈청 희석액을 두 배로 늘렸다. 37°C에서 1시간 인큐베이션한 후, 바이러스-항체 혼합물을 Vero E6 세포(ECACC 85020206; PHE, 영국)의 컨플루언트 단일층으로 옮겼다. 바이러스를 인큐베이터에서 추가 시간 동안 37°C에서 세포에 흡착시키고, 세포 단일층을 MEM/4% FBS/1.5% CMC로 덮었다. 37°C에서 5일 인큐베이션 후, 플레이트를 고정하고, 25% 메탄올(v/v) 중 0.2% 크리스탈 바이올렛 용액(시그마)으로 염색하였다. 플라크를 계수하였다.

[0372] S1+S2 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA)

ELISA 플레이트를 2.0 mg/ml의 재조합 SARS-CoV-2 S1+S2 스파이크 단백질(아크로 바이오시스템즈(Acro Biosystems); SPN-C52H8)로 코팅하고, 2°C 내지 8°C에서 밤새 인큐베이션하였다. S1+S2는 전장 스파이크 단백질 GenBank # QHD43416.1의 아미노산 잔기 Val 16-Pro 1213을 포함한다. 이는 단백질을 삼량체성 예비-융합 상태(R683A, R685A)로 안정화시키는 2개의 돌연변이를 포함하며, 또한 C-말단 10xHis 태그(서열번호 24)를 포함한다. 그런 다음, 플레이트를 0.05% Tween-20(시그마; P3563)이 포함된 PBS로 세척하고, 실온에서 1시간 내지 3시간 동안 차단하였다(스타팅 블록(Starting Block), 써모 사이언티픽(Thermo Scientific); 37,538). 샘플을 차단 완충액을 사용하여 연속 희석하고, 준비된 대조군과 함께 세척되고 차단된 검정 플레이트에 이중으로 첨가하였다. 샘플을 차단된 검정 플레이트에서 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 샘플 및 대조군 인큐베이션 후, 플레이트를 세척하고, 차단 완충액 중 항-인간 IgG HRP 접합체(비디 파밍겐; 555,788)의 1/1000 제제를 각 웰에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척한 다음, TMB 기질(케이피엘; 5120-0077)을 첨가하고, 실온에서 약 10분 동안 인큐베이션하였다. 다음으로 TMB 정지 용액(케이피엘; 5150-0021)을 첨가하고, Synergy HTX 마이크로-플레이트 판독기(바이오텍)에서 450nm 및 650nm에서 플레이트를 판독하였다. 검정 반응의 크기는 플레이트 보정된 광학 밀도가 피험자의 해당 0주차 배경보다 3 SD 높은 최대 희석 연속 희석액의 최대 상호간 희석 인자로 정의된 역가로 나타내었다.

[0374] SARS-CoV-2 스파이크 ELISpot 검정

백신 접종 전후에 말초 단핵 세포(PBMC)를 시험관내에서 전장 컨센서스 스파이크 단백질 서열에 걸쳐 있는 15량체 웹타이드(9개의 잔기에 의해 중첩됨)로 자극하였다. 미리 코팅된 ELISpot 플레이트(맙-테크(Mab-Tech), 인간 IFN-g ELISpot Plus)에서 ml당 5mg의 농도의 웹타이드 풀과 함께 세포를 인큐베이터에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음날, 세포를 세척하고, 플레이트를 항-IFN-g 검출 항체를 바이오티닐화한 후 스트렙타비딘-효소 접합체를 바이오니틸화하여 발색시켜 눈에 보이는 반점을 생성하였다. 각 반점은 개별 사이토카인-분비 세포에 해당한다. 플레이트를 발색시킨 후, 반점을 스캔하고, 면역-포획 및 면역점 소프트웨어가 포함된 CTL S6 마이크로 분석기(CTL)를 사용하여 정량화하였다. 값은 측정된 삼중의 배경-빼기 평균으로 나타내었다. ELISpot 검정 적격성은 12개의 반점 형성 단위가 검출의 하한임을 결정하였다. 따라서, 이 컷오프를 초과하는 모든 것은 항원 특이적 세포 반응의 신호로 간주하였다.

[0376] INO-4800 SARS-CoV-2 스파이크 유세포 분석 검정

PBMC를 또한 유세포 분석을 사용한 세포내 사이토카인 염색(ICS)분석을 위해 사용하였다. 200ml 완전 RPMI 배지 중 백만 개의 PMBC를 DMSO(음성 대조군), PMA 및 아이오노마이신(양성 대조군, 각각 100 ng/ml 및 2 mg/ml) 또는 표시된 웹타이드 풀(225 µg/ml)로 6시간(37°C, 5% CO₂) 동안 자극하였다. 1시간의 자극 후, 브레펠린 A 및 모넨신(비디 골지스탑 앤 골지플러그, 각각 0.001% 및 0.0015%)을 첨가하여 발현된 사이토카인의 분비를 차단하였다. 자극 후, 세포를 4°C로 밤새 옮겼다. 다음으로, 세포를 생존/사멸 염색(라이프 테크놀로지스 Live/Dead aqua fixable 생존력 염료)을 위해 PBS로 세척한 다음, FACS 완충액(0.5% BSA, 2mM EDTA, 20mM HEPES)에 재현 탁시켰다. 다음으로, 세포의 마커를 염색하고, 세포를 고정하고, 투과화(eBioscience™ Foxp3Kit)한 다음, 형광 접합 항체를 사용하여 표시된 사이토카인(표 9)에 대해 염색하였다. 도 22a 및 도 22b는 CD4+ 및 CD8+ T 세포에 대한 대표적인 게이팅 전략뿐만 아니라 IFN-γ, TNF-α, IL-2 및 IL-4의 양성 발현의 예를 보여준다.

[0378] 통계적 분석

이 시험에는 공식적인 전력 분석을 적용하지 않았다. 기술 통계를 사용하여 안전성 종말점: 8주 동안의 AE와의 비율, 투여 부위 반응 및 AESI를 요약하였다. 또한, 기술 통계를 사용하여 면역원성 종말점: 세포 결과에 대한 반응 중앙값(95% 신뢰 구간 포함)과 반응자의 백분율 및 체액성 결과에 대한 기하 평균 역가(95% 신뢰 구간 포함)와 반응자의 백분율을 요약하였다. SARS-CoV-2 중화 반응(자연 로그-척도에서, 대응표본 t-검정(paired t-

test) 사용), ELISpot 반응(Wilcoxon 부호-순위 검정 사용) 및 세포내 흐름 검정 반응(Wilcoxon 부호-순위 검정 사용)에서 백신 접종 후에서 백신 접종 전 쌍을 뺀 차이의 사후 분석을 수행하였다.

[0380]

결과

[0381]

연구 집단 인구 통계

[0382]

총 55명의 참가자를 스크리닝하였고, 40명의 참가자를 초기 두 그룹에 등록하였다(도 16). 평균 연령은 34.5세(18세 내지 50세 범위)였다. 참가자는 55%(22/40)가 남성이었다(표 6). 대부분의 참가자는 백인이었다(82.5%, 33/40).

[0383]

백신 안전성 및 내약성

[0384]

총 참가자 40명 중 39명(97.5%)이 2회 투여를 모두 완료하였다; 2.0mg 그룹의 1명의 피험자는 연구 또는 투여와 관련이 없는 임상 현장으로의 운송 부족으로 인해 2차 투여를 받기 전에 시험 참여를 중단하였다(도 16). 나머지 39명의 모든 피험자는 1차 투여 후 제8주에 방문을 완료하였다. 1차 투여 후 8주까지 총 11건의 국부 및 전신 이상 반응(AE)이 보고되었으며; 이 중 6건은 백신과 관련된 것으로 간주되었다(표 10). 모든 AE는 중증도가 1등급(경증)이었다. 6건의 관련 AE 중 5건은 주사 부위 통증(3명) 및 홍반(2명)을 포함한 주사 부위 반응이었다. 백신과 관련된 한 가지 1등급 전신 AE는 메스꺼움이었다. 모든 관련 AE는 피험자가 1차 또는 2차 백신 접종을 받은 투여일에 발생하였다. 발열 반응은 없었으며, 백신 접종 후 해열제를 사용하지 않았다. AE로 인해 시험을 중단한 피험자는 없었다. 중증 이상 반응(SAE)이나 특별 관심대상의 이상 반응(AESI)은 보고되지 않았다. 초기 8주의 추적 관찰 기간 동안 시험자가 임상적으로 유의한 것으로 간주한 비정상적인 실험실 값은 없었다. 1.0mg 그룹(15%, 3명/20명)과 비교하여 2.0mg 그룹(10%, 2명/20명)에서 백신과 관련된 AE를 경험한 피험자의 수의 증가는 없었다(도 19). 또한, 두 용량 그룹 모두에서 첫 번째 용량에 비해 두 번째 용량으로 인한 AE의 빈도는 증가하지 않았다.

표 10

MedDRA® 시스템 기관 등급, 중증도 및 연구 백신 접종에 대해 조사자가 할당한 관계에 따라 분류된 이상 반응의 수

MedDRA® 기관계 분류	중증도	백신 접종과 무관함	백신 접종과 관련이 있음	총 수
임의의 기관계 분류	경증	5	6	11
	중등도	-	-	-
	중증	-	-	-
위장관 장애	경증	1	1	2
	중등도	-	-	-
	중증	-	-	-
일반 장애 및 투여 부위 상태	경증	-	5	5
	중등도	-	-	-
	중증	-	-	-
부상, 중독 및 결차상의 합병증	경증	2	-	2
	중등도	-	-	-
	중증	-	-	-
신생물 양성, 악성 및 상세불명	경증	1	-	1
	중등도	-	-	-
	중증	-	-	-
신경계 장애	경증	1	-	1
	중등도	-	-	-
	중증	-	-	-

[0385]

면역원성

[0386]

38명의 피험자를 면역원성 분석에 포함하였다. 투여를 완료하기 전에 중단한 2.0mg 그룹의 1명의 피험자 외에, 1.0mg 그룹의 1명의 피험자가 기준일에 혈청 양성으로 간주되어 제외되었다. 이 피험자에 대한 데이터는 표 11에서 찾을 수 있다.

표 11

등록 시 혈청-양성인 피험자에 대한 면역 반응, INO-4800 1.0mg 용량 그룹

면역 검정	제 0 주의 결과	제 6 주의 결과
증화 제 6 주 상호 역가	785	1089
RBD 결합 항체 제 6 주 상호 역가	1	1
S1+S2 결합 항체 제 6 주 상호 역가	1	14580
IFN-감마 ELISpot 제 6 주 SFU/10^6 PBMC	55.6	27.8

[0388]

[0389] 체액성 면역 반응

[0390] S1+S2 스파이크 단백질에 결합하는 능력에 대해 혈청을 테스트하였다. 1.0mg 그룹 참가자의 89%(17/19) 및 2.0mg 그룹 참가자의 95%(18/19)가 백신 접종 전 시점(0주)과 비교할 때 S1+S2 스파이크 단백질에 대한 혈청 IgG 결합 역가가 증가하였으며, 1.0mg 및 2.0mg 그룹에서 반응자 GMT는 각각 655.5(95% CI: 255.6, 1681.0) 및 994.2(95% CI: 395.3, 2500.3)였다(**도 17b, 도 20** 및 표 13). 또한, 살아있는 바이러스 PRNTIC50 중화 검정에 의해 살아있는 바이러스를 중화하는 능력에 대해 혈청을 테스트하였다. 기준선에 비해 제6주에 기하 평균 배수 증가는 1.0mg 및 2.0mg 그룹에서 각각 (4.4, 27.0)의 95% CI로 10.8 및 (5.3, 24.9)의 95% CI로 11.5였다. 각 그룹에서, 제6주에 기준선에 비해 통계적으로 유의한 증가가 있었다($P<0.0001$ 대응표본 t-검정, 사후 분석)(**도 17a**). 제6주에, 반응자의 백분율은 1.0mg 및 2.0mg 그룹에서 각각 78%(14/18) 및 84%(16/19)였고(**도 17a** 및 표 13), 반응자 기하 평균 역가(GMT)는 1.0mg 및 2.0mg 그룹에서 각각 102.3(95% CI: 37.4, 280.3) 및 63.5(95% CI: 39.6, 101.8)였다. 1.0mg 및 2.0mg 용량 그룹에서 제6주에 전체 혈청전환(중화 및/또는 S 단백질에 대한 결합 항체에 반응을 보이는 참가자로 정의됨)은 각 그룹에 대해 95%(18/19)였다(표 13).

[0391] 효소-결합 면역점(ELISpot)

[0392] 제8주에 반응자의 백분율은 1.0mg 용량 그룹에서 74%(14/19)였고, 2.0mg 용량 그룹에서 100%(19/19)였다. 혈청 전환 데이터 결과와 함께 취한 이 데이터는 각 그룹에서 100%(19/19) 전체 면역 반응을 나타낸다(표 13, **도 18a** 및 **도 21**). 10^6 개 PBMC당 SFU 중앙값은 1.0mg 및 2.0mg 용량 그룹의 반응자에 대해 각각 46(95% CI: 21.1, 142.2) 및 71(95% CI: 32.2 내지 194.4)이었다. 기준선에 비해 제8주의 중앙값 변화는 각 그룹에서 22.3(95% CI: 2.2, 63.4) 및 62.8(95% CI: 22.2, 191.1)이었고, 각 그룹에서 기준선보다 통계적으로 유의한 증가가 있었다($P= 0.001$ 및 $P<0.0001$, 각각, Wilcoxon 일치-쌍 부호 순위 검정, 사후 분석)(**도 18a**). 또한, ELISpot 검정으로 테스트된 3개의 회복기 샘플(3개 모두 증상이 있지만 입원하지 않음)은 제8주에 2.0mg 용량 그룹보다 중앙값 33으로 더 낮은 T 세포 반응을 나타내었다는 점에서 흥미롭다(**도 20**). **도 18b** 및 **도 18g**에 도시된 바와 같이, 2.0mg 그룹의 T 세포 반응을 5개의 에피토프 풀에 대해 매핑하였다. 고무적으로, T 세포 반응은 수용체 결합 도메인 영역을 포함하는 지배적인 풀과 함께 스파이크 단백질의 모든 영역에서 관찰되었으며, 그 다음으로 N 말단 도메인뿐만 아니라 융합 웨타이드, 웨타드 반복부 1(Heptad Repeat 1) 및 중앙 나선을 덮는 풀이 뒤따랐다.

[0393] 세포내 흐름 검정

[0394] INO-4800에 대한 세포성 면역 반응에 대한 CD4+ 및 CD8+T 세포의 기여를 세포내 사이토카인 염색(ICS)에 의해 평가하였다. 2.0mg 용량 그룹에서, IFN-γ, TNF-α 및/또는 IL-2(임의의 반응)를 생성하는 CD8+ T 세포에서 제6주까지의 기준선으로부터의 중앙값 변화는 (-0.02, 0.23)의 95% CI로 0.11이었고; 변화는 크게 증가하였다($P=0.0181$, Wilcoxon 일치-쌍 부호 순위 검정, 사후 분석). 이는 주로 IFN-γ뿐만 아니라 TNF-α 생성의 상당한 증가로 인한 것이다(**도 18c**). 또한, 2.0mg 용량 그룹에서, TNF-α를 생성하는 CD4+T 세포에서 제6주에 기준선으로부터의 중앙값 변화는 (0.01 내지 0.09)의 95% CI로 0.02였고; 변화는 또한 크기 증가하였다($P=0.0020$, Wilcoxon 일치-쌍 부호 순위 검정, 사후 분석, **도 18c**). 효과기(CCR7-CD45RA+), 효과기 기억(CCR7-CD45RA-) 및 중심 기억(CCR7+CD45RA-) 세포를 특성화하기 위해 표면 마커 CCR7 및 CD45RA에 대해 임의의 사이토카인(백신 접종 후 IFN-γ 또는 TNF-α 또는 IL-2)을 생성하는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포의 조성을 또한 평가하였다(**도 18d**). 두 용량 그룹에서, SARS-CoV-2 스파이크 웨타이드에 의한 자극에 반응하여 사이토카인을 생성하는 CD8+ T 세포는 일반적으로 3개의 접단에 걸쳐 균형을 이룬 반면, CD4+ T 세포는 주로 중심 기억 표현형이었다(**도 18d**). 백신 접종 후 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 한 번에 하나 이상의 사이토카인을 생성하는 능력에 대해 추가로 조사하였으며, 2.0mg 용량 그룹에서 CD8+ T 세포의 거의 절반(41%)이 IFN-γ 및 TNF-α를 이중으로 생성한다는 점을 알게 되었다(**도 18e**). 1.0mg 용량 그룹에서 사이토카인을 생성하는 CD8+ T 세포는 주로 단일작용성 IFN-γ 생산 세포였다(57%). CD4+ T 세포 구획은 또한 1.0mg 및 2.0mg 용량 그룹에서 각각 6% 및 9%로 본질적으로 다작용성이었고, IFN-γ, TNF-α 및 IL-2의 세 가지 사이토카인 모두를 생성하였다(표 12). Th2 반응을 또한 IL-4 생성을 평가함으로써 측정하였고, 백신 접종 후 어떠한 그룹에서도 통계적으로 유의한 증가는 관찰되지 않았다(Wilcoxon 일치-쌍 부호 순위 검정, 사후 분석)(**도 18f**).

[0395] INO-4800은 1.0mg 및 2.0mg 용량 그룹에서 각각 참가자의 15%(3명/20명 피험자) 및 10%(2명/20명 피험자)의 약품-관련 1등급 AE 빈도로 내약성이 우수하였다. 연구에서는 1등급 AE만이 기록되었으며, 이는 기존의 허가된 백

신과 비교할 때 유리하다. 성공적인 COVID-19 백신의 안전성 프로파일은 중요하며, 이는 노인 및 동반질환이 있는 노인을 포함하여 SARS-CoV-2 감염으로 인한 합병증의 더 심각한 위험이 있는 위험 집단에서 INO-4800의 광범위한 개발을 지원한다. INO-4800은 또한 INO-4800의 2회 투여 후 항체 또는 T 세포 반응 중 하나 또는 둘 다를 나타내는 38명의 평가 가능한 참가자 모두와 함께 균형 잡힌 체액성 및 세포성 면역 반응을 생성하였다. 결합 또는 중화 항체에 의해 측정된 체액성 반응은 각 용량 그룹의 참가자의 95%(18명/19명)에서 관찰되었다. 살아있는 바이러스 중화 검정에 의해 측정된 중화 항체는 참가자의 78%(14명/18명) 및 84%(16명/19명)에서 관찰되었고, 상응하는 GMT는 1.0mg 및 2.0mg 용량 그룹에서 각각 102.3[95% CI(37.4, 280.3)] 및 63.5[95% CI(39.6, 101.8)]였다. 이 범위는 회복기 환자로부터 보고된 PRNT IC50 역가뿐만 아니라 SARS-CoV-2 시험투여에서 보호된 NHP의 PRNT IC50 역가의 범위와 겹친다. 또한, 역가가 통계적으로 유의하게 증가하였다. 중화 항체 역가가 발생하지 않은 백신 수용자 1명을 제외하고 모두 T 세포 ELISpot 검정에서 양성 반응을 보였으며, 이는 백신에 의해 생성된 면역 반응이 이러한 검정에서 차등적으로 등록되고 있음을 시사한다는 점에 유의하는 것이 중요하다. 세포성 면역 반응은 1.0mg 및 2.0mg 용량 그룹 각각의 74%(14명/19명) 및 100%(19명/19명)에서 관찰되었다. 중요하게는, INO-4800은 1.0mg 및 2.0mg 용량 그룹 각각에서 더 빈번하고 더 높은 반응자 반응 중앙값 (46[95% CI(21.1, 142.2)] 대 71[95% CI(32.2, 194.4)] SFU 10^6 개 PBMC)으로 T 세포 반응을 생성하였다. 2.0mg 용량 그룹에서 이러한 T 세포 반응은 테스트된 회복기 샘플보다 규모가 더 커졌다(**도 18a**). 또한, SFU가 통계적으로 유의하게 증가하였다. 유세포 검정에서, 1.0mg 및 2.0mg 용량 그룹 모두, 특히 2.0mg 그룹에서 CD4+ 및 CD8+T 세포 구획 모두에서 사이토카인 생성의 증가를 보여주었다. 2.0mg 그룹은 IFN- γ , TNF- α , CD8+T 세포 구획으로부터의 "임의의 사이토카인" 및 CD4+T 세포 구획으로부터의 TNF- α 를 포함하는 다수의 통계적으로 유의한 사이토카인 결과물을 나타내었다(**도 18c**). 2.0mg 용량 그룹에서 CD8+T 세포 반응이 IL-2가 있거나 없이 IFN- γ 및 TNF- α 모두를 발현하는 세포에 의해 지배되었다는 점이 상당히 중요하다(**도 18e** 및 표 12). 전체적으로, 이러한 세포는 총 CD8+T 세포 반응의 거의 절반에 달하였다(42.7%, 표 12).

[0396] 이 1상 시험에서, INO-4800 백신 접종은 Th1-유형 사이토카인 IFN- γ , TNF- α 및 IL-2의 증가된 발현에 의해 입증된 바와 같이 IFN-ELISpot뿐만 아니라 다중 매개변수 유세포 분석 모두에 의해 측정된 증가된 Th1 표현형으로 실질적인 T 세포 반응을 유도하였다(**도 18c**). INO-4800에 의해 유도된 세포 반응의 평가는 중심 및 효과기 기억 세포 모두로의 분화 특징을 나타내는 SARS-CoV-2 특이적 CD4+ 및 CD8+T 세포의 존재를 나타내었으며, 이는 지속적인 세포 반응이 확립되었음을 시사한다(**도 18d**). 중요하게는, 이는 원형적 Th2 사이토카인인 IL-4의 유도를 최소화하면서 달성되었으며(**도 18f**), 이는 이 백신이 전임상 모델에서 보호 유도와 함께 면역 표현형을 갖고 있어 진행성 질환을 유도할 위험이 없을 것임을 뒷받침한다.

표 12

유세포 분석 다작용성

매개변수 출력	1.0mg 코호트		2.0mg 코호트	
	CD4 사이토카인 빈도(%)	CD8 사이토카인 빈도(%)	CD4 사이토카인 빈도(%)	CD8 사이토카인 빈도(%)
IFN-감마만	31.2	56.7	29.5	27.1
TNF-알파만	20.4	14	20.9	11.2
IL-2만	22.3	16.5	20.1	16.5
IFN-감마 및 TNF-알파만	8.0	9.7	6.7	40.6
IFN-감마 및 IL-2만	2.1	0.9	0.6	1.3
IL-2 및 TNF-알파만	9.6	0.7	13.5	1.2
IFN-감마 및 IL-2 및 TNF-알파	6.4	1.5	8.7	2.1

열거된 백분율은 총 사이토카인 반응에 대한 각 출력의 기여도이다.

[0397]

표 13

면역 검정	1.0mg 코호트			2.0mg 코호트		
	전체 값	반응자 값	반응자 [‡] n(%)	전체 값	반응자 값	반응자 [‡] n(%)
중화 제 6 주 GMT 상호 역가 [95% CI](범위)	44.4 [14.6, 134.8](1, 11647)	102.3 [37.4, 280.3](13, 11647)	14/18(78%)	34.9 [15.8, 77.2] (1,652)	63.5 [39.6, 101.8](13652)	16/19(84%)
S1+S2 결합 항체 제 6 주 GMT 상호 역가 [95% CI](범위)	331.2 [91.2, 1203.2]	655.5 [255.6, 168.1](20, 14580)	17/19(89%)	691.4 [217.5, 2197.2](1, 14580)	994.2 [395.3, 2500.3](20, 14580)	18/19(95%)
총 혈청전환(S1+S2 또는 중화에서의 반응)	해당없음	해당없음	18/19(95%)	해당없음	해당없음	18/19(95%)
IFN-감마 ELISpot 제 8 주 SFU 중앙값 [95% CI](범위)	26.2 SFU [10.0- 64.4] (1, 374.4)	45.6 [21.1, 142.2](16.7, 374.4)	14/19(74%) [¶]	71 SFU [32.2- 194.4] (8.9, 615.6)	71 SFU [32.2- 194.4] (8.9, 615.6)	19/19(100%) [¶]
전체 면역 반응률(혈청전환 또는 ELISpot)	해당없음	해당없음	19/19(100%)	해당없음	해당없음	19/19(100%)

1.0mg 코호트는 기준선 양성 NP ELISA 가 있는 1 명의 피험자를 제외한다

[‡] 반응 기준: 살아있는 중화 -제 6 주 PRNT IC₅₀ 10 이상, 또는 결합 ELISA 활성이 보이는 경우 4 이상; S1+S2 결합 - 제 6 주 값 1 초과; RBD 결합 -제 6 주 값 1 초과; ELISpot - 제 0 주 동안 값 12 SFU 이상

[¶] - 제 6 주 또는 제 8 주 데이터를 사용하여 생성된 반응자

[0398]

확장된 I상 연구

[0399]

약 120명의 건강한 지원자가 세(3) 가지 용량 수준(연구 그룹)에 걸쳐 평가될 것이다. 총 40명의 피험자가 각 연구 그룹에 등록될 것이다. 각 연구 그룹으로의 등록은 연령별로 계층화될 것이다: 18세 내지 50세 n=20, 51세 내지 64세 n=10 및 65세 이상 n=10(표 14).

[0400]

피험자는 적어도 18세의 성인이고; 스크리닝 시 수행된 병력, 신체 검사 및 활력 징후에 근거하여 시험자가 건강한 것으로 판단한 자; 모든 연구 절차를 준수할 수 있고 준수할 의사가 있는 자; 정상 한계 이내이거나 시험자가 임상적으로 유의하지 않은 것으로 간주한 스크리닝 실험실 결과; 스크리닝 시 18 kg/m² 내지 30 kg/m²의 체질량 지수; 스크리닝 시 B형 간염 표면 항원(HBsAg), C형 간염 항체 및 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 항체에 대한 음성 혈청학적 테스트; 시험자가 임상적으로 유의한 소견(예를 들어, 울프-파킨슨-화이트 증후군)이 없는 것으로 간주한 스크리닝 ECG를 갖는 경우일 것이며; 생식 능력과 관련하여 다음 기준 중 하나를 충족하여야 한다: 12개월 이상 동안 자연 무월경으로 정의되는 폐경 후 여성; 외과적으로 불임이거나 또는 불임 상태인 파트너가 있는 경우; 의학적으로 효과적인 피임법의 사용. 제외 기준은 다음과 같다: 스크리닝 방문에서부터 시작하여 마지막 투여 후 3개월까지 시험 예상 기간 내에 임신 또는 수유 중이거나 또는 임신을 계획 중이거나 또는

자녀가 있는 아버지; 스크리닝 동안 양성 혈청 임신 테스트 또는 투여 전 양성 소변 임신 테스트; 0일 이전 30일 이내에 임상시험용 의약품에 대한 연구에 참여 중이거나 또는 참여한 적이 있는 경우; 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)에 대한 이전 노출 또는 COVID-19, 중동 호흡기 증후군(MERS) 또는 중증 급성 호흡기 증후군(SARS)의 예방 또는 치료를 위한 임상시험용 의약품의 접종; SARS-CoV-2에 노출될 위험이 높은 현재 직업(예를 들어, 환자와 직접적인 상호작용을 하거나 또는 직접 의료를 제공하는 의료 종사자 또는 응급 대응 요원)에 있는 경우; 호흡기 질환의 현재 상태 또는 병력, 백신 또는 약물에 대한 과민성 또는 중증 알레르기 반응, 스크리닝 5년 이내의 당뇨병, 고혈압, 악성종양 또는 심혈관 질환의 진단; 원발성 면역결핍증을 포함한 기저 질병 또는 치료의 결과로 인한 면역억제, 경구 또는 비경구 글루코코르티코이드의 장기 사용(7일 이상), 질환 완화 용량의 항류마티스 약물 및 생물학적 질환 완화 약물의 현재 또는 예상 사용, 고령 장기 또는 골수 이식의 병력 및 다른 임상적으로 유의한 면역억제성 또는 임상적으로 진단된 자가면역 질환의 이전 병력; 삼각근 및 전외측 대퇴사두근을 고려하여 ID 주사 및 EP에 이용할 수 있는 허용 가능한 부위가 두 부위 미만 경우; 또는 보고된 흡연, 전자담배 또는 활성 약물, 알코올 또는 약물 남용 또는 의존; 또는 연구 시험자가 생각하기에 연구 결과를 혼란스럽게 하거나 또는 연구 참여로 인해 환자에게 추가적인 위험을 초래할 수 있는 임의의 신체 검사 소견 및/또는 임의의 질병 병력.

[0402] 모든 피험자는 제0일 및 제4주에 투여를 받을 것이다(표 15). 부스터 투여를 받는 데 동의한 피험자(표 16)는 2회-투여 양생법(제0일 및 제4주)으로 이전에 투여받은 것과 동일한 용량으로 투여 일정에서 12주 이전에 부스터 투여를 받을 것이다. 안전성 및 면역원성은 부스터 투여 후 제2주에 평가될 것이다.

표 14

연구 그룹	총 피험자 수	연령별 피험자 수	연령(세)	투여 주	주사당 INO-4800 용량	투여 방문당 주사/EP 수	투여 방문당 INO-4800 용량	총 INO-4800 용량
1	40	20*	18-50	0, 4(± 5 일), 선택적 부스터 ^b	1.0mg	1	1.0mg	3.0mg
		10	51-64					
		10	65 이상					
2	40	20*	18-50	0, 4(± 5 일), 선택적 부스터 ^b	1.0mg	2 ^a	2.0mg	6.0mg
		10	51-64					
		10	65 이상					
3	40	20	18-50	0, 4(± 5 일), 선택적 부스터 ^b	0.5mg	1	0.5mg	1.5mg
		10	51-64					
		10	65 이상					
총				* 기본 연구(확장 연구의 기타)				

^a INO-4800 은 각각의 투여 방문에서 두 개의 다른 팔다리의 허용 가능한 위치에서 ID로

주사한 후 EP로 주사한다

^b 선택적 부스터 용량은 2 회-투여 양생법에 대해 이전에 투여받은 동일한 용량으로 투여 스케줄에서 12 주 이전에 전달된다.

[0403]

[0404] 선택적 부스터 투여를 받지 않은 피험자는 연구 종료(EOS) 방문이 될 제52주까지 연구 종료(EOS) 방문을 위해 추적 관찰될 것이다(표 15). 선택적 부스터 투여를 받은 피험자의 경우, 부스터 투여 방문 후 제48주가 EOS 방문이 될 것이다(표 16).

- [0405] 1차 목적:
- 건강한 성인 지원자에서 ID 주사에 이어 EP에 의해 투여된 INO-4800의 내약성 및 안전성 평가
- [0406] • ID 주사에 이어 EP에 의해 투여된 INO-4800에 대한 세포 및 체액성 면역 반응의 평가
- [0407] 1차 안전성 종말점:
- [0408] • 기관계 분류(SOC), 대표 용어(PT), 중증도 및 임상시험용 의약품과의 관계에 따른 이상 반응의 발생. 이상 반응(AE)이 있는 참가자의 백분율[기간: 기준일에서 최대 52주(선택적 부스터 투여를 받지 않은 경우) 또는 부스터 투여 방문 후 48주(선택적 부스터 투여를 받은 경우)까지].
- [0409] • 투여(즉, 주사) 부위 반응(빈도 및 중증도로 기재됨). 투여(주사) 부위 반응이 있는 참가자의 백분율
- [0410] [기간: 0일에서 최대 52주(선택적 부스터 투여를 받지 않은 경우) 또는 부스터 투여 방문 후 48주(선택적 부스터 투여를 받은 경우)까지].
- [0411] • 특별 관심대상의 이상 반응의 발생. 특별 관심대상의 이상 반응(AESI)이 있는 참가자의 백분율. [기간: 기준일에서 최대 52주(선택적 부스터 투여를 받지 않은 경우) 또는 부스터 투여 방문 후 48주(선택적 부스터 투여를 받은 경우)까지].
- [0412] 1차 면역원성 종말점:
- [0413] • 결합 검정에 의한 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질 항원-특이적 항체. SARS-CoV-2 스파이크 당단백질 항원-특이적 결합 항체 역가의 기준선으로부터의 변화[기간: 기준일에서 최대 52주(선택적 부스터 투여를 받지 않은 경우) 또는 부스터 투여 방문 후 48주(선택적 부스터 투여를 받은 경우)까지].
- [0414] • IFN-감마 ELISpot 및/또는 유세포 분석 검정에 의한 항원-특이적 세포성 면역 반응. 항원-특이적 세포성 면역 반응의 기준선으로부터의 변화
- [0415] [기간: 기준일에서 최대 52주(선택적 부스터 투여를 받지 않은 경우) 또는 부스터 투여 방문 후 48주(선택적 부스터 투여를 받은 경우)까지].
- [0416] 탐색적 목적:
- [0417] • T 세포 및 B 세포성 면역 반응 모두를 평가함으로써 확장된 면역학적 프로파일의 평가
- [0418] • 2회-투여 양생법에 이어 ID 주사에 이어 EP에 의해 투여된 INO-4800의 선택적 부스터 투여의 안전성 및 면역원성의 평가
- [0419] 탐색적 종말점:
- [0420] • 샘플 이용 가능성에 의해 결정되는 모든 주에 면역학적 단백질 및 관심 유전자의 mRNA 수준을 측정함으로써 T 세포 및 B 세포 수, 중화 반응 및 T 세포 및 B 세포 분자 변화에 대한 추가적인 평가를 포함할 수 있는(그러나 이로 제한되지 않음) 확장된 면역학적 프로파일
- [0421] • ID 주사에 이어 EP에 의해 투여된 INO-4800의 선택적 부스터 후 모든 이상 반응의 발생 정도
- [0422] • ID 주사에 이어 EP에 의해 투여된 INO-4800의 선택적 부스터 후 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질 항원-특이적 중화 및 결합 항체
- [0423] • ID 주사에 이어 EP에 의해 투여된 INO-4800의 선택적 부스터 투여 후 IFN- γ ELISpot 및/또는 유세포 분석에 의한 항원-특이적 세포성 면역 반응
- [0424] 안전성 평가. 대상체는 시험 기간 동안 EOS 또는 대상체의 마지막 방문을 통해 안정성에 대해 추적 관찰될 것이다. 이상 반응은 모든 방문(Post-부스터 투여 후 제1일 및 제36주 전화 통화 포함)에서 수집될 것이다. 실험실 혈액 및 소변 샘플은 이벤트 일정에 따라 채취될 것이다(표 15 및 표 16).

표 15

사건의 비-부스터 임상 시험 스케줄

테스트 및 평가	스크리닝 ^a	제 0 일		제 1 일 (+1 일)	제 1 주 (± 3 일)	제 4 주 (± 5 일)		제 6 주 (± 5 일)	제 8 주 (± 5 일)	제 12 주 (± 5 일)	제 28 주 (± 5 일)	제 40 주 (+5d)	제 52 주(± 5d)
		전	후			전	후						
동의서 작성	X												
포함/제외 기준	X												
병력	X	X											
인구통계	X												
병용 약물	X	X			X	X		X	X	X	X	X	
신체 검사 ^b	X	X			X	X		X	X	X	X	X	
활력 징후	X	X			X	X		X	X	X	X	X	
키 및 체중	X												
감별이 있는 CBC	X				X			X	X	X	X	X	
화학 ^c	X				X			X	X	X	X	X	
HIV, HBV, HCV 혈청학 ^d	X												
SARS-CoV-2 혈청학	X												
12-리드 ECG	X												
일반 소변검사 ^e	X				X			X	X	X	X	X	
임신 테스트 ^f	X	X				X							
INO-4800 + EP ^g	X ^h				X ^h								
다운로드 EP 레이터 ⁱ			X			X							
이상 반응 ^j	X	X	X	X ^k	X	X	X	X	X	X	X	X	
면역학(전혈) ^l	X	X				X		X	X	X	X	X	
면역학(혈청) ^m	X	X				X		X	X	X	X	X	

- [0426]
- a. 스크리닝 평가는 제 0 일 ~30 일부터 -1 일 전까지 시행한다.
 - b. 스크리닝 및 제 52 주(또는 임의의 다른 연구 중단 방문)에서만 전체 신체 검사. 다른 모든 방문에서 표적 신체 검사. Na, K, Cl, HCO₃, Ca, PO₄, 글루코스, BUN, Cr, AST, ALT 및 TBili 포함.
 - c. HIV 항체 또는 신속 검사, HBsAg, HCV 항체.
 - d. 포도당, 단백질, 혈뇨용 디스티, 디스티이 비정상인 경우 혈미경 검사를 수행하여야 한다.
 - e. 스크리닝 시 혈청 임신 테스트. 다른 방문에서 소변 임신 테스트.
 - f. 피내 주사 후 EP 를 통해 전달된 모든 용량.
 - h. 연구 그룹 그룹 1 및 그룹 3 의 경우, 바람직하게는 제 0 일 및 제 4 주에 삼각근 피부에 1 회 주사. 연구 그룹 2 의 경우, 서로 다른 삼각근 또는 외측 대퇴사두근에; 바람직하게는 제 0 일 및 제 4 주에 삼각근에 주사할 때마다 피부에 2 회 주사한다.
 - i. INO-4800+EP 의 투여 후, EP 레이터는 CELLECTRA® 2000 장치에서 다운로드되어 Inovio 에 제공된다.
 - j. 동의 시점부터의 AE 및 AE 자격을 갖춘 모든 주사 부위 반응을 포함한다.
 - k. AE 수집을 위한 후속 전화 통화.
 - l. 시점당 10mL 산 시트레이트 텍스트로스(ACD, 엘로우 탑) 듀브에 4 x 8.5mL(34mL) 전혈. 참고: 1 차 투여 전(스크리닝 및 제 0 일 투여 전) 총 68mL 의 전혈을 수집한다.
 - m. 시점당 10mL 레드 탑 혈청 수집 듀브에 1 x 8mL 혈액. 참고: 1 차 투여 전(스크리닝 및 제 0 일 투여 전) 각 시점에서 각 1mL(총 4mL) 혈청의 4 개 분취량을 수집한다.
- [0427]

표 16

사건의 부스터 임상 시험 스케줄

테스트 및 평가	부스터 투여 방문		부스터 투여 방문 후 제 2 주 (± 5 일)	부스터 투여 방문 후 제 12 주 (± 5 일)	부스터 투여 방문 후 제 24 주 (± 5 일)	부스터 투여 후 제 36 주 전화 통화(+5 일)	부스터 투여 방문 후 제 48 주 (± 5 일)
	전	후					
병용 약물	X		X	X	X		X
신체 검사 ^a	X		X	X	X		X
활력 정후	X		X	X	X		X
감별이 있는 CBC	X		X	X	X		X
화학 ^b	X		X	X	X		X
일반 소변검사 ^c	X		X	X	X		X
임신 테스트 ^d	X						
INO-4800 + EP ^e	X ^f						
다운로드 EP 레이터 ^g		X					
이상 반응 ^h	X	X	X	X	X	X ⁱ	X
면역학(전혈) ^j	X		X	X	X		X
면역학(혈청) ^k	X		X	X	X		X

a. 부스터 투여 방문 후 제 48 주(또는 일의의 다른 연구 중단 방문)에서만 전체 신체 검사. 다른 모든 방문에서 대상 신체 검사.

b. Na, K, Cl, HCO₃, Ca, PO₄, 글루코스, BUN, Cr, AST, ALT 및 TBili 포함.

c. 포도당, 단백질, 혈뇨용 딥스틱. 딥스틱이 비정상인 경우 혈미경 검사를 수행하여야 한다.

d. 부스터 투여를 받기 전에 소변 임신 테스트가 음성이어야 한다.

e. 피내 주사 후 EP를 통해 전달된 모든 용량.

f. 연구 그룹 1 및 그룹 3의 경우, 부스터 투여 방문 시 바람직하게는 삼각근(또는 대퇴사두근) 꾀부에 1 회 주사. 연구 그룹 2의 경우, 부스터 투여 방문 시, 각각 다른 삼각근 또는 외측 대퇴사두근, 바람직하게는 삼각근에 각 주사시 꾀부에 2 회 주사.

g. INO-4800+EP의 투여 후, EP 레이터는 CELLECTRA® 2000 장치에서 다운로드되어 Inovio에 제공된다.

h. 동의 시점부터의 AE 및 AE 자격을 갖춘 모든 주사 부위 반응을 포함한다.

i. AE 수집을 위한 후속 전화 통화.

j. 시 점당 10mL 산 시트레이트 테스트로스(ACD, 엘로우 탑) 투브에 4 x 8.5mL(34mL) 전혈.

k. 시 점당 10mL 레드 탑 혈청 수집 투브에 1 x 8mL 혈액.

[0428]

[0429] 면역원성 평가. 면역학 혈액 샘플은 이벤트 일정에 따라 수집될 것이다(표 15 및 표 16). 면역학적 종말점에 대한 수집된 샘플의 분석 결정은 연구 전반에 걸쳐 지속적으로 결정될 것이다.

[0430] 건강한 지원자에게 ID 전달에 이어 CELLECTRA® 2000을 사용하여 EP에 의해 전달된 INO-4800은 내약성이 우수하고 허용 가능한 안전성 프로파일을 나타낼 것으로 예상되며, SARS-CoV-2 스파이크 당단백질에 대한 면역 반응의 생성을 초래하였다.

[0431] 실시예 7 SARS-CoV-2 노출 위험이 높은 건강한 혈청음성 성인에서 피내 투여에 이어 전기천공법(EP)에 의해 투여된 COVID-19 질환에 대한 예방적 백신인 INO-4800의 안전성, 면역원성 및 효능을 평가하기 위한 2/3상 무작위, 맹검, 위약-대조 시험

[0432] 이는 SARS-CoV-2에 대한 노출 위험이 높은 성인 참가자에서 COVID-19 질환을 예방하기 위해 피내(ID) 주사에 이어 CELLECTRA® 2000 장치를 사용한 전기천공법(EP)에 의해 투여된 INO-4800의 안전성, 면역원성 및 효능을 평가하기 위한 2/3상, 무작위, 위약-대조, 다기관 시험이다. 2상 부문은 3개의 연령 그룹에 걸쳐 두 가지 용량 수준으로 대략 400명의 참가자에서 면역원성 및 안전성을 평가할 것이다. 2상 부문으로부터의 안전성 및 면역원성 정보는 대략 7116명의 참가자가 참여하는 연구의 3상 효능 부문에 대한 용량 수준을 결정하는 데 사용될 것이다.

표 17

암(arm)	증재/치료
실험: 2 상: INO-4800 투여 그룹 1 참가자는 제 0 일 및 제 28 일에 INO-4800 1.0 밀리그램(mg)을 1 회 피내(ID) 주사 후 CELLECTRA® 2000 장치를 사용하여 전기 친공법(EP)에 의해 투여받을 것이다.	약물: INO-4800 INO-4800은 제 0 일 및 제 28 일에 ID로 투여될 것이다. 장치: CELLECTRA® 2000 CELLECTRA® 2000 장치를 사용한 EP는 제 0 일 및 제 28 일 INO-4800의 ID 전달 후에 투여될 것이다.
실험: 2상: INO-4800 투여 그룹 2 참가자는 제0일 및 제28일에 INO-4800 1.0mg을 2회 ID 주사 후(총 방문 투여당 2.0mg) CELLECTRA® 2000 장치를 사용하여 EP에 의해 투여받을 것이다.	약물: INO-4800 INO-4800은 제0일 및 제28일에 ID로 투여될 것이다. 장치: CELLECTRA® 2000 CELLECTRA® 2000 장치를 사용한 EP는 제0일 및 제28일 INO-4800의 ID 전달 후에 투여될 것이다.
위약 대조약: 2 상: 위약 투여 그룹 1 참가자는 제 0 일 및 제 28 일에 위약을 1 회 ID 주사 후 CELLECTRA® 2000 장치를 사용하여 EP에 의해 투여받을 것이다.	약물: 위약 멸균 식염수 시트르산나트륨(SSC) 완충액(SSC-0001)이 제 0 일 및 제 28 일에 ID로 투여될 것이다. 다른 명칭: <ul style="list-style-type: none">• SSC-0001 장치: CELLECTRA® 2000 CELLECTRA® 2000 장치를 사용한 EP는 제 0 일 및 제 28 멸균 식염수 시트르산나트륨(SSC) 완충액(SSC-0001)의 ID 전달 후 투여될 것이다.
위약 대조약: 2상: 위약 투여 그룹 2 참가자는 제0일 및 제28일에 위약을 2회 ID 주사 후 CELLECTRA® 2000 장치를 사용하여 EP에 의해 투여받을 것이다.	약물: 위약 멸균 식염수 시트르산나트륨(SSC) 완충액(SSC-0001) 제0일 및 제28일에 ID로 투여될 것이다. 다른 명칭: <ul style="list-style-type: none">• SSC-0001 장치: CELLECTRA® 2000 CELLECTRA® 2000 장치를 사용한 EP는 제0일 및 제28일에 멸균 식염수 시트르산나트륨(SSC) 완충액(SSC-0001)을 ID 전달한 후 투여될 것이다.

<p>실험: 3상: INO-4800 최적 용량 참가자는 제0일 및 제28일에 2상 부문의 결과에 기초하여 INO-4800 1.0mg을 1회 또는 2회 ID 주사한 후 CELLECTRA® 2000 장치를 사용하여 EP에 의해 투여받을 것이다.</p>	<p>약물: INO-4800 INO-4800은 제0일 및 제28일에 ID로 투여될 것이다. 장치: CELLECTRA® 2000 CELLECTRA® 2000 장치를 사용한 EP는 제0일 및 제28일 INO-4800의 ID 전달 후에 투여될 것이다.</p>
<p>위약 대조약: 3상: 위약 최적 용량 참가자는 제0일 및 제28일에 2상 부문의 결과에 기초하여 위약을 1회 또는 2회 ID 주사한 후 CELLECTRA® 2000 장치를 사용하여 EP에 의해 투여받을 것이다.</p>	<p>약물: 위약 멸균 식염수 시트르산나트륨(SSC) 완충액(SSC-0001)은 제0일 및 제28일에 ID로 투여될 것이다. 다른 명칭: • SSC-0001 장치: CELLECTRA® 2000 CELLECTRA® 2000 장치를 사용한 EP는 제0일 및 제28일에 멸균 식염수 시트르산나트륨(SSC) 완충액(SSC-0001)의 ID 전달 후에 투여될 것이다.</p>

[0434]

1차 결과 측정:

[0435]

1. 2상: 인터페론-감마(IFN-γ) 효소-결합 면역점(ELISpot) 검정에 의해 측정된 항원-특이적 세포성 면역 반응의 기준선으로부터의 변화

[0436]

[기간: 기준일에서 최대 393일까지]

[0437]

2. 2상: 슈도바이러스-기반 중화 검정에 의해 측정된 중화 항체 반응의 기준선으로부터의 변화[기간: 기준일에서 393일까지]

[0438]

3. 바이러스학적으로 확인된 COVID-19 질환을 가진 참가자의 백분율

[0439]

[기간: 2회-투여 양생법의 완료 후 14일부터 2차 투여 후 12개월까지(즉, 42일에서 393일까지)]

[0440]

2차 결과 측정:

[0441]

1. 2상 및 3상: 예측되지 않은 그리고 예측된 주사 부위 반응을 나타내는 참가자의 백분율

[0442]

[기간: 동의 시점에서 2차 투여 후 28일까지(56일까지)]

[0443]

2. 2상 및 3상: 예측된 그리고 예측되지 않은 전신 이상 반응(AE)을 나타내는 참가자의 백분율[기간: 동의 시점에서 2차 투여 후 28일까지(56일까지)]

[0444]

3. 2상 및 3상: 중증 이상 반응(SAE)을 나타내는 참가자의 백분율[기간: 기준일에서 393일까지]

[0445]

4. 2상 및 3상: 특별 관심대상의 이상 반응(AESI)을 나타내는 참가자의 백분율[기간: 기준일에서 393일까지]

[0446]

5. 3상: 모든 원인으로 사망한 참가자의 백분율[기간: 기준일에서 393일까지]

[0447]

6. 3상: 비중증 COVID-19 질환이 있는 참가자의 백분율[기간: 2회-투여 양생법의 완료 후 14일부터 2차 투여 후 12개월까지(즉, 42일에서 393일까지)]

[0448]

7. 3상: 중증 COVID-19 질환이 있는 참가자의 백분율[기간: 2회-투여 양생법의 완료 후 14일부터 2차 투여 후 12개월까지(즉, 42일에서 393일까지)]

[0449]

8. 3상: COVID-19 질환으로 사망한 참가자의 백분율[기간: 2회-투여 양생법의 완료 후 14일부터 2차 투여 후 12개월까지(즉, 42일에서 393일까지)]

[0450]

9. 3상: 바이러스학적으로-확인된 SARS-CoV-2 감염이 있는 참가자의 백분율[기간: 2회-투여 양생법의 완료 후 14일부터 2차 투여 후 12개월까지(즉, 42일에서 393일까지)]

- [0452] 10. 3상: COVID-19 질환이 있는 참가자에서의 증상 해결까지의 일[기간: 2회-투여 양생법의 완료 후 14일부터 2차 투여 후 12개월까지(즉, 42일에서 393일까지)]
- [0453] 11. 3상: IFN-감마 ELISpot 검정에 의해 측정된 항원-특이적 세포성 면역 반응에서의 기준선으로부터의 변화[기간: 기준일에서 393일까지]
- [0454] 12. 3상: 슈도바이러스-기반 중화 검정에 의해 측정된 중화 항체 반응에서의 기준선으로부터의 변화[기간: 기준일에서 393일까지]
- [0455] 적격성 기준
- [0456] 연구에 적격한 연령: 18세 이상
- [0457] 연구에 적격한 성별: 모두
- [0458] 젠더 기반: 아니오
- [0459] 건강한 지원자 수용: 예
- [0460] 주요 포함 기준:
- 특히 좁은 환경에서 노출이 상대적으로 길어지거나 또는 개인용 보호 장비(personal protective equipment: PPE)가 일관되지 않게 사용될 수 있는 SARS-CoV-2에 노출될 위험이 높은 환경에서 일하거나 거주하는 자.
- [0461] • 스크리닝 실험실 결과가 실험실 테스트에 대해 정상 한계 내에 있거나 또는 시험자가 임상적으로 유의하지 않은 것으로 간주하는 자.
- [0462] • 폐경 후, 또는 외과적으로 불임이거나 또는 불임 상태인 파트너가 있거나, 또는 마지막 투여 후 3개월까지 지속적이고 올바르게 사용하였을 때 실패율이 연간 1% 미만인 의학적으로 효과적인 피임법을 사용한 자.
- [0463] 주요 제외 기준:
- 온도가 100.4°F(38.0°C) 초파인 급성 열성 질병 또는 상기도 또는 하기도 증상(예를 들어, 기침, 숨가쁨, 인후통)의 급성 발병이 있는 자.
- [0464] • 스크리닝 시 SARS-CoV-2에 대한 혈청 또는 분자(역전사 중합효소 연쇄 반응[RT-PCR]) 테스트에 양성인 자.
- [0465] • 스크리닝 방문에서부터 시작하여 마지막 투여 후 3개월까지 시험 예상 기간 내에 임신 또는 수유 중이거나 또는 임신을 계획 중이거나 또는 자녀가 있는 아버지
- [0466] • 지난 3개월 이내에 입방 밀리미터(/mm³)당 200개 미만의 CD4 수 또는 검출 가능한 바이러스 부하를 기반으로 한 통제되지 않은 HIVd의 알려진 병력이 있는 자.
- [0467] • 0일 이전 30일 이내에 임상시험용 의약품에 대한 연구에 참여 중이거나 또는 참여한 적이 있는 자.
- [0468] • COVID-19, 중동 호흡기 증후군(MERS) 또는 중증 급성 호흡기 증후군(SARS)의 예방 또는 치료를 위한 연구용 백신을 이전에 받은 자(이전 시험에서 위약을 받은 기록이 있는 경우 시험 적격성이 허용됨).
- [0469] • 등록 전 6주 동안 질환의 악화로 치료 또는 입원에 상당한 변화가 필요한 호흡기 질환(예를 들어, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환).
- [0470] • 기저 질병 또는 치료의 결과로 인한 면역억제
- [0471] • ID 주사 및 EP에 이용할 수 있는 허용 가능한 부위의 부족
- [0472] • 0일 이전 1개월 이내에 현혈 또는 수혈
- [0473] • 보고된 알코올 또는 약물 남용 또는 의존 또는 불법 약물 사용(마리화나 사용 제외).

- [0476] • 시험자가 생각하기에 참가자의 안전이나 연구 종료점의 평가에 영향을 미칠 수 있는 모든 질병 또는 병태.
- [0477] 실시예 8 SARS-CoV-2 DNA 백신 INO-4800의 1회 또는 2회 투여 양생법은 비인간 영장류(NHP) 시험투여 모델을 호흡기 질환 부담으로부터 보호한다
- [0478] SARS-CoV-2 스파이크 항원을 암호화하는 합성 DNA 백신 후보인 INO-4800의 피내 전달의 안전성, 면역원성 및 효능을 레서스 마카크 모델에서 평가하였다. 단일 및 두 가지 용량 백신 접종 양생법을 평가하였다. 백신 접종은 SARS-CoV-2에 대해 IFN- γ -생성 T 세포와 함께 결합 및 중화 항체를 모두 유도하였다. 고용량의 SARS-CoV-2 빅토리아01 균주(5×10^6 pfu)를 사용하여 INO-4800 백신 접종이 폐 질환 부담에 미치는 영향을 구체적으로 평가하여 백신 안전성 및 효능 데이터 모두를 얻었다. 보호 효능 및 잠재적인 백신 관련 강화 질환(vaccine enhanced disease: VED)에 대한 백신 유도 면역의 영향에 대한 이해를 제공하기 위해 광범위한 하기도 질환 매개변수를 조직병리학, 폐 질환 스코어링 메트릭 시스템, 인시추 혼성화, 바이러스 RNA RT-PCR 및 컴퓨터 단층촬영(computed tomography: CT) 스캔을 적용하여 측정하였다.
- [0479] 이 실시예는 엄격한 고용량 비인간 영장류 시험투여 모델에서 SARS-CoV-2 DNA 백신 INO-4800의 면역원성, 효능 및 안전성 평가를 설명한다. 레서스 마카크에게 1mg의 INO-4800을 피내 전달하면 2회-투여 양생법과 차선의 1회 투여 양생법 모두에서 SARS-CoV-2 스파이크 항원에 대한 체액성 및 T 세포 반응이 유도된다. 연구 전반에 걸쳐 동물에서 어떠한 명백한 임상적 사건도 기록되지 않았다. 고용량 SARS-CoV-2 시험투여 후, 바이러스 부하의 감소가 관찰되었으며, 1회 및 2회 투여 백신 그룹 모두에서 INO-4800의 효능을 뒷받침하는 폐 질환 부담이 감소하였다. 중요하게는, 백신 관련 강화 질환(VED)은 1회 투여 그룹에서도 관찰되지 않았다.
- [0480] 방법
- [0481] 백신. SARS-CoV-2 IgELS-스파이크를 암호화하는 최적화된 DNA 서열은 발현 및 면역원성을 향상시키기 위해 Inovio의 독점적인 인실리코(in silico) 유전자 최적화 알고리즘을 사용하여 생성하였다. 최적화된 DNA 서열을 합성하고, BamHI 및 XhoI으로 소화시키고, 인간 사이토메갈로바이러스 급초기 프로모터 및 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호의 제어하에 발현 벡터 pGX0001에 클로닝하였다.
- [0482] 동물. 18마리의 인도산 레서스 마카크(Macaca mulatta)를 이 연구에 사용하였다. 연구 그룹은 각 종의 수컷 3마리 및 암컷 3마리로 구성하였고, 모두 2.5년령 내지 3.5년령의 성체이며, 시험투여 당시 체중은 4kg 초과였다. 실험 시작 전에, 사회적으로 적합한 동물을 시험투여 그룹에 무작위로 할당하여 편견을 최소화하였다. 동물을 과학적 절차를 위해 사육, 공급 또는 사용되는 동물의 수용 및 관리에 대한 영국 내무부 실행 강령(2014) 및 2006년 8월 영장류의 수용, 관리 및 사용에 관한 국가 개선, 감소 및 대체를 위한 국가 위원회(NC3R) 지침에 따라 케이지에서 적합한 사회 그룹에 수용하였다. 시험투여 이전 및 기간 동안 하우징은 문헌[Salguero, F.J., et al., Comparison of Rhesus and Cynomolgus macaques as an authentic model for COVID-19. bioRxiv, 2020: p. 2020.09.17.301093]에 기술되어 있다. 모든 실험 작업은 영국 내무부 승인된 프로젝트 라이선스(PDC57C033)의 권한하에 수행하였으며, 이는 포튼 다운 소재의 PHE에서 동물 복지 및 윤리 심사 기관(Animal Welfare and Ethical Review Body: AWERB)의 지역 윤리 심사를 거쳐 1986년 내무부 동물(과학적 절차)에 따라 승인되었다. 하우징으로부터의 제거가 필요한 절차를 위해 케타민 하이드로클로라이드(Ketaset, 100 mg/ml, 포트 도기 애니멀 헬스 엘티디.(Fort Dodge Animal Health Ltd), 영국 사우샘프턴 소재; 10 mg/kg)를 근육내(IM) 주사하여 동물을 진정시켰다. 어떠한 동물도 이전에 실험 절차에 사용된 적이 없었다.
- [0483] 백신 투여. 동물에게 1mg의 SARS-CoV-2 DNA 백신 INO-4800을 제28일에만(1회 투여 그룹) 또는 제0일 및 제28일(2회 투여 그룹)에 피내 주사한 후 3P 어레이가 있는 CELLECTRA 2000® 적응 정전류 전기천공 장치(이노비오 파마슈티칼스)를 사용하여 EP 처리하였다.
- [0484] 백신 접종 단계 동안 격주 간격으로 동물을 진정시키면서 혈청 및 혜파린 처리된 전혈을 수집하였다. 비강 및 인후 면봉을 또한 D56에 시험투여 당일 수집하였다. 시험투여 후, 비강 면봉, 인후 면봉 및 혈청을 1, 3, 5 dpc 및 도태(cull)(6, 7 또는 8 dpc - 절차와 관련된 높은 수준의 노동력으로 인해 시차를 둠)에서 수집하였으며, 혜파린 처리된 전혈은 3 dpc 및 도태에서 수집하였다. 비강 및 인후 면봉은 문헌[Salguero, F.J., et al., Comparison of Rhesus and Cynomolgus macaques as an authentic model for COVID-19. bioRxiv, 2020: p. 2020.09.17.301093]에 기술되어 있는 바와 같이 얻었다.
- [0485] 임상 관찰. 동물을 행동 및 임상 변화에 대해 하루에 여러 번 모니터링하였다. 행동은 우울증, 그룹으로부터 회피, 공격성, 섭식 패턴의 변화, 호흡 패턴, 호흡 속도 및 기침을 포함한 금기-지표에 대해 평가하였다. 연구 전반에 걸쳐 활동 및 건강에 대해 동물을 관찰하고 다음과 같이 점수를 매겼다. 주요: 활동 수준: A0 = 활동적이

며 경계함; A1 = 작동자가 자극할 때에만 활동적임; A2 = 자극/고정 상태에서도 활동적이지 않음; H = 건강함; S = 재채기, C = 기침, Nd = 비강 분비물, Od = 안구 분비물, Rn = 호흡 소음, Lb = 힘든 호흡, L = 무기력, Di = 설사, Ax = 식욕 부진, Dx = 탈수열, RD = 호흡 곤란. 동물 체중, 체온 및 혈액글로빈 수준을 연구 전반에 걸쳐 측정하고 기록하였다.

[0486] 바이러스 및 세포

SARS-CoV-2 빅토리아/01/2020(Caly, L., et al., Isolation and rapid sharing of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) from the first patient diagnosed with COVID-19 in Australia. Med J Aust, 2020. 212(10): p. 459-462)은 Vero/hSLAM 세포에서 1차 성장 후 P1에서 오스트레일리아 멜버른 소재 도히티 연구소(Doherty Institute)로부터 넉넉하게 제공받은 후, 이를 포튼 다운 소재 PHE에서 Vero/hSLAM 세포[ECACC 04091501]에서 두 번 계대하였다. 세포의 감염은 약 0.0005 MOI의 바이러스로 수행하였으며, 멸균된 5mM 붕규산 염 비드와 함께 부드럽게 흔들어 나머지 부착된 세포를 분리한 후 1,000xg에서 10분 동안 원심분리하여 정화시킴으로써 제4일에 수확하였다. 문헌[Lewandowski, K., et al., Metagenomic Nanopore Sequencing of Influenza Virus Direct from Clinical Respiratory Samples. J Clin Microbiol, 2019. 58(1)]에 기술된 바와 같이 Nanopore 및 Illumina를 모두 사용하여 P3 공격시험 스톡에서 전체 게놈 시퀀싱을 수행하였다. 공격시험 스톡의 바이러스 역자를 Vero/E6 세포[ECACC 85020206]에서 플라크 검정에 의해 결정하였다. 세포주는 영국 포튼 다운 소재의 인증된 세포 배양을 위한 유럽 콜렉션(European Collection of Authenticated Cell Cultures: ECACC) PHE로부터 얻었다. 세포 배양물을 10% 소 태아 혈청(FBS)(시그마, 영국 도싯주 소재) 및 25mM HEPES(라이프 테크놀로지스, 미국 캘리포니아주 소재)가 보충된 최소 필수 배지(MEM)(라이프 테크놀로지스, 미국 캘리포니아주 소재)에서 37°C에서 유지하였다. 또한, Vero/hSLAM 배양물에는 발현 플라스미드를 유지하기 위해 0.4 mg/ml의 게네티신(인비트로젠)을 보충하였다. 공격시험 물질의 희석은 인산 완충 식염수(PBS)에서 수행하였다. 접종물(5×10^6 PFU)은 기관내 경로(2ml) 및 비강내 접적(총 1.0ml, 콧구멍당 0.5ml)에 의해 전달하였다.

[0488] 컴퓨터 단층촬영에 의한 임상 징후 및 인라이프 이미징(in-life imaging)

CT 스캔을 SARS-CoV2 시험투여 2주 전 및 시험투여 후 제5일에 수행하였다. CT 이미징은 진정된 동물에서 엘드린 자세 및 반듯이 누운 자세 모두에 대해 16 슬라이스 Lightspeed CT 스캐너(제너럴 일렉트릭 헬스케어(General Electric Healthcare), 미국 위스콘신주 밀워키 소재)를 사용하여 수행하였고, 스캔은 호흡기 질환(이전에 문헌[Salguero, F.J., et al., Comparison of Rhesus and Cynomolgus macaques as an authentic model for COVID-19. 2020: p. 2020.09.17.301093]에 기술되어 있는 바와 같음)의 의료 방사선 전문의가 평가하였다. 낮은 질환 부피(즉, 25% 미만의 폐 침범)를 갖는 개별 NHP 사이의 차이를 구별할 수 있는 능력을 제공하기 위해, 인간 환자에서 COVID의 비정상적인 특징의 소유(COVID 패턴 점수) 및 폐 전반에 걸친 특징 분포(구역 점수)에 대해 점수를 부여하는 정제된(refined) 스코어링 시스템을 설계하였다. COVID 패턴 점수는 다음 시스템에 따라 확인된 결절의 수 및 GGO 및 폐경화의 소유 및 범위에 대해 할당된 점수의 합으로 계산하였다: 결절(들): 1개는 1점, 2개 또는 3개는 2점, 4개 이상은 3점; GGO: 각 환부에 하기에 따른 점수를 부여하였다: 측정된 영역이 1cm 미만인 경우 1점, 1cm 내지 2cm인 경우 2점, 2cm 내지 3cm인 경우 3점, 3cm 초과인 경우 4점이고, GGO의 각 영역에 대한 점수를 합산하여 총 GGO 점수를 얻었다; 폐경화: 각 환부에는 하기에 따른 점수를 부여하였다: 측정된 영역이 1cm 미만인 경우 1점, 1cm 내지 2cm인 경우 2점, 2cm 내지 3cm인 경우 3점, 3cm 초과인 경우 4점이다. 폐경화의 각 영역에 대한 점수를 합산하여 총 폐경화 점수를 얻었다. GGO와 비교하여 폐경화 숙주에 대한 예상되는 추가적인 질환 영향을 설명하기 위해, 스코어링 시스템은 폐경화에 대해 할당된 점수를 두 배로 하여 가중치를 부여하였다. 구역 점수를 결정하기 위해, 폐를 12개의 구역으로 나누고, 폐의 각 측면은 3개의 구역으로 나누었다(위에서 아래로): 상부 구역(용골 위), 중간 구역(용골에서 하부 폐정맥까지) 및 하부 구역(하부 폐정맥 아래). 각 구역은 다시 2개의 영역으로 나누었다: 전방 영역(시상 위치에서 횡격막 중간점의 수직선 이전 영역) 및 후방 영역(시상 위치에서 횡격막 중간점의 수직선 이후 영역). 그 결과 총 12개의 구역이 생성되었고, 구조적 변화를 포함하는 각 구역에 1점을 부여하였다. COVID 패턴 점수 및 구역을 합하여 총 CT 점수를 얻었다.

[0490] 사후 검사 및 조직병리학. 동물을 6, 7 및 8 dpc에서 6마리(각 종 및 성별의 동물을 1마리 포함)의 그룹으로 3개의 상이한 시점에서 안락사시켰다. 기관지 폐포 세척액(BAL)을 부검 시 우측 폐에서 수집하였다. 좌측 폐는 BAL 수집 전에 해부하였고, 후속 조직병리학 및 바이러스학 절차에 사용하였다. 부검 시, 비강 및 인후 면봉, 혈액 처리된 전혈 및 혈청을 조직병리학을 위한 조직 샘플과 함께 채취하였다. 비장, 신장, 간, 종격동 및 겨드랑이 텁크절, 소장(십이지장), 대장(결장), 기관, 후두 접종 부위 및 배액 텁크절과 함께 우측 두개골 및 좌측 말단 폐엽으로부터의 샘플을 10% 중성-완충 포르말린에 침지시켜 고정하고, 일상적으로 파라핀 왁스로 처리

하였다. $4\mu\text{m}$ 절편을 절단하고, 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색하고, 현미경으로 검사하였다. 폐 조직병리학 스코어링 시스템[Salguero, F.J., et al., Comparison of Rhesus and Cynomolgus macaques as an authentic model for COVID-19. bioRxiv, 2020: p. 2020.09.17.301093]을 사용하여 기도 및 실질에 영향을 미치는 병변을 평가하였다. 각 좌측 폐엽으로부터의 3개의 조직 절편을 사용하여 폐 조직병리를 평가하였다. 또한, 폐 조직 절편에서 SARS-CoV-2 바이러스 RNA를 확인하기 위해 RNAscope 기법을 사용하여 샘플을 염색하였다. 간략하게는, 조직을 10분(실온) 동안 과산화수소, 15분(98°C 내지 102°C) 동안 표적 검색, 30분(40°C)(어드밴스드 셀 다이아그노스틱스(Advanced Cell Diagnostics)) 동안 프로테이스 플러스로 전처리하였다. V-nCoV2019-S 프로브(SARS-CoV-2 스파이크 유전자 특이적)를 40°C에서 2시간 동안 조직에서 인큐베이션하였다. 또한, SARS-CoV-2 바이러스 RNA를 확인하기 위해 RNAscope 기법을 사용하여 샘플을 염색하였다. RNAscope 2.5 HD 검출 키트 - Red(어드밴스드 셀 다이아그노스틱스, 바이오테크네(Biotechne))를 사용하여 RNAscope 프로토콜에 따라 신호 증폭을 수행하였다. 모든 H&E 및 ISH 염색된 슬라이드를 Panoramic 3D-Histech 스캐너를 사용하여 디지털 스캔하고, CaseViewer v2.4 소프트웨어를 사용하여 보았다. ISH에 의한 바이러스 RNA의 존재는 전체 폐 조직 절편 슬라이드를 사용하여 평가하였다. 병변 내 염색된 세포의 백분율을 확인하기 위해 Nikon-NIS-Ar 소프트웨어 폐키지를 사용하여 RNAscope 표지된 슬라이드에서 디지털 이미지 분석을 수행하였다.

[0491]

RT-qPCR에 의한 바이러스 부하 정량화. RNA를 비강 면봉 및 인후 면봉으로부터 단리하였다. 샘플을 AVL(퀴아젠) 및 에탄올에서 불활성화하였다. 그런 다음, 제조업체의 지침에 따라 BioSprint™96 One-For-A11 수의사 키트(인디칼(Indical)) 및 Kingfisher Flex 플랫폼을 사용하여 하류 추출을 수행하였다. 조직을 완충액 RLT+ 베타마캡토에탄올(퀴아젠)에 균질화하였다. 그런 다음, 조직 균질액을 QIAshredder 균질기(퀴아젠)를 통해 원심분리하고, 제조업체의 지침에 따라 에탄올을 보충하였다. 그런 다음, 제조업체의 지침에 따라 BioSprint™ 96 One-For-A11 수의사 키트(인디칼) 및 Kingfisher Flex 플랫폼을 사용하여 조직 샘플로부터 하류 추출을 수행하였다.

[0492]

바이러스 부하를 결정하기 위해 SARS-CoV-2 뉴클레오팝시드(N) 유전자의 영역을 표적으로 하는 역전사-정량적 중합효소 연쇄 반응(RT-qPCR)을 사용하였으며, TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG(Applied Biosystems™), 2019-nCoV CDC RUO 키트(인테그레이티드 디엔에이 테크놀로지스(Integrated DNA Technologies)) 및 QuantStudio™ 7 Flex 실시간 PCR 시스템을 사용하여 수행하였다. N1 프라이머 및 프로브의 서열은 다음과 같았다: 2019-nCoV_N1-정방향, 5' GACCCCAAAATCAGCGAAAT 3'(서열번호 18) ; 2019-nCoV_N1-역방향, 5' TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG 3'(서열번호 19); 2019-nCoV_N1-프로브, 5' FAM-ACCCCGCATTACGTTGGTGGACC-BHQ1 3'(서열번호 20). 사이클링(cycling) 조건은 다음과 같았다: 25°C에서 2분, 50°C에서 15분, 95°C에서 2분, 이어서 95°C에서 3초, 55°C에서 30초의 45 사이클. 정량화 표준은 SARS-CoV-2 N ORF(등록 번호 NC_045512.2)의 시험관내 전사된 RNA였으며, 정량화는 1 내지 6 로그 카페/ μl 였다. 4.11 로그 카페/ ml 의 정량 한계 미만(LoQ)으로 검출된 양성 면봉 및 유체 샘플에는 5 카페/ μl 의 값이 할당되었고, 이는 3.81 로그 카페/ ml 에 해당하는 반면 검출되지 않은 샘플에는 3.47 로그 카페/ ml 에 해당하는 검정의 검출 하한(LoD)과 동일한 2.3 카페/ μl 미만의 값이 할당되었다. 4.76 로그 카페/ ml 의 정량 한계 미만(LoQ)으로 검출된 양성 조직 샘플에는 5 카페/ μl 의 값이 할당되었고, 이는 4.46 로그 카페/g에 해당하는 반면, 검출되지 않은 샘플에는 4.76 로그 카페/g에 해당하는 검정의 검출 하한(LoD)과 동일한 2.3 카페/ μl 미만의 값이 할당되었다.

[0493]

서브게놈 RT-qPCR을 TaqMan™ Fast Virus 1-Step Master Mix(써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific)) 및 문헌[Wölfel, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. Nature 581, 465-469 (2020)]에 명시된 올리고뉴클레오팝시드를 사용하여 QuantStudio™ 7 Flex 실시간 PCR 시스템에서 수행하였고, 각각 250nM, 125nM 및 500nM의 최종 농도의 정방향 프라이머, 프로브 및 역방향 프라이머를 사용하였다. sgE 프라이머 및 프로브의 서열은 다음과 같았다:

[0494]

2019-nCoV_sgE-정방향, 5' CGATCTCTGTAGATCTGTTCTC 3'(서열번호 21);

[0495]

2019-nCoV_sgE-역방향, 5' ATATTGCAGCAGTACGCACACA 3'(서열번호 22);

[0496]

2019-nCoV_sgE-프로브, 5' FAM- ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BHQ1 3'(서열번호 23).

[0497]

사이클링 조건은 50°C에서 10분, 95°C에서 2분, 이어서 95°C에서 10초 및 60°C에서 30초의 45 사이클이었다. RT-qPCR 앰플리콘을 전장 SARS-CoV-2 E ORF(등록 번호 NC_045512.2)보다 Wolfel 등[Wölfel, R., Corman, V.M., Guggemos, W. et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. Nature 581, 465-469 (2020)]에 기술되어 있는 UTR 리더 서열 및 추정상의 E 유전자 전사 조절 서열이 선행하는 시험관내 전

사된 RNA 표준에 대해 정량화하였다. 정량 하한(LLOQ) 미만으로 검출된 양성 샘플에는 5 카페/ μl 의 값이 할당된 반면, 검출되지 않은 샘플에는 검정 검출 하한(LLOD)과 동일한 0.9 카페/ μl 이하의 값이 할당되었다. 비강 면봉, 인후 면봉 및 BAL 샘플 추출 샘플의 경우, 이는 4.11 로그 카페/ $\text{m}\ell$ 의 LLOQ 및 3.06 로그 카페/ $\text{m}\ell$ 의 LLOD에 해당한다. 조직 샘플의 경우, 이는 4.76 로그 카페/g의 LLOQ 및 3.71 로그 카페/g의 LLOD에 해당한다.

[0498] **플라크 감소 중화 테스트.** 중화 바이러스 역가를 열-불활성화된(56°C에서 30분) 혈청 샘플에서 측정하였다. SARS-CoV-2를 1.4×10^3 pfu/ $\text{m}\ell$ (70 pfu/50 μl)의 농도로 희석하고, 96-웰 V-바닥 플레이트에서 1:10에서 1:320으로 2배 혈청 희석액과 함께 1% FCS/MEM에서 50:50으로 혼합하였다. 플레이트를 가습된 상자에서 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하여 혈청 샘플의 항체가 바이러스를 중화할 수 있도록 하였다. 중화된 바이러스를 세척된 플라크 검정 24-웰 플레이트의 웰로 옮겨(플라크 검정 방법 참조) 37°C에서 추가로 1시간 동안 흡착되도록 하고, 플라크 검정 오버레이 배지로 덮었다. 습윤 상자에서 37°C에서 5일 동안 인큐베이션한 후, 플레이트를 고정하고, 염색하고, 플라크를 계수하였다.

[0499] **항원 결합 ELISA.** 재조합 SARS-CoV-2 스파이크-특이적 및 RBD-특이적 IgG 반응을 ELISA에 의해 결정하였다. SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 전장 삼량체 및 안정화된 버전은 레이크 파르마(Lake Pharma)(#46328)로부터 공급받았다. 재조합 SARS-CoV-2 수용체-결합-도메인(319-541) Myc-His는 매스바이오로직스(MassBiologics)가 개발하여 친절하게 제공하였다. 고결합 96-웰 플레이트(농크 맥시소르프(Nunc Maxisorp), 442404)를 웰당 50 μl 의 1x PBS(깁코(Gibco)) 중 2 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 스파이크 삼량체(S1+S2) 또는 RBD로 코팅하고, 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. ELISA 플레이트를 세척하고, 1x PBS/0.1% Tween 20 중 5% 소 태아 혈청(FBS, 시그마, F9665)으로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 백신 접종 후 동물로부터 수집된 혈청을 1/50의 희석액에서 시작하여 8회 2-배 연속 희석하였다. 시험투여 후, 샘플을 0.5% triton으로 불활성화시키고, 1/100의 희석액에서 시작하여 8회 3-배 연속 희석하였다. 연속 희석은 1x PBS/0.1% Tween 20 중 10% FBS에서 수행하였다. 플레이트를 세척한 후, 각 혈청 희석액 50 μl /웰을 항원-코팅된 플레이트에 이중으로 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, HRP(인비트로젠, PA1-84631)에 접합된 항-원숭이 IgG를 1X PBS/0.1% Tween 20 중 10% FBS에 희석하고(1: 10,000), 100 μl /웰을 플레이트에 첨가하였다. 그런 다음, 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 1 $\text{mg}/\text{m}\ell$ 의 O-페닐렌다이아민 다이하이드로클로라이드 용액(시그마 P9187)을 제조하고, 웰당 100 μl 을 첨가하였다. 웰당 50 μl 의 1M 염산(피셔 케미칼(Fisher Chemical), J/4320/15)로 밭색을 중단시키고, Softmax(버전 7.0)를 사용하여 몰리큘러 디바이시스(Molecular Devices) versamax 플레이트 판독기에서 490nm에서의 흡광도를 판독하였다. 종말점 역가 결정 방법을 사용하여 역가를 결정하였다. 각 샘플에 대해, 종말점 역가는 컷-오프 이상의 판독값(OD)을 제공하는 최고 샘플 희석의 역수로 정의하였다. 각 실험 그룹에 대한 컷-오프를 미경험 샘플의 평균 OD + 3SD로 결정하였다.

[0500] **말초 혈액 단핵 세포 단리 및 소생(resuscitation).** 표준 방법을 사용하여 헤파린으로 항응고된 전혈(8720 $\text{m}\ell$ 혈액당 132 단위)(비디 사이언시스, 영국 옥스포드 소재)로부터 PBMC를 단리하였다. 조직으로부터 단리된 PBMC를 180°C에서 보관하였다. 소생을 위해, PBMC를 해동하고, 1 U/ $\text{m}\ell$ 의 DNase(시그마)가 포함된 R10 배지(2mM L-글루타민, 50 U/ $\text{m}\ell$ 페니실린 - 50 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 스트렙토마이신 및 10% 열-불활성화된 FBS가 보충된 RPMI 1640으로 이루어짐)로 세척하고, R10 배지에 재현탁시키고, 5% CO₂ 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다.

[0501] **ELISpot.** IFN γ ELISpot 검정을 사용하여 이전에 기술된 바와 같이 인간/시미안 IFN γ 키트(맵 테크(MabTech), 스웨덴 나카 소재)를 사용하여 PBMC에서 SARS-CoV-2-특이적 T 세포의 빈도 및 IFN γ 생성 능력을 추정하였다 [Sibley, L.S., et al., ELISPOT Refinement Using Spot Morphology for Assessing Host Responses to Tuberculosis. Cells, 2012. 1(1): p. 5-14]. 세포를 웰당 2×10^5 개 세포로 검정하였다. 세포를 ECD 스파이크 단백질에 걸쳐 있는 SARS-CoV-2 웹타이드 풀로 밤새 자극하였다. 9개의 아미노산이 중첩되는 15량체 웹타이드를 포함하는 5개의 웹타이드 풀을 748개 사용하였다. 포르볼 12-미리스테йт(시그마)(100 ng/ $\text{m}\ell$) 및 아이오노마이신(씨엔 바이오사이언시스(CN Biosciences), 영국 753 노팅엄 소재)(1 $\text{mg}/\text{m}\ell$)을 양성 대조군으로 사용하였다. 결과를 계산하고, 백만 세포당 반점 형성 단위(SFU)로 보고하였다. 모든 SARS-CoV-2 웹타이드를 이중으로 검정하고, 배지만 있는 웰을 빼서 항원-특이적 SFU를 얻었다. ELISPOT 플레이트를 CTL 스캐너 및 소프트웨어(씨티엘(CTL), 독일 소재)를 사용하여 분석하고, GraphPad Prism(그래프패드 소프트웨어(GraphPad Software), 미국 소재)을 사용하여 추가 분석을 수행하였다.

[0502] **통계.** 모든 통계적 분석은 GraphPad Prism 7 또는 8 소프트웨어(캘리포니아주 라 호야 소재)를 사용하여 수행하였다. 이를 데이터는 $p < 0.05$ 인 경우 유의미한 것으로 간주하였다. 수행된 통계적 분석의 유형은 도면의 범례에

상세히 설명되어 있다. 분석에서 제외된 샘플 또는 동물은 없었다.

[0503] 결과:

[0504] INO-4800의 1회 및 2회 투여 양생법의 면역원성. 12마리(수컷 6마리 및 암컷 6마리)의 레서스 마카크에 각각 제28일 또는 제0일 및 제28일에 INO-4800의 1회 투여(6마리 동물) 또는 2회 투여(6마리 동물)로 백신을 접종하였다(도 22a). 각 처리에 대해, 1mg INO-4800을 피내로 투여한 후 CELLECTRA-ID EP를 투여하였다. 추가로 6마리의 연령 및 성별이 일치하는 동물에게 백신을 접종하지 않고 대조군 그룹으로 제공하였다. 동물을 관찰하고, 연구 기간 동안 경고 및 건강한 것으로 점수를 매겼으며, 동물에서 이상 반응 또는 임상적 이상은 기록되지 않았다(도 23). 모든 동물에서 SARS-CoV-2 스파이크 항원 반응성 IgG 항체의 혈청 역가를 제0일 내지 제56일 사이에 측정하였다. 단일 투여 그룹(INO-4800 X1)에서, SARS-CoV-2 스파이크 항원 삼량체 S1 + S2 ECD 형태에 대한 평균 종말점 역가는 467이고, RBD 항원에 대한 평균 종말점 역가는 442이며, 백신 접종 후 제14일에 살아있는 바이러스(시험투여 균주와 일치하는 빅토리아/01/2020) 중화 역가는 239였다(도 22b 내지 도 22d). 2회 투여 그룹(INO-4800 X2)에서, S1 + S2 ECD에 대해 2,142, RBD 항원에 대해 1,538의 평균 종말점 역가 및 2,199의 살아있는 바이러스 중화 역가가 2차 백신 접종 후 제14일에 측정되었다(도 22b 내지 도 22d). INO-4800을 이용한 백신 접종은 IFN- γ ELISpot에 의해 측정된 바와 같이 PBMC 접단에서 SARS-CoV-2 스파이크 항원-특이적 Th1 T 세포 반응을 유도하였다(도 22e). 요약하면, INO-4800의 피내 전달은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질에 대한 기능적 체액성 및 T 세포 반응을 유도하였으며, 이는 2차 투여 후 증가되었다. 바이러스 시험투여 당일(제56일)에, 혈청 내 SARS-CoV-2 중화 항체의 수준은 대조군 그룹과 비교하여 백신이 접종된 그룹에서 유의하게 높았다($p = 0.015$). 바이러스 시험투여 후, 제56일과 제62일 내지 제64일 사이에 모든 그룹에서 SARS-CoV-2 스파이크 결합 및 중화 항체 역가가 약간 증가하였다(도 22b 내지 도 22d). 대조군 그룹에서, 바이러스 시험투여 후 SARS-CoV-2 스파이크 항원에 걸쳐 있는 웹타이드에 대한 세포성 면역 반응의 증가가 있었지만 백신이 접종된 그룹에서의 변화는 거의 없었으며, 이는 아마도 숙주 면역계의 체액성 암(arm)에 의한 바이러스 감염의 제어 때문일 것이다(도 22f).

[0505] SARS-CoV-2 시험투여 후 상기도 및 하기도에서의 바이러스 부하.

[0506] 제56일에, 모든 동물에게 총 5×10^6 pfu SARS-CoV-2를 상기도 및 하기도 모두에 시험투여하였다. 어떤 동물에서도 시험투여 동안(6일 내지 8일) 명백한 임상 증상은 관찰되지 않았다(도 23a 내지 도 23c). 표시된 시점에서, 비강 및 인후 면봉을 동물로부터 수집하였다. SARS-CoV-2 바이러스 게놈(바이러스 RNA) 및 바이러스 복제를 나타내는 서브게놈(sgmRNA)을 RT-qPCR로 측정하였다(도 24a 및 도 25a). 인후에서의 바이러스 RNA 곡선 아래 면적(AUC)의 분석은 백신이 접종된 그룹에서 유의하게 감소된 수준을 나타내었다(도 24b). 추가적으로, INO-4800 X2 그룹에서 측정된 피크 바이러스 부하 수준은 대조군 그룹과 비교하여 유의하게 감소되었다(도 24c). 분석은 인후 바이러스 부하 및 중화와 항-RBD IgG 역가 사이에 유의한 음의 상관관계가 있음을 나타내었다(도 15a 내지 도 15d). SARS-CoV-2 sgmRNA 데이터는 대조군과 비교하여 백신이 접종된 그룹에서 바이러스 부하의 감소와 유사한 경향을 나타내었다(도 25a 내지 도 25c). 비강 구획의 분석은 대조군과 비교하여 백신이 접종된 그룹에서 바이러스 RNA 및 sgmRNA의 감소 및 가속화된 제거에 대한 경향을 나타내었지만, 유의 수준에는 도달하지 않았다(도 24d 내지 도 24f 및 도 25d 내지 도 25f). 분석은 제3일에 비강 바이러스 부하 및 중화와 항-RBD IgG 역가 사이에 유의한 음의 상관관계가 있음을 나타내었지만, 제1일에서는 그렇지 않았다(도 15e 내지 도 15h).

[0507] 부검 시(시험투여 후 제6일 내지 제8일), BAL액을 각 동물로부터 수집하였다. SARS-CoV-2 바이러스 RNA 및 sgmRNA 수준을 측정한 결과 수준이 부검 날짜에 따라 각 그룹 내에서 다양하였지만 백신이 접종된 그룹에서는 평균 바이러스의 감소를 나타내었다(도 26a, 도 26b). 부검 시 수집된 조직에서 RT-qPCR을 또한 수행하였다. 시험투여 후 이러한 시점에서, 검출된 SARS-CoV-2 바이러스 RNA 수준은 폐를 제외한 대부분의 조직에서 정량 한계 미만이었다(도 27). 폐 조직 샘플에서 검출된 SARS-CoV-2 바이러스 mRNA 및 sgmRNA 수준의 측정은 백신이 접종된 동물에서 감소된 평균 바이러스 부하를 나타내었다(도 26c 내지 도 26d).

[0508] 요약하면, 데이터는 인후에서의 바이러스 부하의 유의한 감소 및 백신이 접종된 그룹의 폐에서의 바이러스 부하의 감소 경향을 보여주었다. 시험투여 후 상이한 시점(제6일, 제7일 또는 제8일)에서 BAL 및 폐 조직 샘플의 수집은 통계적 분석에 영향을 미치는 관찰된 그룹내 변동성에 추가될 가능성이 있다. RT-qPCR 바이러스 부하 데이터는 INO-4800 백신 접종이 고용량 SARS-CoV-2가 시험투여된 레서스 마카크에서 바이러스 부하를 감소시키는 데 긍정적인 효과가 있으며, 일반적으로, 1회 투여 백신 그룹에 비해 2회 투여 백신 그룹에서 더 낮은 바이러스 수준이 측정되었음을 나타낸다.

[0509] SARS-CoV-2 시험투여 후 폐에서의 질환 부담.

[0510] 시험투여 후 제6일 내지 제8일 부검에서 수집된 폐 조직에 대해 폐 질환 부담을 평가하였다. 이중 맹검 방식으로 연구의 모든 동물에 대해 분석을 수행하였다. 폐 조직의 조직 병리학적 분석을 여러 장기 조직에 대해 수행하였지만, 폐에서만 SARS-CoV-2 감염과 양립하는 현저한 병변이 나타났다. SARS-CoV-2 감염과 일치하는 폐 병변이 백신이 접종되지 않은 대조군 동물의 폐에서 관찰되었고, 백신이 접종된 그룹에서는 감소된 수준으로 관찰되었다. 대표적인 조직병리학 이미지는 도 28에 제공된다. 간략하게는, 폐 실질은 영향을 받지 않은 실질로 둘러싸인 폐렴의 다병소성의 유착(coalescing) 영역으로 구성되어 있었다. 허파파리세포의 괴사를 동반한 폐 손상은 환부에서 두드러진 특징이었다. 폐포 공간 및 폐포간 격막에는 혼합 염증성 세포(대식세포, 림프구, 생존 및 퇴행된 호중구 및 때때로 호산구 포함) 및 부종이 포함되어 있었다. 유형 II 허파파리세포 증식증이 또한 말단 세기관지 및 세기관지-폐포 접합부에서 관찰되었다. 더 큰 기도에서, 때때로 국소 상피 변성 및 박리가 호흡기 상피에서 관찰되었다. 적은 수의 호중구, 림프구 세포, 때때로 호산구를 포함하는 혼합 염증성 세포가 기관지 및 세기관지 벽을 침윤하였다. 일부 기도의 내강에서는, 퇴행성 세포, 주로 호중구 및 상피 세포와 혼합된 점액이 관찰되었다. 실질 내에서, 혈관주위 및 세기관지주위 커핑이 또한 관찰되었으며, 대부분 침윤물을 포함한 림프구 세포였다.

[0511] SARS-CoV-2 RNA 양성의 조직병리학 점수 및 조직 영역 백분율을 적용하여 질환 부담을 정량화하였다. 백신이 접종되지 않은 그룹은 백신이 접종된 그룹과 비교할 때 폐에서 가장 높은 조직 병리학적 점수를 보였다(도 29a 및 도 29c). 백신이 접종된 그룹의 동물은 INO-4800X1 그룹의 동물 #10A를 제외하고 백신이 접종되지 않은 동물과 비교할 때 감소된 병리를 보였으며, 이는 백신이 접종되지 않은 동물과 유사한 조직 병리학적 점수를 보여준다. 폐 조직에서 SARS-CoV-2 RNA의 존재를 검출하기 위해, 인시추 혼성화(*in situ hybridization*: ISH)를 수행하였다. 바이러스 RNA는 백신이 접종된 동물에서 감소된 빈도로 조직 병리학적 병변 내의 허파파리세포 및 염증성 세포에서 관찰되었다(도 29b).

[0512] CT 스캔을 수행하여 폐 질환의 인라이프, 비편향, 정량화 가능한 메트릭을 얻었다. SARS-CoV-2의 시험투여 후 제5일에 수행된 폐 CT 이미징 결과를 다음 COVID-19 질환 특징의 존재에 대해 평가하였다: 고립성 폐결절(GGO), 폐경화, 고르지 못한 포장(crazy paving), 결절, 소엽주위 폐경화; 분포 - 상부, 중간, 하부, 중앙 2/3, 말초, 기관지 중심 및 폐 색전. 의료 방사선 전문의는 동물의 치료 및 임상 상태에 대해 맹검이었다. 폐 침범의 정도를 평가하고, COVID 질환에 대해 개발된 스코어링 시스템을 사용하여 정량화하였다. 스코어링 시스템 매개변수는 물질 및 방법 부문에 제공되어 있다. INO-4800의 1회 투여 또는 2회 투여 그룹에서의 각 동물 6마리 중 3마리 및 6마리 중 2마리에서, 그리고 대조군 그룹의 백신이 접종되지 않은 동물 6마리 중 5마리에서 COVID-19 질환의 특징적인 폐 이상이 관찰되었다(대표적인 CT 스캔 이미지는 도 30에 제공됨). 질환 관련 동물에서 폐 침범의 정도는 25% 미만이었으며, 낮은 수준의 질환으로 간주되었다(도 29d). 백신이 접종되지 않은 대조군 그룹에서는 질환 점수가 가장 높았고, INO-4800 1회 및 2회 투여 그룹에서는 질환 점수가 감소되는 경향이 있었다(도 29e 내지 도 29g). 그룹 간의 점수 비교는 통계적 차이에 도달하지 않았다(INO-4800 2회 투여 그룹과 백신 접종하지 않은 그룹 사이의 $p = 0.0584$, Mann Whitney 검정). INO-4800 X1 그룹의 한 이상치 동물(10A)은 다른 동물보다 높은 점수를 받았다. 그러나, 질환의 수준은 여전히 낮은 것으로 간주되었으며, 동일한 조건에서 수행된 다른 NHP SARS-CoV-2 시험투여 연구에서 유사한 질환 부담이 관찰되었다. 요약하면, CT 스캐닝은 레서스 마카크에서 SARS-CoV-2-유도성 질환의 유용한 척도를 제공한다. SARS-CoV-2 감염 후 제5일에, 존재하는 이상은 낮은 수준(25% 미만의 폐 침범)으로 보고되었다. CT 스캔으로부터의 증거는 그룹 간 폐 질환 부담의 차이에 대한 경향을 시사하였으며, 백신이 접종되지 않은 대조군 그룹에서 질환 부담이 가장 높았다.

[0513] 요약하면, 비인간 영장류에 대한 고용량 SARS-CoV-2 시험투여 후, INO-4800 백신의 단일 2회 투여 양생법을 받은 동물에서 질환 부담이 감소되었다. 차선의 1회 투여 백신 접종 양생법을 받은 동물에서도 백신 관련 강화 질환의 징후는 없었다.

[0514] 검토

[0515] 이 실시예는 엄격한 고용량 비인간 영장류 시험투여 모델에서 SARS-CoV-2 DNA 백신 INO-4800의 안전성, 면역원성 및 효능 평가를 설명한다. 레서스 마카크에게 1mg의 INO-4800을 피내 전달하면 2회-투여 양생법 및 1회 투여 양생법 모두에서 SARS-CoV-2 스파이크 항원에 대한 체액성 및 T 세포 반응이 모두 유도된다. 연구 전반에 걸쳐 동물에서 어떠한 명백한 임상적 사건도 기록되지 않았다. 고용량 SARS-CoV-2 시험투여 후, 바이러스 부하의 감소가 관찰되었고, 1회 및 2회 투여 백신 그룹 모두에서 폐 질환 부담이 감소하였으며, 이는 INO-4800의 효능을 뒷받침한다. 중요하게는, 백신 관련 강화 질환(VED)은 1회 투여 그룹에서도 관찰되지 않았다.

[0516]

레서스 마카크 모델은 SARS-CoV-2에 대한 의료 대책을 평가하는 데 널리 사용되는 모델이 되었다. 중요하게는, 야생형의 비순응(non-adapted) SARS-CoV-2는 레서스 마카크의 호흡기관에서 복제되며, 이 동물은 경미한 COVID-19 증상이 있는 인간에게서 관찰된 특징의 일부를 나타낸다[Salguero, F.J., et al., Comparison of Rhesus and Cynomolgus macaques as an authentic model for COVID-19. 2020: p. 2020.09.17.301093.; Muñoz Fontela, C., et al., Animal models for COVID-19. Nature, 2020. 586(7830): p. 509-515]. 여기에서는, INO-4800 백신을 접종한 SARS-CoV-2 시험투여 레서스 마카크에서의 폐 질환 부담에 중점을 두었다. 동물에서 측정된 폐 질환 부담의 수준은 경미한 반면, 백신이 접종된 동물의 폐에서 조직병리학 및 바이러스 검출 점수의 상당한 감소가 관찰되었다(**도 29**). 이는 종종 질환으로 진행되는 COVID-19 환자에서 관찰된 LRT 질환에 긍정적인 영향을 미칠 가능성이 있음을 시사한다. 흥미롭게도, 상기도 인후 구획에서도 바이러스 부하의 상당한 감소가 또한 관찰되었지만, 비강 구획에서는 감소의 경향만 관찰되었다. 인후와 비강 구획 사이에 점막 면역의 차등 유도가 존재할 수 있다. 흥미롭게도, 비강이 아닌 인후의 혈청에서 RBD 표적화와 중화 항체 사이의 유의한 음의 상관관계가 있었으며, 시험투여 후 제1일에 바이러스 부하가 관찰되었다(**도 15**). 그러나, 이러한 URT 구획 중 하나에서의 이러한 항체의 수준은 비강 통로와 비교하여 인후에서 증가된 수준의 기능성 항체의 존재에 대한 추가 증거를 제공하기 위해 검정되지 않았다. 또 다른 가능성은 광범위한(5×10^6 pfu) SARS-CoV-2 시험투여 용량이 직접 주입된 비강 구획에서의 바이러스 제어가 다른 점막 구획보다 더 높을 수 있다는 것이다. 이를 뒷받침하기 위해, 대조군 동물의 데이터는 비강 면봉이 인후 면봉보다 더 높은 바이러스 억제력을 산출하였으며, 유사한 관찰 결과가 COVID-19 대상체에서 보고되었음을 보여주었다[Mohammadi, A., et al., SARS-CoV-2 detection in different respiratory sites: A systematic review and meta-analysis. EBioMedicine, 2020. 59: p. 102903].

[0517]

중요하게는, 데이터는 강화된 호흡기 질환(enhanced respiratory disease: ERD)이 1회 투여 또는 2회 투여 양 생법에서 INO-4800 면역화와 관련이 없음을 나타내었다. INO-4800 X1 투여 그룹에서, 한 마리의 동물(10A)이 가장 높은 폐 조직병리학 점수 및 CT 스캔 점수를 나타내었다. 그러나, 동물 10A의 다병소성 병변은 백신이 접종되지 않은 그룹의 동물에서 관찰된 것과 유사한 조직 병리학적 패턴을 보였으며, 침윤에서 상이한 염증성 세포 하위집단의 유입은 없었다. 백신 관련 강화 질환의 잠재적인 특징은 호산구와 같은 염증성 세포의 증가된 유입이다[Bolles, M., et al., A double-inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine provides incomplete protection in mice and induces increased eosinophilic proinflammatory pulmonary response upon challenge. J Virol, 2011. 85(23): p. 12201-15; Yasui, F., et al., Prior Immunization with Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)-Associated Coronavirus (SARS-CoV) Nucleocapsid Protein Causes Severe Pneumonia in Mice Infected with SARS-CoV. The Journal of Immunology, 2008. 181(9): p. 6337-6348]. 동물 10A에 대한 CT 스캔 및 조직병리학 데이터는 ERD와 관련이 있는 것이 아니라 백신이 접종되지 않은 동물과 유사한 질환 점수 및 패턴과 관련이 있는 것으로 여겨진다. 최소-경증에서 경증-중등도 범위의 유사한 폐 조직병리학 염증 점수가 다른 백신 후보를 투여받은 레서스 마카크에서의 시험투여 후 제7일 또는 제8일에 분석된 샘플에서 보고되었다[Corbett, K.S., et al., Evaluation of the mRNA-1273 Vaccine against SARS-CoV-2 in Nonhuman Primates. New England Journal of Medicine, 2020. 383(16): p. 1544-1555]. 현재, VED는 SARS-CoV-2 백신 접종에 대한 이론적 우려로 남아 있으며, SARS-CoV-2의 포르말린 불활성화된 전체 바이러스 제제를 사용하여 강화된 질환을 유도하려는 시도는 다른 불활성화된 호흡기 바이러스 백신에 대해 이전에 보고된 폐 병리를 반복하는 데 실패하였다[Bewley, K.R., et al., Immunological and pathological outcomes of SARS-CoV-2 challenge after formalin-inactivated vaccine immunization of ferrets and rhesus macaques. 2020: p. 2020.12.21.423746].

[0518]

이 데이터는 INO-4800 면역화 후 수 개월 후에 LRT 바이러스 부하의 감소를 입증한 NHP SARS-CoV-2 시험투여 연구를 보완한다(실시예 9). 그러나, 공격시험 스톡에 사용된 다양한 용량과 변이체 및 시험투여 시점은 포함하여 연구 간에 뚜렷한 차이가 있다. 이 실시예에 설명된 연구에서는, 높은 수준의 순환 중화 항체가 존재하는 시점에서 마지막 백신 접종 후 제4주에 동물에게 시험투여되었다. 다른 연구에서는, 혈청 SARS-CoV-2 중화 항체의 수준은 시험투여 당시에 낮았고, 보호는 동물에서 검출된 SARS-CoV-2 스파이크 항원에 대한 강한 체액성 및 세포 반응과 함께 기억 반응의 회상에 의존하는 것으로 나타났다. 여기에서, 유사한 규모의 기억상실 반응은 관찰되지 않았으며, 이는 보호가 시험투여 시 순환계에 존재하는 항체에 의해 매개되었을 수 있음을 시사하며, 이는 혈청 SARS-CoV-2 표적화 항체 수준과 바이러스 부하의 감소 간의 상관관계에 의해 뒷받침된다(**도 15**).

[0519]

결론적으로, 엄격한 전임상 SARS-CoV-2 동물 모델에서의 결과는 COVID-19에 대한 예방적 대응책으로서 DNA 백신 INO-4800의 효능 및 안전성에 대한 추가적인 지지를 제공한다. 중요하게는, 단일 투여 예방 접종으로 테스트한

결과 폐 질환 부담에 긍정적인 영향을 미치며 VED가 없는 것으로 관찰되었다. INO-4800 임상 데이터와 함께, INO-4800은 높은 안정성으로 인해 안전성, 효능 및 물류상의 실현 가능성(logistical feasibility)의 측면에서 많은 속성을 가지고 있으며, 글로벌 접근을 위한 까다로운 저온유통 유통 요구사항에 대한 필요성을 무효화한다. 또한, 합성 DNA 백신 기술은 고도로 가속화된 개발 일정에 따라 면역 회피 가능성을 나타내는 새로운 SARS-CoV-2 변이체에 대한 후보의 신속한 설계 및 테스트를 허용한다[Wibmer, C.K., et al., SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. 2021: p. 2021.01.18.427166.; Moore, J.P. and P.A. Offit, SARS-CoV-2 Vaccines and the Growing Threat of Viral Variants. JAMA, 2021.].

[0520] 실시예 9 SARS-CoV-2 DNA 백신은 체액성 및 세포성 면역을 유도하여 레서스 마카크 시험투여에서 면역기억 보호를 제공하는 기억 반응을 유발한다

SARS-CoV-2 스파이크 단백질을 암호화하는 합성 DNA 백신의 면역원성은 이전에 마우스와 기니피그 모두에서 입증되었다(실시예 1). 이 실시예에서는, 레서스 마카크에서 INO-4800-유도된 면역 반응의 지속성이 입증되었다. 레서스 마카크에서의 ID-EP 투여는 SARS-CoV-1 S 단백질에 대한 추가적인 교차 반응성과 함께 SARS-CoV-2 S 단백질에 대한 세포성 및 체액성 반응을 유도하였다. 보호 효능은 최종 면역화 후 3개월 이상 경과하여 입증되었으며, 이는 백신이 접종된 마카크에서 면역기억 면역 반응의 확립 및 바이러스 부하의 감소를 보여준다. 바이러스 시험투여 후, 피내(ID) 전달을 통해 1mg(DNA 용량의 1/5)이 투여된 대조군 동물과 비교하여 서브게놈 메신저 RNA(sgRNA) BAL 바이러스 부하의 감소가 관찰되었다. 이는 INO-4800 후보의 중등도 질환에 대한 가능성을 뒷받침하는 세포성 및 체액성 면역 암 모두에서 신속한 회상 반응의 유도와 관련되어 있다. 백신 그룹 동물에서 이상 반응 또는 백신 관련 강화 질환(VED)의 증거는 관찰되지 않았다. 하부 폐 및 하부 VL에서 감소된 바이러스 서브게놈 RNA 부하가 관찰되었다. 코에서는, VL이 더 낮아지는 경향이 관찰되었다. 이러한 데이터는 이 DNA 백신 후보를 사용한 면역화가 활성 바이러스 복제를 제한하고 질환의 중증도를 감소시킬 가능성이 있을 뿐만 아니라 비강에서 바이러스 배출(shedding)을 감소시킬 수 있음을 뒷받침한다.

[0522] 이 연구의 대조군 동물에서 검출된 초기 바이러스 부하는 동일한 조건(약 10^7 PFU/면봉)하에서 수행된 유사한 발표된 연구보다 평균 1 내지 2로그 더 높다는 점(시험투여 후 제1일에 4/5 NHP에서 10^9 PFU/면봉)에 유의하는 것이 중요하다(Yu et al., 2020, Science, eabc6284). 이전에 보고된 NHP 연구 중 2개만이 시험투여를 위한 접종 경로로 비강내 전달을 포함하였다(van Doremalen et al., 2020, bioRxiv 2020.05.13.093195; Yu et al., 2020, Science, eabc6284). 고용량 시험투여 접종물은 감염을 확실히 하기 위해 자주 사용되지만, 이 SARS-CoV-2 레서스 마카크 모델과 같은 치명적이지 않은 시스템은 잠재적으로 보호 백신 및 중재의 영향을 인위적으로 줄일 수 있다(Durudas et al., 2011, Curr HIV Res 9, 276-288; Innis et al., 2019, Vaccine 37, 4830-4834). 이러한 제한에도 불구하고, 이 연구는 B 세포 및 T 세포 구획 모두에 의해 매개되는 면역학적 기억의 빠른 유도에 의해 유도될 가능성이 있는 피크 BAL sgRNA 및 전체 바이러스 RNA의 상당한 감소를 보여주었다. Wolfel 등은 증상의 발병 후 1일 내지 5일 동안 환자의 비강 역가가 평균 6.5×10^5 카페/면봉임을 보고하였다(Wolfel et al., 2020, Nature 581, 465-469). 이러한 역가는 시험투여 용량보다 현저히 낮았으며, 이는 백신 후보가 SARS-CoV-2 감염을 초기에 통제할 수 있는 가능성을 뒷받침한다.

[0523] 이 연구는 전장 SARS-CoV-2 스파이크 단백질을 표적으로 하는 백신 후보를 사용한 DNA 백신 접종이 부분 도메인 및 절단된 면역원과 비교하여 T 세포 면역우세 에피토프의 이용 가능성을 증가시켜 더 광범위하고 더 강력한 면역 반응을 유도할 수 있음을 보여준다. 이 연구에서, SARS-CoV-1에 대한 T 세포 교차-반응성이 관찰되었다.

[0524] T 세포 외에도, INO-4800은 SARS-CoV-2 시험투여 후 급격히 증가하는 지속성 항체 반응을 유도하였다. INO-4800이 D614 및 G614 SARS-CoV-2 변이체 모두에 대해 강력한 중화 항체 반응을 유도한다는 것이 추가로 입증되었다. D/G 614 부위가 RBD 외부에 있지만, 이러한 이동이 백신-유도 항체에 영향을 미칠 가능성이 있음이 제안되었다(Korber B et al., 2020, Cell 182:1-16). 다른 연구에 따르면 G614 변이체는 증가된 SARS-CoV-2 감염력을 나타내었다(Hu et al., 2020, bioRxiv 2020.06.20.161323; Ozono S, 2020, bioRxiv 2020.06.15.151779). 데이터는 D614와 G614 변이체 사이에 유사한 중화 역가의 유도를 보여주며, 이러한 반응은 SARS-CoV-2 시험투여 후에 유사하게 회상되었다.

[0525] 물질 및 방법

[0526] 비인간 영장류 면역화, IFN γ ELISpot 및 ELISA

- [0527] DNA 백신 INO-4800: SARS-CoV-2 IgE-스파이크를 암호화하는 고도로 최적화된 DNA 서열을 발현 및 면역원성을 향상시키기 위해 Inovio의 독점적인 인실리코 유전자 최적화 알고리즘을 사용하여 생성하였다(Smith et al., 2020, *Nat Commun* 11, 2601). 최적화된 DNA 서열을 합성하고, BamHI 및 XhoI로 소화시키고, 인간 사이토메갈로바이러스 급초기 프로모터 및 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호의 제어하에 발현 벡터 pGX0001에 클로닝하였다.
- [0528] 동물: 모든 레서스 마카크 실험은 실험실 동물 관리 평가 및 인증 협회(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care: AAALAC) 국제 공인 시설인 바이오퀄(Bioqual)(메릴랜드주 록빌 소재)의 동물실험 윤리 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)에 의해 승인되었다. 혈액 화학, PBMC 단리, 혈청학적 분석을 위해 혈액을 수집하였다. 폐 항체 수준을 검정하기 위해 제8주에 그리고 폐 바이러스 부하를 검정하기 위해 시험투여 후 제1일, 제2일, 제4일, 제7일에 BAL을 수집하였다.
- [0529] 면역화, 샘플 수집 및 바이러스 시험투여. 10마리의 중국 레서스 마카크(4.55kg 내지 5.55kg 범위)를 연구에서 면역화(수컷 3마리 및 암컷 2마리) 또는 미경험(수컷 2마리 및 암컷 3마리)으로 무작위로 할당하였다. 면역화된 마카크에게 3P 어레이가 있는 CELLECTRA 2000® 적응형 정전류 전기천공 장치(이노비오 파마슈티칼스)를 사용하여 ID-EP 투여에 의해 0주 및 4주에 SARS-CoV-2 DNA 백신 INO-4800의 1mg 주사를 2회 투여하였다. 혈액 화학, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 단리를 분석하기 위해 표시된 시점에서 혈액을 수집하고, 혈청학적 분석을 위해 혈청을 수집하였다. 폐 항체 수준을 검정하기 위해 제8주에 기관지폐포 세척액을 수집하였다. 미경험 동물로부터의 BAL을 대조군으로 사용하였다. 제17주에, 모든 동물에게 1.2×10^8 VP(1.1×10^4 PFU) SARS-CoV-2를 시험투여하였다. 바이러스를 비강내(IN) 경로(각 콧구멍에 0.5ml)에 의해 1ml 그리고 기관내(IT) 경로에 의해 1ml 투여하였다.
- [0530] 말초 혈액 단핵 세포 단리. 각 마카크로부터의 혈액을 시트르산나트륨 세포 준비 튜브(CPT, 비디 사이언시스)에 수집하였다. 제조업체의 프로토콜에 따라 튜브를 원심분리하여 혈장 및 림프구를 분리하였다. 샘플은 바이오퀄로부터 PBMC 단리를 위해 위스타 연구소로 콜드팩으로 당일 배송하였다. PBMC를 세척하고, 암모늄-클로라이드-포타슘(ammonium-chloride-potassium: ACK) 용해 완충액을 사용하여 잔류 적혈구를 제거하였다. ViCell 계수기(벡크만 쿰터(Beckman Coulter))를 사용하여 세포를 계수하고, 10% 소 태아 혈청(아틀라스(Atlas)) 및 1% 폐니실린/스트렙토마이신(깁코)이 보충된 RPMI 1640(코닝(Corning))에 재현탁시켰다. 그런 다음, IFN-γ ELISpot 검정 및 유세포 분석을 위해 신선한 세포를 플레이팅하였다.
- [0531] IFN-γ 효소-결합 면역점(ELISpot). 원숭이 인터페론 감마(IFN-γ) ELISpot 검정을 수행하여 세포 반응을 검출하였다. 원숭이 IFN-γ ELISpotPro(알칼리 포스파테이스) 플레이트(맵 테크, 스웨덴 소재, Cat#3421M-2APW-10)를 10% FBS 및 1% 폐니실린/스트렙토마이신(R10)이 보충된 RPMI 1640(코닝)으로 최소 2시간 동안 차단하였다. PBMC 단리 후, 마카크로부터의 200,000개의 세포를 1) SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 또는 MERS-CoV 스파이크 단백질($5\mu\text{g}/\text{ml}$ /웰 최종 농도)에 해당하는 중첩 웨بت아이드 풀(9량체 중첩이 있는 15량체), 2) DMSO가 포함된 R10(음성 대조군), 또는 3) 항-CD3 양성 대조군(맵 테크, 1:1000 희석)의 존재하에 각 웰에 첨가하였다. 모든 샘플을 3중으로 플레이팅하였다. 플레이트를 37°C, 5% CO₂에서 밤새 인큐베이션하였다. 18시간 내지 20시간 후, 플레이트를 PBS로 세척하고, 제조업체의 프로토콜에 따라 반점을 발색시켰다. CTL 면역점 플레이트 판독기를 사용하여 반점을 이미지화하고, 웨بت아이드 풀로 자극한 웰에서 R10+DMSO 음성 대조군 웰의 반점의 수를 빼서 항원-특이적 반응을 결정하였다.
- [0532] 항원 결합 ELISA. 혈청 및 BAL을 각 시점에서 수집하고, 나타낸 바와 같이 결합 역가에 대해 평가하였다. 96웰 면역흡착 플레이트(NUNC)를 DPBS 중 $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 재조합 SARS-CoV-2 S1+S2 ECD 단백질(시노 바이올로지컬 40589-V08B1), S1 단백질(시노 바이올로지컬 40591-V08H), S2 단백질(시노 바이올로지컬 40590-V08B) 또는 수용체-결합 도메인(RBD) 단백질(시노 바이올로지컬 40595-V05H)로 4°C에서 밤새 코팅하였다. ELISA 플레이트를 또한 $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 재조합 SARS-CoV S1 단백질(시노 바이올로지컬 40150-V08B1) 및 RBD 단백질(시노 바이올로지컬 40592-V08B) 또는 MERS-CoV 스파이크(시노 바이올로지컬 40069-V08B)로 코팅하였다. 플레이트를 PBS + 0.05% Tween20(PBS-T)으로 4회 세척하고, PBS-T(5% SM) 중 5% 탈지유로 37°C에서 90분 동안 차단하였다. INO-4800 백신이 접종된 마카크로부터의 혈청 또는 BAL을 5% SM에 연속 희석하고, 세척된 ELISA 플레이트에 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 플레이트를 PBS-T로 4회 세척하고, 항-원숭이 IgG를 서양고추냉이 과산화효소(서던 바이오텍(Southern Biotech) 4700-5)에 접합시켰다. 플레이트를 PBS-T로 4회 세척하고, 1-단계 TMB 용액(시그마)을 플레이트에 첨가하였다. 동일한 부피의 2N 황산으로 반응을 중단시켰다. 바이오텍 Synergy2 플레이트 판독기를 사용하여 발색 30분 이내에 450nm 및 570nm에서 플레이트를 판독하였다.

[0533]

ACE2 경쟁 ELISA-비인간 영장류. 96-웰 절반 면적 플레이트(코닝)를 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ PolyRab 항-His 항체(써모피셔, PA1-983B)로 실온에서 3시간 동안 코팅한 후, 1x PBS, 5% 탈지유, 1% FBS 및 0.2% Tween-20을 포함하는 차단 완충액으로 밤새 차단하였다. 그런 다음, 플레이트를 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 His6x-태깅된 SARS-CoV-2(서열번호 25로 개시된 "His6x"), S1+S2 ECD(시노바이올로지컬, 40589-V08B1)와 함께 실온에서 1시간 내지 2시간 동안 인큐베이션하였다. NHP 혈청(제0주 또는 제6주)을 1% FBS 및 0.2% Tween을 포함하는 1XPBS로 3-배 연속 희석하고, $0.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 일정한 농도로 huACE2-IgMu와 사전 혼합하였다. 그런 다음, 사전 혼합물을 플레이트에 첨가하고, 실온에서 1시간 내지 2시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 1:20,000 희석의 염소 항-마우스 IgG H+L HRP(A90-116P, 베틸 래보래토리즈(Bethyl Laboratories))와 함께 실온에서 1시간 동안 추가로 인큐베이션한 후, 1-단계 TMB 울트라 기질(써모피셔)을 첨가한 다음, 1M H_2SO_4 로 반응을 중지시켰다. 450nm 및 570nm에서의 흡광도를 바이오텍 플레이트 판독기로 기록하였다.

[0534]

유세포 분석-기반 ACE2 수용체 결합 저해 검정. ACE2-GFP를 안정적으로 발현하는 HEK-293T 세포를 레트로바이러스 형질도입을 사용하여 생성하였다. 형질도입 후, 세포를 GFP 발현에 기초하여 유동 분류하여 GFP 양성 세포를 단리하였다. 이들 세포에 대해 단일 세포 클로닝을 수행하여 ACE2-GFP와 동등한 발현을 나타내는 세포주를 생성하였다. ACE2에 대한 스파이크 결합의 저해를 검출하기 위해, S1+S2 ECD-his 태그(시노 바이올로지컬, 카탈로그 #40589-V08B1)를 표시된 시점에 백신이 접종된 동물로부터 수집된 혈청과 함께 인큐베이션하고, 얼음 위에서 60분 동안 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 희석하였다. 그런 다음, 이 혼합물을 150,000개의 293T-ACE2-GFP 세포로 옮기고, 얼음 위에서 90분 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 세포를 PBS로 2회 세척한 후, surelight® APC 접합된 항-his 항체(압캡(Abcam), ab72579)로 얼음 위에서 30분 동안 염색하였다. 양성 대조군으로서, 스파이크 단백질을 293T-Ace2-GFP 세포로 옮기기 전에 재조합 인간 ACE2와 사전 인큐베이션하였다. BD LSRII를 사용하여 데이터를 수집하고, FlowJo(버전 10)로 분석하였다.

[0535]

슈도바이러스 중화 검정. IgE-SARS-CoV-2 S 플라스미드(진스크립트) 및 pNL4-3.Luc.R-E- 플라스미드(NIH AIDS 시약)를 1:1의 비로 사용하여 GeneJammer(애질런트)로 형질감염된 HEK293T 세포를 사용하여 SARS-CoV-2 슈도바이러스를 생성하였다. 형질감염 48시간 후에, 형질감염 상청액을 수집하고, FBS로 12% 최종 부피로 농축시키고, 멸균 여과(밀리포어 시그마)하고, -80°C 에서 보관하기 위해 분취하였다. SARS-CoV-2 슈도바이러스 중화 검정은 96 웰 형식에 D10 배지(10% FBS 및 1X 페니실린-스트렙토マイ신이 보충된 DMEM)를 사용하여 세팅하였다. Ace2를 안정적으로 발현하는 CHO 세포를 표적 세포(크리에이티브 바이오랩스(Creative Biolabs), 카탈로그 번호 VCeL-Wyb019)로 사용하였다. SARS-CoV-2 슈도바이러스는 감염 72시간 후에 상대 발광 단위(RLU)를 제어하는 세포만을 20배 이상 산출하도록 적정하였다. 중화 검정을 세팅하기 위해, 10,000개의 CHO-Ace2 세포를 $100 \mu\text{l}$ D10 배지가 담긴 96-웰 플레이트에 플레이팅하고, 37°C 및 5% CO₂에서 24시간 동안 밤새 방치하였다. 다음날, INO-4800 백신이 접종된 그룹 및 대조군 그룹으로부터의 원숭이 및 토끼 혈청을 열 불활성화시키고, 원하는 대로 연속 희석하였다. 혈청을 고정된 양의 SARS-CoV-2 슈도바이러스와 함께 실온에서 90분 동안 인큐베이션하였다. 웰을 포함한 플레이팅된 CHO-Ace2 세포로부터 $50 \mu\text{l}$ 의 배지를 제거하였다. 90분 후, 혼합물을 플레이팅된 CHO-Ace2 세포에 첨가하고, 표준 인큐베이터(37% 습도, 5% CO₂)에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. 72시간 후, britelite plus 발광 리포터 유전자 검정 시스템(퍼킨 엘머 카탈로그 번호 6066769)을 사용하여 세포를 용해시키고, 바이오텍 플레이트 판독기를 사용하여 RLU를 측정하였다. GraphPad Prism 8을 사용하여 중화 역가(ID50)를 계산하고, 세포 대조군 웰에서 배경 RLU를 뺀 후 바이러스 대조군 웰에서의 RLU와 비교하여 50% 감소된 상호 혈청 희석(reciprocal serum dilution)으로 정의하였다.

[0536]

바이러스 RNA 검정. 본질적으로 이전에 설명한 바와 같이, RT-PCR 검정을 이용하여 바이러스 부하를 모니터링하였다(Abnink P et al 2019 Science). 간략하게는, QIAcube HT(퀴아젠, 독일 소재) 및 Cador 병원체 HT 키트를 사용하여 기관지폐포 세척액(BAL) 상청액 및 비강 면봉으로부터 RNA를 추출하였다. superscript VILO(인비트로젠)을 사용하여 RNA를 역전사시키고, 제조업체의 사양에 따라 QuantStudio 6 및 7 Flex 실시간 PCR 시스템(어플라이드 바이오시스템즈)을 사용하여 이중으로 실행하였다. 바이러스 부하는 ml당 또는 면봉당 바이러스 RNA 카피로 계산하였으며, 검정 민감도는 50 카피였다. 증폭 표적은 SARS-CoV2 N(뉴클레오팝시드) 유전자였다. 표적에 대한 프라이머 및 프로브는 다음과 같았다: 2019-nCoV_N1-F: 5'-GACCCCAAAATCAGCGAAAT-3'(서열번호 18); 2019-nCoV_N1-R: 5'-TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG-3'(서열번호 19); 2019-nCoV_N1-P: 5'-FAM-ACCCCGCATTACGTTGGTGGACC-BHQ1-3'(서열번호 20).

[0537]

서브게놈 mRNA 검정. SARS-CoV-2 E 유전자 서브게놈 mRNA(sgmRNA)는 이전에 설명한 것과 유사한 접근법을 사용하여 RT-PCR에 의해 평가하였다(Wolfel R et al. 2020, Nature, 581, 465-469). 표준 곡선을 생성하기 위해, SARS-CoV-2 E 유전자 sgmRNA를 pcDNA3.1 발현 플라스미드에 클로닝하고; 이 삽입물을 AmpliCap-Max T7 고수율

메시지 메이커 키트(셀스크립트(Cellscrip))를 사용하여 전사시켜 표준용 RNA를 얻었다. RT-PCR에 앞서, 시험 투여된 동물 또는 표준으로부터 수집된 샘플을 제조업체의 지침에 따라 Superscript III Vilo(인비트로젠)를 사용하여 역전사시켰다. Taqman 맞춤형 유전자 발현 검정(써모피셔 사이언티픽)을 E 유전자 sgmRNA를 표적으로 하는 서열을 사용하여 설계하였다(18). 제조업체의 사양에 따라 QuantStudio 6 및 7 Flex 실시간 PCR 시스템(어플라이드 바이오시스템즈)에서 반응을 수행하였다. 표준 곡선을 사용하여 mL당 또는 면봉당 카페로 sgmRNA를 계산하였으며; 정량적 검정 민감도는 mL당 또는 면봉당 50 카페였다.

[0538] 결과

[0539] INO-4800 면역화된 비인간 영장류에서 기억 체액성 및 세포성 면역 반응의 유도. 비인간 영장류(NHP)는 야생형 SARS-CoV-2에 감염될 수 있고 인간과 유사한 병리를 나타내기 때문에 COVID-19 백신 및 치료제의 개발에 중요한 모델이다(Chandrashekhar et al., 2020, Science, eabc4776; Qin et al., 2005, J Pathol 206, 251-259; Yao et al., 2014, J Infect Dis 209, 236-242; Yu et al., 2020, Science, eabc6284). 레서스 마카크(n=5)에게 0 주 및 4주에 INO-4800(1mg)을 2회 예방접종하였다(도 33a). 미경험 대조군 동물(n=5)에게는 백신을 투여하지 않았다. 체액성 및 세포성 면역 반응은 기억 반응을 위한 1차 면역화 후 15주(약 4개월) 동안 모니터링하였다. 모든 동물은 단일 INO-4800 면역화 후 혈청전환되었으며, SARS-CoV-2 S 단백질의 전장 S1+S2 세포외 도메인(ECD), S1, S2 및 RBD 영역에 대해 혈청 IgG 역가가 검출되었다(도 33b 및 도 33c). 교차-반응성 항체가 또한 SARS-CoV S1 단백질 및 RBD에 대해 검출되었지만, MERS-CoV에 대해서는 검출되지 않았다(도 34). ECD 및 RBD에 대한 SARS-CoV-2-반응성 IgG는 면역화 후 제8주에 기관지폐포 세척액(BAL) 세척에서 검출되었다(도 34).

[0540] 동물의 혈청 샘플에서, SARS-CoV-2 슈도바이러스 중화 활성을 면역화 후 4개월 초과 동안 검출되었으며(도 33d), 이는 마카크에서 보고된 다른 급성 보호 연구에서 관찰된 것(Gao et al., 2020, Science 369, 77-81; Tian et al., 2020, Emerg Microbes Infect, 9:382-385; van Doremalen et al., 2020, bioRxiv 2020.05.13.093195; Yu et al., 2020, Science, eabc6284) 및 회복기 인간에 대해 보고된 것(Ni et al., 2020, Immunity 52, 971-977 e973; Robbiani et al., 2020, Nature, s41586-020-2456-9)과 유사한 기억 역가를 보여준다. COVID-19 유행이 진행되는 동안, 잠재적으로 더 큰 감염력을 가진 D614G SARS-CoV-2 스파이크 변이체가 출현하였으며, 이는 현재 새로운 단리주의 80% 초과를 차지하고 있다(Korber B et al., 2020, Cell 182:1-16). 이 변이체가 나타나기 전에 개발된 백신이 D614G 바이러스를 중화하지 못할 수도 있다는 우려가 있다. 따라서, 이 새로운 변이체에 대한 중화를 G614 스파이크 단백질을 발현하는 변형된 슈도바이러스를 사용하여 평가하였다(도 33e). 유사한 중화 ID50 역가가 D614 및 G614 스파이크 모두에 대해 관찰되었으며, 이는 현재 지배적인 SARS-CoV-2 변이체에 대한 INO-4800에 의한 기능적 항체 반응의 유도를 뒷받침한다.

[0541] 중화 활성을 추가로 조사하기 위해, ACE2 경쟁 ELISA를 사용하여 혈청을 또한 조사하였으며, 여기서 면역화된 NHP의 80%로부터의 혈청은 SARS-CoV-2 스파이크-ACE2 상호작용을 저해하였다(도 33f). 마카크의 100%가 유세포 분석 ACE2-293T 저해 검정에서 반응하였으며, 1:10 희석에서 스파이크-ACE2 상호작용을 53% 내지 96% 저해하고, 1:30 희석에서 24% 내지 53% 저해하였다(도 33g).

[0542] INO-4800 면역화는 또한 5개의 웨타이드 풀 모두에 대해 SARS-CoV-2 S 항원 반응성 T 세포 반응을 유도하였으며, 2차 면역화 2주 후인 제6주에 T 세포 반응은 피크에 도달하였다(0-518 SFU/백만 세포)(도 33h). RBD 및 S2 영역에 대한 뚜렷한 면역원성 에피토프 반응이 검출되었다(도 33b). SARS-CoV 스파이크 단백질에 대한 교차-반응성 T 세포 반응도 또한 검출되었다(도 36a). 그러나, MERS-CoV 스파이크 웨타이드에 대한 교차-반응성은 관찰되지 않았으며, 이는 SARS-CoV-2와 MERS-CoV 사이에 더 낮은 서열 상동성을 뒷받침한다(도 36b).

[0543] 백신은 비인간 영장류에 SARS-CoV-2 시험투여 시 기억 회상 반응을 유도하였다. 백신이 접종되지 않은 대조군과 함께 백신으로 면역화된 마카크에게 최종 면역화 후 제13주(약 3개월)에 SARS-CoV-2를 시험투여하였다(연구 제17주, 도 37). NHP에게 이전에 설명한 바와 같이 비강내 및 기관내 접종에 의해 1.1×10^4 PFU의 SARS-CoV-2 단리주 USA-WA1/2020의 시험투여 용량을 투여하였다(Chandrashekhar et al., 2020; Yu et al., 2020). 바이러스 시험투여 시, INO-4800 백신이 접종된 동물의 3/5가 SARS-CoV-2 전장 ECD에 대해 항체 역가가 즉시 증가하였다. 제7일까지, 동물의 5/5가 전장 ECD 및 RBD 모두에 대해 항체 역가가 증가하였다(도 37b). 시험투여 후 제7일에, 409,600 내지 1,638,400 범위의 강력한 기하 평균 종말점 역가가 동물의 1/5에서만 혈청전환을 나타낸 미경험 그룹(GMT 100)과 비교하여 면역화된 동물에서 관찰되었다(도 37b). 시험투여 후 제7일까지 D614 및 G614 스파이크 변이체 모두에 대해 모든 INO-4800 면역화된 동물에서 슈도중화 역가의 상당한 증가가 관찰되었다(도 37c).

[0544] 시험투여 전후에 세포 반응을 평가하였다. 제15주에, IFN- γ ELISpot 반응은 제6주에 관찰된 피크 반응 이후 유의하게 줄어들었다. 시험투여(약 218.36 SFU/백만 세포) 후 백신이 접종된 그룹에서 T 세포 반응이 증가하였으

며, 이는 면역학적 T 세포 기억의 회상을 암시한다(도 38 및 도 39).

[0545] SARS-CoV-2 시험투여 후 보호 효능. 시험투여 시 바이러스 주입 후 더 이른 시점에서, 바이러스 mRNA 검출은 시험투여 접종물 주입과 활성 감염(active infection)을 구별하지 못하는 반면, sgRNA 수준은 활성 세포 SARS-CoV-2 복제를 나타낼 가능성이 더 높다(Wolfel et al., 2020, Nature, 581, 465-469; Yu et al., 2020, Science, eabc6284). SARS-CoV-2 서브게놈 mRNA(sgRNA)를 1.1×10^4 PFU의 SARS-CoV-2 단리주 USA-WA1/2020로 시험투여 후 백신이 접종되지 않은 대조군 및 INO-4800 백신이 접종된 마카크에서 측정하였다(도 40). BAL에서 피크 바이러스 sgRNA 부하는 INO-4800 백신이 접종된 그룹에서 유의하게 더 낮았고(도 40a 및 도 40b), 시험투여 후 제7일에 바이러스 RNA 부하가 유의하게 더 낮았으며(도 40c), 이는 하기도 질환으로부터의 보호를 나타낸다. sgRNA가 대조군 및 INO-4800 백신이 접종된 동물들 다의 비강 면봉에서 검출된 반면(도 40d 내지 도 40f), 바이러스 RNA 수준은 INO-4800 백신이 접종된 동물에서 2로그 이상 감소하는 경향이 있었다(도 40f). 종합하면, INO-4800 백신 접종에 의해 감소된 바이러스 부하는 SARS-CoV-2 감염에 노출된 직후 빠르게 회상된 면역기억 B 세포 및 T 세포 반응으로 인한 것일 가능성이 있다.

[0546] 전술한 상세한 설명 및 첨부된 실시예는 단지 예시일 뿐이며, 첨부된 청구범위 및 그 균등률에 의해서만 정의되는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 간주되어서는 안 된다는 것을 이해하여야 한다.

[0547] 개시된 실시형태에 대한 다양한 변경 및 수정은 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명의 화학 구조, 치환체, 유도체, 중간체, 합성, 조성물, 제형 또는 사용 방법과 관련된 것을 제한 없이 포함하는 이러한 변경 및 수정은 본 발명의 사상 및 범주를 벗어나지 않고 이루어질 수 있다.

[0548] 예시적인 실시형태

[0549] 실시형태 1. 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2) 스파이크 항원을 암호화하는 핵산 분자로서, 상기 핵산 분자는

[0550] 서열번호 2의 55번 내지 3837번 뉴클레오타이드에 제시된 핵산 서열의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열;

[0551] 서열번호 2의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열;

[0552] 서열번호 2의 55번 내지 3837번 뉴클레오타이드의 핵산 서열;

[0553] 서열번호 2의 핵산 서열;

[0554] 서열번호 3의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열;

[0555] 서열번호 3의 핵산 서열;

[0556] 서열번호 5의 55번 내지 3837번 뉴클레오타이드의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열;

[0557] 서열번호 5의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열;

[0558] 서열번호 5의 55번 내지 3837번 뉴클레오타이드의 핵산 서열;

[0559] 서열번호 5의 핵산 서열;

[0560] 서열번호 6의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열; 또는

[0561] 서열번호 6의 핵산 서열

[0562] 을 포함하는, 핵산 분자.

[0563] 실시형태 2. SARS-CoV-2 스파이크 항원을 암호화하는 핵산 분자로서, 상기 SARS-CoV-2 스파이크 항원은,

[0564] 서열번호 1의 19번 내지 1279번 잔기의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열;

[0565] 서열번호 1의 19번 내지 1279번 잔기에 제시된 아미노산 서열;

[0566] 서열번호 1의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열;

[0567] 서열번호 1의 아미노산 서열;

[0568] 서열번호 4의 19번 내지 1279번 잔기의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열;

- [0569] 서열번호 4의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열;
- [0570] 서열번호 4의 19번 내지 1279번 잔기에 제시된 아미노산 서열; 또는
- [0571] 서열번호 4의 아미노산 서열
- [0572] 을 포함하는, 핵산 분자.
- [0573] 실시형태 3. 발현 벡터로서, 실시형태 1 또는 실시형태 2에 따른 핵산 분자를 포함하는, 발현 벡터.
- [0574] 실시형태 4. 실시형태 3에 있어서, 상기 핵산 분자는 프로모터 및 폴리-아데닐화 신호로부터 선택되는 조절 요소에 작동 가능하게 연결되는, 발현 벡터.
- [0575] 실시형태 5. 실시형태 3 또는 실시형태 4에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드 또는 바이러스 벡터인, 발현 벡터.
- [0576] 실시형태 6. 면역원성 조성물로서, 유효량의 실시형태 3 내지 5 중 어느 하나에 따른 발현 벡터를 포함하는, 면역원성 조성물.
- [0577] 실시형태 7. 실시형태 6에 있어서, 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 포함하는, 면역원성 조성물.
- [0578] 실시형태 8. 실시형태 7에 있어서, 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 완충액, 선택적으로 식염수-시트르산나트륨 완충액을 포함하는, 면역원성 조성물.
- [0579] 실시형태 9. 실시형태 8에 있어서, 상기 조성물은 시트르산나트륨염 완충액 밀리리터당 10mg의 농도로 제형화되는, 면역원성 조성물.
- [0580] 실시형태 10. 실시형태 6 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 보조제를 추가로 포함하는, 면역원성 조성물.
- [0581] 실시형태 11. SARS-CoV-2 스파이크 항원으로서,
- [0582] 서열번호 1의 19번 내지 1279번 잔기의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열;
- [0583] 서열번호 1의 19번 내지 1279번 잔기에 제시된 아미노산 서열;
- [0584] 서열번호 1의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열;
- [0585] 서열번호 1의 아미노산 서열;
- [0586] 서열번호 4의 19번 내지 1279번 잔기의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열;
- [0587] 서열번호 4의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열;
- [0588] 서열번호 4의 19번 내지 1279번 잔기에 제시된 아미노산 서열; 또는
- [0589] 서열번호 4의 아미노산 서열
- [0590] 을 포함하는, SARS-CoV-2 스파이크 항원.
- [0591] 실시형태 12. 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2) 감염을 예방 또는 치료하기 위한 백신으로서, 유효량의 실시형태 1 또는 2의 핵산 분자, 실시형태 3 내지 5 중 어느 하나의 벡터 또는 실시형태 11의 항원을 포함하는, 백신.
- [0592] 실시형태 13. 실시형태 12에 있어서, 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 포함하는, 백신.
- [0593] 실시형태 14. 실시형태 13에 있어서, 상기 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 완충액, 선택적으로 시트르산나트륨염 완충액을 포함하는, 백신.
- [0594] 실시형태 15. 실시형태 14에 있어서, 시트르산나트륨염 완충액의 밀리리터당 10mg 핵산의 농도로 제형화되는, 백신.
- [0595] 실시형태 16. 실시형태 12 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 보조제를 추가로 포함하는, 백신.
- [0596] 실시형태 17. 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)에 대한 면역 반응의 유도를 필요로 하는 대상체에서 SARS-CoV-2에 대한 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 유효량의 실시형태 1 또는 2의 핵산 분자, 실시형태 3 내지 5 중 어느 하나의 벡터, 실시형태 6 내지 10 중 어느 하나의 면역원성 조성물, 실시형태 11의 항원 또는 실시형태 12 내지 16 중 어느 하나의 백신을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

- [0597] 실시형태 18. 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2) 감염으로부터의 보호를 필요로 하는 대상체를 SARS-CoV-2 감염으로부터 보호하는 방법으로서, 유효량의 실시형태 1 또는 2의 핵산 분자, 실시형태 3 내지 5 중 어느 하나의 백터, 실시형태 6 내지 10 중 어느 하나의 면역원성 조성물, 실시형태 11의 항원 또는 실시형태 12 내지 16 중 어느 하나의 백신을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0598] 실시형태 19. 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2) 감염과 관련된 질환 또는 장애로부터의 보호를 필요로 하는 대상체를 이러한 질환 또는 장애로부터 보호하는 방법으로서, 유효량의 실시형태 1 또는 2의 핵산 분자, 실시형태 3 내지 5 중 어느 하나의 백터, 실시형태 6 내지 10 중 어느 하나의 면역원성 조성물, 실시형태 11의 항원 또는 실시형태 12 내지 16 중 어느 하나의 백신을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0599] 실시형태 20. 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2) 감염에 대한 치료를 필요로 하는 대상체를 이러한 감염에 대해서 치료하는 방법으로서, 유효량의 실시형태 1 또는 2의 핵산 분자, 실시형태 3 내지 5 중 어느 하나의 백터, 실시형태 6 내지 10 중 어느 하나의 면역원성 조성물, 실시형태 11의 항원 또는 실시형태 12 내지 16 중 어느 하나의 백신을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하되, 상기 대상체는 이에 의해 1종 이상의 SARS-CoV-2 균주에 저항성이 있는, 방법.
- [0600] 실시형태 21. 실시형태 17 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 투여는 전기천공법 및 주사 중 적어도 하나를 포함하는, 방법.
- [0601] 실시형태 22. 실시형태 17 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 투여는 비경구 투여에 이어 전기천공법을 포함하는, 방법.
- [0602] 실시형태 23. 실시형태 17 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 약 0.5mg 내지 약 2.0mg의 핵산의 초기 용량이 상기 대상체에게 투여되고, 선택적으로 상기 초기 용량은 0.5mg, 1.0mg 또는 2.0mg의 핵산인, 방법.
- [0603] 실시형태 24. 실시형태 23에 있어서, 약 0.5mg 내지 약 2.0mg의 핵산의 후속 용량이 초기 용량 후 약 4주에 상기 대상체에게 투여되고, 선택적으로 상기 후속 용량은 0.5mg, 1.0mg 또는 2.0mg의 핵산인, 방법.
- [0604] 실시형태 25. 실시형태 24에 있어서, 약 0.5mg 내지 약 2.0mg의 핵산의 1회 이상의 추가 후속 용량이 초기 용량 후 적어도 12주에 상기 대상체에게 투여되고, 선택적으로 상기 추가 후속 용량은 0.5mg, 1.0mg 또는 2.0mg의 핵산인, 방법.
- [0605] 실시형태 26. 실시형태 17 내지 25 중 어느 하나에 있어서, INO-4800 또는 이의 바이오시밀러를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0606] 실시형태 27. 실시형태 17 내지 26 중 어느 하나에 있어서, SARS-CoV-2 감염의 치료 또는 SARS-CoV-2 감염과 관련된 질환 또는 장애의 치료 또는 예방을 위한 적어도 1종의 추가적인 작용제를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 더 포함하는, 방법.
- [0607] 실시형태 28. 실시형태 27에 있어서, 상기 핵산 분자, 백터, 면역원성 조성물, 항원 또는 백신은 추가적인 작용제 이전, 이와 동시에 또는 이후에 상기 대상체에게 투여되는, 방법.
- [0608] 실시형태 29. 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)에 대한 면역 반응의 유도를 필요로 하는 대상체에서 이러한 면역 반응을 유도하는 방법에서의, 실시형태 1 또는 2의 핵산 분자, 실시형태 3 내지 5 중 어느 하나의 백터, 실시형태 6 내지 10 중 어느 하나의 면역원성 조성물, 실시형태 11의 항원 또는 실시형태 12 내지 16 중 어느 하나의 백신의 용도.
- [0609] 실시형태 30. 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)에 의한 감염으로부터 대상체를 보호하는 방법에서의, 실시형태 1 또는 2의 핵산 분자, 실시형태 3 내지 5 중 어느 하나의 백터, 실시형태 6 내지 10 중 어느 하나의 면역원성 조성물, 실시형태 11의 항원 또는 실시형태 12 내지 16 중 어느 하나의 백신의 용도.
- [0610] 실시형태 31. 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2) 감염과 관련된 질환 또는 장애로부터 대상체를 보호하는 방법에서의, 실시형태 1 또는 2의 핵산 분자, 실시형태 3 내지 5 중 어느 하나의 백터, 실시형태 6 내지 10 중 어느 하나의 면역원성 조성물, 실시형태 11의 항원 또는 실시형태 12 내지 16 중 어느 하나의 백신의 용도.
- [0611] 실시형태 32. 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2) 감염에 대한 치료를 필요로 하는 대상체를 이러한 감염에 대해서 치료하는 방법에서의, 실시형태 1 또는 2의 핵산 분자, 실시형태 3 내지 5 중 어느 하나의 백신의 용도.

나의 벡터, 실시형태 6 내지 10 중 어느 하나의 면역원성 조성물, 실시형태 11의 항원 또는 실시형태 12 내지 16 중 어느 하나의 백신의 용도.

[0612] 실시형태 33. 실시형태 29 내지 32 중 어느 하나에 있어서, SARS-CoV-2 감염의 치료 또는 SARS-CoV-2 감염과 관련된 질환 또는 장애의 치료 또는 예방을 위한 적어도 1종의 추가적인 작용제와 조합된, 용도.

[0613] 실시형태 34. 실시형태 29 내지 33 중 어느 하나에 있어서, 상기 핵산 분자, 벡터, 면역원성 조성물, 항원 또는 백신은 전기천공법 및 주사 중 적어도 하나에 의해 상기 대상체에게 투여되는, 용도.

[0614] 실시형태 35. 실시형태 34에 있어서, 상기 핵산 분자, 벡터, 면역원성 조성물, 항원 또는 백신은 상기 대상체에게 비경구로 투여된 후 전기천공법에 의해 투여되는, 용도.

[0615] 실시형태 36. 실시형태 29 내지 35 중 어느 하나에 있어서, 약 0.5mg 내지 약 2.0mg의 핵산의 초기 용량이 상기 대상체에게 투여되고, 선택적으로 상기 초기 용량은 0.5mg, 1.0mg 또는 2.0mg의 핵산인, 용도.

[0616] 실시형태 37. 실시형태 36에 있어서, 약 0.5mg 내지 약 2.0mg의 핵산의 후속 용량이 초기 용량 후 약 4주에 상기 대상체에게 투여되고, 선택적으로 상기 후속 용량은 0.5mg, 1.0mg 또는 2.0mg의 핵산인, 용도.

[0617] 실시형태 38. 실시형태 37에 있어서, 약 0.5mg 내지 약 2.0mg의 핵산의 추가 후속 용량이 초기 용량 후 적어도 12주에 상기 대상체에게 투여되고, 선택적으로 상기 추가 후속 용량은 0.5mg, 1.0mg 또는 2.0mg의 핵산인, 용도.

[0618] 실시형태 39. 실시형태 29 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 상기 면역원성 조성물은 INO-4800 또는 이의 바이오 시밀러인, 용도.

[0619] 실시형태 40. 약제의 제조에서의, 실시형태 1 또는 2의 핵산 분자, 실시형태 3 내지 5 중 어느 하나의 벡터 또는 실시형태 11의 항원의 용도.

[0620] 실시형태 41. 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2) 감염을 치료 또는 방지하기 위한 약제의 제조에서의, 실시형태 1 또는 2의 핵산 분자, 실시형태 3 내지 5 중 어느 하나의 벡터 또는 실시형태 11의 항원의 용도.

[0621] 실시형태 42. 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2) 감염과 관련된 질환 또는 장애로부터의 보호를 필요로 하는 대상체를 이러한 질환 또는 장애로부터 보호하기 위한 약제의 제조에서의, 실시형태 1 또는 2의 핵산 분자, 실시형태 3 내지 5 중 어느 하나의 벡터 또는 실시형태 11의 항원의 용도.

[0622] 실시형태 43. 대상체에서 지속적인 세포성 면역 반응을 검출하는 방법으로서,

[0623] SARS-CoV-2 항원에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 면역원성 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계;

[0624] 상기 대상체로부터 말초 단핵 세포(PBMC)를 단리하는 단계;

[0625] 상기 단리된 PBMC를 서열번호 1의 19번 내지 1279번 잔기의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 서열번호 1의 19번 내지 1279번 잔기에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 1의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 서열번호 1의 아미노산 서열, 서열번호 4의 19번 내지 1279번 잔기의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 서열번호 4의 19번 내지 1279번 잔기에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 4의 아미노산 서열 및 적어도 20개의 아미노산을 포함하는 이들의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 SARS-CoV-2 스파이크 항원으로 자극하는 단계; 및

[0626] 사이토카인 발현 세포 수 및 사이토카인 발현 수준 중 적어도 하나를 검출하는 단계

[0627] 를 포함하는, 방법.

[0628] 실시형태 44. 실시형태 43에 있어서, 상기 사이토카인 발현 세포 수 및 사이토카인 발현 수준 중 적어도 하나를 검출하는 단계는 효소-결합 면역점(ELISpot) 및 유세포 분석을 사용하는 세포내 사이토카인 염색(ICS) 분석으로 이루어진 군으로부터 선택되는 검정을 사용하여 수행되는, 방법.

[0629] 실시형태 45. 실시형태 43에 있어서, 상기 대상체에는 핵산 분자를 포함하는 면역원성 조성물이 투여되어, 상기 핵산 분자는,

- [0630] 서열번호 2의 55번 내지 3837번 뉴클레오타이드에 제시된 핵산 서열의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열;
- [0631] 서열번호 2의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열;
- [0632] 서열번호 2의 55번 내지 3837번 뉴클레오타이드의 핵산 서열;
- [0633] 서열번호 2의 핵산 서열;
- [0634] 서열번호 3의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열;
- [0635] 서열번호 3의 핵산 서열;
- [0636] 서열번호 5의 55번 내지 3837번 뉴클레오타이드의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열;
- [0637] 서열번호 5의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열;
- [0638] 서열번호 5의 55번 내지 3837번 뉴클레오타이드의 핵산 서열;
- [0639] 서열번호 5의 핵산 서열;
- [0640] 서열번호 6의 전체 길이에 대해 적어도 약 90% 동일성을 갖는 핵산 서열; 및
- [0641] 서열번호 6의 핵산 서열
- [0642] 로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 방법.
- [0643] 서열 목록
- [0644] pGX9501의 SARS-CoV-2 컨센서스 스파이크 항원 아미노산 삽입 서열(서열번호 1)(IgE 리더 서열 밑줄):
- ```

1 MDWTWILFLV AAATRVHSSQ CVNLTRTRTQL PPAYTNSFTR GVYYPDKVFR SSVLHSTQDL
61 FLPFFSNVTW FHAHVSGTN GTKRFDPNPL PFNDGVYFAS TEKSNIIRGW IFGTTLDSKT
121 QSLLIVNNAT NVVIKVCEFQ FCNDPFLGVY YHKNNKSWME SEFRVYSSAN NCTFEYVSQP
181 FLMDLEGKQG NFKNLREFVF KNIDGYFKIY SKHTPINLVR DLPGQFSALE PLVDLPIGIN
241 ITRFQTLLAL HRSYLTGPDS SSGWTAGAAA YYVGVLQPR FLKYNENGT ITDAVDCALD
301 PLSETKCTLK SFTVEKGIIYQ TSNFRVQPTI SIVREPNNITL LCPFGEVFNA TRFASVYAWN
361 RKRISNCVAD YSVLYNSASF STFKCYGVSP TKLNDLCLFTN VYADSFVIRG DEVRQIAPGQ
421 TGKIAIDNYK LPDDFTGCVI AWNSNNLDSK VGGNNYNYLYR LFRKSNLKPFI ERDISTEYLQ
481 AGSTPCNGVE GFNCYFPLOQ YGFQPTNGVG YQPYRVVVL FELLHAPATV CGPKKSTNLV
541 KNKCVVNENFN GLTGTGVLT SNKFKFLPFQQ FGRIADTTD AVRDPQTLEI LDITPCSF GG
601 VSVITPGTNT SNQVAVIYQD VNCTEVPAI HADQLTPTWR VYSTGSNVFQ TRAGCLIGAE
661 HVNNSYECDI PIGAGICASY QTQTNSPRRA RSVASQSIIA YTMSLGAENS VAYSNNNSIAI
721 PTNFTTISVTT EILPVSMPTKT SVDFTMYICG DSTECSNLLL QYGSFCTQLN RALTGIAVEQ
781 DKNTQEVEFAQ VKQIYKTPPI KDFGGFNFNSQ ILPPDKPSKPSK RSFIEDLLFN KVTLADAGFI
841 KQYGDCLGDI AARDLICAQK FNGLTVLPPL LTDEMIAQYI SALLAGTITS GWTFGAGAAL
901 QIPFAMQMY RFNGIGVTQN VLYENQKLIA NQFMSAIGKI QDSLSSSTASA LGKLQDVVNNQ
961 NAQALNTLVK QLSSNFGAIS SVLNLDLSRL DKVEAEVQID RLITGRLQSL QTYVTQQLIR
1021 AAEIRASANL AATKMSECVL GQSKRVDFCG KGYHLMSPQ SAPHGVVFLH VTYVPAQEKN
1081 FTTAPAIChD GKAHFPREGV FVSNGTHWFV TQRNFYEPQI ITTDNTFVSG NCDVVIGIVN
1141 NTVYDPLQPE LDSFKEELDK YFKNHTSPDV DLGDISGINA SVVNIQKEID RLNEVAKNLN
1201 ESLIDLQELG KYEQYIKWPW YIWLGFIAGL IAIVMVTIML CCMTSCCSCL KGCCSCGSOC
1261 KFDDEDSEPV LKGVKLHYT

```
- [0645]

[0646] pGX9501의 DNA 삽입 서열(서열번호 2)(IgE 리더 서열 밀줄):

```

1 ATGGATTGGA CTTGGATTCT CTTTCTCGTT GCTGCAGCCA CACCGTTCA TAGCAGCCAG
61 TGTGTGAAACC TGACCACCAAG AACACAGCTG CCTCCCTGCCT ACACCAACAG CTTCACCGAGA
121 GGAGTCTACT ACCCAGACAA AGTCTTCAGA AGCTCTGTGC TGCACAGGCC CCAGGACCTG
181 TTCCCTGCCTT TCTTCAGCAA CGTGACCTGG TTCCACGCCA TCCACGTGTC TGGCACCAAC
241 GGCACCAAGA GATTTGACAA CCCTGTTCTT CTTTCAATG ATGGCGTGTGTA CTTTGCAGC
301 ACAGAGAAGA GCAACATCAT CCGAGGCTGG ATCTTGGCA CCACCCCTGGA CAGCAAAACC
361 CAGAGCCTGC TGATCGTGA CAACGCCACC AACGTGGTCA TCAAGGTGTG TGAGTCCAG
421 TTCTGCAATG ACCCTTCTC GGGCGTGTAC TACCACAAGA ACAACAAGTC CTGGATGGAG
481 TCTGAGTTCA GAGTCTACAG CTCTGCCAAC AACTGCACAT TTGAATATGT GTCCCAGCCT
541 TTCCCTGATGG ACCTGGAGGG CAAGCAGGGC AACTTTAAGA ACCTGAGAGA ATTGTTGTTC
601 AAGAACATCG ATGGCTACTT CAAGATCTAC AGCAAGCACA CACCCATCAA CCTGGTGAGA
661 GACCTGCTC AGGGCTCTC TGCCCTGGAG CCTCTGGTGG ACCTGCCAT CGGCATCAAC
721 ATCACCGAT TCCAGACCTG GCTGCCCTG CACAGAACCT ACCTGACCCCC AGGAGACAGC
781 AGCAGCGCT GGACAGCTGG AGCTGTGTC TACTACGTGG GCTACCTGCA GCCCAGGACC
841 TTCCCTGCTGA AGTACAACGA AAATGGCACC ATCACAGATG CTGTTGACTG TGCCCTGGAC
901 CCTCTTAGCG AGACCAAGTG CACCTGAAAG TCCTTCACAG TGGAGAAAGG CATCTACCAAG
961 ACCAGCAACT TCCGAGTGCA GCCAACAGAG AGCATCGTGA GATTCCAAA CATCACCAAC
1021 CTGTCCTT TTGGAGAAAGT CTTCAATGCC ACCAGAGTTTG CTCTGTGTA CGCCTGGAAAC
1081 AGAAAAAGAA TCAAGCAACTG TGTTGTCGAC TACTCTGTGTC TGACAAACTC TGCCTCTTC
1141 TCCACCTTCA AGTGCTATGG AGTCTCTCCA ACCAAGCTGA ATGACCTGTC CTTCACCAAC
1201 GTGTATGCTG ACAGCTTGT GATCAGAGGA GATGAAAGTGC GGCAGATTGC TCCTGGCCAG
1261 ACAGGCAAGA TTGCTGACTA CAACTACAAG CTGCGCTGTG ACTTCACAGG CTGTCATC
1321 GCCTGGAACA GCAACACCT GGACAGCAAG GTGGCGGGAC ACCACAACTA CTTGTACAGA
1381 CTTTTAGGA AGAGCAACCT GAAGCTTTT GAAAGAGACA TCTCCACAGA GATCTACCAAG
1441 GCTGGCAGCA CACCTGCAA TGGTGTGGAA GGCTTCAACT GCTACTTCCC TCTGCAGAGC
1501 TACGGCTTCC AGCAACAAA TGGCGTGGC TACCAAGCTT ACAGAGTGGT GGTGCTGTCC
1561 TTTGAGCTGC TGACCGCCCC TGCCACAGTG TGTTGGCCCCA AGAAGAGCAC CAACCTGGTG
1621 AAGAACAAAT GTGTGAACCT CAATTCAAT GGCTGACAG GCACAGGAGT GCTGACAGAG
1681 AGCAACAAAG AGTTTCTCC TTTCAGCAG TTTGGAAGAG ACATTGCTGA CACACAGAT
1741 GCTGTGAGAG ATCCTCAGAC CCTGGAGATC CTGGATATCA CACCCCTGCTC CTTTGGAGGA

```

[0647]

```

1801 GTTTCTGTCA TCACACCTGG CACCAATACC AGCAACCAAG TGGCTGTGCT GTACCAAGAT
1861 GTGAATTGCA CAGAAGTGCC TGTGCCATC CAGGCTGACC AGCTGACACC CACCTGGAGA
1921 GTGTACACCA CAGGCAGCAA TGTTCCTCAG ACAAGAGCTG GCTGCCTGAT TGGAGCAGAG
1981 CACGTGAACA ACAGCTATGA ATGTGACATC CCTATTGGAG CTGGCATCTG TGCCAGCTAC
2041 CAGACCCAAA CCAACAGCCC AAGAAGAGCC AGATCTGTGG CCAGCCAGAG CATCATGCC
2101 TACACCATGA GCCTGGGAGC TGAGAACTCT GTGGCCTACCA GCAACAAACAG CATGCCATC
2161 CCCACCAACT TCACCATCTC TGTCACCAAGA GAGATCTCTG CTGTCTCCAT GACCAAGACA
2221 TCTGTGGACT GCACCATGTA CATCTGTGGA GACAGCACAG AATGCAGCAA CCTGTCGCTG
2281 CAGTACGGCT CCTTCTGCAC CCAGCTGAAC AGAGCCCTGA CAGGCATCGC TGTGGAGCAG
2341 GACAAGAACAA CACAGGAAGT GTTTGCCAG GTGAAGGCAGA TCTACAAAAC ACCACCCATC
2401 AAGGACTTTG GAGGCTTCAA TTTCTCCCAA ATCTCTGTG ACCCCAGCAA GCCTTCCAAG
2461 AAGAGCTTCA TTGAAAGACCT GCTGTTCAAC AAGATGACCC TGGCTGATGC TGGCTTCATC
2521 AAGCAGTATG GAGACTGCC GGGAGACATT GCTGCCAGAG ACCTGATCTG TGGCCAGAAAG
2581 TTTAATGGCC TGACTGTGCT GCCTCTCTG CTGACAGATG AAATGATCGC CCAGTACACA
2641 TCTGCCCTGC TGCGTGGCAC CATCACCAAGT GCCTGGACAT TGAGGCTGG AGCTGCCCTG
2701 CAGATCCCTT TTGCGCATGCA GATGCCCTAC AGATTTAATG GCATCGGGCT GACCCAGAAC
2761 GTGCTGTGAG AGAACCCAGAA GCTGATGCC AACCAGTTCA ACTCTGCCAT CGGCAAGATC
2821 CAGGACAGCC TGAGCAGCAC AGCCTCTGCC CTGGGCAAGC TGCAAGGATGT GGTGAACCAA
2881 AACGCCAGG CCCTGAACAC CCTGGTGAAG CAGCTGAGCA GCAACTTGG AGCCATCTCC
2941 TCTGTGCTGA ATGACATCTC GAGCGCTG GACAAGGTGG AAGCAGAAAGT GCAGATCGAC
3001 AGACTCATCA CAGGCCCTG CGAGACCTG CAGACCTACG TGACCCAGCA GCTGATCAGA
3061 GCTGCTGAGA TCCGGGCCCTC TGCCACCTG GCTGCCACCA AGATGTCAGA ATGTGTGCTG
3121 GCCCAGAGCA AAAGAGTGGG CTTCTGTGGC AAAGGCTACC ACCTGATGTC CTTCCCTCAG
3181 TCTGCTCTC ACGGCGTGGT GTTCTGCACT GTCACAGTACG TGCTGCCCA GGAGAAGAAC
3241 TTCACCAACAG CTCCCTGCCAT CTGCCACCGAT GGCAGGCC ACCCTCCAAAG AGAAGGTGTC
3301 TTTGCTGCTCA ATGGCACCCA CTGGCTGTG ACCCCAGAGAA ACTCTACGAA GCCTCAGATC
3361 ATCACCAACAG ACAACACATT TGTGTCTGGC AACTGTGATG TGGTCATCGC CATCGTGAAC
3421 AACACAGTTT ATGACCTCTC GCAGCCTGAG CTGGACAGCT TCAAAGAAGA GCTGGACAAG
3481 TACTTCAGA ACCACACATC TCCAGATGTG GACCTGGAG ACATCTCTGG CATCAATGCC
3541 TCTGTGGTGA ACATCCAGAA GGAATTGAC AGGCTGAACG AAGTGGCCAA GAACCTGAAC
3601 GAAAGCCTCA TCGACCTGCA GGAGCTGGC AAGTACCGAGC AGTACATCAA GTGGCTTGG
3661 TACATCTGCC TGGGCTCTCAT CGCTGCCCTC ATGCCCATCG TGATGGTGC CATCATGCTG
3721 TGCTGCATGA CCAGCTGCTG CTCTGCTG AAGGGCTGCT GCAAGCTGTG CAGCTGTC
3781 AAGTTTGATG AAGATGACTC TGAGCCTGTG CTGAAGGGCG TGAAGCTGCA CTACACA

```

[0648]

[0649]

pGX9501의 단일 가닥 DNA 서열(서열번호 3):

```

1 gctgcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttacat tgattattga ctagttatta
61 atagtaatca attacgggtt cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata
121 acttacggta aatggcccgcc ctggctgacc gccaaacgac ccccgccccat tgacgtcaat
181 aatgacgtat gtcccatag taacccaaat aggacttcc cattgacgtc aatgggtgga
241 gtatattacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc
301 ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcttggcat tatgcccagt acatgacctt
361 atggacttcc cttacttggc agtacatcta cgtatttagtc atcgcttata ccatgggtgat
421 gcggttttgg cgtacatca atggcgtgg atagcggtt gactcacggg gatttccaag
481 tctccacccc attgacgtca atggagttt gtttggcac caaaatcaac gggactttcc
541 aaaaatgtcgt aacaactccg cccattgac gcaaatgggc ggttaggcgtg tacgggtggga
601 ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaaccc actgttact ggcttatcga
661 aattaatacg actcaacta gggagaccca agctggctag cgtttaaact taagcttgggt
721 acccgacgtcg gatccggccac catggattgg acttggattc tttttctogt tgctgcagcc
781 acacgcgttc atagcagcca gtgtgtqaac ctgaccacca gaacacagct gccttcgtgcc
841 tacaccaaca gtttccaggaggatctac taccacagaca aagtcttcag aagctctgtg
901 ctgcacacga cccaggacct gttcttgcgtt ttctttagca acgtgacccgt gttccacgcgc
961 atcccacgtgt ctggcaccaa cggcaccaag agatttgaca acctctgttct tcctttcaat
1021 gatggcgtgt actttggccag cacagagaag agcaacatca tccgaggcgtg gatcttggc
1081 accacccctgg acagaaaaac ccagacgttc ctgatgtca acaacgcac caacgtggc
1141 atcaaggtgt gtgagttcca gttctgcaat gacccttcc tggcgtgtt ctaccacaag
1201 aacaacaagt cctggatgga gtctgagttc agagtttaca gctctgcca caactgcaca
1261 tttgaatatg tggccaccc tttctgtat gacctggagg gcaaggcaggg caactttaag
1321 aacctgagag aatttgttca aagaacatc gatggctact tcaagatcta cagcaagcac

```

[0650]

1381 acacccatca acctggtag agacactgcct cagggcttct ctgccctgga gcctctggtg  
 1441 gacctgcaca tcggcatcaa catcaccaga ttccagaccc tgcgtggccct gcacagaagc  
 1501 tacctgaccc caggagacag cagcagcggc tggacagctg gagctgctgc ctactacgtg  
 1561 ggctacctgc agccaggac cttccctgctg aagtacaacg aaaatggcac catcacagat  
 1621 gctgttgaact gtgcctgga ccctcttagc gagaccaagt gcaccctgaa gtccttcaca  
 1681 gtggagaaag gcatttacca gaccgaaac ttccgagtc agccaaacaga gagcatcgty  
 1741 agatttccaa acatcaccaa cctgtgcctt tttggagaag tttcaatgc caccagatt  
 1801 gcttctgtgt acgcctggaa cagaaaaaga atcagcaact gtgtggctgta ctactctgtg  
 1861 ctgtacaaact ctgcctccctt ctccacccctt aagtgtctgt gatgtctcc aaccaagctg  
 1921 aatgacctgt gcttcaccaa ctgtgtactgac gacgcttgg tgatcagagg agatgaagtg  
 1981 cgccagatgg ctccctggcca gacaggaaatg attgctgact acaactacaa gctgctgt  
 2041 gacttcacag gctgtgtat cgcctggaa acgaaacaacc tggcagcga ggtggccgc  
 2101 aactacaact acctgtacag acttttcagg aagagcaacc tgaagccctt tgaaagagac  
 2161 atctccacag agatcataccaa ggctggcage acaccctgc acatgtgtggg aggcttcaac  
 2221 tgctacttcc ctctgcagag ctacggcttc cagccaaacaa atggcgtggg ctaccagcc  
 2281 tacagagttgg tgggtgtgtc cttttagctg ctgcacgcctt ctgcccacagt gtgtggcccc  
 2341 aagaagagca ccaacccgtt gaagaacaaa tgggtgaact tcaatttcaa tggcctgaca  
 2401 ggcacaggag tgctgcacaga gagaacaaag aagtttcttc cttttccagca gtttggaaaga  
 2461 gacattgtgtc acaccacaga tgctgtgaga gatccctcaga ccttggagat cctggatata  
 2521 acaccctgtc cttttggagg atttttgtc atacacacccg gccaataac cagcaaccaa  
 2581 gtggctgtgc tgtaaccaga tggtaattgc acagaagttc ctgtggccat ccacgcgtac  
 2641 cagctgacac ccacccgttggagg agtgtacacg acaggcagca atgttttcca gacaagagct  
 2701 ggtgcctgta ttggagcaga gcaactgtaaac aacagctatg aatgtgacat cccttattgg  
 2761 gtcgcacatgt tgccgcata cccagccaa accaacacagc caagaagagc cagatctgtg  
 2821 gccagccaga gcatcattgc ctacccatgg acgttggggat ctggaaactc tggtggctac  
 2881 agcaacaaca gcatcgccat ccccaaccaac ttccacatctt ctgtgaccac agagatcctg  
 2941 cctgtgttca tgaccaagac atctgtggac tgacccatgt acatgtgtgg agacagcaca  
 3001 gaatgcacca acctgtgtgtc gcaactgtggc tccttcgtca cccagctgaa cagagccctg  
 3061 acaggcatttc ctgtggagca ggacaagaac acacaggaaatg ttttgcctt ggtgaagcag  
 3121 atcttacaaa caccacccat cccacccatgg acgttggggat ttccacatctt aatccctgcct  
 3181 gaccccgacca agccctccaa gagaacgttc attgaagacc tggtaatttcaa caaagtgacc  
 3241 ctggctgtat ctggcttcat caagcgttat ggagactgccc tggagacat tgctgccaga  
 3301 gacatgttgc ttggccagaa gtttaatggc ctgactgtgc tgcttctctt gctgacagat  
 3361 gaaatgtatcg cccagtttgc atctgcctt ctggctggca ccatcaccag tggctggaca  
 3421 tttggactgtc gacgttgcctt gcaatccctt tttggccatgc agatggcttca cagatataat  
 3481 ggcacccggc tgaccccgaa cgtgtgtac gagaacccaga agtgcgtac ccacccgttcc  
 3541 aactctgcca tcggcaagat ccaggacacg ctgagcagca cagcccttgc cctggcaag  
 3601 ctgcaggatgt ttggcaacca aaacggcccg gcccgttca cccctggtaa gcaactgtgg  
 3661 agcaacttgc tggccatcctt ctctgtgtc aatgcacatcc tggccggctt ggacaagggt  
 3721 gaagcagaag tgacatgtca cagactatcc acaggccccc tggcagacat gcaacccatc  
 3781 gtgaccccgac agtgcgtatc agtgcgtgttgc atccggccct ctggcaacat ggcgtccacc  
 3841 aagatgtatc aatgtgtgtt gggccagacg aaaagagttgg actttgtgtgg caaaggctac  
 3901 cacctgtatgt cttccctca gtcgttccctt cactggcgtgg ttgttctgtca cgtgacatc  
 3961 gtgcctggcc aggagaagaa ctteaccaca gtcctgttca ttcggccacga tggcaaggcc  
 4021 cacttccca gagaaggatgtt ttttgcgttcc aatggccatcc actgtgtgtt gacccagaga  
 4081 aacttctatcg agcctcagat catcaccaca gacaacacat ttgtgtgttca caactgtgt  
 4141 gtggctatcg gcatgttcaaa ccaacacatgtt tatgaccctt tggcgttca gtcgttgc  
 4201 ttccaaagaag agtgcgttcaaa gcatcaatgc aacccacatctt ggcacttgg  
 4261 gacatcttcgtc gcatcaatgc ctctgtgttca aacatccaga agggaaatttgc caggctgaae  
 4321 gaagtgccca agaacctgaa cggaaacccctt atcgaccatgc agggacttggg caagtacgag  
 4381 cgtacatca agtggccctt gtcacatgtt ctgggttca tgggtggccatc catcgccatc  
 4441 gtgtatggta ccatttcatgtt gtcgttgcgtt accagctgtt gtcgttgcctt gaaaggctgc  
 4501 tggactgttgc gcaactgttgc caatgttgcgtt gaaatgtactt ctgtggccat gtcgttgg  
 4561 gtgacgttgc actacatgtt gtcgttgcgtt gtcgttgcgtt gtcgttgcgtt gtcgttgg  
 4621 gcttcgcactt gtcgttgcgtt ttggccatca ttcgttgcgtt gtcgttgcgtt gtcgttgcgtt  
 4681 ttggccatca gggatggccatcc tccctacttgc ttttccatataaaaatgggaa aatttgcgtt  
 4741 cattgtgtatca gtaggtgtatca ttcttattttgtt ggggggtgggg tggggccatca gcaacgggg  
 4801 gaggatgggg aagacaatag cggcatgtt gggatgggg tgggttgcgtt gtcgttgcgtt  
 4861 gggcggtttt atggacacca aacggaaacccgg aatgtggccatca tggggccccc ttcgttgcgtt  
 4921 ttggggaaatcc ctggcaatgtt aacttggatgg ctttccatca gccaaggatc ttcgttgcgtt  
 4981 gggatcaag ctctgtatca gacaggat gggatgtt gtcgttgcgtt gaacaagatg

|      |             |             |             |             |             |             |
|------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 5041 | gattgcacgc  | aggttctccg  | ggcgcttggg  | tggagaggt   | attcggtat   | gactgggcac  |
| 5101 | aacagacaat  | cggctgtct   | gatggcccg   | tgttccggcgt | gtcagcgcag  | gggcgcgggg  |
| 5161 | ttcttttgt   | caagaccgcac | ctgtccggtg  | ccctgaatgt  | actgcaagac  | gaggcagcgc  |
| 5221 | ggctatctgt  | gtgtggccacg | acgggggttc  | cttgcgcagc  | tgtgtctgcac | gtgtgtactgt |
| 5281 | aaggccggaa  | ggatctggct  | ctatggggc   | aagtggccgg  | ggaggatccte | ctgtcatctc  |
| 5341 | accttgcctc  | tgccgagaaa  | gtatccatca  | tgggtgtatgc | aatgcggccgg | ctgcataa    |
| 5401 | ttgatecggc  | taectgccc   | ttcgaccacc  | aagcggaaaca | tegcatcgag  | cgagcacgta  |
| 5461 | ctcgatgg    | aggccggctt  | gtcgatcagg  | atgtatctgg  | cgaagagcat  | caggggctcg  |
| 5521 | cgcagccgc   | actgttgc    | aggctcaagg  | cgagctgc    | cgacggccgg  | gatctcgctc  |
| 5581 | tgaccatgg   | cgtatctgtc  | ttggccgaat  | tcatgttgg   | aatatggccgc | ttttttgtat  |
| 5641 | tcatcgactg  | tgccggctg   | ggtgtggcg   | accgcata    | ggacatacg   | ttgggttaccc |
| 5701 | gtgtatattgc | tgaagagctt  | ggccggcgaat | gggtgtgacc  | cttctctgt   | cttac       |
| 5761 | tegcgcgtcc  | cgtatcgacg  | ccgcatacgct | tctatcgct   | tcttgacag   | tttcttctgt  |
| 5821 | ttataaacgc  | ttcaatcttc  | ctgtatcggt  | atttttcttc  | tcgcatactg  | tgccgttattt |
| 5881 | cacccggcat  | cagggtggac  | ttttccggga  | aatgtgcgcg  | gaaccctat   | ttgttttttt  |
| 5941 | ttctaaatac  | atccaatata  | gtatccgc    | atgagacaat  | aaccctgata  | aatgtcttca  |
| 6001 | taatagc     | tgctaaaact  | tcattttta   | tttaaaagg   | tctaggtgaa  | gatcctttt   |
| 6061 | gataatctca  | tgaccaaaaat | cccttaacgt  | gagttttcgt  | tccactgac   | gtcagacccc  |
| 6121 | gtagaaaaa   | ttcaaggatc  | ttcttgcgtat | occttttttc  | tgccgcgtat  | ctgtctgtt   |
| 6181 | caacaaaaaa  | aaccacggct  | accaggcg    | gtttttttgc  | cggatca     | gttaccaact  |
| 6241 | cttttccga   | aggttaactgg | cttcagcaga  | gcgcagat    | caaatactgt  | tctttctgt   |
| 6301 | tagccgtatg  | taggc       | cttcaga     | tctgttagc   | cgccat      | ctcgcgtct   |
| 6361 | ctaatactgt  | taccatgtgc  | tgctgc      | ggcgata     | cgtgttttac  | eggggttgac  |
| 6421 | tcaagacgt   | atgttacgg   | taaggcgacg  | cggtcgggt   | gaacgggggg  | ttcgtgcaca  |
| 6481 | caggcc      | tgggcga     | gac         | gaactgat    | acatcac     | tgatgtat    |
| 6541 | gaaagcgc    | cgcttcccg   | aggggagaa   | gcggac      | atccggta    | cgccagggtc  |
| 6601 | ggaacaggag  | agcgcac     | ggagcttca   | gggggaaac   | cctgttat    | ttatagtc    |
| 6661 | gtccgggtt   | gcaccc      | at          | cgat        | gtatgtc     | aggggggggg  |
| 6721 | agcctatgg   | aaaacgc     | caacgcggc   | tttttac     | tcgttgc     | ttgtgtggcc  |
| 6781 | tttgc       | caca        | ttttt       | tttttac     | tcgttgc     | ttgtgtggcc  |

[0652]

[0653]

pGX9503의 SARS-CoV-2 이상치 스파이크 항원 아미노산 삽입 서열(서열번호 4)(IgE 리더 서열 밑줄):

|      |             |             |              |             |            |              |
|------|-------------|-------------|--------------|-------------|------------|--------------|
| 1    | MDWTWILFLV  | AAATRVHSSQ  | CVNLLTRTQL   | PPAYTNFSFR  | GVYYPDKVFR | SSVLHSTQDLS  |
| 61   | FLPFFSNVTW  | FHAHVSGTN   | GTKRFDNPVL   | PFNDGIVYFAS | TEKSNIIRGW | IFGTTLDSKTF  |
| 121  | QSLLIIVNNAT | NNVIKVCFEQF | FCNDPFLGVY   | YHKNNKSWME  | SEFRVYSSAN | NCTFEVYSSQP  |
| 181  | FLMLEGKQG   | NFKNLREFVF  | KNIDGYFKIY   | SKHTPINLVR  | DLPQGFSALE | PLVDLPIGIN   |
| 241  | ITRPTLLLA   | HRSYLTPGDS  | SSCGTWAGAAA  | YHGTYPLQPT  | FLLKYNEINT | ITVAVACALD   |
| 301  | PLSETKCTLK  | SFTVEKGIIQY | TSNFRVQPTE   | SIVRFPNITN  | LCPFGEVFNA | TRFASVYAWN   |
| 361  | RKRISNCVAD  | YSVLYNSASF  | STFKCYGVSP   | TKLNDLCFTN  | VYADSFVIRG | DEVRQIAFGQ   |
| 421  | TGKIADYNYK  | LPPDFTCVCI  | AWNSSNNLDISK | VGGNNYLYR   | LFRKSNLKPF | ERDISTELYQ   |
| 481  | AGSTPCNGVE  | GFCNYFPBLQS | YGFQPTNGVG   | YQPYRVVUSS  | FELLHAPATV | CGPKKSTNLVW  |
| 541  | KNKCVNFNFN  | GLTGTGVLT   | SNKKFLFPQ    | FGDRDIADTT  | AVRDQPTLEI | LDITPCSFGG   |
| 601  | VSVITPGANT  | SQNQTVLYQD  | VNCTEVPPVAI  | HAQDLPTPTWR | VYSTGSNVFK | TRAGCLIGAE   |
| 661  | HVNNSYECDI  | PIGAGICASY  | QTQTNSPRRA   | RSTASQSIIA  | YTMSLGAENS | VAYSNSNIVI   |
| 721  | PTNTFISVTT  | EILPVSMTKT  | SVDCMYICS    | DSTECSNPILL | QYGSFCTQLN | RALTGIAVEQ   |
| 781  | DKNTQEVFQAQ | VKQIYKTPPI  | KDFGGFNFQ    | ILPDPSKPSK  | RSFIEDLLFN | KVTLADAGFT   |
| 841  | KQYGDCLGDI  | AARDLICIAQK | FNGLTVLPLP   | LTDTEAMIAQY | SALLAGTIS  | GWTGWGAGAAL  |
| 901  | QIPFAMQOMAY | RFGNGIRVTQN | VLYENQKLIA   | NQFNSAIKGII | QDSLSTSASA | LGKLQDVBNVQ  |
| 961  | NAQALNTLVK  | QLSSTFSTIS  | SVLNLDILSRL  | DKVEAEVQID  | RLITGRLQSL | QTYVTQQLIR   |
| 1021 | AAEIRASANL  | KATKMSCEVUL | GQSKRVDFCG   | KGYHLMSPQ   | SAPHGVVFLH | VTYVPAQEKE   |
| 1081 | FTTAPATCHD  | GKAHFPREGV  | FVSNGTHFWV   | TQRNFDEPOI  | ITTDNTFVSG | NCDVVIIVGIVN |
| 1141 | NTVYDPLQPE  | LDSFKEELDK  | YFKNHTSPDV   | DLGDISGGINA | SVVNIQKEID | RLNEVAKNLN   |
| 1201 | ESLIDLQELQG | KYEFLQFV    | YIWLGFIAGL   | IAIVMVTIML  | CCMTSCCSCL | KGCCSCGSCL   |
| 1261 | KFDEDSDSEP  | LKGVKLHYT   |              |             |            |              |

[0654]

[0655] pGX9503의 DNA 삽입 서열(서열번호 5)(IgE 리더 서열 밀줄):

```

1 ATGGAAITGGA CCTGGATTCT TTTTCGTT GCAGCTGCTA CACCGGTTCA TAGCAGCCAG
61 TGTGTGAACC TGACCAACAG AACACAGCTG CCTCCTGCCT ACACCAACAG CTTCACCAAGA
121 GGAGTCTACT ACCCAGACAA GGTGTTCAGA AGCTCTGTGC TGACAGCAC CCAGGACCTC
181 TTCCCTGCCT TCTTCAGCAA CGTGACCTGG TTCCACGCCA TCCACGTGTC TGGCACCAAC
241 GGCACCAAGA GATTGACAA CCTCTGCTG CCTTTCAATG ATGGTGTGTA CTTTGCCAGC
301 ACAGAGAGA GCAACATCAT CCGAGGCTGG ATCTTGCA CCACCCCTGGA CAGCAAAACA
361 CAGAGCCTGC TGATCGTGA TAATGCCACC AACAGTGGTCA TCAAGGTGTG TGAGTTCCAG
421 TTCTGCAATG ACCCTTCCT GGGCGTGTAC TACACAAAGA ACAACAAGTC CTGGATGGAG
481 TCTGAGTCC GAGTGTACAG CTCTGCCAAC AACTGCACAT TTGAATATGT GTCCCAGCCT
541 TTCCCTGATGG ACCTGGAGG CAAGCAGGGC AATTCAAGA ACCTGAGAGA ATTTGTGTC
601 AAGAACATCG ATGCTACTT CAAGATCTAC AGCAAGCACAA CACCCATCAA CCTGGTGAGA
661 GATCTTCCTC AGGGCTCTC TGCCCTGGAG CCTCTGGTGG ACCTGCCCAT CGGCATCAAC
721 ATCACCCCTT TTCAAGACCT GCTGCCCTG CACAGAAGCT ACCTGACCCCC AGGAGACAGC
781 AGCAGCGCTT GGACAGCTGG AGCTGCTGG TACTACGTGG GCTACCTGCA GCCAAGAAC
841 TTCCCTGCTGA AGTACAAAGA AAATGGACC ATCACTGTGG CTGTGGCCTG TGCCCTGGAC
901 CCTCTTCTG AGACCAAGT CACCCCTGAAG TCCTTCACAG TGAGAAAGG CATCTACCAAG
961 ACCAGCAACT TCAGAGTTCA GCCAACAGAG AGCATCGTGA GATTCCAAA CATCACCAAC
1021 CTGTGTCTT TTGGAGAAAGT CTTCATGCC ACCAGATTG CTTCATGTGTA CGCCTGGAAAC
1081 AGAAAAAGAA TCAGCAACTG TGTGGCTGAC TACTCTGTGC TGACAAACTC TGCCCTCTTC
1141 TCCACCTTCA AGTCTACGG TGTGTCTCT ACCAAGCTGA ATGACCTGTG CTTCACCAAC
1201 GTGTATGCTG ACAGCTTGT CATCAGAGGA GATGAAGTGC GCGAGATCGC CCCTGGCAG
1261 ACAGGCAAGA TTGCTGACTA CAACTACAAG CTGCCGTGATG ACTTCACAGG CTGTCATC
1321 GCCTGGACA GCAACAAACCT GGACAGCAAG GTGGGGCGCA ACTACAACTA CCTGTACAGA
1381 CTTTCAGGA AGACAGACCT GAAGGCTTTT GAAAGAGACA TCTCCACAGA GATCTACCAAG
1441 GCTGGCACCA CACCTGGCA TGGAGTGGAA CCTCTCAAT GCTACTTCCC TCTGCAGAGC
1501 TACGGCTTC AGCCACCAA TGGCGTGGG TACCCAGCTT ACAGAGTGGT GGTGCTGTCC
1561 TTTGAGCTGC TGACGCCCTC TGCCACAGTG TGCGGCCCA AGAAGAGCAC CAACCTGGTG
1621 AGAACAAAT GTGTGAACTT CAATTCAAT GGCTGTGACAG GCACAGGAGT GCTGACAGAG
1681 AGCAACAAAGA AGTTCTGCC TTTCCAGCA TTTGGAAAGAG ACATTGCTGA CACCACAGAT
1741 GCTGTGAGAG ATCTTCAGAC CCTGGAGATC CTGGACATCA CACCCCTGCTC CTTTGGAGGA
1801 GTTTCTGTC TCAACACTGG AGCCACACCC AGCAACCAAG TGACAGTGT GTACCAAGAT
1861 GTGAACGCTCA CAGAAGTTCC TGTGGCCATC CACCGCTGACC AGCTGACCCCC AACCTGGAGA
1921 GTCTACACCA CAGGCAGCAA CGTGTGTTAA ACAAGAGCTG GCTGCCCTGAT TGGAGCAGAG
1981 CACGTGAACA ACAGCTATGA ATGTGACATC CCTATTGGAG CTGGCATCTG TGCCAGCTAC
2041 CAGACCAAA CCAACAGCCC AAGAAGGCC AGGAGCACAG CCAGCCAGAG CATCATGCC
2101 TACACCATGA GCCTGGGAGC AGAGAACTCT GTGGCCTACA GCAACAAACAG CATCGTCATC
2161 CCCACCAACT TCACCATCTC TGTGACCACA GAGATCCTGC CTGTGTCCAT GACCAAGACA
2221 TCTGTGAGCT GCACCATGTA CATCTGCAGT GACAGCACAG AATGCAGCA CCCTCTGCTG
2281 CAGTACGGCT CCTCTGCCAC CCAGCTGAAC AGAGGCCCTGA CAGGCATCGC TGTGGAGCAG
2341 GACAAGACAA CACAGGAAGT GTTGGCCAG GTGAAGCAGA TCTACAAAAC ACCACCCATC
2401 AAGGACTTTG GAGGCTCAA CTTCTCCAG ATCTGCCTG ACCCCAGCAA GCCCAGCAAG
2461 AGAAGCTTC TTGAAGACCT GCTGTTCAAC AAAGTGACCC TGGCTGATGC TGGCTTCATC
2521 AAACAATATG GAGACTGCCT GGGAGACATT GCTGCCAGAG ACCTGATCTG TGCCCGAGAAG
2581 TTTAATGGCC TGACTGTGCT GCCTCTCTG CTGACAGATG AAATGATCGC CCAGTACACA
2641 TCTGCCCTGC TGGCTGCCAC CATACATCT GCTGGACAT TTGGAGCTGG AGCTGCCCTG
2701 CAGATCCCTT TTGCATGCA GATGGCCTAC AGATTTAATG GCATCAGAGT GACCCAGAAC
2761 GTGCTGTATG AAAACCAAGA GCTGATGCC ACCAGTTCA ACTCTGCCAT CGGCAAGATC
2821 CAGGACACCC TGAGCAGCAA AGCCCTGCG CTGGGCAAGC TGCAGGATGT GGTGAAACCAA
2881 AATGCCAGG CCTGTGAAAC CCTGGTGAAG CAGCTGAGCA GCACCTTCTC CACCATCTCC
2941 AGCGTGTGAGA ATGACATCTT GAGCCGGCTG GACAAGGTGG AAGCTGAGGT GCAGATCGAC
3001 AGACTCATCA CAGGCCGGCT GCAGAGCCTG CAGACCTACG TGACCCAGCA GCTGATCAGA
3061 GCTGCTGAGA TCAGAGCTTC TGCCAACTCG AAGGCCACCA AGATGTCAGA ATGTGTGCTG
3121 GGCCAGACCA AGAGAGTGGG CTTCTGTGGC AAAGGCTTACCC ACCTGATGTC CTTCCCTCAG
3181 TCTGCTCCCT ACAGCGTGGT GTTCTGCCAC GTGACCTACG TGCTGCCCA GGAGAAGAAC
3241 TTCACACAG CTCTGCCAC CTGCCACGAT GGCAAGGCC ACTTCCCAAG AGAAGGCC
3301 TTTGTGTCCTA ATGGCACCCA CTGGTGTGG ACCCAGAGAA ACTTTGATGA GCCTCAGATC
3361 ATCACCAAG ACAACACATT TGTGTTCTGGC AACTGTGATG TGGTCATCGG CATCGTGAAC
3421 AACACAGTTT ATGACCCCT GCAGGCTGAG CTGGACAGCT TCAAGAAGA GCTGGACAAG
3481 TACTTCAGA ACCACACATC TCCAGATGTG GACCTGGGAG ACATCTCTGG CATCAATGCC
3541 TCTGTGGTGA ACATCCAGAA GGAAATTGAC AGGCTGAACG AAGTGGCCAA GAACCTGAC
3601 GAAAGCCTCA TCGACCTGCA GGAGCTGGGC AAGTACGAGC AGTACATCAA GTGGCCTTGG

```

3661 TACATCTGGC TGGGCTTCAT TGCTGGCCTC ATGCCCATCG TGATGGTGC CATCATGCTG
3721 TGCTGCATGA CCAGCTCTG CTCTTGCTG TGAGGCTGCT GCAGCTGTGG CAGCTGCTGC
3781 AAGTTTGATG AAGATGACTC TGAGCCTGTG CTGAAGGGCG TGAAGCTGCA CTACACA

[0656]

[0657]

[0658]

pGX9503의 단일 가닥 DNA 서열(서열번호 6):

[0659]

3241 ctggctgatg ctggcttcat caaacaatat ggagactgcc tggagacat tgctgccaga  
 3301 gacctgatct gtccccagaa gtttaatggc ctgactgtgc tgccctctct gctgacagat  
 3361 gaaatgatcg cccagtagac atctgcctg ctggctggca ccatcacate tggctggaca  
 3421 ttggagctg gagctgcct gcagatccc tttggcatgc agatggccta cagatttaat  
 3481 ggcatacagg tgaccagaa cgtgtgtat gaaaaccaga agctgatcgc caaccaggatc  
 3541 aactctggca tcggcaagat ccaggacagc ctgagcagca cagccctgc cctggcaag  
 3601 ctgcaggatg tggtaacca aaatggcccg gcctgaaca ccctggtaaa gcagctgagc  
 3661 agcaccttc ccaccatctc cagctgtctg aatgacatcc tgagccggct ggacaagggt  
 3721 gaagctgagg tgcagatcga cagatccatc acaggccggc tgcagagcct gcagacccatc  
 3781 gtgaccggc agctgtcagc agctgtcag atcagatctt ctggcaacccat gaaggccacc  
 3841 aagatgtcag aatgtgtgtct gggcagagc aagagatgtt acttctgtgg caaaggctac  
 3901 cacctgtatgt ccttccctca gtctgtctt caccggctgg tggctctgca cgtgacccatc  
 3961 gtgcctggcc aggagaagaa ctccaccaca gctccgtcca ctcggccacga tggcaaaagcc  
 4021 cactcccaaa gagaaggcgt ctgggtgtcc aatggccacc actgggttgt gaccaggaga  
 4081 aactttgtatg agccctcagat catcaccaca gacaacacat tgggttgtgg caactgtgat  
 4141 gtggcatacg gcatctgaa caacacaggat tttggccctc tgcagccctga gctggacage  
 4201 ttcaaagaag agctggacaa gtacttcaag aaccacacat ctccagatgt ggacctggaa  
 4261 gacatctctg gcatcaatgc ctctgtggta aacatccaga aggaaattga caggctgaac  
 4321 gaatggccca agaaccatgg cggaaagccctt atcggccctgc aggagctggg caagtacag  
 4381 cgtacatcagc agtggccctt gatcatctgg ctgggttgtt tgggttgtt catcgccatc  
 4441 gtgatgggtt gcatcatgtgt ctggctgtatc accagctgtt gctttggccatc gaaggctgc  
 4501 tgcagctgtg gcaatgtgtt caaggttgatgaaatgtactt ctgagctgtt gctgaaggge  
 4561 gtgaagctgc actacacatg ataactcgatg tctagaggc cctgtttaaac cctgtatca  
 4621 gcctcgactg tgcctttagt ttgcggccca tctgttgtttt gcccctcccc cgtgccttcc  
 4681 ttgaccctgg aagggtggccat tttccatgtt ctgggttgtt aatggatggg aattgtcatcg  
 4741 cattgtctgtt gtaggtgtca ttctatcttgggggtgggggggggggggggggggggggggggg  
 4801 gaggattggg aagacaatag caggcatgtt ggggatgcgg tgggtcttat ggttttactt  
 4861 gggcggtttt atggacagca agcggaaaccgg aattggccagc tggggccccc tctggtaagg  
 4921 ttgggaagccctgcaacttggatgg ctgggttgtt gccaaggatc tgatggcgca  
 4981 ggggatcaag ctctgtatca gggacggat gggatgtt tggcatgatt gaacaagatg  
 5041 gattgcacgc aggtttccg gggccgttggg tggaggggtt attcggctat gactggggac  
 5101 aacagacaat cggctgtctt gatggccggc tggctggctt gtcagcgcgg gggcccccgg  
 5161 ttctttttgtt caagaccggc ctgtccgggtt ccctgtatca actgcaagac gaggcagcgc  
 5221 ggctatctg tggccggccatc acggcgatc ctggccggc tttgtgtccatc gttgtactg  
 5281 aaggcggaaag ggacttggctg ctatgggggggggggggggggggggggggggggggggggggg  
 5341 accttgccttcc tggccggaaa gttatccatca tggctgtatc aatggccggg ctgcatacgc  
 5401 ttgatccggc tacctgtccca ttgcaccacc aagcgaaaca tggcatcgag cgagcacgt  
 5461 ctggatggaa agccgggtt gtcgtatcggg atgatctggc cggagacat caggggttcc  
 5521 cggccggccatc actgttccggc aggttccatc gggccatccgc cggccggccatc gatctcgat  
 5581 tgacccatgg cgtatctgc tggccggatca tcatgggttgggggggggggggggggggggggg  
 5641 tcatcgactg tggccggctg ggtgtgggggggggggggggggggggggggggggggggggggg  
 5701 gtgatattgtc tgaagatgtt gggccggat gggccggatc tttccctgtt ctttacggta  
 5761 tggccggctcc cggatccggc tctatcgctt ttttgcggat ttttccctgtt  
 5821 ttatcaaaccgc ttatcaatcc tggatgttggat ctttttccatc tggcatctgt tgggttattt  
 5881 cacaccgcgtt cgggtggccat tttttgggggggggggggggggggggggggggggggggggg  
 5941 ttctaaatataat gttatccgttcc ttttgcggat ttttccctgtt ttttccctgtt  
 6001 taatagcacc tggccggat ttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt  
 6061 gataatctca tgacaaaaat cccttaatggat ggttttttgtt ttttccatgtt gtcagaccc  
 6121 gtagaaaaaaa ttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt  
 6181 caaaaaaaaaaaa aaccaccgcgtt cggccggat ttttttttttttttttttttttttttttttt  
 6241 ctttttccggat ttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt  
 6301 tagccgtatgtt tggccggat ttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt  
 6361 ctttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt  
 6421 tcaagacggat ttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt  
 6481 cggccggccatc tggccggat ttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt  
 6541 gaaaggccatc ttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt  
 6601 ggaacaggat ttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt  
 6661 gtcgggttttcc ttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt  
 6721 agccatgttggccat ttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt  
 6781 ttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt

[0660]

[0661] 서열번호 7 pGX9501 정방향 프라이머

CAGGACAAGAACACACAGGAA

[0662]

[0663] 서열번호 8 pGX9501 역방향 프라이머

CAGGCAGGATTTGGGAGAAA

[0664]

[0665] 서열번호 9 pGX9501 프로브

ACCCATCAAGGACTTGGAGG

[0666]

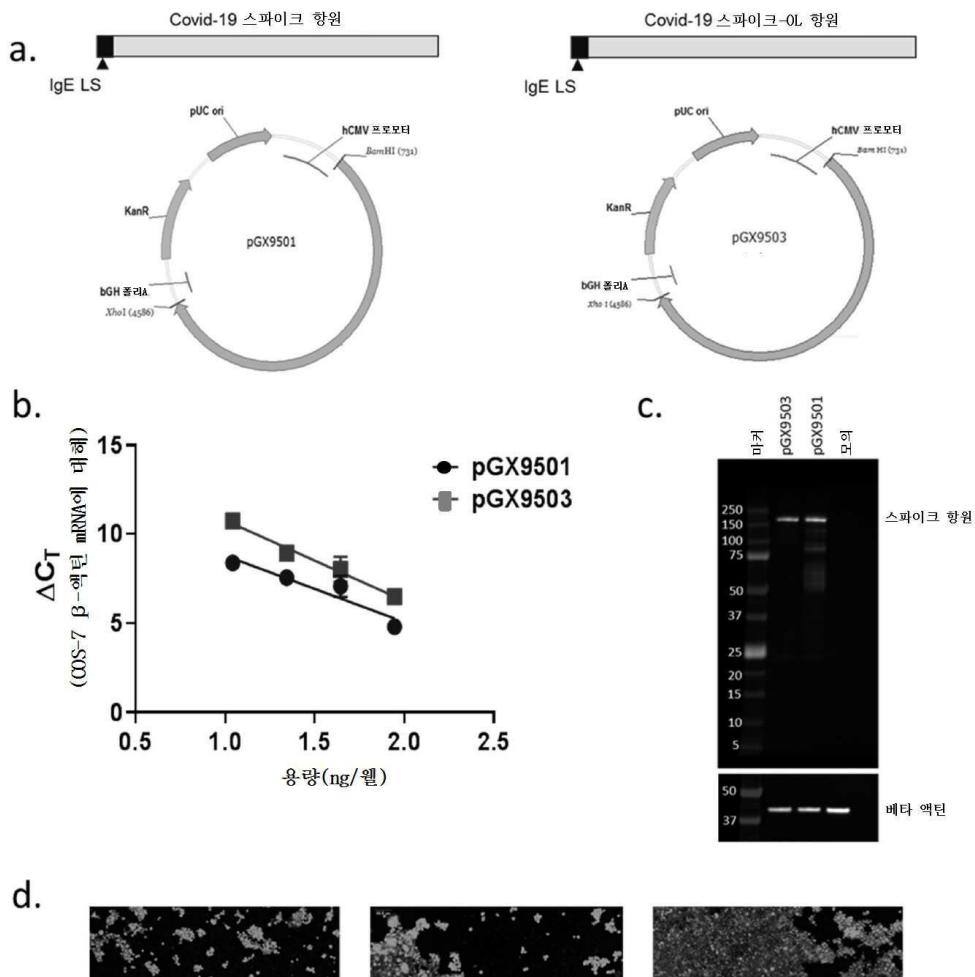
[0667] 서열번호 10 pGX9503 정방향 프라이머

AGGACAAAGAACACACAGGAAG;

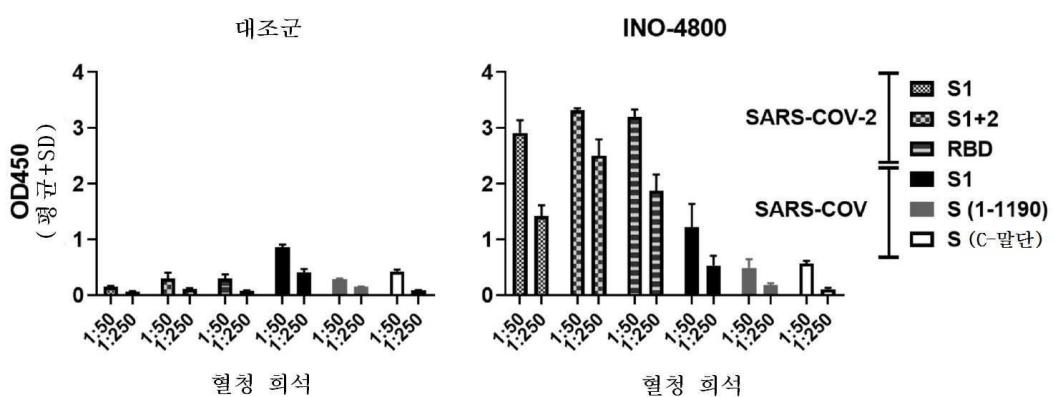
- [0669] 서열번호 11 pGX9503 역방향 프라이머  
CAGGATCTGGGAGAAGTTGAAG
- [0670] 서열번호 12 pGX9503 프로브  
ACACCACCCATCAAGGACTTGGAA
- [0671] 서열번호 13  $\beta$ -액틴 정방향 프라이머  
GTGACGTGGACATCCGTAAA
- [0672] 서열번호 14  $\beta$ -액틴 역방향 프라이머  
CAGGGCAGTAATCTCCTTCTG
- [0673] 서열번호 15  $\beta$ -액틴 프로브  
TACCCCTGGCATTGCTGACAGGATG
- [0674] 서열번호 16  
PHGVVFLHV
- [0675] 서열번호 17  
VVFLHVTVYV
- [0676] 서열번호 18: 2019-nCoV\_N1-F  
5' -GACCCCAAAATCAGCGAAAT- 3'
- [0677] 서열번호 19: 2019-nCoV\_N1-R  
5' -TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG- 3'
- [0678] 서열번호 20: 2019-nCoV\_N1-P  
5' -FAM-ACCCCGCATTACGTTGGTGGACC-BHQ1- 3'
- [0679] 서열번호 21: 2019-nCoV\_sgE-정방향  
5' CGATCTCTTGAGATCTGTTCTC 3'
- [0680] 서열번호 22: 2019-nCoV\_sgE-역방향  
5' ATATTGCAGCAGTACGCACACA 3'
- [0681] 서열번호 23: 2019-nCoV\_sgE-프로브  
5' FAM- ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BHQ1 3'
- [0682]
- [0683]
- [0684]
- [0685]
- [0686]
- [0687]
- [0688]
- [0689]
- [0690]
- [0691]
- [0692]
- [0693]
- [0694]

## 도면

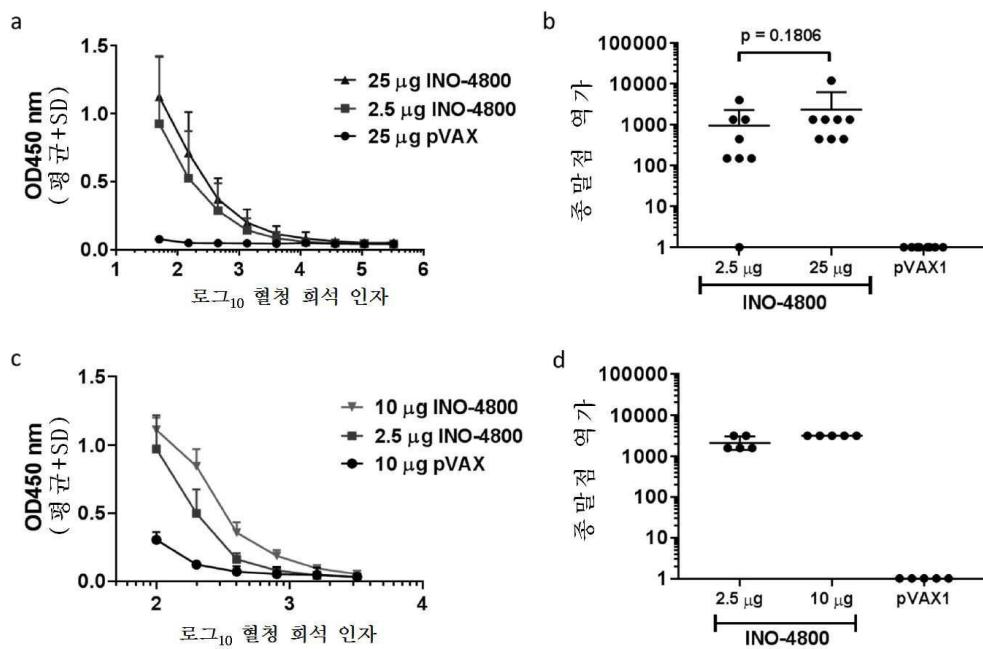
### 도면1



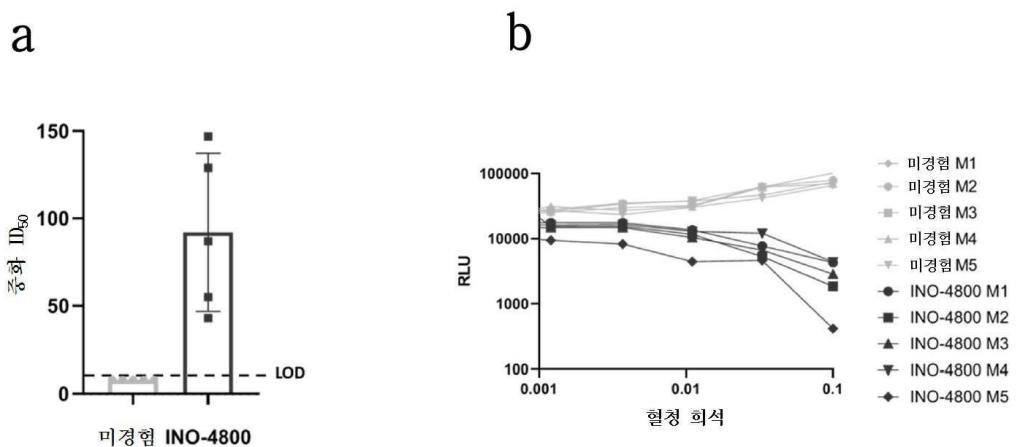
### 도면2



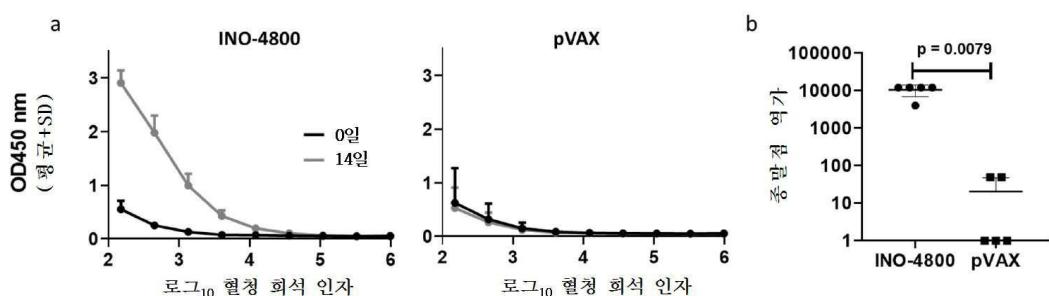
## 도면3



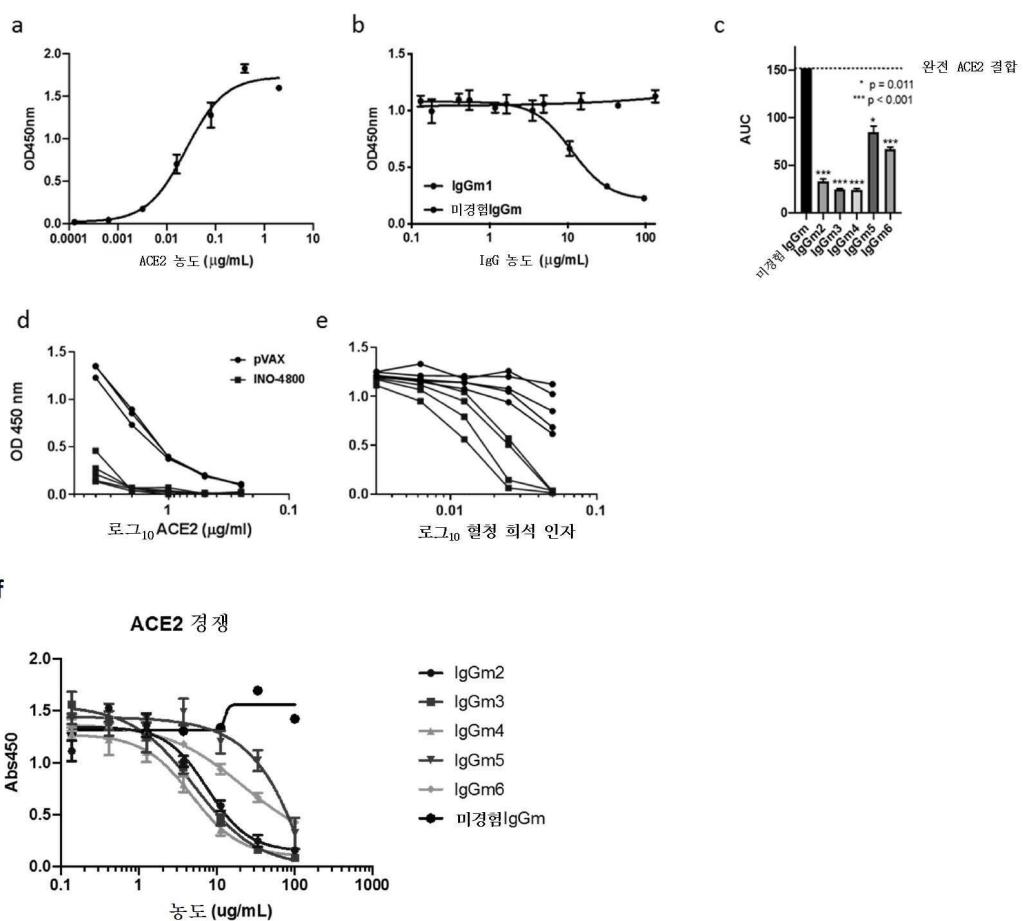
## 도면4



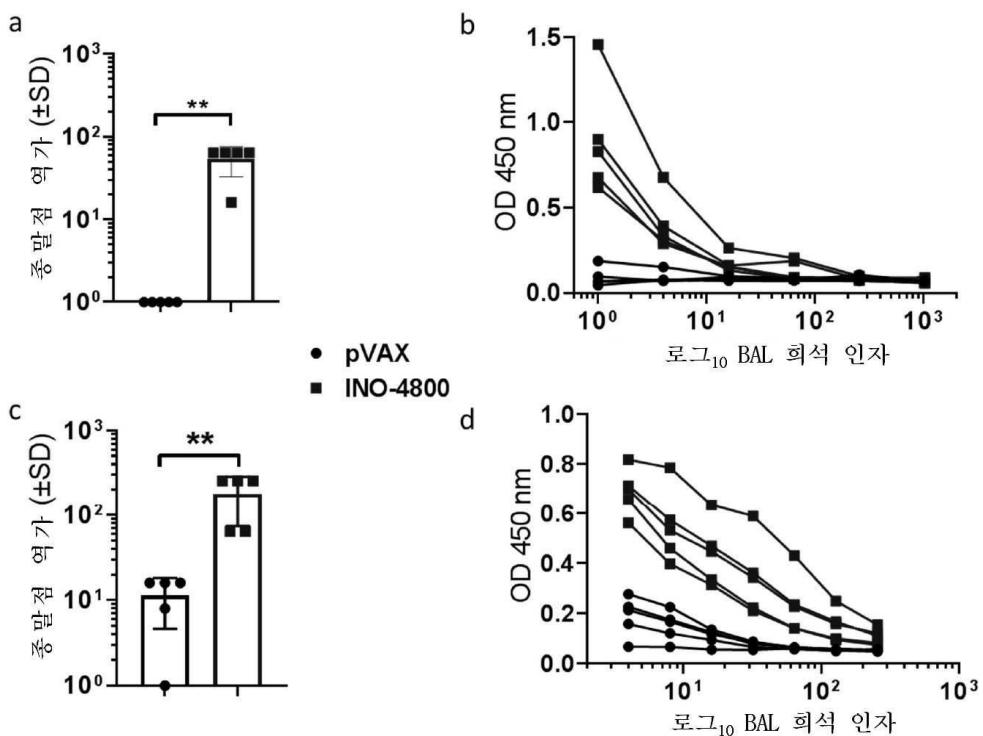
## 도면5



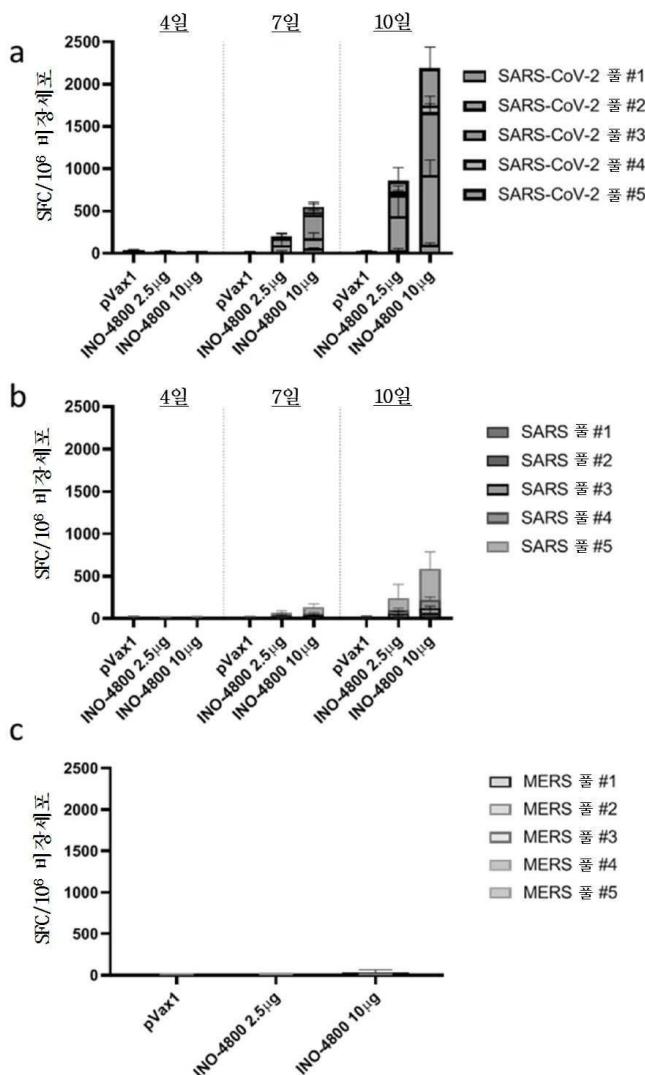
## 도면6



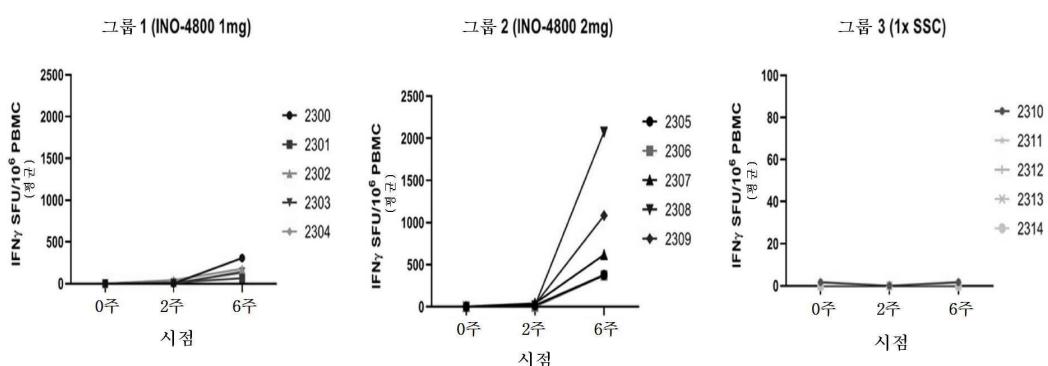
## 도면7



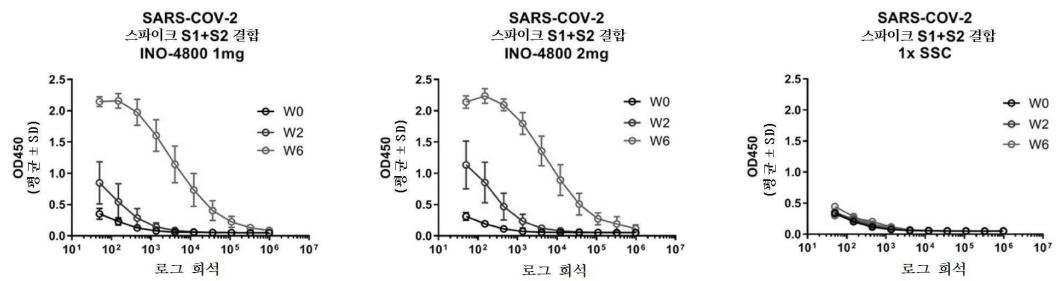
## 도면8



## 도면9

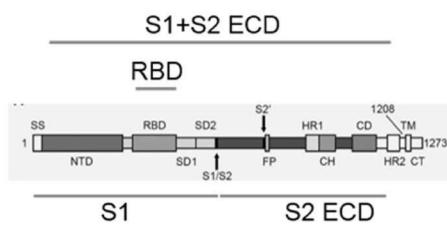


## 도면10

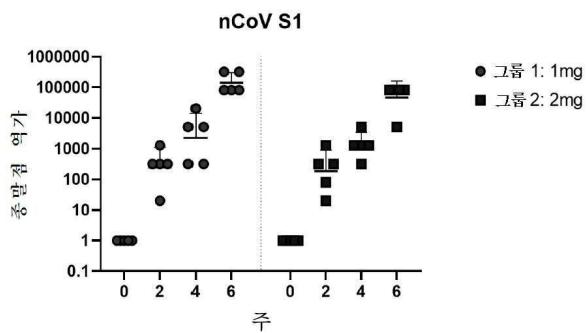


## 도면11ac

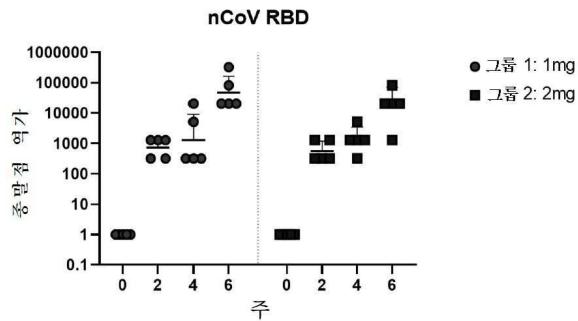
a



b

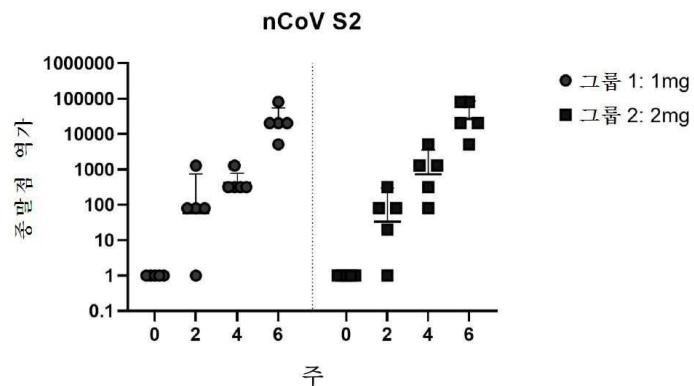


c

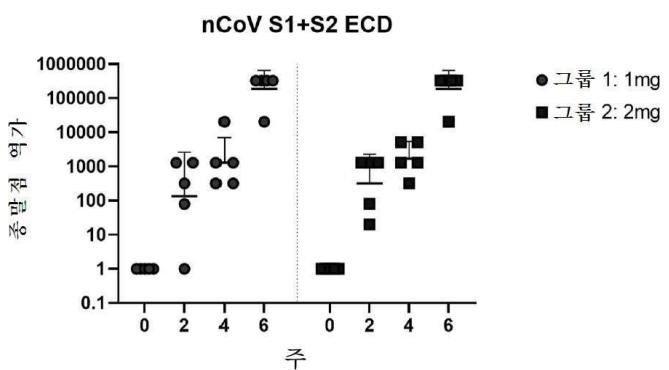


도면 11de

d

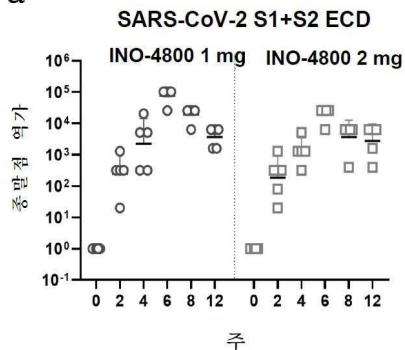


e

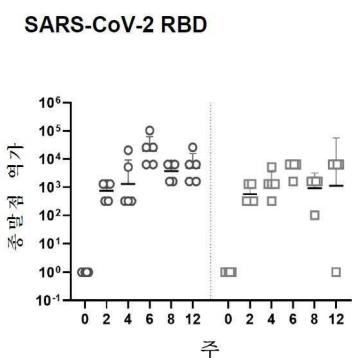


## 도면 12ac

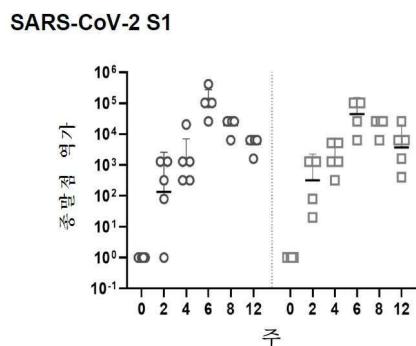
a



b

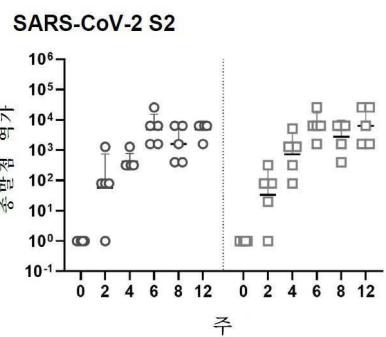


c

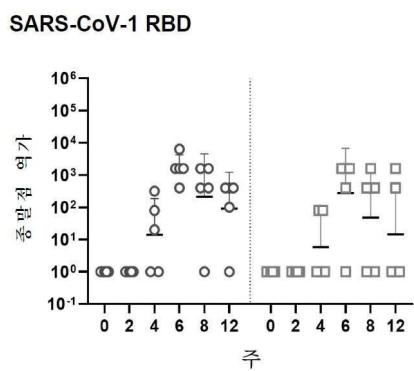


도면 12df

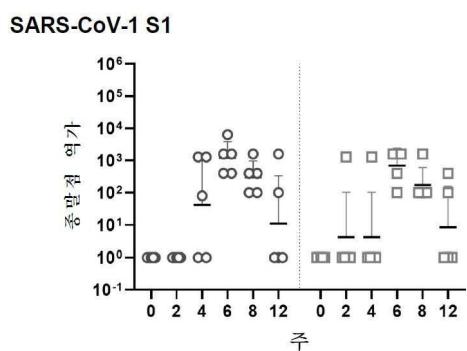
d



e

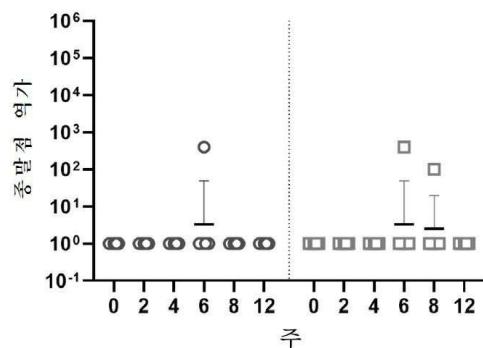


f



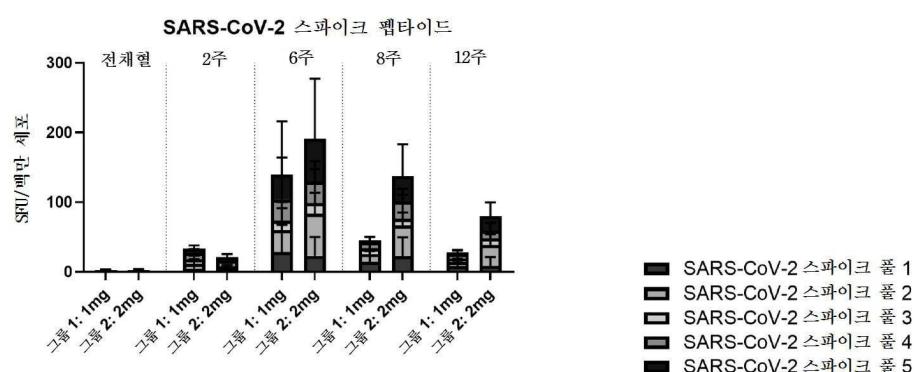
## 도면12g

MERS-CoV S

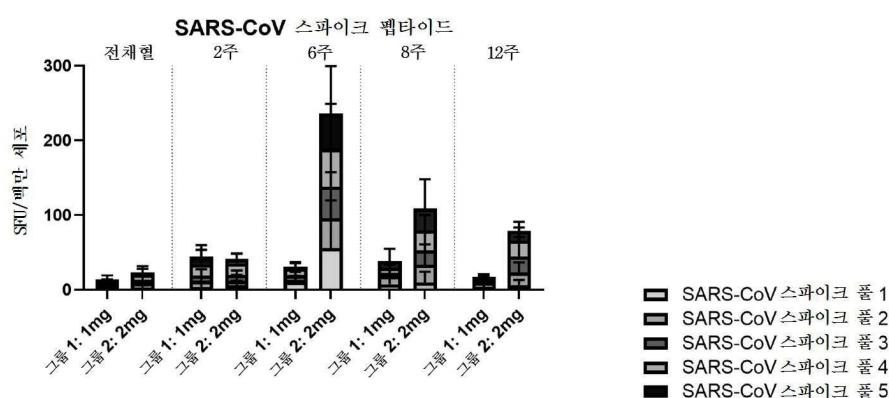


## 도면13ab

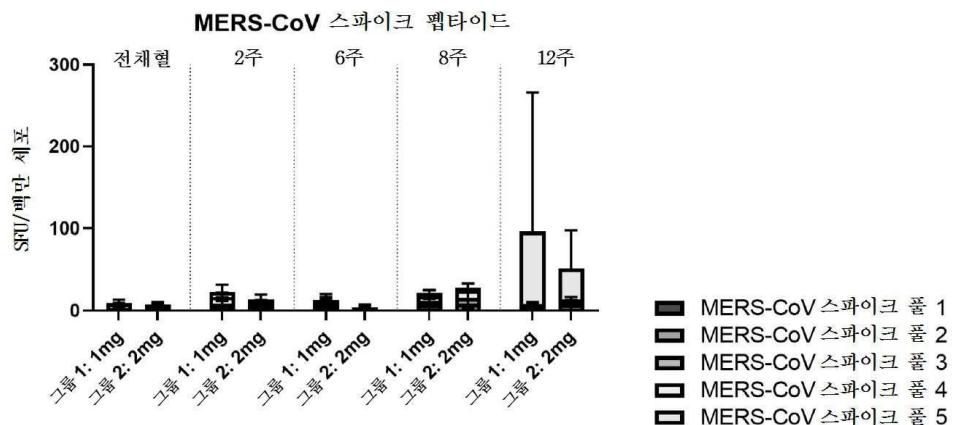
a



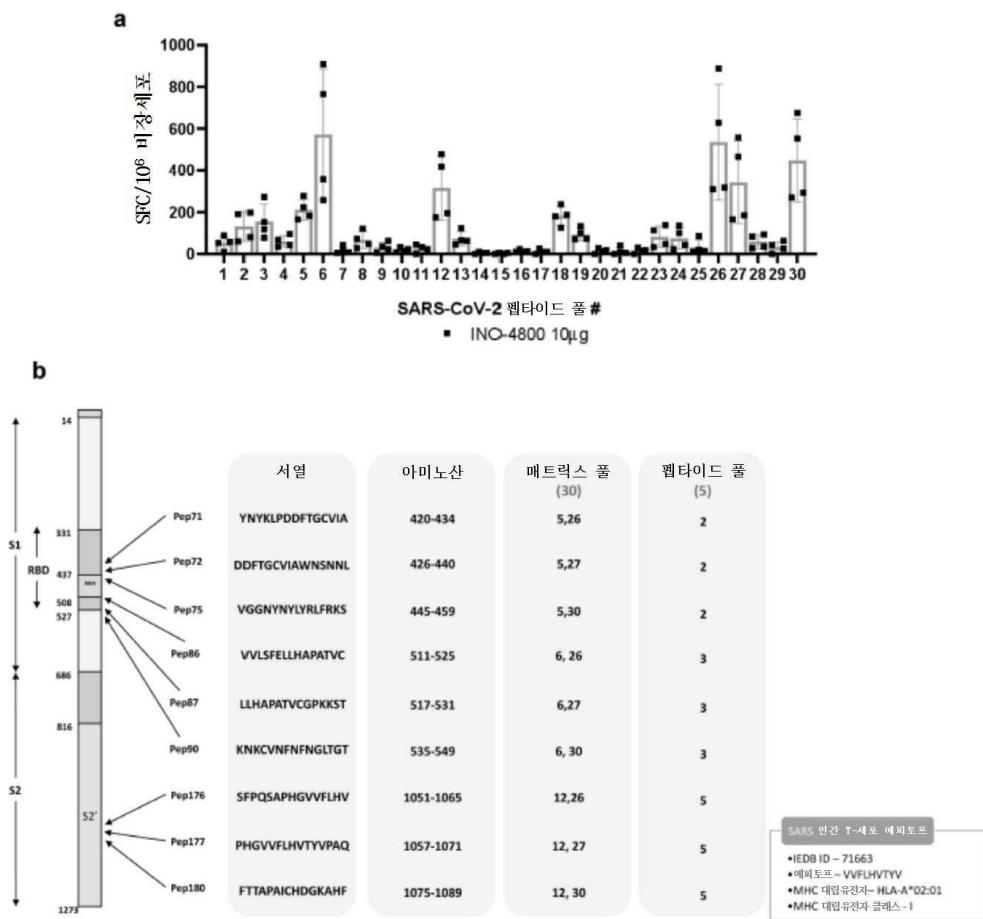
b



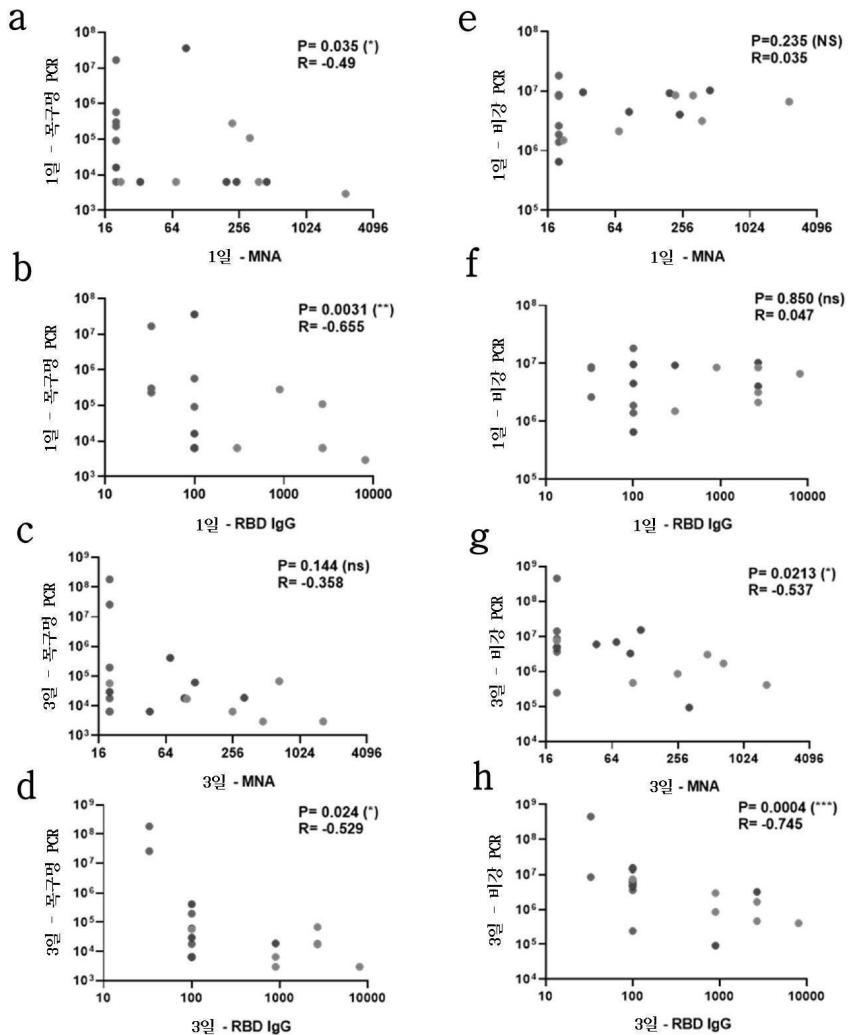
도면13c



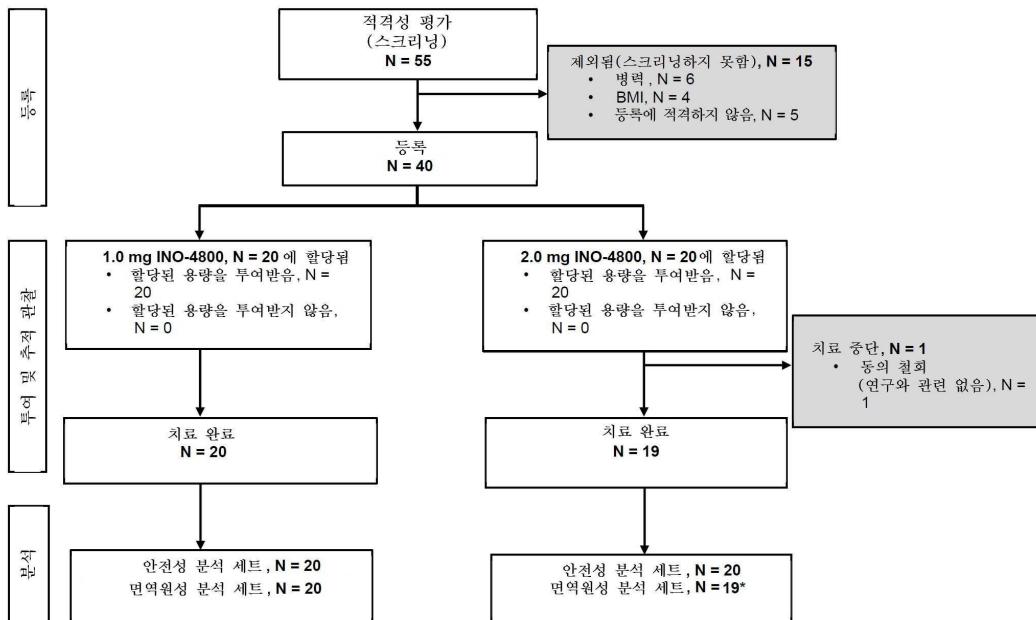
도면14



## 도면15



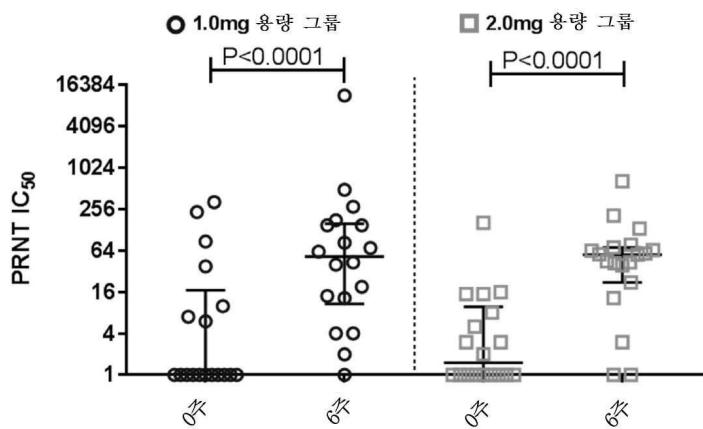
## 도면16



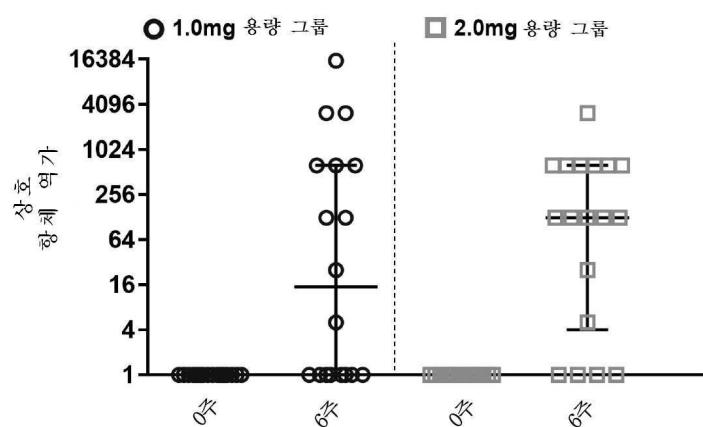
\* 2.0mg 용량 그룹의 한 명의 피험자는 일관된 수송을 확보하지 못하여 중단하였다.

## 도면 17ab

a

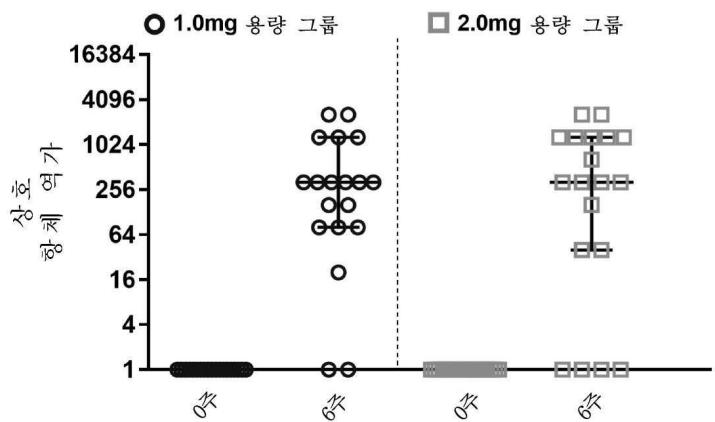


b

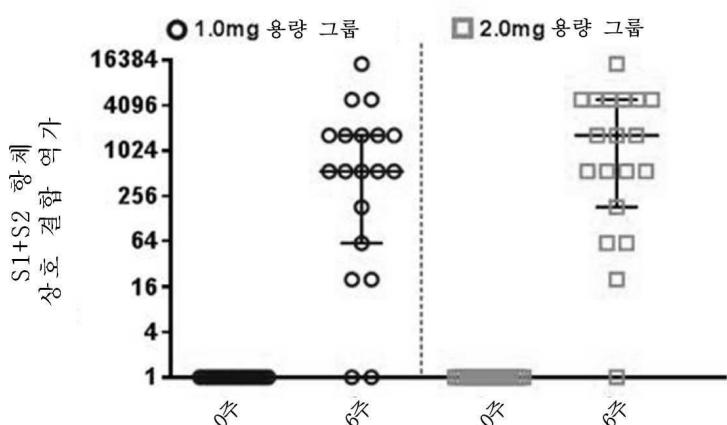


도면 17cd

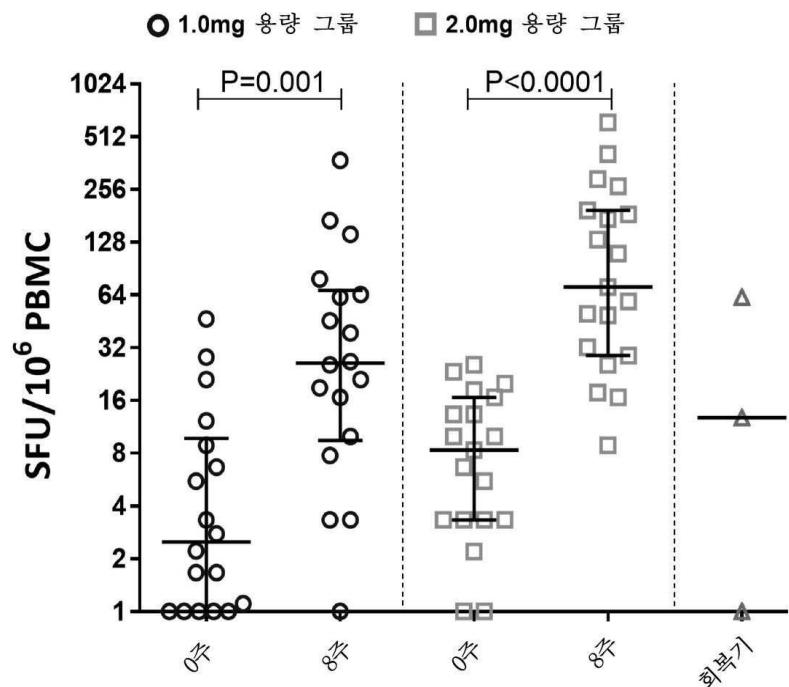
c



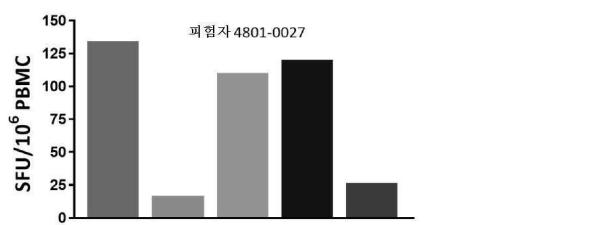
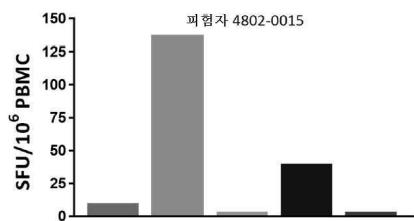
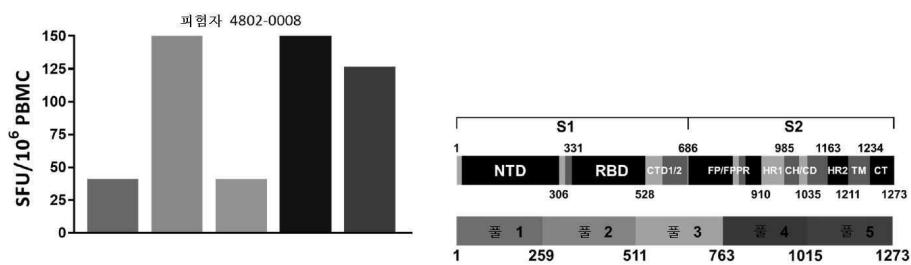
d



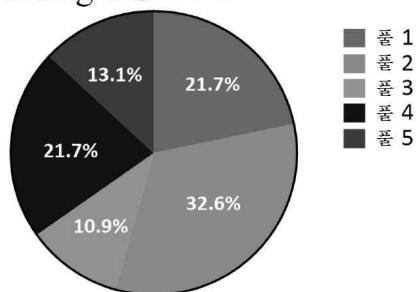
## 도면 18a



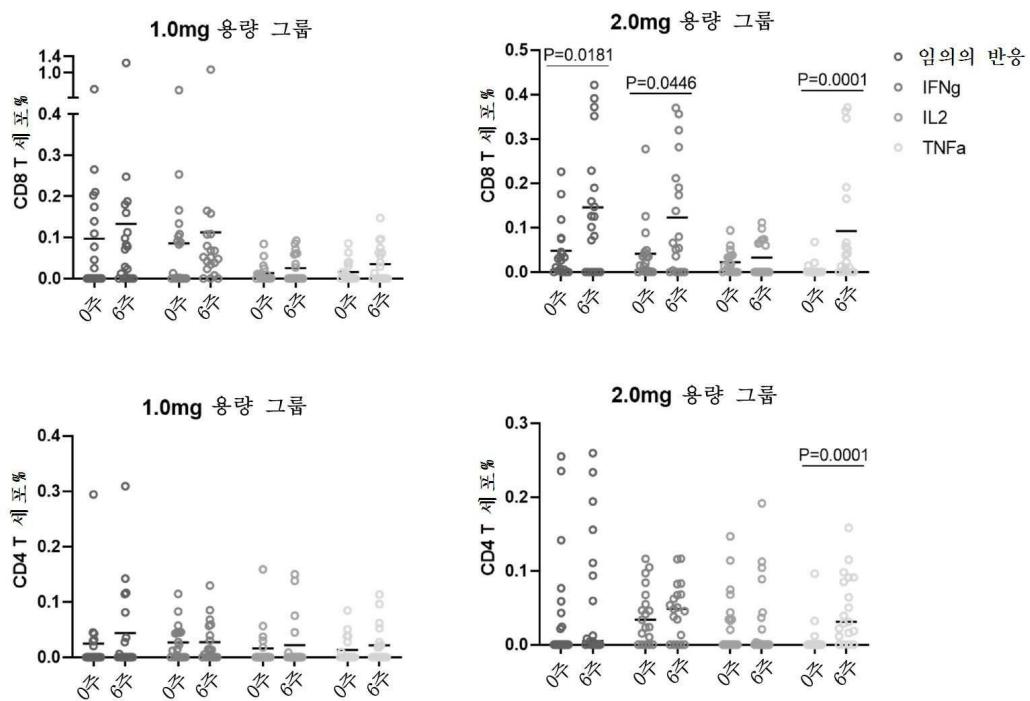
## 도면18b



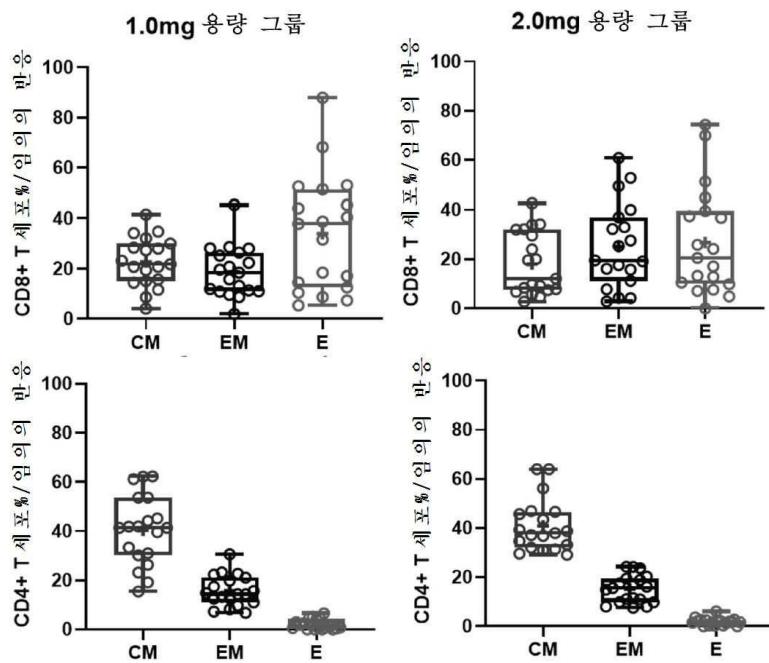
2.0mg 용량 코호트



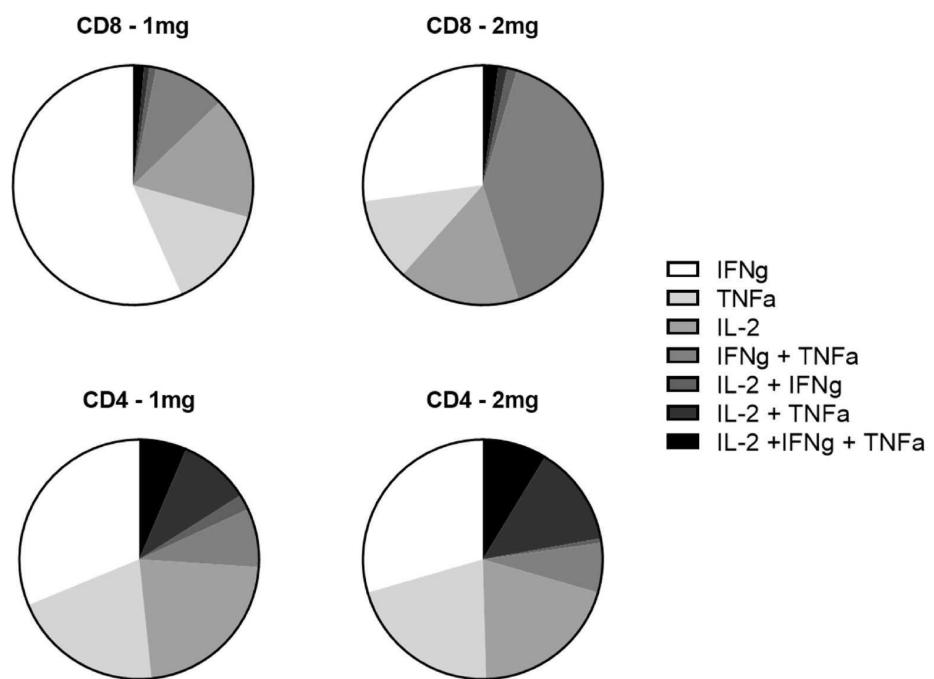
도면18c



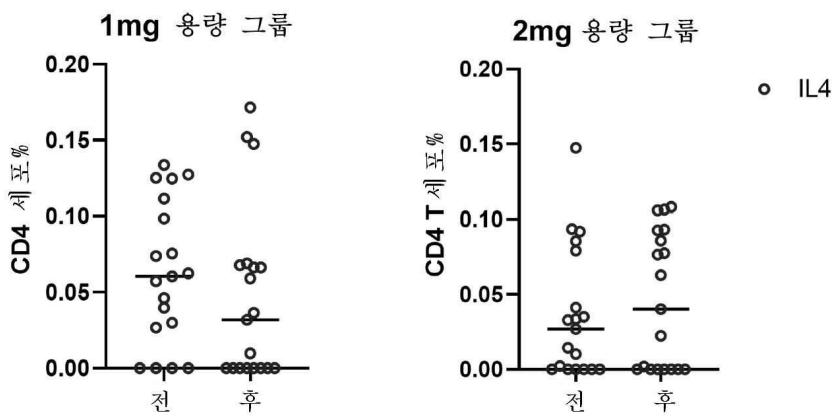
도면18d



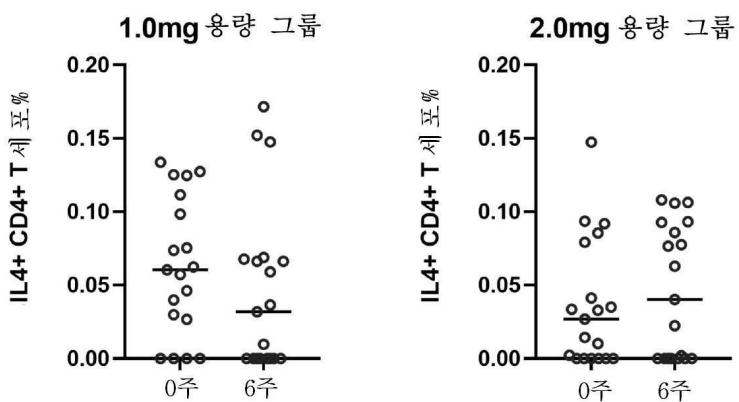
도면 18e



도면 18f



업데이트:



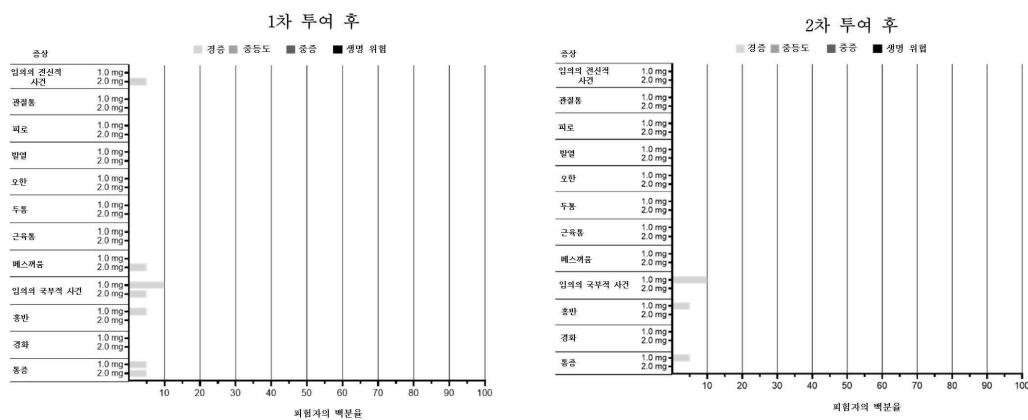
## 도면18g

## 2.0mg 용량 코호트

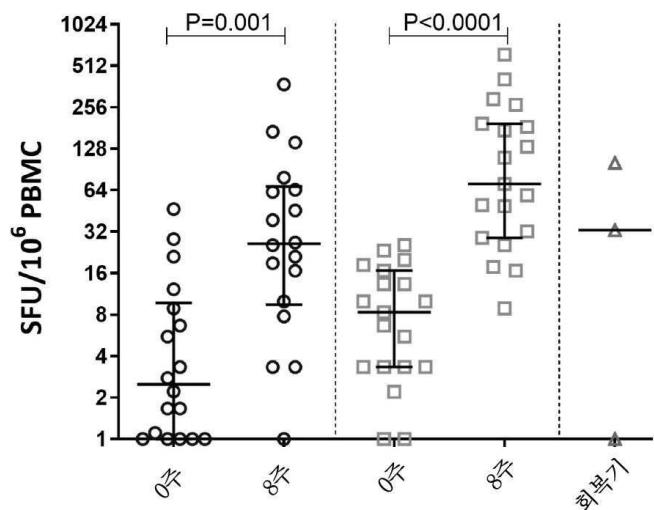
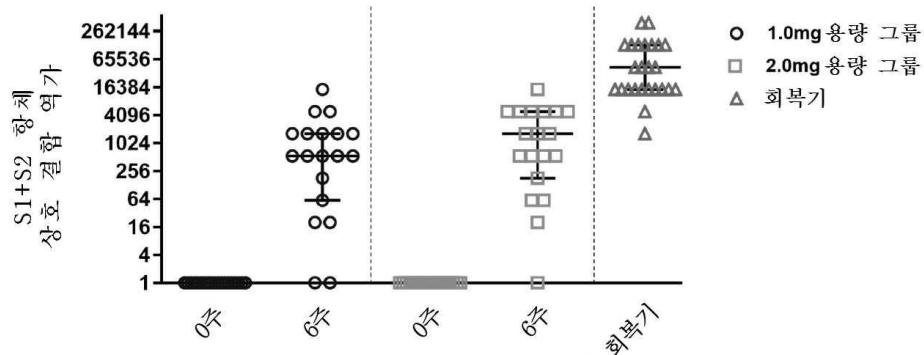
| 피험자 ID    | 풀 1   | 풀 2   | 풀 3   | 풀 4   | 풀 5   | 반응 비율   |    |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|----|
| 4801-0027 | 33.0% | 4.1%  | 27.0% | 29.4% | 6.5%  | 100.00% | 최고 |
| 4801-0028 | 3.3%  | 95.8% | 0.0%  | 0.8%  | 0.0%  | 75.00%  |    |
| 4801-0029 | 20.0% | 0.0%  | 80.0% | 0.0%  | 0.0%  | 50.00%  | 중간 |
| 4802-0013 | 4.7%  | 57.8% | 4.7%  | 23.4% | 9.4%  | 25.00%  |    |
| 4802-0014 | 27.3% | 31.8% | 11.4% | 13.6% | 15.9% | 0.00%   | 최저 |
| 4802-0015 | 5.1%  | 70.9% | 1.7%  | 20.6% | 1.7%  |         |    |
| 4801-0011 | 9.2%  | 62.2% | 5.0%  | 20.2% | 3.4%  |         |    |
| 4801-0016 | 24.2% | 29.3% | 3.0%  | 19.2% | 24.2% |         |    |
| 4801-0017 | 22.6% | 17.0% | 5.7%  | 30.2% | 24.5% |         |    |
| 4801-0026 | 31.3% | 18.7% | 18.7% | 31.3% | 0.0%  |         |    |
| 4802-0005 | 26.1% | 34.8% | 0.0%  | 26.1% | 13.0% |         |    |
| 4802-0012 | 10.3% | 10.3% | 37.9% | 20.7% | 20.7% |         |    |
| 4802-0019 | 0.0%  | 50.0% | 50.0% | 0.0%  | 0.0%  |         |    |
| 4802-0018 | 11.5% | 9.6%  | 3.2%  | 3.8%  | 71.8% |         |    |
| 4802-0020 | 8.0%  | 6.1%  | 36.0% | 5.3%  | 44.7% |         |    |
| 4802-0021 | 0.0%  | 11.5% | 53.8% | 23.1% | 11.5% |         |    |
| 4802-0008 | 6.7%  | 34.7% | 6.7%  | 31.4% | 20.6% |         |    |
| 4802-0016 | 16.3% | 16.9% | 10.2% | 13.3% | 43.4% |         |    |

풀 1      풀 2      풀 3      풀 4      풀 5

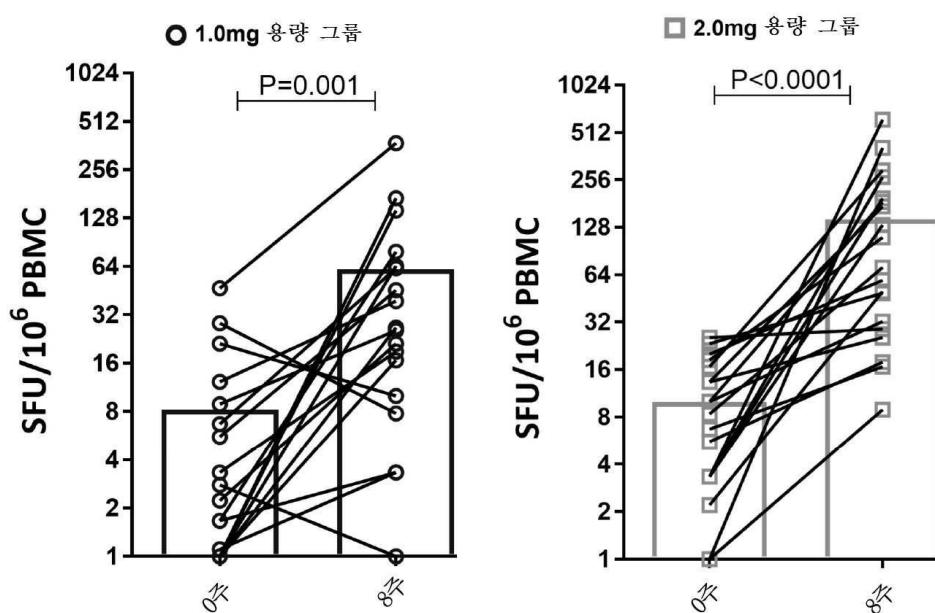
## 도면19



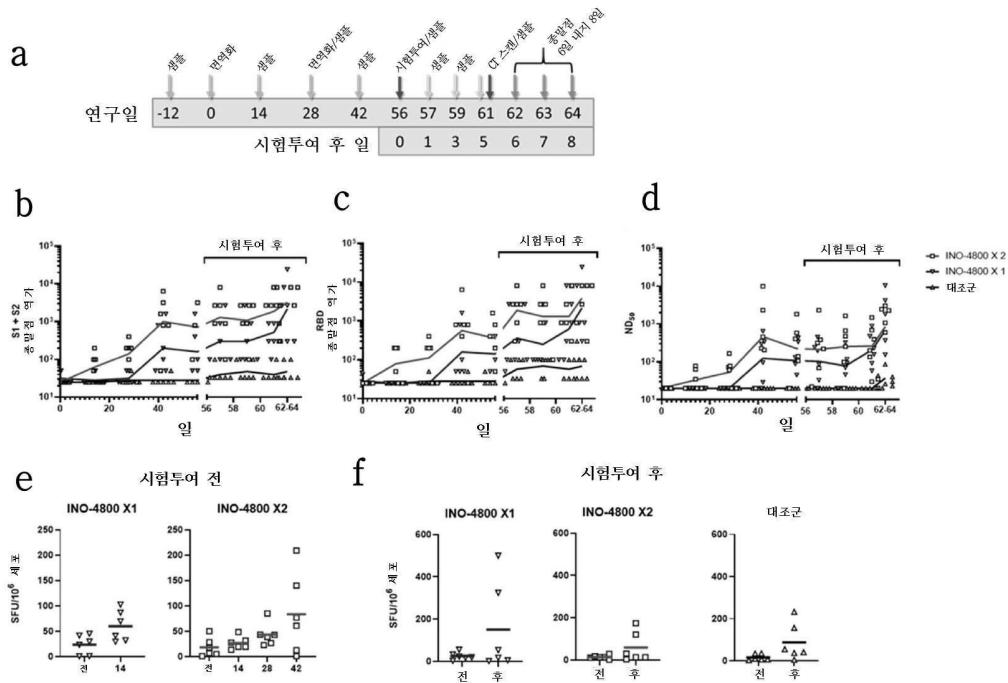
도면20



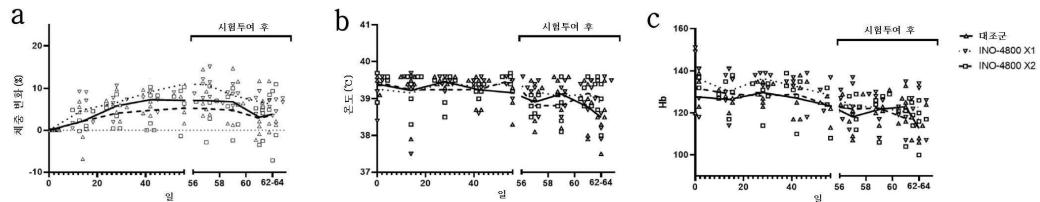
도면21



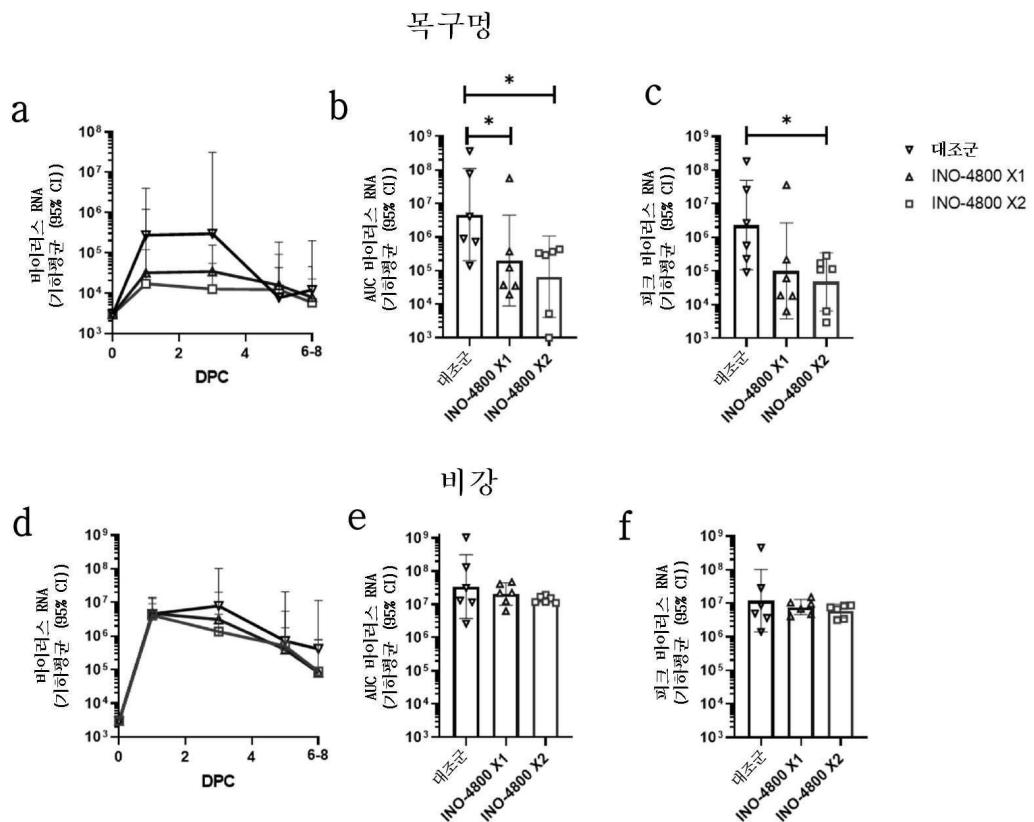
## 도면22



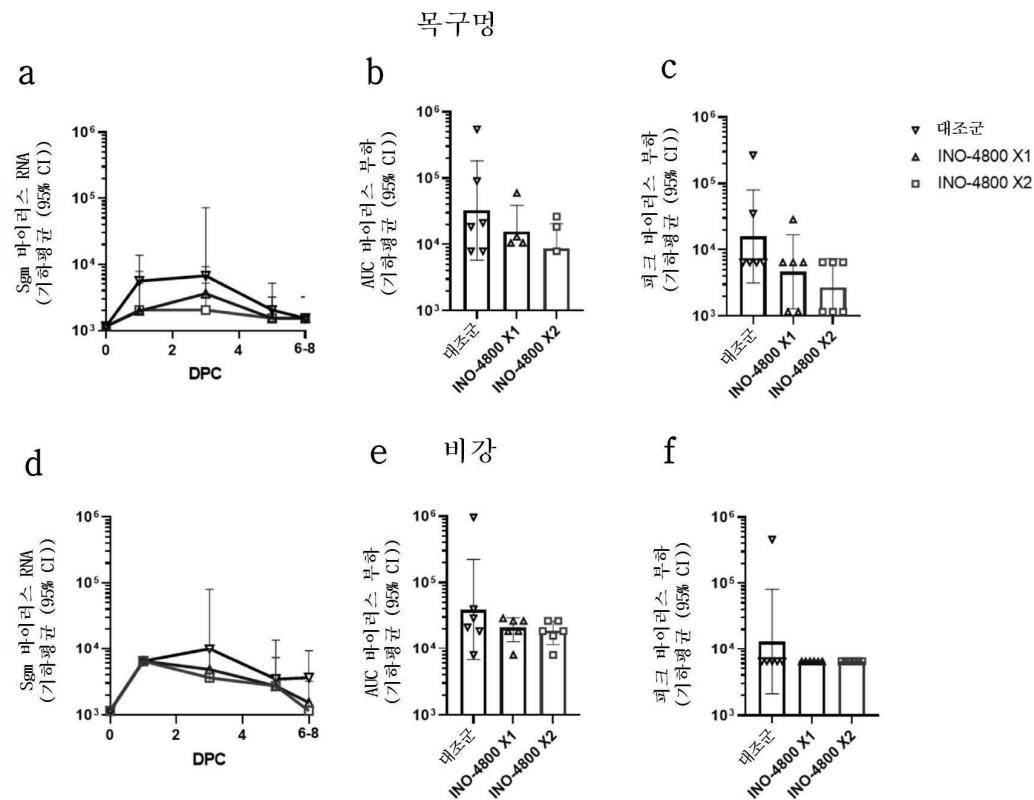
## 도면23



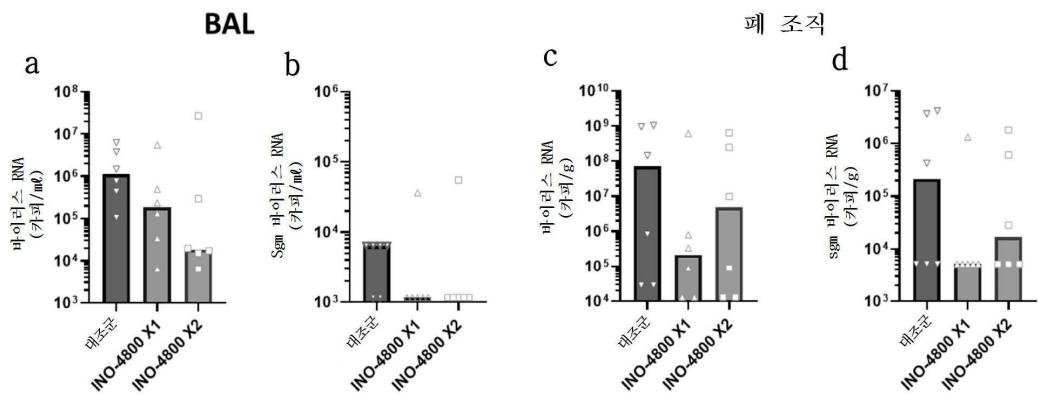
## 도면24



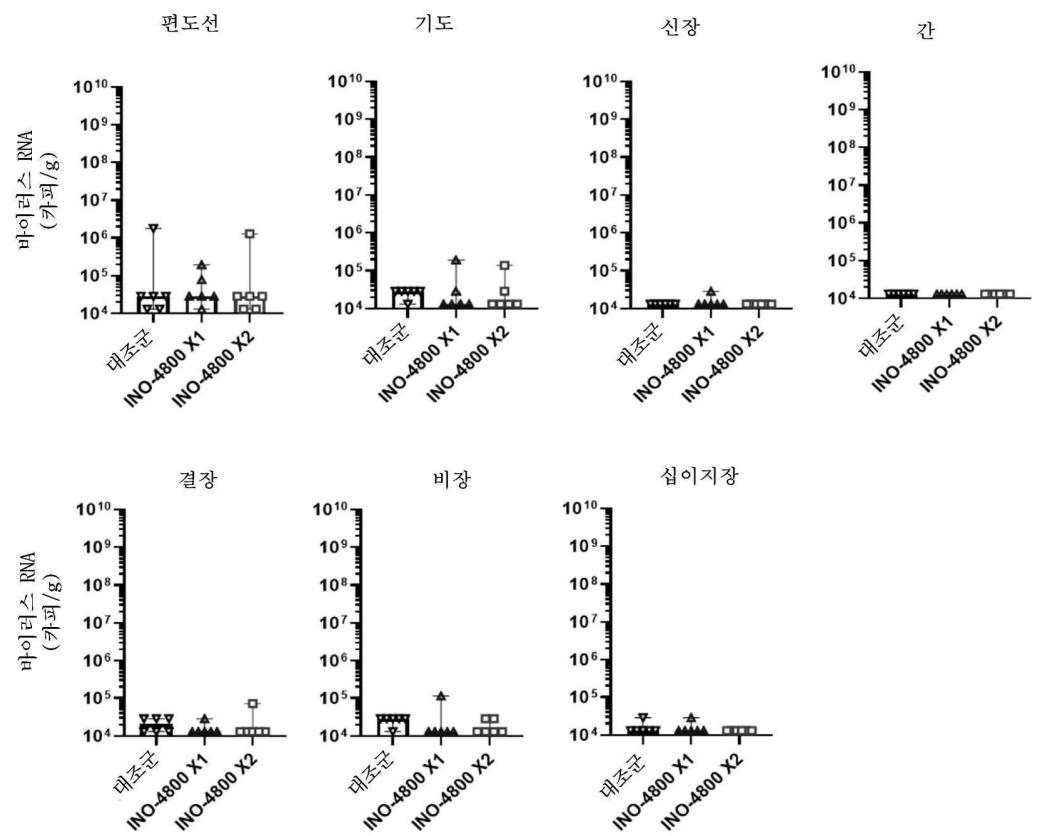
## 도면25



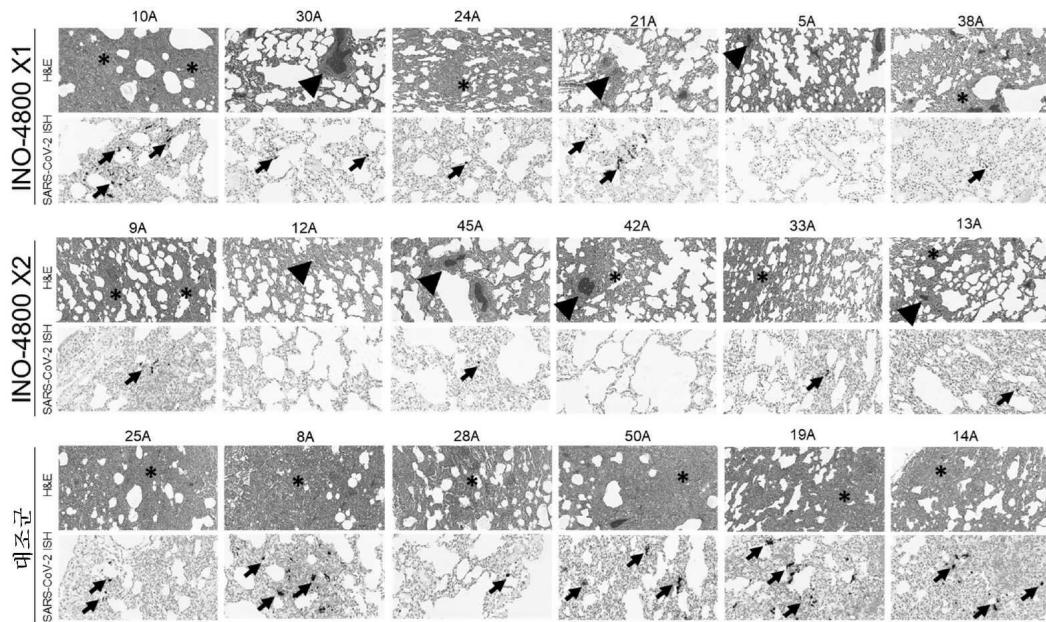
## 도면26



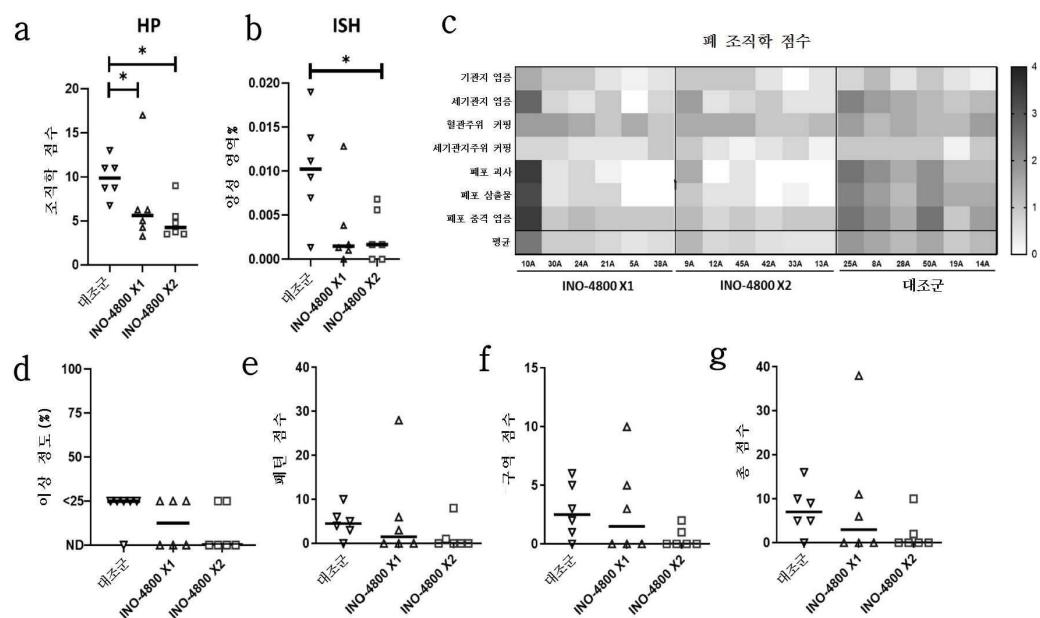
## 도면27



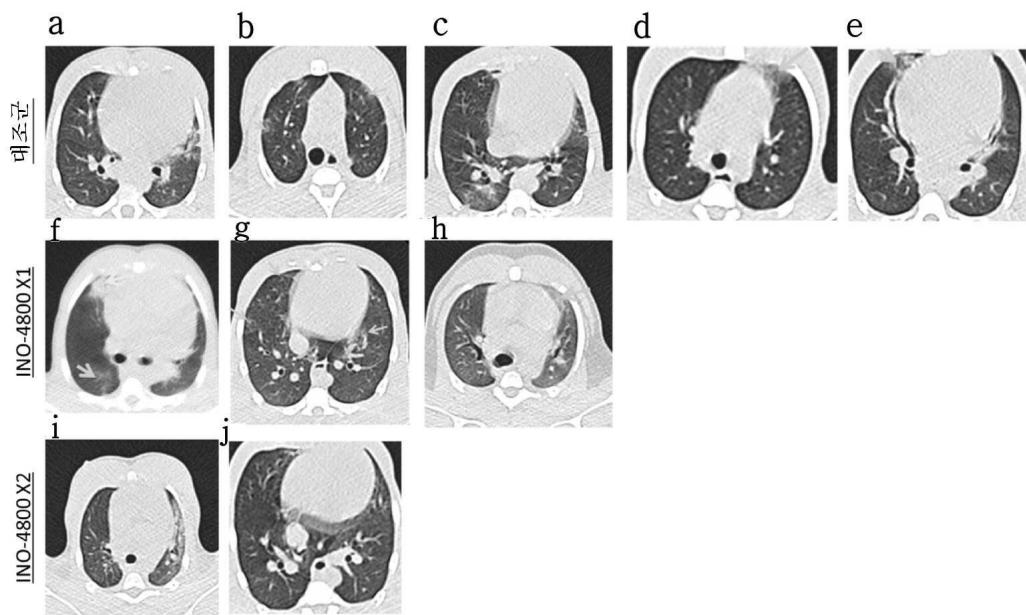
## 도면28



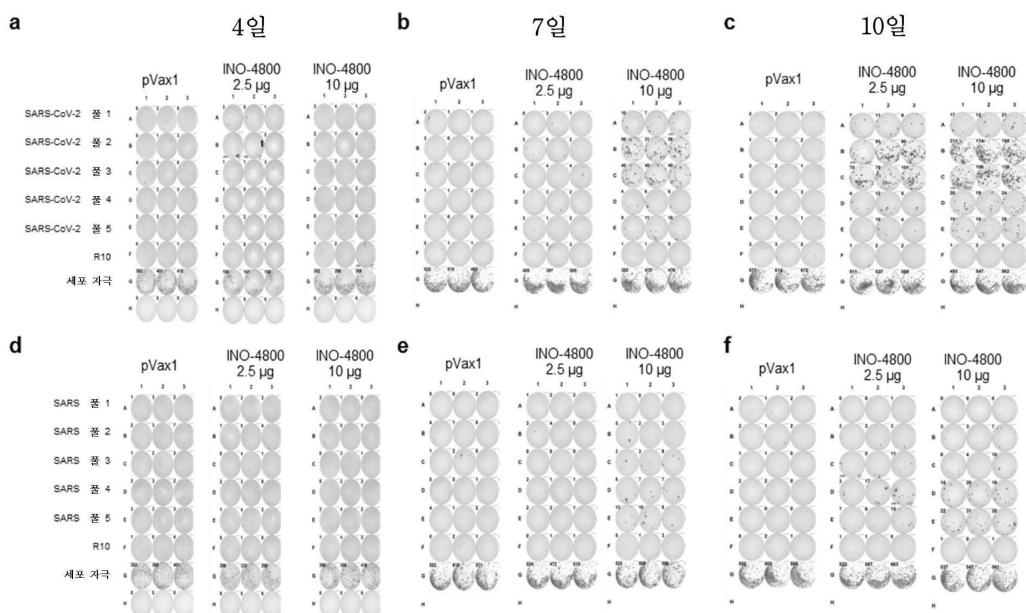
## 도면29



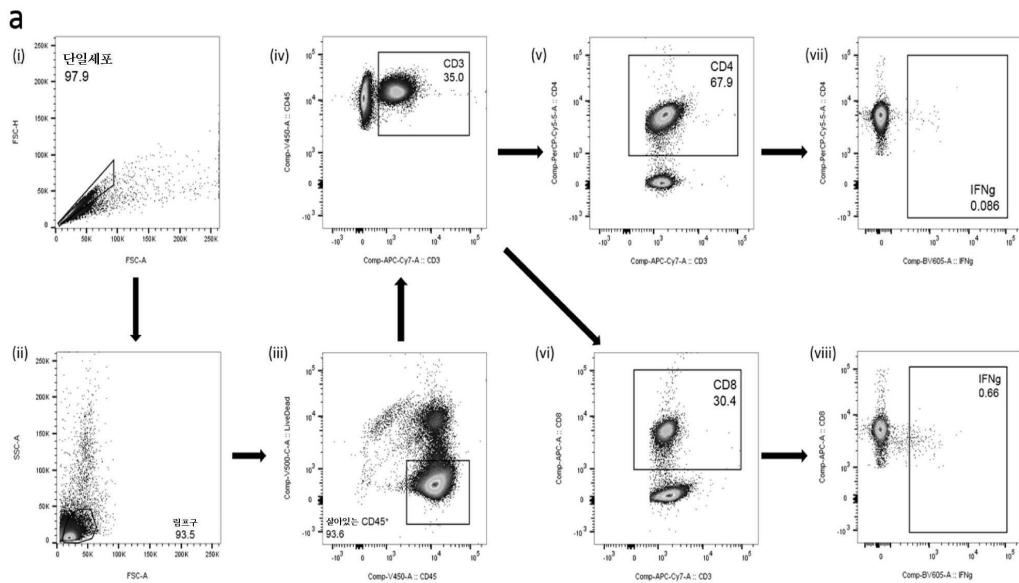
## 도면30



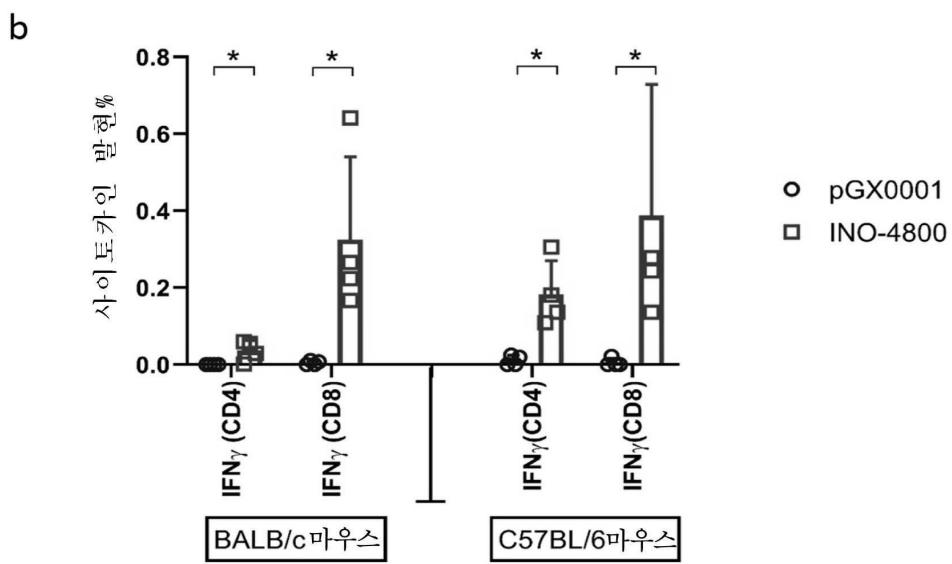
## 도면31



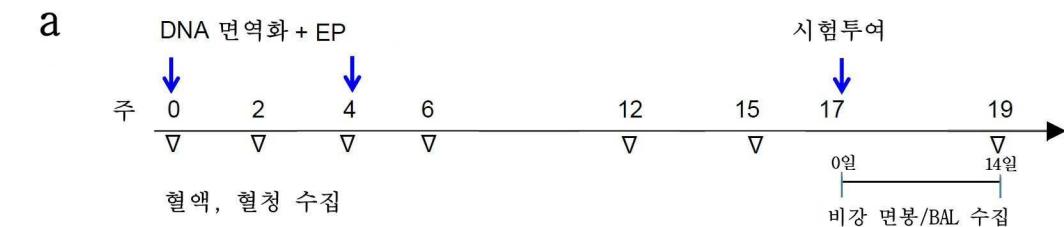
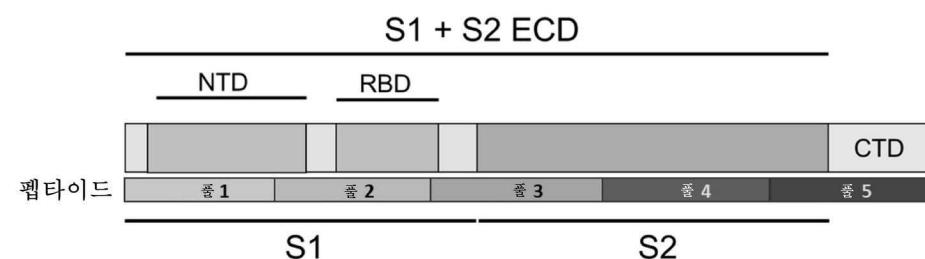
## 도면32a



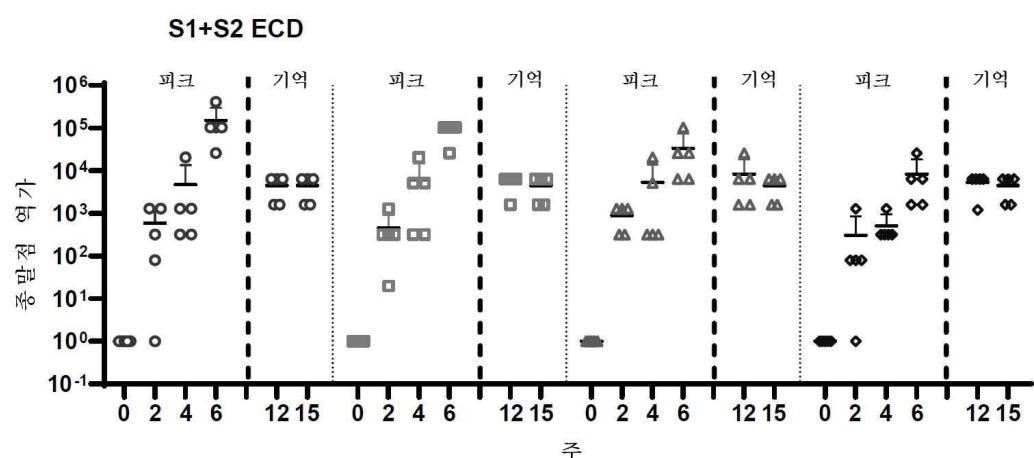
## 도면32b



## 도면33ab

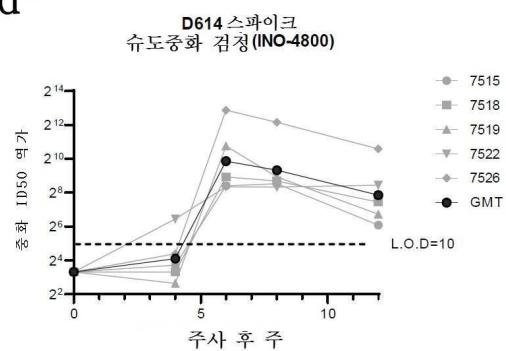
**b**

## 도면33c

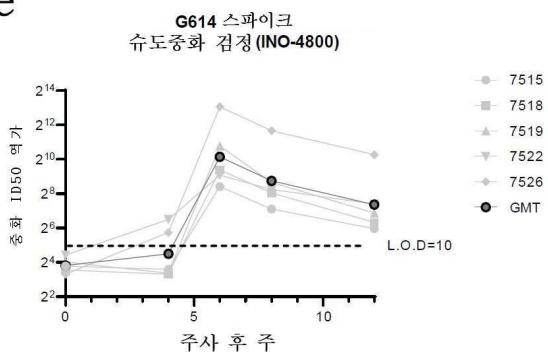


## 도면33df

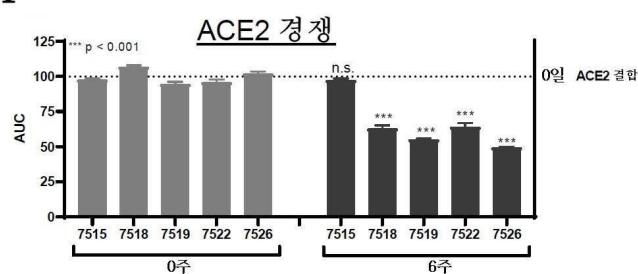
d



e

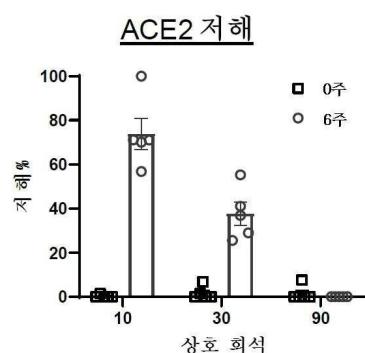


f

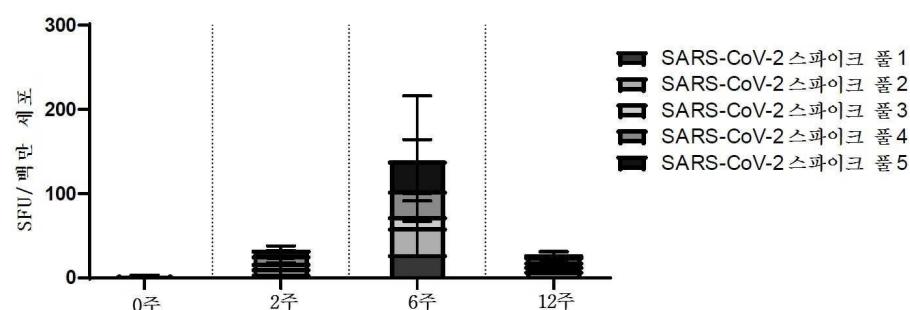


도면33gh

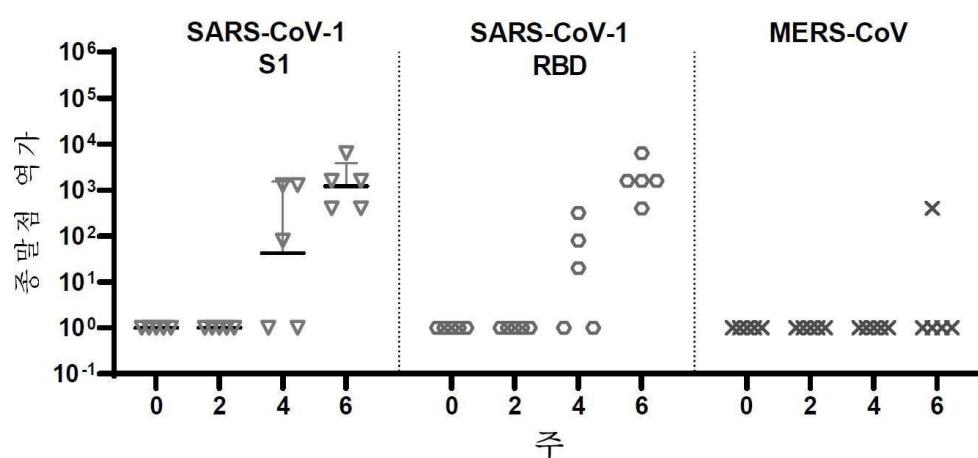
g



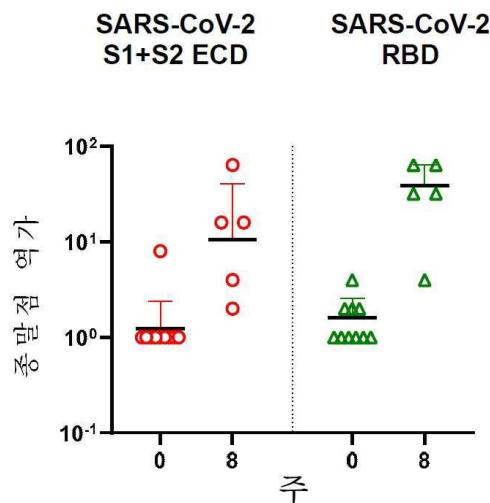
h

T 세포 반응

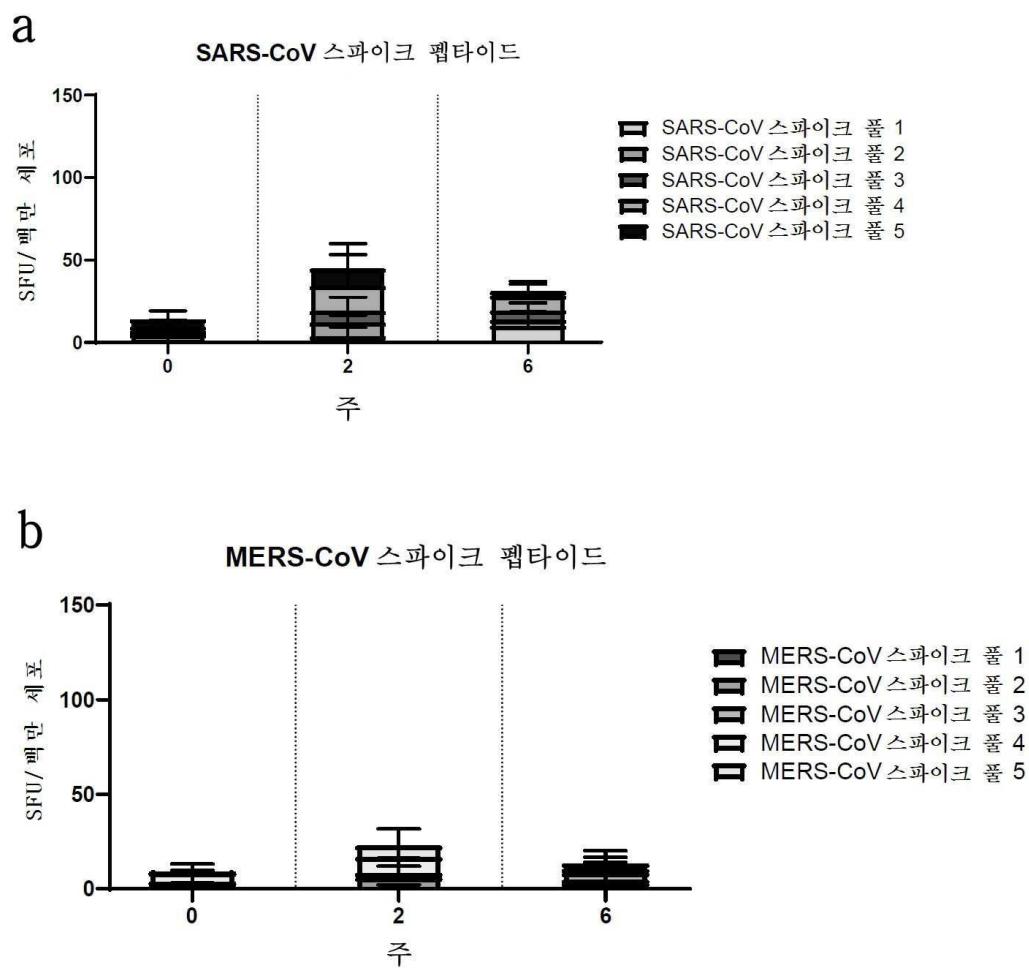
도면34



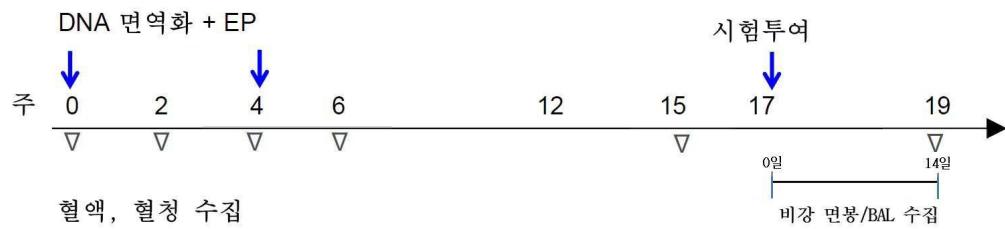
도면35



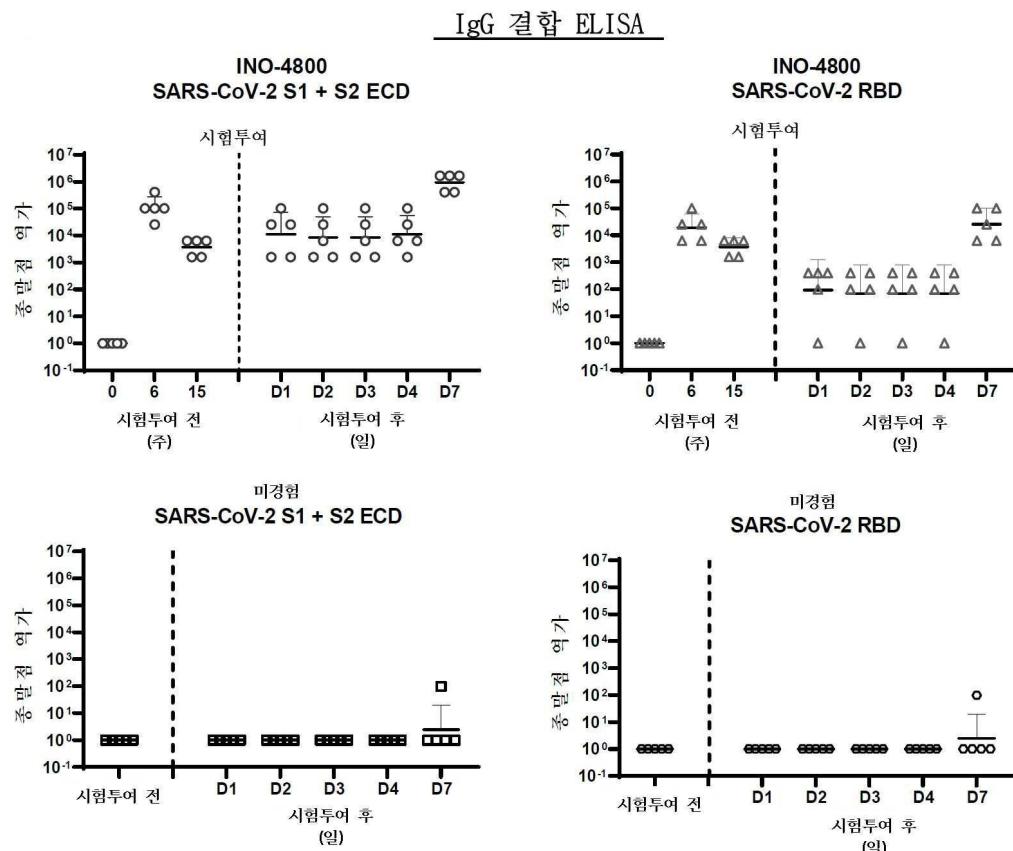
도면36



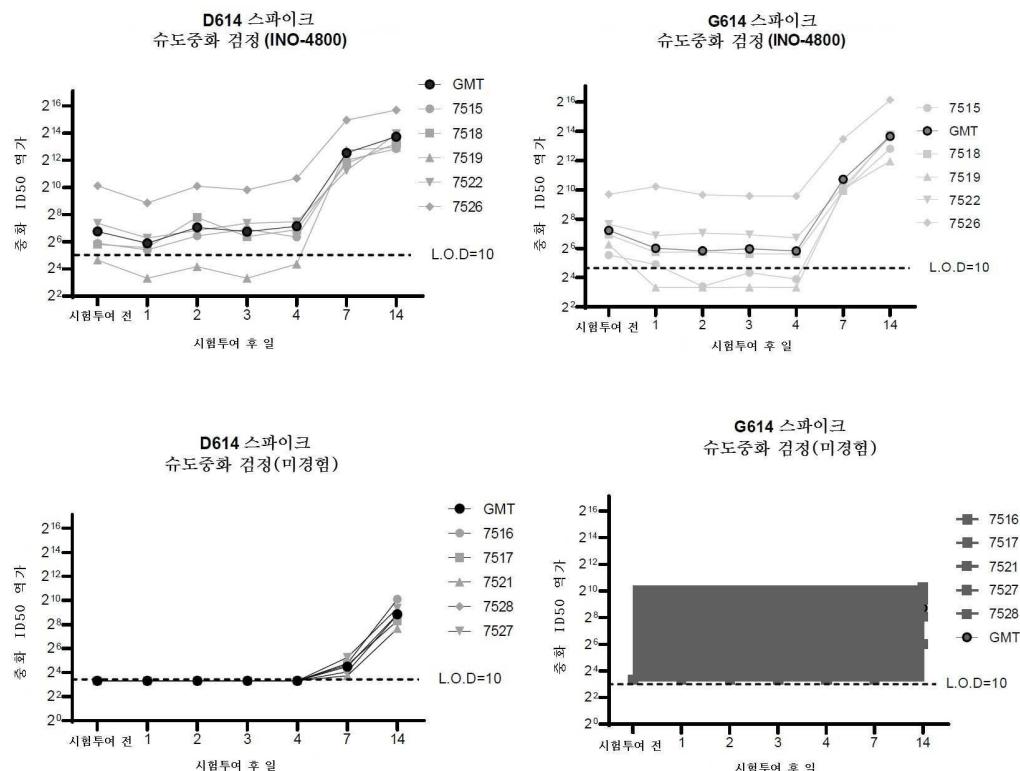
## 도면37a



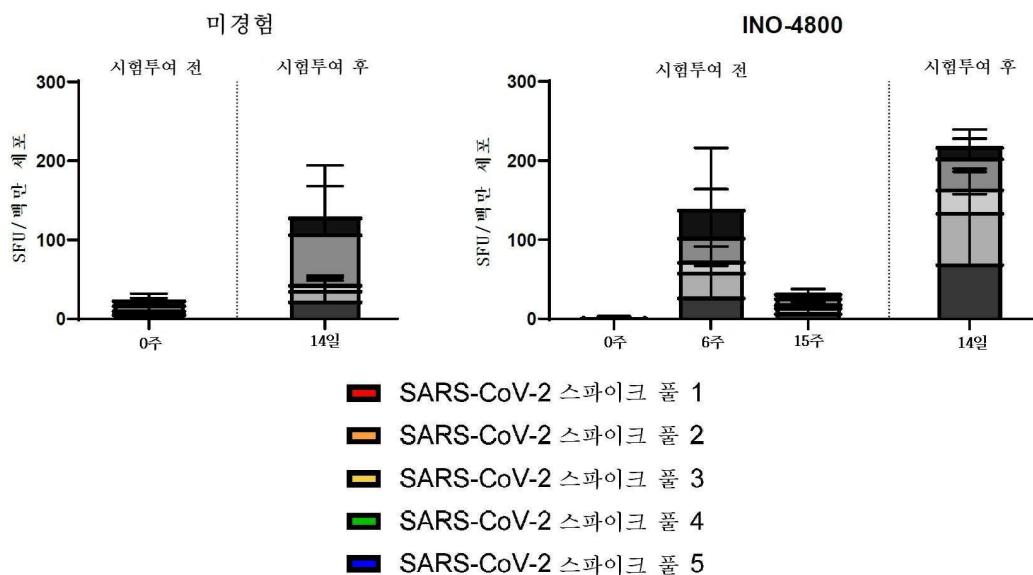
## 도면37b



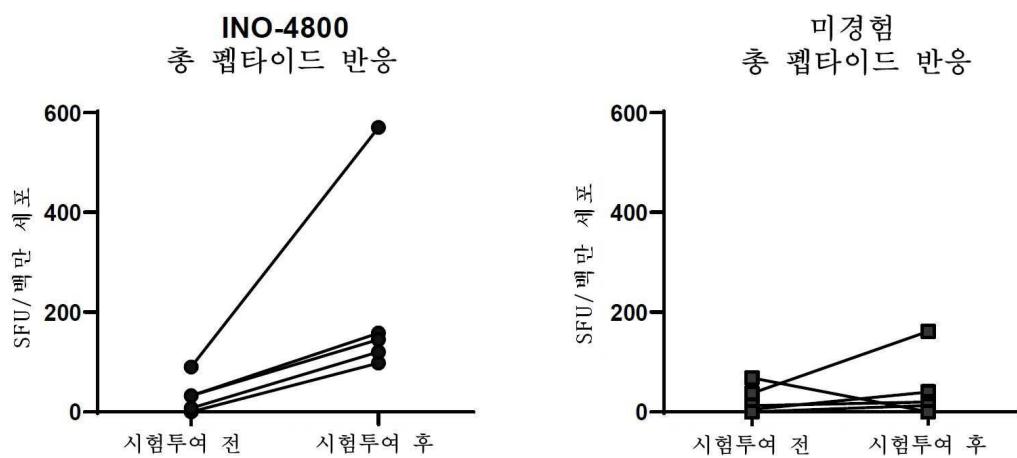
## 도면37c



## 도면38

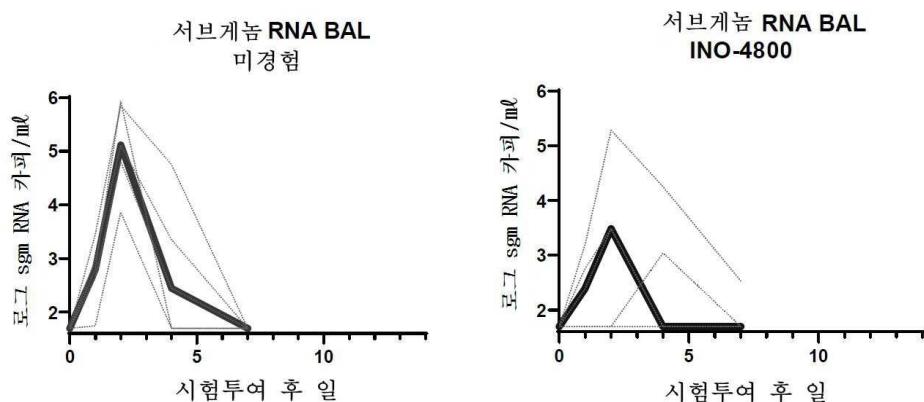


도면39

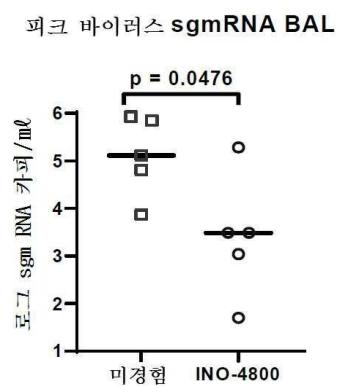


도면40ac

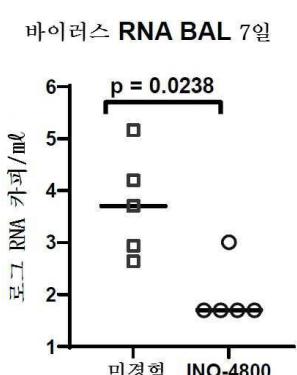
a



b

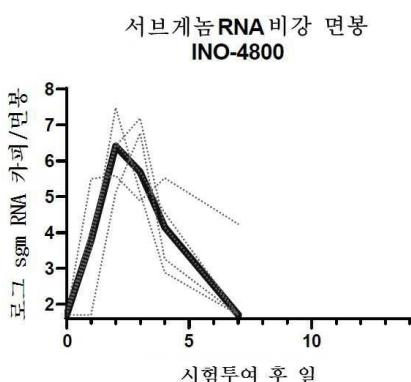
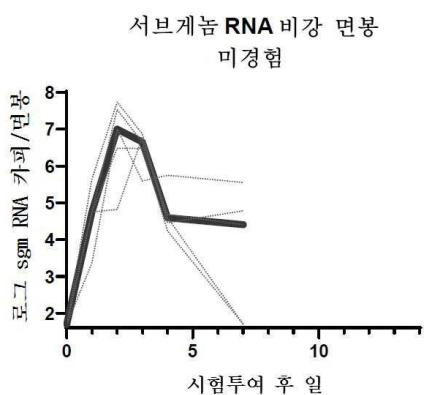


c

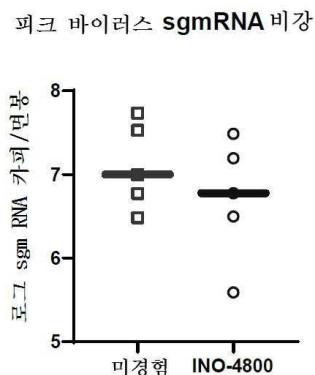


## 도면40df

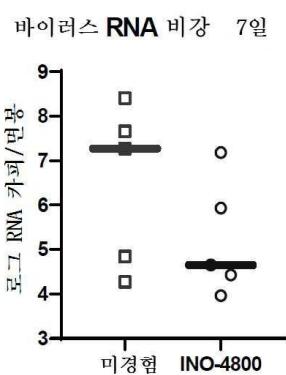
d



e



f



## 서 열 목록

SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; INOVIO PHARMACEUTICALS, INC.

THE WISTAR INSTITUTE OF ANATOMY AND BIOLOGY

&lt;120&gt; VACCINES AGAINST CORONAVIRUS AND METHODS OF USE

&lt;130&gt; WO2021173829

&lt;140&gt; PCT/US2021/019662

&lt;141&gt; 2021.02.25

&lt;150&gt; 63/136,973

&lt;151&gt; 2021-01-13

&lt;150&gt; 63/130,593

&lt;151&gt; 2020-12-24

&lt;150&gt; 63/114,858

<151> 2020-11-17

<150> 63/062,762

<151> 2020-08-07

<150> 63/063,157

<151> 2020-08-07

<150> 63/056,996

<151> 2020-07-27

<150> 63/046,415

<151> 2020-06-30

<150> 63/040,865

<151> 2020-06-18

<150> 63/033,349

<151> 2020-06-02

<150> 63/028,404

<151> 2020-05-21

<150> 63/022,032

<151> 2020-05-08

<150> 63/004,380

<151> 2020-04-02

<150> 62/981,451

<151> 2020-02-25

<150> 62/981,168

<151> 2020-02-25

<160> 35

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1279

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 1

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val

1 5 10 15

His Ser Ser Gln Cys Val Asn Leu Thr Thr Arg Thr Gln Leu Pro Pro

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Phe Ala Ser Thr Glu Lys Ser Asn Ile Ile Arg Gly Trp Ile Phe

100 105 110

Gly Thr Thr Leu Asp Ser Lys Thr Gln Ser Leu Leu Ile Val Asn Asn

115 120 125

Ala Thr Asn Val Val Ile Lys Val Cys Glu Phe Gln Phe Cys Asn Asp

130 135 140

Pro Phe Leu Gly Val Tyr Tyr His Lys Asn Asn Lys Ser Trp Met Glu

145 150 155 160

Ser Glu Phe Arg Val Tyr Ser Ser Ala Asn Asn Cys Thr Phe Glu Tyr

165 170 175

Val Ser Gln Pro Phe Leu Met Asp Leu Glu Gly Lys Gln Gly Asn Phe

180 185 190

Lys Asn Leu Arg Glu Phe Val Phe Lys Asn Ile Asp Gly Tyr Phe Lys

195 200 205

Ile Tyr Ser Lys His Thr Pro Ile Asn Leu Val Arg Asp Leu Pro Gln

210 215 220

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

225 230 235 240

Ile Thr Arg Phe Gln Thr Leu Leu Ala Leu His Arg Ser Tyr Leu Thr

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Pro Gly Asp Ser Ser Ser Gly Trp Thr Ala Gly Ala Ala Ala Tyr Tyr |     |     |
|                                                                 |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Val Gly Tyr Leu Gln Pro Arg Thr Phe Leu Leu Lys Tyr Asn Glu Asn |     |     |
|                                                                 |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Gly Thr Ile Thr Asp Ala Val Asp Cys Ala Leu Asp Pro Leu Ser Glu |     |     |
|                                                                 |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Thr Lys Cys Thr Leu Lys Ser Phe Thr Val Glu Lys Gly Ile Tyr Gln |     |     |
|                                                                 |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Thr Ser Asn Phe Arg Val Gln Pro Thr Glu Ser Ile Val Arg Phe Pro |     |     |
|                                                                 |     |     |
|                                                                 |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg |     |     |
|                                                                 |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Phe Ala Ser Val Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val |     |     |
|                                                                 |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |
| Ala Asp Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys |     |     |
|                                                                 |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |
| Cys Tyr Gly Val Ser Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn |     |     |
|                                                                 |     |     |
|                                                                 |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
| Val Tyr Ala Asp Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile |     |     |
|                                                                 |     |     |
| 405                                                             | 410 | 415 |
| Ala Pro Gly Gln Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro |     |     |
|                                                                 |     |     |
| 420                                                             | 425 | 430 |
| Asp Asp Phe Thr Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp |     |     |
|                                                                 |     |     |
| 435                                                             | 440 | 445 |
| Ser Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys |     |     |
|                                                                 |     |     |
|                                                                 |     |     |
| 450                                                             | 455 | 460 |
| Ser Asn Leu Lys Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln |     |     |
|                                                                 |     |     |
| 465                                                             | 470 | 475 |
| Ala Gly Ser Thr Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe |     |     |
|                                                                 |     |     |
| 485                                                             | 490 | 495 |

Pro Leu Gln Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln

500 505 510

Pro Tyr Arg Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala

515 520 525

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

530 535 540

Val Asn Phe Asn Phe Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Glu

545 550 555 560

Ser Asn Lys Lys Phe Leu Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Ile Ala

565 570 575

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

580 585 590

Ile Thr Pro Cys Ser Phe Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr

595 600 605

Asn Thr Ser Asn Gln Val Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr

610 615 620

Glu Val Pro Val Ala Ile His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Thr Trp Arg

625 630 635 640

Val Tyr Ser Thr Gly Ser Asn Val Phe Gln Thr Arg Ala Gly Cys Leu

645 650 655

Ile Gly Ala Glu His Val Asn Asn Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile

660 665 670

Gly Ala Gly Ile Cys Ala Ser Tyr Gln Thr Gln Thr Asn Ser Pro Arg

675 680 685

Arg Ala Arg Ser Val Ala Ser Gln Ser Ile Ile Ala Tyr Thr Met Ser

690 695 700

Leu Gly Ala Glu Asn Ser Val Ala Tyr Ser Asn Asn Ser Ile Ala Ile

705 710 715 720

Pro Thr Asn Phe Thr Ile Ser Val Thr Thr Glu Ile Leu Pro Val Ser

725 730 735

Met Thr Lys Thr Ser Val Asp Cys Thr Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 740                                                             | 745 | 750 |
| Thr Glu Cys Ser Asn Leu Leu Leu Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln |     |     |
| 755                                                             | 760 | 765 |
| Leu Asn Arg Ala Leu Thr Gly Ile Ala Val Glu Gln Asp Lys Asn Thr |     |     |
|                                                                 |     |     |
| 770                                                             | 775 | 780 |
| Gln Glu Val Phe Ala Gln Val Lys Gln Ile Tyr Lys Thr Pro Pro Ile |     |     |
| 785                                                             | 790 | 795 |
| Lys Asp Phe Gly Gly Phe Asn Phe Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Ser |     |     |
| 805                                                             | 810 | 815 |
| Lys Pro Ser Lys Arg Ser Phe Ile Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val |     |     |
| 820                                                             | 825 | 830 |
| Thr Leu Ala Asp Ala Gly Phe Ile Lys Gln Tyr Gly Asp Cys Leu Gly |     |     |
|                                                                 |     |     |
| 835                                                             | 840 | 845 |
| Asp Ile Ala Ala Arg Asp Leu Ile Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu |     |     |
| 850                                                             | 855 | 860 |
| Thr Val Leu Pro Pro Leu Leu Thr Asp Glu Met Ile Ala Gln Tyr Thr |     |     |
| 865                                                             | 870 | 875 |
| Ser Ala Leu Leu Ala Gly Thr Ile Thr Ser Gly Trp Thr Phe Gly Ala |     |     |
| 885                                                             | 890 | 895 |
| Gly Ala Ala Leu Gln Ile Pro Phe Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe |     |     |
|                                                                 |     |     |
| 900                                                             | 905 | 910 |
| Asn Gly Ile Gly Val Thr Gln Asn Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Leu |     |     |
| 915                                                             | 920 | 925 |
| Ile Ala Asn Gln Phe Asn Ser Ala Ile Gly Lys Ile Gln Asp Ser Leu |     |     |
| 930                                                             | 935 | 940 |
| Ser Ser Thr Ala Ser Ala Leu Gly Lys Leu Gln Asp Val Val Asn Gln |     |     |
| 945                                                             | 950 | 955 |
| Asn Ala Gln Ala Leu Asn Thr Leu Val Lys Gln Leu Ser Ser Asn Phe |     |     |
|                                                                 |     |     |
| 965                                                             | 970 | 975 |
| Gly Ala Ile Ser Ser Val Leu Asn Asp Ile Leu Ser Arg Leu Asp Lys |     |     |
| 980                                                             | 985 | 990 |

Val Glu Ala Glu Val Gln Ile Asp Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln  
 995 1000 1005  
 Ser Leu Gln Thr Tyr Val Thr Gln Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu  
 1010 1015 1020  
 Ile Arg Ala Ser Ala Asn Leu Ala Ala Thr Lys Met Ser Glu Cys  
 1025 1030 1035  
 Val Leu Gly Gln Ser Lys Arg Val Asp Phe Cys Gly Lys Gly Tyr  
 1040 1045 1050  
 His Leu Met Ser Phe Pro Gln Ser Ala Pro His Gly Val Val Phe  
 1055 1060 1065  
 Leu His Val Thr Tyr Val Pro Ala Gln Glu Lys Asn Phe Thr Thr  
 1070 1075 1080  
 Ala Pro Ala Ile Cys His Asp Gly Lys Ala His Phe Pro Arg Glu  
 1085 1090 1095  
 Gly Val Phe Val Ser Asn Gly Thr His Trp Phe Val Thr Gln Arg  
 1100 1105 1110  
 Asn Phe Tyr Glu Pro Gln Ile Ile Thr Thr Asp Asn Thr Phe Val  
 1115 1120 1125  
 Ser Gly Asn Cys Asp Val Val Ile Gly Ile Val Asn Asn Thr Val  
 1130 1135 1140  
 Tyr Asp Pro Leu Gln Pro Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu Glu Leu  
 1145 1150 1155  
 Asp Lys Tyr Phe Lys Asn His Thr Ser Pro Asp Val Asp Leu Gly  
 1160 1165 1170  
 Asp Ile Ser Gly Ile Asn Ala Ser Val Val Asn Ile Gln Lys Glu  
 1175 1180 1185  
 Ile Asp Arg Leu Asn Glu Val Ala Lys Asn Leu Asn Glu Ser Leu  
 1190 1195 1200  
 Ile Asp Leu Gln Glu Leu Gly Lys Tyr Glu Gln Tyr Ile Lys Trp  
 1205 1210 1215  
 Pro Trp Tyr Ile Trp Leu Gly Phe Ile Ala Gly Leu Ile Ala Ile

|                                                             |      |      |
|-------------------------------------------------------------|------|------|
| 1220                                                        | 1225 | 1230 |
| Val Met Val Thr Ile Met Leu Cys Cys Met Thr Ser Cys Cys Ser |      |      |
| 1235                                                        | 1240 | 1245 |
| Cys Leu Lys Gly Cys Cys Ser Cys Gly Ser Cys Cys Lys Phe Asp |      |      |
| 1250                                                        | 1255 | 1260 |
| Glu Asp Asp Ser Glu Pro Val Leu Lys Gly Val Lys Leu His Tyr |      |      |

|      |      |      |
|------|------|------|
| 1265 | 1270 | 1275 |
| Thr  |      |      |

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 3837

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polynucleotide"

&lt;400&gt; 2

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| atggattgga ctggattct ctttcgtt gctgcagcca cacgcgttca tagcagccag    | 60  |
| tgtgtgaacc tgaccaccag aacacagctg ctcctgcct acaccaacag cttcaccaga  | 120 |
| ggagtctact acccagacaa agtcttcaga agctctgtgc tgcacagcac ccaggacctg | 180 |
| ttcctgcctt tcttcagcaa cgtgacctgg ttccacgcct tccacgtgtc tggcaccaac | 240 |

|                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------|-----|
| ggcaccaaga gatttgacaa ccctgttctt ctttcaatg atggcggtgtat ctttgcagc    | 300 |
| acagagaaga gcaacatcat ccgaggctgg atcttggca ccaccctgga cagcaaaacc     | 360 |
| cagagcctgc tgatcgtgaa caacgccacc aacgtggtca tcaagggtgtg tgagttccag   | 420 |
| ttctgcataatg accctttctt gggcggtgtac taccacaaga acaacaagtc ctggatggag | 480 |
| tctgagttca gagtctacag ctctgcacaa aactgcacat ttgaatatgt gtcccagcct    | 540 |
| ttcctgtatgg acctggaggg caagcaggcc aactttaaga acctgagaga atttgtgttc   | 600 |
| aagaacatcg atggctactt caagatctac agcaagcaca cacccatcaa cctggtgaga    | 660 |

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| gacctgcctc agggcttctc tgccctggag cctctggtag acctgcccatt cgccatcaac | 720 |
| atcaccagat tccagaccct gctggccctg cacagaagct acctgacccc aggagacagc  | 780 |
| agcagcggct ggacagctgg agctgctgcc tactacgtgg gctacctgca gcccaggacc  | 840 |
| ttcctgtatgg agtacaacgaa aatggcacc atcacagatg ctgttgactg tgccctggac | 900 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| cctcttagcg agaccaagtg caccctgaag tcctcacag tggagaaagg catctaccag   | 960  |
| accagcaact tccgagtgc gccaacagag agcatgtga gattccaaa catcaccaac     | 1020 |
| ctgtgccctt ttggagaagt cttcaatgcc accagattg ctctgtgtga cgccgtggAAC  | 1080 |
| <br>                                                               |      |
| agaaaaagaa tcagcaactg tgtggctgac tactctgtgc tgtacaactc tgcccttc    | 1140 |
| tccacccctca agtgctatgg agtcttcca accaagctga atgacctgtc cttcaccaac  | 1200 |
| gtgtatgctg acagcttgt gatcagagga gatgaagtgc ggcagattgc tcctggccAG   | 1260 |
| acaggcaaga ttgctgacta caactacaag ctgcctgatg acttcacagg ctgtgtcatc  | 1320 |
| gcctggAACa gcaacaacct ggacagcaag gtggcggca actacaacta cctgtacaga   | 1380 |
| ctttcagga agagcaacct gaagccTTT gaaagagaca tctccacaga gatctaccag    | 1440 |
| gctggcagca caccctgcaa tgggtggAA ggcttcaact gctacttccc tctgcagAGC   | 1500 |
| <br>                                                               |      |
| tacggctcc agccaacaaa tggcgtggc taccagcctt acagagtgg ggtgctgtcc     | 1560 |
| ttttagctgc tgcaCGCCCC tgccacagtg tgtggccca agaagagcac caaccctggTG  | 1620 |
| aagaacaaat gtgtgaactt caatttcaat ggcctgacag gcacaggagt gctgacagAG  | 1680 |
| agcaacaaga agtttcttcc tttccagcag tttggaaAG acattgtGA caccacAGAT    | 1740 |
| gctgtgagAG atcctcAGAC cctggAGATC ctggatATCA caccctgCTC ctggagGA    | 1800 |
| gtttctgtca tcacacctgg caccaatacc agcaaccaag tggctgtgt GAACAGAT     | 1860 |
| gtgaatttgcA cagaagtGCC tggccatc cacgctgacc agctgacacc cacctggAGA   | 1920 |
| <br>                                                               |      |
| gtgtacagca caggcagcaa tttttccAG acaagagctg gctgcctgat tggagcagAG   | 1980 |
| cacgtgaaca acagcttatGA atgtgacATC cctattggAG ctggcatCTG tgccAGCTAC | 2040 |
| cagacccAAA ccaacAGCCC aagaagAGCC agatctgtGG ccagccAGAG catcatGCC   | 2100 |
| tacaccatGA gcctggAGC tgAGAACTCT gtggcttACA gcaacaACAG catGCCATC    | 2160 |
| cccaccaACT tcaccatCTC tgtgaccACA gagatCCTGC ctgtgtCCAT gaccaAGACA  | 2220 |
| tctgtggACT gcaccatGTA catctgtGA gacAGCACAG aatgcAGCAA cctgtGTG     | 2280 |
| cagtaCGGCT cttctgCAC ccAGCTGAAC agAGCCtGA CAGGCACTGC tggagcAG      | 2340 |
| <br>                                                               |      |
| gacaagaaca cacagGAAGT gtttggccAG gtgaAGCAGA tctacAAAC accacCCATC   | 2400 |
| aaggactttg gaggcttcaa ttctccAA atcctgcctG accccAGCAA gccttccaAG    | 2460 |
| agaagcttca ttGAAGACCT gctgttcaAC aaagtGACCC tggctgtatGC tggcttcatC | 2520 |
| aagcagtatG gagactGCCT gggAGACATT gctGCCAGAG acctgtatGC tgCCAGAAG   | 2580 |
| ttaatggcc tgaCTgtGCT gcctcctGCT ctgacAGATG aaatgtatGC CGAGTACACA   | 2640 |
| tctGCCtGC tggctggcAC catcaccAGt ggctggACAT ttggagCTGG agctGCCtG    | 2700 |

cagatccctt ttgccatgca gatggcctac agattnaatg gcatcgccgt gaccagaac 2760

gtgcgtacg agaaccagaa gctgatcgcc aaccagtta actctgccat cgccaagatc  
caggacagcc tgagcagcac agcctctgcc ctggcaagc tgcaggatgt ggtgaaccaa  
aacggccagg ccctgaacac cctggtaag cagctgagca gcaactttgg agccatctcc  
tctgtgtga atgacatct gagccggctg gacaagggtgg aagcagaagt gcagatcgac  
agactcatca caggccgcct gcagagcctg cagacatcg tgaccagca gctgatcaga  
gctgctgaga tccgggcctc tgccaacctg gctgccacca agatgtcaga atgtgtgctg  
ggccagagca aaagagtgga cttctgtggc aaaggctacc acctgatgtc cttccctcag 3180

tctgctctc acggcgtggt gttcctgcac gtgacctacg tgcctgccca ggagaagaac  
ttcaccacag ctccctgccat ctgccacatggcaaggccc acttcccaag agaaggtgtc  
tttggttcca atggcaccca ctggttcgat acccagagaa acttctacga gcctcagatc  
atcaccacag acaacacatt tgtgtctggc aactgtgtatg tggcatcgat catcgtaac  
aacacagttt atgaccctct gcagcctgag ctggacagct tcaaagaaga gctggacaag  
tacttcaaga accacacatc tccagatgtg gacctggag acatctctgg catcaatgcc  
tctgtgtga acatccagaa ggaaatttgcaggctgaacg aagtggccaa gaacctgaac 3600

gaaaggctca tcgacctgca ggagctggc aagtacgagc agtacatcaa gtggccttgg  
tacatctggc tgggttcat cgctggccctc atcgccatcg tggatgtgac catcatgtg  
tgctgcatga ccagctgctg ctcttgcctg aagggtgtgc gcagctgtgg cagctgtgc  
aagtttgtatg aagatgactc tgagcctgtg ctgaagggcg tgaagctgca ctacaca 3837

<210> 3

<211> 6797

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polynucleotide"

<400> 3

gctgcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga cttagttatta 60

atagaatca attacgggt cattagttca tagccatat atggagttcc gcgttacata  
acttacggta aatggccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat  
aatgacgtat gttccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga 240

gtattttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagt tatcatatgc caagtacgcc 300  
ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgccctggcat tatgcccagt acatgaccct 360  
atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtatttagtc atcgcttata ccatggtgat 420  
gcggttttgg cagtcacatca atggcgtgg atagcggtt gactcacggg gatttccaag 480  
  
tctccacccc attgacgtca atggaggtt gtttggcac caaatcaac gggactttcc 540  
aaaatgttgt aacaactccg cccattgac gcaaattggc ggtaggcgtg tacgggtggga 600  
ggtctata agcagagctc tctggctaac tagagaaccc actgcttact ggcttatcga 660  
aattaatacg actcactata gggagaccca agctggctag cgtttaact taagcttgg 720  
accgagctcg gatccgccac catggattgg acttggattc tcttctcgt tgctgcagcc 780  
acacgcgttc atagcagcca gtgtgtgaac ctgaccacca gaacacagct gcctcctgcc 840  
tacaccaaca gcttcaccag aggagtctac taccagaca aagtcttcag aagctctgtg 900  
  
  
ctgcacagca cccaggacct gttccctgcct ttcttcagca acgtgacctg gttccacgcc 960  
atccacgtgt ctggcaccaa cggcaccaag agatttgaca accctgttct tccttcaat 1020  
gatggcgtgt actttgccag cacagagaag agcaacatca tccgaggctg gatcttggc 1080  
accaccctgg acagcaaaac ccagagccctg ctgatcgtga acaacgccc acacgtggtc 1140  
atcaagggtgt gtgagttcca gttctgcaat gacccttcc tggcggtgtt ctaccacaag 1200  
aacaacaagt cctggatgga gtctgagttc agagtctaca gctctgccaa caactgcaca 1260  
tttgaatatg tgtccctagcc ttccctgtatg gacctggagg gcaaggcaggg caactttaag 1320  
  
  
aacctgagag aattttgttt caagaacatc gatggctact tcaagatcta cagcaagcac 1380  
acacccatca acctggtgag agacctgcct cagggcttct ctgccttgga gcctctggtg 1440  
gacctgcccc tcggcatcaa catcaccaga ttccagaccc tgctggccct gcacagaagc 1500  
tacctgaccc caggagacag cagcagccgc tggacagctg gagctgctgc ctactacgtg 1560  
ggctacctgc agcccgaggac ctccctgctg aagtacaacg aaaatggcac catcacagat 1620  
gtgtttgact gtcccttgaa ccctcttagc gagaccaagt gcaccctgaa gtccttcaca 1680  
gtggagaaag gcatctacca gaccagcaac ttcccgagtgc agccaacaga gagcatcgtg 1740  
  
  
agatttccaa acatcaccaa cctgtgcctt tttggagaag tttcaatgc caccagattt 1800  
gcttctgtgt acgcctggaa cagaaaaaga atcagcaact gtgtggctga ctactctgtg 1860  
ctgtacaact ctgcctcctt ctccacccatc aagtgtatgc gagtctctcc aaccaagctg 1920  
aatgacccgt gttcaccaa cgtgtatgc gacagcttgc tgatcagagg agatgaagt 1980  
cgccagatttgc ctccctggccaa gacaggcaag attgtgtact acaactacaa gtcctgtat 2040  
gacttcacag gctgtgtcat cgcctggaaac agcaacaacc tggacagcaa ggtggccggc 2100

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| aactacaact acctgtacag actttcagg aagagcaacc tgaagcctt taaaagagac    | 2160 |
| <br>                                                               |      |
| atctccacag agatctacca ggctggcagc acaccctgca atggtgtgga aggcttcaac  | 2220 |
| tgctacttcc ctctgcagag ctacggcttc cagccaacaa atggcggtgg ctaccagect  | 2280 |
| tacagagtgg tgggtgtgtc ctttgagctg ctgcacgccc ctgccacagt gtgtggcccc  | 2340 |
| aagaagagca ccaacctggt gaagaacaaa tgtgtgaact tcaattcaa tggcctgaca   | 2400 |
| ggcacaggag tgctgacaga gagcaacaag aagtttcttc cttccagca gtttggaga    | 2460 |
| gacattgctg acaccacaga tgctgtgaga gatcctcaga ccctggagat cctggatatc  | 2520 |
| acaccctgct ccttggagg agtttctgtc atcacacctg gcaccaatac cagcaaccaa   | 2580 |
| <br>                                                               |      |
| gtggctgtgc tgtaccaaga tgtgaattgc acagaagtgc ctgtggccat ccacgctgac  | 2640 |
| cagctgacac ccacctggag agtgtacagc acaggcagca atgtttcca gacaagagct   | 2700 |
| ggctgcctga ttggagcaga gcacgtgaac aacagctatg aatgtgacat ccctattgga  | 2760 |
| gctggcatct gtgccagcta ccagacccaa accaacagcc caagaagagc cagatctgt   | 2820 |
| gccagccaga gcatcatcgc ctacaccatg agcctggag ctgagaactc tgtggctac    | 2880 |
| agcaacaaca gcatgccat ccccaccaac ttcaccatct ctgtgaccac agagatctg    | 2940 |
| cctgtgtcca tgaccaagac atctgtggac tgccatgt acatctgtgg agacagcaca    | 3000 |
| <br>                                                               |      |
| gaatgcagca acctgctgct gcagtagcggc tcctctgca cccagctgaa cagagccctg  | 3060 |
| acaggcatcg ctgtggagca ggacaagaac acacaggaag ttttgcctt ggtgaagcag   | 3120 |
| atctacaaaa caccacccat caaggacttt ggaggcttca atttctccca aatctgcct   | 3180 |
| gaccccgca agccttccaa gagaagcttc attgaagacc tgctgtcaa caaagtgacc    | 3240 |
| ctggctgatg ctggcttcat caagcagtat ggagactgcc tggagacat tgctgccaga   | 3300 |
| gacctgatct gtgcccgaa gttaatggc ctgactgtgc tgccctctct gctgacagat    | 3360 |
| gaaatgatcg cccagtacac atctgccctg ctggctggca ccatcaccag tggctggaca  | 3420 |
| <br>                                                               |      |
| tttgagctg gagctgccct gcagatccct tttgccatgc agatggccta cagatttaat   | 3480 |
| ggcatcgccg tgacccagaa cgtgctgtac gagaaccaga agctgatcgc caaccaggatc | 3540 |
| aactctgcca tcggcaagat ccaggacagc ctgagcagca cagcctctgc cctggcaag   | 3600 |
| ctgcaggatg tggtaacca aaacgcccag gccctgaaca ccctggtaa gcagctgagc    | 3660 |
| agcaactttg gagccatctc ctctgtgtc aatgacatcc tgagccggct ggacaagggt   | 3720 |
| gaagcagaag tgcatcg aagactcatc acaggccgcc tgcatcgatc gcagacatc      | 3780 |
| gtgacccagc agctgatcag agctgctgag atccggccct ctgccaacct ggctgccacc  | 3840 |

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| aagatgtcag aatgtgtgct gggccagagc aaaagagtgg acttctgtgg caaaggctac   | 3900 |
| cacctgatgt cttccctca gtctgctct cacggcgtag tttccctgca cgtgacccat     | 3960 |
| gtgcctgccc aggagaagaa cttaccaca gtcctgcca tctgccacga tggcaaggcc     | 4020 |
| cacttccaa gagaagggtt ctgtgtcc aatggcaccc actgggtcgt gaccagaga       | 4080 |
| aacttctacg agcctcagat cataccaca gacaacacat ttgtgtctgg caactgtgat    | 4140 |
| gtggtcattcg gcatcgtgaa caacacagt tatgaccctc tgccagctga gctggacagc   | 4200 |
| ttcaaagaag agctggacaa gtacttcaag aaccacacat ctccagatgt ggacctggaa   | 4260 |
| <br>                                                                |      |
| gacatctctg gcatcaatgc ctctgtggtg aacatccaga agaaattga caggctgaac    | 4320 |
| gaagtggcca agaacctgaa cgaaagccctc atcgacctgc aggagctggg caagtacgag  | 4380 |
| cagtacatca agtggccttg gtacatctgg ctgggcttca tcgctggcct catgccatc    | 4440 |
| gtgtatgtga ccatcatgct gtgctgcattt accagctgtt getcttgctt gaagggtgc   | 4500 |
| tgcagctgtg gcagctgctg caagttttagt gaagatgact ctgagcctgt gctgaaggcc  | 4560 |
| gtgaagctgc actacacatg ataactcgag tctagaggcc ccgttaaac ccgtgatca     | 4620 |
| gcctcgactg tgcccttctag ttgccagcca tctgttgtt gcccctcccc cgtgccttcc   | 4680 |
| <br>                                                                |      |
| ttgaccctgg aaggtgccac tcccactgtc ctttcttaat aaaatgagga aattgcattcg  | 4740 |
| cattgtctga gttagtgtca ttcttattctg ggggggtgggg tggggcagga cagcaagggg | 4800 |
| gaggattttt aagacaatag caggcatgtt gggatgcgg tggctctat ggcttctact     | 4860 |
| ggccgggtttt atggacagca agcgaaccgg aattgcacgc tggggccccc tctggtaagg  | 4920 |
| ttgggaagcc ctgcaaagta aactggatgg ctttcttgc gccaaggatc tggatggcga    | 4980 |
| ggggatcaag ctctgtatcaa gagacaggat gaggatgtt tcgcatgatt gaacaagatg   | 5040 |
| gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct attcgcttat gactggcac    | 5100 |
| <br>                                                                |      |
| aacagacaat cggctgctct gatgccgccc tggccggct gtccggcag gggcccccgg     | 5160 |
| ttcttttgtt caagaccgac ctgtccggtg ccctgaatga actgcaagac gaggcagcgc   | 5220 |
| ggctatcgatgt gctggccacg acggcggttc ctgcgcgc gttgtcactg              | 5280 |
| aagcgggaag ggactggctg ctattggcg aagtgcggg gcaggatctc ctgtcatctc     | 5340 |
| accttgcctcc tggcgagaaa gtatccatca tggctgtatgc aatgcggcgg ctgcatacgc | 5400 |
| ttgatccggc tacctgccc ttgcaccacc aagcggaaaca tcgcatcgag cgagcacgtt   | 5460 |
| ctcgatgga agccggctt gtcgatcagg atgatctgga cgaagagcat cagggctcg      | 5520 |
| <br>                                                                |      |
| cgccagccga actgttgcggc aggctcaagg cgagcatgcc cgacggcgag gatctcgatgt | 5580 |
| tgaccatgg cgtgcctgc ttgcgaaata tcatggtgaa aaatggccgc ttttctggat     | 5640 |
| tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcg accgctatca ggacatagcg ttggctaccc    | 5700 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| gtgatattgc tgaagagctt ggccggcgaat gggctgaccg cttcctcgta cttaacgta  | 5760 |
| tgcgcgtcc cgattcgcag cgcatcgct tctatgcct tcttgacgag ttcttctgaa     | 5820 |
| ttattaacgc ttacaatttc ctgatgcggt atttctcct tacgcatctg tgccgtat     | 5880 |
| cacaccgcat cagggtggcac ttttcgggaa aatgtgcgca gaaccctat ttgttiaattt | 5940 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| ttctaaatac attcaaataat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa | 6000 |
| taatagcagc tgctaaaact tcattttaa tttaaaagga tcttaggtgaa gatcctttt   | 6060 |
| gataatctca tgacccaaat cccttaacgt gagtttcgt tccactgagc gtcagacccc   | 6120 |
| gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ccttttttc tgccgtaat ctgctgcttg    | 6180 |
| caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gttttttgc cggatcaaga gctaccaact   | 6240 |
| cttttccga aggttaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt tcttctagtg  | 6300 |
| tagccgtat taggccacca cttcaagaac tctgtacac cgcctacata cctcgctcg     | 6360 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| ctaattcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtttac cgggttggac  | 6420 |
| tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca  | 6480 |
| cagccccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga | 6540 |
| gaaagcgcca cgcttccgaa agggagaaag gcggacaggt atccggtaaag cggcagggtc | 6600 |
| ggaacaggag agccgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtct  | 6660 |
| gtcgggttcc gccacctctg acttgagcgt cgattttgt gatgctcgta agggggcgg    | 6720 |
| agccatggaa aaaacgcgcag caacgcggcc tttttacggt tcctggcct ttgtcgcc    | 6780 |

|                    |      |
|--------------------|------|
| tttgctcaca ttttctt | 6797 |
|--------------------|------|

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 1279

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

&lt;400&gt; 4

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val

1 5 10 15

His Ser Ser Gln Cys Val Asn Leu Thr Thr Arg Thr Gln Leu Pro Pro

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Phe Ala Ser Thr Glu Lys Ser Asn Ile Ile Arg Gly Trp Ile Phe

100 105 110

Gly Thr Thr Leu Asp Ser Lys Thr Gln Ser Leu Leu Ile Val Asn Asn

115 120 125

Ala Thr Asn Val Val Ile Lys Val Cys Glu Phe Gln Phe Cys Asn Asp

130 135 140

Pro Phe Leu Gly Val Tyr Tyr His Lys Asn Asn Lys Ser Trp Met Glu

145 150 155 160

Ser Glu Phe Arg Val Tyr Ser Ser Ala Asn Asn Cys Thr Phe Glu Tyr

165 170 175

Val Ser Gln Pro Phe Leu Met Asp Leu Glu Gly Lys Gln Gly Asn Phe

180 185 190

Lys Asn Leu Arg Glu Phe Val Phe Lys Asn Ile Asp Gly Tyr Phe Lys

195 200 205

Ile Tyr Ser Lys His Thr Pro Ile Asn Leu Val Arg Asp Leu Pro Gln

210 215 220

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

225 230 235 240

Ile Thr Arg Phe Gln Thr Leu Leu Ala Leu His Arg Ser Tyr Leu Thr

245 250 255

Pro Gly Asp Ser Ser Ser Gly Trp Thr Ala Gly Ala Ala Tyr Tyr

260 265 270

Val Gly Tyr Leu Gln Pro Arg Thr Phe Leu Leu Lys Tyr Asn Glu Asn

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 275 | 280 | 285 |
|-----|-----|-----|

Gly Thr Ile Thr Val Ala Val Ala Cys Ala Leu Asp Pro Leu Ser Glu

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 290 | 295 | 300 |
|-----|-----|-----|

Thr Lys Cys Thr Leu Lys Ser Phe Thr Val Glu Lys Gly Ile Tyr Gln

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| 305 | 310 | 315 | 320 |
|-----|-----|-----|-----|

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

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 325 | 330 | 335 |
|-----|-----|-----|

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

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 340 | 345 | 350 |
|-----|-----|-----|

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

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 355 | 360 | 365 |
|-----|-----|-----|

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

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 370 | 375 | 380 |
|-----|-----|-----|

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

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| 385 | 390 | 395 | 400 |
|-----|-----|-----|-----|

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

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 405 | 410 | 415 |
|-----|-----|-----|

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

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 420 | 425 | 430 |
|-----|-----|-----|

Asp Asp Phe Thr Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 435 | 440 | 445 |
|-----|-----|-----|

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

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 450 | 455 | 460 |
|-----|-----|-----|

Ser Asn Leu Lys Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| 465 | 470 | 475 | 480 |
|-----|-----|-----|-----|

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

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 485 | 490 | 495 |
|-----|-----|-----|

Pro Leu Gln Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 500 | 505 | 510 |
|-----|-----|-----|

Pro Tyr Arg Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 515 | 520 | 525 |
|-----|-----|-----|

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

530 535 540

Val Asn Phe Asn Phe Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Glu

545 550 555 560

Ser Asn Lys Lys Phe Leu Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Ile Ala

565 570 575

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

580 585 590

Ile Thr Pro Cys Ser Phe Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Ala

595 600 605

Asn Thr Ser Asn Gln Val Thr Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr

610 615 620

Glu Val Pro Val Ala Ile His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Thr Trp Arg

625 630 635 640

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

645 650 655

Ile Gly Ala Glu His Val Asn Asn Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile

660 665 670

Gly Ala Gly Ile Cys Ala Ser Tyr Gln Thr Gln Thr Asn Ser Pro Arg

675 680 685

Arg Ala Arg Ser Thr Ala Ser Gln Ser Ile Ile Ala Tyr Thr Met Ser

690 695 700

Leu Gly Ala Glu Asn Ser Val Ala Tyr Ser Asn Asn Ser Ile Val Ile

705 710 715 720

Pro Thr Asn Phe Thr Ile Ser Val Thr Thr Glu Ile Leu Pro Val Ser

725 730 735

Met Thr Lys Thr Ser Val Asp Cys Thr Met Tyr Ile Cys Ser Asp Ser

740 745 750

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

755 760 765

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

|                                                                 |      |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|------|
| 770                                                             | 775  | 780  |
| Gln Glu Val Phe Ala Gln Val Lys Gln Ile Tyr Lys Thr Pro Pro Ile |      |      |
| 785                                                             | 790  | 795  |
| Lys Asp Phe Gly Gly Phe Asn Phe Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Ser |      |      |
| 805                                                             | 810  | 815  |
| Lys Pro Ser Lys Arg Ser Phe Ile Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val |      |      |
| 820                                                             | 825  | 830  |
| Thr Leu Ala Asp Ala Gly Phe Ile Lys Gln Tyr Gly Asp Cys Leu Gly |      |      |
| 835                                                             | 840  | 845  |
| Asp Ile Ala Ala Arg Asp Leu Ile Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu |      |      |
| 850                                                             | 855  | 860  |
| Thr Val Leu Pro Pro Leu Leu Thr Asp Glu Met Ile Ala Gln Tyr Thr |      |      |
| 865                                                             | 870  | 875  |
| Ser Ala Leu Leu Ala Gly Thr Ile Thr Ser Gly Trp Thr Phe Gly Ala |      |      |
| 885                                                             | 890  | 895  |
| Gly Ala Ala Leu Gln Ile Pro Phe Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe |      |      |
| 900                                                             | 905  | 910  |
| Asn Gly Ile Arg Val Thr Gln Asn Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Leu |      |      |
| 915                                                             | 920  | 925  |
| Ile Ala Asn Gln Phe Asn Ser Ala Ile Gly Lys Ile Gln Asp Ser Leu |      |      |
| 930                                                             | 935  | 940  |
| Ser Ser Thr Ala Ser Ala Leu Gly Lys Leu Gln Asp Val Val Asn Gln |      |      |
| 945                                                             | 950  | 955  |
| Asn Ala Gln Ala Leu Asn Thr Leu Val Lys Gln Leu Ser Ser Thr Phe |      |      |
| 965                                                             | 970  | 975  |
| Ser Thr Ile Ser Ser Val Leu Asn Asp Ile Leu Ser Arg Leu Asp Lys |      |      |
| 980                                                             | 985  | 990  |
| Val Glu Ala Glu Val Gln Ile Asp Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln |      |      |
| 995                                                             | 1000 | 1005 |
| Ser Leu Gln Thr Tyr Val Thr Gln Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu     |      |      |
| 1010                                                            | 1015 | 1020 |

Ile Arg Ala Ser Ala Asn Leu Lys Ala Thr Lys Met Ser Glu Cys  
 1025 1030 1035  
 Val Leu Gly Gln Ser Lys Arg Val Asp Phe Cys Gly Lys Gly Tyr  
 1040 1045 1050

His Leu Met Ser Phe Pro Gln Ser Ala Pro His Gly Val Val Phe  
 1055 1060 1065  
 Leu His Val Thr Tyr Val Pro Ala Gln Glu Lys Asn Phe Thr Thr  
 1070 1075 1080  
 Ala Pro Ala Thr Cys His Asp Gly Lys Ala His Phe Pro Arg Glu  
 1085 1090 1095  
 Gly Val Phe Val Ser Asn Gly Thr His Trp Phe Val Thr Gln Arg  
 1100 1105 1110

Asn Phe Asp Glu Pro Gln Ile Ile Thr Thr Asp Asn Thr Phe Val  
 1115 1120 1125  
 Ser Gly Asn Cys Asp Val Val Ile Gly Ile Val Asn Asn Thr Val  
 1130 1135 1140  
 Tyr Asp Pro Leu Gln Pro Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu Glu Leu  
 1145 1150 1155  
 Asp Lys Tyr Phe Lys Asn His Thr Ser Pro Asp Val Asp Leu Gly  
 1160 1165 1170

Asp Ile Ser Gly Ile Asn Ala Ser Val Val Asn Ile Gln Lys Glu  
 1175 1180 1185  
 Ile Asp Arg Leu Asn Glu Val Ala Lys Asn Leu Asn Glu Ser Leu  
 1190 1195 1200  
 Ile Asp Leu Gln Glu Leu Gly Lys Tyr Glu Gln Tyr Ile Lys Trp  
 1205 1210 1215  
 Pro Trp Tyr Ile Trp Leu Gly Phe Ile Ala Gly Leu Ile Ala Ile  
 1220 1225 1230

Val Met Val Thr Ile Met Leu Cys Cys Met Thr Ser Cys Cys Ser  
 1235 1240 1245  
 Cys Leu Lys Gly Cys Cys Ser Cys Gly Ser Cys Cys Lys Phe Asp

|                                                             |      |      |
|-------------------------------------------------------------|------|------|
| 1250                                                        | 1255 | 1260 |
| Glu Asp Asp Ser Glu Pro Val Leu Lys Gly Val Lys Leu His Tyr |      |      |
| 1265                                                        | 1270 | 1275 |
| Thr                                                         |      |      |

<210> 5  
<211> 3837  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| <400> 5                                                            | 60   |
| atggattgga cctggattct ttttctcggt gcagctgcta cacgcgttca tagcagccag  | 120  |
| tgtgtgaacc tgaccaccag aacacagctg cctcctgcct acaccaacag cttcaccaga  | 180  |
| ggagtctact acccagacaa ggtgttcaga agctctgtgc tgcacagcac ccaggacctc  | 240  |
| ttcctgcctt tctttagcaa cgtgacactgg ttccacgcca tccacgtgtc tggcaccaac | 300  |
| ggcaccaaga gatttgacaa ccctgtgctg ccttcaatg atggtgtgtta ctttgcacgc  | 360  |
| acagagaaga gcaacatcat ccgaggctgg atcttggca ccaccctgga cagcaaaaaca  | 420  |
| cagagcctgc tgatcgtgaa taatgccacc aacgtggtca tcaagggtgt tgagttccag  |      |
| <br>                                                               |      |
| ttctgcaatg acccttcctt gggcgtgtac taccacaaga acaacaagtc ctggatggag  | 480  |
| tctgagttcc gagtgtaacag ctctgccaac aactgcacat ttgaatatgt gtcccagct  | 540  |
| ttcctgtatgg acctggaggg caagcaggc aattcaaga acctgagaga atttgttgc    | 600  |
| aagaacatcg atggctactt caagatctac agcaagcaca caccatcaa cctgggtgaga  | 660  |
| gatcttcctc agggcttctc tgccctggag cctctgggtt acctgccccat cgccatcaac | 720  |
| atcacccgct ttccagaccct gctggccctg cacagaagct acctgacccc aggagacagc | 780  |
| agcagcggct ggacagctgg agctgctgcc tactacgtgg gctacactgca gccaagaacc | 840  |
| <br>                                                               |      |
| ttcctgtga agtacaacga aaatggcacc atcaactgtgg ctgtggcctg tgccctggac  | 900  |
| cctctttctg agaccaagtg caccctgaag tccttcacag tggagaaagg catctaccag  | 960  |
| accagcaact tcagagttca gccaacagag agcatcgtga gatttccaaa catcaccaac  | 1020 |
| ctgtgtcctt ttggagaagt cttcaatgcc accagatttgc tttctgtgtt cgcctggAAC | 1080 |
| agaaaaagaa tcagcaactg tgtggctgac tactctgtgc tgtacaactc tgcccttc    | 1140 |

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| tccacattca agtgctacgg tgggtctctt accaagctga atgaccgtgt cttcaccaac   | 1200 |
| gtgtatgctg acagcttgt catcagagga gatgaagtgc ggcagatcgc ccctggccag    | 1260 |
| <br>                                                                |      |
| acaggcaaga ttgctgacta caactacaag ctgcctgatg acttcacagg ctgtgtcatc   | 1320 |
| gcctggaaca gcaacaacct ggacagcaag gtggcggca actacaacta cctgtacaga    | 1380 |
| ctttcagga agagcaacct gaagccttt gaaagagaca tctccacaga gatctaccag     | 1440 |
| gctggcagca caccctgcaa tggagtggaa ggctcaact gctacttccc tctgcagac     | 1500 |
| tacggcttcc agcccaccaa tggcgtggc taccagecctt acagagtgg ggtgctgtcc    | 1560 |
| ttttagctgc tgacgcccc tgccacagtg tgtggccca agaagagcac caacctggtg     | 1620 |
| aagaacaataat gtgtgaactt caatttaaat ggcctgacag gcacaggagt gctgacagag | 1680 |
| <br>                                                                |      |
| agcaacaaga agttcctgcc tttccagcag tttggaaagag acattgtga caccacagat   | 1740 |
| gctgtgagag atcctcagac cctggagatc ctggacatca caccctgctc ctttggagga   | 1800 |
| gtttctgtca tcacacctgg agccaacacc agcaaccaag tgacagtgt gtaccaagat    | 1860 |
| gtgaactgca cagaagttcc tgtggccatc cacgtgacc agctgacccc aacctggaga    | 1920 |
| gtctacagca caggcagcaa cgtgttaaa acaagagctg gtcgcctgat tggagcagag    | 1980 |
| cacgtgaaca acagctatga atgtgacatc cctattggag ctggcatctg tgccagctac   | 2040 |
| cagacccaaa ccaacagccc aagaagagcc aggagcacag ccagccagag catcatcgcc   | 2100 |
| <br>                                                                |      |
| tacaccatga gcctgggagc agagaactct gtggcttaca gcaacaacag catgtcatc    | 2160 |
| cccaccaact tcaccatctc tgtgaccaca gagatctgc ctgtgtccat gaccaagaca    | 2220 |
| tctgtggact gcaccatgta catctgcagt gacagcacag aatgcagcaa ccctctgtg    | 2280 |
| cagtagggct cttctgcac ccagctgaac agagccctga caggcatcgc tgtggagcag    | 2340 |
| gacaagaaca cacaggaagt gtttgcctag gtgaagcaga tctacaaaac accacccatc   | 2400 |
| aaggactttg gaggcttcaa cttctccctg atcctgcctg accccagcaa gcccagcaag   | 2460 |
| agaagcttca ttgaagacact gctgttcaac aaagtgcaccc tggctgatgc tggcttcatc | 2520 |
| <br>                                                                |      |
| aaacaatatg gagactgcct gggagacatt gctgcccagag acctgatctg tgcccagaag  | 2580 |
| ttaatggcc tgactgtgct gcctcctctg ctgacagatg aaatgatcgc ccagtagaca    | 2640 |
| tctgcccctgc tggctggcac catcacatct ggctggacat ttggagctgg agctgcccctg | 2700 |
| cagatccctt ttgccatgca gatggcctac agattnaatg gcatcagagt gacccagaac   | 2760 |
| gtgctgtatg aaaaccagaa gctgatgc aaccaggatca actctgcctt cggcaagatc    | 2820 |
| caggacagcc tgagcagcac agcctctgcc ctggcaagc tgcaggatgt ggtgaaccaa    | 2880 |

|                                                                               |      |
|-------------------------------------------------------------------------------|------|
| aatgccagg ccctgaacac cctggtaag cagctgagca gcaccttctc caccatctcc               | 2940 |
| <br>                                                                          |      |
| agcgtgctga atgacatcct gagccggctg gacaagggtgg aagctgaggt gcagatcgac            | 3000 |
| agactcatca caggccggct gcagagcctg cagacctacg tgaccacca gctgatcaga              | 3060 |
| gctgctgaga tcagagcttc tgccaacctg aaggccacca agatgtcaga atgtgtgctg             | 3120 |
| ggccagagca agagagtgga cttctgtggc aaaggctacc acctgatgtc cttcccttag             | 3180 |
| tctgctcctc acggcgtggt gttcctgcac gtgacctacg tgcctgccc ggagaagaac              | 3240 |
| ttcaccacag ctccgtccac ctgccacatg ggcaaagccc acttccaag agaaggcgtc              | 3300 |
| tttgttcca atggcaccca ctggttcgtg acccagagaa actttgatga gcctcagatc              | 3360 |
| <br>                                                                          |      |
| atcaccacag acaacacatt tgtttctggc aactgtgatg tggcatcg catcgtaac                | 3420 |
| aacacagttt atgaccctct gcagcctgag ctggacagct tcaaagaaga gctggacaag             | 3480 |
| tacttcaaga accacacatc tccagatgtg gacctggag acatctctgg catcaatgcc              | 3540 |
| tctgtgtga acatccagaa gaaatttgcg aggctgaacg aagtggccaa gaacctgaac              | 3600 |
| gaaaggctca tcgacctgca ggagctggc aagtacgagc agtacatcaa gtggccttgg              | 3660 |
| tacatctggc tgggcttcat tgctggcctc atgcctatcg tcatggtgc catcatgtg               | 3720 |
| tgctgcatga ccagctgctg ctctgcctg aaggcgtgct gcagctgtgg cagctgctgc              | 3780 |
| <br>                                                                          |      |
| aagtttgcg aagatgactc tgagcctgtg ctgaagggcg tgaagctgca ctacaca                 | 3837 |
| <210> 6                                                                       |      |
| <211> 6797                                                                    |      |
| <212> DNA                                                                     |      |
| <213> Artificial Sequence                                                     |      |
| <220><221> source                                                             |      |
| <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic<br>polynucleotide" |      |
| <400> 6                                                                       |      |
| gctgcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctgttatta              | 60   |
| atagaatca attacgggtt cattagttca tagccatat atggagttcc gcgttacata               | 120  |
| acttacggta aatggccgc ctggctgacc gcccaacgac cccggccat tgacgtcaat               | 180  |
| aatgacgtat gttccatag taacgccaat agggacttgc cattgacgtc aatgggtgga              | 240  |
| <br>                                                                          |      |
| gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagt tatcatatgc caagtacgcc              | 300  |
| ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgccctggcat tatgcccagt acatgacctt            | 360  |
| atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgcttata ccatggtgat             | 420  |

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| gcgggtttgg cagtacatca atggcggtgg atagcggtt gactcacggg gattccaag     | 480  |
| tctccacccc attgacgtca atggaggtt gtttggcac caaatcaac gggactttcc      | 540  |
| aaaatgtcgt aacaactccg ccccattgac gcaaattggc gtaggcgtg tacggtgga     | 600  |
| ggtctatata agcagagctc tctggtaac tagagaaccc actgcttact ggcttatcga    | 660  |
|                                                                     |      |
| aattaatacg actcactata gggagaccca agctggctag cgttaaact taagcttgg     | 720  |
| accgagctcg gatccgccac catggattgg acctggattc ttttctcgt tgca          | 780  |
| acacgcgttc atagcagcca gtgtgtgaac ctgaccacca gaacacagct gcctccgtcc   | 840  |
| tacaccaaca gtttaccagg aggagtctac tacccagaca aggtgtttag aagctctgt    | 900  |
| ctgcacagca cccaggacct ttcttgct ttcttgcac acgtgacccgt gttccacgcc     | 960  |
| atccacgtgt ctggcaccaa cggcaccaag agatttgaca accctgtgt gccttcaat     | 1020 |
| gatggtgtgt actttgccag cacagagaag agcaacatca tccgaggctg gatcttggc    | 1080 |
|                                                                     |      |
| accaccctgg acagcaaaaac acagagcctg ctgatcgta ataatccac caacgtggc     | 1140 |
| atcaagggtgt gtgagttcca gttctgcaat gacccttcc tggcggtgtta ctaccacaag  | 1200 |
| aacaacaagt cctggatgga gtctgagttc cgagtgtaca gctctccaa caactgcaca    | 1260 |
| tttgaatatg tgtcccgacc ttcttgatg gacctggagg gcaagcagg caattcaag      | 1320 |
| aacctgagag aatttgggtt caagaacatc gatggctact tcaagatcta cagcaagcac   | 1380 |
| acacccatca acctgggttag agatcttctt caggccttct ctgccttgaa gcctctgg    | 1440 |
| gaccctggcca tcggcatcaa catcacccgc ttccagaccc tgctggccct gcacagaagc  | 1500 |
|                                                                     |      |
| tacctgaccc caggagacag cagcagcgcc tggacagctg gagctgctgc ctactacgt    | 1560 |
| ggctacactgc agccaagaac ctccctgctg aagtacaacg aaaatggcac catca       | 1620 |
| gctgtggccct gtgccttgaa ccctttctt gagaccaagt gcaccctgaa gtccttcaca   | 1680 |
| gtggagaaag gcatctacca gaccagcaac ttccaggttc agccaacaga gagcatcg     | 1740 |
| agatttccaa acatcacca cctgtgtctt tttggagaag tttcaatgc caccagatt      | 1800 |
| gcttctgtgt acgcctggaa cagaaaaaga atcagcaact gtgtggctga ctactctgt    | 1860 |
| ctgtacaact ctgccttcctt ctccacccctt aagtgttacg gtgtgtctcc taccaagctg | 1920 |
|                                                                     |      |
| aatgacactgt gtttccacca cgtgtatgct gacagcttg tcatcagagg agatgaagt    | 1980 |
| cggcagatcg cccctggcca gacaggcaag attgctgact acaactacaa gctgcctgat   | 2040 |
| gacttcacag gctgtgtcat cgcctggaa acgcaacaacc tggacagcaa ggtggcg      | 2100 |
| aactacaact acctgtacag acttttcagg aagagcaacc tgaagcctt taaaagagac    | 2160 |
| atctccacag agatctacca ggctggcagc acaccctgca atggagtgaa aggcttcaac   | 2220 |
| tgctacttcc ctctgcagag ctacggcttc cagccccacca atggcggtgg ctaccagcct  | 2280 |

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| tacagagtgg tggtgctgta cttttagctg ctgcacgccc ctgccacagt gtgtggcccc | 2340 |
| <br>                                                              |      |
| aagaagagca ccaacctggta gaagaacaaa tgtgtgaact tcaattcaa tggcctgaca | 2400 |
| ggcacaggag tgctgacaga gagcaacaag aagttctgc cttccagca gtttggaa     | 2460 |
| gacattgctg acaccacaga tgctgtgaga gatcctcaga ccctggagat cctggacatc | 2520 |
| acaccctgct ccttggagg agttctgtc atcacacatc gagccaacac cagcaaccaa   | 2580 |
| gtgacagtgc tgtaccaaga tgtgaactgc acagaagtgc ctgtggccat ccacgctgac | 2640 |
| cagctgaccc caacctggag agtctacagc acaggcagca acgtgtttaa aacaagagct | 2700 |
| ggctgcctga ttggagcaga gcacgtgaac aacagctatg aatgtgacat ccctattgga | 2760 |
| <br>                                                              |      |
| gctggcatct gtgccagcta ccagacccaa accaacagcc caagaagagc caggagcaca | 2820 |
| gccagccaga gcatcatcgcc tacaccatg agcctggag cagagaactc tgtggctac   | 2880 |
| agcaacaaca gcatcgtcat ccccaccaac ttcaccatct ctgtgaccac agagatcctg | 2940 |
| cctgtgtcca tgaccaagac atctgtggac tgcaccatgt acatctgcag tgacagcaca | 3000 |
| gaatgcagca accctctgct gcagtaacgc tcctctgca cccagctgaa cagagccctg  | 3060 |
| acaggcatcg ctgtggagca ggacaagaac acacaggaag ttttgccta ggtgaagcag  | 3120 |
| atctacaaaa caccacccat caaggactt ggaggctca acttctccca gatcctgcct   | 3180 |
| <br>                                                              |      |
| gaccccagca agccagcaa gagaagctt attgaagacc tgctgttcaa caaagtgacc   | 3240 |
| ctggctgatg ctggcttcat caaacaatgg gtagactgcc tggagacat tgctgccaga  | 3300 |
| gacctgatct gtgcccgaa gttaatggc ctgactgtc tgccctctct gctgacagat    | 3360 |
| gaaatgtcg cccagttacac atctgccctg ctggctggca ccatcacatc tggctggaca | 3420 |
| tttggagctg gagctccct gcagatccct ttgccatgc agatggctta cagatttaat   | 3480 |
| ggcatcagag tgacccagaa cgtgctgtat gaaaaccaga agctgatgc caaccagtcc  | 3540 |
| aactctgcca tcggcaagat ccaggacagc ctgagcagca cagcctctgc cctggcaag  | 3600 |
| <br>                                                              |      |
| ctgcaggatg tggtaacca aaatgcccag gccctgaaca ccctggtaa gcagctgagc   | 3660 |
| agcaccttcc cacccatctc cagcgtgtc aatgacatcc tgagccggct ggacaagggt  | 3720 |
| gaagctgagg tgtagatcga cagactcatc acaggccggc tgtagacccct gcagacatc | 3780 |
| gtgacccagc agctgatcg agctgctgag atcagacatc ctgccaaccc gaaggccacc  | 3840 |
| aagatgtcg aatgtgtct gggccagac aagagatgg acttctgtgg caaaggctac     | 3900 |
| cacctgtatgt cttccctca gtctgctct cacggcgtgg tttccctgca cgtgacatc   | 3960 |
| gtgcctgcctt aggagaagaa cttcaccaca gtcctgcca ctcggcacga tggcaagcc  | 4020 |

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| cacttccaa gagaaggcgt ctttgttcc aatggcaccc actggttcgt gaccagaga      | 4080 |
| aactttgatg agcctcagat catcaccaca gacaacacat ttgtttctgg caactgtgat   | 4140 |
| gtggtcatcg gcatcgtgaa caacacagt tatgaccctc tgcagcctga gctggacagc    | 4200 |
| ttcaagaag agctggacaa gtacttcaag aaccacacat ctccagatgt ggacctggaa    | 4260 |
| gacatctcg gcatcaatgc ctctgtggtg aacatccaga agaaattga caggctgaac     | 4320 |
| gaagtggcca agaacctgaa cgaaagcctc atcgaccctgc aggagctggg caagtacgag  | 4380 |
| cagtacatca agtggcccttg gtacatctgg ctggcattca ttgctggcct catgccatc   | 4440 |
| <br>                                                                |      |
| gtgatggta ccatcatgct gtgctgcatt accagctgct gctcttgcct gaaggcgtgc    | 4500 |
| tgccatgtg gcagctgctg caagtttgcgaa gaagatgact ctgagcctgt gctgaaggc   | 4560 |
| gtgaagctgc actacacatg ataactcgag tctagagggc ccgtttaaac ccgtgtatca   | 4620 |
| gcctcgactg tgccatttagt ttgccageca tctgttgcgtt gccctcccc cgtgcctcc   | 4680 |
| ttgaccctgg aaggtgccac tcccactgtc ctttctaat aaaatgagga aattgcattcg   | 4740 |
| cattgtctga gttagtgtca ttctattctg ggggtgggg tggggcagga cagcaagggg    | 4800 |
| gaggattggg aagacaatag caggcatgct gggatgcgg tggctctat ggcttctact     | 4860 |
| <br>                                                                |      |
| ggcggtttt atggacagca agcgaaccgg aattgccagc tggggcgccc tctggtaagg    | 4920 |
| ttgggaagcc ctgcaaagta aactggatgg ctttttgcc gccaaggatc tggatggcga    | 4980 |
| ggggatcaag ctctgatcaa gagacaggat gaggatcgat tcgcatgatt gaacaagatg   | 5040 |
| gattgcacgc agttctccg gccgcttggg tggagaggct attcgctat gactggcac      | 5100 |
| aacagacaat cggtgtctt gatgcccg tggccggct gtcagcgcag gggccccgg        | 5160 |
| ttcttttgtt caagaccgac ctgtccgggtt ccctgaatga actgcaagac gaggcagcgc  | 5220 |
| ggctatcgatg gctggccacg acggcggttc cttgcgcagc tggctcgac gttgtcactg   | 5280 |
| <br>                                                                |      |
| aagcgggaag ggactggctg ctattggcg aagtgcggg gcaggatctc ctgtcatctc     | 5340 |
| accttgcctcc tggcgagaaa gatatccatca tggctgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc | 5400 |
| ttgatccggc tacctgccc ttgcaccacc aagcgaacaatcgcatcgag cgaggacgtat    | 5460 |
| ctcgatggaa agccggctt gtcgatcagg atgatctgga cgaagagcat cagggctcg     | 5520 |
| cgccagccga actgttcgccc aggctcaagg cgagcatgcc cgacggcgg gatctcgat    | 5580 |
| tgaccatgg cgtatgcctgc ttggcaataatgcgtt aaatggccgc ttttctggat        | 5640 |
| tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcg accgctatca ggacatagcg ttggctaccc    | 5700 |
| <br>                                                                |      |
| gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat gggctgaccg cttcctcgat ctttacggta   | 5760 |
| tgcgcgtcc cgattcgcag cgcatcgct tctatcgct tcttgacgag ttcttctgaa      | 5820 |
| ttatataacgc ttacaatttc ctgatgcggt attttctct tacgcattgc tgcggatattt  | 5880 |

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| cacaccgcat caggtggcac tttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat ttgttattt    | 5940 |
| ttctaaatac attcaaatac gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa | 6000 |
| taatagcacg tgctaaaact tcattttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatcctttt   | 6060 |
| gataatctca tgacaaaaat cccttaacgt gagtttcgt tccactgagc gtcagacccc  | 6120 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ccttttttc tgcgctaatt ctgctgttg    | 6180 |
| caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgggtgc cgatcaaga gctaccaact   | 6240 |
| cttttccga aggttaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt tcttcttagtg | 6300 |
| tagccgtat taggccacca cttcaagaac tctgttagcac cgctacata cctcgctcg    | 6360 |
| ctaattctgt taccagtggc tgctgccagt ggatataact cgtgtttac cgggttggac   | 6420 |
| tcaagacat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca   | 6480 |
| cagccccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga | 6540 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| gaaagcgcca cgctccgaa agggagaaag gcggacaggat atccggttaag cgccagggtc | 6600 |
| ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtct   | 6660 |
| gtcggttgc gccacctctg acttggcgat cgattttgt gatgctcgatc agggggcg     | 6720 |
| agcctatgga aaaacgcccag caacgcggcc ttttacggt tcctggcctt ttgtggcct   | 6780 |
| tttgctcaca tggctttt                                                | 6797 |

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

&lt;400&gt; 7

|                         |    |
|-------------------------|----|
| caggacaaga acacacagga a | 21 |
|-------------------------|----|

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 8  
caggcaggat ttgggagaaa 20  
<210> 9  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"  
<400> 9

acccatcaag gactttggag g 21  
<210> 10  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"  
<400> 10  
aggacaagaa cacacaggaa g 21  
<210> 11  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"  
<400> 11  
caggatctgg gagaagttga ag 22  
<210> 12  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220><221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"  
<400> 12  
acaccaccca tcaaggactt tgga 24  
<210> 13  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"  
<400> 13  
gtgacgtgga catccgtaaa 20  
<210> 14  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"  
<400> 14  
cagggcagta attccttct g 21  
<210> 15  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"  
<400> 15  
taccctggca ttgtgacag gatg 24  
<210> 16  
<211> 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

&lt;400&gt; 16

Pro His Gly Val Val Phe Leu His Val

1 5

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

&lt;400&gt; 17

Val Val Phe Leu His Val Thr Val Tyr Val

1 5 10

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

&lt;400&gt; 18

gaccccaaaa tcagcgaaat 20

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

&lt;400&gt; 19

tctggttact gccagttgaa tctg 24

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

<213> Artificial Sequence  
<220><221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"

<400> 20

acccgcatt acgttggtg gacc 24

<210> 21

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence  
<220><221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 21

cgatctttg tagatctgtt ctc 23

<210> 22

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence  
<220><221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 22

atattgcagc agtacgcaca ca 22

<210> 23

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence  
<220><221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"

<400> 23

acactagcca tccttactgc gcttcg 26

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

10xHis tag"

&lt;400&gt; 24

His His His His His His His His His

1 5 10

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt;

&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

6xHis tag"

&lt;400&gt; 25

His His His His His

1 5

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

&lt;400&gt; 26

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

1 5 10 15

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

&lt;400&gt; 27

Asp Asp Phe Thr Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu

1                   5                   10                   15

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<400> 28

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

1                   5                   10                   15

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<400> 29

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

1                   5                   10                   15

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<400> 30

Leu Leu His Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly Pro Lys Lys Ser Thr

1                   5                   10                   15

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<400> 31

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

1                   5                   10                   15

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<400> 32

Ser Phe Pro Gln Ser Ala Pro His Gly Val Val Phe Leu His Val  
1 5 10 15

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<400> 33

Pro His Gly Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val Pro Ala Gln  
1 5 10 15

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<400> 34

Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys His Asp Gly Lys Ala His Phe

1 5 10 15

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<400> 35

Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val

1 5