(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0163164
(43) 공개일자 2024년11월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/005 (2006.01) *A61K 39/215* (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01) *C12N 7/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/005 (2013.01)
A61K 39/215 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7035773
(22) 출원일자(국제) 2023년03월28일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년10월25일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2023/058069
(87) 국제공개번호 WO 2023/186946
국제공개일자 2023년10월05일
(30) 우선권주장
22164874.4 2022년03월28일
유럽특허청(EPO)(EP)
22201198.3 2022년10월12일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
유니버시테트 베른
스위스 CH-3012 베른 호흐슐슈트라쎄 6 퍼발퉁스 디레크티온
인스티투트 퓌어 비롤로기 운트 이뮨올로기 (아이브이아이)
스위스, 3147 미텔호이저른, 젠세마트슈트라세 293
(72) 발명자
티엘, 볼커
스위스, 3004 베른, 튤펜베크 3
에버트, 나딘
스위스, 3076 보르프, 덴텐베르크슈트라세 49
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인더웨이브

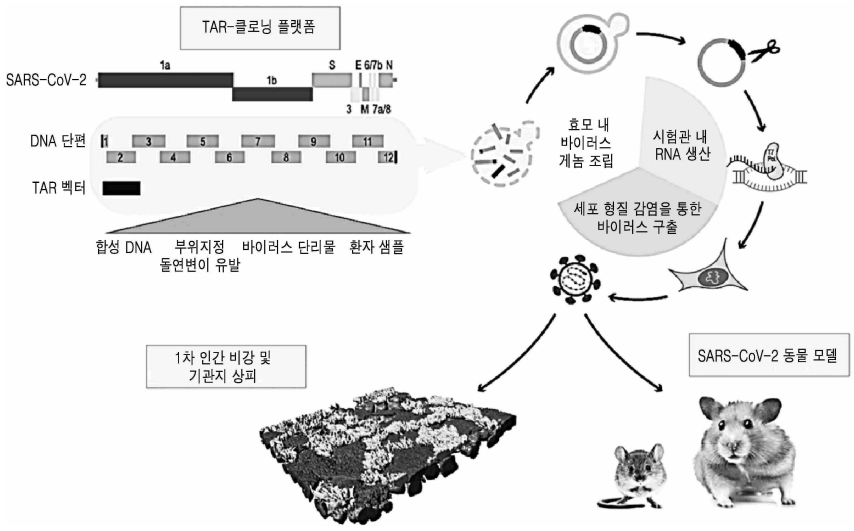
전체 청구항 수 : 총 31 항

(54) 발명의 명칭 **원-투-스톱(One-to-stop) 약독화된 SARS-CoV-2 바이러스**

(57) 요 약

본 발명은 약독화된 SARS-CoV-2 또는 이의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 적어도 20개의 원-투-스톱 (one-to-stop) 코돈을 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 추가적인 변형을 포함할 수 있고, 약독화된 SARS-CoV-2에 포함될 수 있다. 본 발명은 또한 폴리뉴클레오티드 제조 방법 및 예를 들어 의료용 약제학적 제품에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 31/14 (2018.01)
C12N 7/00 (2013.01)
C12N 2770/20021 (2013.01)
C12N 2770/20022 (2013.01)
C12N 2770/20034 (2013.01)
C12N 2770/20062 (2013.01)
(72) 발명자
트뤼브, 베티나 살로메
스위스, 3007 베른, 벨프슈트라세 29
바루트, 굴리즈 투바
스위스, 3007 베른, 벨프슈트라세 29
크래첼, 아니카
스위스, 3008 베른, 센크슈트라세 31
조레스, 요르그
스위스, 3098 쾨니츠, 탈브륀틀리베크 8
라브루사, 파비엔
스위스, 3098 쾨니츠, 슈바르첸부르크슈트라세 292
비어, 마틴
독일, 17498 노이엔키르헨, 알와인-우테노우-링 2 비
호프만, 도나타
독일, 17498 메세켄하겐, 안 덴 제비젠 26
숀, 제이콥
독일, 17489 그라이프스발트, 블라이히슈트라세 46
할웨, 니코 조엘
독일, 17489 그라이프스발트, 슈타인슈트라세 5
울리히, 로렌츠
독일, 66459 림바흐 비 홈부르크 (자르), 하우프트슈트라세 40

명 세 서

청구범위

청구항 1

약독화된 인간 코로나 바이러스 또는 이의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드로서, 상기 폴리뉴클레오티드는 적어도 20개의 원-투-스톱(one-to-stop) 코돈을 포함하며, 원-투-스톱 코돈은

i) 천연 인간 코로나 바이러스 게놈 또는 이의 단편 내 상응하는 코돈과 비교하여 상이하지만 동의(synonymous) 코돈이며;

ii) 종결(STOP) 코돈과 단 하나의 뉴클레오티드가 상이한, 폴리뉴클레오티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드의 단편은, 상응하는 인간 코로나 바이러스 부분과 결합될 때, 15일 후에 5000 PFU 코로나 바이러스 입자로 마우스를 면역화한 후 면역 반응을 유도하고 21일 후에 야생형(WT) 인간 코로나 바이러스로 챌린지하여 35일 후에 측정시 증가된 면역 반응을 유도하는 코로나 바이러스 입자를 코딩하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 3

a) 천연 인간 코로나 바이러스 게놈, 이의 단편 또는 cDNA 클론의 CDS를 제공하는 단계; 및

b) 상기 천연 인간 코로나 바이러스 게놈, 상기 단편 또는 상기 cDNA 클론의 역전사 cDNA 서열을 각각 변형하는 단계를 포함하는

제1항 또는 제2항의 폴리뉴클레오티드의 제조 방법으로서,

상기 변형하는 단계는 상기 천연 인간 코로나 바이러스 게놈, 단편 또는 역전사 cDNA 서열에서 적어도 20개의 코돈을 적어도 20개의 원-투-스톱 코돈으로 대체하는 단계를 포함하며, 원-투-스톱 코돈은

i) 상기 천연 인간 코로나 바이러스 게놈, 단편 또는 역전사 cDNA 서열 내 상응하는 코돈과 비교하여 상이하지만 동의 코돈이며;

ii) 종결(STOP) 코돈과 단 하나의 뉴클레오티드가 상이한, 방법.

청구항 4

제1항, 제2항 또는 제3항에 있어서, 상기 천연 인간 코로나 바이러스 게놈 또는 이의 단편은

a) 서열 번호 7로 정의된 서열 내에 포함된 SARS-CoV-2 서열 또는 서열 번호 7로 정의된 서열로 이루어진 SARS-CoV-2 서열이거나

b) 서열 번호 7로 정의된 서열 내에 포함된 서열 또는 서열 번호 7로 정의된 서열로 이루어진 서열과 80% 일치하는 SARS-CoV-2 서열, 바람직하게는 서열 번호 7로 정의된 서열 내에 포함된 서열 또는 상기 서열 번호 7로 정의된 서열로 이루어진 서열과 80% 일치하며, 하나 이상의 SARS-CoV-2 바이러스 단백질을 코딩하는 능력을 유지하는 SARS-CoV-2 서열인, 폴리뉴클레오티드 또는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단편은 최소 500개의 뉴클레오티드 길이를 갖는, 폴리뉴클레오티드 또는 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간 코로나 바이러스는 SARS-CoV-2이고, 상기 원-투-스톱 코돈 중 적어도 하나는 천연 SARS-CoV-2의 ORF1ab의 서열 부분에 상응하는 서열 부분 또는 단편, 천연 SARS-CoV-2의 구조 단백질을 코딩하는 서열 부분, 또는 천연 SARS-CoV-2의 보조 단백질을 코딩하는 서열 부분에 포함되는,

폴리뉴클레오티드 또는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 원-투-스톱 코돈 중 적어도 하나는 천연 SARS-CoV-2의 ORF1ab의 서열 부분에 상응하는 서열 부분 또는 단편에 포함되는, 폴리뉴클레오티드 또는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 원-투-스톱 코돈 중 적어도 하나는 천연 SARS-CoV-2 게놈의 Nsp2 내지 Nsp15를 코딩하는 서열 부분에 상응하는 서열 부분 또는 단편에 포함되는, 폴리뉴클레오티드 또는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 원-투-스톱 코돈 중 적어도 하나는 천연 SARS-CoV-2 게놈의 Nsp2 내지 Nsp7 또는 Nsp13 내지 Nsp15를 코딩하는 서열 부분에 상응하는 서열 부분 또는 단편에 포함되는, 폴리뉴클레오티드 또는 방법.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서, 상기 원-투-스톱 코돈은 천연 SARS-CoV-2 게놈 상의 위치에 상응하는 표 1로부터 선택된 위치를 갖는 적어도 하나의 원-투-스톱 코돈을 포함하는, 폴리뉴클레오티드 또는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 20개의 원-투-스톱 코돈에 의해 코딩된 아미노산은 Leu, Ser, Arg 및/또는 Gly로 이루어지는, 폴리뉴클레오티드 또는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 원-투-스톱 코돈에 의해 코딩된 아미노산은 Leu 및/또는 Ser로 이루어지는, 폴리뉴클레오티드 또는 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 20개의 원-투-스톱 코돈은 적어도 50개의 원-투-스톱 코돈인, 폴리뉴클레오티드 또는 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간 코로나 바이러스는 SARS-CoV-2이고, 상기 폴리뉴클레오티드는 천연 SARS-CoV-2의 Nsp1 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하지 않거나 천연 SARS-CoV-2의 Nsp1과 비교하여 감소된 Nsp1 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하며,

바람직하게는, 상기 폴리뉴클레오티드는 천연 SARS-CoV-2의 Nsp1과 비교하여 감소된 Nsp1 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하며, 상기 폴리뉴클레오티드는 천연 SARS-CoV-2의 Nsp1을 코딩하는 서열과 비교하여 돌연변이를 포함하고, 상기 돌연변이는 K164A 및/또는 H165A인, 폴리뉴클레오티드.

청구항 15

제1항, 제2항, 제4항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간 코로나 바이러스는 SARS-CoV-2이고, 상기 폴리뉴클레오티드는 천연 SARS-CoV-2의 ORF6 유전자에 의해 코딩된 단백질의 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하지 않거나 천연 SARS-CoV-2의 ORF6 유전자에 의해 코딩된 단백질의 감소된 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 16

제1항, 제2항, 제4항 내지 제15항 중 어느 하나에 있어서, 상기 인간 코로나 바이러스는 SARS-CoV-2이고, 상기 폴리뉴클레오티드는 천연 SARS-CoV-2의 ORF7a 유전자에 의해 코딩된 단백질의 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하지 않거나 천연 SARS-CoV-2의 ORF7a 유전자에 의해 코딩된 단백질의 감소된 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 17

제1항, 제2항, 제4항 내지 제16항 중 어느 하나에 있어서, 상기 인간 코로나 바이러스는 SARS-CoV-2이고, 상기 폴리뉴클레오티드는 천연 SARS-CoV-2의 ORF7b 유전자에 의해 코딩된 단백질의 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하지 않거나 천연 SARS-CoV-2의 ORF7b 유전자에 의해 코딩된 단백질의 감소된 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 18

제1항, 제2항, 제4항 내지 제17항 중 어느 하나에 있어서, 상기 인간 코로나 바이러스는 SARS-CoV-2이고, 상기 폴리뉴클레오티드는 천연 SARS-CoV-2의 ORF8 유전자에 의해 코딩된 단백질의 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하지 않거나 천연 SARS-CoV-2의 ORF8 유전자에 의해 코딩된 단백질의 감소된 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 19

제1항, 제2항, 제4항 내지 제18항 중 어느 하나에 있어서, 상기 인간 코로나 바이러스는 SARS-CoV-2이고, 상기 폴리뉴클레오티드는 스파이크 단백질을 코딩하는 서열 부분을 포함하고, 상기 스파이크 단백질은 천연 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질의 절단 부위와 비교하여 변형되거나 제거된 절단 부위를 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열 번호 6으로 정의된 서열로 구성되거나 이를 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 21

제1항, 제2항, 제4항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 벡터.

청구항 22

제1항, 제2항, 제4항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 유전자 변형된 세포.

청구항 23

제22항의 유전자 변형된 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 약독화된 바이러스의 제조 방법.

청구항 24

제1항, 제2항, 제4항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 약독화된 바이러스.

청구항 25

제21항의 벡터, 제22항의 유전자 변형된 세포 및/또는 제24 항의 약독화된 바이러스를 포함하는 약제로서 사용하기 위한 약제학적 제품.

청구항 26

제21항의 벡터, 제22항의 유전자 변형된 세포 및/또는 제24항의 약독화된 바이러스를 포함하는 인간 코로나 바이러스 감염, 바람직하게는 SARS-CoV-2 감염의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한, 약제학적 제품.

청구항 27

제25항 또는 제26항에 있어서, 상기 약제학적 제품이 돌연변이원을 추가로 포함하는, 약제학적 제품.

청구항 28

치료학적 유효량의 약제학적 제품을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 치료 및/또는 예방 방법으로서, 상기 약제학적 제품은 제21 항의 벡터, 제22항의 유전자 변형된 세포 및/또는 제24항의 약독화된 바이러스를 포함하는, 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 치료 및/또는 예방은 인간 코로나바이러스 감염, 바람직하게는 SARS-CoV-2 감염의 치료 및/또는 예방인, 방법.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서, 상기 방법은 치료학적 유효량의 돌이변이원을 개체에 투여하는 단계를 더 포함하는 것인, 방법.

청구항 31

제27항 또는 제30항에 있어서, 상기 돌연변이원은 5-플루오로우라실 또는 말누피라비르인, 약제학적 제품 또는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 약독화된 SARS-CoV-2 또는 이의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 적어도 20개의 원-투-스톱(one-to-stop) 코돈을 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 추가적인 변형을 포함할 수 있고, 약독화된 SARS-CoV-2에 포함될 수 있다. 본 발명은 또한 폴리뉴클레오티드 제조 방법 및 예를 들어 의료용 약제학적 제품에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 중증 급성 호흡기 증후 군코로나 바이러스2(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, SARS-CoV-2)는 coronavirus disease 2019(COVID-19)의 원인 인자로서 2019년 12월에 출현하였다. 이 바이러스는 인간 사이에서 전염력이 높다. 이 바이러스는 몇 주 만에 전 세계로 급속히 확산되었고, 전 세계는 여전히 진행 중인 COVID-19 대유행과 싸우고 있다.

[0003] 백신의 신속한 개발 및 가용성은 많은 바이러스 및 박테리아를 퇴치하는데 중요하다. 적합한 백신을 생산하는 것은 여러 단계로 이루어진 복잡한 과정이며, 많은 투자에도 불구하고 항상 성공적이지 않다. 일반적으로, 적합한 백신을 개발하는 데는 수년이 걸린다. 이러한 긴 개발 기간에는 특히 새롭게 출현하는 병원체나 돌연변이 병원체와 관련하여 중대한 문제가 있다. 역학적 관점에서 볼 때 새로운 질병의 출현에 너무 늦게 대응하거나 전혀 대응하지 못할 가능성이 있다. 이와 대조적으로, 새로운 병원체나 심하게 돌연변이된 병원체를 분석, 식별 및 추가 검출하는 작업이 이제는 몇 주 또는 며칠 안에 가능해지고, 이는 지난 세기에 비해 엄청난 발전이다.

[0004] 이러한 맥락에서, 바이러스는 돌연변이율이 높아 다른 종에서 인간으로 확산되기 때문에 특별한 관심을 받고 있다. 이러한 바이러스의 급속한 확산은 현대 의학에 큰 도전이 되고 있다. 신생 바이러스를 탐지/식별하고 백신을 개발하기까지 보통 수년의 시간이 걸린다. 몇몇 경우에는, 사전 지식이 충분하다면 몇 달 안에 실험적 백신을 제공할 수 있다. 그러나, 이 기간은 일반적으로 수천 명 또는 수백만 명의 사람들이 감염될 때까지 걸리는 시간보다 훨씬 더 길다. 이러한 신속한 확산은 오늘날 사회의 높은 이동성의 직접적인 결과이기도 하다.

[0005] 이상적으로는, 새로운 바이러스가 확인된 직후에 충분한 양과 최고 품질의 백신을 이용 가능하고, 이를 통해 새로운 바이러스의 최초 발생 장소에 어떤 식으로든 가까이 접근한 모든 사람들의 전국적인 예방 접종이 가능하게 될 것이다. 더욱이 이러한 백신에 대한 이상적인 방법으로 바이러스의 진화와 적응에 대응 가능하다. 이러한 이상적인 생산 가능성은 오늘날 당업자에게 실현 불가능한 것으로 여겨진다.

[0006] 특히 최근에 코로나 대유행으로 인해 백신 생산에 적합한 도구를 개발하는 것의 중요성이 상당히 높아졌다. 코로나 바이러스 SARS-CoV-2에 대한 백신 개발이 장기적으로 대유행과 이에 따른 세계적 위기에 대처할 수 있는 유일하게 입증된 수단이라는 데에는 이견이 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서, 코로나 바이러스 SARS-CoV-2에 대한 백신을 대량으로 고품질로 생산할 수 있는 수단과 방법을 제공할

필요가 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 기술적 과제는 본 명세서에 개시된 구현예(embodiment) 및 청구항에 정의된 바와 같이 해결된다.

[0009] 따라서 본 발명은 특히 하기의 구현예들에 관한 것이다:

[0010] 1. 약독화된 인간 코로나 바이러스 또는 이의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드로서, 상기 폴리뉴클레오티드는 적어도 20개의 원-투-스톱(one-to-stop) 코돈을 포함하고, 원-투-스톱 코돈은

[0011] i) 천연(natural) 인간 코로나 바이러스 게놈 또는 이의 단편 내 상응하는 코돈과 비교하여 상이하지만 동의(synonymous) 코돈이며;

[0012] ii) 종결(STOP) 코돈과 단 하나의 뉴클레오티드가 상이한, 뉴클레오티드.

[0013] 2. 구현예 1에 있어서, 폴리뉴클레오티드의 단편은, 상응하는 인간 코로나 바이러스 부분과 결합될 때, 15일 후에 5000 PFU 코로나 바이러스 입자로 마우스를 면역화한 후 면역 반응을 유도하고 21일 후에 야생형(WT) 인간 코로나 바이러스로 챌린지하고 35일 후에 측정시 증가된 면역 반응을 유도하는 코로나 바이러스 입자를 코딩하는, 폴리뉴클레오티드.

[0014] 3. a) 천연 인간 코로나 바이러스 게놈, 이의 단편 또는 cDNA 클론의 CDS를 제공하는 단계; 및

[0015] b) 상기 천연 인간 코로나 바이러스 게놈, 이의 단편 또는 상기 cDNA 클론의 역전사 cDNA 서열을 각각 변형하는 단계를 포함하는

[0016] 구현예 1 또는 2의 폴리뉴클레오티드 제조 방법으로서,

[0017] 상기 변형 단계는 상기 천연 인간 코로나 바이러스 게놈, 이의 단편 또는 역전사 cDNA 서열에서 적어도 20개의 코돈을 적어도 20개의 원-투-스톱 코돈으로 대체하는 단계를 포함하며, 원-투-스톱 코돈은

[0018] i) 천연 인간 코로나 바이러스 게놈, 이의 단편 또는 역전사 cDNA 서열 내 상응하는 코돈과 비교하여 상이하지만 동의 코돈이며;

[0019] ii) 종결(STOP) 코돈과 단 하나의 뉴클레오티드가 상이한, 방법.

[0020] 4. 구현예 1 또는 2의 폴리뉴클레오티드 또는 구현예 3의 방법에 있어서, 상기 천연 인간 코로나 바이러스 게놈 또는 이의 단편은

[0021] a) 서열 번호 7로 정의된 서열 내에 포함된 SARS-CoV-2 서열 또는 서열 번호 7로 정의된 서열로 이루어진 SARS-CoV-2 서열이거나

[0022] b) 서열 번호 7로 정의된 서열 내에 포함된 서열 또는 서열 번호 7로 정의된 서열로 이루어진 서열과 80% 일치하는 SARS-CoV-2 서열, 바람직하게 서열 번호 7로 정의된 서열 내에 포함된 서열 또는 상기 서열 번호 7로 정의된 서열로 이루어진 서열과 80% 일치하며, 하나 이상의 SARS-CoV-2 바이러스 단백질을 코딩하는 능력을 유지하는 SARS-CoV-2 서열인, 폴리뉴클레오티드 또는 방법.

[0023] 5. 구현예 1, 2 또는 4 중 어느 하나의 폴리뉴클레오티드 또는 구현예 3 또는 4의 방법에 있어서, 상기 단편은 최소 500개의 뉴클레오티드 길이를 갖는, 폴리뉴클레오티드 또는 방법.

[0024] 6. 구현예 1, 2, 4 또는 5 중 어느 하나의 폴리뉴클레오티드 또는 구현예 3 내지 5 중 어느 하나의 방법 있어서, 상기 인간 코로나 바이러스는 SARS-CoV-2이고, 상기 원-투-스톱 코돈 중 적어도 하나는 상기 천연 SARS-CoV-2의 ORF1ab의 서열 부분에 상응하는 서열 부분 또는 단편, 상기 천연 SARS-CoV-2의 구조 단백질을 코딩하는 서열 부분 또는 상기 천연 SARS-CoV-2의 보조 단백질을 코딩하는 서열 부분에 포함되는, 폴리뉴클레오티드 또는 방법.

[0025] 7. 구현예 6의 폴리뉴클레오티드 또는 구현예 6의 방법에 있어서, 상기 원-투-스톱 코돈 중 적어도 하나는 상기 천연 SARS-CoV-2의 ORF1ab의 서열 부분에 상응하는 서열 부분 또는 단편에 포함되는, 폴리뉴클레오티드 또는 방법.

[0026] 8. 구현예 7의 폴리뉴클레오티드 또는 구현예 7의 방법에 있어서, 상기 원-투-스톱 코돈 중 적어도 하나는 상기 천연 SARS-CoV-2 게놈의 Nsp2 내지 Nsp1를 코딩하는 서열에 상응하는 서열 부분 또는 단편에 포함되는, 폴

리뉴클레오티드 또는 방법.

[0027] 9. 구현예 8의 폴리뉴클레오티드 또는 구현예 8의 방법에 있어서, 상기 원-투-스톱 코돈 중 적어도 하나는 상기 천연 SARS-CoV-2 게놈의 Nsp2 내지 Nsp7 또는 Nsp13 내지 Nsp15를 코딩하는 서열 부분에 상응하는 서열 부분 또는 단편에 포함되는, 폴리뉴클레오티드 또는 방법.

[0028] 10. 구현예 8 또는 9의 폴리뉴클레오티드 또는 구현예 8 또는 9의 방법에 있어서, 상기 원-투-스톱 코돈은 상기 천연 SARS-CoV-2 게놈 상의 위치에 해당하는 표 1로부터 선택된 위치를 갖는 적어도 하나의 원-투-스톱 코돈을 포함하는, 폴리뉴클레오티드 또는 방법.

[0029] 11. 구현예 1, 2, 4 내지 10 중 어느 하나의 폴리뉴클레오티드 또는 구현예 3 내지 10 중 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 적어도 20개의 원-투-스톱 코돈에 의해 코딩된 아미노산은 Leu, Ser, Arg 및/또는 Gly로 이루어지는, 폴리뉴클레오티드 또는 방법.

[0030] 12. 구현예 11의 폴리뉴클레오티드 또는 구현예 11의 방법에 있어서, 상기 원-투-스톱 코돈에 의해 코딩된 아미노산은 Leu 및/또는 Ser로 이루어지는, 폴리뉴클레오티드 또는 방법.

[0031] 13. 구현예 1, 2, 4 내지 12 중 어느 하나의 폴리뉴클레오티드 또는 구현예 3 내지 12 중 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 적어도 20개의 원-투-스톱 코돈은 적어도 50개의 원-투-스톱 코돈인, 폴리뉴클레오티드 또는 방법.

[0032] 14. 구현예 1, 2, 4 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 상기 인간 코로나 바이러스는 SARS-CoV-2이고, 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 천연 SARS-CoV-2의 Nsp1 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하지 않거나 또는 천연 SARS-CoV-2의 Nsp1과 비교하여 감소된 Nsp1 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함한다. 바람직하게는, 상기 폴리뉴클레오티드는 천연 SARS-CoV-2의 Nsp1과 비교하여 감소된 Nsp1 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하며, 상기 폴리뉴클레오티드는 천연 SARS-CoV-2의 Nsp1 코딩하는 서열과 비교하여 돌연변이를 포함하고, 상기 돌연변이는 K164A 및/또는 H165A인, 폴리뉴클레오티드.

[0033] 15. 구현예 1, 2, 4 내지 14 중 어느 하나에 있어서, 상기 인간 코로나 바이러스는 SARS-CoV-2이고, 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 천연 SARS-CoV-2의 ORF6 유전자에 의해 코딩된 단백질의 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하지 않거나 상기 천연 SARS-CoV-2의 ORF6 유전자에 의해 코딩된 단백질의 감소된 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

[0034] 16. 구현예 1, 2, 4 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 상기 인간 코로나 바이러스는 SARS-CoV-2이고, 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 천연 SARS-CoV-2의 ORF7a 유전자에 의해 코딩된 단백질의 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하지 않거나 상기 천연 SARS-CoV-2의 ORF7a 유전자에 의해 코딩된 단백질의 감소된 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

[0035] 17. 구현예 1, 2, 4 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 상기 인간 코로나 바이러스는 SARS-CoV-2이고, 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 천연 SARS-CoV-2의 ORF7b 유전자에 의해 코딩된 단백질의 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하지 않거나 상기 천연 SARS-CoV-2의 ORF7b 유전자에 의해 코딩된 단백질의 감소된 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

[0036] 18. 구현예 1, 2, 4 내지 17 중 어느 하나에 있어서, 상기 인간 코로나 바이러스는 SARS-CoV-2이고, 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 천연 SARS-CoV-2의 ORF8 유전자에 의해 코딩된 단백질의 기능을 가지는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하지 않거나 상기 천연 SARS-CoV-2의 ORF8 유전자에 의해 코딩된 단백질의 감소된 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

[0037] 19. 구현예 1, 2, 4 내지 18 중 어느 하나에 있어서, 상기 인간 코로나 바이러스는 SARS-CoV-2이고, 상기 폴리뉴클레오티드는 스파이크 단백질을 코딩하는 서열 부분을 포함하고, 상기 스파이크 단백질은 상기 천연 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질의 절단 부위와 비교하여 변형되거나 제거된 절단 부위를 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

[0038] 20. 구현예 19에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열 번호 6으로 정의된 서열로 구성되거나 이를 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

[0039] 21. 구현예 1, 2, 4 내지 20 중 어느 하나의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

[0040] 22. 구현예 1, 2, 4 내지 20 중 어느 하나의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자 변형된 세포.

[0041] 23. 구현예 22의 유전자 변형된 세포를 배양하는 단계를 포함하는 약독화된 바이러스 제조 방법.

[0042] 24. 구현예 1, 2, 4 내지 20 중 어느 하나의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 약독화된 바이러스.

[0043] 25. 구현예 21의 벡터, 구현예 22의 유전자 변형된 세포 및/또는 구현예 24의 약독화된 바이러스를 포함하는 약제로서 사용하기 위한 약제학적 제품.

[0044] 26. 구현예 21의 벡터, 구현예 22의 유전자 변형된 세포 및/또는 구현예 24의 약독화된 바이러스를 포함하는 인간 코로나 바이러스 감염, 바람직하게는 SARS-CoV-2 감염의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 약제학적 제품.

[0045] 27. 구현예 25 또는 26에 있어서, 상기 약제학적 제품은 돌연변이원을 더 포함하는, 사용을 위한 약제학적 제품.

[0046] 28. 치료학적 유효량의 약제학적 제품을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 치료 및/또는 예방 방법으로서, 상기 약제학적 제품은 구현예 21의 벡터, 구현예 22의 유전자 변형된 세포 및/또는 구현예 24의 약독화된 바이러스를 포함하는, 방법.

[0047] 29. 구현예 28에 있어서, 상기 치료 및/또는 예방은 인간 코로나 바이러스 감염, 바람직하게는 SARS-CoV-2 감염의 치료 및/또는 예방인, 방법.

[0048] 30. 구현예 28 또는 29에 있어서, 상기 방법은 치료학적 유효량의 돌이변이원을 개체에 투여하는 단계를 더 포함하는, 방법.

[0049] 31. 구현예 27의 사용을 위한 약제학적 제품 또는 구현예 30의 방법에 있어서, 상기 돌연변이원은 5-플루오로우라실 또는 말누피라비르인, 방법.

[0050] 따라서, 일 구현예에서, 본 발명은 약독화된 인간 코로나 바이러스(바람직하게는 SARS-CoV-2) 또는 이의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 적어도 20개의 원-투-스톱 코돈을 포함하고, 원-투-스톱 코돈은 i)천연 인간 코로나 바이러스 게놈 (바람직하게는 천연 SARS-CoV-2 게놈) 또는 이의 단편 내 상응하는 코돈과 비교하여 상이하지만 동의 코돈이고, ii) 종결(STOP) 코돈과 단 하나의 뉴클레오티드가 상이하다.

[0051] 본 명세서에서 용어 "폴리뉴클레오티드"는 적어도 60개의 핵산 단량체 단위 (예를 들어, 뉴클레오티드), 바람직하세는 100개 이상의 단량체 단위, 더 바람직하게는 200개 이상의 단량체 단위를 포함하는 핵산을 의미한다. 폴리뉴클레오티드는 선택적으로 기존 또는 천연 서열의 분리, DNA 복제 또는 증폭, 역전사, 적절한 서열의 클로닝 및 제한 분해, 또는 당업계에 알려진 방법에 의한 직접적인 화학 합성을 포함하되 이에 국한되지 않는 모든 적절한 방법에 의해 제조될 수 있다. 용어 "핵산"은 선형 또는 원형 구조이며 단일 또는 이중 가닥 형태인 모든 종류의 데옥시리보뉴클레오티드 (예를 들어, DNA, cDNA 등) 또는 리보뉴클레오티드 (예를 들어, RNA, mRNA 등) 중합체 또는 디옥시리보뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드 (예를 들어, DNA/RNA) 중합체의 조합을 의미한다. 이러한 용어는 염기, 당 및/또는 포스페이트 모이어티 (예를 들어, 포스포로티오에이트 백본들)에서 개질된 뉴클레오티드 뿐만 아니라 천연 뉴클레오티드의 공지된 유사체를 포괄할 수 있다. 일반적으로, 특정 뉴클레오티드의 유사체는 동일한 염기쌍 특이성을 갖는다. 즉, A의 유사체는 T와 염기쌍을 형성한다.

[0052] 본 명세서에서 용어 "약독화된 인간 코로나 바이러스"는 천연 인간 코로나 바이러스와 비교하여, 숙주 생물체가 약독화된 바이러스에 노출(감염)된 후 숙주 생물체에서 증상이 덜 나타나거나 덜 심하거나 심지어 전혀 나타나지 않는 인간 코로나 바이러스를 지칭한다. 동시에, 살아있는 약독화된 바이러스는 야생형 바이러스 감염 및/또는 그의 적어도 하나의 증상에 대해 적어도 부분적으로 보호되어 있는 약독화된 바이러스에 대한 숙주의 면역 반응을 유도한다. 특정 구현예에서, 인간 코로나 바이러스는 베타 코로나 바이러스, 예를 들어 MERS-CoV, SARS-CoV-1 및 SARS-CoV-2로 구성된 군에서 선택된 베타 코로나 바이러스이며, 바람직하게는 SARS-CoV-2이다.

[0053] 본 명세서에서 용어 "단편"은 천연 인간 코로나 바이러스 (바람직하게는 SARS-CoV-2) 게놈보다 적은 수의 단백질 및/또는 길이가 더 짧은 아미노산을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 의미한다. 일부 구현예에서, 상기 단편은 천연 인간 코로나바이러스(바람직하게는 SARS-CoV-2) 서열 부분과 조립되어, 약독화된 인간 코로나 바이러스(바람직하게는 SARS-CoV-2)를 코딩하는 서열을 형성하는 데 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 본원에 기재된 "단편"은 천연 인간 코로나 바이러스(바람직하게는 SARS-CoV-2) 게놈 중 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100%를 함께 코딩하는 복수의 서열이다. 특정 구현예에서, 상기 단편은 인간 개체

에서 면역 반응을 유도할 수 있는 펩티드를 코딩하는데 충분한 길이를 갖는다.

[0054] 특정 구현예에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드의 단편은, 상응하는 인간 코로나 바이러스 부분과 결합될 때, 15일 후 5000 PFU 코로나 바이러스 입자로 마우스의 면역화 후에 면역 반응을 유도하는 코로나 바이러스 입자를 코딩한다.

[0055] 특정 구현예에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드의 단편은, 상응하는 인간 코로나 바이러스 부분과 결합될 때, 15일 후에 5000 PFU 코로나 바이러스 입자로 마우스를 면역화한 후 면역 반응을 유도하고, 21일 후에 WT 인간 코로나 바이러스로 챌린지하고 35일 후에 측정시 증가된 면역 반응을 유도하는 코로나 바이러스 입자를 코딩한다.

[0056] 특정 구현예에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드의 단편은, 상응하는 인간 코로나 바이러스 부분과 결합될 때, 21일 후에 WT 인간 코로나 바이러스로 첼린지 시 26일 후에 측정된 S-Tet+ CD8+ T 세포의 비율을 증가시키는 코로나 바이러스 입자를 코딩한다.

[0057] 특정 구현예에서, 분원에 기재된 폴리뉴클레오티드의 단편은 상응하는 인간 코로나 바이러스 부분과 결합될 때, 15일 후에 5000 PFU 코로나 바이러스 입자로 마우스를 면역화한 후 면역 반응을 유도하고, 21일 후에 WT 인간 코로나 바이러스로 챌린지시 26일 후에 측정된 S-Tet+ CD8+ T 세포의 비율을 증가시키는 코로나 바이러스 입자를 코딩한다.

[0058] 본 명세서에서 사용되는 "상응하는 인간 코로나 바이러스 부분"은 단편에서 누락된 바이러스 게놈 부분을 지칭한다. 바이러스 게놈 단편을 결합시키는 방법은 당업자에게 알려져 있다. 예를 들어, 코로나 바이러스 입자는 단편 서열과 바이러스의 결여된 단백질을 코딩하는 서열 부분을 결합하여 코로나 바이러스 입자를 코딩하는 완전하거나 실질적으로 완전한 서열을 생성함으로써 제조될 수 있다. 대안적으로, 코로나 바이러스 입자는 트랜스 보완 세포주에 의해 제조될 수 있다. 당업자는 임의의 정렬 방법을 사용하여 가장 가까운 관련된 인간 코로나 바이러스가 어떤 것인지 어느 서열 부분(들)이 상응하는 인간 코로나 바이러스(들)인지 식별할 수 있다.

[0059] "코로나 바이러스 입자"는 단편 단독 또는 단편과 상응하는 코로나 바이러스 서열 부분의 조합으로 암화화된 단백질 복합체로, 일반적으로 바이러스 외피, 바람직하게는 모든 구조 단백질의 절반 이상, 더 바람직하게는 모든 구조 단백질을 포함한다.

[0060] 유도 및/또는 증가된 면역 반응은 중화 분석에서 마우스 혈청의 중화 항체 역가를 측정하여 측정되는 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 임계값이 20 VNT100인 경우 "유도된 면역 반응"으로 간주된다 (도 18 참조).

[0061] S-Tet+ CD8+ T 세포의 백분율의 증가는 바람직하게는 사중체 염색으로 측정된다 (도 18 참조).

[0062] 당업자는 각 코로나 바이러스에 어떤 동물이 민감하지 인식하고, 상술한 측정 설정에서 마우스를 다른 동물로 대체할 수 있다. 코로나 바이러스의 유형에 따라, 당업자는 마우스 대신에 야생형 바이러스의 민감성에 따라, 예를 들어 햄스터, 쥐, 기니피그, 페럿, 원숭이 또는 가축 돼지를 선택할 수 있다. 추가적으로, 당업자는 복용량 및 시점과 같은 실험 설정을 적절하게 변경할 수 있다. 더욱이, 동물은 야생형 바이러스에 대한 민감도를 증가시키기 위해 유전자 변형될 수 있다.

[0063] 특정 구현예에서, 본원에 기재된 단편은 적어도 500개, 적어도 1000개, 적어도 2000개, 적어도 3000개, 적어도 4000개, 적어도 5000개, 적어도 6000개, 적어도 7000개, 적어도 8000개, 적어도 9000개, 적어도 10000개, 적어도 15000개, 적어도 20000개 또는 적어도 25000개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다.

[0064] 본 명세서에서 용어 "종결 코돈 (STOP codon)"은 당업계에 공지된 임의의 종결 코돈을 지칭한다. 일부 구현예에서, 종결 코돈(들)은 UAA(RNA), UAG(RNA), UGA(RNA), TAA(DNA), TAG(DNA) 및 TGA(DNA)의 군에서 선택된 하나 이상이다.

[0065] 2 개의 코돈은 이들의 뉴클레오티드 및/또는 뉴클레오티드 순서가 상이한 경우 본원에서"상이한" 것으로 간주된다.

[0066] 2개의 코돈이 동일한 아미노산 또는 유사한 아미노산을 코딩하는 경우, 본 명세서에서 "동의(synonymous)"로 간주된다. 동의 코돈의 맥락에서 "유사한 아미노산"은 대체될 수 있는 아미노산이고, 여기서 대체는 그 일부를 이루는 단백질의 항원성을 변경하지 않거나 실질적으로 변경하지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, 동의 코돈은 동일한 아미노산을 코딩하는 2개의 코돈이다.

[0067] 예를 들어, Leu를 코딩하는 CUU 코돈은 Leu를 또한 코딩하는 UUA 코돈에 의해 대체되지만, (CUU 코돈과 달리)

종결 코돈으로부터 (즉, 종결 코돈 UAA로부터) 단 하나의 뉴클레오티드만 상이하다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드에서 원-투-스톱 코돈 변형은 야생형 (예를 들어, 감염성) 인간 코로나 바이러스 게놈 또는 클론과 뉴클레오티드 서열에 의한 차이를 유도하지만, 아미노산 서열에 의한 차이는 유도하지 않는다 (적어도 첫 번째 복제 주기 이전에는 그렇지 않다).

[0068] 대안적으로 또는 상보적으로, 보다 구체적으로 상보적으로, 본 출원의 수단은 Thr 또는 Ala을 코딩하는 코돈을 Ser을 코딩하고 STOP 코돈과 단 하나의 뉴클레오티드만 다른 코돈으로 대체하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, Thr을 코딩하는 ACA 코돈은 Ser을 코딩하는 UCA 코돈으로 대체될 수 있는데, 이는 UAA STOP 코돈과 단 하나의 뉴클레오티드만 상이하다. 이러한 코돈 대체는 코딩된 단백질의 아미노산 서열을 변형시키고, 따라서 이 단백질의 항원성을 (실질적으로) 변형하지 않도록 선택된다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 추가적으로 근접 코돈 및 종결 코돈의 추가 유형을 포함할 수 있다.

[0069] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 원하는 방식으로 아미노산 서열에 영향을 미치는 상이한 성질 (즉, 원-투-스톱 변형 이외의 변형) 및/또는 결실의 추가 변형을 갖는다.

[0070] 본 명세서에서 용어 "천연 인간 코로나 바이러스"는 임의의 공지된 인간 코로나 바이러스, 바람직하게는 SARS-CoV-2 또는 이로부터 유래된 변이체를 지칭한다. 본원에 기재된 천연 인간 코로나 바이러스 "게놈"은 게놈 그 자체 또는 이의 cDNA 클론을 의미한다. 상기 천연 인간 코로나 바이러스 게놈은 바람직하게는 천연 SARS-CoV-2 게놈이다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 천연 SARS-CoV-2 게놈은 알파, 베타, 감마, 델타, 오미크론, 람다, 뮤, 엡실론, 제타, 에타, 세타 및 이오타의 군으로부터 선택된 변이체의 게놈이며, 바람직하게는 오미크론이다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 천연 SARS-CoV-2 게놈은 알파, 베타, 감마, 델타, 오미크론 계통 B.1.1.529, 오미크론 계통 BA.2, 람다, 뮤, 엡실론, 제타, 에타, 세타 및 이오타의 군으로부터 선택된 변이체의 게놈이다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 천연 SARS-CoV-2 게놈은 델타, 오미크론 계통 B.1.1.529 및 오미크론 계통 BA.2의 군으로부터 선택된 변이체로 부터 유래된 변이체의 게놈이다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 천연 SARS-CoV-2 게놈은 오미크론 계통의 게놈이다. 당업자는 해당 서열을 검색하는 방법을 인지하고 있다. 특정 구현예에서, 본원에 기재된 SARS-CoV-2 게놈은 모든 SARS-CoV-2 단백질의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100%를 코딩하는 서열이다. 특정 구현예에서, 본원에 기재된 SARS-CoV-2 게놈은 SARS-CoV-2 변이체를 기술하는 GISAID 데이터세트에 기술된 서열이다 (Khare, S., et al (2021) GISAID's Role in Pandemic Response. 중국 CDC 주간, 3(49): 1049-1051). 바람직하게는, 상기 GISAID 데이터 세트는 2023년 3월 28일 기준 1,529만 5,201개의 게놈 시퀀스 제출을 포함하는 SARS-CoV-2 변이체를 기술하는 GISAID 데이터 세트이고, 더 바람직하게는 2022년 10월 12일 기준 SARS-CoV-2 변이체를 기술하는 GISAID 데이터 세트이고, 더욱 더 바람직하게는 2022년 3월 28일 기준 SARS-CoV-2 변이체를 기술하는 GISAID 데이터 세트이다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 SARS-CoV-2 게놈은 수탁번호 MT108784 (서열 번호 7)를 갖는 서열이다. 상기 SARS-CoV-2 서열은 계속해서 돌연변이를 일으킨다. 당업자는 다른 바이러스와 미래의 돌연변이를 구별하는 방법을 인지하고 있다. 특정 구현예에서, 본원에 기재된 SARS-CoV-2 게놈 서열과 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 99.5% 동일한 서열은 하나 이상의 SARS-CoV-2 바이러스 단백질을 코딩하는 능력을 유지하는 경우 천연 SARS-CoV-2 게놈으로 간주된다. 일부 구현예에서, 천연 SARS-CoV-2 게놈은 del 69-70, RSYLTPGD246-253N, N440K, G446V, L452R, Y453F, S477G/N, E484Q, E484K, F490S, N501Y, N501S, D614G, Q677P/H, P681H 및 P681R의 군에서 선택된 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 SARS-CoV-2 게놈이다. 일부 구현예에서, 천연 SARS-CoV-2 게놈은 del 69-70, RSYLTPGD246-253N, N440K, G446V, L452R, Y453F, S477G/N, E484Q, E484K, F490S, N501Y, N501S, D614G, Q677P/H, P681H, P681R 및 A701V의 군에서 선택된 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 SARS-CoV-2 게놈이다.

[0071] 이와 같이, 천연 인간 코로나 바이러스(바람직하게는 SARS-CoV-2) 게놈 또는 이의 단편은 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 대한 참조 서열로서의 역할을 한다.

[0072] 천연 인간 코로나 바이러스 (바람직하게는 SARS-CoV-2) 게놈 또는 이의 단편과 관련하여 코돈의 맥락에서 용어 "상응하는" 은 코돈의 위치를 지칭한다. 당업자는 예를 들어, BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여, 예를 들어, 정렬 기술을 사용하여 대응하는 코돈의 위치를 결정하는 방법을 인지하고 있다. 당업자는 비교되는 서열의 전체 길이에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여, 서열을 정렬하고 위치를 결정하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다.

[0073] 본 발명자들은 인간 코로나 바이러스(바람직하게는 SARS-CoV-2) 바이러스가 코돈을 동의 원-투-스톱 코돈으로

대체함으로써 약독화될 수 있다는 것을 발견했다. 이러한 대체는 단백질 수준의 변화를 초래하지 않고 따라서 원래 바이러스와 동일하거나 유사한 면역 반응을 유도한다. 원-투-스톱 코돈의 존재는 돌연변이의 가능성을 증가시킴으로써 바이러스의 적합성을 감소시켜 임계 위치에서 종결 코돈을 생성할 수 있다. 본 발명자들은 인간 코로나 바이러스(바람직하게는 SARS-CoV-2)의 실질적인 약독화를 달성하기 위해 특정 수의 원-투-스톱 코돈이 요구된다는 것을 발견했다.

[0074] 따라서 본 발명은 약독화된 인간 코로나 바이러스가 특정 수의 원-투-스톱 코돈을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 안전하고 효율적으로 달성될 수 있다는 발견에 적어도 부분적으로 기초한다.

[0075] 더욱이, 특정한 원-투-스톱 코돈 대체는 코돈 쌍 탈최적화와 같은 다른 약독화 방법보다 특정하고 표적화된 대체를 위해 유전체에서 더 많은 위치를 가능하게 한다. 이와 같이, 약독화 및 면역원성 사이의 균형은 이전의 방법들보다 더 잘 최적화될 수 있다. 더욱이, 원-투-스톱 코돈은 돌연변이원의 존재뿐만 아니라 원-투-스톱 코돈의 위치 및 수에 의해 조절될 수 있는 표적화된 약독화도 허용한다.

[0076] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 제조하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 a) 천연 인간 코로나바이러스(바람직하게는 SARS-CoV-2) 게놈, 이의 단편 또는 cDNA 클론의 CDS를 제공하는 단계; 및 b) 천연 인간 코로나바이러스(바람직하게는 SARS-CoV-2) 게놈, 이의 단편 또는 상기 cDNA 클론의 역전사된 cDNA 서열을 각각 변형하는 단계를 포함하고, 상기 변형하는 단계는 천연 인간 코로나바이러스(바람직하게는 SARS-CoV-2) 게놈, 이의 단편 또는 역전사된 cDNA 서열에서 적어도 20개의 코돈을 적어도 20개의 원-투-스톱 코돈으로 대체하는 것을 포함하고, 원-투-스톱 코돈은 i) 천연 인간 코로나 바이러스(바람직하게는 SARS-CoV-2) 게놈, 이의 단편 또는 역전사된 cDNA 서열 내 상응하는 코돈과 비교하여 상이하지만 동의 코돈이고; ii) 종결 코돈과 단 하나의 뉴클레오티드가 상이하다.

[0077] 본 명세서에서 용어 천연 인간 코로나 바이러스 (바람직하게는 SARS-CoV-2) 게놈의 "CDS"는 천연 인간 코로나 바이러스(바람직하게는 SARS-CoV-2) 게놈의 코딩 서열을 지칭한다.

[0078] 본원에 기재된 변형 단계는 서열 변경을 지칭한다. 이러한 변경은 재합성, 메가뉴클레아제 및 크리스퍼를 포함하는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 달성될 수 있다.

[0079] 대체는 폴리뉴클레오티드에서 서열 부분 (예를 들어, 코돈)을 제거하고 원하는 서열 부분을 삽입하거나 및/또는 서열을 원하는 서열 부분으로 재합성함으로써 달성될 수 있다.

[0080] 본 발명자들은 천연 인간 코로나 바이러스(바람직하게는 SARS-CoV-2) 게놈의 CDS에서 특정 코돈을 대체하는 것이 충분한 코돈이 교체되는 경우 코딩된 인간 코로나 바이러스(바람직하게는 SARS-CoV-2)의 적합도를 감쇠시킬 수 있다는 것을 발견하였다.

[0081] 따라서, 본 발명은 약독화된 인간 코로나 바이러스(바람직하게는 SARS-CoV-2)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 특정 수의 코돈을 원-투-스톱 코돈으로 대체함으로써 생산될 수 있다는 발견에 적어도 부분적으로 기초한다.

[0082] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 본 발명의 방법에 관한 것으로, 원-투-스톱 코돈의 적어도 하나는 천연 SARS-CoV-2의 ORF1ab의 서열 부분, 천연 SARS-CoV-2의 구조 단백질을 코딩하는 서열 부분 또는 천연 SARS-CoV-2의 보조 단백질을 코딩하는 서열 부분에 상응하는 서열 부분 또는 단편에 포함된다.

[0083] 본 명세서에서 용어 "ORF1ab"는 천연 SARS-CoV-2의 개방 판독 프레임 1a 및/또는 b를 지칭한다.

[0084] 본 명세서에서 용어 "보조 유전자를 코딩하는 서열 부분"은 보조 단백질 ORF3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8, 9b, 9c 및/또는 10을 지칭한다.

[0085] 본 명세서에서 용어 "구조 단백질"은 SARS-CoV-2 단백질 S, E, M 및/또는 N을 지칭한다.

[0086] ORF1ab, 보조 유전자 및 구조 단백질은 SARS-CoV-2의 적합성과 재현성에 관련된 정보를 포함한다. 본 발명자들은 이들 서열 부분 내의 원-투-스톱 코돈이 SARS-CoV-2를 약독화시키는 데 특히 효과적이라는 것을 발견하였다. 이론에 얽매이지 않고, 이러한 영역에서 종결 코돈에 대한 돌연변이는 실질적으로 재생할 바이러스의 능력을 감소시키거나 제거할 것이다.

[0087] 따라서, 본 발명은 ORF1ab, 보조 유전자 및 구조 단백질을 코딩하는 서열 부분 내의 원-투-스톱 코돈이 SARS-CoV-2를 약독화시키는 데 특히 효과적이라는 발견에 적어도 부분적으로 기초하고 있다.

[0088] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 또는 본 발명의 방법에 관한 것으로, 원-투-스톱 코

돈의 적어도 하나는 천연 SARS-CoV-2의 ORF1ab의 서열 부분에 상응하는 서열 부분 또는 단편에 포함된다.

[0089] ORF1ab는 SARS-CoV-2의 적합성과 재현성과 특히 관련이 있다. 본 발명자들은 이들 서열 부분 내의 원-투-스톱 코돈이 SARS-CoV-2를 약독화시키는 데 특히 효과적이라는 것을 발견하였다. 이론에 얽매이지 않고, 이러한 영역에서 종결 코돈에 대한 돌연변이는 실질적으로 재생할 바이러스의 능력을 감소시키거나 제거할 것이다.

[0090] 따라서, 본 발명은 ORF1ab를 코딩하는 서열 부분 내의 원-투-스톱 코돈이 SARS-CoV-2를 약독화시키는 데 특히 효과적이라는 발견에 적어도 부분적으로 기초하고 있다.

[0091] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 본 발명의 방법에 관한 것으로, 원-투-스톱 코돈의 적어도 하나는 천연 SARS-CoV-2의 Nsp2 내지 Nsp15를 코딩하는 서열에 상응하는 서열 부분 또는 단편에 포함된다.

[0092] 따라서, 본 발명은 Nsp2 내지 Nsp15를 코딩하는 서열 부분 내의 원-투-스톱 코돈이 SARS-CoV-2를 약독화시키는 데 특히 효과적이라는 발견에 적어도 부분적으로 기초하고 있다.

[0093] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 또는 본 발명의 방법에 관한 것으로, 원-투-스톱 코돈의 적어도 하나는 천연 SARS-CoV-2의 Nsp2 내지 Nsp7를 코딩하는 서열에 상응하는 서열 부분 또는 단편에 포함된다.

[0094] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 본 발명의 방법에 관한 것으로, 원-투-스톱 코돈의 적어도 하나는 천연 SARS-CoV-2의 Nsp13 내지 Nsp15를 코딩하는 서열에 상응하는 서열 부분 또는 단편에 포함된다.

[0095] 따라서, 본 발명은 특정 서열 부분 내의 원-투-스톱 코돈이 SARS-CoV-2를 약독화시키는 데 특히 효과적이라는 발견에 적어도 부분적으로 기초하고 있다.

[0096] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 본 발명의 방법에 관한 것으로, 원-투-스톱 코돈은 천연 SARS-CoV-2 게놈 상의 위치에 상응하는 표 1로부터 선택된 위치를 갖는 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개 또는 적어도 19개의 원-투-스톱 코돈을 포함한다.

[0097] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 본 발명의 방법에 관한 것으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 내의 원-투-스톱 코돈 중 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%가 천연 SARS-CoV-2 게놈 상의 위치에 상응하는 표 1에서 선택된 위치를 갖는다.

[0098] 따라서, 본 발명은 특정 위치내의 원-투-스톱 코돈이 SARS-CoV-2를 약독화시키는 데 특히 효과적이라는 발견에 적어도 부분적으로 기초하고 있다.

[0099] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 본 발명의 방법에 관한 것으로, 적어도 20개의 원-투-스톱 코돈에 의해 코딩된 아미노산은 Leu, Ser, Arg 및/또는 Gly로 구성된다.

[0100] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 본 발명의 방법에 관한 것으로, 원-투-스톱 코돈에 의해 코딩된 아미노산은 Leu 및/또는 Ser로 구성된다.

[0101] Leu와 Ser은 많은 조합을 통해 원-투-스톱 코돈을 설계하도록 한다.

[0102] 따라서, 본 발명은 특정 아미노산이 특히 효과적인 원-투-스톱 코돈인 코돈에 의해 코딩된다는 발견에 적어도 부분적으로 기초하고 있다.

[0103] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 본 발명의 방법에 관한 것으로, 적어도 20개의 원-투-스톱 코돈은 적어도 20개, 적어도 25개, 적어도 30개, 적어도 35개, 적어도 40개, 적어도 45개, 적어도 50개, 적어도 55개, 적어도 60개, 적어도 65개, 적어도 70개, 적어도 75개, 적어도 80개, 적어도 85개, 적어도 90개, 적어도 95개, 적어도 100개, 적어도 105개, 적어도 110개, 적어도 115, 적어도 120개의 원-투-스톱 코돈이다.

[0104] 따라서, 본 발명은 인간 코로나바이러스(바람직하게는 SARS-CoV-2)의 약독화가 특정 수의 원-투-스톱 코돈을 사용할 경우 상당하다는 발견에 적어도 부분적으로 기초하고 있다.

[0105] 본 발명자들은 원-투-스톱 코돈을 포함하는 두 개의 단편을 결합하면 특히 코딩된 SARS-CoV-2 바이러스를 약독화한다는 것을 발견하였다.

[0106] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 본 발명의 방법에 관한 것으로, 적어도 20개, 적어도 25개, 적어도 30개, 적어도 35개, 적어도 40개, 적어도 45개, 적어도 50개, 적어도 55개 또는 적어도 60개의 원-투-스톱 코돈이 하나의 단편에 포함된다.

[0107] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 관한 것으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 천연 SARS-CoV-2의 Nsp1 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하지 않거나 천연 SARS-CoV-2의 Nsp1에 비해 감소된 Nsp1 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함한다.

[0108] Nsp1의 기능은 특성화되어 있으며 (예를 들어, Min, Yuan-Qin, et al. Frontiers in microbiology (2020): 2393 참조) 숙주 mRNA 번역 억제 및 염증성 사이토카인 유도를 포함한다. 따라서 Nsp1 기능이 감소하거나 없어지면 약독화된 바이러스에 의해 유발되는 숙주(세포) 스트레스가 감소한다. 따라서, 이론에 얽매이지 않고 원-투-스톱 메커니즘은 Sars-CoV-2의 재현성과 감염성을 약화시키는 반면, 감소된 Nsp1 기능은 약독화된 Sars-CoV-2에 의해 유발되는 부작용을 감소시키고, 세포 번역이 차단되지 않기 때문에 감염에 대한 숙주 세포의 반응을 증가시킨다.

[0109] 따라서, 본 발명은 원-투-스톱 코돈 약독화와 감소된 Nsp1의 조합이 상승 효과를 갖는다는 발견에 적어도 부분적으로 기초하고 있다.

[0110] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 관한 것으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 천연 SARS-CoV-2의 ORF6 유전자에 의해 코딩된 단백질의 기능을 가진 단백질을 코딩하는 서열을 포함하지 않거나 천연 SARS-CoV-2의 ORF6 유전자에 의해 코딩된 단백질의 감소된 기능을 가진 단백질을 코딩하는 서열을 포함한다.

[0111] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 관한 것으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 천연 SARS-CoV-2의 ORF7a 유전자에 의해 코딩된 단백질의 기능을 가진 단백질을 코딩하는 서열을 포함하지 않거나 천연 SARS-CoV-2의 ORF7a 유전자에 의해 코딩된 단백질의 감소된 기능을 가진 단백질을 코딩하는 서열을 포함한다.

[0112] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 관한 것으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 천연 SARS-CoV-2의 ORF7b 유전자에 의해 코딩된 단백질의 기능을 가진 단백질을 코딩하는 서열을 포함하지 않거나 천연 SARS-CoV-2의 ORF7b 유전자에 의해 코딩된 단백질의 감소된 기능을 가진 단백질을 코딩하는 서열을 포함한다.

[0113] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 관한 것으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 천연 SARS-CoV-2의 ORF8 유전자에 의해 코딩된 단백질의 기능을 가진 단백질을 코딩하는 서열을 포함하지 않거나 천연 SARS-CoV-2의 ORF8 유전자에 의해 코딩된 단백질의 감소된 기능을 가진 단백질을 코딩하는 서열을 포함한다.

[0114] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 관한 것으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 천연 SARS-CoV-2의 a) ORF8 유전자 및 ORF6 유전자, b) ORF8 유전자 및 ORF7a 유전자, c) ORF8 유전자 및 ORF7b 유전자, d) ORF6 유전자 및 ORF7a 유전자, e) ORF6 유전자 및 ORF7b 유전자, 또는 f) ORF7a 유전자 및 ORF7b 유전자에 의해 코딩된 단백질의 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하지 않거나, 천연 SARS-CoV-2의 a)-f)의 각 유전자 조합에 의해 코딩된 단백질의 감소된 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함한다.

[0115] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 관한 것으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 천연 SARS-CoV-2의 a) ORF8 유전자 및 ORF6 유전자 및 ORF7a 유전자, b) ORF8 유전자 및 ORF6 유전자 및 ORF7b 유전자, c) ORF7b 유전자 및 ORF6 유전자 및 ORF7a 유전자, 또는 d) ORF8 유전자 및 ORF7b 유전자 및 ORF7a 유전자에 의해 코딩된 단백질의 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하지 않거나, 천연 SARS-CoV-2의 a)-d)의 각 유전자 조합에 의해 코딩된 단백질의 감소된 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함한다.

[0116] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 관한 것으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 천연 SARS-CoV-2의 ORF8 유전자 및 ORF6 유전자, 그리고 ORF7a 유전자 및 ORF7b 유전자에 의해 코딩된 단백질의 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하지 않거나, 천연 SARS-CoV-2의 ORF8 유전자 및 ORF6 유전자, 그리고 ORF7a 유전자 및 ORF7b 유전자에 의해 코딩된 단백질의 감소된 기능을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함한다.

[0117] ORF6와 ORF8의 기능은 특징지어지고, 면역 회피 메커니즘을 포함하며 바이러스 숙주 상호작용에 관여한다. 따라서 ORF6 유전자, ORF7a 유전자, ORF7b 유전자 및/또는 ORF8 유전자의 기능이 감소하거나 없어지면 면역 체계가 확실히 인지할 수 있거나 약독화된 바이러스의 바이러스 숙주 상호작용이 손상될 수 있다. 따라서, 이론에 얽매이지 않고 원-투-스톱 메커니즘은 Sars-CoV-2의 재현성과 감염성을 약화시키는 반면, ORF6 유전자, ORF7a 유전

자, ORF7b 유전자 및 ORF8 유전자에 의해 발현되는 단백질의 부재 또는 감소된 기능은 면역 체계의 인식을 증진시키고/시키거나 약독화된 SARS-CoV-2의 바이러스 숙주 상호작용을 손상시키고/시키거나 특정 면역 반응을 유도하는데 요구되는 약독화된 SARS-CoV-2의 용량을 감소시킨다.

[0118] 따라서, 본 발명은 원-투-스톱 코돈 약독화와 ORF6, ORF7a 유전자, ORF7b 유전자 및/또는 ORF8 결실 또는 변형의 조합이 상승 효과를 갖는다는 발견에 적어도 부분적으로 기초한다.

[0119] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 관한 것으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 스파이크 단백질을 코딩하는 서열 부분을 포함하고, 상기 스파이크 단백질은 천연 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질의 절단 부위에 비해 변형되거나 제거된 절단 부위를 포함한다.

[0120] 본 발명자들은 약독화된 SARS-CoV-2의 생산 시, 바이러스가 숙주 세포에서 돌연변이를 일으켜 스파이크 단백질의 절단 부위를 변형하거나 제거하는 경향이 있다는 것을 발견하였다. 시작 시퀀스에서 변형 또는 제거된 절단 부위를 포함하는 서열로 시작함으로써, 서열은 더욱 균일하고/또는 보다 효율적으로 복제된다.

[0121] 본 발명자들은 약독화된 SARS-CoV-2로 감염 시, 공동 수용된 동물에 대한 바이러스 전염율은, 스파이크 단백질 내 절단 부위가 없는 약독화된 SARS-CoV-2가 사용될 때 없거나 감소되었다.

[0122] 본 발명자들은 스파이크 단백질에서 절단 부위가 없는 약독화된 SARS-CoV-2의 복제가 상기도의 점막 조직에서 여전히 효율적이지만, 폐에서의 복제는 감소되었다는 것을 발견하였다.

[0123] 따라서, 본 발명은 스파이크 단백질의 절단 부위를 변형 또는 제거하면 약독화된 SARS-CoV-2 바이러스의 생산이 개선되고, 전염이 감소하며, 하부 호흡기에서 복제가 감소한다는 발견에 적어도 부분적으로 기초한다.

[0124] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드에 관한 것으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 6으로 정의된 서열로 구성되거나 이를 포함한다.

[0125] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터에 관한 것이다.

[0126] 본원에 사용된 용어 "벡터"는 세포에 의해 통합되고 발현되거나 상이한 숙주 세포 사이의 전달을 위해 설계된 핵산 분자를 지칭한다. 클로닝 또는 발현 벡터는 예를 들어 조절 및/또는 전사 후 조절 요소와 프로모터 등의 요소를 포함할 수 있다. 벡터는 세포에서 직접적인 자율 복제를 허용하는 서열을 포함할 수 있거나 숙주 세포 DNA로의 통합을 허용하기에 충분한 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 벡터는 플라스미드 (예를 들어, DNA 플라스미드 또는 RNA 플라스미드), 셔틀 벡터, 트랜스포존, 코즈미드, 인공 염색체 (예를 들어, 박테리아, 효모, 인간) 및 바이러스 벡터의 군으로부터 선택된 벡터이다.

[0127] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 벡터는 적어도 하나의 형질감염 증진제, 예를 들어 올리고뉴클레오티드, 리포플렉스, 폴리머좀, 폴리플렉시, 덴드리머(dendrimers), 무기 나노입자 및 세포 침투 펩티드의 군으로부터 선택되는 형질감염 증진제와 조합하여 사용된다.

[0128] 본 발명의 벡터에 의한 숙주 세포의 형질 도입은 안정적 형질 도입 또는 일시적 형질 도입을 통해 달성될 수 있다(예: Stepanenko, A. A., 및 Heng, H. H., 2017, 돌연변이 연구/돌연변이 연구 리뷰, 773, 91-103 참조).

[0129] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자 변형된 세포에 관한 것이다.

[0130] 본원에 사용된 용어 "유전자 변형된 세포"는 유전 공학에 의해 변형된 세포를 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "조작된(engineered)" 및 이의 다른 문법적 형태는 핵산, 예를 들어 유기체의 게놈 내의 핵산의 하나 이상의 변화를 지칭할 수 있다.

[0131] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 유전자 변형된 세포는 약독화된 인간 코로나 바이러스(바람직하게는 sars-cov-2)의 생산을 위한 또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 증폭을 위한 숙주 세포이다. 본원에 사용된 용어 "숙주 세포"는 이러한 세포의 자손을 포함하는 외인성 핵산이 도입된 세포를 지칭한다. 숙주 세포는 "형질전환체" 및"형질전환된 세포" 를 포함하며, 이는 1 차 형질전환된 세포 및 그로부터 유래된 자손(progeny)을 계대의 수에 상관없이 포함한다. 자손은 핵산 내용물이 모체 세포와 완전히 동일하지 않을 수 있으며, 반면 돌연변이를 포함할 수 있다. 본래 형질전환된 세포에서 스크리닝되거나 또는 선택된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이체 자손이 본 명세서에 포함된다.

[0132] 일부의 경우, 본원에 기재된 숙주 세포는 Vero, VeroE6, VeroE6-TMPRSS2, A549-hACE2, HEK293, MDCK, 중국 햄스터 난소(CHO), BHK-21, SF9, MRC 5, Per.C6, PMK 및 WI-38의 군에서 선택된 적어도 하나의 세포 유형을 포함

한다.

[0133] 일부 구체예에서, 유전자 변형된 세포는 세포 요법에 사용하기 위한 세포이다.

[0134] 특정 구현예에서, 본 발명은 약독화 바이러스의 제조 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 본 발명의 유전자 변형된 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

[0135] 세포 배양 방법은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, Celis, Julio E., ed. 세포생물학: 실험실 핸드북. 1권. 엘스비어, 2005 참조).

[0136] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 약독화 바이러스에 관한 것이다.

[0137] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 약독화된 바이러스는 SARS-CoV-2의 구조 단백질, 바람직하게는 SARS-CoV-2의 모든 구조 단백질을 추가로 포함한다.

[0138] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 벡터, 본 발명의 유전자 변형된 세포 및/또는 본 발명의 약독화 바이러스를 포함하는 약제학적 제품에 관한 것이다.

[0139] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 벡터, 본 발명의 유전자 변형된 세포 및/또는 본 발명의 약독화 바이러스를 포함하는 약제로 사용하기 위한 약제학적 제품에 관한 것이다.

[0140] 본원에 사용된 용어 "약제학적 제품"은 그 안에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적일 수 있도록 하는 형태의 제제를 의미하며, 제제가 투여될 개체에게 허용가능하지 않게 독성인 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 의미한다.

[0141] 본원에 사용된 용어 "약제로의 사용" 또는 "치료"(및 "치료하다 (treat)" 또는 "치료하는 (treating)"와 같은 문법적 변형)는 치료되고 있는 개체의 자연스러운 과정을 변경하려는 시도로 임상 개입을 지칭하며, 예방 또는 임상병리 과정 중에 수행될 수 있다. 바람직한 치료 효과는 이에 국한되지는 않지만, 질병의 발생 또는 재발 방지, 증상의 완화, 질병의 임의의 직접적 또는 간접적인 병리학적 결과를 감소, 질병 진행의 비율 감소, 질병 상태의 개선 또는 동화, 및 완치되거나 개선된 예후를 포함한다.

[0142] 일부 구현예에서, 약제학적 제품은 예를 들어 환자의 면역 반응을 향상시키기 위한 담체 및/또는 보조제와 같은 보조 물질을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 보조제는 칼륨 백반; 수산화 알루미늄; 인산 알루미늄; 수산화 인산 칼슘; 수산화인산 알루미늄 황산염; 파라핀 오일; 프로폴리스; 보르데텔라 페르투시스(Bordetella pertussis) 또는 마이코박테리움 보비스(Mycobacterium bovis) 종의 사멸된 박테리아; 퀼라야(Quillaja), 대두 및/또는 폴리갈라 세네가(Polygala senega)의 식물 사포닌; 사이토카인 IL-1, IL-2 및/또는 IL-12; 그리고 프로인트 완전 보조제의 군에서 선택된 적어도 하나이다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 약제학적 제품은 본 발명의 벡터 및 벡터 안정화제 및/또는 나노입자, 예컨대 LNPs를 포함한다.

[0143] 투여량은 약제학적 제품이 환자에 의해 잘 용인될 뿐만 아니라 감염에 대한 보호 또는 감염의 심각한 진행에 대한 보호와 같은 원하는 의료 효과를 제공하는 면역 반응을 유발시키도록 선택된다. 일 구현예에서, 투여량은 최저 보호 투여량, 최고 허용 가능한 투여량 또는 최저 보호 용량과 최고 허용 가능한 용량 사이에 있다.

[0144] 일부 구현예에서, 약제학적 제품은 본 발명의 벡터를 개체의 체중 1 kg 당 (vg/kg) 최소한 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 10^{13}, 10^{14}, 10^{15}, 10^{16} 이상의 벡터 게놈의 용량으로 포함한다.

[0145] 일부 구현예에서, 약제학적 제품은 본 발명의 약독화된 바이러스를 $1*10^3$ 내지 $1*10^8$ 플라크-형성 유닛(pfu) 또는 포커스 형성 유닛(ffu), 특히 $1*10^4$ 내지 $1*10^7$ PFU 또는 FFU, 특히 $1*10^5$ 내지 $1*10^6$ PFU 또는 FFU의 용량으로 포함한다.

[0146] 다양한 인자는 특정 용도에 사용되는 투여량에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 투여 빈도, 치료 기간, 예방 또는 치료 목적, 다중 치료제 사용, 투여 경로, 이전 요법, 환자의 임상적 이력, 주치의의 판단 및 질병의 중증도, 장애 및/또는 상태는 투여될 필요 용량에 영향을 미칠 수 있다.

[0147] 용량과 마찬가지로, 다양한 요인들이 특정 용도에 사용되는 실제 투여 빈도에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 투여량, 치료 기간, 다중 치료제의 사용, 투여 경로, 질병, 장애 및/또는 상태의 중증도(severity)에 따라 투여 빈도를 증가 또는 감소시킬 필요가 있다.

[0148] 일부 경우에서, 본 발명의 약제학적 제품 (및 임의의 추가적인 치료제)을 투여하기 위한 유효 기간은 개체에게

상당한 독성을 유발하지 않으면서 치료할 질병, 장애 및/또는 상태의 증상의 심각성 또는 발생을 줄이는 임의의 지속기간일 수 있다. 다수의 인자는 특정 치료에 사용되는 실제 유효 기간에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 유효 기간은 투여 빈도, 유효량, 다중 치료제의 사용, 투여 경로, 및 치료되는 질환, 장애 및/또는 상태의 중증도에 따라 달라질 수 있다.

[0149] 일부 구현예에서, 약제학적 제품은 한 번에 환자에게 투여된다. 일부 구현예에서, 약제학적 제품은 적어도 2회 환자에게 투여되며, 제2 투여는 제1 기간 동안 제1 투여로부터 분리된다. 이러한 맥락에서, 제1 기간은 2 주 내지 36 개월, 특히 3 주 내지 30 개월, 특히 4 주 내지 24 개월, 특히 5 주 내지 21 개월, 특히 6 주 내지 18 개월, 특히 7 주 내지 15 개월, 특히 8 주 내지 12 개월, 특히 9 주 내지 10 개월, 특히 10 주 내지 8 개월, 특히 12 주 내지 6 개월, 특히 13 주 내지 4 개월의 범위 내에 있다.

[0150] 일 구현예에서, 약제학적 제품은 환자에게 상이한 백신(예를 들어, 벡터-기반 백신, mRNA-기반 백신, 단백질-기반 백신)을 투여하는데 있어서 일시적으로 오프셋된 환자에게 투여된다. 즉, 다른 백신으로 환자를 예방 접종하기 전이나 후이다. 이러한 맥락에서, 약제학적 제품의 투여는 제2 기간에 의해 상이한 백신의 투여로 오프셋된다. 이러한 맥락에서, 제2 기간은 2 주 내지 36 개월, 특히 3 주 내지 30 개월, 특히 4 주 내지 24 개월, 특히 5 주 내지 21 개월, 특히 6 주 내지 18 개월, 특히 7 주 내지 15 개월, 특히 8 주 내지 12 개월, 특히 9 주 내지 10 개월, 특히 10 주 내지 8 개월, 특히 12 주 내지 6 개월, 특히 13 주 내지 4 개월의 범위 내에 있다.

[0151] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 벡터, 본 발명의 유전자 변형된 세포 및/또는 본 발명의 약독화된 바이러스를 포함하는 인간 코로나 바이러스(바람직하게는 SARS-CoV-2) 감염의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 약제학적 제품에 관한 것이다.

[0152] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 벡터, 본 발명의 유전자 변형된 세포 및/또는 본 발명의 약독화된 바이러스를 포함하는 인간 코로나 바이러스(바람직하게는 SARS-CoV-2) 감염 증상의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 약제학적 제품에 관한 것이다.

[0153] SARS-CoV-2 감염 증상은 기침, 피로, 호흡곤란 (difficulty breathing), 오한, 관절 또는 근육통, 가래 배출, 객담, 호흡장애 (dyspnoea), 근육통, 관절통 또는 인후통, 두통, 메스꺼움, 구토, 설사, 부비동 통증, 코막힘, 후각 또는 미각 감소 또는 변화, 식욕 부진, 체중 감소, 복통, 결막염, 피부 발진, 림프종, 무관심, 및 기면을 포함하지만 이에 국한되지 않으며, 바람직하게는 발열, 기침, 피로, 호흡곤란(difficulty breathing), 오한, 관절 또는 근육통, 가래 배출, 객담, 호흡장애(dyspnoea), 근육통, 관절통, 인후통, 두통, 메스꺼움, 구토, 설사, 부비동 통증, 코막힘 및 후각 또는 미각 감소 또는 변화를 포함한다.

[0154] 본 발명자들은 본원에 기재된 수단 및 방법이 인간 코로나 바이러스(바람직하게는 sars-cov-2) 감염의 치료 및/또는 예방에 유용한 면역 반응을 유도하는데 사용될 수 있다는 것을 발견하였다. 특정 구현예에서, 본원에 기재된 약제학적 제품은 백신 및/또는 백신 부스터이다.

[0155] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 사용을 위한 약제학학 제품에 관한 것으로, 상기 약제학적 제품은 돌연변이원을 더 포함한다.

[0156] 치료학적 유효량의 약제학적 제품을 개체에 투여하는 방법을 포함하는 치료 및/또는 예방 방법으로서, 상기 약제학적 제품은 본 발명의 벡터, 본 발명의 유전자 변형된 세포 및/또는 본 발명의 약독화된 바이러스를 포함한다.

[0157] 본 발명의 치료 및/또는 예방 방법에 있어서, 상기 치료 및/또는 예방은 인간 코로나 바이러스(바람직하게는 SARS-CoV-2) 감염의 치료 및/또는 예방이다.

[0158] 본 발명의 치료 및/또는 예방 방법은 치료학적 유효량의 돌연변이원을 개체에게 투여하는 단계를 더 포함한다.

[0159] 특정 구현예에서, 본 발명은 약독화된 바이러스 또는 그의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 돌연변이원(mutagen)의 조합에 관한 것으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 적어도 20개의 원-투-스톱 코돈을 포함하고, 원-투-스톱 코돈은 i) 천연 바이러스 게놈 또는 이의 단편 내 상응하는 코돈과 비교하여 상이하지만 동의 코돈이고; ii) 종결 코돈과 단 하나의 뉴클레오티드가 상이하다. 약독화된 바이러스는 바람직하게는 인간 코로나 바이러스, 보다 바람직하게는 베타 코로나 바이러스, 더욱 더 바람직하게는 SARS-CoV-2이다.

[0160] 상기 조합은 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 이와 같이, 본원에 기재된 돌연변이원의 투여는 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드의 투여 전, 동시 및/또는 투여 후에 이루어질 수 있다. 특정 구현예에서, 본원에 기재된 조합은 동시 투여를 위한 조성물 또는 동시 또는 순차적 투여를 위한 여러 별개의 조성물의 조합이다. 본원

에 기재된 돌연변이원 및 폴리뉴클레오티드는 동일한 투여 경로(예를 들어, 비경구)에 의해 또는 상이한 투여 경로(예를 들어, 본원에 기재된 돌연변이원의 경구 투여 및 폴리뉴클레오티드의 비경구 투여)에 의해 투여될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 본원에 기재된 돌연변이원은 반복적으로 투여되고, 바람직하게는 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드보다 더 자주 투여된다.

[0161] 따라서, 폴리뉴클레오티드에서 코딩된 약독화는 돌연변이원에 의해 향상될 수 있다. 따라서, 돌연변이원은 일반적이지 않은 면역 반응(예: 더 강한 부작용, 평소보다 더 많은 생체 내 증식)이 예상되거나 관찰되는 개체에 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 본원에 기재된 돌연변이원 및 폴리뉴클레오티드의 조합은 면역 체계 기능이 바뀐 개체에게 투여된다. 면역 체계 기능 변화는 질병이나 장애(예를 들어, 감염, 자가면역 질환, 암, 면역결핍증(후천성 또는 선천성) 또는 비만 등) 및/또는 면역 조절 치료(예를 들어, DMARD, IMiDs 및/또는 종양 치료)에 의해 유발될 수 있지만, 이에 국한되지는 않는다.

[0162] 또는, 약독화된 바이러스에 대한 면역 반응은 측정될 수 있고, 특정 임계값에 도달하면 돌연변이원을 투여함으로써 중단될 수 있거나 조작될 수 있다.

[0163] 상기 돌연변이원은 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 대신 본 발명의 약독화된 바이러스, 본 발명의 숙주 세포 또는 본 발명의 벡터와 동등하게 조합될 수 있다. 특정 구현예에서, 본원에 기재된 돌연변이원은 RNA-뉴클레오티드 유사체이다. 특정 구현예에서, 본원에 기재된 돌연변이원은 5-플루오로우라실(5-fluorouracil) 또는 몰누피라비르 (Malnupiravir)이다.

[0164] 이와 같이, 본 발명은 원-투-스톱 약독화된 바이러스의 감쇠가 돌연변이원에 의해 조절될 수 있다는 발견에 적어도 부분적으로 기초하고 있다.

[0165] 폴리뉴클레오티드의 모든 구현예는 임의의 원하는 방식으로 조합될 수 있으며, 개별적으로 또는 임의의 조합으로 약독화된 인간 코로나 바이러스(바람직하게는 SARS-CoV-2), 약학 조성물, 이의 용도, 치료 방법, 벡터, 숙주 세포 및 바이러스 제조 방법에 적용될 수 있다.

[0166] "a," "an," 및 "the"는 본 명세서에서 관사의 문법적 목적어 중 하나 또는 하나 이상(즉, 적어도 하나 또는 하나 이상)을 지칭하는 데 사용된다. "또는" 은 대안들의 하나, 둘 모두, 또는 이들의 임의의 조합을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. "및/또는" 은 대안 중 하나 또는 둘 모두를 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

[0167] 본 명세서 전반에 걸쳐, 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 단어 "포함하다(comprise)," "포함하다(comprises)" 및 "포함하는(comprising)" 은 명시된 단계나 요소 또는 단계나 요소 그룹을 포함하는 것을 의미하지만, 다른 단계나 요소 또는 단계나 요소 그룹을 제외하는 것을 의미하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0168] 용어 "포함하다(include)" 및 "포함하다(comprise)"는 동의어로 사용된다. "바람직하게는" 은 다른 옵션을 배제하지 않고 일련의 옵션 중 하나의 옵션을 의미한다. "예를 들어 (e.g.)"는 언급된 예에 제한 없이 하나의 예를 의미한다. "로 이루어진(consisting of)"은 "로 이루어진" 어구 뒤에 나오는 모든 것을 포함하고 이에 국한됨을 의미한다.

[0169] 본 명세서 전반에 걸쳐 "일 구현예," "구현예," "특정 구현예," "관련 구현예," "특정 구현예," "추가 구현예," "일부 구현예," "구체적 구현예" 또는 "추가 구현예" 또는 이들의 조합은 구현예와 관련하여 설명된 특정 특징, 구조 또는 특성이 본 발명의 적어도 하나의 구현예에 포함된다는 것을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전반에 걸쳐 다양한 위치에서 전술한 문구의 언급은 반드시 모두 동일한 구현예를 지칭하는 것은 아니다. 더욱이, 특정한 특징들, 구조들 또는 특성들은 하나 이상의 구현예에서 임의의 적합한 방식으로 조합될 수 있다. 또한, 일 구현예에서, 어떤 특징을 긍정적으로 언급하는 것은 특정 구현예에서 그 특징을 배제하기 위한 근거로 사용된다는 것도 이해해야 한다.

[0170] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 및 과학 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 물질이 아래에 기술된다. 충돌의 경우에는, 정의를 포함하는 본 명세서가 우선할 것이다. 또한, 물질, 방법 및 예는 단지 예시적인 것이며 본 발명을 제한하려는 의도는 아니다.

[0171] 본 명세서에 기술된 일반적인 방법 및 기술은 당업계에 잘 알려진 통상적인 방법에 따라 수행될 수 있으며, 달리 명시되지 않는 한 본 명에서 전체에서 인용되고 논의되는 다양한 일반적인 참조문헌 및 보다 구체적인 참조문헌에 기술된 대로 수행될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory 수동,

2d ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) and Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), and Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990)] 참조.

[0172] 발명의 여러 측면들이 도면과 앞서 설명한 내용에 상세하게 예시되고 설명되지만, 그러한 예시 및 설명은 예시적인 또는 예시적이고 제한적이지 않는 것으로 간주되어야 한다. 이하의 청구항의 범위 및 사상 내에서 통상의 기술을 가진 자라면 변경 및 수정을 가할 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 특히, 본 발명은 상기 및 하기에 기술된 다양한 구현예의 특징을 임의로 조합한 추가 구현예를 포괄한다.

도면의 간단한 설명

[0173] 도면의 간단한 설명

도 1: 효모에서 "형질전환 관련 재조합"(TAR) 클로닝을 사용한 재조합 SARS-CoV-2 생성을 개략적으로 도시한 것으로, 이후 재조합 SARS-CoV-2 RNA 게놈과 유사한 시험관 내 전사 RNA를 생성하고, 이후 바이러스 표현형을 평가함.

도 2: SARS-CoV-2 게놈; 모듈식, 원-투-스톱 (OTS) 클로닝 전략

도 3: 1차 기도 상피 배양물에서의 SARS-CoV-2-OTS 복제. 바이러스 역가(조직 배양 감염량 50%; TCID50)를 감염 후 0(접종물), 1, 24, 48, 72, 96 시간에 정단 세척액에서 측정하였다. A: OTS-클론: 33 ° C에서 hNEC에서의 96시간 반응 속도; B: OTS-클론: 37 ° C에서 hNEC에서의 96시간 반응 속도

도 4: OTS8, OTS4-5는 약독화에 대한 평가가 이루어졌다.

A: 체중, B: 임상 점수, C: 조직병리학적 점수, D: 바이러스 카피, E: 바이러스 역가

도 5: OTS2, OTS7 및 OTS7-8은 약독화에 대한 평가가 이루어졌다.

A: 체중, B: 임상 점수, C: 조직병리학적 점수, D: 바이러스 카피, E: 바이러스 역가

도 6: OTS4-5 및 OTS7-8 약독화 및 보호. 마우스를 OTS4-5, OTS-7-8로 면역화하였다. 7일째에 마우스의 절반을 분석을 위해 안락사시켰다. 병원성 야생형 바이러스로 챌린지는 면역화 후 21일째에 수행되었다.

A: 챌린지 전 생존율 B: 챌린지 후 생존율(A와 B에서 면역 후 7일째에 마우스의 50%가 분석을 위해 안락사됨에 유의), C: 챌린지 전 체중 D: 챌린지 후 체중 E: 챌린지 전 점수, F: 챌린지 후 점수 G: 면역 후 7일째 바이러스 카피: 임상 점수가 높고 체중이 감소한 동물 H: 26일째(챌린지 후 5일째)의 바이러스 카피, I: 35일째(챌린지 후 14일째)의 바이러스 카피, J: 챌린지 전 바이러스 카피 구강인두 면봉, K: 챌린지 후 바이러스 카피 구강인두 면봉, L: 챌린지 후 5일째 바이러스 역가 M: 챌린지 후 14일째 바이러스 역가

도 7: OTS4-5 및 OTS7-8 약독화 및 보호

A: 우한 WT에 대한 중화 항체 검사: 중화 항체 역가, B: 스파이크 특이적 CD8+ T 세포: T 세포 반응, C 조직병리학적 점수,

도 8: OTS4-5 및 OTS4-5-7-8은 약독화에 대한 평가가 이루어졌다.

A: 생존율, B: 임상 점수, C: 체중, D: 면봉, E-G: RNA, H-I: PFU

도 9: 구조체 개요

도 10: 원투스톱 4-5/7-8 구조체를 가진 천연 시리아 햄스터 (또한 페럿(ferr)/마우스)

P = 비강 세척

A:

비강 내 접종: 5000 PFU/햄스터, OTS4-5/7-8 접종 N=10, WT 접종 대조군 N=4, OTS4-5/7-8 접촉 N=4; 공동 수용: 접촉 그룹의 공동 수용; 부검 1: 접종군과 대조군의 절반 부검; 부검 2: 접종군과 접촉군 5개 부검

B:

비강 내 접종: 5000 PFU/햄스터, OTS4-5/7-8 접종 N=8, OTS4-5/7-8 접촉 N=3; 챌린지: 접종 및 N=4 천연 대조

군에 WT 5000 PFU/햄스터로 챌린지하고 접촉 군의 공동 수용; 부검: 접종군 및 접촉군의 부검. 5 dpc 부검에 적용할 수 있다.

도 11: A: 햄스터 생존율; B: 상대 체중

도 12: 게놈 카피

도 13: OTS 접종 동물과 직접 접촉 동물의 체액 면역 반응(RBD-ELISA-데이터). FCS 결실되면, 최종 OTS의 천연 접촉 동물로의 감염이 방지된다.

도 14: WT 또는 최종 OTS 접종 5일 후 조직 특이적 유전자 카피.

도 15: 14 dpc에서 체액 면역 반응(RBD-ELISA-데이터). 최종 OTS (SEQ ID NO: 6)는 천연 접촉 동물로의 챌린지 바이러스 감염을 방지한다.

도 16: A: 5-FU:

세포: VeroET 세포; 30분 전처리; ID3 및 ID194로 1시간 동안 MOI 0.1로 감염; 접종물을 제거하고 농도가 40-280 uM 범위인 DMEM+ 약물을 첨가; 수확 및 TCID50 24시간 pi

B: 몰누피라비르:

세포: VeroET 세포; 30분 전처리; ID3 및 ID194로 1시간 동안 MOI 0.1로 감염; 접종물을 제거하고 농도가 0.1 내지 10 uM 범위인 DMEM+ 약물을 첨가; 수확 및 TCID50 24시간 pi

도 17

인간 기관지 상피 세포(hBEC) 배양물을 SARS-CoV-2 WT뿐만 아니라 단편 2, 7 또는 8(OTS2, 7, 8)의 OTS 코돈을 갖는 SARS-CoV-2로 감염시켰다. 바이러스 역가를 TCID50/ml에서 감염 후 96 시간까지 나타내었다. OTS2는 72 및 96 hpi에서 상당히 약독화된다.

도 18

면역 반응 평가. A: 바이러스 특이적 면역 반응을 평가하기 위한 실험 설계. 마우스는 약독화된 SARS-CoV-2 OTS4-5, OTS7-8, OTS4-5-7-8, OTS-206으로 감염시켜 면역화시키거나 모의 감염시켰다. WT SARS-CoV-2로 챌린지는 21일 후에 수행되었다. B: 바이러스 중화 분석법을 이용하여 15일차 (챌린지 전(pre-challenge))와 35일차 (챌린지 후(post-challenge))에 마우스로부터 얻은 혈청에서 SARS-CoV-2 중화 항체 역가 측정 C: 테트라머 염색법을 이용하여 15일차(챌린지 전)와 26일차(챌린지 후)에 SARS-CoV-2 특이적 CD8+T 세포 반응 측정(H-2K(b) SARS-CoV-2 스파이크 에피토프 539-546 (VNFNFNGL) 서열 번호 8).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0174] 실시예

[0175] 본 발명의 양상들은 추가적으로 다음의 예시적이고 비제한적인 실시예들을 통해 설명된다. 이 실시예들은 본 발명의 실시 형태들에 대한 이해와 그것의 많은 이점들에 대한 이해를 더 잘할 수 있도록 제공된다. 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 실시예를 입증하기 위해 포함된다. 본 발명의 실시 예에 개시된 기술은 본 발명을 실시하는 데 있어서 효과적으로 기능하도록 사용된 기술을 나타내며, 따라서 본 발명의 실시를 위한 바람직한 실시 방식으로 간주될 수 있다는 점을 당업자는 이해해야 한다. 그러나, 본 개시내용에 비추어, 개시된 특정 실시예에 많은 변경을 가할 수 있으며, 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고도 동일하거나 유사한 결과를 얻을 수 있다는 것을 인식해야 한다.

[0176] 실시예 1

[0177] 재조합 SARS-CoV-2의 생성은 효모에서 "형질전환 관련 재조합 (TAR)" 콜로닝 기법을 사용하여 이루어졌다 (전체 SASRS-CoV-2 게놈에 걸쳐 있는 12개의 중첩 DNA 단편). 이어서, 재조합 SARS-CoV-2 RNA 게놈과 유사한 시험관 내 전사 RNA가 생성되었고, 시험관 내 전사 RNA를 BHK-SARS-N 세포로 형질 감염 후 감염성 재조합 바이러스를 구출하였다 (Thi Nhu Thao, Tran, et al., 2020, Nature 582.7813: 561-565; 및 도 1 참조).

[0178] 재조합 바이러스는 VeroE6 및 VeroE6-TMPRSS2 세포와 1차 인간 기도 상피 배양물에서 시험관 내에서 특성화되었다. 생체 내 바이러스는 K18-hACE2-마우스, hACE2-KI-마우스 및 시리아 햄스터를 포함한 다양한 동물 모델에서

평가하였다 (도 1)

[0179] 클로닝: 합성 DNA 단편의 세트는 Leu 또는 Ser을 코딩하는 많은 수의 OTS 코돈을 포함하도록 설계되었다 (표 1 참조). 단편 2-5,7-8 (도 2 참조)은 바이러스 복제효소 유전자 산물을 코딩하고 유전체의 이 영역에서 종결 코돈의 출연빈도를 증가시키는 것이 약독화된 바이러스를 생성하는데 가장 효과적일 것으로 판단되어 선택되었다.

[0180] 구조체를 복제하여 추가로 분석했다.

[0181] 1차 기도 상피 배양물에서의 SARS-CoV-2-OTS 복제:

[0182] 바이러스 역가는 감염 후 0(접종원), 1, 24, 48, 72, 96시간에 정단 세척액에서 측정되었다. (도 3)

[0183] k18-hACE2-마우스에서 약독화 및 보호의 평가:

[0184] 1차 인간 상피 배양물에서 결정된 복제 동역학을 바탕으로 하기 실험을 생체내에서 수행하였다.

[0185] 약독화 평가:

[0186] K18-hACE2 마우스를 5000 PFU로 비강내 감염시켰다. 구인두 면봉 검사를 매일 실시했다. 감염 후 2일과 5/6일째에 장기를 채취했다. 바이러스 RNA는 qRT-PCR로 정량화하고, 바이러스 역가를 플라크 분석에 의해 측정하였다 (PFU를 측정하기 위해). 임상 점수 및 체중을 매일 측정하였다.

[0187] OTS8, OTS4-5는 약독화에 대한 평가를 실시하였다 (도 4).

[0188] OTS2, OTS7, OTS7-8는 약독화에 대한 평가를 실시하였다 (도 5).

[0189] 약독화 및 보호 평가:

[0190] K18-hACE2 마우스를 5000 PFU로 비강내 감염시켰다. 구인두 면봉 검사를 매일 실시했다. 감염 후 2일과 5/6일째에 장기를 채취했다. 바이러스 RNA는 qRT-PCR로 정량화하고, 바이러스 역가를 플라크 분석에 의해 측정하였다 (PFU를 측정하기 위해). 임상 점수 및 체중을 매일 측정하였다.

[0191] 챌린지: 감염 후 21일이 지난 마우스를 WT SARS-CoV-2(5000 PFU)로 챌린지하고, 추가로 15일 동안 모니터링했다. 체중 및 임상 점수를 매일 검출하였다. 바이러스 RNA 하중, 바이러스 역가를 챌린지 후 5일과 14/15일에 측정하였다. 면봉을 주당 3-4회 채취하였다. 항체 역가 및 CD8 T세포 반응을 지시된 시점에서 측정하였다.

[0192] OTS4-5 및 OTS7-8의 약독화와 보호에 대한 분석이 수행되었다 (도 6, 7, 8).

표 1

		사스-코브-2 WT	OTS 단편 2		OTS 단편 2/3		OTS 단편 4/5		OTS 단편 7		OTS 단편 8		OTS 단편 7/8		OTS 단편 4/5/7/8	
게놈 주석 – 켄티드	게놈 변화	WT 코돈	OTS 코돈	뉴클레오티드 변화	OTS 코돈	뉴클레오티드 변화	OTS 코돈	뉴클레오티드 변화	OTS 코돈	WT 코돈	OTS 코돈	뉴클레오티드 변화	OTS 코돈	뉴클레오티드 변화	OTS 코돈	뉴클레오티드 변화
			77	136	164	291	191	335	80	149	66	120	146	269	337	604
NSP1	Leu46Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP1	Leu64Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP1	Leu88Leu	CTG	TTG	1	TTG	1	CTG	0	CTG	0	CTG	0	CTG	0	CTG	0
NSP1	Leu92Leu	CTC	TTG	2	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0
NSP1	Ser100Ser	AGT	TCA	3	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP1	Leu104Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP1	Leu107Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP1	Leu122Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	TTC	0	TTC	0	TTC	0	TTC	0	TTC	0
NSP1	Leu123Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	TTC	0	TTC	0	TTC	0	TTC	0	TTC	0
NSP1	Leu140Leu	CTA	TTA	1	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0
NSP1	Leu149Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP1	Ser166Ser	AGC	TCG	3	TCG	3	AGC	0	AGC	0	AGC	0	AGC	0	AGC	0
NSP1	Ser167Ser	AGT	TCA	3	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP1	Leu173Leu	CTC	TTG	2	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0
NSP1	Leu177Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Leu198Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Leu204Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Leu205Leu	CTA	TTA	1	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0
NSP2	Leu219Leu	CTG	TTG	1	TTG	1	CTG	0	CTG	0	CTG	0	CTG	0	CTG	0
NSP2	Ser245Ser	TCT	TCA	1	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP2	Ser248Ser	AGC	TCG	3	TCG	3	AGC	0	AGC	0	AGC	0	AGC	0	AGC	0
NSP2	Ser279Ser	TCC	TCG	1	TCG	1	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0
NSP2	Leu293Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Ser302Ser	TCT	TCA	1	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0

[0193]

NSP2	Leu320 Leu	CTC	TTG	2	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0
NSP2	Ser383 Ser	AGT	TCA	3	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP2	Ser391 Ser	TCT	TCA	1	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP2	Leu397 Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Ser412 Ser	TCT	TCA	1	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP2	Ser428 Ser	AGC	TCG	3	TCG	3	AGC	0	AGC	0	AGC	0	AGC	0	AGC	0
NSP2	Ser443 Ser	TCC	TCG	1	TCG	1	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0
NSP2	Leu446 Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Leu450 Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Leu451 Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Leu454 Leu	CTC	TTG	2	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0
NSP2	Leu469 Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Ser479 Ser	TCT	TCA	1	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP2	Ser481 Ser	TCT	TCA	1	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP2	Ser483 Ser	TCC	TCG	1	TCG	1	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0
NSP2	Ser485 Ser	AGT	TCA	3	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP2	Ser505 Ser	TCC	TCG	1	TCG	1	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0
NSP2	Leu530 Leu	CTG	TTG	1	TTG	1	CTG	0	CTG	0	CTG	0	CTG	0	CTG	0
NSP2	Ser531 Ser	AGT	TCA	3	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP2	Leu533 Leu	CTT	TTG	2	TTG	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Ser549 Ser	TCC	TCG	1	TCG	1	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0
NSP2	Leu552 Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Ser558 Ser	TCT	TCA	1	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP2	Leu570 Leu	CTA	TTA	1	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0
NSP2	Leu578 Leu	CTG	TTG	1	TTG	1	CTG	0	CTG	0	CTG	0	CTG	0	CTG	0
NSP2	Leu580 Leu	CTC	TTG	2	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0
NSP2	Ser588 Ser	TCT	TCA	1	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP2	Leu595 Leu	CTA	TTA	1	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0
NSP2	Leu613 Leu	CTA	TTA	1	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0
NSP2	Leu624 Leu	CTC	TTG	2	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0
NSP2	Leu628 Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0

[0194]

NSP2	Leu631 Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Leu642 Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Ser674 Ser	AGT	TCA	3	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP2	Leu681 Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Ser692 Ser	TCT	TCA	1	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP2	Leu700 Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Ser723 Ser	TCC	TCG	1	TCG	1	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0
NSP2	Leu729 Leu	CTA	TTA	1	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0
NSP2	Leu730 Leu	CTC	TTG	2	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0
NSP2	Leu733 Leu	CTA	TTA	1	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0
NSP2	Leu747 Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Ser771 Ser	AGT	TCA	3	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP2	Leu788 Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Leu791 Leu	CTC	TTG	2	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0
NSP2	Leu815 Leu	CTC	TTG	2	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0
NSP3	Ser838 Ser	AGT	TCA	3	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP3	Leu845 Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Leu853 Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Ser858 Ser	TCT	TCA	1	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Leu864 Leu	CTC	TTG	2	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0
NSP3	Ser887 Ser	TCT	TCA	1	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Leu893 Leu	CTG	TTG	1	TTG	1	CTG	0	CTG	0	CTG	0	CTG	0	CTG	0
NSP3	Ser901 Ser	AGT	TCA	3	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP3	Ser911 Ser	TCT	TCA	1	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Ser923 Ser	TCT	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Ser966 Ser	TCT	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Leu969 Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Ser984 Ser	AGT	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP3	Ser994 Ser	AGT	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP3	Leu101 6Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Leu103 4Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0

[0195]

NSP3	Leu106 5Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Ser108 7Ser	TCT	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Leu109 7Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Ser110 2Ser	AGT	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP3	Leu111 0Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Leu111 5Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Leu113 0Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Leu113 1Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Ser113 3Ser	AGT	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP3	Leu114 4Leu	CTA	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0
NSP3	Leu114 5Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Ser116 1Ser	TCT	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Leu118 3Leu	CTC	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0
NSP3	Leu118 6Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Ser118 9Ser	AGC	AGC	0	TCG	3	AGC	0	AGC	0	AGC	0	AGC	0	AGC	0
NSP3	Ser119 5Ser	AGT	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP3	Leu124 3Leu	CTG	CTG	0	TTG	1	CTG	0	CTG	0	CTG	0	CTG	0	CTG	0
NSP3	Leu124 9Leu	CTC	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0
NSP3	Leu125 5Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Leu126 3Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Leu127 0Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Ser127 2Ser	AGT	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP3	Leu131 3Leu	CTA	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0
NSP3	Leu134 6Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Leu135 6Leu	CTA	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0
NSP3	Ser135 8Ser	TCT	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Ser136 1Ser	TCT	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Leu136 8Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Ser137 2Ser	TCT	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Leu137 9Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Ser142 7Ser	AGT	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0

[0196]

NSP3	Leu143 4Leu	CTT	CT T	0	TT A	2	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0
NSP3	Leu143 8Leu	CTT	CT T	0	TT A	2	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0
NSP3	Leu144 1Leu	CTA	CT A	0	TT A	1	CT A	0	CT A	0	CT A	0	CT A	0	CT A	0
NSP3	Leu144 5Leu	CTT	CT T	0	TT A	2	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0
NSP3	Leu145 0Leu	CTT	CT T	0	TT A	2	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0
NSP3	Leu146 9Leu	CTC	CT C	0	TT G	2	CT C	0	CT C	0	CT C	0	CT C	0	CT C	0
NSP3	Ser147 6Ser	TCT	TC T	0	TC A	1	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC T	0
NSP3	Ser147 8Ser	TCT	TC T	0	TC A	1	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC T	0
NSP3	Leu149 0Leu	CTT	CT T	0	TT A	2	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0
NSP3	Ser149 2Ser	TCT	TC T	0	TC A	1	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC T	0
NSP3	Ser149 3Ser	TCT	TC T	0	TC A	1	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC T	0
NSP3	Ser149 4Ser	TCT	TC T	0	TC A	1	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC T	0
NSP3	Leu150 7Leu	CTT	CT T	0	TT A	2	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0
NSP3	Ser151 0Ser	TCC	TC C	0	TC G	1	TC C	0	TC C	0	TC C	0	TC C	0	TC C	0
NSP3	Ser151 5Ser	TCC	TC C	0	TC G	1	TC C	0	TC C	0	TC C	0	TC C	0	TC C	0
NSP3	Ser151 7Ser	TCT	TC T	0	TC A	1	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC T	0
NSP3	Ser152 0Ser	TCT	TC T	0	TC A	1	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC T	0
NSP3	Leu152 8Leu	CTT	CT T	0	TT A	2	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0
NSP3	Ser153 4Ser	AGT	AG T	0	TC A	3	AG T	0	AG T	0	AG T	0	AG T	0	AG T	0
NSP3	Ser153 9Ser	AGT	AG T	0	TC A	3	AG T	0	AG T	0	AG T	0	AG T	0	AG T	0
NSP3	Leu154 6Leu	CTA	CT A	0	TT A	1	CT A	0	CT A	0	CT A	0	CT A	0	CT A	0
NSP3	Leu155 6Leu	CTT	CT T	0	TT A	2	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0
NSP3	Leu155 9Leu	CTT	CT T	0	TT A	2	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0
NSP3	Leu156 0Leu	CTT	CT T	0	TT A	2	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0
NSP3	Ser156 1Ser	TCT	TC T	0	TC A	1	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC T	0
NSP3	Leu157 9Leu	TTG	TT G	0	CT C	2	TT G	0	TT G	0	TT G	0	TT G	0	TT G	0
NSP3	Leu162 7Leu	CTA	CT A	0	TT A	1	CT A	0	CT A	0	CT A	0	CT A	0	CT A	0
NSP3	Ser164 1Ser	AGT	AG T	0	TC A	3	AG T	0	AG T	0	AG T	0	AG T	0	AG T	0
NSP3	Leu164 3Leu	CTG	CT G	0	TT G	1	CT G	0	CT G	0	CT G	0	CT G	0	CT G	0
NSP3	Ser166 6Ser	TCT	TC T	0	TC A	1	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC T	0
NSP3	Leu167 6Leu	CTT	CT T	0	TT A	2	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0

[0197]

NSP3	Leu168 3Leu	CTC	CT C	0	TT G	2	CT C	0	CT C	0	CT C	0	CT C	0	CT C	0
NSP3	Leu169 5Leu	CTA	CT A	0	TT A	1	CT A	0	CT A	0	CT A	0	CT A	0	CT A	0
NSP3	Leu171 3Leu	CTT	CT T	0	TT A	2	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0
NSP3	Ser173 3Ser	AGT	AG T	0	TC A	3	AG T	0	AG T	0	AG T	0	AG T	0	AG T	0
NSP3	Ser174 3Ser	TCT	TC T	0	TC A	1	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC T	0
NSP3	Leu176 2Leu	CTT	CT T	0	TT A	2	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0
NSP3	Leu177 4Leu	CTT	CT T	0	TT A	2	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0
NSP3	Ser177 5Ser	TCT	TC T	0	TC A	1	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC T	0
NSP3	Leu179 7Leu	CTA	CT A	0	TT A	1	CT A	0	CT A	0	CT A	0	CT A	0	CT A	0
NSP3	Leu181 6Leu	CTT	CT T	0	TT A	2	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0
NSP3	Ser182 5Ser	AGT	AG T	0	TC A	3	AG T	0	AG T	0	AG T	0	AG T	0	AG T	0
NSP3	Ser184 1Ser	TCT	TC T	0	TC A	1	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC T	0
NSP3	Leu185 3Leu	CTT	CT T	0	TT A	2	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0	CT T	0
NSP3	Ser285 6Ser	TCC	TC C	0	TC G	1	TC C	0	TC C	0	TC C	0	TC C	0	TC C	0
NSP3	Ser187 2Ser	AGT	AG T	0	TC A	3	AG T	0	AG T	0	AG T	0	AG T	0	AG T	0
NSP3	Ser190 5Ser	TCT	TC T	0	TC A	1	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC T	0
NSP3	Leu202 8Leu	CTG	CT G	0	CT G	0	TT G	1	CT G	0	CT G	0	CT G	0	TT G	1
NSP3	Leu203 9Leu	CTT	CT T	0	CT T	0	TT A	2	CT T	0	CT T	0	CT T	0	TT A	2
NSP3	Leu204 4Leu	CTA	CT A	0	CT A	0	TT A	1	CT A	0	CT A	0	CT A	0	TT A	1
NSP3	Ser204 8Ser	TCT	TC T	0	TC T	0	TC A	1	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC A	1
NSP3	Leu206 2Leu	CTT	CT T	0	CT T	0	TT A	2	CT T	0	CT T	0	CT T	0	TT A	2
NSP3	Leu207 7Leu	CTT	CT T	0	CT T	0	TT A	2	CT T	0	CT T	0	CT T	0	TT A	2
NSP3	Ser208 3Ser	AGT	AG T	0	AG T	0	TC A	3	AG T	0	AG T	0	AG T	0	TC A	3
NSP3	Leu209 5Leu	TTA	TT A	0	TT A	0	CT A	1	TT A	0	TT A	0	TT A	0	CT A	1
NSP3	Ser210 3Ser	TCT	TC T	0	TC T	0	TC A	1	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC A	1
NSP3	Ser210 4Ser	AGT	AG T	0	AG T	0	TC A	3	AG T	0	AG T	0	AG T	0	TC A	3
NSP3	Ser211 4Ser	TCT	TC T	0	TC T	0	TC A	1	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC A	1
NSP3	Leu212 2Leu	CTT	CT T	0	CT T	0	TT A	2	CT T	0	CT T	0	CT T	0	TT A	2
NSP3	Ser213 2Ser	AGT	AG T	0	AG T	0	TC A	3	AG T	0	AG T	0	AG T	0	TC A	3
NSP3	Leu214 6Leu	CTT	CT T	0	CT T	0	TT A	2	CT T	0	CT T	0	CT T	0	TT A	2
NSP3	Ser215 1Ser	AGT	AG T	0	AG T	0	TC A	3	AG T	0	AG T	0	AG T	0	TC A	3

[0198]

NSP3	Leu217 7Leu	CTA	CT A	0	CT A	0	TT A	1	CT A	0	CT A	0	CT A	0	TT A	1
NSP3	Ser218 5Ser	AGT	AG T	0	AG T	0	TC A	3	AG T	0	AG T	0	AG T	0	TC A	3
NSP3	Ser218 8Ser	TCT	TC T	0	TC T	0	TC A	1	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC A	1
NSP3	Ser219 3Ser	TCT	TC T	0	TC T	0	TC A	1	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC A	1
NSP3	Ser220 5Ser	AGT	AG T	0	AG T	0	TC A	3	AG T	0	AG T	0	AG T	0	TC A	3
NSP3	Leu221 1Leu	CTA	CT A	0	CT A	0	TT A	1	CT A	0	CT A	0	CT A	0	TT A	1
NSP3	Ser222 4Ser	TCT	TC T	0	TC T	0	TC A	1	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC A	1
NSP3	Leu222 6Leu	CTG	CT G	0	CT G	0	TT G	1	CT G	0	CT G	0	CT G	0	TT G	1
NSP3	Leu223 5Leu	CTA	CT A	0	CT A	0	TT A	1	CT A	0	CT A	0	CT A	0	TT A	1
NSP3	Ser223 7Ser	AGT	AG T	0	AG T	0	TC A	3	AG T	0	AG T	0	AG T	0	TC A	3
NSP3	Leu224 0Leu	CTA	CT A	0	CT A	0	TT A	1	CT A	0	CT A	0	CT A	0	TT A	1
NSP3	Ser224 2Ser	TCT	TC T	0	TC T	0	TC A	1	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC A	1
NSP3	Ser225 5Ser	TCT	TC T	0	TC T	0	TC A	1	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC A	1
NSP3	Ser226 1Ser	TCT	TC T	0	TC T	0	TC A	1	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC A	1
NSP3	Ser227 3Ser	TCT	TC T	0	TC T	0	TC A	1	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC A	1
NSP3	Ser228 5Ser	TCT	TC T	0	TC T	0	TC A	1	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC A	1
NSP3	Ser228 9Ser	AGT	AG T	0	AG T	0	TC A	3	AG T	0	AG T	0	AG T	0	TC A	3
NSP3	Leu229 2Leu	CTT	CT T	0	CT T	0	TT A	2	CT T	0	CT T	0	CT T	0	TT A	2
NSP3	Ser229 3Ser	AGT	AG T	0	AG T	0	TC A	3	AG T	0	AG T	0	AG T	0	TC A	3
NSP3	Ser229 7Ser	TCT	TC T	0	TC T	0	TC A	1	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC A	1
NSP3	Ser330 3Ser	TCT	TC T	0	TC T	0	TC A	1	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC A	1
NSP3	Ser231 3Ser	TCT	TC T	0	TC T	0	TC A	1	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC A	1
NSP3	Leu233 3Leu	CTT	CT T	0	CT T	0	TT A	2	CT T	0	CT T	0	CT T	0	TT A	2
NSP3	Leu234 1Leu	CTT	CT T	0	CT T	0	TT A	2	CT T	0	CT T	0	CT T	0	TT A	2
NSP3	Ser235 2Ser	AGC	AG C	0	AG C	0	TC G	3	AG C	0	AG C	0	AG C	0	TC G	3
NSP3	Ser236 0Ser	AGT	AG T	0	AG T	0	TC A	3	AG T	0	AG T	0	AG T	0	TC A	3
NSP3	Ser236 2Ser	TCT	TC T	0	TC T	0	TC A	1	TC T	0	TC T	0	TC T	0	TC A	1
NSP3	Leu236 4Leu	CTT	CT T	0	CT T	0	TT A	2	CT T	0	CT T	0	CT T	0	TT A	2
NSP3	Leu237 1Leu	CTT	CT T	0	CT T	0	TT A	2	CT T	0	CT T	0	CT T	0	TT A	2
NSP3	Ser239 0Ser	AGT	AG T	0	AG T	0	TC A	3	AG T	0	AG T	0	AG T	0	TC A	3
NSP3	Ser243 3Ser	TCC	TC C	0	TC C	0	TC G	1	TC C	0	TC C	0	TC C	0	TC G	1

[0199]

NSP3	Leu2447Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP3	Ser2462Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP3	Ser2466Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP3	Leu2475Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP3	Ser2487Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Ser2488Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Ser2493Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP3	Ser2500Ser	TCC	TCC	0	TCC	0	TCG	1	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCG	1
NSP3	Leu2503Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP3	Ser2517Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Leu2518Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP3	Ser2519Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Leu2527Leu	CTG	CTG	0	CTG	0	TTG	1	CTG	0	CTG	0	CTG	0	TTG	1
NSP3	Ser2553Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Ser2558Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Leu2564Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP3	Leu2570Leu	CTG	CTG	0	CTG	0	TTG	1	CTG	0	CTG	0	CTG	0	TTG	1
NSP3	Leu2572Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP3	Ser2578Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Ser2583Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP3	Leu2600Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP3	Leu2612Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP3	Leu2620Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP3	Ser2625Ser	TCC	TCC	0	TCC	0	TCG	1	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCG	1
NSP3	Ser2631Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Leu2655Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP3	Ser2661Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Ser2669Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP3	Leu2677Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP3	Leu2688Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP3	Ser2699Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3

[0200]

NSP3	Ser270 6Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP3	Ser272 2Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Leu272 5Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP3	Ser273 1Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP3	Leu276 0Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP4	Leu277 8Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP4	Leu278 1Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP4	Ser279 7Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP4	Ser280 4Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP4	Ser282 2Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP4	Ser283 9Ser	AGC	AGC	0	AGC	0	TCG	3	AGC	0	AGC	0	AGC	0	TCG	3
NSP4	Ser284 4Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP4	Ser289 0Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP4	Leu290 3Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP4	Ser292 6Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP4	Leu293 9Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP4	Ser294 2Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP4	Ser294 7Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP4	Leu295 6Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP4	Ser296 0Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP4	Leu298 9Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP4	Ser297 2Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP4	Ser298 1Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP4	Ser299 9Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP4	Ser300 1Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP4	Leu300 6Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP4	Ser301 3Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP4	Leu302 7Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP4	Leu303 4Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP4	Ser304 6Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP4	Leu306 0Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2

[0201]

NSP4	Ser307 5Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP4	Leu308 4Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP4	Leu308 6Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP4	Leu309 2Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP4	Ser310 6Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP4	Leu311 6Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP4	Ser312 1Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP4	Ser314 9Ser	TCC	TCC	0	TCC	0	TCG	1	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCG	1
NSP4	Ser315 8Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP4	Leu316 1Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP4	Ser317 1Ser	TCC	TCC	0	TCC	0	TCG	1	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCG	1
NSP4	Ser317 3Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	2	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	2
NSP4	Leu318 0Leu	CTG	CTG	0	CTG	0	TTG	1	CTG	0	CTG	0	CTG	0	TTG	1
NSP4	Leu319 1LEu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP4	Ser319 5Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP4	Leu319 8Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP4	Leu320 1Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP4	Leu321 0Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP4	Ser321 8Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP4	Ser322 5Ser	AGC	AGC	0	AGC	0	TCG	3	AGC	0	AGC	0	AGC	0	TCG	3
NSP4	Leu323 4Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP4	Leu323 8Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP4	Ser324 2Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP4	Ser324 6Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP4	Leu324 9Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP4	Ser325 6Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP5	Ser326 4Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP5	Ser327 3Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP5	Leu329 0Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP5	Leu329 3Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP5	Leu329 5Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2

[0202]

NSP5	Ser330 9Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP5	Leu331 3Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP5	Leu332 1Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP5	Ser332 5Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP5	Leu333 8Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP5	Ser334 4Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP5	Leu335 0Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP5	Leu335 3Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP5	Ser338 6Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP5	Leu340 4Leu	TTA	TTA	0	TTA	0	CTT	2	TTA	0	TTA	0	TTA	0	CTT	2
NSP5	Ser341 0Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP5	Ser342 1Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP5	Leu348 3Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP5	Leu349 0Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP5	Leu349 5Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP5	Leu350 5Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP5	Leu351 3Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP5	Leu351 6Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP5	Leu353 5Leu	CTG	CTG	0	CTG	0	TTG	1	CTG	0	CTG	0	CTG	0	TTG	1
NSP5	Ser354 7Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP6	Ser357 0Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP6	Leu358 5Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP6	Leu358 1Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP6	Ser359 7Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP6	Ser360 1Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP6	Ser362 2Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP6	Leu363 6Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP6	Ser364 3Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP6	Leu364 4Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP6	Ser365 8Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP6	Ser367 3Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3

[0203]

NSP6	Ser367 5Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP6	Leu367 9Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP6	Leu369 2Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP6	Leu369 4Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP6	Leu371 1Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP6	Leu371 7Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP6	Ser373 2Ser	TCC	TCC	0	TCC	0	TCG	1	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCG	1
NSP6	Leu373 6Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP6	Ser373 9Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP6	Ser374 2Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP6	Leu377 6Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP6	Leu378 1Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	2	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	2
NSP6	Leu379 6Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP6	Leu382 8Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP6	Leu382 9Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP6	Ser383 4Ser	AGC	AGC	0	AGC	0	TCG	3	AGC	0	AGC	0	AGC	0	TCG	3
NSP6	Leu384 0Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP7	Ser386 0Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP7	Leu387 3Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP7	Leu387 9Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP7	Ser388 5Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP12	Leu479 2Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP12	Ser481 6Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP12	Ser482 4Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	TCA	3	TCA	3
NSP12	Ser482 5Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP12	Ser484 2Ser	AGC	AGC	0	AGC	0	AGC	0	TCG	3	AGC	0	TCG	3	TCG	3
NSP12	Leu485 1Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	TTA	1	TTA	1
NSP12	Leu486 0Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	TTA	1	TTA	1
NSP12	Leu486 1Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	TTA	1	TTA	1
NSP12	Leu488 9Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	TTA	1	TTA	1
NSP12	Leu490 8Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2

[0204]

NSP12	Ser491 1Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	TCA	3	TCA	3
NSP12	Leu491 8Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP12	Leu493 5Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP12	Ser494 0Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	TCA	3	TCA	3
NSP12	Ser495 2Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP12	Ser495 5Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	TCA	3	TCA	3
NSP12	Ser498 3Ser	AGC	AGC	0	AGC	0	AGC	0	TCG	3	AGC	0	TCG	3	TCG	3
NSP12	Ser499 8Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	TCA	3	TCA	3
NSP12	Leu500 5Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP12	Leu502 1Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP12	Leu502 7Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP12	Leu502 9Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP12	Ser503 8Ser	AGC	AGC	0	AGC	0	AGC	0	TCG	3	AGC	0	TCG	3	TCG	3
NSP12	Ser505 5Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	TCA	3	TCA	3
NSP12	Leu506 4Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	TTA	1	TTA	1
NSP12	Ser508 3Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	TCA	3	TCA	3
NSP12	Leu509 8Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP12	Ser510 0Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP12	Leu511 8Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP12	Leu512 3Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	TTG	2	TTG	2
NSP12	Leu514 9Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	TTG	2	TTG	2
NSP12	Ser515 0Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP12	Ser515 9Ser	AGC	AGC	0	AGC	0	AGC	0	TCG	3	AGC	0	TCG	3	TCG	3
NSP12	Ser516 3Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP12	Leu516 6Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	TTA	1	TTA	1
NSP12	Ser516 9Ser	AGC	AGC	0	AGC	0	AGC	0	TCG	3	AGC	0	TCG	3	TCG	3
NSP12	Leu517 7Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP12	Ser518 6Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP12	Leu519 8Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP12	Ser520 5Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP12	Leu521 0Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	TTA	1	TTA	1

[0205]

NSP12	Leu522Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP12	Leu522Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	TTA	1	TTA	1
NSP12	Leu524Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP12	Ser525Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP12	Leu526Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP12	Leu528Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	TTA	1	TTA	1
NSP12	Ser529Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP12	Leu529Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP13	Leu533Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP13	Ser536Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP13	Leu538Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP13	Ser539Ser	AGC	AGC	0	AGC	0	AGC	0	TCG	3	AGC	0	TCG	3	TCG	3
NSP13	Ser542Ser	AGC	AGC	0	AGC	0	AGC	0	TCG	3	AGC	0	TCG	3	TCG	3
NSP13	Leu545Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	TTG	2	TTG	2
NSP13	Leu545Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP13	Leu546Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	TTG	2	TTG	2
NSP13	Leu547Leu	CTG	CTG	0	CTG	0	CTG	0	TTG	1	CTG	0	TTG	1	TTG	1
NSP13	Ser547Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP13	Leu548Leu	CTG	CTG	0	CTG	0	CTG	0	TTG	1	CTG	0	TTG	1	TTG	1
NSP13	Ser548Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP13	Leu548Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP13	Leu549Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP13	Ser551Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	TCA	3	TCA	3
NSP13	Leu555Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	TTG	2	TTG	2
NSP13	Ser555Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	TCA	3	TCA	3
NSP13	Leu556Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	TTA	1	TTA	1
NSP13	Leu557Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	TTG	2	TTG	2
NSP13	Ser558Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP13	Ser558Ser	AGC	AGC	0	AGC	0	AGC	0	TCG	3	AGC	0	TCG	3	TCG	3
NSP13	Ser560Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP13	Leu560Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTA	2	CTC	0	TTA	2	TTA	2

[0206]

NSP13	Ser5612Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	TCA	3	TCA	3
NSP13	Leu5618Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	TTA	1	TTA	1
NSP13	Leu5620Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	TTG	2	TTG	2
NSP13	Ser5624Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP13	Ser5633Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP13	Leu5640Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	TTA	1	TTA	1
NSP13	Ser5654Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	TCA	3	TCA	3
NSP13	Ser5708Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	TCA	3	TCA	3
NSP13	Leu5823Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	TTA	2	TTA	2
NSP13	Leu5851Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	TTA	1	TTA	1
NSP13	Ser5878Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP13	Leu5896Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	TTA	2	TTA	2
NSP13	Ser5900Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP14	Leu6904Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	TTA	2	TTA	2
NSP14	Ser6912Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	TCA	3	TCA	3
NSP14	Leu6913Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	TTA	2	TTA	2
NSP14	Leu6931Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	TTG	2	TTG	2
NSP14	Ser6936Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	TCA	3	TCA	3
NSP14	Leu6951Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	TTG	2	TTG	2
NSP14	Ser6952Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	TCA	3	TCA	3
NSP14	Leu6978Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	TTG	2	TTG	2
NSP14	Ser6980Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP14	Leu6983Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	TTA	1	TTA	1
NSP14	Ser6986Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP14	Leu6991Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	TTA	1	TTA	1
NSP14	Ser6998Ser	TCC	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCG	1	TCG	1	TCG	1
NSP14	Ser7001Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	TCA	3	TCA	3
NSP14	Leu7003Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTA	2	TTA	2	TTA	2
NSP14	Leu7006Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	TTA	2	TTA	2
NSP14	Leu7008Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	TTA	2	TTA	2
NSP14	Ser7095Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	TCA	3	TCA	3

[0207]

NSP14	Leu6098Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	TTA	2	TTA	2
NSP14	Leu6101Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	TTG	2	TTG	2
NSP14	Ser6102Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP14	Ser6118Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP14	Leu6133Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	TTA	1	TTA	1
NSP14	Ser6142Ser	TCC	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCG	1	TCG	1	TCG	1
NSP14	Ser6154Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP14	Leu6177Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	TTA	1	TTA	1
NSP14	Ser6179Ser	AGC	AGC	0	AGC	0	AGC	0	AGC	0	TCG	3	TCG	3	TCG	3
NSP14	Leu6183Leu	CTG	CTG	0	CTG	0	CTG	0	CTG	0	TTG	1	TTG	1	TTG	1
NSP14	Ser6195Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	TCA	3	TCA	3
NSP14	Leu6204 62	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	TTA	1	TTA	1
NSP14	Leu6253Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	TTA	2	TTA	2
NSP14	Ser6281Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	TCA	3	TCA	3
NSP14	Ser6293Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP14	Leu6307Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	TTA	1	TTA	1
NSP14	Ser6320Ser	TCC	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCG	1	TCG	1	TCG	1
NSP14	Leu6330Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	TTA	1	TTA	1
NSP14	Ser6331Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP14	Leu6333Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	TTA	2	TTA	2
NSP14	Ser6342Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	TCA	3	TCA	3
NSP14	Ser6358Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	TCA	3	TCA	3
NSP14	Ser6372Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP14	Ser6374Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	TCA	3	TCA	3
NSP14	Ser6378Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP14	Leu6392Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	TTA	1	TTA	1
NSP14	Ser6394Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP14	Leu6419Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	TTG	2	TTG	2
NSP14	Ser6431Ser	AGC	AGC	0	AGC	0	AGC	0	AGC	0	TCG	3	TCG	3	TCG	3
NSP14	Leu6443Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	TTG	2	TTG	2
NSP14	Leu6450Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	TTA	2	TTA	2

[0208]

NSP15	Ser6452Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	TCA	3	TCA	3
NSP15	Ser6476Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP15	Leu6508Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	TTA	2	TTA	2
NSP15	Leu6523Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	TTG	2	TTG	2
NSP15	Ser6548Ser	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TCA	3	TCA	3	TCA	3
NSP15	Ser6554Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP15	Leu6570Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	TTG	2	TTG	2
NSP15	Leu6593Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	TTA	2	TTA	2
NSP15	Ser6598Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	TCA	3	TCA	3
NSP15	Ser6605Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP15	Ser6612Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	TCA	3	TCA	3
NSP15	Leu6613Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	TTA	2	TTA	2

[0209]

[0210] 실시예 2

[0211] Nsp1의 돌연변이

[0212] 본 발명자들은 SARS-CoV-2에 대한 생 약독화 백신의 개발을 위한 전략을 모색했다. Nsp1 이중 돌연변이체 K164A/H165A는 억제 능력을 상실하고, 본 발명자들은 SARS-CoV-2 Nsp1 돌연변이체 감염에 대한 전사 반응을 예비 분석한 결과 감염에 대한 숙주의 반응이 증가했음을 확인했다.

[0213] 본 발명자들은 추가적으로 Nsp1을 두 위치(K164A, H165A)에서 돌연변이시키고, 보조 ORFs 6-8을 삭제했다.

[0214] FCS 영역 결실

[0215] FCS 영역은 Davidson AD, Williamson MK, Lewis S, et al., 2020, Genome Med. 2020;12(1):68.에 기재된 대로 결실되었다.

[0216] 본 발명자들은 5000 PFU/마우스의 비강내 투여를 통해 햄스터를 OTS 바이러스로 감염시키고, 감염 후 21일 후에 시조 SARS-CoV-2(우한 야생형(WT))로 챌린지 감염시켰다 (도 10).

[0217] 본 발명자들은 OTS 바이러스나 SARS-CoV-2 WT를 접종한 동물의 생존률을 평가하였다 (도 11). SARS-CoV-2 야생형을 접종한 동물의 75%가 접종 후 8일 이내에 질병에 걸리거나 종료 기준에 도달했다. 매우 대조적으로, OTS 구조체를 접종한 동물 중 어느 것도 사망하지 않았다.

[0218] SARS-CoV-2 WT, OTS4-5 및 OTS7-8 바이러스를 접종한 동물은 감염 시 체중이 감소했다(평균 체중 = 각각 84 % (7 dpi), 91 % (8 dpi) 및 89 % (7 dpi)). 매우 대조적으로, OTS 4-5-6-7-8 Nsp1 K164A/H165A.delORF6-8 및 OTS 4-5-6-7-8 Nsp1 K164A/H165A.delORF6-8.FCS(도면에서 OTS final로 지칭되는 서열 번호 6)를 접종한 동물은 점차 체중이 증가했다(평균 체중 = 106 % (7 dpi) 및 108 % (8 dpi)). 이는 고감도 시리아 햄스터 모델에서 OTS 4-5-6-7-8 Nsp1 K164A/H165A.delORF6-8 및 OTS 4-5-6-7-8 Nsp1 K164A/H165A.delORF6-8.FCS의 병원성 없음을 나타낸다 (도 11).

[0219] 추가적으로, 외이, 기관, 폐(두개골, 내측, 후방) 샘플 및 비강 세척 샘플을 감염 후 5일 후에 채취하여 ORF1ab(Nsp12) 특이적 RT-qPCR로 분석했다. 게놈 카피 표준을 사용하여 각 샘플에 대한 ml당 바이러스 게놈 카피 총량(gc/ml)을 계산했다. 이러한 정보를 바탕으로 바이러스 게놈 카피의 양을 서로 비교하였고, 배수 변화 값을 계산하였다 (도 12-14). SARS-CoV-2 WT, OTS4-5, OTS7-8로 감염된 햄스터는 장기 및 세척 샘플에서 바이러스 게놈 부하에 있어 차이가 없었다. 대조적으로, OTS 4-5-6-7-8 Nsp1 K164A/H165A.delORF6-8 및 OTS 4-5-6-7-8 Nsp1 K164A/H165A.delORF6-8.FCS는 장기 및 세척 샘플에서 바이러스 게놈 부하가 감소했다.

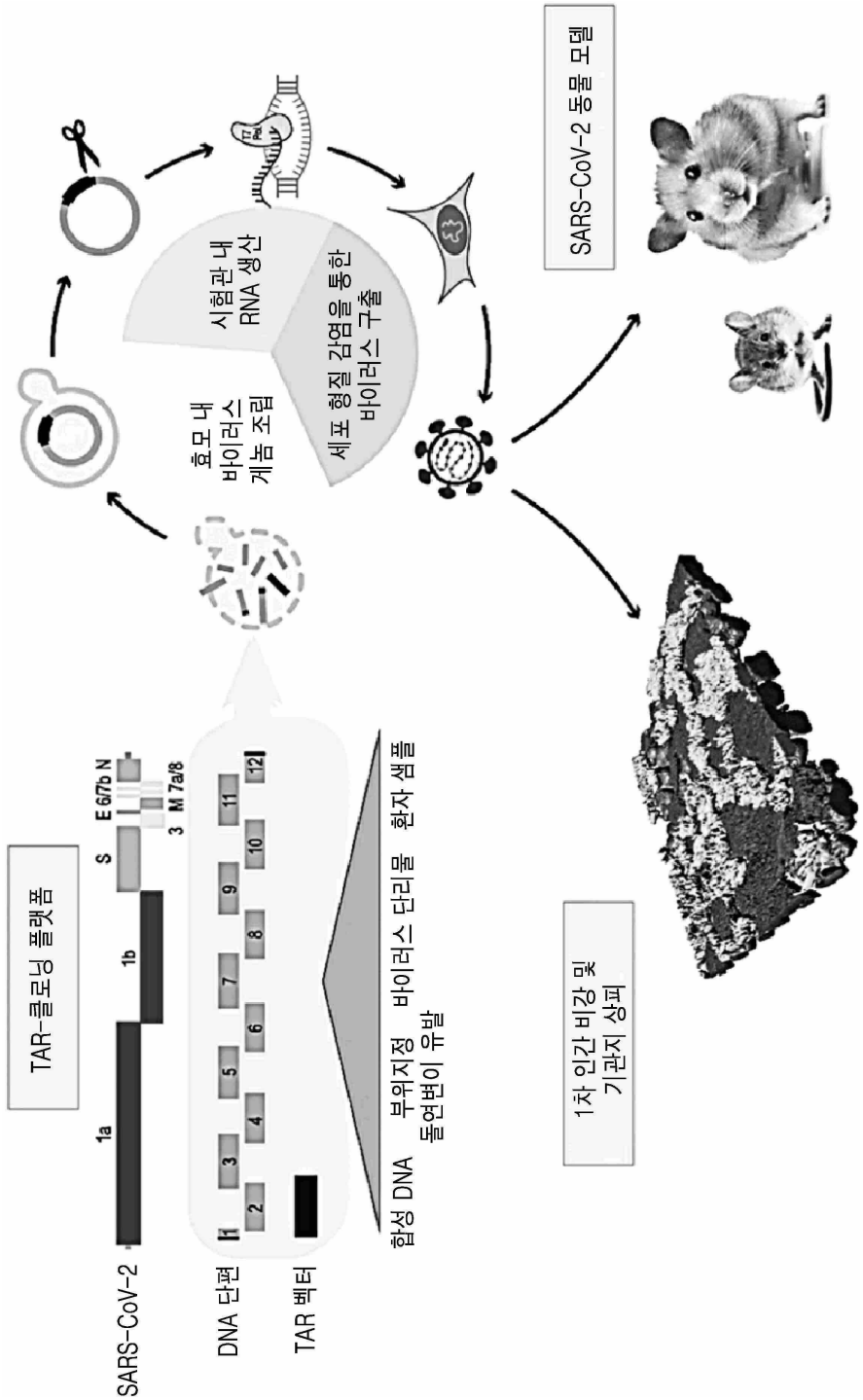
[0220] 시리아 햄스터에서 OTS 백신 후보물질인 OTS4-5, OTS7-8, OTS 4-5-6-7-8 Nsp1 K164A/H165A.delORF6-8과 OTS 4-5-6-7-8 Nsp1 K164A/H165A.delORF6-8.FCS에 대한 생체 내 평가를 실시하여, OTS4-5와 OTS7-8의 부분적 약독화와 OTS 4-5-6-7-8 Nsp1 K164A/H165A.delORF6-8과 OTS 4-5-6-7-8 Nsp1 K164A/H165A.delORF6-8.FCS의 향상된 특성을 확인한다.

[0221] 실시예 3

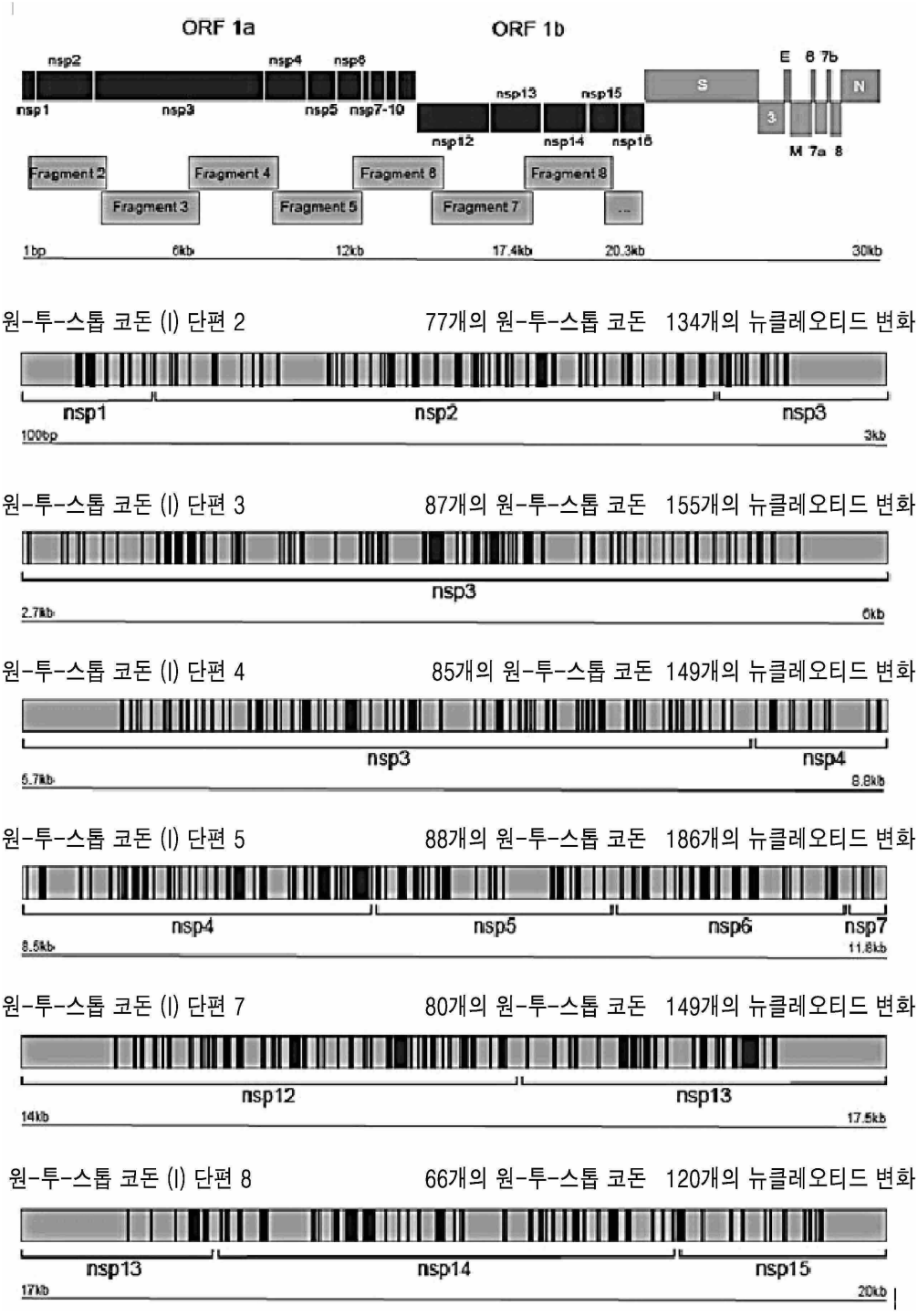
[0222] 5-플루오로우라실이나 말누피라비르와 같은 돌연변이원을 첨가하면 TCID50 바이러스 분석에서 감염성 바이러스 입자의 수가 감소된다. 특히, OTS 바이러스는 WT SARS-CoV-2보다 돌연변이원에 의해 불활성화될 가능성이 더 높다.

도면

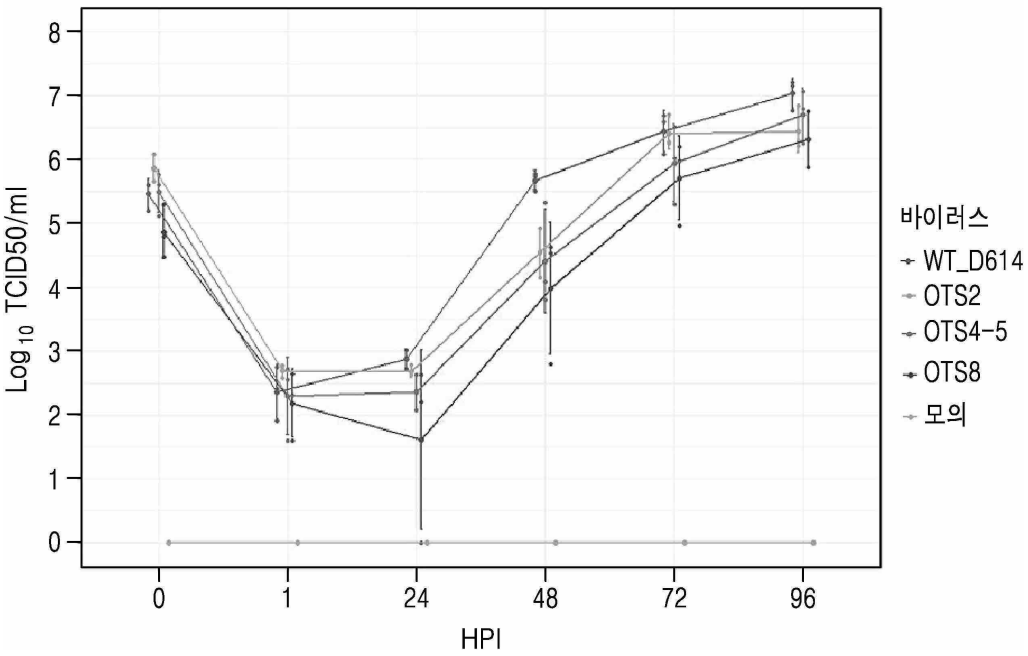
도면1



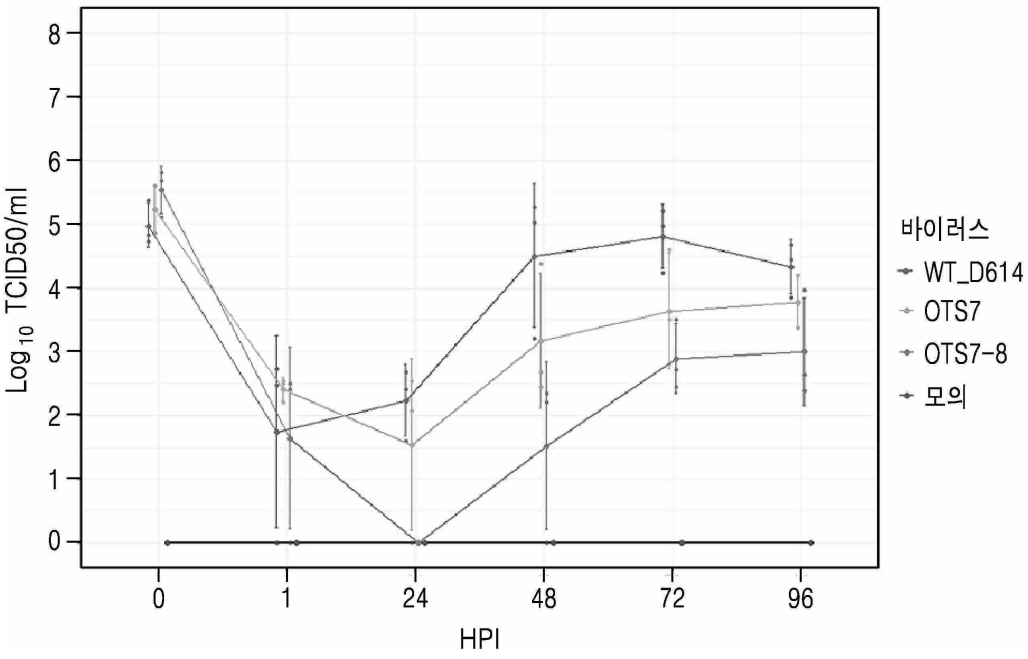
도면2


ORF 1a
ORF 1b
nsp2
nsp4
nsp6
nsp1
nsp3
nsp5
nsp7-10
nsp13
nsp15
nsp12
nsp14
nsp16
E
6
7b
S
N
3
M
7a
8
Fragment 2
Fragment 4
Fragment 6
Fragment 8
Fragment 3
Fragment 5
Fragment 7
...
1bp
6kb
12kb
17.4kb
20.3kb
30kb
원-투-스톱 코돈 (I) 단편 2
77개의 원-투-스톱 코돈
134개의 뉴클레오티드 변화
nsp1
nsp2
nsp3
100bp
3kb
원-투-스톱 코돈 (I) 단편 3
87개의 원-투-스톱 코돈
155개의 뉴클레오티드 변화
nsp3
2.7kb
6kb
원-투-스톱 코돈 (I) 단편 4
85개의 원-투-스톱 코돈
149개의 뉴클레오티드 변화
nsp3
nsp4
5.7kb
8.8kb
원-투-스톱 코돈 (I) 단편 5
88개의 원-투-스톱 코돈
186개의 뉴클레오티드 변화
nsp4
nsp5
nsp6
nsp7
8.5kb
11.8kb
원-투-스톱 코돈 (I) 단편 7
80개의 원-투-스톱 코돈
149개의 뉴클레오티드 변화
nsp12
nsp13
14kb
17.5kb
원-투-스톱 코돈 (I) 단편 8
66개의 원-투-스톱 코돈
120개의 뉴클레오티드 변화
nsp13
nsp14
nsp15
17kb
20kb

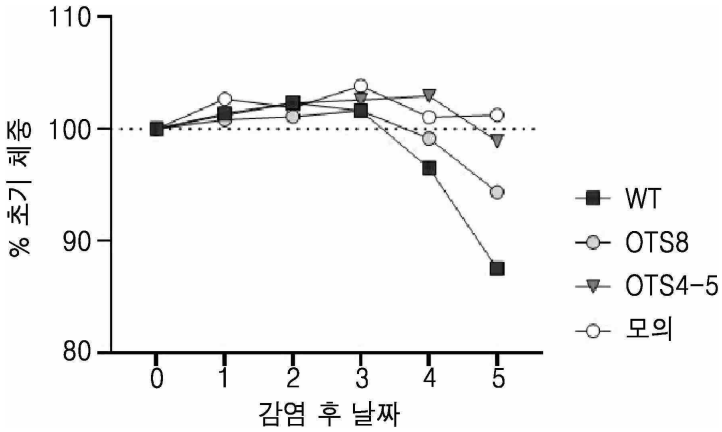
도면3a


8
7
6
5
4
3
2
1
0
Log10 TCID50/ml
0
1
24
48
72
96
HPI
바이러스
WT_D614
OTS2
OTS4-5
OTS8
모의

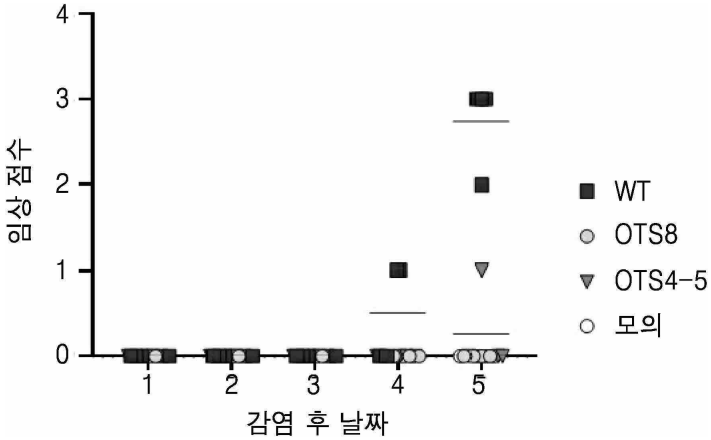
도면3b


8
7
6
5
4
3
2
1
0
Log10 TCID50/ml
0
1
24
48
72
96
HPI
바이러스
WT_D614
OTS7
OTS7-8
모의

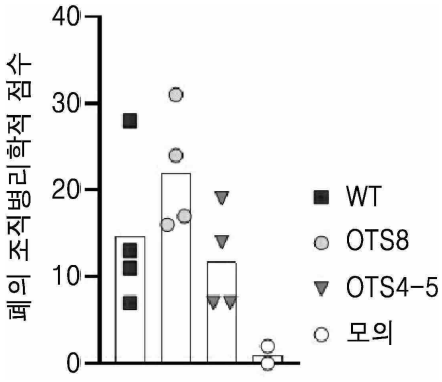
도면4a



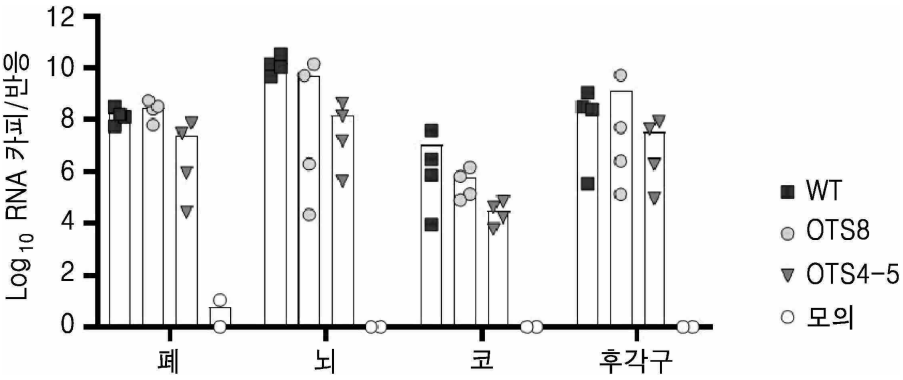
도면4b



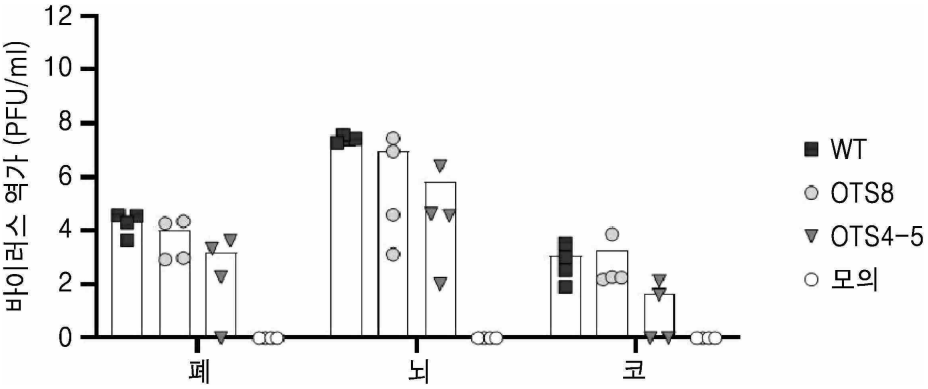
도면4c



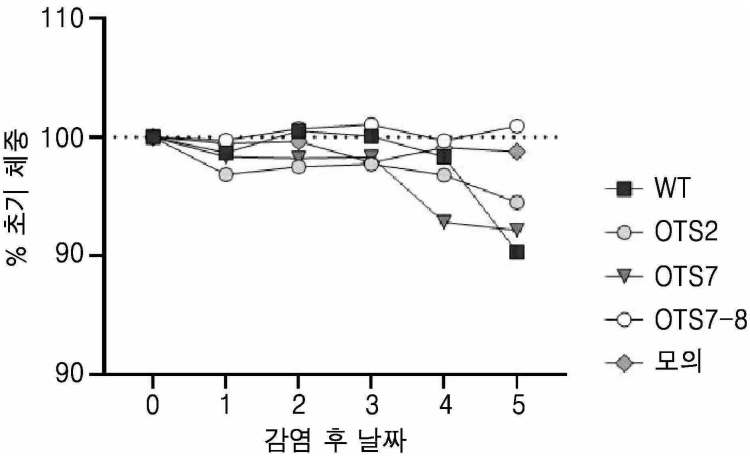
도면4d



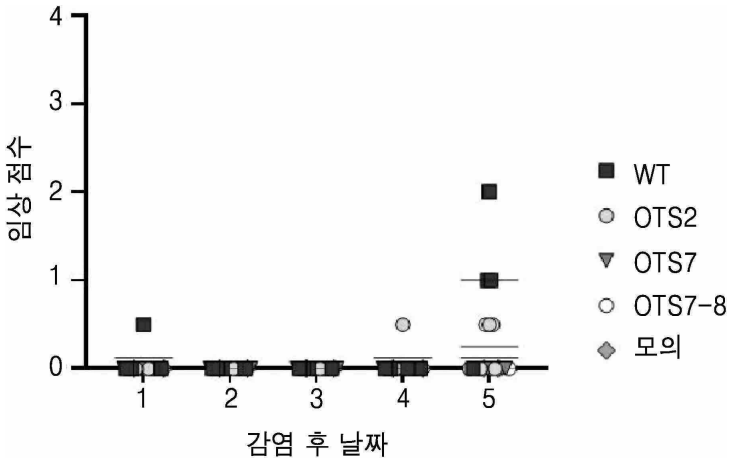
도면4e



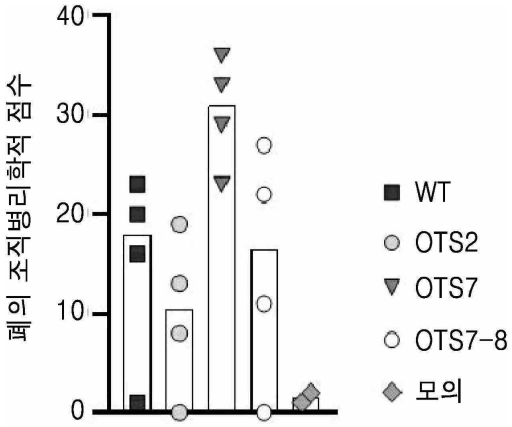
도면5a



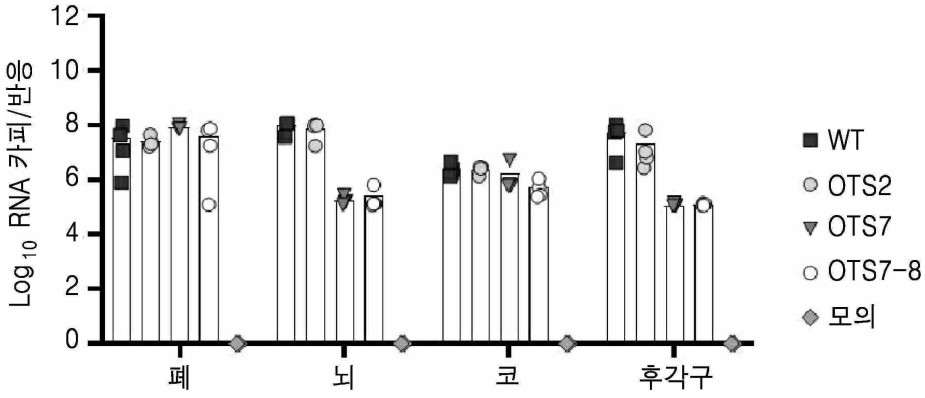
도면5b



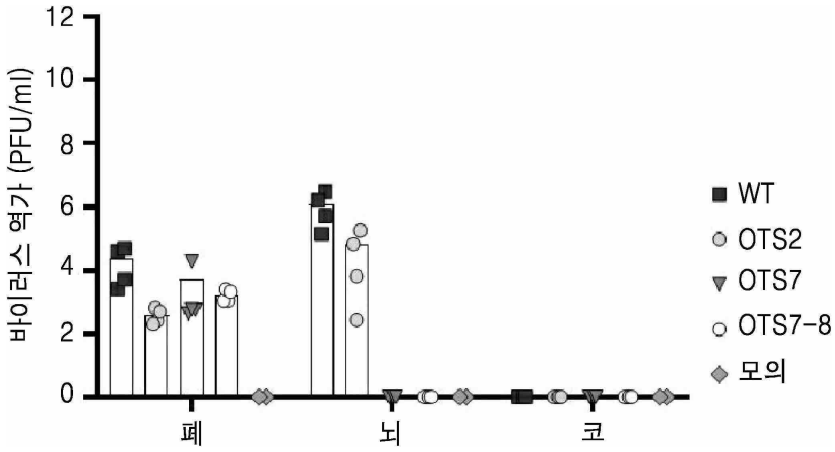
도면5c



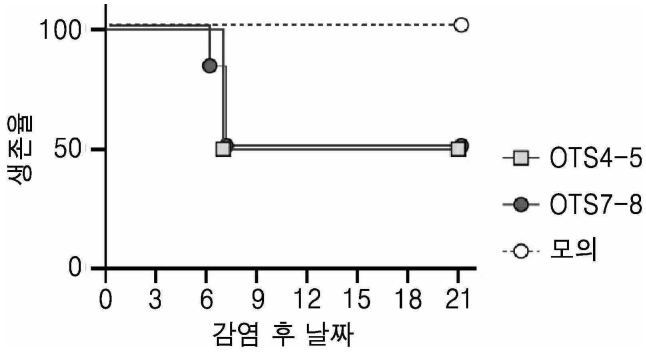
도면5d



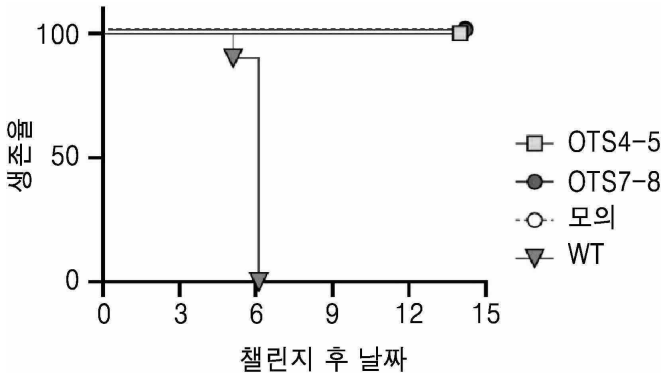
도면5e



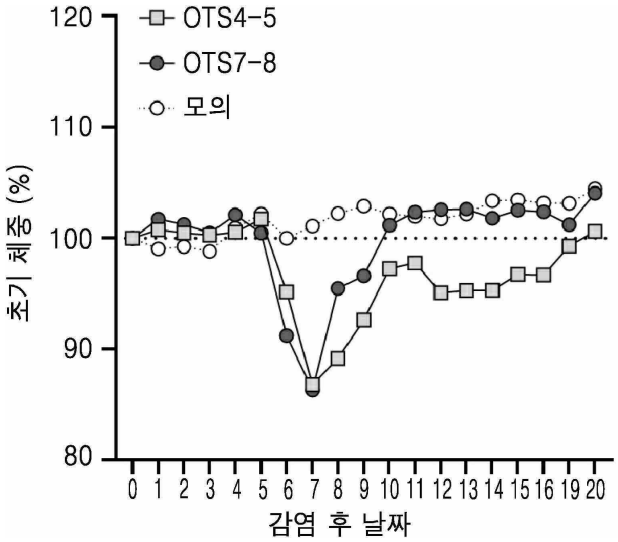
도면6a



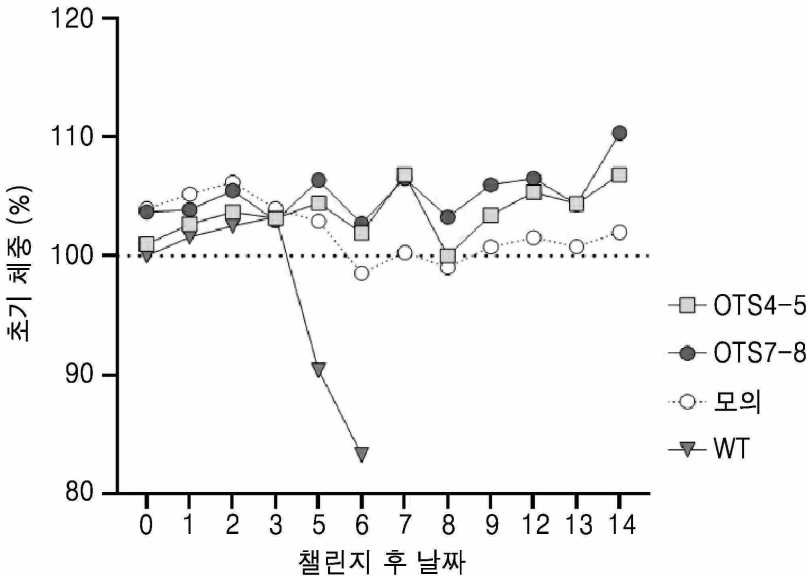
도면6b



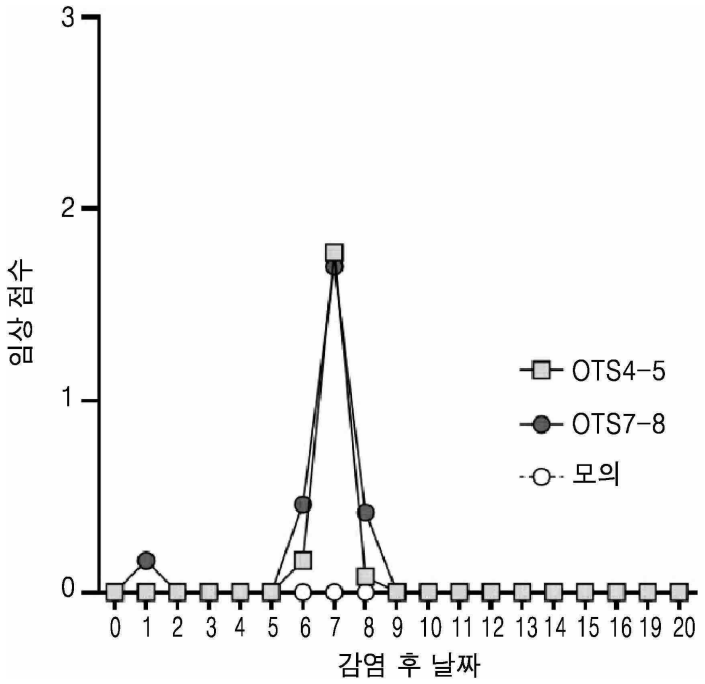
도면6c


120
110
100
90
80
초기 체중 (%)
OTS4-5
OTS7-8
모의
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 19 20
감염 후 날짜

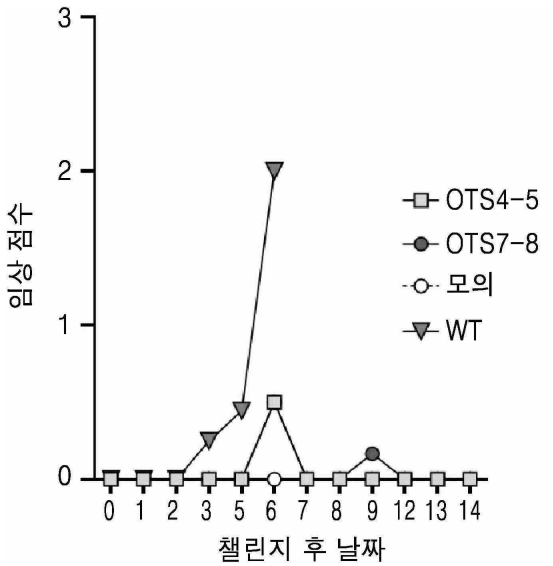
도면6d


120
110
100
90
80
초기 체중 (%)
0 1 2 3 5 6 7 8 9 12 13 14
챌린지 후 날짜
OTS4-5
OTS7-8
모의
WT

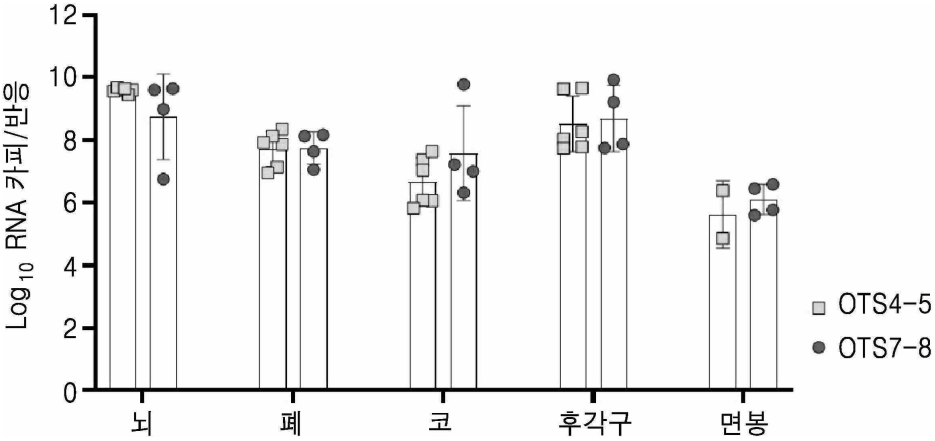
도면6e


3
2
1
0
임상 점수
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 19 20
감염 후 날짜
OTS4-5
OTS7-8
모의

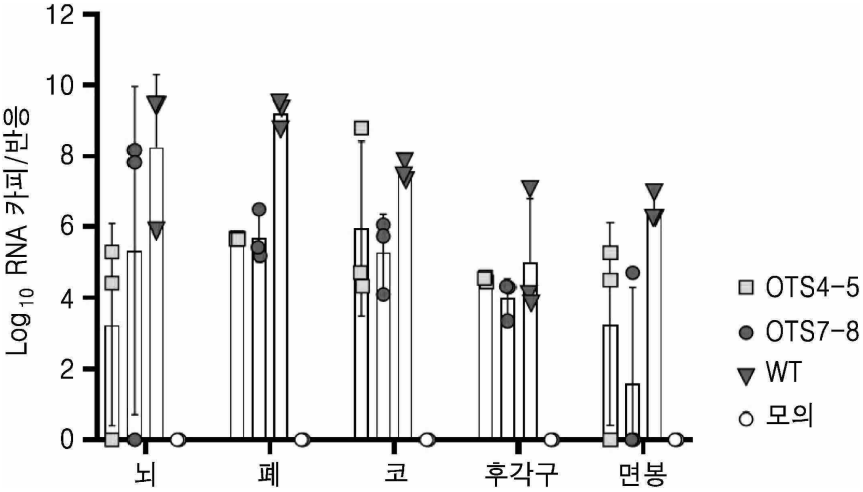
도면6f


3
2
1
0
임상 점수
0 1 2 3 5 6 7 8 9 12 13 14
챌린지 후 날짜
OTS4-5
OTS7-8
모의
WT

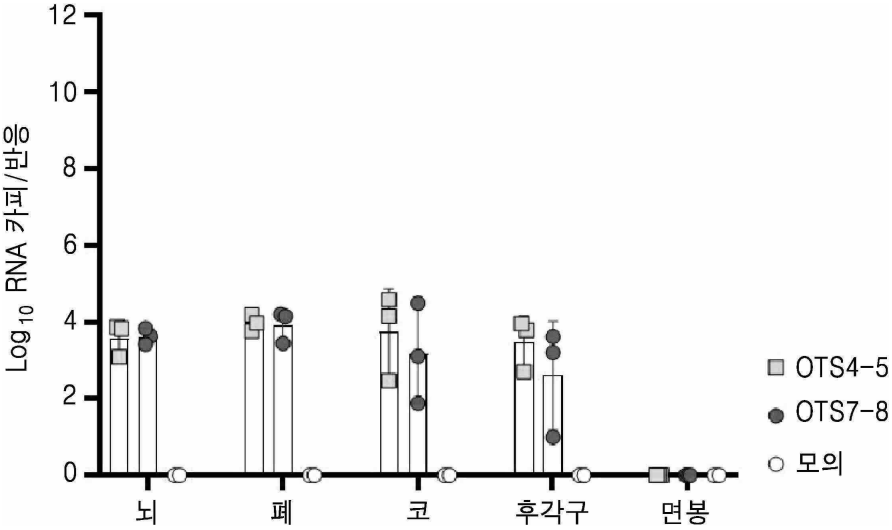
도면6g



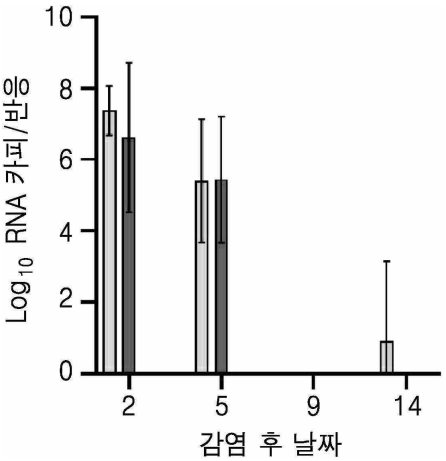
도면6h



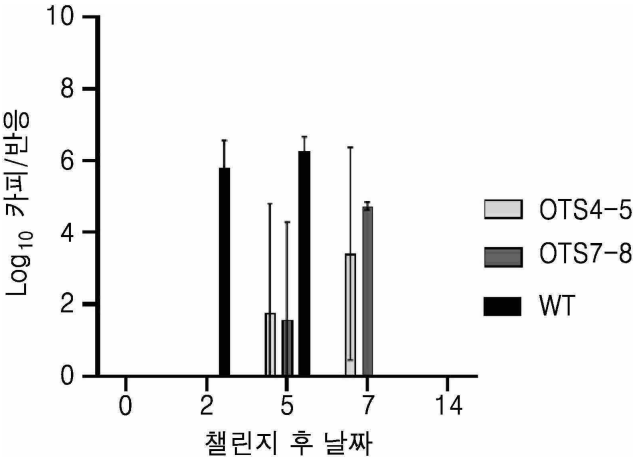
도면6i



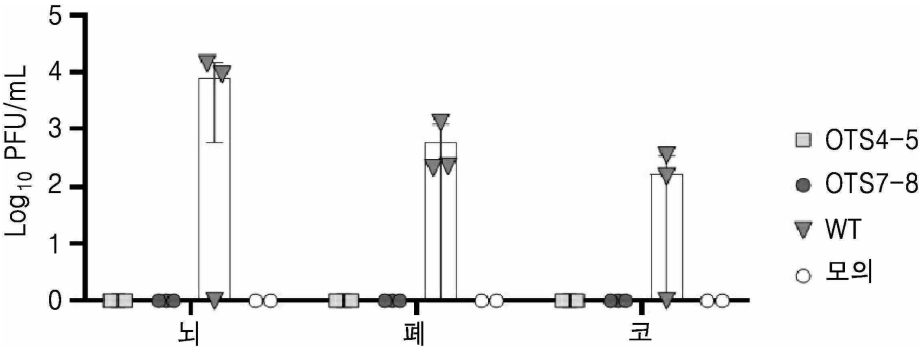
도면6j



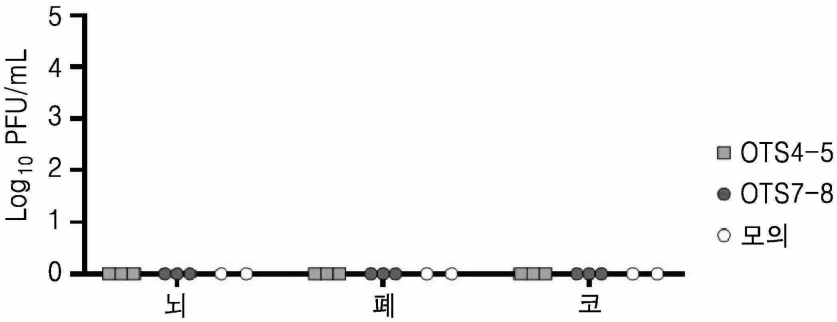
도면6k



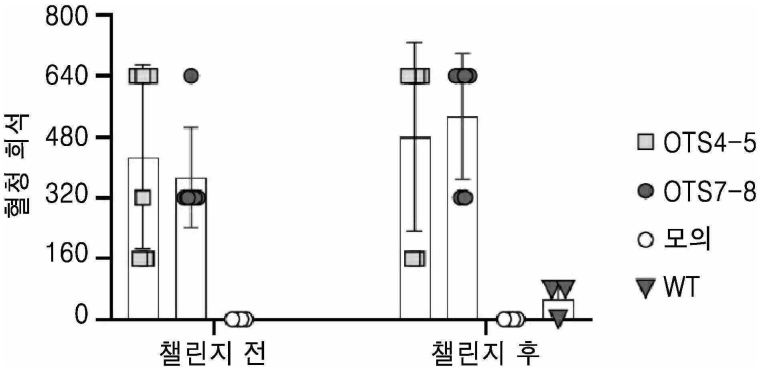
도면6l



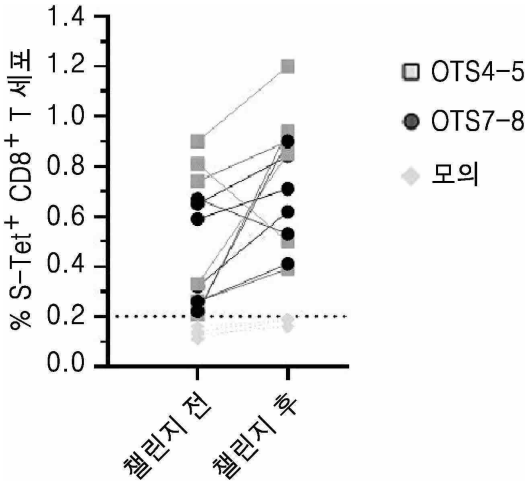
도면6m



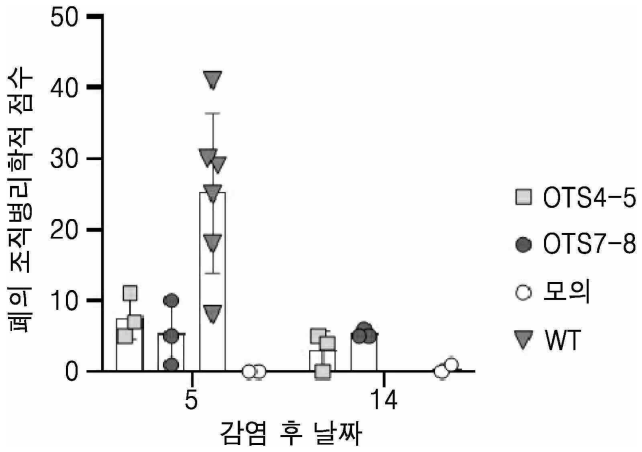
도면7a



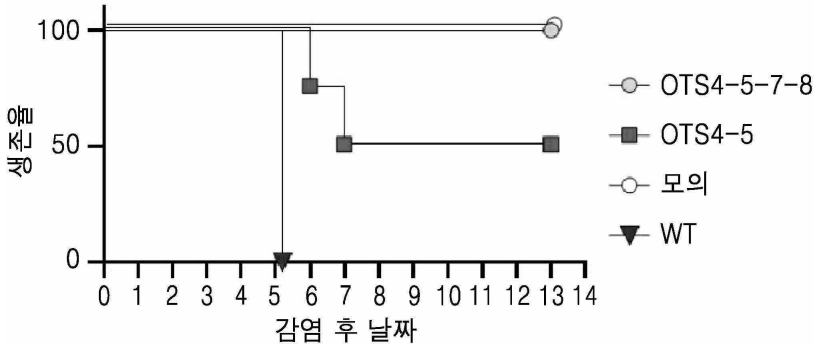
도면7b



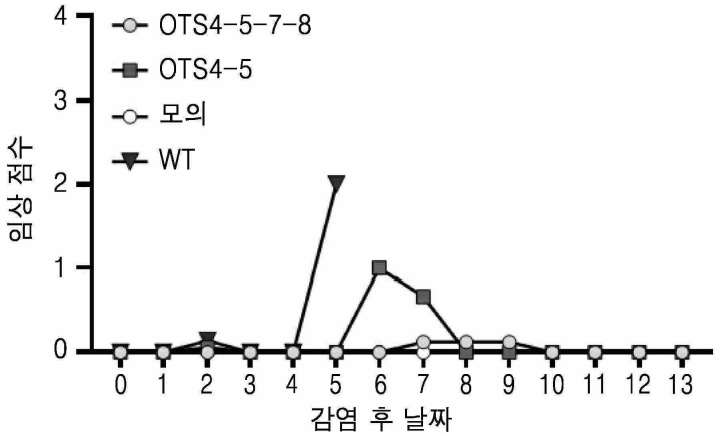
도면7c



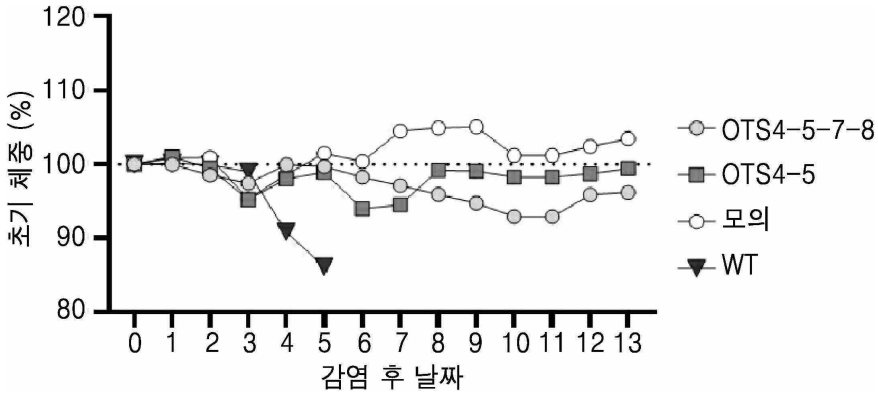
도면8a



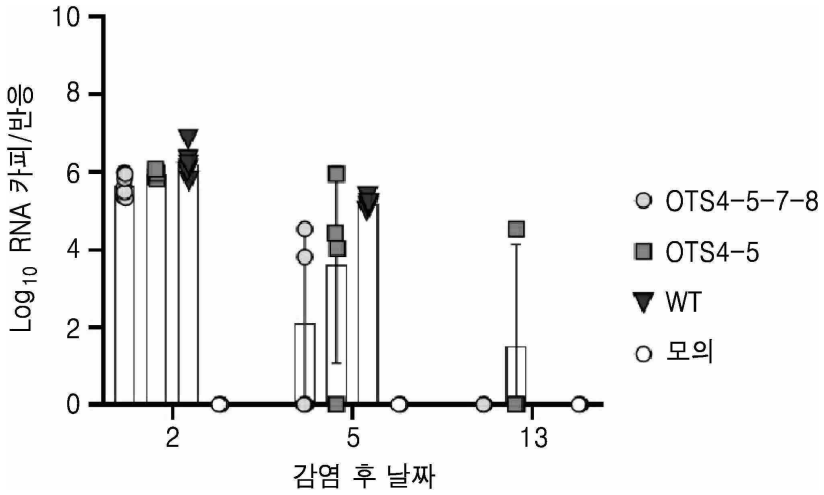
도면8b



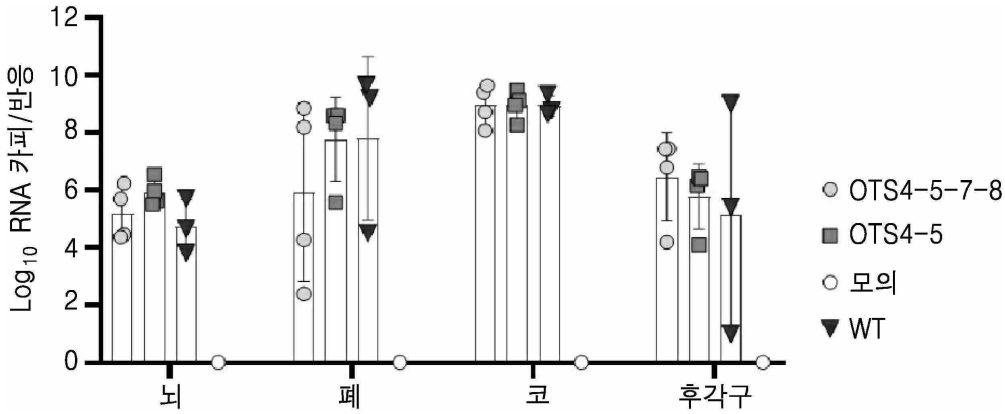
도면8c



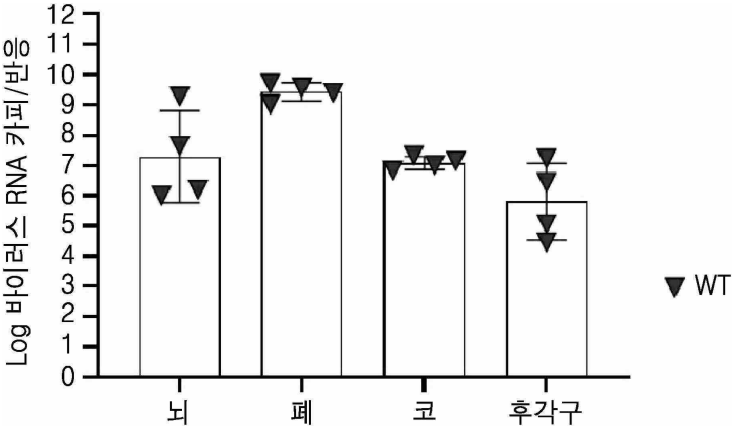
도면8d



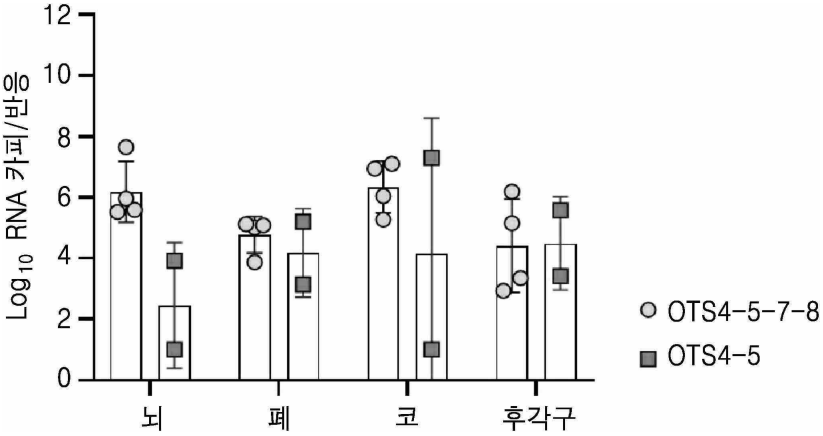
도면8e



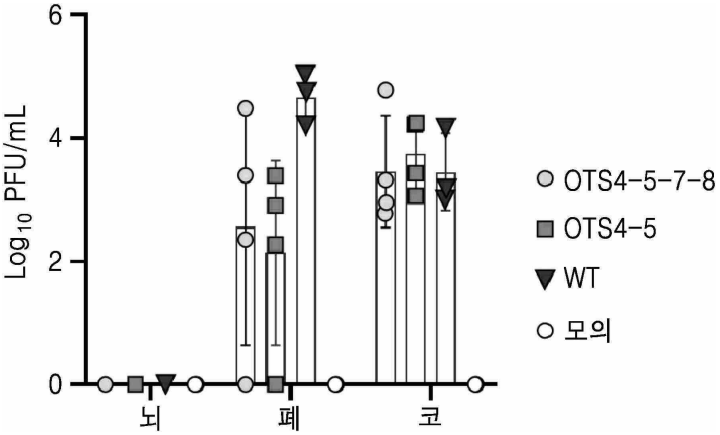
도면8f



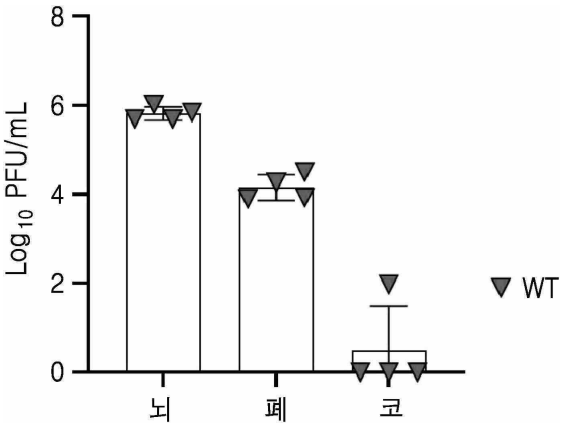
도면8g



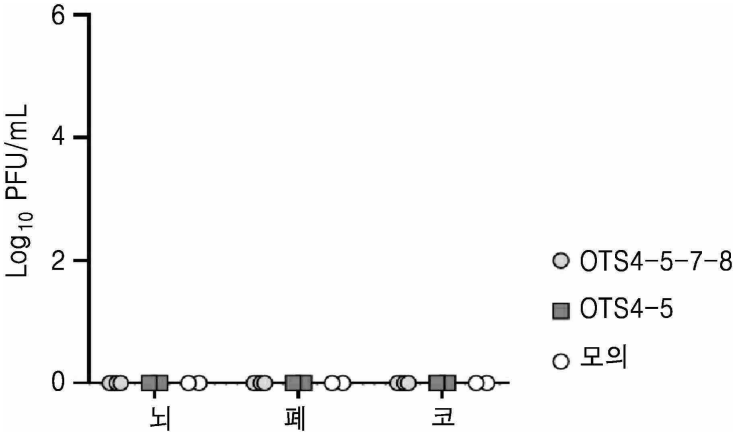
도면8h



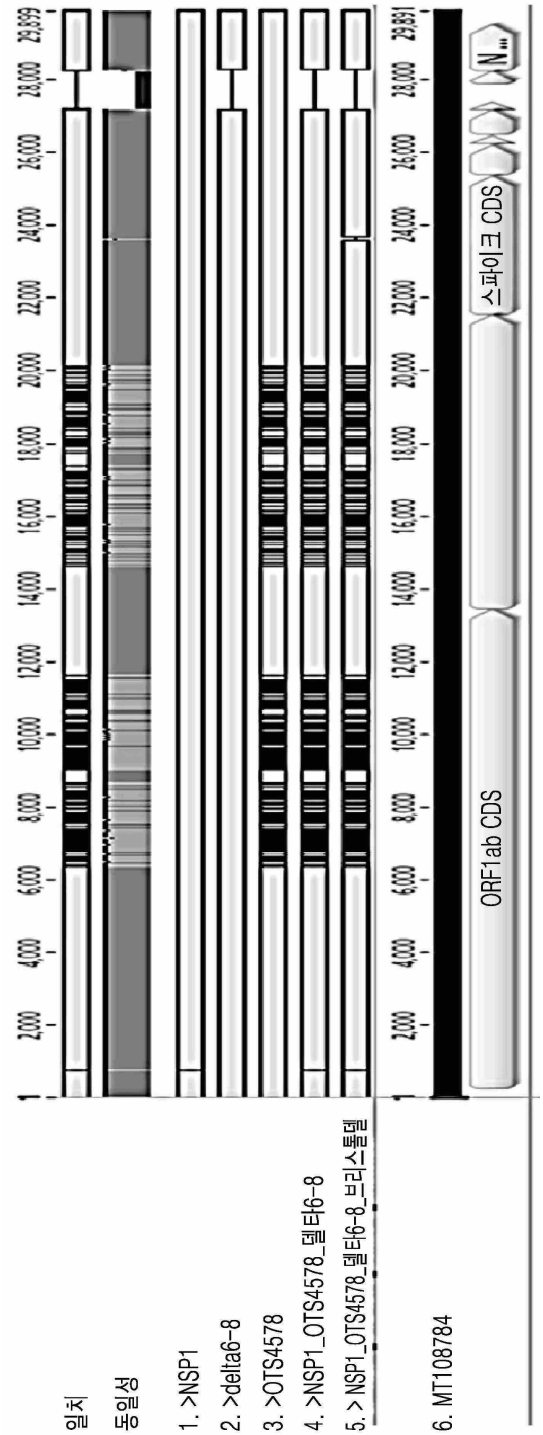
도면8i


8
6
4
2
0
Log10 PFU/mL
WT
뇌
폐
코

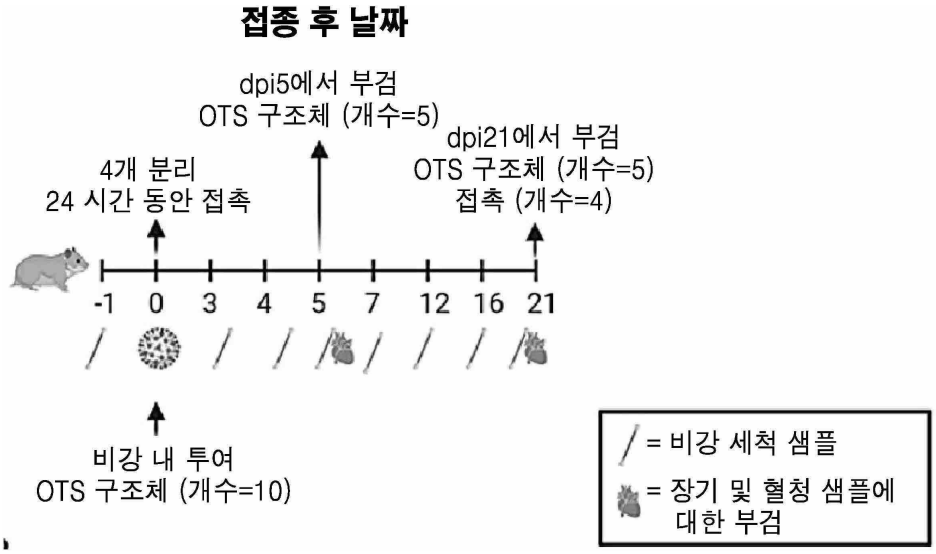
도면8j


6
4
2
0
Log10 PFU/mL
OTS4-5-7-8
OTS4-5
모의
뇌
폐
코

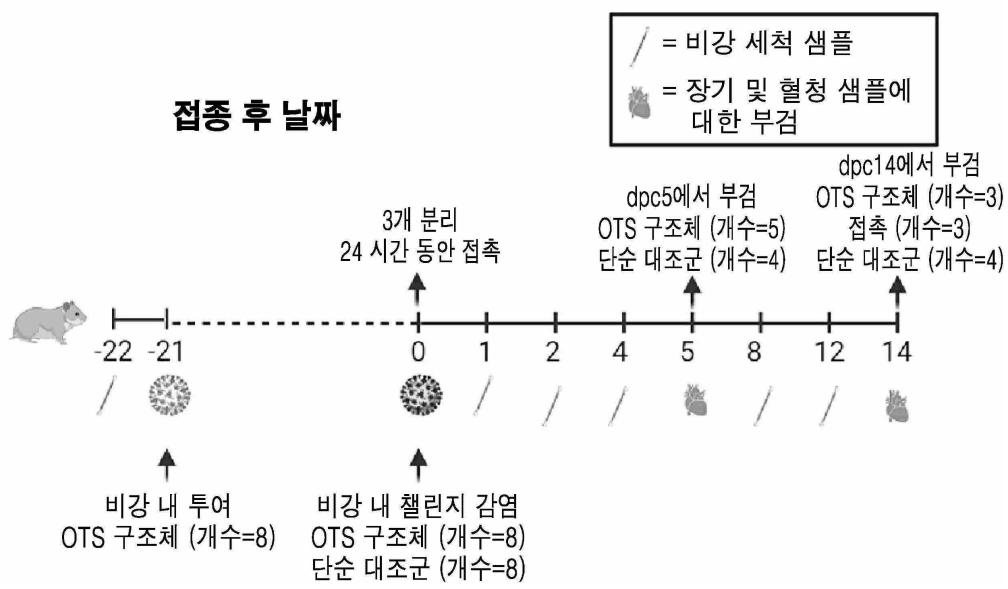
도면9


일치
동일성
1. >NSP1
2. >delta6-8
3. >OTS4578
4. >NSP1_OTS4578_델타6-8
5. >NSP1_OTS4578_델타6-8_브리스톨델
6. MT108784
ORF1ab CDS
스파이크 CDS

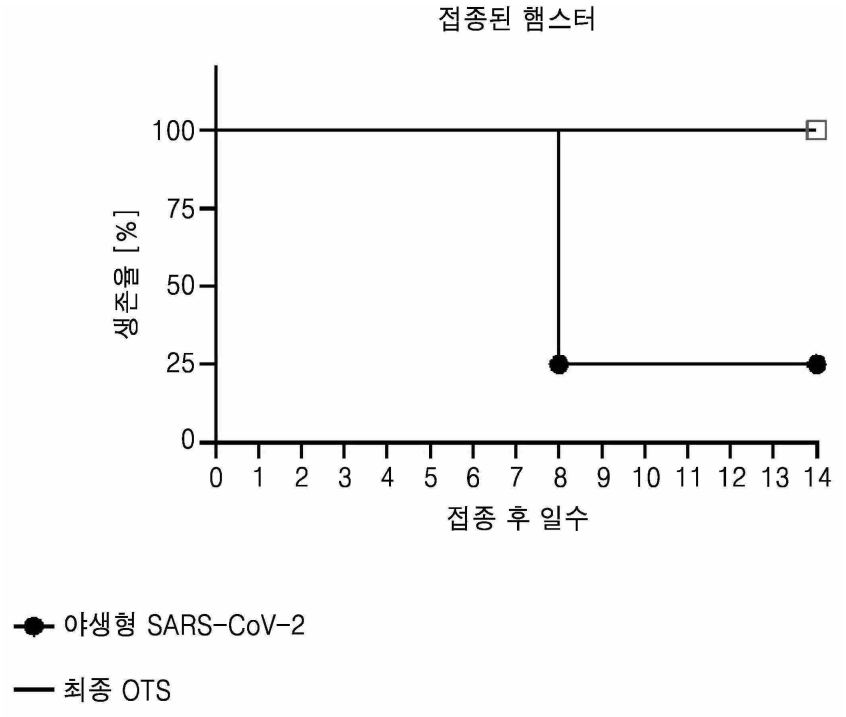
도면10a


접종 후 날짜
dpi5에서 부검
OTS 구조체 (개수=5)
dpi21에서 부검
OTS 구조체 (개수=5)
접촉 (개수=4)
4개 분리
24 시간 동안 접촉
-1 0 3 4 5 7 12 16 21
비강 내 투여
OTS 구조체 (개수=10)
= 비강 세척 샘플
= 장기 및 혈청 샘플에 대한 부검

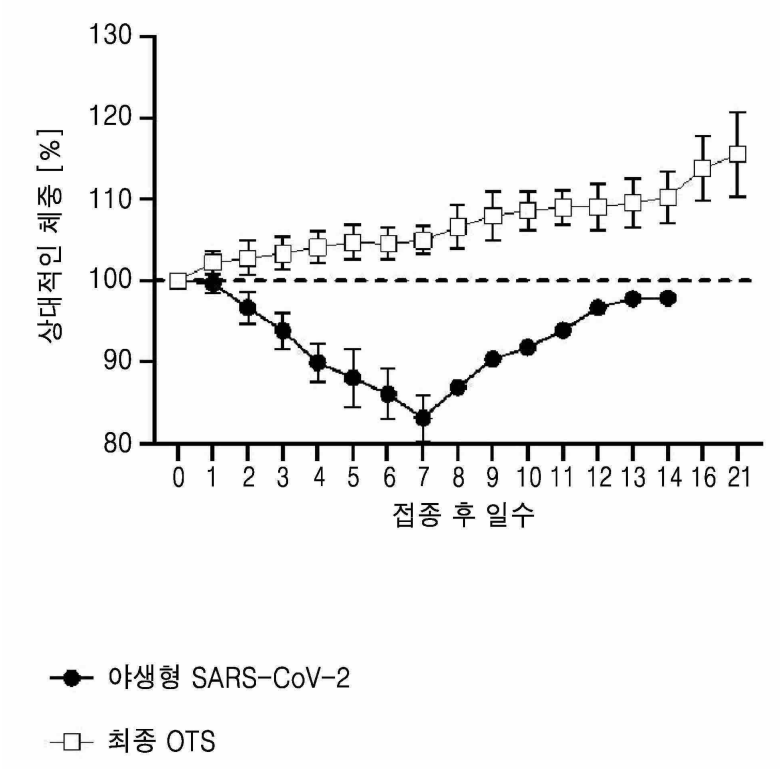
도면10b


= 비강 세척 샘플
= 장기 및 혈청 샘플에 대한 부검
접종 후 날짜
dpc14에서 부검
OTS 구조체 (개수=3)
접촉 (개수=3)
단순 대조군 (개수=4)
dpc5에서 부검
OTS 구조체 (개수=5)
단순 대조군 (개수=4)
3개 분리
24 시간 동안 접촉
-22 -21 0 1 2 4 5 8 12 14
비강 내 투여
OTS 구조체 (개수=8)
비강 내 챌린지 감염
OTS 구조체 (개수=8)
단순 대조군 (개수=8)

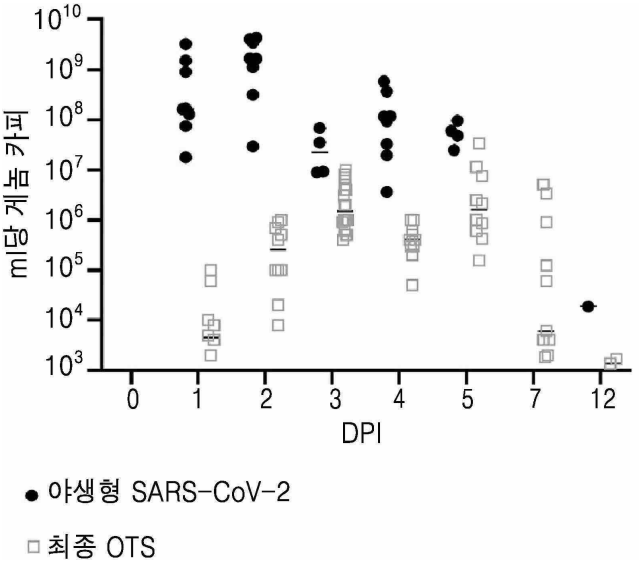
도면11a


접종된 햄스터
생존율 [%]
100
75
50
25
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
접종 후 일수
야생형 SARS-CoV-2
최종 OTS

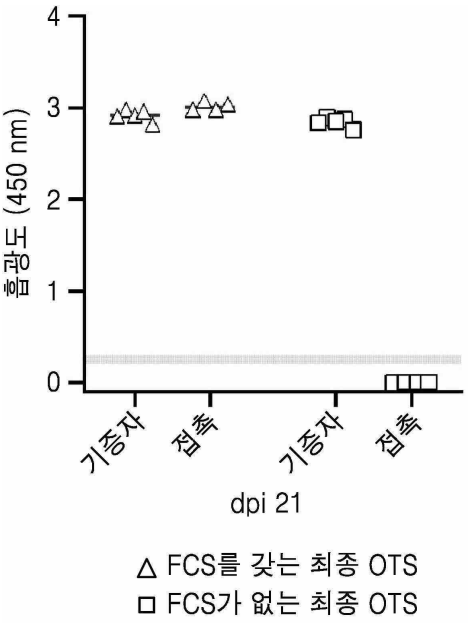
도면11b


상대적인 체중 [%]
130
120
110
100
90
80
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 16 21
접종 후 일수
야생형 SARS-CoV-2
최종 OTS

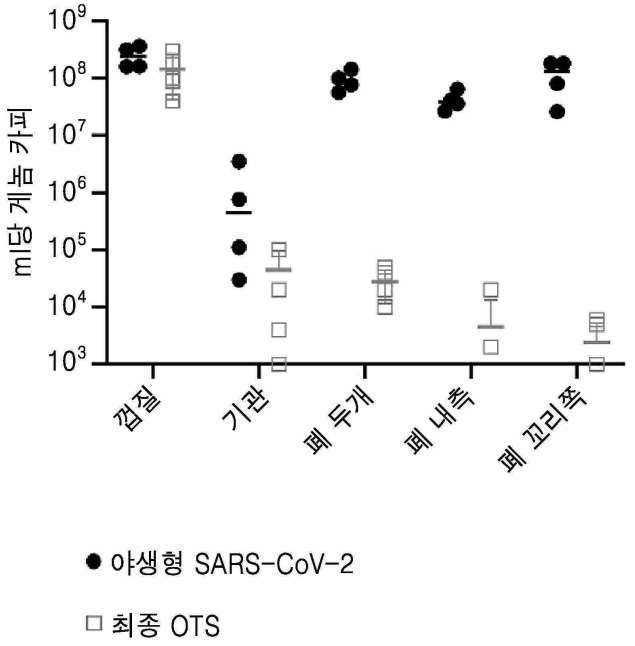
도면12


ml당 게놈 카피
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
10^{4}
10^{3}
0
1
2
3
4
5
7
12
DPI
야생형 SARS-CoV-2
최종 OTS

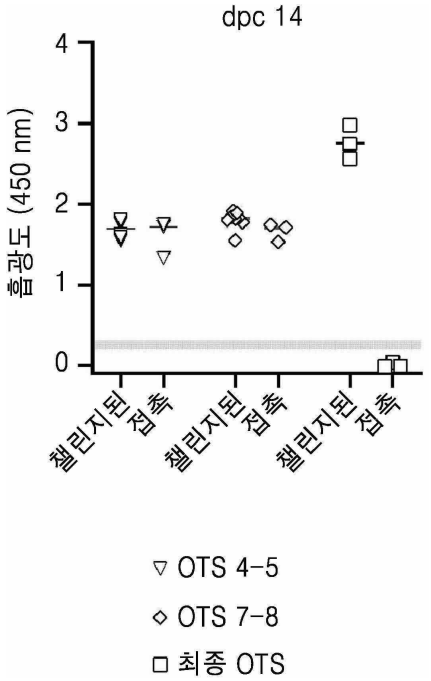
도면13


흡광도 (450 nm)
4
3
2
1
0
기증자
접촉
기증자
접촉
dpi 21
△ FCS를 갖는 최종 OTS
□ FCS가 없는 최종 OTS

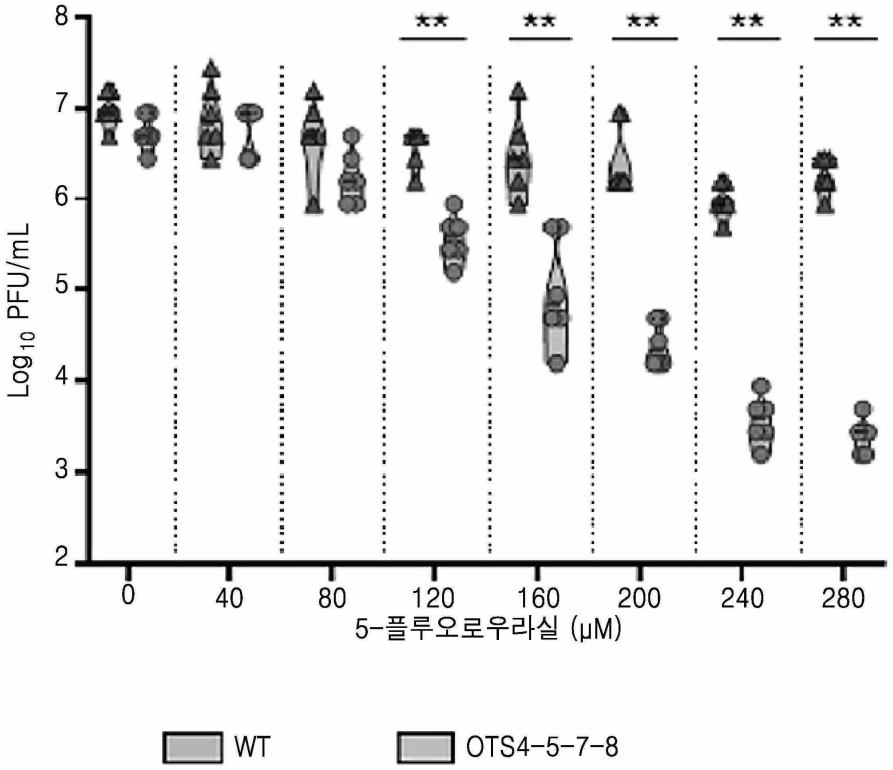
도면14


ml당 게놈 카피
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
검절
기관
폐 두개
폐 내측
폐 꼬리쪽
야생형 SARS-CoV-2
최종 OTS

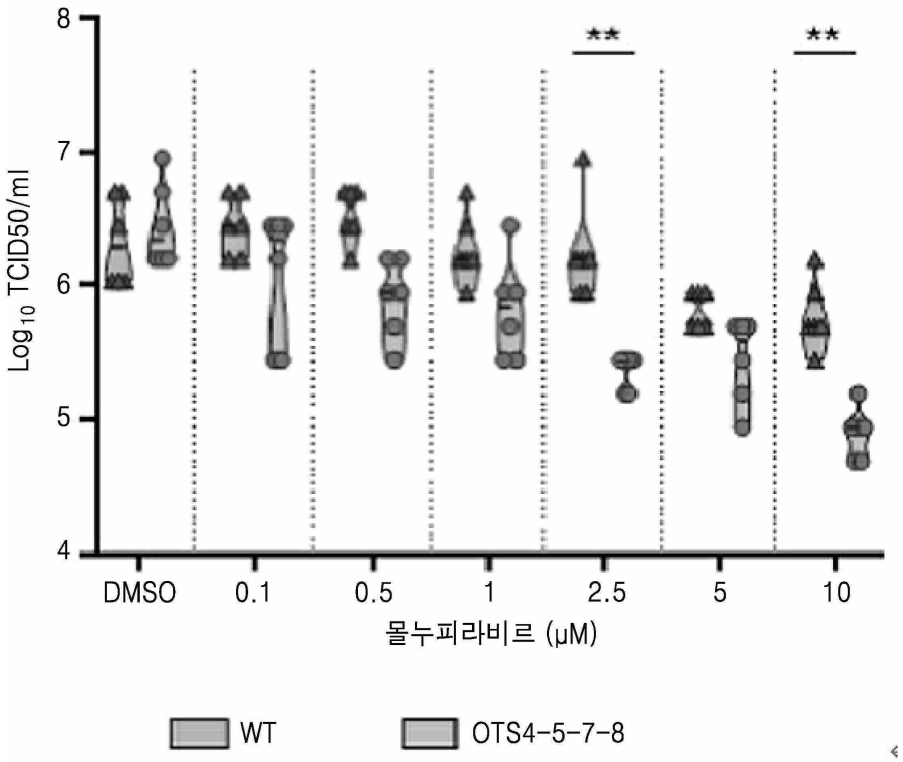
도면15


dpc 14
흡광도 (450 nm)
4
3
2
1
0
챌린지된
접촉
챌린지된
접촉
챌린지된
접촉
OTS 4-5
OTS 7-8
최종 OTS

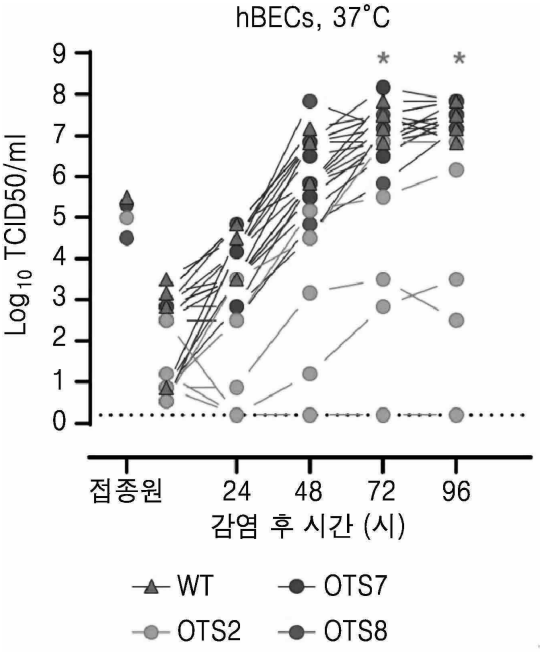
도면16a


8
7
6
5
4
3
2
Log10 PFU/mL
**
**
**
**
**
0
40
80
120
160
200
240
280
5-플루오로우라실 (μM)
WT
OTS4-5-7-8

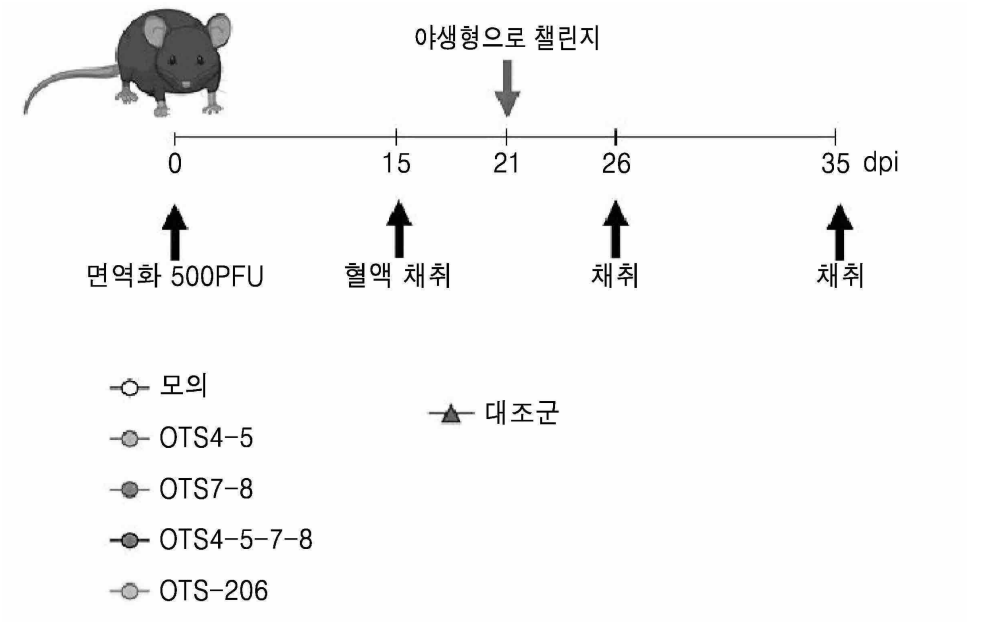
도면16b


8
7
6
5
4
Log10 TCID50/ml
**
**
DMSO
0.1
0.5
1
2.5
5
10
몰누피라비르 (μM)
WT
OTS4-5-7-8

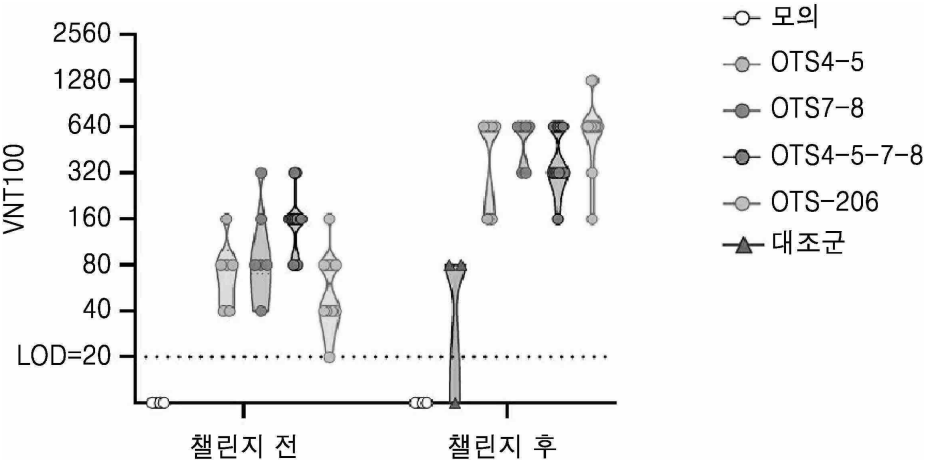
도면17


hBECs, 37°C
Log10 TCID50/ml
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
*
*
접종원
24
48
72
96
감염 후 시간 (시)
WT
OTS7
OTS2
OTS8

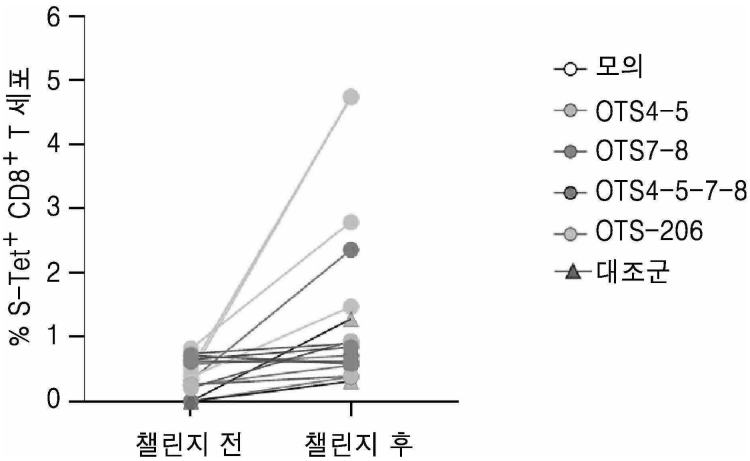
도면18a


야생형으로 챌린지
0
15
21
26
35 dpi
면역화 500PFU
혈액 채취
채취
채취
모의
OTS4-5
OTS7-8
OTS4-5-7-8
OTS-206
대조군

도면18b


2560
1280
640
320
160
80
40
LOD=20
VNT100
챌린지 전
챌린지 후
모의
OTS4-5
OTS7-8
OTS4-5-7-8
OTS-206
대조군

도면18c


6
5
4
3
2
1
0
% S-Tet+ CD8+ T 세포
챌린지 전
챌린지 후
모의
OTS4-5
OTS7-8
OTS4-5-7-8
OTS-206
대조군

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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