



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 120282795 A

(43) 申请公布日 2025. 07. 08

(21) 申请号 202380033194.2

(22) 申请日 2023.02.02

(30) 优先权数据

63/305979 2022.02.02 US

63/375803 2022.09.15 US

63/384075 2022.11.16 US

63/434815 2022.12.22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.09.30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/061878 2023.02.02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/150638 EN 2023.08.10

(71) 申请人 华盛顿大学

地址 美国密苏里州

(72) 发明人 M·迪亚摩德 I·德米特里耶夫

A·哈桑 D·居里尔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

专利代理师 黄登高 张华

(51) Int.Cl.

A61K 39/215 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

权利要求书3页 说明书59页

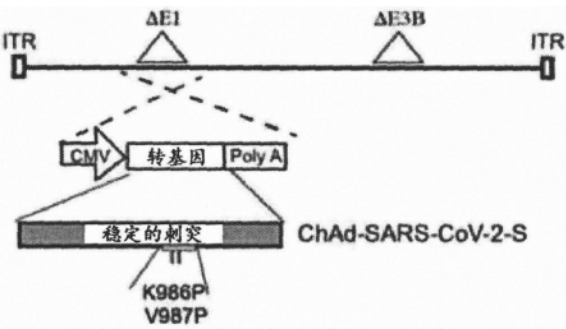
序列表(电子公布) 附图44页

(54) 发明名称

OMICRON冠状病毒疫苗构建体及其制备和使用方法

(57) 摘要

本文提供了编码SARS-CoV2冠状病毒的刺突蛋白变体的腺病毒载体,以及包含该载体的组合物。还提供了使用所提供的组合物预防和治疗SARS-CoV2的方法。



1. 一种腺病毒载体,其包含非人腺病毒的基因组,其中所述腺病毒的基因组已被修饰,使得所述载体缺少天然E1和任选的E3或E3B基因座,并且包含编码SARS-CoV-2刺突(S)蛋白的核酸序列,所述蛋白具有与SEQ ID NO:10、12、20或21中的任一个或其免疫原性部分或片段具有至少80%同一性的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的腺病毒载体,其中所述非人腺病毒是猿猴腺病毒(SAdV)。

3. 根据权利要求1或2中任一项所述的腺病毒载体,其中所述核酸序列编码与SEQ ID NO:10-12、20或21中的一个或多个具有至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%序列同一性的氨基酸序列。

4. 根据权利要求2所述的腺病毒载体,其包含与SEQ ID NO:13-19中的任一个具有至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%序列同一性的核酸序列或由其组成。

5. 一种腺病毒载体,其包含编码与SEQ ID NO:10-12、20、21中的任一个或其免疫原性部分或片段具有至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%同一性的氨基酸序列的核酸序列。

6. 一种腺病毒载体,其包含与SEQ ID NO:13-19中的任一个具有至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%序列同一性的核酸序列或由其组成。

7. 一种腺病毒载体,其包含核酸序列,其中所述核酸序列编码与SEQ ID NO:3具有至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%同一性的氨基酸序列,所述氨基酸序列包含来自以下组成的列表的至少10个、或至少15个、或至少20个、或至少25个、或至少30个突变:T19I、L24S、de125-27、69-70del、G142D、V213G、G339D、S371F、S373P、S375F、T376A、K417N、N440K、S477N、T478K、E484A、Q493R、L452R、F486V、Q498R、N501Y、D614G、H655Y、N679K、P681H、R682G、R683S、R685S、N764K、D796Y、A942P、Q954H、N969K、K988P和V989P。

8. 根据权利要求7所述的腺病毒载体,其进一步包含至少2个、或至少3个、或至少4个、或至少5个、或6个如F819P、A894P、A901P、A944P、K988P和V989P中所提供的稳定化突变。

9. 根据权利要求5-8中任一项所述的腺病毒载体,其中所述腺病毒载体在E1和任选的E3或E3B基因中具有功能性缺失。

10. 根据权利要求5-9任一项所述的腺病毒载体,其中所述腺病毒载体是猿猴腺病毒载体。

11. 根据权利要求10所述的腺病毒载体,其中所述腺病毒载体是黑猩猩腺病毒载体36。

12. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1-11中任一项所述的腺病毒载体以及药学

上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或佐剂。

13. 一种免疫原性组合物, 其包括根据权利要求1-11中任一项所述的腺病毒载体、药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或佐剂。

14. 根据权利要求12所述的药物组合物或根据权利要求10所述的免疫原性组合物, 其进一步包含一种或多种另外的活性成分。

15. 根据权利要求12所述的药物组合物或根据权利要求13所述的免疫原性组合物, 其中所述组合物配制用于鼻内或肌肉内施用。

16. 一种宿主细胞, 其用根据前述权利要求中任一项所述的腺病毒载体或组合物转导。

17. 一种包装细胞系, 其产生根据前述权利要求中任一项所述的组合物或病毒载体。

18. 根据权利要求17所述的包装细胞系, 其中所述细胞包含在根据前述权利要求中任一项所述的腺病毒载体中功能性缺失的腺病毒基因的补充物。

19. 根据权利要求17所述的包装细胞系, 其中所述功能性缺失的腺病毒基因的补充物包括E1、E3或E3B基因中的一个或多个。

20. 一种试剂盒, 其包含: (i) 根据权利要求16所述的宿主细胞、根据权利要求18所述的包装细胞系、根据权利要求1-11中任一项所述的腺病毒载体、根据权利要求12所述的药物组合物或根据权利要求13所述的免疫原性组合物中的一种或多种, 以及(ii) 使用说明。

21. 一种冠状病毒疫苗, 其包含根据权利要求1-11任一项所述的腺病毒载体。

22. 一种组合物, 其包含先前施用根据权利要求1-11中任一项所述的腺病毒载体、根据权利要求9所述的药物组合物或根据权利要求13所述的免疫原性组合物的第一受试者的血清。

23. 一种治疗患有冠状病毒感染的第二受试者的方法, 其包括向所述第二受试者施用免疫原性有效量的包含根据权利要求22所述的血清的组合物。

24. 一种在有需要的受试者中诱导针对冠状病毒的免疫反应的方法, 其包括向所述受试者施用免疫原性有效量的组合物, 所述组合物包含根据权利要求1-11中任一项所述的腺病毒载体、根据权利要求12所述的药物组合物或根据权利要求13所述的免疫原性组合物。

25. 一种在有需要的受试者中治疗或预防冠状病毒感染的方法, 其包括向所述受试者施用免疫原性有效量的组合物, 所述组合物包含根据权利要求1-11中任一项所述的腺病毒载体、根据权利要求9所述的药物组合物或根据权利要求13所述的免疫原性组合物或根据权利要求22所述的血清。

26. 根据权利要求23-25中任一项所述的方法, 其中所述组合物鼻内施用。

27. 根据权利要求23-25中任一项所述的方法, 其中所述组合物肌肉内施用。

28. 根据权利要求23-27所述的方法, 其进一步包括一次或多次额外施用所述组合物。

29. 根据权利要求24或25中任一项所述的方法, 其中所述冠状病毒是SARS-CoV-2病毒或其变体。

30. 根据权利要求29所述的方法, 其中所述冠状病毒是 α 、 β 、 γ 、 δ 或omicron变体或其亚变体。

31. 根据权利要求29所述的方法, 其中所述冠状病毒是omicron毒株或其亚变种。

32. 根据权利要求24或25所述的方法, 其中所述受试者是人。

33. 根据权利要求32所述的方法, 其中所述受试者患有冠状病毒感染、疑似患有冠状病

毒感染、或处于发展冠状病毒感染的风险中。

34. 一种制备腺病毒的方法,其包括用根据权利要求1-21中任一项所述的腺病毒载体转染细胞;在使得所述细胞产生重组腺病毒条件下培养所述细胞;并收集所述重组腺病毒。

35. 根据权利要求34所述的方法,其中所述细胞是HEK、Vero或PER细胞。

OMICRON冠状病毒疫苗构建体及其制备和使用方法

[0001] 政府支持

[0002] 本发明在美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)颁发的CA211096下在政府支持下完成。政府对本发明享有某些权利。

技术领域

[0003] 本公开内容大体上涉及生物技术和医学领域,并且更具体地,涉及可用于疫苗中以增强针对呼吸道病毒感染的疗法的核酸构建体、多肽和载体及其使用方法。

[0004] 相关申请的交叉引用

[0005] 本申请要求于2022年12月22日提交的美国临时申请号63/434,815的权益,并要求于2022年11月16日提交的美国临时申请号63/384,075的权益,并要求于2022年9月15日提交的美国临时申请号63/375,803的权益,并要求于2022年2月2日提交的美国临时申请号63/305,979的权益,其公开内容通过引用整体并入本文。

背景技术

[0006] 病毒感染每年导致数十万的死亡。然而,许多病毒的治疗选择有限。此外,病毒携带者可能是无症状的,这导致受感染但无症状的个体具有高传播率。严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)是COVID-19综合征的病原体,该综合征可迅速进展为肺炎、呼吸衰竭和全身炎性疾病。SARS-CoV-2是一种正义单链RNA病毒。作为一种 β 冠状病毒,SARS-CoV-2与另外两种高致病性呼吸道病毒SARS-CoV和中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)有关。SARS-CoV-2感染导致可进展为呼吸衰竭,并且还会出现心脏病理、胃肠道疾病、凝血病和过度炎症综合征的临床综合征。老年人、免疫功能低下者和患有合并症(例如肥胖、糖尿病和高血压)的那些人死于COVID-19的风险最大。自大流行开始以来,全球已记录超过6.69亿感染和680万死亡。

[0007] COVID-19的广泛发病率、死亡率和使社会经济不稳定的后果凸显了迫切需要部署有效的SARS-CoV-2疫苗,以减轻感染的严重程度、遏制传播、结束大流行并防止其复发。

发明内容

[0008] 本技术的一个方面涵盖一种腺病毒载体,其包含非人腺病毒的基因组。腺病毒的基因组已被修饰,使得载体缺少天然的E1和可选的E3或E3B基因座,并且包含编码SARS-CoV-2刺突(S)蛋白的核酸序列,该蛋白具有与SEQ ID NOS:10、12、20或21中的任一个或其免疫原性部分或片段具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[0009] 本技术的另一方面涵盖一种腺病毒载体,其包含编码与SEQ ID NO:10-12、20、21中的任一个或其免疫原性部分或片段具有至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%同一性的氨基酸序列的核酸序列。

[0010] 本技术的另一方面涵盖一种腺病毒载体,其包含与SEQ ID NO:13-19中的任一个具有至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%序列同一性的核酸序列或由其组成。

[0011] 本技术的另一方面涵盖一种腺病毒载体,其包含核酸序列,其中该核酸序列编码与SEQ ID NO:3具有至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%同一性的氨基酸序列,并且所述氨基酸序列包含来自以下组成的列表的至少10个、或至少15个、或至少20个、或至少25个、或至少30个突变:T19I、L24S、de125-27、69-70del、G142D、V213G、G339D、S371F、S373P、S375F、T376A、K417N、N440K、S477N、T478K、E484A、Q493R、L452R、F486V、Q498R、N501Y、D614G、H655Y、N679K、P681H、R682G、R683S、R685S、N764K、D796Y、A942P Q954H、N969K、K988P和V989P。

[0012] 另一个方面涵盖一种药物组合物,其包含本文所述的腺病毒载体。类似地,一个方面涵盖一种免疫原性组合物,其包含本文所述的腺病毒载体。

[0013] 本技术的一些方面涵盖用本文所述的腺病毒载体转导的宿主细胞,或产生本文所述的腺病毒载体的包装细胞系。

[0014] 本技术的其他方面涵盖试剂盒。一般而言,试剂盒包括:(i) 本文所述的宿主细胞、本文所述的包装细胞系、本文所述的腺病毒载体、本文所述的药物组合物或本文所述的免疫原性组合物中的一种或多种,以及(ii) 使用说明书。

[0015] 本技术的某些方面涵盖一种冠状病毒疫苗,其包含如本文详述的腺病毒载体。在特定方面,本技术涵盖一种组合物,其包含先前施用本文所述腺病毒载体、本文所述药物组合物或本文所述免疫原性组合物的第一受试者的血清。本技术进一步涵盖一种治疗患有冠状病毒感染的第二受试者的方法,该方法包括向第二受试者施用免疫原性有效量的包含第一受试者血清的组合物。

[0016] 在另一个方面,本技术涵盖一种在有需要的受试者中诱导针对冠状病毒的免疫反应的方法。该方法包括向受试者施用免疫原性有效量的组合物,所述组合物包含本文所述的腺病毒载体、本文所述的药物组合物或本文所述的免疫原性组合物。

[0017] 下面将更详细地描述其他方面和迭代。

附图说明

[0018] 本领域技术人员将理解,下面描述的附图仅用于说明目的。附图并非旨在以任何方式限制本教导的范围。

[0019] 申请文件包含至少一个彩色附图。经请求并支付必要的费用后,专利局将提供本专利申请公开的彩色附图副本。

[0020] 图1A显示了转基因盒的图解:ChAd-对照没有转基因插入物;ChAd-SARS-CoV-2-S编码具有两个所示脯氨酸突变的SARS-CoV-2S蛋白。

[0021] 图1B显示ChAd-SARS-CoV-2-S转导的293细胞与抗S mAb的结合。(左)概述:++、+++、++++、-分别表示<25%、25-50%、>50%和无结合。(右)两次实验的代表性流式细胞术直方图。

[0022] 图1C显示四周龄雌性BALB/c小鼠用ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由肌肉内途径免疫,且四周后加强。评估了初免或加强后第21天的免疫小鼠血清中的抗体反应。

[0023] 图1D显示了ELISA测量的抗S和RBD IgG水平。

[0024] 图1E显示FRNT确定的中和活性。数据汇集自两次实验 ($n=15$ 至 30 ;Mann-Whitney检验:****, $P<0.0001$)。

[0025] 图1F显示在加强免疫后第7天用S蛋白肽池再刺激后分析细胞介导的反应。通过流式细胞术测定脾细胞的CD8⁺T细胞中的IFN γ 和颗粒酶B表达以及CD4⁺T细胞中仅颗粒酶B表达。

[0026] 图1G显示了阳性细胞群体的频率和数量汇总 ($n=5$;Mann-Whitney检验:*, $P<0.05$;**, $P<0.01$;***, $P<0.001$)。条形表示中值,且虚线为测定的检测限 (LOD)。

[0027] 图1H显示在加强后7天收获脾脏,并通过ELISPOT测量分泌SARS-CoV-2刺激特异性IgG+抗体的细胞 (ASC) 频率 (Mann-Whitney检验:****, $P<0.0001$)。条形和柱形显示中值,且虚线表示测定的检测限 (LOD)。

[0028] 图2A显示了通过ELISA测定在初免或加强后第21天收集的来自ChAd对照免疫小鼠的血清 (如图1所述) 的S特异性IgG反应。经由肌肉内途径用ChAd对照或ChAd-SARS-CoV-2-S对四周龄雌性BALB/c小鼠进行初免或初免和加强。

[0029] 图2B显示在初免后第21天收集来自ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2疫苗接种的小鼠的血清样本。经由肌肉内途径,用ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S对四周龄雌性BALB/c小鼠进行初免或初免和加强。

[0030] 图2C显示在加强后第21天收集来自ChAd对照或ChAd-SARS-CoV-2疫苗接种的小鼠的血清样本,并通过FRNT测定中和活性。显示了所示疫苗的与个体小鼠相对应的血清中和曲线 (每组 $n=15-30$)。每个点表示两个技术重复的平均值,误差线表示标准差 (SD)。如通过灶斑减少中和试验 (FRNT) 测量的,ChAd-SARS-CoV-2-S疫苗诱导中和抗体。

[0031] 图2D显示了在通过肌肉内途径接种疫苗的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S小鼠的SARS-CoV-2激发前5天和激发后8天获得的配对血清中ELISA测量的抗SARS-CoV-2NP IgG反应 ($n=5$;** $P<0.01$;*** $P<0.001$;配对t检验)。虚线表示来自未经处理的血清的平均IgG滴度。

[0032] 图3显示用于分析T细胞反应的门控策略。四周龄雌性BALB/c小鼠用ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S进行免疫,并在四周后进行加强。在加强后第7天分析脾细胞中的T细胞反应。针对淋巴细胞 (FSC-A/SSC-A)、单细胞 (SSC-W/SSC-H)、活细胞 (Aqua-)、CD45⁺、CD19⁻,然后是表达IFN γ 或颗粒酶B的CD4⁺或CD8⁺细胞群体对细胞进行门控。

[0033] 图4A显示仅初免后通过FRNT测定来自所示疫苗组的血清中Hu-AdV5-hACE2的中和活性。对四周龄雌性BALB/c小鼠进行初免或初免和加强。在Hu-AdV5-hACE2转导前一天收集血清样本。

[0034] 图4B显示在初免和加强后通过FRNT测定来自所示疫苗组的血清中Hu-AdV5-hACE2的中和活性。每个符号表示单只动物;每个点表示两次技术重复,且条形表示范围。包括阳性对照 (抗Hu-Adv5血清) 作为参考框。

[0035] 图5A是用于研究肌肉内递送的ChAd-SARS-CoV-2-S对SARS-CoV-2感染的保护效力的疫苗接种和激发方案。四周龄BALB/c雌性小鼠用ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S免疫。

一些小鼠接受了同源疫苗的加强剂量。在免疫后第35天,小鼠如下用SARS-CoV-2激发:用抗Ifnar1 mAb处理动物,并在一天后经由鼻内途径用Hu-AdV5-hACE2转导。五天后,经由鼻内途径用 4×10^5 个病灶形成单位 (FFU) 的SARS-CoV-2激发小鼠。

[0036] 图5B显示在4和8dpi时收获组织用于分析。通过噬斑测定测量肺中的感染性病毒。

[0037] 图5C显示通过RT-qPCR (C) 测量了4和8dpi时肺、脾和心脏中的病毒RNA水平 ($n=3-7$, Mann-Whitney检验:*** $P<0.001$)。

[0038] 图5D显示使用SARS-CoV-2探针 (棕色) 在4dpi时收获的肺中进行病毒RNA原位杂交。图像显示了低倍 (顶部;比例尺100 μm) 和中倍 (中间;比例尺100 μm) 放大倍数以及高倍放大倍数插图 (每组 $n=3$ 的代表性图像)。

[0039] 图5E显示在相对于Gapdh水平归一化并与未接种疫苗、未受激发的对照比较后,通过RT-qPCR确定了来自4dpi时的肺匀浆的所示细胞因子和趋化因子的基因表达的倍数变化 ($n=7$; Mann-Whitney检验:***, $P<0.001$)。

[0040] 图5F显示接受初免-加强免疫的小鼠在加强免疫后第35天进行激发。在4dpi时收集组织用于分析。通过噬斑测定确定肺中的感染性病毒。

[0041] 图5G显示接受初免-加强免疫的小鼠在加强免疫后第35天进行激发,并使用RT-qPCR测量肺、脾和心脏中的病毒RNA (G) ($n=6-7$; Mann-Whitney检验:**, $P<0.01$)。(B-C和E-G) 柱形显示中值,且虚线表示测定的LOD。

[0042] 图6显示用ChAd-SARS-CoV-2-S进行单剂量肌肉内疫苗接种保护小鼠免受SARS-CoV-2诱导的肺部炎症。用ChAd-对照和ChAd-SARS-CoV-2-S免疫四周龄雌性BALB/c小鼠,并按照图5中描述的方案进行激发。在8dpi时收获肺。切片用苏木精和伊红染色,并在40倍 (左;比例尺250 μm)、200倍 (中;比例尺50 μm) 和400倍 (右;比例尺25 μm) 放大倍数下成像。每个图像代表一组3只小鼠。

[0043] 图7A显示了研究ChAd-SARS-CoV-2-S的鼻内免疫后的免疫反应的实验方案。经由鼻内途径用ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S免疫五周龄BALB/c雌性小鼠。

[0044] 图7B显示了评估初免后一个月免疫小鼠血清中的抗体反应。ELISA测量了SARS-CoV-2S特异性和RBD特异性IgG。

[0045] 图7C显示了ELISA测量的SARS-CoV-2S特异性和RBD特异性IgA水平。

[0046] 图7D显示了FRNT测定的中和活性。数据汇集自两次实验,每组 $n=10-25$ 只小鼠 (Mann-Whitney检验:****, $P<0.0001$)。

[0047] 图7E显示接受加强剂量的小鼠在一周后被处死以评估粘膜和细胞介导的免疫反应。SARS-CoV-2S特异性和RBD特异性IgG。

[0048] 图7F显示通过ELISA测定BAL液中的SARS-CoV-2S特异性和RBD特异性IgA水平。

[0049] 图7G显示通过FRNT测量BAL液对SARS-CoV-2的中和活性。

[0050] 图7H显示在用S蛋白肽池再刺激后,通过流式细胞术测定肺中的CD8+T细胞的IFN γ 和颗粒酶B表达。

[0051] 图7I显示也针对CD103和CD69的表达对肺中的CD8+T细胞进行表型分析。

[0052] 图7J显示了通过ELISPOT测量加强后一周收获的脾脏中分泌SARS-CoV-2刺突特异性IgG+和IgA+抗体的细胞 (ASC) 的频率。粘膜和细胞介导的响应的数据汇集自两个实验 (E-I: 每组 $n=7-9$; Mann-Whitney检验:***, $P<0.001$) ; J: 每组 $n=5$; Mann-Whitney检验:**, $P<$

0.01;***, $P < 0.001$)。(B-J) 条形和柱形显示中值,且虚线表示测定的LOD。

[0053] 图8A显示用SARS-CoV-2毒株2019n-CoV/USA_WA1/2020测试来自ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S疫苗接种的小鼠的血清样本的中和活性(每组 $n=8-10$)。经由鼻内接种途径用ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S免疫五周龄雌性BALB/c小鼠。通过FRNT测定免疫后一个月收集的血清样本的中和活性。在初免后第30天对小鼠进行加强,并在一周后处死以评估免疫反应。

[0054] 图8B显示测试来自ChAd-SARS-CoV-2-S疫苗接种的小鼠的血清样本的对表达重组荧光素酶的SARS-CoV-2病毒(野生型(左)和D614G变体(中间))的中和作用。(右)指示了配对EC50值($n=5$;n.s.不显著,配对t检验)。

[0055] 图8C显示从ChAd对照或ChAd-SARS-CoV-2-S疫苗接种的小鼠中收集BAL液,并使用FRNT测定测量对SARS-CoV-2毒株2019n-CoV/USA_WA1/2020的中和作用(每组 $n=8-10$)。每个点表示两个技术重复的平均值,误差线表示SD。

[0056] 图9A显示在4和8dpi时收集组织和鼻冲洗液用于分析。通过噬斑测定测量肺中的感染性病毒。经由鼻内途径用ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S免疫五周龄BALB/c雌性小鼠。在免疫后第35天,小鼠如下进行激发:用抗Ifnar1 mAb处理动物,并在一天后经由鼻内途径用Hu-AdV5-hACE2转导。五天后,用 4×10^5 FFU的SARS-CoV-2鼻内激发小鼠。

[0057] 图9B显示通过RT-qPCR测量4和8dpi时肺、脾、心脏、鼻甲和鼻冲洗液中的病毒RNA水平。经由鼻内途径用ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S免疫五周龄BALB/c雌性小鼠。在免疫后第35天,小鼠如下进行激发:用抗Ifnar1 mAb处理动物,并在一天后经由鼻内途径用Hu-AdV5-hACE2转导。五天后,用 4×10^5 FFU的SARS-CoV-2鼻内激发小鼠。

[0058] 图9C显示4dpi时的肺匀浆中通过RT-qPCR确定的所示细胞因子和趋化因子的基因表达的倍数变化(相对于Gapdh归一化,并与未经处理的对照比较)(2次实验, $n=6-9$;显示中位数:*, $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$;Mann-Whitney检验)。柱形显示中位数,且虚线表示测定的LOD。经由鼻内途径用ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S免疫五周龄BALB/c雌性小鼠。在免疫后第35天,小鼠如下进行激发:用抗Ifnar1 mAb处理动物,并在一天后经由鼻内途径用Hu-AdV5-hACE2转导。五天后,用 4×10^5 FFU的SARS-CoV-2鼻内激发小鼠。

[0059] 图9D显示在8dpi时收获肺。切片用苏木精和伊红染色,并在40倍(左;比例尺250 μ m)、200倍(中间;比例尺50 μ m)和400倍(右;比例尺25 μ m)放大倍数下成像。每个图像代表一组3只小鼠。五周龄BALB/c雌性小鼠经由鼻内途径用ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S免疫。在免疫后第35天,小鼠如下进行激发:用抗Ifnar1 mAb处理动物,并在一天后经由鼻内途径用Hu-AdV5-hACE2转导。五天后,用 4×10^5 FFU的SARS-CoV-2鼻内激发小鼠。

[0060] 图9E显示在通过鼻内途径接种疫苗的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S小鼠的SARS-CoV-2激发前5天和激发后8天获得的配对血清中ELISA测量的抗SARS-CoV-2NP IgM(左)和IgG(右)抗体反应($n=6$;ns:不显著;** $P < 0.01$,**** $P < 0.0001$;配对t检验)。虚线表示来自未经处理的血清的平均IgM和IgG滴度($n=6$)。五周龄BALB/c雌性小鼠经由鼻内途径用ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S免疫。在免疫后第35天,小鼠如下进行激发:用抗Ifnar1 mAb处理动物,并在一天后经由鼻内途径用Hu-AdV5-hACE2转导。五天后,用 4×10^5 FFU的SARS-CoV-2鼻内激发小鼠。

[0061] 图10A显示免疫方案。用 10^{10} 个ChAd对照病毒颗粒或递减剂量(10^{10} 、 10^9 和 10^8 vp)的ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN或IM途径对五周龄雌性BALB/c小鼠进行疫苗接种。

[0062] 图10B显示评估免疫小鼠血清中的体液反应($n=6-14$)。提供了100天时来自IN免疫小鼠的ELISA测量的抗S和RBD IgG水平。单因素方差分析以及Dunnett事后检验比较了疫苗组和对照组:ns,不显著;** $P<0.01$ **** $P<0.0001$)。

[0063] 图10C显示评估免疫小鼠血清中的体液反应($n=6-14$)。提供了100天时来自IN免疫小鼠的ELISA测量的IgA水平。单因素方差分析以及Dunnett事后检验比较了疫苗组和对照组:ns,不显著;** $P<0.01$ **** $P<0.0001$)。单因素方差分析以及Dunnett事后检验比较了疫苗组和对照组:ns,不显著;** $P<0.01$ **** $P<0.0001$)。单因素方差分析以及Dunnett事后检验比较了疫苗组和对照组:ns,不显著;** $P<0.01$ **** $P<0.0001$)。

[0064] 图10D显示接种疫苗后100天,通过FRNT测定的来自IN免疫小鼠的血清的中和活性。单因素方差分析以及Dunnett事后检验比较了疫苗组和对照组:ns,不显著;** $P<0.01$ **** $P<0.0001$)。

[0065] 图10E显示来自接种疫苗后100天时的IN免疫小鼠或来自100天时的IM免疫小鼠的ELISA测量的抗S和RBD IgG水平。单因素方差分析以及Dunnett事后检验比较了疫苗组和对照组:ns,不显著;** $P<0.01$ **** $P<0.0001$)。

[0066] 图10F显示来自接种疫苗后100天时的IN免疫小鼠或来自100天时的IM免疫小鼠的ELISA测量的抗S和RBD IgA水平。单因素方差分析以及Dunnett事后检验比较了疫苗组和对照组:ns,不显著;** $P<0.01$ **** $P<0.0001$)。

[0067] 图10G显示通过FRNT测定的来自接种疫苗后100天时的IM免疫小鼠的血清的中和活性。单因素方差分析以及Dunnett事后检验比较了疫苗组和对照组:ns,不显著;** $P<0.01$ **** $P<0.0001$)。

[0068] 图10H显示评估免疫小鼠血清中的体液反应($n=6-14$)。提供了200天时来自IN免疫小鼠的ELISA测量的抗S和RBD IgG水平。单因素方差分析以及Dunnett事后检验比较了疫苗组和对照组:ns,不显著;** $P<0.01$ **** $P<0.0001$)。

[0069] 图10I显示评估免疫小鼠血清中的体液反应($n=6-14$)。提供了200天时来自IN免疫小鼠的ELISA测量的抗S和RBD IgA水平。单因素方差分析以及Dunnett事后检验比较了疫苗组和对照组:ns,不显著;** $P<0.01$ **** $P<0.0001$)。

[0070] 图10J接种疫苗后200天,通过FRNT测定的来自IN免疫小鼠的血清的中和活性。单因素方差分析以及Dunnett事后检验比较了疫苗组和对照组:ns,不显著;** $P<0.01$ **** $P<0.0001$)。

[0071] 图10K显示来自接种疫苗后200天时的IN免疫小鼠或来自100天时的IM免疫小鼠的ELISA测量的抗S和RBD IgG水平。单因素方差分析以及Dunnett事后检验比较了疫苗组和对照组:ns,不显著;** $P<0.01$ **** $P<0.0001$)。

[0072] 图10L显示来自接种疫苗后200天时的IN免疫小鼠或来自100天时的IM免疫小鼠的ELISA测量的抗S和RBD IgA水平。单因素方差分析以及Dunnett事后检验比较了疫苗组和对照组:ns,不显著;** $P<0.01$ **** $P<0.0001$)。

[0073] 图10M显示通过FRNT测定的来自接种疫苗后200天时的IM免疫小鼠的血清的中和活性。单因素方差分析以及Dunnett事后检验比较了疫苗组和对照组:ns,不显著;** $P<$

0.01;****, $P < 0.0001$)。

[0074] 图10N显示通过ELISPOT测定测量的骨髓中产生S特异性IgG或IgA的LLPC的频率 ($n = 4$)。Mann-Whitney检验:*, $P < 0.05$ 。B-N, 条形显示中值, 且虚线表示测定的检测限 (LOD)。

[0075] 图11A显示在第100天收集来自ChAd-SARS-CoV-2-S疫苗接种小鼠的血清样本。用单一 10^{10} 、 10^9 或 10^8 剂量的ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN或IM途径免疫五周龄雌性BALB/c小鼠。

[0076] 图11B显示在免疫后第200天收集来自ChAd-SARS-CoV-2-S疫苗接种的小鼠的血清样本, 并通过FRNT测定中和活性。用单一 10^{10} 、 10^9 或 10^8 剂量的ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN或IM途径免疫五周龄雌性BALB/c小鼠。显示了所示疫苗的与个体小鼠相对应的血清中和曲线 (每组 $n = 6-14$)。每个点表示两个技术重复的平均值。

[0077] 图12A显示通过Luminex平台分析来自鼻内接种ChAd-SARS-CoV-2-S的小鼠血清, 以定量抗SARS-CoV-2 (WA1/2020D614G) 刺突和RBD IgG1的量。条形表示平均值。

[0078] 图12B显示通过luminex分析血清以定量针对不同SARS-CoV-2蛋白变体的抗SARS-CoV-2IgG1的量。极坐标图表示每种SARS-CoV-2蛋白和变体的IgG1中值百分位数排名。

[0079] 图12C显示热图, 其显示了每种疫苗方案针对SARS-CoV-2刺突或RBD蛋白的IgG滴度和Fc γ R结合滴度。每个方块表示病况组内的平均z分数。

[0080] 图12D显示将血清与原代小鼠中性粒细胞 (mADNP) 或J774A.1细胞 (mADCP) 和SARS-CoV-2刺突包被的珠一起孵育, 并在1小时后测量吞噬作用。条形表示平均值, 且误差条表示标准差。

[0081] 图12E显示将血清与原代小鼠中性粒细胞 (mADNP) 或J774A.1细胞 (mADCP) 和WA1/2020D614G、B.1.1.7或B.1.351刺突包被的珠一起孵育, 并在1小时后测量吞噬作用。极坐标图表示每种SARS-CoV-2蛋白和变体的mADNP或mADCP中值百分位数排名。对于(A和D): 单因素方差分析以及Dunnett事后检验比较了疫苗组与对照组: **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$)。(A和D): 条形表示中值。

[0082] 图13A显示ChAd-SARS-CoV-2-S对BALB/c小鼠中的SARS-CoV-2感染的保护效力持久性。用 10^{10} vp的ChAd-对照或 10^{10} 、 10^9 和 10^8 vp的ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄雌性BALB/c小鼠。在第100天, 小鼠如下进行激发: 用抗Ifnar1 mAb处理动物, 并在一天后经由IN途径用Hu-AdV5-hACE2转导。五天后, 用 5×10^4 FFU的SARS-CoV-2WA1/2020经由鼻内途径接种小鼠。在4dpi时收获如图中所示的组织, 并通过RT-qPCR测量来自免疫后100天受激发的小鼠的病毒RNA水平 ($n = 6-14$, Kruskal Wallis以及Dunn事后检验: ns, 不显著; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.1$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$)。条形显示中值, 且虚线表示测定的LOD。

[0083] 图13B显示ChAd-SARS-CoV-2-S对BALB/c小鼠中的SARS-CoV-2感染的保护效力持久性。用 10^{10} vp的ChAd-对照或 10^{10} 、 10^9 和 10^8 vp的ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄雌性BALB/c小鼠。在免疫后第100天, 小鼠如下进行激发: 用抗Ifnar1mAb处理动物, 并在一天后经由IN途径用Hu-AdV5-hACE2转导。五天后, 用 5×10^4 FFU的SARS-CoV-2WA1/2020经由鼻内途径接种小鼠。在4dpi时收获如图中所示的组织, 并通过RT-qPCR测量来自免疫后100天受激发的小鼠的病毒RNA水平 ($n = 6-14$, KruskalWallis以及Dunn事后检验: ns, 不显著; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.1$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$)。条形显示中值, 且虚线表示测定的LOD。

[0084] 图13C显示ChAd-SARS-CoV-2-S对BALB/c小鼠中的SARS-CoV-2感染的保护效力持久性。用 10^{10} vp的ChAd-对照或 10^{10} 、 10^9 和 10^8 vp的ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄雌性BALB/c小鼠。在免疫后第100天,小鼠如下进行激发:用抗Ifnar1mAb处理动物,并在一天后经由IN途径用Hu-AdV5-hACE2转导。五天后,用 5×10^4 FFU的SARS-CoV-2WA1/2020经由鼻内途径接种小鼠。在4dpi时收获如图中所示的组织,并通过RT-qPCR测量来自免疫后100天受激发的小鼠的病毒RNA水平($n=6-14$,KruskalWallis以及Dunn事后检验:ns,不显著;** $P<0.01$; $*$ $P<0.1$ *** $P<0.001$ **** $P<0.0001$)。条形显示中值,且虚线表示测定的LOD。

[0085] 图13D显示ChAd-SARS-CoV-2-S对BALB/c小鼠中的SARS-CoV-2感染的保护效力持久性。用 10^{10} vp的ChAd-对照或 10^{10} vp的ChAd-对照经由IM途径免疫五周龄雌性BALB/c小鼠。在第100天,小鼠如下进行激发:用抗Ifnar1 mAb处理动物,并在一天后经由IN途径用Hu-AdV5-hACE2转导。五天后,用 5×10^4 FFU的SARS-CoV-2WA1/2020经由鼻内途径接种小鼠。在4dpi时收获如图中所示的组织,并通过RT-qPCR测量来自免疫后100天受激发的小鼠的病毒RNA水平($n=6-14$,KruskalWallis以及Dunn事后检验:ns,不显著;** $P<0.01$; $*$ $P<0.1$ *** $P<0.001$ **** $P<0.0001$)。条形显示中值,且虚线表示测定的LOD。

[0086] 图13E显示ChAd-SARS-CoV-2-S对BALB/c小鼠中的SARS-CoV-2感染的保护效力持久性。用 10^{10} vp的ChAd-对照或 10^{10} 、 10^9 和 10^8 vp的ChAd-SARS-CoV-2-S经由IM途径免疫五周龄雌性BALB/c小鼠。在免疫后第100天,小鼠如下进行激发:用抗Ifnar1mAb处理动物,并在一天后经由IN途径用Hu-AdV5-hACE2转导。五天后,用 5×10^4 FFU的SARS-CoV-2WA1/2020经由鼻内途径接种小鼠。在4dpi时收获如图中所示的组织,并通过RT-qPCR测量来自免疫后100天受激发的小鼠的病毒RNA水平($n=6-14$,KruskalWallis以及Dunn事后检验:ns,不显著;** $P<0.01$; $*$ $P<0.1$ *** $P<0.001$ **** $P<0.0001$)。条形显示中值,且虚线表示测定的LOD。

[0087] 图13F显示ChAd-SARS-CoV-2-S对BALB/c小鼠中的SARS-CoV-2感染的保护效力持久性。用 10^{10} vp的ChAd-对照或 10^{10} 、 10^9 和 10^8 vp的ChAd-SARS-CoV-2-S经由IM途径免疫五周龄雌性BALB/c小鼠。在免疫后第100天,小鼠如下进行激发:用抗Ifnar1mAb处理动物,并在一天后经由IN途径用Hu-AdV5-hACE2转导。五天后,用 5×10^4 FFU的SARS-CoV-2WA1/2020经由鼻内途径接种小鼠。在4dpi时收获如图中所示的组织,并通过RT-qPCR测量来自免疫后100天受激发的小鼠的病毒RNA水平($n=6-14$,KruskalWallis以及Dunn事后检验:ns,不显著;** $P<0.01$; $*$ $P<0.1$ *** $P<0.001$ **** $P<0.0001$)。条形显示中值,且虚线表示测定的LOD。

[0088] 图13G显示ChAd-SARS-CoV-2-S对BALB/c小鼠中的SARS-CoV-2感染的保护效力持久性。用 10^{10} vp的ChAd-对照或 10^{10} 、 10^9 和 10^8 vp的ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄雌性BALB/c小鼠。在第200天,小鼠如下进行激发:用抗Ifnar1 mAb处理动物,并在一天后经由IN途径用Hu-AdV5-hACE2转导。五天后,用 5×10^4 FFU的SARS-CoV-2WA1/2020经由鼻内途径接种小鼠。在4dpi时收获如图中所示的组织,并通过RT-qPCR测量来自免疫后200天受激发的小鼠的病毒RNA水平($n=6-14$,Kruskal Wallis以及Dunn事后检验:ns,不显著;** $P<0.01$; $*$ $P<0.1$ *** $P<0.001$ **** $P<0.0001$)。条形显示中值,且虚线表示测定的LOD。

[0089] 图13H显示ChAd-SARS-CoV-2-S对BALB/c小鼠中的SARS-CoV-2感染的保护效力持

久性。用 10^{10} vp的ChAd-对照或 10^{10} 、 10^9 和 10^8 vp的ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄雌性BALB/c小鼠。在免疫后第200天,小鼠如下进行激发:用抗Ifnar1mAb处理动物,并在一天后经由IN途径用Hu-AdV5-hACE2转导。五天后,用 5×10^4 FFU的SARS-CoV-2WA1/2020经由鼻内途径接种小鼠。在4dpi时收获如图中所示的组织,并通过RT-qPCR测量来自免疫后200天受激发的小鼠的病毒RNA水平($n=6-14$,KruskalWallis以及Dunn事后检验:ns,不显著;** $P<0.01$;* $P<0.1$ *** $P<0.001$ **** $P<0.0001$)。条形显示中值,且虚线表示测定的LOD。

[0090] 图13I显示ChAd-SARS-CoV-2-S对BALB/c小鼠中的SARS-CoV-2感染的保护效力持久性。用 10^{10} vp的ChAd-对照或 10^{10} 、 10^9 和 10^8 vp的ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄雌性BALB/c小鼠。在免疫后第200天,小鼠如下进行激发:用抗Ifnar1mAb处理动物,并在一天后经由IN途径用Hu-AdV5-hACE2转导。五天后,用 5×10^4 FFU的SARS-CoV-2WA1/2020经由鼻内途径接种小鼠。在4dpi时收获如图中所示的组织,并通过RT-qPCR测量来自免疫后200天受激发的小鼠的病毒RNA水平($n=6-14$,KruskalWallis以及Dunn事后检验:ns,不显著;** $P<0.01$;* $P<0.1$ *** $P<0.001$ **** $P<0.0001$)。条形显示中值,且虚线表示测定的LOD。

[0091] 图13J显示ChAd-SARS-CoV-2-S对BALB/c小鼠中的SARS-CoV-2感染的保护效力持久性。用 10^{10} vp的ChAd-对照或 10^{10} vp的ChAd-对照经由IM途径免疫五周龄雌性BALB/c小鼠。在第200天,小鼠如下进行激发:用抗Ifnar1 mAb处理动物,并在一天后经由IN途径用Hu-AdV5-hACE2转导。五天后,用 5×10^4 FFU的SARS-CoV-2WA1/2020经由鼻内途径接种小鼠。在4dpi时收获如图中所示的组织,并通过RT-qPCR测量来自免疫后200天受激发的小鼠的病毒RNA水平($n=6-14$,KruskalWallis以及Dunn事后检验:ns,不显著;** $P<0.01$;* $P<0.1$ *** $P<0.001$ **** $P<0.0001$)。条形显示中值,且虚线表示测定的LOD。

[0092] 图13K显示ChAd-SARS-CoV-2-S对BALB/c小鼠中的SARS-CoV-2感染的保护效力持久性。用 10^{10} vp的ChAd-对照或 10^{10} 、 10^9 和 10^8 vp的ChAd-SARS-CoV-2-S经由IM途径免疫五周龄雌性BALB/c小鼠。在免疫后第200天,小鼠如下进行激发:用抗Ifnar1mAb处理动物,并在一天后经由IN途径用Hu-AdV5-hACE2转导。五天后,用 5×10^4 FFU的SARS-CoV-2WA1/2020经由鼻内途径接种小鼠。在4dpi时收获如图中所示的组织,并通过RT-qPCR测量来自免疫后200天受激发的小鼠的病毒RNA水平($n=6-14$,KruskalWallis以及Dunn事后检验:ns,不显著;** $P<0.01$;* $P<0.1$ *** $P<0.001$ **** $P<0.0001$)。条形显示中值,且虚线表示测定的LOD。

[0093] 图13L显示ChAd-SARS-CoV-2-S对BALB/c小鼠中的SARS-CoV-2感染的保护效力持久性。用 10^{10} vp的ChAd-对照或 10^{10} 、 10^9 和 10^8 vp的ChAd-SARS-CoV-2-S经由IM途径免疫五周龄雌性BALB/c小鼠。在免疫后第200天,小鼠如下进行激发:用抗Ifnar1mAb处理动物,并在一天后经由IN途径用Hu-AdV5-hACE2转导。五天后,用 5×10^4 FFU的SARS-CoV-2WA1/2020经由鼻内途径接种小鼠。在4dpi时收获如图中所示的组织,并通过RT-qPCR测量来自免疫后200天受激发的小鼠的病毒RNA水平($n=6-14$,KruskalWallis以及Dunn事后检验:ns,不显著;** $P<0.01$;* $P<0.1$ *** $P<0.001$ **** $P<0.0001$)。条形显示中值,且虚线表示测定的LOD。

[0094] 图14A显示ELISA测量的SARS-CoV-2S特异性和RBD特异性IgG水平。用 10^9 vp的

ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠。评估了免疫后6周小鼠血清中的抗体反应。Mann-Whitney检验:***, $P < 0.001$;****, $P < 0.0001$ 。

[0095] 图14B显示ELISA测量的SARS-CoV-2S特异性和RBD特异性IgA水平。用 10^9 vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠。评估了免疫后6周小鼠血清中的抗体反应。Mann-Whitney检验:***, $P < 0.001$;****, $P < 0.0001$ 。

[0096] 图14C显示6周时小鼠血清中的FRNT确定的中和活性。用 10^9 vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠。提供了来自6周时收集的针对WA1/2020和Wash-B.1.351的免疫小鼠的血清中和活性配对分析。双尾Wilcoxon配对符号秩检验:*, $P < 0.05$;****, $P < 0.0001$ 。

[0097] 图14D显示6周时小鼠血清中的FRNT确定的中和活性。用 10^9 vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠。提供了来自6周时收集的针对WA1/2020和Wash-B.1.1.28的免疫小鼠的血清中和活性配对分析。双尾Wilcoxon配对符号秩检验:*, $P < 0.05$;****, $P < 0.0001$ 。

[0098] 图14E显示ELISA测量的SARS-CoV-2S特异性和RBD特异性IgG水平。用 10^9 vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠。评估了免疫后9周小鼠血清中的抗体反应。Mann-Whitney检验:***, $P < 0.001$;****, $P < 0.0001$ 。

[0099] 图14F显示ELISA测量的SARS-CoV-2S特异性和RBD特异性IgA水平。用 10^9 vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠。评估了免疫后9周小鼠血清中的抗体反应。Mann-Whitney检验:***, $P < 0.001$;****, $P < 0.0001$ 。

[0100] 图14G显示6周时小鼠血清中的FRNT确定的中和活性。用 10^9 vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠。提供了来自9周时收集的针对WA1/2020和Wash-B.1.351的免疫小鼠的血清中和活性配对分析。双尾Wilcoxon配对符号秩检验:*, $P < 0.05$;****, $P < 0.0001$ 。

[0101] 图14H显示6周时小鼠血清中的FRNT确定的中和活性。用 10^9 vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠。提供了来自9周时收集的针对WA1/2020和Wash-B.1.1.28的免疫小鼠的血清中和活性配对分析。双尾Wilcoxon配对符号秩检验:*, $P < 0.05$;****, $P < 0.0001$ 。

[0102] 图15A显示了实验方案。用 10^{10} vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠。

[0103] 图15B用 10^{10} vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠。免疫后6周,用 10^4 FFU的Wash-B.1.351的SARS-CoV-2激发小鼠。显示了体重随时间变化的图。数据为比较疫苗组与对照组的平均值 $\pm$ SEM(每组 $n=6-9$;非配对t检验用于曲线下面积,**** $P < 0.0001$)。

[0104] 图15C用 10^{10} vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠。免疫后6周,用 10^4 FFU的Wash-B.1.351的SARS-CoV-2激发小鼠。通过RT-qPCR测量6dpi时肺中的病毒RNA水平($n=6-9$;Mann-Whitney检验:** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$)。条形显示中值,且虚线表示测定的LOD。

[0105] 图15D用 10^{10} vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠。免疫后6周,用 10^4 FFU的Wash-B.1.351的SARS-CoV-2激发小鼠。通过RT-

qPCR测量6dpi时心脏中的病毒RNA水平 ($n=6-9$; Mann-Whitney检验: $**P<0.01$, $***P<0.001$)。条形显示中值,且虚线表示测定的LOD。

[0106] 图15E用 10^{10} vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠。免疫后6周,用 10^4 FFU的Wash-B.1.351的SARS-CoV-2激发小鼠。通过RT-qPCR测量6dpi时鼻冲洗液中的病毒RNA水平 ($n=6-9$; Mann-Whitney检验: $**P<0.01$, $***P<0.001$)。条形显示中值,且虚线表示测定的LOD。

[0107] 图15F用 10^{10} vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠。免疫后6周,用 10^4 FFU的Wash-B.1.351的SARS-CoV-2激发小鼠。免疫后6周,用 10^4 FFU的Wash-B.1.351的SARS-CoV-2激发小鼠。通过RT-qPCR测量6dpi时脑中的病毒RNA水平 ($n=6-9$; Mann-Whitney检验: $**P<0.01$, $***P<0.001$)。条形显示中值,且虚线表示测定的LOD。

[0108] 图15G用 10^{10} vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠。免疫后6周,用 10^4 FFU的Wash-B.1.1.28的SARS-CoV-2激发小鼠。显示了体重随时间变化的图。数据为比较疫苗组与对照组的平均值 $\pm$ SEM (每组 $n=6-9$; 非配对t检验用于曲线下面积, $****P<0.0001$)。

[0109] 图15H用 10^{10} vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠。免疫后6周,用 10^4 FFU的Wash-B.1.1.28的SARS-CoV-2激发小鼠。通过RT-qPCR测量6dpi时肺中的病毒RNA水平 ($n=6-9$; Mann-Whitney检验: $**P<0.01$, $***P<0.001$)。条形显示中值,且虚线表示测定的LOD。

[0110] 图15I用 10^{10} vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠。免疫后6周,用 10^4 FFU的Wash-B.1.1.28的SARS-CoV-2激发小鼠。通过RT-qPCR测量6dpi时心脏中的病毒RNA水平 ($n=6-9$; Mann-Whitney检验: $**P<0.01$, $***P<0.001$)。条形显示中值,且虚线表示测定的LOD。

[0111] 图15J用 10^{10} vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠。免疫后6周,用 10^4 FFU的Wash-B.1.1.28的SARS-CoV-2激发小鼠。通过RT-qPCR测量6dpi时鼻冲洗液中的病毒RNA水平 ($n=6-9$; Mann-Whitney检验: $**P<0.01$, $***P<0.001$)。条形显示中值,且虚线表示测定的LOD。

[0112] 图15K用 10^{10} vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠。免疫后6周,用 10^4 FFU的Wash-B.1.1.28的SARS-CoV-2激发小鼠。免疫后6周,用 10^4 FFU的Wash-B.1.351的SARS-CoV-2激发小鼠。通过RT-qPCR测量6dpi时脑中的病毒RNA水平 ($n=6-9$; Mann-Whitney检验: $**P<0.01$, $***P<0.001$)。条形显示中值,且虚线表示测定的LOD。

[0113] 图15L用 10^{10} vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠。免疫后6周,用 10^4 FFU的WA1/2020的SARS-CoV-2激发小鼠。显示了体重随时间变化的图。数据为比较疫苗组与对照组的平均值 $\pm$ SEM (每组 $n=6-9$; 非配对t检验用于曲线下面积, $****P<0.0001$)。

[0114] 图15M用 10^{10} vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠。免疫后6周,用 10^4 FFU的WA1/2020的SARS-CoV-2激发小鼠。通过RT-qPCR测量6dpi时肺中的病毒RNA水平 ($n=6-9$; Mann-Whitney检验: $**P<0.01$, $***P<0.001$)。条形显

示中值,且虚线表示测定的LOD。

[0115] 图15N用 10^{10} vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠。免疫后6周,用 10^4 FFU的WA1/2020的SARS-CoV-2激发小鼠。通过RT-qPCR测量6dpi时心脏中的病毒RNA水平($n=6-9$;Mann-Whitney检验:** $P<0.01$,*** $P<0.001$)。条形显示中值,且虚线表示测定的LOD。

[0116] 图15O用 10^{10} vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠。免疫后6周,用 10^4 FFU的WA1/2020的SARS-CoV-2激发小鼠。通过RT-qPCR测量6dpi时鼻冲洗液中的病毒RNA水平($n=6-9$;Mann-Whitney检验:** $P<0.01$,*** $P<0.001$)。条形显示中值,且虚线表示测定的LOD。

[0117] 图15P用 10^{10} vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠。免疫后9个月,用 10^4 FFU的Wash-B.1.351的SARS-CoV-2激发小鼠。显示了体重随时间变化的图。数据为比较疫苗组与对照组的平均值 $\pm$ SEM(每组 $n=6-9$;非配对t检验用于曲线下面积,**** $P<0.0001$)。

[0118] 图15Q用 10^{10} vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠。免疫后6周,用 10^4 FFU的Wash-B.1.351的SARS-CoV-2激发小鼠。通过RT-qPCR测量6dpi时肺中的病毒RNA水平($n=6-9$;Mann-Whitney检验:** $P<0.01$,*** $P<0.001$)。条形显示中值,且虚线表示测定的LOD。

[0119] 图15R用 10^{10} vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠。免疫后9个月,用 10^4 FFU的Wash-B.1.351的SARS-CoV-2激发小鼠。通过RT-qPCR测量6dpi时心脏中的病毒RNA水平($n=6-9$;Mann-Whitney检验:** $P<0.01$,*** $P<0.001$)。条形显示中值,且虚线表示测定的LOD。

[0120] 图15S用 10^{10} vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠。免疫后9个月,用 10^4 FFU的Wash-B.1.351的SARS-CoV-2激发小鼠。通过RT-qPCR测量6dpi时鼻冲洗液中的病毒RNA水平($n=6-9$;Mann-Whitney检验:** $P<0.01$,*** $P<0.001$)。条形显示中值,且虚线表示测定的LOD。

[0121] 图15T用 10^{10} vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠。免疫后9个月,用 10^4 FFU的Wash-B.1.351的SARS-CoV-2激发小鼠。免疫后9个月,用 10^4 FFU的Wash-B.1.351的SARS-CoV-2激发小鼠。通过RT-qPCR测量6dpi时脑中的病毒RNA水平($n=6-9$;Mann-Whitney检验:** $P<0.01$,*** $P<0.001$)。条形显示中值,且虚线表示测定的LOD。

[0122] 图16A显示如通过FRNT测量的,ChAd-SARS-CoV-2-S疫苗诱导针对WA1/2020、Wash-B.1.351或Wash-B.1.1.28的中和活性。用 10^9 vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠,并在六周时收集血清样本。显示了所示疫苗的与个体小鼠相对应的血清中和曲线(每组 $n=7-20$)。每个点表示两个技术重复的平均值。

[0123] 图16B显示如通过FRNT测量的,ChAd-SARS-CoV-2-S疫苗诱导针对WA1/2020、Wash-B.1.351或Wash-B.1.1.28的中和活性。用 10^9 vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2雌性小鼠,并在9个月时收集血清样本。显示了所示疫苗的与个体小鼠相对应的血清中和曲线(每组 $n=7-20$)。每个点表示两个技术重复的平均值。

[0124] 图17显示了SARS-Cov2-Omicron S蛋白的稳定变体与SARS-CoV2-Wuhan S蛋白的

序列比对。

[0125] 图18显示了对由包括Omicron BA.5的ChAd载体衍生物介导的SARS-CoV-2刺突基因表达的评估。

[0126] 图19A显示了疫苗接种、血液采样、病毒激发和尸体剖检的方案和时间安排。

[0127] 图19B显示了抗SARS-CoV-2IgG与SARS-CoV-2Wuhan-1 S蛋白的结合。Kruskal Wallis以及Dunn事后检验:ns,不显著;* $P<0.05$,** $P<0.01$ *** $P<0.001$ **** $P<0.0001$)。

[0128] 图19C显示了抗SARS-CoV-2IgA与SARS-CoV-2Wuhan-1 S蛋白的结合。Kruskal Wallis以及Dunn事后检验:ns,不显著;* $P<0.05$,** $P<0.01$ *** $P<0.001$ **** $P<0.0001$)。

[0129] 图19D显示了抗SARS-CoV-2IgG与BA.5S蛋白的结合。Kruskal Wallis以及Dunn事后检验:ns,不显著;* $P<0.05$,** $P<0.01$ *** $P<0.001$ **** $P<0.0001$)。

[0130] 图19E显示了抗SARS-CoV-2IgA与BA.5S蛋白的结合。Kruskal Wallis以及Dunn事后检验:ns,不显著;* $P<0.05$,** $P<0.01$ *** $P<0.001$ **** $P<0.0001$)。

[0131] 图19F显示了抗SARS-CoV-2IgG与SARS-CoV-2BQ.1.1S蛋白的结合。KruskalWallis以及Dunn事后检验:ns,不显著;* $P<0.05$,** $P<0.01$ *** $P<0.001$ **** $P<0.0001$)。

[0132] 图19G显示了抗SARS-CoV-2IgA与SARS-CoV-2BQ.1.1S蛋白的结合。KruskalWallis以及Dunn事后检验:ns,不显著;* $P<0.05$,** $P<0.01$ *** $P<0.001$ **** $P<0.0001$)。

[0133] 图20A显示了FRNT对WA1/2020的中和活性。用 10^9 vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S疫苗经由IN途径免疫七周龄K18-hACE2雌性小鼠,并在28天后获取血清。每个点表示来自单个小鼠的数据,并且是两个技术重复的平均值。

[0134] 图20B显示了FRNT对BA.5的中和活性。用 10^9 vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S疫苗经由IN途径免疫七周龄K18-hACE2雌性小鼠,并在28天后获取血清。每个点表示来自单个小鼠的数据,并且是两个技术重复的平均值。

[0135] 图20C显示了FRNT对BF.7的中和活性。用 10^9 vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S疫苗经由IN途径免疫七周龄K18-hACE2雌性小鼠,并在28天后获取血清。每个点表示来自单个小鼠的数据,并且是两个技术重复的平均值。

[0136] 图20D显示了FRNT对BQ.1.1的中和活性。用 10^9 vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S疫苗经由IN途径免疫七周龄K18-hACE2雌性小鼠,并在28天后获取血清。每个点表示来自单个小鼠的数据,并且是两个技术重复的平均值。

[0137] 图20E显示了FRNT对XBB.1.1的中和活性。用 10^9 vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S疫苗经由IN途径免疫七周龄K18-hACE2雌性小鼠,并在28天后获取血清。每个点表示来自单个小鼠的数据,并且是两个技术重复的平均值。

[0138] 图20F显示了中和数据,其绘制为针对所示用于感染的SARS-CoV-2毒株的给定疫苗(ChAd-SARS-CoV-2S(Wuhan-1))的直接比较。

[0139] 图20G显示了中和数据,其绘制为针对所示用于感染的SARS-CoV-2毒株的给定疫苗ChAd-SARS-CoV-2-S(BA.5)的直接比较。

[0140] 图20H显示了中和数据,其绘制为针对所示用于感染的SARS-CoV-2毒株的给定疫苗ChAd-SARS-CoV-2-S(二价)的直接比较。

[0141] 图21A显示了用SARS-CoV-2WA1/2020D614G(左)或OmicronBQ.1.1(右)激发后6dpi时肺中病毒RNA水平。动物未接种疫苗(对照)或经由鼻内途径用单剂量(总共 10^9 个病毒颗粒)的ChAd-对照、ChAd-SARS-CoV-2S(Wuhan-1)、ChAd-SARS-CoV-2-S(BA.5)或二价(ChAd-SARS-CoV-2S(Wuhan-1)+ChAd-SARS-CoV-2-S(BA.5))免疫。Kruskal Wallis以及Dunn事后检验:ns,不显著;*, $P<0.05$,**, $P<0.01$;***, $P<0.001$;****, $P<0.0001$ 。

[0142] 图21B显示了用SARS-CoV-2WA1/2020D614G(左)或OmicronBQ.1.1(右)激发后6dpi时鼻甲(图21B)和鼻冲洗液中的病毒RNA水平。动物未接种疫苗(对照)或经由鼻内途径用单剂量(总共 10^9 个病毒颗粒)的ChAd-对照、ChAd-SARS-CoV-2S(Wuhan-1)、ChAd-SARS-CoV-2-S(BA.5)或二价(ChAd-SARS-CoV-2S(Wuhan-1)+ChAd-SARS-CoV-2-S(BA.5))免疫。Kruskal Wallis以及Dunn事后检验:ns,不显著;*, $P<0.05$,**, $P<0.01$;***, $P<0.001$;****, $P<0.0001$ 。

[0143] 图21C显示用SARS-CoV-2WA1/2020D614G(左)或OmicronBQ.1.1(右)激发后6dpi时用SARS-CoV-2WA1/2020D614G(左)或Omicron BQ.1.1(右)激发后6dpi时鼻冲洗液中的病毒RNA水平。动物未接种疫苗(对照)或经由鼻内途径用单剂量(总共 10^9 个病毒颗粒)的ChAd-对照、ChAd-SARS-CoV-2S(Wuhan-1)、ChAd-SARS-CoV-2-S(BA.5)或二价(ChAd-SARS-CoV-2S(Wuhan-1)+ChAd-SARS-CoV-2-S(BA.5))免疫。KruskalWallis以及Dunn事后检验:ns,不显著;*, $P<0.05$,**, $P<0.01$;***, $P<0.001$;****, $P<0.0001$ 。

[0144] 图22显示了在用SARS-CoV-2WA1/2020D614G(左)或OmicronBQ.1.1(右)激发后6dpi时接种疫苗的小鼠中细胞因子诱导的热图。底部显示了小鼠的疫苗接种状态(未接种疫苗、ChAd-对照、ChAd-SARS-CoV-2S、ChAd-SARS-CoV-2-S或二价(ChAd-SARS-CoV-2S(Wuhan-1)+ChAd-SARS-CoV-2-S(BA.5)))。图的颜色反映了与未经处理的小鼠相比的 $\log_2$ 倍数变化。

[0145] 图23显示了BA.5S蛋白的稳定化变体相对于“原始”毒株的序列比对。

具体实施方式

[0146] 本公开至少部分基于用于治疗或预防冠状病毒感染的重组非人腺病毒载体组合物及其免疫原性组合物的开发。此外,本公开内容提供了施用本文公开的组合物的方法,从而提供针对冠状病毒感染的持久细胞和体液介导的免疫。

[0147] 导致2002-2004年SARS流行的严重急性呼吸综合征冠状病毒1(SARS-CoV-1)、引起2012年首次报告的中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)以及导致最近冠状病毒病2019(Covid-19)大流行的SARS-CoV-2均与细胞表面上的血管紧张素转换酶2(ACE2)结合,从而感染细胞。大体上,ACE-2是SARS-CoV-1、SARS-CoV-2和MERS-COV以及最有可能的未来SARS-COV变体的功能性受体。ACE-2是肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)的重要组成部分。ACE-2将血管紧张素2转化为血管紧张素1-7。高血管紧张素2与血管收缩、炎症和急性肺损伤有关。ACE2在各种器官(包括肺、心脏、肾、肝、肠和其他组织)中表达。SARS-CoV病毒与ACE-2结合并进入细胞。

[0148] SARS-CoV-2RNA基因组长度为约30,000个核苷酸。5'的三分之二编码非结构蛋白,其使得基因组复制和病毒RNA合成成为可能。剩余三分之一编码结构蛋白,比如形成球状病毒体的刺突(S)、包膜、膜和核蛋白(NP),以及调节细胞反应的辅助蛋白。S蛋白在病毒体上

形成同源三聚体刺突,并与细胞表面受体血管紧张素转换酶2(ACE2) 接合,以促进冠状病毒进入人体细胞。SARS-CoV和SARS-CoV-2S蛋白在进入过程期间顺序地被切割,产生S1和S2片段,然后进一步加工S2,以产生较小的S2'蛋白(Hoffmann等人,2020)。S1蛋白包括受体结合结构域(RBD),以及S2蛋白促进膜融合。通过低温电子显微镜解析了可溶、稳定的融合前形式的SARS-CoV-2S蛋白的结构,揭示了其与SARS-CoV S蛋白有相当大的相似性。这种形式的S蛋白被有效的中和单克隆抗体识别,并可充当有前景的疫苗靶标。

[0149] SARS-CoV-2基因组序列的发布促使学术界、政府和行业团体立即开始开发主要靶向病毒S蛋白的疫苗候选物。改善的基因组测序能力还提供了有关在任何给定时间点传播的SARS-CoV-2变体的大量信息。SARS-CoV-2随着时间的推移而突变,导致出现新的变体,其在序列、传播性和感染严重程度方面不同。已经出现了各种SARS-CoV-2变体。原始形式的SARS-CoV-2通常被称为“原始”毒株。随后,在2020年12月至2021年4月之间出现了包括 α (B.1.1.7)、 β (B.1.351)、 γ (P.1)和 δ (B.1.617.2和AY在亚谱系)内的变体。然而,目前的主要变体是2021年11月左右出现的Omicron变体(B.1.1.529和BA亚谱系)。如本文所用,在病毒的上下文中的术语“变体”是可包含一个或多个突变的病毒基因组(遗传密码)。在一些情况下,可出现一组具有相似基因变化的变体,比如一个谱系或谱系组。如这里使用的“谱系”是具有共同祖先的一组密切相关的病毒。本文中使用的术语“亚谱系”或“亚变体”是谱系内的一组相似病毒。不断出现Omicron的亚谱系或亚变体以及其他变体。

[0150] 已经开发了多种平台来递送SARS-CoV-2S蛋白,包括DNA质粒、脂质纳米颗粒包封的mRNA、灭活病毒体和病毒载体疫苗。几种疫苗已进入临床试验以评估安全性,以及一些已推进至评估免疫原性和效力的试验。由于大流行的紧迫性,大多数疫苗在没有实质性的动物中的效力数据的情况下推进至人体试验。这种情况发生的部分原因是疫苗的设计和开发超过了可用的SARS-CoV-2感染和发病机制的临床前疾病模型的产生。

[0151] 先前评估了针对 β 冠状病毒的基于腺病毒(Ad)的疫苗。单剂量的编码MERS-CoV的全长S蛋白的黑猩猩Ad载体疫苗保护人二肽基肽酶4(hDPP4)转基因小鼠免受感染,减少病毒脱落并提高骆驼的存活,并且在1期临床试验中对人是安全且免疫原性的。表达MERS S1-CD40L融合蛋白的基于人Ad的疫苗在转基因hDPP4小鼠中也是保护性的。表达全长S蛋白的基于Ad的SARS-CoV疫苗在激发后的雪貂中预防肺炎,并且在恒河猴中为高度免疫原性的。编码野生型SARS-CoV-2S蛋白(ChAdOx1 nCoV-19)的黑猩猩Ad载体(Y25,其为猿猴Ad-23)作为单次肌肉内注射剂目前正在人体中进行评估(NCT04324606)。初步的预印本分析表明,这种疫苗保护免受肺部感染和肺炎,但不能对抗上呼吸道感染和鼻腔病毒脱落(doi.org/10.1101/2020.05.13.093195)。然而,这种疫苗作为鼻用疫苗失败了。

[0152] 本文公开了用于治疗处于患呼吸道病毒感染的风险中、具有轻微呼吸道病毒感染症状或具有严重呼吸道病毒感染症状的个体的组合物、方法和治疗方案。本公开的组合物可用于治疗、预防或降低呼吸道病毒感染的感染性。治疗方案可包括向处于患呼吸道病毒感染的风险中或患有病毒感染的个体施用本公开的组合物,从而预防或治疗病毒感染。在一些实施方案中,可通过减少上呼吸道中的病毒感染来预防或减少病毒传播。本公开的组合物和方法提供强健的抗原特异性抗体、中和抗体以及B细胞和T细胞反应。这赋予了针对感染的保护,显著降低了肺中的病毒产量、炎症和病理。本公开的组合物和方法产生强健的粘膜免疫,包括血清和肺中高水平的中和和抗RBD IgA和IgG以及肺中的SARS-CoV-2特异性

驻留记忆T细胞。所公开的组合物和方法完全保护免受鼻腔通道、上气道、肺组织和所有其他可能传播的部位中的SARS-CoV-2感染。根据对抗NP和抗ORF8反应的测量,单次鼻内剂量的本公开组合物赋予消除性免疫(sterilizing immunity),这在任何COVID-19疫苗中均未曾被描述过,更不用说单剂量施用。

[0153] 本公开的组合物可配制用于局部,例如鼻内(例如,作为鼻喷雾剂或吸入剂),或全身(例如,静脉内或腹膜内),并施用以治疗或预防呼吸道病毒感染(例如,冠状病毒感染,比如SARS-CoV-2)。本公开的组合物(例如,配制用于鼻腔递送或吸入的组合物)可施用于可能处于感染病毒感染(例如,SARS-CoV-2)的风险中的受试者。例如,本公开的组合物可施用于高风险环境中的个体(例如,医护人员)、已暴露于或怀疑已暴露于病毒(例如,SARS-CoV-2)的个体、或病毒感染测试呈阳性的个体。本公开的组合物可施用于表现出呼吸道感染(例如,SARS-CoV-2感染)症状或在施用时无症状的个体。在一些实施方案中,本公开的组合物可由个体自行施用(例如,作为鼻腔喷雾剂或吸入剂),并且可在医疗机构外施用(例如,在家中)。

[0154] 本文中公开的方法和组合物可用于治疗、预防或降低呼吸道病毒感染的感染性。在一些实施方案中,病毒感染可以是冠状病毒感染。潜伏期长的病原体(比如潜伏期中位数为约五天的SARS-CoV-2)可具有高传播风险,因为许多受感染的个体可能不知道自己已被感染。此外,冠状病毒携带者可能经常无症状或症状轻微,导致病毒宿主与人群中的其他成员之间未察觉的接触。处于冠状病毒感染风险中的受试者可能会接触冠状病毒感染的无症状携带者,从而无意中感染冠状病毒。需要预防处于风险中的个体(例如,接触过冠状病毒携带者或可能接触冠状病毒携带者的个体)的冠状病毒感染的方法和组合物。在一些实施方案中,本文中公开的组合物、方法或治疗方案可以治疗或预防SARS-CoV-2感染(例如COVID-19)。

[0155] 下面讨论了用于制备所公开的组合物的组分以及在本文中公开的方法中使用的组合物本身。本文公开了这些材料和其他材料,并且应当理解,当公开这些材料的组合、子集、相互作用、组等时,虽然可能未明确公开这些化合物的每种不同的单独和集体组合和排列的特指,但本文具体考虑和描述了其每一种。例如,如果公开和讨论了特定化合物,并且讨论了可以对该化合物的多个分子进行的多种修饰,则具体考虑的是该化合物的每一个组合和排列以及可能的修饰,除非明确指出相反。因此,如果公开了一类分子A、B和C,以及一类分子D、E和F,并且公开了组合分子A-D的实例,那么即使没有单独列出每种,每种也是单独和集体考虑的,这意味着组合A-E、A-F、B-D、B-E、B-F、C-D、C-E和C-F被视为公开。同样,还公开了这些的任何子集或组合。因此,例如,A-E、B-F和C-E的子组将被视为公开。该构思适用于本申请的所有方面,包括但不限于制造和使用所公开组合物的方法中的步骤。因此,如果可以进行各种另外的步骤,则应理解,这些另外的步骤中的每一个都可以与所公开方法的任何特定实施方案或实施方案的组合一起进行。

[0156] 本发明的各个方面将在以下章节中进一步详细描述。

[0157] I. 定义

[0158] 为了更容易理解本发明,首先对某些术语进行定义。除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明实施方案所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。与本文所述方法和材料相似、修改或等效的许多方法和材料可用于实践本发明的实

施方案,而无需过度的实验,本文描述了优选的材料和方法。在描述和要求保护本发明的实施方案时,将根据以下所述的定义使用以下术语。

[0159] 本文中使用的措辞和术语仅用于描述目的,且不应被视为限制。例如,使用单数术语(比如“一个/种”)并非旨在限制项目的数量。此外,使用关系术语(比如但不限于“顶部”、“底部”、“左”、“右”、“上部”、“下部”、“向下”、“向上”和“侧面”)在说明书中用于在具体提及附图时清晰起见,并不旨在限制本发明构思或所附权利要求的范围。

[0160] 任何程度术语,比如但不限于说明书和所附权利要求中使用的“基本上”,应理解为包括精确的配置或类似但不精确的配置。例如,“基本上平坦的表面”是指具有精确的平坦表面或类似但不精确的平坦表面。类似地,如说明书和所附权利要求中使用的术语“约”或“大约”应理解为包括所列值或为所列值的三倍或三分之一的值。例如,约3mm包括从1mm到9mm的所有值,而大约50度包括从16.6度到150度的所有值。例如,它们可以指小于或等于 $\pm 5\%$,比如小于或等于 $\pm 2\%$ 、比如小于或等于 $\pm 1\%$ 、比如小于或等于 $\pm 0.5\%$ 、比如小于或等于 $\pm 0.2\%$ 、比如小于或等于 $\pm 0.1\%$ 、比如小于或等于 $\pm 0.05\%$ 。

[0161] 术语“包含”、“包括”和“具有”在本公开中可互换使用。术语“包含”、“包括”和“具有”是指包括但不一定限于所描述的事物。

[0162] 如本文中使用的术语“或”和“和/或”应解释为包含性的或是指任何一个或任何组合。因此,“A、B或C”或“A、B和/或C”是指以下的任一种:“A”、“B”或“C”;“A和B”;“A和C”;“B和C”;“A、B和C”。只有当要素、功能、步骤或动作的组合在某种程度上本质上相互排斥时,才会出现此定义的例外。

[0163] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语均具有本发明所属领域的技术人员通常理解的含义。以下参考文献为技术人员提供了本发明中使用的许多术语的一般定义:Singleton等人,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology(1994年第2版);The Cambridge Dictionary of Science and Technology(Walker编辑,1988);The Glossary of Genetics,第5版,R.Rieger等人(编辑),Springer Verlag(1991);以及Hale&Marham,The Harper Collins Dictionary of Biology(1991),所有这些文献通过引用并入本文。如本文中所用,以下术语具有下文赋予它们的含义,除非另有说明。

[0164] 本文中使用的措辞和术语是为了描述的目的,且不应被视为限制。在介绍本公开的要素或其优选方面时,冠词“一个/种(a)”、“一个/种(an)”、“该/所述(the)”和“所述(said)”旨在是指存在一个或多个要素。术语“包含”、“包括”和“具有”旨在是包含性的,并且是指除了所列要素之外可能存在另外的要素。无论何时使用术语“包含”、“包括”,都应理解本公开还明确考虑并涵盖“由所公开要素组成的”另外的方面,其中不包括除所列要素之外的另外的要素。

[0165] 如本文中使用的术语“约”或“大约”可指在由本领域普通技术人员确定的特定值的可接受误差范围内,这将部分取决于如何测量或确定该值,例如测量系统的局限性。例如,“约”可指按照给定值的实践,在1个或超过1个标准偏差内。当在本申请和权利要求中描述特定值时,除非另有说明,术语“约”可指特定值的可接受误差范围,比如术语“约”修饰的值的10%。如本文所用,术语“约”可指相对于所述值(例如量、剂量、温度、时间、百分比等) $\pm 10\%$ 、 $\pm 9\%$ 、 $\pm 8\%$ 、 $\pm 7\%$ 、 $\pm 6\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 4\%$ 、 $\pm 3\%$ 、 $\pm 2\%$ 或 $\pm 1\%$ 。

[0166] 此外,由于本发明构思容易受到许多不同形式的可互换使用的“方面”或“实施方

案”的影响,因此意在将本公开应视为本发明构思原理的实例,而不意在将本发明构思限制于所示和所述的特定方面。本发明构思的特征中的任一个可以单独使用或与任何其他特征组合使用。在说明书中提及术语“方面”和/或类似术语意味着所提及的一个和/或多个特征包含在说明书的至少一个方面中。在说明书中分开提及的术语“方面”和/或类似术语的不一定指同一方面,并且也不相互排斥,除非如此说明和/或除非本领域技术人员从说明书中可以容易地显而易见。例如,在一个方面中描述的特征、结构、过程、步骤、动作等也可以包含在其他方面中,但不一定包含。因此,本发明构思可以包括本文所述方面的各种组合和/或整合。此外,如本文所述的本公开的所有方面对于其实践而言并非必不可少。同样,本领域技术人员在查看附图和说明书后,将显而易见或变得显而易见本发明构思的其他系统、方法、特征和优点。意在将所有此类另外的系统、方法、特征和优点包括在本说明书中、包括在本发明构思的范围内并由权利要求所涵盖。

[0167] 术语“核酸”或“多核苷酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其聚合物。除非特别限制,该术语涵盖含有已知天然核苷酸类似物的核酸,所述类似物具有与参考核酸相似的结合特性,并以与天然存在的核苷酸类似的方式代谢。除非另有说明,特定核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰变体(例如,简并密码子取代)、等位基因、直系同源物、SNP和互补序列以及明确指出的序列。具体而言,简并密码子取代可以通过产生其中一个或多个选定(或所有)密码子的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现。参见例如,Batzer等人,Nucleic Acid Res.19:5081(1991),其公开内容全文并入本文。在一些方面,核酸序列可以编码多肽序列。

[0168] 如本文所用,术语“编码”广义上指使用聚合物大分子中的信息来指导产生不同于第一分子的第二分子的任何过程。第二分子可以具有不同于第一分子的化学性质的化学结构。例如,在一些方面,术语“编码”描述半保守DNA复制的过程,其中双链DNA分子的一条链被用作模板,以通过DNA依赖性DNA聚合酶编码新合成的互补姐妹链。在其他方面,DNA分子可以编码RNA分子(例如,通过使用DNA依赖性RNA聚合酶的转录过程)。此外,RNA分子可以编码多肽,如在翻译过程中。当用于描述翻译过程时,术语“编码”还延伸到编码氨基酸的三联体密码子。在一些方面,RNA分子可以编码DNA分子,例如,通过结合RNA依赖性DNA聚合酶的逆转录过程。在另一方面,DNA分子可以编码多肽,其中应理解,在这种情况下使用的“编码”包括转录和翻译过程。

[0169] 当将核酸置于与另一核酸序列的结构或功能关系中时,该核酸是“可操作地连接的”。例如,如果将一个DNA区段和另一个DNA区段相对于彼此定位在同一连续DNA分子上,并且具有结构或功能关系,则这个DNA区段与另一个DNA区段可以是可操作地连接的,比如相对于编码序列定位以促进编码序列的转录的启动子或增强子;相对于编码序列定位以促进翻译的核糖体结合位点;或相对于编码序列定位以促进前蛋白(例如,参与编码多肽分泌的前蛋白)的表达的前序列或分泌前导序列。在其他实例中,可操作地连接的核酸序列不是连续的,但以使得它们作为核酸或作为由它们表达的蛋白具有与彼此的功能关系的方式定位。例如,增强子不必是连续的。连接可以通过在方便的限制位点处进行连接或通过使用合成的寡核苷酸衔接子或接头来实现。

[0170] 在一些方面,编码多肽的核酸可以可操作地连接至表达控制序列。

[0171] 表达控制序列是指调节与其可操作地连接的异源核酸序列的表达的核酸序列。当

表达控制序列控制和调节核酸序列的转录以及(在适当的情况下)翻译时,表达控制序列可操作地连接至核酸序列。因此,表达控制序列可以包括适当的启动子、增强子、转录终止子、蛋白编码基因前的起始密码子(ATG)、内含子的剪接信号、维持该基因的正确阅读框以允许mRNA的正确翻译以及终止密码子。术语“控制序列”旨在至少包括其存在可以影响表达的组分,并且还可以包括其存在有利的另外组分,例如前导序列和融合伴侣序列。表达控制序列可以包括启动子。

[0172] 启动子是足以指导转录的最小序列。还包括足以使启动子依赖性基因表达可控制为细胞类型特异性、组织特异性或可由外部信号或药剂诱导的那些启动子元件;此类元件可以位于基因的5'或3'区域。包括组成型和诱导型启动子二者(参见例如Bitter等人, *Methods in Enzymology* 153:516-544,1987)。例如,当在细菌系统中克隆时,可以使用诱导型启动子,比如噬菌体λ的pL、pLac、ptrp、ptac(ptrp-lac杂合启动子)等。在一个实施方案中,当在哺乳动物细胞系统中克隆时,可以使用来源于哺乳动物细胞基因组的启动子(比如金属硫蛋白启动子)或来源于哺乳动物病毒的启动子(比如逆转录病毒长末端重复;腺病毒晚期启动子;痘苗病毒7.5K启动子)。也可以使用由重组DNA或合成技术产生的启动子来提供核酸序列的转录。表达载体:包含重组多核苷酸的载体,所述重组多核苷酸包含可操作地连接至待表达的核苷酸序列的表达控制序列。表达载体包含足够的用于表达的顺式作用元件;用于表达其他元件可以由宿主细胞或在体外表达系统中提供。表达载体包括所有本领域中已知的那些,比如并入重组多核苷酸的粘粒、质粒(例如裸露的或包含在脂质体中的)和病毒(例如慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0173] 术语“异源”是指源自不同的遗传来源。与细胞异源的核酸分子源自其在其中表达的细胞以外的遗传来源。在一个特定的非限制性实例中,编码重组冠状病毒S蛋白的异源核酸分子在细胞(比如哺乳动物细胞)中表达。将异源核酸分子引入细胞或生物体的方法在本领域中是公知的,例如用核酸转化,包括电穿孔、脂质转染、粒子枪加速和同源重组。

[0174] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白”可互换使用,并且是指包含通过肽键共价连接的氨基酸残基的化合物。蛋白或肽必须含有至少两个氨基酸,并且对可组成蛋白或肽序列的氨基酸的最大数量没有限制。多肽包括任何包含通过肽键相互连接的两个或更多个氨基酸的肽或蛋白。如本文所用,该术语是指短链(例如在本领域中通常也称为肽、寡肽和寡聚物)和长链(在本领域中通常称为蛋白,蛋白有许多类型)二者。“多肽”包括例如生物活性片段、基本同源的多肽、寡肽、同二聚体、异二聚体、多肽变体、修饰多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等。多肽包括天然肽、重组肽或其组合。

[0175] 在本申请的上下文中,蛋白由氨基酸序列表示,并且相应地,核酸分子或多核苷酸由核酸序列表示。序列之间的同一性和相似性:在本申请通篇中,每当提到特定的氨基酸序列SEQ ID NO(以SEQ ID NO:Y为例)时,都可以将其替换为:由包含与氨基酸序列SEQ ID NO:Y具有至少60%序列同一性或相似性的序列的氨基酸序列表示的多肽。另一优选的序列同一性或相似性水平为65%。另一优选的序列同一性或相似性水平为70%。另一优选的序列同一性或相似性水平为75%。另一优选的序列同一性或相似性水平为80%。另一优选的序列同一性或相似性水平为85%。另一优选的序列同一性或相似性水平为90%。另一优选的序列同一性或相似性水平为95%。另一优选的序列同一性或相似性水平为98%。另一优选的序列同一性或相似性水平为99%。

[0176] 本文所述的每个氨基酸序列凭借其与其与给定氨基酸序列的同一性或相似性百分比,在进一步优选的方面分别具有分别与给定的核苷酸或氨基酸序列的至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的同一性或相似性。术语“同源性”、“序列同一性”等在本文中可互换使用。序列同一性在本文中被描述为如通过比较序列确定的,两个或更多个氨基酸(多肽或蛋白)序列或两个或更多个核酸(多核苷酸)序列之间的关系。在优选的方面,序列同一性是基于两个给定的SEQ ID NO的全长或其部分来计算的。其部分优选是指两个SEQ ID NO的至少50%、60%、70%、80%、90%或100%。在本领域中,视情况而定,“同一性”还指氨基酸或核酸序列之间的序列相关性程度,如通过此类序列的字符串之间的匹配来确定的。例如,可以通过使用常用于此目的的计算机程序(比如全局或局部比对算法)比较两个序列来确定两个序列之间的序列同一性程度。非限制性实例包括BLASTp、BLASTn、Clustal W、MAFFT、ClustalOmega、AlignMe、Praline、GAP、BESTFIT或其他合适的方法或算法。Needleman和Wunsch全局比对算法可用于在整个长度或其部分(其部分可指序列长度的至少50%、60%、70%、80%、90%)上比对两个序列,最大化匹配数并最小化空位数。可以使用默认设置,并且优选的程序是用于双序列比对的Needle(在一个方面,使用EMBOSS Needle 6.6.0.0,空位开放罚分10,空位延伸罚分:0.5,末端空位罚分:假,末端空位开放罚分:10,末端空位延伸罚分:0.5)和用于多序列比对的MAFFT(在一个方面,MAFFT v7默认值为:BLOSUM62[b162],空位开放:1.53,空位延伸:0.123,顺序:对齐,树重建数量:2,引导树输出:打开[真],最大迭代:2,执行FFTS:未使用)。

[0177] 通过比较一个多肽的氨基酸序列及其保守氨基酸取代与第二多肽的序列来确定两个氨基酸序列之间的“相似性”。用于确定序列同一性的类似算法也可用于确定序列相似性。任选地,在确定氨基酸相似性时,技术人员还可以考虑所谓的保守氨基酸取代。如本文所用,“保守”氨基酸取代是指具有相似侧链的残基的可互换性。

[0178] 例如,具有脂肪族侧链的氨基酸组为甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;具有脂肪族羟基侧链的氨基酸组为丝氨酸和苏氨酸;具有含酰胺侧链的氨基酸组为天冬酰胺和谷氨酰胺;具有芳香族侧链的氨基酸组为苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;具有碱性侧链的氨基酸组为赖氨酸、精氨酸和组氨酸;以及具有含硫侧链的氨基酸组为半胱氨酸和蛋氨酸。优选的保守氨基酸取代组为:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。本文中公开的氨基酸序列的取代变体是所公开的序列中至少一个残基被移除并在其位置插入不同残基的那些。优选地,氨基酸改变是保守的。每个天然存在的氨基酸的优选保守取代如下:Ala取代为Ser、Arg取代为Lys、Asn取代为Gln或His、Asp取代为Glu、Cys取代为Ser或Ala、Gln取代为Asn、Glu取代为Asp、Gly取代为Pro、His取代为Asn或Gln、Ile取代为Leu或Val、Leu取代为Ile或Val、Lys取代为Arg、Gln或Glu、Met取代为Leu或Ile、Phe取代为Met、Leu或Tyr、Ser取代为Thr、Thr取代为Ser、Trp取代为Tyr、Tyr取代为Trp或Phe以及Val取代为Ile或Leu。

[0179] 佐剂是指用于增强抗原性的媒介物。在一些实施方案中,佐剂可以包括将抗原吸

附在其上的矿物质悬浮液(明矾、氢氧化铝或磷酸铝);或油包水乳液,例如,其中抗原溶液在矿物油(弗氏不完全佐剂),有时包括杀死的分枝杆菌(弗氏完全佐剂)中乳化以进一步增强抗原性(抑制抗原降解和/或引起巨噬细胞流入)。在一些实施方案中,所公开的免疫原性组合中使用的佐剂是卵磷脂和卡波姆均聚物的组合(比如可从Advanced BioAdjuvants, LLC获得的ADJUPLEX™佐剂,另外参见Wegmann, Clin Vaccine Immunol, 22(9):1004-1012, 2015)。用于在所公开的免疫原性组合中使用的另外佐剂包括QS21纯化植物提取物、Matrix M、AS01、MF59和ALFQ佐剂。免疫刺激寡核苷酸(比如包括CpG基序的那些)也可用作佐剂。佐剂包括生物分子(“生物佐剂”),比如共刺激分子。示例性佐剂包括IL-2、RANTES、GM-CSF、TNF- α 、IFN- γ 、G-CSF、LFA-3、CD72、B7-1、B7-2、OX-40L、4-1BBL和toll样受体(TLR)激动剂,比如TLR-9激动剂。佐剂的另外描述可在例如Singh(编辑)Vaccine Adjuvants and Delivery Systems. Wiley-Interscience, 2007中找到。佐剂可与所公开的组合物组合使用。

[0180] 术语“抗体”是指免疫球蛋白、抗原结合片段或其衍生物,其特异性结合并识别分析物(抗原),比如冠状病毒S蛋白、其抗原片段或抗原的二聚体或多聚体。术语“抗体”在本文中以最广泛的意义使用,并涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)和抗体片段,只要它们表现出所需的抗原结合活性即可。抗体的非限制性实例包括,例如,完整的免疫球蛋白及其保留对抗原的结合亲和力的变体和片段。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双抗体(diabody);线性抗体;单链抗体分子(例如scFv);以及由抗体片段形成的多特异性抗体。抗体片段包括通过修饰全抗体产生的抗原结合片段或使用重组DNA方法从头合成的那些(参见例如Kontermann和Dubel(编辑), Antibody Engineering, 第1-2卷, 第2版, Springer Press, 2010)。

[0181] 冠状病毒是一种正义单链RNA病毒家族,已知其引起严重呼吸道疾病。目前已知感染人的来自冠状病毒家族的病毒来自 α 冠状病毒属和 β 冠状病毒属。此外,据信 γ 冠状病毒属和 δ 冠状病毒属将来可能感染人。

[0182] β 冠状病毒的非限制性实例包括中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)、严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)、人冠状病毒HKU1(HKU1-CoV)、人冠状病毒OC43(OC43-CoV)、鼠肝炎病毒(MHV-CoV)、蝙蝠SARS样冠状病毒WIV1(WIV1-CoV)和人冠状病毒HKU9(HKU9-CoV)。 α 冠状病毒的非限制性实例包括人冠状病毒229E(229E-CoV)、人冠状病毒NL63(NL63-CoV)、猪流行性腹泻病毒(PEDV)和传染性胃肠炎冠状病毒(TGEV)。 δ 冠状病毒的非限制性实例是猪 δ 冠状病毒(SDCV)。

[0183] 病毒基因组带帽、多聚腺苷酸化,并被核衣壳蛋白覆盖。冠状病毒病毒体包括含有I型融合糖蛋白(称为刺突(S)蛋白)的病毒包膜。大多数冠状病毒具有共同的基因组组织,其中复制酶基因包含在基因组的5'部分,以及结构基因包含在基因组的3'部分。

[0184] 冠状病毒刺突(S)蛋白:其是最初作为前体蛋白合成的I类融合糖蛋白。单独的前体S多肽形成同三聚体,并在高尔基体中经历糖基化以及经过加工以除去信号肽,并由细胞蛋白酶切割以产生单独的S1和S2多肽链,它们在同三聚体中作为S1/S2原体保持缔合,并因此是异二聚体的三聚体。S1亚基在病毒膜远端,且包含介导病毒附着至其宿主受体的受体结合结构域(RBD)。S2亚基包含融合蛋白体系,比如融合肽、两个七肽重复序列(heptad-

repeat sequence) (HR1和HR2) 和融合糖蛋白特有的中央螺旋、跨膜结构域和胞浆尾部结构域。

[0185] 冠状病毒刺突(S)蛋白融合前构象是冠状病毒S蛋白的胞外域在分泌系统中加工成成熟的冠状病毒S蛋白后,并且在触发导致冠状病毒S转变为融合后构象的融合事件之前所采用的结构构象。本文中公开了融合前构象的示例性冠状病毒S蛋白(HKU1-CoV)的三维结构,并在Kirchdoerfer等人,“Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein,”*Nature*, 531:118-121, 2016(通过引用并入本文)中提供。

[0186] “稳定在融合前构象”的冠状病毒S胞外域三聚体与天然冠状病毒S序列相比包含一个或多个氨基酸取代、缺失或插入,其提供了与由相应的天然冠状病毒S序列形成的冠状病毒S胞外域三聚体相比,增加的融合前构象保留。通过一个或多个氨基酸取代、缺失或插入对融合前构象的“稳定化”可以是例如能量稳定化(例如,降低融合前构象相对于融合后开放构象的能量)和/或动力学稳定化(例如,降低从融合前构象到融合后构象的转变速率)。此外,与相应的天然冠状病毒S序列相比,融合前构象的冠状病毒S胞外域三聚体的稳定化可以包括对变性的抗性增加。本文提供了确定冠状病毒S胞外域三聚体是否处于融合前构象的方法,并且包括(但不限于)负染电子显微镜和使用融合前构象特异性抗体的抗体结合测定。

[0187] 简并变体:在本公开的上下文中,“简并变体”是指编码多肽的多核苷酸,其包括由于遗传密码而为简并的序列。存在20种天然氨基酸,其大多数由多于一个密码子指定。因此,包括编码肽的所有简并核苷酸序列,只要由核苷酸序列编码的肽的氨基酸序列不变即可。

[0188] 在一个实例中,期望的反应是抑制或减少或预防CoV(比如SARS-CoV-2)感染。CoV感染不需要被完全消除或减少或预防才使方法有效。例如,施用有效量的免疫原可以诱导免疫反应,其使CoV感染(例如,如通过细胞的感染或通过被CoV感染的受试者的数量或百分比测量的)减少期望量,例如与合适的对照相比,减少至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或甚至至少100%(可检测的CoV感染的消除或预防)。表位:抗原决定簇。这些是具有抗原性,使得其引发特异性免疫反应的分子上的特定化学基团或肽序列,例如,表位是B细胞和/或T细胞对其作出反应的抗原区域。抗体可与特定抗原表位结合,所述表位比如冠状病毒S胞外域(比如SARS-CoV S胞外域)上的表位。表位可由连续氨基酸或通过蛋白的三级折叠而并列的非连续氨基酸形成。

[0189] 表达是指核酸序列的转录或翻译。例如,当基因的DNA被转录成RNA或RNA片段时,基因表达,在一些实例中,RNA或RNA片段被加工成mRNA。当基因的mRNA被翻译成氨基酸序列(比如蛋白或蛋白片段)时,基因也可表达。在特定实例中,当异源基因被转录成RNA时,异源基因表达。在另一个实例中,当异源基因的RNA被翻译成氨基酸序列时,异源基因表达。术语“表达”在本文中用于表示转录或翻译。表达的调控可以包括对转录、翻译、RNA运输和加工、中间分子(比如mRNA)的降解的控制,或通过特定蛋白分子产生后对其进行激活、失活、区室化或降解。

[0190] 术语“宿主细胞”是指已引入外源核酸的细胞,包括此类细胞的子代。宿主细胞包括“转化子”和“转化细胞”,其包括原代转化细胞和由其衍生的子代,无论传代数量如何。宿主细胞包括已引入外源核酸的受试者(例如哺乳动物受试者(例如人))体内的细胞。

[0191] “免疫原”是指任何在施用后可在受试者中诱导免疫反应的多肽。在一些实施方案中,免疫原由核酸分子编码,所述核酸分子可并入例如多核苷酸或载体中,用于免疫原(例如,目标基因产物或其片段(例如,多肽))的后续表达。

[0192] 如本文所用,术语“免疫原性组合物”定义为用于刺激免疫反应的材料,并且可以在将免疫原性组合物施用于受试者后赋予免疫。

[0193] 术语“免疫刺激剂”是指通过诱导激活或增加其任何组分的活性来刺激免疫系统的物质(例如药物和营养素)。免疫刺激剂包括细胞因子(例如粒细胞巨噬细胞集落刺激因子)和干扰素(例如IFN- α 和/或IFN- γ)。

[0194] “药物组合物”是指含有治疗或生物活性剂(比如免疫原性组合物或疫苗,其优选包括编码目标抗原基因产物或其片段的核苷酸序列)的任何组合物,其适合施用于受试者并治疗或预防疾病(例如,CoV感染)或减少或改善该疾病的一种或多种症状(例如,CoV病毒滴度、病毒播散、感染和/或细胞融合)。为了本发明的目的,药物组合物包括疫苗,并且适合递送治疗或生物活性剂的药物组合物可以包括例如片剂、软胶囊剂、胶囊剂、丸剂、散剂、颗粒剂、混悬剂、乳剂、溶液剂、凝胶剂、水凝胶、口服凝胶、糊剂、滴眼剂、软膏剂、乳膏剂、硬膏剂、浸液、递送装置、栓剂、灌肠剂、注射剂、植入物、喷雾剂或气雾剂。任何这些制剂可以通过本领域公知和公认的方法制备。参见例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy (第21版),A.R.Gennaro编辑,Lippincott Williams&Wilkins,2005,以及Encyclopedia of Pharmaceutical Technology,J.Swarbrick编辑,Informa Healthcare,2006,其每一篇通过引用并入本文。免疫反应是免疫系统细胞(比如B细胞、T细胞或单核细胞)对刺激的反应。在一个实施方案中,该反应是对特定抗原具有特异性的反应(“抗原特异性反应”)。在一个实施方案中,免疫反应是T细胞反应,比如CD4+反应或CD8+反应。在另一个实施方案中,该反应是B细胞反应,并导致特异性抗体的产生。

[0195] 初免-加强疫苗接种是一种免疫疗法,其包括向受试者施用第一免疫原性组合物(初免疫苗),然后施用第二免疫原性组合物(加强疫苗)以诱导免疫反应。初免疫苗和/或加强疫苗包括表达免疫反应所针对的抗原的载体(比如病毒载体、RNA或DNA载体)。加强疫苗在初免疫苗之后施用于受试者;在本文中公开了初免疫苗和加强疫苗的施用之间的合适时间间隔和此类时间范围的实例。在一些实施方案中,初免疫苗、加强疫苗或初免疫苗和加强疫苗二者另外包括佐剂。

[0196] 疫苗是一种诱导受试者的预防性或治疗性免疫反应的药物组合物。在一些情况下,免疫反应是保护性免疫反应。通常,疫苗诱导对病原体(例如病毒病原体)的抗原或与病理状况相关的细胞成分的抗原特异性免疫反应。疫苗可以包括多核苷酸(比如编码所公开抗原的核酸)、肽或多肽(比如所公开的抗原)、病毒、细胞或一种或多种细胞成分。在非限制性实例中,疫苗诱导免疫反应,所述免疫反应与对照相比降低与冠状病毒感染(比如SARS-CoV或MERS-CoV感染)相关的症状的严重程度和/或降低病毒载量。在另一个非限制性实例中,疫苗诱导免疫反应,所述免疫反应与对照相比降低和/或预防冠状病毒感染(比如SARS-CoV或MERS-CoV感染)。在某些方面,本公开的疫苗可以被称作“二价”或“多价”,因为它们作为单一载体,能够同时诱导针对两种或更多种病毒病原体(例如两种冠状病毒分离株)的免疫反应。

[0197] 载体是含有带有启动子的DNA或RNA分子的实体,所述启动子可操作地连接至目标

抗原的编码序列并且可表达该编码序列。非限制性实例包括裸露或包装的(脂质和/或蛋白)DNA、裸露或包装的RNA、可为复制缺陷的病毒或细菌或其他微生物的子组件,或可为复制缺陷的病毒或细菌或其他微生物。载体有时被称为构建体。重组DNA载体是具有重组DNA的载体。载体可以包括允许其在宿主细胞中复制的核酸序列,比如复制起点。载体还可以包括一个或多个选择标记基因和本领域已知的其他遗传元件。病毒载体是具有至少一些来源于一种或多种病毒的核酸序列的重组核酸载体。

[0198] 病毒样颗粒(VLP)是源自若干种病毒中的任一种的非复制性病毒壳。VLP通常由一种或多种病毒蛋白构成,所述病毒蛋白诸如但不限于被称为衣壳、外壳、壳、表面和/或包膜蛋白的那些蛋白,或源自这些蛋白的颗粒形成多肽。VLP可以在蛋白在适当的表达系统中重组表达后自发形成。生产特定VLP的方法在本领域中是已知的。可以使用本领域中已知的常规技术(比如通过电子显微镜、生物物理表征等)检测重组表达病毒蛋白后VLP的存在情况。此外,可以通过已知技术(例如密度梯度离心)分离VLP并通过特征密度条带鉴定。参见例如,Baker等人(1991)Biophys.J.60:1445-1456;以及Hagensee等人(1994)/.Virol.68:4503-4505;Vincente,J Invertebr Pathol.,2011;Schneider-Ohrum和Ross,Curr.Top.Microbiol.Immunol,354:53073,2012。

[0199] II.组合物

[0200] 本公开的组合物可包含一种或多种活性剂。在一些实施方案中,活性剂可以是预防、治疗或降低病毒感染的感染性的药剂。在一些实施方案中,治疗病毒感染可包括降低病毒的感染性和/或传播。在一些实施方案中,预防病毒感染可包括降低病毒的感染性和/或传播。本公开的组合物可包含预防病毒感染的活性剂、治疗病毒感染的活性剂、降低病毒感染的感染性的活性剂或其组合。本公开的组合物可进一步包含药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。此外,本公开的组合物可含有防腐剂、增溶剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、甜味剂、着色剂、气味剂、盐(本发明的物质本身可以以药学上可接受的盐的形式提供)、缓冲剂、包衣剂或抗氧化剂。

[0201] 本公开涉及非人腺病毒载体组合物以及使用包含腺病毒载体和任选的一种或多种其他活性成分、药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或佐剂的免疫原性组合物来治疗或预防呼吸道病毒感染的方法。本申请人发现使用猿猴腺病毒载体克服了人腺病毒载体平台中见到的异源载体交叉免疫问题(PMID:32450106)。本申请人配置了表达SARS-CoV-2抗原(比如稳定形式的SARS-CoV-2“S”蛋白)的黑猩猩腺病毒载体,并显示它可以在疾病的动物模型中保护免受COVID-19。当在腺病毒载体中表达时,SARS-CoV-2抗原或其免疫原性部分可以在感染人后刺激免疫反应,并从而赋予对COVID-19疾病的免疫力。本申请人进一步发现,该腺病毒载体平台可成功用于递送SARS-CoV-2抗原的变体,所述变体在产生针对SARS-CoV-2的亚谱系或亚变体的免疫原性反应方面是有效的。

[0202] 本发明的其他方面将在下文进一步详细描述。

[0203] a) 腺病毒载体

[0204] 本公开提供了用于递送编码SARS-CoV-2抗原的DNA(比如稳定形式的SARS-CoV-2“S”蛋白)的腺病毒载体。编码SARS-CoV2-Wuhan S蛋白的转基因的核苷酸序列作为SEQ ID NO:1提供,并且包含编码SARS-CoV2-Wuhan S蛋白的转基因的示例性腺病毒载体的核苷酸序列在SEQ ID NO:2中提供。SARS-CoV2-Wuhan S蛋白的蛋白编码序列在SEQ ID NO:3中提

供。

[0205] 腺病毒是无包膜病毒,直径为大约90-100nm,其包含核衣壳和线性双链DNA基因组。病毒核衣壳包含五邻体和六邻体衣壳体。独特的纤维与每个五邻体基质相连,并且有助于病毒经由宿主细胞表面上的柯萨奇腺病毒受体附着至宿主细胞。已鉴定了超过50种腺病毒的血清型毒株,其大多数引起人的呼吸道感染、结膜炎和胃肠炎。腺病毒通常作为游离元件在宿主细胞的细胞核中复制,而不是整合到宿主基因组中。腺病毒基因组包含4个早期转录单位(E1、E2、E3和E4),它们主要具有调节功能并为宿主细胞的病毒复制做好准备。基因组还包含5个晚期转录单位(L1、L2、L3、L4和L5),它们编码包括五邻体(L2)、六邻体(L3)、支架蛋白(L4)和纤维蛋白(L5)的结构蛋白,这5个晚期转录单位受单个启动子控制。基因组的每个末端都包含病毒复制所必需的反向末端重复(ITR)。

[0206] 重组腺病毒最初是为基因疗法而开发的,但这些基因递送剂所引发的强烈且持续的转基因特异性免疫反应促使它们用作疫苗载体。除了具有高度的免疫原性之外,腺病毒还为临床疫苗开发提供了许多其他优点。腺病毒基因组相对较小(在26到45kbp之间)、表征良好且易于操作。单个转录单位E1的缺失会使病毒复制缺陷,这提高了其可预测性并减少了临床应用中的副作用。重组腺病毒可以容纳相对较大的转基因,在一些情况下最长达8kb,这允许了亚基设计的灵活性,并且重组腺病毒具有相对广泛的趋性,有助于将转基因递送到多种细胞和组织。对于临床应用而言重要的是,大规模生产和纯化高滴度重组腺病毒的方法已经得到充分建立。迄今为止,C亚组血清型AdHu2或AdHu5已主要用作载体。然而,基于原型人腺病毒AdHu5的第一代疫苗载体在临床试验中显示出较差的效力,尽管临床前数据令人鼓舞。随后发现,由于自然感染,很大一部分成年人含有显著滴度的针对常见人血清型(比如AdHu2和AdHu5)的中和抗体。中和抗体可通过阻断病毒进入宿主细胞并因此递送目标转基因来降低病毒载体疫苗的效力。

[0207] 本文所述的组合物包括将异源分子递送至细胞以用于治疗或疫苗目的的载体。如本文所用,载体可以包括任何遗传元件,包括但不限于裸DNA、噬菌体、转座子、粘粒、附加体、质粒或病毒。在一些实施方案中,此类载体包含猿猴腺病毒DNA(例如,SApV-36)和转基因或编码蛋白(例如,S-蛋白)的核酸序列。如本文所用,“转基因”是指所选择的异源基因(编码异源多肽的核酸序列)与驱动宿主细胞中基因产物的翻译、转录和/或表达所必需的其他调节元件或表达控制序列的组合。在若干实施方案中,病毒载体可以包括表达编码冠状病毒S蛋白的转基因的腺病毒载体。来自各种来源、亚型或亚型混合物的腺病毒可以用作腺病毒载体的病毒基因组的来源。可以使用非人腺病毒(例如,猿猴、黑猩猩、大猩猩、鸟类、犬科动物、绵羊或牛腺病毒)来产生腺病毒载体。例如,可以使用猿猴腺病毒作为腺病毒载体的病毒基因组的来源。猿猴腺病毒可以是血清型1、3、7、11、16、18、19、20、27、33、36、38、39、48、49、50或任何其他猿猴腺病毒血清型。可以通过使用本领域已知的任何合适的缩写来指代猿猴腺病毒,例如SV、SApV、SAV或sAV。在一些实例中,猿猴腺病毒载体是血清型36的猿猴腺病毒载体。

[0208] 通常,SApV衍生的腺病毒载体被设计为使得转基因位于包含所选腺病毒基因原属的区域中的其他腺病毒序列的核酸分子中。如果需要,可以将转基因插入现有基因区域以破坏该区域的功能。备选地,可以将转基因插入部分或完全缺失的腺病毒基因的位点。例如,转基因可以位于比如可以选择的功能性E1缺失和/或功能性E3缺失(或E3B)和/或完全

E3缺失等的位点之类的位点。术语“功能性地缺失”或“功能性缺失”是指足够量的基因区域被移除或以其他方式被破坏(例如通过突变或修饰)使得基因区域不再能够产生基因表达的功能产物。如果需要,可以移除整个基因区域。在一个实施方案中,根据本公开有用的腺病毒载体是猿猴腺病毒SAd36,其在E1和E3B基因中具有缺失。在一个方面,该载体包含完全E3缺失。在一个方面,腺病毒载体具有SEQ ID NO:4的核酸序列。在另一个方面,腺病毒载体具有与SEQ ID NO:4具有至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%序列同一性的核酸序列。

[0209] 例如,对于可用于产生重组病毒的生产载体,该载体可以包含转基因和腺病毒基因组的5'端或腺病毒基因组的3'端,或腺病毒基因组的5'和3'端二者。腺病毒基因组的5'端包含包装和复制所必需的5'顺式元件,即5'反向末端重复(ITR)序列(其充当复制起点)和天然5'包装增强子结构域(其包含包装线性Ad基因组所必需的序列和E1启动子的增强子元件)。腺病毒基因组的3'端包括包装和衣壳化所必需的3'顺式元件(包括ITR)。合适地,重组腺病毒含有5'和3'腺病毒顺式元件二者,并且转基因位于5'和3'腺病毒序列之间。基于猿猴的腺病毒载体(例如SAdV-36)也可含有另外的腺病毒序列。

[0210] 合适地,这些基于猿猴的腺病毒载体含有一个或多个源自腺病毒基因组的腺病毒元件。在一个实施方案中,载体含有源自与提供ITR的腺病毒血清型不同的腺病毒血清型的腺病毒序列。如本文所定义,假型腺病毒是指其中腺病毒的衣壳蛋白来自与提供ITR的腺病毒不同的腺病毒的腺病毒。可以使用本领域技术人员已知的技术,使用本文所述的腺病毒构建嵌合或杂合腺病毒。参见例如,US 7,291,498。

[0211] 转基因是与转基因侧翼的载体序列异源的核酸序列,其编码目标多肽、蛋白或其他产物。核酸编码序列以允许转基因在宿主细胞中转录、翻译和/或表达的方式可操作地连接至调节组件。

[0212] 在一些实施方案中,转基因编码SARS-CoV-2抗原,比如稳定形式的SARS-CoV-2“S”蛋白。在一些实施方案中,转基因编码具有与SEQ ID NO:3的冠状病毒刺突蛋白部分(或其免疫原性部分或变体)具有至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%序列同一性;或与具有K986P和V987P突变的SEQ ID NO:3或具有D614G突变的SEQ ID NO:3具有至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%序列同一性的序列的冠状病毒刺突蛋白(S)蛋白的至少一部分或免疫原性片段,或其免疫原性片段或变体。在一些实施方案中,转基因编码SARS-CoV-2变体的刺突蛋白,在非限制性实例中,编码相对于SEQ ID NO:3具有D80G、144del、F157S、L5F、T95I、A67V、S477N、144del、Q677H、A701V、F888L、T791I、T859N、D950H、E484Q、D614G、E484K、N501Y、Δ69-70、L452R、或K417N或RBD E484K突变的刺突蛋白。在一些实施方案中,转基因编码来自WA1/2020、B.1.1.7、B.1.351、B.1.1.28、P.1、B.1.427、B.1.526、B.1.526.1、B.1.525、P.2、B.1.617、B.1.617.1、B.1.617.2、B.1.617.3、B.1.429、B.1.429、B.1.529变体的刺突蛋白。在上述每个实施方案中,刺突蛋白被进一步修饰为融合前稳定形式(例如在残

基1050至1069之间或残基981至999之间具有双脯氨酸取代)。

[0213] 具有多个刺突蛋白突变的变体Omicron(B.1.1.529)最初在博茨瓦纳被检测到。具体地,一些Omicron变体的基因组编码具有以下突变的S蛋白:A67V、 Δ 69-70、T95I、G142D/A143-145、A211/L212I、214EPE、G339D、S371L、S373P、S375F、K417N、N440K、G446S、S477N、T478K、E484A、Q493K、G496S、Q498R、N501Y、Y505H、T547K、D614G、H655Y、N679K、P681H、N764K、D796Y、N856K、Q954H、N969K和L981F。在一些实施方案中,该示例性毒株和其他新出现的毒株(例如,另外的重要变体)是本文中公开的方法和制剂的候选物。因此,在一些实施方案中,本公开还涵盖重组腺病毒载体,其包含源自Omicron B.1.1.529毒株或其变体的转基因稳定刺突蛋白序列。Omicron毒株的亚变体的非限制性实例包括BA1.1、BA.2、BA.3、BA.4和BA.5。在一个示例性方面,BA.5变体可具有以下突变:T19I、L24S、del25-27、69-70del、G142D、V213G、G339D、S371F、S373P、S375F、T376A、K417N、N440K、S477N、T478K、E484A、Q493R、L452R、F486V、Q498R、N501Y、D614G、H655Y、N679K、P681H、R682G、R683S、R685S、N764K、D796Y、Q954H、N969K。

[0214] 因此,在一些实施方案中,转基因核酸编码稳定的SARS-CoV2-Omicron-刺突蛋白(SARS-CoV2-Omicron-S2P),如SEQ ID NO:10中提供的;或编码与SEQ ID NO:10(SARS-CoV2-Omicron-S2P)具有至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%序列同一性的蛋白的核酸序列。

[0215] 在一些实施方案中,转基因核酸编码SEQ ID NO:11的SARS-Cov2-Omicron-刺突蛋白(SARS-CoV-2-Omicron-S6P);或编码与SEQ ID NO:11(SARS-CoV2-Omicron-S6P)具有至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%序列同一性的蛋白的核酸序列。

[0216] 在一些实施方案中,转基因核酸编码SEQ ID NO:12的SARS-Cov2-Omicron-刺突蛋白(SARS-CoV-2-Omicron-S6P δ F);或编码与SEQ ID NO:12(SARS-CoV2-Omicron-S6P δ F)具有至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%序列同一性的蛋白的核酸序列。

[0217] 在一些实施方案中,转基因核酸编码SEQ ID NO:20的SARS-Cov2-Omicron-刺突蛋白(SARS-CoV-2-Omicron-S6PdF);或编码与SEQ ID NO:20(二价BA.5-S6PdF)具有至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%序列同一性的蛋白的核酸序列。

[0218] 在一些实施方案中,转基因核酸编码SEQ ID NO:21的SARS-Cov2-Omicron-刺突蛋白(SARS-CoV-2-Omicron-S6P);或编码与SEQ ID NO:21(二价BA.5-S6P)具有至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%序列同一性的蛋白的核酸序列。

[0219] 在一些方面,腺病毒载体包含核酸序列(转基因),其中该核酸序列编码与SEQ ID NO:3或其变体具有至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%同一性的氨基酸序列,所述变体包含以下突变中的至少5个、或至少10个、或至少15个、或至少20个、或至少25个、或至少30个或更多个并进一步包含至少2个、或至少3个、或至少4个、或至少5个或6个如F819P、A894P、A901P、A944P、K988P和V989P中所提供的稳定化突变:T19I、L24S、del25-27、69-70del、G142D、V213G、G339D、S371F、S373P、S375F、T376A、K417N、N440K、S477N、T478K、E484A、Q493R、L452R、F486V、Q498R、N501Y、D614G、H655Y、N679K、P681H、R682G、R683S、R685S、N764K、D796Y、A942P、Q954H、N969K、K988P和V989P。在一些方面,腺病毒载体编码与SEQ ID NO.3或如SEQ ID NO.10-11和20-21中提供的Omicron变体具有至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%同一性的蛋白,所述Omicron变体包含至少2个、或至少3个、或至少4个、或至少5个、或6个如F819P、A894P、A901P、A944P、K988P和V989P中所提供的稳定化突变。图23中提供了SEQ ID NO:10、11、20、21相对于Wuhan序列的序列比对。

[0220] 在一些实施方案中,本公开还涵盖腺病毒载体,其包含编码超过一种冠状病毒刺突蛋白变体或其部分的免疫原性片段的核酸序列。在一些实施方案中,本公开还涵盖腺病毒载体,其包含编码具有与SEQ ID NO:3、10、11、20或21具有至少80%同一性的序列的冠状病毒刺突蛋白(S)蛋白或其免疫原性片段或变体的至少一部分或免疫原性片段的核酸序列,以及编码具有与源自SARS-CoV2的一种或多种另外的蛋白具有至少约80%同一性的序列的其至少一部分或免疫原性片段或变体的核酸序列。在一些方面,一种或多种另外的蛋白可以选自非结构蛋白1-16(nsp1-16)、包括S蛋白、包膜(E)、膜(M)和核衣壳(N)的结构蛋白和以下11种辅助蛋白:ORF3a、ORF3b、ORF3c、ORF3d、ORF6、ORF7a、ORF7b、ORF8、ORF9b、ORF9c和ORF10。在一些实施方案中,本公开还涵盖腺病毒载体,其包含与SEQ ID NO:3、10、11、20或21具有至少80%同一性的序列的冠状病毒刺突蛋白(S)蛋白或其免疫原性片段或变体的至少一部分或免疫原性片段的核酸序列,以及编码源自另一病毒(例如狂犬病、麻疹、RSV或流感)的蛋白的至少一部分或免疫原性片段的核酸序列。合适蛋白的实例包括但不限于流感血凝素、流感核蛋白、流感M2、破伤风毒素C片段、炭疽保护性抗原、炭疽致死因子、炭疽萌发因子、狂犬病糖蛋白、HBV表面抗原、HIV gp120、HIV gp160、人癌胚抗原、疟疾CSP、疟疾SSP、疟疾MSP、疟疾pfg、肉毒杆菌毒素A和结核分枝杆菌HSP。在一些实施方案中,腺病毒载体被描述为表达二价、三价或多价免疫原性蛋白,其中它引发针对超过一种病毒或超过一种SARS-CoV2谱系、变体、亚谱系或亚变体的免疫反应。

[0221] 在一些实施方案中,本公开还涵盖包含编码如本文所公开的S蛋白序列的核酸序列的质粒和腺病毒载体(载体)。在一些方面,核酸与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6具有至少80%同一性。在一些实施方案中,腺病毒载体或质粒包含与SEQ ID NO:2、5或6具有至少约80%同一性的核酸序列或由其组成。在一些实施方案中,核酸序列具有与SEQ ID NO:2、5或6的至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、

99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%的同一性。

[0222] 在一些实施方案中,载体包含如SEQ ID NO:13 (ChAd-S6PdF529) 中提供的核酸序列或由其组成。在一些实施方案中,载体包含与SEQ ID NO:13具有至少约80%同一性的核酸序列或由其组成。在一些实施方案中,核酸序列具有与SEQ ID NO:13的至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%的同一性。

[0223] 在一些实施方案中,载体包含如SEQ ID NO:14 (ChAd-S2P529) 中提供的核酸序列/由其组成。在一些实施方案中,载体包含与SEQ ID NO:14具有至少约80%同一性的核酸序列或由其组成。在一些实施方案中,核酸序列具有与SEQ ID NO:14的至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%的同一性。

[0224] 在一些实施方案中,载体包含如SEQ ID NO:15 (ChAd-S6P529) 中提供的核酸序列或由其组成。在一些实施方案中,载体包含与SEQ ID NO:15具有至少约80%同一性的核酸序列或由其组成。在一些实施方案中,核酸序列具有与SEQ ID NO:15的至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%的同一性。

[0225] 在一些实施方案中,质粒包含如SEQ ID NO:16 (pSAd36E3E1stS) (其中整个E3基因被缺失) 所提供的核酸序列或由其组成。在一些实施方案中,载体包含与SEQ ID NO:16具有至少约80%同一性的核酸序列或由其组成。在一些实施方案中,核酸序列具有与SEQ ID NO:16的至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%的同一性。

[0226] 在一些实施方案中,载体包含如SEQ ID NO:17 (SAd36E3E1stS) (其中整个E3基因被缺失) 所提供的核酸序列或由其组成。在一些实施方案中,载体包含与SEQ ID NO:17具有至少约80%同一性的核酸序列或由其组成。在一些实施方案中,核酸序列具有与SEQ ID NO:17的至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%的同一性。

[0227] 在一些实施方案中,载体包含如SEQ ID NO:18 (ChAd.BA.5-S6PdF) 中提供的核酸序列或由其组成。在一些实施方案中,载体包含与SEQ ID NO:18具有至少约80%同一性的核酸序列或由其组成。在一些实施方案中,核酸序列具有与SEQ ID NO:18的至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%的同一性。

[0228] 在一些实施方案中,载体包含如SEQ ID NO:19 (ChAd.BA.5-S6P) 中提供的核酸序列或由其组成。在一些实施方案中,载体包含与SEQ ID NO:19具有至少约80%同一性的核

酸序列或由其组成。在一些实施方案中,核酸序列具有与SEQ ID NO:19的至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%的同一性。

[0229] 除了上文中为转基因确定的主要元件之外,载体还可以包括常规控制元件,其以允许转基因在用本发明产生的质粒载体转染的或用本发明产生的病毒感染的细胞中转录、翻译和/或表达的方式可操作地连接至转基因。如本文所用,“可操作地连接的”序列包括与目标基因连续的表达控制序列和以反式或在远处起作用以控制目标基因的表达控制序列。表达控制序列包括适当的转录起始、终止、启动子和增强子序列;有效的RNA加工信号,比如剪接和多聚腺苷酸化(polyA)信号;稳定细胞质mRNA的序列;增强翻译效率的序列(即Kozak共识序列);增强蛋白稳定性的序列;以及在需要时增强编码产物分泌的序列。

[0230] 大量表达控制序列(包括天然的、组成型的、诱导型的和/或组织特异性的启动子)是本领域已知并可以利用的。组成型启动子的实例包括但不限于逆转录病毒劳斯肉瘤病毒(RSV)LTR启动子(任选地与RSV增强子一起)、巨细胞病毒(CMV)启动子(任选地与CMV增强子一起)[参见例如,Boshart等人,Cell,41:521-530(1985)]、SV40启动子、二氢叶酸还原酶启动子、 β -肌动蛋白启动子、磷酸甘油激酶(PGK)启动子和EF-1 α 启动子[Invitrogen]。

[0231] 诱导型启动子使得能够调节基因表达,并且可以通过外源提供的化合物、环境因素(比如温度)或特定生理状态(例如急性期、细胞的特定分化状态或仅在复制细胞中)的存在情况来调节。诱导型启动子和诱导型系统可从多种商业来源获得,包括但不限于Invitrogen、Clontech和Ariad。已经描述了许多其他系统,且本领域技术人员可以容易地选择。例如,诱导型启动子包括锌诱导型绵羊金属硫蛋白(MT)启动子和地塞米松(Dex)诱导型小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子。其他诱导型系统包括T7聚合酶启动子系统[WO 98/10088];蜕皮激素昆虫启动子[No等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,93:3346-3351(1996)];四环素抑制系统[Gossen等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:5547-5551(1992)];四环素诱导系统[Gossen等人,Science,268:1766-1769(1995),另外参见Harvey等人,Curr.Opin.Chem.Biol.,2:512-518(1998)]。其他系统包括FK506二聚体、使用castradiol、diphenolmurislerone的VP 16或p65、RU486诱导型系统[Wang等人,Nat.Biotech.,15:239-243(1997)和Wang等人,Gene Ther.,4:432-441(1997)]和雷帕霉素诱导型系统[Magari等人,J.Clin.Invest.,100:2865-2872(1997)]。一些诱导型启动子的有效性随时间增加。在这种情况下,可以通过串联插入多个阻遏物(例如通过IRES与TetR连接的TetR)来增强此类系统的有效性。备选地,可以等待至少3天后筛选所需功能。可以通过已知方法增强所需蛋白的表达以增强此系统的有效性。例如,使用土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE)。

[0232] 在另一个实施方案中,可以使用转基因的天然启动子。当期望转基因的表达应模仿天然表达时,可优选天然启动子。当转基因的表达必须在时间或发育上、或以组织特异性方式、或响应于特定转录刺激进行调节时,可以使用天然启动子。在进一步的实施方案中,还可以使用其他天然表达控制元件,比如增强子元件、多聚腺苷酸化位点或Kozak共识序列来模仿天然表达。转基因的另一个实施方案包括可操作地连接至组织特异性启动子的转基因。例如,如果需要在骨骼肌中表达,则应使用在肌肉中有活性的启动子。这些包括来自编码骨骼 β -肌动蛋白、肌球蛋白轻链2A、肌营养不良蛋白、肌肉肌酸激酶的基因的启动子,以

及具有高于天然存在的启动子的活性的合成肌肉启动子(参见Li等人,Nat.Biotech.,17:241-245(1999))。已知组织特异性的启动子的实例有肝脏(白蛋白,Miyatake等人,J.Virol.,71:5124-32(1997);乙型肝炎病毒核心启动子,Sandig等人,Gene Ther.,3:1002-9(1996); α -甲胎蛋白(AFP),Arbuthnot等人,Hum.Gene Ther.,7:1503-14(1996))、骨钙素(Stein等人,Mol.Biol Rep.,24:185-96(1997));骨涎蛋白(Chen等人,J.Bone Miner.Res.,11:654-64(1996))、淋巴细胞(CD2,Hansal等人,J.Immunol,161:1063-8(1998);免疫球蛋白重链;T细胞受体链)、神经元,比如神经元特异性烯醇化酶(NSE)启动子(Andersen等人,Cell.MolNeurobiol,13:503-15(1993))、神经丝轻链基因(Piccioli等人,Proc.Natl Acad.ScL USA,88:561 1-5(1991))以及神经元特异性vgf基因(Piccioli等人,Neuron,15:373-84(1995))等。任选地,携带编码治疗有用或免疫原性产物的转基因的载体还可以包括选择标记或报告基因,其可包括编码遗传霉素、潮霉素或嘌呤霉素抗性等的序列。此类可选择报告子或标记基因(优选位于待包装到病毒颗粒中的病毒基因组之外)可用于指示质粒在细菌细胞中的存在情况,比如氨苄青霉素抗性。载体的其他组件可包括复制起点。这些以及其他启动子和载体元件的选择是常规的,并且许多此类序列是可获得的[参见例如,Sambrook等人,以及其中引用的参考文献]。这些载体是结合本领域技术人员已知的技术,使用本文中提供的技术和序列产生的。此类技术可以包括cDNA的常规克隆技术,比如文本[Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY]中描述的那些、腺病毒基因组的重叠寡核苷酸序列的使用、聚合酶链式反应以及提供所需核苷酸序列的任何合适方法。

[0233] 在一些实施方案中,本公开提供了病毒样颗粒(VLP),其包括所公开的重组腺病毒载体。VLP缺少病毒复制所需的病毒组分,并因此代表高度减毒、复制缺陷的病毒形式。病毒样颗粒及其生产方法是本领域普通技术人员已知和熟悉的,并且已知来自几种病毒的病毒蛋白形成VLP,包括人乳头瘤病毒、HIV(Kang等人,Biol.Chem.380:353-64(1999))、塞姆利基-森林病毒(Notka等人,Biol.Chem.380:341-52(1999))、人多瘤病毒(Goldmann等人,J.Virol.73:4465-9(1999))、轮状病毒(Jiang等人,Vaccine 17:1005-13(1999))、细小病毒(Casal,Biotechnology and Applied Biochemistry,第29卷,第2部分,第141-150页(1999))、犬细小病毒(Hurtado等人,J.Virol.70:5422-9(1996))、戊型肝炎病毒(Li等人,J.Virol.71:7207-13(1997))以及新城疫病毒。此类VLP的形成可以通过任何合适的技术检测。本领域已知的用于检测培养基中VLP的合适技术的实例包括,例如,电子显微镜技术、动态光散射(DLS)、选择性色谱分离(例如,VLP的离子交换、疏水相互作用和/或尺寸排阻色谱分离)和密度梯度离心。

[0234] b) 组合物的组分

[0235] 本公开还提供了药物组合物。该药物组合物包含作为活性成分的本公开的腺病毒组合物,以及至少一种药学上可接受的赋形剂。

[0236] 药学上可接受的赋形剂可以是稀释剂、粘合剂、填充剂、缓冲剂、pH调节剂、崩解剂、分散剂、防腐剂、润滑剂、掩味剂、调味剂或着色剂。用于形成药物组合物的赋形剂的量和类型可以根据已知的药学原理进行选择。

[0237] 在本文所述的每个实施方案中,本发明的组合物除了本公开的腺病毒组合物之外,还可任选地包含一种或多种另外的药物或治疗活性剂。因此,除了本文所述的疗法之

外,还可以向受试者提供已知对治疗病毒感染有效的其他疗法。在一些实施方案中,第二药剂选自皮质类固醇、非甾体抗炎药(NSAID)、静脉注射免疫球蛋白、激酶抑制剂、融合或重组蛋白、单克隆抗体或其组合。在一些实施方案中,适合于组合治疗的药剂包括但不限于吸入性支气管扩张剂和吸入性类固醇。

[0238] (i) 稀释剂

[0239] 在一个实施方案中,赋形剂可以是稀释剂。稀释剂可以是可压缩的(即可塑性变形的)或磨损脆性(abrasively brittle)的。合适的可压缩稀释剂的非限制性实例包括微晶纤维素(MCC)、纤维素衍生物、纤维素粉末、纤维素酯(即乙酸酯和丁酸酯混合酯)、乙基纤维素、甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、玉米淀粉、磷酸化玉米淀粉、预糊化玉米淀粉、米淀粉、马铃薯淀粉、木薯淀粉、淀粉-乳糖、淀粉-碳酸钙、淀粉羟乙酸钠、葡萄糖、果糖、乳糖、一水合乳糖、蔗糖、木糖、乳糖醇、甘露醇、麦芽糖醇(malitol)、山梨醇、木糖醇、麦芽糖糊精和海藻糖。合适的磨损脆性稀释剂的非限制性实例包括磷酸氢钙(无水或二水合物)、磷酸三钙、碳酸钙和碳酸镁。

[0240] (ii) 粘合剂

[0241] 在另一个实施方案中,赋形剂可以是粘合剂。合适的粘合剂包括但不限于淀粉、预糊化淀粉、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、乙基纤维素、聚丙烯酰胺、聚乙烯基噁唑烷酮、聚乙烯醇、C₁₂-C₁₈脂肪酸醇、聚乙二醇、多元醇、糖、寡糖、多肽、寡肽及其组合。

[0242] (iii) 填充剂

[0243] 在另一个实施方案中,赋形剂可以是填充剂。合适的填充剂包括但不限于合适的填料包括但不限于碳水化合物、无机化合物和聚乙烯吡咯烷酮。作为非限制性实例,填充剂可以是二碱式和三碱式硫酸钙、淀粉、碳酸钙、碳酸镁、微晶纤维素、磷酸氢钙、碳酸镁、氧化镁、硅酸钙、滑石、改性淀粉、乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇。

[0244] (iv) 缓冲剂

[0245] 在又一实施方案中,赋形剂可为缓冲剂。合适的缓冲剂的代表性实例可包括但不限于磷酸盐、碳酸盐、柠檬酸盐、tris缓冲剂以及缓冲盐水盐(例如,Tris缓冲盐水或磷酸盐缓冲盐水)。

[0246] (v) pH调节剂

[0247] 在各种实施方案中,赋形剂可为pH调节剂。作为非限制性实例,pH调节剂可为碳酸钠、碳酸氢钠、柠檬酸钠、柠檬酸或磷酸。

[0248] (vi) 崩解剂

[0249] 在进一步的实施方案中,赋形剂可以是崩解剂。崩解剂可以是非泡腾的或泡腾的。非泡腾崩解剂的合适实例包括但不限于淀粉,比如玉米淀粉、马铃薯淀粉、其预糊化和改性淀粉、甜味剂、粘土,比如膨润土、微晶纤维素、藻酸盐、淀粉羟乙酸钠、树胶,比如琼脂、瓜尔胶、刺槐豆胶、刺梧桐胶、果胶和黄蓍胶。合适的泡腾崩解剂的非限制性实例包括与柠檬酸组合的碳酸氢钠和与酒石酸组合的碳酸氢钠。

[0250] (vii) 分散剂

[0251] 在又一实施方案中,赋形剂可为分散剂或分散增强剂。合适的分散剂可包括但不限于淀粉、藻酸、聚乙烯吡咯烷酮、瓜尔胶、高岭土、膨润土、纯化木纤维素、淀粉羟乙酸钠、

同无定形硅酸盐(isoamorphous silicate)和微晶纤维素。

[0252] (viii) 赋形剂

[0253] 在另一个替代实施方案中,赋形剂可以是防腐剂。合适的防腐剂的非限制性实例包括抗氧化剂,比如BHA、BHT、维生素A、维生素C、维生素E或视黄醇棕榈酸酯、柠檬酸、柠檬酸钠;螯合剂,比如EDTA或EGTA;以及抗微生物剂,比如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇或苯酚。

[0254] (ix) 润滑剂

[0255] 在进一步的实施方案中,赋形剂可以是润滑剂。合适的润滑剂的非限制性实例包括矿物质,比如滑石或二氧化硅;以及脂肪,比如植物硬脂、硬脂酸镁或硬脂酸。

[0256] (x) 掩味剂

[0257] 在又一个实施例中,赋形剂可以是掩味剂。掩味材料包括纤维素醚;聚乙二醇;聚乙烯醇;聚乙烯醇和聚乙二醇共聚物;单甘油酯或三甘油酯;丙烯酸聚合物;丙烯酸聚合物与纤维素醚的混合物;乙酸邻苯二甲酸纤维素;及其组合。

[0258] (xi) 调味剂

[0259] 在替代实施方案中,赋形剂可以是调味剂。调味剂可以选自合成风味油和调味芳香剂和/或天然油、来自植物、叶、花、果实的提取物及其组合。

[0260] (xii) 着色剂

[0261] 在又一个实施方案中,赋形剂可以是着色剂。合适的着色添加剂包括但不限于食品、药物和化妆品色素(FD&C)、药物和化妆品色素(D&C)或外用药物和化妆品色素(Ext.D&C)。

[0262] (xiii) 佐剂

[0263] 在又一个实施方案中,制剂可以包含佐剂。本领域已知佐剂进一步增加对所应用的抗原决定簇的免疫应答,并且包含腺病毒和合适佐剂的药物组合物例如在WO 2007/110409(其通过引用并入本文)中公开。合适的佐剂的实例包括铝盐,比如氢氧化铝和/或磷酸铝;油乳剂组合物(或水包油组合物),包括角鲨烯-水乳剂,比如MF59(参见例如WO 90/14837);皂苷制剂,例如QS21和免疫刺激复合物(ISCMS);细菌或微生物衍生物,其实例是单磷酸脂质A(MPL)、3-O-脱乙酰化MPL(3dMPL)、含CpG基序的寡核苷酸、ADP-核糖基化细菌毒素或其突变体,比如大肠杆菌(E.coli)热不稳定肠毒素LT、霍乱毒素CT等。还可以使用载体编码的佐剂,例如通过使用编码C4结合蛋白(C4 bp)的寡聚化结构域与目标抗原的融合体的异源核酸。在某些实施方案中,本发明的组合物包含铝作为佐剂,例如以氢氧化铝、磷酸铝、磷酸铝钾或其组合的形式,浓度为每剂量0.05-5mg,例如0.075-1.0mg的铝含量。

[0264] 组合物中赋形剂或赋形剂组合的重量分数可为组合物总重量的约99%或更少、约97%或更少、约95%或更少、约90%或更少、约85%或更少、约80%或更少、约75%或更少、约70%或更少、约65%或更少、约60%或更少、约55%或更少、约50%或更少、约45%或更少、约40%或更少、约35%或更少、约30%或更少、约25%或更少、约20%或更少、约15%或更少、约10%或更少、约5%或更少、约2%或约1%或更少。

[0265] 本文所述的药剂和组合物可使用一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂,通过任何常规方式进行配制,如在例如Remington's Pharmaceutical Sciences(A.R.Gennaro编辑),第21版,ISBN:0781746736(2005)(其通过引用全文并入本文)中所述。此类制剂将包含治疗有效量的本文所述的生物活性剂(其可为纯化形式),以及合适量的载体(以便提供用

于向受试者适当施用的形式)。

[0266] 术语“制剂”是指制备适合于向受试者(比如人)施用的形式的药物。因此,“制剂”可以包括药学上可接受的赋形剂,包括稀释剂或载体。

[0267] 如本文所用,术语“药学上可接受的”可描述不会引起不可接受的药理活性损失或不可接受的不良副作用的物质或组分。药学上可接受的成分的实例可以是具有美国药典(USP 29)和国家处方集(NF 24),United States Pharmacopeial Convention, Inc, Rockville, Maryland, 2005 (“USP/NF”)或更新版本中的专论的那些,以及不断更新的FDA非活性成分搜索在线数据库中列出的组分。也可以使用USP/NF等中未描述的其他有用成分。

[0268] 如本文所用,术语“药学上可接受的赋形剂”可以包括任何和所有溶剂、分散介质、涂层、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂或吸收延迟剂。将此类介质和药剂用于药物活性物质是本领域公知的(通常参见Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R.Gennaro编辑),第21版,ISBN:0781746736(2005))。除非任何常规介质或药剂与活性成分不相容,否则考虑将其用于治疗组合物中。补充性活性成分也可并入组合物中。

[0269] “稳定的”制剂或组合物可以指具有足够的稳定性,以允许在方便的温度下(比如在约0°C至约60°C之间)储存一段商业上合理的时间的组合物,所述商业上合理的时间段比如至少约一天、至少约一周、至少约一个月、至少约三个月、至少约六个月、至少约一年或至少约两年。

[0270] 制剂应适合施用方式。本公开使用的药剂可通过已知方法配制用于使用若干种途径施用于受试者,所述途径包括但不限于肠胃外、肺部、口服、局部、粘膜、皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外、眼部、颊和直肠。单个药剂也可与一种或多种另外的药剂组合施用,或其他生物活性剂或生物惰性剂一起施用。此类生物活性剂或生物惰性剂可与药剂流体或机械连通,或通过离子、共价、范德华力、疏水、亲水或其他物理力附着于药剂。

[0271] 在一些方面,本公开涵盖鼻内递送的制剂。包含用于鼻内递送的组合物的制剂可具有与生理酸性鼻腔pH相对应的pH。生理酸性鼻腔pH可取决于完整的鼻粘膜功能。组合物可包含约为 6.5 ± 0.5 (5.9至7.3)或约 6.7 ± 0.6 (5.3至7.6)的pH。组合物可包含约3.8-7.7 (平均值 $\pm$ SD 5.7 ± 0.9)的pH。用于鼻腔递送的组合物可处于微酸性范围内。平均pH可具有pH 5.7的酸度。

[0272] 经由鼻内施用有效递送治疗剂除了由于与粘液层的糖蛋白结合而导致的药物损失之外,必须考虑到跨鼻粘膜的保护性粘液衬里(mucus lining)的降低的输送率。正常粘液是一种粘弹性的凝胶状物质,其由水、电解质、粘蛋白、大分子和脱落的上皮细胞组成。它主要用作下层粘膜组织的细胞保护和润滑覆盖物。粘液由位于鼻上皮和其他粘膜上皮中的随机分布的分泌细胞分泌。粘液的结构单位是粘蛋白。这种糖蛋白主要引起了粘液的粘弹性质,尽管其他大分子也可有助于这种特性。在气道粘液中,此类大分子包括局部产生的分泌性IgA、IgM、IgE、溶菌酶和支气管转铁蛋白,它们也在宿主防御机制中起重要作用。

[0273] 本公开的协同施用方法任选地合并有效的粘液溶解或粘液清除剂,其用于降解、稀释或清除来自鼻内粘膜表面的粘液,以促进鼻内施用的生物治疗剂的吸收和/或吸附。在这些方法中,粘液溶解或粘液清除剂作为辅助化合物协同施用,以增强生物活性剂的鼻内递送。备选地,将有效量的粘液溶解或粘液清除剂作为本发明的多加工方法中的加工助剂,

或作为本发明的组合制剂中的添加剂合并,以提供改善的制剂,其通过降低鼻内粘液的屏障作用来增强生物治疗化合物的鼻内递送。

[0274] 多种粘液溶解或粘液清除剂可用于并入本发明的方法和组合物中。根据其作用机制,粘液溶解和粘液清除剂通常可分为以下组:裂解粘蛋白糖蛋白的蛋白核心的蛋白酶(例如,链霉蛋白酶、木瓜蛋白酶);裂解粘蛋白二硫键的巯基化合物;以及破坏粘液中的非共价键的洗涤剂(例如,Triton X-100、Tween 20)。在此上下文中的另外的化合物包括但不限于胆汁盐和表面活性剂,例如脱氧胆酸钠、牛磺脱氧胆酸钠、甘氨酸胆酸钠和溶血磷脂酰胆碱。

[0275] 胆汁盐在引起粘液的结构分解方面的有效性顺序为脱氧胆酸盐>牛磺胆酸盐>甘氨酸胆酸盐。根据本发明的方法,降低粘液粘度或粘附性以增强鼻内递送的其他有效药剂包括例如短链脂肪酸和通过螯合起作用的粘液溶解剂,比如N-酰基胶原肽、胆汁酸和皂苷(后者部分通过螯合 Ca^{2+} 和/或 Mg^{2+} 起作用, Ca^{2+} 和/或 Mg^{2+} 在维持粘液层结构方面起重要作用)。

[0276] 用于在本发明的方法和组合物中使用的另外的粘液溶解剂包括N-乙酰-L-半胱氨酸(ACS),其是一种降低支气管肺粘液的粘度和粘附性二者的有效粘液溶解剂,并且据报道其适度增加麻醉大鼠中人生长激素的鼻腔生物利用度(从7.5%到12.2%)。这些和其他粘液溶解或粘液清除剂以通常为约0.2至20mM的浓度范围与鼻粘膜接触,与生物活性剂的施用相协同以降低鼻内粘液的极性粘度和/或弹性。

[0277] 其他粘液溶解或粘液清除剂可以选自一系列糖苷酶,其能够裂解粘液糖蛋白内的糖苷键。 α -淀粉酶和 β -淀粉酶是此类酶的代表,尽管它们的粘液溶解作用可能有限。相比之下,细菌糖苷酶允许这些微生物渗透其宿主的粘液层。

[0278] 对于与本公开中的腺病毒组合物的组合使用,非离子型洗涤剂通常也可用作粘液溶解或粘液清除剂。这些药剂通常不会改变或显著削弱腺病毒组合物的活性。

[0279] c) 施用

[0280] (i) 剂型

[0281] 组合物可以配制成各种剂型,并通过将递送治疗有效量的活性成分的多种不同的方式施用。此类组合物可以通过合适的途径(例如口服、肠胃外、肺部、局部、粘膜、皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外、眼部、颊和直肠)以根据需要含有常规无毒的药学上可接受的载体、佐剂和媒介物的剂量单位制剂施用。局部施用还可涉及使用透皮施用,比如透皮贴剂或离子电渗疗法装置。如本文所用的术语肠胃外包括皮下、静脉内、肌肉内、关节内或胸骨内注射或输注技术。药物的制剂在例如Gennaro, A.R., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. (第18版, 1995), 以及 Liberman, H.A. 和 Lachman, L. 编辑, Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker Inc., New York, N.Y. (1980) 中讨论。在特定实施方案中,组合物可以是食品补充剂,或者组合物可以是化妆品。

[0282] 对于肠外施用(包括皮下、眼内、皮内、静脉内、肌肉内、关节内和腹膜内),制剂可以是水性或基于油的溶液。水性溶液可包括无菌稀释剂,比如水、盐水溶液、药学上可接受的多元醇,比如甘油、丙二醇、或其他合成溶剂;抗菌剂和/或抗真菌剂,比如苯甲醇、对羟基苯甲酸甲酯、氯丁醇、苯酚、硫柳汞等;抗氧化剂,比如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,比如乙二胺四乙酸;缓冲剂,比如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;和/或用于调节张力的药剂,比如氯化钠、右旋糖或多元醇,比如甘露醇或山梨醇。水溶液的pH值可用酸或碱(比如盐酸或

氢氧化钠) 调节。基于油的溶液或混悬液可进一步包含芝麻油、花生油、橄榄油或矿物油。组合物可存在于单位剂量或多剂量容器中, 例如密封安瓿和小瓶, 并且可在冷冻干燥(冻干) 条件下储存, 只需在临使用前添加携带的无菌液体, 例如注射用水。可从无菌粉末、颗粒和片剂制备即用的注射溶液和混悬液。

[0283] 如果需要鼻腔或呼吸道(粘膜) 施用, 组合物可为形式, 并通过挤压式喷雾分配器、泵式分配器或气雾剂分配器分配。此类分配器也可用于将组合物递送至口或口腔(例如, 颊或舌) 粘膜、鼻腔。气雾剂通常通过碳氢化合物加压。泵式分配器可优选分配计量剂量或具有特定粒径的剂量。

[0284] 在某些实施方案中, 本文中公开的载体组合物与例如药学上可接受的缓冲剂、载体、赋形剂和/或佐剂一起共同配制在用于施用的单一组合物中, 例如混合, 并同时一起施用给受试者。在其他实施方案中, 载体和蛋白例如与药学上可接受的缓冲剂、载体、赋形剂和/或佐剂一起配制在单独的组合物中, 并在24小时内(比如在12小时、10小时、8小时、6小时、4小时、2小时内, 或在1小时或更短内) 以单独的组合物施用给受试者。

[0285] 通常, 施用安全和有效量的腺病毒组合物, 例如, 该量将在受试者中引起期望的治疗效果, 同时将不期望的副作用最小化。在各种实施例中, 本文所述的腺病毒组合物的有效量可以显著降低患有病毒感染的受试者的病毒感染性。在一些实施方案中, 有效量是能够治疗呼吸道病毒感染的量。在一些实施方案中, 有效量是能够治疗与呼吸道病毒感染相关的一种或多种症状的量。

[0286] 可与药学上可接受的载体组合以产生单一剂型的本文所述的组合物的量将根据所治疗的宿主和具体的施用模式而变化。本领域技术人员将理解, 每种剂型的单个剂量中所含的药剂的单位含量本身不必构成治疗有效量, 因为通过施用多个单个剂量可达到必要的治疗有效量。

[0287] 腺病毒载体的剂量将主要取决于比如所治疗的病况、患者的年龄、体重和健康状况之类的因素, 并且因此可因患者而异。例如, 病毒载体的治疗有效成人或兽医剂量通常在约100 μ L至约100mL的含有约 1×10^6 至约 1×10^{15} 个颗粒、约 1×10^7 至 1×10^{13} 个颗粒或约 1×10^9 至 1×10^{12} 个颗粒病毒的浓度的载体的范围内。剂量范围取决于动物的大小和施用途径。例如, 用于肌肉内注射的合适人或兽医剂量(对于约80kg的动物) 为对于单一部位, 每mL在约 1×10^9 至约 5×10^{12} 个颗粒的范围内。任选地, 可以递送多个施用位点。在另一个实例中, 对于口服制剂, 合适的人或兽医剂量可以在约 1×10^{11} 至约 1×10^{15} 颗粒的范围内。本领域技术人员可以根据施用途径以及重组载体所用于的治疗或疫苗应用来调整这些剂量。可以监测转基因的表达水平, 或者对于免疫原, 监测循环抗体的水平, 以确定剂量施用的频率。确定施用频率的时间安排的其他方法是本领域技术人员将容易显而易见的。

[0288] 任选的方法步骤涉及在施用病毒载体的同时、或之前或之后向患者共同施用合适量的短效免疫调节剂。所选择的免疫调节剂在本文中定义为能够抑制针对本发明的重组载体的中和抗体的形成或能够抑制载体的细胞溶解性T淋巴细胞(CTL) 消除的药剂。免疫调节剂可干扰T辅助亚群($T_H i$ 或 T^+) 与B细胞之间的相互作用以抑制中和抗体的形成。备选地, 免疫调节剂可以抑制 $T_H i$ 细胞与CTL之间的相互作用以减少载体的CTL消除的发生。多种有用的免疫调节剂及其使用剂量公开于例如Yang等人, J. Virol., 70(9) (1996年9月); 于1996年5月2日公开的国际专利申请公开号W0 96/12406; 以及国际专利申请号PCT/US96/03035中,

其所有均通过引用并入本文。

[0289] 对于任何具体受试者的具体治疗有效剂量水平将取决于多种因素,包括所治疗的病症和病症的严重程度;所采用的具体化合物的活性;所采用的具体组合物;受试者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;施用时间;施用途径;所采用的组合物的排泄率;治疗的持续时间;与所采用的具体化合物组合使用或同时使用的药物;以及医学领域中公知的类似因素(参见例如Koda-Kimble等人(2004) *Applied Therapeutics: The Clinical Use of Drugs*, Lippincott Williams&Wilkins, ISBN 0781748453; Winter (2003) *Basic Clinical Pharmacokinetics*, 第4版, Lippincott Williams&Wilkins, ISBN 0781741475; Sharqel (2004) *Applied Biopharmaceutics&Pharmacokinetics*, McGraw-Hill/Appleton& Lange, ISBN 0071375503)。例如,以低于实现所需治疗效果所需的那些的水平开始组合物的剂量,并逐渐增加剂量直至实现所需效果完全在本领域的技术内。如果需要,为了施用的目的,可以将有效每日剂量分成多个剂量。因此,单剂量组合物可以包含此类量或其约数以构成每日剂量。然而,应当理解,本公开的化合物和组合物的每日总用量将由主治医生在合理的医学判断范围内决定。

[0290] 病毒组合物的施用可以作为单一事件发生,或者在治疗的时间过程中发生。例如,可以每天、每周、每两周或每月施用一种或多种纳米颗粒组合物。对于急性病况的治疗,治疗的时间过程通常至少为几天。某些病况可以将治疗从几天延长到几周。例如,治疗可以延长超过一周、两周或三周。对于更慢性的病况,治疗可以从几周延长到几个月或甚至一年或更长。

[0291] 根据本文所述方法的治疗可以在呼吸道病毒的常规治疗方式之前、与其同时或之后进行。

[0292] 本公开涵盖包含如上文公开的化合物(以便促进施用并促进活性剂的稳定性)的药物组合物。例如,本公开的化合物可以与至少一种药学上可接受的载体或赋形剂混合,从而产生能够且有效施用(给予)给活受试者(比如合适的受试者(即“需要治疗的受试者”或“有需要的受试者”))的药物组合物。为了本发明的方面和实施方案的目的,受试者可以是人或任何其他动物。

[0293] III. 方法

[0294] 本公开涵盖了治疗、预防或降低有需要的受试者的病毒感染性或传播性的方法。在一些实施方案中,该方法通过防止病毒内化到受试者的细胞中或通过防止病毒基因组内化到受试者的细胞中来预防或降低病毒感染的感染性。在一些实施方案中,施用本文中提供的组合物(例如章节II中描述的那些)可以在受试者中产生免疫反应,所述免疫反应破坏或阻止病毒表面蛋白(例如,刺突蛋白或包膜蛋白)与宿主受体蛋白(例如,上皮血管紧张素转换酶(ACE))之间的相互作用。向处于病毒感染风险中的受试者施用本公开的组合物可以降低受试者的冠状病毒感染的风险。

[0295] 所公开的组合物可以施用于受试者以诱导受试者对相应冠状病毒刺突蛋白的免疫反应。在特定实例中,受试者是人。免疫反应可以是保护性免疫反应,例如抑制后续感染相应冠状病毒的反应。免疫反应的引发还可用于治疗或抑制与相应冠状病毒相关的感染和疾病。

[0296] 可以选择已发展与免疫原中的S蛋白相对应的冠状病毒感染或处于发展其的风险

中(例如由于暴露于冠状病毒或可能暴露于冠状病毒)的受试者进行治疗。在施用所公开的免疫原后,可针对感染或与冠状病毒相关的症状或二者对受试者进行监测。

[0297] 预期用本公开的治疗剂和方法治疗的典型受试者包括人以及非人灵长类动物和其他动物。为了鉴定根据本公开的方法的预防或治疗的受试者,采用公认的筛选方法来确定与目标疾病或病况或疑似疾病或病况相关的风险因素,或确定受试者中现有疾病或病况的状态。这些筛选方法包括,例如,确定可能与目标疾病或病况或疑似疾病或病症相关的环境、家庭、职业和其他此类风险因素的常规检查,以及检测和/或表征冠状病毒感染的诊断方法,比如各种ELISA和其他免疫测定方法。这些和其他常规方法允许临床医生选择需要使用本公开的方法和药物组合物的疗法的患者。根据这些方法和原理,可以根据本文的教导或其他常规方法,作为独立的预防或治疗方案,或作为其他治疗的后续、辅助或协同治疗方案施用组合物。

[0298] 所公开的组合物的施用可以用于预防或治疗目的。当预防性地提供时,所公开的治疗剂在任何症状之前(例如在感染之前)提供。所公开的治疗剂的预防性施用用来预防或改善任何后续感染。当治疗性地提供时,所公开的治疗剂在疾病或感染的症状发作时或之后(例如在与组合物中的S蛋白相对应的冠状病毒感染的症状发展之后),或在诊断出冠状病毒感染之后提供。因此,可以在预期的冠状病毒暴露之前(以减轻感染和/或相关疾病症状的预期严重程度、持续时间或程度)、在暴露或怀疑暴露于病毒之后或在实际开始感染之后提供治疗剂。

[0299] 本文所述的组合物以有效诱导或增强受试者(优选人)对冠状病毒S蛋白的免疫反应的量提供给受试者。所公开的组合物的实际剂量将根据比如受试者的疾病指征和具体状态(例如,受试者的年龄、尺寸、健康状况、症状程度、易感因素等)、施用时间和途径、同时施用的其他药物或治疗,以及用于在受试者中引发所需活性或生物反应的组合物的具体药理学之类的因素而变化。可以调整剂量方案以提供最佳预防或治疗反应。

[0300] 根据本公开的组合物可用于协同疫苗接种方案或组合制剂中。在某些实施方案中,组合物和协同免疫方案采用单独的转基因或制剂,其各自旨在引发抗病毒免疫反应,比如对冠状病毒S蛋白的免疫反应。引发抗病毒免疫反应的单独免疫原性组合物可以组合成在单个免疫步骤中施用于受试者的多价免疫原性组合物,或者它们可以在协同(或初免-加强)免疫方案中单独施用(在单价免疫原性组合物中)。

[0301] 可以有若干次加强,且每次加强可以是不同的所公开的转基因。在一些实例中,加强可以是与另一次加强或初免相同的转基因。初免和加强可以作为单剂量或多剂量施用,例如可以在几天、几周或几个月内向受试者施用两剂、三剂、四剂、五剂、六剂或更多。也可以给予多次加强,比如一至五次(例如,1、2、3、4或5次加强)或更多次。可以在一系列连续免疫中使用不同的剂量。例如,在初次免疫中相对较大的剂量,并然后用相对较小的剂量加强。

[0302] 在一些实施方案中,加强可以在初免后约两周、约三至八周或约四周,或在初免后约几个月施用。在一些实施方案中,加强可以在初免后约5个月、约6个月、约7个月、约8个月、约10个月、约12个月、约18个月、约24个月,或在初免后或多或少的时间内施用。还可以在适当的时间点使用定期的另外的加强以增强受试者的“免疫记忆”。可以通过从受试者取血清的等分试样并在免疫程序过程期间测定抗体滴度来确定所选疫苗接种参数(例如制剂、

剂量、方案等)的充分性。此外,可针对所需的效果,例如感染的预防或疾病状态的改善(例如病毒载量的减少)监测受试者的临床状况。如果这种监测指示疫苗接种是次佳的,则受试者可用另外剂量的免疫原性组合物进行加强,并且可以以预期增强免疫反应的方式修改疫苗接种参数。

[0303] 在一些实施方案中,本公开的组合物以单剂量施用。

[0304] 施用本公开的所公开的组合物后,受试者的免疫系统通常会通过产生对该组合物中所含的冠状病毒S蛋白具有特异性的抗体而对该组合物作出反应。这种反应表明向受试者递送了免疫有效剂量。

[0305] 在一些实施方案中,将在评估有效剂量/免疫方案的背景下确定受试者的抗体反应。在大多数情况下,评估从受试者获得的血清或血浆中的抗体滴度将是足够的。是否施用加强接种和/或改变向个体施用的治疗剂的量的决定可以至少部分地基于抗体滴度水平。抗体滴度水平可以基于例如免疫结合测定,所述测定测量血清中与抗原(包括例如免疫原中包含的重组冠状病毒S蛋白)结合的抗体的浓度。

[0306] 冠状病毒感染不需要被完全消除或减少或预防才使方法有效。例如,与不存在该组合物的情况下的冠状病毒感染相比,用一种或多种所公开的组合物引发对冠状病毒的免疫反应可以减少或抑制冠状病毒感染所需的量,例如至少10%、至少20%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或甚至至少100%(可检测的感染细胞的消除或预防)。在其他实例中,可以通过所公开的方法减少或抑制冠状病毒复制。冠状病毒复制不需要被完全消除才使方法有效。例如,与不存在免疫反应的情况下的冠状病毒复制相比,使用一种或多种所公开的组合物引发的免疫反应可以将相应冠状病毒的复制减少所需的量,例如至少10%、至少20%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或甚至至少100%(可检测的冠状病毒复制的消除或预防)。

[0307] 在一些实施方案中,所公开的组合物与佐剂的施用同时施用于受试者。本领域已知佐剂进一步增加对所应用的抗原决定簇的免疫反应,并且包含腺病毒和合适佐剂的药物组合物例如在WO 2007/110409(其通过引用并入本文)中公开。本文中提供了合适佐剂的实例。

[0308] 在一些实施方案中,向受试者施用治疗有效量的一种或多种所公开的组合物在受试者中诱导中和免疫反应。为了评估中和活性,在免疫受试者后,可以在适当的时间点从受试者收集血清,冷冻并储存用于进行中和测试。测定中和活性的方法为本领域普通技术人员已知的,并且在本文中进一步描述,且包括但不限于噬斑减少中和(PRNT)测定、微量中和测定、基于流式细胞术的测定、单循环感染测定。在一些实施方案中,可以使用一组冠状病毒假病毒测定血清中和活性。例如,为了测试疫苗候选物对多种MERS-CoV毒株的免疫原性(在无需生物安全3级设施的情况下),先前开发了一种假型报告病毒中和测定(Wand等人, Nat Commun, 6: 7712, 2015),其类似于先前针对SARS-CoV开发的测定(Martin等人, Vaccine 26, 6338, 2008; Yang等人, Nature 428, 561, 2004; Naldini等人, PNAS 93, 11382, 1996; Yang等人, PNAS 102, 797, 2005)。

[0309] 在其他实施方案中,本公开提供了治疗、预防或降低呼吸道病毒感染的感染性的方法。在一些实施方案中,病毒感染可以是冠状病毒感染。冠状病毒可以是SARS-CoV、SARS-CoV-2、MERS-CoV、HKU1、OC43或229E。冠状病毒可以是 β 冠状病毒。处于冠状病毒感染风险中

的受试者可能会与冠状病毒感染的无症状携带者接触,从而无意中感染冠状病毒感染。

[0310] 本公开的某些方法涵盖了制造本文所述的腺病毒的方法。此类方法可以包括用本文所述的腺病毒载体转染细胞;在使得细胞产生重组腺病毒条件下培养细胞;以及收集重组腺病毒。合适的细胞是本领域已知的。在一些实施方案中,细胞可以是HEK、Vero或PER细胞。

[0311] 本公开还涵盖用第一受试者的血清治疗第二受试者的方法。具体而言,本公开涵盖包含先前施用本文详述的腺病毒载体的第一受试者的血清、本文详述的药物组合物或本文详述的免疫原性组合物的组合物。收集此类血清的方法是本领域已知的。用第一受试者的血清治疗第二受试者的方法通常包括向第二受试者施用免疫原性有效量的包含来自第一受试者的血清的组合物。向受试者施用血清的方法是已知的,并且确定血清的剂量在本领域技术人员的能力之内。

[0312] 通常,如本文所述的方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开的纳米颗粒组合物。本文所述的方法通常对有需要的受试者进行。受试者可以是啮齿动物、人、家畜动物、伴侣动物或动物学动物。在一个实施方案中,受试者可以是啮齿动物,例如小鼠、大鼠、豚鼠等。在另一个实施方案中,受试者可以是家畜动物。合适的家畜动物的非限制性实例可以包括猪、牛、马、山羊、绵羊、美洲驼和羊驼。在另一个实施方案中,受试者可以是伴侣动物。伴侣动物的非限制性实例可以包括宠物,比如狗、猫、兔和鸟。在另一个实施方案中,受试者可以是动物学动物。如本文所用,“动物学动物”是指可以在动物园中找到的动物。此类动物可以包括非人类灵长类动物、大型猫科动物、狼和熊。在优选实施方案中,受试者是人。

[0313] IV. 试剂盒

[0314] 还提供了试剂盒。此类试剂盒可以包括本文所述的药剂或组合物,并且在某些实施方案中,包括施用说明。组分可以包括但不限于以下中的一种或多种:(i) 如本文所述的宿主细胞、如本文所述的包装细胞、如本文所述的腺病毒载体、如本文所述的药物组合物或如本文所述的免疫原性组合物,以及(ii) 使用说明。在一些实施方案中,本公开的试剂盒可以包括如上文章节II中详述的组合物。此类试剂盒可以促进本文所述的方法的实施。当以试剂盒形式提供时,组合物的不同组分可以包装在单独的容器中并在临使用前混合。如果需要,可以将组分的此类单独包装呈现在包装或分配器装置中,所述包装或分配器装置可包含一个或多个含有组合物的单位剂型。例如,包装可以包括金属或塑料箔,比如泡罩包装。在某些情况下,组分的此类单独包装还可以允许长期储存而不会失去组分的活性。

[0315] 试剂盒还可包括待添加到单独包装的冻干活性组分中的在单独容器中的试剂(例如无菌水或盐水)。例如,密封的玻璃安瓿可包含冻干组分,并且在单独的安瓿瓶中包含无菌水、无菌盐水或无菌,其各自在中性非反应气体(比如氮气)下包装。安瓿可由任何合适的材料组成,比如玻璃、有机聚合物(比如聚碳酸酯、聚苯乙烯)、陶瓷、金属或通常用于容纳试剂的任何其他材料。合适容器的其他实例包括可由与安瓿类似的物质制成的瓶,以及可由箔衬里的内部(比如铝或合金)组成的囊膜。其他容器包括试管、小瓶、烧瓶、瓶、注射器等。容器可具有无菌进入孔,比如具有可被皮下注射针刺穿的塞子的瓶。其他容器可具有由可容易移除的膜隔开的两个隔室,所述膜在移除后允许组分混合。可移除的膜可以是玻璃、塑料、橡胶等。

[0316] 在某些实施方案中,试剂盒可以提供说明材料。说明可以打印在纸上或其他基材

上,和/或可以作为电子可读介质(比例如软盘、迷你CD-ROM、CD-ROM、DVD-ROM、Zip盘、录像带、录音带等)提供。详细说明可以不与试剂盒物理关联;相反,用户可被引导到试剂盒制造商或经销商指定的互联网网站。

[0317] 利用分子生物学方案的本文所述的组合物和方法可以根据本领域已知的多种标准技术(参见例如Sambrook和Russel(2006)Condensed Protocols from Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,ISBN-10:0879697717;Ausubel等人(2002)Short Protocols in Molecular Biology,第5版,Current Protocols,ISBN-10:0471250929;Sambrook和Russel(2001)Molecular Cloning:ALaboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,ISBN-10:0879695773;Elhai,J.和Wolk,C.P.1988.Methods in Enzymology167,747-754;Studier(2005)Protein Expr Purif.41(1),207-234;Gellissen编辑(2005)Production of Recombinant Proteins:Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems,Wiley-VCH,ISBN-10:3527310363;Baneyx(2004)Protein Expression Technologies,Taylor&Francis,ISBN-10:0954523253)。

[0318] 本文中公开的特定实施方案可在权利要求书中使用“由……组成”或“基本上由……组成”语言而非“包括”进一步限制。当在权利要求书中使用时,无论是提交的还是根据修改添加的,过渡术语“由……组成”排除了权利要求书中未指定的任何要素、步骤或成分。过渡术语“基本上由……组成”将权利要求书的范围限制在指定的材料或步骤以及不会实质性影响基本和新颖特征的那些。所要求保护的本发明的实施方案在本文中固有或明确地描述和实现。

[0319] 由于可以对上述材料和方法进行各种改变而不脱离本发明的范围,因此上述描述和以下给出的实施例中包含的所有内容应被解释为说明性的,而不是限制性的。

[0320] 实施例

[0321] 包括以下实施例以说明本公开的各种实施方案。本领域技术人员应当理解,以下实施例中公开的技术代表本发明人发现的在实施本发明中起良好作用的技术,并因此可以认为构成了用于其实践的优选模式。然而,根据本公开内容,本领域技术人员应当理解,可以对所公开的具体实施方案进行许多改变,并且仍然获得相像或相似的结果,而不会脱离本发明的精神和范围。

[0322] 实施例1:在表达人ACE2受体的小鼠中单剂量黑猩猩腺病毒载体疫苗保护免受SARS-CoV-2感染和肺炎

[0323] 本实施例提供了一种基于黑猩猩Ad(猿猴AdV-36)的SARS-CoV-2疫苗(ChAd-SARS-CoV-2-S),其编码在S2亚基中引入两个脯氨酸取代后的融合前稳定的刺突(S)蛋白。ChAd-SARS-CoV-2-S的肌肉内施用诱导针对S蛋白的强健全身性体液和细胞介导的免疫反应。在瞬时表达人ACE2(hACE2)受体的小鼠的SARS-CoV-2激发后,一个或两个疫苗剂量保护免受肺部感染、炎症和病理。尽管在血清中诱导了高水平的中和抗体,但两种给药方案都不能完全保护免受SARS-CoV-2感染,因为在肺部仍然检测到相当高的病毒RNA水平。相比之下,当通过鼻内途径施用单剂量ChAd-SARS-CoV-2-S时,检测到高水平的中和抗体和抗SARS-CoV-2IgA,以及在上呼吸道和下呼吸道二者中的针对感染的完全保护。此外,并且与对照ChAd疫苗相比,在SARS-CoV-2激发后8天,经由鼻内递送用ChAd-SARS-CoV-2-S免疫的动物中没有

对SARS-CoV-2NP蛋白的血清抗体反应。因此,ChAd-SARS-CoV-2-S有可能在接种部位赋予消除性免疫,这预防了病毒诱导的疾病和传播二者。

[0324] 结果

[0325] 黑猩猩Ad载体疫苗诱导针对抗SARS-CoV-2的强健抗体反应:构建了两个基于猿猴Ad-36病毒的复制缺陷型ChAd载体。ChAd-SARS-CoV-2-S载体以转基因形式编码SARS-CoV-2S蛋白的全长序列,包括胞外结构域、跨膜结构域和胞质结构域(GenBank:QJQ84760.1),并且通过在残基K986和V987处的两个脯氨酸取代使其稳定在融合前形式。ChAd对照没有转基因。S蛋白转基因由巨细胞病毒启动子在转录上进行控制。为了使载体复制缺陷并增强包装能力,分别替换了E1A/B基因并在E3B基因中引入缺失(图1A)。为了证实S蛋白得到表达且抗原性完整,转导了293T细胞并通过流式细胞术证实了一组22种中和单克隆抗体对S蛋白的结合(图1B)。

[0326] 为了评估ChAd-SARS-CoV-2-S的免疫原性,用 10^{10} 个病毒颗粒的ChAd-SARS-CoV-2-S或ChAd-对照通过肌肉内接种免疫4周龄BALB/c小鼠组。一些小鼠在四周后接受加强剂量。在初免或加强免疫后21天收集血清样本(图1C),并通过ELISA评估针对纯化的S和RBD蛋白的IgG反应。尽管ChAd-SARS-CoV-2-S诱导了高水平的S特异性和RBD特异性IgG,但在ChAd-对照免疫的小鼠中检测到的水平较低(如果有的话)(图1D和图2A)。使用灶斑减少中和试验(FRNT)体外测定血清样本对感染性SARS-CoV-2的中和。如预期的,来自ChAd对照免疫小鼠的血清在初次免疫或加强后不抑制SARS-CoV-2感染。相比之下,来自ChAd-SARS-CoV-2-S疫苗接种动物的血清强烈中和了SARS-CoV-2感染,且加强增强了这种抑制活性(图1E和图2B-2C)。

[0327] 疫苗诱导的记忆性CD8⁺T细胞和抗原特异性B细胞反应:由于最佳疫苗免疫通常包含体液和细胞反应二者,因此测量了接种疫苗后SARS-CoV-2特异性CD4⁺和CD8⁺T细胞的水平。用ChAd-SARS-CoV-2-S或ChAd-对照免疫四周龄BALB/c小鼠,并在三周后加强。为了评估疫苗诱导的SARS-CoV-2特异性CD4⁺和CD8⁺T细胞反应,在加强免疫后一周收获脾细胞,并用253个重叠的15聚体S肽池进行离体刺激。随后,通过流式细胞术确定细胞内IFN γ 和颗粒酶B表达的定量。在离体肽再刺激后,用ChAd-SARS-CoV-2-S免疫的小鼠中,脾CD8⁺T细胞表达IFN γ ,且脾脏CD4⁺和CD8⁺T细胞二者均表达颗粒酶B,但在用ChAd-对照载体免疫的小鼠中则不这样(图1F-1G和图3)。为了评估抗原特异性B细胞反应,收获脾细胞并用S蛋白进行ELISPOT分析。ChAd-SARS-CoV-2-S疫苗在脾中诱导S蛋白特异性IgG抗体分泌细胞,而对照疫苗则不诱导(图1H)。

[0328] 用ChAd-SARS-CoV-2-S疫苗肌肉内免疫保护免受肺部的SARS-CoV-2感染:测试了在鼻内递送载体化人Ad(Hu-Ad5-hACE2)后,最近开发的SARS-CoV-2感染模型(其中BALB/c小鼠在肺中表达hACE2)中ChAd疫苗的保护活性。内源性小鼠ACE2不支持病毒进入,并且该系统使得能够在小鼠肺部引起SARS-CoV-2感染。首先用ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S疫苗经由肌肉内途径免疫四周龄BALB/c小鼠。大约三十天后,分别经由鼻内和腹膜内途径给小鼠施用 10^8 噬斑形成单位(PFU)的Hu-Ad5-hACE2和抗Ifnar1单克隆抗体(mAb)。还施用单剂量的抗Ifnar1 mAb以增强该模型中的肺部发病机制。证实了ChAd和Hu-Ad5载体之间不存在交叉免疫。来自ChAd免疫小鼠的血清不中和Hu-Ad5感染(图4A-4B)。

[0329] 在Hu-Ad5-hACE2转导后五天,用 4×10^5 个病灶形成单位(FFU)的SARS-CoV-2经由

鼻内途径激发小鼠(图2A)。在感染后4天(dpi)(该模型中的病毒负荷的峰值),将小鼠安乐死,并收获肺、脾和心脏用于病毒负荷和细胞因子分析。值得注意的是,如通过噬斑测定确定的,在用ChAd-SARS-CoV-2-S免疫的小鼠的肺中没有可检测到的感染性病毒,而在用ChAd-对照进行疫苗接种的小鼠中存在高水平(图5B)。与该结果一致,与接受ChAd-对照载体小鼠相比,在ChAd-SARS-CoV-2-S疫苗接种动物的肺、心脏和脾中观察到降低的病毒RNA水平(图5C)。对在4dpi时收获的肺中的病毒RNA的原位杂交染色揭示了与ChAd对照相比,用ChAd-SARS-CoV-2-S免疫的动物的肺泡细胞中SARS-CoV-2RNA显著减少(图5D)。在8dpi时将免疫动物亚组安乐死,并收获组织用于评估。此时,与对照ChAd载体相比,ChAd-SARS-CoV-2-S免疫小鼠的肺和脾中的病毒RNA水平再次较低或没有(图5C)。总之,这些数据指示,用ChAd-SARS-CoV-2-S单次肌肉内免疫导致受激发小鼠的肺中SARS-CoV-2感染的明显减少但未消除。

[0330] 接下来,评估了疫苗对肺部炎症和疾病的影响。与ChAd对照相比,用ChAd-SARS-CoV-2-S免疫的动物的肺组织中几种促炎细胞因子和趋化因子mRNA水平较低,包括CXCL10、IL1 β 、IL-6、CCL5、IFN β 和IFN γ (图5E)。此外,用ChAd对照疫苗免疫并用SARS-CoV-2激发的小鼠显示出病毒性肺炎的证据,其特征是免疫细胞在血管周围和肺泡位置积聚、血管充血和间质水肿。相比之下,用ChAd-SARS-CoV-2-S免疫的动物显示出肺中炎症反应的明显减弱,这种炎症反应在ChAd对照免疫的小鼠中发展(图6)。因此,用Ch-Ad-SARS-CoV-2免疫减少病毒感染和与SARS-CoV-2感染相关的随之而来的肺部炎症和损伤。

[0331] 然后评估使用初免-加强疫苗方案的改善的保护。用ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由肌肉内途径免疫BALB/c小鼠,并在四周后接受同源加强剂量。在加强后第29天,用单剂量的抗Ifnar1抗体治疗小鼠,然后是Hu-Ad5-hACE2,并然后在五天后用SARS-CoV-2激发。如预期的,初免-加强方案保护免受SARS-CoV-2激发,在肺中未检测到感染性病毒(图5F)。尽管在4dpi时检测到肺、脾和心脏中病毒RNA的明显减少,但仍然存在残留的病毒RNA水平,表明即使在加强后保护也不完全(图5G)。

[0332] 用ChAd-SARS-CoV-2-S单次鼻内免疫诱导对SARS-CoV-2的消除性免疫:通过鼻咽途径进行粘膜免疫可引发包括分泌性IgA抗体的局部免疫反应,其在呼吸道病原体接种部位处或附近赋予保护。为了评估粘膜疫苗接种的免疫原性和保护效力,用 10^{10} 个病毒颗粒的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由鼻内途径接种五周龄BALB/c小鼠(图7A)。免疫后四周收集血清样本以评估体液免疫反应。ChAd-SARS-CoV-2-S而非ChAd-对照的鼻内免疫诱导血清中高水平的S特异性和RBD特异性IgG和IgA(图7B-7C)以及SARS-CoV-2中和抗体(几何平均滴度为1/1,574)(图7D和图8A)。来自用ChAd-SARS-CoV-2-S免疫的小鼠的血清抗体等效地中和编码S蛋白中D614G突变的重组、表达荧光素酶的SARS-CoV-2变体(图8B);这一发现很重要,因为许多循环病毒含有这种取代,其与细胞培养中更高的感染性有关(doi.org/10.1101/2020.06.12.148726)。还评估了免疫小鼠的支气管肺泡灌洗(BAL)液中的SARS-CoV-2特异性抗体反应。来自ChAd-SARS-CoV-2-S而非ChAd-对照疫苗接种小鼠的BAL液显示出高水平的S特异性和RBD特异性IgG和IgA抗体(图7E-7F),包括具有中和活性的那些(图7G和图8C)。

[0333] 为了评估经由粘膜免疫激活的T细胞反应,用ChAd-SARS-CoV-2-S或ChAd-对照经由鼻内途径对小鼠进行疫苗接种,并在四周后进行类似加强。加强后一周收获肺,并通过流

式细胞术分析T细胞。用S肽池进行离体再刺激导致接受ChAd-SARS-CoV-2-S疫苗的小鼠肺中产生IFN γ 和颗粒酶B的CD8⁺T细胞的明显增加(图7H)。具体而言,在肺中鉴定了分泌IFN γ 的抗原特异性CD103⁺CD69⁺CD8⁺T细胞群体(图7I),其在表型上与疫苗诱导的驻留记忆T细胞一致。在脾中,在用ChAd-SARS-CoV-2-S鼻内免疫后检测到分泌抗体的浆细胞产生针对S蛋白的IgA或IgG(图7J)。值得注意的是,观察到的分泌抗SIgA的B细胞的频率是IgG的约5倍。

[0334] 评估了单剂量鼻内免疫后ChAd疫苗的保护效力。接种疫苗后第30天,如上所述向小鼠施用 10^8 PFU的Hu-Ad5-hACE2和抗Ifnar1mAb。五天后,用 4×10^5 FFU的SARS-CoV-2激发小鼠。在4和8dpi时,收获肺、脾、心脏、鼻甲和鼻冲洗液并评估病毒负荷。如通过肺中没有感染性病毒(图9A)以及肺、脾、心脏、鼻甲或鼻冲洗液中几乎没有可测量的病毒RNA(图9B)判断的,鼻内递送ChAd-SARS-CoV-2-S疫苗表现出明显的保护效力。4dpi时肺和鼻甲中极低的病毒RNA水平可能反映了输入的非复制病毒,因为此时在缺少hACE2受体表达的C57BL/6小鼠中测量到相似的水平。用ChAd-SARS-CoV-2-S免疫的小鼠的肺匀浆中细胞因子和趋化因子mRNA水平也显著低于ChAd对照疫苗(图9C),残留表达可能是由于人Ad载体hACE2递送系统所致。最后,对来自用ChAd-SARS-CoV-2-S通过鼻内途径进行疫苗接种并用SARS-CoV-2激发的动物的肺组织进行的组织病理学分析显示,与ChAd对照疫苗接种动物中观察到的广泛炎症相比,8dpi时血管周围和肺泡浸润极少(如果有的话)(图9D)。

[0335] 为了确定鼻内递送ChAd-SARS-CoV-2-S是否实现了消除性免疫,在8dpi时测量了抗NP抗体,并将其与来自SARS-CoV-2感染前5天的反应进行了比较。由于疫苗载体中不存在NP基因,因此SARS-CoV-2暴露后针对NP的体液免疫反应的诱导表明存在病毒蛋白翻译和主动感染。在SARS-CoV-2激发后,在通过鼻内途径接种疫苗的ChAd对照小鼠或通过肌肉内途径接种疫苗的ChAd对照和ChAd-SARS-CoV-2-S小鼠中检测到抗NP抗体反应(图9E和图2D)。值得注意的是,没有一只用ChAd-SARS-CoV-2-S经由鼻内途径免疫的小鼠在SARS-CoV-2感染后显示出抗NP抗体反应的显著增加。结合我们的病毒学分析,这些数据表明,ChAd-SARS-CoV-2-S的单次鼻内免疫诱导强健且可能是消除性的粘膜免疫,其预防了表达hACE2受体小鼠的上呼吸道和下呼吸道中的SARS-CoV-2感染。

[0336] 讨论

[0337] 在本实施例中,评估了作为SARS-CoV-2的疫苗平台的复制缺陷型ChAd载体的肌肉内和鼻内施用。基于稳定S蛋白的疫苗经由肌肉内途径的单剂量免疫诱导S特异性和RBD特异性结合以及中和抗体。如通过肺中没有感染性病毒,以及肺和其他器官中病毒RNA水平的显著降低证明的,用一个或两个剂量进行疫苗接种保护表达hACE2的小鼠免受SARS-CoV-2激发。与对照ChAd疫苗相比,用ChAd-SARS-CoV-2-S免疫的小鼠也显示出肺部病理、肺部炎症和肺炎迹象明显减少(甚至消失)。然而,如通过几个组织(包括肺)中可检测到的病毒RNA水平和抗NP抗体反应的诱导证明的,ChAd-SARS-CoV-2-S的肌肉内疫苗接种并不赋予消除性免疫。用单剂量的ChAd-SARS-CoV-2-S经由鼻内途径免疫的小鼠也保护免受SARS-CoV-2激发。然而,鼻内疫苗接种产生强健的IgA和中和抗体反应,其保护上呼吸道和下呼吸道二者免受SARS-CoV-2感染,并抑制野生型和D614G变体病毒二者的感染。上气道组织中极低的病毒RNA以及在激发的背景下对NP没有血清学反应强烈表明大多数接受单次鼻内剂量的ChAd-SARS-CoV-2-S的动物获得了消除性免疫。

[0338] 尽管在为了控制大流行的加快努力中,几种疫苗候选物(例如脂质包封的mRNA、DNA、灭活和病毒载体化)迅速推进至人体临床试验,但很少有研究证明其在临床前模型中的效力。用两个或三个剂量的编码全长SARS-CoV-2S蛋白的DNA质粒疫苗免疫的恒河猴在血清中诱导了中和抗体,并降低了BAL和鼻粘膜液中的病毒负荷。此外,两周内用纯化的灭活SARS-CoV-2进行三次免疫诱导中和抗体,并且根据施用的剂量为恒河猴提供部分或完全的针对感染和病毒性肺炎的保护。这些激发模型的一个局限性是,与一些人类和其他非人灵长类动物物种相比,恒河猴在SARS-CoV-2感染后发展轻度间质性肺炎。本实施例在表达hACE2的小鼠中显示,单次肌肉内或鼻内剂量的ChAd-SARS-CoV-2-S疫苗赋予显著且可能完全的针对病毒复制、炎症和肺部疾病的保护。

[0339] 本公开支持使用非人Ad载体疫苗对抗新兴RNA病毒(包括SARS-CoV-2)。先前的工作显示了在几种小鼠激发模型(包括在妊娠的背景下)中编码寨卡病毒(ZIKV)的prM-E基因的大猩猩Ad的单剂量或两剂量方案的效力。其他人评估了對抗ZIKV的ChAd或恒河猴Ad疫苗候选物,并在小鼠和非人灵长类动物中显示出效力。编码野生型SARS-CoV-2S蛋白(ChAd0x1)的一种不同的ChAd目前正在人体中进行临床试验(NCT04324606)。尽管尚未报道来自人体试验的数据,但对恒河猴的研究表明,单次肌肉内剂量保护免受肺而非上呼吸道中的感染(biorxiv.org/content/10.1101/2020.05.13.093195v1)。在任何临床前或临床研究中,没有针对SARS-CoV-2评估的疫苗显示出免疫增强的证据,根据对其他人和动物冠状病毒的研究,这是一种理论上的风险。事实上,并且与SARS-CoV疫苗或抗体的数据形成对比,在用编码SARS-CoV-2S蛋白的ChAd免疫或施用被动转移的单克隆抗体的动物中未观察到增强的感染、免疫病理学或疾病。

[0340] ChAd-SARS-CoV-2-S在离体S肽再刺激后诱导了SARS-CoV-2特异性CD8⁺T细胞反应,其包括高百分比和数量的表达IFN γ 和颗粒酶的细胞。由ChAd-SARS-CoV-2-S疫苗诱导强健的CD8⁺T细胞反应与其他猿猴Ad载体的报告一致。ChAd疫苗载体不仅克服了预先存在的针对人腺病毒的免疫的问题,而且由于它们不会诱导耗尽的T细胞反应而具有免疫学优势。

[0341] 单次鼻内剂量的ChAd-SARS-CoV-2-S赋予针对SARS-CoV-2激发的优异免疫,比相同疫苗和剂量的一次或两次肌肉内免疫更优。鉴于血清中和抗体反应是相当的,推测鼻内递送后观察到的更大保护是由于产生的粘膜免疫反应。事实上,在血清和肺中检测到高水平的抗SARS-CoV-2IgA,以及在脾中检测到分泌IgA的B细胞。此外,鼻内疫苗接种还在肺中诱导SARS-CoV-2特异性CD8⁺T细胞,包括CD103⁺CD69⁺细胞,其可能具有驻留记忆表型。据我们所知,目前正在临床试验中的SARS-CoV-2疫苗平台均未使用鼻内递送方式。人们对将鼻内递送用于甲型流感病毒疫苗非常感兴趣,因为它们能够引发局部体液和细胞免疫反应。事实上,对甲型流感病毒再次感染的消除性免疫需要肺中的局部适应性免疫反应,其最好通过鼻内接种而非肌肉内接种来诱导。当存在对经由鼻内途径施用减毒活病毒疫苗的担忧时,基于亚单位或复制缺陷型载体疫苗有望以更安全的方式产生粘膜免疫,尤其是考虑到制剂方面的进步。

[0342] 总之,本实施例确立了用ChAd-SARS-CoV-2-S进行免疫诱导中和抗体和抗原特异性CD8⁺T细胞反应二者。虽然ChAd-SARS-CoV-2-S的单次肌肉内免疫赋予针对肺中SARS-CoV-2感染和炎症的保护,但鼻内递送ChAd-SARS-CoV-2-S诱导粘膜免疫,提供更优异的保

护,并可能促进消除性免疫,至少在瞬时表达hACE2受体的小鼠中是如此。因此,本实施例支持将鼻内递送ChAd-SARS-CoV-2-S作为控制SARS-CoV-2感染、疾病和传播的平台。

[0343] 方法

[0344] 病毒和细胞:将Vero E6 (CRL-1586,美国典型培养物保藏中心(ATCC),Vero CCL81 (ATCC)和HEK293细胞在37℃下在补充有10%胎牛血清(FBS)、10mM HEPES pH 7.3、1mM丙酮酸钠、1×非必需氨基酸和100U/ml青霉素-链霉素的杜氏改良Eagle培养基(DMEM)中培养。

[0345] SARS-CoV-2毒株2019n-CoV/USA_WA1/2020获自美国疾病控制和预防中心(来自Natalie Thornburg的馈赠)。将病毒在Vero CCL81细胞中传代一次,并通过在Vero E6细胞上的病灶形成测定(FFA)进行滴定。表达重组荧光素酶的全长SARS-CoV-2报告病毒(2019n-CoV/USA_WA1/2020毒株)先前已有报道(Zost等人,2020年),以及D614G变体将在其他地方描述。所有感染性SARS-CoV-2的工作均在美国机构生物安全委员会批准的BSL3和A-BSL3设施中使用适当的正压空气呼吸器和防护设备进行。

[0346] 小鼠实验:动物研究按照美国国立卫生研究院的《实验动物护理和使用指南》中的建议进行。方案经华盛顿大学医学院的机构动物护理和使用委员会批准(保证号A3381-01)。病毒接种是在用盐酸氯胺酮和赛拉嗪诱导和维持的麻醉下进行的,并尽一切努力将动物的痛苦降到最低。

[0347] 雌性BALB/c小鼠购自The Jackson Laboratory(目录000651)。用50μl PBS中的 10^{10} 个病毒颗粒(vp)的ChAdV-空或ChAd-SARS-CoV-2-S经由后肢的肌肉内注射或经由鼻内接种免疫四至五周龄的动物。免疫动物的亚组在初次免疫后四周,使用与用于初次免疫相同的途径进行加强。在鼻内施用 10^8 PFU的Hu-AdV5-hACE2前一天,向接种疫苗的小鼠(10至11周龄)给予2mg抗Ifnar1 mAb(MAR1-5A3,Leinco)的单次腹膜内注射。Hu-AdV5转导后五天,用 4×10^5 FFU的SARS-CoV-2通过鼻内途径接种小鼠。在4或8dpi时将动物安乐死,并收获组织用于病毒学、免疫学和病理学分析。

[0348] 黑猩猩腺病毒载体的构建:猿猴Ad36载体(ChAd)获自宾夕法尼亚大学的宾夕法尼亚载体中心。ChAd基因组通过E1和E3B区域(GenBank:FJ025917.1;核苷酸分别为455-3026和30072-31869)中的缺失进行工程化。在互补DNA链上以逆时针方向并入修饰的人巨细胞病毒主要立即早期启动子序列代替E1基因。CMV修饰包括在TATA盒和mRNA起始(GenBank:MN920393,核苷酸174211-174212)之间串联插入的两拷贝的tet操纵子2(TetO2)序列(5'-TCT CTA TCA CTG ATA GGG AGA TCT CTA TCA CTG ATA GG GA-3')(SEQ ID NO:7)。将SARS-CoV-2S(编码在残基K986和V987处具有两个脯氨酸取代(其使S的融合前形式稳定)的融合前稳定突变体)克隆到pSAd36基因组质粒中CMV-tetO2启动子控制下的独特PmeI位点以产生pSAd36-S。类似地,类似地克隆了如SEQ ID NO:10、11、20、21中所公开的突变体SAR-CoV-2S蛋白。同时,还产生了携带不具有转基因的空CMV-tetO2盒的pSAd36-对照。用PacI限制酶将pSAd36-S和pSAd-对照质粒线性化,以释放病毒基因组,用于转染到T-Rex 293-HEK细胞(Invitrogen)中。将挽救的复制缺陷型ChAd-SARS-CoV-2-S和ChAd-对照载体在293细胞中放大,并通过CsCl密度梯度超速离心纯化。通过分光光度法在260nm处测定每种载体制剂中的病毒颗粒浓度。

[0349] 表达人ACE2的人腺病毒载体的构建:将密码子优化的hACE2序列克隆到穿梭载体(pShuttle-CMV,Addgene 240007)中以产生pShuttle-hACE2。用PmeI将pShuttle-hACE2线

性化,并随后与HuAdv5主链质粒(pAdEasy-1载体;Addgene 240005)共转化到大肠杆菌菌株BJ5183中,通过同源重组产生pAdV5-ACE2。含有HuAdv5基因组的pAdEasy-1质粒具有E1和E3基因中的缺失。hACE2受巨细胞病毒启动子的转录控制,并且在其3'端侧翼是SV40多聚腺苷酸化信号。用Pac I限制性酶将pAd-hACE2线性化,然后转染到T-Rex 293HEK细胞(Invitrogen)中以产生HuAdv5-hACE2。在293-HEK细胞中产生重组HuAdv5-hACE2,并通过CsCl密度梯度超速离心纯化。通过293-HEK细胞中的噬斑测定确定病毒滴度。

[0350] 原位RNA杂交和组织学:根据制造商的说明,使用RNAscope 2.5HD (Brown) (Advanced Cell Diagnostics)进行RNA原位杂交。尸体剖检时收集左肺组织,用10%中性缓冲福尔马林(NBF)充胀(inflate),并然后在10% NBF中浸泡固定七天,然后进行处理。石蜡包埋的肺切片通过在60℃下孵育1小时进行脱蜡,并在室温下用H₂O₂猝灭内源性过氧化物酶10分钟。将载玻片在RNAscope靶标修复试剂中煮沸15分钟,并在RNAscope蛋白酶Plus试剂中孵育30分钟,然后进行SARS-CoV2 RNA探针(Advanced Cell Diagnostics 848561)杂交和信号扩增。切片用Gi11's苏木精复染,并通过明视野显微镜可视化。一些肺切片在苏木精和伊红染色后进行组织学处理。

[0351] SARS-CoV-2中和测定:将热灭活血清样本连续稀释,并与10²FFU的SARS-CoV-2一起在37℃下孵育1小时。将病毒-血清混合物添加到96孔板中的Vero细胞单层中,并在37℃下孵育1小时。随后,用补充有2% FBS的MEM中的1% (w/v) 甲基纤维素覆盖细胞。将板孵育30小时,然后在室温下使用PBS中的4% PFA固定1小时。洗涤细胞,然后顺序地与抗SARS-CoV-2CR3022抗体(Yuan等人,2020) (1μg/mL) 和补充有0.1% (w/v) 皂苷(Sigma) 和0.1% BSA的PBS中的HRP缀合山羊抗人IgG(Sigma)一起孵育。使用TrueBlue过氧化物酶底物(KPL)对板进行显色,然后在BioSpot分析仪(Cellular Technology Limited)上计数病灶。对于用表达荧光素酶的SARS-CoV-2的中和实验,将血清样本以1:50开始稀释3倍,并与85PFU的每种重组病毒(野生型和D614G)混合。将接种在透明底黑壁96孔板(Corning)中的Vero E6细胞用血清-病毒混合物接种,并将细胞在37℃下培养48小时。随后,裂解细胞并根据制造商的说明使用Nano-Glo荧光素酶测定系统(Promega)测量荧光素酶活性。

[0352] Hu-AdV5中和测定:在Hu-AdV5-hACE2转导前一天,从用ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S肌肉内免疫的小鼠中收集血清样本。将血清热灭活并连续稀释,然后与10²FFU的HuAdv5一起在37℃下孵育1小时。将病毒-血清混合物添加到96孔板中的HEK293细胞单层中,并在37℃下孵育1小时。然后用补充有5% FBS的MEM中的1% (w/v) 甲基纤维素覆盖细胞。将板在37℃下孵育48小时,然后在室温下用PBS中的2% PFA固定1小时。随后,用PBS洗涤板,并与在透化缓冲液(补充有0.1% (w/v) 皂苷和0.1% BSA的PBS)中稀释的生物素化的抗HuAdv5-六邻体抗体(2μg/mL;Novus Biologicals NB600413)一起在4℃下孵育过夜。再次洗涤板,并与透化缓冲液中的链霉亲和素-HRP(1:3000;Vector Laboratories SA-5004)一起在室温下孵育30分钟。在最后一次洗涤系列之后,使用TrueBlue过氧化物酶底物(KPL)对板进行显色,并在BioSpot分析仪(Cellular Technology Limited)上计数病灶。

[0353] 蛋白表达和纯化:将纯化的来自2019-nCoV/USA-WA1/2020SARS-CoV-2毒株的RNA逆转录为cDNA,并将其用作模板进行重组基因克隆。将全长SARS-CoV-2NP(NP-FL)克隆到带有六组氨酸标签的pET21a中,并使用BL21(DE3)-RIL大肠杆菌在Terrific Broth(bioWORLD)中进行重组表达。在25℃下用异丙基β-D-1-硫代半乳糖苷(Goldbio)诱导过夜

后,将细胞裂解在20mM Tris-HCl pH 8.5,1MNaCl,5mMβ-巯基乙醇和5mM咪唑中用于镍亲和纯化。在补充有500mM咪唑的先前缓冲液(prior buffer)中洗脱后,使用尺寸排阻色谱法,并且在一些情况下使用阳离子交换色谱法将蛋白纯化至同质。SARS-CoV-2RBD和S胞外域(破坏S1/S2弗林蛋白酶切割位点,将双脯氨酸突变引入S2亚基中以及合并折叠三聚化基序)克隆到带有C端六组氨酸或八组氨酸标签的pFM1.2中,瞬时转染到Expi293F细胞中,并如先前所述(Alsoussi等人,2020)通过带钴树脂色谱法(G-Biosciences)进行纯化。

[0354] ELISA:将纯化的抗原(S、RBD或NP)在4℃下以50mM Na₂CO₃pH 9.6中的2μg/mL(70μL)涂覆到96孔Maxisorp透明板上过夜。吸出涂覆缓冲液,并用200μL 1×PBS+0.05% Tween-20+1% BSA+0.02%NaN₃(封闭缓冲液,PBSTBA)在37℃下1小时或4℃下过夜封闭孔。将热灭活的血清样本稀释在单独的96孔聚丙烯板中的PBSTBA中。然后用1×PBS+0.05% Tween-20(PBST)洗涤板三次,然后加入50μL相应的血清稀释液。将血清在封闭的ELISA板中在室温下孵育至少1小时。再次将ELISA板在PBST中洗涤三次,然后加入50μL PBST中的1:2000抗小鼠IgG-HRP(Southern Biotech目录号1030-05)或PBST中的1:10000的生物素化抗小鼠IgG、抗小鼠IgM或抗小鼠IgA(SouthernBiotech)。将板在室温下孵育1小时,在PBST中洗涤三次,并然后将链霉亲和素-HRP(ThermoFisher)的1:5000稀释物加入孔中。在室温下孵育1小时后,用PBST洗涤板三次,并加入50μL的1-Step Ultra TMB-ELISA(ThermoFisher 目录号34028)。12至15分钟的孵育后,用50μL 2M硫酸终止反应。在加入硫酸的2分钟内读取(Synergy H1)每个孔在450nm处的吸光度。使用微孔板读取器(Bio-Rad)确定光密度(450nm)测量。

[0355] ELISpot测定:将MultiScreen-HA过滤器96孔板(Millipore)板用3μg/ml的SARS-CoV-2S蛋白在4℃过夜预涂覆。用PBST冲洗后,将板用培养基(RPMI,10% FBS,青霉素-链霉素,1mM丙酮酸钠,0.1mM非必需氨基酸,10mM HEPES和50mMβ-巯基乙醇)在37℃下封闭4小时。将培养基中的脾细胞单细胞悬浮液加入S蛋白涂覆的板中,并在37℃和5%加湿CO₂下孵育4小时。用PBS和PBST洗涤后,将板与生物素化抗IgG或抗IgA(Southern Biotech)一起孵育,然后与链霉亲和素缀合的辣根过氧化物酶(Jackson ImmunoResearch)一起孵育,每次在室温下1小时。用PBS再次洗涤后,加入3-氨基-9-乙基咔唑(Sigma)底物溶液进行斑点显色。通过用水冲洗终止反应。使用Biospot读板仪(Cellular Technology)计数斑点。

[0356] 病毒负荷测量:使用氯胺酮和赛拉嗪混合物将SARS-CoV-2感染的小鼠安乐死,并收集器官。称量组织并使用MAGNA Lyser(Roche),用珠将其匀浆化于1ml含有2%胎牛血清(FBS)的杜氏改良Eagle培养基(DMEM)中。使用MagMax mirVana总RNA分离试剂盒(Thermo Scientific)和Kingfisher duo prime提取仪(Thermo Scientific)从澄清的组织匀浆中提取RNA。如先前所述(Hassan等人,2020),通过一步法定量逆转录酶PCR(qRT-PCR)TaqMan测定测量SARS-CoV-2RNA水平。使用SARS-CoV-2核衣壳(N)特异性引物和探针组:(L引物:ATGCTGCAATCGTGCTACAA(SEQ ID NO:8);R引物:GACTGCCGCCTCTGCTC(SEQ ID NO:9)。病毒RNA表示为以log10尺度上的每毫克的(N)基因拷贝数。对于一些样本,通过Vero E6细胞上的噬斑测定来确定病毒滴度。细胞因子和趋化因子mRNA测量。从肺匀浆中提取的RNA肺匀浆经DNase处理,并用于使用High-Capacity cDNA逆转录试剂盒(Thermo Scientific)合成cDNA,根据制造商的方案添加RNase抑制剂。使用TaqMan Fast Universal PCR master mix(Thermo Scientific)以及IFN-γ(IDT:Mm.PT.58.41769240)、IL-6(Mm.PT.58.10005566)、

IL-1 β (Mm.PT.58.41616450)、TNF- α (Mm.PT.58.12575861)、CXCL10 (Mm.PT.58.43575827)、CCL2 (Mm.PT.58.42151692)、CCL5 (Mm.PT.58.43548565)、CXCL11 (Mm.PT.58.10773148.g)、IFN- γ (Mm.PT.58.30132453.g) 和 IFN γ -2/3 (Thermo Scientific Mm04204156_gH) 所特定的商业引物/探针组确定细胞因子和趋化因子表达,并将结果相对于GAPDH (Mm.PT.39a.1) 水平归一化。将经治疗的小鼠与未接受治疗的对照进行比较,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法确定倍数变化。

[0357] 肽再刺激和细胞内细胞因子染色:将来自肌肉内疫苗接种小鼠的脾细胞与253个重叠的15聚体SARS-CoV-2S肽池一起在培养中在37°C下孵育12小时,然后用布雷菲德菌素A (BioLegend,420601) 处理4小时。用Fc γ R抗体 (BioLegend,克隆93) 封闭后,将细胞在冰上用CD45 BUV395 (BD BioSciences克隆30-F11);CD44 PE-Cy7、CD4 PE-Cy5、CD8b PreCP-Cy5.5和CD19 APC-Cy7 (BioLegend克隆,分别为IM7、GK1.5、YTS156.7.7和6D5) 以及可固定浅绿色死细胞染色剂 (Invitrogen,L34966) 染色。用Foxp3/转录因子染色缓冲液套装 (eBiosciences,00-5523) 固定和透化染色细胞。随后,用抗IFN- γ Alexa647 (BD Biosciences,克隆XMGI.2)、抗TNF α BV605 (BioLegend,克隆MP6-XT22) 和抗GrB PE (Invitrogen,GRB04) 进行细胞内染色。收获来自鼻内免疫小鼠的肺,并在37°C下在由补充有(167 μ g/ml)的Liberase DH (Sigma) 和(100 μ g/ml)的DNase I (Sigma) 的RPMI培养基组成的消化缓冲液中消化1小时。将肺细胞在37°C下与上述253个重叠15聚体SARS-CoV-2S肽池一起在布雷菲德菌素A存在下孵育5小时。然后如上所述对肺细胞进行染色,除了用CD4-BV421 (BioLegend克隆GK1.5) 替代CD4-PE-Cy5,不包括CD19染色,并增加CD103-FITC和CD69-BV711 (BioLegend克隆,分别为2E7和H1.2F3)。使用FlowJo X 10.0软件在BD LSRFortessa X-20细胞计数仪上进行分析。

[0358] 基于流式细胞术的抗原表征:在用ChAd-SARS-CoV-2-S (MOI为5) 转导前24小时,将HEK-293T细胞以 10^6 个细胞/孔接种在6孔板中。20小时后,收获细胞,使用Foxp3转录因子染色缓冲液套装 (Thermo Fisher) 固定和透化,并与以下抗SARS-CoV-2中和鼠mAb一起孵育后对病毒抗原染色:SARS2-01、SARS2-02、SARS2-07、SARS2-11、SARS2-12、SARS2-16、SARS2-18、SARS2-20、SARS2-21、SARS2-22、SARS2-23、SARS2-29、SARS2-31、SARS2-32、SARS2-34、SARS2-38、SARS2-39、SARS2-50、SARS2-55、SARS2-58、SARS2-66和SARS2-71 (L.VanBlargan和M.Diamond,未发表的结果)。将H77.39 (其为同型匹配的抗HCV E2 mAb) 用作阴性对照。洗涤细胞,与Alexa Fluor647缀合的山羊抗鼠IgG (Thermo Fisher) 一起孵育,并使用MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec) 通过流式细胞术进行分析。将对给定mAb呈阳性的细胞百分比与用饱和量的抗SARS-CoV-2mAb的寡克隆混合物染色的细胞进行比较。

[0359] 实施例2:鼻内疫苗在小鼠中持久保护免受SARS-CoV-2变体

[0360] 减弱抗体中和作用的SARS-CoV-2变体可危及疫苗效力和COVID-19大流行的结束。实施例1显示了单剂量鼻内施用的基于刺突蛋白的黑猩猩腺病毒载体疫苗 (ChAd-SARS-CoV-2-S) 在动物中的保护活性,该疫苗已推进至人体试验。本实施例提供了在小鼠中的持久性、剂量反应和交叉保护活性。ChAd-SARS-CoV-2-S的单次鼻内剂量在血清中诱导持久的高中中和Fc效应抗体反应,并在骨髓中诱导分泌S特异性IgG和IgA的长寿命浆细胞。在100倍疫苗剂量范围内和200天的时间内观察到针对历史SARS-CoV-2毒株的保护。接种疫苗后6周或9个月,血清抗体中和具有B.1.351和B.1.1.28刺突蛋白的SARS-CoV-2毒株,并在激发后

在上呼吸道和下呼吸道赋予了几乎完全的保护。因此,在小鼠中,用ChAd-SARS-CoV-2-S进行鼻内免疫提供了针对历史和新出现的SARS-CoV-2毒株的持久保护。

[0361] SARS-CoV-2病毒体的刺突(S)蛋白是基于抗体和疫苗对策的主要目标。S蛋白充当主要的病毒附着和进入因子,并接合细胞表面受体血管紧张素转换酶2(ACE2)以促进SARS-CoV-2进入人体细胞。SARS-CoV-2S蛋白被裂解产生S1和S2片段,其中S1蛋白含有受体结合结构域(RBD),且S2蛋白促进膜融合和病毒穿透到细胞质中。SARS-CoV-2S蛋白的融合前形式被有效的中和单克隆抗体或蛋白抑制剂识别。

[0362] 已经使用DNA质粒、脂质纳米颗粒包封的mRNA、灭活病毒体、蛋白亚基或病毒载体疫苗平台开发了许多靶向SARS-CoV-2S蛋白的疫苗候选物。通过肌肉内(IM)注射施用的几种疫苗(例如,Pfizer/BioNTech BNT162b2和Moderna 1273mRNA和Johnson&Johnson Ad26.COV2以及AstraZeneca ChAdOx1 nCoV-19腺病毒平台)已在许多国家获得紧急使用授权,向全球提供了数亿剂(covid19.who.int)。

[0363] 虽然通过IM注射施用疫苗诱导保护免受严重疾病和死亡的强健的全身性免疫,但关于它们限制SARS-CoV-2传播的能力仍存在疑问,特别是在上呼吸道感染没有减少的情况下。事实上,许多IM施用疫苗在临床前研究中显示出对上气道感染和传播的可变的保护,并且未能诱导实质性的粘膜(IgA)免疫。这个问题很重要,因为出现了在刺突蛋白中具有取代的更具传染性的SARS-CoV-2变体,包括B.1.1.7、B.1.351和B.1.1.28。对假病毒和真实的SARS-CoV-2毒株的实验也表明,疫苗诱导的血清对表达在刺突基因的位置L452、E484和其他位置处的突变的变体的中和减弱。除了对保护的可能负面影响之外,对某些变体减弱的免疫和呼吸道粘膜中天然较低的抗S IgG水平的组合可为上气道中抗性的进一步选择和传播到普通人群中创造条件。

[0364] 如本文所述,单剂量、鼻内(IN)递送的编码融合前稳定S蛋白的基于黑猩猩腺病毒(猿猴Ad-36)的SARS-CoV-2疫苗(ChAd-SARS-CoV-2-S)在K18-hACE2转基因小鼠、仓鼠和非人灵长类动物中诱导强健的体液、细胞介导的免疫反应和粘膜免疫反应,并限制上气道和下气道感染。已推进至人体临床试验(BBV154,临床试验NCT04751682)的该疫苗与ChAdOx1 nCoV-19(其是一种目前在一些国家已获准紧急使用的基于黑猩猩Ad-23的SARS-CoV-2疫苗)不同。这里,作为评估ChAd-SARS-CoV-2-S的潜在效用的进一步步骤,评估了其在小鼠中的剂量反应、持久性和交叉保护活性,包括对上气道和下气道感染的影响。在IN免疫后大约9个月,ChAd-SARS-CoV-2-S疫苗接种动物的血清中的中和抗体和抗S蛋白IgA水平仍然较高,并且抑制具有B.1.351和B.1.1.28刺突蛋白的SARS-CoV-2毒株的感染。此时,易感的K18-hACE2转基因小鼠在用展示B.1.351刺突蛋白的SARS-CoV-2病毒激发后,完全保护免受上呼吸道和下呼吸道感染。

[0365] 结果

[0366] 单次ChAd-SARS-CoV-2-S免疫在不同剂量下诱导持久的抗刺突和中和反应:评估了用递增剂量的ChAd-SARS-CoV-2-S(10^8 、 10^9 和 10^{10} 个病毒颗粒[vp])或 10^{10} vp的ChAd-对照疫苗IM免疫或IN免疫后100或200天,BALB/c小鼠中体液免疫反应的持久性(图10A)。首先,通过ELISA测量抗S和抗RBD IgG和IgA水平。与先前在一个月时间点30的结果一致,在疫苗接种后100或200天,用ChAd-SARS-CoV-2-S的IN免疫比用IM免疫或用ChAd-对照的疫苗接种诱导了更优异的抗体反应(图10B-10M和图11)。在100或200天时,IN免疫后血清中抗S和抗

RBD特异性结合IgG水平高于IM免疫。在用 10^{10} 、 10^9 和 10^8 vp的ChAd-SARS-CoV-2-S进行IN免疫后100天,S特异性IgG反应的几何平均滴度(GMT)分别为 1.1×10^6 、 4.8×10^5 和 2.6×10^5 ,以及RBD特异性IgG分别为 3.2×10^5 、 1.8×10^5 和 8.7×10^4 (图10B)。相比之下,在 10^{10} 、 10^9 和 10^8 vp的ChAd-SARS-CoV-2-S进行IM免疫后100天的S特异性和RBD特异性IgG反应为1/4至1/6($P < 0.0001$),其中S特异性IgG滴度分别为 2.1×10^5 、 1.1×10^5 和 4.5×10^4 ,以及RBD特异性IgG滴度分别为 5.1×10^4 、 2.9×10^4 和 2.3×10^4 (图10E)。在IN或IM免疫后200天,观察到S特异性和RBD特异性IgG滴度的相似剂量反应(图10H和图10K)。在用 10^{10} 、 10^9 和 10^8 vp的ChAd-SARS-CoV-2-S进行IN免疫后200天,S特异性IgG的GMT分别为 2.8×10^6 、 2.4×10^6 和 1.2×10^6 ,以及RBD特异性IgG的GMT分别为 1.1×10^6 、 6.1×10^5 和 3.2×10^5 (图10H)。在用 10^{10} 、 10^9 和 10^8 vp的ChAd-SARS-CoV-2-S进行IM免疫后200天,S特异性IgG GMT分别为 8.1×10^5 、 6.9×10^5 和 2.6×10^5 ,以及RBD特异性IgG GMT分别为 1.4×10^5 、 1.3×10^5 和 8.0×10^4 (图10K)。因此,IN免疫后的抗S和抗RBD IgG水平高于IM免疫,并且甚至在单剂量疫苗接种后数月血清中持续升高。

[0367] 接下来,我们评估了血清IgA反应的诱导和持久性。尽管IM免疫未能诱导S特异性或RBD特异性IgA(图1F和L),但在免疫后100或200天在IN免疫后检测到相当水平的抗S和RBD IgA(图1C和I)。在用 10^{10} 、 10^9 和 10^8 vp的ChAd-SARS-CoV-2-S进行IM免疫后100天,S特异性IgA的GMT分别为 4.8×10^3 、 1.2×10^3 和 8.4×10^2 ,以及RBD特异性IgA的GMT分别为 2.2×10^3 、 4.6×10^2 和 2.9×10^2 (图1C)。与IgG观察到的一样,IgA水平随着时间持续增加,使得在用 10^{10} 、 10^9 和 10^8 vp的ChAd-SARS-CoV-2-S进行IN免疫后,在200天时的S特异性IgA的GMT分别为 1.1×10^4 、 7.4×10^3 和 5.4×10^3 ,以及RBD特异性IgA的GMT分别为 5.2×10^3 、 3.8×10^3 和 9.8×10^2 (图1I)。

[0368] 接下来,通过使用灶斑减少中和试验(FRNT)测定中和活性(图10D、图10G、图10J、图10M和图11)来评估血清学反应的功能相关性。如预期的,在来自ChAd对照治疗小鼠的血清中未检测到中和活性。在用 10^{10} 、 10^9 和 10^8 vp的ChAd-SARS-CoV-2-S进行IN免疫后100天,平均有效半数最大抑制滴度[EC50]分别为39,449、9,989和7,270(图10D)。相比之下,在用 10^{10} 、 10^9 和 10^8 vp的ChAd-SARS-CoV-2-S进行IM免疫后的该时间点,EC50值为1/20至1/8($P < 0.0001$),分别为4,988、2,017和391(图10G)。在用 10^{10} 、 10^9 和 10^8 vp的ChAd-SARS-CoV-2-S进行IN免疫后200天,且与观察到的较高抗S和RBD滴度一致,EC50值分别为45,591、22,769和23,433(图10J)。相比之下,在用 10^{10} 、 10^9 和 10^8 vp的ChAd-SARS-CoV-2-S进行IM免疫后200天,EC50值低得多,分别为2,524、940和716(图10M)。

[0369] 长寿命浆细胞(LLPC)驻留在骨髓中,并持续分泌与血清水平相关的高水平抗体。为了评估用 10^{10} vp的ChAd-SARS-CoV-2-S进行IM或IN免疫后200天的抗原特异性LLPC的水平,从骨髓分离CD138+细胞并使用ELISPOT测定来测定S特异性IgG或IgA的产生。观察到IN免疫后分泌S特异性IgG的LLPC频率为IM免疫的约4倍(图10N)。此外,在IN免疫后,检测到产生S特异性IgA的LLPC数量更高,其在IM免疫后没有(图10N)。总之,这些数据确立了以下:(a)单剂量免疫比IM免疫促进更优异的体液免疫;(b)1/100接种剂量的ChAd-SARS-CoV-2-S在小鼠中诱导强健的中和抗体反应;(c)IN而非IM免疫诱导针对SARS-CoV-2S蛋白的血清IgA反应和IgA特异性LLPC;以及(d)ChAd-SARS-CoV-2-S诱导的体液免疫是持久的,并在接种疫苗后六个月时间内上升。

[0370] IN接种ChAd-SARS-CoV-2-S诱导具有Fc效应子功能能力的广泛抗体反应:为了进一步表征体液反应,在IN或IM接种疫苗后90天,使用源自BALB/c小鼠的血清分析了抗体与SARS-CoV-2变体蛋白的结合和Fc效应子功能。我们的SARS-CoV-2蛋白组包括对应于WA1/2020、B.1.1.7、B.1.351、B.1.1.28毒株的刺突(D614G、E484K、N501Y、 Δ 69-70、K417N)和RBD(E484K)抗原。首先,使用luminex平台测量了几种同型(IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM和IgA)的抗SARS-CoV-2特异性抗体反应及其结合Fc γ 受体(小鼠Fc γ RIIB、Fc γ RIII、Fc γ RIV)的能力。与通过ELISA获得的数据一致(图10B和图10E),ChAd-SARS-CoV-2-S的IN接种疫苗诱导了比IM免疫更高水平的针对D614G刺突和WA1/2020RBD蛋白的IgG1,并且如预期的,降低剂量的疫苗引起更低的抗体滴度(图12A)。IN免疫后针对所有刺突和RBD变体的抗SARS-CoV-2IgG1滴度也高于IM免疫后,且滴度随疫苗剂量而降低(图12B)。如热图所示,对所有抗SARS-CoV-2特异性抗体同型均观察到这种趋势,并且与Fc γ R结合模式相关(图12C)。这些数据表明IN接种疫苗比IM接种疫苗诱导更高量级和更广泛的针对SARS-CoV-2的抗体亚类反应。

[0371] 抗体效应子功能(比如调理作用)部分由Fc γ 受体接合介导。为了确定观察到的抗体滴度和Fc γ R结合滴度的差异是否导致效应子功能的差异,进行了抗体依赖性中性粒细胞(ADNP)和细胞吞噬作用(ADCP)测定(图12D-12E)。来自IN接种疫苗小鼠的血清刺激明显多于获自IM接种疫苗小鼠的那些的ADNP。然而,来自IN和IM接种疫苗后得到的抗体的ADCP的极小差异是显而易见的(图12D-12E)。这些数据表明,用ChAd-SARS-CoV-2-S进行IN接种疫苗诱导比IM接种疫苗更大且更具功能性的抗体反应。

[0372] 鼻内施用的ChAd-SARS-CoV-2-S在BALB/c小鼠中诱导针对SARS-CoV-2激发的持久保护:为了评估ChAd-SARS-CoV-2-S疫苗的效力,用SARS-CoV-2对按照图10A中所述给药方案免疫的BALB/c小鼠进行激发。在鼻内引入使得hACE2能够异位表达的Hu-Ad5-hACE2,并通过历史SARS-CoV-2毒株在BALB/c小鼠中产生SARS-CoV-2感染之前进行病毒激发。用 10^{10} vp的ChAd-对照或 10^{10} 、 10^9 和 10^8 vp的ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN或IM途径免疫动物一次。在接种疫苗后第95天或第195天,向小鼠给予 10^8 噬斑形成单位(PFU)的Hu-Ad5-hACE2和抗Ifnar1 mAb;后者在该模型中减弱了先天免疫并增强了发病机制。五天后,用 5×10^4 病灶形成单位(FFU)的SARS-CoV-2(毒株WA1/2020)经由IN途径激发BALB/c小鼠。感染后4天(dpi),从在免疫后100天受激发的小鼠中收获肺、脾和心脏,并从在免疫后200天受激发的第二群组中收集肺、鼻甲和鼻冲洗液。使用亚基因组RNA(N基因)的引物,通过定量逆转录PCR(qRT-PCR)评估组织中的病毒负荷。与接受ChAd-对照疫苗的动物相比,如通过肺、脾和心脏中几乎没有病毒RNA所证明的,用所有三种剂量IN接种疫苗均在接种疫苗后100天诱导了显著的保护(图13A-13C)。在免疫后200天,与ChAd-对照免疫的小鼠相比,通过IN递送ChAd-SARS-CoV-2-S赋予的保护在上呼吸道和下呼吸道中仍然强健。尽管如此,在用最低 10^8 vp剂量的ChAd-SARS-CoV-2-S免疫的动物中,观察到肺部和鼻甲中的感染突破有限(图13G和图13I)。相比之下,在IM免疫后100天的保护低于在相同激发时间点的IN免疫后。虽然在心脏和脾中未检测到病毒RNA(图13E-13F),但与IN途径相比,用ChAd-SARS-CoV-2-S通过IM免疫的小鼠的肺中测量到至少为1,000至30,000倍($P < 0.0001$)的水平(图13A和图13D)。还观察到通过IM途径给药的更大影响,因为在 10^8 vp剂量下肺中的病毒RNA载量的减少与ChAd-对照疫苗接种小鼠相比不再有差异(图13D)。在IM免疫后200天,观察到肺部、鼻冲洗液和鼻甲中针对

SARS-CoV-2感染的保护低于IN免疫后(图13G-13L)。

[0373] ChAd-SARS-CoV-2-S在hACE2转基因小鼠中诱导持久免疫:接下来,评估了鼻内递送的ChAd-SARS-CoV-2-S在K18-hACE2C57BL/6小鼠中的免疫原性,K18-hACE2 C57BL/6小鼠比BALB/c小鼠更容易感染SARS-CoV-2。用 10^9 vp的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径接种五周龄K18-hACE2小鼠。六周后收集血清样本,并评估体液免疫反应。IN免疫ChAd-SARS-CoV-2-S而非ChAd-对照诱导高水平的S特异性和RBD特异性IgG和IgA(图14A-14B)。通过FRNT测定测量了针对WA1/2020和另外两种具有来自B.1.351和B.1.1.28变体的刺突蛋白的SARS-CoV-2毒株的中和抗体滴度(图14C-14D和图16)。在单次IN剂量的ChAd-SARS-CoV-2-S后诱导了高水平的针对WA1/2020的中和抗体(EC₅₀为9,591)。如疫苗诱导的人血清所观察到的,与WA1/2020相比,观察到针对Wash-B.1.351(约1/5, $P < 0.0001$;图14C)和Wash-B.1.1.28(约1/3, $P < 0.0001$;图14D) SARS-CoV-2毒株的中和滴度的降低。为了评估体液反应的持久性,经由IN途径免疫K18-hACE2小鼠的单独的群组,并在九个月时收集血清样本。在此时间点,ChAd-SARS-CoV-2-S诱导了高水平的S特异性和RBD特异性IgG和IgA以及针对WA1/2020的中和抗体(EC₅₀为12,550)(图14E-14H和图16)。当针对Wash-B.1.351和Wash-B.1.1.28病毒进行测试时,与WA1/2020相比,也观察到中和滴度降低(约1/8至1/6, $P < 0.05$;图14G-14H),尽管它们仍然保持较高(EC₅₀分别为1,627和1,918)。

[0374] ChAd-SARS-CoV-2-S在hACE2转基因小鼠中赋予针对Wash B.1.351和Wash-B.1.1.28激发的交叉保护:测试了ChAd-SARS-CoV-2-S针对WA1/2020和两种具有与重要变体相对应的刺突基因的嵌合病毒(Wash-B.1.351和Wash-B.1.1.28)的保护效力(图15A)。用单次 10^9 vp剂量的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄K18-hACE2小鼠。六周后,用 10^4 FFU的Wash-B.1.351、Wash B.1.1.28或WA1/2020通过IN途径对小鼠进行激发。所有用ChAd-SARS-CoV-2免疫的小鼠均未表现出体重减轻,而大多数ChAd-对照疫苗接种小鼠在3至6dpi时经历了明显的体重减轻(图15B、图15G和图15L)。值得注意的是,用ChAd-SARS-CoV-2-S进行疫苗接种导致在6dpi时上呼吸道和下呼吸道、心脏和脑中几乎没有可检测的SARS-CoV-2RNA(图15C-15F、图15H-15K和图15M-15O)。作为对交叉保护反应持久性的进一步测试,用单个 10^{10} vp剂量的ChAd-对照或ChAd-SARS-CoV-2-S经由IN途径免疫五周龄的K18-hACE2小鼠。九个月后,用 10^4 FFU的Wash-B.1.351经由IN途径对小鼠进行激发。与ChAd-对照治疗的小鼠形成对比,ChAd-SARS-CoV-2-S疫苗接种的小鼠保持了体重(图15P)。此外,观察到了明显的病毒学保护,因为在一些小鼠的上呼吸道和下呼吸道、心脏和脑中仅检测到极低量的Wash-B.1.351SARS-CoV-2RNA(图15Q-15T)。

[0375] 讨论

[0376] 疫苗诱导的免疫反应的持久性是提供针对SARS-CoV-2感染的持续保护和遏制当前大流行的关键。这里,显示了用ChAd-SARS-CoV-2-S进行单次IN免疫诱导持续上升数月的S特异性和RBD特异性结合和中和抗体,这表明存在持续的生发中心反应。IN接种疫苗后六个月在骨髓中检测到LLPC,它们分泌SARS-CoV-2特异性IgG和IgA,这可能促成循环中持久的高抗病毒抗体水平。相比之下,用ChAd-SARS-CoV-2-S进行IM免疫诱导较低水平的血清中和抗体、较少的分泌刺突特异性IgG的LLPC,并且几乎没有血清或细胞IgA反应。至少在小鼠中,用ChAd-SARS-CoV-2-S进行单次IN剂量免疫产生持久的体液免疫,其在100倍剂量范围内均有观察到。这些临床前免疫原性结果不亚于针对SARS-CoV-2的mRNA疫苗在人体中的研

究,后者显示体液免疫反应持续至少数月。相比之下,自然SARS-CoV-2感染后抗体反应的持久性可能存在相当大的差异。

[0377] 在六个月内的多个时间点,ChAd-SARS-CoV-2-S的单次免疫在hACE2转导的BALB/c小鼠或K18-hACE2转基因C57BL/6小鼠中赋予针对SARS-CoV-2(WA1/2020毒株)激发的持久保护。尤其是IN免疫提供了针对上呼吸道和下呼吸道感染的几乎完全的病毒学保护,仅在1/100的疫苗剂量下才观察到有限的感染突破。上呼吸道中感染的消除表明IN接种疫苗可以预防传播。相比之下,IM免疫降低了肺中的病毒RNA水平,但在来自上呼吸道样本中显示出针对同源WA1/2020毒株的明显更少的保护。尽管来自不同平台的许多SARS-CoV-2疫苗候选物已在动物模型中表现出免疫原性和保护效力,但据我们所知,尚无具有确立的持久性或针对变异病毒的保护的疫苗候选物。IN免疫(甚至在1/100接种剂量下)赋予的长期保护是有前景的。如果重现小鼠的结果,则剂量节约策略可使得能够生产可减少SARS-CoV-2的感染和传播的大量疫苗剂量。

[0378] 在受体结合基序中具有氨基酸突变的SARS-CoV-2S变体(例如B.1.351和B.1.1.28)的出现值得关注,因为它们对许多中和抗体的抑制活性具有抗性。事实上,来自用BNT162b2 mRNA或ChAdOx1 nCoV-19(AZD1222)疫苗进行疫苗接种的受试者的人血清显示出减少的针对B.1.351的中和。令人担忧的是,IM施用的ChAdOx1 nCoV-19(AZD1222)显示出降低的针对人的轻度至中度B.1.351感染的保护效力。在K18-hACE2转基因小鼠中,当我们比较IN递送的ChAd-SARS-CoV-2-S针对WA1/2020和表达B.1.1.28或B.1.351刺突蛋白的嵌合SARS-CoV-2毒株的免疫原性时,也观察到减少的对变体病毒的中和(1/8至1/3),尽管滴度保持在 $>1,000$ 。在ChAd-SARS-CoV-2-S的IN免疫后六周,K18-hACE2小鼠受到针对体重减轻和WA1/2020、Wash-B.1.351和Wash-B.1.1.28在上呼吸道和下呼吸道以及脑中感染的完全保护。值得注意的是,在单次IN免疫九个月后进行激发的K18-hACE2小鼠的单独群组中,动物受到了针对Wash-B.1.351激发的完全保护。尽管SARS-CoV-2疫苗的保护相关因素尚未完全确立,但针对变体病毒的高水平交叉中和抗体,加上强健的病毒特异性全身和粘膜CD8+T细胞应答,可能有助于保护。除此之外,抗体效应子功能也可能有助于预防SARS-CoV-2感染和疾病。事实上,在源自IN递送的ChAd-SARS-CoV-2-S的血清中观察到增强的针对SARS-CoV-2变体蛋白的Fc效应子功能,包括ADNP和ADCP反应的强健诱导。

[0379] 总之,本实施例显示,用ChAd-SARS-CoV-2-S进行IN免疫诱导针对SARS-CoV-2的强健且持久的结合IgG和IgA抗体、中和抗体、Fc效应子功能和LLPC反应。在小鼠中,用ChAd-SARS-CoV-2-S进行单次IN免疫赋予针对表现出对应于B.1.351和B.1.1.28变体的刺突蛋白的SARS-CoV-2毒株的交叉保护,即使在接种疫苗后九个月也是如此。鉴于在多种动物模型30、31、32中的临床前评估的效力以及针对重要变体的持久保护性免疫,ChAd-SARS-CoV-2-S的IN递送是用于预防SARS-CoV-2感染和减少传播的有前景的平台。

[0380] 方法

[0381] 病毒和细胞:将Vero E6(CRL-1586,美国典型培养物保藏中心(ATCC))、Vero-TMPRSS2 57、Vero(CCL-81,ATCC)和HEK293(CRL-1573,ATCC)细胞在补充有10%胎牛血清(FBS),10mM HEPES pH 7.3,1mM丙酮酸钠,1×非必需氨基酸和100U/ml青霉素-链霉素的杜氏改良Eagle培养基(DMEM)中在37℃下培养。Vero-TMPRSS2细胞还补充有5μg/mL杀稻瘟菌素。

[0382] SARS-CoV-2毒株2019n-CoV/USA_WA1/2020 (WA1/2020) 获自美国疾病控制与预防中心。病毒在Vero CCL-81细胞中传代一次,并通过Vero E6细胞上的病灶形成测定 (FFA) 进行滴定。先前描述了具有变体刺突基因的Wash-B.1.351和Wash-B.1.1.28嵌合病毒28,58。所有病毒在Vero-TMPRSS2细胞中传代一次,并进行下一代测序以确认取代的引入和稳定性。所有病毒实验均在经批准的生物安全3级 (BSL-3) 设施中进行。

[0383] 小鼠实验:动物研究按照美国国立卫生研究院的《实验动物护理和使用指南》中的建议进行。方案经华盛顿大学医学院的机构动物护理和使用委员会批准 (保证号A3381-01)。病毒接种是在用盐酸氯胺酮和赛拉嗪诱导和维持的麻醉下进行的,并尽一切努力将动物的痛苦降到最低。

[0384] 雌性BALB/c (目录000651) 和K18-hACE2 C57BL/6 (目录034860) 小鼠购自The Jackson Laboratory。用50 μ l PBS中的 10^{10} vp的ChAdV-对照或 10^8 、 10^9 或 10^{10} vp的ChAd-SARS-CoV-2-S经由IM(后肢) 或IN注免疫四至五周龄的动物。在IN施用 10^8 PFU对的Hu-Ad5-hACE2前一天,向疫苗接种BALB/c小鼠 (10至11周龄) 给予2mg抗Ifnar1mAb (MAR1-5A3 59 (Leinco)) 的单次腹膜内注射37。Hu-Ad5-hACE2转导后五天,用 4×10^5 FFU的WA1/2020SARS-CoV-2通过IN途径接种小鼠。在用 10^4 FFU的SARS-CoV-2 (WA1/2020、Wash-B.1.351或Wash-B.1.1.28) 经由IN途径免疫后的指定天数,对K18-hACE2小鼠进行激发。在6dpi时将动物安乐死,并收获组织用于病毒学分析。

[0385] 黑猩猩和人类腺病毒载体:ChAd-SARS-CoV-2和ChAd-对照疫苗载体源自猿猴Ad36主链60,并且本文已描述了构建和验证。将挽救的复制缺陷型ChAd-SARS-CoV-2-S和ChAd-对照载体在HEK293细胞中放大,并通过CsCl密度梯度超速离心纯化。通过分光光度法在260nm处测定每种载体制剂中的病毒颗粒浓度。Hu-AdV5-hACE2载体也如上所述,并在HEK293细胞中产生。通过HEK293细胞中的噬斑测定确定病毒滴度。

[0386] SARS-CoV-2中和女人的:将热灭活血清样本连续稀释,并与 10^2 FFU的不同SARS-CoV-2毒株一起在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时。将病毒-血清混合物添加到96孔板中的Vero细胞单层中,并在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时。随后,用补充有2% FBS的MEM中的1% (w/v) 甲基纤维素覆盖细胞。将板孵育30小时,然后使用PBS中的4% PFA在室温下固定1小时。洗涤细胞,然后顺序地与SARS2-2、SARS2-11、SARS2-16、SARS2-31、SARS2-38、SARS2-57和SARS2-71 62抗S抗体的寡克隆池以及补充有0.1% 皂苷和0.1% 牛血清白蛋白的PBS中的HRP缀合的山羊抗鼠IgG (Sigma,12-349) 一起孵育。使用TrueBlue过氧化物酶底物 (KPL) 对板进行显色,然后在BioSpot分析仪 (Cellular Technology Limited) 上计数病灶。

[0387] 蛋白表达和纯化:先前已描述了对应于WA1/2020SARS-CoV-2毒株的纯化的S和RBD蛋白的克隆和生产。简而言之,将融合前稳定的S 64和RBD克隆到带有六组氨酸标签的pCAGGS哺乳动物表达载体中,并瞬时转染到Expi293F细胞中。蛋白通过带钴树脂色谱法 (G-Biosciences) 纯化。

[0388] ELISA:将纯化的抗原 (S或RBD) 在4 $^{\circ}$ C下以50mM Na₂CO₃ pH9.6中的2 μ g/mL (70 μ L) 涂覆到96孔Maxisorp透明板上过夜。吸出涂覆缓冲液,并用200 μ L 1 $\times$ PBS+0.05% Tween-20+1% BSA+0.02%NaN₃ (封闭缓冲液,PBSTBA) 在4 $^{\circ}$ C下过夜封闭孔。将热灭活的血清样本稀释在单独的96孔聚丙烯板中的PBSTBA中。然后用1 $\times$ PBS+0.05% Tween-20 (PBST) 洗涤板三次,然后加入50 μ L相应的血清稀释液。将血清在封闭的ELISA板中在室温下孵育至少1小时。

再次将ELISA板在PBST中洗涤三次,然后加入50 μ L PBST中的1:1000抗小鼠IgG-HRP (Southern Biotech目录号1030-05)或PBST中的1:1000的抗小鼠IgA-HRP (SouthernBiotech)。将板在室温下孵育1小时,在PBST中洗涤三次,并然后加入100 μ L的1-Step Ultra TMB-ELISA (ThermoFisher目录号34028)。12至15分钟的孵育后,用50 μ L 2M硫酸终止反应。使用微孔板读取器 (Bio-Rad) 确定光密度 (450nm) 测量。

[0389] ELISPOT测定:为了定量骨髓中的S特异性浆细胞,使用研钵和研杵将股骨和胫骨在RPMI 1640中压碎,通过100 μ m过滤器过滤,并进行ACK裂解。根据制造商的说明 (EasySep Mouse CD138 Positive Selection,STEMCELL),通过正向选择和磁珠富集CD138⁺细胞。将富集的CD138⁺细胞在预涂覆有SARS-CoV-2S蛋白的MultiScreen-HA滤板 (Millipore) 中补充有10% FBS的RPMI 1640中孵育过夜。使用TruBlue底物 (KPL) 对病灶进行显色,然后顺序地与抗小鼠IgG-生物素或抗小鼠IgA-生物素和链霉亲和素-HRP一起孵育。使用BioSpot仪器对板进行成像,并手动计数病灶。

[0390] 病毒负荷测量:使用氯胺酮和赛拉嗪混合物将SARS-CoV-2感染的小鼠安乐死,并收集器官。称量组织并使用MAGNA Lyser (Roche),用珠将其匀浆化于1ml含有2%胎牛血清 (FBS) 的杜氏改良Eagle培养基 (DMEM) 中。使用MagMax mirVana总RNA分离试剂盒 (Thermo Scientific) 和KingFisher Flex提取系统 (Thermo Scientific) 从澄清的组织匀浆中提取RNA。如先前所述37,通过一步法定量逆转录酶PCR (qRT-PCR) TaqMan测定测量SARS-CoV-2RNA水平。SARS-CoV-2核衣壳 (N) 特异性引物和探针组如上所述使用。病毒RNA表示为以log10尺度上的每毫克的 (N) 基因拷贝数。

[0391] Luminex分析:Luminex分析如先前所述进行。简而言之,使用NHS-酯连接以及磺基-NHS和EDC (Thermo Fisher),将蛋白 (刺突:D614G、E484K、N501 Δ 69-70、K417N、B.1.1.7、B.1.351;受体结合结构域 (RBD) (ImmuneTech):WT、E484K、B.1.1.7、B.1.351、B.1.128) 羧基偶联至磁性Luminex microplex羧化珠 (Luminex Corporation) 上,并然后与血清 (IgG1、Fc γ RIIb、Fc γ RIII 1:3000;IgG2a、G2b、G3、A、Fc γ RIV 1:1000,IgM 1:500) 一起在37 $^{\circ}$ C下孵育2小时。通过将免疫复合物与第二山羊抗小鼠PE抗体 (IgG1 1070-09、IgG2a 1080-09S、IgG2b 1090-09S、IgG3 1100-09、IgM 1020-09、IgA 1040-09Southern Biotech) 一起孵育来对每个同型进行同型分析。通过将免疫复合物与缀合至链霉亲和素-PE (Prozyme) 结合的生物素化Fc γ R (Fc γ RIIb、Fc γ RIII和Fc γ RIV,由Duke ProteinProduction Facility提供) 一起孵育来定量Fc γ R结合。用IQue (Intellicyt) 进行流式细胞术,并在IntelliCyt ForeCyt (v8.1) 上进行分析。

[0392] 抗体依赖性中性粒细胞或细胞吞噬作用:抗体依赖性中性粒细胞吞噬作用 (ADNP) 和细胞吞噬作用 (ADCP) 测定如先前所述进行。简而言之,使用NHS-酯连接以及磺基-NHS和EDC (Thermo Fisher),将刺突蛋白羧基偶联至蓝色、黄绿色或红色FluoSphereTM羧酸盐改性的微球,0.2 μ m (ThermoFisher)。将刺突涂覆的珠与稀释血清 (1:150ADNP,1:100ADCP) 一起在37 $^{\circ}$ C下孵育2小时。对于ADNP测定,从BALB/c小鼠中收集骨髓细胞,并对红细胞进行ACK裂解。剩余的细胞用PBS洗涤,并等分到96孔板中 (每孔 5×10^4 个细胞)。将珠-抗体复合物加入细胞,并在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时。洗涤后,用以下抗体对细胞进行染色:CD11b APC (BioLegend 101212)、CD11c A700 (BioLegend117320)、Ly6G Pacific Blue (127628)、Ly6C BV605 (BioLegend 128036)、Fcblock (BD Bioscience 553142) 和CD3 PE/Cy7 (BioLegend

100320)。用4% PFA固定细胞,在BD LSRFortessa (BD Biosciences) 上处理。中性粒细胞定义为CD3⁻、CD11b⁺、Ly6G⁺。中性粒细胞吞噬作用评分计算为(%FITC+) × (FITC的几何平均荧光强度)/10000。对于ADCP测定,将J774A.1 (ATCC TIB-67) 鼠单核细胞与刺突涂覆的珠-抗体复合物一起在37℃下孵育1小时。将细胞在5mM EDTA PBS中洗涤,用4% PFA固定,并在BD LSRFortessa (BD Biosciences) 上进行分析。细胞吞噬作用评分计算为(%FITC+) × (FITC的几何平均荧光强度)/10000。

[0393] 实施例3:来自CHAD载体的SARS-CoV-2刺突基因(BA.5)变体的表达

[0394] 如先前在构建黑猩猩腺病毒载体中所讨论的,构建包含SAR-CoV2-Omicron BA.5 (二价)的S6P和S6PdF变体的腺病毒载体,并进行表达测试。这些构建体分别称为ChAd.BA.5-S6P、ChAd.BA.5-S6PdF。用 3×10^3 vp/细胞的新产生的ChAd.BA.5-S6P(源自omicron变体BA.5并具有S6P)和ChAd.BA.5-S6PdF载体或ChAd-SARS-CoV-2-S(WA1/2020-S2P)和ChAd.BA.1-S6PdF载体或不携带转基因的ChAd载体感染人A549细胞的单层。感染后48小时,使用结合刺突糖蛋白的不同表位的原代mAb的混合物通过流式细胞术检测SARS-CoV-2刺突基因的表达。如图18中所提供的,用ChAd.BA.5-S6P和ChAd.BA.5-S6PdF载体感染分别导致90%和92%的表达刺突基因的细胞,这非常接近由ChAd-SARS-CoV-2-S(WA1/2020-S2P)(93%)和ChAd.BA.1-S6PdF(96%)所达到的表达水平。用ChAd阴性对照感染显示5%的背景表达水平,类似于与驴抗小鼠IgG的原代和次级Alexa Fluor 594缀合的F(ab')₂片段一起孵育的对照未感染细胞(4.2%)。这些数据表明,ChAd.BA.5-S6P和ChAd.BA.5-S6PdF载体均应诱导有效的刺突表达,产生与由ChAd-SARS-CoV-2-S和ChAd.BA.1-S6PdF疫苗载体所达到的免疫反应相当的强烈的免疫反应。

[0395] 实施例4:用CHAD-WUHAN-S和CHAD.BA.5-S或CHAD-二价进行鼻内接种疫苗持久地保护小鼠免受SARS-CoV-2变体

[0396] 使用本文中提供的方法,体内测试了用Ch-AD-对照、ChAD-Wuhand-S、ChAd-BA.5和ChAd-二价的鼻内疫苗的效力。图23提供了相关S蛋白的序列比对。图19A提供了疫苗接种、血液采样、病毒激发和尸体剖检的时间安排的示意图。在初步实验中,对抗SARS-CoV-2IgG(图19B、19D、19F)或IgA(图19C、19E、19G)与SARS-CoV-2Wuhan-1(图19B-C)、BA.5(图19D-E)或BQ.1.1(图21F-G)S蛋白的结合进行了测试。基于对接种疫苗后28天获得的血清进行的ELISA测试,用二价ChAd-CoV-2S(Wuhan)和ChAd-CoV-2-S(BA.5)进行鼻内免疫与相应的单价疫苗组分相比,提供了针对Wuhan-1、BA.5和BQ.1.1刺突蛋白的更大的IgA和IgG反应广泛性。

[0397] 接下来,使用FRNT测试了Ch-AD-对照、ChAD-Wuhand-S、ChAd-BA.5和ChAD-二价进行鼻内免疫针对WA1/2020的中和活性。图20A显示了通过FRNT的针对WA1/2020的中和活性。图20B显示了通过FRNT的针对BA.5的中和活性。图20C显示FRNT对BF.7的中和活性。图20D显示了通过FRNT的针对BQ.1.1的中和活性。图20E显示了通过FRNT的针对XBB.1.1的中和活性。每个点表示来自单个小鼠的数据并且是两个技术重复的平均值。图20F-H显示了中和数据,其绘制为给定疫苗(ChAd-SARS-CoV-2S(Wuhan-1,图20F)、ChAd-SARS-CoV-2-S(BA.5,图20G)或二价疫苗(ChAd-SARS-CoV-2S(Wuhan-1)+ChAd-SARS-CoV-2-S(BA.5),图20H)针对用于感染的所示SARS-CoV-2毒株的直接比较。

[0398] 所提供的数据显示,用二价ChAd-CoV-2S(Wuhan)和ChAd-CoV-2-S(BA.5)进行鼻内

免疫与相应的单价疫苗相比,提供了更强的针对Wuhan-1、BA.5和BQ.1.1病毒的血清中和抗体反应。

[0399] 最后,分析了在用SARS-CoV-2WA1/2020D614G(左)或OmicronBQ.1.1(右)激发后6dpi时肺(图21A)、鼻甲(图21B)和鼻冲洗液(图21C)中的病毒RNA水平。用二价ChAd-CoV-2S(Wuhan)和ChAd-CoV-2-S(BA.5)进行鼻内免疫与相应的单价疫苗相比,提供了更大的针对WA1/2020D614G和BQ.1.1病毒的肺部感染的保护。这对应于针对肺部炎症的改善保护,以及通过细胞因子水平测量的(图22)。

[0400] 等价物

[0401] 虽然本文已经描述和说明了几个发明实施方案,但本领域的普通技术人员将容易设想出用于执行功能和/或获得本文所述的结果和/或一个或多个优点的各种其他手段和/或结构,并且这些变化和/或修改中的每一个都被视为在本文所述的发明实施方案的范围内。更一般地,本领域的技术人员将容易理解,本文所述的所有参数、尺寸、材料和配置都旨在是示例性的,并且实际参数、尺寸、材料和/或配置将取决于使用发明教导的具体应用。本领域的技术人员将认识到或能够仅使用常规实验确定本文所述的特定发明实施方案的许多等价物。因此,应理解,前述实施方案仅以示例的方式呈现,并且在所附权利要求及其等价物的范围内,发明实施方案可以以不同于具体描述和要求保护的方式实施。本公开的发明实施方案指向本文所述的每个单独的特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法。此外,两个或更多个此类特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法的任意组合(在此类特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法不相互矛盾的情况下)均包含在本公开的发明范围内。

[0402] 本文公开的所有参考文献、专利和专利申请均通过引用就其各自被引用的主题而言(在某些情况下可能涵盖整个文件)并入。

[0403] 如本文中所用,说明书和权利要求书中的短语“和/或”应理解为指所连接要素的“任一或两者”,即在一些情况下结合存在而在另一些情况下分离存在的要素。用“和/或”列出的多个要素应以相同方式解释,即“一个或多个”要素如此结合。除了“和/或”条款中明确标识的要素之外,还可以任选地存在其他要素,无论这些要素与明确标识的要素相关还是无关。因此,作为非限制性实例,当与开放式语言(比如“包括”)结合使用时,在一个实施方案中,提及“A和/或B”可以仅指A(任选地包括除B之外的要素);在另一个实施方案中,仅指B(任选地包括除A之外的要素);在又一个实施例中,指A和B二者(任选地包括其他要素);等。

[0404] 如本文中所用,在本说明书和权利要求书中,“或”应理解为具有与如上述定义的“和/或”相同的含义。例如,当将列表中的项目分开时,“或”或“和/或”应解释为包含性的,即,包括多个或一系列要素中的至少一个,但也包括超过一个,以及任选地,包括另外未列出的项目。只有明确表示相反的术语,比如“仅一个”或“恰好一个”,或者在权利要求书中使用时的“由……组成”,才指包括多个或一系列要素中的恰好一个要素。一般而言,如本文中所用,术语“或”仅在排他性术语(比如“任一”、“一个”、“仅一个”或“恰好一个”)前面时才应解释为表示排他性替代方案(即“一个或另一个但不是两者”)。“基本上由……组成”在权利要求书中使用时应具有其在专利法领域中使用的普通含义。

[0405] 如本文中所用,在说明书和权利要求书中,涉及一个或多个要素的列表的短语“至少一个”,应理解为指选自要素列表中的任何一个或多个要素的至少一个要素,但不一定包

括要素列表中具体列出的每个要素中的至少一个,且不排除要素列表中的任何要素组合。该定义还允许除了短语“至少一个”所指的要素列表中具体标识的要素之外,还可以任选地存在要素,无论与具体标识的要素相关还是不相关。因此,作为非限制性实例,“A和B中的至少一个”(或等价地,“A或B中的至少一个”,或等价地,“A和/或B中的至少一个”)在一个实施方案中,可以指至少一个,任选地包括超过一个A,不存在B(并且任选地包括除B之外的要素);在另一个实施方案中,指至少一个,任选地包括超过一个B,不存在A(并且任选地包括除A之外的要素);在又一个实施例中,指至少一个,任选地包括超过一个A,以及至少一个,任选地包括超过一个B(并且任选地包括其他要素);等。

[0406] 除非另有定义,本文中所用的所有技术术语具有本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。如本说明书和所附权利要求书中所用,单数形式“一个/种(a)”、“一个/种(an)”和“该/所述”包括复数指代,除非上下文另有明确规定。除非另有说明,本文中对“或”的任何提及均旨在涵盖“和/或”。

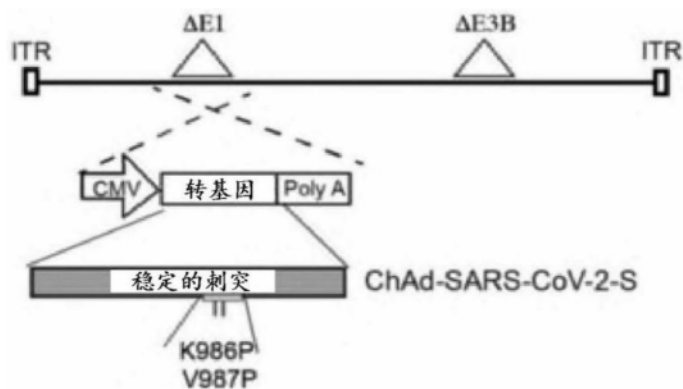


图1A

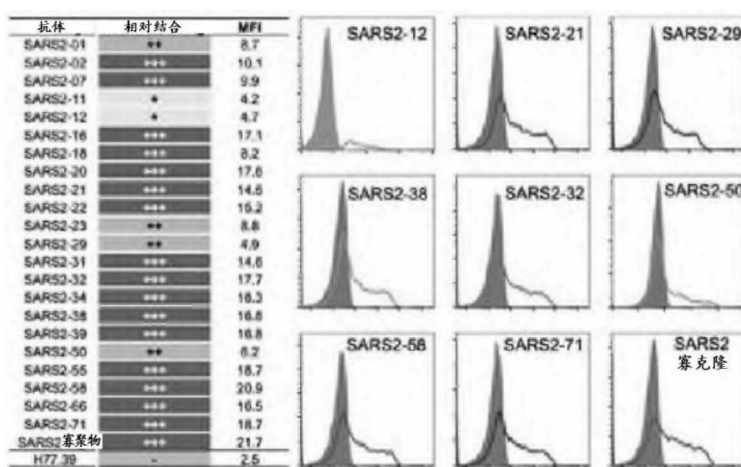


图1B

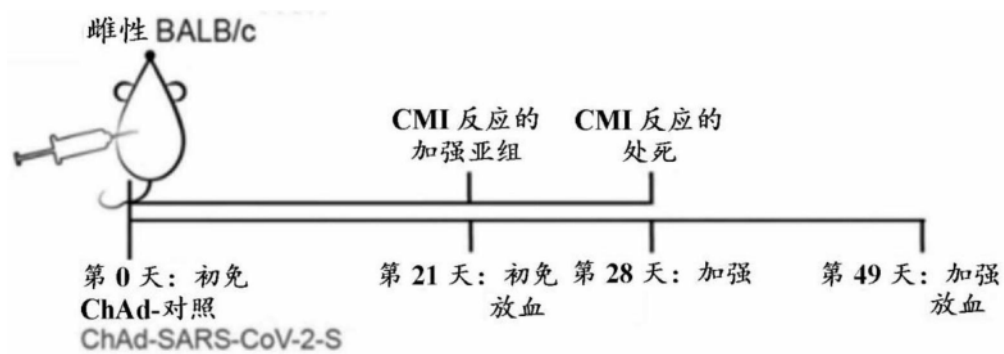


图1C

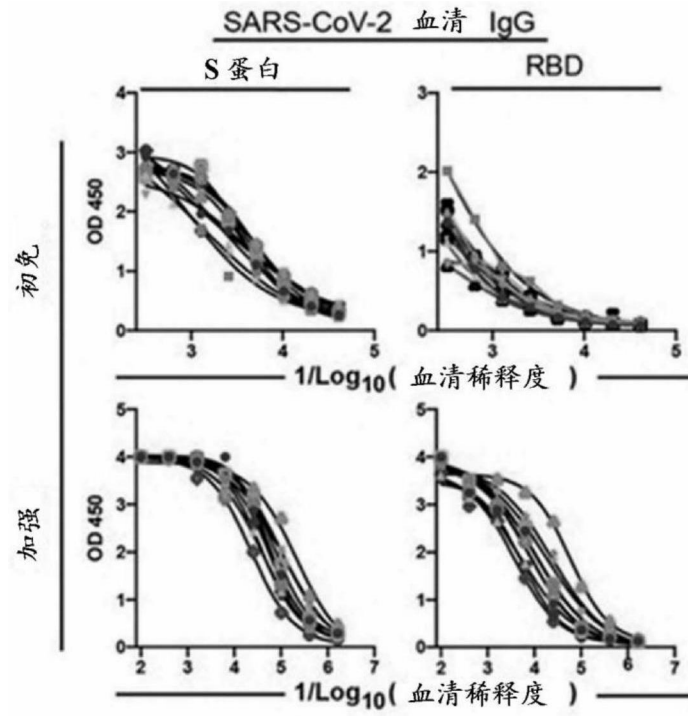


图1D

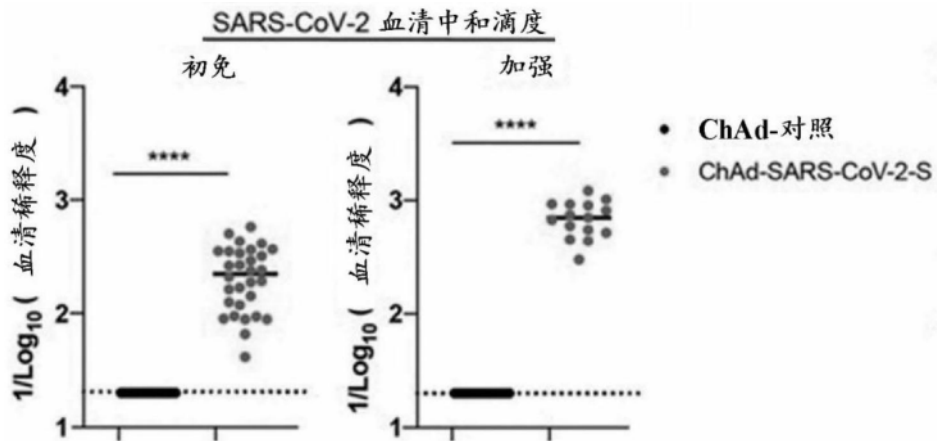


图1E

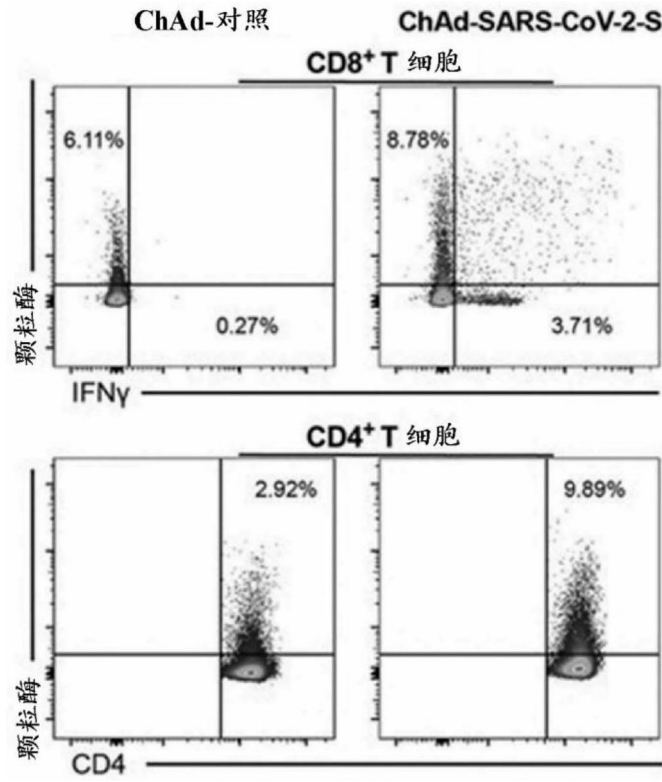


图1F

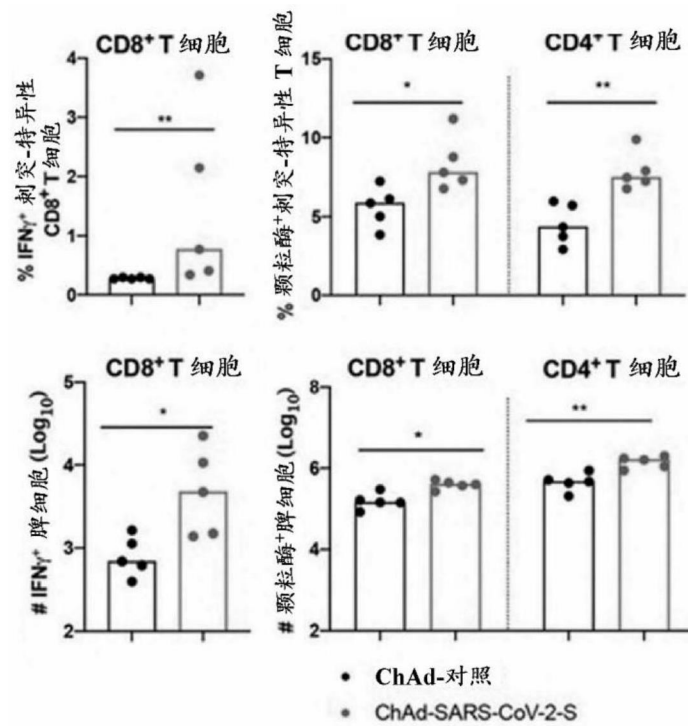


图1G

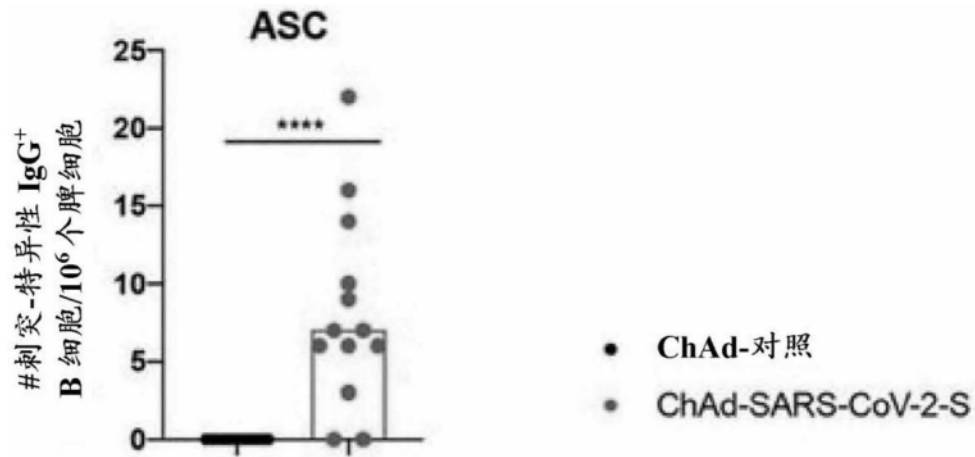


图1H

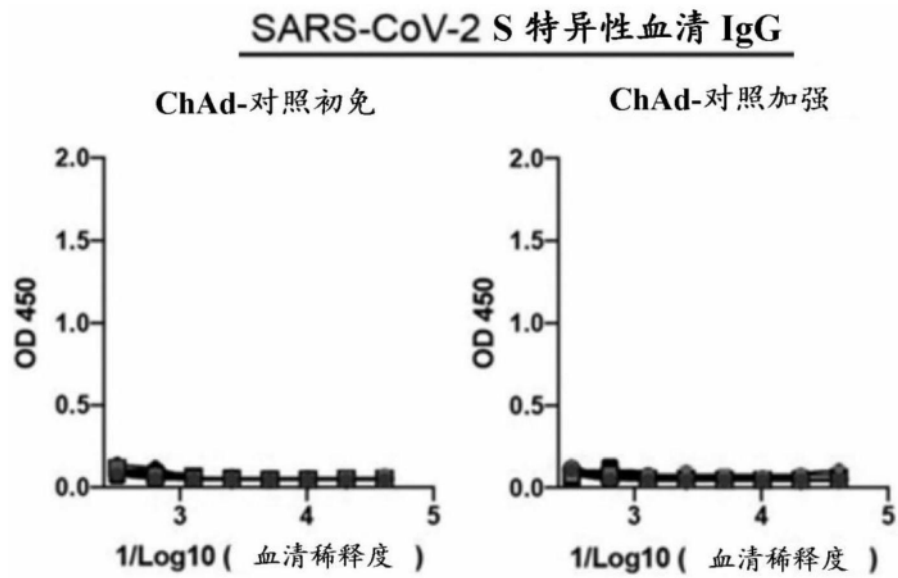


图2A

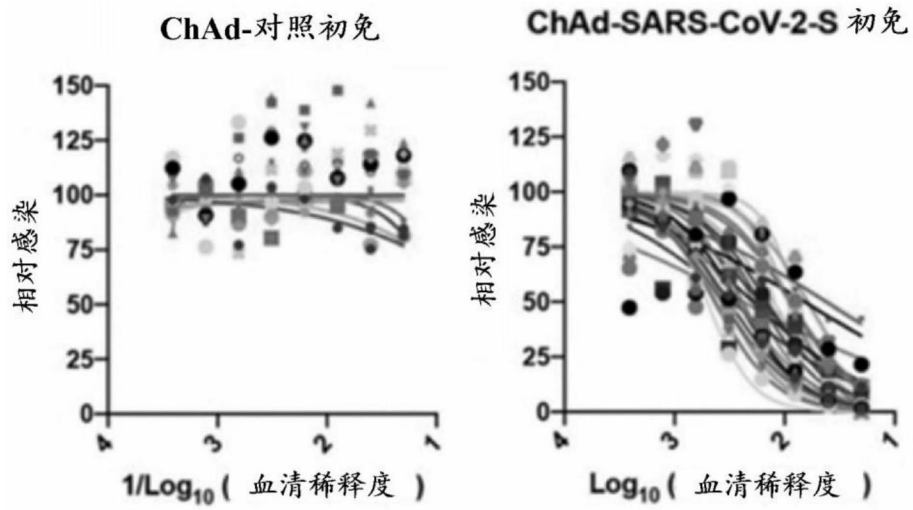


图2B

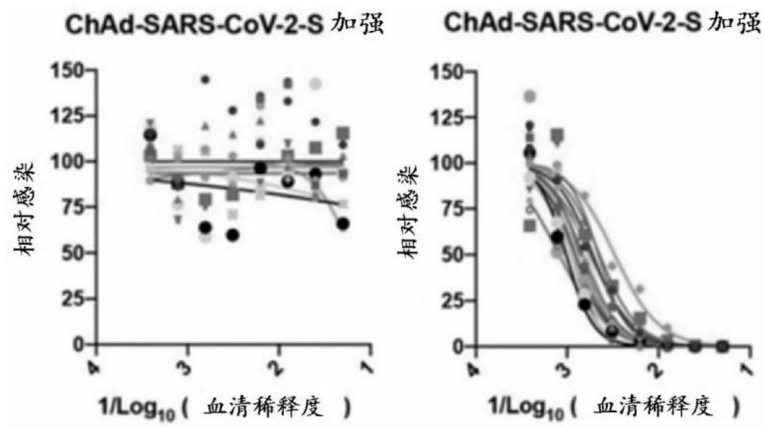


图2C

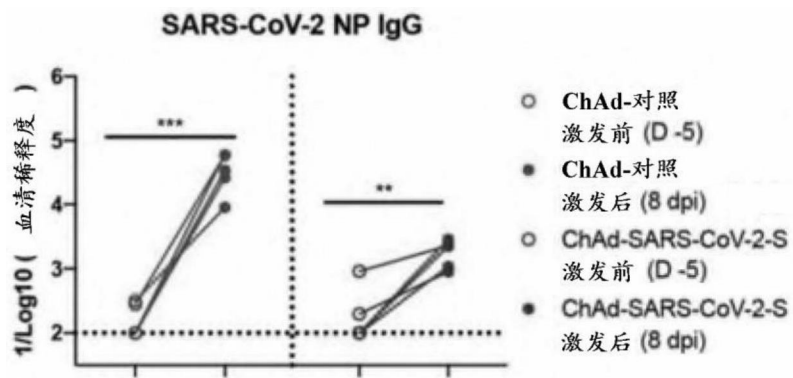


图2D

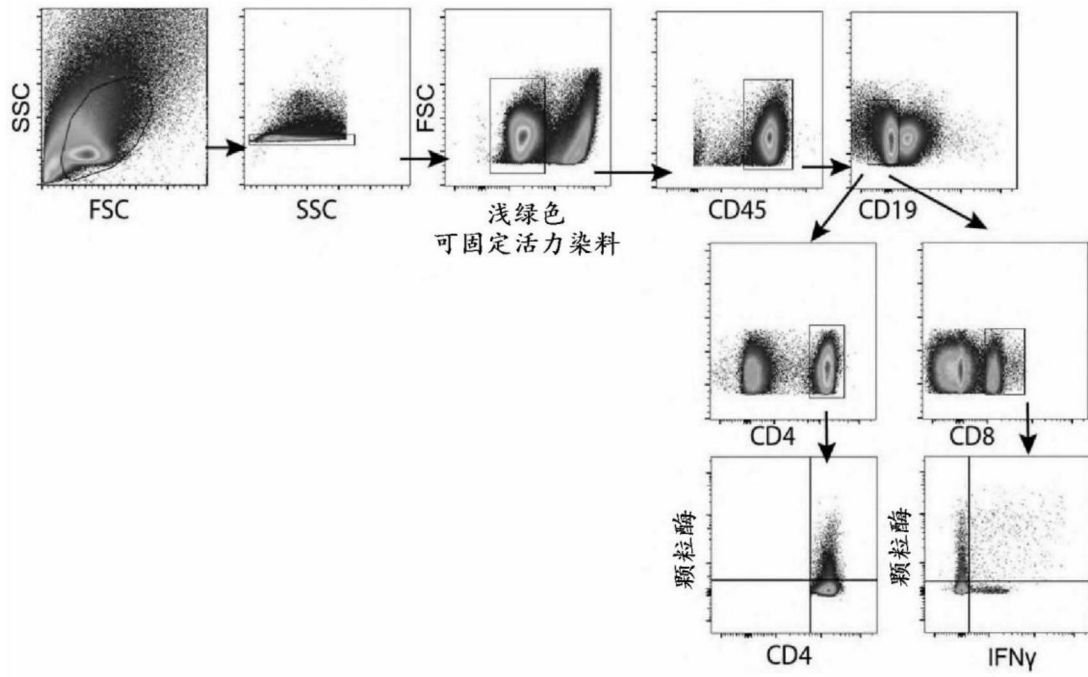


图3

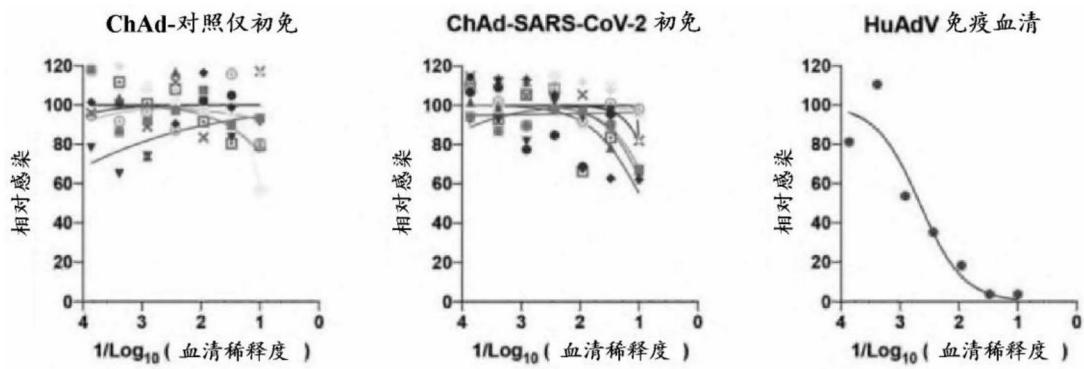


图4A

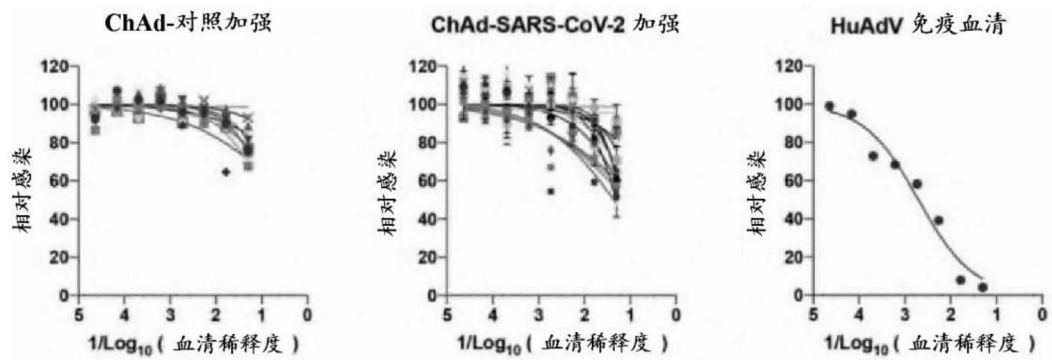


图4B

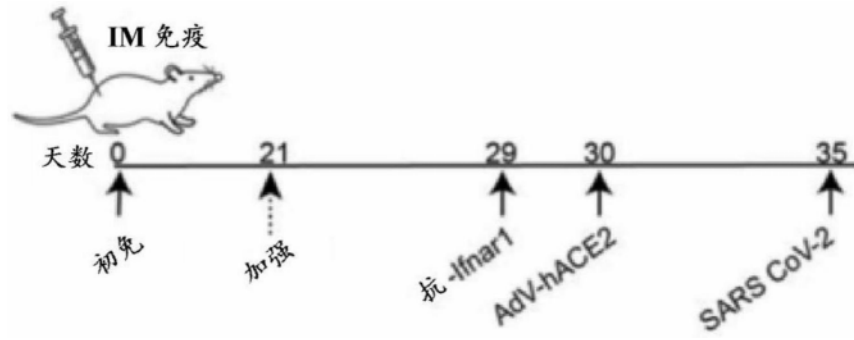


图5A

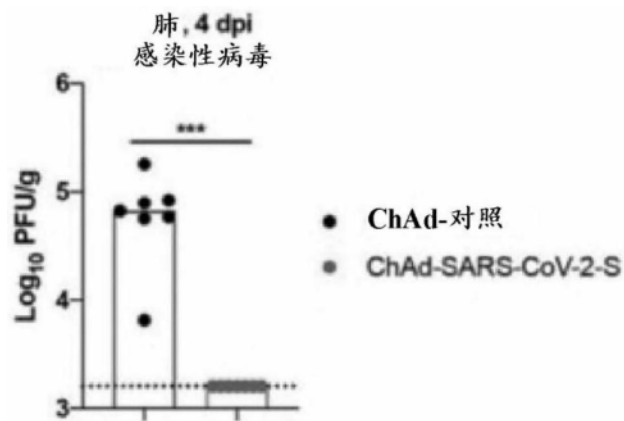


图5B

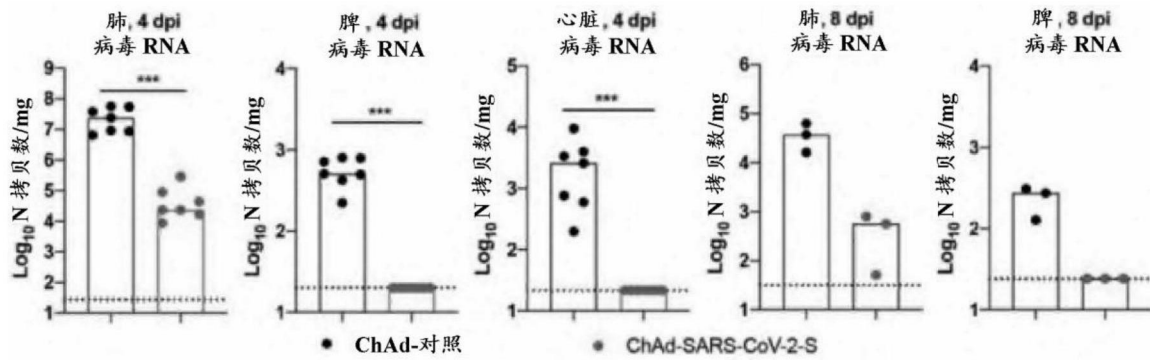


图5C

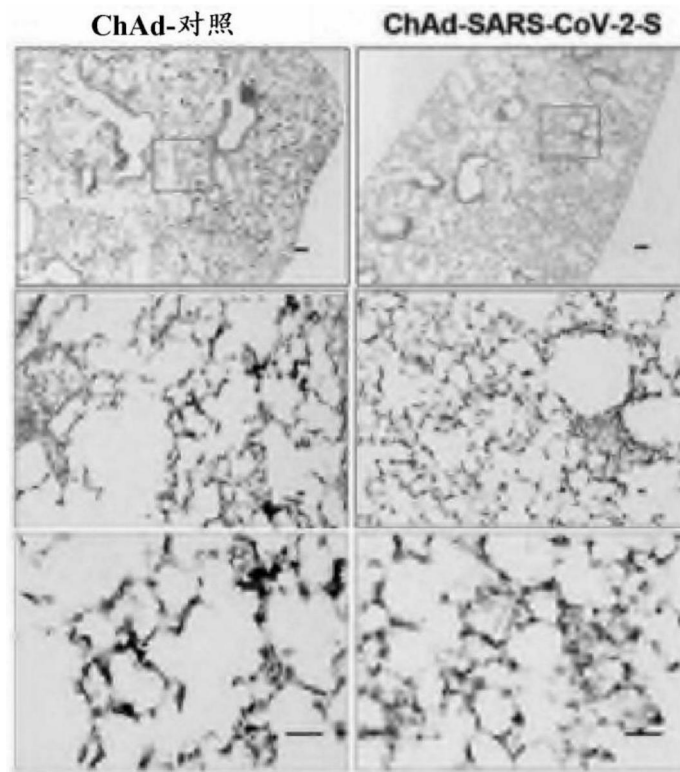


图5D

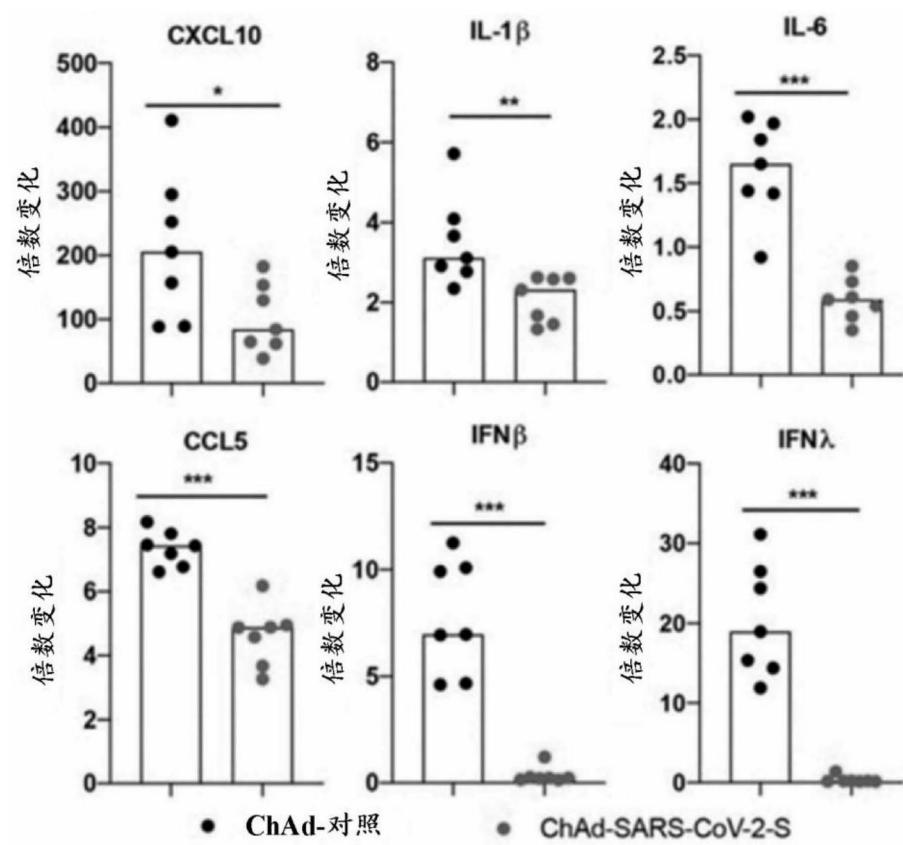


图5E

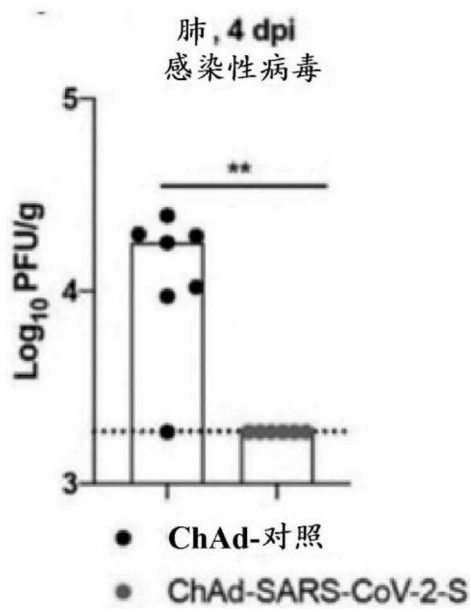


图5F

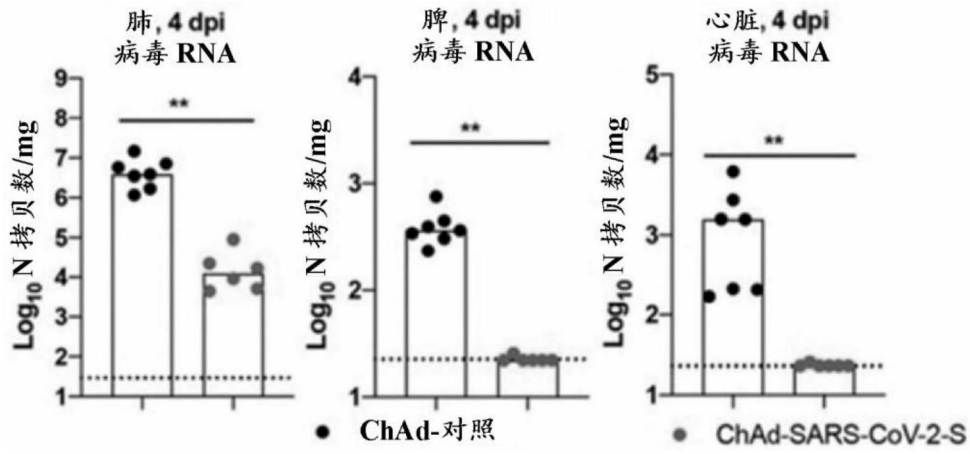


图5G

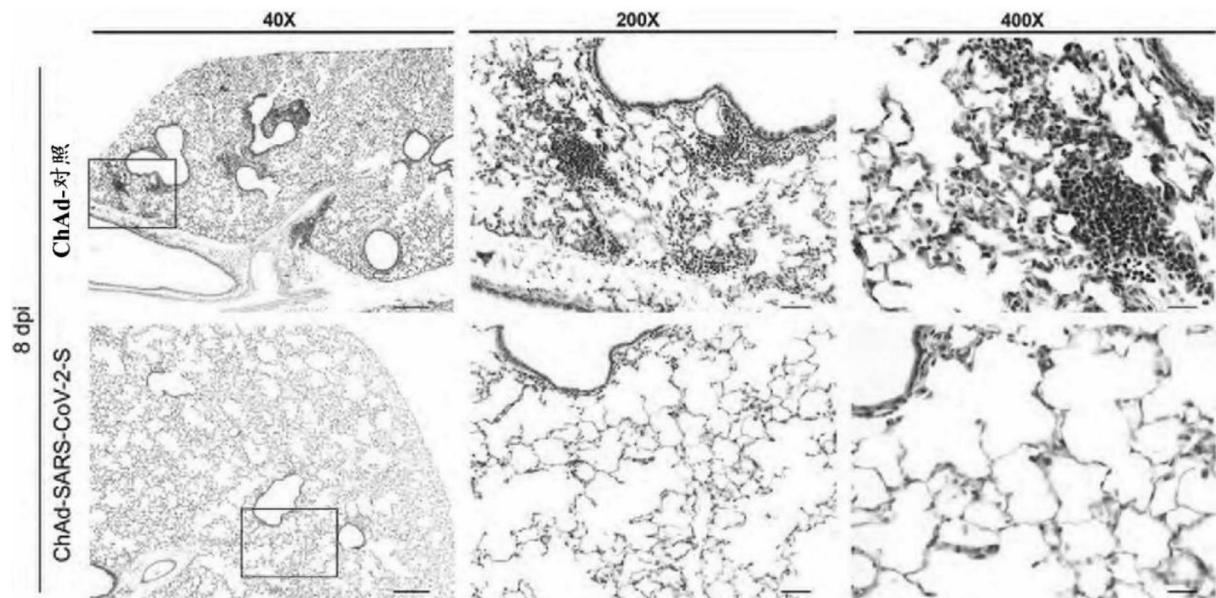


图6

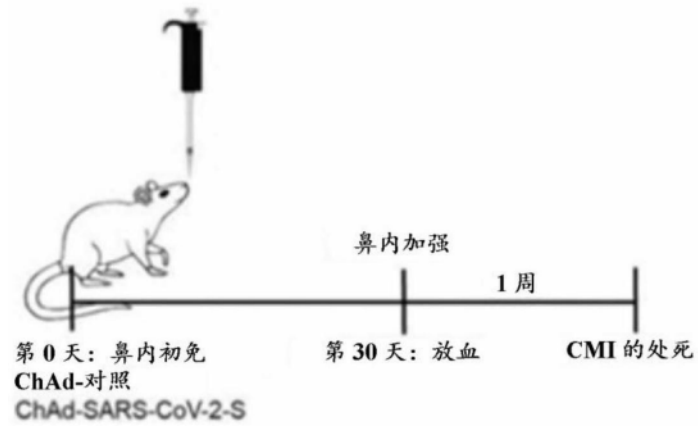


图7A

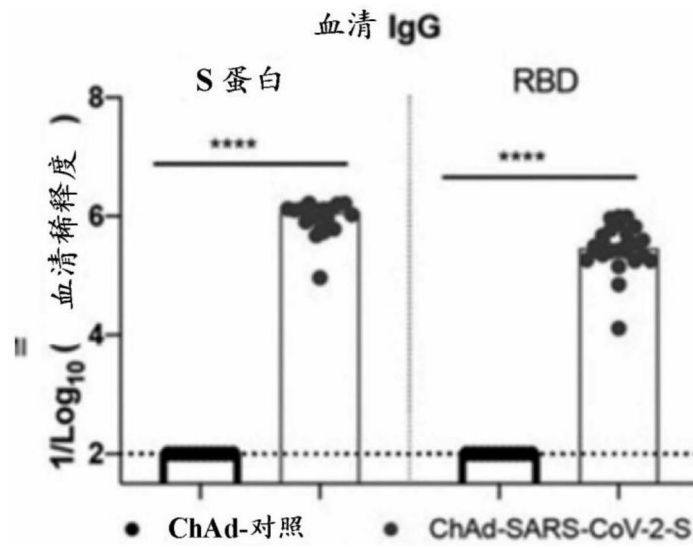


图7B

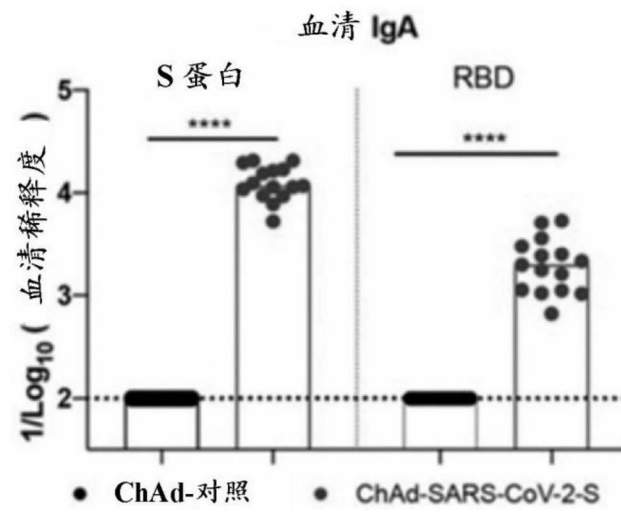


图7C

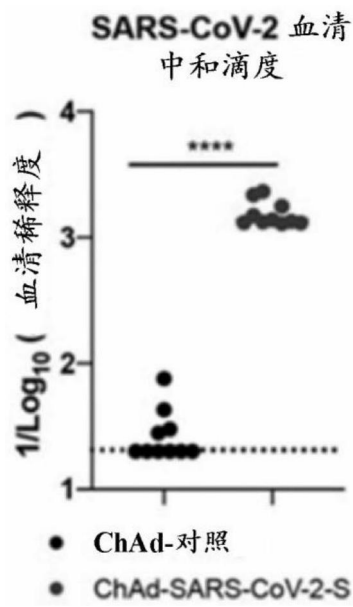


图7D

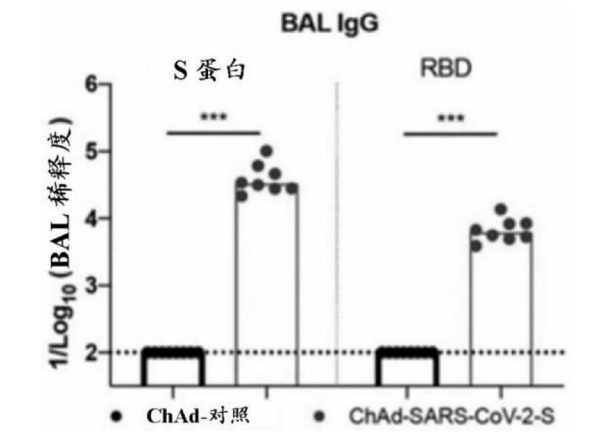


图7E

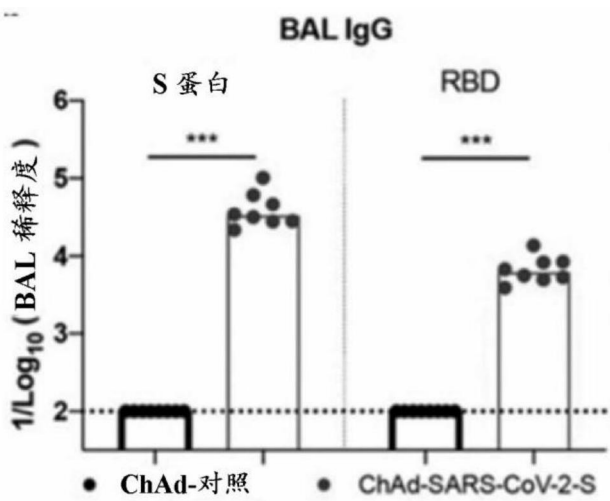


图7F

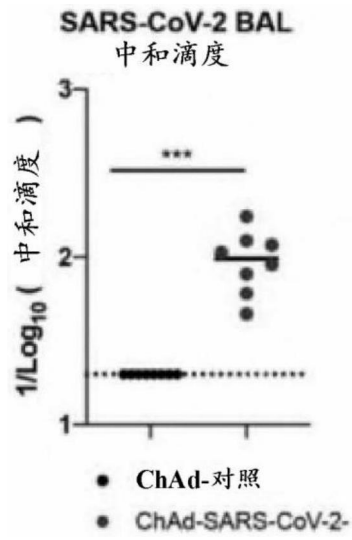


图7G

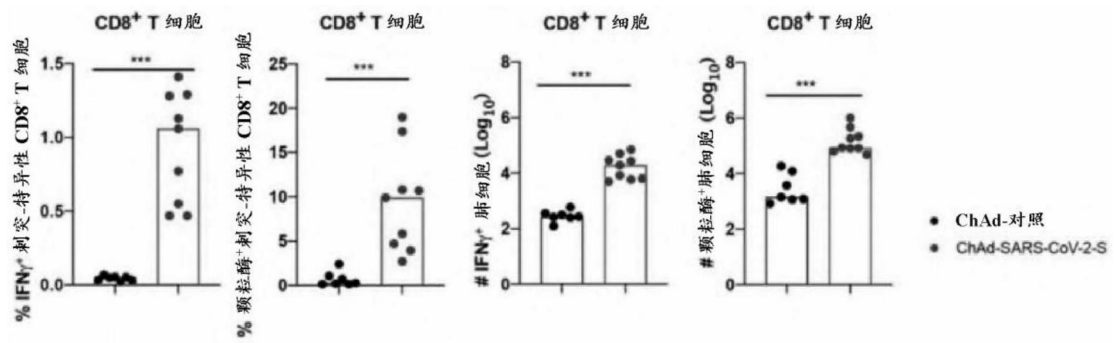


图7H

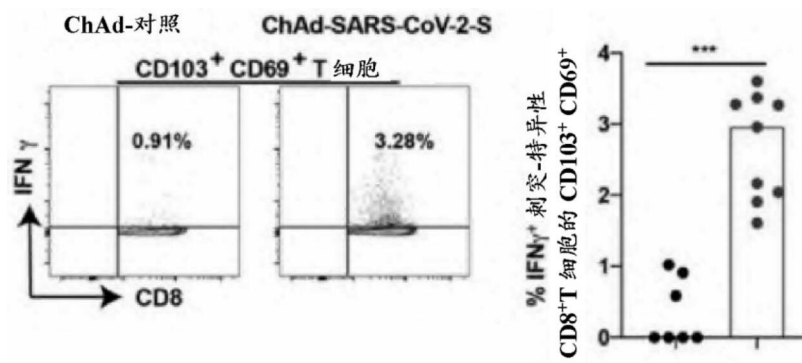


图7I

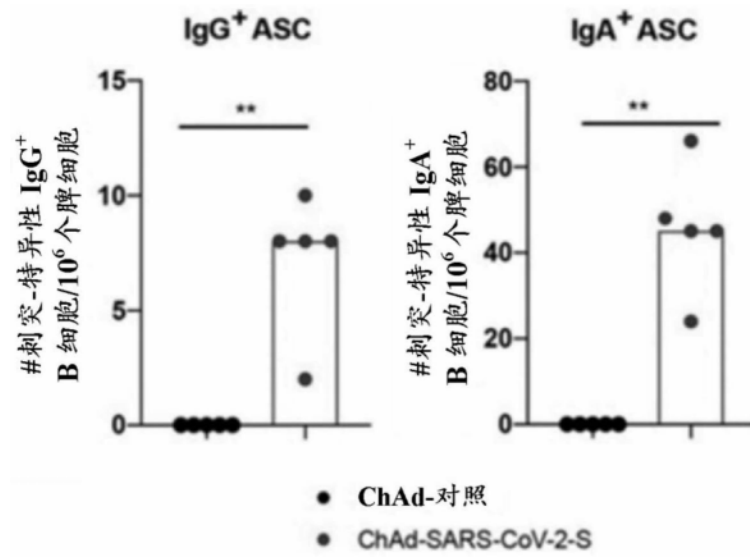


图7J

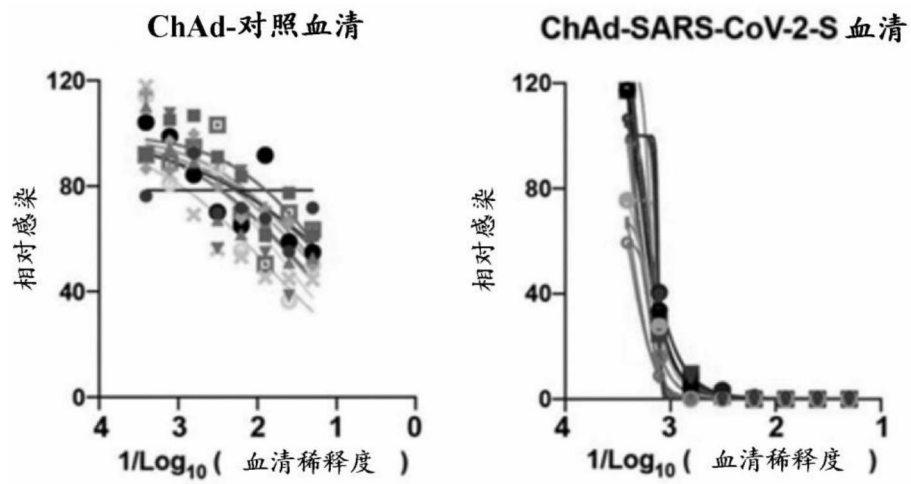


图8A

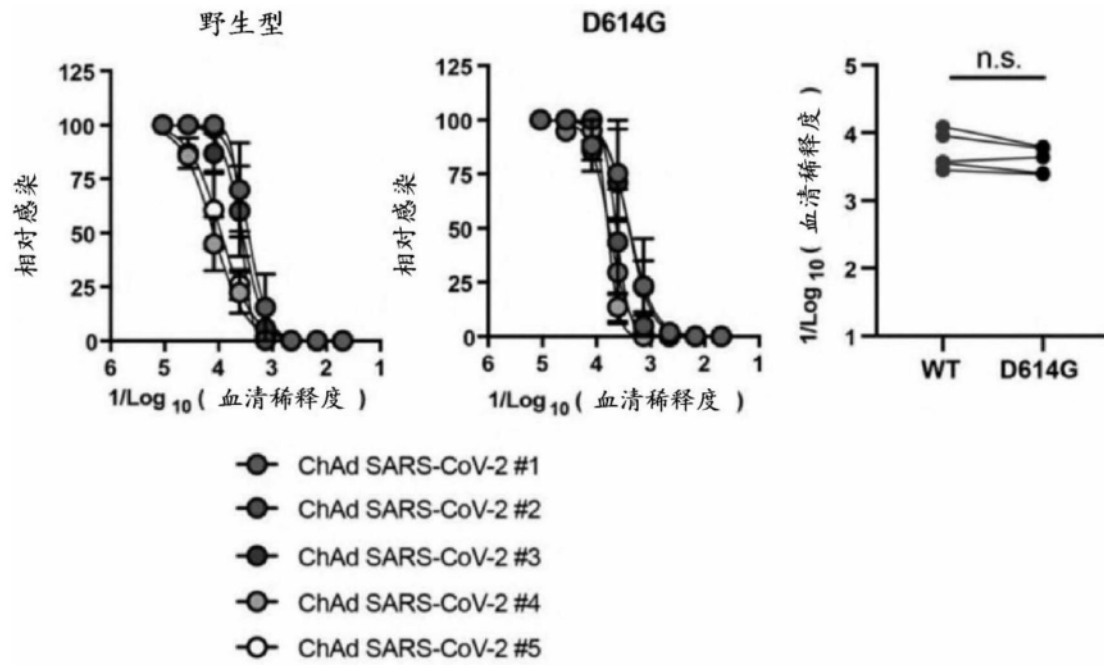


图8B

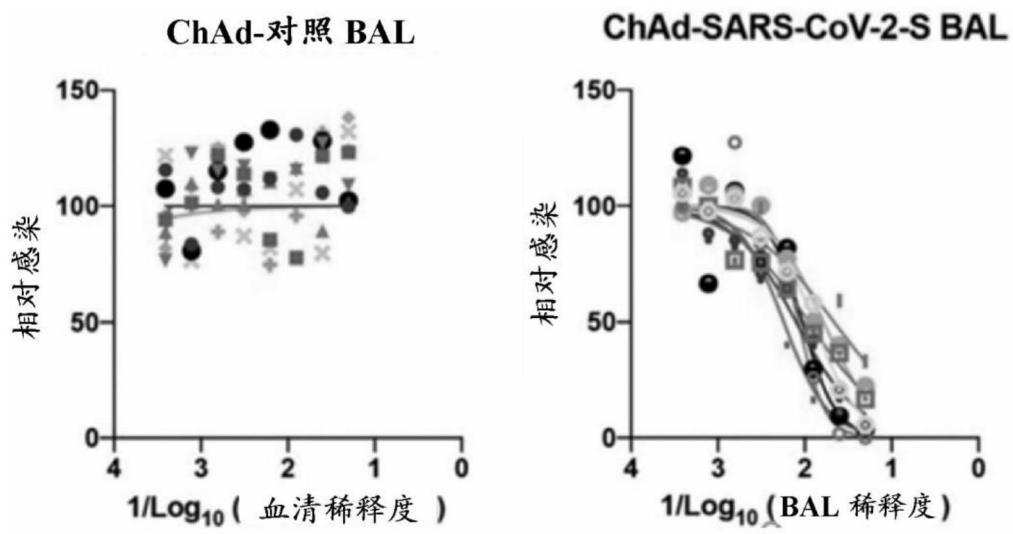


图8C

肺感染性病毒, 4 dpi

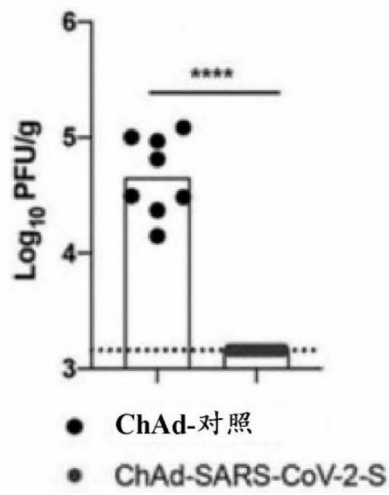


图9A

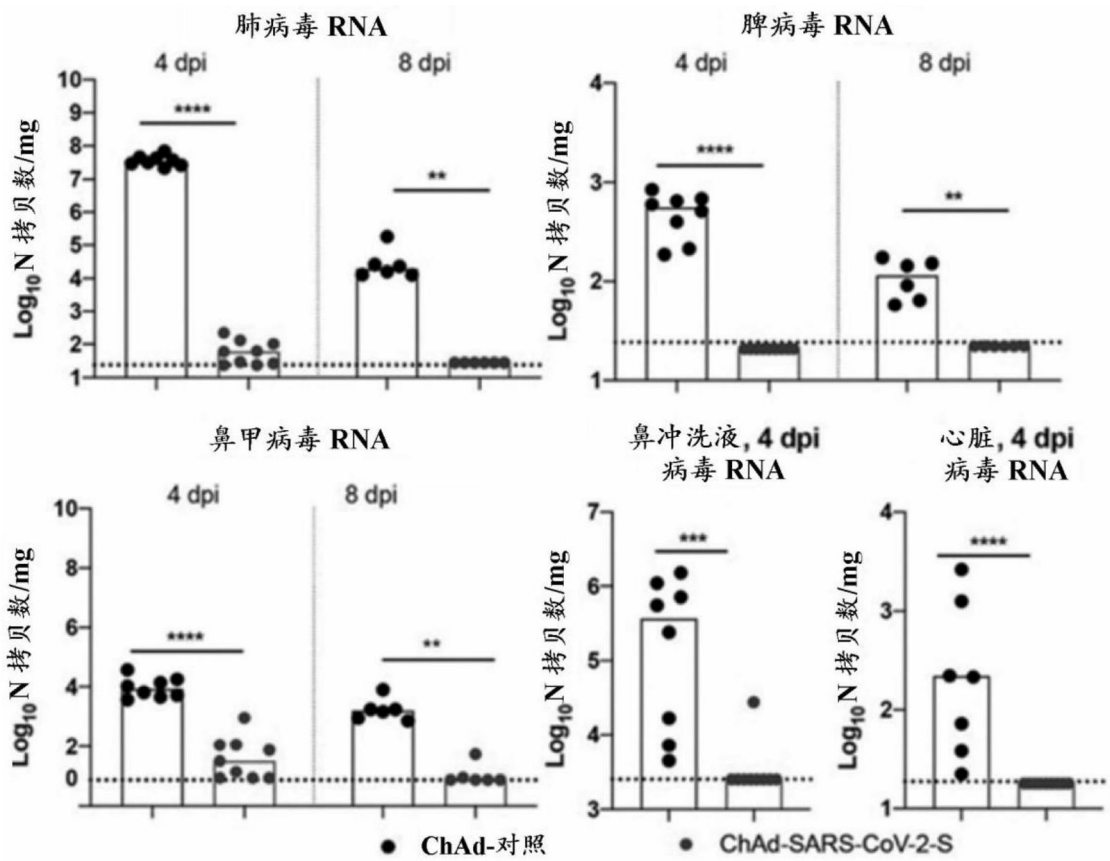


图9B

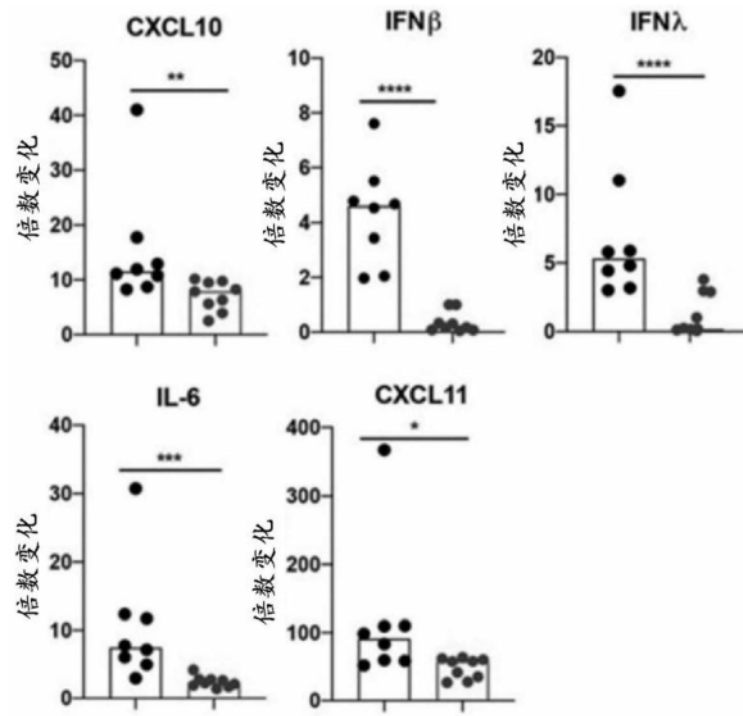


图9C

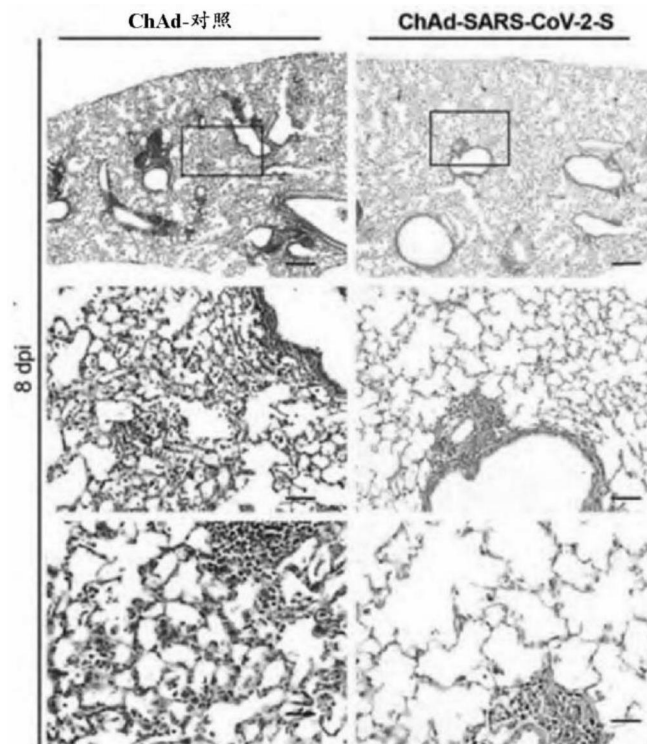


图9D

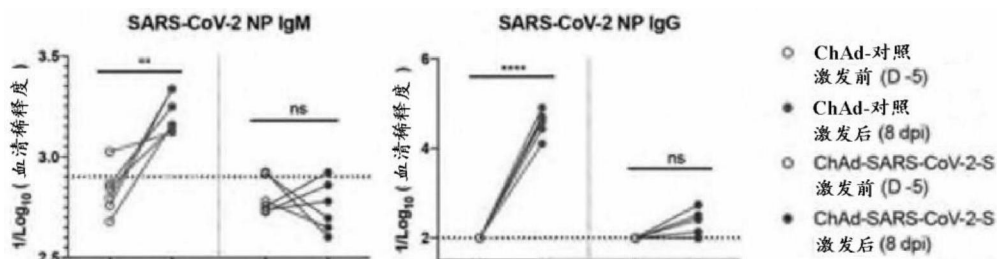


图9E

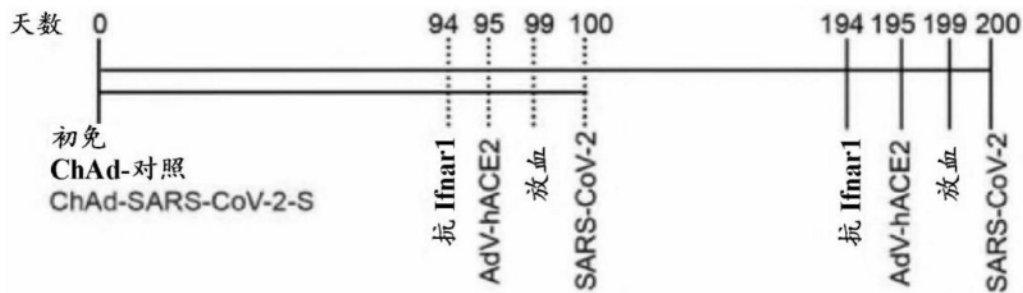


图10A

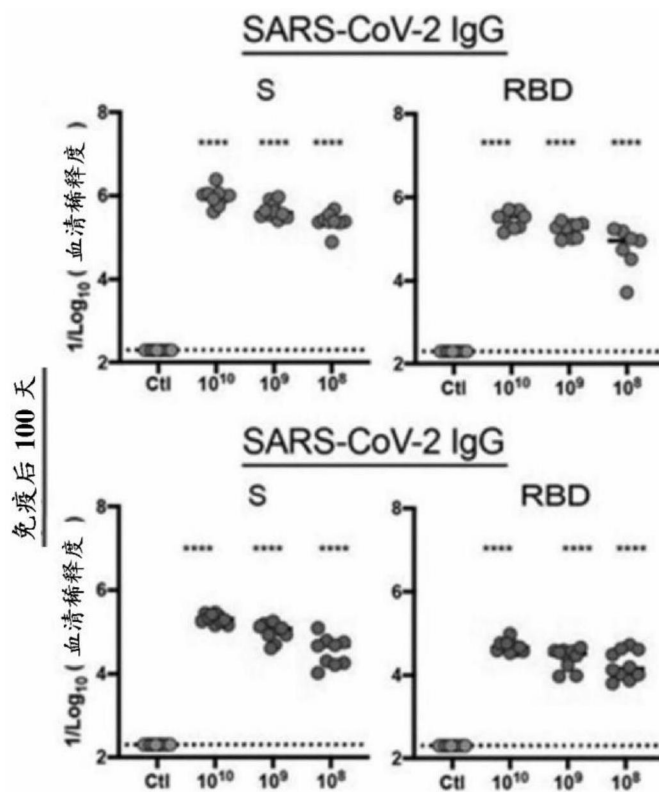


图10B

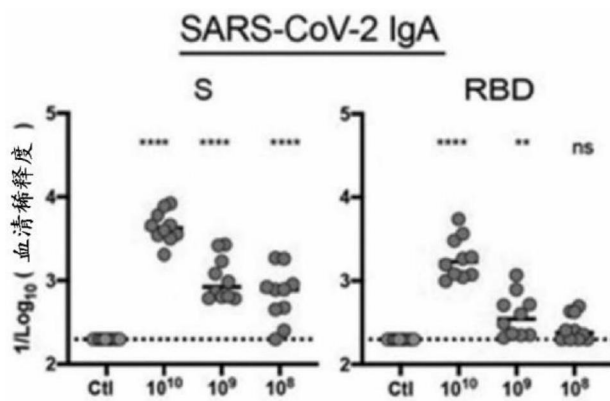


图10C

血清中和滴度

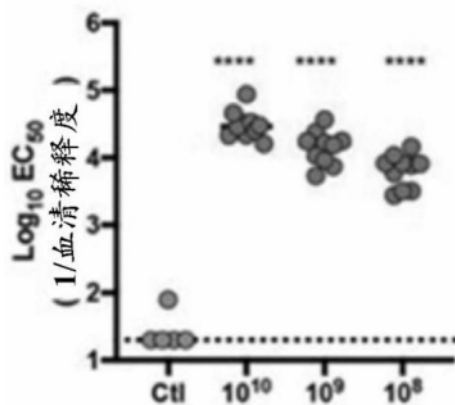


图10D

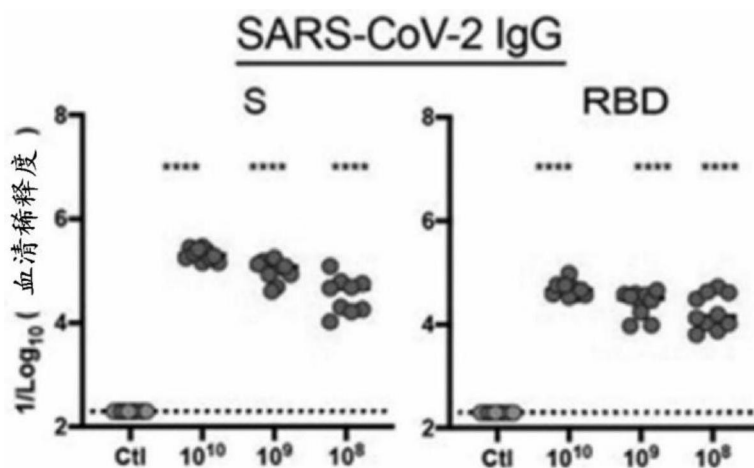


图10E

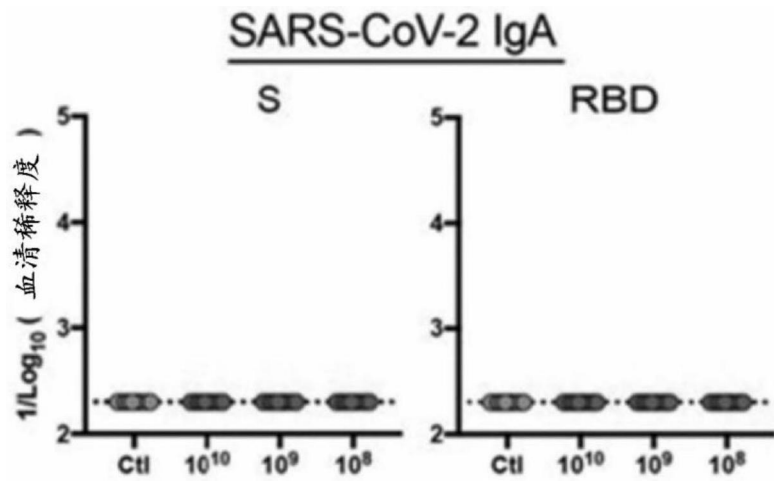


图10F

血清中和滴度

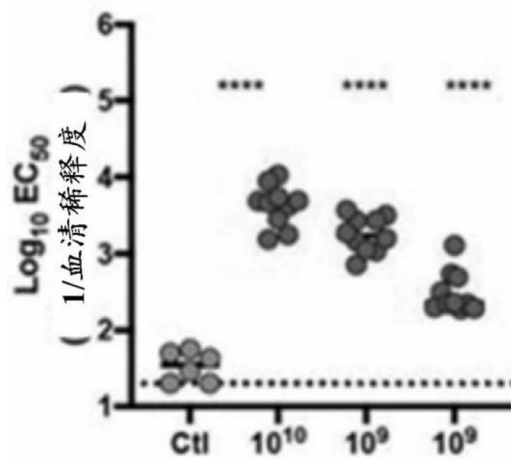


图10G

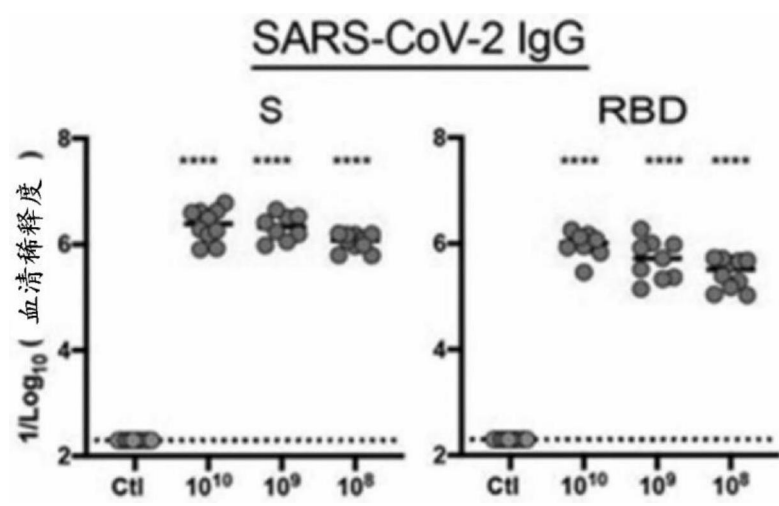


图10H

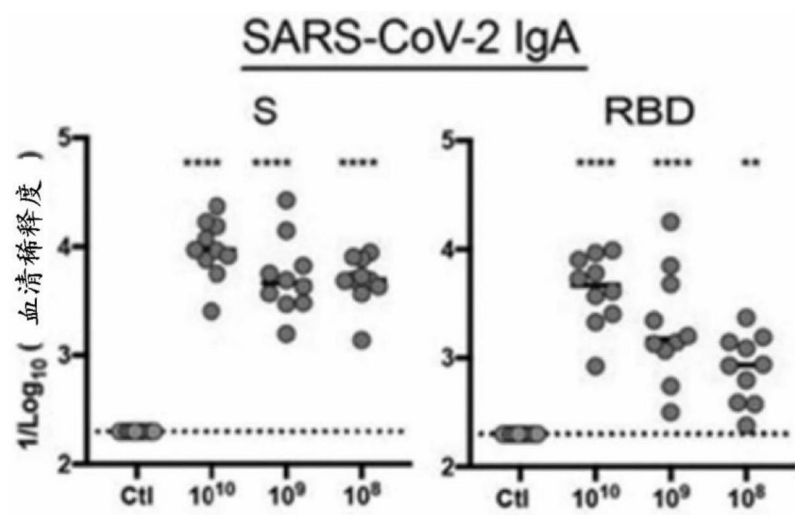


图10I

血清中和滴度

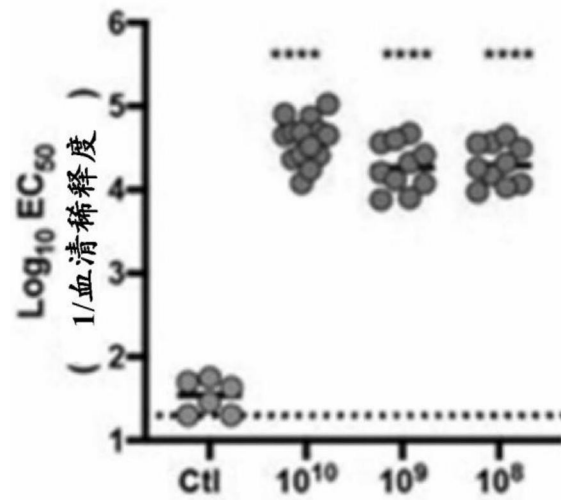


图10J

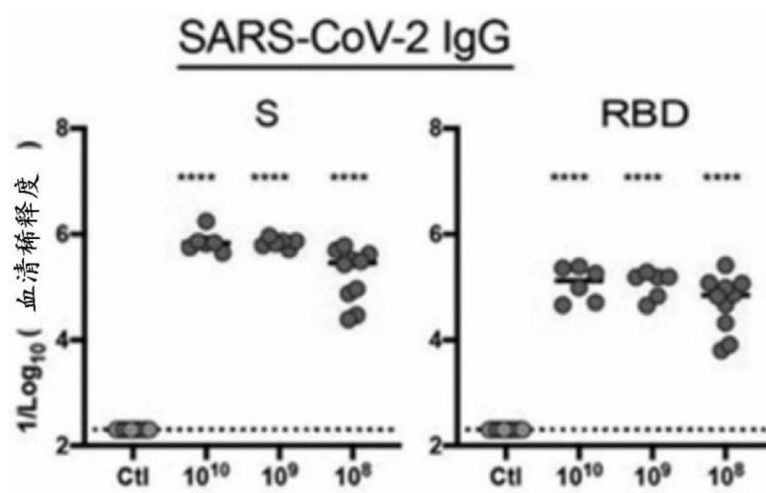


图10K

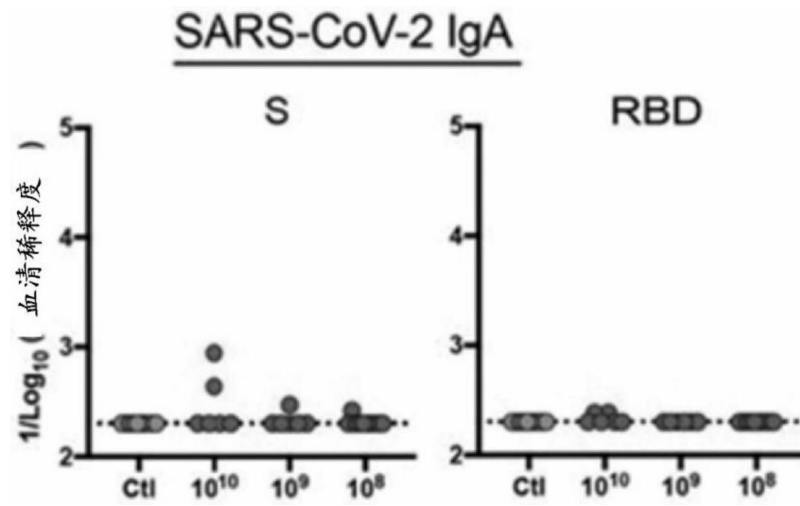


图10L

血清中和滴度

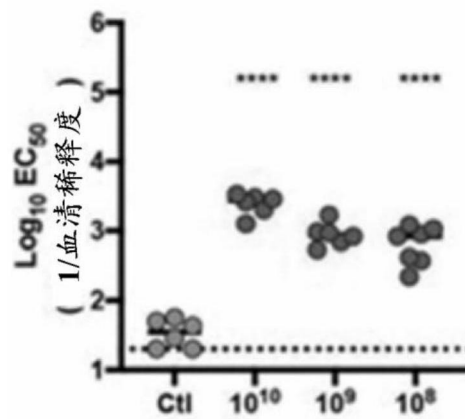


图10M



图10N

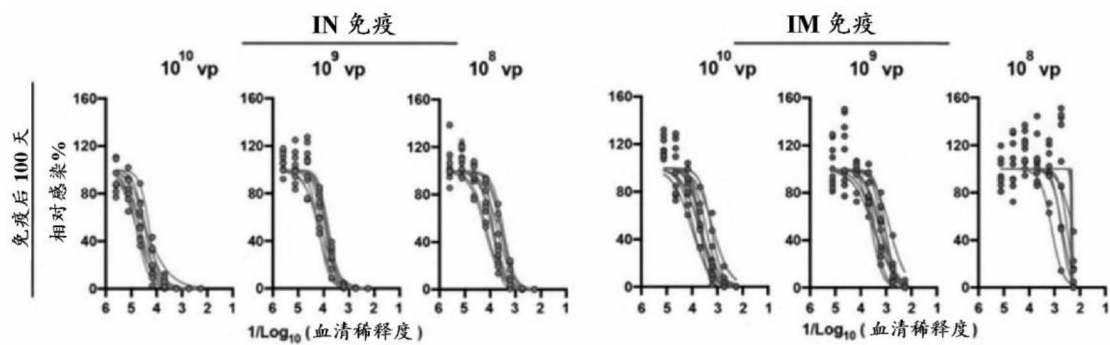


图11A

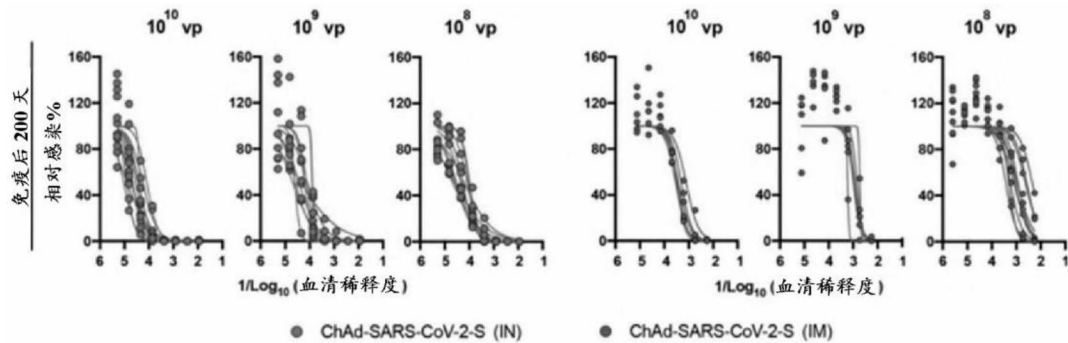


图11B

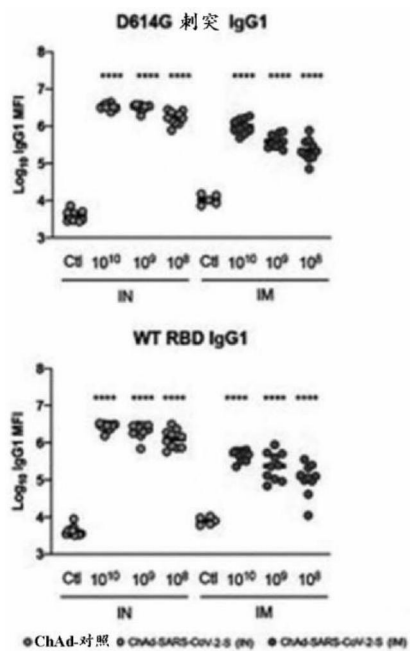


图12A

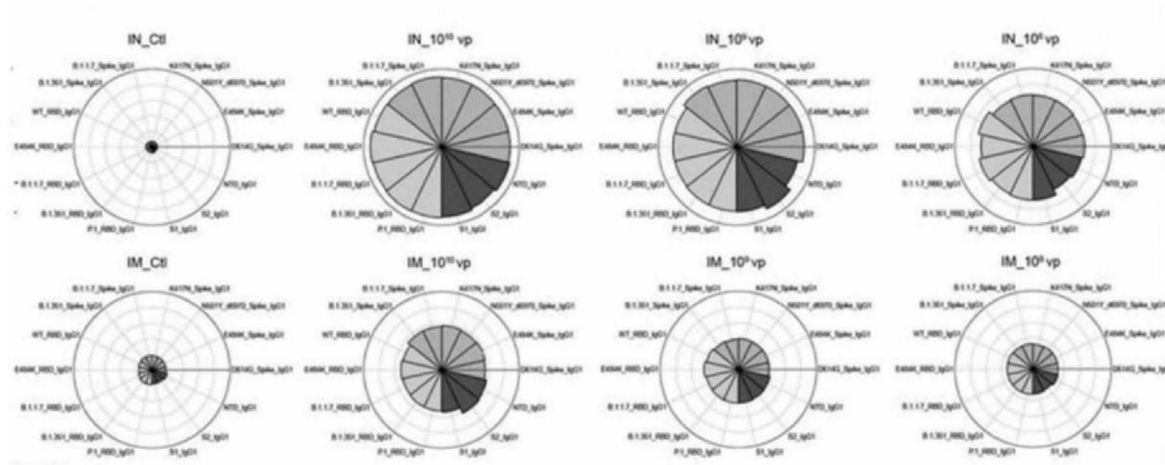


图12B

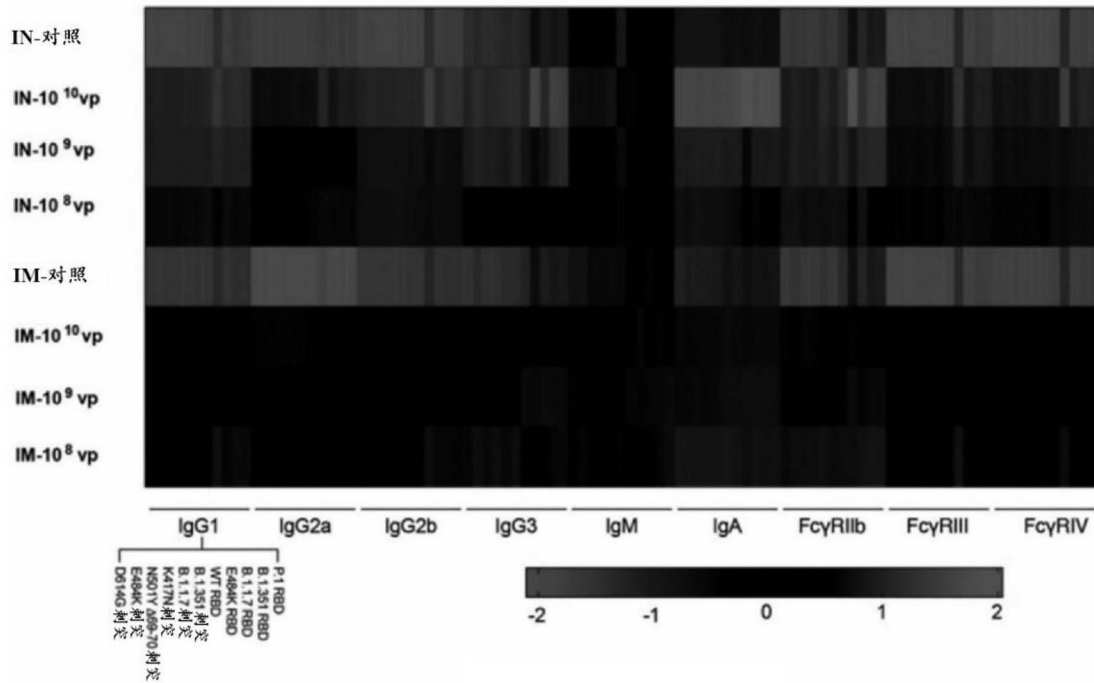


图12C

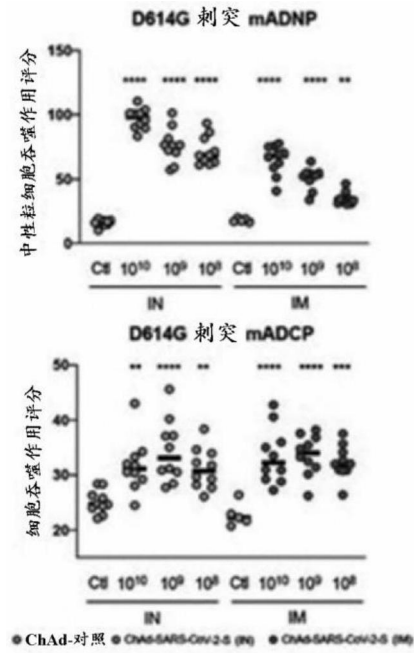


图12D

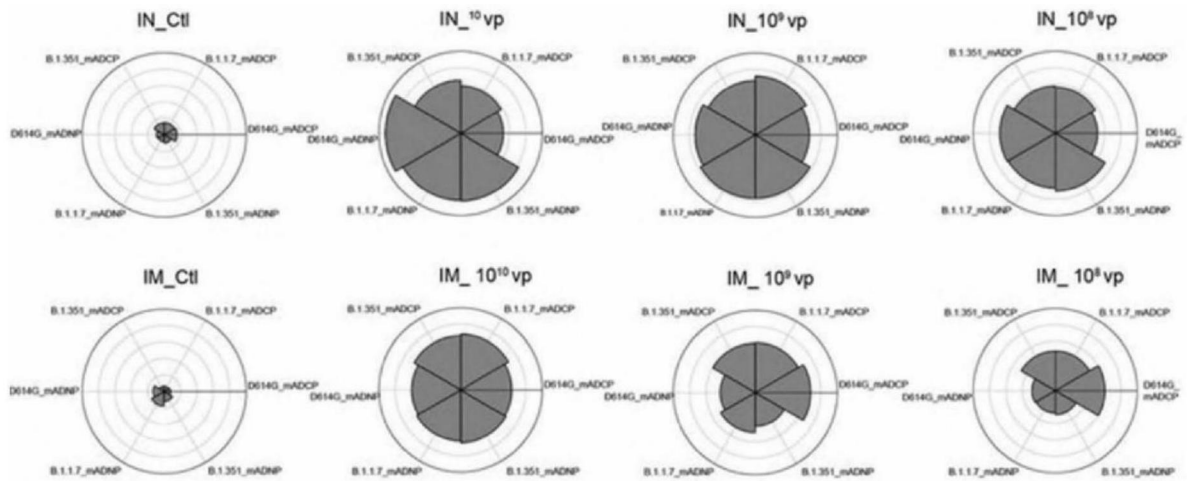


图12E

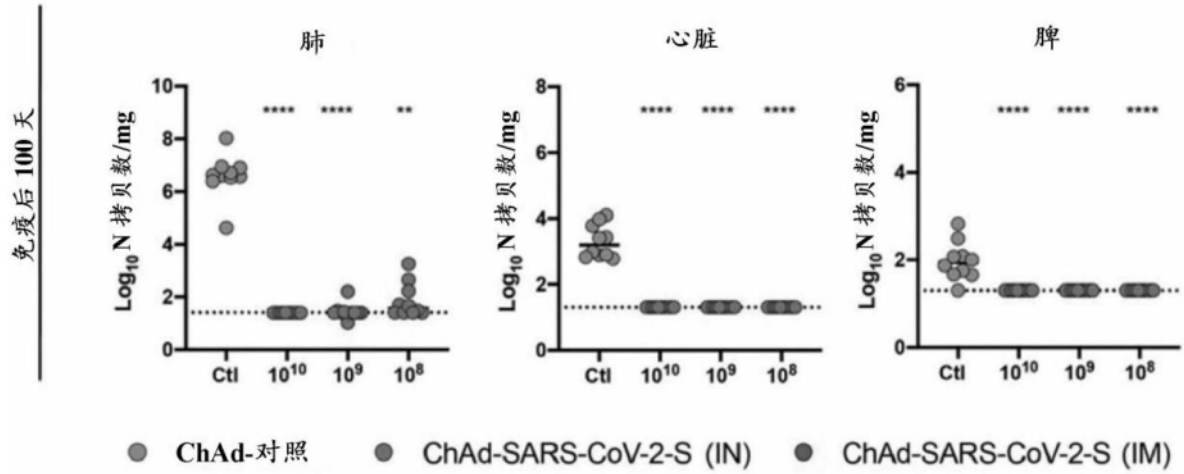


图 13A

图 13B

图 13C

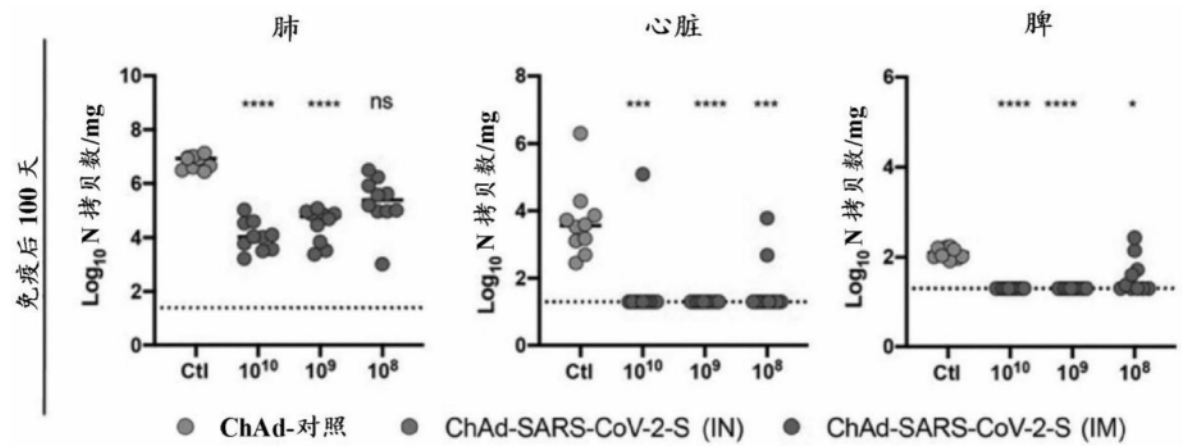


图 13D

图 13E

图 13F

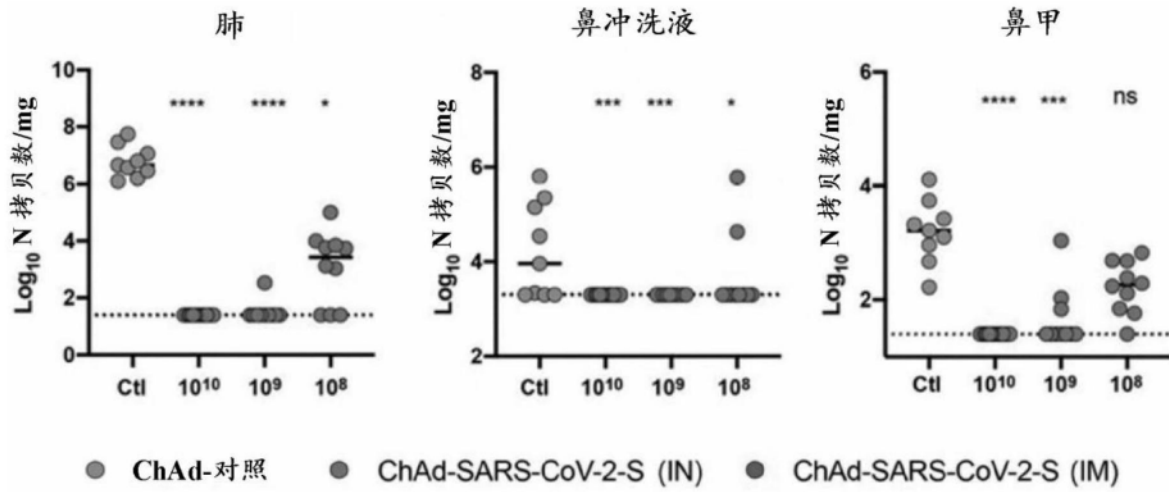


图 13G

图 13H

图 13I

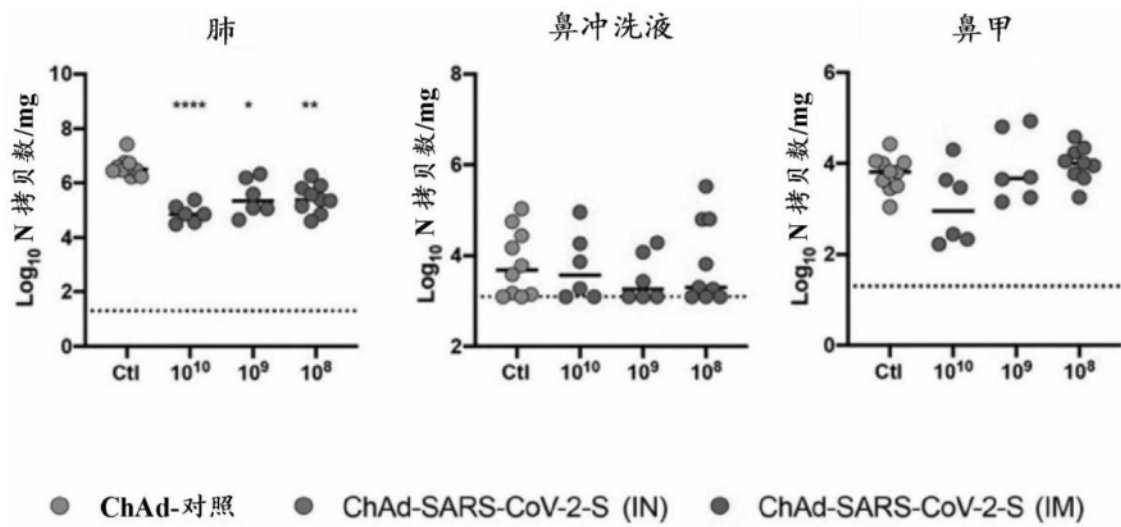


图 13J

图 13K

图 13L

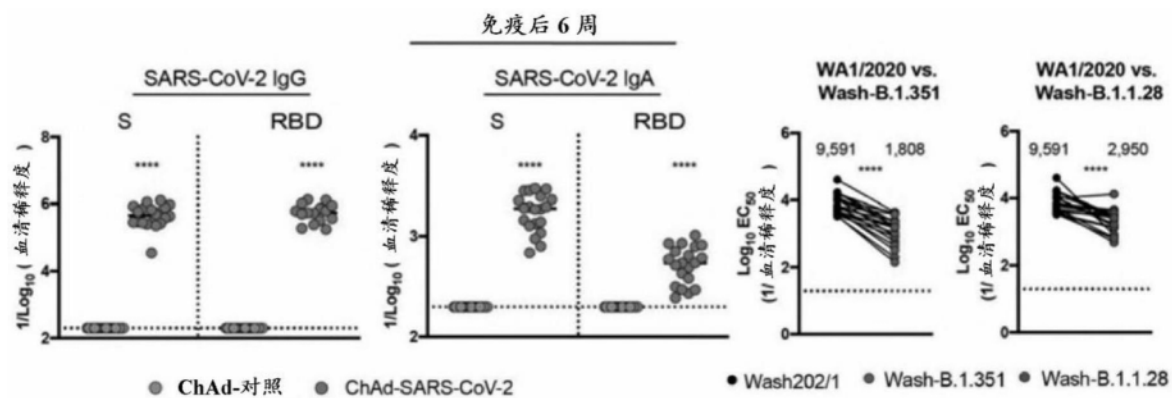


图 14A

图 14B

图 14C

图 14D

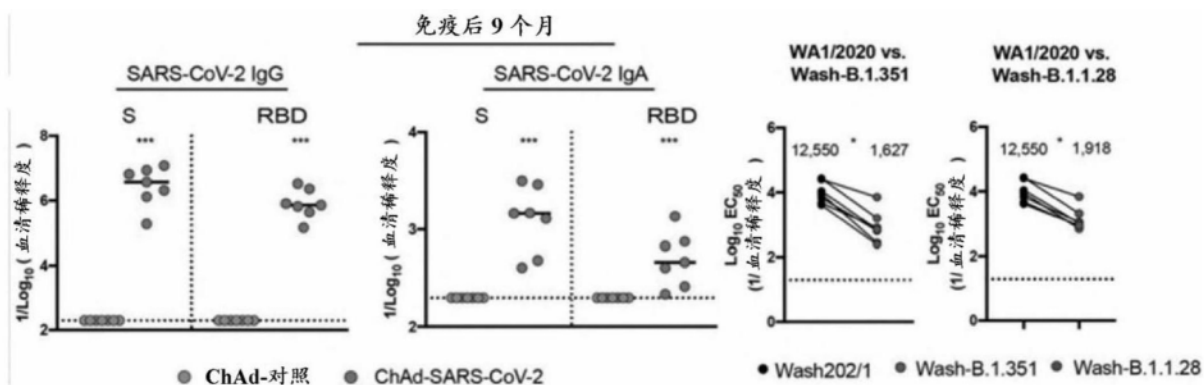


图 14E

图 14F

图 14G

图 14H

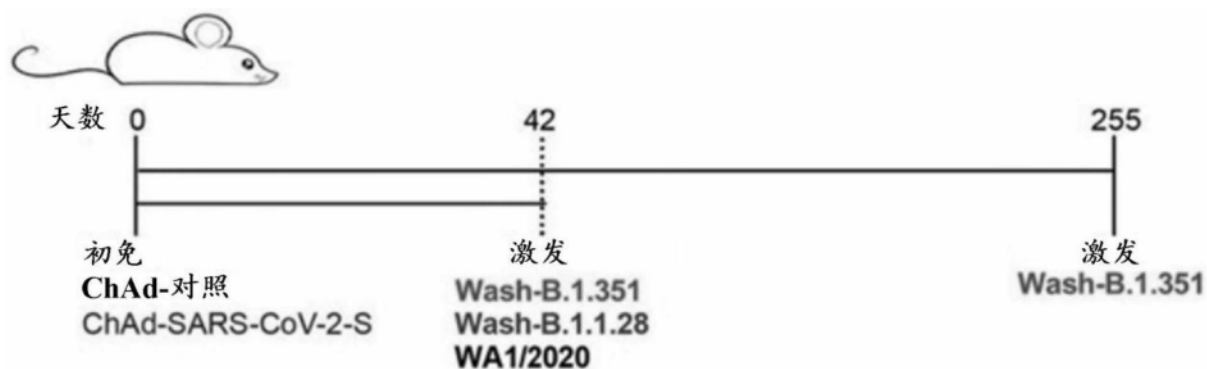
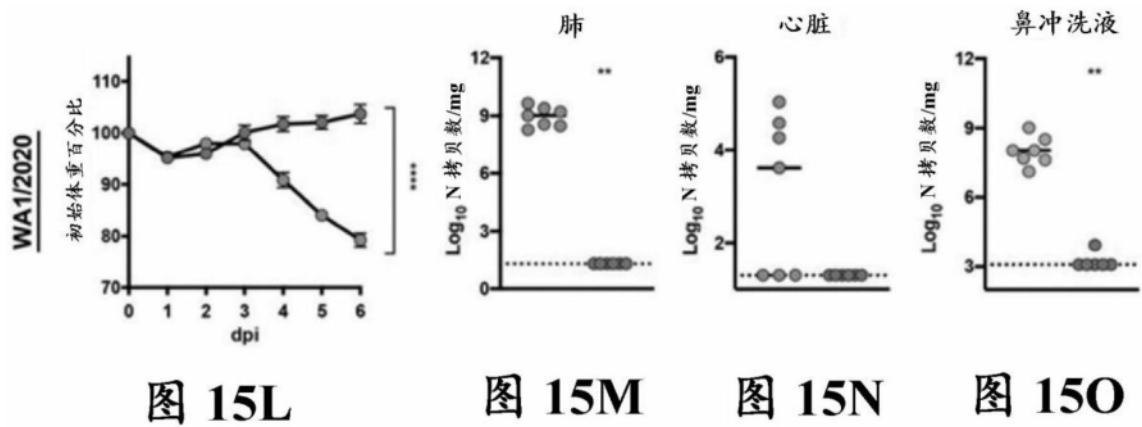
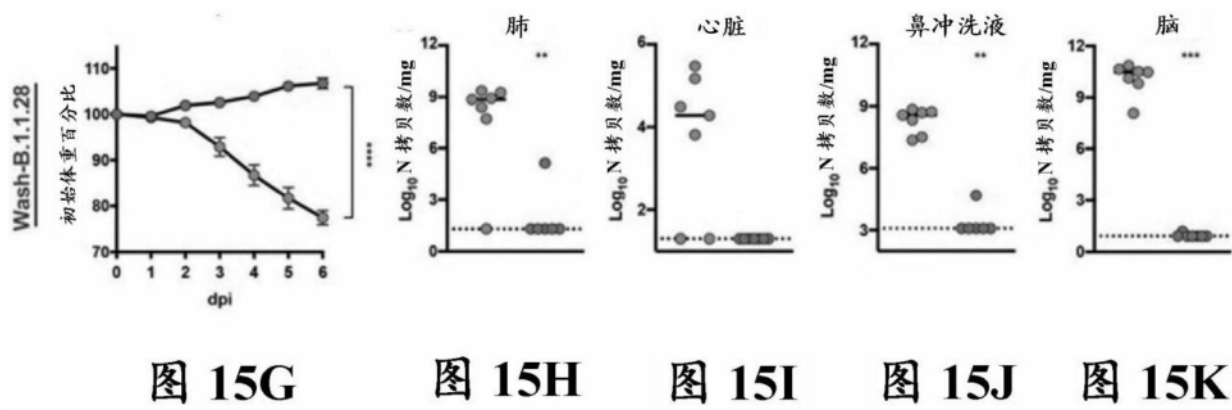
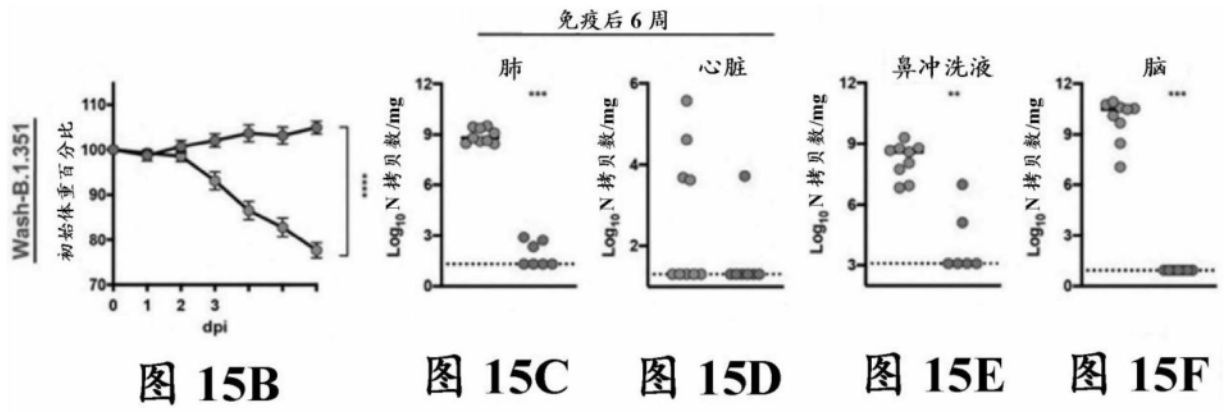


图15A



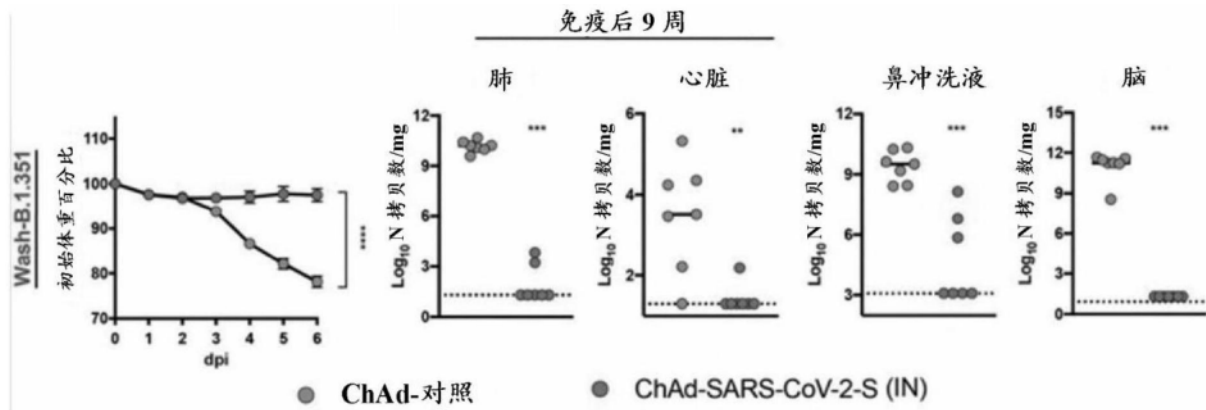


图 15P

图 15Q

图 15R

图 15S

图 15T

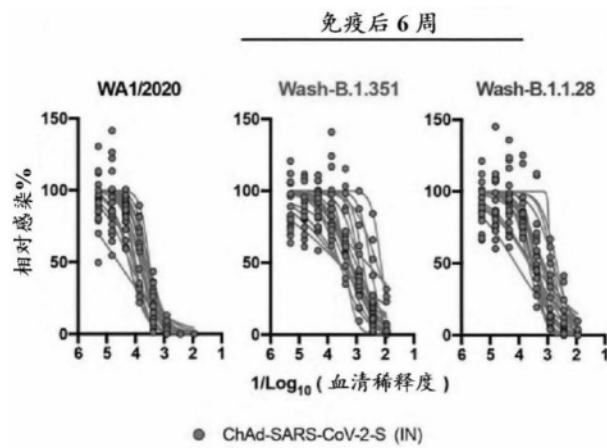


图16A

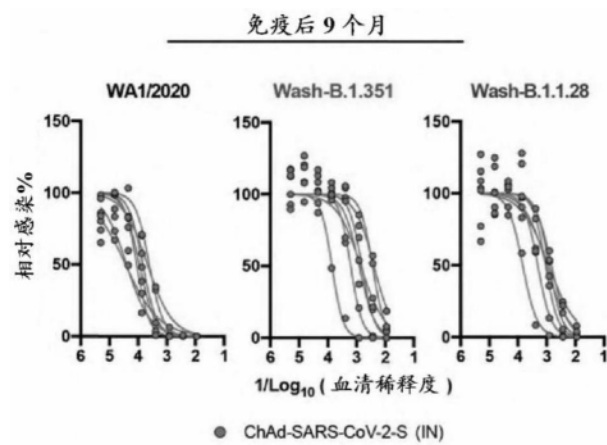


图16B

		第 1 部分									
		(1)	1	10	20	30	40	50	60	70	76
SARS-CoV2-Wuhan-S	(1)	MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTAGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFMHIVSGTNGT									
SARS-CoV2-Omicron-US	(1)	MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTAGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFMHIVSGTNGT									
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(1)	MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTAGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFMHIVSGTNGT									
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(1)	MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTAGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFMHIVSGTNGT									
SARS-CoV2-Omicron-S6Pdf	(1)	MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTAGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFMHIVSGTNGT									
		第 2 部分									
		(77)	77	90	100	110	120	130	140	150	152
SARS-CoV2-Wuhan-S	(77)	KRFDNPVLPFNDGVYFASDEKSNIIIRGWIIFGTTLDSEKTSQSLIVNNATHNVVVKVCFQFCNDPFLDGVYHKNKNSW									
SARS-CoV2-Omicron-US	(75)	KRFDNPVLPFNDGVYFASDEKSNIIIRGWIIFGTTLDSEKTSQSLIVNNATHNVVVKVCFQFCNDPFLDGVYHKNKNSW									
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(75)	KRFDNPVLPFNDGVYFASDEKSNIIIRGWIIFGTTLDSEKTSQSLIVNNATHNVVVKVCFQFCNDPFLDGVYHKNKNSW									
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(75)	KRFDNPVLPFNDGVYFASDEKSNIIIRGWIIFGTTLDSEKTSQSLIVNNATHNVVVKVCFQFCNDPFLDGVYHKNKNSW									
SARS-CoV2-Omicron-S6Pdf	(75)	KRFDNPVLPFNDGVYFASDEKSNIIIRGWIIFGTTLDSEKTSQSLIVNNATHNVVVKVCFQFCNDPFLDGVYHKNKNSW									
		第 3 部分									
		(153)	153	160	170	180	190	200	210	220	228
SARS-CoV2-Wuhan-S	(153)	MESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLLMDLEGKQGNFKNLREFFVFNIDGYFKIYSKHTPIIVREFFDLPGGSALEPL									
SARS-CoV2-Omicron-US	(148)	MESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLLMDLEGKQGNFKNLREFFVFNIDGYFKIYSKHTPIIVREFFDLPGGSALEPL									
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(148)	MESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLLMDLEGKQGNFKNLREFFVFNIDGYFKIYSKHTPIIVREFFDLPGGSALEPL									
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(148)	MESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLLMDLEGKQGNFKNLREFFVFNIDGYFKIYSKHTPIIVREFFDLPGGSALEPL									
SARS-CoV2-Omicron-S6Pdf	(148)	MESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLLMDLEGKQGNFKNLREFFVFNIDGYFKIYSKHTPIIVREFFDLPGGSALEPL									
		第 4 部分									
		(229)	229	240	250	260	270	280	290	300	304
SARS-CoV2-Wuhan-S	(227)	VDLPIGINITRFQTLALHRSYLTTPGDSSESGWTAGAAAYVGYLQPTFFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCT									
SARS-CoV2-Omicron-US	(224)	VDLPIGINITRFQTLALHRSYLTTPGDSSESGWTAGAAAYVGYLQPTFFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCT									
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(224)	VDLPIGINITRFQTLALHRSYLTTPGDSSESGWTAGAAAYVGYLQPTFFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCT									
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(224)	VDLPIGINITRFQTLALHRSYLTTPGDSSESGWTAGAAAYVGYLQPTFFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCT									
SARS-CoV2-Omicron-S6Pdf	(224)	VDLPIGINITRFQTLALHRSYLTTPGDSSESGWTAGAAAYVGYLQPTFFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCT									
		第 5 部分									
		(305)	305	310	320	330	340	350	360	370	380
SARS-CoV2-Wuhan-S	(303)	LKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFNITNLCPFDEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNLAFFETFK									
SARS-CoV2-Omicron-US	(300)	LKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFNITNLCPFDEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNLAFFETFK									
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(300)	LKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFNITNLCPFDEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNLAFFETFK									
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(300)	LKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFNITNLCPFDEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNLAFFETFK									
SARS-CoV2-Omicron-S6Pdf	(300)	LKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFNITNLCPFDEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNLAFFETFK									
		第 6 部分									
		(381)	381	390	400	410	420	430	440	450	456
SARS-CoV2-Wuhan-S	(379)	CYGVSPKTLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRIAPGQTGNIADYNKELPDDFTGCVIAWNSNLDSEKVCNGYHYLYR									
SARS-CoV2-Omicron-US	(376)	CYGVSPKTLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRIAPGQTGNIADYNKELPDDFTGCVIAWNSNLDSEKVCNGYHYLYR									
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(376)	CYGVSPKTLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRIAPGQTGNIADYNKELPDDFTGCVIAWNSNLDSEKVCNGYHYLYR									
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(376)	CYGVSPKTLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRIAPGQTGNIADYNKELPDDFTGCVIAWNSNLDSEKVCNGYHYLYR									
SARS-CoV2-Omicron-S6Pdf	(376)	CYGVSPKTLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRIAPGQTGNIADYNKELPDDFTGCVIAWNSNLDSEKVCNGYHYLYR									
		第 7 部分									
		(457)	457	470	480	490	500	510	520	530	532
SARS-CoV2-Wuhan-S	(455)	LFRKSNLKPFPERDISTEYQAGNKPCHGVAGFNCYFPLRSYSFRPTYGVGHQFYRVVVLGFELLHAPATVCGPKKS									
SARS-CoV2-Omicron-US	(452)	LFRKSNLKPFPERDISTEYQAGNKPCHGVAGFNCYFPLRSYSFRPTYGVGHQFYRVVVLGFELLHAPATVCGPKKS									
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(452)	LFRKSNLKPFPERDISTEYQAGNKPCHGVAGFNCYFPLRSYSFRPTYGVGHQFYRVVVLGFELLHAPATVCGPKKS									
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(452)	LFRKSNLKPFPERDISTEYQAGNKPCHGVAGFNCYFPLRSYSFRPTYGVGHQFYRVVVLGFELLHAPATVCGPKKS									
SARS-CoV2-Omicron-S6Pdf	(452)	LFRKSNLKPFPERDISTEYQAGNKPCHGVAGFNCYFPLRSYSFRPTYGVGHQFYRVVVLGFELLHAPATVCGPKKS									
		第 8 部分									
		(533)	533	540	550	560	570	580	590	600	608
SARS-CoV2-Wuhan-S	(531)	TNLVKKNKCVNFNFNGLKGTGVLTESNKKFLPFQGFGRDIADTTDAVADPQTLEILDITPCSGFGGVSVITPGTNTSN									
SARS-CoV2-Omicron-US	(528)	TNLVKKNKCVNFNFNGLKGTGVLTESNKKFLPFQGFGRDIADTTDAVADPQTLEILDITPCSGFGGVSVITPGTNTSN									
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(528)	TNLVKKNKCVNFNFNGLKGTGVLTESNKKFLPFQGFGRDIADTTDAVADPQTLEILDITPCSGFGGVSVITPGTNTSN									
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(528)	TNLVKKNKCVNFNFNGLKGTGVLTESNKKFLPFQGFGRDIADTTDAVADPQTLEILDITPCSGFGGVSVITPGTNTSN									
SARS-CoV2-Omicron-S6Pdf	(528)	TNLVKKNKCVNFNFNGLKGTGVLTESNKKFLPFQGFGRDIADTTDAVADPQTLEILDITPCSGFGGVSVITPGTNTSN									

图17

第 9 部分									
	(609)	609	620	630	640	650	660	670	684
SARS-CoV2-Wuhan-S	(607)	QVAVLYQGVNCTEVFPVAIHADQLTPTWRVYSTGSHVFPQTRAGCLIGAEYVNNSEYCDIPIGAGICASYQTQTNHSH							
SARS-CoV2-Omicron-US	(604)	QVAVLYQGVNCTEVFPVAIHADQLTPTWRVYSTGSHVFPQTRAGCLIGAEYVNNSEYCDIPIGAGICASYQTQTNHSH							
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(604)	QVAVLYQGVNCTEVFPVAIHADQLTPTWRVYSTGSHVFPQTRAGCLIGAEYVNNSEYCDIPIGAGICASYQTQTNHSH							
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(604)	QVAVLYQGVNCTEVFPVAIHADQLTPTWRVYSTGSHVFPQTRAGCLIGAEYVNNSEYCDIPIGAGICASYQTQTNHSH							
SARS-CoV2-Omicron-S6Pdf	(604)	QVAVLYQGVNCTEVFPVAIHADQLTPTWRVYSTGSHVFPQTRAGCLIGAEYVNNSEYCDIPIGAGICASYQTQTNHSH							
第 10 部分									
	(685)	685	690	700	710	720	730	740	760
SARS-CoV2-Wuhan-S	(683)	HARSVASQSI IAYTMSLGAENSVAYSNHNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSFECNLLQVGS							
SARS-CoV2-Omicron-US	(680)	HARSVASQSI IAYTMSLGAENSVAYSNHNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSFECNLLQVGS							
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(680)	HARSVASQSI IAYTMSLGAENSVAYSNHNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSFECNLLQVGS							
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(680)	HARSVASQSI IAYTMSLGAENSVAYSNHNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSFECNLLQVGS							
SARS-CoV2-Omicron-S6Pdf	(680)	HARSVASQSI IAYTMSLGAENSVAYSNHNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSFECNLLQVGS							
第 11 部分									
	(761)	761	770	780	790	800	810	820	836
SARS-CoV2-Wuhan-S	(759)	FCTQLNRALTGTIAVEQDKNTQEVFAQVKQIKYTPPIKDFGGFNFSGILDPDFKPSKRSPIEDLLFNKVTLADAGFI							
SARS-CoV2-Omicron-US	(756)	FCTQLNRALTGTIAVEQDKNTQEVFAQVKQIKYTPPIKDFGGFNFSGILDPDFKPSKRSPIEDLLFNKVTLADAGFI							
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(756)	FCTQLNRALTGTIAVEQDKNTQEVFAQVKQIKYTPPIKDFGGFNFSGILDPDFKPSKRSPIEDLLFNKVTLADAGFI							
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(756)	FCTQLNRALTGTIAVEQDKNTQEVFAQVKQIKYTPPIKDFGGFNFSGILDPDFKPSKRSPIEDLLFNKVTLADAGFI							
SARS-CoV2-Omicron-S6Pdf	(756)	FCTQLNRALTGTIAVEQDKNTQEVFAQVKQIKYTPPIKDFGGFNFSGILDPDFKPSKRSPIEDLLFNKVTLADAGFI							
第 12 部分									
	(837)	837	850	860	870	880	890	900	912
SARS-CoV2-Wuhan-S	(835)	KQYGDCLGDI AARDLICAKFNGLVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGALQIFPMQMAHYRFNGIG							
SARS-CoV2-Omicron-US	(832)	KQYGDCLGDI AARDLICAKFNGLVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGALQIFPMQMAHYRFNGIG							
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(832)	KQYGDCLGDI AARDLICAKFNGLVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGALQIFPMQMAHYRFNGIG							
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(832)	KQYGDCLGDI AARDLICAKFNGLVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGALQIFPMQMAHYRFNGIG							
SARS-CoV2-Omicron-S6Pdf	(832)	KQYGDCLGDI AARDLICAKFNGLVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGALQIFPMQMAHYRFNGIG							
第 13 部分									
	(913)	913	920	930	940	950	960	970	988
SARS-CoV2-Wuhan-S	(911)	VTQNVLYENQKLIANGFNSAIGHIQDSLSSTASALGKLQDVVHNAQALNTLVKQLSSHFAGAISSVLDLISRLDK							
SARS-CoV2-Omicron-US	(908)	VTQNVLYENQKLIANGFNSAIGHIQDSLSSTASALGKLQDVVHNAQALNTLVKQLSSHFAGAISSVLDLISRLDK							
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(908)	VTQNVLYENQKLIANGFNSAIGHIQDSLSSTASALGKLQDVVHNAQALNTLVKQLSSHFAGAISSVLDLISRLDK							
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(908)	VTQNVLYENQKLIANGFNSAIGHIQDSLSSTASALGKLQDVVHNAQALNTLVKQLSSHFAGAISSVLDLISRLDK							
SARS-CoV2-Omicron-S6Pdf	(908)	VTQNVLYENQKLIANGFNSAIGHIQDSLSSTASALGKLQDVVHNAQALNTLVKQLSSHFAGAISSVLDLISRLDK							
第 14 部分									
	(989)	989	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1064
SARS-CoV2-Wuhan-S	(987)	VEAEVQIDRLITGRQLSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSCEVLGQSKRVDFCGKGYHLMSPFQSAFHGVVF							
SARS-CoV2-Omicron-US	(984)	VEAEVQIDRLITGRQLSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSCEVLGQSKRVDFCGKGYHLMSPFQSAFHGVVF							
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(984)	VEAEVQIDRLITGRQLSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSCEVLGQSKRVDFCGKGYHLMSPFQSAFHGVVF							
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(984)	VEAEVQIDRLITGRQLSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSCEVLGQSKRVDFCGKGYHLMSPFQSAFHGVVF							
SARS-CoV2-Omicron-S6Pdf	(984)	VEAEVQIDRLITGRQLSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSCEVLGQSKRVDFCGKGYHLMSPFQSAFHGVVF							
第 15 部分									
	(1065)	1065	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1140
SARS-CoV2-Wuhan-S	(1063)	LHVTVVPAQEKNETTAPAI CHDGHKHFPRG VFVSNGTNHFV TQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVY							
SARS-CoV2-Omicron-US	(1060)	LHVTVVPAQEKNETTAPAI CHDGHKHFPRG VFVSNGTNHFV TQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVY							
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(1060)	LHVTVVPAQEKNETTAPAI CHDGHKHFPRG VFVSNGTNHFV TQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVY							
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(1060)	LHVTVVPAQEKNETTAPAI CHDGHKHFPRG VFVSNGTNHFV TQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVY							
SARS-CoV2-Omicron-S6Pdf	(1060)	LHVTVVPAQEKNETTAPAI CHDGHKHFPRG VFVSNGTNHFV TQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVY							
第 16 部分									
	(1141)	1141	1150	1160	1170	1180	1190	1200	1216
SARS-CoV2-Wuhan-S	(1139)	DPLQPELDSFKEELDKYFKNHSTSPVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLESIDLQELGKYEQYIKWPF							
SARS-CoV2-Omicron-US	(1136)	DPLQPELDSFKEELDKYFKNHSTSPVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLESIDLQELGKYEQYIKWPF							
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(1136)	DPLQPELDSFKEELDKYFKNHSTSPVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLESIDLQELGKYEQYIKWPF							
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(1136)	DPLQPELDSFKEELDKYFKNHSTSPVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLESIDLQELGKYEQYIKWPF							
SARS-CoV2-Omicron-S6Pdf	(1136)	DPLQPELDSFKEELDKYFKNHSTSPVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLESIDLQELGKYEQYIKWPF							
第 17 部分									
	(1217)	1217	1230	1240	1250	1260	1275		
SARS-CoV2-Wuhan-S	(1215)	YIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCMTSCCCLKGCSCGSCCFDEDDSEPVKGVKLHYT							
SARS-CoV2-Omicron-US	(1212)	YIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCMTSCCCLKGCSCGSCCFDEDDSEPVKGVKLHYT							
SARS-CoV2-Omicron-S2P	(1212)	YIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCMTSCCCLKGCSCGSCCFDEDDSEPVKGVKLHYT							
SARS-CoV2-Omicron-S6P	(1212)	YIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCMTSCCCLKGCSCGSCCFDEDDSEPVKGVKLHYT							
SARS-CoV2-Omicron-S6Pdf	(1212)	YIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCMTSCCCLKGCSCGSCCFDEDDSEPVKGVKLHYT							

图17续

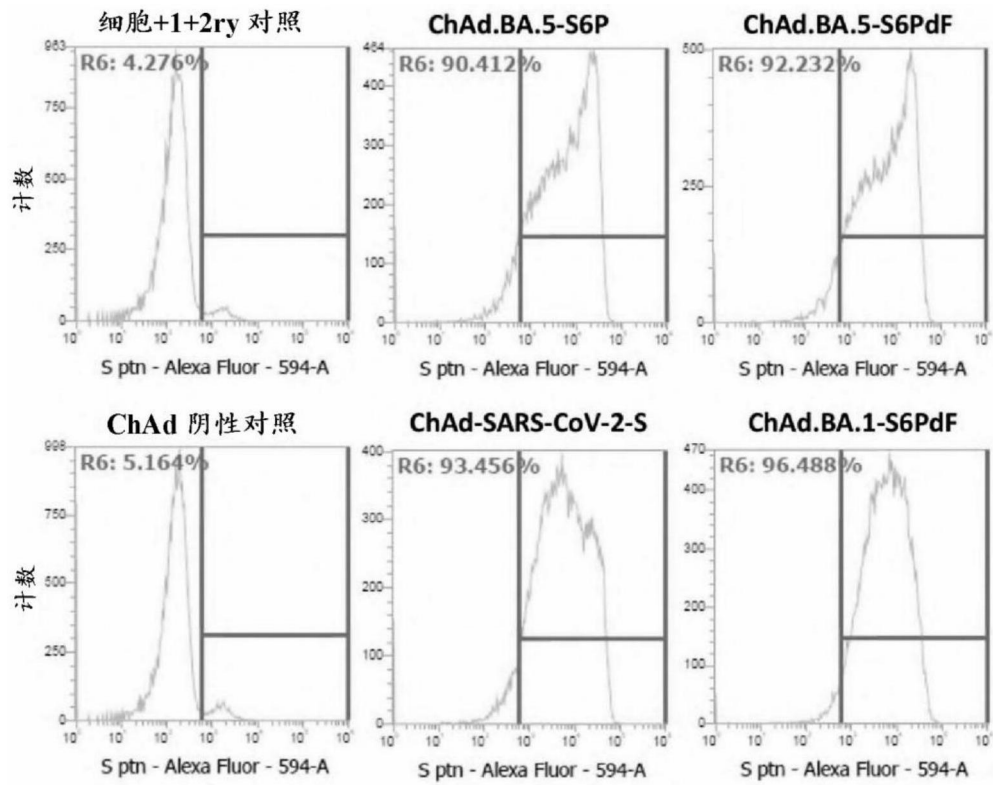


图18

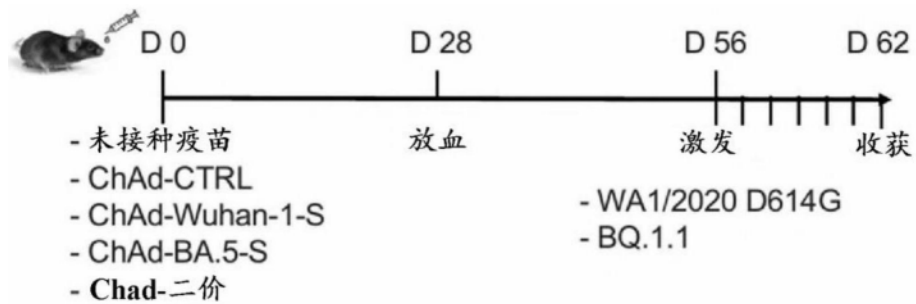


图19A

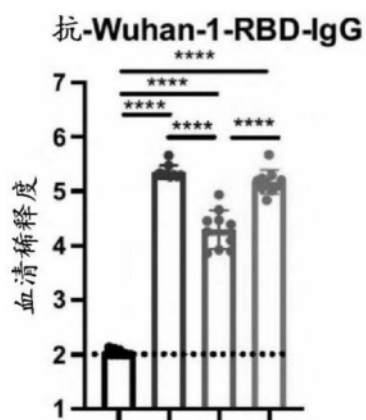


图19B

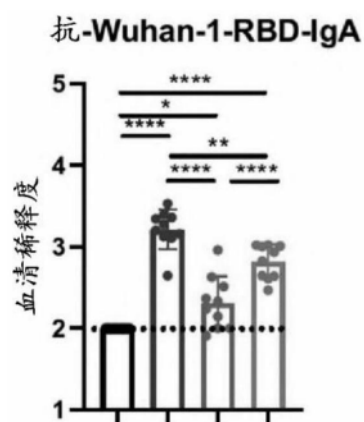


图19C

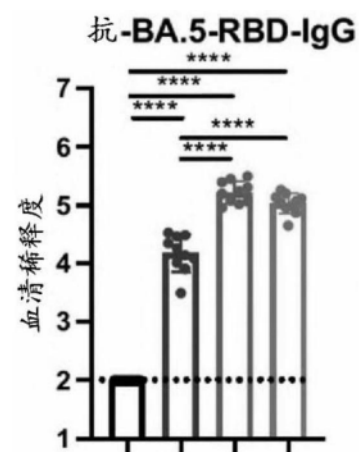


图19D

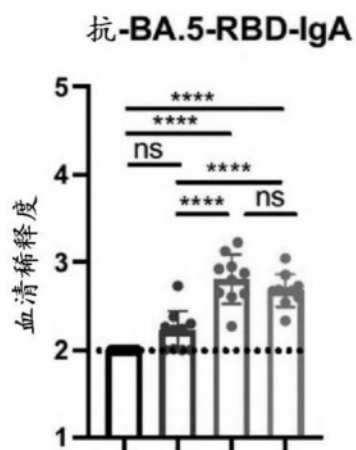


图19E

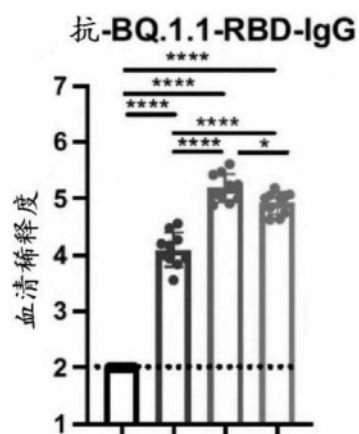


图19F

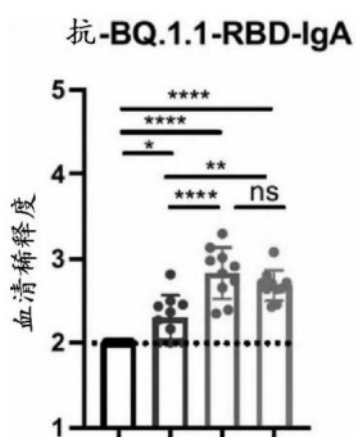


图19G

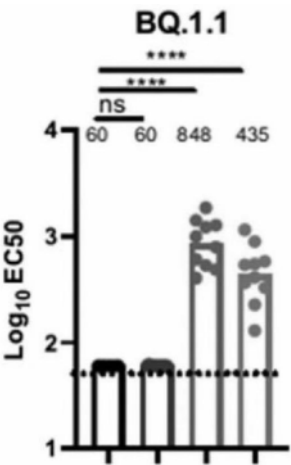
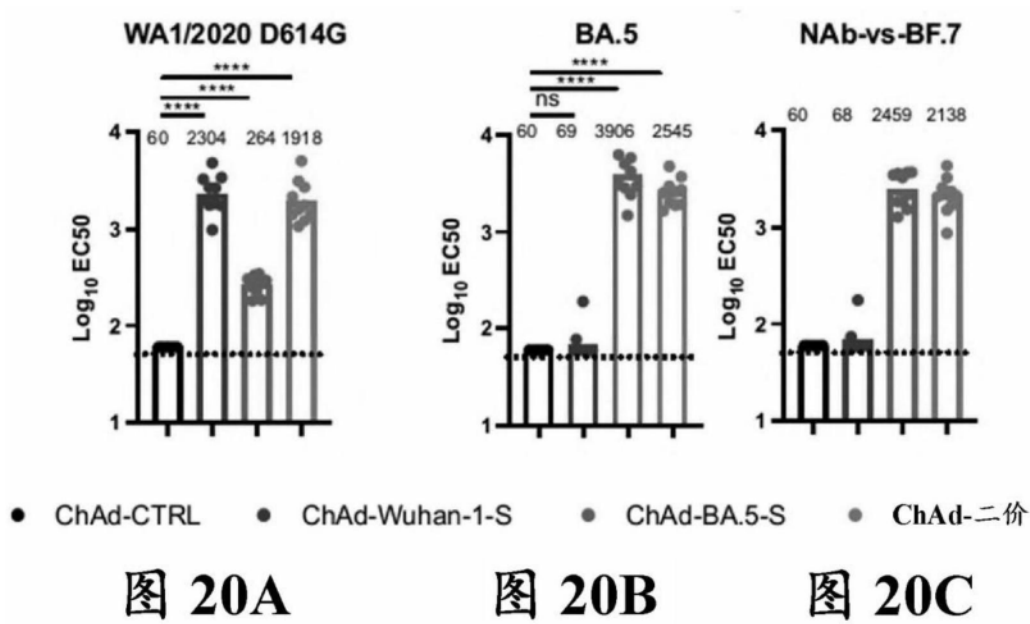


图20D

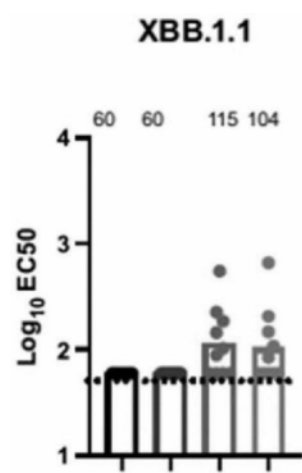


图20E

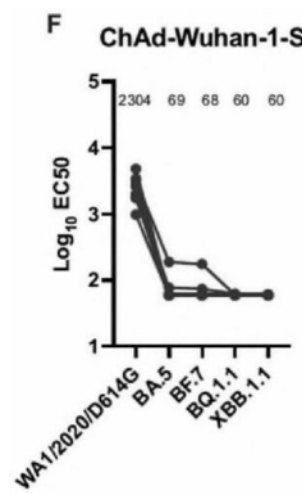


图20F

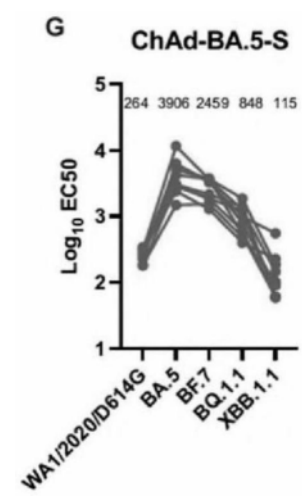


图20G

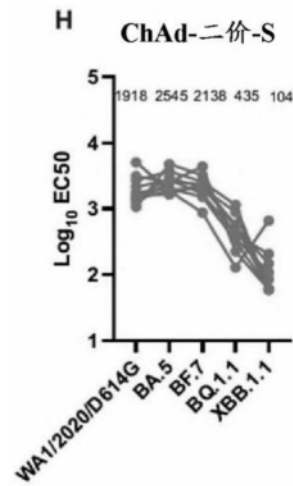


图20H

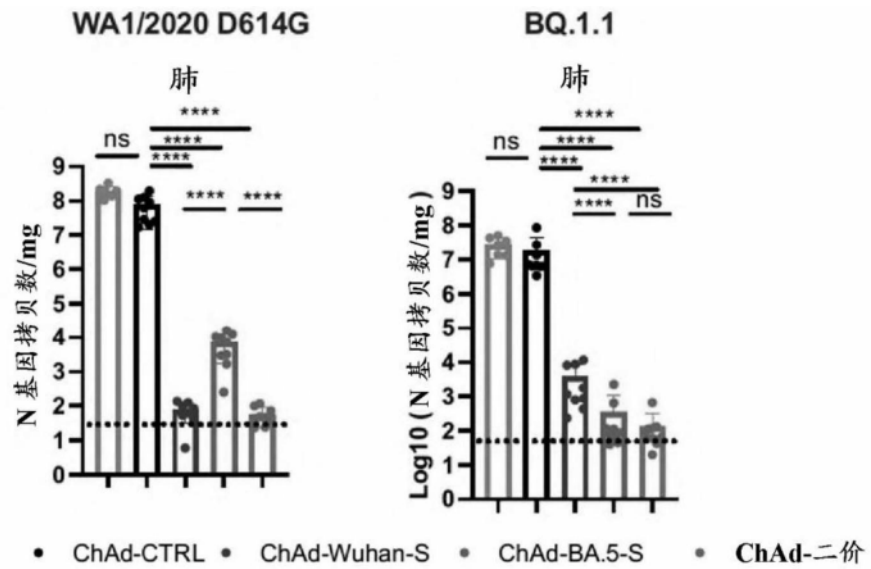


图21A

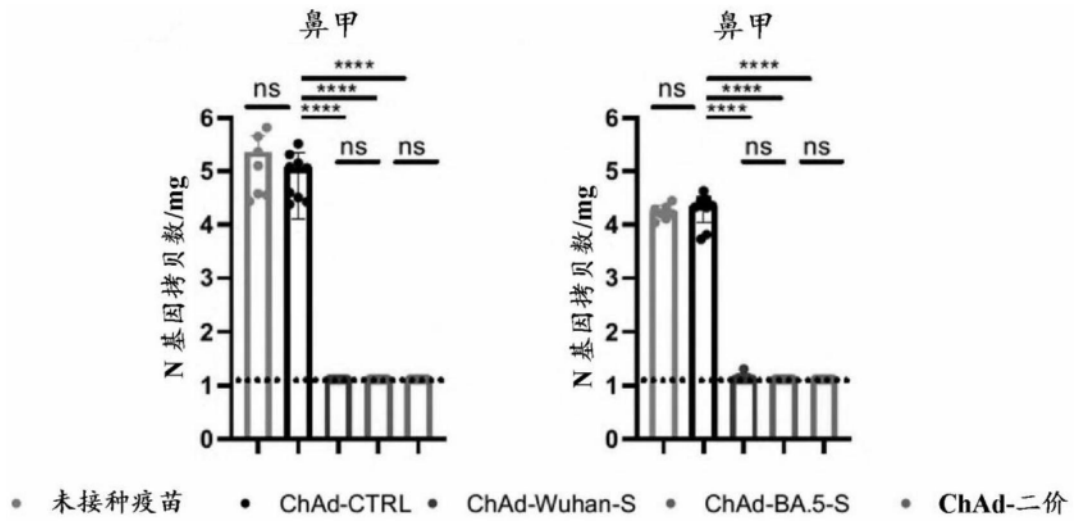


图21B

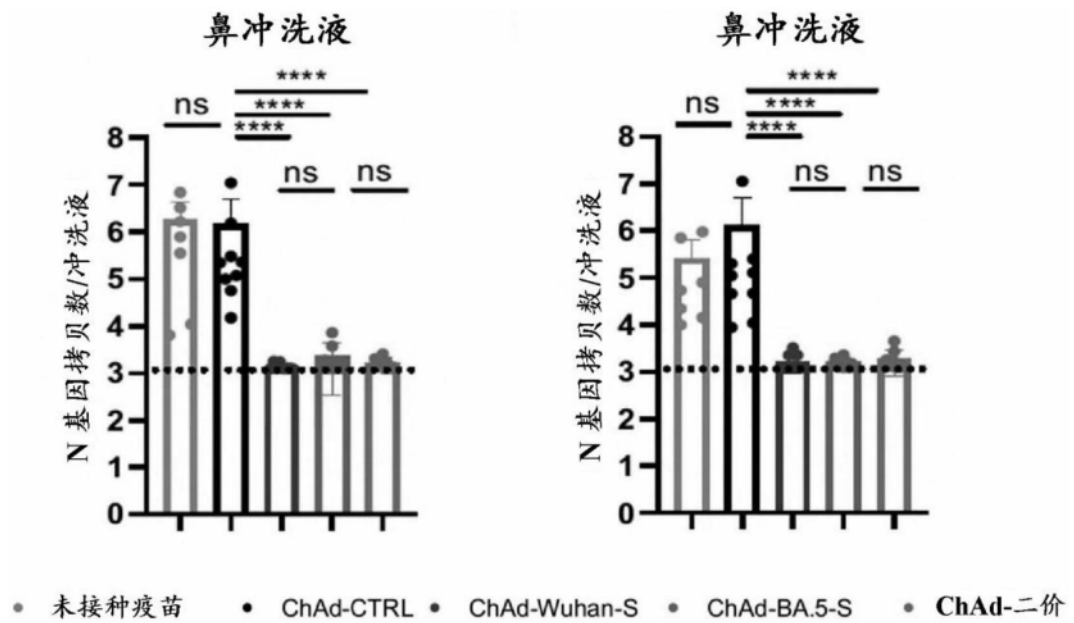


图21C

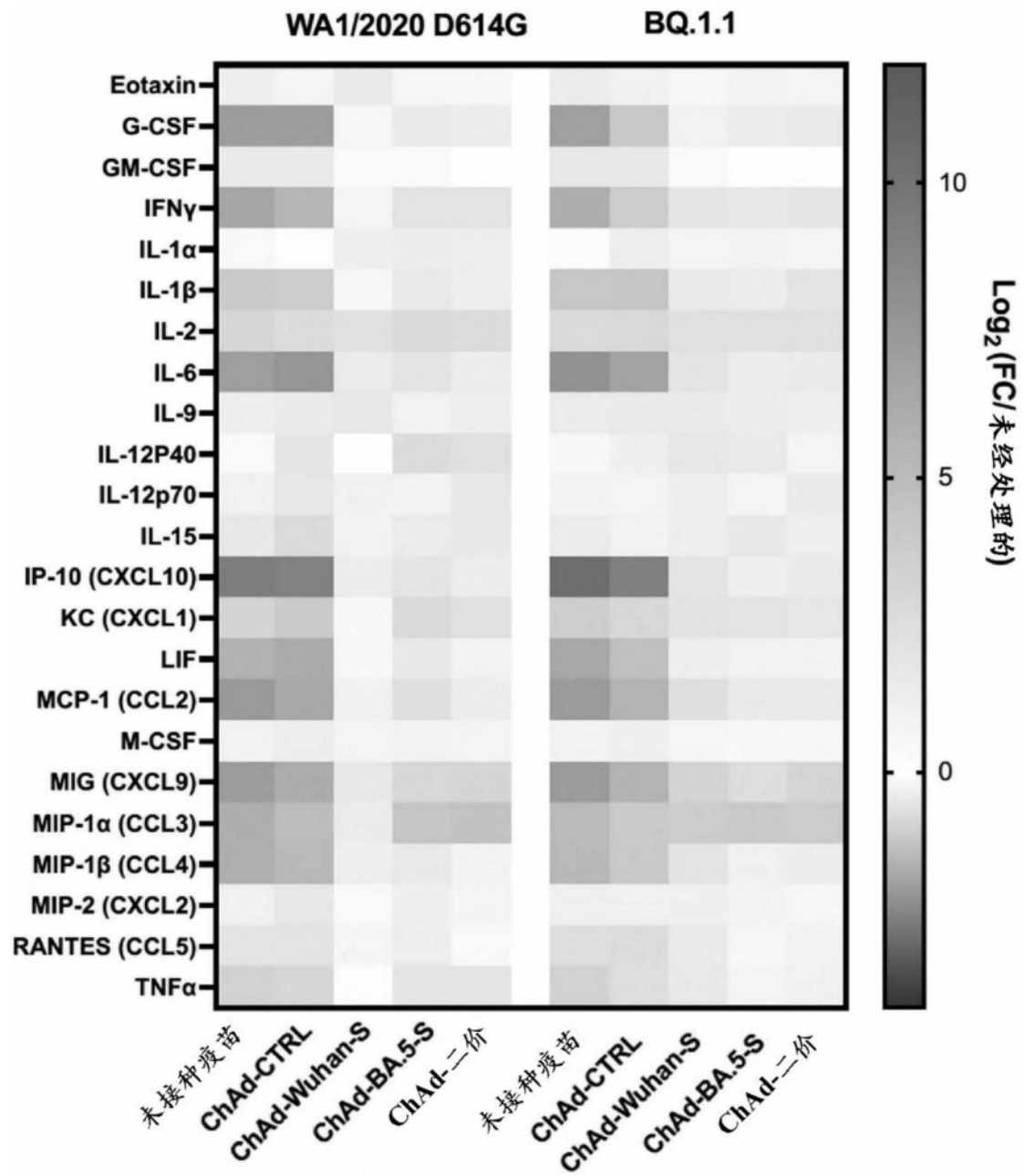


图22

图23

图23续