

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-504431
(P2025-504431A)

(43)公表日 令和7年2月12日(2025.2.12)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 P	31/14 (2006.01)	A 6 1 P	31/14		4 C 0 8 4
A 6 1 K	9/14 (2006.01)	A 6 1 K	9/14		4 C 0 8 5
A 6 1 K	39/215(2006.01)	A 6 1 K	39/215		4 C 0 8 6
A 6 1 K	9/12 (2006.01)	A 6 1 K	9/12		4 C 0 8 7
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全55頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-542183(P2024-542183)			(71)出願人	510031453
(86)(22)出願日	令和5年1月17日(2023.1.17)				テラヴェクティス
(85)翻訳文提出日	令和6年9月6日(2024.9.6)				T H E R A V E C T Y S
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/051025				フランス国、エフー75724 パリ・
(87)国際公開番号	WO2023/135333				セデックス 15、リュ・デュ・ドクド
(87)国際公開日	令和5年7月20日(2023.7.20)				ウール・ルー 28、バティマン・パス
(31)優先権主張番号	PCT/IB2022/000035				トゥール・ビオトープ
(32)優先日	令和4年1月17日(2022.1.17)			(74)代理人	100108453
(33)優先権主張国・地域又は機関	国際事務局(IB)				弁理士 村山 靖彦
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV			(74)代理人	100110364
	最終頁に続く				弁理士 実広 信哉
				(74)代理人	100133400
					弁理士 阿部 達彦
				(72)発明者	ビエール・シャルノー
					フランス・75724・パリ・セデック
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 レンチウイルスベースの経鼻ワクチンによるSARS-CoV-2免疫のブースト

(57)【要約】

本発明は、コロナウイルスに対する免疫の分野に関する。この点に関して、本発明は、(i)SARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質、mRNA、アデノウイルス、不活化ウイルス若しくはタンパク質サブユニットワクチン組成物等のSARS-CoV-2感染若しくは疾患に対する第一世代のワクチン、特にタンパク質若しくはmRNAベースのワクチンによるワクチン接種、又は(ii)SARS-CoV-2誘導性の疾患若しくはそれに 관련된疾患に基づき、以前に重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2(SARS-CoV-2)に対する免疫を獲得した対象、特にヒト対象におけるブースト若しくは標的免疫化治療における使用に適したレンチウイルスベースの免疫原性薬剤を提供する。したがって、本発明は、特に、SARS-CoV-2に対する利用可能なワクチンの欠点を克服するのを助け、特に、長期間持続する免疫応答を含む、コロナウイルスに対する粘膜体液性免疫応答及び細胞性免疫応答を誘発することにより、タンパク質、mRNA、アデノウイルス、不活化ウイルス若しくはタンパク質サブユニットワクチン等の利用可能な第一世代のワクチン、特にタンパク質若しくはmRNAワクチンで免疫した後に観察される免疫応答の衰退若しくは不十分な細胞記憶応答を克服するのに効率的でありうるレンチウイルスベースの免疫原性薬剤に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

SARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質、mRNA、アデノウイルス、不活化ウイルス及びタンパク質サブユニットワクチン組成物からなる群から選択されるSARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するワクチン組成物、特にSARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質若しくはmRNAワクチン組成物によるプライム免疫を受けた対象、特にヒト対象の上気道に投与するためのワクチンレジメンにおける異種ブースト若しくはは標的免疫化剤としての使用のための、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2(SARS-CoV-2)のスパイク(S)タンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子。

10

【請求項 2】

投与が、SARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質、mRNA、アデノウイルス、不活化ウイルス及びタンパク質サブユニットワクチン組成物からなる群から選択されるSARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するワクチン組成物、特にSARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質若しくはmRNAワクチン組成物によるプライム投与を受けた対象において、鼻腔内粘膜ブースト若しくは標的免疫として行われる、請求項1に記載のSARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子。

【請求項 3】

- Sタンパク質が、ヒト宿主に対して病原性を有するSARS-CoV-2ウイルス由来であり、特に(i)SARS-CoV-2祖先株、D614G株、アルファ株、ベータ株、ガンマ株、デルタ株及びオミクロン株からなる群から選択されるSARS-CoV-2ウイルス由来のSタンパク質であり、好ましくはベータ株若しくはオミクロン株から、より好ましくはベータ株から選択されるSARS-CoV-2ウイルス由来のSタンパク質であるか、又は(ii)前記祖先株、D614G株、アルファ株、ベータ株、ガンマ株、デルタ株若しくはオミクロン株のバリエーション由来のSタンパク質であって、そのようなバリエーションが、配列番号1と少なくとも90%同一なアミノ酸配列を有するスパイクタンパク質をコードする、Sタンパク質である、或いは

20

- Sタンパク質が、1~12個、特に1~6個のアミノ酸残基の変異、特に1~12個、特に1~6個のアミノ酸残基の置換及び/若しくは欠失による、祖先株、D614G株、アルファ株、ベータ株、ガンマ株、デルタ株若しくはオミクロン株のいずれかのネイティブSタンパク質の誘導体、特に、(a)スパイクタンパク質のアミノ酸配列において配列番号1を参照して残基986及び987として提供される位置のSタンパク質のS2ドメインにおけるプロリン残基についての2個の連続するアミノ酸残基の置換によって特徴付けられるSタンパク質の安定化形態であるか、又は(b)Sタンパク質のアミノ酸配列において配列番号1を参照して残基675から残基685に位置するフリン部位の欠失によるSタンパク質の融合前の形態であるか、又は(c)フリン部位の欠失及び配列番号1を参照して残基986及び987の位置におけるS2ドメイン中のプロリン残基についての2個の連続するアミノ酸残基の置換によるSタンパク質の安定化された融合前の形態である、請求項1又は2に記載のSARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子。

30

40

【請求項 4】

Sタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号1であるか、又は配列番号1と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有するその誘導体であり、SARS-CoV-2のSタンパク質の誘導体が、(i)配列番号1のアミノ酸配列の位置417におけるリジン残基からアスパラギン残基への変異(K417N)、(ii)配列番号1のアミノ酸配列の位置484におけるグルタミン酸残基からリジン残基への変異(E484K)、又は配列番号1のアミノ酸配列の位置484におけるグルタミン酸残基からアラニン残基への変異(E484A)、(iii)配列番号1のアミノ酸配列の位置501におけるアスパラギン残基のチロシン残基への変異(N501Y)、(iv)配列番号1のアミノ酸配列の位置986におけるリジン残基のプロリン残基への変異(K986P)、

50

並びに(v)配列番号1のアミノ酸配列の位置987におけるバリン残基のプロリン残基への変異(V987P)を含む、少なくとも5つのアミノ酸変異を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載のSARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子。

【請求項5】

組成物の投与を受ける対象が、(a)SARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質、mRNA、アデノウイルス、不活化ウイルス及びタンパク質サブユニットワクチン組成物からなる群から選択されるSARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するワクチン組成物、特にSARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質若しくはmRNAベースのワクチンを、筋肉内、皮内若しくは皮下投与等の全身プライム及び/若しくはブースト投与、特に筋肉内プライム及び/又はブースト投与として以前に投与された対象、(b)SARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質、mRNA、アデノウイルス、不活化ウイルス及びタンパク質サブユニットワクチン組成物からなる群から選択されるSARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するワクチン組成物、特にSARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質若しくはmRNAベースのワクチンの筋肉内、皮内若しくは皮下投与等の全身プライム投与、特に筋肉内プライム投与を受け、その後コロナウイルス疾患2019(COVID-19)等のコロナウイルス疾患から回復した対象、(c)COVID-19等のコロナウイルス疾患から最初に回復し、その後SARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質ベース若しくはmRNAベースのワクチンの筋肉内、皮内若しくは皮下投与等、特に筋肉内投与の全身プライム投与を受けた対象、並びに(d)SARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質若しくはmRNAベースのワクチンの筋肉内、皮内若しくは皮下投与等、特に筋肉内投与の全身投与を2回より多く、特に3回より多く受けた対象からなる群から選択される、請求項1～4のいずれか一項に記載のSARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子。

【請求項6】

SARS-CoV-2のSタンパク質が更に、(vi)配列番号1のアミノ酸配列の位置446におけるグリシン残基からセリン残基への変異(G446S)、(vii)配列番号1のアミノ酸配列の位置478におけるトレオニン残基からリジン残基への変異(T478K)、(viii)配列番号1のアミノ酸配列の位置493におけるグルタミン残基からアルギニン残基への変異(Q493R)、及び(ix)配列番号1のアミノ酸配列の位置498におけるグルタミン残基からアルギニン残基への変異(Q498R)からなる群から選択されるアミノ酸変異を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載のSARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子。

【請求項7】

コードされたSARS-CoV-2の変異Sタンパク質が、配列番号10又は配列番号18、好ましくは配列番号10のアミノ酸配列を有する、請求項1～6のいずれか一項に記載のSARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子。

【請求項8】

偽型レンチウイルスベクター粒子が、水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質G(VSV-G)タンパク質で偽型化されている、請求項1～7のいずれか一項に記載のSARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子。

【請求項9】

SARS-CoV-2感染若しくは疾患に対する長期にわたる保護粘膜体液性免疫応答及び/又は長期にわたる粘膜細胞性免疫応答を誘発するためのプライム/ブースト又は標的免疫化レジメンにおいて、前記応答が、対象の呼吸器系及び/又は中枢神経系を保護する、請求項1～8のいずれか一項に記載のSARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子。

【請求項10】

偽型レンチウイルスベクター粒子が、SARS-CoV-2に対するCD8⁺ T細胞応答を誘発する、請求項1～9のいずれか一項に記載のSARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体

をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子。

【請求項 1 1】

偽型レンチウイルスベクター粒子が、スパイクに特異的な肺常在メモリーCD8⁺ T細胞 (T_{rm})及び/又はエフェクターCD8⁺ T細胞(T_c1)を誘導し、インターフェロン-ガンマ(IFN- γ)/腫瘍壊死因子(TNF)/インターロイキン-2(IL-2)を産生する、請求項1~10のいずれか一項に記載のSARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子。

【請求項 1 2】

偽型レンチウイルスベクター粒子が、非組み込み型、非細胞変性型、及び非複製型である、請求項1~11のいずれか一項に記載のSARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体をコードする擬似型レンチウイルスベクター粒子。

【請求項 1 3】

対象が、SARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質、mRNA、アデノウイルス、不活化ウイルス及びタンパク質サブユニットワクチン組成物からなる群から選択されるSARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するワクチン組成物、特にSARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質又はmRNAベースのワクチンによる初回ワクチン接種の最初の注射後、又はSARS-CoV-2疾患回復後、特にCOVID-19回復後の12週目から免疫の衰退を示す、請求項1~12のいずれか一項に記載のSARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子。

【請求項 1 4】

偽型レンチウイルスベクター粒子が、鼻腔内エアロゾル、鼻腔内滴下剤又は鼻腔内吸入剤として投与するための液体組成物又は乾燥粉末として製剤化される、請求項1~13のいずれか一項に記載のSARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子。

【請求項 1 5】

投与レジメンが、偽型レンチウイルスベクター粒子の1つ以上の剤形の投与を含み、各剤形の投与量が10⁷~10⁹トランスダクション単位(TU)である、請求項1~14のいずれか一項に記載のSARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子。

【請求項 1 6】

SARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子と、薬学的に許容される担体とを含む免疫原性組成物であって、SARS-CoV-2のSタンパク質の偽型化誘導体が、(i)配列番号1のアミノ酸配列の位置417におけるリジン残基からアスパラギン残基への変異(K417N)、(ii)配列番号1のアミノ酸配列の位置484におけるグルタミン酸残基からアラニン残基への変異(E484A)、(iii)配列番号1のアミノ酸配列の位置501におけるアスパラギン残基からチロシン残基への変異(N501Y)、(iv)配列番号1のアミノ酸配列の位置986におけるリジン残基からプロリン残基への変異(K986P)、(v)配列番号1のアミノ酸配列の位置987におけるバリン残基からプロリン残基への変異(V987P)、(vi)配列番号1のアミノ酸配列の位置446におけるグリシン残基からセリン残基への変異(G446S)、(vii)配列番号1のアミノ酸配列の位置478におけるトレオニン残基からリジン残基への変異(T478K)、(viii)配列番号1のアミノ酸配列の位置493におけるグルタミン残基からアルギニン残基への変異(Q493R)、及び(ix)配列番号1のアミノ酸配列の位置498におけるグルタミン残基からアルギニン残基への変異(Q498R)を含む、少なくとも9つのアミノ酸変異を含む、免疫原性組成物。

【請求項 1 7】

コードされたSARS-CoV-2の変異Sタンパク質が、配列番号18のアミノ酸配列を有する、請求項16に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 8】

鼻腔内投与用に製剤化された、請求項16又は17に記載の免疫原性組成物。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、コロナウイルスに対する免疫の分野に関する。この点に関して、本発明は、(i) SARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質、mRNA、アデノウイルス、不活化ウイルス若しくはタンパク質サブユニットワクチン組成物等のSARS-CoV-2感染若しくは疾患に対する第一世代のワクチン、特にタンパク質若しくはmRNAベースのワクチンによるワクチン接種、又は(ii) SARS-CoV-2誘導性の疾患若しくはそれに相関した疾患に基づき、以前に重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2(SARS-CoV-2)に対する免疫を獲得した対象、特にヒト対象におけるブースト若しくは標的免疫化治療における使用に適したレンチウイルスベースの免疫原性薬剤を提供する。したがって、本発明は、特に、SARS-CoV-2に対する利用可能なワクチンの欠点を克服するのに助け、特に、長期間持続する免疫応答を含む、コロナウイルスに対する粘膜体液性免疫応答及び細胞性免疫応答を誘発することにより、タンパク質、mRNA、アデノウイルス、不活化ウイルス若しくはタンパク質サブユニットワクチン等の利用可能な第一世代のワクチン、特にタンパク質若しくはmRNAワクチンで免疫した後に観察される免疫応答の衰退若しくは不十分な細胞記憶応答を克服するのに効率的でありうるレンチウイルスベースの免疫原性薬剤に関する。

10

【背景技術】

【0002】

(i) コロナウイルス感染症2019(COVID-19)のパンデミックの持続、(ii) SARS-CoV-2に対する第一世代ワクチンの防御能の弱体化、(iii) 新たな懸念されるウイルスバリエーション(VOC)の絶え間ない出現を考慮すると、将来の一次ワクチン若しくはブースターワクチンにとっては、新たな有効なワクチンプラットフォームが極めて重要となり得る(「Global COVID-19 Vaccination - Strategic Vision for 2022」、World Health Organization、SAGE meeting October 2021)。本発明者らは最近、複数の前臨床モデルにおいて、全身プライム、続いて鼻腔内(i.n.)ブーストで使用した場合における、祖先SARS-CoV-2に由来するスパイク糖タンパク質(S)の全長配列をコードするレンチウイルスワクチンベクター(LV)(LV::S)の強力な性能を実証した(Ku MWら、Cell Host Microbe、29(2)、236-249 e236、2021)。LV::Sは、祖先SARS-CoV-2及びVOCに対して、呼吸器を確実に完全に(交差的に)保護する(Ku MWら、EMBO Mol Med、e14459、2021)。更に、ヒトアンジオテンシン変換酵素2(hACE2)を発現し、SARS-CoV-2の複製に対する脳の寛容性がかつてないほど高い新たなトランスジェニックマウスでは、中枢神経系を完全に保護するためにLV::Sによるi.n.ブーストが必要とされる(Ku MWら、EMBO Mol Med、e14459、2021)。LV::Sは、免疫回避の可能性を持つ新興のVOCに対する防御を強化し、拡大するための一次ワクチン又はブースターとして使用されることが意図されている(Juno JA、Wheatley AK、Nat Med、27(11)、1874-1875、2021)。

20

30

【0003】

第一世代のCOVID-19ワクチンによって与えられる保護の持続期間はまだ十分に確立されておらず、血清学的検査では予測が困難であり、多様な個人において、また異なるVOCに対して変動する。ワクチン接種率が高いにもかかわらず、世界的パンデミックが現在悪化していることは、COVID-19に対する個人及び集団の免疫を確保するためには、ブースター接種を繰り返す必要があることを指し示している。この文脈において、第一世代COVID-19ワクチンの複数回の同種追加投与による安全性と潜在的な副作用、例えばmRNAワクチンに含まれるポリエチレングリコール(PEG)に対するアレルギー反応に関係する副作用が考慮されなければならない(Castells MC、Phillips EJ、N Engl J Med、384(7)、643-649、2021)。重要なこととして、非一致のワクチン送達方法、すなわち異種プライムブースト形式は、様々な感染性疾患の多くの前臨床モデルにおいて、同種プライムブーストアプローチよりも成功する戦略であることが証明されている(He Qら、Emerg Microbes Infect、10(1)、629-637、2021; Lu S、Curr Opin Im

40

50

munol、21(3)、346-351、2009;Nordstrom Pら、Lancet Reg Health Eur、100249、2021)。したがって、COVID-19に対する異種ブースターを開発するために、新しい効率的なワクチン接種プラットフォームに特に関心が持たれる。LV::Sワクチン候補は、COVID-19に対する予防的使用に関して大きな可能性を有しており、これは主に、強力な中和液性応答だけでなく、SARS-CoV-2 VOCに蓄積されたエスケープ変異の影響を受けない強固な防御T細胞応答を誘導する、その強力な能力に基づいている(Ku MWら、EMBO Mol Med、e14459、2021)。

【0004】

更に、特に新型VOCに対する第一世代ワクチンによって最初に誘導された免疫の予防能が低下していることが観察されており、追加のワクチン投与は不可欠となる(「Global COVID-19 Vaccination - Strategic Vision for 2022」、World Health Organization、SAGE meeting October 2021)。同じワクチンの追加投与に代わるものとして、異種プライムブーストレジメンでワクチンプラットフォームを組み合わせることで、防御効果が得られる可能性がある(Barros-Martins Jら、Nat Med、27(9)、1525-1529、2021)。同種ワクチン投与と比較して、異種プライムブースト戦略は、ベクター特異的免疫又はワクチン自体若しくは賦形剤に対して生じうる反応原性を悪化させるリスクを誘発/強化することなく、特異的な適応免疫応答及び長期的な防御をよりよく強化しうる。更に、最大の中和幅を誘導するためには、SARS-CoV-2のVOC出現の動態に応じてスパイク抗原の配列を適応させる必要がある。加えて、症候性SARS-CoV-2感染に対する防御は主に血清中和活性に関係するが、重症COVID-19に対する防御はCD8⁺T細胞免疫に関係する。ウイルスに感染した細胞を細胞溶解する能力を持つこれらの細胞は、特にウイルスの複製を制御し、SARS-CoV-2感染の消散をもたらす(Sette A、Crotty S. Cell、184(4)、861-880、2021)。したがって、適応したスパイク配列を含む適切なB細胞及びT細胞ワクチンプラットフォームは、パンデミックの現段階における最大の関心事である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】「Global COVID-19 Vaccination - Strategic Vision for 2022」、World Health Organization、SAGE meeting October 2021

【非特許文献2】Ku MWら、Cell Host Microbe、29(2)、236-249 e236、2021

【非特許文献3】Ku MWら、EMBO Mol Med、e14459、2021

【非特許文献4】Juno JA、Wheatley AK. Nat Med、27(11)、1874-1875、2021

【非特許文献5】Castells MC、Phillips EJ. N Engl J Med、384(7)、643-649、2021

【非特許文献6】He Qら、Emerg Microbes Infect、10(1)、629-637、2021

【非特許文献7】Lu S. Curr Opin Immunol、21(3)、346-351、2009

【非特許文献8】Nordstrom Pら、Lancet Reg Health Eur、100249、2021

【非特許文献9】Barros-Martins Jら、Nat Med、27(9)、1525-1529、2021

【非特許文献10】Sette A、Crotty S. Cell、184(4)、861-880、2021

【非特許文献11】Hu B、Tai A、Wang P. Immunol Rev、239(1)、45-61、2011

【非特許文献12】Ku MW、Charneau P、Majlessi L. Expert Rev Vaccines、1-16、2021

【非特許文献13】Guermonprez Pら、J. Int Rev Cell Mol Biol、349、1-54、2019

【非特許文献14】Ku MWら、Commun Biol、4(1)、713、2021

【非特許文献15】Cousin Cら、Cell Rep、26(5)、1242-1257 e1247、2019

【非特許文献16】Lopez Jら、「An optimized lentiviral vector induces CD4⁺ T-cell immunity and predicts a booster vaccine against tuberculosis.

」改訂版

10

20

30

40

50

- 【非特許文献 17】Lund FE、Randall TD. Science、373(6553)、397-399、2021
- 【非特許文献 18】van Doremalen Nら、Sci Transl Med、13(607)、2021
- 【非特許文献 19】Jackson LAら、N Engl J Med、383(20)、1920-1931、2020
- 【非特許文献 20】Wang Fら、Med Sci Monit、26、e924700、2020
- 【非特許文献 21】Wallsら、2020、「Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein.」、Cell 181:281-292 e286
- 【非特許文献 22】Guoら、2020、「The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status.」、Mil Med Res 7、11
- 【非特許文献 23】Wangら、2020、「A Unique Protease Cleavage Site Predicted in the Spike Protein of the Novel Pneumonia Coronavirus (2019-nCoV) Potentially Related to Viral Transmissibility」、Virol Sin 2020 Jun; 35(3):337-339. doi: 10.1007/s12250-020-00212-7. Epub 2020 Mar 20
- 【非特許文献 24】Belouzardら、2009、「Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites.」、Proc Natl Acad Sci U S A 106:5871-5876
- 【非特許文献 25】Coutardら、2020、「The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade.」、Antiviral Res 176:104742
- 【非特許文献 26】Sternberg and Naujokat、2020、「Structural features of coronavirus SARS-CoV-2 spike protein: Targets for vaccination」、Life Sci 257、118056
- 【非特許文献 27】Laiら、2017、「The SARS-CoV Fusion Peptide Forms an Extended Bipartite Fusion Platform that Perturbs Membrane Order in a Calcium-Dependent Manner.」、J Mol Biol 429:3875-3892
- 【非特許文献 28】Vesinら、2022、Mol Ther 30、2984-2997
- 【非特許文献 29】Decruら、2022、Front Immunol. 13、909910
- 【非特許文献 30】Valyi-Nagyら、2022、Int J Mol Sci、23.10.3390
- 【非特許文献 31】Gallaisら、2021、EBioMedicine、71、103561
- 【非特許文献 32】Dullら、1998、J Virol、72(11):8463-71
- 【非特許文献 33】Zuffereyら、1998、J Virol 72(12):9873-80
- 【非特許文献 34】Strangら、2005、J Virol 79(3):1165-71
- 【非特許文献 35】Relanderら、2005、Mol Ther 11(3):452-9
- 【非特許文献 36】Stewartら、2009、Gene Ther、16(6):805-14
- 【非特許文献 37】Stuartら、2011、Hum gene Ther
- 【非特許文献 38】Bricker TL、Cell Rep、36(3)、109400、2021
- 【非特許文献 39】Hassan AOら、Cell Rep Med、2(4)、100230、2021
- 【非特許文献 40】Lescure FXら、Lancet Infect Dis、20(6)、697-706、2020
- 【非特許文献 41】Sterlin Dら、Sci Transl Med、13(577)、2021
- 【非特許文献 42】Chandrashekar Aら、Science、369(6505)、812-817、2020
- 【非特許文献 43】Tostanoski LHら、Nat Med、26(11)、1694-1700、2020
- 【非特許文献 44】Wolfel R、Corman VM、Guggemos Wら、「Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019.」、Nature、581(7809)、465-469、2020
- 【非特許文献 45】Iglesiasら、J. Gene Med.、2006、8、265-274
- 【非特許文献 46】Lescureら、Lancet Infect. Dis.、2020、20、697-706
- 【非特許文献 47】Planasら、Nature、2022、602、671-675
- 【非特許文献 48】Cormanら、Euro Surveill. 2020、25(3)
- 【非特許文献 49】McCallumら、Nat. Struct. Mol. Biol.、2020、27、942-949

10

20

30

40

50

【非特許文献50】 Launayら、EBioMedicine 2022、75、103810
 【非特許文献51】 Tegallyら、Nature 2021、592、438-443
 【非特許文献52】 Kuzminaら、iScience 2021、24、103467
 【非特許文献53】 Hsiehら、Science、2020、369(6510):1501-5
 【非特許文献54】 Siaら、Nature 2020、583(7818):834-8
 【非特許文献55】 Halfmannら、Cell Rep. 2022;39(3):110688
 【非特許文献56】 Munoz-Fontelaら、Nature 2020、586(7830):509-15
 【非特許文献57】 Wangら、Sci Transl Med. 2021、13(577)
 【非特許文献58】 Langelら、Sci Transl Med. 2022、14(658)
 【非特許文献59】 Afkhamiら、Cell 2022、185(5):896-915
 【非特許文献60】 Coughlanら、Mol. Ther. 2022、**「Adenovirus-based vaccines-a platform for pandemic preparedness against emerging viral pathogens」**

10

【非特許文献61】 Abu-Raddad LJら、2021;385(2):187-9
 【非特許文献62】 Kuhlmann Cら、2022;399(10325):625-6
 【非特許文献63】 Tang Jら、**「Respiratory mucosal immunity against SARS-CoV-2 following mRNA vaccination.」**、Sci Immunol. 2022:eadd4853
 【非特許文献64】 Altmann DMら、2021;2(5):100286
 【非特許文献65】 Mazzone Aら、2022;13:801431
 【非特許文献66】 Gostic KMら、2016;354(6313):722-6
 【非特許文献67】 Roltgen Kら、**「Immune imprinting, breadth of variant recognition, and germinal center response in human SARS-CoV-2 infection and vaccination.」**、Cell. 2022
 【非特許文献68】 Reynolds CJら、2022;377(6603):eabq1841
 【非特許文献69】 Kalnin KVら、2022;40(9):1289-98
 【発明の概要】
 【0006】

20

本発明者らは、LV::SがSARS-CoV-2、特にその既知及び新たに生じたVOC(SARS-CoV-2のアルファ、ベータ、ガンマ、デルタ、及びオミクロンバリエーションを含むが、これらに限定はされない)に対する防御を強化し、拡大するための、異種in.ブースターワクチンとして使用するのに極めて適したものとなり得ると考えた。早期にワクチン接種を受けた国では、最初の免疫化の完了後わずか数か月で集団免疫が弱まり、新たな感染の波が増加している(Juno JA、Wheatley AK. Nat Med、27(11)、1874-1875、2021)。
 【0007】

30

本発明で使用するLVは、特に、非組み込み型、非複製型、非細胞変性型であり、炎症性が無視できるほど低い(Hu B、Tai A、Wang P. Immunol Rev、239(1)、45-61、2011;Ku MW、Charneau P、Majlessi L. Expert Rev Vaccines、1-16、2021)。これらのベクターは、水疱性口内炎ウイルス(VSV-G)由来の異種糖タンパク質で偽型化されており、これは、特に樹状細胞を含む多様な細胞型に対する幅広い指向性をベクターに付与している。後者は主に非分裂細胞であるため、遺伝子導入はほとんど許容しない。したがって、LVは非分裂細胞の核に遺伝子を効率的に移送するという中心的な特性を備えており、それによって樹状細胞の効率的な形質導入が可能とする。ナイーブT細胞を活性化するユニークな能力を持つこれらの細胞においてその結果生じる内因性の抗原発現(Guermontprez Pら、J. Int Rev Cell Mol Biol、349、1-54、2019)は、高品質のエフェクターT細胞及びメモリーT細胞を誘導するLVの卓越した能力と相関する(Ku MWら、Commun Biol、4(1)、713、2021)。重要なこととして、VSV-Gの偽型化(pseudo-typing)はまた、LVがヒトにおける既存のベクター特異的免疫の標的となることも回避するが、これがワクチン開発においては鍵となる(Hu B、Tai A、Wang P. Immunol Rev、239(1)、45-61、2011;Ku MW、Charneau P、Majlessi L. Expert Rev Vaccines、1-16、2021)。LVの安全性は、ヒトでのフェーズI/IIaヒト免

40

50

疫不全ウイルス-1治療ワクチン試験で確立されている(EU臨床試験登録、2011-006260-52の臨床試験)。それらの非細胞変性性及び非炎症性(Cousin Cら、Cell Rep、26(5)、1242-1257 e1247、2019;Lopez Jら、「An optimized lentiviral vector induces CD4⁺ T-cell immunity and predicts a booster vaccine against tuberculosis.」改訂版)のため、LVは粘膜ワクチン接種によく適している。i.n.投与経路は、粘膜IgA応答、並びに気道に常在するメモリーB及びTリンパ球を誘発するという、よく認識された利点を有する(Lund FE、Randall TD、Science、373(6553)、397-399、2021)。この経路は、ハムスター及びマカクの両方の前臨床モデルにおいて、SARS-CoV-2の感染を減らすのに最も効果的であることも示されている(van Doremalen Nら、Sci Transl Med、13(607)、2021)。i.n.免疫接種による粘膜免疫の誘導は、SARS-CoV-2が感染可能な主な解剖学的部位に到達する前に、宿主生物への入り口で直接それを中和することを可能とする(Ku MWら、Cell Host Microbe、29(2)、236-249 e236、2021)。

10

【0008】

本発明において、本発明者らは、S_{CoV-2}のS2ドメインにおけるK⁹⁸⁶P及びV⁹⁸⁷P置換によって安定化された、ベータバリエーションのダウンセレクションされたS_{CoV-2}をコードするLVを産生した(LV::S_{Beta-2P})。mRNA-1273(Moderna)ワクチンで筋肉内(i.m.)にプライミング及びブーストされ、(交差)血清中和能が徐々に低下しているマウスにおいて、本発明者らは、i.n.LV::S_{Beta-2P}異種ブーストとi.m.mRNA-1273(Moderna)(Jackson LAら、N Engl J Med、383(20)、1920-1931、2020;Wang Fら、Med Sci Monit、26、e924700、2020)同種ブーストの全身及び粘膜免疫応答並びに防御能を比較した。本発明者らは、改良された抗原設計、新たなワクチン送達LVプラットフォーム、及び代替的なi.n.投与経路により、以前のレジメンに対する複数の利点を観察した。

20

【0009】

第1の態様によれば、本発明はそれゆえ、SARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質、mRNA、アデノウイルス、不活化ウイルス及びタンパク質サブユニットワクチン組成物からなる群から選択されるSARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するワクチン組成物、特にSARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質若しくはmRNAワクチン組成物によるプライム免疫化を受けた対象、特にヒト対象の上気道に投与するためのワクチンレジメンにおける異種ブースト若しくは標的免疫化剤としての使用のための、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2(SARS-CoV-2)のスパイク(S)タンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子に関する。本発明によるSARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質サブユニットワクチン組成物の非限定的な例は、アジュバント化組換えスパイクタンパク質に基づくワクチン、又はナノ粒子にパッケージ化された組換えスパイクタンパク質に基づくワクチンを含む。

30

【0010】

SARS-CoV-2ウイルスのスパイク(S)タンパク質は、エンベロープに固定された糖タンパク質として当技術分野でよく識別されている(Wallsら、2020、「Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein.」、Cell 181:281-292 e286)。より正確には、SARS-CoV-2 S(S_{CoV-2})は(180kDa)₃ホモ三量体クラスIウイルス融合タンパク質であり、宿主細胞上で発現されるカルボキシペプチダーゼアンギオテンシン変換酵素2(ACE2)に結合する。S_{CoV-2}タンパク質の単量体は、外部ドメイン、膜貫通アンカードメイン、及び短い内部テールを有している。S_{CoV-2}は、2段階の連続的なタンパク質分解切断により活性化されて、宿主細胞膜との融合を開始する。構造的な再編成を導くS_{CoV-2}-ACE2相互作用の後、S_{CoV-2}の細胞外ドメインがまず、特異性の高いフリン682^{RRAR}685(配列番号21)部位で切断されるが(Guoら、2020、「The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status.」、Mil Med Res 7、11;Wallsら、2020)、これは、遍在的なフリンの発現と関連したウイルスの病

40

50

理学的特徴を決定する鍵となる因子である(Wangら、2020、「A Unique Protease Cleavage Site Predicted in the Spike Protein of the Novel Pneumonia Coronavirus (2019-nCoV) Potentially Related to Viral Transmissibility.」、*Virol Sin* 2020 Jun;35(3):337-339. doi: 10.1007/s12250-020-00212-7. Epub 2020 Mar 20)。結果として生じるサブユニットは、(i)原子的な接触がACE2プロテアーゼドメインに限定されたACE2受容体結合ドメイン(RBD)を含み、また、中和抗体(NAb)の標的となる主要なB細胞エпитープも含むS1(Wallsら、2020)、及び(ii)膜融合要素を含むS2から構成される。S_{CoV-1}の場合と同様に、S1の切断により、2番目のタンパク質分解切断部位797^R、つまりS2'がS2上でアクセス可能となる(Belouzardら、2009、「Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites」、*Proc Natl Acad Sci U S A* 106:5871-5876)。細胞又は組織のタイプに応じて、フリリン、トリプシン、カテプシン、TMPRSS(TransMembrane Protease Serine Protease)-2若しくは-4を含む1つ又はいくつかの宿主プロテアーゼが、この第2の切断工程に参与し得る(Coutardら、2020、「The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade.」、*Antiviral Res* 176:104742)。その結果生じるSの「融合性」の立体構造変化は、S_{CoV-2}の非常に安定した融合後形態をもたらし、これが宿主細胞膜との融合反応を開始させ(Sternberg and Naujokat、2020、「Structural features of coronavirus SARS-CoV-2 spike protein: Targets for vaccination.」、*Life Sci* 257、118056)、そして、S2'に隣接する融合ペプチド(FP)の露出を導く。宿主細胞/小胞膜へのFPの挿入は、融合反応を刺激し、それによってウイルスRNAが宿主細胞質内へと放出される(Laiら、2017、「The SARS-CoV Fusion Peptide Forms an Extended Bipartite Fusion Platform that Perturbs Membrane Order in a Calcium-Dependent Manner」、*J Mol Biol* 429:3875-3892)。S_{CoV-2}-ACE2相互作用が、SARS-CoV-2による宿主細胞感染においてこれまでに特定されている唯一のメカニズムであり、また、RBDが多数の立体構造B細胞エпитープを含んでいる(Wallsら、2020)という事実から、このウイルスエンベローブ糖タンパク質を中和抗体(NAb)の主要な標的となることが指摘される。

【0011】

本発明のレンチウイルス粒子による発現のためのSタンパク質は、SARS-CoV-2株に由来してもよく、したがって、ウイルスタンパク質のネイティブ配列であるアミノ酸配列によって特徴付けられうる。特定の実施形態において、本発明は、祖先株のSタンパク質(アミノ酸配列が配列番号1である)、又はアルファ株、ベータ株、ガンマ株、デルタ株若しくはオミクロン株(すべて、互いに対してバリエーション株とみなされる)等の後に発見されたバリエーション株のSタンパク質等の既知のSARS-CoV-2株のSタンパク質を用いて実施される。

【0012】

或いは、本発明は、Sタンパク質の誘導体、すなわち、本明細書で開示されるような、Sタンパク質のアミノ酸配列の変異によって得られるネイティブSタンパク質の誘導体を用いて実施されてもよい。LV::S組換え粒子を発現させるために、Sタンパク質をコードする核酸は、起源のウイルス株に存在する遺伝子の配列を有していてもよいし、又は哺乳動物細胞、特にヒト細胞での発現に適したコドン最適化された酸核酸であってもよい。Sタンパク質の誘導体を発現するLV組換え粒子を発現させるために、Sタンパク質の誘導体をコードする核酸は、ウイルス株中に存在するSタンパク質の遺伝子の配列から導きだされる配列を有していてもよく、また、哺乳動物細胞での発現に適したコドン最適化された酸核酸であってもよい。

【0013】

特定の実施形態において、本発明において使用される組換えレンチウイルス粒子(LV)は、HIV-1ベースのレンチウイルス粒子である。したがって、本明細書において「レン

チウイルス粒子」の「LV」という表現が使用される場合、それは特にHIV-1ベースのレンチウイルス粒子、特にVSV-Gタンパク質で偽型化されたLV粒子、特に実施例に示されているLVに向けられる。

【0014】

「ブースト」又は「ブースト免疫化」又は「ブースト投与」又は「標的免疫化」という表現は、本発明によれば、異種免疫剤、特に異種ワクチンの最初の投与後、又はそのような異種免疫剤若しくはワクチンの2回目以降の投与後に行われる免疫原性物質の投与を指す。言い換えれば、本発明に従って使用される免疫剤は、同じSARS-CoV-2又はそのバリエーション株に対する異種免疫剤若しくはワクチンのプライム投与、又はプライム投与と更に1回若しくは複数回の投与を以前に受けた対象に投与される。ブースト又は標的免疫化は、SARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質、mRNA、アデノウイルス、不活化ウイルス若しくはタンパク質サブユニットワクチン組成物等のSARS-CoV-2感染若しくは疾患に対する第一世代のワクチンの投与経路、特に筋肉内、皮内若しくは皮下投与経路を含む全身投与経路を利用することが最も多いタンパク質若しくはmRNAワクチンの投与経路とは相応に異なる、上気道への投与、特に鼻腔内投与によって達成される。ブースト若しくは標的免疫化は、以前に上昇させた免疫反応を増強、改善若しくは延長することを目的としており、場合によってはそのような反応を拡大して、複数のSARS-CoV-2ウイルスに対する交差中和を誘発することも意図されている。応答の改善は、本発明で使用される免疫剤が粘膜応答を誘発し、それに応じて、全身部位だけでなく、SARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質、mRNA、アデノウイルス、不活化ウイルス若しくはタンパク質サブユニットワクチン組成物、特に全身経路で注射されるタンパク質若しくはmRNAワクチン等のSARS-CoV-2感染若しくは疾患に対する異種ワクチンではうまく標的化若しくは保護されていないおそれのある上気道及び下気道、中枢神経系も保護する能力から生じうる。特定の実施形態では、ブースト投与は、ウイルスの新たに生じた株に対する対象の交差中和免疫応答を高めることが意図される。特定の実施形態において、ブースト若しくは標的免疫は、本明細書に開示されるような異種免疫剤を投与され、SARS-CoV-2による感染若しくはCOVID-19等のそのような感染に関連する疾患に罹患し、回復した対象に投与されうる。免疫剤の使用及び対象の治療経過に関する追加の特徴については、以下の説明が開示される。

【0015】

「上気道への」投与は、上気道の粘膜への送達をもたらす、あらゆるタイプの投与を含み、特に鼻腔への投与を含む。上気道への投与は、エアロゾル吸入、鼻腔注入、鼻腔吸入、及びそれらのあらゆる組み合わせを含むが、これらに限定はされない。いくつかの実施形態では、投与はエアロゾル吸入によるものである。いくつかの実施形態では、投与は鼻腔投与によるものである。いくつかの実施形態では、投与は鼻腔吸入によるものである。

【0016】

特定の実施形態によれば、SARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子は、SARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質、mRNA、アデノウイルス、不活化ウイルス及びタンパク質サブユニットワクチン組成物からなる群から選択されるSARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するワクチン組成物、特にSARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質若しくはmRNAワクチン組成物のプライム投与を受けた対象において、鼻腔内粘膜ブースト若しくは標的免疫化として投与するためのものである。

【0017】

特定の実施形態によれば、本明細書に開示の実施形態に従って使用するためのSARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子は、以下の特徴によって更に特徴付けられる：

- Sタンパク質が、ヒト宿主に対して病原性を有するSARS-CoV-2ウイルス由来であり、特に(i)SARS-CoV-2祖先株、D614G株、アルファ株、ベータ株、ガンマ株、デルタ株及びオミクロン株からなる群から選択されるSARS-CoV-2ウイルス由来のSタンパク

質であり、好ましくはベータ株若しくはオミクロン株から、より好ましくはベータ株から選択されるSARS-CoV-2ウイルス由来のSタンパク質であるか、又は(ii)前記祖先株、D614G株、アルファ株、ベータ株、ガンマ株、デルタ株若しくはオミクロン株のバリエーション由来のSタンパク質であって、そのようなバリエーションが、配列番号1と少なくとも90%同一なアミノ酸配列を有するSタンパク質をコードする、Sタンパク質である、或いは

- Sタンパク質が、1~12個、特に1~6個のアミノ酸残基の変異、特に1~12個、特に1~6個のアミノ酸残基の置換及び/若しくは欠失による、祖先株、D614G株、アルファ株、ベータ株、ガンマ株、デルタ株若しくはオミクロン株のいずれかのネイティブSタンパク質の誘導体、特に、(a)Sタンパク質のアミノ酸配列において配列番号1を参照して残基986及び987として提供される位置のSタンパク質のS2ドメインにおけるプロリン残基についての2個の連続するアミノ酸残基の置換によって特徴付けられるSタンパク質の安定化形態であるか、又は(b)Sタンパク質のアミノ酸配列において配列番号1を参照して残基675から残基685に位置するフリン部位の欠失によるSタンパク質の融合前の形態であるか、又は(c)フリン部位の欠失及び配列番号1を参照して残基986及び987の位置におけるS2ドメイン中のプロリン残基についての2個の連続するアミノ酸残基の置換によるSタンパク質の安定化融合前の形態である。

10

【0018】

特定の実施形態において、SARS-CoV-2の祖先株のSタンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列を有し、SARS-CoV-2の祖先株のSタンパク質をコードするポリヌクレオチドのネイティブ配列は、配列番号2において定義される。

20

【0019】

別の特定の実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列の位置614におけるアスパラギン酸残基のグリシン残基への変異(D614G)、配列番号1のアミノ酸配列の位置986におけるリジン残基のプロリン残基への変異(K986P)、及び配列番号1のアミノ酸配列の位置987におけるバリリン残基からプロリン残基への変異(V987P)を含む、SARS-CoV-2のD614G株のSタンパク質をコードするポリヌクレオチドのネイティブ配列、すなわち、変異2Pは配列番号3(S_{D614G-2P})において定義されている。前記変異2Pを含むSARS-CoV-2のD614G株のSタンパク質(S_{D614G-2P})は、配列番号4のアミノ酸配列を有する。

【0020】

別の特定の実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列の位置986におけるリジン残基のプロリン残基への変異(K986P)及び配列番号1のアミノ酸配列の位置987におけるバリリン残基のプロリン残基への変異(V987P)、すなわち、変異2Pを含む、SARS-CoV-2のアルファ株のSタンパク質をコードするポリヌクレオチドのネイティブ配列は、配列番号5(S_{Alpha-2P})において定義されている。前記変異2Pを含むSARS-CoV-2のアルファ株のSタンパク質(S_{Alpha-2P})は、配列番号6のアミノ酸配列を有する。

30

【0021】

別の特定の実施形態では、SARS-CoV-2のベータ株のSタンパク質をコードするポリヌクレオチドのネイティブ配列は、配列番号7(S_{Beta})において定義されている。SARS-CoV-2のベータ株(S_{Beta})のSタンパク質は、配列番号8のアミノ酸配列を有する。

【0022】

別の特定の実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列の位置986におけるリジン残基のプロリン残基への変異(K986P)及び配列番号1のアミノ酸配列の位置987におけるバリリン残基のプロリン残基への変異(V987P)、すなわち、変異2Pを含む、SARS-CoV-2のベータ株のSタンパク質をコードするポリヌクレオチドのネイティブ配列は、配列番号9(S_{Beta-2P})において定義されている。前記変異2Pを含むSARS-CoV-2のベータ株のSタンパク質(S_{Beta-2P})は、配列番号10のアミノ酸配列を有する。

40

【0023】

別の特定の実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列の位置986におけるリジン残基のプロリン残基への変異(K986P)及び配列番号1のアミノ酸配列の位置987におけるバリリン残基のプロリン残基への変異(V987P)、すなわち、変異2Pを含む、SARS-CoV-2の

50

ガンマ株のSタンパク質をコードするポリヌクレオチドのネイティブ配列は、配列番号11($S_{\text{Gamma-2P}}$)において定義されている。前記変異2Pを含むSARS-CoV-2のガンマ株のSタンパク質($S_{\text{Gamma-2P}}$)は、配列番号12のアミノ酸配列を有する。

【0024】

別の特定の実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列の位置986におけるリジン残基のプロリン残基への変異(K986P)及び配列番号1のアミノ酸配列の位置987におけるバリリン残基のプロリン残基への変異(V987P)、すなわち、変異2Pを含む、SARS-CoV-2のデルタ株のSタンパク質をコードするポリヌクレオチドのネイティブ配列は、配列番号13($S_{\text{Delta-2P}}$)において定義されている。前記変異2Pを含むSARS-CoV-2のデルタ株のSタンパク質($S_{\text{Delta-2P}}$)は、配列番号14のアミノ酸配列を有する。

【0025】

別の特定の実施形態では、SARS-CoV-2のオミクロン株のSタンパク質をコードするポリヌクレオチドのネイティブ配列は、配列番号15(S_{omicron})において定義されている。SARS-CoV-2のオミクロン株(S_{omicron})のSタンパク質は、配列番号16のアミノ酸配列を有する。

【0026】

別の特定の実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列の位置986におけるリジン残基のプロリン残基への変異(K986P)及び配列番号1のアミノ酸配列の位置987におけるバリリン残基のプロリン残基への変異(V987P)、すなわち、変異2Pを含む、SARS-CoV-2のオミクロン株のSタンパク質をコードするポリヌクレオチドのネイティブ配列は、配列番号17($S_{\text{omicron-2P}}$)において定義されている。前記変異2Pを含むSARS-CoV-2のオミクロン株のSタンパク質($S_{\text{omicron-2P}}$)は、配列番号18のアミノ酸配列を有する。

【0027】

別の特定の実施形態では、SARS-CoV-2のオミクロン-BA.1株のSタンパク質をコードするポリヌクレオチドのネイティブ配列は、配列番号23($S_{\text{omicron-BA.1}}$)において定義されている。SARS-CoV-2のオミクロン株($S_{\text{omicron-BA.1}}$)のSタンパク質は、配列番号24のアミノ酸配列を有する。

【0028】

別の特定の実施形態では、SARS-CoV-2のオミクロン-BA.4若しくはBA.5株のSタンパク質をコードするポリヌクレオチドのネイティブ配列は、配列番号25($S_{\text{omicron-BA.4/5}}$)において定義されている。SARS-CoV-2のオミクロン-BA.4若しくはBA.5株($S_{\text{omicron-BA.4/5}}$)のSタンパク質は、配列番号26のアミノ酸配列を有する。

【0029】

別の特定の実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列の位置986におけるリジン残基のプロリン残基への変異(K986P)及び配列番号1のアミノ酸配列の位置987におけるバリリン残基のプロリン残基への変異(V987P)、すなわち、変異2Pを含む、SARS-CoV-2の祖先株のSタンパク質をコードするポリヌクレオチドのネイティブ配列は、配列番号19(S_{2P})において定義されている。前記変異2Pを含むSARS-CoV-2の祖先株のSタンパク質(S_{2P})は、配列番号20のアミノ酸配列を有する。

【0030】

特定の実施形態において、偽型レンチウイルスベクター粒子は、パスツール研究所(25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 FRANCE)にあるCOLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES (CNCM)に2021年7月6日に番号CNCM I-5710の下、寄託されたベクターpFlap-ieCMV-S-B351-2P-WPREmによってコードされる変異2P($S_{\text{Beta-2P}}$)を含む、SARS-CoV-2のベータ株のSタンパク質をコードする。

【0031】

また、ベクターpFlap-ieCMV-S-B351-2P-WPREm(CNCM I-5710)も提供される。pFlap-ieCMV-S-B351-2P-WPREmのヌクレオチド配列は配列番号22において定義されている。

10

20

30

40

50

【0032】

また、ベクター-pFlap-ieCMV-S-B351-2P-WPREm(CNCM I-5710又は配列番号22)を含む宿主細胞も提供される。

【0033】

また、変異2P(S_{Beta-2P})を含むSARS-CoV-2のベータ株のSタンパク質をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子も提供されるが、ここで、偽型レンチウイルスベクター粒子は、ベクター-pFlap-ieCMV-S-B351-2P-WPREm(CNCM I-5710又は配列番号22)による宿主細胞の共トランスフェクションを含む方法によって産生される。

【0034】

特定の実施形態において、本明細書に開示の実施形態に従って使用するためのSARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子は、以下の特徴によって更に特徴付けられる:Sタンパク質のアミノ酸配列が配列番号1であるか、又は配列番号1と少なくとも90%同一なアミノ酸配列を有するその誘導体であり、そしてSARS-CoV-2のSタンパク質の誘導体が、(i)配列番号1のアミノ酸配列の位置417におけるリジン残基からアスパラギン残基への変異(K417N)、(ii)配列番号1のアミノ酸配列の位置484におけるグルタミン酸残基からリジン残基への変異(E484K)、又は配列番号1のアミノ酸配列の位置484におけるグルタミン酸残基からアラニン残基への変異(E484A)、(iii)配列番号1のアミノ酸配列の位置501におけるアスパラギン残基のチロシン残基への変異(N501Y)、(iv)配列番号1のアミノ酸配列の位置986におけるリジン残基のプロリン残基への変異(K986P)、並びに(v)配列番号1のアミノ酸配列の位置987におけるバリン残基のプロリン残基への変異(V987P)を含む、少なくとも5つのアミノ酸変異を含む。

【0035】

特定の実施形態において、本発明に従って使用するためのSARS-CoV-2のSSタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子は、SARS-CoV-2のSタンパク質が更に、(vi)配列番号1のアミノ酸配列の位置446におけるグリシン残基からセリン残基への変異(G446S)、(vii)配列番号1のアミノ酸配列の位置478におけるトレオニン残基からリジン残基への変異(T478K)、(viii)配列番号1のアミノ酸配列の位置493におけるグルタミン残基からアルギニン残基への変異(Q493R)、及び(ix)配列番号1のアミノ酸配列の位置498におけるグルタミン残基からアルギニン残基への変異(Q498R)からなる群から選択されるアミノ酸変異を含むようなものである。

【0036】

特定の実施形態において、本発明に従って使用するためのSARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子は、コードされたSARS-CoV-2の変異Sタンパク質が、配列番号10又は配列番号18、好ましくは配列番号10のアミノ酸配列を有するようなものである。

【0037】

別の特の実施形態において、本発明に従って使用するためのSARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子は、コードされたSARS-CoV-2の変異Sタンパク質が、配列番号24又は配列番号26のアミノ酸配列を有するようなものである。

【0038】

特定の実施形態において、本発明に従って使用するためのSARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子は、水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質G(VSV-G)タンパク質で偽型化されている。

【0039】

特に、VSV-Gタンパク質は、インディアナ株又はニュージャージー株のVSVウイルスによって提供されるのが有利である。

【0040】

特定の実施形態において、本発明に従って使用するためのSARS-CoV-2のSタンパク質

又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子は、偽型レンチウイルスベクター粒子が、非組み込み型、非細胞変性型及び非複製型であるようなものである。

【0041】

本発明による免疫原性薬剤の本明細書に開示の使用に係るいくつかの実施形態において、免疫原性薬剤又はその薬剤を含む組成物は、SARS-CoV-2によるヒト対象の感染を予防する方法において使用するためのものである。いくつかの実施形態において、免疫原性薬剤又は組成物は、SARS-CoV-2に曝露されるか、又はSARS-CoV-2に感染するリスクのあるヒト対象におけるSARS-CoV-2の複製に対する防御方法に使用するためのものである。いくつかの実施形態において、免疫原性組成物は、SARS-CoV-2に曝露されるか、又はSARS-CoV-2に感染するリスクのあるヒト対象において、COVID-19等のSARS-CoV-2による感染に関連する症状の発現又は疾患の発症を予防する方法において使用するためのものである。いくつかの実施形態において、免疫原性組成物は、SARS-CoV-2に曝露されるか、又はSARS-CoV-2に感染するリスクのあるヒト対象において、SARS-CoV-2による感染に関連する神経学的転帰結果の発症を予防する方法において使用するためのものである。いくつかの実施形態において、免疫原性組成物は、SARS-CoV-2に曝露されるか、又はSARS-CoV-2に感染するリスクのあるヒト対象の中枢神経系(CNS)を保護する方法において使用するためのものである。いくつかの実施形態では、ワクチンは、SARS-CoV-2による感染に対する防御、特に滅菌防御を提供する。

10

【0042】

開示される方法における使用のためのこれらの用途のいずれにおいても、免疫原性薬剤又は組成物は、SARS-CoV-2に対する免疫応答を惹起するために、上気道への投与に有効な量で、ブースト又は標的投与段階において予防剤として対象に投与されるものである。

20

【0043】

いくつかの実施形態において、免疫原性組成物は、SARS-CoV-2感染に対する、又はSARS-CoV-2感染に関連する症状若しくはCOVID-19疾患の発症に対するヒト対象(ここで、対象は肺及び/又はCNS病態を発症するリスクがある)の防御方法における使用のためのものである。特に、ヒト対象が併存疾患、特にCNSに影響を及ぼす併存疾患に罹患しているため、SARS-CoV-2の複製からCNSを免疫的に保護する必要がある。

【0044】

特定の実施形態において、本明細書に開示の実施形態のいずれか1つに従って使用するためのSARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子は、(a)SARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質、mRNA、アデノウイルス、不活化ウイルス及びタンパク質サブユニットワクチン組成物からなる群から選択されるSARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するワクチン組成物、特にSARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質若しくはmRNAベースのワクチンを、筋肉内、皮内若しくは皮下投与等の全身プライム及び/若しくはブースト投与、特に筋肉内プライム及び/又はブースト投与として以前に投与された対象、(b)SARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質、mRNA、アデノウイルス、不活化ウイルス及びタンパク質サブユニットワクチン組成物からなる群から選択されるSARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するワクチン組成物、特にSARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質若しくはmRNAベースのワクチンの筋肉内、皮内若しくは皮下投与等の全身プライム投与、特に筋肉内プライム投与を受け、その後コロナウイルス疾患2019(COVID-19)等のコロナウイルス疾患から回復した対象、(c)COVID-19等のコロナウイルス疾患から最初に回復し、その後SARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質ベース若しくはmRNAベースのワクチンの筋肉内、皮内若しくは皮下投与、特に筋肉内投与等の全身プライム投与を受けた対象、並びに(d)SARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質若しくはmRNAベースのワクチンの筋肉内、皮内若しくは皮下投与、特に筋肉内投与等の全身投与を2回より多く、特に3回より多く受けた対象からなる群から選択される対象に投与される。

30

40

【0045】

50

特定の実施形態において、SARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子は、SARS-CoV-2感染若しくは疾患に対する長期間持続する防御的粘膜液性免疫応答及び/又は長期間持続する粘膜細胞性免疫応答を誘発するためのプライム/ブースト又は標的免疫化レジメンにおける使用のためのものであり、ここで、前記応答は対象の呼吸器系及び/又はCNSを保護する。

【0046】

特定の実施形態において、SARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子は、免疫化レジメンにおける使用のためのものであり、ここで、偽型レンチウイルスベクター粒子は、SARS-CoV-2に対するCD⁸⁺T細胞応答を誘発する。

特定の実施形態においてSARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子は、免疫化レジメンにおける使用のためのものであり、ここで、偽型化レンチウイルスベクター粒子は、スパイクに特異的で、インターフェロン-ガンマ(IFN- γ)/腫瘍壊死因子(TNF)/インターロイキン-2(IL-2)サイトカインを産生することができる肺に常在するメモリーCD⁸⁺T細胞(T_{rm})及び/又はエフェクターCD⁸⁺T細胞(T_{c1})を誘発する。特定の実施形態において、本発明に従って使用するためのARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子は、対象が、SARS-CoV-2感染症若しくは疾患に対するタンパク質、mRNA、アデノウイルス、不活化ウイルス及びタンパク質サブユニットワクチン組成物からなる群から選択されるSARS-CoV-2感染症若しくは疾患に対するワクチン組成物、特にSARS-CoV-2感染症若しくは疾患に対するタンパク質又はmRNAベースのワクチンによる初回ワクチン接種の最初の注射後、又はSARS-CoV-2疾患回復後、特にCOVID-19回復後の12週目から免疫の衰退を示す、免疫化レジメンにおいて使用される。

【0047】

マウスの前臨床試験結果において、本発明者らは、スパイク抗原を発現するmRNAベースのワクチンを最後に投与してから4~5ヶ月後には、SARS-CoV-2に対する防御免疫がもはや存在しないことを示した(Vesinら、2022、Mol Ther 30、2984-2997)。更に、スパイク抗原を発現するmRNAベースのワクチンを最後に投与してから3~10ヶ月後には、ワクチン接種者の血清中の中和抗スパイク抗体レベルが有意に低下することが、現在では十分に確立されている(Decruら、2022、Front Immunol. 13、909910)。

【0048】

また、SARS-CoV-2スパイクを含む抗原に免疫系が事前に曝露された後、ワクチン接種の文脈において、ワクチン接種の戦略とは関係なく、或いは感染の文脈でも、B細胞とT細胞のコンパートメントで記憶免疫が一般に誘導されることも広く確立されている(Valyi-Nagyら、2022、Int J Mol Sci、23.10.3390)。現在評価されている限りでは、ワクチン接種又は感染によって誘導される抗スパイク免疫の場合、そのような記憶免疫は平均して少なくとも1年間持続すると予想されている(Gallaisら、2021、EBioMedicine、71、103561)。この記憶免疫は、少なくともmRNAワクチンの最終投与から1年後まではブースト可能である。

【0049】

特定の実施形態において、本発明に従って使用するためのSARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子は、SARS-CoV-2との最後の接触後、SARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質、mRNA、アデノウイルス、不活化ウイルス及びタンパク質サブユニットワクチン組成物からなる群より選択されるSARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するワクチン組成物、特にSARS-CoV-2感染若しくは疾患に対するタンパク質若しくはmRNAワクチン組成物の投与後、少なくとも3ヶ月後、特に3~24ヶ月後、好ましくは3~12ヶ月後に、鼻腔内粘膜ブースト又は標的免疫として本発明に従って対象に投与される。

【0050】

特定の実施形態において、本発明に従って使用するためのSARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子は、鼻腔内エアロゾル、鼻腔内滴下剤又は鼻腔内吸入剤として投与するための液体組成物又は乾燥粉末として製剤化される。特定の実施形態において、本発明に従って使用するためのSARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子は、投与レジメンが、偽型レンチウイルスベクター粒子の1つ以上の剤形の投与を含み、各剤形の投与量が $10^7 \sim 10^9$ トランスダクション単位(TU)である、免疫化レジメンにおいて使用される。

【0051】

別の態様によれば、本発明はまた、SARS-CoV-2のSタンパク質又はその誘導体をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子と、薬学的に許容される担体とを含む免疫原性組成物にも関し、ここで、SARS-CoV-2のSタンパク質の偽型化誘導体は、(i)配列番号1のアミノ酸配列の位置417におけるリジン残基からアスパラギン残基への変異(K417N)、(ii)配列番号1のアミノ酸配列の位置484におけるグルタミン酸残基からアラニン残基への変異(E484A)、(iii)配列番号1のアミノ酸配列の位置501におけるアスパラギン残基からチロシン残基への変異(N501Y)、(iv)配列番号1のアミノ酸配列の位置986におけるリジン残基からプロリン残基への変異(K986P)、(v)配列番号1のアミノ酸配列の位置987におけるバリン残基からプロリン残基への変異(V987P)、(vi)配列番号1のアミノ酸配列の位置446におけるグリシン残基からセリン残基への変異(G446S)、(vii)配列番号1のアミノ酸配列の位置478におけるトレオニン残基からリジン残基への変異(T478K)、(viii)配列番号1のアミノ酸配列の位置493におけるグルタミン残基からアルギニン残基への変異(Q493R)、及び(ix)配列番号1のアミノ酸配列の位置498におけるグルタミン残基からアルギニン残基への変異(Q498R)を含む、少なくとも9つのアミノ酸変異を含む。

【0052】

この免疫原性組成物は、偽型レンチウイルスベクター粒子が、アミノ酸配列が配列番号18であるSARS-CoV-2の変異Sタンパク質をコードするようなものでありうる。

【0053】

別の実施形態によれば、この免疫原性組成物は、偽型レンチウイルスベクター粒子が、アミノ酸配列が配列番号24又は配列番号26であるSARS-CoV-2の変異Sタンパク質をコードするようなものであってもよい。

【0054】

さらなる実施形態によれば、免疫原性組成物は、本明細書の実施形態に開示されているように、鼻腔内投与用に製剤化される。

【0055】

本発明はまた、本明細書に開示される使用又は方法を実施する際に使用するのに適したキットにも関する。いくつかの実施形態において、キットは、本開示によるSARS-CoV-2 Sタンパク質をコードする偽型レンチウイルスベクター粒子又はその誘導体を対象の上気道への投与するための剤形、及びアプリケーションタを含む。いくつかの実施形態において、アプリケーションタは、エアロゾル吸入のためのアプリケーションタである。いくつかの実施形態において、アプリケーションタは、鼻腔注入用のアプリケーションタである。いくつかの実施形態において、アプリケーションタは、鼻腔吸入用のアプリケーションタである。各々の適切な例は、当該技術分野で知られており、使用されうる。

【0056】

組換えLV粒子の調製は、非組み込み型、非複製型の組換えLV粒子を得ることを含め、当技術分野で知られている。特に、Ku MWら、Cell Host Microbe、29(2)、236-249 e236、2021; Ku MWら、EMBO Mol Med、e14459、2021; Ku MW、Charn eau P、Majlessi L. Expert Rev Vaccines、1-16、2021の開示が参照される。ポリヌクレオチド構築物は、選択されたスパイクタンパク質又はその誘導体をコードする配列で適応されうる。

【0057】

いくつかの実施形態において、レンチウイルスベクター粒子は、HIV-1 Gag及びPolタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、レンチウイルスベクター粒子は、サブタイプD、特にHIV-1_{NDK}、Gag及びPolタンパク質を含む。

【0058】

いくつかの実施形態によれば、レンチベクター粒子は、DNAプラスミドで形質転換された宿主細胞で得られる。

【0059】

そのようなDNAプラスミドは、以下を含み得る：

- 細菌の複製起点(例えば、pUC ori);
- 選択のための抗生物質耐性遺伝子(例えば、Amp^r又はKan^r);そして、より具体的には:

- SARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体をコードする少なくとも1つの核酸を含み、プロモーター、例えばCMVプロモーターに転写可能に連結されたレンチウイルスベクター。

【0060】

そのような方法は、以下の工程を含み、本発明に従って使用するための組換えベクター粒子を産生することを可能とする：

i)適切な宿主細胞をレンチウイルスベクターでトランスフェクトする工程;

ii)レトロウイルス(好ましくはレンチウイルス)の少なくとも構造活性及びポリメラーゼ(+インテグラーゼ)活性をコードするウイルスDNA配列を含むパッケージングプラスミドベクターで前記宿主細胞をトランスフェクトする工程;そのようなパッケージングプラスミドは、当技術分野において記述されている(Dullら、1998、J Virol、72(11):8463-71;Zuffereyら、1998、J Virol 72(12):9873-80);

iii)前記レンチウイルスベクターの発現及びレンチウイルスベクター粒子へのパッケージングを得るために、前記トランスフェクトされた宿主細胞を培養する工程;並びに

iv)前記培養宿主細胞における工程iii)の発現及びパッケージングから生じるレンチウイルスベクター粒子を収集する工程。

【0061】

適切な宿主細胞は、好ましくはヒト培養細胞株、例えばHEK293T株等のHEK細胞株である。

【0062】

或いは、ベクター粒子を産生する方法は、宿主細胞で実施され、この宿主細胞は、ゲノムが以下の構成要素:レンチウイルスベクターDNA配列、パッケージング遺伝子、及びエンベロープ遺伝子の1つ以上で安定に形質転換されている。そのようなDNA配列は、ベクター配列の転写を可能にし、粒子産生速度を向上させる追加のプロモーターを含む、本発明に係るプロウイルスベクターに類似するものとみなすことができる。

【0063】

好ましい実施形態では、宿主細胞は、細胞全体が膨潤又は死滅することなく、培養培地中でウイルス粒子を連続的に産生できるように更に改変されている。ウイルス粒子を産生するためのそのような技術に関しては、Strangら、2005、J Virol 79(3):1165-71; Relanderら、2005、Mol Ther 11(3):452-9;Stewartら、2009、Gene Ther、16(6):805-14;及びStuartら、2011、Hum gene Therを参照してもよい。

【0064】

レンチウイルス粒子ベクターは、先に定義したように、以下の要素を含み得る：

- cPPT/CTSポリヌクレオチド配列;及び
- β 2m若しくは主要組織適合性複合体クラスI(MHC-I)プロモーターの制御下にあるCARをコードする核酸、及び場合により、上記の追加要素のうちの1つ。

【0065】

本発明の他の特徴及び利点は、後に続く実施例から明らかになり、また、図においても示される。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0066】

【図1】交差血清中和抗体を誘導する可能性が最も高いS_{CoV-2}バリエーションのダウンセレクトクシオン。(A)LV::S_{Alpha}、LV::S_{Beta}若しくはLV::S_{Gamma}によるプライムブーストワクチン接種、並びにC57BL/6マウス(n=4~5/群)における(交差)血清中和アッセイのタイムライン。(B)D614G、アルファ、ベータ又はガンマバリエーション由来のS_{CoV-2}を保有する偽型ウイルスに対するワクチン接種マウス由来の血清の中和活性の半値最大有効濃度(EC50)をブーストの前後で評価した。(C)S_{D614G}をコードするLV(WT又はS2ドメインにK⁹⁸⁶P-V⁹⁸⁷P置換を有するもの)を用いて(A)で詳述したレジメンに従ってワクチン接種したC57BL/6マウス由来の血清のEC50。(B)に示されているように、EC50はブーストの前後で評価した。

10

【図2】LV::S_{Beta-2P}で更に経鼻的にブーストしたmRNA-1273ワクチン接種マウスにおける抗S_{CoV-2}液性応答。(A)LV::S_{Beta-2P}(n=4~5/群)の漸増用量で後にi.n.免疫したC57BL/6マウスにおけるmRNA-1273の筋肉内(i.m.)-i.m.プライムブーストワクチン接種と(交差)血清中和フォローアップのタイムライン。(B)D614G、アルファ、ベータ、ガンマ、デルタ又はデルタ+バリエーションのS_{CoV-2}を保有する偽型ウイルスに対し、表示の時点で測定された血清EC50。(C)後期LV::S_{Beta-2P} i.n.又はmRNA-1273(Moderna)i.m.ブーストの2週間後における血清中の抗S_{CoV-2} IgG又はIgA。統計的有意性は、マン-ホイットニー検定によって決定した(*=p<0.05、**=p<0.01、***=p<0.001)。

20

【図3】LV::S_{Beta-2P}で更に経鼻的にブーストしたmRNA-1273ワクチン接種マウスにおける肺常在メモリーB細胞サブセット。マウスは図2に詳述したものである。LV::S_{Beta-2P} i.n.ブーストの2週間後に粘膜免疫細胞を調べた。(A)肺B常在メモリー細胞を検出するためのサイトメトリーゲーティング戦略、及び(B)様々な群における表面IgM/IgD-B細胞中のB_{rm}の割合。

【図4】LV::S_{Beta-2P}で更に経鼻的にブーストしたmRNA-1273ワクチン接種マウスにおけるS_{CoV-2}に対する全身CD8⁺ T細胞応答。マウスは図2に詳述したものである。C57BL/6(H-2^b)マウスにおいて、関連するS_{CoV-2} MHC-I制限エピトープを包含するS:256-275、S:536-550又はS:576-590の合成15merペプチドで刺激した後、LV::S_{Beta-2P}のi.n.ブーストの2週間後に、IFN- γ ELISPOTでT脾細胞応答を評価した。統計的有意性は、マン-ホイットニー検定によって評価した(*=p<0.05)。

30

【図5】LV::S_{Beta-2P}で更に経鼻的にブーストしたmRNA-1273ワクチン接種マウスにおけるS_{CoV-2}に対する粘膜CD8⁺ T細胞応答。マウスは図2に詳述したものである。(A)S:256-275、S:536-550及びS:576-590ペプチドのプールでin vitro刺激した後、細胞内サイトカイン染色(ICS)によって検出された肺CD8⁺ T細胞による代表的なIFN- γ 応答。細胞は、生存しているCD45⁺CD8⁺ T細胞についてゲーティングされている。

【図6】LV::S_{Beta-2P}で更に経鼻的にブーストしたmRNA-1273ワクチン接種マウスにおける肺常在記憶T細胞サブセット。マウスは図2及び図3において詳述したものである。LV::S_{Beta-2P} i.n.ブーストの2週間後に粘膜免疫細胞を調べた。(A)肺CD8⁺ T常在メモリー細胞(Trm、CD44⁺CD62L⁺CD69⁺CD103⁺)を検出するためのサイトメトリーゲーティング戦略、及び(B)様々な群におけるCD8⁺CD44⁺ T細胞中のTrmの割合。

40

【図7】mRNA-1273でプライミングし、ブーストしたマウスにおける後期LV::S_{Beta-2P} i.n.ブーストによる完全な防御能。(A)後に1×10⁸ TU/マウスの最適投与量以下のLV::S_{Beta-2P}(n=4~5/群)のi.n.免疫し、0.3×10⁵ TCID₅₀(50%の組織培養感染用量)のSARS-CoV-2デルタバリエーションでi.n.チャレンジする4日前にAd5::hACE-2でi.n.前処理した、C57BL/6マウスにおけるmRNA-1273 i.m.-i.m.プライム-ブーストワクチン接種のタイムライン。(B)Ad5::hACE-2でi.n.前処置した異なる群のマウスの肺におけるhACE-2 mRNAの比較定量。(C)従来のE_{CoV-2}特異的(上)又はサブゲノムE_{sg}特異的(下)qRT-PCRにより3dpiにおいて評価したウイルスRNA含有量。下の線は検出限界を指し示している。統計的有意性は、マン-ホイットニー検定で評価した(*=p<0.05、*

50

*=p < 0.01)。

【図8】LV::SBeta-2Pで更に経鼻的にブーストしたmRNA-1273ワクチン接種マウスにおける抗Scov-2液性応答。(A)最初にmRNA-1273でプライミングし、i.m.ブーストしたマウスの血清中における抗Scov-2(左)及び抗RBD(右)IgGのフォローアップ。(B)最初にmRNA-1273でi.m.プライミング及びブーストし、その後、3回目のmRNA-1273のi.m.投与又はLV::SBeta-2Pのi.n.ブーストでブーストしたマウスの全肺抽出液中における抗Scov-2 IgG(上)、抗RBD IgG(中)、及び抗Scov-2 IgA(下)。

【図9】LV::SBeta-2Pで更に経鼻的にブーストしたmRNA-1273ワクチン接種マウスにおけるScov-2に対する粘膜CD8⁺ Tc2応答の欠如。マウスは図2に詳述したものである。IFN- γ /TNF/IL-2を検出するために行ったアッセイと並行してICSにより調べた、S:256-275、S:536-550及びS:576-590ペプチドのプールによるin vitro刺激後の肺CD8⁺ T細胞によるIL-4、IL-5、IL-10及びIL-13産生の欠如(図5参照)。細胞は、生存しているCD45⁺CD8⁺ T細胞についてゲーティングされている。

【図10A】(A)SD614G-2P抗原をコードするLVの産生に使用されるプラスミドのマップ。

【図10B】(B)SAlpha-2P抗原をコードするLVの産生に使用されるプラスミドのマップ。

【図10C】(C)SGamma-2P抗原をコードするLVの産生に使用されるプラスミドのマップ。

【図10D】(D)SDelta-2P抗原をコードするLVの産生に使用されるプラスミドのマップ。

【図10E】(E)SBeta-2P抗原をコードするLVの産生に使用されるプラスミドのマップ。

【図10F】(F)Somicron-2P抗原をコードするLVの産生に使用されるプラスミドのマップ。

【図11A】(A)オミクロンBA.1(上)サブバリエーション由来のスパイクのアミノ酸配列。太字及び下線で指し示した配列は、H-2^bマウスにおけるマウスMHC-I制限T細胞エピートープである(Ku MWら、EMBO Mol Med、e14459、2021)。灰色で強調表示した配列は、HHD-DR1 MHCヒト化マウスで同定されたMHC-I又はII制限ヒトT細胞エピートープである。

【図11B】(B)オミクロンBA 4/5(下)サブバリエーション由来のスパイクのアミノ酸配列。太字及び下線で指し示した配列は、H-2^bマウスにおけるマウスMHC-I制限T細胞エピートープである(Ku MWら、EMBO Mol Med、e14459、2021)。灰色で強調表示した配列は、HHD-DR1 MHCヒト化マウスで同定されたMHC-I又はII制限ヒトT細胞エピートープである。

【図12】様々なLV::Sでi.m.免疫したハムスターにおける液性免疫。(A)祖先WA1株又はベータSARS-CoV-2株由来のScov-2タンパク質をコードするLVの模式図。Scov-2をコードするコドン最適化配列をヒトPCMVieプロモーターの制御下にあるpFLAPレンチウイルスベクタープラスミドにクローニングした;RRE、rev応答要素;cPPT、中心ポリプリン区域。LV::SWA1は、Scov-2の配列全体を含んでいる。RBD、S1/S2、S2'切断部位、配列番号27のRRARフリン切断部位を包含する675QTQTNSPRRAR685配列、並びにK⁹⁸⁶P、V⁹⁸⁷P、K⁴¹⁷N、E⁴⁸⁴K及びN⁵⁰¹Y置換が指し示されている。(B)LV形質導入293T細胞におけるSWA1、SWA1-2P、SWA1- Δ F-2P、及びSBeta2-Pの発現を検出するためのウェスタンブロット分析。全細胞溶解物を、抗S2ウサギポリクローナル抗体を用いて非還元条件下で分析した。陰性対照としてLV::GFPを含めた。全長のスパイク(S)とS2サブユニットが指し示されている。(C)ゴールデンハムスター(n=4/群)に、1 $\times$ 10⁸TUのLV::SWA1、LV::SWA1-2P、LV::SWA1 Δ F-2P、又はLV::SBeta-2Pをi.m.免疫した。5週間後、血清中の抗SWA1応答をELISA法で測定し、平均終点希釈力価で表した。エラーバーは平均値の標準誤差(SEM)を表している。差異の統計的有意性は、クラスカル-ウォリス検定とそれに続くダンの多重比較検定によって決定し、有意ではないことが判明した。点線は、検出限界(LOD)を指し示している。

10

20

30

40

50

【図13】ハムスターにおけるLV::S投与後の液性免疫。(A)ハムスター(n=6/群)におけるLV::Sプライムブーストワクチン接種レジメンとWA1 SARS-CoV-2チャレンジのタイムライン。(B)血清抗S_{WA1}又は抗RBD_{WA1} IgG応答が、ELISAによって測定された平均終点希釈力価として表されている。(C)D614G SARS-CoV-2バリエーション由来のS_{CoV-2}を保有する偽型ウイルスを用いて測定した、WA1 SARS-CoV-2チャレンジ前に採取した血清、又は4dpiに採取した肺ホモジネートの中和活性(EC50)。データは平均値±SEMとして示されている。アスタリスクは、群間の差異の有意性を指し示している。p値は、クラスカル-ウォリス検定とそれに続くダンの多重比較検定を使用して決定した;*p<0.05、**p<0.01。有意差のみが示されている。点線はLODを指し示している。

【図14】単回i.n.LV::S注射がWA1 SARS-CoV-2からハムスターを完全に保護する。ハムスターは、図13の凡例に記載されているものである。(A)4dpiにおいてトータルE(左)又はEsg qRT-PCR(右)によって定量した肺のウイルス量。バーは、幾何平均値を表している。(B)4dpiにおけるLV::S-又はLV ctrl-ワクチン接種ハムスターの体重減少率。(C)チャレンジ後の肺組織における炎症性サイトカインの発現。ヒートマップは、LV::Sワクチン接種又はLV ctrl投与を行った個体における炎症関連メディエーターの発現における相対的log₂倍数変化を要約したものであり、肺の全ホモジネートから抽出したRNAを用いて4dpiにおいて分析し、未処置の対象のサンプルに対して正規化した。各群6匹のハムスターがヒートマップに示されている。LV::S群とLV ctrl群の統計的差は、クラスカル-ウォリス検定とそれに続くダンの多重比較検定によって決定し、アスタリスクによって指し示されている;*p<0.05;**p<0.01;***p<0.001。ワクチン接種群とLV ctrlとの間で比較を行った。

【図15】単回i.n. LV::S注射が肺の組織病変を大幅に低減させた。(A)4dpiにおいて調べた肺の組織学的H&E分析。1)炎症スコアと2)間質性症候群の組織学的スコアを要約したヒートマップ。LV ctrlを注射し感染させたハムスターにおける、(B)代表的な肺胞間質症候群と(C)重篤な炎症。ここでは臓器の構造が大部分消失しているが、肺胞腔と細気管支腔の残骸が見られる。(D~F)LV ctrl免疫動物の気管支病変。気管支腔内の上皮細胞と細胞の破片(黒矢印)(D)、気管支上皮の腔内への乳頭状突起(星)(E)、及び上皮の消失を伴う変性病変(緑矢印)(F)が示されている。(G)ワクチン接種を受けたハムスターにおける軽度の肺胞浸潤。肺胞の一部(矢印)が、部分的又は完全に細胞と好酸球性滲出液で満たされている。(H)SARS-CoV-2感染ハムスターの肺に対して行った代表的なN_{CoV-2}特異的IHC像。下のパネルは、上のパネルの拡大図を示している。スケールバーは、上段が1mm、下段が25µmである。

【図16】LV::S_{Beta-2p}の単回又はブースターi.n.投与による肺及び鼻甲介におけるSARS-CoV-2オミクロン感染性ウイルスの低減。(A)単回又はプライムブーストワクチン接種とオミクロンSARS-CoV-2チャレンジのタイムライン。ハムスター(n=4-5/群)に1×10⁸TUのLV::S_{Beta-2p}をi.n.又はi.m.投与した。3週間後、LV::S_{Beta-2p}又はLV ctrlを同量i.n.ブーストした。血清サンプルを血清学的分析のために3週目と7週目に採取した。(B)ELISAにより測定し、平均終点希釈力価として表した血清又は抗S_{omicron}(上段パネル)又は抗RBD_{omicron}(下段パネル)のIgG反応。データは平均値±SEMとして示されている。LV::S_{Beta-2p}又はLV ctrl-ワクチン接種ハムスターのチャレンジ後(C)及び4dpi(D)における体重減少の割合。(E)肺及び(F)NTのウイルス量は、4dpiにEsg qRT-PCRによって定量した。バーは、幾何平均値を表している。統計的差異は、クラスカル-ウォリス検定とそれに続くダンの多重比較検定によって決定し、アスタリスクにより指し示されている。*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001。点線はLODを指し示している。

【図17】オミクロンSARS-CoV-2感染ハムスターの肺において行ったN_{CoV-2}抗原の免疫検出。ハムスターは図16で説明したものである。(A)各ワクチン接種レジメンの一例が、低倍率で示されている。実線の矢印は、炎症性浸潤の病巣を、点線の矢印は、この低倍率でも免疫検出シグナルが識別可能な領域を示している。(B)拡大図では、炎症巣(下)内のウイルス抗原(茶色)の集中が示されており、炎症が全くないか、ほとんどない領

域(上)では、わずかな染色のみが示されている。

【図18】LV::SWA1-2P又はLV::SBeta-2Pプライム(i.m.)-LV::SBeta-2Pブースト(i.n.)でワクチン接種したハムスターにおけるロバストな液性応答。(A)プライムブーストワクチン接種のタイムライン。ハムスター(n=4/群)を 1×10^8 TUのLV::SWA1-2P又はLV::SBeta-2Pでi.m.プライミングした。5週間後、ハムスターを同量のLV::SBeta-2Pでi.n.ブーストした。(B)ELISAにより測定し、平均終点希釈力価 $\pm$ SEMで表した血清抗SWA1若しくは抗RBDWA1(左のパネル)又は抗Somicron若しくは抗-RBDomicron(右のパネル)IgG反応。統計的差異が、アスタリスクで指し示されている。 $*p < 0.05$ 。

【図19】LV::Sプライム(i.m.)-LV::SBeta-2Pブースト(i.n.)ワクチン接種ハムスターにおける抗Scov-2抗体のインプリンティング。ハムスターは、図18の凡例に記載されているものである。(A~C)D614G、アルファ、ベータ、ガンマ、デルタ又はオミクロンバリエーション由来のScov-2を保有する偽型ウイルスを用いて決定したEC50。血清中プライム5週間後(A)、若しくは血清中ブースト2週間後(B)、及び肺ホモジネート中(C)におけるEC50。データは、幾何平均EC50として表されている。統計的有意差は、二元配置分散分析の後にシダックの多重比較検定を用いて分析した; $**p < 0.01$; $****p < 0.0001$ 。点線は、検出の下限(LOD)を指し示している。

【図20】プライム(i.m.)ブースト(i.n.)レジメンで使用したLV::SBeta-2Pのオミクロンバリエーションに対する完全な防御能力。(A)B6.K18-hACE2^{IP-THV}トランスジェニックマウス(n=5/群)におけるプライムブーストワクチン接種と 0.3×10^5 TCID₅₀のSARS-CoV-2オミクロンバリエーションによるi.n.チャレンジのタイムライン。(B)5dpiにおいてサブゲノムEsg特異的qRT-PCRにより評価した肺ウイルスRNA含有量。下の線は、検出限界を指し示している。統計的有意性は、マン-ホイットニー検定で評価した($*=p < 0.05$, $**=p < 0.01$)。

【発明を実施するための形態】

【0067】

液性応答を誘導するだけでなく、特に質の高いメモリーT細胞応答(Ku MWら、Comm Biol、4(1)、713、2021)を確立することにおける、非常に生産的である、LVベースの戦略は、COVID-19ワクチンの主要な候補としてそれ自体も大いに有効であるとしても、異種ブーストのための有利なプラットフォームである(Ku MWら、Cell Host Microbe、29(2)、236-249 e236、2021; Ku MWら、EMBO Mol Med、e14459、2021)。更に、重要なことに、LVは非細胞変性性で、非複製性で、ほとんど炎症性でないため、非侵襲的なi.n.ブーストを実施するために用いて、呼吸器系並びに中枢神経系を保護する滅菌性粘膜免疫を効果的に誘導することができる(Ku MWら、Cell Host Microbe、29(2)、236-249 e236、2021; Ku MWら、EMBO Mol Med、e14459、2021)。鼻腔スワブ及び鼻嗅神経上皮中のウイルス含有量を低減させる上では、i.n.ワクチン接種経路が、最も効果的であることが複数のチームによって示されている(Brickner TL、Cell Rep、36(3)、109400、2021; Hassan AOら、Cell Rep Med、2(4)、100230、2021)。そこで、本発明者らは、SARS-CoV-2感染の呼吸鎖を遮断/減少させるのに、i.n.ワクチン接種が有効となり得るとの仮説を立てた。

【0068】

LVベースの免疫化のもう一つの大きな利点は、多様なVOCのスパイクからのT細胞エピトープの高い交差反応性による、強力なT細胞免疫応答の誘導である。したがって、中和抗体が破綻若しくは衰退した場合、本発明者らが最近、抗体が欠損し、B細胞が障害した μ MT KOマウスにおいて記述したように、T細胞アームは大部分が防御的であり続ける(Ku MWら、EMBO Mol Med、e14459、2021)。この特性は、出現したVOCのスパイクに蓄積された変異にもかかわらず、複数の保存されたT細胞エピトープに対して誘導される高品質で長期にわたるT細胞免疫に関連している(Ku MWら、EMBO Mol Med、e14459、2021)。

【0069】

本発明において、本発明者らはまず、VOCに対して最大の中和幅を誘導するSBeta抗原

をダウンセレクションし、この抗原の安定化バージョンをコードする非組み込み型のLVを設計した。(交差)血清中和能が衰退したmRNA-1273でプライミング及びブーストされたマウスにおいて、本発明者らはLV::SBeta-2Pの用量を漸増させてi.n.ブーストに使用した。本発明者らは、抗Scov-2 IgG及びIgA力価が用量依存的に上昇し、VOCに対する血清中和能が血清と肺ホモジネートの両方で拡大することを実証した。mRNA-1273の3回目の用量をi.m.注射したマウスの肺では、抗Scov-2 IgAは検出されなかった。これらのマウスでは、常在性のメモリー特性と関連付けられているCD38⁺ CD73⁺ CD62L⁺ CD69⁺ CD80⁺の表現型を持つ肺表面IgM/D⁺ B細胞の割合の増加が、用量依存的に検出された。そのようなB細胞サブセットの増加は、mRNA-1273をi.m.で追加投与されたマウスでは検出されなかった。

10

【0070】

スパイク特異的なエフェクター肺CD8⁺ Tc1細胞は、最初にmRNA-1273でプライミング及びブーストされ、後期にi.n.でLV::SBeta-2Pブーストを受けたマウスで多く検出された。これらの肺CD8⁺T細胞は、Tc2表現型を示さなかった。肺CD8⁺ CD44⁺ CD69⁺ CD103⁺ Trmの割合の増加もまた、LV::SBeta-2Pをi.n.ブーストしたマウスでのみ用量依存的に検出されたが、mRNA-1273をi.m.ブーストしたマウスでは検出されなかった。また、Scov-2の様々な免疫原性領域に対する全身のCD8⁺ T細胞応答は、最初にmRNA-1273でプライミングし、ブーストしたマウスにおいて、 1×10^8 又は 1×10^9 TUのLV::SBeta-2Pのi.n.ブーストで増加した。LV::SBeta-2Pの最も高いi.n.用量は、mRNA-1273の追加i.m.用量に匹敵した。LV::SBeta-2Pのi.n.投与が、全身のT細胞免疫

20

【0071】

mRNA-1273でプライミング及びブーストしたマウスの肺の防御能を評価したところ、追加ブースティングを行わなかった場合、mRNA-1273の最初の注射から20週後には、SARS-CoV-2のデルタバリエントに対する検出可能な防御能力は残っていなかった。これらのマウスにおいて、最適用量以下、すなわち 1×10^8 TUのLV::SBeta-2Pのi.n.ブースター注射は、肺におけるSARS-CoV-2の複製を完全に阻害した。mRNA-1273の3回目の後期i.m.ブースター注射は、同様に肺のSARS-CoV-2 RNA含有量を低減させたが、すべてのマウスでウイルスの複製を完全には阻害しなかった。

30

【0072】

mRNA-1273へのプライム-ブーストの4ヶ月後にデルタバリエントに対する防御能がなかったことは、適応免疫記憶が二次リンパ器官、すなわち、気道から遠く離れた解剖学的部位に位置する可能性が高いという仮説により説明され得る。この文脈では、デルタバリエント及びオミクロンバリエント等の新たなVOCの感染部位における非常に急速な複製は、免疫記憶の再活性化に十分な時間を与えず、局所粘膜感染、複製、及びウイルス感染を防ぐのに十分な早さが得られない。

【0073】

本発明において、本発明者らは、LV::SBeta-2Pのi.n.ブーストが、ロバストな全身及び粘膜適応免疫を誘導し、防御応答の特異性を拡大するために使用できることの数多くの証拠を提供した。LV::SBeta-2Pのi.n.ブーストは、強度を強化し、VOCの交差認識を広げ、宿主生物の粘膜呼吸器へのSARS-CoV-2の主要な侵入点へのB及びT細胞免疫応答を標的化し、主な解剖学的部位の感染を回避する。現在、LV::SBeta-2Pによるi.n.ブーストを以前にワクチン接種を受けた人々又はCOVID回復期患者において使用するためのフェーズI/IIa臨床試験が準備中である。

40

【0074】

本発明者らは、SARS-CoV-2感染に対するLV媒介性防御において、B細胞非依存性及び抗原特異的T細胞免疫が主要な役割を果たすことを確立した(Ku MWら、EMBO Mol Med、e14459、2021)。これは、LV::SBeta-2Pによって全身レベル及び肺で誘導され、ワクチン接種したマウスで検出可能であった強力なT細胞応答と一致していた(Vesi

50

n, B.ら、Mol Ther 30、2984-2997、2022)。重要なことに、祖先S_{CoV-2}配列上で同定され、SBeta-2Pに含まれているマウス及びヒトのT細胞エピトープのすべて又は大部分が、Omicron BA.1及びBA.4/5サブバリエーションを含む新たに生じたバリエーション由来の変異スパイクにおいて保存されていた(図11)。

【0075】

これらの観察は、ロバストなT細胞応答を誘発することにより、祖先だけでなく、最近出現したSARS-CoV-2のバリエーションに対しても完全な防御を誘導することにおける、SARS-CoV-2のスパイクタンパク質を発現するLV、特にLV::SBeta-2Pの強力な能力を指し示している。

【0076】

中和抗体の標的であるB細胞エピトープとは対照的に、これまでに同定されたT細胞エピトープは、新たに出現したバリエーションのS_{CoV-2}に蓄積された変異によって影響を受けていないか、ほとんど影響を受けていなかった(図11)。

【0077】

この観察は、強力なT細胞免疫を誘導するLVプラットフォームが、なぜ新たに出現したバリエーションに対して不変かつ完全な防御能力を持つのかを指し示している。

【0078】

材料及び方法

マウスの免疫とSARS-CoV-2感染

雌のC57BL/6JマウスをJanvier社(Le Genest Saint Isle、フランス)から購入し、パスツール研究所の動物施設で病原体のない特定の条件下で個々に換気されたケージに収容し、7週齢で使用した。マウスにmRNA-1273(Moderna)ワクチン1µg/マウスをi.m.免疫した。LVをi.n.注射するために、マウスをケタミン(Imalgene社、80255 mg/kg)及びキシラジン(Rompun社、5mg/kg)のi.p.注射により麻酔した。SARS-CoV-2に対する防御実験のために、マウスをアイソレーター内のフィルター付きケージに移した。SARS-CoV-2接種の4日前に、マウスを 3×10^8 IGUのAd5::hACE2で以前に記載されたようにして前処理した(Ku MWら、Cell Host Microbe、29(2)、236-249 e236、2021)。その後、マウスをレベル3のバイオセーフティキャビネットに移し、20 µl中に含まれる 0.3×10^5 TCID₅₀のデルタSARS-CoV-2臨床分離株(Lescure FXら、Lancet Infect Dis、20(6)、697-706、2020)をi.n.接種した。その後、マウスをバイオセーフティレベル3の動物施設のアイソレーター内のフィルター付きケージに収容した。これらの施設で承認された標準的な手順に従い、感染動物から回収した臓器を処置した。

【0079】

動物実験の倫理承認

動物実験は、パスツール研究所の動物実験委員会による承認、地域の倫理委員会によるプロトコル同意(CETEA #DAP20007、CETEA #DAP200058、及び高等教育研究省APAFIS#24627-2020031117362508 v1、APAFIS#28755-2020122110238379 v1)の後、欧州及びフランスのガイドライン(指令86/609/CEE及び1987年10月19日の命令87-848)に従って行った。

【0080】

ワクチンLVの構築及び産生

まず、祖先I、D614G、アルファ、ベータ又はガンマVOC由来のスパイクのコードン最適化配列を合成し、pMK-RQ_S-2019-nCoV_S501YV2プラスミドに挿入した。その後、S配列をBamHI/XhoI消化によって抽出し、pFlapレンチウイルスプラスミド中のネイティブのヒトieCMVプロモーターとウッドチャック転写後調節エレメント(WPRE)配列の変異型atg開始コードン配列との間に位置するBamHI制限部位とXhoI制限部位の間に連結させた(プラスミドマップを参照、図10)。SD614G又はSBetaにK⁹⁸⁶P-V⁹⁸⁷P "2P"二重変異を導入するために、対応するpFlapプラスミドにTakara In-Fusionキットを用いてディレクショナル変異誘発を行った。様々なpFlap-ieCMV-S-WPREm又はp

10

20

30

40

50

Flap-ieCMV-S₂p-WPREmプラスミドを増幅し、他所に記載されているようにして、非組み込み型ワクチン性LVを産生するために使用した(Ku MWら、Cell Host Microbe、29(2)、236-249 e236、2021; Ku MW、Charneau P、Majlessi L. Expert Rev Vaccines、1-16、2021)。

【0081】

液性及び全身T細胞免疫の解析

抗Scov-2 IgG抗体価及びIgA抗体価は、組換え安定化Scov-2又はRBDフラグメントをコーティングに用いたELISAによって測定した。清澄化及び脱補体化した血清又は肺ホモジネートの中和能を、以前に記載されたようにして、多様なバリエーション由来のScov-2で偽型化したレンチウイルス粒子を用いて定量した(Ku MWら、Cell Host Microbe、29(2)、236-249 e236、2021; Sterlin Dら、Sci Transl Med、13(577)、2021)。

【0082】

H-2^dマウスにおいて、Scov-2 MHC-I制限エピトープを含むS:256-275、S:536-550又はS:576-590合成15merペプチドでin vitro刺激した後、IFN- γ ELISPOTによりT-脾細胞応答を定量した(Ku MWら、Cell Host Microbe、29(2)、236-249 e236、2021)。スポットはCTL Immunospot S6 ultimate-V AnalyserでCTL Immunocapture 7.0.8.1プログラムを用いて定量した。

【0083】

肺免疫細胞の表現型及び機能的細胞分析

肺免疫細胞の濃縮及び染色は、400U/mlのIV型コラゲナーゼ及びDNアーゼI(Roche社)で処理して37℃で30分間インキュベートし、GentleMacs(Miltenyi Biotec社)を用いてホモジナイズした後、他所に詳述されているようにして行った(Ku MWら、Cell Host Microbe、29(2)、236-249 e236、2021; Ku MWら、EMBO Mol Med、e14459、2021)。その後、細胞懸濁液を100 μ m孔フィルターで濾過し、1200rpmで遠心分離し、3000rpm、RT、20分間、ブレーキなしの遠心分離後、フィコール勾配で濃縮した。回収した細胞をA、B、Cペプチドプール(各1 μ g/ml)又は陰性対照ペプチド(x290 μ g/ml)を負荷した合生骨髓由来樹状細胞と共培養した。肺Tc1細胞の検出には以下の混合物を使用した:表面染色用のPerCP-Cy5.5-抗CD3(45-0031-82、eBioScience社)、eF450-抗CD4(48-0042-82、eBioScience社)及びAPC-抗CD8(17-0081-82、eBioScience社)、並びに細胞内染色用のBV650-抗IFN-g(563854、BD社)、FITC-抗TNF(554418、BD社)及びPE-抗IL-2(561061、BD社)。肺Tc2細胞の検出には以下の混合物を用いた:表面染色用のPerCP-Cy5.5-抗CD3(45-0031-82、eBioScience社)、eF450-抗CD4(48-0042-82、eBioScience社)、及びBV711-抗CD8(563046、BD Biosciences)、並びに細胞内染色用のBV605-抗IL-4(504125、BioLegend Europe BV社)、APC-抗IL-5(504306、BioLegend Europe BV社)、FITC-抗IL-10(505006、BioLegend Europe BV社)、及びPE-抗IL-13(12-7133-81、eBioScience社)。細胞内染色は、Fix Perm kit(BD社)を用いて、製造元のプロトコルに従って行った。死細胞はNear IR Live/Dead(Invitrogen社)を用いて除外した。染色はFc γ II/III受容体をブロックする抗CD16/CD32(BD)の存在下で行った。

【0084】

肺に常在するメモリーCD8⁺ T細胞サブセットを同定するために、PerCP-Vio700-抗CD3(130-119-656、Miltenyi Biotec社)、PECy7-CD4(552775、BD Biosciences社)、BV510-抗CD8(100752、BioLegend社)、PE-抗CD62L(553151、BD Biosciences社)、APC-抗CD69(560689、BD Biosciences社)、APC-Cy7-抗CD44(560568、BD Biosciences社)、FITC-抗CD103(11-1031-82、eBiosciences社)及び黄色のLive/Dead(Invitrogen社)を用いた。肺B細胞は、PerCP Vio700-抗IgM(130-106-012、Miltenyi社)、及びPerCP Vio700-抗IgD(130-103-797、Miltenyi社)、APC-H7-抗CD19(560143、BD Biosciences社)、PE-抗CD38(102708、BioLegend Europe BV社)、PE-Cy7-抗CD62L(ab25569、AbCam社)、BV711

-抗CD69(740664、BD Biosciences社)、BV421-抗CD73(127217、BioLegend Europe BV社)、FITC-抗CD80(104705、BioLegend Europe BV社)及び黄色のLive/Dead(Invitrogen社)の混合物を用いた表面染色によって調査した。

【0085】

細胞を適切な混合物と友に4℃で25分間インキュベートし、3%のFCSを含むPBSで洗浄し、4℃で一晩インキュベートした後、4%パラホルムアルデヒドで固定した。サンプルはAttune NxTサイトメーター(Invitrogen社)で取得し、データはFlowJoソフトウェア(Treestar社、オレゴン州、米国)で解析した。

【0086】

臓器内のウイルスRNA含有量の測定

マウスから臓器を取り出し、直ちにドライアイス上で-80℃に凍結した。循環SARS-CoV-2からのRNAは、他所に記載されているようにして(Ku MWら、Cell Host Microbe、29(2)、236-249 e236、2021)肺から調製した。肺ホモジネートは、MP Biomedical Fastprep 24 Tissue Homogenizerを用いて、500 µlのPBSを加えた溶解マトリクスM(MP Biomedical社)で解凍及びホモジナイズすることにより調製した。RNAは、AVLバッファー/キャリアーRNAによる中和ステップを省略した以外は、Qiagen Rneasyキットを用いて、2000gで10分間遠心分離した臓器ホモジネートの上清から抽出した。次に、このRNAサンプルを使用して、E特異的なqRT-PCRによってウイルスRNA含有量を決定した。Esg特異的qRT-PCRによりウイルスRNA含有量を測定するために、1mLのTRIzol試薬(ThermoFisher社)を含む溶解マトリクスD(MP Biomedical社)を使用し、MP Biomedical Fastprep 24 Tissue Homogenizerを用いて6.0m/sで30秒のホモジナイズを2回行って、トータルRNAを調製した。RNAサンプルの品質は、Bioanalyzer 2100(Agilent Technologies社)を用いて評価した。ウイルスRNA含有量はNanoDrop Spectrophotometer(Thermo Scientific NanoDrop社)を用いて定量した。RNA Integrity Number(RIN)は7.5~10.0であった。SARS-CoV-2 E又はEサブゲノムmRNAは、最近の記載(Ku MWら、EMBO Mol Med、e14459、2021)のようにして、SuperScript(商標)III Platinum One-Step qRT-PCR System(Invitrogen社)と特異的なプライマー及びプローブ(Eurofins社)を用いて、逆転写及びリアルタイム定量TaqMan(登録商標)PCRの後に定量した。

【実施例】

【0087】

抗原の設計及びリード候補のダウンセレクション

既知のバリエーションのウイルス拡散の動態を考慮することができ、最大の中和幅を誘導することができる最適なS_{CoV-2}バリエーションを選択するために、本発明者らは、アルファ、ベータ又はガンマSARS-CoV-2 VOCから全長S_{CoV-2}をコードするLVを産生した。C57BL/6マウス(n=5/群)に各LVを1×10⁸ TU/マウスでプライムi.m.(0週目)及びブーストi.m.(3週目)し、ブースト前(3週目)及びブースト後(5週目)に、様々なS_{CoV-2}を保有する偽型ウイルスに対する血清の(交差)中和能を評価した(図1A)。LV::S_{Alpha}による免疫は、S_{D614G}及びS_{Alpha}に対して適切な中和能を生じたが、S_{Beta}及びS_{Gamma}に対しては生じなかった(図1B)。LV::S_{Beta}とLV::S_{Gamma}の間で、前者はS_{D614G}、S_{Alpha}及びS_{Gamma}バリエーションに対して最も高い交差血清中和能を生じた。LVによる免疫化の文脈で他のワクチン戦略を使用した以前の観察と一致して、S_{CoV-2}のS2ドメインにおけるK^{986P}-V^{987P}置換は、(交差)血清中和能を向上させたが(図1C)、これはおそらく、S_{CoV-2-2p}の半減期の延長に起因するものである(Walls ACら、Cell、181(2)、281-292 e286、2020)。

【0088】

これらのデータを総合することにより、mRNA-1273のような第一世代のCOVID-19ワクチンによって以前に誘導された衰退している免疫を強化するために、LV(LV::S_{Beta-2p})の文脈で使用するための最良の交差反応性抗原候補としてS_{Beta-2p}をダウンセレクトすることができた。

【0089】

mRNA-1273でプライミング及びブーストしたマウスにおける液性免疫のフォローアップとLV::SBeta-2pのi.nブーストの効果

本発明者らは、LV::SBeta-2pのi.n.ブーストワクチン接種が、mRNA-1273で最初にプライミング及びブーストされ、(交差)血清中和能が低下しているマウスにおいて、免疫応答を強化及び拡大する可能性を分析した。マウスにおけるmRNA-1273の最適用量と定義されている1 μ g/マウスで、C57BL/6マウスを0週目にi.m.でプライミングし、3週目にi.m.ブーストした(Nature、2020、Vol. 586、567-571)(図2A)。長期的な血清学的フォローアップは、プライム後3週間においてSD614GとSAlphaの両方に対する交差中和活性が容易に検出可能であることを実証した(図2B)。また、交差血清中和は、程度は低いがSGammaに対しても検出されたが、SBeta、SDelta、SDelta+に対しては検出されなかった。6週目、すなわちブースト後3週目には、すべてのSCoV-2バリエーションに対する交差血清中和活性が検出可能であったが、SBeta、SDelta及びSDelta+に対する活性は非常に低い程度であった。6週目から10週目にかけて、SBeta、SDelta、又はSDelta+に対する交差血清中和は徐々に有意に減少した。

10

【0090】

15週目に、mRNA-1273でプライミングしたマウス群とブーストしたマウス群に、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、又は 1×10^9 TU/マウスのLV::SBeta-2pをi.n.で漸増投与した(図2A)。対照のmRNA-1273でプライミング及びブーストしたマウスには、空のLV(LV Ctrl)を 1×10^9 TUでi.n.投与した。並行して、この時点においてmRNA-1273でプライミング及びブーストしたマウスに1 μ gのmRNA-1273又はPBSをi.m.注射した。プライミングしていない週齢をマッチさせたマウスに、 1×10^9 TUのLV::SBeta-2p又はPBSをi.n.投与した。

20

【0091】

mRNA-1273でプライミングしたマウスでは、血清中の抗SCoV-2及び抗RBD IgGは3週目において検出され、6週目及び10週目で調べたようにmRNA-1273ブースト後に増加し、その後、追加ブーストがない場合には17週目に減少した(図8A)。15週目にブーストされた、mRNA-1273でプライミング及びブーストしたマウスでは、 1×10^8 又は 1×10^9 TUのLV::SBeta-2p又は3回目の用量のmRNA-1273を注射したマウスの抗SCoV-2 IgGの力価に有意な増加が観察された(図2C)。抗SCoV-2 IgAの力価は、 1×10^9 TUのLV::SBeta-2pを注射したマウスでは、3回目の用量のmRNA-1273を注射したマウスよりも高かった(図2C)。粘膜レベルでは、この時点で、全肺抽出物中の抗SCoV-2及び抗RBD IgGの力価は、LV::SBeta-2p注射マウスにおいて用量依存的に増加し、LV::SBeta-2pの最高用量はmRNA-1273の3回目のi.m.用量に匹敵した(図8B)。重要なことに、肺の抗SCoV-2 IgAの有意な力価は、LV::SBeta-2pでブーストしたマウスでのみ検出されたが、mRNA-1273でi.m.後期ブーストしたマウスではほとんど検出されなかった(図8B)。

30

【0092】

粘膜細胞レベルでは、肺のIgM⁺/IgD⁺ CD19⁺(Igスイッチ)B細胞集団の内部で、常在メモリーB細胞を構成し得るCD38⁺ CD62L⁺ CD69⁺ CD73⁺ CD80⁺細胞の割合の増加が、LV::SBeta-2pでi.n.ブーストしたマウスでは用量依存的に検出されたが、mRNA-1273でi.m.ブーストしたマウスでは検出されなかった(図3A、図3B)。

40

【0093】

以前にmRNA-1273でプライミング及びブーストしたマウスのLV::SBeta-2pのi.n.ブースト後における全身及び粘膜T細胞免疫の特徴

全身の抗SCoV-2 T細胞免疫は、H-2^bマウスのCD8⁺ T細胞に対して免疫優位なSCoV-2領域を包含する個々のS:256-275、S:536-550又はS:576-590ペプチドでin vitro刺激した後、上記のレジメンに従って免疫した個々のマウスの脾臓におけるIFN- γ 特異的ELISPOTによって評価した(図2A)(Ku MWら、Cell Host Microbe、29(2)、236-249 e236、2021)。重要なことに、17週目にmRNA-1273でプライムブーストした

50

マウスの脾臓で検出された弱い抗S CD8⁺ T細胞免疫は、 1×10^8 及び 1×10^9 TU/マウスのLV::SBeta-2Pでi.n.ブースティングを行うと、大きく増加した(図4)。全身T細胞免疫に関して、 1×10^9 TU用量のLV::SBeta-2Pのi.n.投与によるブースター効果は、mRNA-1273のi.m.追加投与と同等か、それよりも高い傾向があった。

【0094】

並行して、同じ動物において、S:256-275、S:536-550及びS:576-590ペプチドのプールを負荷した自家骨髄樹状細胞でin vitro刺激した後、個々のマウスから得たT細胞濃縮画分における細胞内Tc1及びTc2サイトカイン染色によって、粘膜抗S_{CoV-2} T細胞免疫を評価した(図5A)。以前にmRNA-1273でプライミング及びブーストしたマウスでは、肺でわずかなS_{CoV-2}特異的IFN- γ /TNF/IL-2 CD8⁺ T細胞応答が検出されただけであった(図5A)。LV::SBeta-2Pのi.n.投与は、これらのTc1反応を用量依存的に増強し、 1×10^8 又は 1×10^9 TUの用量でかなりの割合のTc1細胞が誘導された。mRNA-1273のi.m.投与では、粘膜T細胞に対するブースト効果はかなり低かった(図5A、図5B)。Tc2反応(IL-4、IL-5、IL-10、IL-13)は、どの実験群でも検出されなかった(図9)。

【0095】

重要なことに、LV::SBeta-2Pの漸増用量をi.n.でブーストしたマウスでは、肺常在メモリーCD8⁺ T細胞(Trm)の割合が有意に増加したが、これは、mRNA-1273の3回目の用量をi.m.で投与された対応するマウスとは全く対照的である。実際、後者では、多くの感染症で防御能と非常に頻繁に相関するこのTrm細胞集団の有意な割合は見られなかった(図6A、図6B)。

【0096】

mRNA-1273でプライミング及びブーストしたマウスにおける後期LV::SBeta-2Pのi.n.ブーストによる完全な防御能。

次に、本発明者らは、mRNA-1273でプライミングし、ブーストしたマウスにおいて、LV::SBeta-2Pのi.n.ブーストによる保護ワクチン効果を、上記と同等のワクチン接種レジメンに従って評価した。15週目に、mRNA-1273でプライミングし、ブーストしたマウスに、最適以下量の 1×10^8 TUのLV::SBeta-2P又は対照の空のLVをi.n.投与した(図7A)。そのような最適以下の用量の選択は、同種LVプライムブースト実験において保護に有効であったこの用量での本発明者らの多数の以前の観察に基づいていた(Ku MWら、Cell Host Microbe、29(2)、236-249 e236、2021; Ku MWら、EMBO Mol Med、e14459、2021)。対照のmRNA-1273免疫マウスには、mRNA-1273をi.m.投与又はPBS投与した。ワクチン未接種の週齢と性別を一致させた対照は、未免疫のままにした。後期ブーストの4週間後、すなわち20週目に、すべてのマウスを、 3×10^8 感染ゲノムユニット(IGU)のhACE2164(Ad5::hACE2)をコードするアデノウイルスベクター血清型5で前処理し(Ku MWら、Cell Host Microbe、29(2)、236-249 e236、2021)、それらの肺がSARS-CoV-2の複製を許容するようにした(図7B)。4日後、本発明の時点、すなわち2021年11月の時点において世界で最も拡大したSARS-CoV-2バリエーションであったSARS-CoV-2デルタバリエーションでマウスをチャレンジした。

【0097】

感染後3日目(dpi)に、肺のトータルRNAの分析は、まず、Ad5::hACE2のin vivo形質導入後、すべてのマウスでhACE-2が均一に発現していることを示した(図7B)。その後、3dpiの時点で、トータルRNAとサブゲノム(Esg)E_{CoV-2} RNA qRT-PCRを評価することにより(後者は活発なウイルス複製の指標である)、肺ウイルス量を決定した(Chandrashekar Aら、Science、369(6505)、812-817、2020; Tostanoski LHら、Nat Med、26(11)、1694-1700、2020; Wolfel R、Corman VM、Guggemos Wら、「Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019」、Nature、581(7809)、465-469、2020)。最初にmRNA-1273でプライミング及びブーストし、その後、対照LVをi.n.注射又はPBS単独をi.m.注射したマウスにおいて、SARS-CoV-2デルタバリエーションによるチャレンジに対する有意な防御能は検出されなかった。これとは正反対に、LV::SBeta-2Pのi.n.ブーストは、SARS-CoV-2のE_{CoV-2}

v-2 RNA総含有量を劇的に低減させ、複製に関連するEsg EcoV-2 RNAのコピーは、この群では検出されなかった(図7B)。後期mRNA-1273のi.m.ブーストを受けた群では、EcoV-2 RNAの総含有量も大幅に低減していた。この群では、5例中3例でEsg EcoV-2 RNAの含有量が検出されなかった。

【0098】

・シリアゴールデンハムスターにおけるワンショット又はブースター鼻腔内レンチウイルスワクチン接種によるSARS-CoV-2に対する肺の完全な予防

本発明者らは、オリジナルのSARS-CoV-2スパイク糖タンパク質の安定化形態をコードするワクチンレンチウイルスベクターを単回鼻腔内投与することにより、プロトタイプのSARS-CoV-2に対して感受性のシリアゴールデンハムスターモデルにおいて、呼吸器の完全な肺保護が誘導され、肺の炎症が強く低減されることを実証した。更に、本発明者らは、SARS-CoV-2ベータバリエーションの安定化スパイクをコードするレンチウイルスベクター(LV::SBeta-2p)が、SARS-CoV-2オミクロンバリエーションの接種後に、肺及び鼻甲介における病態を予防し、感染性ウイルス量を低減させることを示した。重要なことに、LV::SBeta-2pで鼻腔内ブーストすると、LV::SBeta-2pでプライミングしたハムスターでは、祖先SARS-CoV-2に由来するスパイクをコードするLVでプライミングした対応するハムスターよりも、交差血清中和がはるかに向上した。これらの結果は、オリジナルのスパイク配列による免疫インプリンティングが、新たなバリエーションに対する交差防御にネガティブな影響を与えることを強く示唆した。本発明者らの結果は、すでにワクチン接種を受け、免疫が消失している人におけるワクチン効果の問題に取り組み、LVベースの鼻腔内ワクチン接種が単回投与又はブースターのいずれとしても効率的であることを示した。

【0099】

Sタンパク質を発現するLVの構築及び産生

LV::SWA1及びLV::SWA1-ΔF2Pの構築については、以前に記載した(Ku MWら、Cell Host Microbe、29(2)、236-249 e236、2021; Ku MWら、EMBO Mol Med、e14459、2021)。

【0100】

LVの産生及び滴定

レンチウイルス粒子は、組み込み不全ベクターの産生のためのベクタープラスミドpFlap/Scov-2、水疱性口内炎ウイルスGインディアナエンベローププラスミド、及びカプシド形成プラスミドpD64Vを用いた、HEK293T細胞の一過的リン酸カルシウム共トランスフェクションにより産生した。上清をトランスフェクションの48時間後に採取し、4°C、2500rpm、6分間の遠心分離で清澄化した。LVを分注し、-80°Cで保存した。ベクターの力価は、アフィジコリンで処理したHEK293T細胞を形質導入することにより決定した。核内遺伝子導入の有効性に比例する力価は、pFLAPプラスミドに特異的なフォワードプライマー及びリバースプライマー、並びに宿主ハウスキーピング遺伝子のgadhに特異的なフォワードプライマー及びリバースプライマーを用いた形質導入後3日目の全溶解物に対するqPCRにより、Transduction Unit(TU)/mLとして決定した(Iglesiasら、J. Gene Med.、2006、8、265-274)。

【0101】

SDS-PAGE及びウェスタンブロッティング

6ウェルプレートにHEK293T細胞(2×10^6 細胞/ウェル)を播種し、一晚増殖させた後、SARS-CoV-2 S導入遺伝子をコードするLVを10の感染倍数で形質導入した。形質導入48時間後に細胞溶解液を収集し、定量した。ボルトサンプルバッファーを用いて95°Cボルトで5分間加熱した後、サンプルを成形済みのボルト4-12%ビストリスゲル(Invitrogen社)にローディングした。タンパク質をiBlot2ドライブロッティングシステム(Invitrogen社)を用いてニトロセルロースメンブレンに転写し、メンブレンをTBSTブロッカー(0.2%のTween 20と5%のミルクを含むトリス緩衝生理食塩水(TBS))でブロッキングした。1時間のブロッキング後、メンブレンをTBSTブロッカー中で抗SARS-CoV-2

S2ウサギポリクローナル抗体(SinoBiological 40590-T62)と共に一晚インキュベートした。その後、メンブレンをTBSTで10分間3回洗浄し、続いて、TBSTブロッカー中で1:2,500のDyLight 800標識ヤギ抗ウサギIgG(H+L)二次抗体(Invitrogen社、Cat # SA5-35571)と共に1時間インキュベートした。最後に、メンブレンをTBSTで10分間3回洗浄し、ODYSSEY CLx Infrared Imaging System(Li-COR社)を用いて現像した。ラダーとして、E-PAGE SeeBlue Pre-stained Standard(Invitrogen社)を使用した。

【0102】

ハムスター

雄の *Mesocricetus auratus* ゴールデンハムスター(Le Genest Saint Isle、フランス)を成熟した状態で購入し、実験開始時の体重は80~100グラムであった。ハムスターは免疫期間中、病原体を含まない特定の条件下で、個々に換気されたケージに収容した。SARS-CoV-2感染のために、これらのハムスターをパスツール研究所の動物施設内のアイソレーター内に設置された個別フィルター付きケージに移した。i.m.又はi.n.注射の前に、ハムスターをイソフルラン吸入又はケタミン(Imalgene社、100mg/kg)及びキシラジン(Rompun社、5mg/kg)のi.p.注射で鎮静させた。

10

【0103】

動物実験の倫理承認

ハムスターに対する実験は、パスツール研究所の動物実験委員会による承認、地域の倫理委員会(CETEA #DAP200007)、及び高等教育研究省(APAFIS#24627-2020031117362508 v1)により下されたプロトコル同意の後、欧州及びフランスのガイドライン(指令86/609/CEE及び1987年10月19日の命令87-848)に従って実施した。

20

【0104】

SARS-CoV-2スパイクタンパク質の産生

SARS-CoV-2 WA1又はOmicron BA.1スパイク(HexaPro)外部ドメインの安定化バージョン(foldon三量体化モチーフが続く)、及びC末端タグ(Hisx8-tag、Strep-tag、及びAviTag)を含むWA1又はOmicron BA.1 RBDタンパク質をコードするコドン最適化ヌクレオチドフラグメントを合成し、pcDNA3.1/Zeo(+)発現ベクター(Thermo Fisher Scientific社)中にクローニングした。組換えタンパク質は、前述(PMID:25910833)のように、ポリエチレンイミン(PEI)沈殿法を用いて、指数関数的に増殖するFreestyle 293-F懸濁細胞(Thermo Fisher Scientific社、ウォルサム、マサチューセッツ州)に一過的にトランスフェクションを行うことにより生成した。製造元の指示に従って、Ni Sepharose(登録商標)Excel Resin(GE Healthcare社)を用いた高性能クロマトグラフィーによって培養上清からタンパク質を精製し、Slide-A-Lyzer(登録商標)透析カセット(Thermo Fisher Scientific社)を用いてPBSに対して透析し、NanoDrop 2000装置(Thermo Fisher Scientific社)を用いて定量し、そして以前に記載されたようにして、NuPAGE 3~8%トリス酢酸ゲル(Life Technologies社)を用いたSDS-PAGEによって純度を管理した(PMID:25910833)。

30

【0105】

液性応答

免疫グロブリンG(IgG)抗体は、SARS-CoV-2 WA1株又はOmicron株由来の組換え安定化S_{CoV-2}及びRBDタンパク質を用いた酵素結合免疫吸着法(ELISA)により検出した。Nunc Polysorp ELISAプレート(ThermoFisher社、475094)を50mMのNa₂CO₃(pH9.6)中、1µg/mLで4°C、一晚コーティングした。インキュベーション後、プレートを1×PBS+0.05% Tween-20(PBST)で洗浄し、PBST+1% BSAにより37°Cで2~3時間ブロッキングした。プレートをPBS-T+1%BSAで連続希釈した血清と共に37°Cで1.5時間インキュベートした。洗浄後、ウサギ抗ハムスターIgG-西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート(Jackson Immuno Research社、M37470)を二次抗体として使用し、3,5,3',5'-テトラメチルベンジジン(Eurobio Scientific社、5120-0047)を抗体反応検出基質として使用した。50µLの2M硫酸で反応を停止させた。終点力価は、免疫

40

50

前の血清の平均+3SDより大きい吸光度をもたらし最も高い血清希釈度として計算した。

【0106】

SARS-CoV-2の接種

ハムスターにケタミンとキシラジンの混合液をi.p.注射して麻酔し、バイオセーフティキャビネット3に移し、 0.3×10^5 TCID₅₀のWA1(Lescureら、Lancet Infect. Dis.、2020、20、697-706)又はSARS-CoV-2臨床分離株(Planasら、Nature、2022、602、671-675)のOmicron BA.1バリエーション(Pango系統BA.1、GISAID: EPI_ISL_6794907及びEPI_ISL_7413964)を含む50 µlのウイルス接種液をi.n.接種した。動物をパスツール研究所のバイオセーフティレベル3の動物施設中にあるアイソレーターに収容した。これらの施設で承認された標準的な手順に従い、感染動物から回収した臓器を処置した。

10

【0107】

偽型ウイルス中和アッセイ

Nabの定量は、以前に記載されたようにして(Sterlinら、Sci. Transl. Med.、2021、13、eabd2223)、ヒトACE2を安定に発現するHEK293T細胞(HEK293T-ACE2)とレポータールシフェラーゼホタル遺伝子を保有する非複製型S_{CoV-2}偽型LV粒子とを使用して、ネイティブSARS-CoV-2ウイルスの融合ステップを模倣することによる宿主細胞浸潤の定量化を可能とする阻害アッセイによって評価した。血清サンプル又は清澄化肺ホモジネートは、56℃で30分間熱不活化した。10%熱不活性化FCS、100 U/mLペニシリン及び100 mg/mLストレプトマイシン及び1 mMピルビン酸ナトリウム(Gibco社、11360-070)を含む25 µlのDMEM-glutamax(Gibco社、21063-029)で希釈したサンプルの連続4倍希釈液をU底プレート中、室温で30分間、25 µl中1 ngのS_{CoV-2}偽型LV p24相当量と共に混合した。次にサンプルを、 2×10^4 個のHEK 293T-ACE2細胞を含む透明平底96ウェルブラックプレート(Corning社、CLS3603)に移した。プレートを37℃で72時間インキュベートした後、EnSpireプレートリーダー(PerkinElmer社)上でONE-Glo(商標)Luciferase Assay System(Promega社、E6120)を用いてルシフェラーゼ発現を測定した。EC50は、表示のS_{CoV-2}バリエーションを有するレンチウイルスベクターによる50%のHEK 293T-ACE2細胞感染をもたらし血清希釈度の逆数として報告された。

20

【0108】

臓器内のウイルス量の測定

肺と鼻甲介(NT)を無菌的に摘出し、直ちに-80℃で凍結した。循環SARS-CoV-2からのRNAは、最近記載されたようにして肺から調製した(Ku MWら、Cell Host Microbe、29(2)、236-249 e236、2021)。簡単に説明すると、肺ホモジネートは、MP Biomedical Fastprep 24 Tissue Homogenizerにおいて、500 µlの氷冷PBS中で溶解マトリックスA(MP Biomedicals社、116913050-CF)を用いて臓器を解凍し、ホモジナイズすることにより調製し、E特異的qRT-PCRによるウイルス量の測定に用いた。或いは、1 mLのTRIzol試薬(ThermoFisher社、15596026)を含む溶解マトリックスD(MP Biomedical社、116910050-CF)を添加し、MP Biomedical Fastprep 24 Tissue Homogenizerを用いて、6.0 m/sで30秒間のホモジナイズを2回行うことにより、肺又はNTからトータルRNAを調製した。これらのRNA調製物を用いて、Esg特異的qRT-PCRによるウイルス量の測定、又は炎症性メディエーターの測定を行った。

40

【0109】

SuperScript(商標)III Platinum(商標)One-Step qRT-PCR Kit(Invitrogen社、11732020)と特異的なプライマー及びプローブ(Eurofins社)を用いた逆転写及びリアルタイム定量TaqMan(登録商標)PCRの後、SARS-CoV-2 E遺伝子又はEサブゲノムmRNA(Esg RNA)を以前記載したようにして定量した(Cormanら、Euro Surveill. 2020、25(3); Wolfelら、Nature 2020、581(7809):465-9)。「T7 SARS-CoV-2 Esg mRNA」のPCRフラグメントに由来するin vitro転写RNAを用いて、Esg mRNAアッセイの標準曲線を実行した。In vitro転写RNAは、T7 RiboMAX Express Large

50

Scale RNA production system(Promega社、P1320)を用いて合成し、フェノール/クロロホルム抽出と、イソプロパノールとエタノールによる2回の連続的な沈殿によって精製した。RNAの濃度は光学密度測定により決定し、 $100\mu\text{g/mL}$ のtRNAキャリアーを含むRNaseフリー水で 10^9 ゲノム当量/ μL に希釈し、 -80°C で保存した。このin vitro転写RNAの連続希釈液を、 $10\mu\text{g/mL}$ のtRNAキャリアーを含むRNaseフリー水で調製し、各アッセイの標準曲線を作成した。PCR条件は:(i) 55°C で10分間の逆転写、(ii) 95°C で3分間の酵素不活性化、及び(iii) 95°C で15秒間、 58°C で30秒間の変性/増幅45サイクルであった。PCR産物はABI 7500 Fast real-time PCR system(Applied Biosystems社)で解析した。RNAコピー値は標準曲線から外挿し、体積を乗じて臓器あたりのRNAコピー数を得た。検出限界は標準曲線に基づいており、Ct値が40になるRNAの量として定義した。

10

【0110】

ハムスターの肺と脳における炎症性メディエーターのqRT-PCR定量は、最近詳述されたようにして、TRIzol試薬で抽出したトータルRNAにおいて行った(Ku MWら、Cell Host Microbe、29(2)、236-249 e236、2021)。

【0111】

病理組織学

ハムスターの肺由来のサンプルをホルマリンで7日間固定し、パラフィンに包埋した。パラフィン切片(厚さ $5\mu\text{m}$)をヘマトキシリン及びエオジン(H&E)で染色した。病理組織学的病変は定性的に記述し、可能な場合には以下を用いてスコア化した:(i)分布の修飾語(すなわち、局所性、多巣性、局所広範囲性、又はびまん性)、(ii)5段階の重症度グレード(すなわち、1:最小、2:軽度、3:中等度、4:顕著、5:重症)。場合によっては、免疫組織化学(IHC)解析用に連続切片を調製した。IHCは既述のようにして行った(Ku MWら、EMBO Mol Med、e14459、2021)。IHCには、ウサギ抗NCoV-2抗体(Novus Biologicals社、NB100-56576)とビオチン化ヤギ抗ウサギIgG二次抗体(Dako社、E0432)を用いた。スライドはAxioScan Z1(Zeiss社)システムを用いてスキャンし、画像はZen 2.6ソフトウェアで解析した。

20

【0112】

統計分析

統計的有意性は、P値が0.05未満の場合に割り当てた。ELISAの力価は、統計解析の前に $\log_{10}$ 変換した。2群の比較には、ノンパラメトリックマン-ホイットニー検定を用いた。2つより多い実験群を比較するためには、クラスカル-ウォリスANOVAとダンの多重比較検定を適用した。VoCの中和活性の差は、二元配置分散分析(二元配置ANOVA)と多重比較のためのシダック検定によって分析した。検定はGraphPad Prismソフトウェア(バージョン9、Graphpad Software社、ラホヤ、カリフォルニア州、米国)を用いて行った。

30

【0113】

結果

様々なSCoV-2の形態をコードするLVの免疫原性

サイトメガロウイルス(CMV)即時型初期プロモーター(P_{CMVie})の転写制御下のSCoV-2の安定化コンフォーマーをコードする非組み込み型LVを構築した(図12A)。最初の2つのSCoV-2コンフォーマーは、ヒトコドン最適化全長膜アンカー型先祖WA1 SCoV-2由来のものであった(Ku MWら、Cell Host Microbe、29(2)、236-249 e236、2021)。LV::SWA1-2Pは、S2ドメインのヒンジループに2つの安定化 K^{986P} 及び V^{987P} 置換を持つSWA1をコードしている。LV::SWA1 ΔF -2Pは、2つの K^{986P} と V^{987P} 置換に加えて、融合前の状態でのさらなる安定性のために、S1/S2フリント切断部位(配列番号27の675-QTQTNSPRRAR-685)を包含するループを欠失させたSWA1をコードしている(McCallumら、Nat. Struct. Mol. Biol.、2020、27、942-949;Launayら、EBioMedicine 2022、75、103810)。SBeta-2Pは、ベータ(B.1.351)VoC由来のもので、 K^{986P} と V^{987P} の2つの置換を含む。SBetaは、SWA1とは異なり、特にRBDに位置

40

50

するN^{501Y}/K^{417N}/E^{484K}変異によって異なっている(Tegallyら、Nature 2021、592、438-443)。S_{WA1}を保有する偽ウイルスは、現在承認されているワクチンを接種された個人の血清によって中和されるのに対し、これらのRBD変異を呈するものは中和に中程度から強力に抵抗する(Kuzminaら、iScience 2021、24、103467)。この観察は、S配列バリエーションをさらなるワクチン接種に適応させる根拠を提供した。4種のLVで形質導入したHEK293T細胞におけるS_{CoV-2}免疫原の発現は、全細胞溶解物に対するウェスタンブロットにより確認された(図12B)。予想された通り、S2フリン切断産物は、インタクトなフリン切断部位を保有するS_{WA1}、S_{WA1-2P}又はS_{Beta-2P}をコードするLVによって形質導入された細胞でのみ検出された。

【0114】

LV::S_{WA1}、LV::S_{WA1-2P}、LV::S_{WA1ΔF-2P}及びS_{Beta2P}の免疫原性を比較するために、ハムスター(n=4/群)を1×10⁸TUのいずれかのLVの単回i.m.注射によって免疫した。5週間(wk)後、高血清力価の抗S_{WA1} IgG抗体が、調査したすべてのLVによって誘導された(図12C)。これらのLV間で免疫原性に有意差は認められなかったため、以下「LV::S」と呼ぶLV::S_{WA1ΔF-2P}を同種SARS-CoV-2に対する防御の評価のために選択した。

【0115】

LV::Sの単回i.n.投与によるSARS-CoV-2に対する口バストな液性応答の誘導

本発明者らは最近、ハムスターモデルにおいて、LV::Sをプライム(i.m.)-ブースト(i.n.)プロトコルで使用すると、単回i.m.注射と比較して、SARS-CoV-2に対する防御が有意に向上することを示した(Ku MWら、Cell Host Microbe、29(2)、236-249 e236、2021)。ここで、本発明者らは、祖先WA1 SARS-CoV-2に対するLV::Sの単回i.n.投与の防御能を評価した。ハムスター(n=6/群)を0週目又は5週目に、1×10⁸TUのLV::Sの単回注射でi.n.免疫した(図13A)。陽性対照として、ハムスターの一群を0週目に1×10⁸TUのLV::Sによりi.m.でプライミングし、5週目に同量のLV::Sによりi.n.ブーストした。対照のハムスターには、同じレジメンに従い、無関係な抗原として緑色蛍光タンパク質を発現するLV(LV ctrl)を同量投与した。7週目に、すべての動物を0.3×10⁵TCID₅₀のWA1 SARS-CoV-2をi.n.でチャレンジした(図13A)。チャレンジ前、免疫前の血清及びLV ctrl群の血清は、抗S_{WA1}抗体及び抗RBD_{WA1}抗体について陰性であった(図13B)。LV::Sの単回i.n.注射後、すべての動物が高力価の抗S_{WA1} IgG及び抗RBD_{WA1} IgG応答を開始した。これらの抗体価は、5週目にワクチン接種したハムスターが示すように、早くも免疫後2週目には得られる。血清IgG力価は、7週目まで安定していた。7週目には、i.m.-i.n.群と比較して、i.n.投与群では有意に低い抗S_{WA1}及び抗RBD_{WA1} IgG力価が検出された。血清中和活性は、S_{WA1}を保有する偽型ウイルスを用いて評価した。抗RBD IgG力価と一致して、血清中和活性は、i.m.-i.n.群と比較して、単回i.n.注射で免疫したハムスターでは低くなっていた(図13C)。i.n.注射後2週目又は7週目の抗S及び抗RBD IgG力価は同等であったにもかかわらず、より早い時期にワクチン接種を受けたハムスターの血清は、わずかに高い中和能を示し、これは、効率的な中和能を得るためには時間をかけて抗体が成熟する必要があることを示唆している。しかしながら、SARS-CoV-2接種4日後(4dpi)の全肺ホモジネートでは、すべてのワクチン接種群が同等の中和能を有していた(図13C)。肺におけるウイルス中和活性は、血清で検出可能な活性よりも防御の関連性が高い可能性がある。

【0116】

LV::Sの単回i.n.投与により誘導される同種SARS-CoV-2チャレンジに対する防御効果

i.m.-i.n.群又は単回i.n.群のいずれかのLV::Sワクチン接種個体の肺では、4dpiにおけるSARS-CoV-2エンベロープ(E)RNAのqRT-PCR検出によって決定されるように、LV ctrl群と比較してウイルス含量の約2~4log₁₀の減少が観察された(図14A、左のパネル)。サブゲノムE RNA(Esg)qRT-PCR法で測定した肺ウイルス量は、活発なウイルス複製の指標となる(Wolfelら、Nature 2020、581(7809):465-9)。この解析は、ワクチン接種を受けた3つの群ではウイルスの複製が全くないのに対し、LV ctrl群では、肺

10

20

30

40

50

あたりのSARS-CoV-2のEsg RNAの幾何平均 $\pm$ SDは $(5.4 \pm 6.8) \times 10^8$ コピーであることを示した(図14A、右のパネル)。4dpiの時点で、観察された防御に一致して、i.n.単独又はi.m.-i.n.プライム-ブーストレジメンのいずれかでワクチン接種したハムスターでは、2~3%の体重減少しか検出されなかったのに対し、LV ctrlを投与したハムスターでは12%の体重減少が検出された(図14B)。LV::Sワクチンを接種し、SARS-CoV-2でチャレンジしたハムスターの全肺ホモジネートにおいて、4dpiにおけるqRT-PCRで評価したところ、LV ctrlを注射し、チャレンジした対応するハムスターと比較して、炎症性IFN- γ 、TGF- β 、IL-6サイトカイン、抗炎症性IL-10サイトカイン、並びにCCL2、CCL3、CCL5及びCXCL10ケモカイン、並びにFoxP3の発現に顕著な減少が検出された(図14C)。炎症性マーカーの変化は、チャレンジの2週間前にi.n.投与を受けた群で特に顕著であった。これらの結果と一致して、ウイルス量と炎症には正の相関が認められたが($r=0.46$ 、 $p < 0.05$)、体重はウイルス量及び炎症とそれぞれ逆相関であった($r=-0.6842$ 、 $p < 0.001$ 及び $r=-0.56$ 、 $p < 0.01$ 、スピアマン検定)。

10

20

30

40

50

【0117】

LV::Sの単回i.n.投与によりワクチン接種したハムスターにおける感染による炎症の低減
肺の病理組織学的検査では、ワクチン接種を受けた対照が、肺浸潤(図15A)と重度の肺胞間質炎症(図15B)を呈し、濃いプレコンソリデーション領域が導かれた(図15C)。これらの肺も気管支病変を呈し、個々の細胞又はクラスター化した細胞の上皮剥離(図15D)、乳頭状突起(図15E)又は管腔内上皮ひだ(図15F)を生じる過形成性上皮増殖の像が認められた。ワクチン接種群では、間質性病変(図15A)及び肺胞性病変(図15G)は、最小限から中等度であった。SARS-CoV-2ヌクレオカプシドタンパク質(NCoV-2)特異的ポリクローナル抗体を用いたLV ctrl処置及び感染ハムスターの肺の免疫組織化学分析は、気管支上皮細胞(図示せず)及び間質(図15H、右のパネル)にNCov-2⁺細胞のクラスターを多数検出した。対照的に、LV::Sワクチン接種動物では、炎症の重症度が低減されていた。検出可能な場合、炎症ゾーンはまだNCov-2⁺細胞を含んでおり、これは、ウイルス複製は制御されているものの(図14A)、初期の4dpiの時点では、浸潤とウイルスの残骸が、まだ完全に吸収されていないことを指し示している。

【0118】

これらのデータは総合的に、LV::Sの単回i.n.投与による免疫化が、i.m.プライミング後のi.n.ブーストレジメンと同程度に効率的であり、同種SARS-CoV-2感染に対して強力な防御免疫を付与することを指し示していた。

【0119】

LV::SBeta-2pプライム(i.m.)-ブースト(i.n.)ワクチン接種はオミクロンバリエーションに対して交差防御を行う

パンデミックの動態を考えると、重要な問題は、新たなVoCに対する交差防御を誘導するワクチンの能力である。様々なVoC由来のSをコードする一連のLVに基づき、本発明者らは最近、LV::SBeta-2pを、交差中和能の最も広いスペクトルを生成する最良の候補として選択した(Vesin, B.ら、Mol Ther 30、2984-2997、2022)。SARS-CoV-2オミクロンに対するハムスターモデルにおいてLV::SBeta-2pの有効性を評価するため、0週目に 1×10^8 TUのLV::SBeta-2pによりハムスター($n=4 \sim 5$ /群)をi.m.又はi.n.でプライミングした。3週目に、各1群に同じ用量のLV::SBeta-2pをi.n.ブーストした(図16A)。7週目に 0.3×10^5 TCID₅₀のSARS-CoV-2 BA.1オミクロンサブバリエーション(Planasら、Nature 2022、602(7898):671:5)ですべての群をチャレンジした。Somicronは、SWA1と比較して32個の変異を有している。これらの変異のうち、15個はRBDに位置している。患者から分離されたこのBA.1オミクロン株をハムスターに感染させると、体重が有意に減少した(図16B)。

【0120】

すべてのLV::SBeta-2pワクチン接種ハムスターにおいて、Somicron及びRBDomicronに対する口バストな交差反応性血清IgG力価がELISAにより検出された(図16B)。プライミングから3週間後、群間において抗体価に有意差は観察されなかった。抗体レベルは

単回注射後安定したままであったが、i.n.でプライミングとブースティングを行った動物では、抗S_{omicron}の力価の有意な上昇が観察された。対照的に、抗RBD抗体価は、すべてのワクチン接種群で経時的に上昇し続けた(図16B、下段)。

【0121】

チャレンジ後、LV::S_{Beta-2P}を単回i.m.注射したハムスター、又はLV ctrlを受けたハムスターは、徐々に体重を失った(図16C)。LV::S_{Beta-2P}でワクチン接種したハムスターは、5%未満の体重減少を示し、病的兆候は見られなかった(図16D)。4dpiの時点で、肺と鼻甲介のウイルス含有量を分析した。LV ctrl注射群の両臓器で高いウイルス量が検出された(図16E、図16F)。対照的に、i.m.-i.n.群の肺からはEsg RNAは検出されず、他の群では約2logの有意な低減が観察された(図16E)。特筆すべきは、ウイルスの複製を抑制しなかったi.m.ワクチン接種ハムスターの体重減少が最も大きかったことである。また、有意に低減したものの、すべてのハムスターのNTで依然としてウイルスの活発な複製が検出可能であったことから、LVベースのi.n.ワクチン接種は、肺の保護には強い効果を示すものの、鼻腔内感染を完全には予防しないことが指し示された(図17F)。しかしながら、プライミング経路に関係なく、i.n.ブーストは、気道組織における感染の制御と拡散において、単回ワクチン投与よりも優れた有効性を導いた。

10

【0122】

LV::S_{Beta-2P}ワクチン接種ハムスターにおける免疫組織化学により決定されたウイルス含量の減少

4dpiにおいて、ctrl群の肺切片を病理組織学的に分析したところ、図15Hと同様の病変が示された(図17)。免疫組織化学像は、i.n.又はi.m.ブーストしたマウスでは、プライミングのみ及びLV ctrlを注射した動物よりも少ないNCoV-2の染色を一般的に呈したが、群内の変動の程度は比較的大きかった(図17)。加えて、本発明者らは、IHCシグナルの程度とEsg qRT-PCR定量との間に厳密な相関関係を観察しておらず、これは、免疫染色された抗原の一部が非複製性のウイルス残骸に相当することを指し示している。

20

【0123】

総合すると、これらの結果は、LVによる単回i.n.免疫化は感染を制御するのに十分であるが、LVベースのi.n.投与は、以前に誘導された抗COVID-19免疫をブーストすることにより適していることを示した。

【0124】

LV::S_{WA1-2P}でプライミングし、LV::S_{Beta-2P}でブーストしたハムスターにおける交差反応性抗体の誘導

次に本発明者らは、S_{WA1}に曝されたことのある動物において、LV::S_{Beta-2P}のi.n.ブーストの有効性を評価した。0週目に 1×10^8 TUのLV::S_{WA1-2P}又はLV::S_{Beta-2P}により、ハムスター(n=4/群)をi.m.でプライミングした。5週目に、両群を 1×10^8 TUのLV::S_{Beta-2P}でi.n.ブーストした(図18A)。すべてのワクチン接種ハムスターにおいて、試験したプライミング後のどの時点でも、Sタンパク質及びRBDタンパク質に対するロバストな血清IgG力価が検出された(図18B)。プライミングの後又はブーストの後において、同等なS_{WA1}又はS_{omicron}特異的抗体反応の速度論的プロファイル及び強度が観察された(図18B、上段)。同種又は異種のi.n.ブーストはいずれも、抗S抗体価をそれぞれ1.8倍又は2.5倍にわずかに上昇させた。対照的に、RBD_{WA1}と比較して、約4倍から10倍低いRBD_{omicron}に対する血清IgG応答が測定された(図18B、下段)。しかしながら、抗RBD_{omicron} IgG力価は、同種ブーストより異種ブーストによって有意に良好に向上され、それぞれ3.8倍と1.7倍であった。

30

40

【0125】

LV::Sでプライミングし、LV::S_{Beta-2P}でブーストしたハムスターにおける抗S_{CoV-2}抗体インプリンティング

i.m.注射の5週間後、LV::S_{WA1-2P}及びLV::S_{Beta-2P}はいずれも、S_{D614G}又はS_{Alpha}を保有する偽型ウイルスに対して高い血清中和活性を示した(図19A)。S_{D614G}、S_{Alpha}、及びS_{Delta}に対する交差中和活性は、免疫したハムスターの2つの群で同様であっ

50

た。注目すべきことに、単回i.m.注射の後、LV::SBeta-2Pで免疫したハムスターだけが、Somicronに対しては弱かったものの、すべてのSバリエーションに対する血清中和活性を示した。

【0126】

LV::SBeta-2Pのi.n.ブーストは、両群においてすべてのVoCに対する交差血清中和能を増加させた(図19B)。中和抗体のレベルは、LV::SWA1-2Pでプライミングし、LV::SBeta-2Pでブーストしたハムスターの血清では向上したが、それらは、SBetaを保有する偽型ウイルスを交差中和することはほとんどできず、Somicronを保有する偽型ウイルスを交差中和することは全くできなかった(図19B)。肺ホモジネートは、異種プライム-ブースト後にSBeta又はSomicronに対して交差中和活性を示さない同様なプロファイルを示した(図19C)。これとは正に対照的に、LV::SBeta-2Pでプライミングし、LV::SBeta-2Pでブーストしたハムスターの血清及び肺ホモジネートは、SBeta又はSGammaを保有する偽型ウイルスをはるかに良く交差中和することができ、Somicronを保有する偽型ウイルスも、より少ない程度には交差中和できた。しかしながら、このプライム-ブーストレジメンは、上で観察されたように、SARS-CoV-2Omicronのチャレンジに対して十分な防御を与えた(図16)。したがって、LV::SBeta-2Pブーストは、LV::SBeta-2Pでプライミングしたハムスターでは、LV::SWA1でプライミングしたハムスターよりも、交差血清中和をはるかに良く向上させる。これらの結果は、抗S液性免疫における明確なインプリンティング効果を示しており、特にオミクロン及びベータバリエーションに対して明白であった。

10

20

【0127】

考察

LVベースのプラットフォームは、COVID-19に対する強力なワクチン接種アプローチとして最近登場した。本発明者らは特に、全身的プライムとして使用した後に粘膜i.n.ブーストを行った場合に、SARS-CoV-2感染に対する肺の防御を誘導するその強力な予防能力を実証した(Ku MWら、Cell Host Microbe、29(2)、236-249 e236、2021)。本研究では、臨床試験へと向けたさらなるステップとして、本発明者らはSWA1又はSBetaの安定化型をコードするLVを使用した。この選択は、融合前の形態のウイルスエンベロープ糖タンパク質の安定化が、サブユニットワクチンの工業的製造において組換えタンパク質として製造する際の収率を向上させることを示すデータに基づいている。それは更に、最適な免疫原性形状の抗原の利用可能性を高めることで、核酸ベースのワクチンの有効性も高める(Hsiehら、Science、2020、369(6510):1501-5)。

30

【0128】

本報告の最初の部分で、本発明者らは、SWA1をコードするLVの単回i.n.投与が、ウイルス学的、免疫学的及び病理組織学的パラメーターによって評価されるように、高感受性ハムスターモデルにおいて、i.m.-i.n.プライム-ブーストレジメンと同程度に効率的に、肺の完全な保護をもたらすことを実証した。ハムスターのACE2オルソログタンパク質は、Scov-2と効率的に相互作用し、これは、高い複製率を持つSARS-CoV-2による宿主細胞侵入を容易に可能にする。SARS-CoV-2の接種後、急速に体重が減少し、重篤な肺病変が発症することから、非近交系のハムスターは、薬剤又はワクチン候補の有効性を評価するための感度の高いモデルとなった(Siaら、Nature 2020、583(7818):834-8)。ハムスターは、軽度のCOVID-19病態しか発症しないアカゲザルよりも難しいモデルであった。したがって、ハムスターモデルにおいて単回i.n.投与によって同種チャレンジに対して肺を強力に保護したことは、主要な重要性を有する資産であった。この保護は、粘膜免疫の発達に起因するものである可能性が高い。粘膜レベルでウイルスの相互作用をブロックし得る抗原特異的分泌性二量体IgAの誘導は、ウイルス排出を減少させ、防御と相関することが示されている(Halfmannら、Cell Rep. 2022;39(3):110688;Munoz-Fontelaら、Nature 2020、586(7830):509-15;Wangら、Sci Transl Med. 2021、13(577))。i.n.免疫化ハムスターの鼻甲介では依然として感染性ウイルスが検出されたが、感染性ウイルス力価の有意な低下は、最近Langel SNらによって記述された

40

50

ように、感染及び伝播の減少につながり、疾患制御の手段を提供する可能性がある(Langelら、Sci Transl. Med. 2022、14(658))。実際、本発明者らは、以前にマウスモデルにおいて、抗S IgG抗体と分泌性IgA抗体が、LVのi.n.投与後に肺に常在するメモリーB細胞及びT細胞と一緒に生成されることを示している。LVベースのSARS-CoV-2ワクチンによって誘導されるIgAの存在は、ウイルスに対する完全な肺の防御と関連していた(Vesin, B.ら、Mol Ther 30、2984-2997、2022)。残念ながら、抗IgA抗体及び活性化/メモリーT細胞マーカーに対する抗体を含む免疫学的ツールがないため、ハムスターモデルでは粘膜免疫を評価することができなかった。一方、SARS-CoV-2の祖先株だけでなく、新たに出現したVoCに対しても、i.n.免疫がより良い防御を提供するという証拠が増えつつあった(Afkhamiら、Cell 2022、185(5):896-915; Brickerら、Cell Rep. 2021、36(3):109400)。この領域を探索するこれまでの研究は、チンパンジーのアデノウイルスベクターワクチンが使用しているが、これは炎症性であることが知られており、粘膜ワクチン接種に使用するのにはリスクがある(Coughlanら、Mol. Ther. 2022、「Adenovirus-based vaccines-a platform for pandemic preparedness against emerging viral pathogens」)。これとは正反対に、LVは非細胞変性性であり、非常に弱い炎症性であり(Kuら、Vaccines 2021:1-16、1988854)、粘膜ワクチン接種にはるかにより適している。同種SARS-CoV-2チャレンジの2週間又は7週間前の、LVベースのワクチンの単回i.n.投与が防御を引き起こすという事実は、LVベースのワクチンの臨床試験を設定する上で貴重である。このプラットフォームは、ウイルス感染の低減における粘膜免疫の大きな利点と共に、集団ワクチン接種に顕著な利点をもたらすことができる。

10

20

【0129】

SARS-CoV-2のVoCの継続的な出現は、抗S抗体反応の観点から、以前の感染又は主にSWA1に基づく第一世代ワクチンによる以前のワクチン接種のいくつかの側面を模倣し得る異種抗原ブースターの防御能を評価することにより、研究を拡大することを本発明者らに促した。ワクチン接種者において多数のブレークスルーSARS-CoV-2感染が観察されており、これは、これらのワクチンの交差効果が不完全であることを示している(Abu-Raddad LJら、2021;385(2):187-9; Kuhlmann Cら、2022;399(10325):625-6)。最近、SARS-CoV-2に対する気道における口バストな滅菌免疫(sterilizing immunity)を確立するには、粘膜ブースターワクチン接種が必要であることが報告されている(Tang Jら、「Respiratory mucosal immunity against SARS-CoV-2 following mRNA vaccination.」、Sci Immunol. 2022:eadd4853)。LV免疫したハムスターにおいて、本発明者らは、SWA1抗原とSBeta-2P抗原のSCoV-2に対する交差反応性血清IgG応答を誘導する能力の間に著しい違いを検出しなかった。しかしながら、T細胞応答もまたSARS-CoV-2感染に対する主要なエフェクターであるため、ワクチンの防御能力とそれらの中和抗体誘導能力の間には、明確な区別がなされるべきである。特に、LVに基づく防御の有効性は、中和抗体応答を誘導する能力だけでなく、T細胞免疫原性にも大きく依存する。成熟B細胞コンパートメントと抗体応答を完全に欠く μ MT KOマウスにおいて、肺のほぼ完全な保護が達成されることは注目に値する(Ku MWら、EMBO Mol Med. 2021:e14459)。更に、LV::Sプライム(i.m.)ブースト(i.n.)マウスの肺では、粘膜常在メモリーT細胞、並びに $IFN\gamma^+$ $IL-2^+$ TNF^+ トリプル陽性 $CD8^+$ T細胞エフェクターが、容易に検出される[26]。更に、自然感染後に得られた知見は、新たに出現したSARS-CoV-2バリエーションのS抗原に生じる変異による影響を一般的に受けにくい特異的T細胞免疫が、ウイルス複製に対して大部分有効であることを示唆している(Altman DMら、2021;2(5):100286; Mazzoni Aら、2022;13:801431)。T細胞を介した防御は、ハムスターでも確実に働いている。しかしながら、前述のように、免疫学的ツールの欠如は、本研究においてT細胞応答の特徴付けを妨げた。

30

40

【0130】

LV::Sでプライミングし、LV::SBeta-2Pでブーストしたハムスターでは、D614G、アルファ及びデルタバリエーションに対する血清中和能は増強されたにもかかわらず、ベータ及

50

びガンマバリエントに対しては統計的に大きく減少した交差中和活性が観察され、オミクロンバリエントに対する交差中和活性は観察されなかった。同様に、A型インフルエンザウイルスの場合も、ある血清型への最初の暴露は、そのバリエントに対する将来の応答に影響を及ぼし得る(Gostic KMら、2016;354(6313):722-6)。このことは、抗体応答に対する過去の感染又はワクチン接種の免疫インプリンティング効果に関する懸念を生じさせ、ワクチンを設計する際にはこれを考慮する必要がある(Roltgen Kら、「Immune imprinting, breadth of variant recognition, and germinal center response in human SARS-CoV-2 infection and vaccination.」、Cell. 2022)。本研究は、初期のSバリエントへの免疫系の前曝露が、異種Sバリエントによる後期ブースター後に測定される中和抗体反応にネガティブな影響を及ぼすことを指し示している。本発明者らの結果は、SARS-CoV-2の祖先又はアルファバリエントのいずれかに感染した医療従事者が、オミクロンに対する中和免疫の低下を示すという最近のデータを裏付けるものである(Reynolds CJら、2022;377(6603):eabq1841)。更に、mRNAワクチンを用いて、Kalninらは、異種ブースティングが同種ブースティングに比べて劣った中和抗体価をもたらすことも示している(Kalnin KVら、2022;40(9):1289-98)。このネガティブな効果を打ち消し、VoCに対する十分なレベルの交差中和を達成するためには、バリエントS配列の追加注射が必要とされ得るという仮説が提唱され得る。

10

【0131】

総合的に、発明者らの結果は、効果的なワクチン送達プラットフォームとしてのLVの能力を実証した。LVは、SARS-CoV-2 VoCに対する強力な防御免疫を誘導する効果的で有望な戦略であり、非炎症性であるため、粘膜i.n.ワクチン接種に適しているという利点を有していた。本発明者らは最近、 1×10^9 TUの高用量のLVを注射したマウスにおいて、LV::SBeta-2Pのi.n.投与の安全性を実証した(Vesin, B.ら、Mol Ther 30、2984-2997、2022)。肺の病理組織学的分析では、副作用は検出されなかった。

20

【0132】

・SARS-CoV-2オミクロンバリエントに対するLV::SBeta-2Pの完全な交差防御能

発明者らは、肺でSARS-CoV-2感染を起こしやすく、更にSARS-CoV-2の複製に対する前例のない脳の許容性を示したB6.K18-hACE2^{IP-THV}トランスジェニックマウスにおいて、LV::SBeta-2Pの保護効果を評価した(Ku MWら、EMBO Mol Med、e14459、2021)。B6.K18-hACE2^{IP-THV}マウス(n=5/群)を0週目に 1×10^8 TU/マウスのLV::SBeta-2P又は、空のLV(シャム)で筋肉内(i.m.)にプライミングし、3週目に同じ用量の同じベクターで鼻腔内(i.n.)にブーストした(図20A)。その後、5週目に 0.3×10^5 TCID₅₀のSARS-CoV-2オミクロンバリエントをマウスにチャレンジ(i.n.)した。

30

【0133】

その後、感染後5日目に、活発なウイルス複製の指標であるサブゲノムECoV-2 RNA(Esg)qRT-PCRを用いて、肺と脳のウイルスRNA含有量を測定した(Chandrashekarら、2020、Science、369、812-817;Tostanoskiら、2020、Nat. Med. 26、1694-1700;Wolfelら、2020、Nature、581、465-469)。LV::SBeta-2Pワクチン接種は、肺におけるSARS-CoV-2オミクロンに対する滅菌防御をもたらし、すなわち、ワクチン接種したマウスではEsgウイルスRNAが検出されなかったのに対し、シャムワクチン接種したマウスでは $(5.83 \pm 6.22) \times 10^9$ コピー/肺であった(図20B、左)。並行して、脳内のウイルスRNA含有量のEsg qRT-PCR定量は、ワクチン接種マウスでは全くウイルスRNAのコピーを検出しなかったのに対し、シャムワクチン接種対照マウスの脳内では $(6.41 \pm 1.29) \times 10^9$ コピーのウイルスRNAを検出した(図20B右)。注目すべきは、5匹中2匹がオミクロンで頸部感染を示さなかったにもかかわらず、他の3匹は脳内で非常に大量のウイルス複製を示したことである。

40

【0134】

したがって、LV::SBeta-2Pはオミクロンバリエントに対して完全な交差防御能を示し、これは我々が以前に示した祖先又はデルタバリエントに対する効率に完全に匹敵するものであった(Ku MWら、EMBO Mol Med、e14459、2021;Ku MWら、Cell Host

50

【図 1】

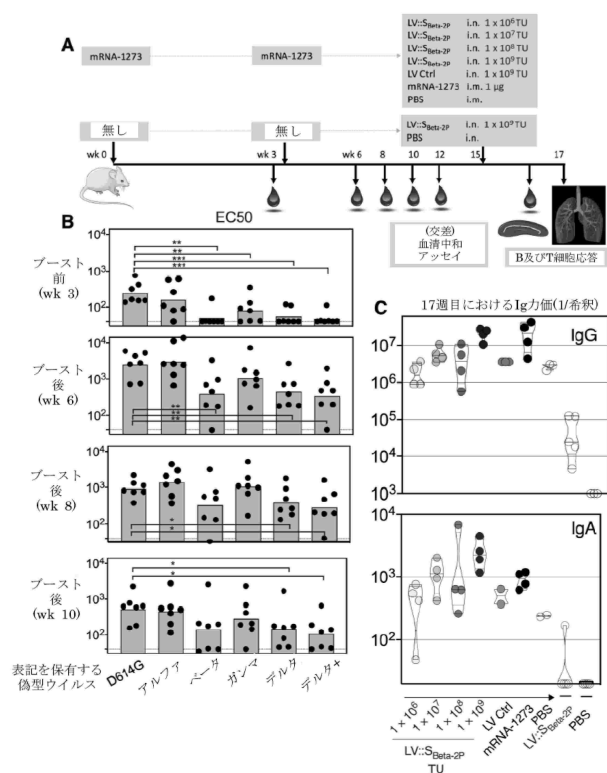


Figure 2

【図 3】

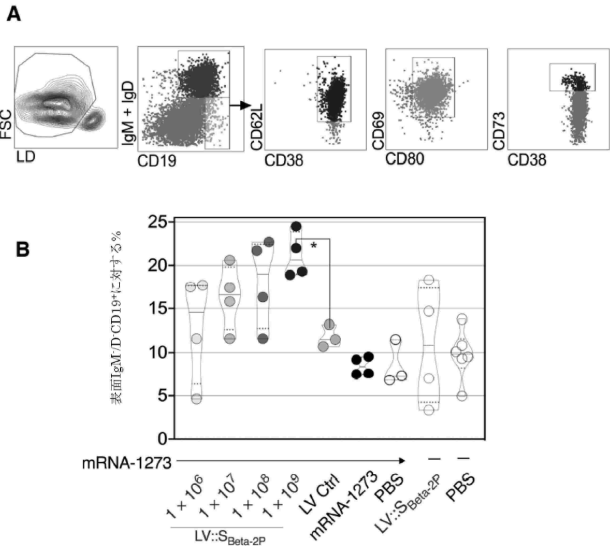


Figure 3

【図 4】

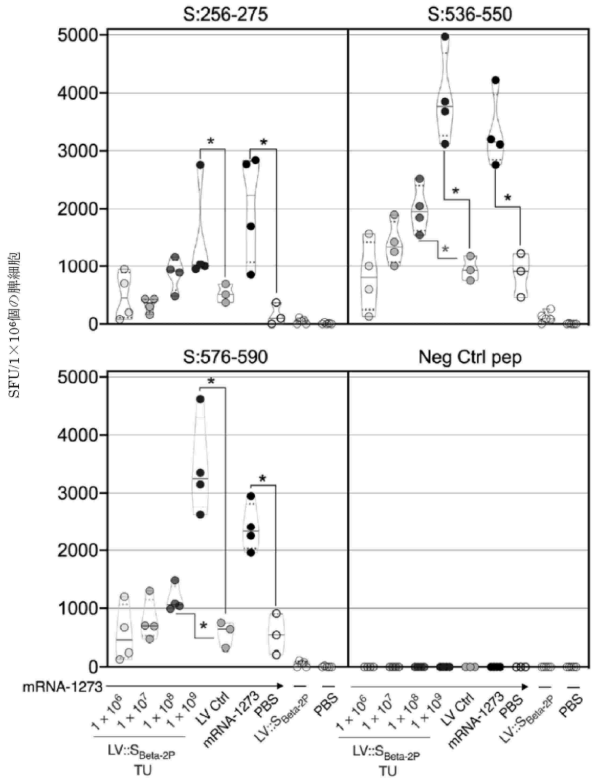


Figure 4

【図 5】

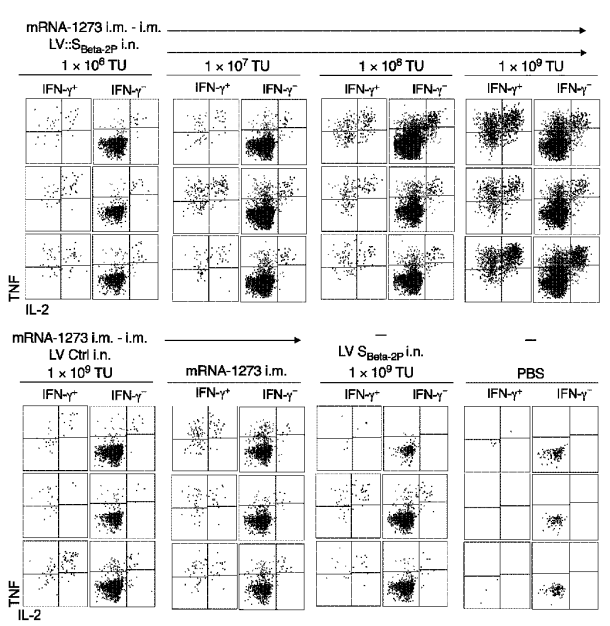


Figure 5

【図 6】

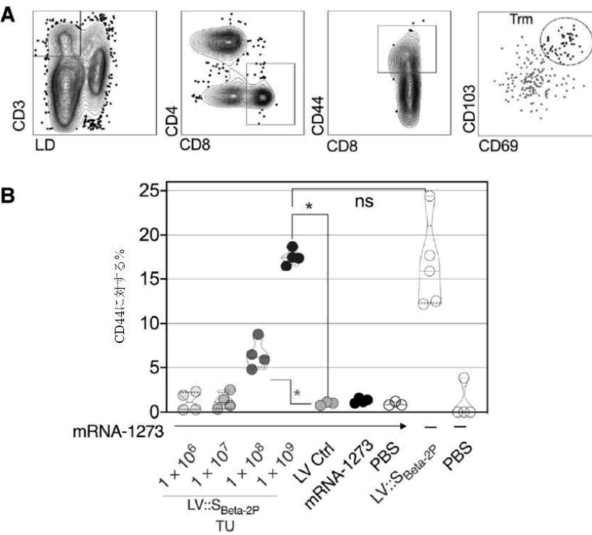


Figure 6

【図 7】

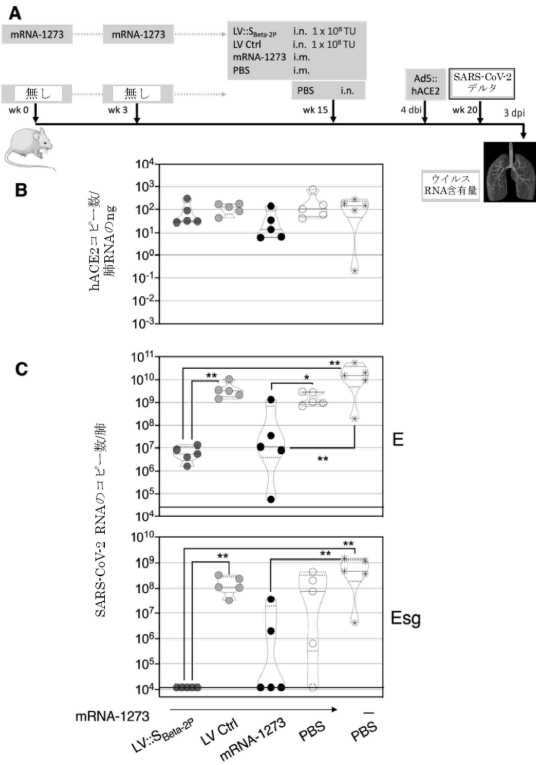


Figure 7

【図 8】

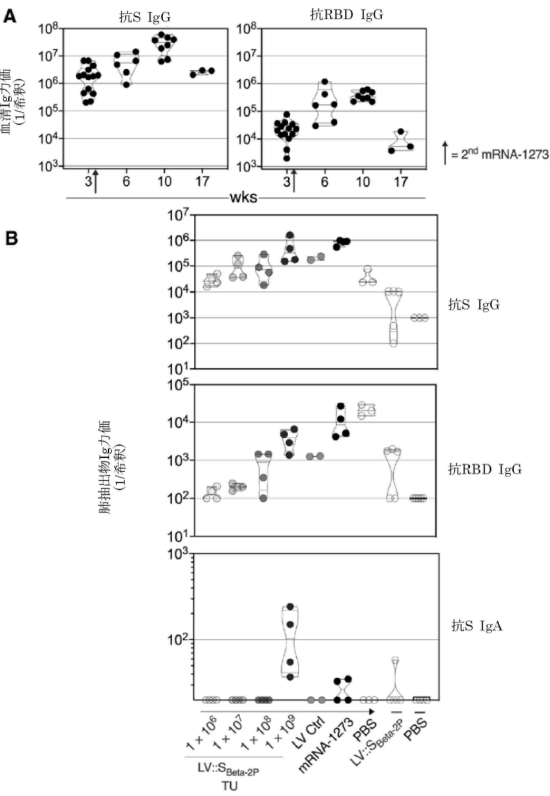


Figure 8

【図 9】

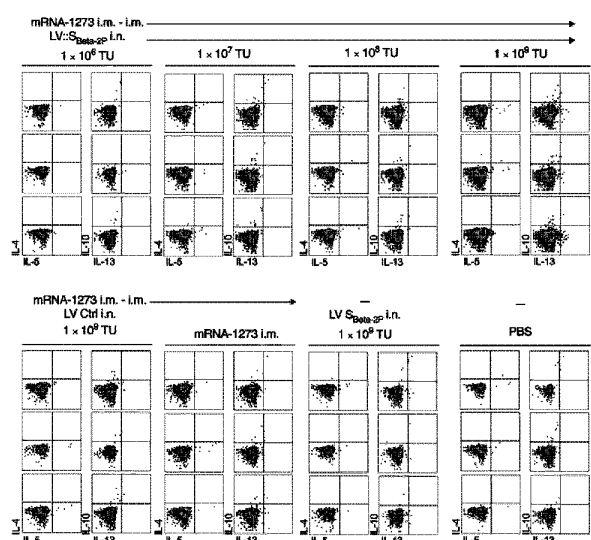


Figure 9

【図 10 A】

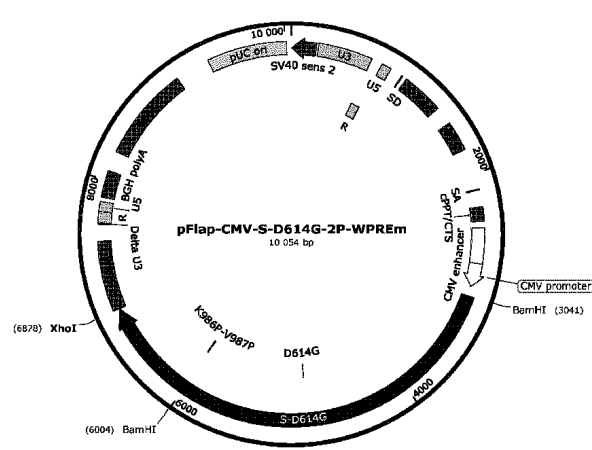


Figure 10A

10

20

30

40

50

【図 10 B】

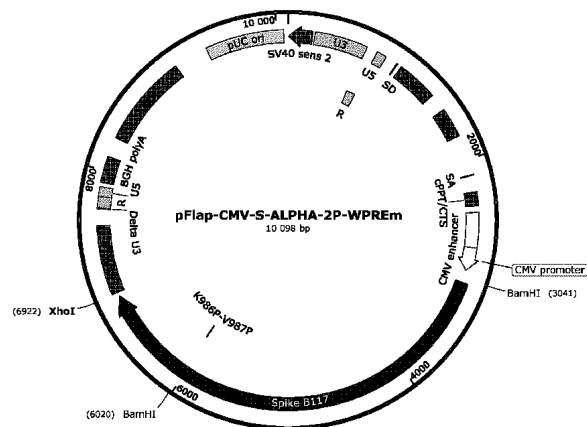


Figure 10B

【図 10 C】

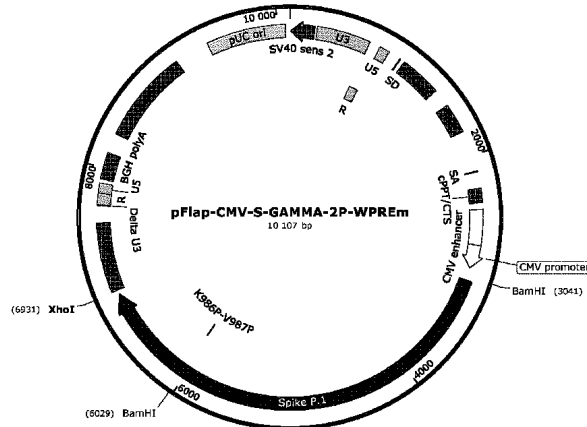


Figure 10C

【図 10 D】

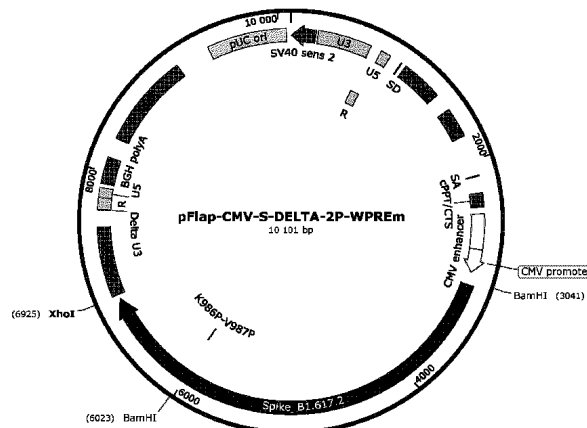


Figure 10D

【図 10 E】

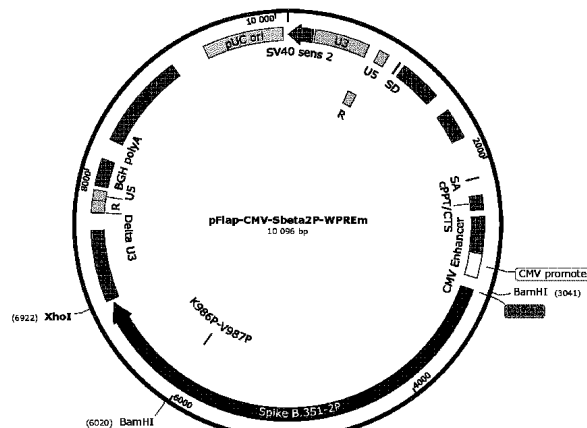


Figure 10E

10

20

30

40

50

【図 1 1 A】

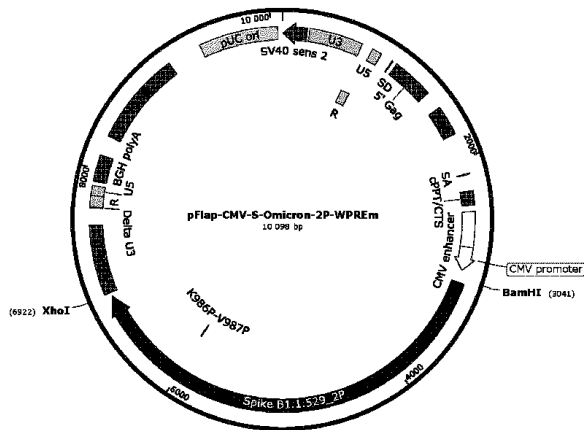


Figure 10F

[illegible]

Figure 11A

【図 12】

MFVFLVLPLVLSQVCVNLUTRTQSYTNSFTFRGVYPVKFRSSVLHSTQDQLFPFSSVNTWFWHIASGNTGKTRFDPNPVLPFN
 DGVYFASTEKSNRIGRWGFTGLRQDQLQVLINNVKIVCFQCPNDPLFVVYVKNKNSMSEFRRVSSANCTTF
 EYVYGLPMDLEQGKNGFNKFLNDFKQVNLIDGYKFSKATPNLGRDLPQSALEPDLPIGINTRFTQTLALHRSYVLT
 DSSSGWTGAGAAAYVGYGLQPTFLCKYINENGITITVDALCDPLSEKTLKSFTEKGYIOT **NITN**
GLPDEVFVNATRFASVYAWNRKISNLSVYVNFPAFCKYGSPTKDLGCTVNLVDSFVIRGNEVQIAPQOT
 CNADINEYNKLDPDFTCVCIWANSNK**LDSKVG**GNVNYRYRLFRKSNLKFPERDISTEIYQAGNKPCNGVAGVNCYFQLOSY
 GRDTPYVGHQPPYVR **QK**PKSTNKL **FN**KKKFLPQOQFGRDITD
VYDQGTGLEIDTFCSGGYSVITPNTNSNQVVLQYGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRYVSNSGVTQFACGLIEAGY
 VNNSYECDDPIGAG**CASYOTQTSKHHRRAS**VASQJIAQYMTSLGSAENSVAYSNIAJPTNFITSVTELLPDSVMTKTSVOC
 TMYICGDSTCESNLGLYGGSFCTQKRLRGLTAEVQDQNTVEFAVQKYPKPIQYGGFNFSGLDPLDPSKPSKR
 YVYVYAGFQYQZGLDQIARDLCAQKFNGLTVLPPILLTEMAIQTSSALAGITSGVTFWGGAGAALYFAMQM
 AYRNFNGIVQTNLVYQENAFQNSAIGKQDLSLSTASALGKQDVLVNNHAQALNTLVQLSSKFSAIGS
VQIDRITLITGRISLOQTVTQVLQIRAAEIRASANLAAKTMCEVLSQSKRVDFCGKGYHLMFSPQASPHGVFLH
 VTYVPQAQKNFTALCIDHGKAHFREGVYVSNGTWVFTVQRNFYEPQIITDNTFVSGNGCYHVMVGNNTVYDPLQPE
 LDSFKEELDKYMTTSPDVLDDISIGNAYVNIQKDEIRNEVANKLNEUSDJLQELGQYEQIYGVVLMFWHGLAGLAI
 VMYTMLLCYKTSNCSLCKGCCSGCCSFDEEDPEYKGVGLHY*

Figure 11B

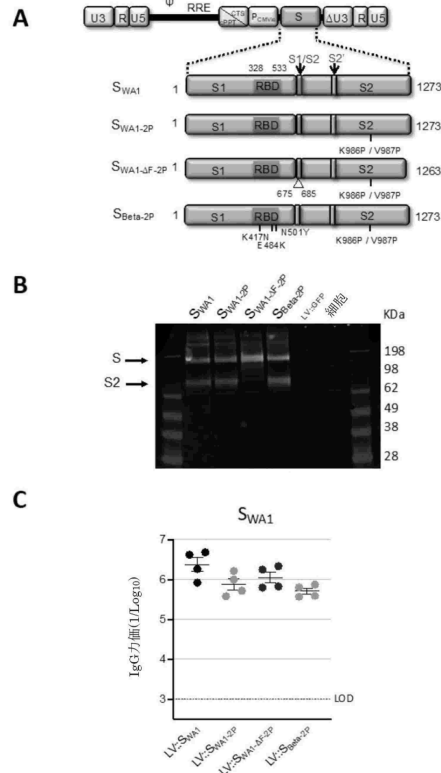


Figure 12

【図 1 3】

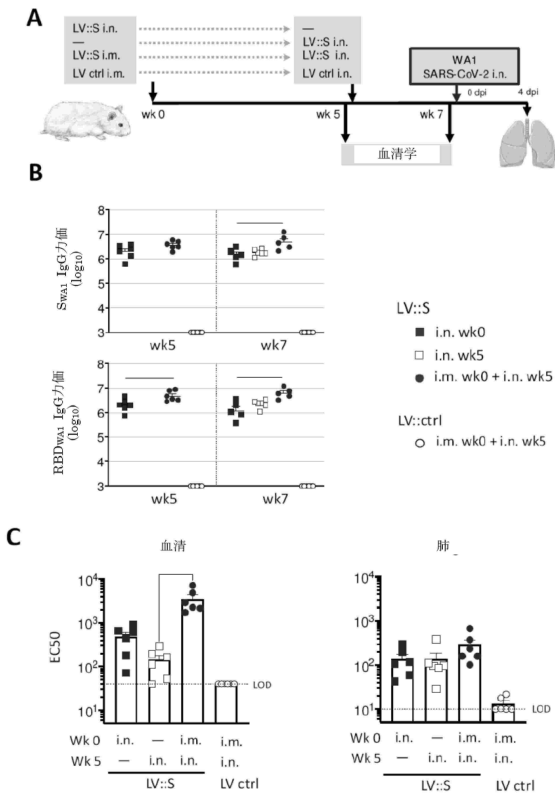


Figure 13

【図 1 4】

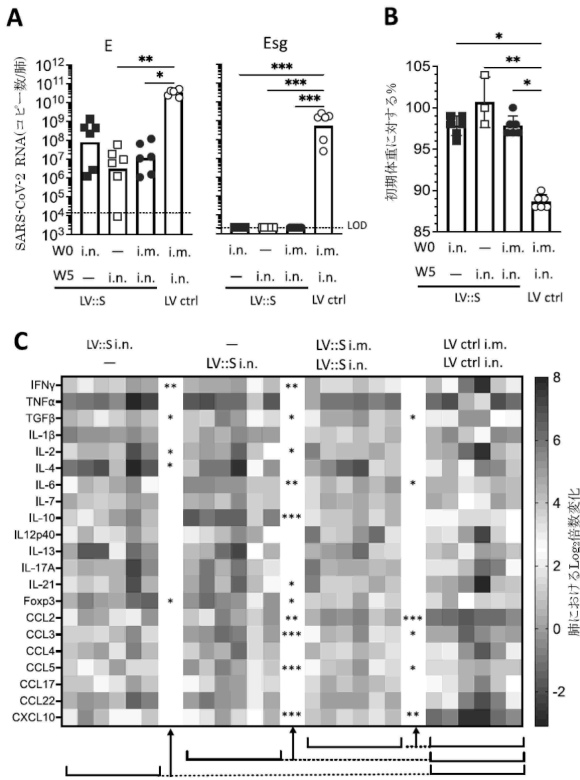
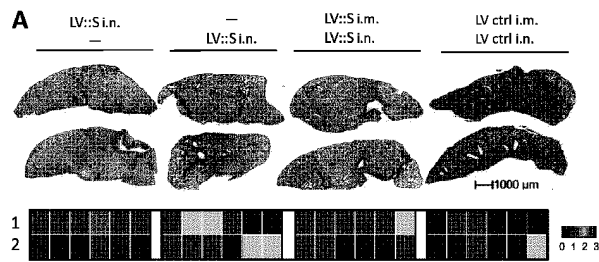
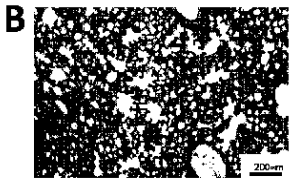


Figure 14

【図 1 5 A】



【図 1 5 B】



10

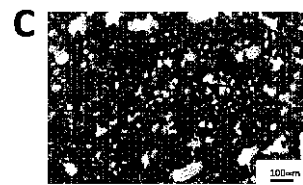
20

30

40

50

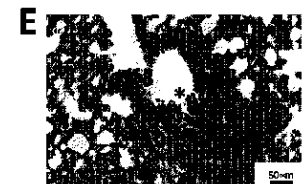
【図 15 C】



【図 15 D】



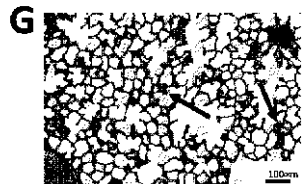
【図 15 E】



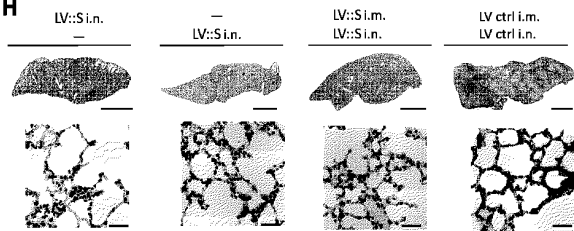
【図 15 F】



【図 15 G】



【図 15 H】



10

20

30

40

50

【図 16】

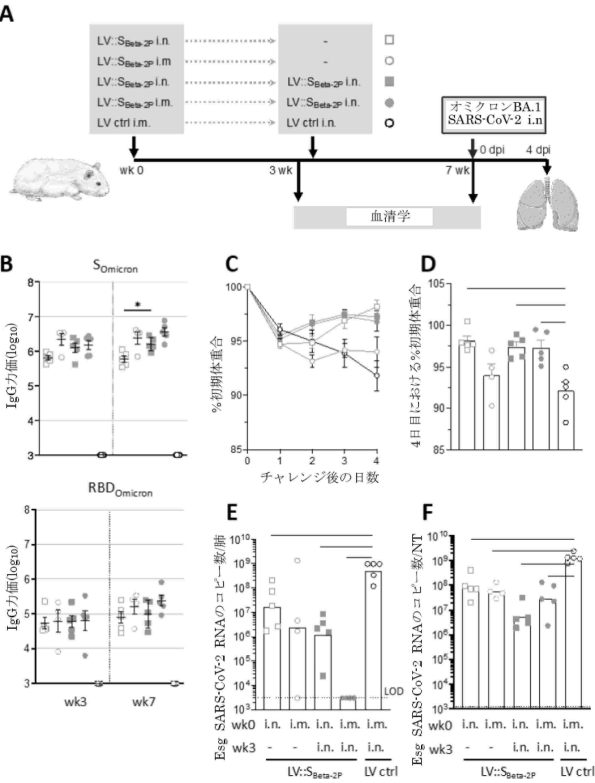
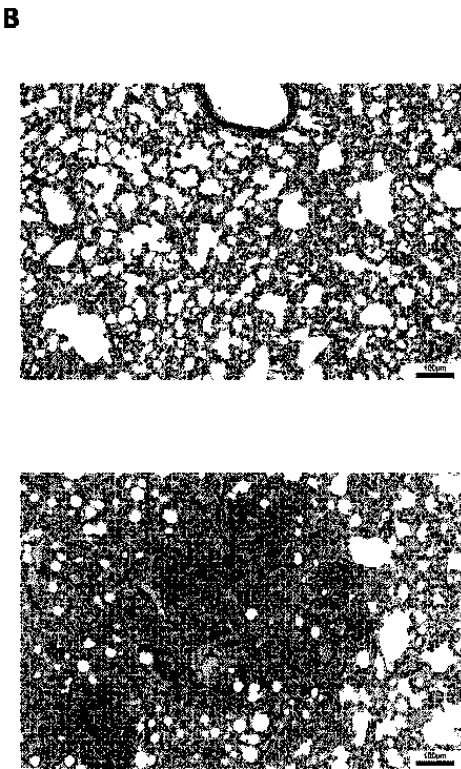
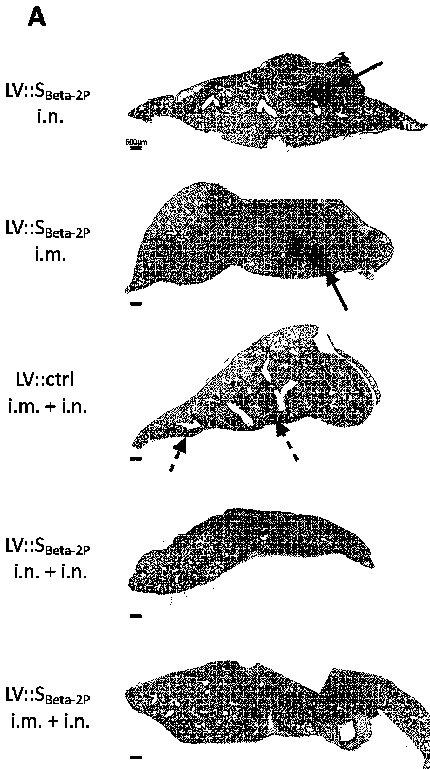


Figure 16

【図 17 B】



【図 17 A】



【図 18】

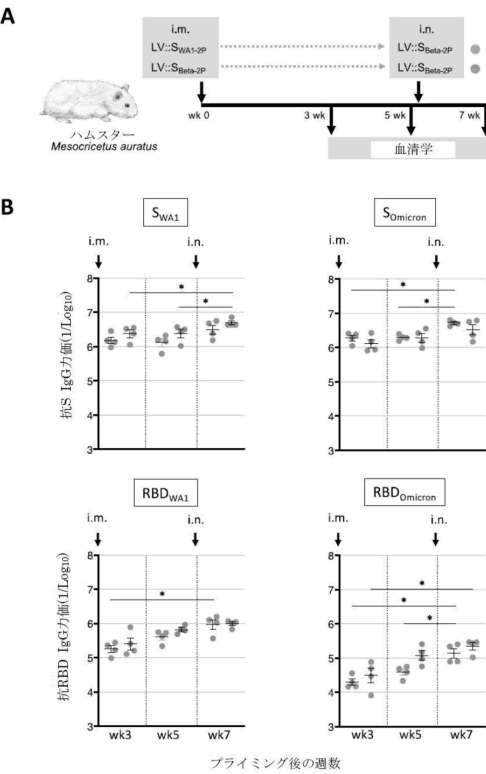


Figure 18

10

20

30

40

50

【図 19】

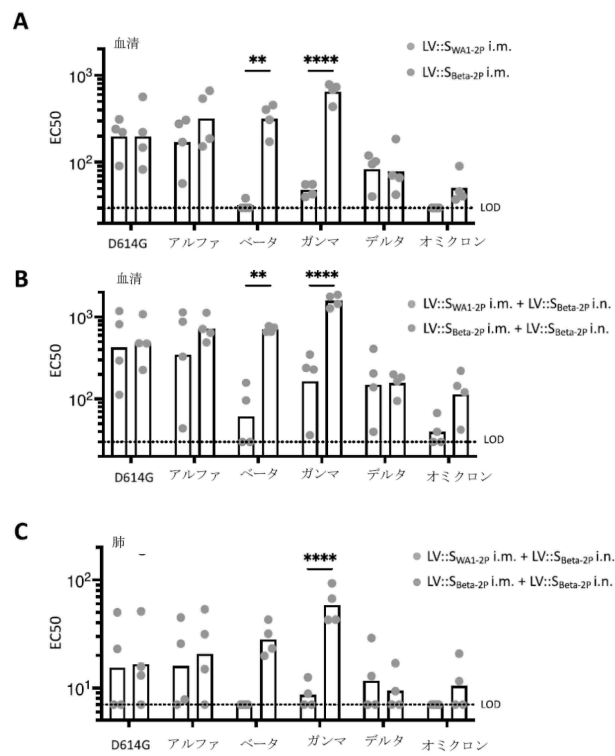


Figure 19

【図 20】

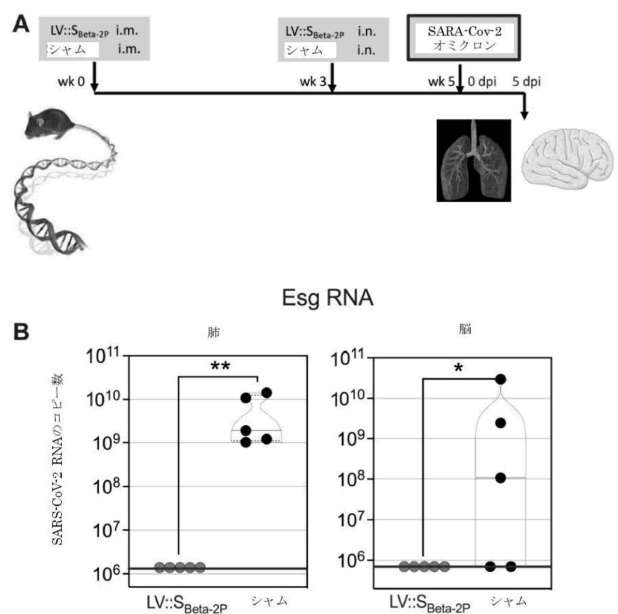


Figure 20

【配列表】

2025504431000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/051025

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/12 A61K39/215 C07K14/005 C12N15/86 A61P31/14 ADD.												
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K C12N A61P												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
Y	Ku Min-Wen ET AL: "Intranasal vaccination with a lentiviral vector strongly protects against SARS-CoV-2 in mouse and golden hamster preclinical methods", bioRxiv, 3 September 2020 (2020-09-03), XP055852779, DOI: 10.1101/2020.07.21.214049 Retrieved from the Internet: URL:https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.07.21.214049v2.full [retrieved on 2021-10-19] page 4 page 9; figure 6 abstract ----- -/--	1-15										
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.												
* Special categories of cited documents : <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 14 April 2023		Date of mailing of the international search report 16/06/2023										
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Saame, Tina										

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/051025

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KU MIN-WEN ET AL: "Brain cross-protection against SARS-CoV-2 variants by a lentiviral vaccine in new transgenic mice", EMBO MOLECULAR MEDICINE , vol. 13, no. 12 7 December 2021 (2021-12-07), XP055957650, US ISSN: 1757-4676, DOI: 10.15252/emmm.202114459 Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8646827/pdf/EMMM-13-e14459.pdf page 2, left-hand column page 4, right-hand column; figure 4 page 7, left-hand column -----	1-15
Y	WO 2021/181100 A1 (UNIV OXFORD INNOVATION LTD [GB]) 16 September 2021 (2021-09-16) page 41, paragraph 2; claims 1, 16 page 158, paragraph 1 -----	1-15
Y	SAPKOTA BINAYA ET AL: "Heterologous prime-boost strategies for COVID-19 vaccines", JOURNAL OF TRAVEL MEDICINE , vol. 29 16 December 2021 (2021-12-16), pages 1-10, XP055957660, CA ISSN: 1195-1982, DOI: 10.1093/jtm/taab191 Retrieved from the Internet: URL:https://watermark.silverchair.com/taab191.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kKhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAtwggLYBgkqhkiG9w0BBwaggLJMIICxQIBADCCAr4GCSqGS1b3DQEHATAeBg1ghkgBZQMEAS4wEQQMaGDWFBxZHqOntvugAgEQgIICj8aztL_Ocxke97Kde2SkzbUUZh-E5CT1A5HdxZsHtyeZLS1RXKxvZIGtAy8DVXW0VzIZorODv09ODJOcDUR6A6nkwIxE table 2 abstract -----	1-15
Y,P	WO 2022/013405 A1 (PASTEUR INSTITUT [FR]; THERAVECTYS [FR]) 20 January 2022 (2022-01-20) the whole document -----	1-15
15 Y,P	WO 2022/136921 A1 (PASTEUR INSTITUT [FR]; THERAVECTYS [FR]) 30 June 2022 (2022-06-30) the whole document -----	1-15
1	----- -/--	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/051025

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y,P	WO 2022/167831 A1 (PASTEUR INSTITUT [FR]; THERAVECTYS [FR]) 11 August 2022 (2022-08-11) the whole document -----	1-15

1

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2023/051025

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2023/051025**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:
1-15

30

40

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2023/051025

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-15

A pseudotyped lentiviral vector particle encoding a Spike (S) protein of a Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) or a derivative thereof for use as a heterologous boost or target immunization agent in a vaccine regimen for administration to the upper respiratory tract of a subject, in particular a human subject, who received a prime immunization with a vaccine composition against SARS-CoV-2 infection or disease selected from the group consisting of a protein, an mRNA, an adenovirus, an inactivated virus and a protein subunit vaccine composition against SARS-CoV-2 infection or disease, in particular a protein or an mRNA vaccine composition against SARS-CoV-2 infection or disease.

2. claims: 16-18

An immunogenic composition comprising a pseudotyped lentiviral vector particle encoding a S protein of a SARS-CoV-2 or a derivative thereof and a pharmaceutically acceptable carrier, wherein the pseudotyped derivative of the S protein of SARS-CoV-2 comprises at least nine amino acid mutations including (i) a mutation of the lysine residue to the asparagine residue at position 417 of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 (K417N), (ii) a mutation of the glutamic acid residue to the alanine residue at position 484 of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 (E484A), (iii) a mutation of the asparagine residue to the tyrosine residue at position 501 of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 (N501Y), (iv) a mutation of the lysine residue to the proline residue at position 986 of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 (K986P), (v) a mutation of the valine residue to the proline residue at position 987 of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 (V987P), (vi) a mutation of the glycine residue to the serine residue at position 446 of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 (G446S), (vii) a mutation of the threonine residue to the lysine residue at position 478 of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 (T478K), (viii) a mutation of the glutamine residue to the arginine residue at position 493 of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 (Q493R) and (ix) a mutation of the glutamine residue to the arginine residue at position 498 of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 (Q498R).

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/051025

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2021181100 A1	16-09-2021	AU 2021235248 A1	01-09-2022
		BR 112022016580 A2	16-11-2022
		CA 3171939 A1	16-09-2021
		CL 2022002420 A1	28-04-2023
		CN 115720522 A	28-02-2023
		CO 2022011811 A2	30-08-2022
		CR 20220501 A	23-01-2023
		DO P2022000184 A	16-10-2022
		EC SP22076973 A	30-12-2022
		EP 4117723 A1	18-01-2023
		IL 295630 A	01-10-2022
		JP 2023517286 A	25-04-2023
		KR 20220152248 A	15-11-2022
		PE 20221758 A1	11-11-2022
		TW 202200198 A	01-01-2022
		UY 39131 A	30-09-2021
		WO 2021181100 A1	16-09-2021
WO 2022013405 A1	20-01-2022	AU 2021308424 A1	09-02-2023
		CA 3185952 A1	20-01-2022
		EP 4181954 A1	24-05-2023
		KR 20230041028 A	23-03-2023
		WO 2022013405 A1	20-01-2022
WO 2022136921 A1	30-06-2022	NONE	
WO 2022167831 A1	11-08-2022	NONE	

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 9/08 (2006.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)
 A 6 1 P 37/04 (2006.01)
 A 6 1 K 31/7105(2006.01)
 A 6 1 K 35/761 (2015.01)
 C 1 2 N 15/867 (2006.01)
 C 1 2 N 15/50 (2006.01)
 C 0 7 K 14/165 (2006.01)
 C 0 7 K 14/145 (2006.01)

A 6 1 K 9/08
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 P 37/04
 A 6 1 K 31/7105
 A 6 1 K 35/761
 C 1 2 N 15/867 Z
 C 1 2 N 15/50
 C 0 7 K 14/165
 C 0 7 K 14/145

4 H 0 4 5

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,
 ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,C
 O,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,I
 R,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX
 ,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,
 SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

ス・１５・リュ・デュ・ドクトゥール・ルー・２８・パストゥールーテラヴェクティス・ジョイン
 ト・ラボ・アンスティテュ・パストゥール

(72)発明者 ラレー・マジレッシ

フランス・７５７２４・パリ・セデックス・１５・リュ・デュ・ドクトゥール・ルー・２８・パス
 トゥールーテラヴェクティス・ジョイント・ラボ・アンスティテュ・パストゥール

(72)発明者 マリリーヌ・ブルジーヌ

フランス・７５７２４・パリ・セデックス・１５・リュ・デュ・ドクトゥール・ルー・２８・パス
 トゥールーテラヴェクティス・ジョイント・ラボ・アンスティテュ・パストゥール

(72)発明者 ベンジャミン・ヴェシン

フランス・７５７２４・パリ・セデックス・１５・リュ・デュ・ドクトゥール・ルー・２８・パス
 トゥールーテラヴェクティス・ジョイント・ラボ・アンスティテュ・パストゥール

(72)発明者 ジョディ・ロペス

フランス・７５７２４・パリ・セデックス・１５・リュ・デュ・ドクトゥール・ルー・２８・パス
 トゥールーテラヴェクティス・ジョイント・ラボ・アンスティテュ・パストゥール

(72)発明者 イングリッド・フェール

フランス・７５７２４・パリ・セデックス・１５・リュ・デュ・ドクトゥール・ルー・２８・パス
 トゥールーテラヴェクティス・ジョイント・ラボ・アンスティテュ・パストゥール

F ターム (参考)

4C076 AA11 AA24 AA29 AA93 BB25 CC06 CC35
 4C084 AA13 MA13 MA16 MA59 NA14 ZB09 ZB33
 4C085 AA03 BA71 CC08 EE01 GG10
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA13 MA16 NA05 ZB09 ZC42
 4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 CA09 CA12 MA43 MA59 NA14
 4H045 AA11 AA30 CA01 DA86 EA31 FA74