



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118829444 A

(43) 申请公布日 2024. 10. 22

(21) 申请号 202380017293.1

(22) 申请日 2023.01.17

(30) 优先权数据

PCT/IB2022/000035 2022.01.17 IB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.07.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2023/051025 2023.01.17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/135333 EN 2023.07.20

(83) 生物保藏信息

CNCM I-5710 2021.07.06

(71) 申请人 巴斯德研究所

地址 法国巴黎

申请人 赛拉福柯蒂斯公司

(72) 发明人 P·沙尔诺 L·玛若莱斯

M·布尔吉内 B·韦辛

J·洛佩斯 I·费特

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 孟凡宏

(51) Int. Cl.

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/215 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

权利要求书3页 说明书29页

序列表(电子公布) 附图22页

(54) 发明名称

用基于慢病毒的鼻疫苗加强SARS-CoV-2免疫

(57) 摘要

本发明涉及针对冠状病毒的免疫领域。在这方面,本发明提供了一种基于慢病毒的免疫原性剂,其适用于受试者,特别是人受试者的加强或靶向免疫治疗,基于:(i) 用第一代针对SARS-CoV-2感染或疾病的疫苗接种,如针对SARS-CoV-2感染或疾病的蛋白、mRNA、腺病毒、灭活病毒或蛋白亚单位疫苗组合物,特别是基于蛋白或mRNA的疫苗,或(ii) SARS-CoV-2诱导的或相关的疾病,所述受试者先前已发展出针对严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)的免疫。因此,本发明涉及基于慢病毒的免疫原性剂,通过触发针对冠状病毒的粘膜体液和细胞免疫应答,包括长期免疫应答,其特别可以帮助克服现有针对SARS-CoV-2疫苗的缺陷,特别是可以有效克服在用现有第一代疫苗如蛋白、mRNA、腺病毒、灭活病毒或蛋白亚单位疫苗,特别是蛋白或mRNA疫苗免疫后观察到的免疫应答减弱或细胞记忆应答不

足。

1. 一种编码严重急性呼吸综合征冠状病毒2 (SARS-CoV-2) 的刺突 (S) 蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒,其用作疫苗方案中的异源加强或靶向免疫剂,所述疫苗方案施用于受试者,特别是人受试者的上呼吸道,所述受试者接受了针对SARS-CoV-2感染或疾病的疫苗组合物的初次免疫,所述疫苗组合物选自由针对SARS-CoV-2感染或疾病的蛋白、mRNA、腺病毒、灭活病毒和蛋白亚单位疫苗组合物组成的组,特别是针对SARS-CoV-2感染或疾病的蛋白或mRNA疫苗组合物。

2. 根据权利要求1所述的用于用途的编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒,其中所述施用是在受试者中作为鼻内粘膜加强或靶向免疫进行的,所述受试者接受了针对SARS-CoV-2感染或疾病的疫苗组合物的初次免疫,所述疫苗组合物选自由针对SARS-CoV-2感染或疾病的蛋白、mRNA、腺病毒、灭活病毒和蛋白亚单位疫苗组合物组成的组,特别是针对SARS-CoV-2感染或疾病的蛋白或mRNA疫苗组合物。

3. 根据权利要求1或2所述的用于用途的编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒,其中:

-所述S蛋白来自对人宿主致病的SARS-CoV-2病毒,特别是 (i) 来自SARS-CoV-2病毒的S蛋白,所述SARS-CoV-2病毒选自由SARS-CoV-2祖先毒株、D614G毒株、Alpha毒株、Beta毒株、Gamma毒株、Delta毒株和Omicron毒株组成的组,优选来自Beta毒株或Omicron毒株,更优选来自Beta毒株,或 (ii) 来自所述祖先毒株、D614G毒株、Alpha毒株、Beta毒株、Gamma毒株、Delta毒株和Omicron毒株的变体的S蛋白,其中所述变体编码具有与SEQ ID NO:1至少90%同一性的氨基酸序列的S蛋白,或

-所述S蛋白是所述祖先毒株、D614G毒株、Alpha毒株、Beta毒株、Gamma毒株、Delta毒株和Omicron毒株之一的天然S蛋白的衍生物,通过突变1至12个、特别是1至6个氨基酸残基,特别是通过取代和/或缺失1至12个、特别是1至6个氨基酸残基,特别地, (a) 是所述S蛋白的稳定化形式,其特征在于参考刺突蛋白的氨基酸序列中SEQ ID NO:1的残基986和987所提供的位置处,在S蛋白的S2结构域中用脯氨酸残基取代两个连续氨基酸残基,或 (b) 是所述S蛋白的融合前形式,其通过缺失位于S蛋白的氨基酸序列中参考SEQ ID NO:1的残基675至残基685的弗林蛋白酶位点,或 (c) 是所述S蛋白的稳定化融合前形式,其通过缺失所述弗林蛋白酶位点并参考SEQ ID NO:1的第986和987位,在S2结构域中用脯氨酸残基取代两个连续氨基酸残基。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的用于用途的编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒,其中所述S蛋白的氨基酸序列是SEQ ID NO:1或是具有与SEQ ID NO:1至少90%同一性的氨基酸序列的其衍生物,并且其中所述SARS-CoV-2的S蛋白的衍生物包含至少五个氨基酸突变,包括 (i) SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第417位赖氨酸残基突变为天冬酰胺残基 (K417N), (ii) SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第484位谷氨酸残基突变为赖氨酸残基 (E484K) 或SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第484位谷氨酸残基突变为丙氨酸残基 (E484A), (iii) SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第501位天冬酰胺残基突变为酪氨酸残基 (N501Y), (iv) SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第986位赖氨酸残基突变为脯氨酸残基 (K986P), 和 (v) SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第987位缬氨酸残基突变为脯氨酸残基 (V987P)。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的用于用途的编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物

的假型慢病毒载体颗粒,其中接受了所述组合物施用的受试者选自(a)先前已接受针对SARS-CoV-2感染或疾病的疫苗组合物的受试者,所述疫苗组合物选自由针对SARS-CoV-2感染或疾病的蛋白、mRNA、腺病毒、灭活病毒和蛋白亚单位疫苗组合物组成的组,特别是作为全身初次免疫和/或加强免疫施用如肌内、皮内或皮下施用,特别是肌内初次免疫和/或加强免疫施用的针对SARS-CoV-2感染或疾病的基于蛋白或mRNA的疫苗,(b)已接受针对SARS-CoV-2感染或疾病的疫苗组合物的全身初次免疫施用如肌内、皮内或皮下施用,特别是肌内初次免疫施用,且然后已从冠状病毒疾病如冠状病毒疾病2019(COVID-19)恢复的受试者,所述疫苗组合物由针对SARS-CoV-2感染或疾病的蛋白、mRNA、腺病毒、灭活病毒和蛋白亚单位疫苗组合物组成的组,特别是针对SARS-CoV-2感染或疾病的基于蛋白或mRNA的疫苗组合物,(c)已首先从冠状病毒疾病如COVID-19恢复,且然后已接受针对SARS-CoV-2感染或疾病的基于蛋白或mRNA的疫苗的全身初次免疫施用如肌内、皮内或皮下施用,特别是肌内施用的受试者,和(d)已接受多于两次,特别是多于三次的针对SARS-CoV-2感染或疾病的基于蛋白或mRNA的疫苗的全身施用如肌内、皮内或皮下施用,特别是肌内施用的受试者。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的用于用途的编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒,其中SARS-CoV-2的所述S蛋白还包含选自以下的氨基酸突变:(vi) SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第446位甘氨酸残基突变为丝氨酸残基(G446S), (vii) SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第478位苏氨酸残基突变为赖氨酸残基(T478K), (viii) SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第493位谷氨酰胺残基突变为精氨酸残基(Q493R), 和 (ix) SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第498位谷氨酰胺残基突变为精氨酸残基(Q498R)。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的用于用途的编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒,其中SARS-CoV-2的经编码的突变S蛋白具有SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:18,优选SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的用于用途的编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒,其中所述假型慢病毒载体颗粒用水泡性口炎病毒糖蛋白G(VSV-G)蛋白假型化。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的用于用途的编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒,其用于引发针对SARS-CoV-2感染或疾病的长期保护性粘膜体液免疫应答和/或长期粘膜细胞免疫应答的初次免疫/加强免疫或靶向免疫方案中,其中所述应答保护受试者的呼吸系统和/或中枢神经系统。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的用于用途的编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒,其中所述假型慢病毒载体颗粒引发针对SARS-CoV-2的CD8⁺T细胞应答。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的用于用途的编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒,其中所述假型慢病毒载体颗粒引发对刺突特异性的肺驻留记忆CD8⁺T细胞(T_{rm})和/或效应CD8⁺T细胞(T_{c1})并产生干扰素-Gamma (IFN- γ)/肿瘤坏死因子(TNF)/白介素-2(IL-2)。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的用于用途的编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒,其中所述假型慢病毒载体颗粒是非整合的、非致细胞病变的和/或非复制的。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的用于用途的编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒, 其中所述受试者从第一次注射针对SARS-CoV-2感染或疾病的疫苗组合物的初始疫苗接种后的第12周开始具有免疫减弱, 所述疫苗组合物选自由针对SARS-CoV-2感染或疾病蛋白、mRNA、腺病毒、灭活病毒和蛋白亚单位疫苗组合物组成的组, 特别是针对SARS-CoV-2感染或疾病或SARS-CoV-2疾病恢复后, 特别是COVID-19恢复后的的基于蛋白或mRNA的疫苗。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的用于用途的编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒, 其中所述假型慢病毒载体颗粒被配制成液体组合物或干粉, 其用于作为鼻内气雾剂、鼻内滴剂或鼻内吹入剂施用。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的用于用途的编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒, 其中所述施用方案包括施用所述假型慢病毒载体颗粒的一种或多种剂型, 其中每种剂型的剂量为 10^7 至 10^9 转导单位(TU)。

16. 一种免疫原性组合物, 其包含编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒和药学上可接受的载体, 其中SARS-CoV-2的所述S蛋白的假型衍生物包含至少9个氨基酸突变, 包括(i) SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第417位赖氨酸残基突变为天冬酰胺残基(K417N), (ii) SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第484位谷氨酸残基突变为丙氨酸残基(E484A), (iii) SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第501位天冬酰胺残基突变为酪氨酸残基(N501Y), (iv) SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第986位赖氨酸残基突变为脯氨酸残基(K986P), (v) SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第987位缬氨酸残基突变为脯氨酸残基(V987P), (vi) SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第446位甘氨酸残基突变为丝氨酸残基(G446S), (vii) SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第478位苏氨酸残基突变为赖氨酸残基(T478K), (viii) SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第493位谷氨酰胺残基突变为精氨酸残基(Q493R), 和(ix) 在SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第498位谷氨酰胺残基突变为精氨酸残基(Q498R)。

17. 根据权利要求16所述的免疫原性组合物, 其中SARS-CoV-2的经编码的突变S蛋白具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

18. 根据权利要求16或17所述的免疫原性组合物, 其被配制用于鼻内施用。

用基于慢病毒的鼻疫苗加强SARS-CoV-2免疫

技术领域

[0001] 本发明涉及针对冠状病毒的免疫领域。在这方面,本发明提供了基于慢病毒的免疫原性剂,其适用于受试者,特别是人受试者的加强或靶向免疫治疗,基于:(i)用第一代针对SARS-CoV-2感染或疾病的疫苗接种,如针对SARS-CoV-2感染或疾病的蛋白、mRNA、腺病毒、灭活病毒或蛋白亚单位疫苗组合物,特别是基于蛋白或mRNA的疫苗,或(ii)SARS-CoV-2诱导的或相关的疾病,所述受试者先前已发展出针对严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)的免疫。因此,本发明涉及基于慢病毒的免疫原性剂,通过触发针对冠状病毒的粘膜体液和细胞免疫应答,包括长期免疫应答,其特别可以帮助克服现有针对SARS-CoV-2疫苗的缺陷,特别是可以有效克服在用现有第一代疫苗如蛋白、mRNA、腺病毒、灭活病毒或蛋白亚单位疫苗,特别是蛋白或mRNA疫苗免疫后观察到的免疫应答减弱或细胞记忆应答不足。

背景技术

[0002] 考虑:(i)冠状病毒疾病2019(COVID-19)的持续大流行,(ii)第一代疫苗针对SARS-CoV-2的保护潜力的减弱,和(iii)新型病毒关注变体(VOC)的不停出现,新型有效疫苗平台对于未来的初次或加强疫苗可能是关键的(全球COVID-19疫苗接种-2022年的战略愿景,世界卫生组织,SAGE会议,2021年10月)。本发明人最近证明了当在多个临床前模型中用于全身初次免疫,接着鼻内(i.n.)加强免疫时,编码来自祖先SARS-CoV-2(LV::S)的刺突糖蛋白的全长序列的慢病毒接种载体(LV)的强大性能(Ku MW,et al.Cell Host Microbe,29(2),236-249e236,2021)。LV::S确保呼吸道针对祖先SARS-CoV-2和VOC的完全(交叉)保护(Ku MW,et al.EMBO Mol Med,e14459,2021)。此外,在新的转基因小鼠中,表达人血管紧张素转化酶2(hACE2)并显示出空前的脑对SARS-CoV-2复制的允许,用LV::S进行i.n.加强免疫是中枢神经系统的完全保护所需的(Ku MW,et al.EMBO Mol Med,e14459,2021)。LV::S旨在用作初级疫苗或加强剂,以增强和扩大针对新出现的具有免疫逃避潜力的VOC的保护(Juno JA,Wheatley AK.Nat Med,27(11),1874-1875,2021)。

[0003] 由第一代COVID-19疫苗赋予的保护的持续时间尚未确定,用血清学实验室测试难以预测,并且在不同个体中和针对不同的VOC是可变的。尽管接种率很高,但目前世界范围大流行病的恶化表明需要反复加强免疫,以确保针对COVID-19的个体和集体免疫。在本文中,必须考虑多个额外同源剂量的第一代COVID-19疫苗的安全性和潜在副作用,例如与对mRNA疫苗中所含的聚乙二醇(PEG)的过敏反应有关(Castells MC,Phillips EJ.N Engl J Med,384(7),643-649,2021)。重要的是,在各种感染性疾病的许多临床前模型中,不匹配的疫苗递送方法,即异源初次免疫-加强免疫形式,已被证明是比同源初次免疫-加强免疫方法更成功的策略(He Q,et al.Emerg Microbes Infect,10(1),629-637,2021;Lu S.Curr Opin Immunol,21(3),346-351,2009;Nordstrom P,et al.Lancet Reg Health Eur,100249,2021)。因此,开发针对COVID-19的异源加强剂特别关注新型有效疫苗接种平台。LV::S疫苗候选物对于针对COVID-19的预防性应用具有严重的潜力,主要是基于其强烈的

诱导能力,不仅是强烈的中和体液应答,而且是强烈的保护性T细胞应答,其不受SARS-CoV-2VOC中积累的逃逸突变的影响(Ku MW,et al.EMBO Mol Med,e14459,2021)。

[0004] 此外,已经观察到,随着第一代疫苗最初诱导的免疫,特别是针对新型VOC的免疫的预防潜力降低,施用额外的疫苗剂量变得至关重要(全球COVID-19疫苗接种-2022年的战略愿景,世界卫生组织,SAGE会议,2021年10月)。作为相同疫苗的额外剂量的替代,在异源初次免疫-加强免疫方案中组合疫苗平台可有希望获得保护功效(Barros-Martins J,et al.Nat Med,27(9),1525-1529,2021)。与同源疫苗剂量施用相比,异源初次免疫-加强免疫策略可更好地增强特异性适应性免疫应答和长期保护,而不触发/增强载体特异性免疫或对疫苗本身或赋形剂的可能反应原性加重的风险。此外,为了诱导最大的中和广度,刺突抗原的序列必须根据SARS-CoV-2VOC出现的动力学而适应。此外,针对症状性SARS-CoV-2感染的保护主要与血清中和活性有关,而针对重度COVID-19的保护涉及CD8⁺T细胞免疫。这些细胞具有细胞溶解病毒感染细胞的能力,特别是控制病毒复制并导致SARS-CoV-2感染的消退(Sette A,Crotty S.Cell,184(4),861-880,2021)。因此,适当的B-和T-细胞疫苗平台,包括适应的刺突序列,在大流行的当前阶段是最感兴趣的。

[0005] 发明人推理LV::S可能非常适于用作异源i.n加强疫苗,以增强和扩大针对SARS-CoV-2的保护,特别是针对已知和新出现的VOC(包括但不限于SARS-CoV-2的Alpha、Beta、Gamma、Delta和Omicron变体),而早期接种的国家中的集体免疫在初始免疫完成后的仅几个月减弱,并且新的感染波正在增加(Juno JA,Wheatley AK.Nat Med,27(11),1874-1875,2021)。

[0006] 用于本发明的LV尤其是非整合性的、非复制性的、非细胞致病性的和可忽略炎性的(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)。这些载体用来自水泡性口炎病毒(VSV-G)的异源糖蛋白假型化,这赋予它们对不同细胞类型,特别包括树突细胞的广泛向性。后者主要是非分裂细胞,因此几乎不允许基因转移。因此,LV具有将基因有效转移到非分裂细胞的细胞核中的核心性质,因此使树突细胞的有效转导成为可能。在这些细胞中产生的内源性抗原表达具有独特的激活天然T细胞的能力(Guermonprez P,et al.J.Int Rev Cell Mol Biol,349,1-54,2019),与LV诱导高质量效应细胞和记忆T细胞的突出能力相关(Ku MW,et al.Commun Biol,4(1),713,2021)。重要的是,VSV-G假型化还避免了LV成为人中预先存在的载体特异性免疫的靶标,这在疫苗开发中是关键性的(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)。在I/IIa期人免疫缺陷病毒-1治疗性疫苗试验(欧盟临床试验登记,2011-006260-52临床试验)中已确定LV在人中的安全性。由于它们的非细胞致病性和非炎性特性(Cousin C,et al.Cell Rep,26(5),1242-1257e1247,2019;Lopez J,et al.An optimized lentiviral vector induces CD4⁺T-cell immunity and predicts a booster vaccine against tuberculosis.in revision),LV非常适合粘膜接种。i.n.施用途具有公认的触发粘膜IgA应答以及呼吸道中驻留记忆B和T淋巴细胞的优点(Lund FE,Randall TD.Science,373(6553),397-399,2021)。在仓鼠和猕猴的临床前模型中,该途径在减少SARS-CoV-2传播方面也显示为最有效(van Doremalen N,et al.Sci Transl Med,13(607),2021)。通过i.n.免疫诱导粘膜免疫允许SARS-CoV-2中和,在其进入主要的可感染的解剖部位之前,直接在

宿主生物体的通道中 (Ku MW, et al. Cell Host Microbe, 29(2), 236-249e236, 2021)。

[0007] 发明概述

[0008] 在本发明中, 发明人产生了编码Beta变体的向下选择 S_{CoV-2} 的LV, 其通过 S_{CoV-2} (LV:: $S_{Beta-2P}$) 的S2结构域中 $K^{986}P$ 和 $V^{987}P$ 取代来稳定。在小鼠中, 用mRNA-1273 (Moderna) 疫苗肌肉内 (i.m.) 初次免疫和加强免疫, 并且其中 (交叉) 血清中和潜力逐渐降低, 本发明人比较了全身和粘膜免疫应答以及i.n.的LV:: $S_{Beta-2P}$ 异源加强免疫与i.m.的mRNA-1273 (Moderna) 同源加强免疫的保护潜力 (Jackson LA, et al. Preliminary Report. N Engl J Med, 383(20), 1920-1931, 2020; Wang F, et al. Med Sci Monit, 26, e924700, 2020)。相对于具有改进抗原设计的先前方案, 本发明人观察到新型疫苗递送LV平台和替代i.n.施用途径的多个优点。

[0009] 根据第一个方面, 本发明因此涉及编码严重急性呼吸综合征冠状病毒2 (SARS-CoV-2) 的刺突 (S) 蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒, 其用作疫苗方案中的异源加强或靶向免疫剂, 所述疫苗方案施用于受试者, 特别是人受试者的上呼吸道, 所述受试者接受了针对SARS-CoV-2感染或疾病的疫苗组合物的初次免疫, 所述疫苗组合物选自针对SARS-CoV-2感染或疾病的蛋白、mRNA、腺病毒、灭活病毒和蛋白亚单位疫苗组合物组成的组, 特别是针对SARS-CoV-2感染或疾病的蛋白或mRNA疫苗组合物。根据本发明的针对SARS-CoV-2感染或疾病的蛋白亚单位疫苗组合物的非限制性实例可以包括基于佐剂化重组刺突蛋白的疫苗或基于包装在纳米颗粒中的重组刺突蛋白的疫苗。

[0010] SARS-CoV-2病毒的刺突 (S) 蛋白在本领域中被完全鉴定为包膜锚定的糖蛋白 (Walls et al, 2020, Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. Cell 181:281-292e286)。更准确地说, SARS-CoV-2S (S_{CoV-2}) 是一种 (180kDa)₃同源三聚体I类病毒融合蛋白, 其与在宿主细胞上表达的羧肽酶血管紧张素转化酶2 (ACE2) 接合。 S_{CoV-2} 蛋白的单体具有胞外结构域、跨膜锚定结构域和短内部尾。 S_{CoV-2} 通过两步依次的蛋白水解切割被激活, 以启动与宿主细胞膜的融合。在导致构象重组的 S_{CoV-2} -ACE2相互作用之后, S_{CoV-2} 的胞外结构域首先在高度特异性弗林蛋白酶682^{RRAR}685 (SEQ ID NO:21) 位点被切割 (Guo et al., 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 et al., 2020), 这是决定病毒病理特征的关键因素, 与普遍存在的弗林蛋白酶表达有关 (Wang et al., 2020A 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)。所得亚单位由以下组成: (i) S1, 其具有ACE2受体结合结构域 (RBD), 与限制于ACE2蛋白酶结构域的原子接触, 并且还具有主要的B细胞表位, 靶向中和抗体 (NAbs) (Walls et al., 2020), 和 (ii) S2, 其具有膜融合元件。与 S_{CoV-1} 一样, S1的脱落使得S2上第二蛋白水解切割位点797^R可接近, 即S2' (Belouzard et al., 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)。根据细胞或组织类型, 一种或多种宿主蛋白酶, 包括弗林蛋白酶、胰蛋白酶、组织蛋白酶或跨膜蛋白酶丝氨酸蛋白酶 (TMPRSS) -2或-4, 可以参与该第二切割步骤

(Coutard et al., 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)。随后S的“融合(fusogenic)”构象变化导致 S_{CoV-2} 的高度稳定的融合后形式,其起始与宿主细胞膜的融合反应(Sternberg and Naujokat, 2020 Structural features of coronavirus SARS-CoV-2 spike protein: Targets for vaccination. *Life Sci* 257, 118056),并导致邻近S2'的融合肽(FP)的暴露。将FP插入宿主细胞/囊泡膜引发融合反应,由此病毒RNA释放到宿主细胞溶质中(Lai et al., 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)。事实上, S_{CoV-2} -ACE2相互作用是唯一的机制,迄今为止被鉴定为宿主细胞被SARS-CoV-2感染,并且RBD含有许多构象B细胞表位(Walls et al., 2020),指定该病毒包膜糖蛋白作为中和抗体(NAbS)的主要靶标。

[0011] 由本发明的慢病毒颗粒表达的S蛋白可以来源于SARS-CoV-2毒株,因此可以通过作为病毒蛋白天然序列的氨基酸序列来表征。在一个具体的实施方案中,本发明使用已知SARS-CoV-2毒株的S蛋白进行,如祖先毒株的S蛋白(其中氨基酸序列是SEQ ID NO:1),或后来发现的变异株,如Alpha毒株、Beta毒株、Gamma毒株、Delta毒株和Omicron毒株(都被认为是彼此的变异株)。

[0012] 或者,本发明可以用S蛋白的衍生物进行,即通过在S蛋白的氨基酸序列中突变获得的天然S蛋白的衍生物,如本文将公开的。为了表达LV::S重组颗粒,编码S蛋白的核酸可以具有存在于起源病毒株中的基因序列,或者可以是适合在哺乳动物细胞,特别是人细胞中表达的密码子优化的核酸。为了表达S蛋白衍生物的LV重组颗粒,编码S蛋白衍生物的核酸可以具有存在于病毒株的S蛋白基因序列推导出的序列,并且可以是适合在哺乳动物细胞中表达的密码子优化的核酸。

[0013] 在一个具体的实施方案中,用于本发明的重组慢病毒颗粒(LV)是基于HIV-1的慢病毒颗粒。因此,当本文使用表述“慢病毒颗粒”或“LV”时,其特别涉及基于HIV-1的慢病毒颗粒,尤其是用VSV-G蛋白假型化的LV颗粒,尤其是实施例中所示的LV。

[0014] 根据本发明,表述“加强”或“加强免疫”或“加强施用”或“靶向免疫”是指在第一次施用异源免疫剂,特别是异源疫苗后,或在第二次或随后施用这种异源免疫剂或疫苗后,施用免疫原性剂。换句话说,根据本发明使用的免疫剂向先前接受初次免疫施用,或初次免疫和另外一次或多次施用剂量的针对相同SARS-CoV-2或其变异株的异源免疫剂或疫苗的受试者施用。加强或靶向免疫是通过对上呼吸道施用实现的,特别是作为鼻内施用,因此区别于第一代针对SARS-CoV-2感染或疾病的疫苗的施用途径,例如针对SARS-CoV-2感染或疾病的蛋白、mRNA、腺病毒、灭活病毒或蛋白亚单位疫苗组合物,特别是最常使用全身施用途径(包括肌内、皮内或皮下施用途径)的蛋白或mRNA疫苗。加强或靶向免疫旨在增强、改善或延长先前产生的免疫应答,并可能扩大这种应答以引发针对多种SARS-CoV-2病毒的交叉中和。应答的改善可能是由于本发明中使用的免疫剂引发粘膜应答以及相应保护,不仅是全身部位,而且是上呼吸道和下呼吸道以及中枢神经系统这些可能没有被针对SARS-CoV-2感染或疾病的异源疫苗成功靶向或保护,所述异源疫苗例如针对SARS-CoV-2感染或疾病的蛋白、mRNA、腺病毒、灭活病毒或蛋白亚单位疫苗组合物,特别是通过全身途径注射的蛋白或

mRNA疫苗。在一个具体的实施方案中,加强免疫施用旨在提高受试者中针对新出现的病毒株的交叉中和免疫应答。在一个具体的实施方案中,加强或靶向免疫可以施用于接受了本文公开的异源免疫剂且已经从感染SARS-CoV-2或与这种感染相关的疾病如COVID-19恢复的受试者。在以下描述中将公开与免疫剂的使用和受试者的治疗过程有关的其它特征。

[0015] 施用于“上呼吸道”包括导致递送至上呼吸道的粘膜内层的任何类型的施用,并且特别包括鼻施用。对上呼吸道的施用包括但不限于气溶胶吸入、鼻滴注、鼻吹入及其所有组合。在一些实施方案中,施用是通过气溶胶吸入。在一些实施方案中,通过鼻滴注施用。在一些实施方案中,通过鼻吹入施用。

[0016] 根据一个具体的实施方案,编码SARS-CoV-2S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒作为鼻内粘膜加强免疫或靶向免疫施用于接受了针对SARS-CoV-2感染或疾病的疫苗组合物的初次免疫施用的受试者,所述疫苗组合物选自针对SARS-CoV-2感染或疾病的蛋白、mRNA、腺病毒、灭活病毒和抗蛋白亚单位疫苗组合物中组成的组,特别是针对SARS-CoV-2感染或疾病的蛋白或mRNA疫苗组合物。

[0017] 根据一个具体的实施方案,本文公开的实施方案使用的编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒的特征还在于以下特征:

[0018] -所述S蛋白来自对人宿主致病的SARS-CoV-2病毒,特别是(i)来自SARS-CoV-2病毒的S蛋白,所述SARS-CoV-2病毒选自SARS-CoV-2祖先毒株、D614G毒株、Alpha毒株、Beta毒株、Gamma毒株、Delta毒株和Omicron毒株组成的组,优选来自Beta毒株或Omicron毒株,更优选来自Beta毒株,或(ii)来自所述祖先毒株、D614G毒株、Alpha毒株、Beta毒株、Gamma毒株、Delta毒株和Omicron毒株的变体的S蛋白,其中所述变体编码具有与SEQ ID NO:1至少90%同一性的氨基酸序列的S蛋白,或

[0019] -所述S蛋白是所述祖先毒株、D614G毒株、Alpha毒株、Beta毒株、Gamma毒株、Delta毒株和Omicron毒株之一的天然S蛋白的衍生物,通过突变1至12个、特别是1至6个氨基酸残基,特别是通过取代和/或缺失1至12个、特别是1至6个氨基酸残基,特别地,(a)是所述S蛋白的稳定化形式,其特征参考S蛋白的氨基酸序列中SEQ ID NO:1的残基986和987所提供的位置处,在S蛋白的S2结构域中用脯氨酸残基取代两个连续氨基酸残基,或(b)是所述S蛋白的融合前形式,其通过缺失位于S蛋白的氨基酸序列中参考SEQ ID NO:1的残基675至残基685的弗林蛋白酶位点,或(c)是所述S蛋白的稳定化融合前形式,其通过缺失所述弗林蛋白酶位点并参考SEQ ID NO:1的第986和987位,在S2结构域中用脯氨酸残基取代两个连续氨基酸残基。

[0020] 在一个具体的实施方案中,SARS-CoV-2的祖先毒株的S蛋白具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列且编码SARS-CoV-2的祖先毒株的S蛋白的多核苷酸的天然序列在SEQ ID NO:2中定义。

[0021] 在另一个具体的实施方案中,编码SARS-CoV-2的D614G毒株的S蛋白的多核苷酸的天然序列包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第614位天冬氨酸残基突变为甘氨酸残基(D614G)、SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第986位赖氨酸残基突变为脯氨酸残基(K986P)和SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第987位缬氨酸残基突变为脯氨酸残基(V987P),即突变2P在SEQ ID NO:3(S_{D614G-2P})中定义。包含所述突变2P的SARS-CoV-2的D614G毒株的S蛋白(S_{D614G-2P})具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0022] 在另一个具体的实施方案中,编码SARS-CoV-2的Alpha毒株的S蛋白的多核苷酸的天然序列包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第986位赖氨酸残基突变为脯氨酸残基 (K986P) 和SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第987位缬氨酸残基突变为脯氨酸残基 (V987P),即突变2P在SEQ ID NO:5 ($S_{\text{Alpha-2P}}$) 中定义。包含所述突变2P的SARS-CoV-2的Alpha毒株的S蛋白 ($S_{\text{Alpha-2P}}$) 具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0023] 在另一个具体的实施方案中,编码SARS-CoV-2的Beta毒株的S蛋白的多核苷酸的天然序列在SEQ ID NO:7 (S_{Beta}) 中定义。SARS-CoV-2的Beta毒株的S蛋白 (S_{Beta}) 具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

[0024] 在另一个具体的实施方案中,编码SARS-CoV-2的Beta毒株的S蛋白的多核苷酸的天然序列包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第986位赖氨酸残基突变为脯氨酸残基 (K986P) 和SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第987位缬氨酸残基突变为脯氨酸残基 (V987P),即突变2P在SEQ ID NO:9 ($S_{\text{Beta-2P}}$) 中定义。包含所述突变2P的SARS-CoV-2的Beta毒株的S蛋白 ($S_{\text{Beta-2P}}$) 具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0025] 在另一个具体的实施方案中,编码SARS-CoV-2的Gamma毒株的S蛋白的多核苷酸的天然序列包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第986位赖氨酸残基突变为脯氨酸残基 (K986P) 和SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第987位缬氨酸残基突变为脯氨酸残基 (V987P),即突变2P在SEQ ID NO:11 ($S_{\text{Gamma-2P}}$) 中定义。包含所述突变2P的SARS-CoV-2的Gamma毒株的S蛋白 ($S_{\text{Gamma-2P}}$) 具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

[0026] 在另一个具体的实施方案中,编码SARS-CoV-2的Delta毒株的S蛋白的多核苷酸的天然序列包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第986位赖氨酸残基突变为脯氨酸残基 (K986P) 和SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第987位缬氨酸残基突变为脯氨酸残基 (V987P),即突变2P在SEQ ID NO:13 ($S_{\text{Delta-2P}}$) 中定义。包含所述突变2P的SARS-CoV-2的Delta毒株的S蛋白 ($S_{\text{Delta-2P}}$) 具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

[0027] 在另一个具体的实施方案中,编码SARS-CoV-2的Omicron毒株的S蛋白的多核苷酸的天然序列在SEQ ID NO:15 (S_{Omicron}) 中定义。SARS-CoV-2的Omicron毒株的S蛋白 (S_{Omicron}) 具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0028] 在另一个具体的实施方案中,编码SARS-CoV-2的Omicron毒株的S蛋白的多核苷酸的天然序列包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第986位赖氨酸残基突变为脯氨酸残基 (K986P) 和SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第987位缬氨酸残基突变为脯氨酸残基 (V987P),即突变2P在SEQ ID NO:17 ($S_{\text{Omicron-2P}}$) 中定义。包含所述突变2P的SARS-CoV-2的Omicron毒株的S蛋白 ($S_{\text{Omicron-2P}}$) 具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

[0029] 在另一个具体的实施方案中,编码SARS-CoV-2的Omicron BA.1毒株的S蛋白的多核苷酸的天然序列在SEQ ID NO:23 ($S_{\text{Omicron-BA.1}}$) 中定义。SARS-CoV-2的Omicron毒株的S蛋白 ($S_{\text{Omicron-BA.1}}$) 具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列。

[0030] 在另一个具体的实施方案中,编码SARS-CoV-2的Omicron BA.4或BA.5毒株的S蛋白的多核苷酸的天然序列在SEQ ID NO:25 ($S_{\text{Omicron-BA.4/5}}$) 中定义。SARS-CoV-2的Omicron BA.4或BA.5毒株的S蛋白 ($S_{\text{Omicron-BA.4/5}}$) 具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[0031] 在另一个具体的实施方案中,编码SARS-CoV-2的祖先毒株的S蛋白的多核苷酸的天然序列包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第986位赖氨酸残基突变为脯氨酸残基 (K986P)

和SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第987位缬氨酸残基突变为脯氨酸残基(V987P),即突变2P在SEQ ID NO:19(S_{2p})中定义。包含所述突变2P的SARS-CoV-2的祖先毒株的S蛋白(S_{2p})具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列。

[0032] 在一个具体的实施方案中,假型慢病毒载体颗粒编码包含突变2P的SARS-CoV-2的Beta毒株的S蛋白(S_{Beta-2p}),其由载体pFlap-ieCMV-S-B351-2P-WPREm编码,所述载体于2021年7月6日以N^oCNCM I-5710保藏于位于法国巴黎塞德克斯15区Docteur Roux街25-28号巴斯德研究所75724(Institut Pasteur,25-28rue du Docteur Roux,75724Paris Cedex 15)的国家微生物菌种保藏中心(COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES,CNCM)。

[0033] 还提供了载体pFlap-ieCMV-S-B351-2P-WPREm(CNCM I-5710)。pFlap-ieCMV-S-B351-2P-WPREm的核苷酸序列在SEQ ID NO:22中定义。

[0034] 还提供了包含载体pFlap-ieCMV-S-B351-2P-WPREm(CNCM I-5710或SEQ ID NO:22)的宿主细胞。

[0035] 还提供了编码包含突变2P(S_{Beta-2p})的SARS-CoV-2的Beta毒株的S蛋白的假型慢病毒载体颗粒,其中所述假型慢病毒载体颗粒通过包括用载体pFlap-ieCMV-S-B351-2P-WPREm(CNCM I-5710或SEQ ID NO:22)共转染宿主细胞的方法制备。

[0036] 在一个具体的实施方案中,根据本文公开的实施方案的用于用途的编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒的特征还在于以下特征:S蛋白的氨基酸序列是SEQ ID NO:1或是具有与SEQ ID NO:1至少90%同一性的氨基酸序列的其衍生物,并且SARS-CoV-2的S蛋白的衍生物包含至少五个氨基酸突变,包括(i)SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第417位赖氨酸残基突变为天冬酰胺残基(K417N), (ii)SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第484位谷氨酸残基突变为赖氨酸残基(E484K)或SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第484位谷氨酸残基突变为丙氨酸残基(E484A), (iii)SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第501位天冬酰胺残基突变为酪氨酸残基(N501Y), (iv)SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第986位赖氨酸残基突变为脯氨酸残基(K986P),和(v)SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第987位缬氨酸残基突变为脯氨酸残基(V987P)。

[0037] 在一个具体的实施方案中,根据本发明的用于用途的编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒如此以使得SARS-CoV-2的S蛋白进一步包含选自以下的氨基酸突变:(vi)SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第446位甘氨酸残基突变为丝氨酸残基(G446S), (vii)SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第478位苏氨酸残基突变为赖氨酸残基(T478K), (viii)SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第493位谷氨酰胺残基突变为精氨酸残基(Q493R),和(ix)SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第498位谷氨酰胺残基突变为精氨酸残基(Q498R)。

[0038] 在一个具体的实施方案中,根据本发明的用于用途的编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒如此以使得SARS-CoV-2的经编码的突变S蛋白具有SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:18,优选SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0039] 在另一个具体的实施方案中,根据本发明的用于用途的编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒如此以使得SARS-CoV-2的经编码的突变S蛋白具有SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[0040] 在一个具体的实施方案中,根据本发明的用于用途的编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒用水泡性口炎病毒糖蛋白G(VSV-G)蛋白假型化。

[0041] 特别地,VSV-G蛋白有利地由印第安纳毒株或新泽西毒株的VS病毒提供。

[0042] 在一个具体的实施方案中,根据本发明的用于用途的编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒如此以使得假型慢病毒载体颗粒是非整合的、非致细胞病变的和非复制的。

[0043] 根据本文公开的本发明的免疫原性剂的用途,在一些实施方案中,免疫原性剂或包含其的组合物用于预防人受试者被SARS-CoV-2感染的方法。在一些实施方案中,免疫原性剂或组合物用于保护处于暴露于SARS-CoV-2或被SARS-CoV-2感染的风险中的人受试者中免受SARS-CoV-2复制的方法。在一些实施方案中,免疫原性组合物用于预防处于暴露于SARS-CoV-2或被SARS-CoV-2感染的风险中的人受试者中与SARS-CoV-2感染相关如COVID-19的症状发展或疾病发展的方法。在一些实施方案中,免疫原性组合物用于预防处于暴露于SARS-CoV-2或被SARS-CoV-2感染的风险中的人受试者中与SARS-CoV-2感染相关的神经学结果的发作的方法。在一些实施方案中,免疫原性组合物用于保护处于暴露于SARS-CoV-2或被SARS-CoV-2感染的风险中的人受试者的中枢神经系统(CNS)的方法。在一些实施方案中,疫苗提供免受SARS-CoV-2感染的保护,特别是杀菌保护。

[0044] 在所公开的方法中使用的这些应用中的任一种中,免疫原性剂或组合物在加强或靶向施用步骤中作为预防性试剂向受试者施用,以有效量施用于上呼吸道以引发针对SARS-CoV-2的免疫应答。

[0045] 在一些实施方案中,所述免疫原性组合物用于保护人受试者免受SARS-CoV-2感染或免受与SARS-CoV-2感染相关的症状或COVID-19疾病的发展的方法,其中所述受试者处于发展肺和/或CNS病理的风险中。特别是人受试者需要免疫保护CNS以防SARS-CoV-2复制,因为他/她患有共生病症,特别是影响CNS的共生病症。

[0046] 在一个具体的实施方案中,将根据本文公开的任何实施方案的用于用途的编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒施用于选自以下的受试者:(a) 先前已接受针对SARS-CoV-2感染或疾病的疫苗组合物的受试者,所述疫苗组合物选自由针对SARS-CoV-2感染或疾病的蛋白、mRNA、腺病毒、灭活病毒和蛋白亚单位疫苗组合物组成的组,特别是作为全身初次免疫和/或加强免疫施用如肌内、皮内或皮下施用,特别是肌内初次免疫和/或加强免疫施用的针对SARS-CoV-2感染或疾病的基于蛋白或mRNA的疫苗,(b) 已接受针对SARS-CoV-2感染或疾病的疫苗组合物的全身初次免疫施用如肌内、皮内或皮下施用,特别是肌内初次免疫施用,且然后已从冠状病毒疾病如冠状病毒疾病2019(COVID-19)恢复的受试者,所述疫苗组合物由针对SARS-CoV-2感染或疾病的蛋白、mRNA、腺病毒、灭活病毒和蛋白亚单位疫苗组合物组成的组,特别是针对SARS-CoV-2感染或疾病的基于蛋白或mRNA的疫苗组合物,(c) 已首先从冠状病毒疾病如COVID-19恢复,且然后已接受针对SARS-CoV-2感染或疾病的基于蛋白或mRNA的疫苗的全身初次免疫施用如肌内、皮内或皮下施用,特别是肌内施用的受试者,和(d) 已接受多于两次,特别是多于三次的针对SARS-CoV-2感染或疾病的基于蛋白或mRNA的疫苗的全身施用如肌内、皮内或皮下施用,特别是肌内施用的受试者。

[0047] 在一个具体的实施方案中,编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载

体颗粒用于引发针对SARS-CoV-2感染或疾病的长期保护性粘膜体液免疫应答和/或长期粘膜细胞免疫应答的初次免疫/加强免疫或靶向免疫方案,其中所述应答保护受试者的呼吸系统和/或CNS。

[0048] 在一个具体的实施方案中,编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒用于免疫方案,其中假型慢病毒载体颗粒引发针对SARS-CoV-2的CD8⁺T细胞应答。

[0049] 在一个具体的实施方案中,编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒用于免疫方案,其中假型慢病毒载体颗粒引发对刺突特异性的肺驻留记忆CD8⁺T细胞 (T_{rm}) 和/或效应CD8⁺T细胞 (T_{c1}) 并产生干扰素-Gamma (IFN-Gamma) /肿瘤坏死因子 (TNF) /白介素-2 (IL-2)。在一个具体的实施方案中,根据本发明的用于用途的编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒用于免疫方案,其中所述受试者从第一次注射针对SARS-CoV-2感染或疾病的疫苗组合物的初始疫苗接种后的第12周开始具有免疫减弱,所述疫苗组合物选自针对SARS-CoV-2感染或疾病蛋白、mRNA、腺病毒、灭活病毒和蛋白亚单位疫苗组合物组成的组,特别是针对SARS-CoV-2感染或疾病或SARS-CoV-2疾病恢复后,特别是COVID-19恢复后的基于蛋白或mRNA的疫苗。

[0050] 在小鼠的临床前结果中,发明人表明在最后一次施用表达刺突抗原的基于mRNA的疫苗后4至5个月,不再有针对SARS-CoV-2的保护性免疫 (Vesin et al., 2022, Mol Ther 30, 2984-2997)。此外,现已充分证明,在最后一次施用表达刺突抗原的基于mRNA的疫苗后的3至10个月,经疫苗接种的个体的血清中中和抗刺突抗体的水平显著降低 (Decru et al., 2022, Front Immunol. 13, 909910)。

[0051] 还广泛证明的是,在免疫系统预暴露于抗原 (包括SARS-CoV-2刺突) 后,在疫苗接种的情况下-无论疫苗接种策略如何-或在感染的情况下,通常在B和T细胞区室中诱导记忆免疫 (Valyi-Nagy et al., 2022, Int J Mol Sci, 23.10.3390)。就目前评估而言,在由疫苗接种或感染诱导的抗刺突免疫的情况下,预计这种记忆免疫平均持续至少一年 (Gallais et al., 2021, EBioMedicine, 71, 103561)。这种记忆免疫是可加强的,至少直到最后一次施用mRNA疫苗后一年。

[0052] 在一个具体的实施方案中,在最后一次与SARS-CoV-2接触或施用针对SARS-CoV-2感染或疾病的疫苗组合物 (选自由针对SARS-CoV-2感染或疾病的蛋白、mRNA、腺病毒、灭活病毒和蛋白亚单位疫苗组合物组成的组,特别是针对SARS-CoV-2感染或疾病的蛋白或mRNA疫苗组合物) 之后,根据本发明的用于用途的编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒在根据本发明的受试者中作为鼻内粘膜加强或靶向免疫施用至少3个月,特别是3至24个月,优选3至12个月。

[0053] 在一个具体的实施方案中,根据本发明的用于用途的编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒被配制成液体组合物或干粉,其用于作为鼻内气雾剂、鼻内滴剂或鼻内吹入剂施用。在一个具体的实施方案中,根据本发明的用于用途的编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒用于免疫方案,其中施用方案包括施用假型慢病毒载体颗粒的一种或多种剂型,其中每种剂型的剂量为10⁷至10⁹转导单位 (TU)。

[0054] 根据另一方面,本发明还涉及一种免疫原性组合物,其包含编码SARS-CoV-2的S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒和药学上可接受的载体,其中SARS-CoV-2的所述S蛋白的假型衍生物包含至少9个氨基酸突变,包括 (i) SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第417位赖

氨酸残基突变为天冬酰胺残基(K417N), (ii) SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第484位谷氨酸残基突变为丙氨酸残基(E484A), (iii) SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第501位天冬酰胺残基突变为酪氨酸残基(N501Y), (iv) SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第986位赖氨酸残基突变为脯氨酸残基(K986P), (v) SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第987位缬氨酸残基突变为脯氨酸残基(V987P), (vi) SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第446位甘氨酸残基突变为丝氨酸残基(G446S), (vii) SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第478位苏氨酸残基突变为赖氨酸残基(T478K), (viii) SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第493位谷氨酰胺残基突变为精氨酸残基(Q493R), 和(ix) 在SEQ ID NO:1的氨基酸序列的第498位谷氨酰胺残基突变为精氨酸残基(Q498R)。

[0055] 这种免疫原性组合物可以是假型慢病毒载体颗粒编码SARS-CoV-2的突变S蛋白, 其氨基酸序列是SEQ ID NO:18。

[0056] 根据另一个实施方案, 所述免疫原性组合物可以是假型慢病毒载体颗粒编码SARS-CoV-2的突变S蛋白, 其氨基酸序列是SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:26。

[0057] 根据另一个实施方案, 免疫原性组合物被配制用于如本文实施方案所公开的鼻内施用。

[0058] 本发明还涉及适用于实践本文公开的用途或方法的试剂盒。在一些实施方案中, 试剂盒包括用于向受试者的上呼吸道施用根据本公开的编码SARS-CoV-2S蛋白或其衍生物的假型慢病毒载体颗粒的剂型, 和应用器。在一些实施方案中, 应用器是用于气溶胶吸入的应用器。在一些实施方案中, 应用器是用于鼻滴注的应用器。在一些实施方案中, 应用器是用于鼻吹入的应用器。每一个的合适实例在本领域中是已知的并且可以使用。

[0059] 重组LV颗粒的制备是本领域已知的, 包括获得非整合的、非复制的重组LV颗粒。特别参考Ku MW, et al. Cell Host Microbe, 29(2), 236-249e236, 2021; Ku MW et al, EMBO Mol Med, e14459, 2021, Ku MW, Charneau P, Majlessi L. Expert Rev Vaccines, 1-16, 2021 所公开的。多核苷酸构建体可与编码所选刺突蛋白或其衍生物的序列相适应。

[0060] 在一些实施方案中, 慢病毒载体颗粒包含HIV-1Gag和Pol蛋白。在一些实施方案中, 慢病毒载体颗粒包含亚型D, 尤其是HIV-1_{NDK}、Gag和Pol蛋白。

[0061] 根据一些实施方案, 慢病毒载体颗粒在用DNA质粒转化的宿主细胞中获得。

[0062] 这种DNA质粒可以包含:

[0063] -细菌复制起点(例如:pUC ori);

[0064] -抗生素抗性基因(例如:Amp^r或Kan^r) 用于选择; 并且更特别地:

[0065] -慢病毒载体, 其包含至少一种编码SARS-CoV-2S蛋白或其衍生物的核酸, 所述核酸与启动子例如CMV启动子转录连接。

[0066] 这种方法允许产生根据本发明的用于用途的重组载体颗粒, 包括以下步骤:

[0067] i) 用慢病毒载体转染合适的宿主细胞;

[0068] ii) 用包装质粒载体转染所述宿主细胞, 其包含至少编码逆转录病毒(优选慢病毒)的结构和聚合酶(+整合酶)活性的病毒DNA序列; 这种包装质粒在本领域有描述(Dull et al., 1998, J Virol, 72(11):8463-71; Zufferey et al., 1998, J Virol 72(12):9873-80);

[0069] iii) 培养所述转染的宿主细胞以获得表达并将所述慢病毒载体包装为慢病毒载

体颗粒;以及

[0070] iv) 收获在所述培养的宿主细胞中由步骤iii) 的表达和包装产生的慢病毒载体颗粒。

[0071] 合适的宿主细胞优选为人培养细胞系,例如HEK细胞系,如HEK293T系。

[0072] 或者,用于产生载体颗粒的方法在宿主细胞中进行,所述宿主细胞的基因组已用以下组分中的一种或多种稳定转化:慢病毒载体DNA序列、包装基因和包膜基因。这种DNA序列可被认为与根据本发明的前病毒载体相似,其包含额外的启动子以允许载体序列的转录并提高颗粒生产率。

[0073] 在一个优选的实施方案中,宿主细胞被进一步修饰以能够在培养基中以连续方式产生病毒颗粒,而不使整个细胞膨胀或死亡。关于用于产生病毒颗粒的这种技术,可以参考Strang et al.,2005,J Virol79(3):1165-71;Relander et al.,2005,Mol Ther 11(3):452-9;Stewart et al.,2009,Gene Ther,16(6):805-14;和Stuart et al.,2011,Hum gene Ther。

[0074] 慢病毒颗粒载体可包含如前定义的以下元件:

[0075] -cPPT/CTS多核苷酸序列;以及

[0076] -编码在 $\beta 2m$ 或主要组织相容性复合体I型(MHC-I)启动子控制下的CAR的核酸,和任选地上述额外元件之一。

[0077] 本发明的其它特征和优点将从下面的实施例中变得明显,并且也将在附图中示出。

附图说明

[0078] 图1:具有诱导交叉血清中和抗体的最高潜力的 S_{CoV-2} 变体的向下选择。(A) 用LV:: S_{Alpha} 、LV:: S_{Beta} 或LV:: S_{Gamma} 初次免疫-加强免疫接种时间表和C57BL/6小鼠中(交叉)血清中和测定(n=4-5只/组)。(B) 在加强免疫之前和之后,针对携带来自D614G、Alpha、Beta或Gamma变体的 S_{CoV-2} 的假病毒评价来自接种小鼠的血清的中和活性的半最大有效浓度(EC50)。(C) 来自C57BL/6小鼠的血清的EC50,按照(A)中详述的方案用编码 S_{D614G} 的LV接种,所述LV是WT或在S2结构域中携带 $K^{986}P-V^{987}P$ 取代。如(B)所示,在加强免疫之前和之后评估EC50。

[0079] 图2:进一步用LV:: $S_{Beta-2P}$ 鼻内加强免疫的mRNA-1273-接种的小鼠中的抗 S_{CoV-2} 体液应答。(A) C57BL/6小鼠中mRNA-1273经肌肉(i.m.)-i.m.初次免疫-加强免疫接种的时间线,所述小鼠随后通过递增剂量的LV:: $S_{Beta-2P}$ 经i.n.免疫(n=4-5只/组)和(交叉)血清中和随访。(B) 在指定时间点测定的针对携带来自D614G、Alpha、Beta、Gamma、Delta或Delta+变体的 S_{CoV-2} 的假病毒的血清EC50。(C) 晚期LV:: $S_{Beta-2P}$ 经i.n.或mRNA-1273(Moderna)经i.m.加强免疫后两周的血清中的抗 S_{CoV-2} IgG或IgA。通过Mann-Whitney检验测定统计学显著性(*=p<0.05,**=p<0.01,***=p<0.001)。

[0080] 图3:进一步用LV:: $S_{Beta-2P}$ 鼻内加强免疫的mRNA-1273-接种的小鼠中的肺驻留记忆B细胞亚群。小鼠是图2中详述的那些。LV:: $S_{Beta-2P}$ 经i.n.加强免疫后两周研究粘膜免疫细胞。(A) 检测肺B驻留记忆细胞的细胞计数门控策略,和(B) 各组中表面IgM/IgD B细胞中Brm的百分比。

[0081] 图4:进一步用LV::S_{Beta-2P}鼻内加强免疫的mRNA-1273-接种的小鼠中对S_{CoV-2}的全身性CD8⁺T-细胞应答。小鼠是图2中详述的那些。在C57BL/6(H-2^b)小鼠中,通过用涵盖S_{CoV-2}MHC-I-限制性表位的S:256-275、S:536-550或S:576-590合成的15聚体肽刺激后通过IFN- γ ELISPOT,在LV::S_{Beta-2P}经i.n.加强免疫后两周评价T-脾细胞应答。通过Mann-Whitney检验评价统计学显著性(*=p<0.05)。

[0082] 图5:进一步用LV::S_{Beta-2P}鼻内加强免疫的mRNA-1273-接种的小鼠中对S_{CoV-2}的粘膜CD8⁺T-细胞应答。小鼠是图2中详述的那些。(A)用S:256-275、S:536-550或S:576-590肽库体外刺激后通过细胞内细胞因子染色(ICS)检测的肺CD8⁺T细胞的代表性IFN- γ 应答。在活的CD45⁺CD8⁺T细胞上门控细胞。

[0083] 图6.进一步用LV::S_{Beta-2P}鼻内加强免疫的mRNA-1273-接种的小鼠中的肺驻留记忆T细胞亚群。小鼠是图2和3中详述的那些。LV::S_{Beta-2P}经i.n.加强免疫后两周研究粘膜免疫细胞。(A)检测肺CD8⁺T驻留记忆细胞(Trm,CD44⁺CD62L⁻CD69⁺CD103⁺)的细胞计数门控策略,和(B)各组中CD8⁺CD44⁺T细胞中Trm的百分比。

[0084] 图7.mRNA-1273-初次免疫和加强免疫小鼠的晚期LV::S_{Beta-2P}加强免疫的完全保护潜力。(A)C57BL/6小鼠中mRNA-1273经i.m.-i.m.初次免疫-加强免疫接种的时间线,所述小鼠随后用1 $\times$ 10⁸TU/小鼠的次优剂量的LV::S_{Beta-2P}经i.n.免疫(n=4-5只/组),用Ad5::hACE-2经i.n.预处理4天,然后用0.3 $\times$ 10⁵TCID₅₀(50%的组织培养感染剂量)的SARS-CoV-2Delta变体攻击。(B)用Ad5::hACE-2经i.n.预处理的同组小鼠的肺中hACE-2mRNA的比较定量。(C)通过常规E_{CoV-2}-特异性(顶部)或亚基因组Esg-特异性(底部)qRT-PCR在感染后第3天评价病毒RNA含量。底线表示检测限。通过Mann-Whitney检验评价统计学显著性(*=p<0.05,**=p<0.01)。

[0085] 图8.进一步用LV::S_{Beta-2P}鼻内加强免疫的mRNA-1273-接种的小鼠中的抗S_{CoV-2}体液应答。(A)最初用mRNA-1273经i.m.初次免疫和加强免疫的小鼠血清中的抗S_{CoV-2}(左)和抗RBD(右)IgG的随访。(B)在最初用mRNA-1273经i.m.初次免疫和加强免疫后用mRNA-1273经i.m.第三剂量或LV::S_{Beta-2P}经i.n.加强免疫的小鼠的总肺提取物中的抗S_{CoV-2}IgG(顶部)、抗RBD IgG(中间)和抗S_{CoV-2}IgA(底部)。

[0086] 图9.进一步用LV::S_{Beta-2P}鼻内加强免疫的mRNA-1273-接种的小鼠中不存在对S_{CoV-2}的粘膜CD8⁺Tc2应答。小鼠是图2中详述的那些。用S:256-275、S:536-550或S:576-590肽库体外刺激后,肺CD8⁺T细胞不产生IL-4、IL-5、IL-10和IL-13,通过与用于检测IFN- γ /TNF/IL-2的测定平行的ICS来研究(参见图5)。在活的CD45⁺CD8⁺T细胞上门控细胞。

[0087] 图10.用于产生编码(A)S_{D614G-2P}、(B)S_{Alpha-2P}、(C)S_{Gamma-2P}、(D)S_{Delta-2P}、(E)S_{Beta-2P}和(F)S_{Omicron-2P}抗原的LV的质粒图谱。

[0088] 图11.来自(A)Omicron BA.1(顶部)或(B)Omicron BA4/5(底部)亚变体的刺突的氨基酸序列。粗体和下划线表示的序列是H-2^b小鼠中的鼠MHC-I-限制的T-细胞表位(Ku MW, et al.EMBO Mol Med,e14459,2021)。灰色突出显示的序列是在HHD-DR1 MHC-人源化小鼠中鉴定的MHC-I或-II-限制的人T-细胞表位。

[0089] 图12.用各种LV::S经i.m.免疫的仓鼠的体液免疫。(A)编码来自祖先WA1或Beta SARS-CoV-2毒株的S_{CoV-2}蛋白的LV的示意图。在人PCMVie启动子;RRE,rev响应元件;cPPT,中央多嘌呤区的控制下将编码S_{CoV-2}的密码子优化序列克隆到pFLAP慢病毒载体质粒中。LV::

S_{WA1} 包括 S_{CoV-2} 的整个序列。标明RBD、S1/S2、S2'切割位点、涵盖SEQ ID NO:27的RRAR弗林蛋白酶切割位点的675^{QTQNSPRRAR}685序列,以及K⁹⁸⁶P,V⁹⁸⁷P,K⁴¹⁷N,E⁴⁸⁴K和N⁵⁰¹Y取代。(B) 蛋白免疫印迹分析检测LV转导的293T细胞中 S_{WA1} 、 S_{WA1-2P} 、 $S_{WA1-\Delta F-2P}$ 和 $S_{Beta2-P}$ 的表达。使用抗S2兔多克隆抗体在非还原条件下分析总细胞裂解物。包括LV::GFP作为阴性对照。标明全长刺突(S)和S2亚基。(C) 用 1×10^8 TU的LV:: S_{WA1} 、LV:: S_{WA1-2P} 、LV:: $S_{WA1-\Delta F-2P}$ 或LV:: $S_{Beta2-P}$ 经i.m.免疫叙利亚金仓鼠($n=4$ 只/组)。5周后,通过ELISA测定以平均终点稀释滴度表示的血清抗- S_{WA1} 应答。误差条代表平均值的标准误差(SEM)。差异的统计学显著性通过Kruskal-Wallis检验,随后通过Dunn's多重比较检验确定,并且发现不显著。虚线表示检测限(LOD)。

[0090] 图13. LV::S施用后的仓鼠的体液免疫。(A) 仓鼠中LV::S初次免疫-加强免疫接种方案和WA1 SARS-CoV-2攻击($n=6$ 只/组)的时间线。(B) 通过ELISA测定将血清抗- S_{WA1} 或-RBD_{WA1} IgG应答表示为平均终点稀释滴度。(C) 在WA1 SARS-CoV-2攻击前采集的血清的中和活性(EC50)或在感染后第4天采集的肺匀浆的中和活性(EC50)通过使用携带来自D614G SARS-CoV-2变体的 S_{CoV-2} 的假病毒来测定。数据表示为平均值 $\pm$ SEM。星号表示组间差异的显著性。p值通过使用Kruskal-Wallis检验,随后通过Dunn's多重比较检验确定;* $p<0.05$,** $p<0.01$ 。仅显示了显著差异。虚线表示LOD。

[0091] 图14. 单次i.n.的LV::S注射完全保护仓鼠免受WA1 SARS-CoV-2。仓鼠是在图13的图例中描述的那些。(A) 在感染后第4天通过总E(左)或Esg qRT-PCR(右)定量肺病毒载量。条代表几何平均值。(B) LV::S-或LV ctrl接种的仓鼠在感染后第4天的重量减轻百分比。(C) 攻击后肺组织中炎性细胞因子的表达。热图概括了LV::S接种或LV ctrl施用的个体中炎症相关介质表达的相对log₂倍变化,如通过使用从总肺匀浆中提取的RNA在感染后第4天分析,并相对于来自未处理对照的样品进行标准化。在热图中显示了每组6只单独的仓鼠。通过Kruskal-Wallis检验,随后通过Dunn's多重比较检验确定LV::S和LV ctrl组之间的统计学差异,并用星号表示;* $p<0.05$;** $p<0.01$;*** $p<0.001$ 。在接种组和LV ctrl之间进行比较。

[0092] 图15. 单次i.n.的LV::S注射大幅降低了肺组织病理学。(A) 在感染后第4天研究的肺组织学H&E分析。热图概括组织学评分,用于:1) 炎症评分和2) 间质综合征。(B) 代表性肺泡-间质综合征和(C) LV ctrl注射和感染的仓鼠的严重炎症。此处的器官结构大部分被闭塞,同时可以看到肺泡腔和细支气管腔的残余物。(D-F) LV ctrl免疫的动物的支气管病变。所示为支气管腔中的上皮细胞和细胞碎片(黑色箭头)(D),支气管上皮乳头状突起进入腔中(星形)(E)和上皮消失的变性病变(绿色箭头)(F)。(G) 接种的仓鼠的轻度肺泡浸润。一些肺泡(箭头)部分或完全充满细胞和嗜酸性渗出液。(H) 在SARS-CoV-2感染的仓鼠的肺上进行的代表性N_{CoV-2}特异性IHC成像。下图显示了上图的放大视图。上图的比例尺为1mm,并且下图的比例尺为25 μ m。

[0093] 图16. 通过i.n.施用单次或加强剂量的LV:: $S_{Beta-2P}$ 降低肺和鼻甲的SARSCoV-2omicron感染性病毒。(A) 单次或初次免疫-加强免疫接种和Omicron SARS-CoV-2攻击的时间线。用 1×10^8 TU的LV:: $S_{Beta-2P}$ 经初次免疫i.n.或i.m.仓鼠($n=4-5$ 只/组)。三周后,用同样量的LV:: $S_{Beta-2P}$ 或LV ctrl经i.n.加强免疫它们中的一些。在第3周和第7周收集血清样品用于血清学分析。(B) 血清或抗- $S_{Omicron}$ (上图)或-RBD_{Omicron}(下图) IgG应答,表示为平均终点稀释滴度,通过ELISA测定。数据表示为平均值 $\pm$ SEM。LV:: $S_{Beta-2P}$ -或LV ctrl接种的仓鼠在

攻击后 (C) 和感染后第4天 (D) 的重量减轻百分比。通过Esg qRT-PCR在感染后第4天定量 (E) 肺和 (F) NT病毒载量。条代表几何平均值。通过Kruskal-Wallis检验, 随后通过Dunn's多重比较检验确定统计学差异, 并用星号表示。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$ 。虚线表示LOD。

[0094] 图17. 在SARS-CoV-2感染的仓鼠的肺上进行的NCoV-2抗原的免疫检测。仓鼠是图16中描述的那些。(A) 每种接种方案的一个实例以低放大倍数显示。实线箭头表示炎性浸润灶, 并且虚线箭头表示即使在该低放大倍数下免疫检测信号也可辨别的区域。(B) 特写视图描述了炎性病灶 (底部) 内的病毒抗原 (棕色) 的浓度, 而没有或几乎没有炎症的区域 (顶部) 仅显示很少的染色。

[0095] 图18. 通过LV::S_{WAI-2P}或LV::S_{Beta-2P}初次免疫 (i.m.) -LV::S_{Beta-2P}加强免疫 (i.n.) 接种的仓鼠的强烈体液应答。(A) 初次免疫-加强免疫接种的时间表。用 1×10^8 TU的LV::S_{WAI-2P}或LV::S_{Beta-2P}经i.m.初次免疫仓鼠 (n=4只/组)。5周后, 用同样量LV::S_{Beta-2P}经i.n.加强免疫仓鼠。(B) 血清抗-S_{WAI}或-RBD_{WAI} (左图) 或抗-S_{Omicron}或-RBD_{Omicron} (右图) IgG应答, 表示为平均终点稀释滴度 $\pm$ SEM, 通过ELISA测定。统计差异用星号表示。 $*p<0.05$ 。

[0096] 图19. 通过LV::S初次免疫 (i.m.) -LV::S_{Beta-2P}加强免疫 (i.n.) 接种的仓鼠的抗S_{CoV-2}抗体印记。仓鼠是在图18的图例中描述的那些。(A-C) 通过使用携带来自D614G、Alpha、Beta、Gamma、Delta或Omicron变体的S_{CoV-2}的假病毒测定的EC50。血清中初次免疫后5周的EC50 (A) 或血清中加强免疫后2周的EC50 (B) 和肺匀浆的EC50 (C)。数据表示为几何平均EC50。使用双因素ANOVA, 随后Sidak's多重比较检验分析统计显著性; $**p<0.01$; $****p<0.0001$ 。虚线表示检测限 (LOD)。

[0097] 图20. 在初次免疫 (i.m.) 加强免疫 (i.n.) 方案中使用LV::S_{Beta-2P}免受Omicron变体的完全保护能力。(A) 在B6.K18-hACE2^{IP-THV}转基因小鼠中 (n=5只/组) 用 0.3×10^5 TCID₅₀的SARS-CoV-2micron变体初次免疫-加强免疫接种和i.n.攻击的时间表。(B) 在感染后第5天通过亚基因组Esg特异性qRT-PCR评估肺病毒RNA含量。底线表示检测限。通过Mann-Whitney检验评价统计学显著性 ($*=p<0.05$, $**=p<0.01$)。

[0098] 发明详述

[0099] 基于LV的策略是高产的, 不仅在诱导体液应答中, 而且特别是在建立高质量和记忆T-细胞应答中 (Ku MW, et al. Commun Biol, 4 (1), 713, 2021), 其是用于异源加强免疫的有利平台, 即使其自身作为主要的COVID-19疫苗候选物也是非常有效的 (Ku MW, et al. Cell Host Microbe, 29 (2), 236-249e236, 2021; Ku MW, et al. EMBO Mol Med, e14459, 2021)。此外, 且重要的是, LV是非细胞致病性的、非复制性的并且几乎不是炎性的, 因此可以用于进行非侵入性的i.n.加强免疫, 以有效地诱导杀菌粘膜免疫从而保护呼吸系统以及CNS (Ku MW, et al. Cell Host Microbe, 29 (2), 236-249e236, 2021; Ku MW, et al. EMBO Mol Med, e14459, 2021)。若干团队已表明i.n.途径接种是降低鼻拭子和鼻嗅觉神经上皮中病毒含量的最有效途径 (Bricker TL, Cell Rep, 36 (3), 109400, 2021; Hassan AO, et al. Cell Rep Med, 2 (4), 100230, 2021)。因此, 本发明人假设i.n.接种可以有效地阻断/减少SARS-CoV-2传播的呼吸链。

[0100] 基于LV的免疫的另一个主要优点是诱导强烈的T细胞免疫应答, 其具有来自不同VOC的刺突的T细胞表位的高交叉反应性。因此, 当中和抗体失效或减弱时, T细胞臂保持大部分保护性, 如本发明人最近在抗体缺乏、B细胞受损的 μ MT KO小鼠中所描述的 (Ku MW, et

al.EMBO Mol Med,e14459,2021)。尽管在新出现的VOC的刺突中积累了突变,这个特性与针对多个保守T细胞表位诱导的高质量 and 长期的T细胞免疫有关(Ku MW,et al.EMBO Mol Med,e14459,2021)。

[0101] 在本发明中,发明人首先向下选择 S_{Beta} 抗原,其诱导针对VOC的最大中和广度,并设计编码该抗原的稳定化形式的非整合LV。在具有减弱(交叉)血清中和能力的mRNA-1273-初次免疫和-加强免疫小鼠中,本发明人在i.n.加强免疫中使用递增剂量的LV:: $S_{\text{Beta-2P}}$ 。本发明人证明了抗 $S_{\text{CoV-2}}$ IgG和IgA滴度的剂量依赖性增加,以及针对VOC的血清和肺匀浆中的变广的血清中和潜力。用第三剂量的mRNA-1273经i.m.注射的小鼠的肺中没有检测到抗 $S_{\text{CoV-2}}$ IgA。在这些小鼠中,以剂量依赖性方式检测到具有 $CD38^+CD73^+CD62L^+CD69^+CD80^+$ 表型的肺表面IgM/D⁺B细胞的比例增加,其与驻留记忆特征相关。在通过i.m.接受额外mRNA-1273剂量的B细胞亚群的对应物中没有检测到这种增加。

[0102] 在最初mRNA-1273-初次免疫和加强免疫,且接受晚期i.n.的LV:: $S_{\text{Beta-2P}}$ 加强免疫的小鼠中大量检测到刺突特异性效应肺 $CD8^+Tc1$ 细胞。这些肺 $CD8^+$ T细胞不显示Tc2表型。仅在LV:: $S_{\text{Beta-2P}}$ 经i.n.加强免疫的小鼠中以剂量依赖性方式检测到肺 $CD8^+CD44^+CD69^+CD103^+$ Trm的比例增加,但在用mRNA-1273经i.m.加强免疫的它们的对应物中没有检测到。在初始mRNA-1273-初次免疫和加强免疫的小鼠中用 1×10^8 或 1×10^9 TU的LV:: $S_{\text{Beta-2P}}$ 经i.n.加强免疫也增加了针对 $S_{\text{CoV-2}}$ 的各种免疫原性区域的全身性 $CD8^+$ T细胞应答。最高i.n.剂量的LV:: $S_{\text{Beta-2P}}$ 与额外i.m.剂量的mRNA-1273相当。LV:: $S_{\text{Beta-2P}}$ 的i.n.施用对全身T细胞免疫具有加强免疫作用的事实代表了这种接种方案的另一个优点。

[0103] 用mRNA-1273初次免疫和加强免疫而没有额外加强免疫的小鼠的肺的保护潜力的评价显示,在第一次注射mRNA-1273后20周,没有可检测的免受SARS-CoV-2的Delta变体的保护能力剩余。在这些小鼠中,次优剂量的i.n.加强注射,即 1×10^8 TU的LV:: $S_{\text{Beta-2P}}$ 完全抑制肺中的SARS-CoV-2复制。第三次晚期mRNA-1273的i.m.加强注射以相似的方式降低了肺中SARS-CoV-2RNA含量,但没有完全抑制所有小鼠中的病毒复制。

[0104] 对mRNA-1273初次免疫-加强免疫后4个月缺乏免受Delta变体的保护潜力可以通过以下假设来解释:适应性免疫记忆可能位于次级淋巴器官中,即远离呼吸道的远解剖位点。在本文中,新型VOC如Delta和Omicron变体在感染部位的特别快速的复制将不允许足够的时间用于免疫记忆的再活化和足够早地防止局部粘膜感染、复制和病毒传播。

[0105] 在本发明中,发明人提供了许多证据表明LV:: $S_{\text{Beta-2P}}$ 经i.n.加强免疫可用于诱导强烈的全身和粘膜适应性免疫,以扩大保护性应答的特异性。LV:: $S_{\text{Beta-2P}}$ 经i.n.加强免疫增强了强度,拓宽了VOC交叉识别,并且将B细胞和T细胞免疫应答靶向SARS-CoV-2的主要进入点至宿主机体的粘膜呼吸,并且避免主要解剖部位的感染。I/IIa期临床试验目前准备用于在先前接种的人中或在COVID-恢复期患者中通过LV:: $S_{\text{Beta-2P}}$ 经i.n.加强免疫。

[0106] 本发明人证实,B细胞非依赖性和抗原特异性T细胞免疫在LV介导的免受SARS-CoV-2感染的保护中发挥主要作用(Ku MW,et al.EMBO Mol Med,e14459,2021)。这与通过LV:: $S_{\text{Beta-2P}}$ 诱导的在接种的小鼠中可检测到全身水平和肺中的强T细胞应答一致(Vesin, B.,etal.Mol Ther 30,2984-2997,2022)。重要的是,在祖先 $S_{\text{CoV-2}}$ 序列上鉴定并包括在 $S_{\text{Beta-2P}}$ 中的所有或绝大多数鼠和人T细胞表位在来自新出现的变体(包括Omicron BA.1和BA.4/5亚变体)的突变刺突中保守(图11)。

[0107] 这些观察结果表明表达SARS-CoV-2的刺突蛋白的LV能力强,尤其是LV:S_{Beta-2P}通过引起强烈的T-细胞应答诱导免疫不仅是祖先而且免疫最近出现的SARS-CoV-2变体的完全保护。

[0108] 与作为中和抗体靶的B-细胞表位相反,迄今鉴定的T-细胞表位未受新出现变体的SCoV-2中累积的突变影响或几乎不受影响(图11)。

[0109] 这一观察结果说明了为什么诱导强T细胞免疫的LV平台具有免疫新出现的变体的不变和完全的保护能力。

[0110] 材料和方法

[0111] 小鼠免疫接种和SARS-CoV-2感染

[0112] 雌性C57BL/6JRj小鼠购自Janvier(Le Genest Saint Isle,法国),在巴斯德研究所的动物设施中在特定的无病原体条件下圈养在单独通风的笼中,并在7周龄时使用。用1μg/小鼠的mRNA-1273(Moderna)疫苗经i.m.免疫小鼠。对于LV的i.n.注射,通过氯胺酮(Imalgene,80255mg/kg)和盐酸二甲苯胺噻嗪(Rompun,5mg/kg)的i.p.注射麻醉小鼠。对于免疫SARS-CoV-2的保护实验,将小鼠转移到隔离器的过滤笼中。在SARS-CoV-2接种前4天,用 3×10^8 IGU的如前所述的Ad5:hACE2预处理小鼠(Ku MW,et al.Cell Host Microbe,29(2),236-249e236,2021)。然后将小鼠转移到3级生物安全柜中并用 0.3×10^5 TCID₅₀的包含在20μl中的Delta SARS-CoV-2临床分离株(Lescure FX,et al.Lancet Infect Dis,20(6),697-706,2020)经i.n.接种。然后将小鼠圈养在3级生物安全动物设施的隔离器的过滤笼中。根据这些机构批准的标准程序操作从感染动物回收的器官。

[0113] 动物实验的伦理批准。

[0114] 根据欧洲和法国指南(1987年10月19日的指令86/609/CEE和法令87-848)进行动物实验,随后获得巴斯德研究所安全、动物护理和使用委员会的批准,由当地伦理委员会(CETEA#DAP 20007,CETEA#DAP200058和高等教育和研究部APAFIS#24627-2020031117362508v1,APAFIS#28755-2020122110238379v1)提供的方案协议。

[0115] 疫苗LV的构建和生产

[0116] 首先,合成来自祖先、D614G、Alpha、Beta或Gamma VOC的刺突的密码子优化序列并将其插入pMK-RQ_S-2019-nCoV_S501YV2质粒。然后通过BamHI/XhoI消化提取S序列,连接到pFlap慢病毒质粒的BamHI和XhoI限制性位点之间,其位于天然人ieCMV启动子和土拨鼠转录后调控元件(WPRE)序列的突变的atg起始密码子之间(参见质粒图谱,图10)。为了在S_{D614G}或S_{Beta}中引入K⁹⁸⁶P-V⁹⁸⁷P“2P”双突变,通过使用Takara In-Fusion试剂盒在相应的pFlap质粒上进行定向诱变。扩增各种pFlap-ieCMV-S-WPREm或pFlap-ieCMV-S_{2P}-WPREm质粒,并用于产生非整合型疫苗LV,如别处所述(Ku MW,et al.Cell Host Microbe,29(2),236-249e236,2021;Ku MW,Charneau P,Majlessi L.Expert Rev Vaccines,1-16,2021)。

[0117] 体液和全身T细胞免疫分析

[0118] 使用用于包被的重组稳定的S_{CoV-2}或RBD片段,通过ELISA测定抗S_{CoV-2}IgG和IgA抗体滴度。通过使用来自不同变体的S_{CoV-2}假型化的慢病毒颗粒来定量澄清和去补体的血清或肺匀浆的中和潜力,如先前所述(Ku MW,et al.Cell Host Microbe,29(2),236-249e236,2021;Sterlin D,et al.Sci Transl Med,13(577),2021)。

[0119] 在H-2^d小鼠中,用含有S_{CoV-2}MHC-I-限制的表位的S:256-275、S:536-550或S:576-

590合成的15聚体肽体外刺激后,通过IFN- γ ELISPOT定量T脾细胞应答(Ku MW,et al.Cell Host Microbe,29(2),236-249e236,2021)。使用CTL Immunocapture 7.0.8.1程序在CTL Immunospot S6 ultimate-V分析仪中定量斑点。

[0120] 肺免疫细胞的表型和功能细胞计量学分析

[0121] 肺免疫细胞的富集和染色如别处所述述的进行(Ku MW,et al.Cell Host Microbe,29(2),236-249e236,2021;Ku MW,et al.EMBO Mol Med,e14459,2021)。用400U/ml IV型胶原酶和DNaseI(Roche)处理后,在37°C孵育30分钟,并使用GentleMacs(Miltenyi Biotec)匀浆。然后将细胞悬液通过100 μ m-孔过滤器过滤,以1200rpm离心,并在室温下不使用捣碎机以3000rpm离心20分钟后在Ficoll梯度上富集。将回收的细胞与载有A、B、C肽库(各1 μ g/ml)或阴性对照肽(x290 μ g/ml)的同基因骨髓来源的树突细胞共培养。使用以下混合物检测肺Tc1细胞:用于表面染色的PerCP-Cy5.5-抗-CD3(45-0031-82,eBioScience)、eF450-抗-CD4(48-0042-82,eBioScience)和APC-抗-CD8(17-0081-82,eBioScience),用于细胞内染色的BV650-抗-IFN- γ (563854,BD)、FITC-抗-TNF(554418,BD)和PE-抗-IL-2(561061,BD)。使用以下混合物检测肺Tc2细胞:用于表面染色的PerCP-Cy5.5-抗-CD3(45-0031-82,eBioScience)、eF450-抗-CD4(48-0042-82,eBioScience)、BV711-抗-CD8(563046,BDBioscienceS),和用于细胞内染色的BV605-抗-IL-4(504125,Biolegend Europe BV)、APC-抗-IL-5(504306,Biolegend Europe BV)、FITC-抗-IL-10(505006,Biolegend Europe BV)、PE-抗-IL-13(12-7133-81,eBioScience)。按照制造商的方案,使用Fix Perm试剂盒(BD)进行细胞内染色。通过使用Near IR Live/Dead(Invitrogen)排除死细胞。在FcGammaII/III受体阻断抗CD16/CD32(BD)存在下进行染色。

[0122] 为了鉴定肺驻留记忆CD8⁺T细胞亚群,使用PerCP-Vio700-抗-CD3(130-119-656,Miltenyi Biotec)、PECy7-CD4(552775,BD Biosciences)、BV510-抗-CD8(100752,BioLegend)、PE-抗-CD62L(553151,BD Biosciences)、APC-抗-CD69(560689,BD Biosciences)、APC-Cy7-抗-CD44(560568,BD Biosciences)、FITC-抗-CD103(11-1031-82,eBiosciences)和黄色Live/Dead(Invitrogen)的混合物。通过用PerCP Vio700-抗-IgM(130-106-012,Miltenyi)和PerCP Vio700-抗-IgD(130-103-797,Miltenyi)、APC-H7-抗-CD19(560143,BD Biosciences)、PE-抗-CD38(102708,Biolegend Europe BV)、PE-Cy7-抗-CD62L(ab 25569,Abcam)、BV711-抗-CD69(740664,BD Biosciences)、BV421-抗-CD73(127217,Biolegend Europe BV)、FITC-抗-CD80(104705,Biolegend Europe BV)和黄色Live/Dead(Invitrogen)的混合物进行表面染色来研究肺B细胞。

[0123] 将细胞与适当的混合物在4°C孵育25分钟,在含有3%FCS的PBS中洗涤,并在4°C孵育过夜后用4%多聚甲醛固定。在Attune NxT血细胞计数器(Invitrogen)中获得样品并通过FlowJo软件(Treestar,OR,USA)分析数据。

[0124] 器官中病毒RNA含量的测定

[0125] 取出小鼠的器官并立即在-80°C下在干冰上冷冻。来自循环SARS-CoV-2的RNA是从肺中制备的,如别处所述(Ku MW,et al.Cell Host Microbe,29(2),236-249e236,2021)。使用MP Biomedical Fastprep 24组织匀浆器,通过在裂解基质M(MP Biomedical)中用500 μ l PBS解冻和匀浆来制备肺匀浆。使用Qiagen Rneasy试剂盒以2000g离心10分钟从器官匀浆的上清液中提取RNA,除了省略用AVL缓冲液/载体RNA的中和步骤。然后使用RNA样品通过

E-特异性qRT-PCR测定病毒RNA含量。为了通过Esg-特异性qRT-PCR测定病毒RNA含量,使用含有1mL TRIzol试剂(ThermoFisher)的裂解基质D(MP Biomedical)制备总RNA,并使用MP Biomedical Fastprep24组织匀浆器以6.0m/S匀浆30秒两次。使用Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies)评价RNA样品的质量。使用NanoDrop分光光度计(Thermo Scientific NanoDrop)定量病毒RNA含量。RNA完整值(RIN)为7.5-10.0。使用SuperScriptTMIIIPlatinum One-Step qRT-PCR系统(Invitrogen)和特异性引物和探针(Eurofins),根据逆转录和实时定量TaqMan®PCR,定量SARS-CoV-2E或E亚基因组mRNA,如最近所述(Ku MW, et al. EMBO Mol Med, e14459, 2021)。

实施例

[0126] 抗原设计和先导候选物的向下选择

[0127] 为了选择最合适的可以考虑已知变体的病毒传播动力学并能够诱导最大的中和广度的S_{CoV-2}变体,本发明人产生编码来自Alpha、Beta或Gamma SARS-CoV-2 VOC的全长S_{CoV-2}的LV。用 1×10^8 TU/小鼠的每个单独LV初次免疫i.m. (第0周)和加强免疫i.m. (第3周) C57BL/6小鼠(n=5只/组),并在针对携带各种S_{CoV-2}的假病毒加强免疫之前(wk3)和加强免疫之后(wk5),评估其血清的(交叉)中和潜力(图1A)。用LV::S_{Alpha}免疫针对S_{D614G}和S_{Alpha}产生适当的中和能力,但对S_{Beta}和S_{Gamma}不产生(图1B)。在LV::S_{Beta}和LV::S_{Gamma}之间,前者产生了针对S_{D614G}、S_{Alpha}和S_{Gamma}变体的最高交叉血清中和潜力。根据先前在用LV免疫的情况下使用其它接种策略的观察结果,SCoV-2的S2结构域中的K⁹⁸⁶P-V⁹⁸⁷P取代改善了(交叉)血清中和潜力(图1C),这最可能是由S_{CoV-2-2P}的半衰期延长引起的(Walls AC, et al. Cell, 181(2), 281-292 e286, 2020)。

[0128] 综合这些数据,允许向下选择S_{Beta-2P}作为最佳交叉反应性抗原候选物用于LV(LV::S_{Beta-2P})的情况,以增强先前由第一代COVID-19疫苗如mRNA-1273诱导的免疫减弱。

[0129] mRNA-1273-初次免疫和-加强免疫小鼠中体液免疫的随访和LV::S_{Beta-2P}的i.n.加强免疫的作用

[0130] 发明人分析了LV::S_{Beta-2P}的i.n.加强疫苗接种增强和拓宽小鼠中免疫应答的潜力,所述小鼠最初已经用mRNA-1273初次免疫和加强免疫,并且其中(交叉)血清中和潜力正在降低。C57BL/6小鼠用1μg/小鼠的mRNA-1273在第0周经i.m.初次免疫和在第3周经i.m.加强免疫,定义为小鼠中该疫苗的最佳剂量(Nature, 2020, Vol. 586, 567-571)(图2A)。纵向血清学随访表明,在初次免疫后3周时,可容易地检测到针对S_{D614G}和S_{Alpha}的交叉中和活性(图2B)。也可检测到针对S_{Gamma}交叉血清中和,尽管程度较低,但不针对S_{Beta}、S_{Delta}或S_{Delta+}。在第6周,即加强免疫后3周,可检测到针对所有S_{CoV-2}变体的交叉血清中和活性,尽管针对S_{Beta}、S_{Delta}或S_{Delta+}的程度要小得多。从第6周到第10周,针对S_{Beta}、S_{Delta}或S_{Delta+}的交叉血清中和逐渐且显著降低。

[0131] 在第15周,mRNA-1273-初次免疫和-加强免疫的小鼠组接受i.n.的递增剂量的 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 或 1×10^9 TU/小鼠的LV::S_{Beta-2P}(图2A)。对照mRNA-1273-初次免疫和-加强免疫的小鼠接受i.n.的 1×10^9 TU的空LV(LV ctrl1)。同时,在该时间点,用1μg mRNA-1273或PBS经i.m.注射mRNA-1273-初次免疫和-加强免疫的小鼠。未初次免疫的、年龄匹配的小鼠接受i.n.的 1×10^9 TU的LV::S_{Beta-2P}或PBS。

[0132] 在mRNA-1273-初次免疫的小鼠中,在第3周检测到血清抗S_{CoV-2}和抗RBD IgG,在mRNA-1273加强免疫后增加,如在第6和10周研究的,然后在不存在额外加强免疫的情况下在第17周减少(图8A)。在mRNA-1273-初次免疫和-加强免疫小鼠中,在第15周加强免疫,在用 1×10^8 或 1×10^9 TU的LV::S_{Beta-2P}或第三剂量的mRNA-1273注射的小鼠中观察到抗S_{CoV-2}IgG的滴度显著增加(图2C)。在用 1×10^9 TU的LV::S_{Beta-2P}注射的小鼠中,抗S_{CoV-2}IgA的滴度高于用第三剂量的mRNA-1273注射的那些小鼠(图2C)。在粘膜水平,在该时间点,总肺提取物中抗S_{CoV-2}和抗RBD IgG的滴度在LV::S_{Beta-2P}小鼠中以剂量依赖性方式增加,其中LV::S_{Beta-2P}的最高剂量与i.m.第三剂量的mRNA-1273相当(图8B)。重要的是,仅在LV::S_{Beta-2P}加强免疫的小鼠中检测到显著滴度的肺抗S_{CoV-2}IgA,但在它们的晚期通过i.m.加强免疫的对应物中几乎检测不到(图8B)。

[0133] 在粘膜细胞水平,在肺IgM⁻/IgD⁻CD19⁺(Ig转换的)B细胞群体内,在用LV::S_{Beta-2P}经i.n.加强免疫的小鼠中以剂量依赖性方式检测到可能构成驻留记忆B细胞的CD38⁺CD62L⁺CD69⁺CD73⁺CD80⁺细胞的百分比增加,但不在其mRNA-1273经i.m.-加强免疫的对应物中检测到(图3A、B)。

[0134] 在先前mRNA-1273-初次免疫和-加强免疫的小鼠中用LV::S_{Beta-2P}经i.n.加强免疫后全身和粘膜T细胞免疫的特征

[0135] 用涵盖H-2^b小鼠中CD8⁺T细胞的免疫显性S_{CoV-2}区域的单独S:256-275、S:536-550或S:576-590肽体外刺激后(Ku MW, et al. Cell Host Microbe, 29 (2), 236-249e236, 2021),在按照上述方案免疫的个体小鼠的脾中,通过IFN- γ -特异性ELISPOT评估全身抗-S_{CoV-2}T-细胞免疫(图2A)。重要的是,第17周时在mRNA-1273初次免疫-加强免疫小鼠的脾中可检测到的弱抗-SCD8⁺T-细胞免疫在用 1×10^8 和 1×10^9 TU/小鼠的LV::S_{Beta-2P}经i.n.加强免疫后大幅增加(图4)。 1×10^9 TU剂量的LV::S_{Beta-2P}经i.n.在全身T细胞免疫上的加强剂作用与额外剂量的mRNA-1273i.m.相当,或倾向于更高。

[0136] 同时,在相同的动物中,用载有S:256-275、S:536-550和S:576-590肽库的自体骨髓树突细胞体外刺激后,通过来自个体小鼠的富含T细胞的级分中胞内Tc1和Tc2细胞因子染色来评估粘膜抗S_{CoV-2}T细胞免疫性(图5A)。在先前mRNA-1273-初次免疫和-加强免疫的小鼠中,在肺中仅检测到少量S_{CoV-2}-特异性IFN- γ /TNF/IL-2CD8⁺T-细胞应答(图5A)。LV::S_{Beta-2P}的i.n.施用以剂量依赖性方式加强这些Tc1应答,其中相当大百分比的这种Tc1细胞被 1×10^8 或 1×10^9 TU的剂量诱导。mRNA-1273i.m.施用对粘膜T细胞具有显著较低的加强作用(图5A、B)。在任何实验组中均未检测到Tc2应答(IL-4、IL-5、IL-10和IL-13)(图9)。

[0137] 重要的是,肺驻留记忆CD8⁺T细胞(Trm)的比例在用递增剂量的LV::S_{Beta-2P}经i.n.加强免疫的小鼠中显著增加,与其接受i.m.第三剂量的mRNA-1273的对应物相反。事实上,后者没有这种Trm细胞群(在许多感染性疾病中非常频繁地与保护潜力相关)的显著比例(图6A、B)。

[0138] mRNA-1273-初次免疫和-加强免疫的小鼠中晚期LV::S_{Beta-2P} i.n.加强免疫的完全保护潜力

[0139] 然后发明人评价了在mRNA-1273-初次免疫和-加强免疫的小鼠中,根据与上述方案相当的接种方案,LV::S_{Beta-2P} i.n.加强免疫的保护性疫苗功效。在第15周,mRNA-1273-初次免疫和-加强免疫的小鼠接受i.n.次优剂量的 1×10^8 TU的LV::S_{Beta-2P}或对照空LV(图

7A)。这种次优剂量的选择是基于本发明人先前众多的观察,这种剂量在同源LV初次免疫-加强免疫实验中的保护中有效(Ku MW,et al.Cell Host Microbe,29(2),236-249e236,2021;Ku MW,et al.EMBO Mol Med,e14459,2021)。对照mRNA-1273免疫小鼠接受mRNA-1273i.m.或PBS。未接种的、年龄和性别匹配的对照保持未免疫。晚期加强免疫后4周,即第20周,用 3×10^8 感染性基因组单位(IGU)的编码hACE2164(Ad5::hACE2)的5型腺病毒载体预处理所有小鼠(Ku MW,et al.Cell Host Microbe,29(2),236-249e236,2021),使其肺允许SARS-CoV-2复制(图7B)。四天后,用SARS-CoV-2Delta变体攻击小鼠,在本发明的时候,即2021年11月,SARS-CoV-2Delta变体是世界范围内最广泛的SARS-CoV-2变体。

[0140] 在感染后(dpi)第3天,总肺RNA的分析首先显示了Ad5::hACE-2体内转导后的所有小鼠中均匀表达hACE2(图7B)。然后在感染后第3天通过评估总E RNA和亚基因组(Esg)E_{Cov-2}RNA qRT-PCR测定肺病毒载量,后者是活病毒复制的指示(Chandrashekar A,et al.Science,369(6505),812-817,2020;Tostanoski LH,et al.Nat Med,26(11),1694-1700,2020;Wolfel R,Corman VM,Guggemos W et al.Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019.Nature,581(7809),465-469,2020)。在最初用mRNA-1273初次免疫和加强免疫的小鼠中,然后用对照LV经i.n.注射或单独用PBS经i.m.注射,未检测到免受SARS-CoV-2Delta变体攻击的显著保护潜力。在净对照中,LV::S_{Beta-2P}i.n.加强免疫急剧降低SARS-CoV-2的总E_{Cov-2}RNA含量,并且在该组中没有检测到复制相关的Esg E_{Cov-2}RNA的拷贝(图7B)。在接受晚期mRNA-1273i.m.加强免疫的组中,总E_{Cov-2}RNA含量也显著降低。Esg E_{Cov-2}RNA含量在该组的5只中有3只未检测到。

[0141] 在叙利亚金仓鼠中通过单剂或加强剂鼻内慢病毒接种的针对SARS-CoV-2的全肺预防

[0142] 本发明人证明,编码稳定化形式的原始SARS-CoV-2刺突糖蛋白的疫苗慢病毒载体的单次鼻内施用在易感叙利亚金仓鼠模型中诱导呼吸道的完全肺保护且强烈减少针对原型SARS-CoV-2的肺炎。另外,本发明人表明在用SARS-CoV-20micron变体接种后,编码稳定化的SARS-CoV-2Beta变体的刺突的慢病毒载体(LV::S_{Beta-2P}) 在肺和鼻甲中防止病理学且降低感染性病毒载量。重要的是,用LV::S_{Beta-2P}的鼻内加强免疫改善了交叉中和,其在LV::S_{Beta-2P}初次免疫的仓鼠中远好于在用编码来自祖先SARS-CoV-2的刺突的LV初次免疫的对应物。这些结果强烈提示,具有原始刺突序列的免疫印记对免受新变体的交叉保护具有负面影响。本发明人的结果解决了在已经接种并且已经丧失免疫力的人中的疫苗有效性问题,并且表明了作为单剂量或作为加强剂的基于LV的鼻内接种的有效性。

[0143] 表达S蛋白的构LV的构建和生产

[0144] 先前已描述LV::S_{WA1}和LV::S_{WA1-ΔF2P}的构建(Ku MW,et al.Cell Host Microbe,29(2),236-249e236,2021;Ku MW,et al.EMBO Mol Med,e14459,2021)。

[0145] LV的生产和滴定

[0146] 通过载体质粒pFlap/S_{Cov-2}(水泡性口炎病毒G Indiana包膜质粒)和用于产生整合缺陷型载体的衣壳化质粒pD64V瞬时磷酸钙共转染HEK293T细胞来产生慢病毒颗粒。在转染后48小时收获上清液,通过在4℃以2500rpm离心6分钟澄清。将LV等分并储存在-80℃。用阿非迪霉素处理的转导HEK293T细胞来测定载体滴度。通过使用pFLAP质粒特异性正向和反向引物以及宿主管家gadph基因特异性正向和反向引物,在转导后第3天在总裂解物上通过

qPCR将与核基因转移的效力成比例的滴度测定为转导单位(TU)/mL,如先前所述(Iglesias et al., J. Gene Med., 2006, 8, 265-274)。

[0147] SDS-PAGE和蛋白免疫印迹(western blotting)

[0148] 用HEK293T细胞(2×10^6 个细胞/孔)接种6孔板,并且过夜生长后,用编码SARS-CoV-2S转基因的LV转导,感染复数为10。转导后48小时收集细胞裂解物并定量。用Bolt样品缓冲液在95℃加热5分钟后,将样品加载到预制的Bolt 4-12% Bis-Tris凝胶(Invitrogen)上。使用iBlot2干印迹系统(Invitrogen)将蛋白转移至硝酸纤维素膜,并用TBST封闭剂(含0.2% Tween20和5%牛奶的Tris缓冲盐(TBS))封闭膜。1小时封闭后,将膜与抗SARS-CoV-2S2兔多克隆抗体(SinoBiological 40590-T62)在TBST封闭剂中孵育过夜。然后将膜用TBST洗涤三次,持续10分钟,随后与1:2500 DyLight 800-缀合的山羊抗兔IgG(H+L)二抗(Invitrogen, Cat#SA5-35571)在TBST封闭剂中孵育1小时。最后,将膜用TBST洗涤三次,持续10分钟,并使用ODYSSEY CLx红外成像系统(Li-COR)显影。将预染色的E-PAGE SeeBlue标准品(Invitrogen)用作梯度。

[0149] 仓鼠

[0150] 购买雄性金黄地鼠(*Mesocricetus auratus*)叙利亚金仓鼠(Le Genest Saint Isle, 法国),其为成熟的并在实验开始时称重为80-100gr。在免疫接种期间,将仓鼠在特定的无病原体条件下圈养在单独通风的笼中。对于SARS-CoV-2感染,将这些仓鼠转移到单独过滤的笼中,所述笼放置在巴斯德研究所的动物设施中的隔离器内。i.m.或i.n.注射前,用异氟烷吸入或i.p.注射氯胺酮(Imalgene, 100mg/kg)和盐酸二甲苯胺噻嗪(Rompun, 5mg/kg)使仓鼠镇静。

[0151] 动物研究的伦理批准

[0152] 根据欧洲和法国指南(1987年10月19日的指令86/609/CEE和法令87-848)实现动物实验,随后获得巴斯德研究所安全、动物护理和使用委员会的批准,由当地伦理委员会(CETEA#DAP 20007, CETEA#DAP200058和高等教育和研究部APAFIS#24627-2020031117362508v1, APAFIS#28755-2020122110238379v1)提供的方案协议。

[0153] SARS-CoV-2刺突蛋白的生产

[0154] 合成编码稳定化形式的SARS-CoV-2WA1或Omicron BA.1刺突(HexaPro)胞外结构域的密码子优化的核苷酸片段(后接折叠的三聚化基序)和含有C-末端标签(Hisx8-标签、Strep-标签和AviTag)的WA1或Omicron BA.1RBD蛋白,并克隆到pcDNA3.1/Zeo⁽⁺⁾表达载体(Thermo Fisher Scientific)。通过使用如前所述的聚乙烯亚胺(PEI)沉淀法(PMID: 25910833)瞬时转染指数生长的Freestyle293-F悬浮细胞(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)来产生重组蛋白。根据制造商的说明书(GE Healthcare),使用Ni琼脂糖® Excel树脂,通过高效层析从培养物上清液中纯化蛋白,使用Slide-A-Lyzer®透析盒(Thermo Fisher Scientific)针对PBS透析,使用NanoDrop2000仪器(Thermo Fisher Scientific)定量,并使用NuPAGE 3-8% Tris-乙酸酯凝胶(Life Technologies)通过SDS-PAGE控制纯度,如前所述(PMID: 25910833)。

[0155] 体液应答

[0156] 使用来自SARS-CoV-2WA1或Omicron毒株的重组稳定的S_{CoV-2}和RBD蛋白,通过酶联免疫吸附测定(ELISA)检测免疫球蛋白G(IgG)Ab。在4℃下,在50mM Na₂CO₃(pH9.6)中以1μg/

mL包被Nunc Polysorp ELISA板(ThermoFisher,475094)过夜。孵育后,用1X PBS+0.05% Tween-20(PBST)洗涤板,并用PBST+1%BSA在37°C下封闭2至3小时。将板与连续稀释的血清在PBS-T+1%BSA中在37°C孵育1.5小时。洗涤后,将兔抗仓鼠IgG-辣根过氧化物酶缀合物(Jackson Immuno Research,M37470)用作第二Ab,并将3,5,3',5'-四甲基联苯胺(Eurobio Scientific,5120-0047)用作检测Ab应答的底物。用50μL 2M硫酸终止反应。将导致吸光度值大于免疫前血清平均值+3SD的最高血清稀释度计算为终点滴定。

[0157] SARS-CoV-2接种

[0158] 将氯胺酮和盐酸二甲苯胺噻嗪混合物通过i.p.注射麻醉仓鼠,转移到3级生物安全柜中并用50μl含有 0.3×10^5 TCID₅₀的WA1的病毒接种物(Lescure et al.,Lancet Infect.Dis.,2020,20,697-706)或SARS-CoV-2临床分离物(Planas et al.,Nature,2022,602,671-675)的Omicron BA.1变体(Pango lineage BA.1,GISAID:EPI_ISL_6794907and EPI_ISL_7413964)经i.n.接种。将动物圈养在巴斯德研究所的3级生物安全动物设施的隔离器中。根据这些机构批准的标准程序操作从感染动物回收的器官。

[0159] 假病毒中和测定

[0160] 通过使用稳定表达人ACE2的HEK293T细胞(HEK 293T-ACE2)和携带报告萤光素酶萤火虫基因的非复制性S_{CoV-2}假型LV颗粒的抑制测定来评估Nab定量,从而允许通过模拟天然SARS-CoV-2病毒的融合步骤来定量宿主细胞侵袭,如先前所述(Sterlin et al.,Sci.Transl.Med.,2021,13,eabd2223)。将血清样品或澄清的肺匀浆在56°C热灭活30分钟。将在含有10%热灭活FCS、100U/mL青霉素和100mg/mL链霉素和1mM丙酮酸钠(Gibco,11360-070)的25μl DMEM-glutamax(Gibco,21063-029)中稀释的样品的连续四倍稀释液与1ng的S_{CoV-2}假型LV p24等价物在25μl中在U形底板中在室温下混合30分钟。然后将样品转移到含有 2×10^4 个HEK 293T-ACE2细胞的透明平底96孔黑色板(Corning,CLS3603)。将板在37°C下孵育72小时,然后使用ONE-Glo™萤光素酶测定系统(Promega,E6120)在EnSpire酶标仪(PerkinElmer)上测定萤光素酶表达。EC50报告为血清稀释度的倒数,其指示携带所示S_{CoV-2}变体的慢病毒载体感染50%的HEK 293T-ACE2细胞。

[0161] 器官中病毒载量的测定

[0162] 无菌取出肺和鼻甲(NT)并立即在-80°C下冷冻。来自循环SARS-CoV-2的RNA从肺中制备,如最近所述(Ku MW,et al.Cell Host Microbe,29(2),236-249e236,2021)。简言之,在MP Biomedical Fastprep 24组织匀浆器中,使用裂解基质A(MP Biomedicals,116913050-CF)在500μl冰冷的PBS中通过解冻和匀浆器官来制备肺匀浆,并用于通过E-特异性qRT-PCR测定病毒载量。或者,通过加入含有1mL的TRIzol试剂(ThermoFisher,15596026)的裂解基质D(MP Biomedical,116910050-CF)并使用MP Biomedical Fastprep 24组织匀浆器以6.0m/S匀浆30秒,从肺或NT制备总RNA。这些RNA制备物用于通过Esg-特异性qRT-PCR或炎性介质测定病毒载量。

[0163] 使用SuperScript™IIIPlatinum™ One-Step qRT-PCR试剂盒(Invitrogen,11732020)和特异性引物和探针(Eurofins),根据逆转录和实时定量TaqMan®PCR,定量SARS-CoV-2E或E亚基因组mRNA,如最近所述(Corman et al.Euro Surveill.2020,25(3); Wolfel et al.,Nature 2020,581(7809):465-9)。使用衍生自“T7 SARS-CoV-2Esg mRNA”的PCR片段的体外转录的RNA进行Esg mRNA测定的标准曲线。使用T7 RiboMAX Express大规模

RNA生产系统(Promega,P1320)合成体外转录的RNA,并通过苯酚/氯仿提取和用异丙醇和乙醇两次连续沉淀来纯化。通过光密度测量测定RNA的浓度,在含有100 μ g/mL tRNA载体的无RNAse水中稀释至10⁹基因组当量/ μ L,并储存在-80 $^{\circ}$ C。在含有10 μ g/ml tRNA载体的无RNAse水中制备该体外转录的RNA的连续稀释液,以建立每个测定的标准曲线。PCR条件为:(i)55 $^{\circ}$ C逆转录10min,(ii)95 $^{\circ}$ C酶失活3min,(iii)45个循环的95 $^{\circ}$ C变性/扩增15s、58 $^{\circ}$ C变性/扩增30s。在ABI 7500快速实时PCR系统(Applied Biosystems)上分析PCR产物。从标准曲线推断RNA拷贝值并乘以体积以获得每个器官的RNA拷贝。检测限基于标准曲线并定义为Ct值为40的RNA量。

[0164] 在用TRIzol试剂提取的总RNA中进行仓鼠肺和脑中炎性介质的qRT-PCR定量,如最近详述的(Ku MW,et al.Cell Host Microbe,29(2),236-249e236,2021)。

[0165] 组织病理学

[0166] 将来自仓鼠肺的样品在福尔马林中固定7天并包埋在石蜡中。用苏木精和伊红(H&E)染色石蜡切片(5 μ m厚)。定性描述了组织病理学病变,并在可能时进行评分,使用:(i)分布限定符(即,焦点、多焦点、局部扩展或扩散),和(ii)五级严重性等级,即1:最小值,2:轻度,3:中度,4:显著,和5:重度。在一些情况下,制备连续切片用于免疫组织化学(IHC)分析。如先前所述进行IHC(Ku MW,et al.EMBO Mol Med,e14459,2021)。在IHC中使用兔抗-N_{CoV-2}抗体(Novus Biologicals,NB100-56576)和生物素化山羊抗-兔Ig第二抗体(Dako,E0432)。使用AxioScan Z1(Zeiss)系统扫描载玻片并用Zen 2.6软件分析图像。

[0167] 统计分析

[0168] 当P值<0.05时指定统计显著性。将ELISA滴度在统计分析前转化为log₁₀。为了比较两组,使用非参数Mann-Whitney检验。为了比较多于2个实验组,应用Kruskal-Wallis ANOVA与Dunn's多重比较检验。通过双因素ANOVA和用于多重比较的Sidak检验来分析VoC的中和和活性的差异。使用GraphPad Prism软件(版本9,Graphpad软件,Lajolla,CA,美国)进行检验。

[0169] 结果

[0170] 编码各种S_{CoV-2}形式的LV的免疫原性

[0171] 构建在巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子(P_{CMVie})转录控制下的编码S_{CoV-2}的稳定构象异构体的非整合LV(图12A)。前两个S_{CoV-2}构象异构体衍生自人密码子优化的全长膜锚定的祖先WA1S_{CoV-2}(Ku MW,et al.Cell Host Microbe,29(2),236-249e236,2021)。LV::S_{WA1-2P}编码在S2结构域的铰链环中具有两个稳定的K⁹⁸⁶P和V⁹⁸⁷P取代的S_{WA1}。LV::S_{WA1 Δ F-2P}编码除了两个K⁹⁸⁶P和V⁹⁸⁷P取代外,还缺失了涵盖S1/S2弗林蛋白酶切割位点(SEQ ID NO:27的675-QTQTNSPRRAR-685)的环的S_{WA1},其用于在预融合状态下的进一步稳定性(McCallum et al.,Nat.Struct.Mol.Biol.,2020,27,942-949;Launay et al.,EBioMedicine 2022,75,103810)。S_{Beta-2P}来自Beta(B.1.351)VoC并且包含两个K⁹⁸⁶P和V⁹⁸⁷P取代。S_{Beta}与S_{WA1}的区别特别在于位于RBD的N⁵⁰¹Y/K⁴¹⁷N/E⁴⁸⁴K突变(Tegally et al.,Nature2021,592,438-443)。而携带S_{WA1}的假病毒被来自目前批准的疫苗接种的个体的血清中和,那些呈现这些RBD突变的个体中度至强烈地抵抗中和(Kuzmina et al.,iScience 2021,24,103467)。该观察结果提供了适应S序列变体进一步接种的理由。通过对总细胞裂解物的蛋白免疫印迹证实S_{CoV-2}免疫原在用4个LV转导的HEK293T细胞中的表达(图12B)。如所预期的,S2弗林蛋白酶切割产物

仅在由编码 S_{WA1} 、 S_{WA1-2P} 或含有完整弗林蛋白酶切割位点的 $S_{Beta-2P}$ 的LV转导的细胞中检测到。

[0172] 为比较LV:: S_{WA1} 、LV:: S_{WA1-2P} 、LV:: $S_{WA1\Delta F-2P}$ 和LV:: $S_{Beta-2P}$ 的免疫原性,通过 1×10^8 TU的任一种LV的单次i.m.注射来免疫仓鼠($n=4$ 只/组)。五周(wks)后,所有研究的LV都诱导了高血清滴度的抗- S_{WA1} IgG抗体(图12C)。由于在这些LV之间没有观察到免疫原性的显著差异,选择LV:: $S_{WA1\Delta F-2P}$,下文称为“LV::S”,用于评价免受同源SARS-CoV-2的保护作用。

[0173] 通过单次i.n.LV::S施用诱导针对SARS-CoV-2的强体液应答

[0174] 发明人最近显示了在仓鼠模型中,初次免疫(i.m.)-加强免疫(i.n.)方案中使用的LV::S与单次i.m.注射相比显著改善了免受SARS-CoV-2的保护(Ku MW, et al. Cell Host Microbe, 29(2), 236-249e236, 2021)。在此,发明人评价了单次i.n.施用的LV::S免受祖先WA1 SARS-CoV-2的保护潜力。在第0周或第5周,用 1×10^8 TU的LV::S的单次注射经i.n.免疫仓鼠($n=6$ 只/组)(图13A)。作为阳性对照,在第0周用 1×10^8 TU的LV::S经i.m.初次免疫一组仓鼠,然后在第5周用相同量的LV::S经i.n.加强免疫。按照相同方案,对照仓鼠接受等量的表达绿色荧光蛋白的LV作为无关抗原(LV ctrl)。在第7周,用 0.3×10^5 TCID₅₀的WA1 SARS-CoV-2经i.n.攻击所有动物(图13A)。攻击前,免疫前血清和来自LV ctrl组的那些血清测试为抗- S_{WA1} 和抗-RBD_{WA1}抗体阴性(图13B)。单次LV::S经i.n.注射后,所有动物均装载高滴度的抗- S_{WA1} 和抗-RBD_{WA1} IgG。免疫后2周就获得这些抗体滴度,如在第5周接种的仓鼠所示。血清IgG滴度保持稳定直到第7周。在第7周时,与i.m.-i.n.组相比,经i.n.注射的组中检测到显著较低的抗- S_{WA1} 和抗-RBD_{WA1} IgG滴度。通过使用具有 S_{WA1} 的假病毒评价血清中和活性。与抗RBD IgG滴度一致,与i.m.-i.n.相比,用单次i.n.注射免疫的仓鼠中血清中和活性较低(图13C)。尽管在i.n.注射后第2或7周抗-S和抗-RBD IgG滴度相当,来自在较早时间点接种的仓鼠的血清表现出稍高的中和能力,提示需要抗体随时间成熟以达到有效的中和潜力。然而,在SARS-CoV-2接种后4天(感染后第4天),所有接种组的总肺匀浆具有相等的中和能力(图13C)。肺中的病毒中和活性可以是比血清中可检测到的保护更相关的关联。

[0175] 通过单次i.n.LV::S施用诱导的免受同源SARS-CoV-2攻击的保护

[0176] 在i.m.-i.n.或单次i.n.组的LV::S接种个体的肺中,与LV ctrl组相比,观察到病毒含量减少约2至4log₁₀,如通过在感染后第4天检测SARS-CoV-2包膜(E)RNA的qRT-PCR所测定的(图14A,左图)。通过亚基因组E RNA(Esg)qRT-PCR测量的肺病毒含量是活病毒复制的指示(Wolfel et al., Nature 2020, 581(7809):465-9)。该分析显示三个接种组中完全不存在复制病毒,而LV ctrl组中SARS-CoV-2/肺的Esg RNA的几何平均值 $\pm$ SD为 $(5.4 \pm 6.8) \times 10^8$ 个拷贝(图14A,右图)。在感染后第4天,与观察到的保护作用一致,与接受LV ctrl的仓鼠中12%重量减轻相比,通过单独i.n.或i.m.-i.n.初次免疫-加强免疫方案接种的仓鼠中仅检测到2-3%的重量减轻(图14B)。如通过qRT-PCR在感染后第4天在LV::S-接种和SARS-CoV-2攻击的仓鼠的总肺匀浆中所评估,与其LV ctrl注射和攻击的对应物相比,检测到炎性IFN- γ 、TGF- α 、IL-6细胞因子、抗炎IL-10细胞因子、CCL2、CCL3、CCL5和CXCL10趋化因子以及FoxP3的表达显著降低(图14C)。对于攻击前2周接受i.n.施用的组,炎性标志物的变化特别明显。与这些结果一致,在病毒载量和炎症之间发现正相关($r=0.46$, $p<0.05$),而重量分别与病毒载量和炎症负相关($r=-0.6842$, $p<0.001$ 和 $r=-0.56$, $p<0.01$, Spearman检验)。

[0177] 在单次i.n.LV::S施用接种的仓鼠中感染驱动的炎症减少

[0178] 在肺组织病理学检查中,接种的对照显示肺浸润(图15A)和严重的肺泡-间质炎症(图15B),导致致密的预合并区域(图15C)。这些肺也显示支气管病变,具有单个或成簇细胞的上皮脱落(图15D)和产生乳头状突起的增生性上皮生长(图15E)或腔内上皮褶皱(图15F)的图像。在接种组中,间质(图15A)和肺泡(图15G)病变为轻度至中度。用SARS-CoV-2核衣壳蛋白(N_{CoV-2})特异性多克隆抗体对经LV ctrl处理和感染的仓鼠的肺进行免疫组织化学分析,在支气管上皮细胞(未显示)和间质中(图15H,右图)检测到许多 N_{CoV-2} +细胞簇。相反,LV::S-接种动物中炎症的严重程度降低。当可检测时,发炎区仍含有 N_{CoV-2} +细胞,表明尽管病毒复制已被控制(图14A),但在早期感染后第4天时间点,浸润和病毒残余物尚未完全再吸收。

[0179] 这些数据共同表明用单独i.n.LV::S施用与i.m.初次免疫后接i.n.加强免疫方案一样有效,赋予了免受同源SARS-CoV-2感染的强保护性免疫。

[0180] LV::S_{Beta-2P}初次免疫(i.m.)-加强免疫(i.n.)疫苗接种免受Omicron变体的交叉保护

[0181] 鉴于大流行病的动态,一个重要的问题是疫苗诱导免受新型VoC的交叉保护的能力。基于一系列编码来自各种VoC的S的LV,发明人最近选择了LV::S_{Beta-2P}作为产生最广谱的交叉中和潜力的最佳候选物(Vesin, B., et al. Mol Ther 30, 2984-2997, 2022)。为评价仓鼠模型中LV::S_{Beta-2P}针对SARS-CoV-2Omicron的功效,在第0周用 1×10^8 TU的LV::S_{Beta-2P}经i.m.或i.n.初次免疫仓鼠($n=4-5$ 只/组)。在第3周,用相同量的LV::S_{Beta-2P}经i.n.加强免疫一组的每只(图16A)。在第7周用 0.3×10^5 TCID₅₀的SARS-CoV-2BA.100micron亚变体攻击所有组(Planas et al., Nature 2022, 602(7898):671:5)。与 S_{WAL} 相比, $S_{Omicron}$ 具有32个突变。在这些突变中,15个位于RBD。用分离自患者的该BA.100micron毒株感染仓鼠导致重量显著降低(图16B)。

[0182] 通过ELISA在所有LV::S_{Beta-2P}接种的仓鼠中检测到针对 $S_{Omicron}$ 和RBD_{Omicron}的强交叉反应性血清IgG滴度(图16B)。初次免疫后3周,各组之间的抗体滴度没有显著差异。单次注射后抗体水平保持稳定,而在i.n.初次免疫和加强免疫的动物中观察到抗- $S_{Omicron}$ 滴度的显著增加。相反,抗RBD抗体滴度在所有接种组中随时间持续升高(图16B,下图)。

[0183] 攻击后,通过LV::S_{Beta-2P}的单次i.m.注射而接种的仓鼠或接受LV ctrl的那些逐渐减轻重量(图16C)。用LV::S_{Beta-2P}经i.n.接种的仓鼠表现出小于5%的重量减轻,没有发病体征(图16D)。在感染后第4天,分析肺和鼻甲中的病毒含量。在LV ctrl注射组的两个器官中检测到高病毒含量(图16E、16F)。相反,未从i.m.-i.n.组的肺中检测到Esg RNA,且在其他组中观察到约2log的显著降低(图16E)。值得注意的是,i.m.接种的未控制病毒复制的仓鼠具有最高的重量减轻。尽管也显著降低,但在所有仓鼠的NT中仍可检测到活病毒复制,表明尽管其在保护肺中的功效强,但基于LV的i.n.接种不能完全预防鼻感染(图17F)。然而,无论初次免疫途径如何,i.n.加强免疫在呼吸道组织感染的控制和传播方面的功效优于单次疫苗施用。

[0184] LV::S_{Beta-2P}接种的仓鼠中通过免疫组织化学测定的病毒含量降低

[0185] 在感染后第4天,ctrl组中肺切片的组织病理学分析显示图15H中详述的类似病变(图17)。免疫组织化学图像显示,相对于仅初次免疫的和LV ctrl注射的动物,在i.n或i.m

加强免疫的小鼠中通常较不丰富的 N_{CoV-2} 染色,尽管存在相对高程度的组内变化(图17)。此外,本发明人没有观察到IHC信号的程度和 Esg qRT-PCR定量之间的紧密相关性,表明免疫染色抗原的一部分对应于非复制型病毒残余物。

[0186] 总之,这些结果表明,尽管用LV单次i.n.免疫足以控制感染,基于LV的i.n.施用将更好地适应于加强先前诱导的抗COVID-19免疫。

[0187] LV:: S_{WA1-2P} -初次免疫和LV:: $S_{Beta-2P}$ -加强免疫的仓鼠中交叉反应性抗体的诱导

[0188] 然后本发明人评价了在先前暴露于 S_{WA1} 的动物中LV:: $S_{Beta-2P}$ i.n.加强免疫的功效。在第0周用 1×10^8 TU的LV:: S_{WA1-2P} 或LV:: $S_{Beta-2P}$ 经i.m.初次免疫仓鼠。在第5周用 1×10^8 TU的LV:: $S_{Beta-2P}$ 经i.n.加强免疫两个组(图18A)。在所有接种的仓鼠中,在初次免疫后的任何时间点检测到针对S和RBD蛋白的强血清IgG滴度(图18B)。在初次免疫后或加强免疫后,观察到 S_{WA1} -或 $S_{Omicron}$ 特异性抗体应答的动力学曲线和强度相当(图18B,上图)。同源或异源i.n.加强免疫分别使抗S抗体滴度少量增加1.8倍或2.5倍。相比之下,与RBD $_{WA1}$ 相比,测量到针对RBD $_{Omicron}$ 的血清IgG应答降低了约4至10倍(图18B,下图)。然而,异源加强免疫的抗-RBD $_{Omicron}$ IgG滴度比同源加强免疫的抗-RBD $_{Omicron}$ IgG滴度显著改善,分别增加3.8和1.7倍。

[0189] LV::S-初次免疫和LV:: $S_{Beta-2P}$ -加强免疫的仓鼠中抗 S_{CoV-2} 抗体印记

[0190] i.m.注射后5周,LV:: S_{WA1-2P} 和LV:: $S_{Beta-2P}$ 都诱导针对具有 S_{D614G} 或 S_{Alpha} 的假病毒的高血清中和活性(图19A)。针对 S_{D614G} 、 S_{Alpha} 和 S_{Delta} 的交叉中和活性在两组免疫仓鼠中相似。值得注意的是,在单次i.m.注射后,仅LV:: $S_{Beta-2P}$ 免疫的仓鼠表现出针对所有S变体的血清中和活性,尽管针对 $S_{Omicron}$ 更弱。

[0191] LV:: $S_{Beta-2P}$ i.n.加强免疫增加了两组中针对所VoC的交叉血清中和潜力(图19B)。尽管来自LV:: S_{WA1-2P} -初次免疫和LV:: $S_{Beta-2P}$ -加强免疫的仓鼠的血清中的中和抗体水平提高,它们几乎不能交叉中和具有 S_{Beta} 的假病毒且完全不能交叉中和具有 $S_{Omicron}$ 的假病毒(图19B)。异源初次免疫-加强免疫后,肺匀浆表现出相似结果,没有针对 S_{Beta} 或 $S_{Omicron}$ 的交叉中和活性(图19C)。在净对照中,来自LV:: $S_{Beta-2P}$ -初次免疫和LV:: $S_{Beta-2P}$ -加强免疫的仓鼠的血清和肺匀浆能更好地交叉中和具有 S_{Beta} 或 $S_{Omicron}$ 的假病毒,且交叉中和具有 $S_{Omicron}$ 的假病毒的程度较少。然而,这种初次免疫-加强免疫方案足以提供免受SARS-CoV-2 $_{Omicron}$ 攻击的保护,如上所观察到的(图16)。因此,LV:: $S_{Beta-2P}$ 加强免疫在LV:: $S_{Beta-2P}$ -初次免疫的仓鼠中对交叉血清中和的改善远好于其在LV:: S_{WA1} -初次免疫对应物中。这些结果表明在抗S体液免疫中具有明显的印记作用,并且特别明显地针对Omicron和Beta变体。

[0192] 讨论

[0193] 最近出现了基于LV的平台作为针对COVID-19的有力疫苗接种方法。本发明人尤其证明了当用作全身初次免疫后接粘膜i.n.加强免疫时,其在诱导肺中免受SARS-CoV-2感染的保护方面的强预防能力(Ku MW, et al. Cell Host Microbe, 29(2), 236-249e236, 2021)。在本研究中,作为向临床试验的进一步步骤,发明人使用编码稳定化的 S_{WA1} 或 S_{Beta} 形式的LV。这种选择是基于表明病毒包膜糖蛋白在其预融合形式中的稳定性提高了在亚单位疫苗的工业制造中作为重组蛋白生产的产量的数据。此外,其还通过提高抗原在其最佳免疫原性形式下的可用性而增加基于核酸的疫苗的功效(Hsieh et al., Science, 2020, 369(6510):1501-5)。

[0194] 在本报告的第一部分中,发明人证明了编码 S_{WAI} 的LV的单次i.n.施用与i.m.-i.n.初次免疫-加强免疫方案在高度易感仓鼠模型中赋予肺的完全保护方面一样有效,如通过病毒学、免疫学和组织病理学参数所评估。仓鼠ACE2直系同源蛋白与 S_{CoV-2} 有效地相互作用,容易使宿主细胞以高复制率被SARS-CoV-2侵入。随着SARS-CoV-2接种后重量的快速减轻和严重肺病理学的发展,远系繁殖的仓鼠提供了评价候选药物或疫苗的功绩的敏感模型(Sia et al., Nature 2020, 583(7818):834-8)。仓鼠代表了比仅发展轻度的COVID-19病理的恒河猴更具挑战性的模型。因此,在仓鼠模型中通过单次i.n.施用赋予免受同源攻击的肺的强保护是首要价值。这种保护最可能是由于粘膜免疫的发展。已表明诱导能阻断病毒在粘膜水平上相互作用的抗原特异性分泌性二聚IgA减少病毒脱落且与保护相关(Halfmann et al., Cell Rep. 2022; 39(3):110688; Munoz-Fontela et al., Nature 2020, 586(7830):509-15; Wang et al. Sci Transl Med. 2021, 13(577))。尽管在i.n.-免疫的仓鼠的鼻甲中仍检测到感染性病毒,但感染性病毒滴度的显著降低可导致传输和传播减少,如提供了疾病控制手段的Langel SN等人最近所述(Langel et al., Sci Transl. Med. 2022, 14(658))。实际上,本发明人先前已经在小鼠模型中显示抗-S IgG和分泌性IgA抗体在肺中产生,连同肺驻留记忆B和T细胞一起在i.n. LV施用后产生。由基于LV的SARS-CoV-2疫苗诱导的IgA的存在与免受病毒的完全肺保护相关(Vesin, B., et al. Mol Ther 30, 2984-2997, 2022)。不幸的是,由于缺乏免疫学工具,包括抗IgA抗体和针对活化/记忆T细胞标记的抗体,不能在仓鼠模型中评价粘膜免疫性。同时,越来越多的证据表明i.n.免疫提供了更好的保护,不仅针对SARS-CoV-2祖先毒株,而且针对新出现的VoC(Afkhami et al., Cell 2022, 185(5):896-915; Bricker et al., Cell Rep. 2021, 36(3):109400)。目前探索该结构域的研究使用已知为促炎性的黑猩猩腺病毒载体疫苗,因此用于粘膜接种是有风险的(Coughlan et al., Mol. Ther. 2022, Adenovirus-based vaccines-a platform for pandemic preparedness against emerging viral pathogens)。在净对照中, LV是非致细胞病变的和非常弱的炎性的(Ku et al. Vaccines 2021:1-16, 1988854)并且更适合于粘膜接种。在同源SARS-CoV-2攻击前2或7周,在用基于LV的疫苗进行临床试验时单次i.n.基于LV的疫苗施用获得保护的事实是有价值的。该平台可以为大规模接种提供显著的优势,其具有粘膜免疫减少病毒传播的主要优势。

[0195] SARS-CoV-2VoC的持续出现促使发明人通过评估异源抗原加强剂的保护潜力来扩展其研究,就抗-S抗体应答而言,所述异源抗原加强剂可以模拟先前感染或主要基于 S_{WAI} 的第一代疫苗的早期接种的一些方面。已经在接种的个体中观察到许多突破性SARS-CoV-2感染,显示这些疫苗的不完全交叉功效(Abu-Raddad LJ, et al. N Engl J Med. 2021; 385(2):187-9; Kuhlmann C, et al. Lancet. 2022; 399(10325):625-6)。最近,已经报道了需要粘膜加强剂接种以在呼吸道中建立针对SARS-CoV-2的强杀菌免疫(Tang J, et al. Respiratory mucosal immunity against SARS-CoV-2 following mRNA vaccination. Sci Immunol. 2022:eadd4853)。在LV免疫的仓鼠中,发明人没有检测到 S_{WAI} 和 $S_{Beta-2P}$ 抗原诱导针对 S_{CoV-2} 的交叉反应性血清IgG应答的能力之间的显著差异。然而,由于T细胞应答也是针对SARS-CoV-2感染的主要效应物,在疫苗的保护能力和其诱导中和抗体的能力之间应该有清楚的区别。特别地,基于LV的保护的有效性不仅依赖于诱导中和抗体应答的能力,而且在很大程度上依赖于它们的T细胞免疫原性。值得注意的是,在完全缺乏成熟B细胞区室和抗体

应答的 μ MT KO小鼠中实现了对肺的几乎完全的保护(Ku MW, et al. EMBO Mol Med. 2021; e14459)。此外, 粘膜驻留记忆T细胞以及 $\text{IFN } \gamma^+ \text{IL-2}^+ \text{TNF}^+$ 三阳性 CD8^+ T细胞效应在LV::S-初次免疫(i.m.)和加强免疫(i.n.)的小鼠的肺中可容易地检测到[26]。此外, 在天然感染后获得的发现很大程度上提示特异性T细胞免疫(其通常较少受到新出现的SARS-CoV-2变体的S抗原中发生的突变影响)在很大程度上针对病毒复制是有效的(Altmann DM, et al. Cell Rep Med. 2021; 2(5):100286; Mazzoni A, et al. Front Immunol. 2022; 13:801431)。T细胞介导的保护当然也在仓鼠中操作。然而, 如上所述, 免疫工具的缺乏阻止了本研究中T细胞应答的表征。

[0196] LV::S-初次免疫和LV::S_{Beta-2P}-加强免疫的仓鼠中, 尽管针对D614G、Alpha和Delta变体的血清中和潜力增强, 观察到针对Beta和Gamma变体的交叉中和活性在统计学上显著降低, 且观察到针对Omicron变体没有交叉中和活性。同样, 在甲型流感病毒的情况下, 第一次暴露于血清型可影响将来对其变体的应答(Gostic KM, et al. Science. 2016; 354(6313):722-6)。这引起了对先前感染或接种在抗体应答上的免疫印记作用的关注, 当设计疫苗时需要考虑这一点(Roltgen K, et al. Immune imprinting, breadth of variant recognition, and germinal center response in human SARS-CoV-2 infection and vaccination. Cell. 2022)。本研究表明免疫系统对早期S变体的预暴露在中和抗体应答上具有负面影响, 如用异源S变体的晚期加强剂后所测量。本发明人的结果证实了最近的数据, 表明被SARS-CoV-2祖先或Alpha变体感染的卫生保健工作者针对Omicron表现出降低的中和免疫(Reynolds CJ, et al. Science. 2022; 377(6603):eabq1841)。此外, 使用mRNA疫苗, Kalnin等人还显示了与同源加强免疫相比, 异源加强免疫提供了较差的中和抗体滴度(Kalnin KV, et al. Vaccine. 2022; 40(9):1289-98)。可以提出假设, 即可能需要变体S序列的额外注射以抵消这种负面影响并达到针对VoC的足够水平的交叉中和。

[0197] 总之, 本发明人的结果证明了LV作为有效疫苗递送平台的能力。LV是引发针对SARS-CoV-2VoC的强保护性免疫的有效且有前景的策略, 并且具有非炎性的优点, 因此适用于粘膜i.n.接种。本发明人最近证明了在已注射高剂量的 1×10^9 TU的LV的小鼠中LV::S_{Beta-2P}i.n.施用的安全性(Vesin, B., et al. Mol Ther 30, 2984-2997, 2022)。肺组织病理学分析未发现不良反应。

[0198] LV::S_{Beta-2P}免受SARS-CoV-2Omicron变体的完全交叉保护能力

[0199] 本发明人评价了B6.K18-hACE2^{IP-THV}转基因小鼠中LV::S_{Beta-2P}的保护性功效, 所述小鼠倾向于肺中SARS-CoV-2感染, 并且另外显示了空前的脑对SARS-CoV-2复制的允许(Ku MW, et al. EMBO Mol Med, e14459, 2021)。在第0周用 1×10^8 TU/小鼠的LV::S_{Beta-2P}或空LV(假)经肌内(i.m.)初次免疫B6.K18-hACE2^{IP-THV}小鼠(n=5只/组), 且然后在第3周用相同剂量的相同载体经鼻内(i.n.)加强免疫(图20A)。然后在第5周用 0.3×10^5 TCID₅₀的SARS-CoV-2Omicron变体攻击(i.n.)小鼠。

[0200] 然后在感染后第5天通过使用亚基因组E_{Cov-2}RNA(Esg)qRT-PCR测定肺和脑病毒RNA含量, 其是活病毒复制的指示(Chandrashekar et al., 2020, Science, 369, 812-817; Tostanoski et al., 2020, Nat. Med. 26, 1694-1700; Wolfel et al., 2020, Nature, 581, 465-469)。LV::S_{Beta-2P}接种赋予了免受肺中的SARS-CoV-2Omicron的杀菌保护, 即接种小鼠中没有检测到Esg病毒RNA, 而在它们的假接种对应物中检测到 $(5.83 \pm 6.22) \times 10^9$ 个拷贝

的病毒RNA/肺(图20B,左)。同时,脑内病毒RNA含量的Esg qRT-PCR定量在接种的小鼠中没有检测到病毒RNA的拷贝,而在假接种的对照的脑中检测到 $(6.41 \pm 1.29) \times 10^9$ 个拷贝(图20B右)。值得注意的是,即使5只中的2只小鼠没有表现出Omicron的宫颈感染,其它3只小鼠在脑中表现出非常高的病毒复制量。

[0201] 因此, LV::S_{Beta-2p} 显示出免受Omicron变体的完全交叉保护能力,这与我们先前证明的其针对祖先或Delta变体的有效性完全相当(Ku MW, et al. EMBO Mol Med, e14459, 2021; Ku MW, et al. Cell Host Microbe, 29(2), 236-249e236, 2021; Vesin, B., et al. Mol Ther 30, 2984-2997, 2022)。

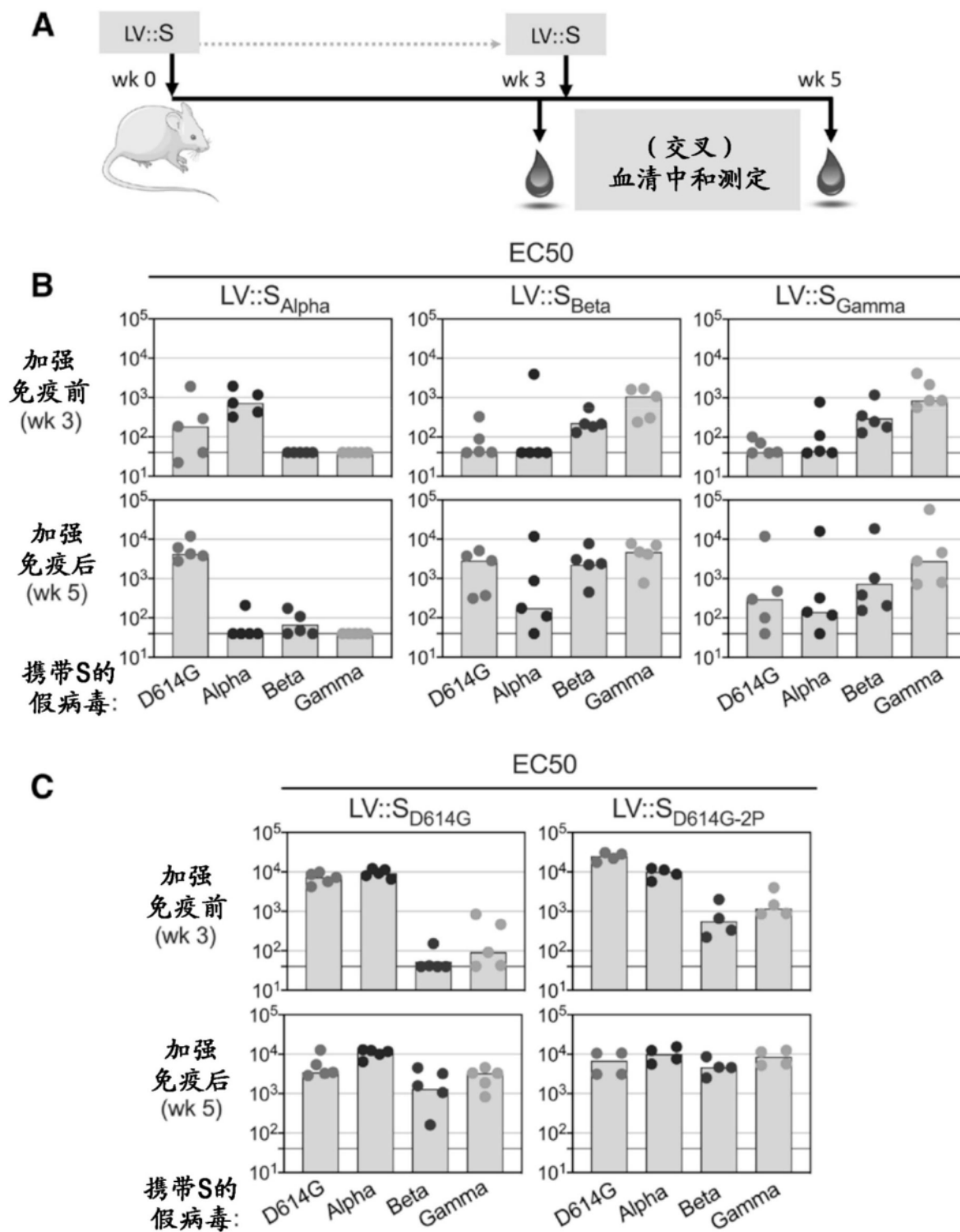


图1

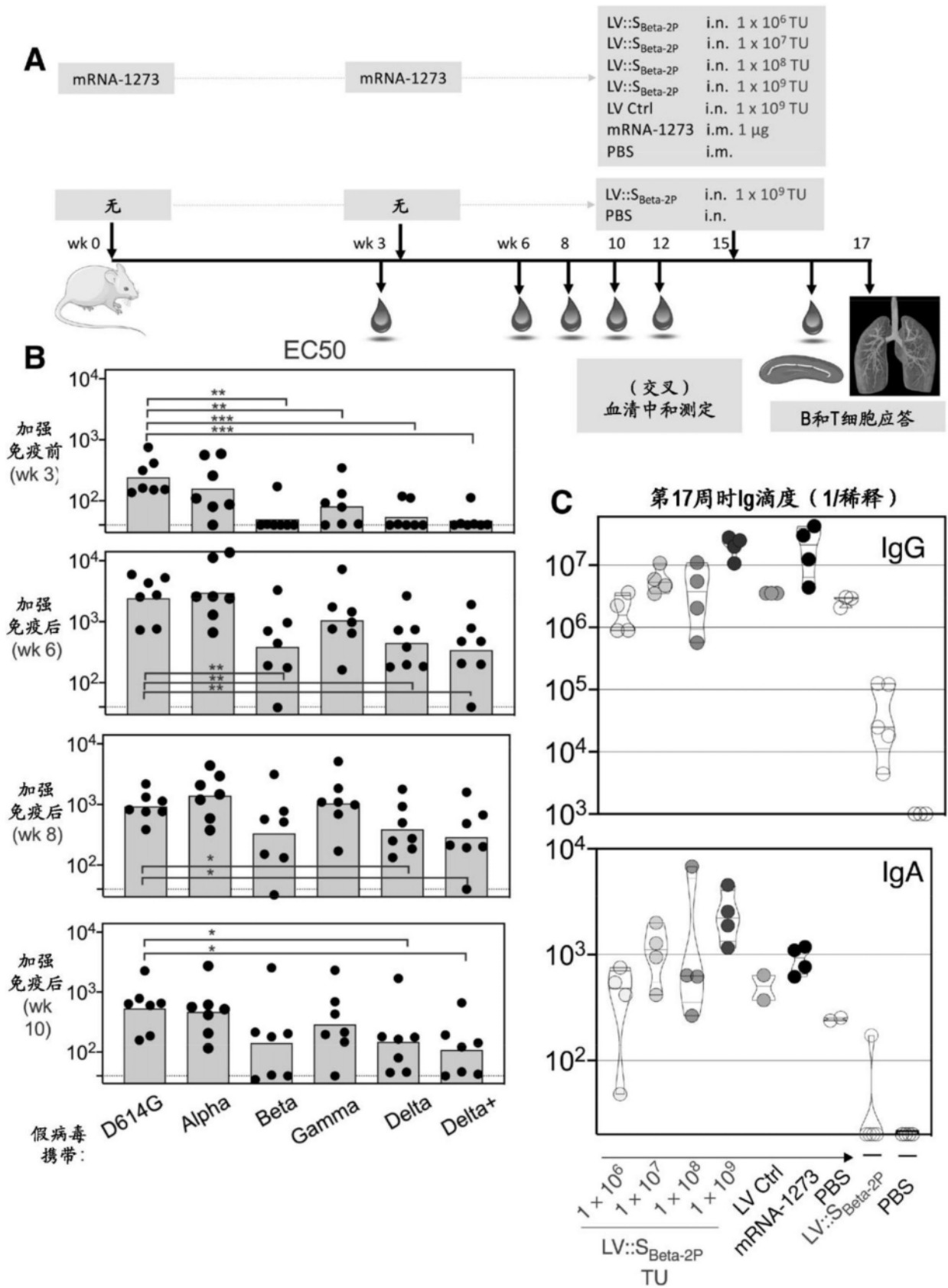


图2

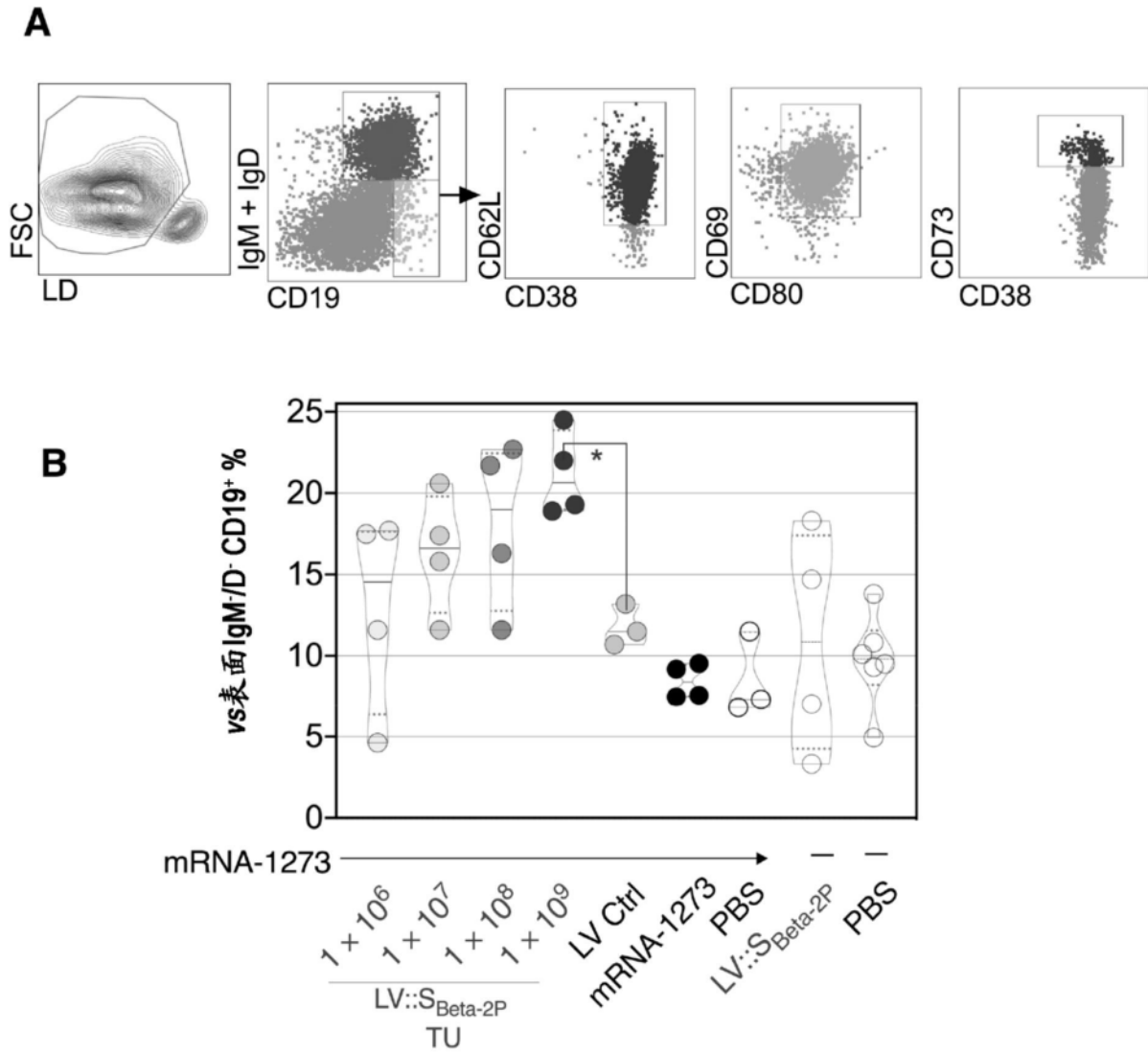


图3

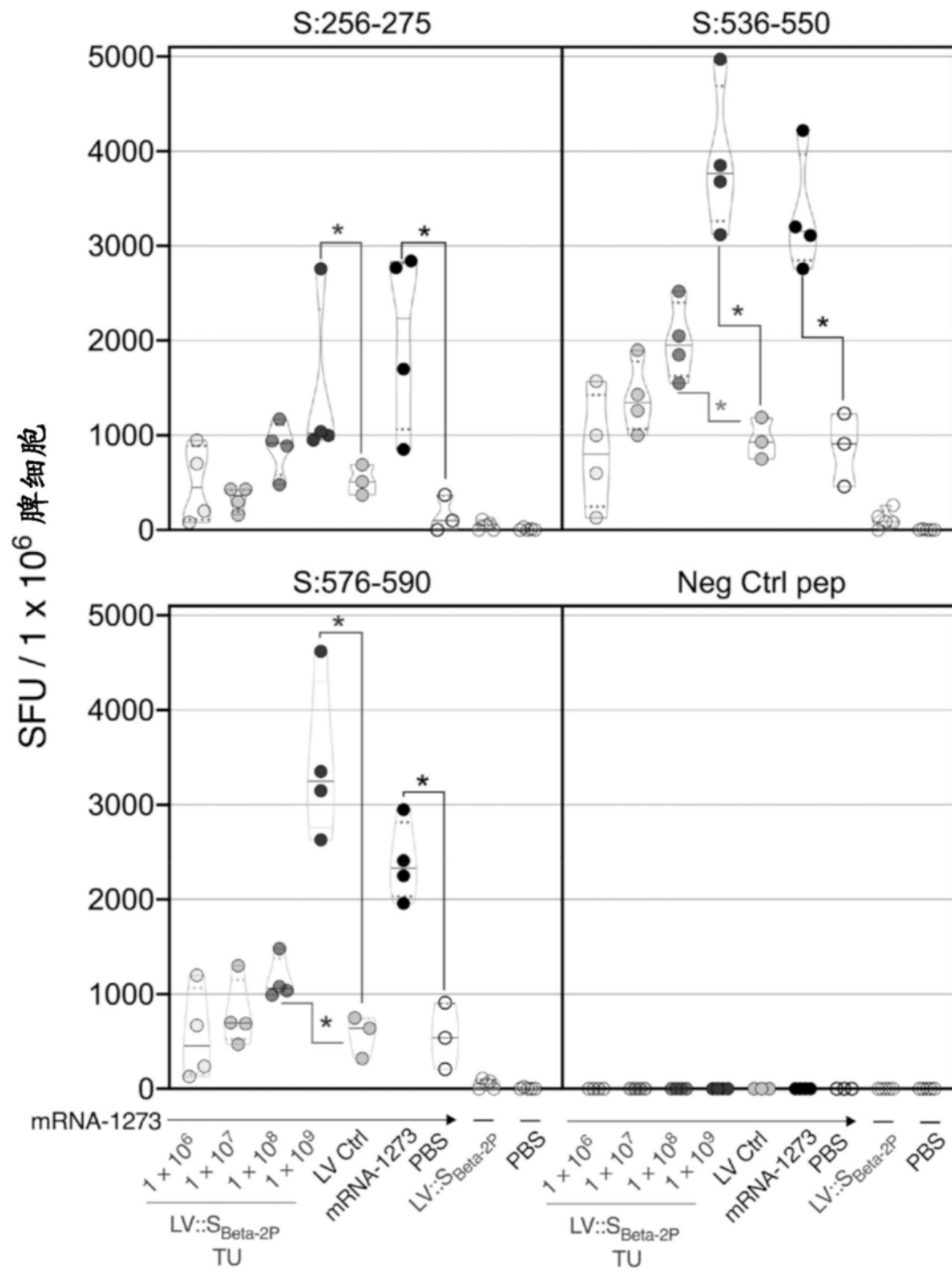


图4

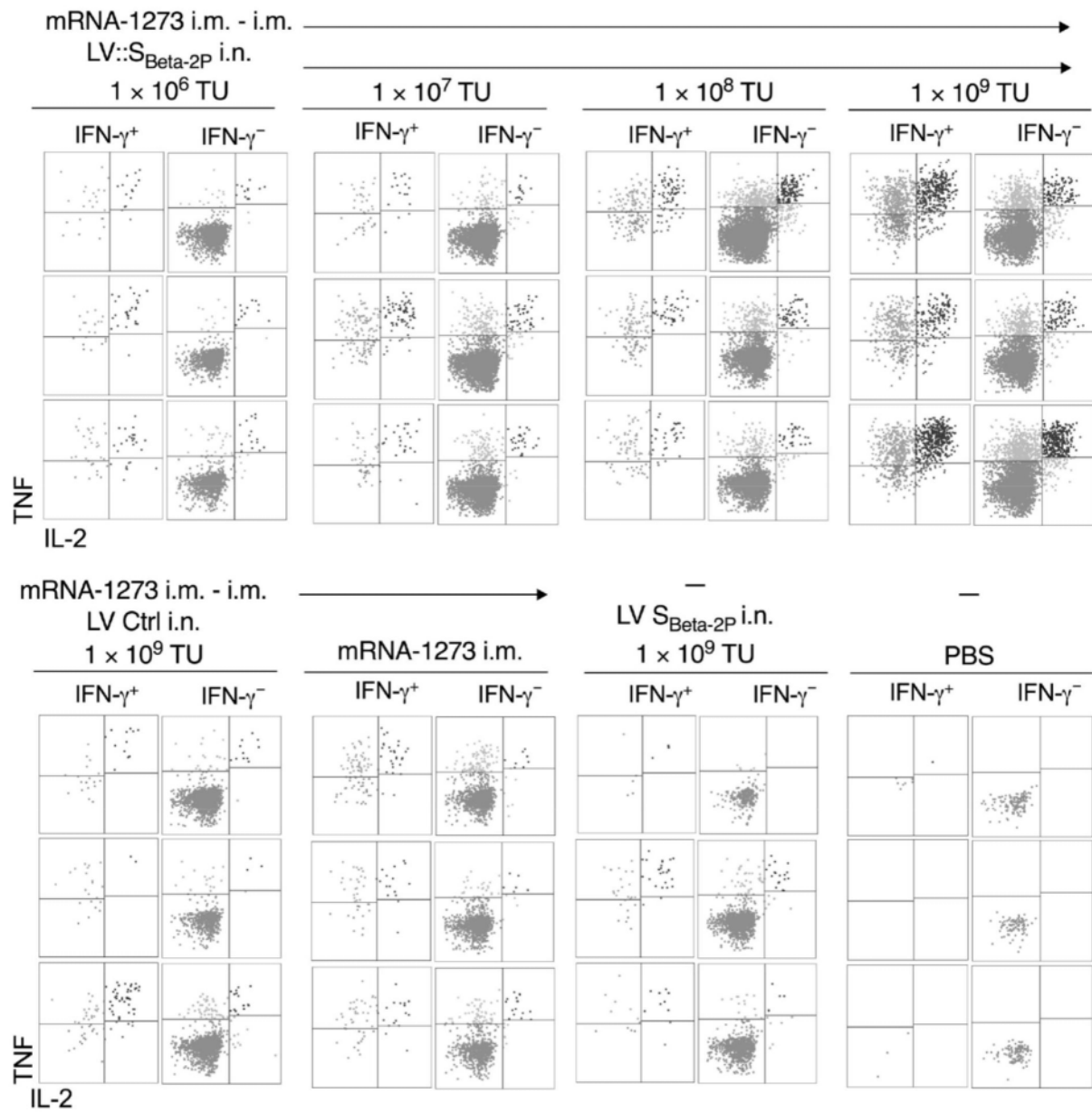


图5

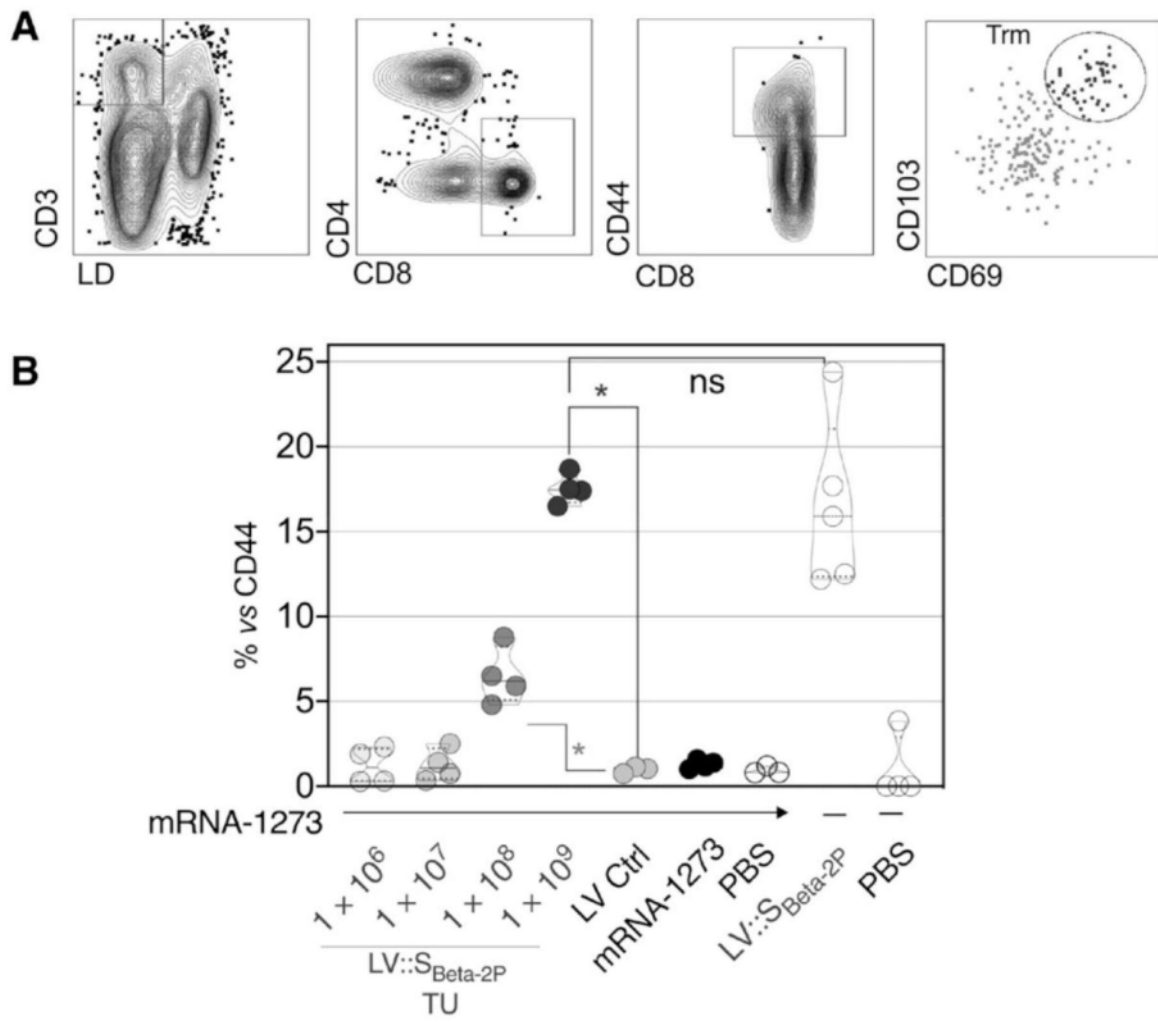


图6

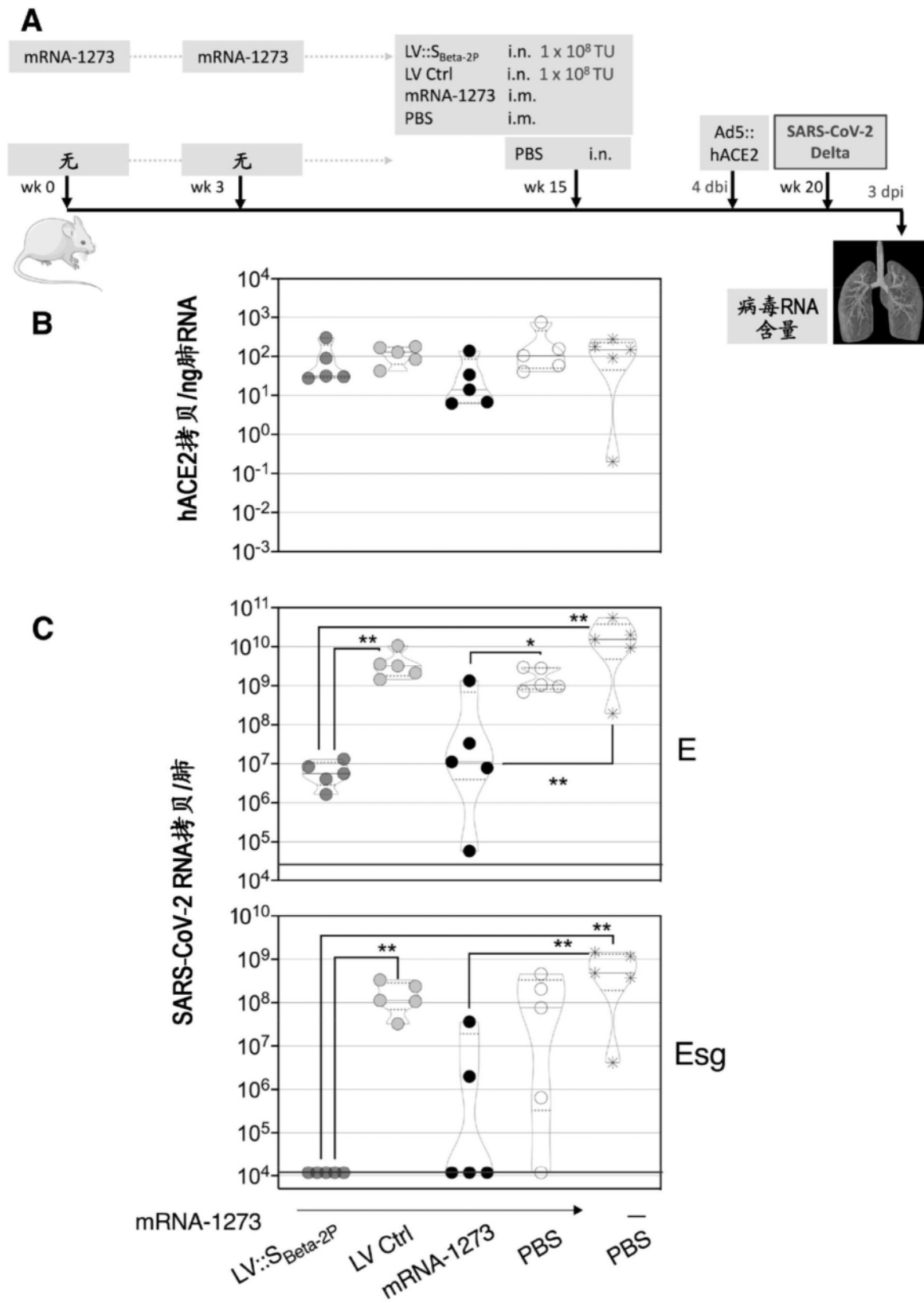


图7

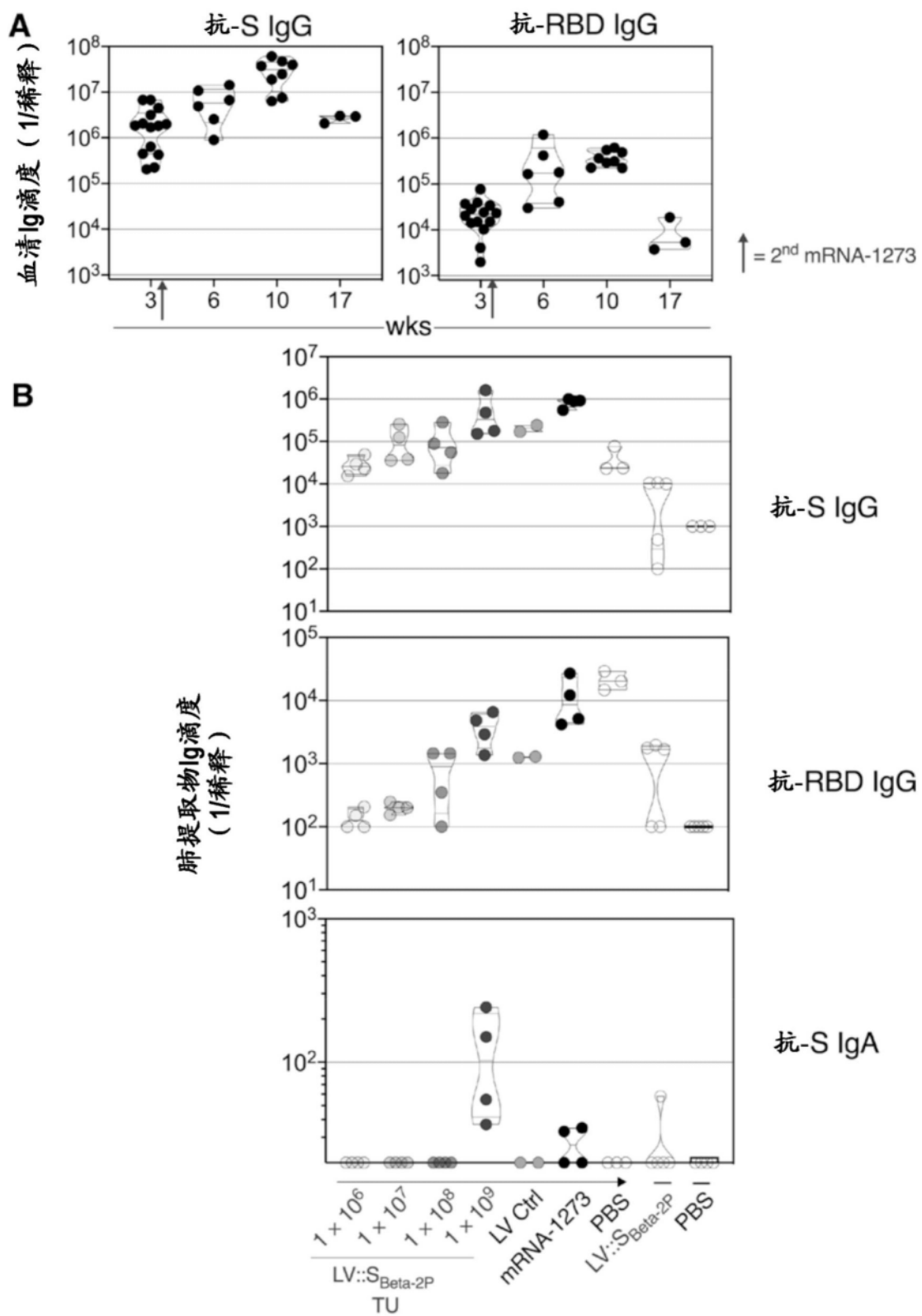


图8

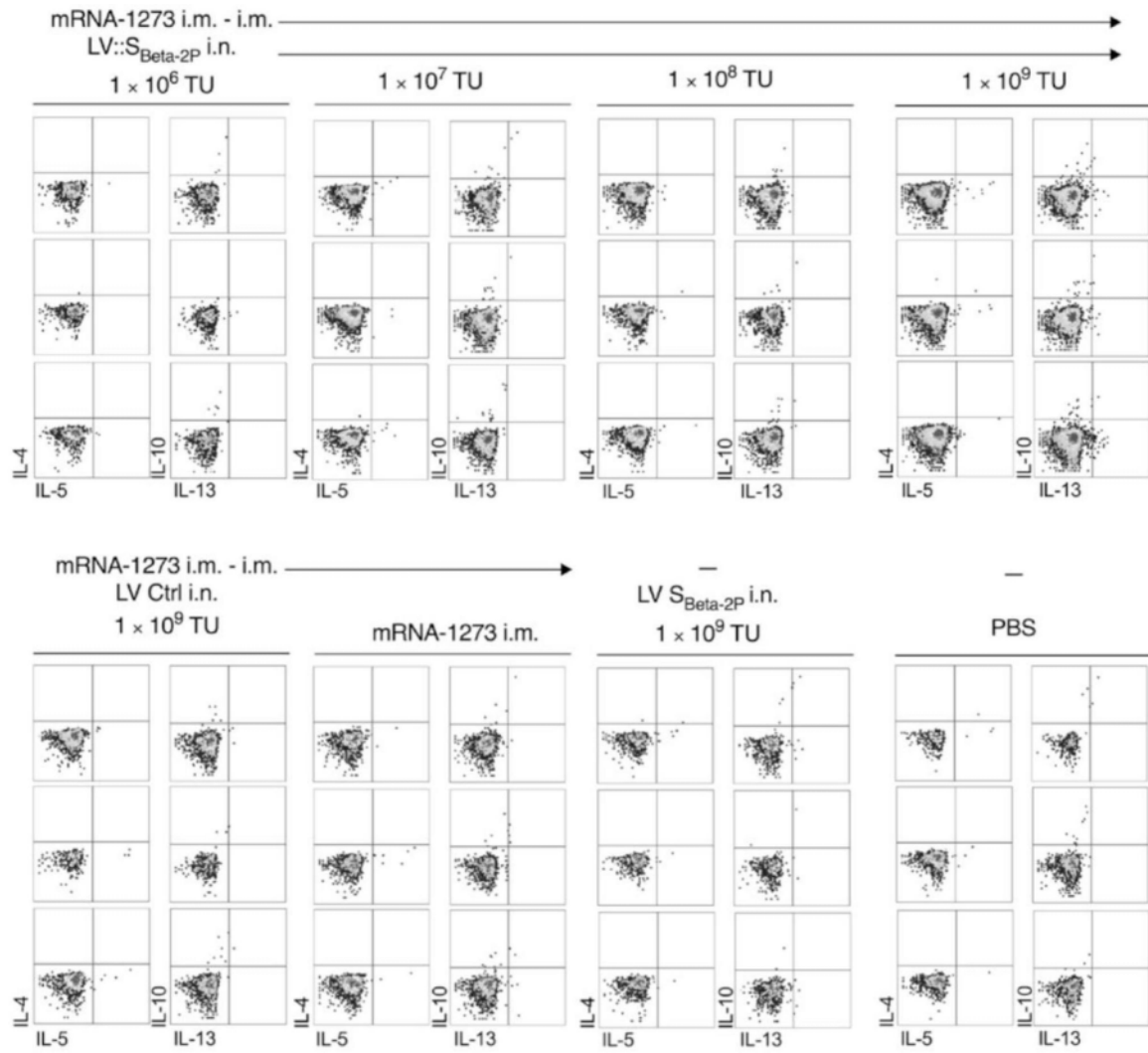


图9

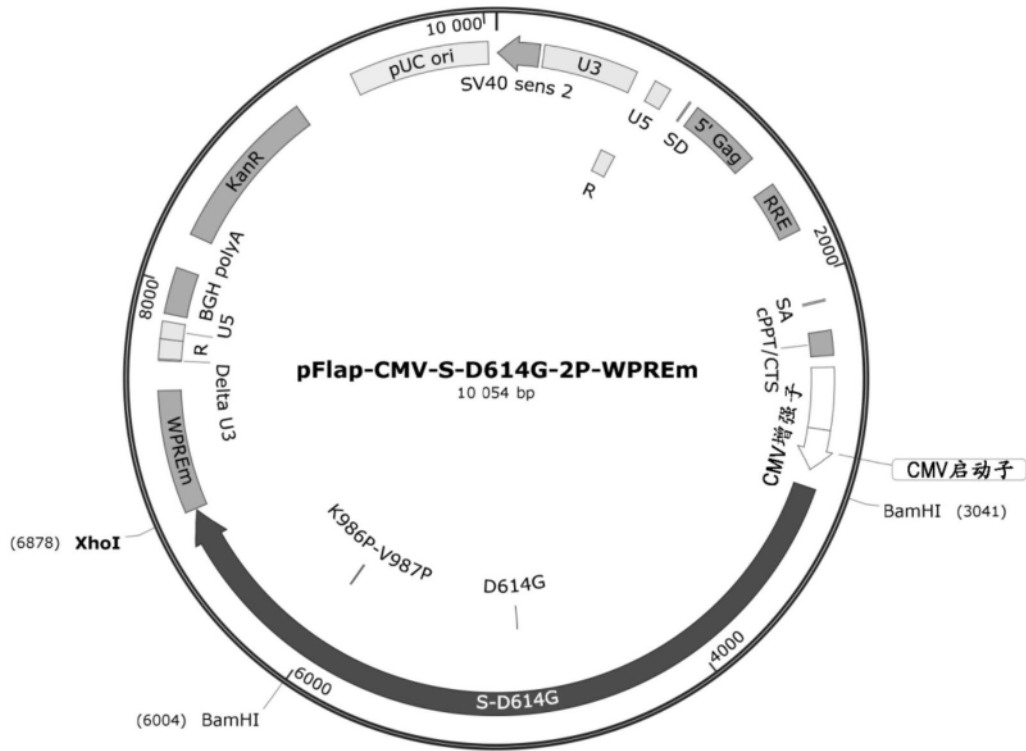


图10A

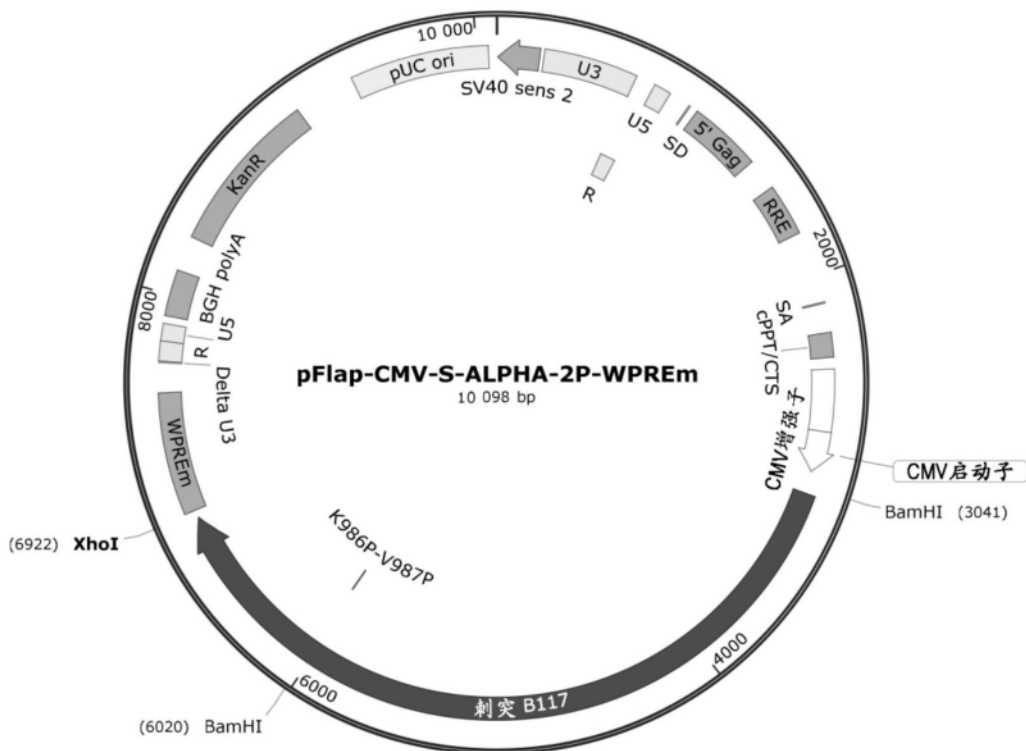


图10B

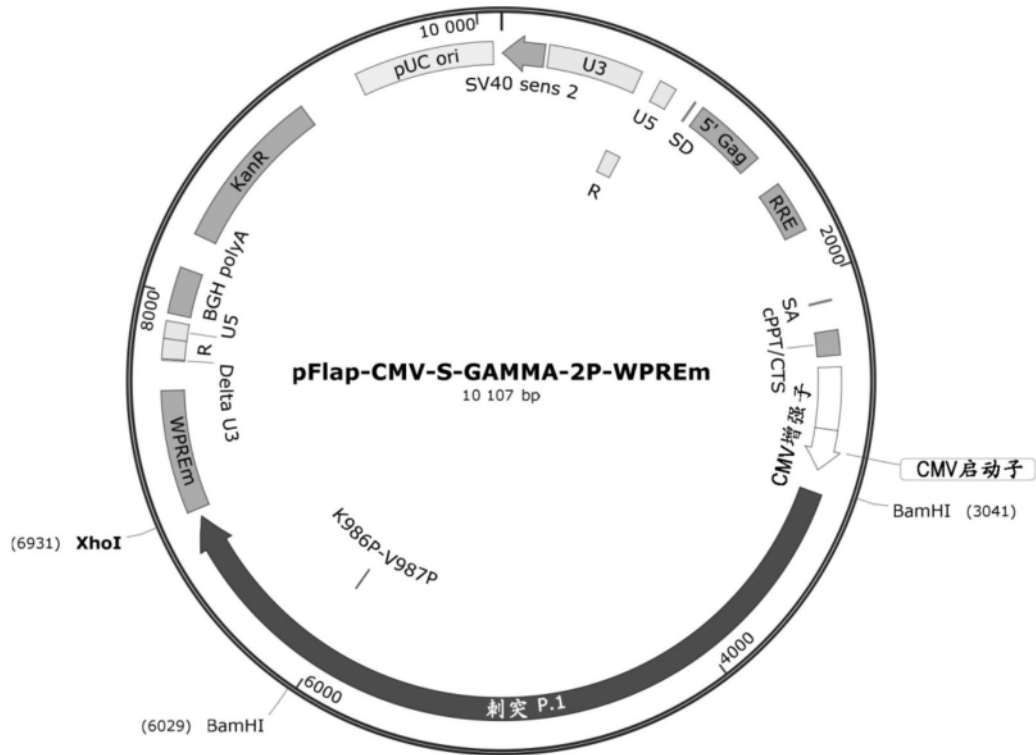


图10C

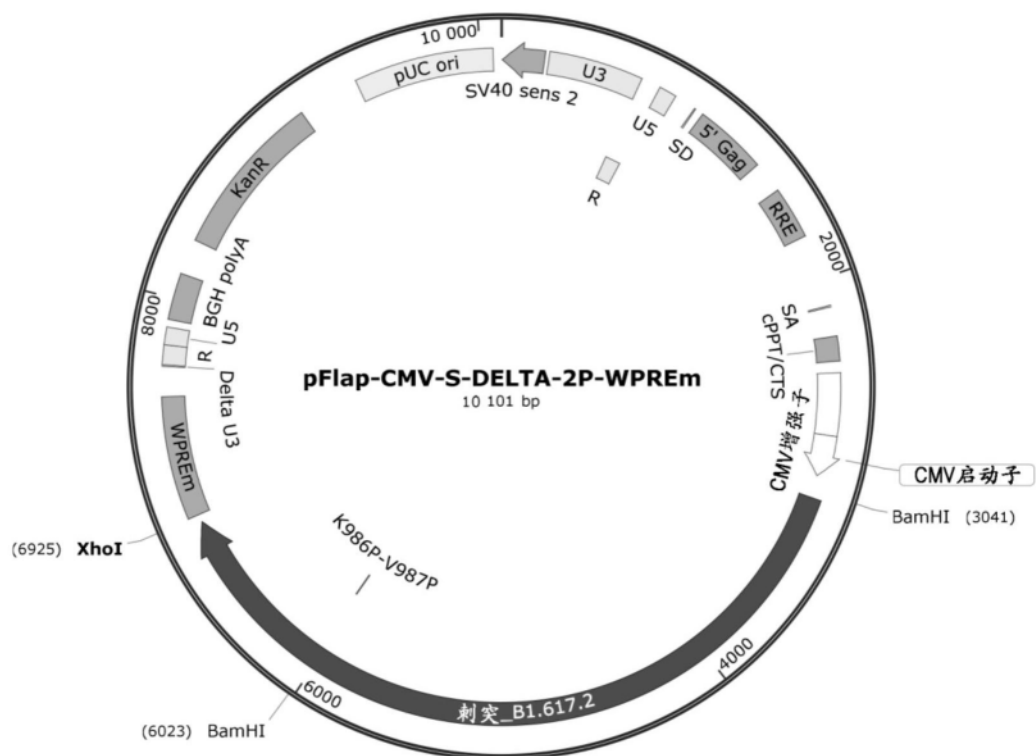


图10D



图10E

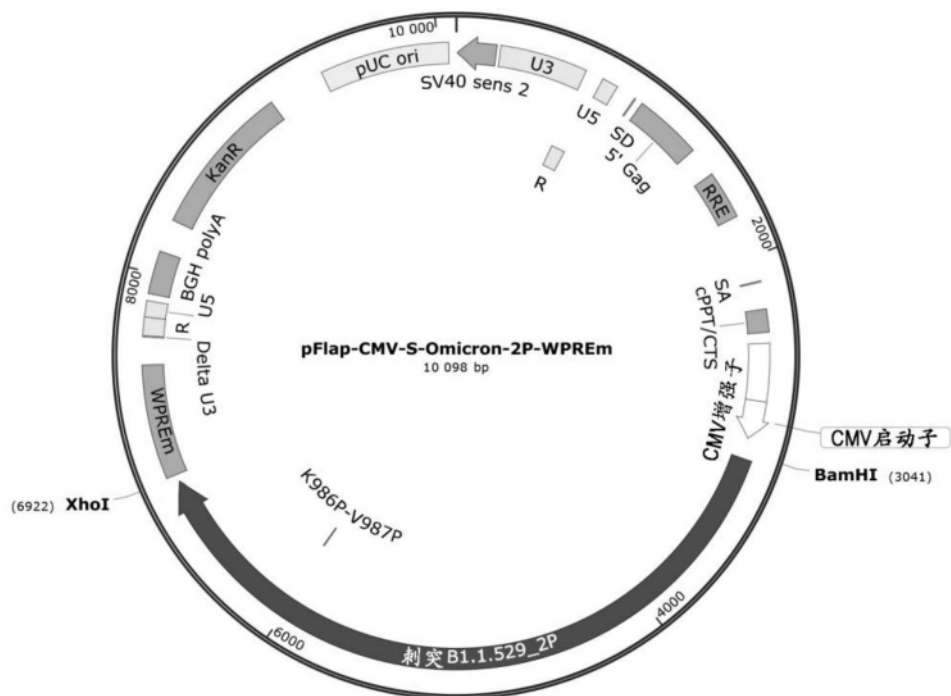


图10F

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSNGTKRFDN
PVLFPNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLIVNNATNVVIVKCEFQFCNDPFLGVYHKNKSWMESEFRVYSS
ANNCTFEYVSQPFMLDLEGKQGNFKNLREFVFNIDGYFKIYKHTPINLVRDLPGGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALH
RSYLTPGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGITDAVDCALDPLSETKCTLSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIV
RFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRRKRISNCVADYSVLNSASFSTFKCYGVSPKLNLCFTNVYADSFVIRGDEV
QIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNC
YFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRD
IADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAG
CLIGAEHVNNSECDIPGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNIAIPTNFTISVTTEILPVSM
KTSVDCTMYICGDSTECNLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSK
RSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIP
FAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVL
NDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLSMFPQSAPH
GVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHGDKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVY
DPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGF
IAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLGKVKLHYT*

图11A

MFVFLVLLPLVSSQCVNLITRTQSYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAISGTNGTKRFDNPVLPFN
DGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLIVNNATNVVIVKCEFQFCNDPFLDVYHKNKSWMESEFRVYSSANNCTF
EYVSQPFMLDLEGKQGNFKNLREFVFNIDGYFKIYKHTPINLGRDLPGGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTPG
DSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGITDAVDCALDPLSETKCTLSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITN
LCPFDEVFNATRFASVYAWNRRKRISNCVADYSVLNFAFFAFKCYGVSPKLNLCFTNVYADSFVIRGNEVSQIAPGQT
GNIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNKLDSKVGGNYNYRYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGNKPCNGVAGVNCYFPLQSY
GFRPTYGVGHQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDA
VRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEY
VNNSYECDIPIGAGICASYQTQTKSHRRARSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNIAIPTNFTISVTTEILPVSMKTSVDC
TMYICGDSTECNLLQYGSFCTQLKRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKYFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLL
FNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQM
AYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNHNAAQALNTLVKQLSSKFGAISSVLNDILSRL
DKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLSMFPQSAPHGVVFLH
VTYVPAQEKNFTTAPAICHGDKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPE
LDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAI
VMVTIMLCCMTSCCCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLGKVKLHYT*

图11B

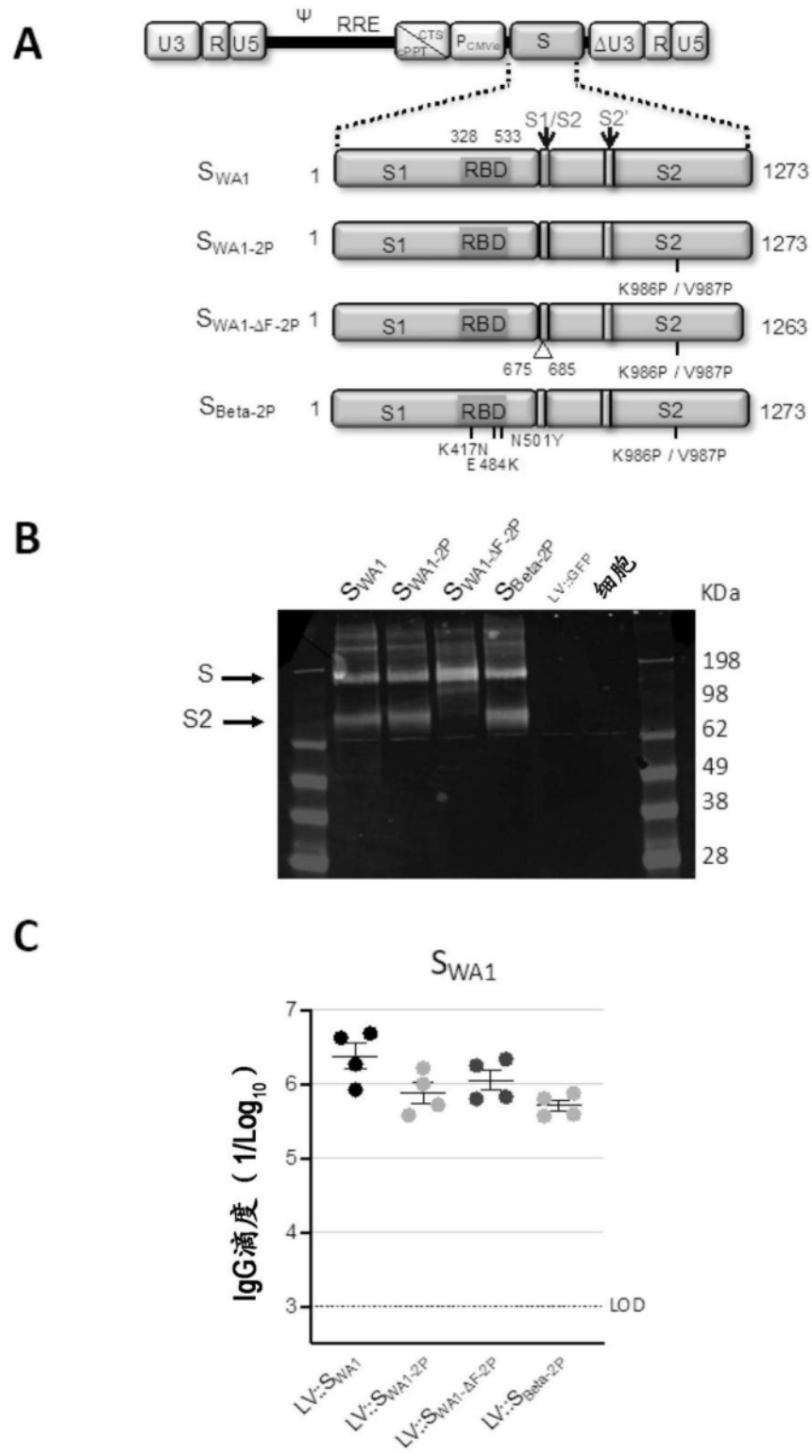


图12

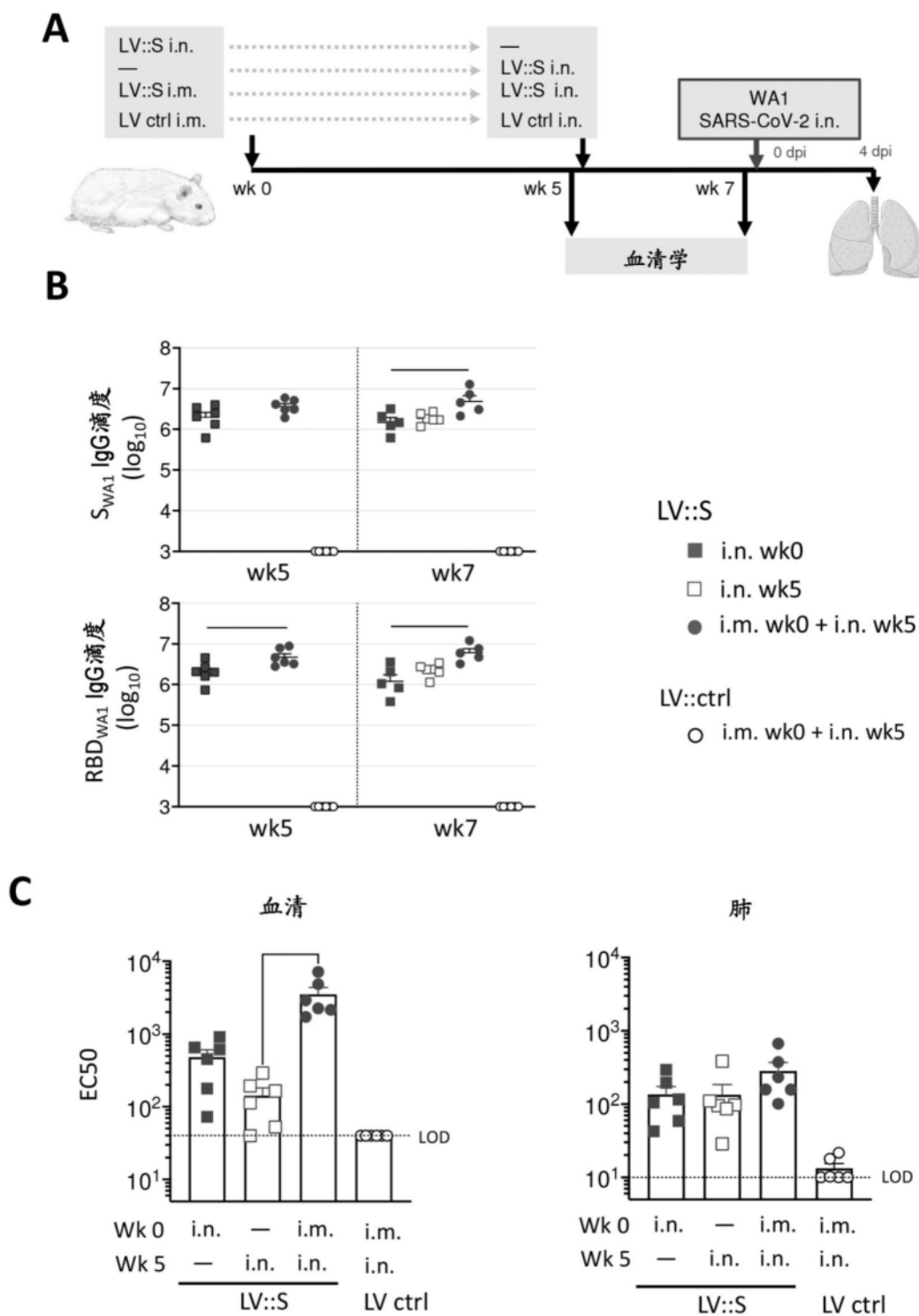


图13

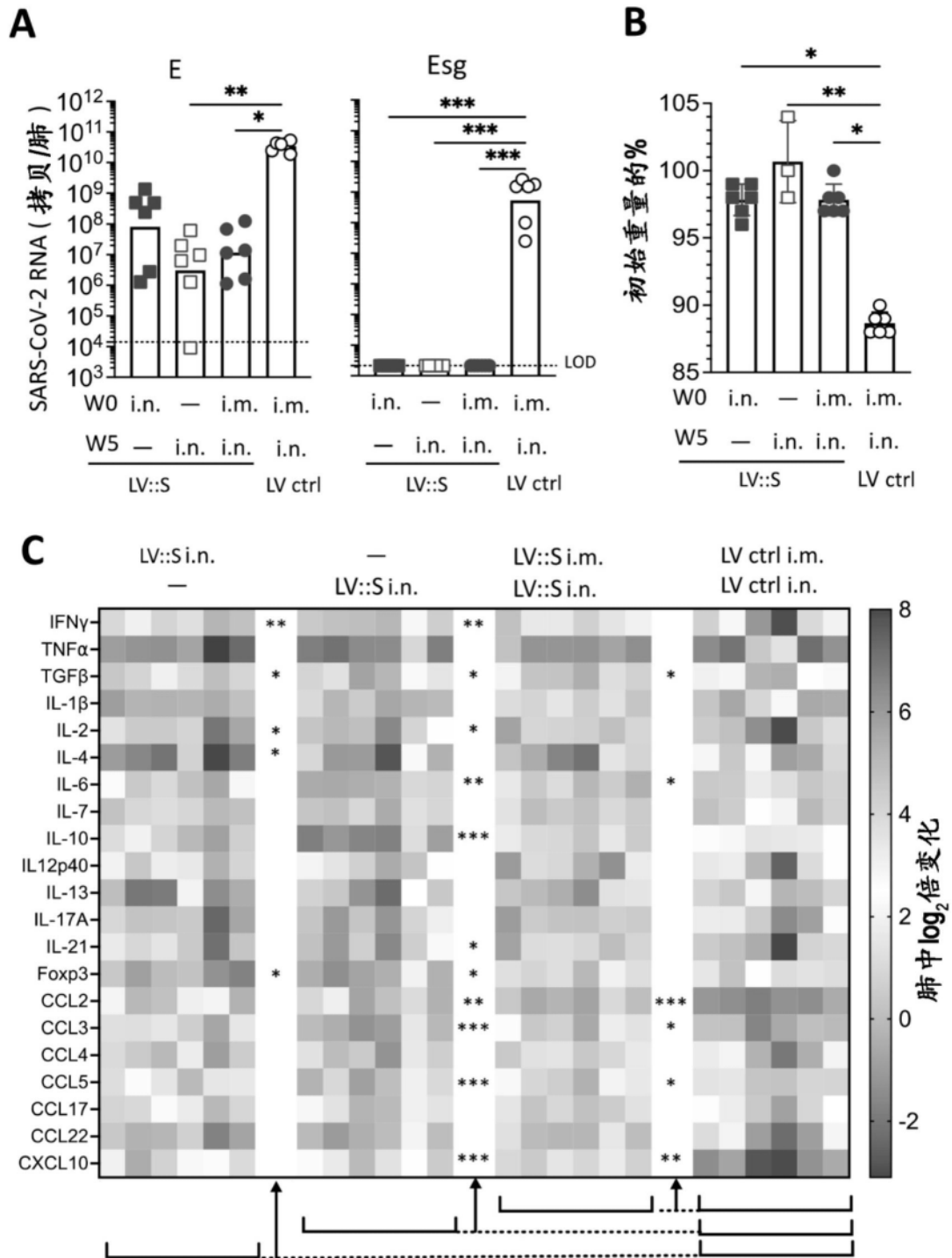


图14

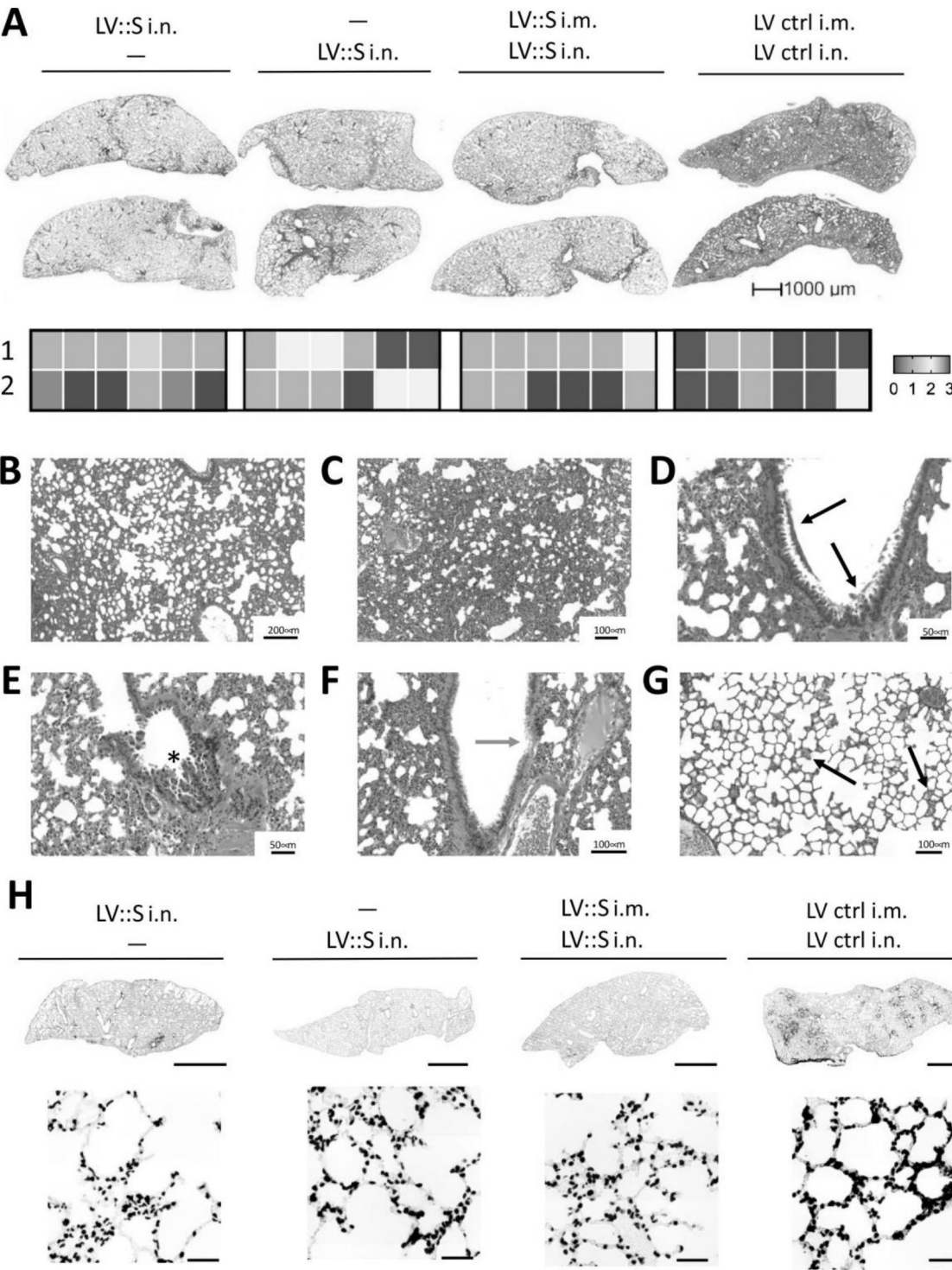


图15

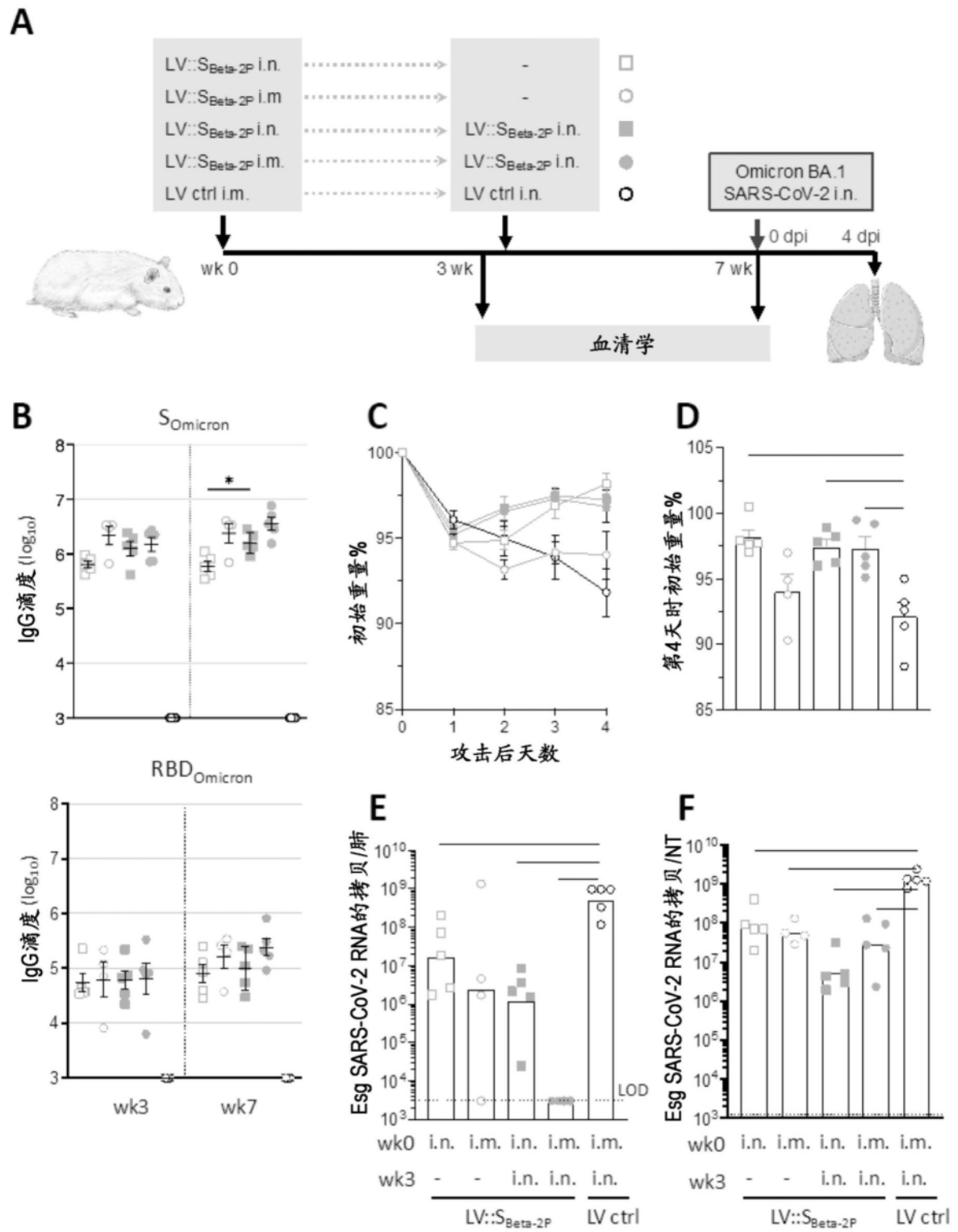


图16

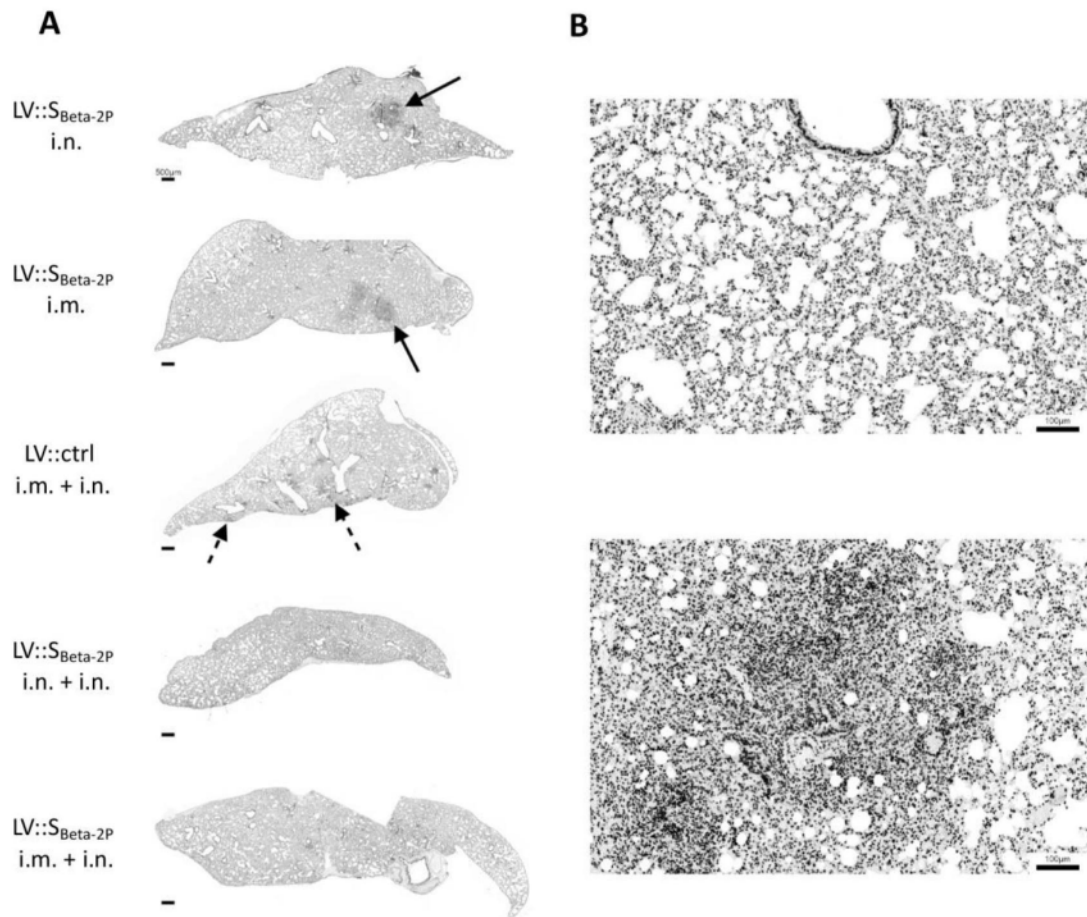


图17

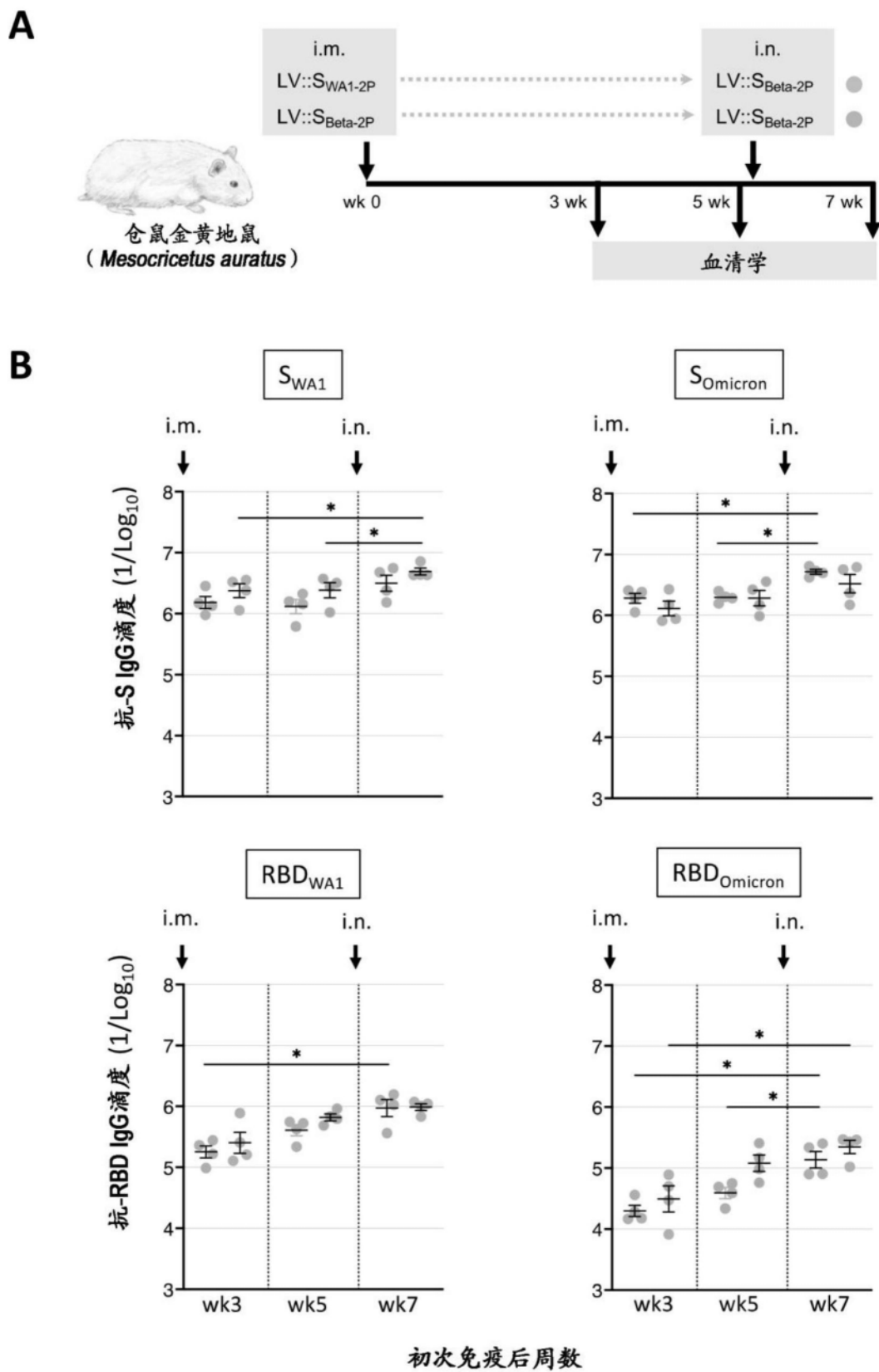


图18

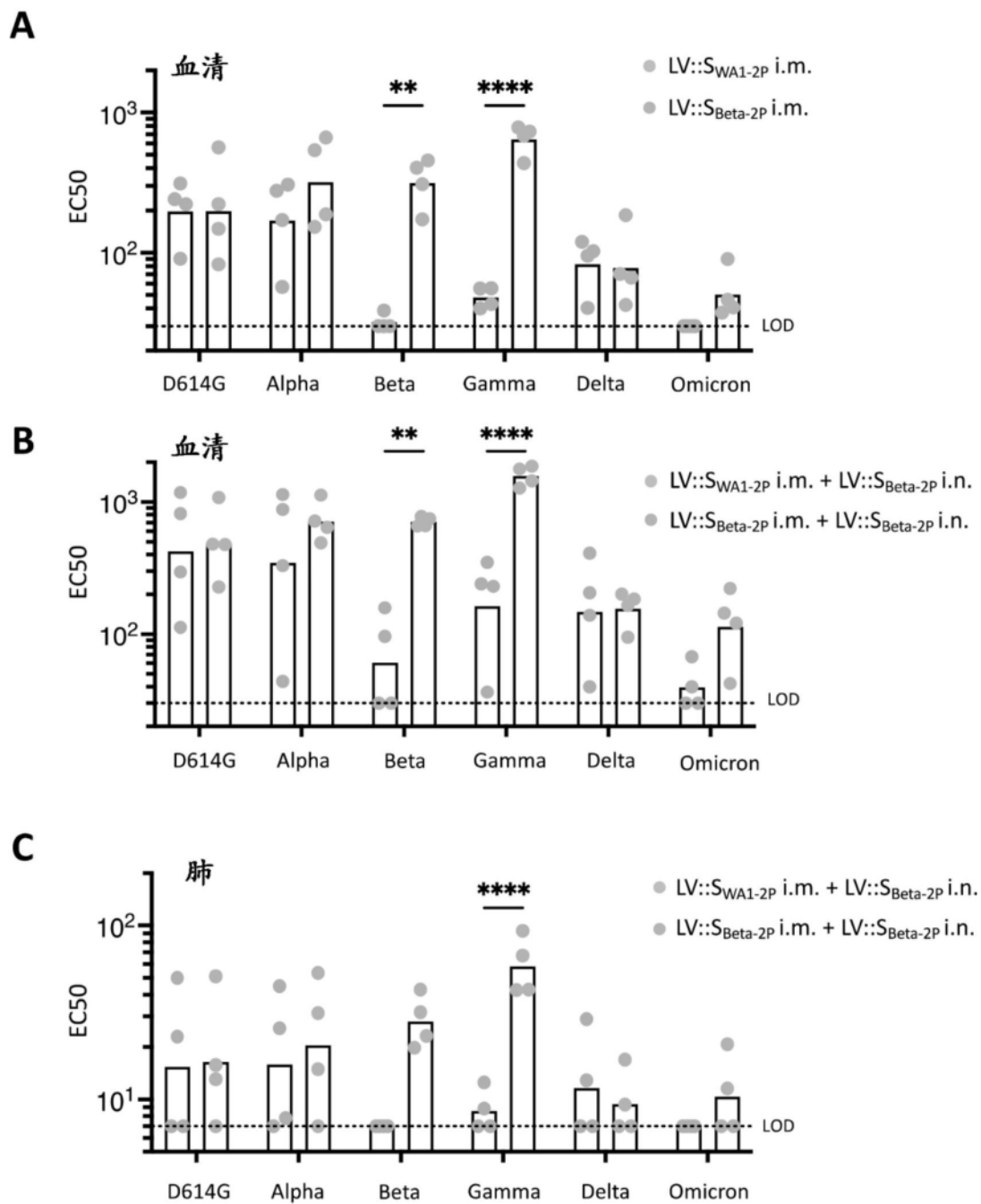


图19

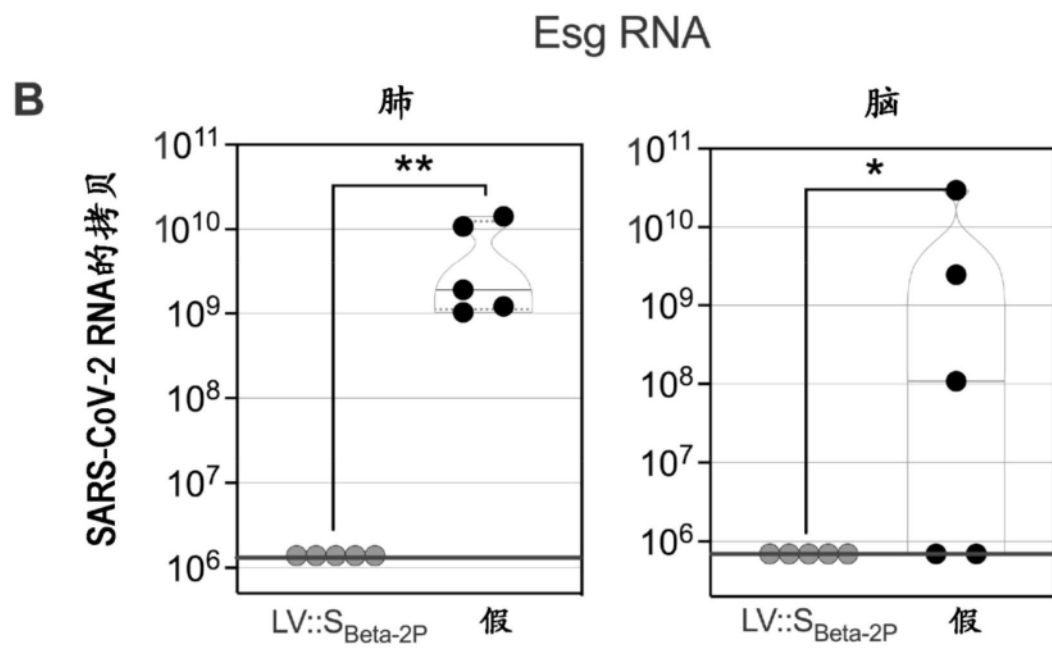
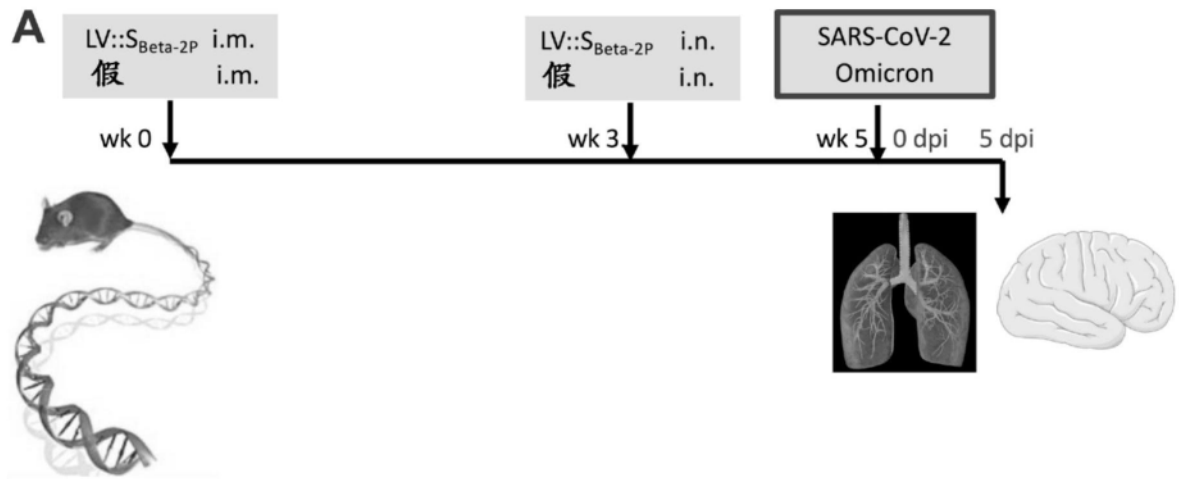


图20