(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116437951 A
(43)申请公布日 2023.07.14

(21)申请号 202180049931.9

(22)申请日 2021.05.19

(30)优先权数据
63/027,283 2020.05.19 US
63/047,789 2020.07.02 US
63/139,292 2021.01.19 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.01.18

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/033275 2021.05.19

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/236854 EN 2021.11.25

(71)申请人 磨石生物公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 R·耶冷斯凯 高明德 M·钟
J·赫尔贝特 K·朱斯
C·D·斯卡伦 L·吉特林
A·R·拉帕波特

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 陈文平 袁泉

(51)Int.Cl.
A61K 39/39(2006.01)

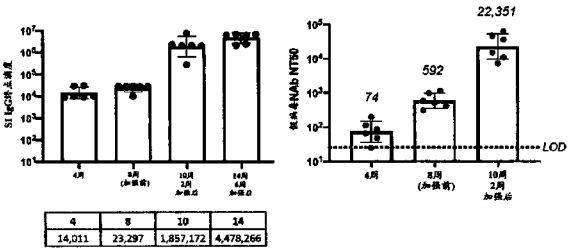
权利要求书27页 说明书145页
序列表（电子公布） 附图76页

(54)发明名称

SARS-COV-2疫苗

(57)摘要

本文公开了包含SARS-CoV-2 MHC表位编码盒和/或全长SARS-CoV-2蛋白的疫苗组合物。还公开了与所述组合物相关的核苷酸、细胞和方法，包括它们作为疫苗的用途。



4	8	10	14
14,011	23,297	1,857,172	4,478,266

CN 116437951 A

1.一种用于递送抗原表达系统的组合物,所述组合物包含:

所述抗原表达系统,其中所述抗原表达系统包含:

(a)任选地,一种或多种载体,所述一种或多种载体包含:

载体骨架,其中所述骨架包含:

(i)至少一种启动子核苷酸序列,和

(ii)至少一种聚腺苷酸化(聚(A))序列;和

(b)抗原盒,任选地其中所述抗原盒在存在时被插入到所述载体骨架中,并且其中所述抗原盒包含:

(i)至少一种编码免疫原性多肽的SARS-CoV-2衍生核酸序列,其中所述免疫原性多肽包含:

-至少一个包含如表A中所示多肽序列的MHC I类表位,

-至少一个包含如表B中所示多肽序列的MHC II类表位,

-至少一个包含如表C中所示多肽序列的MHC I类表位,任选地其中所述至少一个MHC I表位存在于如SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58所示的串联多肽序列中,

-至少一种如表10中所示的多肽序列或其含表位的片段,任选地其中所述至少一种多肽序列存在于如SEQ ID NO:92所示的串联多肽序列中,

-至少一种如表12A、表12B或表12C中所示的多肽序列,或其含表位的片段,任选地其中所述至少一种多肽序列存在于包含表12A、表12B或表12C中所示的所述序列中的每一个的串联多肽中,任选地其中所述串联多肽包含表12A、表12B或表12C中所示的序列顺序,

-至少一种包含如表A和/或表C所示多肽序列的MHC I类表位或包含如表B所示多肽序列的MHC II类表位,其中编码的SARS-CoV-2免疫原性多肽在SARS-CoV-2与除SARS-CoV-2以外的冠状病毒物种和/或亚种之间保守,任选地其中所述除SARS-CoV-2以外的冠状病毒物种和/或亚种是严重急性呼吸系统综合征(SARS)和/或中东呼吸系统综合征(MERS),

-一个或多个验证表位和/或至少4、5、6或7个预测表位,其中至少85%、90%或95%的群体携带至少一种经验证呈递所述一个或多个验证表位中的至少一者的HLA和/或至少一种经预测呈递所述至少4、5、6或7个预测表位中的每一者的HLA,

-SARS-CoV-2刺突蛋白,其包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段,任选地其中所述刺突多肽包含关于SEQ ID NO:59的D614G突变,并且任选地其中所述刺突多肽由SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:87所示的核苷酸序列编码,

-SARS-CoV-2修饰的刺突蛋白,其包含选自由以下组成的组的突变:关于如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列的刺突R682突变、刺突R815突变、刺突K986P突变、刺突V987P突变及其组合,并且任选地其中所述修饰的刺突蛋白包含如SEQ ID NO:60或SEQ ID NO:90所示的多肽序列或其含表位的片段,

-SARS-CoV-2膜蛋白,其包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段,

-SARS-CoV-2核衣壳蛋白,其包含如SEQ ID NO:62所示的核衣壳多肽序列或其含表位的片段,

-SARS-CoV-2包膜蛋白,其包含如SEQ ID NO:63所示的包膜多肽序列或其含表位的片段,

-上述任一项的变体,其包含在1%或更多的SARS-CoV-2亚型中发现的突变,任选地其中所述变体包含表1中所示的SARS-CoV-2变体,和/或任选地其中所述变体包括包含关于如SEQ ID NO:59所示刺突多肽序列的刺突D614G突变的SARS-CoV-2变体刺突蛋白、对应于任选地包含如SEQ ID NO:112所示的刺突多肽序列的B.1.351SARS-CoV-2分离株的SARS-CoV-2变体刺突蛋白,或对应于任选地包含如SEQ ID NO:110所示的刺突多肽序列的B.1.1.7 SARS-CoV-2分离株的SARS-CoV-2变体刺突蛋白,

-或其组合;并且

其中所述免疫原性多肽任选地包含N末端接头和/或C末端接头;

(ii)任选地,可操作地连接到所述SARS-CoV-2衍生核酸序列的第二启动子核苷酸序列;和

(iii)任选地,至少一种MHC II类表位编码核酸序列;

(iv)任选地,至少一种编码GPGPG氨基酸接头序列(SEQ ID NO:56)的核酸序列;和

(v)任选地,至少一种第二聚(A)序列,其中所述第二聚(A)序列是所述载体骨架的原生聚(A)序列或外源聚(A)序列,任选地其中所述外源聚(A)序列包含SV40聚(A)信号序列或牛生长激素(BGH)聚(A)信号序列。

2.一种基于抗原的疫苗,所述基于抗原的疫苗包含:

(i)至少一种SARS-CoV-2衍生的免疫原性多肽,其中所述免疫原性多肽包含:

-至少一个包含如表A中所示多肽序列的MHC I类表位,

-至少一个包含如表B中所示多肽序列的MHC II类表位,

-至少一个包含如表C中所示多肽序列的MHC I类表位,任选地其中所述至少一个MHC I表位存在于如SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58所示的串联多肽序列中,

-至少一种如表10中所示的多肽序列或其含表位的片段,任选地其中所述至少一种多肽序列存在于如SEQ ID NO:92所示的串联多肽序列中,

-至少一种如表12A、表12B或表12C中所示的多肽序列,或其含表位的片段,任选地其中所述至少一种多肽序列存在于包含表12A、表12B或表12C中所示的每个序列的串联多肽中,任选地其中所述串联多肽包含表12A、表12B或表12C中所示的序列顺序,

-至少一种包含如表A和/或表C所示多肽序列的MHC I类表位或包含如表B所示多肽序列的MHC II类表位,其中编码的SARS-CoV-2免疫原性多肽在SARS-CoV-2与除SARS-CoV-2以外的冠状病毒物种和/或亚种之间保守,任选地其中所述除SARS-CoV-2以外的冠状病毒物种和/或亚种是严重急性呼吸系统综合征(SARS)和/或中东呼吸系统综合征(MERS),

-一个或多个验证表位和/或至少4、5、6或7个预测表位,其中至少85%、90%或95%的群体携带至少一种经验证呈递所述一个或多个验证表位中的至少一者的HLA和/或至少一种经预测呈递所述至少4、5、6或7个预测表位中的每一者的HLA,

-SARS-CoV-2刺突蛋白,其包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段,任选地其中所述刺突多肽包含关于SEQ ID NO:59的D614G突变,并且任选地其中所述刺突多肽由SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:87所示的核苷酸序列编码,

-SARS-CoV-2修饰的刺突蛋白,其包含选自由以下组成的组的突变:关于如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列的刺突R682突变、刺突R815突变、刺突K986P突变、刺突V987P突变及

其组合,并且任选地其中所述修饰的刺突蛋白包含如SEQ ID NO:60或SEQ ID NO:90所示的多肽序列或其含表位的片段,

-SARS-CoV-2膜蛋白,其包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段,

-SARS-CoV-2核衣壳蛋白,其包含如SEQ ID NO:62所示的核衣壳多肽序列或其含表位的片段,

-SARS-CoV-2包膜蛋白,其包含如SEQ ID NO:63所示的包膜多肽序列或其含表位的片段,

-上述任一项的变体,其包含在1%或更多的SARS-CoV-2亚型中发现的突变,任选地其中所述变体包含表1中所示的SARS-CoV-2变体,和/或任选地其中所述变体包括包含关于如SEQ ID NO:59所示刺突多肽序列的刺突D614G突变的SARS-CoV-2变体刺突蛋白、对应于任选地包含如SEQ ID NO:112所示的刺突多肽序列的B.1.351SARS-CoV-2分离株的SARS-CoV-2变体刺突蛋白,或对应于任选地包含如SEQ ID NO:110所示的刺突多肽序列的B.1.1.7 SARS-CoV-2分离株的SARS-CoV-2变体刺突蛋白,

-或其组合;并且

其中所述免疫原性肽任选地包含N末端接头和/或C末端接头

(ii)任选地,至少一种MHC II类抗原;和

(iii)任选地,至少一种GPGPG氨基酸接头序列(SEQ ID NO:56)。

3.一种用于递送抗原表达系统的组合物,所述组合物包含:

所述抗原表达系统,

其中所述抗原表达系统包含:

(a)任选地,一种或多种载体,所述一种或多种载体包含:

载体骨架,其中所述骨架包含:

(i)至少一种启动子核苷酸序列,和

(ii)至少一种聚腺苷酸化(聚(A))序列;和

(b)抗原盒,任选地其中所述抗原盒在存在时被插入到所述载体骨架中,并且其中所述抗原盒包含:

(i)至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20种或更多种SARS-CoV-2衍生的编码免疫原性多肽的核酸序列,其中所述免疫原性多肽包含:

(A)包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白和包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2膜蛋白,任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:66或SEQ ID NO:67所示的序列,

(B)包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白和至少一个包含如表C中所示多肽序列的MHC I表位,任选地其中所述至少一个MHC I表位存在于如SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58所示的串联多肽序列中,任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:68所示的序列,

(C)包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白,任选地其中所述刺突多肽包含关于SEQ ID NO:59的D614G突变,并且任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:87所示的序列,

(D)至少一个包含如表C中所示的多肽序列的MHC I类表位,任选地其中所述至少一个MHC I表位存在于如SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58所示的串联多肽序列中,任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:64或SEQ ID NO:65所示的序列,

(E)SARS-CoV-2修饰的刺突蛋白,其包含选自由以下组成的组的突变:关于如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列的刺突D614G突变、刺突R682V突变、刺突R815N突变、刺突K986P突变、刺突V987P突变及其组合,并且任选地其中所述修饰的刺突蛋白包含如SEQ ID NO:60或SEQ ID NO:90所示的多肽序列或其含表位的片段,任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:70或SEQ ID NO:89所示的序列,

(F)包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白、包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2膜蛋白、包含如SEQ ID NO:62所示的核衣壳多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2核衣壳蛋白,和包含如SEQ ID NO:63所示的包膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2包膜蛋白,任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:71所示的序列,

(G)包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白、包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2膜蛋白,和包含如SEQ ID NO:62所示的核衣壳多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2核衣壳蛋白,任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:72所示的序列,

(H)包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白、包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2膜蛋白,和包含如SEQ ID NO:63所示的包膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2包膜蛋白,任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:73所示的序列,

(I)至少一个包含如表C中所示的多肽序列的MHC I类表位,任选地其中所述至少一个MHC I表位存在于如SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58所示的串联多肽序列中,包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白,包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2膜蛋白,和包含如SEQ ID NO:63所示的包膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2包膜蛋白,任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:74所示的序列,

(J)包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白,和SARS-CoV-2修饰的刺突蛋白,所述SARS-CoV-2修饰的刺突蛋白包含选自由以下组成的组的突变:关于如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列的刺突D614G突变、刺突R682V突变、刺突R815N突变、刺突K986P突变、刺突V987P突变及其组合,并且任选地其中所述修饰的刺突蛋白包含如SEQ ID NO:60或SEQ ID NO:90所示的多肽序列或其含表位的片段,

(K)包含如SEQ ID NO:90所示的修饰的刺突多肽序列或其含表位的片段和至少一种如表10中所示的多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白,任选地其中所述至少一种多肽序列存在于如SEQ ID NO:92所示的串联多肽序列中,

(L)至少一种如表12A、表12B或表12C中所示的多肽序列或其含表位的片段,任选地其中所述至少一种多肽序列存在于包含表12A、表12B或表12C中所示的每个序列的串联多肽中,任选地其中所述串联多肽包含表12A、表12B或表12C中所示的序列顺序,

(M)至少一个包含如表A和/或表C中所示的多肽序列的MHC I类表位或包含如表B中所

示的多肽序列的MHC II类表位,其中编码的SARS-CoV-2免疫原性多肽在SARS-CoV-2与除SARS-CoV-2以外的冠状病毒物种和/或亚种之间是保守的,任选地其中所述除SARS-CoV-2以外的冠状病毒物种和/或亚种是严重急性呼吸系统综合征(SARS)和/或中东呼吸系统综合征(MERS),或

(N)一个或多个验证表位和/或至少4、5、6或7个预测表位,其中至少85%、90%或95%的群体携带至少一种经验证呈递所述一个或多个验证表位中的至少一者的HLA和/或至少一种经预测呈递所述至少4、5、6或7个预测表位中的每一者的HLA,并且

其中所述SAR-CoV-2 SARS-CoV-2衍生核酸序列中的每一者包含:

(A)任选地,5′接头序列,和

(B)任选地,3′接头序列;

(ii)任选地,与所述SARS-CoV-2衍生核酸序列可操作地连接的第二启动子核苷酸序列;和

(iii)任选地,至少一种MHC II类表位编码核酸序列;

(iv)任选地,至少一种编码GPGPG氨基酸接头序列(SEQ ID NO:56)的核酸序列;和

(v)任选地,至少一种第二聚(A)序列,其中所述第二聚(A)序列是所述载体骨架的原生聚(A)序列或外源聚(A)序列,任选地其中所述外源聚(A)序列包含SV40聚(A)信号序列或牛生长激素(BGH)聚(A)信号序列。

4.一种用于递送抗原表达系统的组合物,所述组合物包含:

所述抗原表达系统,

其中所述抗原表达系统包含:

(a)任选地,一种或多种载体,所述一种或多种载体包含:

载体骨架,其中所述骨架包含:

(i)至少一种启动子核苷酸序列,和

(ii)至少一种聚腺苷酸化(聚(A))序列;和

(b)抗原盒,任选地其中所述抗原盒在存在时被插入到所述载体骨架中,并且其中所述抗原盒包含:

(i)至少18个SARS-CoV-2衍生核酸序列,每个核酸序列编码如表C中所示的免疫原性多肽序列,任选地其中所述免疫原性多肽序列连接在如SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58所示的串联多肽序列中;

(ii)任选地,可操作地连接到所述SARS-CoV-2衍生核酸序列的第二启动子核苷酸序列;和

(iii)任选地,至少一种MHC II类表位编码核酸序列;

(iv)任选地,至少一种编码GPGPG氨基酸接头序列(SEQ ID NO:56)的核酸序列;和

(v)任选地,至少一种第二聚(A)序列,其中所述第二聚(A)序列是所述载体骨架的天然聚(A)序列或外源聚(A)序列,任选地其中所述外源聚(A)序列包含SV40聚(A)信号序列或牛生长激素(BGH)聚(A)信号序列。

5.一种用于递送抗原表达系统的组合物,所述组合物包含:

所述抗原表达系统,

其中所述抗原表达系统包含:

(a)任选地,一种或多种载体,所述一种或多种载体包含:

载体骨架,其中所述骨架包含:

(i)至少一种启动子核苷酸序列,和

(ii)至少一种聚腺苷酸化(聚(A))序列;和

(b)抗原盒,任选地其中所述抗原盒在存在时被插入到所述载体骨架中,并且其中所述抗原盒包含:

(i)至少15个SARS-CoV-2衍生核酸序列,每个核酸序列编码如表10中所示的免疫原性多肽序列,任选地其中所述免疫原性多肽序列连接在如SEQ ID NO:92中所示的串联多肽序列中;

(ii)任选地,可操作地连接到所述SARS-CoV-2衍生核酸序列的第二启动子核苷酸序列;和

(iii)任选地,至少一种MHC II类表位编码核酸序列;

(iv)任选地,至少一种编码GPGPG氨基酸接头序列(SEQ ID NO:56)的核酸序列;和

(v)任选地,至少一种第二聚(A)序列,其中所述第二聚(A)序列是所述载体骨架的天然聚(A)序列或外源聚(A)序列,任选地其中所述外源聚(A)序列包含SV40聚(A)信号序列或牛生长激素(BGH)聚(A)信号序列。

6.一种用于递送抗原表达系统的组合物,其中所述抗原表达系统包含如SEQ ID NO:114所示的核苷酸序列。

7.一种用于递送抗原表达系统的组合物,其中所述抗原表达系统包含如SEQ ID NO:93所示的核苷酸序列。

8.一种用于递送抗原表达系统的组合物,所述组合物包含:

所述抗原表达系统,

其中所述抗原表达系统包含:

(a)一种或多种载体,所述一种或多种载体包含:

载体骨架,其中所述载体骨架包含黑猩猩腺病毒载体,任选地其中所述黑猩猩腺病毒载体是ChAdV68载体,或甲病毒载体,任选地其中所述甲病毒载体是委内瑞拉马脑炎病毒载体,并且其中所述骨架包含:

(i)至少一种启动子核苷酸序列,和

(ii)至少一种聚腺苷酸化(聚(A))序列;和

(b)抗原盒,其中所述抗原盒被插入所述载体骨架中,使得所述抗原盒与所述至少一种启动子核苷酸序列可操作地连接,并且其中所述抗原盒包含:

(i)至少一种SARS-CoV-2衍生的编码免疫原性多肽的核酸序列,其中所述免疫原性多肽包含:

-至少一个包含如表A中所示多肽序列的MHC I类表位,

-至少一个包含如表B中所示多肽序列的MHC II类表位,

-至少一个包含如表C中所示多肽序列的MHC I类表位,任选地其中所述至少一个MHC I表位存在于如SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58所示的串联多肽序列中,

-至少一种如表10中所示的多肽序列或其含表位的片段,任选地其中所述至少一种多肽序列存在于如SEQ ID NO:92所示的串联多肽序列中,

-至少一种如表12A、表12B或表12C中所示的多肽序列，或其含表位的片段，任选地其中所述至少一种多肽序列存在于包含表12A、表12B或表12C中所示的每个序列的串联多肽中，任选地其中所述串联多肽包含表12A、表12B或表12C中所示的序列顺序，

-至少一种包含如表A和/或表C所示多肽序列的MHC I类表位或包含如表B所示多肽序列的MHC II类表位，其中编码的SARS-CoV-2免疫原性多肽在SARS-CoV-2与除SARS-CoV-2以外的冠状病毒物种和/或亚种之间保守，任选地其中所述除SARS-CoV-2以外的冠状病毒物种和/或亚种是严重急性呼吸系统综合征(SARS)和/或中东呼吸系统综合征(MERS)，

-一个或多个验证表位和/或至少4、5、6或7个预测表位，其中至少85％、90％或95％的群体携带至少一种经验证呈递所述一个或多个验证表位中的至少一者的HLA和/或至少一种经预测呈递所述至少4、5、6或7个预测表位中的每一者的HLA，

-SARS-CoV-2刺突蛋白，其包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段，任选地其中所述刺突多肽包含关于SEQ ID NO:59的D614G突变，并且任选地其中所述刺突多肽由SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:87所示的核苷酸序列编码，

-SARS-CoV-2修饰的刺突蛋白，其包含选自由以下组成的组的突变:关于如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列的刺突R682突变、刺突R815突变、刺突K986P突变、刺突V987P突变及其组合，并且任选地其中所述修饰的刺突蛋白包含如SEQ ID NO:60或SEQ ID NO:90所示的多肽序列或其含表位的片段，

-SARS-CoV-2膜蛋白，其包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段，

-SARS-CoV-2核衣壳蛋白，其包含如SEQ ID NO:62所示的核衣壳多肽序列或其含表位的片段，

-SARS-CoV-2包膜蛋白，其包含如SEQ ID NO:63所示的包膜多肽序列或其含表位的片段，

-上述任一项的变体，其包含在1％或更多的SARS-CoV-2亚型中发现的突变，任选地其中所述变体包含表1中所示的SARS-CoV-2变体，和/或任选地其中所述变体包括包含关于如SEQ ID NO:59所示刺突多肽序列的刺突D614G突变的SARS-CoV-2变体刺突蛋白、对应于任选地包含如SEQ ID NO:112所示的刺突多肽序列的B.1.351SARS-CoV-2分离株的SARS-CoV-2变体刺突蛋白，或对应于任选地包含如SEQ ID NO:110所示的刺突多肽序列的B.1.1.7 SARS-CoV-2分离株的SARS-CoV-2变体刺突蛋白，并且任选地其中所述刺突多肽由SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:87所示的核苷酸序列编码，

-或其组合;并且

其中所述免疫原性多肽任选地包含N末端接头和/或C末端接头;

(ii)任选地，可操作地连接到所述SARS-CoV-2衍生核酸序列的第二启动子核苷酸序列;和

(iii)任选地，至少一种MHC II类表位编码核酸序列;

(iv)任选地，至少一种编码GPGPG氨基酸接头序列(SEQ ID NO:56)的核酸序列;和

(v)任选地，至少一种第二聚(A)序列，其中所述第二聚(A)序列是所述载体骨架的原生聚(A)序列或外源聚(A)序列，任选地其中所述外源聚(A)序列包含SV40聚(A)信号序列或牛生长激素(BGH)聚(A)信号序列。

9.根据权利要求1-8中任一项所述的组合物,其中编码所述免疫原性多肽的所述SARS-CoV-2衍生核酸序列中的一者或多者的有序序列描述于下式,从5′至3′包含:

Pa-(L5b-Nc-L3d)X-(G5e-Uf)Y-G3g

其中P包含所述第二启动子核苷酸序列,其中a=0或1,

N包含所述SARS-CoV-2衍生核酸序列之一,其中c=1,任选地其中每个N编码如表A、表B、表C和/或表10所示的多肽序列,

L5包含所述5′接头序列,其中b=0或1,

L3包含所述3′接头序列,其中d=0或1,

G5包含至少一种编码GPGPG氨基酸接头(SEQ ID NO:56)的核酸序列之一,其中e=0或1,

G3包含编码GPGPG氨基酸接头(SEQ ID NO:56)的至少一种核酸序列之一,其中g=0或1,

U包含所述至少一种MHC II类表位编码核酸序列之一,其中f=1,

X=1至400,其中对于每个X,相应的Nc是SARS-CoV-2衍生核酸序列,并且

Y=0、1或2,其中对于每个Y,相应的Uf是通用的MHC II类表位编码核酸序列,任选地其中所述至少一种通用序列包含破伤风类毒素和PADRE中的至少一者,或MHC II类SARS-CoV-2衍生的表位编码核酸序列。

10.如权利要求9所述的组合物,其中对于每个X,相应的N_c是不同的SARS-CoV-2衍生核酸序列。

11.如权利要求9或10所述的组合物,其中对于每个Y,相应的Uf是不同的MHC II类SARS-CoV-2衍生核酸序列。

12.如权利要求9-11中任一项所述的组合物,其中

b=1,d=1,e=1,g=1,h=1,X=18,Y=2,

(i)所述载体骨架包含ChAdV68载体,a=1,P是CMV启动子,存在至少一种第二聚(A)序列,其中所述第二聚(A)序列是所述载体骨架的外源聚(A)序列,并且任选地其中所述外源聚(A)序列包含SV40聚(A)信号序列或BGH聚(A)信号序列,或(ii)所述载体骨架包含委内瑞拉马脑炎病毒载体,a=0,并且所述抗原盒与内源26S启动子可操作地连接,并且所述至少一种聚腺苷酸化聚(A)序列是由所述骨架提供的至少80个连续A核苷酸的聚(A)序列(SEQ ID NO:27940),

每个N编码长度为7-15个氨基酸的MHC I类表位、MHC II类表位、能够刺激B细胞应答的表位或其组合

L5是编码所述表位的原生N末端氨基酸序列的原生5′接头序列,并且其中所述5′接头序列编码长度至少为3个氨基酸的肽,

L3是编码所述表位的原生C末端氨基酸序列的原生3′接头序列,并且其中所述3′接头序列编码长度为至少3个氨基酸的肽,并且

U是PADRE II类序列和破伤风类毒素MHC II类序列中的每一者。

13.如上述权利要求中任一项所述的组合物,所述组合物还包含纳米微粒递送媒介物。

14.如权利要求13所述的组合物,其中所述纳米微粒递送媒介物是脂质纳米粒子(LNP)。

15.如权利要求14所述的组合物,其中所述LNP包含可电离氨基脂质。

16.如权利要求15所述的组合物,其中所述可电离氨基脂质包含MC3样(二亚油基甲基-4-二甲基氨基丁酸酯)分子。

17.如权利要求13-16中任一项所述的组合物,其中所述纳米微粒递送媒介物包封所述抗原表达系统。

18.如权利要求1-4、9-11或13-17中任一项所述的组合物,其中所述抗原盒整合在所述至少一种启动子核苷酸序列和所述至少一种聚(A)序列之间。

19.如权利要求1-4、9-11或13-18中任一项所述的组合物,其中所述至少一种启动子核苷酸序列与所述SARS-CoV-2衍生核酸序列可操作地连接。

20.如权利要求1-4、9-11或13-19中任一项所述的组合物,其中所述一种或多种载体包含一种或多种+-链RNA载体。

21.如权利要求20所述的组合物,其中所述一种或多种+-链RNA载体包含5′7-甲基鸟苷(m7g)帽。

22.如权利要求20或21所述的组合物,其中所述一种或多种+-链RNA载体是通过体外转录产生的。

23.如权利要求1-4、9-11或13-22中任一项所述的组合物,其中所述一种或多种载体在哺乳动物细胞内自我复制。

24.如权利要求1-4、9-11或13-23中任一项所述的组合物,其中所述骨架包含奥拉病毒、摩根堡病毒、委内瑞拉马脑炎病毒、罗斯河病毒、塞姆利基森林病毒、辛德毕斯病毒或马雅罗病毒的至少一种核苷酸序列。

25.如权利要求1-4、9-11或13-23中任一项所述的组合物,其中所述骨架包含委内瑞拉马脑炎病毒的至少一种核苷酸序列。

26.如权利要求24或25所述的组合物,其中所述骨架至少包含由所述奥拉病毒、所述摩根堡病毒、所述委内瑞拉马脑炎病毒、所述罗斯河病毒、所述塞姆利基森林病毒、所述辛德毕斯病毒或所述马雅罗病毒的核苷酸序列编码的用于非结构蛋白介导的扩增的序列、26S启动子序列、聚(A)序列、非结构蛋白1(nsP1)基因、nsP2基因、nsP3基因和nsP4基因。

27.如权利要求24或25所述的组合物,其中所述骨架至少包含由所述奥拉病毒、所述摩根堡病毒、所述委内瑞拉马脑炎病毒、所述罗斯河病毒、所述塞姆利基森林病毒、所述辛德毕斯病毒或所述马雅罗病毒的核苷酸序列编码的用于非结构蛋白介导的扩增的序列、26S启动子序列和聚(A)序列。

28.如权利要求26或27所述的组合物,其中用于非结构蛋白介导的扩增的序列选自由以下组成的组:甲病毒5′UTR、51-nt CSE、24-nt CSE、26S亚基因组启动子序列、19-nt CSE、甲病毒3′UTR或其组合。

29.如权利要求26-28中任一项所述的组合物,其中所述骨架不编码结构性病毒粒子蛋白衣壳E2和E1。

30.如权利要求29所述的组合物,其中所述抗原盒被插入以代替所述奥拉病毒、所述摩根堡病毒、所述委内瑞拉马脑炎病毒、所述罗斯河病毒、所述塞姆利基森林病毒、所述辛德毕斯病毒或所述马雅罗病毒的核苷酸序列内的结构性病毒粒子蛋白。

31.如权利要求24或25所述的组合物,其中所述委内瑞拉马脑炎病毒包含SEQ ID NO:3

或SEQ ID NO:5的序列。

32.如权利要求24或25所述的组合物,其中所述委内瑞拉马脑炎病毒包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5的序列,其还包含碱基对7544和11175之间的缺失。

33.如权利要求32所述的组合物,其中所述骨架包含以SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7所示的序列。

34.如权利要求32或33所述的组合物,其中所述盒被插入在位置7544以代替如SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5的序列中所示的碱基对7544和11175之间的缺失。

35.如权利要求30-34所述的组合物,其中所述抗原盒的插入提供了包含nsP1-4基因和至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列的多顺反子RNA的转录,其中所述nsP1-4基因和所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列在单独的开放阅读框中。

36.如权利要求1-4、9-11或13-35中任一项所述的组合物,其中所述至少一种启动子核苷酸序列是由所述骨架编码的原生26S启动子核苷酸序列。

37.如权利要求1-4、9-11或13-23中任一项所述的组合物,其中所述骨架包含黑猩猩腺病毒载体的至少一种核苷酸序列,任选地其中所述黑猩猩腺病毒载体是ChAdV68载体。

38.如权利要求37所述的组合物,其中所述ChAdV68载体骨架包含以SEQ ID NO:1所示的序列。

39.如权利要求37所述的组合物,其中所述ChAdV68载体骨架包含以SEQ ID NO:1所示的序列,除了所述序列在选自由SEQ ID NO:1所示序列的黑猩猩腺病毒E1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4、L1、L2、L3、L4和L5基因组成的组的至少一种基因中完全缺失或功能性缺失,任选地其中所述序列在以下中完全缺失或功能性缺失:以SEQ ID NO:1所示序列的(1)E1A和E1B;(2)E1A、E1B和E3;或(3)E1A、E1B、E3和E4。

40.如权利要求37所述的组合物,其中所述ChAdV68载体骨架包含自SEQ ID NO:1的序列获得的基因或调控序列,任选地其中所述基因选自由以SEQ ID NO:1所示序列的黑猩猩腺病毒反向末端重复序列(ITR)、E1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4、L1、L2、L3、L4和L5基因组成的组。

41.如权利要求37所述的组合物,其中所述ChAdV68载体骨架包含部分缺失的E4基因,所述基因包含缺失或部分缺失的E4orf2区和缺失或部分缺失的E4orf3区,以及任选地缺失或部分缺失的E4orf4区。

42.如权利要求37所述的组合物,其中所述ChAdV68载体骨架包含SEQ ID NO:1所示序列的至少核苷酸2至36,518,并且还包含:(1)SEQ ID NO:1所示序列的至少核苷酸577至3403的E1缺失,(2)SEQ ID NO:1所示序列的至少核苷酸27,125至31,825的E3缺失,和(3)SEQ ID NO:1所示序列的至少核苷酸34,916至35,642的E4缺失;任选地其中所述抗原盒被插入在所述E1缺失内。

43.如权利要求37所述的组合物,其中所述ChAdV68载体骨架包含以SEQ ID NO:75所示的序列,任选地其中所述抗原盒被插入在所述E1缺失内。

44.如权利要求37所述的组合物,其中所述ChAdV68载体骨架包含在碱基对编号577和3403之间或碱基对456和3014之间的一个或多个缺失,并且任选地其中所述载体还包含在SEQ ID NO:1所示序列的碱基对27,125和31,825之间或碱基对27,816和31,333之间的一个或多个缺失。

45.如权利要求37所述的组合物，其中所述ChAdV68载体骨架包含在SEQ ID NO:1所示序列的碱基对编号3957和10346之间、碱基对编号21787和23370之间以及碱基对编号33486和36193之间的一个或多个缺失。

46.如权利要求37-45中任一项所述的组合物，其中所述盒被插入在所述ChAdV骨架中的E1区、E3区和/或允许并入所述盒的任何缺失的AdV区。

47.如权利要求37-46中任一项所述的组合物，其中所述ChAdV骨架由第一代、第二代或辅助依赖性腺病毒载体之一产生。

48.如权利要求37-47中任一项所述的组合物，其中所述至少一种启动子核苷酸序列选自由以下组成的组:CMV、SV40、EF-1、RSV、PGK、HSA、MCK和EBV启动子序列。

49.如权利要求37-47中任一项所述的组合物，其中所述至少一种启动子核苷酸序列是CMV启动子序列。

50.如权利要求1-4、9-11或13-49中任一项所述的组合物，其中所述至少一种启动子核苷酸序列是外源RNA启动子。

51.如权利要求1-4、9-11或13-50中任一项所述的组合物，其中所述第二启动子核苷酸序列是26S启动子核苷酸序列或CMV启动子核苷酸序列。

52.如权利要求1-4、9-11或13-50中任一项所述的组合物，其中所述第二启动子核苷酸序列包含多个26S启动子核苷酸序列或多个CMV启动子核苷酸序列，其中每个26S启动子核苷酸序列或CMV启动子核苷酸序列提供所述单独的开放阅读框中的一者或多者的转录。

53.如上述权利要求中任一项所述的组合物，其中所述一种或多种载体的大小各自为至少300nt。

54.如上述权利要求中任一项所述的组合物，其中所述一种或多种载体的大小各自为至少1kb。

55.如上述权利要求中任一项所述的组合物，其中所述一种或多种载体的大小各自为2kb。

56.如上述权利要求中任一项所述的组合物，其中所述一种或多种载体的大小各自小于5kb。

57.如上述权利要求中任一项所述的组合物，其中所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列中的至少一者编码由MHC I类呈递的多肽序列或其部分。

58.如上述权利要求中任一项所述的组合物，其中所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列中的至少一者编码由MHC II类呈递的多肽序列或其部分。

59.如上述权利要求中任一项所述的组合物，其中所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列中的至少一者编码能够刺激B细胞应答的多肽序列或其部分，任选地其中所述能够刺激B细胞应答的多肽序列或其部分包含全长蛋白质、蛋白质结构域、蛋白质亚基或预测或已知能够被抗体结合的抗原片段。

60.如权利要求1-4、9-11或13-59中任一项所述的组合物，其中每个SARS-CoV-2衍生核酸序列彼此直接连接。

61.如权利要求1-4、9-11或13-60中任一项所述的组合物，其中所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列中的至少一者利用编码接头的核酸序列与不同的SARS-CoV-2衍生核酸序列连接。

62.如权利要求61所述的组合物，其中所述接头连接两个MHC I类序列或一个MHC I类序列至一个MHC II类序列。

63.如权利要求62所述的组合物，其中所述接头选自由以下组成的组：(1)连续甘氨酸残基，长度为至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个残基(SEQ ID NO:27941)；(2)连续丙氨酸残基，长度为至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个残基(SEQ ID NO:27942)；(3)两个精氨酸残基(RR)；(4)丙氨酸、丙氨酸、酪氨酸(AAY)；(5)由哺乳动物蛋白酶体有效加工的长度为至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸残基的共有序列；和(6)侧接源自同源蛋白来源的抗原并且长度为至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或2-20个氨基酸残基的一种或多种原生序列。

64.如权利要求61所述的组合物，其中所述接头连接两个MHC II类序列或一个MHC II类序列至一个MHC I类序列。

65.如权利要求64所述的组合物，其中所述接头包含序列GPGPG(SEQ ID NO:56)。

66.如权利要求1-4、9-11或13-65中任一项所述的组合物，其中所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列中的至少一种序列与增强所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列的表达、稳定性、细胞运输、加工和呈递和/或免疫原性的单独或连续的序列可操作地或直接地连接。

67.如权利要求66所述的组合物，其中所述单独或连续的序列包含以下中的至少一者：泛素序列、经修饰以增加蛋白酶体靶向的泛素序列(例如，所述泛素序列在位置76处含有Gly至Ala取代)、免疫球蛋白信号序列(例如，IgK)、主要组织相容性I类序列、溶酶体相关膜蛋白(LAMP)-1、人树突状细胞溶酶体相关膜蛋白和主要组织相容性II类序列；任选地其中所述经修饰以增加蛋白酶体靶向的泛素序列是A76。

68.如上述权利要求中任一项所述的组合物，其中所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列中的至少一者编码经预测或验证能够由至少一种HLA等位基因呈递的两种或更多种不同的多肽。

69.如上述权利要求中任一项所述的组合物，其中所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列中的每一者编码的多肽序列或其部分为经翻译的相应全长SARS-CoV-2蛋白的小于50％、小于49％、小于48％、小于47％、小于46％、小于45％、小于45％、小于43％、小于42％、小于41％、小于40％、小于39％、小于38％、小于37％、小于36％、小于35％、小于34％或小于33％。

70.如上述权利要求中任一项所述的组合物，其中所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列中的每一者编码不会编码经翻译的相应SARS-CoV-2蛋白的功能蛋白、功能蛋白结构域、功能蛋白亚基或功能蛋白片段的多肽序列或其部分。

71.如上述权利要求中任一项所述的组合物，其中所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列中的两者或更多者衍生自相同的SARS-CoV-2基因。

72.如权利要求71所述的组合物，其中衍生自相同的SARS-CoV-2基因的所述两个或更多个SARS-CoV-2衍生核酸序列被排序，使得如果第二核酸序列跟随在相应的SARS-CoV-2基因中的第一核酸序列之后，则所述第一核酸序列不能之后紧跟着所述第二核酸序列或连接到所述第二核酸序列。

73.如权利要求1-4、9-11或13-72中任一项所述的组合物，其中所述至少一种SARS-

CoV-2衍生核酸序列包含至少2-10、2、3、4、5、6、7、8、9或10种核酸序列。

74.如权利要求1-4、9-11或13-72中任一项所述的组合物，其中所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列包含至少11-20、15-20、11-100、11-200、11-300、11-400、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20种或多达400种核酸序列。

75.如权利要求1-4、9-11或13-72中任一项所述的组合物，其中所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列包含至少2-400种核酸序列，并且其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列中的至少两者编码多肽序列或其部分，所述多肽序列或其部分(1)由MHC I类呈递，(2)由MHC II类呈递，和/或(3)能够刺激B细胞应答。

76.如权利要求5或12所述的组合物，其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列中的至少两者编码多肽序列或其部分，所述多肽序列或其部分(1)由MHC I类呈递，(2)由MHC II类呈递，和/或(3)能够刺激B细胞应答类别。

77.如上述权利要求中任一项所述的组合物，其中当施用于所述受试者并被翻译时，由所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列编码的至少一种抗原呈递在抗原呈递细胞上，导致靶向SARS-CoV-2感染细胞表面上的至少一种抗原的免疫应答。

78.如上述权利要求中任一项所述的组合物，其中当施用于所述受试者并被翻译时，由所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列编码的至少一种抗原导致靶向SARS-CoV-2病毒上的至少一种抗原的抗体应答。

79.如上述权利要求中任一项所述的组合物，其中当将至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列施用于受试者并被翻译时，MHC I类或II类抗原中的至少一者被呈递在抗原呈递细胞上，导致靶向SARS-CoV-2感染细胞表面上的至少一种抗原的免疫应答，并且任选地其中所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列中的每一者的表达由所述至少一种启动子核苷酸序列驱动。

80.如权利要求1-4、9-11或13-79中任一项所述的组合物，其中每个MHC I类表位编码SARS-CoV-2衍生核酸序列编码长度为8至35个氨基酸，任选地长度为9-17、9-25、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35个氨基酸的多肽序列。

81.如权利要求1-4、9-11或13-80中任一项所述的组合物，其中存在所述至少一种MHC II类表位编码核酸序列。

82.如权利要求1-4、9-11或13-80中任一项所述的组合物，其中所述至少一种MHC II类表位编码核酸序列存在并且包含至少一种MHC II类SARS-CoV-2衍生核酸序列。

83.如权利要求1-4、9-11或13-82中任一项所述的组合物，其中所述至少一种MHC II类表位编码核酸序列的长度为12-20、12、13、14、15、16、17、18、19、20或20-40个氨基酸。

84.如权利要求1-4、9-11或13-83中任一项所述的组合物，其中所述至少一种MHC II类表位编码核酸序列存在并且包含至少一种通用MHC II类表位编码核酸序列，任选地其中所述至少一种通用序列包含破伤风类毒素和PADRE中的至少一者，和/或至少一种MHC II类SARS-CoV-2衍生的表位编码核酸序列。

85.如权利要求1-4、9-11或13-84中任一项所述的组合物，其中所述至少一种启动子核苷酸序列或所述第二启动子核苷酸序列是诱导型的。

86.如权利要求1-4、9-11或13-84中任一项所述的组合物，其中所述至少一种启动子核

苷酸序列或所述第二启动子核苷酸序列是非诱导型的。

87.如权利要求1-4、9-11或13-86中任一项所述的组合物，其中所述至少一种聚(A)序列包含所述骨架原生的聚(A)序列。

88.如权利要求1-4、9-11或13-86中任一项所述的组合物，其中所述至少一种聚(A)序列包含所述骨架外源的聚(A)序列。

89.如权利要求1-4、9-11或13-88中任一项所述的组合物，其中所述至少一种聚(A)序列与所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列中的至少一者可操作地连接。

90.如权利要求1-4、9-11或13-89中任一项所述的组合物，其中所述至少一种聚(A)序列是至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个或至少90个连续A核苷酸(SEQ ID NO:27943)。

91.如权利要求1-4、9-11或13-89中任一项所述的组合物，其中所述至少一种聚(A)序列是至少80个连续A核苷酸(SEQ ID NO:27940)。

92.如权利要求1-4、9-11或13-91中任一项所述的组合物，其中存在至少一种第二聚(A)序列。

93.如权利要求92所述的组合物，其中所述至少一种第二聚(A)序列包含SV40聚(A)信号序列或牛生长激素(BGH)聚(A)信号序列，或两种或更多种SV40聚(A)信号序列或BGH聚(A)信号序列的组合。

94.如权利要求92所述的组合物，其中所述至少一种第二聚(A)序列包含两种或更多种第二聚(A)序列，任选地其中所述两种或更多种第二聚(A)序列包含两种或更多种SV40聚(A)信号序列、两种或更多种BGH聚(A)信号序列，或SV40聚(A)信号序列和BGH聚(A)信号序列的组合。

95.如上述权利要求中任一项所述的组合物，其中所述抗原盒还包含以下中的至少一者:内含子序列，外源内含子序列，组成型转运元件(CTE)，RNA转运元件(RTE)，土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)序列，内部核糖体进入序列(IRES)序列，编码2A自切割肽序列的核苷酸序列，编码弗林蛋白酶切割位点的核苷酸序列，或已知增强可操作地连接到所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列中的至少一者的mRNA的核输出、稳定性或翻译效率的5′或3′非编码区中的序列。

96.如上述权利要求中任一项所述的组合物，其中所述抗原盒还包含报告基因，包括但不限于绿色荧光蛋白(GFP)、GFP变体、分泌型碱性磷酸酶、荧光素酶、荧光素酶变体、或可检测的肽或表位。

97.如权利要求96所述的组合物，其中所述可检测的肽或表位选自由HA标签、Flag标签、His标签或V5标签组成的组。

98.如上述权利要求中任一项所述的组合物，其中所述一种或多种载体还包含一种或多种编码至少一种免疫调节剂的核酸序列。

99.如权利要求98所述的组合物，其中所述免疫调节剂是抗CTLA4抗体或其抗原结合片段、抗PD-1抗体或其抗原结合片段、抗PD-L1抗体或其抗原结合片段、抗4-1BB抗体或其抗原结合片段、或抗OX-40抗体或其抗原结合片段。

100.如权利要求99所述的组合物，其中所述抗体或其抗原结合片段是Fab片段、Fab′片段、单链Fv(scFv)、呈单一特异性或连接在一起的多个特异性的单域抗体(sdAb)(例如骆驼

科动物抗体结构域)，或全长单链抗体(例如，具有通过柔性接头连接的重链和轻链的全长IgG)。

101.如权利要求99或100所述的组合物，其中所述抗体的重链和轻链序列是由诸如2A或IRES的自切割序列分开的连续序列；或者所述抗体的重链和轻链序列是通过柔性接头诸如连续甘氨酸残基连接。

102.如权利要求98所述的组合物，其中所述免疫调节剂是细胞因子。

103.如权利要求102所述的组合物，其中所述细胞因子是IL-2、IL-7、IL-12、IL-15或IL-21中的至少一者或其各自的变体。

104.如权利要求1-4、9-11或13-103中任一项所述的组合物，其中MHC I类或MHC II类表位编码SARS-CoV-2衍生核酸序列是通过执行以下步骤来选择：

(a)从SARS-CoV-2病毒或SARS-CoV-2感染细胞获得外显子组、转录组或全基因组SARS-CoV-2核苷酸测序数据中的至少一者，其中所述SARS-CoV-2核苷酸测序数据用于获得代表一组抗原中的每一者的肽序列的数据；

(b)将每个抗原的肽序列输入到呈递模型中，以产生所述抗原中的每一者由MHC等位基因中的一者或多者在SARS-CoV-2感染细胞表面上呈递的数值可能性集合，所述数值可能性集合已至少基于所接收的质谱数据进行鉴定；以及

(c)基于所述数值可能性集合选择所述抗原集合的子集以产生经选择抗原集合，所述经选择抗原用于产生所述MHC I类或MHC II类表位编码SARS-CoV-2衍生核酸序列。

105.如权利要求5或12所述的组合物，其中每个MHC I类或MHC II类表位编码SARS-CoV-2衍生核酸序列是通过执行以下步骤来选择：

(a)从SARS-CoV-2病毒或SARS-CoV-2感染细胞获得外显子组、转录组或全基因组SARS-CoV-2核苷酸测序数据中的至少一者，其中所述SARS-CoV-2核苷酸测序数据用于获得代表一组抗原中的每一者的肽序列的数据；

(b)将每个抗原的肽序列输入到呈递模型中，以产生所述抗原中的每一者由MHC等位基因中的一者或多者在SARS-CoV-2感染细胞表面上呈递的数值可能性集合，所述数值可能性集合已至少基于所接收的质谱数据进行鉴定；以及

(c)基于所述数值可能性集合选择所述抗原集合的子集以产生经选择抗原集合，所述经选择抗原用于产生至少18种SARS-CoV-2衍生核酸序列。

106.如权利要求104所述的组合物，其中所述经选择抗原集合的数目为2-20。

107.如权利要求104-106所述的组合物，其中所述呈递模型表示以下两者之间的依赖性：

(a)所述MHC等位基因中的特定一者和在肽序列的特定位置处的特定氨基酸的一对的存在；和

(b)由所述对的MHC等位基因中的所述特定一者将在所述特定位置处包含所述特定氨基酸的所述肽序列呈递在SARS-CoV-2感染细胞表面上的可能性。

108.如权利要求104-107所述的组合物，其中选择所述经选择抗原集合包括基于所述呈递模型选择相对于未选择的抗原被呈递在SARS-CoV-2感染细胞表面上的可能性增加的抗原，任选地其中所述经选择抗原已被验证为由一个或多个特定的HLA等位基因呈递。

109.如权利要求104-108所述的组合物，其中选择所述经选择抗原集合包括基于所述

呈递模型选择相对于未选择的抗原能够在所述受试者中诱导SARS-CoV-2特异性免疫应答的可能性增加的抗原。

110.如权利要求104-109所述的组合物,其中选择所述经选择抗原集合包括基于所述呈递模型选择相对于未选择的抗原能够被专职抗原呈递细胞(APC)呈递给初始T细胞的可能性增加的抗原,任选地其中所述APC是树突状细胞(DC)。

111.如权利要求104-110所述的组合物,其中选择所述经选择抗原集合包括基于所述呈递模型选择相对于未选择的抗原经由中心或外周耐受性受抑制的可能性降低的抗原。

112.如权利要求104-111所述的组合物,其中选择所述经选择抗原集合包括基于所述呈递模型选择相对于未选择的抗原能够在所述受试者中诱导对正常组织的自身免疫应答的可能性降低的抗原。

113.如权利要求104-112所述的组合物,其中外显子组或转录组SARS-CoV-2核苷酸测序数据是通过对SARS-CoV-2病毒或SARS-CoV-2感染组织或细胞进行测序而获得的。

114.如权利要求113所述的组合物,其中所述测序是下一代测序(NGS)或任何大规模并行测序方法。

115.如上述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述抗原盒包含由所述抗原盒中的相邻序列形成的连接表位序列。

116.如权利要求115所述的组合物,其中至少一个或每个连接表位序列对MHC具有大于500nM的亲和力。

117.如权利要求115或116所述的组合物,其中每个连接表位序列都是非自身的。

118.如上述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述抗原盒包含一个或多个验证表位和/或至少4、5、6或7个预测表位,其中至少85%、90%或95%的群体携带至少一个经验证呈递所述一种或多种验证表位中的至少一者的HLA和/或至少一个经预测呈递所述至少4、5、6或7个预测表位中的每一者的HLA。

119.如上述权利要求中任一项所述的组合物,其中预测或验证所述MHC I类和/或MHC II类表位中的每一者能够由至少5%的群体中存在的至少一个HLA等位基因呈递。

120.如上述权利要求中任一项所述的组合物,其中预测或验证所述MHC I类和/或MHC II类表位中的每一者能够由至少一个HLA等位基因呈递,其中每个抗原/HLA对在群体中具有至少0.01%的抗原/HLA流行率。

121.如上述权利要求中任一项所述的组合物,其中预测或验证所述MHC I类和/或MHC II类表位中的每一者能够由至少一个HLA等位基因呈递,其中每个抗原/HLA对在群体中具有至少0.1%的抗原/HLA流行率。

122.如上述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述抗原盒不编码包含经翻译的野生型核酸序列的非治疗性MHC I类或II类表位核酸序列,其中预测所述非治疗性表位将展示在所述受试者的MHC等位基因上。

123.如权利要求122所述的组合物,其中所述非治疗性预测的MHC I类或II类表位序列是由所述抗原盒中的相邻序列形成的连接表位序列。

124.如权利要求115-123所述的组合物,其中所述预测是基于通过将所述非治疗性表位的序列输入到呈递模型中而生成的呈递可能性。

125.如权利要求115-124中任一项所述的组合物,其中所述抗原盒中的所述至少一种

SARS-CoV-2衍生核酸序列的顺序通过一系列包括以下的步骤确定：

(a)产生一组对应于不同顺序的所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列的候选抗原盒序列；

(b)对于每个候选抗原盒序列，基于所述候选抗原盒序列中非治疗性表位的呈递来确定呈递评分；以及

(c)选择与低于预定阈值的呈递评分相关的候选盒序列作为抗原疫苗的抗原盒序列。

126.一种药物组合物，所述药物组合物包含如上述权利要求中任一项所述的组合物和药学上可接受的载剂。

127.如权利要求126所述的组合物，其中所述组合物还包含佐剂。

128.如权利要求126或127所述的药物组合物，其中所述组合物还包含免疫调节剂。

129.如权利要求128所述的药物组合物，其中所述免疫调节剂是抗CTLA4抗体或其抗原结合片段、抗PD-1抗体或其抗原结合片段、抗PD-L1抗体或其抗原结合片段、抗4-1BB抗体或其抗原结合片段、或抗OX-40抗体或其抗原结合片段。

130.一种分离的核苷酸序列或分离的核苷酸序列集合，其包含如前述组合物权利要求中任一项所述的抗原盒和从SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5的序列获得的一种或多种元件，任选地其中所述一种或多种元件选自由以下组成的组：非结构蛋白介导的扩增所必需的序列、26S启动子核苷酸序列、聚(A)序列以及以SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5所示的序列的nsP1-4基因，并且任选地其中所述核苷酸序列是cDNA。

131.如权利要求130所述的分离的核苷酸序列，其中所述序列或分离的核苷酸序列集合包含插入在以SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7所示序列的位置7544处的如上述组合物权利要求中任一项所述的抗原盒。

132.如权利要求130或131所述的分离的核苷酸序列，所述分离的核苷酸序列还包含：

从SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5的序列获得的所述一种或多种元件的T7或SP6 RNA聚合酶启动子核苷酸序列5′；和

任选地，所述聚(A)序列的一个或多个限制性位点3′。

133.如权利要求130所述的分离的核苷酸序列，其中上述组合物权利要求中任一项所述的抗原盒被插入在SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9的位置7563处。

134.一种分离的核苷酸序列或分离的核苷酸序列集合，其包含上述组合物权利要求中任一项所述的抗原盒和从SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:75的序列获得的一种或多种元件，任选地其中所述一种或多种元件选自由以下组成的组：黑猩猩腺病毒反向末端重复序列(ITR)、SEQ ID NO:1所示序列的E1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4、L1、L2、L3、L4和L5基因，并且任选地其中所述核苷酸序列是cDNA。

135.如权利要求134所述的分离的核苷酸序列，其中所述序列或分离的核苷酸序列集合包含插入在SEQ ID NO:75所示序列的E1缺失内的如上述组合物权利要求中任一项所述的抗原盒。

136.如权利要求134或135所述的分离的核苷酸序列，所述分离的核苷酸序列还包含：

从SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:75的序列获得的一种或多种元件的T7或SP6 RNA聚合酶启动子核苷酸序列5′；和

任选地，聚(A)序列的一个或多个限制性位点3′。

137.一种载体或载体集合,所述载体或载体集合包含如权利要求130-136所述的核苷酸序列。

138.一种分离的细胞,所述分离的细胞包含如权利要求130-137所述的核苷酸序列或分离的核苷酸序列集合,任选地其中所述细胞是BHK-21、CHO、HEK293或其变体、911、HeLa、A549、LP-293、PER.C6或AE1-2a细胞。

139.一种试剂盒,所述试剂盒包括如上述组合物权利要求中任一项所述的组合物和使用说明书。

140.一种用于在受试者中治疗SARS-CoV-2感染或预防SARS-CoV-2感染的方法,所述方法包括向所述受试者施用如上述组合物权利要求中任一项所述的组合物或如权利要求126-129中任一项所述的药物组合物。

141.如权利要求140所述的方法,其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列编码至少一种免疫原性多肽,对应于由所述受试者感染的或有感染其风险的SARS-CoV-2亚型编码的多肽。

142.一种用于在受试者中诱导免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用如上述组合物权利要求中任一项所述的组合物或如权利要求126-129中任一项所述的药物组合物。

143.如权利要求140-142中任一项所述的方法,其中所述受试者表达至少一种预测或已知呈递由至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列编码的MHC I类或MHC II类表位的HLA等位基因。

144.如权利要求140-142中任一项所述的方法,其中所述受试者表达至少一种预测或已知呈递由所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列编码的MHC I类表位的HLA等位基因,并且其中所述MHC I类表位包含至少一个包含如表A中所示的多肽序列的MHC I类表位。

145.如权利要求140-142中任一项所述的方法,其中所述受试者表达至少一种预测或已知呈递由所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列编码的MHC II类表位的HLA等位基因,并且其中所述MHC II类表位包含至少一个包含如表B中所示的多肽序列的MHC II类表位。

146.如权利要求140-145中任一项所述的方法,其中所述组合物是肌肉内(IM)、皮内(ID)、皮下(SC)或静脉内(IV)施用的。

147.如权利要求140-145中任一项所述的方法,其中所述组合物是肌肉内施用的。

148.如权利要求140-147中任一项所述的方法,所述方法还包括施用一种或多种免疫调节剂,任选地其中在施用所述组合物或药物组合物之前、同时或之后施用所述免疫调节剂。

149.如权利要求148所述的方法,其中所述一种或多种免疫调节剂选自由以下组成的组:抗CTLA4抗体或其抗原结合片段、抗PD-1抗体或其抗原结合片段、抗PD-L1抗体或其抗原结合片段、抗4-1BB抗体或其抗原结合片段、或抗OX-40抗体或其抗原结合片段。

150.如权利要求148或149所述的方法,其中所述免疫调节剂是静脉内(IV)、肌肉内(IM)、皮内(ID)或皮下(SC)施用的。

151.如权利要求150所述的方法,其中所述皮下施用在所述组合物或药物组合物施用部位附近或紧邻一个或多个载体或组合物引流淋巴结。

152.如权利要求140-151中任一项所述的方法,所述方法还包括向所述受试者施用第二疫苗组合物。

153.如权利要求152所述的方法,其中所述第二疫苗组合物是在施用如权利要求140-151中任一项所述的组合物或药物组合物之前施用的。

154.如权利要求152所述的方法,其中所述第二疫苗组合物是在施用如权利要求140-151中任一项所述的组合物或药物组合物之后施用的。

155.如权利要求153或154所述的方法,其中所述第二疫苗组合物与如权利要求140-151中任一项所述的组合物或药物组合物相同。

156.如权利要求153或154所述的方法,其中所述第二疫苗组合物与如权利要求140-151中任一项所述的组合物或药物组合物不同。

157.如权利要求156所述的方法,其中所述第二疫苗组合物包含编码至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列的黑猩猩腺病毒载体。

158.如权利要求157所述的方法,其中由所述黑猩猩腺病毒载体编码的所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列与如上述组合物权利要求中任一项所述的至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列相同。

159.一种制造如上述组合物权利要求中任一项所述的一种或多种载体的方法,所述方法包括:

(a)获得包含骨架和抗原盒的线性化DNA序列;

(b)通过将所述线性化DNA序列添加到包含将所述线性化DNA序列转录成RNA的所有必要组分的体外转录反应中,来体外转录所述线性化DNA序列,任选地还包括将m7g帽体外添加到所得RNA中;以及

(c)从所述体外转录反应中分离所述一种或多种载体。

160.如权利要求159所述的制造方法,其中所述线性化DNA序列是通过将DNA质粒序列线性化或通过使用PCR扩增而产生的。

161.如权利要求160所述的制造方法,其中所述DNA质粒序列是使用细菌重组或全基因组DNA合成或全基因组DNA合成与所合成DNA在细菌细胞中扩增中的一者产生的。

162.如权利要求159所述的制造方法,其中从所述体外转录反应中分离所述一种或多种载体涉及苯酚氯仿提取、基于二氧化硅柱的纯化或类似的RNA纯化方法中的一者或多者。

163.一种制造用于递送抗原表达系统的如上述组合物权利要求中任一项所述的组合物的方法,所述方法包括:

(a)提供用于纳米微粒递送媒介物的组分;

(b)提供所述抗原表达系统;以及

(c)为所述纳米微粒递送媒介物和所述抗原表达系统提供足以产生用于递送所述抗原表达系统的组合物的条件。

164.如权利要求163所述的制造方法,其中所述条件由微流体混合提供。

165.一种评估处于SARS-CoV-2感染风险或患有SARS-CoV-2感染的受试者的方法,所述方法包括以下步骤:

a)确定或已经确定:

1)所述受试者是否具有预测或已知呈递基于抗原的疫苗中包含的抗原的HLA等位基因,

b)根据(a)的结果确定或已经确定所述受试者是当所述受试者表达所述HLA等位基因

时用所述基于抗原的疫苗进行治疗的候选者,和

c)任选地,向所述受试者施用或已经施用所述基于抗原的疫苗,其中所述基于抗原的疫苗包含:

1)至少一种SARS-CoV-2衍生的免疫原性多肽,或

2)编码所述至少一种SARS-CoV-2衍生的免疫原性多肽的SARS-CoV-2衍生的核酸序列,并且

任选地其中所述免疫原性多肽包含:

-至少一个包含如表A中所示多肽序列的MHC I类表位,

-至少一个包含如表B中所示多肽序列的MHC II类表位,

-至少一个包含如表C中所示多肽序列的MHC I类表位,任选地其中所述至少一个MHC I表位存在于如SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58所示的串联多肽序列中,

-至少一种如表10中所示的多肽序列或其含表位的片段,任选地其中所述至少一种多肽序列存在于如SEQ ID NO:92所示的串联多肽序列中,

-至少一种如表12A、表12B或表12C中所示的多肽序列,或其含表位的片段,任选地其中所述至少一种多肽序列存在于包含表12A、表12B或表12C中所示的每个序列的串联多肽中,任选地其中所述串联多肽包含表12A、表12B或表12C中所示的序列顺序,

-至少一种包含如表A和/或表C所示多肽序列的MHC I类表位或包含如表B所示多肽序列的MHC II类表位,其中编码的SARS-CoV-2免疫原性多肽在SARS-CoV-2与除SARS-CoV-2以外的冠状病毒物种和/或亚种之间保守,任选地其中所述除SARS-CoV-2以外的冠状病毒物种和/或亚种是严重急性呼吸系统综合征(SARS)和/或中东呼吸系统综合征(MERS),

-一个或多个验证表位和/或至少4、5、6或7个预测表位,其中至少85%、90%或95%的群体携带至少一种经验证呈递所述一个或多个验证表位中的至少一者的HLA和/或至少一种经预测呈递所述至少4、5、6或7个预测表位中的每一者的HLA,

-SARS-CoV-2刺突蛋白,其包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段,任选地其中所述刺突多肽包含关于SEQ ID NO:59的D614G突变,并且任选地其中所述刺突多肽由SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:87所示的核苷酸序列编码,

-SARS-CoV-2修饰的刺突蛋白,其包含选自由以下组成的组的突变:关于如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列的刺突R682突变、刺突R815突变、刺突K986P突变、刺突V987P突变及其组合,并且任选地其中所述修饰的刺突蛋白包含如SEQ ID NO:60或SEQ ID NO:90所示的多肽序列或其含表位的片段,

-SARS-CoV-2膜蛋白,其包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段,

-SARS-CoV-2核衣壳蛋白,其包含如SEQ ID NO:62所示的核衣壳多肽序列或其含表位的片段,

-SARS-CoV-2包膜蛋白,其包含如SEQ ID NO:63所示的包膜多肽序列或其含表位的片段,

-上述任一项的变体,其包含在1%或更多的SARS-CoV-2亚型中发现的突变,任选地其中所述变体包含表1中所示的SARS-CoV-2变体,和/或任选地其中所述变体包括包含关于如SEQ ID NO:59所示刺突多肽序列的刺突D614G突变的SARS-CoV-2变体刺突蛋白、对应于任

选地包含如SEQ ID NO:112所示的刺突多肽序列的B.1.351SARS-CoV-2分离株的SARS-CoV-2变体刺突蛋白,或对应于任选地包含如SEQ ID NO:110所示的刺突多肽序列的B.1.1.7 SARS-CoV-2分离株的SARS-CoV-2变体刺突蛋白,并且任选地其中所述刺突多肽由SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:87所示的核苷酸序列编码,

-或其组合;并且

其中所述免疫原性肽任选地包含N末端接头和/或C末端接头。

166.如权利要求165所述的方法,其中步骤(a)和/或(b)包括从已经处理来自所述受试者的样品的第三方获得数据集。

167.如权利要求165所述的方法,其中步骤(a)包括从所述受试者获得样品并使用选自由以下组成的组的方法测定所述样品:外显子组测序、靶向外显子组测序、转录组测序、Sanger测序、基于PCR的基因分型测定、基于质谱的方法、微阵列、Nanostring、ISH和IHC。

168.如权利要求166或167所述的方法,其中所述样品包括受感染样品、正常组织样品、或所述受感染样品和所述正常组织样品。

169.如权利要求168所述的方法,其中所述样品选自组织、体液、血液、脊髓液和针吸出物。

170.如权利要求165-169中任一项所述的方法,其中所述HLA等位基因具有至少5%的HLA频率。

171.如权利要求165-170中任一项所述的方法,其中所述至少一种SARS-CoV-2衍生的免疫原性多肽或由所述SARS-CoV-2衍生核酸序列编码的所述至少一种SARS-CoV-2衍生的免疫原性多肽包含由所述HLA等位基因在所述受试者的细胞上呈递的MHC I类或MHC II类表位。

172.如权利要求165-171中任一项所述的方法,其中所述基于抗原的疫苗包含抗原表达系统。

173.如权利要求172所述的方法,其中所述抗原表达系统包含如权利要求1-125中任一项所述的抗原表达系统中的任一者。

174.如权利要求165-171中任一项所述的方法,其中所述基于抗原的疫苗包含如权利要求126-129中任一项所述的药物组合物中的任一者。

175.一种用于在受试者中治疗SARS-CoV-2感染、预防SARS-CoV-2感染和/或诱导免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用基于抗原的疫苗给所述受试者,其中所述基于抗原的疫苗包含:

1)至少一种SARS-CoV-2衍生的免疫原性多肽,或

2)编码所述至少一种SARS-CoV-2衍生的免疫原性多肽的SARS-CoV-2衍生核酸序列,并且

其中所述免疫原性多肽包含:

-至少一个包含如表A中所示多肽序列的MHC I类表位,

-至少一个包含如表B中所示多肽序列的MHC II类表位,

-至少一个包含如表C中所示多肽序列的MHC I类表位,任选地其中所述至少一个MHC I表位存在于如SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58所示的串联多肽序列中,

-至少一种如表10中所示的多肽序列或其含表位的片段,任选地其中所述至少一种多

肽序列存在于如SEQ ID NO:92所示的串联多肽序列中，

-至少一种如表12A、表12B或表12C中所示的多肽序列，或其含表位的片段，任选地其中所述至少一种多肽序列存在于包含表12A、表12B或表12C中所示的每个序列的串联多肽中，任选地其中所述串联多肽包含表12A、表12B或表12C中所示的序列顺序，

-至少一种包含如表A和/或表C所示多肽序列的MHC I类表位或包含如表B所示多肽序列的MHC II类表位，其中编码的SARS-CoV-2免疫原性多肽在SARS-CoV-2与除SARS-CoV-2以外的冠状病毒物种和/或亚种之间保守，任选地其中所述除SARS-CoV-2以外的冠状病毒物种和/或亚种是严重急性呼吸系统综合征(SARS)和/或中东呼吸系统综合征(MERS)，

-一个或多个验证表位和/或至少4、5、6或7个预测表位，其中至少85％、90％或95％的群体携带至少一种经验证呈递所述一个或多个验证表位中的至少一者的HLA和/或至少一种经预测呈递所述至少4、5、6或7个预测表位中的每一者的HLA，

-SARS-CoV-2刺突蛋白，其包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段，任选地其中所述刺突多肽包含关于SEQ ID NO:59的D614G突变，并且任选地其中所述刺突多肽由SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:87所示的核苷酸序列编码，

-SARS-CoV-2修饰的刺突蛋白，其包含选自由以下组成的组的突变：关于如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列的刺突R682突变、刺突R815突变、刺突K986P突变、刺突V987P突变及其组合，并且任选地其中所述修饰的刺突蛋白包含如SEQ ID NO:60或SEQ ID NO:90所示的多肽序列或其含表位的片段，

-SARS-CoV-2膜蛋白，其包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段，

-SARS-CoV-2核衣壳蛋白，其包含如SEQ ID NO:62所示的核衣壳多肽序列或其含表位的片段，

-SARS-CoV-2包膜蛋白，其包含如SEQ ID NO:63所示的包膜多肽序列或其含表位的片段，

-上述任一项的变体，其包含在1％或更多的SARS-CoV-2亚型中发现的突变，任选地其中所述变体包含表1中所示的SARS-CoV-2变体，和/或任选地其中所述变体包括包含关于如SEQ ID NO:59所示刺突多肽序列的刺突D614G突变的SARS-CoV-2变体刺突蛋白、对应于任选地包含如SEQ ID NO:112所示的刺突多肽序列的B.1.351SARS-CoV-2分离株的SARS-CoV-2变体刺突蛋白，或对应于任选地包含如SEQ ID NO:110所示的刺突多肽序列的B.1.1.7 SARS-CoV-2分离株的SARS-CoV-2变体刺突蛋白，并且任选地其中所述刺突多肽由SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:87所示的核苷酸序列编码，

-或其组合；并且

其中所述免疫原性肽任选地包含N末端接头和/或C末端接头。

176.一种用于在受试者中治疗SARS-CoV-2感染、预防SARS-CoV-2感染和/或诱导免疫应答的方法，所述方法包括向所述受试者施用基于抗原的疫苗给所述受试者，其中所述基于抗原的疫苗包含：

1)至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20种或更多种SARS-CoV-2衍生的免疫原性多肽，或

2)至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20种或更多种SARS-

CoV-2衍生的编码免疫原性多肽的核酸序列,并且

其中所述免疫原性多肽包含:

(A)包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白和包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2膜蛋白,任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:66或SEQ ID NO:67所示的序列,

(B)包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白和至少一个包含如表C中所示多肽序列的MHC I表位,任选地其中所述至少一个MHC I表位存在于如SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58所示的串联多肽序列中,任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:68所示的序列,

(C)包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白,任选地其中所述刺突多肽包含关于SEQ ID NO:59的D614G突变,并且任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:87所示的序列,

(D)至少一个包含如表C中所示的多肽序列的MHC I类表位,任选地其中所述至少一个MHC I表位存在于如SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58所示的串联多肽序列中,任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:64或SEQ ID NO:65所示的序列,

(E)SARS-CoV-2修饰的刺突蛋白,其包含选自由以下组成的组的突变:关于如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列的刺突D614G突变、刺突R682V突变、刺突R815N突变、刺突K986P突变、刺突V987P突变及其组合,并且任选地其中所述修饰的刺突蛋白包含如SEQ ID NO:60或SEQ ID NO:90所示的多肽序列或其含表位的片段,任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:70或SEQ ID NO:89所示的序列,

(F)包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白、包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2膜蛋白、包含如SEQ ID NO:62所示的核衣壳多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2核衣壳蛋白,和包含如SEQ ID NO:63所示的包膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2包膜蛋白,任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:71所示的序列,

(G)包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白、包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2膜蛋白,和包含如SEQ ID NO:62所示的核衣壳多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2核衣壳蛋白,任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:72所示的序列,

(H)包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白、包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2膜蛋白,和包含如SEQ ID NO:63所示的包膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2包膜蛋白,任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:73所示的序列,

(I)至少一个包含如表C中所示的多肽序列的MHC I类表位,任选地其中所述至少一个MHC I表位存在于如SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58所示的串联多肽序列中,包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白,包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2膜蛋白,和包含如SEQ ID NO:63所示的包膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2包膜蛋白,任选地其中所述SARS-CoV-2衍

生核酸序列包含如SEQ ID NO:74所示的序列，

(J)包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白，和SARS-CoV-2修饰的刺突蛋白，所述SARS-CoV-2修饰的刺突蛋白包含选自由以下组成的组的突变：关于如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列的刺突D614G突变、刺突R682V突变、刺突R815N突变、刺突K986P突变、刺突V987P突变及其组合，并且任选地其中所述修饰的刺突蛋白包含如SEQ ID NO:60或SEQ ID NO:90所示的多肽序列或其含表位的片段，

(K)包含如SEQ ID NO:90所示的修饰的刺突多肽序列或其含表位的片段和至少一种如表10中所示的多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白，任选地其中所述至少一种多肽序列存在于如SEQ ID NO:92所示的串联多肽序列中，

(L)至少一种如表12A、表12B或表12C中所示的多肽序列或其含表位的片段，任选地其中所述至少一种多肽序列存在于包含表12A、表12B或表12C中所示的每个序列的串联多肽中，任选地其中所述串联多肽包含表12A、表12B或表12C中所示的序列顺序，

(M)至少一个包含如表A和/或表C中所示的多肽序列的MHC I类表位或包含如表B中所示的多肽序列的MHC II类表位，其中编码的SARS-CoV-2免疫原性多肽在SARS-CoV-2与除SARS-CoV-2以外的冠状病毒物种和/或亚种之间是保守的，任选地其中所述除SARS-CoV-2以外的冠状病毒物种和/或亚种是严重急性呼吸系统综合征(SARS)和/或中东呼吸系统综合征(MERS)，或

(N)一个或多个验证表位和/或至少4、5、6或7个预测表位，其中至少85％、90％或95％的群体携带至少一种经验证呈递所述一个或多个验证表位中的至少一者的HLA和/或至少一种经预测呈递所述至少4、5、6或7个预测表位中的每一者的HLA。

177.一种用于在受试者中治疗SARS-CoV-2感染、预防SARS-CoV-2感染和/或诱导免疫应答的方法，所述方法包括向所述受试者施用基于抗原的疫苗给所述受试者，其中所述基于抗原的疫苗包含：

(a)一种或多种载体，所述一种或多种载体包含：

载体骨架，其中所述载体骨架包含黑猩猩腺病毒载体，任选地其中所述黑猩猩腺病毒载体是ChAdV68载体，或甲病毒载体，任选地其中所述甲病毒载体是委内瑞拉马脑炎病毒载体，并且其中所述骨架包含：

(i)至少一种启动子核苷酸序列，和

(ii)至少一种聚腺苷酸化(聚(A))序列；和

(b)抗原盒，其中所述抗原盒被插入所述载体骨架中，使得所述抗原盒与所述至少一种启动子核苷酸序列可操作地连接，并且其中所述抗原盒包含：

(i)至少一种SARS-CoV-2衍生的编码免疫原性多肽的核酸序列，其中所述免疫原性多肽包含：

-至少一个包含表A中所示多肽序列的MHC I类表位，

-至少一个包含表B中所示多肽序列的MHC II类表位，

-至少一个包含表C中所示多肽序列的MHC I类表位，任选地其中所述至少一个MHC I表位存在于如SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58所示的串联多肽序列中，

-至少一种如表10中所示的多肽序列或其含表位的片段，任选地其中所述至少一种多肽序列存在于如SEQ ID NO:92所示的串联多肽序列中，

-至少一种如表12A、表12B或表12C中所示的多肽序列，或其含表位的片段，任选地其中所述至少一种多肽序列存在于包含表12A、表12B或表12C中所示的每个序列的串联多肽中，任选地其中所述串联多肽包含表12A、表12B或表12C中所示的序列顺序，

-至少一种包含如表A和/或表C所示多肽序列的MHC I类表位或包含如表B所示多肽序列的MHC II类表位，其中编码的SARS-CoV-2免疫原性多肽在SARS-CoV-2与除SARS-CoV-2以外的冠状病毒物种和/或亚种之间保守，任选地其中所述除SARS-CoV-2以外的冠状病毒物种和/或亚种是严重急性呼吸系统综合征(SARS)和/或中东呼吸系统综合征(MERS)，

-一个或多个验证表位和/或至少4、5、6或7个预测表位，其中至少85％、90％或95％的群体携带至少一种经验证以呈递所述一个或多个验证表位中的至少一者的HLA和/或至少一种经预测呈递所述至少4、5、6或7个预测表位中的每一者的HLA，

-SARS-CoV-2刺突蛋白，其包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段，任选地其中所述刺突多肽包含关于SEQ ID NO:59的D614G突变，并且任选地其中所述刺突多肽由SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:87所示的序列编码，

-SARS-CoV-2修饰的刺突蛋白，其包含选自由以下组成的组的突变：关于如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列的刺突R682突变、刺突R815突变、刺突K986P突变、刺突V987P突变及其组合，并且任选地其中所述修饰的刺突蛋白包含如SEQ ID NO:60或SEQ ID NO:90所示的多肽序列或其含表位的片段，

-SARS-CoV-2膜蛋白，其包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段，

-SARS-CoV-2核衣壳蛋白，其包含如SEQ ID NO:62所示的核衣壳多肽序列或其含表位的片段，

-SARS-CoV-2包膜蛋白，其包含如SEQ ID NO:63所示的包膜多肽序列或其含表位的片段，

-上述任一项的变体，其包含在1％或更多的SARS-CoV-2亚型中发现的突变，任选地其中所述变体包含表1中所示的SARS-CoV-2变体，和/或任选地其中所述变体包括包含关于如SEQ ID NO:59所示刺突多肽序列的刺突D614G突变的SARS-CoV-2变体刺突蛋白、对应于任选地包含如SEQ ID NO:112所示的刺突多肽序列的B.1.351SARS-CoV-2分离株的SARS-CoV-2变体刺突蛋白，或对应于任选地包含如SEQ ID NO:110所示的刺突多肽序列的B.1.1.7 SARS-CoV-2分离株的SARS-CoV-2变体刺突蛋白，并且任选地其中所述刺突多肽由SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:87所示的核苷酸序列编码，

-或其组合；并且

其中所述免疫原性肽任选地包含N末端接头和/或C末端接头；

(ii)任选地，可操作地连接到所述SARS-CoV-2衍生核酸序列的第二启动子核苷酸序列；和

(iii)任选地，至少一种MHC II类表位编码核酸序列；

(iv)任选地，至少一种编码GPGPG氨基酸接头序列(SEQ ID NO:56)的核酸序列；和

(v)任选地，至少一种第二聚(A)序列，其中所述第二聚(A)序列是所述载体骨架的原生聚(A)序列或外源聚(A)序列，任选地其中所述外源聚(A)序列包含SV40聚(A)信号序列或牛生长激素(BGH)聚(A)信号序列。

178.一种用于在受试者中治疗SARS-CoV-2感染、预防SARS-CoV-2感染和/或诱导免疫

应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用基于抗原的疫苗给所述受试者,其中所述基于抗原的疫苗包含:

1)至少一种SARS-CoV-2衍生的免疫原性多肽,或

2)编码所述至少一种SARS-CoV-2衍生的免疫原性多肽的SARS-CoV-2衍生核酸序列,并且

其中所述免疫原性多肽包含至少15个各自编码如表10中所示的免疫原性多肽序列的SARS-CoV-2衍生核酸序列,任选地其中所述免疫原性多肽序列连接在如SEQ ID NO:92所示的串联多肽序列中。

179.一种用于在受试者中治疗SARS-CoV-2感染、预防SARS-CoV-2感染和/或诱导免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用基于抗原的疫苗给所述受试者,其中所述基于抗原的疫苗包含如SEQ ID NO:114所示的核苷酸序列。

180.一种用于在受试者中治疗SARS-CoV-2感染、预防SARS-CoV-2感染和/或诱导免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用基于抗原的疫苗给所述受试者,其中所述基于抗原的疫苗包含如SEQ ID NO:93所示的核苷酸序列。

181.一种用于在受试者中治疗SARS-CoV-2感染、预防SARS-CoV-2感染和/或诱导免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用基于抗原的疫苗给所述受试者,其中所述基于抗原的疫苗包含:

1)至少一种SARS-CoV-2衍生的免疫原性多肽,或

2)编码所述至少一种SARS-CoV-2衍生的免疫原性多肽的SARS-CoV-2衍生核酸序列,并且

其中所述免疫原性多肽包含至少18个各自编码如表C中所示的免疫原性多肽序列的SARS-CoV-2衍生核酸序列,任选地其中所述免疫原性多肽序列连接在如SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58所示的串联多肽序列中。

182.如权利要求175-151中任一项所述的方法,其中所述基于抗原的疫苗包含抗原表达系统。

183.如权利要求182所述的方法,其中所述抗原表达系统包含如权利要求1-125中任一项所述的抗原表达系统中的任一者。

184.如权利要求175-181中任一项所述的方法,其中所述基于抗原的疫苗包含如权利要求126-129中任一项所述的药物组合物中的任一者。

185.如权利要求175-184中任一项所述的方法,其中所述受试者表达至少一种预测或已知呈递由所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列编码的MHC I类或MHC II类表位的HLA等位基因。

186.如权利要求175-184中任一项所述的方法,其中所述受试者表达至少一种预测或已知呈递由所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列编码的MHC I类表位的HLA等位基因,并且其中所述MHC I类表位包含至少一种包含如表A所示的多肽序列的MHC I类表位。

187.如权利要求175-184中任一项所述的方法,其中所述受试者表达至少一种预测或已知呈递由所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列编码的MHC II类表位的HLA等位基因,并且其中所述MHC II类表位包含至少一种包含如表B所示的多肽序列的MHC II类表位。

188.如权利要求175-187中任一项所述的方法,其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列编

码至少一种对应于由所述受试者感染的或有感染其风险的SARS-CoV-2亚型编码的多肽的免疫原性多肽。

189.如权利要求175-188中任一项所述的方法，其中所述方法包括同源初免/加强策略。

190.如权利要求175-188中任一项所述的方法，其中所述方法包括异源初免/加强策略，任选地其中所述异源初免/加强策略包括(a)由不同疫苗平台编码的相同抗原盒，(b)由相同疫苗平台编码的不同抗原盒，和/或(c)由不同疫苗平台编码的不同抗原盒。

191.如权利要求190所述的方法，其中所述不同的抗原盒包含刺突编码盒和单独的T细胞表位编码盒。

192.如权利要求190所述的方法，其中所述不同的抗原盒包含编码源自不同SARS-CoV-2分离株的不同表位和/或抗原的盒。

SARS-COV-2疫苗

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2020年5月19日提交的美国临时申请第63/027,283号、2020年7月2日提交的美国临时申请第63/047,789号和2021年1月19日提交的美国临时申请第63/139,292号的权益,所述申请各自特此出于所有目的通过引用整体并入。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,所述序列表已以ASCII格式以电子方式提交并特此通过引用整体并入。所述ASCII副本创建于2021年5月19日,命名为GSO_091WO_SL.txt并且大小为10,142,398字节。

背景技术

[0005] 严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)是导致2019年冠状病毒病(Covid-19)大流行的病毒株。截至2020年4月15日,所述病毒已感染超过200万人,并在全球造成约140,000例死亡。在冠状病毒背景下,CD8+T细胞应答可能对COVID-19很重要,原因有两个。首先是在临床前模型中反复观察到,仅刺激抗体应答的SARS疫苗通常与肺部炎症相关,而与病毒清除无关。这已在啮齿动物和非人类灵长类动物(NHP)两者中观察到,并且目前的共识是它是由不平衡的免疫应答引起的,并且很可能通过使用驱动平衡抗体和CD8+T细胞(Th1)应答的疫苗来解决(关于评估用COVID-19疫苗加重疾病风险的共识考虑(Consensus considerations on the assessment of the risk of disease enhancement with COVID-19 vaccines):流行病防范创新联盟(Coalition for Epidemic Preparedness Innovations,CEPI)/布莱顿协作(Brighton Collaboration,BC)科学工作会议的成果,2020年3月12-13日)。其次,冠状病毒显然频繁变异并从动物宿主传播到人类,其中在过去18年中发生了三次流行/大流行(2002年的SARS、2012年的MERS、现在的COVID-19)。抗体应答通常针对高度可突变的蛋白质(诸如SARS-CoV-2的刺突蛋白),所述蛋白质在菌株和分离株之间发生显著变化,而T细胞表位通常来源于进化上更保守的蛋白质。T细胞记忆通常也比B细胞记忆更持久,并因此针对SARS-CoV-2的CD8+T记忆可能提供更长且更好的保护来抵御未来的SARS变体。许多疫苗已证明能够在NHP和人类中驱动抗体应答,但常用的治疗诸如蛋白质/肽和mRNA疫苗并没有在这些物种中刺激有意义的CD8+T细胞应答。

[0006] 在感染性疾病情形下抗原疫苗设计的另一个问题是,存在的许多蛋白质中哪一种产生“最佳”治疗性抗原,例如可刺激免疫力的抗原。

[0007] 除了当前抗原预测方法的挑战之外,可用于人类中抗原递送的可用载体系统也存在某些挑战,可用载体系统中的许多来源于人类。例如,由于先前的自然暴露,许多人对人类病毒具有预先存在的免疫力,并且这种免疫力可能是在疫苗接种策略中(诸如在癌症治疗或针对感染性疾病的疫苗接种中)使用重组人类病毒进行抗原递送的主要障碍。尽管在解决上述问题的疫苗接种策略方面取得了一些进展,但仍需要改进,特别是对于临床应用,诸如提高疫苗效力和功效,诸如需要一种刺激包括老年人在内的人类中平衡的B和T细胞免疫的SARS-CoV-2疫苗。

发明内容

[0008] 本文提供了一种用于递送抗原表达系统的组合物,所述组合物包含:抗原表达系统,其中所述抗原表达系统包含:(a)任选地,一种或多种载体,所述一种或多种载体包含:载体骨架,其中所述骨架包含:(i)至少一种启动子核苷酸序列,和(ii)至少一种聚腺苷酸化(聚(A))序列;和(b)抗原盒,任选地其中所述抗原盒在存在时被插入到所述载体骨架中,并且其中所述抗原盒包含:(i)至少一种编码免疫原性多肽的SARS-CoV-2衍生核酸序列,其中所述免疫原性多肽包含:

[0009] -至少一个包含表A中所示多肽序列的MHC I类表位,

[0010] -至少一个包含表B中所示多肽序列的MHC II类表位,

[0011] -至少一个包含表C中所示多肽序列的MHC I类表位,

[0012] 任选地其中所述至少一个MHC I表位存在于如SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58所示的串联多肽序列中,

[0013] -至少一种如表10中所示的多肽序列或其含表位的片段,任选地其中所述至少一种多肽序列存在于如SEQ ID NO:92所示的串联多肽序列中,

[0014] -至少一种如表12A、表12B或表12C中所示的多肽序列,或其含表位的片段,任选地其中所述至少一种多肽序列存在于包含表12A、表12B或表12C中所示的每个序列的串联多肽中,任选地其中所述串联多肽包含表12A、表12B或表12C中所示的序列顺序,

[0015] -至少一种包含如表A和/或表C所示多肽序列的MHC I类表位或包含如表B所示多肽序列的MHC II类表位,其中编码的SARS-CoV-2免疫原性多肽在SARS-CoV-2与除SARS-CoV-2以外的冠状病毒物种和/或亚种之间保守,任选地其中所述除SARS-CoV-2以外的冠状病毒物种和/或亚种是严重急性呼吸系统综合征(SARS)和/或中东呼吸系统综合征(MERS),

[0016] -一个或多个验证表位和/或至少4、5、6或7个预测表位,其中至少85%、90%或95%的群体携带至少一种经验证呈递所述一个或多个验证表位中的至少一者的HLA和/或至少一种经预测呈递所述至少4、5、6或7个预测表位中的每一者的HLA,

[0017] -SARS-CoV-2刺突蛋白,其包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段,任选地其中所述刺突多肽包含关于SEQ ID NO:59的D614G突变,并且任选地其中所述刺突多肽由SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:87所示的核苷酸序列编码,

[0018] -SARS-CoV-2修饰的刺突蛋白,其包含选自由以下组成的组的突变:关于如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列的刺突R682突变、刺突R815突变、刺突K986P突变、刺突V987P突变及其组合,并且任选地其中所述修饰的刺突蛋白包含如SEQ ID NO:60或SEQ ID NO:90所示的多肽序列或其含表位的片段,

[0019] -SARS-CoV-2膜蛋白,其包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段,

[0020] -SARS-CoV-2核衣壳蛋白,其包含如SEQ ID NO:62所示的核衣壳多肽序列或其含表位的片段,

[0021] -SARS-CoV-2包膜蛋白,其包含如SEQ ID NO:63所示的包膜多肽序列或其含表位的片段,

[0022] -上述任一项的变体,其包含在1%或更多的SARS-CoV-2亚型中发现的突变,任选

地其中所述变体包含表1中所示的SARS-CoV-2变体，和/或任选地其中所述变体包括包含关于如SEQ ID NO:59所示刺突多肽序列的刺突D614G突变的SARS-CoV-2变体刺突蛋白、对应于任选地包含如SEQ ID NO:112所示的刺突多肽序列的B.1.351SARS-CoV-2分离株的SARS-CoV-2变体刺突蛋白，或对应于任选地包含如SEQ ID NO:110所示的刺突多肽序列的B.1.1.7SARS-CoV-2分离株的SARS-CoV-2变体刺突蛋白，并且任选地其中所述刺突多肽由SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:87所示的核苷酸序列编码，

[0023] -或其组合；并且其中所述免疫原性多肽任选地包含N末端接头和/或C末端接头；(ii)任选地，可操作地连接到所述SARS-CoV-2衍生核酸序列的第二启动子核苷酸序列；和(iii)任选地，至少一种MHC II类表位编码核酸序列；(iv)任选地，至少一种编码GPGPG氨基酸接头序列(SEQ ID NO:56)的核酸序列；和(v)任选地，至少一种第二聚(A)序列，其中所述第二聚(A)序列是所述载体骨架的原生聚(A)序列或外源聚(A)序列，任选地其中所述外源聚(A)序列包含SV40聚(A)信号序列或牛生长激素(BGH)聚(A)信号序列。

[0024] 本文还提供了一种基于抗原的疫苗，所述疫苗包含：(i)至少一种SARS-CoV-2衍生的免疫原性多肽，其中所述免疫原性多肽包含：

[0025] -至少一个包含表A中所示多肽序列的MHC I类表位，

[0026] -至少一个包含表B中所示多肽序列的MHC II类表位，

[0027] -至少一个包含表C中所示多肽序列的MHC I类表位，

[0028] 任选地其中所述至少一个MHC I表位存在于如SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58所示的串联多肽序列中，

[0029] -至少一种如表10中所示的多肽序列或其含表位的片段，任选地其中所述至少一种多肽序列存在于如SEQ ID NO:92所示的串联多肽序列中，

[0030] -至少一种如表12A、表12B或表12C中所示的多肽序列，或其含表位的片段，任选地其中所述至少一种多肽序列存在于包含表12A、表12B或表12C中所示的每个序列的串联多肽中，任选地其中所述串联多肽包含表12A、表12B或表12C中所示的序列顺序，

[0031] -至少一种包含如表A和/或表C所示多肽序列的MHC I类表位或包含如表B所示多肽序列的MHC II类表位，其中编码的SARS-CoV-2免疫原性多肽在SARS-CoV-2与除SARS-CoV-2以外的冠状病毒物种和/或亚种之间保守，任选地其中所述除SARS-CoV-2以外的冠状病毒物种和/或亚种是严重急性呼吸系统综合征(SARS)和/或中东呼吸系统综合征(MERS)，

[0032] -一个或多个验证表位和/或至少4、5、6或7个预测表位，其中至少85％、90％或95％的群体携带至少一种经验证呈递所述一个或多个验证表位中的至少一者的HLA和/或至少一种经预测呈递所述至少4、5、6或7个预测表位中的每一者的HLA，

[0033] -SARS-CoV-2刺突蛋白，其包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段，任选地其中所述刺突多肽包含关于SEQ ID NO:59的D614G突变，并且任选地其中所述刺突多肽由SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:87所示的核苷酸序列编码，

[0034] -SARS-CoV-2修饰的刺突蛋白，其包含选自由以下组成的组的突变：关于如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列的刺突R682突变、刺突R815突变、刺突K986P突变、刺突V987P突变及其组合，并且任选地其中所述修饰的刺突蛋白包含如SEQ ID NO:60或SEQ ID NO:90所示的多肽序列或其含表位的片段，

[0035] -SARS-CoV-2膜蛋白,其包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段,

[0036] -SARS-CoV-2核衣壳蛋白,其包含如SEQ ID NO:62所示的核衣壳多肽序列或其含表位的片段,

[0037] -SARS-CoV-2包膜蛋白,其包含如SEQ ID NO:63所示的包膜多肽序列或其含表位的片段,

[0038] -上述任一项的变体,其包含在1%或更多的SARS-CoV-2亚型中发现的突变,任选地其中所述变体包含表1中所示的SARS-CoV-2变体,和/或任选地其中所述变体包括包含关于如SEQ ID NO:59所示刺突多肽序列的刺突D614G突变的SARS-CoV-2变体刺突蛋白、对应于任选地包含如SEQ ID NO:112所示的刺突多肽序列的B.1.351SARS-CoV-2分离株的SARS-CoV-2变体刺突蛋白,或对应于任选地包含如SEQ ID NO:110所示的刺突多肽序列的B.1.1.7SARS-CoV-2分离株的SARS-CoV-2变体刺突蛋白,并且任选地其中所述刺突多肽由SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:87所示的核苷酸序列编码,

[0039] -或其组合;并且其中所述免疫原性肽任选地包含N末端接头和/或C末端接头;(ii)任选地,至少一种MHC II类抗原;和(iii)任选地,至少一种GPGPG氨基酸接头序列(SEQ ID NO:56)。

[0040] 本文还提供了一种用于递送抗原表达系统的组合物,所述组合物包含:所述抗原表达系统,其中所述抗原表达系统包含:(a)任选地,一种或多种载体,所述一种或多种载体包含:载体骨架,其中所述骨架包含:(i)至少一种启动子核苷酸序列,和(ii)至少一种聚腺苷酸化(聚(A))序列;和(b)抗原盒,任选地其中所述抗原盒在存在时被插入到所述载体骨架中,并且其中所述抗原盒包含:(i)至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20种或更多种SARS-CoV-2衍生的编码免疫原性多肽的核酸序列,其中所述免疫原性多肽包含:(A)包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白和包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2膜蛋白,任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:66或SEQ ID NO:67所示的序列,(B)包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白和至少一个包含如表C中所示多肽序列的MHC I表位,任选地其中所述至少一个MHC I表位存在于如SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58所示的串联多肽序列中,任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:68所示的序列,(C)包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白,任选地其中所述刺突多肽包含关于SEQ ID NO:59的D614G突变,并且任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:87所示的序列,(D)至少一个包含如表C中所示的多肽序列的MHC I类表位,任选地其中所述至少一个MHC I表位存在于如SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58所示的串联多肽序列中,任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:64或SEQ ID NO:65所示的序列,(E)SARS-CoV-2修饰的刺突蛋白,其包含选自由以下组成的组的突变:关于如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列的刺突D614G突变、刺突R682V突变、刺突R815N突变、刺突K986P突变、刺突V987P突变及其组合,并且任选地其中所述修饰的刺突蛋白包含如SEQ ID NO:60或SEQ ID NO:90所示的多肽序列或其含表位的片段,任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:70

或SEQ ID NO:89所示的序列,(F)包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白、包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2膜蛋白、包含如SEQ ID NO:62所示的核衣壳多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2核衣壳蛋白,和包含如SEQ ID NO:63所示的包膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2包膜蛋白,任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:71所示的序列,(G)包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白、包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2膜蛋白,和包含如SEQ ID NO:62所示的核衣壳多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2核衣壳蛋白,任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:72所示的序列,(H)包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白、包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2膜蛋白,和包含如SEQ ID NO:63所示的包膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2包膜蛋白,任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:73所示的序列,(I)至少一个包含如表C中所示的多肽序列的MHC I类表位,任选地其中所述至少一个MHC I表位存在于如SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58所示的串联多肽序列中,包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白,包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2膜蛋白,和包含如SEQ ID NO:63所示的包膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2包膜蛋白,任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:74所示的序列,(J)包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白,和SARS-CoV-2修饰的刺突蛋白,所述SARS-CoV-2修饰的刺突蛋白包含选自由以下组成的组的突变:关于如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列的刺突D614G突变、刺突R682V突变、刺突R815N突变、刺突K986P突变、刺突V987P突变及其组合,(K)包含如SEQ ID NO:90所示的修饰的刺突多肽序列或其含表位的片段和至少一种如表10中所示的多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白,任选地其中所述至少一种多肽序列存在于如SEQ ID NO:92所示的串联多肽序列中,(L)至少一种如表12A、表12B或表12C中所示的多肽序列或其含表位的片段,任选地其中所述至少一种多肽序列存在于包含表12A、表12B或表12C中所示的每个序列的串联多肽中,任选地其中所述串联多肽包含表12A、表12B或表12C中所示的序列顺序,(M)至少一个包含如表A和/或表C中所示的多肽序列的MHC I类表位或包含如表B中所示的多肽序列的MHC II类表位,其中编码的SARS-CoV-2免疫原性多肽在SARS-CoV-2与除SARS-CoV-2以外的冠状病毒物种和/或亚种之间是保守的,任选地其中所述除SARS-CoV-2以外的冠状病毒物种和/或亚种是严重急性呼吸系统综合征(SARS)和/或中东呼吸系统综合征(MERS),或(N)一个或多个验证表位和/或至少4、5、6或7个预测表位,其中至少85%、90%或95%的群体携带至少一种经验证呈递所述一个或多个验证表位中的至少一者的HLA和/或至少一种经预测呈递所述至少4、5、6或7个预测表位中的每一者的HLA,并且任选地其中所述修饰的刺突蛋白包含如SEQ ID NO:60或SEQ ID NO:90所示的多肽序列或其含表位的片段,并且其中所述SAR-CoV-2SARS-CoV-2衍生核酸序列中的每一者包含:(A)任选地,5'接头序列,和(B)任选地,3'接头序列;(ii)任选地,与所述SARS-CoV-2衍生核酸序列可操作地连接的第二启动子核苷酸序列;和(iii)任选地,至少一种MHC II类表位编码核酸序列;(iv)任选地,至少一种编码GPGPG氨基酸接头序列(SEQ ID NO:56)的核酸序列;和(v)任选

地,至少一种第二聚(A)序列,其中所述第二聚(A)序列是所述载体骨架的原生聚(A)序列或外源聚(A)序列,任选地其中所述外源聚(A)序列包含SV40聚(A)信号序列或牛生长激素(BGH)聚(A)信号序列。

[0041] 本文还提供了一种用于递送抗原表达系统的组合物,所述组合物包含:所述抗原表达系统,其中所述抗原表达系统包含:(a)任选地,一种或多种载体,所述一种或多种载体包含:载体骨架,其中所述骨架包含:(i)至少一种启动子核苷酸序列,和(ii)至少一种聚腺苷酸化(聚(A))序列;和(b)抗原盒,任选地其中所述抗原盒在存在时被插入到所述载体骨架中,并且其中所述抗原盒包含:(i)至少18个SARS-CoV-2衍生核酸序列,每个核酸序列编码如表C中所示的免疫原性多肽序列,任选地其中所述免疫原性多肽序列连接在如SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58所示的串联多肽序列中;(ii)任选地,可操作地连接到所述SARS-CoV-2衍生核酸序列的第二启动子核苷酸序列;和(iii)任选地,至少一种MHC II类表位编码核酸序列;(iv)任选地,至少一种编码GPGPG氨基酸接头序列(SEQ ID NO:56)的核酸序列;和(v)任选地,至少一种第二聚(A)序列,其中所述第二聚(A)序列是所述载体骨架的天然聚(A)序列或外源聚(A)序列,任选地其中所述外源聚(A)序列包含SV40聚(A)信号序列或牛生长激素(BGH)聚(A)信号序列。

[0042] 本文还提供了一种用于递送抗原表达系统的组合物,所述组合物包含:所述抗原表达系统,其中所述抗原表达系统包含:(a)任选地,一种或多种载体,所述一种或多种载体包含:载体骨架,其中所述骨架包含:(i)至少一种启动子核苷酸序列,和(ii)至少一种聚腺苷酸化(聚(A))序列;和(b)抗原盒,任选地其中所述抗原盒在存在时被插入到所述载体骨架中,并且其中所述抗原盒包含:(i)至少15个SARS-CoV-2衍生核酸序列,每个核酸序列编码如表10中所示的免疫原性多肽序列,任选地其中所述免疫原性多肽序列连接在如SEQ ID NO:92中所示的串联多肽序列中;(ii)任选地,可操作地连接到所述SARS-CoV-2衍生核酸序列的第二启动子核苷酸序列;和(iii)任选地,至少一种MHC II类表位编码核酸序列;(iv)任选地,至少一种编码GPGPG氨基酸接头序列(SEQ ID NO:56)的核酸序列;和(v)任选地,至少一种第二聚(A)序列,其中所述第二聚(A)序列是所述载体骨架的天然聚(A)序列或外源聚(A)序列,任选地其中所述外源聚(A)序列包含SV40聚(A)信号序列或牛生长激素(BGH)聚(A)信号序列。

[0043] 本文还提供了一种用于递送抗原表达系统的组合物,所述组合物包含:所述抗原表达系统,其中所述抗原表达系统包含:(a)一种或多种载体,所述一种或多种载体包含:载体骨架,其中所述载体骨架包含黑猩猩腺病毒载体,任选地其中所述黑猩猩腺病毒载体是ChAdV68载体,或甲病毒载体,任选地其中所述甲病毒载体是委内瑞拉马脑炎病毒载体,并且其中所述骨架包含:(i)至少一种启动子核苷酸序列,和(ii)至少一种聚腺苷酸化(聚(A))序列;和(b)抗原盒,其中所述抗原盒被插入所述载体骨架中,使得所述抗原盒与所述至少一种启动子核苷酸序列可操作地连接,并且其中所述抗原盒包含:(i)至少一种SARS-CoV-2衍生的编码免疫原性多肽的核酸序列,其中所述免疫原性多肽包含:

[0044] -至少一个包含表A中所示多肽序列的MHC I类表位,

[0045] -至少一个包含表B中所示多肽序列的MHC II类表位,

[0046] -至少一个包含表C中所示多肽序列的MHC I类表位,

[0047] 任选地其中所述至少一个MHC I表位存在于如SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58所示

的串联多肽序列中，

[0048] -SARS-CoV-2刺突蛋白，其包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段，任选地其中所述刺突多肽包含关于SEQ ID NO:59的D614G突变，并且任选地其中所述刺突多肽由SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:87所示的核苷酸序列编码，

[0049] -SARS-CoV-2修饰的刺突蛋白，其包含选自由以下组成的组的突变：关于如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列的刺突R682突变、刺突R815突变、刺突K986P突变、刺突V987P突变及其组合，并且任选地其中所述修饰的刺突蛋白包含如SEQ ID NO:60或SEQ ID NO:90所示的多肽序列或其含表位的片段，

[0050] -SARS-CoV-2膜蛋白，其包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段，

[0051] -SARS-CoV-2核衣壳蛋白，其包含如SEQ ID NO:62所示的核衣壳多肽序列或其含表位的片段，

[0052] -SARS-CoV-2包膜蛋白，其包含如SEQ ID NO:63所示的包膜多肽序列或其含表位的片段，

[0053] -上述任一项的变体，其包含在1％或更多的SARS-CoV-2亚型中发现的突变，任选地其中所述变体包含表1中所示的SARS-CoV-2变体，和/或任选地其中所述变体包括包含关于如SEQ ID NO:59所示刺突多肽序列的刺突D614G突变的SARS-CoV-2变体刺突蛋白、对应于任选地包含如SEQ ID NO:112所示的刺突多肽序列的B.1.351SARS-CoV-2分离株的SARS-CoV-2变体刺突蛋白，或对应于任选地包含如SEQ ID NO:110所示的刺突多肽序列的B.1.1.7SARS-CoV-2分离株的SARS-CoV-2变体刺突蛋白，并且任选地其中所述刺突多肽由SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:87所示的核苷酸序列编码，

[0054] -或其组合；并且其中所述免疫原性多肽任选地包含N末端接头和/或C末端接头；(ii)任选地，可操作地连接到所述SARS-CoV-2衍生核酸序列的第二启动子核苷酸序列；和(iii)任选地，至少一种MHC II类表位编码核酸序列；(iv)任选地，至少一种编码GPGPG氨基酸接头序列(SEQ ID NO:56)的核酸序列；和(v)任选地，至少一种第二聚(A)序列，其中所述第二聚(A)序列是所述载体骨架的原生聚(A)序列或外源聚(A)序列，任选地其中所述外源聚(A)序列包含SV40聚(A)信号序列或牛生长激素(BGH)聚(A)信号序列。

[0055] 本文还提供了一种用于递送抗原表达系统的组合物，其中所述抗原表达系统包含如SEQ ID NO:114所示的核苷酸序列。

[0056] 本文还提供了一种用于递送抗原表达系统的组合物，其中所述抗原表达系统包含如SEQ ID NO:93所示的核苷酸序列。

[0057] 本文还提供了一种评估处于SARS-CoV-2感染风险或患有SARS-CoV-2感染的受试者的方法，所述方法包括以下步骤：a)确定或已经确定：1)所述受试者是否具有预测或已知会呈递基于抗原的疫苗中包含的抗原的HLA等位基因，b)根据(a)的结果确定或已经确定所述受试者是当所述受试者表达所述HLA等位基因时用所述基于抗原的疫苗进行治疗的候选者，和c)任选地，向所述受试者施用或已经施用所述基于抗原的疫苗，其中所述基于抗原的疫苗包含：1)至少一种SARS-CoV-2衍生的免疫原性多肽，或2)编码所述至少一种SARS-CoV-2衍生的免疫原性多肽的SARS-CoV-2衍生的核酸序列，并且任选地其中所述免疫原性多肽

包含：

[0058] -至少一个包含表A中所示多肽序列的MHC I类表位，

[0059] -至少一个包含表B中所示多肽序列的MHC II类表位，

[0060] -至少一个包含表C中所示多肽序列的MHC I类表位，

[0061] 任选地其中所述至少一个MHC I表位存在于如SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58所示的串联多肽序列中，

[0062] -至少一种如表10中所示的多肽序列或其含表位的片段，任选地其中所述至少一种多肽序列存在于如SEQ ID NO:92所示的串联多肽序列中，

[0063] -至少一种如表12A、表12B或表12C中所示的多肽序列，或其含表位的片段，任选地其中所述至少一种多肽序列存在于包含表12A、表12B或表12C中所示的每个序列的串联多肽中，任选地其中所述串联多肽包含表12A、表12B或表12C中所示的序列顺序，

[0064] -至少一种包含如表A和/或表C所示多肽序列的MHC I类表位或包含如表B所示多肽序列的MHC II类表位，其中编码的SARS-CoV-2免疫原性多肽在SARS-CoV-2与除SARS-CoV-2以外的冠状病毒物种和/或亚种之间保守，任选地其中所述除SARS-CoV-2以外的冠状病毒物种和/或亚种是严重急性呼吸系统综合征(SARS)和/或中东呼吸系统综合征(MERS)，

[0065] -一个或多个验证表位和/或至少4、5、6或7个预测表位，其中至少85％、90％或95％的群体携带至少一种经验证呈递所述一个或多个验证表位中的至少一者的HLA和/或至少一种经预测呈递所述至少4、5、6或7个预测表位中的每一者的HLA，

[0066] -SARS-CoV-2刺突蛋白，其包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段，任选地其中所述刺突多肽包含关于SEQ ID NO:59的D614G突变，并且任选地其中所述刺突多肽由SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:87所示的核苷酸序列编码，

[0067] -SARS-CoV-2修饰的刺突蛋白，其包含选自由以下组成的组的突变：关于如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列的刺突R682突变、刺突R815突变、刺突K986P突变、刺突V987P突变及其组合，并且任选地其中所述修饰的刺突蛋白包含如SEQ ID NO:60或SEQ ID NO:90所示的多肽序列或其含表位的片段，

[0068] -SARS-CoV-2膜蛋白，其包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段，

[0069] -SARS-CoV-2核衣壳蛋白，其包含如SEQ ID NO:62所示的核衣壳多肽序列或其含表位的片段，

[0070] -SARS-CoV-2包膜蛋白，其包含如SEQ ID NO:63所示的包膜多肽序列或其含表位的片段，

[0071] -上述任一项的变体，其包含在1％或更多的SARS-CoV-2亚型中发现的突变，任选地其中所述变体包含表1中所示的SARS-CoV-2变体，和/或任选地其中所述变体包括包含关于如SEQ ID NO:59所示刺突多肽序列的刺突D614G突变的SARS-CoV-2变体刺突蛋白、对应于任选地包含如SEQ ID NO:112所示的刺突多肽序列的B.1.351SARS-CoV-2分离株的SARS-CoV-2变体刺突蛋白，或对应于任选地包含如SEQ ID NO:110所示的刺突多肽序列的B.1.1.7SARS-CoV-2分离株的SARS-CoV-2变体刺突蛋白，并且任选地其中所述刺突多肽由SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:87所示的核苷酸序列编码，

[0072] -或其组合;并且其中所述免疫原性肽任选地包含N末端接头和/或C末端接头。

[0073] 在一些方面,步骤(a)和/或(b)包括从已经处理来自所述受试者的样品的第三方获得数据集。在一些方面,步骤(a)包括从所述受试者获得样品并使用选自由以下组成的组的方法测定所述样品:外显子组测序、靶向外显子组测序、转录组测序、Sanger测序、基于PCR的基因分型测定、基于质谱的方法、微阵列、Nanostring、ISH和IHC。在一些方面,所述样品包括受感染样品、正常组织样品、或所述受感染样品和所述正常组织样品。在一些方面,所述样品选自组织、体液、血液、脊髓液和针吸出物。在一些方面,所述HLA等位基因具有至少5%的HLA频率。在一些方面,所述至少一种SARS-CoV-2衍生的免疫原性多肽或由所述SARS-CoV-2衍生核酸序列编码的所述至少一种SARS-CoV-2衍生的免疫原性多肽包含由所述HLA等位基因在所述受试者的细胞上呈递的MHC I类或MHC II类表位。在一些方面,所述基于抗原的疫苗包含抗原表达系统。在一些方面,所述抗原表达系统包含本文提供的所述抗原表达系统中的任一者。在一些方面,所述基于抗原的疫苗包含本文提供的药物组合物中的任一者。

[0074] 本文还提供了一种用于在受试者中治疗SARS-CoV-2感染、预防SARS-CoV-2感染和/或诱导免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用基于抗原的疫苗给所述受试者,其中所述基于抗原的疫苗包含:1)至少一种SARS-CoV-2衍生的免疫原性多肽,或2)编码所述至少一种SARS-CoV-2衍生的免疫原性多肽的SARS-CoV-2衍生核酸序列,并且其中所述免疫原性多肽包含:

[0075] -至少一个包含表A中所示多肽序列的MHC I类表位,

[0076] -至少一个包含表B中所示多肽序列的MHC II类表位,

[0077] -至少一个包含表C中所示多肽序列的MHC I类表位,

[0078] 任选地其中所述至少一个MHC I表位存在于如SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58所示的串联多肽序列中,

[0079] -SARS-CoV-2刺突蛋白,其包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段,任选地其中所述刺突多肽包含关于SEQ ID NO:59的D614G突变,并且任选地其中所述刺突多肽由SEQ IDNO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:87所示的核苷酸序列编码,

[0080] -SARS-CoV-2修饰的刺突蛋白,其包含选自由以下组成的组的突变:关于如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列的刺突R682突变、刺突R815突变、刺突K986P突变、刺突V987P突变及其组合,并且任选地其中所述修饰的刺突蛋白包含如SEQ ID NO:60或SEQ ID NO:90所示的多肽序列或其含表位的片段,

[0081] -SARS-CoV-2膜蛋白,其包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段,

[0082] -SARS-CoV-2核衣壳蛋白,其包含如SEQ ID NO:62所示的核衣壳多肽序列或其含表位的片段,

[0083] -SARS-CoV-2包膜蛋白,其包含如SEQ ID NO:63所示的包膜多肽序列或其含表位的片段,

[0084] -上述任一项的变体,其包含在1%或更多的SARS-CoV-2亚型中发现的突变,任选地其中所述变体包含表1中所示的SARS-CoV-2变体,和/或任选地其中所述变体包括包含关

于如SEQ ID NO:59所示刺突多肽序列的刺突D614G突变的SARS-CoV-2变体刺突蛋白、对应于任选地包含如SEQ ID NO:112所示的刺突多肽序列的B.1.351SARS-CoV-2分离株的SARS-CoV-2变体刺突蛋白，或对应于任选地包含如SEQ ID NO:110所示的刺突多肽序列的B.1.1.7 SARS-CoV-2分离株的SARS-CoV-2变体刺突蛋白，并且任选地其中所述刺突多肽由SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:87所示的核苷酸序列编码，

[0085] -或其组合；并且其中所述免疫原性肽任选地包含N末端接头和/或C末端接头。

[0086] 本文还提供了一种用于在受试者中治疗SARS-CoV-2感染、预防SARS-CoV-2感染和/或诱导免疫应答的方法，所述方法包括向所述受试者施用基于抗原的疫苗给所述受试者，其中所述基于抗原的疫苗包含：1)至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20种或更多种SARS-CoV-2衍生的免疫原性多肽，或2)至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20种或更多种SARS-CoV-2衍生的编码免疫原性多肽的核酸序列，并且其中所述免疫原性多肽包含：(A)包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白和包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2膜蛋白，任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:66或SEQ ID NO:67所示的序列，(B)包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白和至少一个包含如表C中所示多肽序列的MHC I表位，任选地其中所述至少一个MHC I表位存在于如SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58所示的串联多肽序列中，任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:68所示的序列，(C)包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白，任选地其中所述刺突多肽包含关于SEQ ID NO:59的D614G突变，并且任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:87所示的序列，(D)至少一个包含如表C中所示的多肽序列的MHC I类表位，任选地其中所述至少一个MHC I表位存在于如SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58所示的串联多肽序列中，任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:64或SEQ ID NO:65所示的序列，(E)SARS-CoV-2修饰的刺突蛋白，其包含选自由以下组成的组的突变：关于如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列的刺突D614G突变、刺突R682V突变、刺突R815N突变、刺突K986P突变、刺突V987P突变及其组合，并且任选地其中所述修饰的刺突蛋白包含如SEQ ID NO:60或SEQ ID NO:90所示的多肽序列或其含表位的片段，任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:70所示的序列，(F)包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白、包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2膜蛋白、包含如SEQ ID NO:62所示的核衣壳多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2核衣壳蛋白，和包含如SEQ ID NO:63所示的包膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2包膜蛋白，任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:71所示的序列，(G)包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白、包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2膜蛋白，和包含如SEQ ID NO:62所示的核衣壳多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2核衣壳蛋白，任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:72所示的序列，(H)包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白、包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2膜蛋白，和包含如SEQ ID

NO:63所示的包膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2包膜蛋白,任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:73所示的序列,(I)至少一个包含如表C中所示的多肽序列的MHC I类表位,任选地其中所述至少一个MHC I表位存在于如SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58所示的串联多肽序列中,包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白,包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2膜蛋白,和包含如SEQ ID NO:63所示的包膜多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2包膜蛋白,任选地其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列包含如SEQ ID NO:74所示的序列,或(J)包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段的SARS-CoV-2刺突蛋白,和SARS-CoV-2修饰的刺突蛋白,所述SARS-CoV-2修饰的刺突蛋白包含选自由以下组成的组的突变:关于如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列的刺突D614G突变、刺突R682V突变、刺突R815N突变、刺突K986P突变、刺突V987P突变及其组合,并且任选地其中所述修饰的刺突蛋白包含SEQ ID NO:60或SEQ ID NO:90所述的多肽序列或其含表位的片段。

[0087] 本文还提供了一种用于在受试者中治疗SARS-CoV-2感染、预防SARS-CoV-2感染和/或诱导免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用基于抗原的疫苗给所述受试者,其中所述基于抗原的疫苗包含:(a)一种或多种载体,所述一种或多种载体包含:载体骨架,其中所述载体骨架包含黑猩猩腺病毒载体,任选地其中所述黑猩猩腺病毒载体是ChAdV68载体,或甲病毒载体,任选地其中所述甲病毒载体是委内瑞拉马脑炎病毒载体,并且其中所述骨架包含:(i)至少一种启动子核苷酸序列,和(ii)至少一种聚腺苷酸化(聚(A))序列;和(b)抗原盒,其中所述抗原盒被插入所述载体骨架中,使得所述抗原盒与所述至少一种启动子核苷酸序列可操作地连接,并且其中所述抗原盒包含:(i)至少一种SARS-CoV-2衍生的编码免疫原性多肽的核酸序列,其中所述免疫原性多肽包含:

[0088] -至少一个包含表A中所示多肽序列的MHC I类表位,

[0089] -至少一个包含表B中所示多肽序列的MHC II类表位,

[0090] -至少一个包含表C中所示多肽序列的MHC I类表位,

[0091] 任选地其中所述至少一个MHC I表位存在于如SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58所示的串联多肽序列中,

[0092] -SARS-CoV-2刺突蛋白,其包含如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列或其含表位的片段,任选地其中所述刺突多肽包含关于SEQ ID NO:59的D614G突变,并且任选地其中所述刺突多肽由SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:87所示的核苷酸序列编码,

[0093] -SARS-CoV-2修饰的刺突蛋白,其包含选自由以下组成的组的突变:关于如SEQ ID NO:59所示的刺突多肽序列的刺突R682突变、刺突R815突变、刺突K986P突变、刺突V987P突变及其组合,并且任选地其中所述修饰的刺突蛋白包含如SEQ ID NO:60或SEQ ID NO:90所示的多肽序列或其含表位的片段,

[0094] -SARS-CoV-2膜蛋白,其包含如SEQ ID NO:61所示的膜多肽序列或其含表位的片段,

[0095] -SARS-CoV-2核衣壳蛋白,其包含如SEQ ID NO:62所示的核衣壳多肽序列或其含表位的片段,

[0096] -SARS-CoV-2包膜蛋白,其包含如SEQ ID NO:63所示的包膜多肽序列或其含表位

的片段，

[0097] -上述任一项的变体，其包含在1％或更多的SARS-CoV-2亚型中发现的突变，任选地其中所述变体包含表1中所示的SARS-CoV-2变体，和/或任选地其中所述变体包括包含关于如SEQ ID NO:59所示刺突多肽序列的刺突D614G突变的SARS-CoV-2变体刺突蛋白、对应于任选地包含如SEQ ID NO:112所示的刺突多肽序列的B.1.351SARS-CoV-2分离株的SARS-CoV-2变体刺突蛋白，或对应于任选地包含如SEQ ID NO:110所示的刺突多肽序列的B.1.1.7SARS-CoV-2分离株的SARS-CoV-2变体刺突蛋白，并且任选地其中所述刺突多肽由SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:87所示的核苷酸序列编码，

[0098] -或其组合；并且其中所述免疫原性多肽任选地包含N末端接头和/或C末端接头；(ii)任选地，可操作地连接到所述SARS-CoV-2衍生核酸序列的第二启动子核苷酸序列；和(iii)任选地，至少一种MHC II类表位编码核酸序列；(iv)任选地，至少一种编码GPGPG氨基酸接头序列(SEQ ID NO:56)的核酸序列；和(v)任选地，至少一种第二聚(A)序列，其中所述第二聚(A)序列是所述载体骨架的天然聚(A)序列或外源聚(A)序列，任选地其中所述外源聚(A)序列(A)包含SV40聚(A)信号序列或牛生长激素(BGH)聚(A)信号序列。

[0099] 本文还提供了一种用于在受试者中治疗SARS-CoV-2感染、预防SARS-CoV-2感染和/或诱导免疫应答的方法，所述方法包括向所述受试者施用基于抗原的疫苗给所述受试者，其中所述基于抗原的疫苗包含：1)至少一种SARS-CoV-2衍生的免疫原性多肽，或2)编码所述至少一种SARS-CoV-2衍生的免疫原性多肽的SARS-CoV-2衍生核酸序列，并且其中所述免疫原性多肽包含至少18个各自编码如表C中所示的免疫原性多肽序列的SARS-CoV-2衍生核酸序列，任选地其中所述免疫原性多肽序列连接在如SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58所示的串联多肽序列中。

[0100] 在一些方面，所述基于抗原的疫苗包含抗原表达系统。在一些方面，所述抗原表达系统包含本文提供的抗原表达系统中的任一者。在一些方面，所述基于抗原的疫苗包含本文提供的药物组合物中的任一者。在一些方面，所述受试者表达至少一种预测或已知呈递由至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列编码的MHC I类或MHC II类表位的HLA等位基因。在一些方面，所述受试者表达预测或已知呈递由至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列编码的MHC I类表位的至少一种HLA等位基因，并且其中所述MHC I类表位包含至少一个包含如表A中所示的多肽序列的MHC I类表位。在一些方面，所述受试者表达至少一个预测或已知呈递由至少一种SARS-CoV-2衍生核酸编码的MHC II类表位序列的HLA等位基因，并且其中所述MHC II类表位包含至少一个包含如表B中所示的多肽序列的MHC II类表位。在一些方面，所述SARS-CoV-2衍生核酸序列编码至少一种对应于由所述受试者感染或有感染风险的SARS-CoV-2亚型编码的多肽的免疫原性多肽。

[0101] 在一些方面，编码所述免疫原性多肽的所述SARS-CoV-2衍生核酸序列中的一者或多者的有序序列描述于下式，从5’至3’包含：

[0102] Pa-(L5b-Nc-L3d)X-(G5e-Uf)Y-G3g

[0103] 其中P包含所述第二启动子核苷酸序列，其中a＝0或1，N包含所述SARS-CoV-2衍生核酸序列之一，其中c＝1，任选地其中每个N编码如表A、表B和/或表C中所示的多肽序列，L5包含所述5’接头序列，其中b＝0或1，L3包含所述3’接头序列，其中d＝0或1，G5包含至少一种编码GPGPG氨基酸接头(SEQ ID NO:56)的核酸序列之一，其中e＝0或1，G3包含编码GPGPG

氨基酸接头(SEQ ID NO:56)的至少一种核酸序列之一,其中g＝0或1,U包含所述至少一种MHC II类表位编码核酸序列之一,其中f＝1,X＝1至400,其中对于每个X,相应的Nc是SARS-CoV-2衍生核酸序列,并且Y＝0、1或2,其中对于每个Y,相应的Uf是通用的MHC II类表位编码核酸序列,任选地其中所述至少一种通用序列包含破伤风类毒素和PADRE中的至少一者,或MHC II类SARS-CoV-2衍生的表位编码核酸序列。

[0104] 在一些方面,对于每个X,相应的Nc是不同的SARS-CoV-2衍生核酸序列。在一些方面,对于每个Y,相应的Uf是不同的MHC II类SARS-CoV-2衍生核酸序列。在一些方面,b＝1,d＝1,e＝1,g＝1,h＝1,X＝18,Y＝2,(i)所述载体骨架包含ChAdV68载体,a＝1,P是CMV启动子,存在至少一种第二聚(A)序列,其中所述第二聚(A)序列是所述载体骨架的外源聚(A)序列,并且任选地其中所述外源聚(A)序列包含SV40聚(A)信号序列或BGH聚(A)信号序列,或(ii)所述载体骨架包含委内瑞拉马脑炎病毒载体,a＝0,并且所述抗原盒与内源26S启动子可操作地连接,并且所述至少一种聚腺苷酸化聚(A)序列是由所述骨架提供的至少80个连续A核苷酸的聚(A)序列(SEQ ID NO:27940),每个N编码长度为7-15个氨基酸的MHC I类表位、MHC II类表位、能够刺激B细胞应答的表位或其组合,L5是编码所述表位的原生N末端氨基酸序列的原生5'接头序列,并且其中所述5'接头序列编码长度至少为3个氨基酸的肽,L3是编码所述表位的原生C末端氨基酸序列的原生3'接头序列,并且其中所述3'接头序列编码长度为至少3个氨基酸的肽,并且U是PADRE II类序列和破伤风类毒素MHC II类序列中的每一者。

[0105] 在一些方面,所述组合物还包含纳米微粒递送媒介物。在一些方面,所述纳米微粒递送媒介物是脂质纳米粒子(LNP)。在一些方面,所述LNP包含可电离氨基脂质。在一些方面,所述可电离氨基脂质包含MC3样(二亚油基甲基-4-二甲基氨基丁酸酯)分子。在一些方面,所述纳米微粒递送媒介物包封所述抗原表达系统。

[0106] 在一些方面,所述抗原盒整合在所述至少一种启动子核苷酸序列和所述至少一种聚(A)序列之间。在一些方面,所述至少一种启动子核苷酸序列与所述SARS-CoV-2衍生核酸序列可操作地连接。

[0107] 在一些方面,所述一种或多种载体包含一种或多种+-链RNA。在一些方面,所述一种或多种+-链RNA载体包含5'7-甲基鸟苷(m7g)帽。在一些方面,所述一种或多种+-链RNA载体是通过体外转录产生。在一些方面,所述一种或多种载体在哺乳动物细胞内自我复制。

[0108] 在一些方面,所述骨架包含奥拉病毒(Aura virus)、摩根堡病毒(Fort Morgan virus)、委内瑞拉马脑炎病毒、罗斯河病毒(Ross River virus)、塞姆利基森林病毒(Semliki Forest virus)、辛德毕斯病毒(Sindbis virus)或马雅罗病毒(Mayaro virus)的至少一种核苷酸序列。在一些方面,所述骨架包含委内瑞拉马脑炎病毒的至少一种核苷酸序列。在一些方面,所述骨架至少包含由所述奥拉病毒、所述摩根堡病毒、所述委内瑞拉马脑炎病毒、所述罗斯河病毒、所述塞姆利基森林病毒、所述辛德毕斯病毒或所述马雅罗病毒的核苷酸序列编码的用于非结构蛋白介导的扩增的序列、26S启动子序列、聚(A)序列、非结构蛋白1(nsP1)基因、nsP2基因、nsP3基因和nsP4基因。在一些方面,所述骨架至少包含由所述奥拉病毒、所述摩根堡病毒、所述委内瑞拉马脑炎病毒、所述罗斯河病毒、所述塞姆利基森林病毒、所述辛德毕斯病毒或所述马雅罗病毒的核苷酸序列编码的用于非结构蛋白介导的扩增的序列、26S启动子序列和聚(A)序列。在一些方面,用于非结构蛋白介导的扩增的

序列选自由以下组成的组:甲病毒5'UTR、51-nt CSE、24-nt CSE、26S亚基因组启动子序列、19-nt CSE、甲病毒3'UTR或其组合。在一些方面,所述骨架不编码结构性病毒粒子蛋白衣壳E2和E1。在一些方面,所述抗原盒被插入以代替所述奥拉病毒、所述摩根堡病毒、所述委内瑞拉马脑炎病毒、所述罗斯河病毒、所述塞姆利基森林病毒、所述辛德毕斯病毒或所述马雅罗病毒的核苷酸序列内的结构性病毒粒子蛋白。在一些方面,所述委内瑞拉马脑炎病毒包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5的序列。在一些方面,所述委内瑞拉马脑炎病毒包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5的序列,其还包含碱基对7544和11175之间的缺失。在一些方面,所述骨架包含以SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7所示的序列。在一些方面,所述盒被插入在位置7544以代替如SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5的序列中所示的碱基对7544和11175之间的缺失。在一些方面,所述抗原盒的插入提供了包含nsP1-4基因和至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列的多顺反子RNA的转录,其中所述nsP1-4基因和所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列在单独的开放阅读框中。在一些方面,所述至少一种启动子核苷酸序列是由所述骨架编码的原生26S启动子核苷酸序列。

[0109] 在一些方面,所述骨架包含黑猩猩腺病毒载体的至少一种核苷酸序列,任选地其中所述黑猩猩腺病毒载体是ChAdV68载体。在一些方面,所述ChAdV68载体骨架包含以SEQ ID NO:1所示的序列。在一些方面,ChAdV68载体骨架包含以SEQ ID NO:1所示的序列,除了所述序列在选自由SEQ ID NO:1所示序列的黑猩猩腺病毒E1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4、L1、L2、L3、L4和L5基因组成的组的至少一种基因中完全缺失或功能性缺失,任选地其中所述序列在以下中完全缺失或功能性缺失:以SEQ ID NO:1所示序列的(1)E1A和E1B;(2)E1A、E1B和E3;或(3)E1A、E1B、E3和E4。在一些方面,所述ChAdV68载体骨架包含自SEQ ID NO:1的序列获得的基因或调控序列,任选地其中所述基因选自由以SEQ ID NO:1所示序列的黑猩猩腺病毒反向末端重复序列(ITR)、E1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4、L1、L2、L3、L4和L5基因组成的组。在一些方面,所述ChAdV68载体骨架包含部分缺失的E4基因,所述基因包含缺失或部分缺失的E4orf2区和缺失或部分缺失的E4orf3区,以及任选地缺失或部分缺失的E4orf4区。在一些方面,所述ChAdV68载体骨架包含SEQ ID NO:1所示序列的至少核苷酸2至36,518,并且还包含:(1)SEQ ID NO:1所示序列的至少核苷酸577至3403的E1缺失,(2)SEQ ID NO:1所示序列的至少核苷酸27,125至31,825的E3缺失,和(3)SEQ ID NO:1所示序列的至少核苷酸34,916至35,642的E4缺失;任选地其中所述抗原盒被插入在所述E1缺失内。在一些方面,所述ChAdV68载体骨架包含以SEQ ID NO:75所示的序列,任选地其中所述抗原盒被插入在所述E1缺失内。在一些方面,所述ChAdV68载体骨架包含在碱基对编号577和3403之间或碱基对456和3014之间的一个或多个缺失,并且任选地其中所述载体还包含在SEQ ID NO:1所示序列的碱基对27,125和31,825之间或碱基对27,816和31,333之间的一个或多个缺失。在一些方面,所述ChAdV68载体骨架包含在SEQ ID NO:1所示序列的碱基对编号3957和10346之间、碱基对编号21787和23370之间以及碱基对编号33486和36193之间的一个或多个缺失。在一些方面,其中所述盒被插入在所述ChAdV骨架中的E1区、E3区和/或允许并入所述盒的任何缺失的AdV区。在一些方面,所述ChAdV骨架由第一代、第二代或辅助依赖性腺病毒载体之一产生。

[0110] 在一些方面,所述至少一种启动子核苷酸序列选自由以下组成的组:CMV、SV40、EF-1、RSV、PGK、HSA、MCK和EBV启动子序列。在一些方面,所述至少一种启动子核苷酸序列是

CMV启动子序列。在一些方面,所述至少一种启动子核苷酸序列是外源RNA启动子。在一些方面,所述第二启动子核苷酸序列是26S启动子核苷酸序列或CMV启动子核苷酸序列。在一些方面,所述第二启动子核苷酸序列包含多个26S启动子核苷酸序列或多个CMV启动子核苷酸序列,其中每个26S启动子核苷酸序列或CMV启动子核苷酸序列提供所述单独的开放阅读框中的一者或多者的转录。

[0111] 在一些方面,所述一种或多种载体的大小各自为至少300nt。在一些方面,所述一种或多种载体的大小各自为至少1kb。在一些方面,所述一种或多种载体的大小各自为2kb。在一些方面,所述一种或多种载体的大小各自小于5kb。

[0112] 在一些方面,所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列中的至少一者编码由MHC I类呈递的多肽序列或其部分。在一些方面,所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列中的至少一者编码由MHC II类呈递的多肽序列或其部分。在一些方面,所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列中的至少一者编码能够刺激B细胞应答的多肽序列或其部分,任选地其中所述能够刺激B细胞应答的多肽序列或其部分包含全长蛋白质、蛋白质结构域、蛋白质亚基或预测或已知能够被抗体结合的抗原片段。

[0113] 在一些方面,每个SARS-CoV-2衍生核酸序列彼此直接连接。在一些方面,所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列中的至少一者利用编码接头的核酸序列与不同的SARS-CoV-2衍生核酸序列连接。在一些方面,所述接头连接在一些方面,所述接头选自由以下组成的组:(1)连续甘氨酸残基,长度为至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个残基(SEQ ID NO:27941);(2)连续丙氨酸残基,长度为至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个残基(SEQ ID NO:27942);(3)两个精氨酸残基(RR);(4)丙氨酸、丙氨酸、酪氨酸(AAY);(5)由哺乳动物蛋白酶体有效加工的长度为至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸残基的共有序列;(6)侧接源自同源蛋白来源的抗原并且长度为至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或2-20个氨基酸残基的一种或多种原生序列;和(7)弗林蛋白酶或TEV切割序列。在一些方面,所述接头连接两个MHC II类序列或一个MHC II类序列至一个MHC I类序列。在一些方面,所述接头包含序列GPGPG(SEQ ID NO:56)。

[0114] 在一些方面,所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列中的至少一种序列与增强所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列的表达、稳定性、细胞运输、加工和呈递和/或免疫原性的单独或连续的序列可操作地或直接地连接。在一些方面,所述单独或连续的序列包含以下中的至少一者:泛素序列、经修饰以增加蛋白酶体靶向的泛素序列(例如,所述泛素序列在位置76处含有Gly至Ala取代)、免疫球蛋白信号序列(例如,IgK)、主要组织相容性I类序列、溶酶体相关膜蛋白(LAMP)-1、人树突状细胞溶酶体相关膜蛋白和主要组织相容性II类序列;任选地其中所述经修饰以增加蛋白酶体靶向的泛素序列是A76。

[0115] 在一些方面,所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列中的至少一者编码经预测或验证能够由至少一种HLA等位基因呈递的两种或更多种不同的多肽。

[0116] 在一些方面,所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列中的每一者编码的多肽序列或其部分为经翻译的相应全长SARS-CoV-2蛋白的小于50%、小于49%、小于48%、小于47%、小于46%、小于45%、小于45%、小于43%、小于42%、小于41%、小于40%、小于39%、小于38%、小于37%、小于36%、小于35%、小于34%或小于33%。

[0117] 在一些方面,所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列中的每一者编码不会编码经

翻译的相应SARS-CoV-2蛋白的功能蛋白、功能蛋白结构域、功能蛋白亚基或功能蛋白片段的多肽序列或其部分。

[0118] 在一些方面，所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列中的两者或更多者衍生自相同的SARS-CoV-2基因。在一些方面，衍生自相同SARS-CoV-2基因的两个或更多个SARS-CoV-2衍生核酸序列被排序，使得如果第二核酸序列跟随在相应的SARS-CoV-2基因中的第一核酸序列之后，则所述第一核酸序列不能之后紧跟着所述第二核酸序列或连接到所述第二核酸序列。

[0119] 在一些方面，所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列包含至少2-10、2、3、4、5、6、7、8、9或10种核酸序列。在一些方面，所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列包含至少11-20、15-20、11-100、11-200、11-300、11-400、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20种或多达400种核酸序列。在一些方面，所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列包含至少2-400种核酸序列，并且其中所述SARS-CoV-2衍生核酸序列中的至少两者编码以下多肽序列或其部分，其(1)由MHC I类呈递，(2)由MHC II类呈递，和/或(3)能够刺激B细胞应答。在一些方面，所述SARS-CoV-2衍生核酸序列中的至少两者编码以下多肽序列或其部分，其(1)由MHC I类呈递，(2)由MHC II类呈递，和/或(3)能够刺激B细胞应答类别。

[0120] 在一些方面，当施用于受试者并被翻译时，由至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列编码的至少一种抗原呈递在抗原呈递细胞上，导致靶向SARS-CoV-2感染细胞表面上的至少一种抗原的免疫应答。在一些方面，当施用于受试者并被翻译时，由至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列编码的至少一种抗原导致靶向SARS-CoV-2病毒上的至少一种抗原的抗体应答。在一些方面，当将至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列施用于受试者并被翻译时，MHC I类或II类抗原中的至少一者被呈递在抗原呈递细胞上，导致靶向SARS-CoV-2感染细胞表面上的至少一种抗原的免疫应答，并且任选地其中所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列中的每一者的表达由所述至少一种启动子核苷酸序列驱动。

[0121] 在一些方面，每个MHC I类表位编码SARS-CoV-2衍生核酸序列编码长度为8至35个氨基酸，任选地长度为9-17、9-25、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35个氨基酸的多肽序列。在一些方面，存在至少一种MHC II类表位编码核酸序列。在一些方面，所述至少一种MHC II类表位编码核酸序列存在并且包含至少一种MHC II类SARS-CoV-2衍生核酸序列。在一些方面，所述至少一种MHC II类表位编码核酸序列的长度为12-20、12、13、14、15、16、17、18、19、20或20-40个氨基酸。在一些方面，所述至少一种MHC II类表位编码核酸序列存在并且包含至少一种通用MHC II类表位编码核酸序列，任选地其中所述至少一种通用序列包含破伤风类毒素和PADRE中的至少一者，和/或至少一种MHC II类SARS-CoV-2衍生的表位编码核酸序列。

[0122] 在一些方面，所述至少一种启动子核苷酸序列或所述第二启动子核苷酸序列是诱导型的。在一些方面，所述至少一种启动子核苷酸序列或所述第二启动子核苷酸序列是非诱导型的。在一些方面，所述至少一种聚(A)序列包含所述骨架原生的聚(A)序列。在一些方面，所述至少一种聚(A)序列包含所述骨架外源的聚(A)序列。

[0123] 在一些方面，所述至少一种聚(A)序列与所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列中的至少一者可操作地连接。在一些方面，所述至少一种聚(A)序列是至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个或至少90个连续A核苷酸(SEQ ID NO:

27943)。在一些方面,所述至少一种聚(A)序列是至少80个连续A核苷酸(SEQ ID NO:27940)。在一些方面,存在至少一种第二聚(A)序列。在一些方面,所述至少一种第二聚(A)序列包含SV40聚(A)信号序列或牛生长激素(BGH)聚(A)信号序列,或两种或更多种SV40聚(A)信号序列或BGH聚(A)信号序列的组合。在一些方面,所述至少一种第二聚(A)序列包含两种或更多种第二聚(A)序列,任选地其中所述两种或更多种第二聚(A)序列包含两种或更多种SV40聚(A)信号序列、两种或更多种BGH聚(A)信号序列,或SV40聚(A)信号序列和BGH聚(A)信号序列的组合。

[0124] 在一些方面,所述抗原盒还包含以下中的至少一者:内含子序列,外源内含子序列,组成型转运元件(CTE),RNA转运元件(RTE),土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)序列,内部核糖体进入序列(IRES)序列,编码2A自切割肽序列的核苷酸序列,编码弗林蛋白酶切割位点的核苷酸序列,或已知增强可操作地连接到所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列中的至少一者的mRNA的核输出、稳定性或翻译效率的5'或3'非编码区中的序列。

[0125] 在一些方面,所述抗原盒还包含报告基因,包括但不限于绿色荧光蛋白(GFP)、GFP变体、分泌型碱性磷酸酶、荧光素酶、荧光素酶变体、或可检测的肽或表位。在一些方面,所述可检测的肽或表位选自由HA标签、Flag标签、His标签或V5标签组成的组。

[0126] 在一些方面,所述一种或多种载体还包含一种或多种编码至少一种免疫调节剂的核酸序列。在一些方面,所述免疫调节剂是抗CTLA4抗体或其抗原结合片段、抗PD-1抗体或其抗原结合片段、抗PD-L1抗体或其抗原结合片段、抗4-1BB抗体或其抗原结合片段、或抗OX-40抗体或其抗原结合片段。在一些方面,所述抗体或其抗原结合片段是Fab片段、Fab'片段、单链Fv(scFv)、呈单一特异性或连接在一起的多个特异性的单域抗体(sdAb)(例如骆驼科动物抗体结构域),或全长单链抗体(例如,具有通过柔性接头连接的重链和轻链的全长IgG)。在一些方面,所述抗体的重链和轻链序列是由例如2A或IRES的自切割序列分开的连续序列;或者所述抗体的重链和轻链序列是通过柔性接头如连续甘氨酸残基连接。在一些方面,所述免疫调节剂是细胞因子。在一些方面,所述细胞因子是IL-2、IL-7、IL-12、IL-15或IL-21中的至少一者或其各自的变体。

[0127] 在一些方面,MHC I类或MHC II类表位编码SARS-CoV-2衍生核酸序列是通过执行以下步骤来选择:(a)从SARS-CoV-2病毒或SARS-CoV-2感染细胞获得外显子组、转录组或全基因组SARS-CoV-2核苷酸测序数据中的至少一者,其中所述SARS-CoV-2核苷酸测序数据用于获得代表一组抗原中的每一者的肽序列的数据;(b)将每个抗原的肽序列输入到呈递模型中,以产生所述抗原中的每一者由MHC等位基因中的一者或多者在SARS-CoV-2感染细胞表面上呈递的数值可能性集合,所述数值可能性集合已至少基于所接收的质谱数据进行鉴定;以及(c)基于所述数值可能性集合选择所述抗原集合的子集以产生经选择抗原集合,所述经选择抗原用于产生所述MHC I类或MHC II类表位编码SARS-CoV-2衍生核酸序列。

[0128] 在一些方面,每个MHC I类或MHC II类表位编码SARS-CoV-2衍生核酸序列是通过执行以下步骤来选择:(a)从SARS-CoV-2病毒或SARS-CoV-2感染细胞获得外显子组、转录组或全基因组SARS-CoV-2核苷酸测序数据中的至少一者,其中所述SARS-CoV-2核苷酸测序数据用于获得代表一组抗原中的每一者的肽序列的数据;(b)将每个抗原的肽序列输入到呈递模型中,以产生所述抗原中的每一者由MHC等位基因中的一者或多者在SARS-CoV-2感染细胞表面上呈递的数值可能性集合,所述数值可能性集合已至少基于所接收的质谱数据进

行鉴定;以及(c)基于所述数值可能性集合选择所述抗原集合的子集以产生经选择抗原集合,所述经选择抗原用于产生至少18种SARS-CoV-2衍生核酸序列。在一些方面,所述经选择抗原集合的数目为2-20。在一些方面,所述呈递模型表示以下两者之间的依赖性:(a)所述MHC等位基因中的特定一者和在肽序列的特定位置处的特定氨基酸的一对的存在;和(b)由所述对的所述MHC等位基因中的所述特定一者将在所述特定位置处包含所述特定氨基酸的所述肽序列呈递在SARS-CoV-2感染细胞表面上的可能性。在一些方面,选择所述经选择抗原集合包括基于所述呈递模型选择相对于未选择的抗原被呈递在SARS-CoV-2感染细胞表面上的可能性增加的抗原,任选地其中所述经选择抗原已被验证为由一个或多个特定的HLA等位基因呈递。在一些方面,选择所述经选择抗原集合包括基于所述呈递模型选择相对于未选择的抗原能够在受试者中诱导SARS-CoV-2特异性免疫应答的可能性增加的抗原。在一些方面,选择所述经选择抗原集合包括基于所述呈递模型选择相对于未选择的抗原能够被专职抗原呈递细胞(APC)呈递给初始T细胞的可能性增加的抗原,任选地其中所述APC是树突状细胞(DC)。在一些方面,选择所述经选择抗原集合包括基于所述呈递模型选择相对于未选择的抗原经由中心或外周耐受性受抑制的可能性降低的抗原。在一些方面,选择所述经选择抗原集合包括基于所述呈递模型选择相对于未选择的抗原能够在受试者中诱导对正常组织的自身免疫应答的可能性降低的抗原。在一些方面,外显子组或转录组SARS-CoV-2核苷酸测序数据是通过对SARS-CoV-2病毒或SARS-CoV-2感染组织或细胞进行测序而获得的。在一些方面,所述测序是下一代测序(NGS)或任何大规模并行测序方法。

[0129] 在一些方面,所述抗原盒包含由抗原盒中的相邻序列形成的连接表位序列。在一些方面,至少一个或每个连接表位序列对MHC具有大于500nM的亲和力。在一些方面,每个连接表位序列都是非自身的。

[0130] 在一些方面,预测或验证所述MHC I类和/或MHC II类表位中的每一者能够由至少5%的群体中存在的至少一个HLA等位基因呈递。在一些方面,预测或验证所述MHC I类和/或MHC II类表位中的每一者能够由至少一个HLA等位基因呈递,其中每个抗原/HLA对在群体中具有至少0.01%的抗原/HLA流行率。在一些方面,预测或验证所述MHC I类和/或MHC II类表位中的每一者能够由至少一个HLA等位基因呈递,其中每个抗原/HLA对在群体中具有至少0.1%的抗原/HLA流行率。

[0131] 在一些方面,所述抗原盒不编码包含经翻译的野生型核酸序列的非治疗性MHC I类或II类表位核酸序列,其中预测所述非治疗性表位将展示在所述受试者的MHC等位基因上。在一些方面,所述非治疗性预测的MHC I类或II类表位序列是由所述抗原盒中的相邻序列形成的连接表位序列。

[0132] 在一些方面,所述预测是基于通过将所述非治疗性表位的序列输入到呈递模型中而生成的呈递可能性。在一些方面,所述抗原盒中的所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列的顺序通过一系列包括以下的步骤确定:(a)产生一组对应于不同顺序的所述至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列的候选抗原盒序列;(b)对于每个候选抗原盒序列,基于所述候选抗原盒序列中非治疗性表位的呈递来确定呈递评分;以及(c)选择与低于预定阈值的呈递评分相关的候选盒序列作为抗原疫苗的抗原盒序列。

[0133] 本文还提供了一种药物组合物,本文提供的任何组合物和药学上可接受的载剂。在一些方面,所述组合物还包含佐剂。在一些方面,所述组合物还包含免疫调节剂。在一些

方面,所述免疫调节剂是抗CTLA4抗体或其抗原结合片段、抗PD-1抗体或其抗原结合片段、抗PD-L1抗体或其抗原结合片段、抗4-1BB抗体或其抗原结合片段、或抗OX-40抗体或其抗原结合片段。

[0134] 本文还提供了一种分离的核苷酸序列或分离的核苷酸序列集合,其包含本文所述的任何组合物的抗原盒和从SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5的序列获得的一种或多种元件,任选地其中所述一种或多种元件选自由以下组成的组:非结构蛋白介导的扩增所必需的序列、26S启动子核苷酸序列、聚(A)序列以及以SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5所示的序列的nsP1-4基因,并且任选地其中所述核苷酸序列是cDNA。在一些方面,所述序列或分离的核苷酸序列集合包含插入在以SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7所示序列的位置7544处的上述组合物权利要求中任一项所述的抗原盒。在一些方面,所述组合物还包含:从SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5的序列获得的所述一种或多种元件的T7或SP6 RNA聚合酶启动子核苷酸序列5';和任选地,所述聚(A)序列的一个或多个限制性位点3'。在一些方面,本文提供的任何组合物的抗原盒被插入在SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9的位置7563处。

[0135] 本文还提供了一种分离的核苷酸序列或分离的核苷酸序列集合,其包含本文提供的任何组合物的抗原盒和从SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:75的序列获得的一种或多种元件,任选地其中所述一种或多种元件选自由以下组成的组:黑猩猩腺病毒反向末端重复序列(ITR)、SEQ ID NO:1所示序列的E1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4、L1、L2、L3、L4和L5基因,并且任选地其中所述核苷酸序列是cDNA。在一些方面,所述序列或分离的核苷酸序列集合包含插入在SEQ ID NO:75所示序列的E1缺失内的本文提供的任何组合物的抗原盒。在一些方面,所述分离的序列还包含:从SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:75的序列获得的一种或多种元件的T7或SP6 RNA聚合酶启动子核苷酸序列5';和任选地,聚(A)序列的一个或多个限制性位点3'。

[0136] 本文还提供了包含本文提供的任何分离的核苷酸序列或分离的核苷酸序列集合的载体或载体集合。

[0137] 本文还提供了一种分离的细胞,其包含本文提供的任何分离的核苷酸序列或分离的核苷酸序列集合,任选地其中所述细胞是BHK-21、CHO、HEK293或其变体、911、HeLa、A549、LP-293、PER.C6或AE1-2a细胞。

[0138] 本文还提供了一种试剂盒,其包括本文提供的任何组合物和使用说明书。

[0139] 本文还提供了一种用于在受试者中治疗SARS-CoV-2感染或预防SARS-CoV-2感染的方法,所述方法包括向所述受试者施用本文提供的任何组合物或药物组合物。在一些方面,所述SARS-CoV-2衍生核酸序列编码至少一种免疫原性多肽,对应于由所述受试者感染或有感染风险的SARS-CoV-2亚型编码的多肽。

[0140] 在一些方面,本文所述的任何方法包括同源初免/加强策略。在一些方面,本文所述的任何方法包括异源初免/加强策略。在一些方面,所述异源初免/加强策略包括由不同疫苗平台编码的相同抗原盒。在一些方面,所述异源初免/加强策略包括由相同疫苗平台编码的不同抗原盒。在一些方面,所述异源初免/加强策略包括由不同疫苗平台编码的不同抗原盒。在一些方面,所述不同抗原盒包含刺突编码盒和单独的T细胞表位编码盒。在一些方面,所述不同抗原盒包含编码源自不同SARS-CoV-2分离株的不同表位和/或抗原的盒。

[0141] 本文还提供了一种用于在受试者中诱导免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用本文提供的任何组合物或药物组合物。在一些方面,所述受试者表达至少一种预

测或已知呈递由至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列编码的MHC I类或MHC II类表位的HLA等位基因。在一些方面,所述受试者表达至少一种预测或已知呈递由至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列编码的MHC I类表位的HLA等位基因,并且其中所述MHC I类表位包含至少一个包含如表A中所示的多肽序列的MHC I类表位。在一些方面,所述受试者表达至少一种预测或已知呈递由至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列编码的MHC II类表位的HLA等位基因,并且其中所述MHC II类表位包含至少一个包含如表B中所示的多肽序列的MHC II类表位。在一些方面,所述组合物是肌肉内(IM)、皮内(ID)、皮下(SC)或静脉内(IV)施用的。在一些方面,所述组合物是肌肉内施用的。

[0142] 在一些方面,所述方法还包括施用一种或多种免疫调节剂,任选地其中在施用所述组合物或药物组合物之前、同时或之后施用所述免疫调节剂。在一些方面,所述一种或多种免疫调节剂选自由以下组成的组:抗CTLA4抗体或其抗原结合片段、抗PD-1抗体或其抗原结合片段、抗PD-L1抗体或其抗原结合片段、抗4-1BB抗体或其抗原结合片段、或抗OX-40抗体或其抗原结合片段。在一些方面,所述免疫调节剂是静脉内(IV)、肌肉内(IM)、皮内(ID)或皮下(SC)施用的。在一些方面,所述皮下施用在所述组合物或药物组合物施用部位附近或紧邻一个或多个载体或组合物引流淋巴结。

[0143] 在一些方面,所述方法还包括向所述受试者施用第二疫苗组合物。在一些方面,所述第二疫苗组合物是在施用所述第一组合物或药物组合物之前施用。在一些方面,所述第二疫苗组合物是在施用本文提供的任何组合物或药物组合物之后施用。在一些方面,所述第二疫苗组合物与所施用的第一组合物或药物组合物相同。在一些方面,所述第二疫苗组合物与所施用的第一组合物或药物组合物不同。在一些方面,所述第二疫苗组合物包含编码至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列的黑猩猩腺病毒载体。在一些方面,由所述黑猩猩腺病毒载体编码的至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列与本文提供的任何组合物的至少一种SARS-CoV-2衍生核酸序列相同。

[0144] 本文还提供了一种制造上述组合物权利要求中任一项所述的一种或多种载体的方法,所述方法包括:(a)获得包含骨架和抗原盒的线性化DNA序列;(b)通过将所述线性化DNA序列添加到包含将所述线性化DNA序列转录成RNA的所有必要组分的体外转录反应中,来体外转录所述线性化DNA序列,任选地还包括将m7g帽体外添加到所得RNA中;以及(c)从所述体外转录反应中分离所述一种或多种载体。在一些方面,所述线性化DNA序列是通过将DNA质粒序列线性化或通过使用PCR扩增而产生的。在一些方面,所述DNA质粒序列是使用细菌重组或全基因组DNA合成或全基因组DNA合成与所合成DNA在细菌细胞中扩增中的一者产生的。在一些方面,从所述体外转录反应中分离所述一种或多种载体涉及苯酚氯仿提取、基于二氧化硅柱的纯化或类似的RNA纯化方法中的一者或多者。

[0145] 本文还提供了一种制造用于递送抗原表达系统的上述组合物权利要求中任一项所述的组合物的方法,所述方法包括:(a)提供用于纳米微粒递送媒介物的组分;(b)提供所述抗原表达系统;以及(c)为所述纳米微粒递送媒介物和所述抗原表达系统提供足以产生用于递送所述抗原表达系统的组合物的条件。在一些方面,所述条件由微流体混合提供。

[0146] 本文还提供了一种制造本文公开的腺病毒载体的方法,所述方法包括:获得包含至少一种启动子序列和抗原盒的质粒序列;将所述质粒序列转染到一种或多种宿主细胞中;以及从所述一种或多种宿主细胞中分离所述腺病毒载体。

[0147] 在一些方面，分离包括：裂解宿主细胞以获得包含所述腺病毒载体的细胞裂解物；以及从所述细胞裂解物中纯化所述腺病毒载体。

[0148] 在一些方面，所述质粒序列是使用细菌重组或全基因组DNA合成或全基因组DNA合成与所合成DNA在细菌细胞中扩增中的一者产生的。在一些方面，所述一种或多种宿主细胞是CHO、HEK293或其变体、911、HeLa、A549、LP-293、PER.C6和AE1-2a细胞中的至少一者。在一些方面，从所述细胞裂解物中纯化所述腺病毒载体涉及色谱分离、离心、病毒沉淀和过滤中的一者或多者。

[0149] 在一些方面，任何上述组合物还包含纳米微粒递送媒介物。在一些方面，所述纳米微粒递送媒介物可以是脂质纳米粒子(LNP)。在一些方面，所述LNP包含可电离氨基脂质。在一些方面，所述可电离氨基脂质包含MC3样(二亚油基甲基-4-二甲基氨基丁酸酯)分子。在一些方面，所述纳米微粒递送媒介物包封所述抗原表达系统。

[0150] 在一些方面，任何上述组合物还包含多个LNP，其中所述LNP包含：所述抗原表达系统；阳离子脂质；非阳离子脂质；和抑制所述LNP聚集的缀合脂质，其中所述多个LNP中至少约95％的LNP：具有非层状形态；或者是电子致密的。

[0151] 在一些方面，所述非阳离子脂质是(1)磷脂和(2)胆固醇或胆固醇衍生物的混合物。

[0152] 在一些方面，所述抑制LNP聚集的缀合脂质是聚乙二醇(PEG)-脂质缀合物。在一些方面，所述PEG-脂质缀合物选自由以下组成的组：PEG-二酰基甘油(PEG-DAG)缀合物、PEG二烷氧基丙基(PEG-DAA)缀合物、PEG-磷脂缀合物、PEG-神经酰胺(PEG-Cer)缀合物及其混合物。在一些方面，所述PEG-DAA缀合物是选自由以下组成的组的成员：PEG-二癸氧基丙基(C_{10})缀合物、PEG-二月桂氧基丙基(C_{12})缀合物、PEG-二肉豆蔻酰氧基丙基(C_{14})缀合物、PEG-二棕榈酰氧基丙基(C_{16})缀合物、PEG-二硬脂酰氧基丙基(C_{18})缀合物及其混合物。

[0153] 在一些方面，所述抗原表达系统完全包封在所述LNP中。

[0154] 在一些方面，所述LNP的非层状形态包括反六角形(H_{II})或立方相结构。

[0155] 在一些方面，所述阳离子脂质占LNP中存在的总脂质的约10摩尔％至约50摩尔％。在一些方面，所述阳离子脂质占LNP中存在的总脂质的约20摩尔％至约50摩尔％。在一些方面，所述阳离子脂质占LNP中存在的总脂质的约20摩尔％至约40摩尔％。

[0156] 在一些方面，所述非阳离子脂质占LNP中存在的总脂质的约10摩尔％至约60摩尔％。在一些方面，所述非阳离子脂质占LNP中存在的总脂质的约20摩尔％至约55摩尔％。在一些方面，所述非阳离子脂质占LNP中存在的总脂质的约25摩尔％至约50摩尔％。

[0157] 在一些方面，所述缀合脂质占LNP中存在的总脂质的约0.5摩尔％至约20摩尔％。在一些方面，所述缀合脂质占LNP中存在的总脂质的约2摩尔％至约20摩尔％。在一些方面，所述缀合脂质占LNP中存在的总脂质的约1.5摩尔％至约18摩尔％。

[0158] 在一些方面，大于95％的LNP具有非层状形态。在一些方面，大于95％的LNP是电子致密的。

[0159] 在一些方面，任何上述组合物还包含多个LNP，其中所述LNP包含：阳离子脂质，其占LNP中存在的总脂质的50摩尔％至65摩尔％；抑制LNP聚集的缀合脂质，其占LNP中存在的总脂质的0.5摩尔％至2摩尔％；和非阳离子脂质，其包含：磷脂和胆固醇或其衍生物的混合物，其中所述磷脂占LNP中存在的总脂质的4摩尔％至10摩尔％，并且所述胆固醇或其衍生

物占LNP中存在的总脂质的30摩尔％至40摩尔％；磷脂和胆固醇或其衍生物的混合物，其中所述磷脂占LNP中存在的总脂质的3摩尔％至15摩尔％，并且所述胆固醇或其衍生物占LNP中存在的总脂质的30摩尔％至40摩尔％；或LNP中存在的总脂质的高达49.5摩尔％，并包含磷脂和胆固醇或其衍生物的混合物，其中所述胆固醇或其衍生物占LNP中存在的总脂质的30摩尔％至40摩尔％。

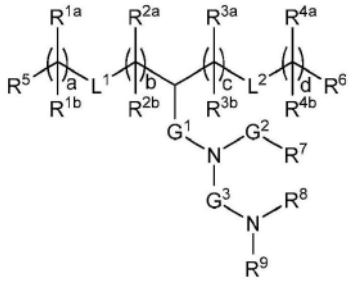
[0160] 在一些方面，任何上述组合物还包含多个LNP，其中所述LNP包含：阳离子脂质，其占LNP中存在的总脂质的50摩尔％至85摩尔％；抑制LNP聚集的缀合脂质，其占LNP中存在的总脂质的0.5摩尔％至2摩尔％；和非阳离子脂质，其占LNP中存在的总脂质的13摩尔％至49.5摩尔％。

[0161] 在一些方面，所述磷脂包含二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)或其混合物。

[0162] 在一些方面，所述缀合脂质包含聚乙二醇(PEG)-脂质缀合物。在一些方面，所述PEG-脂质缀合物包含PEG-二酰基甘油(PEG-DAG)缀合物、PEG-二烷氧基丙基(PEG-DAA)缀合物或其混合物。在一些方面，所述PEG-DAA缀合物包含PEG-二肉豆蔻酰氧基丙基(PEG-DMA)缀合物、PEG-二硬脂酰氧基丙基(PEG-DSA)缀合物或其混合物。在一些方面，所述缀合物的PEG部分具有约2,000道尔顿的平均分子量。

[0163] 在一些方面，所述缀合脂质占LNP中存在的总脂质的1摩尔％至2摩尔％。

[0164] 在一些方面，所述LNP包含具有式I结构的化合物：

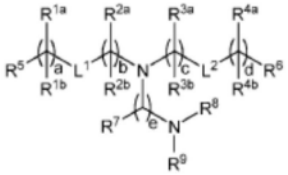
[0165] 

I

[0166] 或其药学上可接受的盐、互变异构体、前药或立体异构体，其中：L^1和L^2各自独立地是-O(C=O)-、-(C=O)O-、-C(=O)-、-O-、-S(O)$_x$-、-S-S-、-C(=O)S-、-SC(=O)-、-R^aC(=O)-、-C(=O)R^a-、-R^aC(=O)R^a-、-OC(=O)R^a-、-R^aC(=O)O-或直接键；G^1是Ci-C_2亚烷基、-(C=O)-、-O(C=O)-、-SC(=O)-、-R^aC(=O)-或直接键；-C(=O)-、-(C=O)O-、-C(=O)S-、-C(=O)R^a-或直接键；G是Ci-C_6亚烷基；R^a是H或C1-C12烷基；R^{1a}和R^{1b}在每次出现时独立地是：(a)H或C_1-C_{12}烷基；或(b)R^{1a}是H或C_1-C_{12}烷基，并且R^{1b}和其所结合的碳原子一起与相邻R^{1b}和其所结合的碳原子一起形成碳碳双键；R^{2a}和R^{2b}在每次出现时独立地是：(a)H或C_1-C_{12}烷基；或(b)R^{2a}是H或C_1-C_{12}烷基，并且R^{2b}和其所结合的碳原子一起与相邻R^{2b}和其所结合的碳原子一起形成碳碳双键；R^{3a}和R^{3b}在每次出现时独立地是：(a)H或C_1-C_{12}烷基；或(b)R^{3a}是H或C_1-C_{12}烷基，并且R^{3b}和其所结合的碳原子一起与相邻R和其所结合的碳原子一起形成碳碳双键；R^{4a}和R^{4b}在每次出现时独立地是：(a)H或C1-C12烷基；或(b)R^{4a}是H或C1-C12烷基，并且R^{4b}和其所结合的碳原子一起与相邻R^{4b}和其所结合的碳原子一起形成碳碳双键；R^5和R^6各自独立地是H或甲基；R^7是C4-C20烷基；R^8和R^9各自独立地是C1-C12烷基；或者R^8和R^9与其所连接

的氮原子一起形成5元、6元或7元杂环；a、b、c和d各自独立地是1至24的整数；并且x是0、1或2。

[0167] 在一些方面，所述LNP包含具有式II结构的化合物：

[0168] 

II

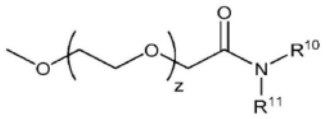
[0169] 或其药学上可接受的盐、互变异构体、前药或立体异构体，其中：L^1和L^2各自独立地是-O(C=O)-、-(C=O)O-或碳碳双键；R^{1a}和R^{1b}在每次出现时独立地是(a)H或C_1-C_{12}烷基，或(b)R^{1a}是H或C_1-C_{12}烷基，并且R^{1b}和其所结合的碳原子一起与相邻R^{1b}和其所结合的碳原子一起形成碳碳双键；R^{2a}和R^{2b}在每次出现时独立地是(a)H或C_1-C_{12}烷基，或(b)R^{2a}是H或C_1-C_{12}烷基，并且R^{2b}和其所结合的碳原子一起与相邻R^{2b}和其所结合的碳原子一起形成碳碳双键；R^{3a}和R^{3b}在每次出现时独立地是(a)H或C_1-C_{12}烷基，或(b)R^{3a}是H或C_1-C_{12}烷基，并且R^{3b}和其所结合的碳原子一起与相邻R^{3b}和其所结合的碳原子一起形成碳碳双键；R^{4a}和R^{4b}在每次出现时独立地是(a)H或C_1-C_{12}烷基，或(b)R^{4a}是H或C_1-C_{12}烷基，并且R^{4b}和其所结合的碳原子一起与相邻R^{4b}和其所结合的碳原子一起形成碳碳双键；R^5和R^6各自独立地是甲基或环烷基；R^7在每次出现时独立地是H或C_1-C_{12}烷基；R^8和R^9各自独立地是未被取代的C1-C12烷基；或者R^8和R^9与其所连接的氮原子一起形成包含一个氮原子的5元、6元或7元杂环；a和d各自独立地是0至24的整数；b和c各自独立地是1至24的整数；并且e是1或2，其条件是：R^{1a}、R^{2a}、R^{3a}或R^{4a}中的至少一者是C1-C12烷基，或者L^1或L^2中的至少一者是-O(C=O)-或-(C=O)O-；并且R^{1a}和R^{1b}当a为6时不是异丙基或者当a为8时不是正丁基。

[0170] 在一些方面，任何上述组合物还包含一种或多种赋形剂，所述赋形剂包含中性脂质、类固醇和聚合物缀合脂质。在一些方面，所述中性脂质包含1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DMPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)和1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)中的至少一者。在一些方面，所述中性脂质是DSPC。

[0171] 在一些方面，所述化合物与所述中性脂质的摩尔比在约2:1至约8:1的范围内。

[0172] 在一些方面，所述类固醇是胆固醇。在一些方面，所述化合物与胆固醇的摩尔比在约2:1至1:1的范围内。

[0173] 在一些方面，所述聚合物缀合脂质是聚乙二醇化脂质。在一些方面，所述化合物与所述聚乙二醇化脂质的摩尔比在约100:1至约25:1的范围内。在一些方面，所述聚乙二醇化脂质是PEG-DAG、PEG聚乙烯(PEG-PE)、PEG-琥珀酰基-二酰基甘油(PEG-S-DAG)、PEG-cer或PEG二烷氧基丙基氨基甲酸酯。在一些方面，所述聚乙二醇化脂质具有以下结构III：

[0174] 

III

[0175] 或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体，其中：R^{10}和R^{11}各自独立地是含有10至30个碳原子的直链或支链的饱和或不饱和的烷基链，其中所述烷基链任选地被一个或多个酯键中断；并且z具有30至60范围内的平均值。在一些方面，R^{10}和R^{11}各自独立地是具有12至16个碳原子的直链的饱和烷基链。在一些方面，平均z是约45。

[0176] 这里开始

[0177] 在一些方面，所述LNP在与聚阴离子核酸混合时自组装成非双层结构。在一些方面，所述非双层结构的直径介于60nm和120nm之间。在一些方面，所述非双层结构的直径为约70nm、约80nm、约90nm或约100nm。在一些方面，其中纳米微粒递送媒介物具有约100nm的直径。

[0178] 本文还提供了包含本文所述的任何核苷酸序列的载体或载体集合。本文还公开了包含本文公开的分离的核苷酸序列的载体。

[0179] 本文还提供了包含本文所述的任何核苷酸序列或分离的核苷酸序列集合的分离的细胞，任选地其中所述细胞是BHK-21、CHO、HEK293或其变体、911、HeLa、A549、LP-293、PER.C6或AE1-2a细胞。

[0180] 本文还提供了包括本文所述的任何组合物和使用说明书的试剂盒。本文还公开了包括本文公开的载体或组合物和使用说明书的试剂盒。

[0181] 本文还提供了一种用于治疗患有Covid-19的受试者的方法，所述方法包括向所述受试者施用本文所述的任何组合物或任何药物组合物。

[0182] 本文还提供了一种用于治疗感染SARS-CoV-2或有感染SARS-CoV-2风险的受试者的方法，所述方法包括向所述受试者施用本文所述的任何组合物或任何药物组合物。

[0183] 本文还提供了一种用于在受试者中刺激免疫应答的方法，所述方法包括向所述受试者施用本文所述的任何组合物或任何药物组合物。

[0184] 本文还公开了一种用于治疗受试者的方法，所述方法包括向所述受试者施用本文公开的载体或本文公开的药物组合物。

[0185] 本文还公开了一种制造任何上述组合物的一种或多种载体的方法。

[0186] 本文还公开了一种制造本文公开的任何组合物的方法。

附图说明

[0187] 关于以下描述和附图将更好地理解本发明的这些和其他特征、方面和优势，在所述附图中：

[0188] 图1呈现了SARS-CoV-2基因组结构示意图，描绘了其中鉴定的至少14个开放阅读框(ORF)。图改编自Zhou等人，(2020)[A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin.Nature,579(1月)]。

[0189] 图2描绘了复制酶ORF1ab的16个切割产物和相关信息。图改编自Wu等人，(2020).[Nature,579(1月)]

[0190] 图3描绘了产生平衡免疫应答的一般疫苗接种方法,所述方法诱导中和抗体(来自B细胞)以及效应和记忆CD8+T细胞应答以获得最大功效。SARS-CoV-2基因组结构改编自Zhou等人,(2020)[A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin.Nature,579(1月)]。

[0191] 图4展示了野生型和D614G变体SARS-Cov-2刺突蛋白在不同地理位置随时间变化的已知流行率。

[0192] 图5展示了仅编码刺突或编码刺突和额外预测的串联T细胞表位的盒在所显示的四个群体上的覆盖率。第一栏显示预计呈递的SARS-CoV-2表位数量,并且第二栏显示基于0.2PPV的预期呈递表位数量。如果使用特定数量的表位,则每行显示每个群体的保护覆盖率。

[0193] 图6A说明了由每个MHC II类等位基因分别呈递的刺突蛋白或额外预测的串联T细胞表位的预测表位的数量。

[0194] 图6B说明了从仅编码刺突(上图)或编码刺突和额外预测的串联T细胞表位(下图)的盒预测将在所示四个群体中呈递的SARS-CoV-2表位的数量。

[0195] 图7A呈现了含有I类等位基因的训练样本的数量(至少10个样本)。

[0196] 图7B呈现了描绘每个I类等位基因的训练样本数量与等位基因数量的直方图。

[0197] 图8A展示了用编码SARS-CoV-2刺突蛋白的ChAdV68载体免疫的小鼠的T细胞应答。显示的是离体刺激(过夜)后的IFNγELISpot,其中重叠肽池(15个氨基酸长,11个氨基酸重叠)跨越刺突抗原。左图呈现每个测试的单独肽池的每10^6个脾细胞的SFC(每个池的平均值+/-SE,每组N=6(对于首次试验,n=3))。右图呈现两个肽池的总应答的每10^6个脾细胞的SFC(平均值+/-SD,每只动物对两个池的应答总和)。每个样品和池相对于DMSO对照进行背景校正。

[0198] 图8B展示了用编码SARS-CoV-2刺突蛋白的SAM载体免疫小鼠的T细胞应答。显示的是离体刺激(过夜)后的IFNγELISpot,其中重叠肽池(15个氨基酸长,11个氨基酸重叠)跨越刺突抗原。作为每个测试的单独肽池的每10^6个脾细胞的SFC。

[0199] 图8C展示了用编码SARS-CoV-2刺突蛋白的SAM载体免疫小鼠的T细胞应答。显示的是在离体刺激(过夜)后的IFNγELISpot,其中重叠肽池(15个氨基酸长,11个氨基酸重叠)跨越刺突抗原,作为跨两个肽池的组合应答的每10^6个脾细胞的SFC。

[0200] 图9描绘了SARS-CoV-2疫苗在小鼠中的功效研究的示意图。

[0201] 图10A显示了使用抗刺突S2抗体在编码各种刺突变异的载体中表达刺突的蛋白质印迹。

[0202] 图10B显示了使用抗刺突S1抗体在编码各种刺突变异的载体中表达刺突的蛋白质印迹。

[0203] 图10C显示了使用抗刺突S1抗体在编码全长刺突、单独的刺突S1或单独的刺突S2的载体中表达刺突的蛋白质印迹。

[0204] 图10D显示了使用抗刺突S2抗体在编码全长刺突、单独的刺突S1或单独的刺突S2的载体中表达刺突的蛋白质印迹。

[0205] 图11显示了使用抗刺突S2抗体在编码各种序列优化的刺突变异的载体中表达刺突的蛋白质印迹。

[0206] 图12A描绘了用于评估SARS-CoV-2转录物的RNA剪接的基于PCR的测定的示意图。

[0207] 图12B显示了编码的刺突蛋白的PCR扩增子。左图描绘了来自受感染293细胞的cDNA模板(“ChAd-刺突(IDT)cDNA”)或来自编码SARS-CoV-2刺突盒的质粒(“刺突质粒”)的扩增子。右图描绘了来自用仅编码刺突S1(“刺突S1”)或全长刺突(“刺突”)的载体感染的293细胞的cDNA的扩增子。

[0208] 图13显示了来自用编码各种刺突变异的载体感染的293细胞的cDNA编码的刺突蛋白的PCR扩增子。

[0209] 图14呈现了具有至少一个估计接收至少一个由TCE5编码的免疫原性表位的HLA的指定祖先群体的估计覆盖率,其中当个体的HLA(1)已知呈递编码表位(“验证表位”),或(2)预计呈递至少4个(第1栏)、5个(第2栏)、6个(第3栏)或7个(第4栏)编码表位(“预测表位”;EDGE评分>.01)时,认为收到免疫原性肽呈递发生。FA=非裔美国人,API=亚洲或太平洋岛民,EUR=欧洲人,HIS=西班牙裔

[0210] 图15A呈现了在施用带有不同序列优化“IDT刺突$_g$”(显示为“刺突V1”或“v1”)或“CT刺突$_g$”(显示为“刺突V2”或“v2”)的刺突编码盒的ChAdV平台后的T细胞应答(左图)、刺突特异性IgG抗体(中图)和中和抗体(右图)。Balb/c小鼠以1x10^{11} VP基于ChAdV的疫苗平台免疫。

[0211] 图15B呈现了在施用带有不同序列优化“IDT刺突$_g$”(显示为“刺突V1”或“v1”)或“CT刺突$_g$”(显示为“刺突V2”或“v2”)的刺突编码盒的SAM平台后的T细胞应答(左图)、刺突特异性IgG抗体(中图)和中和抗体(右图)。Balb/c小鼠以10μg基于SAM的疫苗平台免疫。

[0212] 图16呈现了在施用具有未修饰或修饰(“CT刺突F2P$_g$”显示为“刺突F2P”)刺突编码盒(所有载体都利用刺突序列v2)的ChAdV平台(左图)或SAM平台(右图)后的刺突特异性IgG抗体产生。如所示,Balb/c小鼠用1x10^{11} VP基于ChAdV的疫苗平台或10μg基于SAM的疫苗平台免疫。

[0213] 图17A呈现了在施用具有仅编码刺突的修饰盒(“CT刺突F2P$_g$”显示为“刺突”)和修饰的刺突以及编码TCE5的其他非刺突T细胞表位(显示为“刺突TCE”)的ChAdV平台后T细胞对刺突的应答(左图)和T细胞对编码的T细胞表位的应答(右图)。Balb/c小鼠用1x10^{11} VP基于ChAdV的疫苗平台免疫。显示的是免疫后2周的IFNγELISpot。T细胞对跨越刺突、核壳体或Orf3a的重叠肽池的应答。

[0214] 图17B呈现了在施用具有仅编码刺突的修饰盒(“CT刺突F2P$_g$”显示为“刺突”)和修饰的刺突以及编码TCE5的其他非刺突T细胞表位(显示为“TCE刺突”)的SAM平台后T细胞对刺突的应答(左图)和T细胞对编码的T细胞表位的应答(右图)。Balb/c小鼠用10μg基于SAM的疫苗平台免疫。显示的是免疫后2周的IFNγELISpot。T细胞对跨越刺突、核壳体或Orf3a的重叠肽池的应答。

[0215] 图18A呈现了在用包括单独的“IDT刺突$_g$”(左栏)、从第一个亚基因组启动子表达的IDT刺突$_g$和接着从第二个亚基因组启动子表达的TCE5(中栏),或从第一个亚基因组启动子表达的TCE5和接着从第二个亚基因组启动子表达的IDT刺突$_g$的SAM构建体免疫后,T细胞对刺突的应答(上图;IFNg ELISpot。对跨越刺突抗原的8个重叠肽池的应答总和),T细胞对编码的T细胞表位的应答(中图;IFNg ELISpot。对跨越NCap、膜和Orf3a的3个重叠肽池的应答总和),和刺突特异性IgG抗体(下图;通过MSD ELISA测量的S1 IgG结合。插值终点滴度。

几何平均值，几何SD)。对于T细胞应答，Balb/c小鼠用10ug每种疫苗进行免疫，n＝6/组。免疫后2周进行脾细胞分离。对于IgG应答，Balb/c小鼠用10ug每种疫苗进行免疫，n＝4/组。在免疫后4周采集并分析血清。

[0216] 图18B呈现了在用包括单独的“IDT刺突$_g$”(第一栏)、从第一个亚基因组启动子表达的IDT刺突$_g$和接着从第二个亚基因组启动子表达的TCE6或TCE7(分别是第2栏和第4栏)，或从第一个亚基因组启动子表达的TCE6或TCE7和接着从第二个亚基因组启动子表达的IDT刺突$_g$(分别是第3栏和第5栏)的SAM构建体免疫后，T细胞对刺突的应答(上图；IFNg ELISpot。对跨越刺突抗原的8个重叠肽池的应答总和)，T细胞对编码的T细胞表位的应答(中图；IFNg ELISpot。对跨越NCap、膜和Orf3a的3个重叠肽池的应答总和)，和刺突特异性IgG抗体(下图；通过MSD ELISA测量的S1 IgG结合。插值终点滴度。几何平均值，几何SD)。对于T细胞应答，Balb/c小鼠用10ug每种疫苗进行免疫，n＝6/组。免疫后2周进行脾细胞分离。对于IgG应答，Balb/c小鼠用10ug每种疫苗进行免疫，n＝4/组。在免疫后4周采集并分析血清。

[0217] 图18C呈现了在用包括单独的“CT刺突$_g$”(第一栏)、从第一个亚基因组启动子表达的CT刺突$_g$和接着从第二个亚基因组启动子表达的TCE5或TCE8(分别是第2栏和第4栏)，或从第一个亚基因组启动子表达的TCE5或TCE8和接着从第二个亚基因组启动子表达的CT刺突$_g$的SAM构建体免疫后，T细胞对刺突的应答(上图；IFNg ELISpot。对跨越刺突抗原的2个重叠肽池的应答总和)，T细胞对编码的T细胞表位的应答(中图；IFNg ELISpot。对跨越NCap和Orf3a的2个重叠肽池的应答总和)，和刺突特异性IgG抗体(下图；通过MSD ELISA测量的S1 IgG结合。插值终点滴度。几何平均值，几何SD)。对于T细胞应答，Balb/c小鼠用10ug每种疫苗进行免疫，n＝6/组。免疫后2周进行脾细胞分离。对于IgG应答，Balb/c小鼠用10ug每种疫苗进行免疫，n＝4/组。在免疫后4周采集并分析血清。

[0218] 图19A呈现了在施用具有带有“CT刺突$_g$”的刺突编码盒的ChAdV平台后跨多个刺突T细胞表位池的T细胞应答(左图)、随着时间的刺突特异性IgG抗体滴度(右上图)和随着时间的中和抗体滴度(右下图)。Balb/c小鼠用$1x10^{11}$ VP基于ChAdV的疫苗平台免疫。T细胞应答是免疫后2周对跨越刺突抗原的8个重叠肽池进行的IFNγELISpot。

[0219] 图19B呈现了在施用具有带有“CT刺突$_g$”的刺突编码盒后跨多个刺突T细胞表位池的T细胞应答(左图)、随着时间的刺突特异性IgG抗体滴度(右上图)和随着时间的中和抗体滴度(右下图)。Balb/c小鼠用10μg基于SAM的疫苗平台免疫。示出了免疫后2周的IFNγ ELISpot。T细胞应答是免疫后2周对跨越刺突抗原的8个重叠肽池进行的IFNγELISpot。

[0220] 图20A呈现了在施用包括带有“CT刺突$_g$”的刺突编码盒的ChAdV平台初免剂量，然后后续施用包括带有“IDT刺突$_g$”的刺突编码盒的SAM平台加强剂量后小鼠中的异源免疫方案(上图)和跨多个刺突T细胞表位池的T细胞应答(下图)。小鼠用$6x10^9$ VP基于ChAdV的疫苗平台和10μg基于SAM的疫苗平台免疫。T细胞应答是对跨越刺突抗原的8个重叠肽池。IFNg ELISpot。平均值+/-SEM。

[0221] 图20B呈现了在施用包括带有“CT刺突$_g$”的刺突编码盒的ChAdV平台初免剂量，然后后续施用包括带有“IDT刺突$_g$”的刺突编码盒的SAM平台加强剂量后在指定时间的刺突特异性IgG抗体滴度(左图；ELISA。几何平均终点滴度，几何SD)和在指定时间的中和抗体滴度(右图；假病毒中和滴度。几何平均值，几何SD)。小鼠用$6x10^9$VP基于ChAdV的疫苗平台和10μ

g基于SAM的疫苗平台免疫。

[0222] 图21A呈现了在施用包括带有“CT刺突$_g$”的刺突编码盒的ChAdV平台初免剂量，然后后续施用包括带有“IDT刺突$_g$”的刺突编码盒的SAM平台加强剂量后NHP中的异源免疫方案(上图)和跨多个刺突T细胞表位池的峰值T细胞应答(中图和下图)。NHP(n＝5)用1x10^{12} VP基于ChAdV的疫苗平台和100μg基于SAM的疫苗平台免疫。

[0223] 图21B呈现了在施用包括带有“CT刺突$_g$”的刺突编码盒的ChAdV平台初免剂量，然后后续施用包括带有“IDT刺突$_g$”的刺突编码盒的SAM平台加强剂量后随时间变化的刺突特异性IgG抗体滴度(左上图)、随时间变化的中和抗体滴度(左下图)，以及与恢复期人类血清中发现的滴度相比的中和抗体滴度(右图)。NHP(n＝5)用1x10^{12}VP基于ChAdV的疫苗平台和100μg基于SAM的疫苗平台免疫。

[0224] 图22A呈现了在施用包括带有“IDT刺突$_D$”的刺突编码盒的SAM平台后小鼠中的同源免疫初免/加强方案(上图)和T细胞对刺突的应答(下图)。Balb/c小鼠用10μg基于SAM的疫苗平台进行免疫。

[0225] 图22B呈现了在施用包括带有“IDT刺突$_D$”的刺突编码盒的SAM平台后在指定时间的刺突特异性IgG抗体滴度(左图)和中和抗体滴度(右图)。Balb/c小鼠用10μg基于SAM的疫苗平台进行免疫。

[0226] 图23呈现了在施用包括带有“IDT刺突$_G$”的刺突编码盒的SAM平台后小鼠中的同源免疫初免/加强方案(上图)、刺突特异性IgG抗体滴度(中图)、随时间变化的中和抗体滴度(下图)和与恢复期人类血清中发现的滴度相比的中和抗体滴度(右下图)。Balb/c小鼠用30μg基于SAM的疫苗平台进行免疫。

[0227] 图24A呈现了包含在TCE10中的核衣壳序列图谱，包括具有侧翼序列的框架、验证表位、预测表位、突变以及框架与突变之间的重叠。

[0228] 图24B呈现了包含在TCE10中的ORF3a的序列图谱，包括具有侧翼序列的框架、验证表位、预测表位、突变以及框架与突变之间的重叠。

[0229] 图24C呈现了包含在TCE10中的nsp3的序列图谱，包括具有侧翼序列的框架、验证表位、预测表位、突变以及框架与突变之间的重叠。

[0230] 图24D呈现了包含在TCE10中的膜的序列图谱，包括具有侧翼序列的框架、验证表位、预测表位、突变以及框架与突变之间的重叠。

[0231] 图24E呈现了包含在TCE10中的nsp4的序列图谱，包括具有侧翼序列的框架、验证表位、预测表位、突变以及框架与突变之间的重叠。

[0232] 图24F呈现了包含在TCE10中的nsp12的序列图谱，包括具有侧翼序列的框架、验证表位、预测表位、突变以及框架与突变之间的重叠。

[0233] 图25A呈现了包含在TCE9中的nsp12的序列图谱，包括具有侧翼序列的框架、验证表位、预测表位、突变以及框架与突变之间的重叠。

[0234] 图25B呈现了包含在TCE9中的nsp4的序列图谱，包括具有侧翼序列的框架、验证表位、预测表位、突变以及框架与突变之间的重叠。

[0235] 图25C呈现了包含在TCE9中的膜的序列图谱，包括具有侧翼序列的框架、验证表位、预测表位、突变以及框架与突变之间的重叠。

[0236] 图25D呈现了包含在TCE9中的nsp3的序列图谱，包括具有侧翼序列的框架、验证表

位、预测表位、突变以及框架与突变之间的重叠。

[0237] 图25E呈现了包含在TCE9中的ORF3a的序列图谱，包括具有侧翼序列的框架、验证表位、预测表位、突变以及框架与突变之间的重叠。

[0238] 图25F呈现了包含在TCE9中的核衣壳的序列图谱，包括具有侧翼序列的框架、验证表位、预测表位、突变以及框架与突变之间的重叠。

[0239] 图25G呈现了包含在TCE9中的nsp6的序列图谱，包括具有侧翼序列的框架、验证表位、预测表位、突变以及框架与突变之间的重叠。

[0240] 图26A呈现了包含在TCE11中的nsp12的序列图谱，包括具有侧翼序列的框架、验证表位、预测表位、突变以及框架与突变之间的重叠。

[0241] 图26B呈现了包含在TCE11中的膜的序列图谱，包括具有侧翼序列的框架、验证表位、预测表位、突变以及框架与突变之间的重叠。

[0242] 图26C呈现了包含在TCE11中的nsp4的序列图谱，包括具有侧翼序列的框架、验证表位、预测表位、突变以及框架与突变之间的重叠。

[0243] 图26D呈现了包含在TCE11中的nsp3的序列图谱，包括具有侧翼序列的框架、验证表位、预测表位、突变以及框架与突变之间的重叠。

[0244] 图27呈现了SARS-CoV-2与SARS-CoV之间(左图)以及SARS-CoV-2与MERS之间(右图)的共享候选9聚体表位分布的百分比。

[0245] 图28呈现了通过针对指定肽池的IFNγELISpot评估的直接离体测试(即，没有IVS扩增)的来自恢复期SARS-CoV-2供体(队列1)的PBMC中的T细胞对刺突和TCE5编码表位的应答(参见表D-F)。

[0246] 图29呈现了通过针对指定肽池的IFNγELISpot评估的来自恢复期SARS-CoV-2供体(队列1)的IVS扩增的PBMC中的T细胞对刺突和TCE5编码表位的应答(参见表D-F)。

[0247] 图30呈现了通过针对指定肽池的IFNγELISpot评估的来自恢复期SARS-CoV-2供体(队列2)的IVS扩增的PBMC中的T细胞对刺突和TCE5编码表位的应答(参见表D-F)。ULOQ:定量上限

[0248] 图31呈现了通过针对指定肽池的IFNγELISpot评估的来自恢复期SARS-CoV-2供体(队列1和队列2)中选择的IVS扩增的PBMC中的T细胞对刺突和TCE5编码表位的应答(参见表D-F)。ULOQ:定量上限

[0249] 图32呈现了通过针对指定肽池的IFNγELISpot评估的来自恢复期SARS-CoV-2供体(队列1)的IVS扩增的PBMC(包括CD4或CD8耗尽的PBMC)中的T细胞对刺突和TCE5编码表位的应答(参见表D-F)。

[0250] 图33A呈现了通过Incucyte®评估的T细胞介导的针对以下的靶标杀伤：(1)DMSO+仅靶标对照[实心圆圈]；(2)肽+仅靶标对照[空心圆圈]；(3)DMSO+靶标+PBMC效应子对照[实心方块]；和(4)肽+靶标+PBMC效应子[空心方块]。显示了A*03:01靶标的数据；队列2供体169923；验证池。

[0251] 图33B呈现了通过Incucyte®评估的T细胞介导的针对以下的靶标杀伤：(1)DMSO+仅靶标对照[实心圆圈]；(2)肽+仅靶标对照[空心圆圈]；(3)DMSO+靶标+PBMC效应子对照[实心方块]；和(4)肽+靶标+PBMC效应子[空心方块]。显示了A*02:01靶标的数据；队列2供体389341；ORF3a池。

[0252] 图33C呈现了通过Incucyte®评估的T细胞介导的针对以下的靶标杀伤：(1)DMSO+仅靶标对照[实心圆圈]；(2)肽+仅靶标对照[空心圆圈]；(3)DMSO+靶标+PBMC效应子对照[实心方块]；和(4)肽+靶标+PBMC效应子[空心方块]。显示了A*02:01靶标的数据；队列2供体941176；验证池。

[0253] 图33D呈现了通过Incucyte®评估的T细胞介导的针对以下的靶标杀伤：(1)DMSO+仅靶标对照[实心圆圈]；(2)肽+仅靶标对照[空心圆圈]；(3)DMSO+靶标+PBMC效应子对照[实心方块]；和(4)肽+靶标+PBMC效应子[空心方块]。显示了A*02:01靶标的数据；队列2供体941176；ORF3a池。

[0254] 图33E呈现了通过Incucyte®评估的T细胞介导的针对以下的靶标杀伤：(1)DMSO+仅靶标对照[实心圆圈]；(2)肽+仅靶标对照[空心圆圈]；(3)DMSO+靶标+PBMC效应子对照[实心方块]；和(4)肽+靶标+PBMC效应子[空心方块]。显示了A*02:01靶标的数据；队列2供体941176；核衣壳池。

[0255] 图33F呈现了通过Incucyte®评估的T细胞介导的针对以下的靶标杀伤：(1)DMSO+仅靶标对照[实心圆圈]；(2)肽+仅靶标对照[空心圆圈]；(3)DMSO+靶标+PBMC效应子对照[实心方块]；和(4)肽+靶标+PBMC效应子[空心方块]。显示了A*01:01靶标的数据；队列2供体941176；验证池。

[0256] 图33G呈现了通过Incucyte®评估的T细胞介导的针对以下的靶标杀伤：(1)DMSO+仅靶标对照[实心圆圈]；(2)肽+仅靶标对照[空心圆圈]；(3)DMSO+靶标+PBMC效应子对照[实心方块]；和(4)肽+靶标+PBMC效应子[空心方块]。显示了A*01:01靶标的数据；队列2供体941176；ORF3a池。

[0257] 图33H呈现了通过Incucyte®评估的T细胞介导的针对以下的靶标杀伤：(1)DMSO+仅靶标对照[实心圆圈]；(2)肽+仅靶标对照[空心圆圈]；(3)DMSO+靶标+PBMC效应子对照[实心方块]；和(4)肽+靶标+PBMC效应子[空心方块]。显示了A*30:01靶标的数据；队列2供体627934；验证池。

[0258] 图33I呈现了通过Incucyte®评估的T细胞介导的针对以下的靶标杀伤：(1)DMSO+仅靶标对照[实心圆圈]；(2)肽+仅靶标对照[空心圆圈]；(3)DMSO+靶标+PBMC效应子对照[实心方块]；和(4)肽+靶标+PBMC效应子[空心方块]。显示了A*30:01靶标的数据；队列2供体627934；核衣壳池。

[0259] 图33J呈现了通过Incucyte®评估的T细胞介导的针对以下的靶标杀伤：(1)DMSO+仅靶标对照[实心圆圈]；(2)肽+仅靶标对照[空心圆圈]；(3)DMSO+靶标+PBMC效应子对照[实心方块]；和(4)肽+靶标+PBMC效应子[空心方块]。显示了A*30:01靶标的数据；队列2供体627934；验证池。

[0260] 图33K呈现了通过Incucyte®评估的T细胞介导的针对以下的靶标杀伤：(1)DMSO+仅靶标对照[实心圆圈]；(2)肽+仅靶标对照[空心圆圈]；(3)DMSO+靶标+PBMC效应子对照[实心方块]；和(4)肽+靶标+PBMC效应子[空心方块]。显示了A*03:01靶标的数据；队列2供体627934；核衣壳池。

[0261] 图33L呈现了通过Incucyte®评估的T细胞介导的针对以下的靶标杀伤：(1)DMSO+仅靶标对照[实心圆圈]；(2)肽+仅靶标对照[空心圆圈]；(3)DMSO+靶标+PBMC效应子对照[实心方块]；和(4)肽+靶标+PBMC效应子[空心方块]。显示了A*11:01靶标的数据；队列2供体

602232;验证池。

[0262] 图34说明了在印度恒河猴中评估编码SARS-CoV-2刺突蛋白的不同分离株的ChAdV和SAM疫苗平台的同源和异源初免/加强方案。

[0263] 图35A呈现了第1组的跨多个刺突T细胞表位池的T细胞应答(上图;每个池的平均值±SE)、针对单个大刺突T细胞表位池的单个NHP随时间变化的T细胞应答(中图)和随时间变化的刺突特异性IgG抗体滴度(下图)。n=5个NHP

[0264] 图35B呈现了第2组的跨多个刺突T细胞表位池的T细胞应答(上图;每个池的平均值±SE)、针对单个大刺突T细胞表位池的单个NHP随时间变化的T细胞应答(中图)和随时间变化的刺突特异性IgG抗体滴度(下图)。n=5个NHP

[0265] 图35C呈现了第5组的跨多个刺突T细胞表位池的T细胞应答(上图;每个池的平均值±SE)、针对单个大刺突T细胞表位池的单个NHP随时间变化的T细胞应答(中图)和随时间变化的刺突特异性IgG抗体滴度(下图)。n=5个NHP

[0266] 图35D呈现了第6组的跨多个刺突T细胞表位池的T细胞应答(上图;每个池的平均值±SE)、针对单个大刺突T细胞表位池的单个NHP随时间变化的T细胞应答(中图)和随时间变化的刺突特异性IgG抗体滴度(下图)。n=5个NHP

[0267] 图36呈现了第1组的针对单个大刺突T细胞表位池的单个NHP随时间变化的T细胞应答(上图)、T细胞对TCE5编码表位的应答(中图)和随时间变化的刺突特异性IgG抗体滴度(下图)的汇总。n=5个NHP

[0268] 图37呈现了在每个NHP组的加强1(左栏)和加强2(右栏)之后针对D614G假病毒(左图)和B.1.351假病毒(右图)的中和抗体产生。

[0269] 图38呈现了中和抗体产生,其比较了加强1后(上图)和加强2后(下图)针对每种假病毒的相对Nab滴度水平。

具体实施方式

[0270] I.定义

[0271] 一般来说,权利要求书和本说明书中所用的术语旨在解释为具有本领域普通技术人员所理解的普通含义。为了更清楚,某些术语定义如下。在普通含义与所提供的定义之间存在矛盾的情况下,将使用所提供的定义。

[0272] 如本文所用,术语“抗原”是刺激免疫应答的物质。抗原可以是新抗原。抗原可以是“共有抗原”,其是在特定群体(例如患有感染性疾病或有感染上感染性疾病风险的特定SARS-CoV-2患者群体)中发现的抗原。

[0273] 如本文所用,术语“基于抗原的疫苗”是基于一种或多种抗原(例如多种抗原)的疫苗组合物。疫苗可为基于核苷酸(例如基于病毒、基于RNA或基于DNA)的疫苗、基于蛋白质(例如基于肽)的疫苗或其组合。

[0274] 如本文所用,术语“候选抗原”是产生可代表抗原的序列的突变或其他异常。

[0275] 如本文所用,术语“编码区”是编码蛋白质的基因的一个或多个部分。

[0276] 如本文所用,术语“编码突变”是发生在编码区中的突变。

[0277] 如本文所用,术语“ORF”是指开放阅读框。

[0278] 如本文所用,术语“错义突变”是引起从一个氨基酸取代为另一个氨基酸的突变。

[0279] 如本文所用,术语“无义突变”是引起从氨基酸到终止密码子的取代或引起典型起始密码子去除的突变。

[0280] 如本文所用,术语“移码突变”是引起蛋白质框架改变的突变。

[0281] 如本文所用,术语“插入/缺失”是一种或多种核酸的插入或缺失。

[0282] 如本文所用,在两个或更多个核酸或多肽序列的上下文中,术语百分比“同一性”是指当出于最大对应性比较和比对时,两个或更多个序列或子序列具有指定百分比的相同的核苷酸或氨基酸残基,如使用下文所描述的序列比较算法(例如BLASTP和BLASTN或技术人员可用的其他算法)中的一者或通过目视检查所测量。取决于应用,“同一性”百分比可存在于所比较的序列区域上,例如在功能结构域上,或者存在于待比较的两个序列的全长上。

[0283] 关于序列比较,通常一个序列充当与测试序列比较的参考序列。当使用序列比较算法时,将测试和参考序列输入计算机,必要时指定子序列坐标,并且指定序列算法程序参数。然后,序列比较算法根据所指定的程序参数来计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。或者,序列相似性或不相似性可通过组合存在或不存在特定核苷酸,或对于翻译序列,在所选择的序列位置(例如序列基序)处的氨基酸来建立。

[0284] 比较序列的最佳比对可例如通过以下进行:Smith和Waterman,Adv.Appl.Math.2:482(1981)的局部同源性算法;Needleman和Wunsch,J.Mol.Biol.48:443(1970)的同源性比对算法;Pearson和Lipman,Proc.Nat’l.Acad.Sci.USA 85:2444(1988)的相似性搜寻方法;这些算法的计算机化实施方式(Wisconsin Genetics软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,Genetics Computer Group,575ScienceDr.,Madison,Wis.);或目视检查(一般参见Ausubel等人,同上)。

[0285] 适合于测定序列同一性百分比和序列相似性的算法的一个实例是BLAST算法,其描述于Altschul等人,J.Mol.Biol.215:403-410(1990)中。执行BLAST分析的软件可通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)公开获得。

[0286] 如本文所用,术语“非终止或通读”是引起天然终止密码子去除的突变。

[0287] 如本文所用,术语“表位”是通常由抗体或T细胞受体结合的抗原的特异性部分。

[0288] 如本文所用,术语“免疫原性”是例如经由T细胞、B细胞或两者刺激免疫应答的能力。

[0289] 如本文所用,术语“HLA结合亲和力”、“MHC结合亲和力”意指特异性抗原与特异性MHC等位基因之间结合的亲和力。

[0290] 如本文所用,术语“诱饵”是用于从样品中富集特定DNA或RNA序列的核酸探针。

[0291] 如本文所用,术语“变体”是受试者的核酸与用作对照的参考人类基因组之间的差异。

[0292] 如本文所用,术语“变体调用(variant call)”是通常根据测序的变体存在的算法确定。

[0293] 如本文所用,术语“多态性”是生殖系变体,即在个体的所有携带DNA的细胞中发现的变体。

[0294] 如本文所用,术语“体细胞变体”是在个体的非生殖系细胞中产生的变体。

[0295] 如本文所用,术语“等位基因”是基因的形式或基因序列的形式或蛋白质的形式。

[0296] 如本文所用,术语“HLA型”是HLA基因等位基因的补体。

[0297] 如本文所用,术语“无义介导的衰变”或“NMD”是由于过早终止密码子引起的细胞对mRNA的降解。

[0298] 如本文所用,术语“外显子组”是编码蛋白质的基因组的子集。外显子组可为基因组的集合外显子。

[0299] 如本文所用,术语“逻辑回归”是来自统计的二进制数据的回归模型,其中因变量等于1的概率的逻辑被建模为因变量的线性函数。

[0300] 如本文所用,术语“神经网络”是用于分类或回归的机器学习模型,其由多层线性变换,接着是通常经由随机梯度下降和反向传播进行训练的逐元素非线性组成。

[0301] 如本文所用,术语“蛋白质组”是由细胞、细胞群或个体表达和/或翻译的全部蛋白质的集合。

[0302] 如本文所用,术语“肽组”是由MHC-I或MHC-II呈递在细胞表面上的所有肽的集合。肽组可指细胞或细胞集合的特性(例如,感染性疾病肽组,意指被感染性疾病感染的所有细胞的肽组的联合)。

[0303] 如本文所用,术语“ELISPOT”意指酶联免疫吸附斑点测定,其是用于监测人类和动物中的免疫应答的常用方法。

[0304] 如本文所用,术语“葡聚糖肽多聚体”是在流式细胞术中用于抗原特异性T细胞染色的基于葡聚糖的肽-MHC多聚体。

[0305] 如本文所用,术语“耐受性或免疫耐受性”是对一种或多种抗原(例如自身抗原)免疫无应答的状态。

[0306] 如本文所用,术语“中心耐受性”是通过缺失自身反应性T细胞克隆或通过促进自身反应性T细胞克隆分化成免疫抑制性调控T细胞(Treg)而在胸腺中遭受的耐受性。

[0307] 如本文所用,术语“外周耐受性”是通过下调或不激活经受中心耐受性的自身反应性T细胞或促进这些T细胞分化成Treg而在外周遭受的耐受性。

[0308] 术语“样品”可包括通过包括静脉穿刺、排泄、射精、按摩、活组织检查、针抽吸、灌洗样品、刮取、手术切口或干预的手段或本领域中已知的其他手段从受试者获取的单细胞或多细胞或细胞碎片或体液等分试样。

[0309] 术语“受试者”涵盖人类或非人类,无论体内、离体或体外,雄性或雌性的细胞、组织或生物体。术语受试者包括包含人类的哺乳动物。

[0310] 术语“哺乳动物”涵盖人类和非人类,并且包括(但不限于)人类、非人类灵长类动物、犬科动物、猫科动物、鼠科动物、牛科动物、马科动物和猪科动物。

[0311] 术语“临床因素”是指受试者状况的量度,例如疾病活动或严重程度。“临床因素”涵盖受试者健康状况的所有标志物,包括非样品标志物,和/或受试者的其他特征,例如(但不限于)年龄和性别。临床因素可为可在确定条件下评价来自受试者的样品(或样品群体)或受试者而获得的评分、值或值集合。临床因素也可通过标志物和/或其他参数(例如基因表达替代物)来预测。临床因素可包括感染类型(例如冠状病毒物种)、感染亚型(例如SARS-CoV-2变体)和医疗史。

[0312] 术语“源自感染的抗原编码核酸序列”是指从受感染细胞或感染性疾病生物体,例如经由RT-PCR,获得的核酸序列;或通过对受感染细胞或感染性疾病生物体进行测序并且

然后使用所述测序数据合成核酸序列，例如，经由本领域已知的各种合成或基于PCR的方法获得的序列数据。衍生序列可包括编码与相应的原生感染性疾病生物体核酸序列相同的多肽序列的核酸序列变体，例如序列优化的核酸序列变体(例如，密码子优化和/或以其他方式优化用于表达)。衍生序列可包括编码经修饰的感染性疾病生物体多肽序列的核酸序列变体，所述多肽序列相对于原生感染性疾病生物体多肽序列具有一个或多个(例如，1、2、3、4或5个)突变。例如，相对于感染性疾病生物体蛋白质的原生多肽序列，经修饰的多肽序列可具有一个或多个错义突变。

[0313] 术语“编码免疫原性多肽的SARS-CoV-2核酸序列”是指从SARS-CoV-2病毒中获得的核酸序列，例如经由RT-PCR;或通过对SARS-CoV-2病毒或SARS-CoV-2病毒感染细胞进行测序来获得序列数据，然后使用测序数据合成核酸序列，例如经由本领域中已知的各种合成或基于PCR的方法。衍生序列可包括编码与相应原生SARS-CoV-2核酸序列相同的多肽序列的核酸序列变体，例如序列优化的核酸序列变体(例如，密码子优化和/或以其他方式优化用于表达)。衍生序列可包括编码修饰的SARS-CoV-2多肽序列的核酸序列变体，所述修饰的SARS-CoV-2多肽序列相对于原生SARS-CoV-2多肽序列具有一个或多个(例如，1、2、3、4或5个)突变。例如，相对于SARS-CoV-2蛋白的原生刺突多肽序列，修饰的刺突多肽序列可具有一个或多个突变，例如R682、R815、K986P或V987P的一个或多个错义突变。

[0314] 术语“甲病毒”是指披膜病毒科(Togaviridae)的成员，并且是正义单链RNA病毒。甲病毒通常分类为旧世界，例如辛德毕斯、罗斯河、马雅罗、基孔肯雅和塞姆利基森林病毒，或新世界，例如东部马脑炎、奥拉、摩根堡、或委内瑞拉马脑炎及其衍生菌株TC-83。甲病毒通常是自我复制RNA病毒。

[0315] 术语“甲病毒骨架”是指允许病毒基因组自我复制的甲病毒的最小序列。最小序列可包括用于非结构蛋白质介导的扩增的保守序列、非结构蛋白质1(nsP1)基因、nsP2基因、nsP3基因、nsP4基因和聚A序列，以及用于包括亚基因组启动子(例如26S启动子元件)的亚基因组病毒RNA表达的序列。

[0316] 术语“用于非结构蛋白质介导的扩增的序列”包括本领域技术人员熟知的甲病毒保守序列元件(CSE)。CSE包括(但不限于)甲病毒5’UTR、51-nt CSE、24-nt CSE、亚基因组启动子序列(例如26S亚基因组启动子序列)、19-nt CSE和甲病毒3’UTR。

[0317] 术语“RNA聚合酶”包括催化由DNA模板产生RNA多核苷酸的聚合酶。RNA聚合酶包括(但不限于)源自噬菌体的聚合酶，包括T3、T7和SP6。

[0318] 术语“脂质”包括疏水性和/或两亲性分子。脂质可为阳离子、阴离子或中性的。脂质可为合成或天然来源的，并且在一些情况下是可生物降解的。脂质可包括胆固醇、磷脂、脂质缀合物，包括(但不限于)聚乙二醇(PEG)缀合物(聚乙二醇化脂质)、蜡、油、甘油酯、脂肪和脂溶性维生素。脂质还可包括二亚油基甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(MC3)和MC3样分子。

[0319] 术语“脂质纳米粒子”或“LNP”包括使用含脂质膜围绕水性内部形成的小泡样结构，也称为脂质体。脂质纳米粒子包括具有通过表面活性剂稳定的固体脂质核心的基于脂质的组合物。核心脂质可为脂肪酸、酰基甘油、蜡和这些表面活性剂的混合物。生物膜脂质，例如磷脂、鞘磷脂、胆汁盐(牛磺胆酸钠)和固醇(胆固醇)，可用作稳定剂。脂质纳米粒子可使用限定比率的不同脂质分子形成，包括(但不限于)限定比率的一种或多种阳离子脂质、阴离子脂质或中性脂质。脂质纳米粒子可将分子包封在外膜壳内，并且随后可与靶细胞接

触以将包封的分子递送至宿主细胞细胞溶质。脂质纳米粒子可用非脂质分子修饰或官能化,包括在其表面上。脂质纳米粒子可为单层的(单层)或多层的(多层)。脂质纳米粒子可与核酸复合。单层脂质纳米粒子可与核酸复合,其中核酸在水性内部。多层脂质纳米粒子可与核酸复合,其中核酸在水性内部,或者形成或包夹在其间。

[0320] 缩写:MHC:主要组织相容性复合物;HLA:人白细胞抗原或人MHC基因座;NGS:下一代测序;PPV:阳性预测值;TSNA:肿瘤特异性新抗原;FFPE:福尔马林固定、石蜡包埋;NMD:无义介导的衰变;NSCLC:非小细胞肺癌;DC:树突状细胞。

[0321] 应注意,除非上下文另外明确规定,否则如本说明书和所附权利要求中所用,单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括多个指示物。

[0322] 除非上下文特别陈述或以其他方式显而易见,否则如本文中所用,术语“约”应理解为在本领域的正常公差范围内,例如在平均值的2个标准偏差内。约可理解为在陈述值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%内。除非上下文另有明确说明,否则本文所提供的所有数值均通过术语约修饰。

[0323] 本文中未直接定义的任何术语应理解为具有与本发明的技术领域中所理解通常相关的含义。本文论述某些术语,以向从业者提供描述本发明的方面的组合物、装置、方法等以及如何制造或使用其的额外指导。应了解,相同事物可以超过一种方式表示。因此,替代性措辞和同义词可用于本文所论述的术语中的任何一者或多者。无论本文中是否详述或论述术语都无关紧要。提供一些同义词或可取代的方法、材料等。除非明确陈述,否则对一个或数个同义词或等效物的叙述不排除使用其他同义词或等效物。包括术语实例在内的实例的使用仅用于说明性目的,并且不在本文中限制本发明的方面的范围和含义。

[0324] 在本说明书正文内引用的所有参考文献、颁布专利和专利申请均出于所有目的特此通过引用整体并入。

[0325] II.抗原鉴定

[0326] 肿瘤和正常外显子组和转录组的NGS分析研究方法已被描述并应用于抗原鉴定领域。[6,14,15]可考虑某些优化以提高临床环境中抗原鉴定的灵敏度和特异性。这些优化可分为两个领域,与实验室过程相关的领域和与NGS数据分析相关的领域。所描述的研究方法也可应用于鉴定其他环境中的抗原,例如鉴定来自感染性疾病生物体(例如SARS-CoV-2)、受试者中的感染或受试者的受感染细胞的抗原的鉴定。优化的实例对于本领域技术人员来说是已知的,例如在美国专利第10,055,540号、美国申请公开第US20200010849A1号、国际专利申请公开WO/2018/195357和WO/2018/208856、美国申请第16/606,577号和国际专利申请PCT/US2020/021508中更详细描述的方法,所述文献各自出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0327] 用于鉴定抗原(例如,源自感染性疾病生物体的抗原)的方法包括鉴定可能呈递在细胞表面上(例如,由MHC呈递在受感染细胞或免疫细胞(包括专职抗原呈递细胞如树突状细胞)上)和/或可能具免疫原性的抗原。举例来说,一种这样的方法可包括以下步骤:从受感染细胞或感染性疾病生物体(例如,SARS-CoV-2)获得外显子组、转录组或全基因组核苷酸测序和/或表达数据中的至少一者,其中所述核苷酸测序数据和/或表达数据用于获得代表一组抗原(例如,源自感染性疾病生物体的抗原)中的每一者的肽序列的数据;将每种抗原的肽序列输入到一个或多个呈递模型中,以产生所述抗原中的每一者由一种或多种MHC

等位基因在所述受试者的细胞表面(例如受感染细胞)上呈递的数值可能性集合,所述数值可能性集合已至少基于所接收的质谱数据进行鉴定;以及基于所述数值可能性集合选择所述抗原集合的子集以产生经选择抗原集合。

[0328] IV.抗原

[0329] 抗原可包括核苷酸或多肽。例如,抗原可以是编码多肽序列的RNA序列。因此可用于疫苗的抗原可包括核苷酸序列或多肽序列。

[0330] 本文公开了肽和编码肽的核酸序列,所述肽来源于与SARS-CoV-2、受试者中的SARS-CoV-2感染或受试者的SARS-CoV-2感染细胞相关的任何多肽。抗原可来源于SARS-CoV-2病毒的核苷酸序列或多肽序列。SARS-CoV-2的多肽序列包括但不限于表A中所示的预测MHC I类表位、表B中所示的预测MHC II类表位、表C中所示的预测MHC I类表位、SARS-CoV-2刺突肽(例如衍生自SEQ ID NO:59的肽)、SARS-CoV-2膜肽(例如衍生自SEQ ID NO:61的肽)、SARS-CoV-2核衣壳肽(例如衍生自SEQ ID NO:62的肽)、SARS-CoV-2包膜肽(例如衍生自SEQ ID NO:63的肽)、SARS-CoV-2复制酶orf1a和orf1b肽[例如一种或多种非结构蛋白(nsp)1-16],或由SARS-CoV-2病毒编码的任何其他肽序列。肽和编码肽的核酸序列可来源于SARS-CoV-2分离株NC_045512.2,有时称为SARS-CoV-2参考序列(SEQ ID NO:76;NC_045512.2,出于所有目的通过引用并入本文)。肽和编码肽的核酸序列可来源于与SARS-CoV-2分离株NC_045512.2不同的分离株,例如关于SARS-CoV-2分离株NC_045512.2在蛋白质中具有一个或多个突变的分离株(也称为蛋白质变体)。疫苗接种策略可包括具有来源于不同分离株的肽和编码所述肽的核酸序列的多种疫苗。例如,作为一个说明性的非限制性实例,可施用编码来自SARS-CoV-2分离株NC_045512.2的刺突蛋白的疫苗,接着后续施用编码来自B.1.351(“南非”)SARS-CoV-2分离株(例如,SEQ ID NO:112)或来自B.1.1.7(“南非”)SARS-CoV-2分离株(例如,SEQ ID NO:110)的刺突蛋白的疫苗。一种或多种变体可包括但不限于SARS-CoV-2刺突蛋白、SARS-CoV-2膜蛋白、SARS-CoV-2核衣壳蛋白、SARS-CoV-2包膜蛋白、SARS-CoV-2复制酶orf1a和orf1b蛋白[例如一种或多种非结构蛋白(nsp)1-16]或由SARS-CoV-2病毒编码的任何其他蛋白质序列中的突变。可根据SARS-CoV-2亚型/分离株中突变的流行率来选择变体,例如存在1%或更高、2%或更高、3%或更高、4%或更高、5%或更高、6%或更高、7%或更高、8%或更高、9%或更高、10%或更高、20%或更高、30%或更高、40%或更高、50%或更高、60%或更高、70%或更高、80%或更高、90%或更高的SARS-CoV-2亚型/分离株的突变/变体。表1显示了大于1%的分离株的突变的实例。可根据特定人群(例如特定人口或地理人群)中存在的SARS-CoV-2亚型/分离株中突变的流行率来选择变体。普遍变体/突变的一个说明性非限制性实例是在全世界测序的60.05%的基因组以及分别在欧洲和北美的70.46%和58.49%的序列中发现的刺突D614G错义突变。因此,疫苗可设计成编码至少一种免疫原性多肽,所述多肽对应于由受试者感染或有感染风险的SARS-CoV-2亚型编码的多肽,例如用于针对处于特定SARS-CoV-2亚型/分离株感染风险的特定人口或地理人群的预防性疫苗。疫苗可设计成编码至少一种与SARS-CoV-2编码的多肽相相应的免疫原性多肽和至少一种与除SARS-CoV-2以外的冠状病毒物种和/或亚种编码的多肽相相应的免疫原性多肽,例如,严重急性呼吸系统综合征(SARS)2002相关物种(NC_004718.3,出于所有目的通过引用并入本文)和/或中东呼吸系统综合征(MERS)2012相关物种(NC_019843.3,出于所有目的通过引用并入本文)。疫苗可设计成编码至少一种与由SARS-CoV-2

编码的多肽相对应的免疫原性多肽，所述多肽在SARS-CoV-2与冠状病毒物种和/或除SARS-CoV-2以外的亚种例如严重急性呼吸系统综合征(SARS)和/或中东呼吸系统综合征(MERS)物种之间是保守的(例如，表位之间100％氨基酸序列保守)。在SARS-CoV-2与冠状病毒物种和/或除SARS-CoV-2以外的亚种之间保守的SARS-CoV-2表位可包括来源于冠状病毒刺突蛋白、冠状病毒膜蛋白、冠状病毒核衣壳蛋白、冠状病毒包膜蛋白、冠状病毒复制酶orf1a和orf1b蛋白[例如一种或多种非结构蛋白(nsp)1-16]或由冠状病毒编码的任何其他蛋白质序列的表位，例如，如图27所示。

[0331] 可选择预计呈递在细胞(例如受感染细胞或免疫细胞，包括专职抗原呈递细胞如树突状细胞)的细胞表面上的抗原。可选择预计具有免疫原性的抗原。使用本文所述的方法预测将由MHC呈递在细胞表面上的示例性抗原包括表A中所示的预测MHC I类表位、表B中所示的预测MHC II类表位和表C中所示的预测MHC I类表位。

[0332] 可选择已被验证为由特定HLA呈递和/或刺激免疫应答的抗原，例如文献中先前报道/验证的抗原(例如，如在Nelde等人，[Nature Immunology第22卷，第74-85页2021]，Tarke等人，2021，或Schel ien等人[bioRxiv 2020.08.13.249433]中)。免疫应答的刺激量值可用于指导表位/抗原选择，例如选择刺激尽可能强的免疫应答的表位，包括当盒具有大小限制时。作为基于量值的选择的一个说明性非限制性实例，可使用以下：(1)个体的量值是其各自双倍型等位基因上所有表位量值的总和；(2)每个表位量值＝(应答量值)x(阳性应答频率/100)，[例如，使用出于所有目的通过引用并入本文的Tarke等人(Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalen ce of SARS-CoV-2epitopes in COVID-19cases.Cell Rep Med.2021年2月16日;2(2):100204.doi:10.1016/j.xcrm.2021.100204.电子版于2021年1月26日。)中测得的值]；(3)排除除起始蛋白以外的表位，所述表位跨越>5％频率的突变，任选地在侧翼区域中允许突变；和/或(4)盒顺序确定以最小化跨相邻框架的非预期连接表位，以及最小化相同蛋白质中的连续框架以减少功能性蛋白质片段的机率，如本文所述。

[0333] 可构建盒以编码一个或多个验证表位和/或至少4、5、6或7个预测表位，其中至少85％、90％或95％的群体携带至少一个经验证呈递一种或多种验证表位中的至少一者的HLA和/或至少一个经预测呈递至少4、5、6或7个预测表位中的每一者的HLA。可构建盒以编码一个或多个验证表位和至少4、5、6或7个预测表位，其中至少85％、90％或95％的群体携带至少一个经验证呈递一种或多种验证表位中的至少一者的HLA或至少一个经预测呈递至少4、5、6或7个预测表位中的每一者的HLA。

[0334] 由抗原核苷酸序列编码的一种或多种多肽可包含以下中的至少一者：IC50值小于1000nM的与MHC的结合亲和力，对于MHC I类肽，长度为8-15、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸，在肽内或肽附近存在促进蛋白酶体切割的序列基序，以及存在促进TAP转运的序列基序。对于长度为6-30、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸的MHC II类肽，在肽内或附近存在促进通过胞外或溶酶体蛋白酶(例如组织蛋白酶)切割或HLA-DM催化的HLA结合的序列基序。

[0335] 一种或多种抗原可呈递在受感染细胞(例如SARS-CoV-2感染细胞)的表面上。

[0336] 一种或多种抗原在患有或怀疑患有感染(例如SARS-CoV-2感染)的受试者中可以是免疫原性的，例如，能够在受试者中刺激T细胞应答和/或B细胞应答。一种或多种抗原在

处于感染(例如SARS-CoV-2感染)风险的受试者中可以是免疫原性的,例如,能够在受试者中刺激T细胞应答和/或B细胞应答,从而提供针对感染的免疫保护(即免疫力),例如,刺激记忆T细胞、记忆B细胞或感染特异性抗体的产生。

[0337] 一种或多种抗原能够刺激B细胞应答,例如产生识别所述一种或多种抗原的抗体(例如识别SARS-CoV-2抗原和/或病毒的抗体)。抗体可识别线性多肽序列或识别二级和三级结构。因此,B细胞抗原可包括线性多肽序列或具有二级和三级结构的多肽,包括但不限于全长蛋白质、蛋白质亚基、蛋白质结构域或已知或预测具有二级和三级结构的任何多肽序列。能够刺激B细胞对感染的应答的抗原可为在感染性疾病生物体(例如SARS-CoV-2)的表面上发现的抗原。能够刺激B细胞对感染的应答的抗原可为在感染性疾病生物体中表达的细胞内抗原。能够刺激B细胞应答的SARS-CoV-2抗原包括但不限于SARS-CoV-2刺突肽、SARS-CoV-2膜肽、SARS-CoV-2核衣壳肽和SARS-CoV-2包膜肽。

[0338] 一种或多种抗原可包括能够刺激T细胞应答的抗原(例如,包括预测的T细胞表位序列的肽)和能够刺激B细胞应答的不同抗原(例如,全长蛋白质、蛋白质亚基、蛋白质结构域)的组合。

[0339] 在针对受试者产生疫苗的情况下,可排除在受试者中刺激自身免疫应答的一种或多种抗原。

[0340] 至少一种抗原肽分子(例如,表位序列)的大小可包含但不限于约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29、约30、约31、约32、约33、约34、约35、约36、约37、约38、约39、约40、约41、约42、约43、约44、约45、约46、约47、约48、约49、约50、约60、约70、约80、约90、约100、约110、约120或更多个氨基分子残基,和可源自其中的任何范围。在具体实施方案中,抗原肽分子等于或小于50个氨基酸。

[0341] 抗原肽和多肽可为:对于MHC I类,15个残基或更少的长度并且通常由约8个与约11个之间的残基、特别是9或10个残基组成;对于MHC II类,6-30个残基(包括端值)。

[0342] 如果需要,可以数种方式设计较长的肽。在一种情况下,当HLA等位基因上肽的呈递可能性经预测或已知时,较长的肽可由以下任一者组成:(1)个别呈递的具有朝向每个相应基因产物的N末端和C末端延伸2-5个氨基酸的肽;(2)所呈递的肽中的一些或全部与各自的延伸序列的串联。在另一种情况下,当测序揭示存在长(>10个残基)表位序列时,较长的肽将由以下组成:(3)新型感染性疾病特异性氨基酸的整个区段,从而绕过了对最强HLA呈递的较短肽的基于计算或体外测试的选择的需要。在这两种情况下,使用较长的肽允许患者细胞进行内源性加工,并且可引起更有效的抗原呈递,导致T细胞应答增加。较长的肽还可包括肽的全长蛋白质、蛋白质亚基、蛋白质结构域及其组合,例如在感染性疾病生物体中表达的那些。可包括较长的肽(例如,全长蛋白质、蛋白质亚基或蛋白质结构域)及其组合以刺激B细胞应答。

[0343] 抗原肽和多肽可呈递在HLA蛋白上。在一些方面,抗原肽和多肽以比野生型肽更大的亲和力呈递在HLA蛋白上。在一些方面,抗原肽或多肽的IC50可至少小于5000nM、至少小于1000nM、至少小于500nM、至少小于250nM、至少小于200nM、至少小于150nM、至少小于100nM、至少小于50nM或更小。

[0344] 在一些方面,抗原肽和多肽在施用至受试者时不刺激自身免疫应答和/或引起免

疫耐受性。

[0345] 还提供了包含至少两种或更多种抗原肽的组合物。在一些实施方案中，所述组合物含有至少两种不同的肽。至少两种不同的肽可衍生自相同的多肽。不同的多肽是指肽因长度、氨基酸序列或两者而异。肽可衍生自已知或怀疑与感染性疾病生物体相关的任何多肽，或衍生自已知或已发现与正常细胞或组织相比在受感染细胞中具有改变的表达的任何多肽(例如，感染性疾病多核苷酸或多肽，包括在宿主细胞中表达受限的感染性疾病多核苷酸或多肽)的肽。

[0346] 具有所需活性或特性的抗原肽和多肽可经修饰以提供某些所需属性，例如改善的药理学特征，同时增加或至少保留基本上所有未经修饰的肽与所需MHC分子结合和激活适当T细胞的生物活性。例如，抗原肽和多肽可进行各种变化，例如保守或非保守取代，其中此类变化可在其使用中提供某些优势，例如改进的MHC结合、稳定性或呈递。保守取代意指用生物和/或化学类似的另一氨基酸残基置换氨基酸残基(例如，一个疏水性残基置换另一个氨基酸残基，或一个极性残基置换另一氨基酸残基)。取代包括以下组合，例如Gly、Ala；Val、Ile、Leu、Met；Asp、Glu；Asn、Gln；Ser、Thr；Lys、Arg；和Phe、Tyr。单氨基酸取代的效应也可使用D-氨基酸探测。此类修饰可使用熟知的肽合成程序进行，如例如Merrifield，Science 232:341-347(1986)，Barany和Merrifield，The Peptides，Gross和Meienhofer编(N.Y.，Academic Press)，第1-284页(1979)；以及Stewart和Young，Solid Phase Peptide Synthesis，(Rockford，Ill.，Pierce)，第2版(1984)中所述。

[0347] 肽和多肽用各种氨基酸模拟物或非天然氨基酸修饰可在提高肽和多肽的体内稳定性方面特别有用。稳定性可以多种方式加以测定。例如，肽酶和各种生物介质(例如人类血浆和血清)已用于测试稳定性。参见例如Verhoef等人，Eur.J.Drug Metab Pharmacokin.11:291-302(1986)。肽的半衰期可使用25％人类血清(v/v)测定方便地确定。方案一般如下。汇集的人类血清(AB型，非热灭活)在使用之前通过离心去脂。血清然后用RPMI组织培养基稀释至25％并用于测试肽稳定性。在预定时间间隔下，移出少量反应溶液并添加至6％三氯乙酸或乙醇水溶液中。将混浊的反应样品冷却(4℃)15分钟，并且然后旋转集结沉淀的血清蛋白质。然后使用稳定性特定的色谱条件通过反相HPLC来判定肽的存在。

[0348] 肽和多肽可经修饰以提供除改进的血清半衰期以外的所需属性。例如，肽刺激CTL活性的能力可通过与含有至少一个能够诱发T辅助细胞应答的表位的序列连接来增强。免疫原性肽/T辅助细胞缀合物可通过间隔分子连接。间隔子通常由相对较小的中性分子(例如氨基酸或氨基酸模拟物)构成，其在生理条件下基本上不带电。间隔子通常选自例如Ala、Gly或非极性氨基酸或中性极性氨基酸的其他中性间隔子。应理解，任选存在的间隔子无需由相同残基组成，并且因此可为杂寡聚物或均寡聚物。当存在时，间隔子将通常是至少一个或两个残基，更通常是三至六个残基。或者，肽可在无间隔子的情况下连接到T辅助肽。

[0349] 可修饰编码抗原的多肽以改变多肽的加工，例如蛋白酶切割和/或其他翻译后加工。可修饰编码抗原的多肽，使得抗原倾向于特定的构象。可修饰编码抗原的多肽，使得突变(例如，一个或多个错义突变)破坏抗原中的特定构象，例如通过引入破坏二级和三级结构(例如，α-螺旋或β-折叠构象)的脯氨酸。在一些情况下，改变、减少或消除加工或构象变化可能会使抗原偏向有利于中和抗体产生的状态。在一系列说明性实例中，在氨基酸682、

815、987和988处的SARS-CoV-2刺突突变被工程化以使刺突蛋白偏向于保持在主要融合前状态，这是抗体介导的中和的潜在优选状态。具体而言，不希望受理论束缚，R682的突变(例如，R682V)破坏了参与将刺突加工成S1和S2的弗林蛋白酶切割位点；R815的突变(例如，R815N)破坏了S2内的切割位点；以及K986和V987的突变，例如引入两个脯氨酸的K986P和V987P，这会干扰刺突的二级结构，使其不太可能从融合前状态处理到融合后状态。因此，抗原盒可编码修饰的刺突蛋白，其关于SARS-CoV-2分离株NC_045512.2具有选自以下的至少一种突变：刺突R682V突变、刺突R815N突变、刺突K986P突变、刺突V987P突变及其组合(参见SEQ ID NO:59参考和含有突变的SEQ ID NO:60/SEQ ID NO:90)。修饰的多肽序列可与原生SARS-CoV-2多肽序列具有至少60％、70％、80％或90％的同一性。修饰的多肽序列可与原生SARS-CoV-2多肽序列具有至少91％、92％、93％或94％的同一性。修饰的多肽序列可与天然SARS-CoV-2多肽序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％的同一性。修饰的多肽序列可与原生SARS-CoV-2多肽序列具有至少99.1％、99.2％、99.3％、99.4％、99.5％、99.6％、99.7％、99.8％或99.9％的同一性。

[0350] 抗原肽可直接或经由在肽的氨基或羧基端处的间隔子连接到T辅助肽。抗原肽或T辅助肽的氨基端可被酰化。示例性T辅助肽包括破伤风类毒素830-843、流感307-319、疟疾环子孢子382-398和378-389。

[0351] 蛋白质或肽可通过本领域技术人员已知的任何技术制造，包括经由标准分子生物学技术表达蛋白质、多肽或肽；从天然来源分离蛋白质或肽；或化学合成蛋白质或肽。先前已公开对应于各种基因的核苷酸和蛋白质、多肽和肽序列，并且可见于本领域普通技术人员已知的计算机化数据库中。一种此类数据库是位于美国国家卫生研究院(National Institutes of Health)网站的美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)的Genbank和GenPept数据库。已知基因的编码区可使用本文所公开或本领域普通技术人员应知晓的技术扩增和/或表达。或者，蛋白质、多肽和肽的各种市售制剂是本领域技术人员已知的。

[0352] 在另一方面，抗原包括编码抗原肽或其部分的核酸(例如多核苷酸)。多核苷酸可为例如DNA、cDNA、PNA、CNA、RNA(例如mRNA)、单链和/或双链、或原生或稳定化形式的多核苷酸，例如具有硫代磷酸酯骨架的多核苷酸，或其组合，并且其可含有或可不含内含子。可对编码抗原的多核苷酸序列进行序列优化以改进表达，例如通过改进转录、翻译、转录后加工和/或RNA稳定性。例如，可对编码抗原的多核苷酸序列进行密码子优化。本文中的“密码子优化”是指就给定生物体的密码子偏倚而言，用经常使用的同义密码子替换不经常使用的密码子。可对多核苷酸序列进行优化以改进转录后加工，例如优化以减少意外剪接，例如通过去除剪接基序(例如，典型和/或隐秘/非典型剪接供体、分支和/或受体序列)和/或引入外源剪接基序(例如剪接供体、分支和/或受体序列)以偏向偏好的剪接事件。外源内含子序列包括但不限于源自SV40(例如，SV40微型内含子[SEQ ID NO:88])和源自免疫球蛋白(例如，人β-珠蛋白基因)的那些。外源内含子序列可并入在启动子/增强子序列和抗原序列之间。Callendret等人(Virology.2007年7月5日;363(2):288-302)更详细地描述了用于表达载体的外源内含子序列，所述文献出于所有目的通过引用并入本文。可对多核苷酸序列进行优化以改进转录物稳定性，例如通过去除RNA不稳定性基序(例如，富含AU的元件和3’UTR基序)和/或重复核苷酸序列。可对多核苷酸序列进行优化以改进准确转录，例如通过去除

隐秘的转录起始子和/或终止子。可对多核苷酸序列进行优化以改进翻译和翻译准确性，例如通过去除隐秘的AUG起始密码子、过早的聚A序列和/或二级结构基序。可对多核苷酸序列进行优化以改进转录物的核输出，例如通过添加组成型转运元件(CTE)、RNA转运元件(RTE)或土拨鼠转录后调控元件(WPRE)。Callendret等人(Virology.2007年7月5日;363(2):288-302)更详细地描述了用于表达载体的核输出信号，所述文献出于所有目的通过引用并入本文。多核苷酸序列可关于GC含量进行优化，例如以反映给定生物体的平均GC含量。序列优化可平衡一种或多种序列特性，例如转录、翻译、转录后加工和/或RNA稳定性。序列优化可产生平衡了转录、翻译、转录后加工和RNA稳定性中的每一者的最佳序列。序列优化算法是本领域技术人员已知的，例如GeneArt(Thermo Fisher)、Codon Optimization Tool(IDT)、Cool Tool、SGI-DNA(La Jolla California)。可分别对抗原编码蛋白的一个或多个区域进行序列优化。作为一个非限制性说明性实例，SARS-CoV-2刺突蛋白可在蛋白质的S1区中经序列优化并且S2区被独立优化(例如，使用不同算法进行优化和/或对于S2区特异性的一种或多种序列特性进行优化)。

[0353] 本文公开的方法还可包括鉴定对子集中的抗原中的至少一者具有抗原特异性的一种或多种T细胞。在一些实施方案中，鉴定包括在扩增一种或多种抗原特异性T细胞的条件下使一种或多种T细胞与子集中的一种或多种抗原共同培养。在其他实施方案中，鉴定包括使一种或多种T细胞与包含子集中的一种或多种抗原的四聚体在允许T细胞与四聚体之间结合的条件下接触。在甚至其他实施方案中，本文公开的方法还可包括鉴定一种或多种经鉴定T细胞的一种或多种T细胞受体(TCR)。在某些实施方案中，鉴定一种或多种T细胞受体包括对一种或多种经鉴定T细胞的T细胞受体序列进行测序。本文公开的方法还可包括对多个T细胞进行基因工程化以表达一种或多种经鉴定T细胞受体中的至少一者;在扩增所述多个T细胞的条件下培养所述多个T细胞;以及将扩增T细胞注入受试者体内。在一些实施方案中，对多个T细胞进行基因工程化以表达一种或多种经鉴定T细胞受体中的至少一者包括将一种或多种经鉴定T细胞的T细胞受体序列克隆到表达载体中;以及用所述表达载体转染所述多个T细胞中的每一者。在一些实施方案中，本文公开的方法还包括在扩增一种或多种经鉴定T细胞的条件下培养所述一种或多种经鉴定T细胞;以及将扩增T细胞注入受试者中。

[0354] 本文还公开了一种分离的T细胞，其对子集中的至少一种经选择抗原具有抗原特异性。

[0355] 另一方面提供了一种能够表达多肽或其部分的表达载体。不同细胞类型的表达载体在本领域中已熟知并且无需过度实验便可选择。一般来说，DNA以适当定向插入至表达载体(例如质粒)中并以正确阅读框进行表达。如果需要，DNA可连接到由所需宿主识别的适当转录和翻译调节控制核苷酸序列，但此类控制件一般可用于表达载体中。载体然后经由标准技术引入至宿主中。指导可见于例如Sambrook等人(1989)Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.中。

[0356] V.疫苗组合物

[0357] 本文还公开了一种免疫原性组合物，例如疫苗组合物，其能够引起特异性免疫应答，例如感染性疾病生物体特异性免疫应答。疫苗组合物通常包含例如使用本文描述的方法选择的一种或多种抗原。疫苗组合物也可以称为疫苗。

[0358] 疫苗可含有1至30种肽;2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、

21、22、23、24、25、26、27、28、29或30种不同的肽;6、7、8、9、10、11、12、13或14种不同的肽;或12、13或14种不同的肽。肽可包括翻译后修饰。疫苗可含有1至100或更多种核苷酸序列;2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或更多种不同的核苷酸序列;6、7、8、9、10、11、12、13或14种不同的核苷酸序列;或12、13或14种不同的核苷酸序列。疫苗可含有1至30种抗原序列;2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或更多种不同的抗原序列;6、7、8、9、10、11、12、13或14种不同的抗原序列;或12、13或14种不同的抗原序列。

[0359] 疫苗可含有1至30种抗原编码核酸序列;2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或更多种不同的抗原编码核酸序列;6、7、8、9、10、11、12、13或14种不同的抗原编码核酸序列;或12、13或14种不同的抗原编码核酸序列。抗原编码核酸序列可指“抗原盒”的抗原编码部分。本文更详细地描述了抗原盒的特征。抗原编码核酸序列可含有一种或多种表位编码核酸序列(例如,编码串联的T细胞表位的抗原编码核酸序列)。

[0360] 疫苗可含有1至30种不同的表位编码核酸序列;2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或更多种不同的表位编码核酸序列;6、7、8、9、10、11、12、13或14种不同的表位编码核酸序列;或12、13或14种不同的表位编码核酸序列。表位编码核酸序列可指单个表位序列的序列,例如编码串联的T细胞表位的抗原编码核酸序列中的T细胞表位中的每一者。

[0361] 疫苗可含有表位编码核酸序列的至少两个重复序列。如本文所用,“重复序列”是指抗原编码核酸序列内相同的核酸表位编码核酸序列(包括本文所述的任选的5’接头序列和/或任选的3’接头序列)的两次或更多次迭代。在一个实例中,盒的抗原编码核酸序列部分编码表位编码核酸序列的至少两个重复序列。在进一步的非限制性实例中,盒的抗原编码核酸序列部分编码超过一个不同的表位,并且至少一个不同的表位由编码所述不同表位的核酸序列的至少两个重复序列编码(即,至少两个不同的表位编码核酸序列)。在说明性的非限制性实例中,抗原编码核酸序列编码由表位编码核酸序列表位编码序列A(E_A)、表位编码序列B(E_B)和表位编码序列C(E_C)编码的表位A、B和C,并且具有至少一个不同表位的重复序列的示例性抗原编码核酸序列由但不限于下式说明:

[0362] -一个不同表位的重复序列(表位A的重复序列)：

[0363] E_A-E_B-E_C-E_A;或

[0364] E_A-E_A-E_B-E_C

[0365] -多个不同表位的重复序列(表位A、B和C的重复序列)：

[0366] E_A-E_B-E_C-E_A-E_B-E_C;或

[0367] E_A-E_A-E_B-E_B-E_C-E_C

[0368] -多个不同表位的多次重复序列(表位A、B和C的重复序列)：

[0369] E_A-E_B-E_C-E_A-E_B-E_C-E_A-E_B-E_C;或

[0370] E_A-E_A-E_A-E_B-E_B-E_B-E_C-E_C-E_C

[0371] 上述实例不是限制性的，并且具有至少一个不同表位的重复序列的抗原编码核酸序列可以任何顺序或频率编码每个不同表位。例如，顺序和频率可以是不同表位的随机排列，例如，在具有表位A、B和C的实例中，通过式E_A-E_B-E_C-E_C-E_A-E_B-E_A-E_C-E_A-E_C-E_C-E_B。

[0372] 本文还提供了一种抗原编码盒，所述抗原编码盒具有至少一个由下式从5'至3'描述的抗原编码核酸序列：

[0373] $(E_x-(E^N{}_n)_y)_z$

[0374] 其中E表示包含至少一种不同的表位编码核酸序列中的至少一者的核苷酸序列，

[0375] n表示单独的不同的表位编码核酸序列的数目并且是包括0的任何整数，

[0376] E^N表示包含对于每个相应n的单独不同的表位编码核酸序列的核苷酸序列，

[0377] 对于z的每次迭代：x＝0或1，对于每个n，y＝0或1，和x或y＝1中的至少一者，并且

[0378] z＝2或更大，其中所述抗原编码核酸序列包含E、给定E^N或其组合的至少两次迭代。

[0379] 每个E或E^N可独立地包含本文所述的任何表位编码核酸序列(例如编码如表A、表B和/或表C中所示的多肽序列的核苷酸序列)。例如，每个E或E^N可独立地包含由式($L5_b$-N_c-$L3_d$)从5'至3'描述的核苷酸序列，其中N包含与每个E或E^N相关的不同表位编码核酸序列，其中c＝1，L5包含5'接头序列，其中b＝0或1，并且L3包含3'接头序列，其中d＝0或1。本文进一步描述了可使用的表位和接头。

[0380] 表位编码核酸序列的重复序列(包括任选的5'接头序列和/或任选的3'接头序列)可彼此直接线性连接(例如，如上所示的E_A-E_A-.....)。表位编码核酸序列的重复序列可被一个或多个额外的核苷酸序列分开。一般来说，表位编码核酸序列的重复序列可被适用于本文所述组合物的任何大小的核苷酸序列分开。在一个实例中，表位编码核酸序列的重复序列可由单独的不同的表位编码核酸序列分开(例如，如上所示的E_A-E_B-E_C-E_A……)。在重复序列被单个单独的不同表位编码核酸序列分开并且每个表位编码核酸序列(包括任选的5'接头序列和/或任选的3'接头序列)编码长度为25个氨基酸的肽的实例中，重复序列可被75个核苷酸分开，例如在以E_A-E_B-E_A……表示的抗原编码核酸中，E_A被75个核苷酸分开。在一个说明性实例中，具有编码25聚体抗原Trp1(VTNTEMFVTAPDNLGYMYEVQWPGQ;SEQ ID NO:116)和Trp2(TQPQIANCSVYDFFVWLHYYSVRDT;SEQ ID NO:117)的重复序列的序列VTNTEMFVTAPDNLGYMYEVQWPGQTQPQIANCSVYDFFVWLHYYSVRDTVTNTEMFVTAPDNLGYMYEVQWPGQTQPQIANCSVYDFFVWLHYYSVRDT(SEQ ID NO:115)的抗原编码核酸序列，Trp1的重复序列由25聚体Trp2分开并且因此Trp1表位编码核酸序列的重复序列由75个核苷酸的Trp2表位编码核酸序列分

开。在重复序列由2、3、4、5、6、7、8或9个单独的不同表位编码核酸序列分开并且每个表位编码核酸序列(包括任选的5'接头序列和/或任选的3'接头序列)编码长度为25个氨基酸的肽的实例中,所述重复序列可分别由150、225、300、375、450、525、600或675个核苷酸分开。

[0381] 在一个实施方案中,选择不同肽和/或多肽或编码其的核苷酸序列,使得肽和/或多肽能够与不同MHC分子(例如不同MHC I类分子和/或不同MHC II类分子)结合。在一些方面,一种疫苗组合物包含能够与最常出现的MHC I类分子和/或不同MHC II类分子缔合的肽和/或多肽的编码序列。因此,疫苗组合物可包含能够与至少2个优选的、至少3个优选的或至少4个优选的MHC I类分子和/或不同MHC II类分子缔合的不同片段。

[0382] 疫苗组合物可刺激特异性细胞毒性T细胞应答和特异性辅助T细胞应答。

[0383] 疫苗组合物可刺激特异性B细胞应答(例如,抗体应答)。

[0384] 疫苗组合物可刺激特异性细胞毒性T细胞应答、特异性辅助T细胞应答和/或特异性B细胞应答。疫苗组合物可刺激特异性细胞毒性T细胞应答和特异性B细胞应答。疫苗组合物可刺激特异性辅助T细胞应答和特异性B细胞应答。疫苗组合物可刺激特异性细胞毒性T细胞应答、特异性辅助T细胞应答和特异性B细胞应答。

[0385] 疫苗组合物的组合可刺激特异性细胞毒性T细胞应答、特异性辅助T细胞应答和/或特异性B细胞应答。疫苗组合物可为同源的并且联合刺激特异性细胞毒性T细胞应答、特异性辅助T细胞应答和/或特异性B细胞应答。疫苗组合物可为同源的并且联合刺激特异性细胞毒性T细胞应答、特异性辅助T细胞应答和特异性B细胞应答。疫苗组合物可为异源的并且联合刺激特异性细胞毒性T细胞应答、特异性辅助T细胞应答和/或特异性B细胞应答。疫苗组合物可为异源的并且联合刺激特异性细胞毒性T细胞应答、特异性辅助T细胞应答和特异性B细胞应答。异源疫苗包含由不同疫苗平台(例如病毒疫苗(例如,基于ChAdV的平台)和mRNA疫苗(例如,基于SAM的平台))编码的相同抗原盒。异源疫苗包含由相同疫苗平台(例如病毒疫苗(例如,基于ChAdV的平台)或mRNA疫苗(例如,基于SAM的平台))编码的不同抗原盒(例如,刺突盒和单独的T细胞表位编码盒,或源自不同SARS-CoV-2分离株的表位/抗原,例如来自SARS-CoV-2分离株NC_045512.2和B.1.351分离株的刺突蛋白变体)。异源疫苗包含由不同的疫苗平台(例如,病毒疫苗(例如,基于ChAdV的平台)和mRNA疫苗(例如,基于SAM的平台))编码的不同的抗原盒(例如,刺突盒和单独的T细胞表位编码盒或源自不同SARS-CoV-2分离株的表位/抗原,例如来自SARS-CoV-2分离株NC_045512.2和B.1.351分离株的刺突蛋白变体)。例如,作为一个说明性的非限制性实例,病毒疫苗(例如,基于ChAdV的平台)尤其可刺激强大的细胞毒性T细胞应答,而mRNA疫苗(例如,基于SAM的平台)尤其可刺激强大的B细胞应答。

[0386] 疫苗组合物还可包含佐剂和/或载剂。有用的佐剂和载剂的实例在下文中给出。组合物可与载剂缔合,例如蛋白质或抗原呈递细胞,例如能够将肽呈递至T细胞的树突状细胞(DC)。

[0387] 佐剂是混合至疫苗组合物中增加或以其他方式修饰对抗原的免疫应答的任何物质。载剂可为支架结构,例如能够与抗原缔合的多肽或多糖。任选地,佐剂是共价或非共价缀合的。

[0388] 佐剂提高对抗原的免疫应答的能力通常显现为免疫介导性反应的显著或实质性增加或疾病症状的减少。例如,体液免疫的增强典型地显现为针对抗原所产生的抗体滴度

的显著增大,并且T细胞活性的增强典型地显现为细胞增殖或细胞性细胞毒性或细胞因子分泌的增强。佐剂还可改变免疫应答,例如通过将主要体液或Th应答变为主要细胞或Th应答。

[0389] 合适的佐剂包括(但不限于)1018ISS、明矾、铝盐、Amplivax、AS15、BCG、CP-870,893、CpG7909、CyaA、dSLIM、GM-CSF、IC30、IC31、咪喹莫特(Imiquimod)、ImuFact IMP321、IS Patch、ISS、ISCOMATRIX、JuvImmune、LipoVac、MF59、单磷酰基脂质A、Montanide IMS 1312、Montanide ISA 206、Montanide ISA 50V、Montanide ISA-51、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、PepTel载体系统、PLG微粒、雷西莫特(resiquimod)、SRL172、病毒颗粒和其他病毒样颗粒、YF-17D、VEGF捕获剂、R848、β-葡聚糖、Pam3Cys、Aquila的源自皂素的QS21刺激子(Aquila Biotech,Worcester,Mass.,USA)、分支杆菌提取物和合成细菌细胞壁模拟物,以及其他专用佐剂,例如Ribi的Detox.Quil或Superfos。例如弗氏(Freund's)不完全或GM-CSF的佐剂是有用的。先前已描述对树突状细胞具有特异性的数种免疫佐剂(例如MF59)及其制备(Dupuis M等人,Cell Immunol.1998;186(1):18-27;Allison A C;Dev Biol Stand.1998;92:3-11)。还可使用细胞因子。数种细胞因子已直接关联于:影响树突状细胞迁移至淋巴组织(例如TNF-α)、加速树突状细胞成熟变为T-淋巴细胞的有效抗原呈递细胞(例如GM-CSF、IL-1和IL-4)(美国专利第5,849,589号,其通过引用整体明确并入本文)以及充当免疫佐剂(例如IL-12)(Gabrilovich D I等人,J Immunother Emphasis Tumor Immunol.1996(6):414-418)。

[0390] 还已报道CpG免疫刺激性寡核苷酸增强佐剂在疫苗环境中的效应。还可使用其他TLR结合分子,例如结合RNA的TLR 7、TLR 8和/或TLR 9。

[0391] 有用佐剂的其他实例包括(但不限于)经化学修饰的CpG(例如CpR、Idera)、聚(I:C)(例如聚i:CI2U)、非CpG细菌DNA或RNA以及免疫活性小分子和抗体,例如环磷酰胺、舒尼替尼(sunitinib)、贝伐单抗(bevacizumab)、西乐葆(celebrex)、NCX-4016、西地那非(sildenafil)、他达拉非(tadalafil)、伐地那非(vardenafil)、索拉菲尼(sorafinib)、XL-999、CP-547632、帕佐泮尼(pazopanib)、ZD2171、AZD2171、伊匹单抗、曲美木单抗(tremelimumab)和SC58175,其可起治疗作用和/或充当佐剂。佐剂和添加剂的量和浓度可容易由本领域技术人员确定而无需过度实验。额外佐剂包括集落刺激因子,例如颗粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF,沙格司亭(sargramostim))。

[0392] 疫苗组合物可包含超过一种的不同佐剂。此外,治疗性组合物可包含任何佐剂物质,包括以上各者中的任一者或其组合。还预期,疫苗和佐剂可一起或以任何适当的顺序分开施用。

[0393] 载剂(或赋形剂)可独立于佐剂存在。载剂的功能可例如是增加特定突变体的分子量以提高活性或免疫原性、赋予稳定性、增加生物活性或增加血清半衰期。此外,载剂可辅助呈递肽至T细胞。载剂可为本领域技术人员已知的任何合适的载剂,例如蛋白质或抗原呈递细胞。载剂蛋白质可为(但不限于)匙孔螺血氰蛋白、血清蛋白质(例如转铁蛋白)、牛血清白蛋白、人类血清白蛋白、甲状腺球蛋白或卵白蛋白、免疫球蛋白或激素,例如胰岛素或棕榈酸。为了用于人类免疫接种,载剂通常是生理学上可接受的载剂,其为人类可接受的并且安全的。然而,破伤风类毒素和/或白喉类毒素是合适的载剂。或者,载剂可为葡聚糖,例如琼脂糖。

[0394] 细胞毒性T细胞(CTL)识别呈结合至MHC分子的肽形式而非完整外来抗原自身的抗原。MHC分子本身位于抗原呈递细胞的细胞表面上。因此,如果存在肽抗原、MHC分子和APC的三聚体复合物,则可能激活CTL。相应地,如果不仅将肽用于激活CTL,而且如果另外添加具有相应MHC分子的APC,则可加强免疫应答。因此,在一些实施方案中,疫苗组合物另外含有至少一种抗原呈递细胞。

[0395] 抗原还可包括于基于病毒载体的疫苗平台中,例如牛痘、禽痘、自我复制甲病毒、马拉巴病毒(marabavirus)、腺病毒(参见例如Tatsis等人,Adenoviruses,Molecular Therapy(2004)10,616-629)或慢病毒,包括(但不限于)第二、第三或杂交第二/第三代慢病毒和任一代的重组慢病毒,其设计成靶向特定细胞类型或受体(参见例如Hu等人,Immunization Delivered by Lentiviral Vectors for Cancer and Infectious Diseases,Immunol Rev.(2011)239(1):45-61;Sakuma等人,Lentiviral vectors:basic to translational,Biochem J.(2012)443(3):603-18;Cooper等人,Rescue of splicing-mediated intron loss maximizes expression in lentiviral vectors containing the human ubiquitin C promoter,Nucl.Acids Res.(2015)43(1):682-690;Zufferey等人,Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient In Vivo Gene Delivery,J.Virol.(1998)72(12):9873-9880)。取决于上述基于病毒载体的疫苗平台的包装能力,这种方法可递送编码一种或多种抗原肽的一种或多种核苷酸序列。序列可侧接非突变序列,可由接头分开或者可在前面有一种或多种靶向亚细胞区室的序列(参见例如Gros等人,Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients,Nat Med.(2016)22(4):433-8;Stronen等人,Targeting of cancer neoantigens with donor-derived T cell receptor repertoires,Science.(2016)352(6291):1337-41;Lu等人,Efficient identification of mutated cancer antigens recognized by T cells associated with durable tumor regressions,Clin Cancer Res.(2014)20(13):3401-10)。在引入宿主中后,受感染细胞表达抗原,从而刺激针对一种或多种肽的宿主免疫(例如CTL)应答。可用于免疫方案中的牛痘载体和方法描述于例如美国专利第4,722,848号中。另一种载体是卡介苗(Bacille Calmet te Guerin,BCG)。BCG载体描述于Stover等人(Nature 351:456-460(1991))中。根据本文描述,可用于抗原的治疗性施用或免疫接种的各种其他疫苗载体,例如伤寒沙门氏菌载体等,对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0396] V.A.抗原盒

[0397] 鉴于本文提供的教导,用于选择一种或多种抗原、“盒”的克隆和构建以及将其插入病毒载体中的方法在本领域技术范围内。“抗原盒”或“盒”是指经选择的抗原或多种抗原(例如,抗原编码核酸序列)与转录抗原和表达转录产物所必需的其他调控元件的组合。经选择的抗原或多种抗原可指不同的表位序列,例如,盒中的抗原编码核酸序列可编码表位编码核酸序列(或多个表位编码核酸序列),使得表位被转录和表达。一种抗原或多种抗原可以允许转录的方式可操作地连接到调控组件。此类组件包括可驱动一种或多种抗原在用病毒载体转染的细胞中表达的常规调控元件。因此,抗原盒还可含有经选择的启动子,所述启动子与一种或多种抗原连接并且与其他任选的调控元件一起位于重组载体的经选择的病毒序列内。盒可具有一种或多种抗原编码核酸序列,例如含有多个抗原编码核酸序列的

盒,每个抗原编码核酸序列独立地可操作地连接到单独的启动子和/或使用其他多顺反子系统例如2A核糖体跳跃序列元件(例如,E2A、P2A、F2A或T2A序列)或内部核糖体进入位点(IRES)序列元件连接在一起。接头也可具有切割位点,例如TEV或弗林蛋白酶切割位点。具有切割位点的接头可与其他元件组合使用,例如多顺反子系统中的那些。在一个非限制性说明性实例中,弗林蛋白酶切割位点可与2A核糖体跳跃序列元件结合使用,使得弗林蛋白酶切割位点被配置为促进翻译后2A序列的去除。在含有超过一个抗原编码核酸序列的盒中,每个抗原编码核酸序列可含有一种或多种表位编码核酸序列(例如,编码串联的T细胞表位的抗原编码核酸序列)。在多顺反子格式的说明性实例中,编码SARS-CoV-2抗原的盒配置如下:(1)内源26S启动子-刺突蛋白-T2A-膜蛋白,或(2)内源26S启动子-刺突蛋白-26S启动子-串联T细胞表位。

[0398] 有用的启动子可为组成型启动子或经调控(诱导型)启动子,其将能够控制有待表达的抗原的量。例如,合乎需要的启动子是巨细胞病毒立即早期启动子/增强子的启动子[参见例如Boshart等人,Cell,41:521-530(1985)]。另一种合乎需要的启动子包括劳斯肉瘤(Rous sarcoma)病毒LTR启动子/增强子。另一种启动子/增强子序列是鸡细胞质β-肌动蛋白启动子[T.A.Kost等人,Nucl.Acids Res.,11(23):8287(1983)]。其他适合或合乎需要的启动子可由本领域技术人员选择。

[0399] 抗原盒还可包括对病毒载体序列异源的核酸序列,包括提供转录物的有效聚腺苷酸化(聚(A)、聚-A或pA)的信号的序列和具有功能性剪接供体和受体位点的内含子。本发明的示例性载体中采用的普通聚-A序列是源自乳多泡病毒SV-40的聚-A序列。聚-A序列一般可在基于抗原的序列之后和在病毒载体序列之前插入盒中。普通内含子序列也可源自SV-40,并且被称为SV-40T内含子序列。抗原盒还可含有此类内含子,位于启动子/增强子序列与抗原之间。这些和其他普通载体元件的选择是常规的[参见例如Sambrook等人,“Molecular Cloning.A Laboratory Manual.”,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory,New York(1989)和其中引用的参考文献]并且许多此类序列可从商业和工业来源以及Genbank获得。

[0400] 抗原盒可具有一种或多种抗原。例如,给定盒可包括1-10、1-20、1-30、10-20、15-25、15-20、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多种抗原。抗原可直接彼此连接。抗原也可利用接头彼此连接。抗原相对于彼此可处于任何方向,包括N至C或C至N。

[0401] 如别处所述,抗原盒可定位于病毒载体骨架中的任何经选择缺失的位点中,例如基于ChAd的载体或VEE骨架的缺失结构蛋白的E1基因区缺失或E3基因区缺失的位点,以及可选择的其他位点。

[0402] 可使用下式描述抗原编码序列(例如,盒或盒中编码免疫原性多肽的一个或多个核酸序列)以描述从5’到3’的每个元件的有序序列:

[0403] P_a-($L5_b$-N_c-$L3_d$)$_X$-($G5_e$-U_f)$_Y$-$G3_g$

[0404] 其中P包含第二启动子核苷酸序列,其中a=0或1,其中c=1,N包含本文描述的SARS-CoV-2衍生核酸序列之一,任选地其中每个N编码如表A、表B和/或表C中所示的多肽序列,L5包含5’接头序列,其中b=0或1,L3包含3’接头序列,其中d=0或1,G5包含至少一种编码GPGPG氨基酸接头(SEQ ID NO:56)的核酸序列之一,其中e=0或1,G3包含编码GPGPG氨基

酸接头(SEQ ID NO:56)的至少一种核酸序列之一,其中g＝0或1,U包含至少一种MHC II类表位编码核酸序列之一,其中f＝1,X＝1至400,其中对于每个X,相应的N_c是SARS-CoV-2衍生核酸序列,并且Y＝0、1或2,其中对于每个Y,相应的U_f是(1)通用的MHC II类表位编码核酸序列,任选地其中所述至少一种通用序列包含破伤风类毒素和PADRE中的至少一者,或(2)MHC II类SARS-CoV-2衍生的表位编码核酸序列。在一些方面,对于每个X,相应的N_c是不同的SARS-CoV-2衍生核酸序列。在一些方面,对于每个Y,相应的U_f是不同的通用MHC II类表位编码核酸序列或不同的MHC II类SARS-CoV-2衍生的表位编码核酸序列。在一些情况下,上述抗原编码序列式仅描述了抗原盒中编码串联的表位序列(例如串联的T细胞表位)的部分。例如,在编码串联的T细胞表位和一种或多种全长SARS-CoV-2蛋白的盒中,上述抗原编码序列式描述了串联的T细胞表位,而盒分别编码一种或多种全长SARS-CoV-2蛋白,其任选使用多顺反子系统例如2A核糖体跳跃序列元件(例如,E2A、P2A、F2A或T2A序列)、内部核糖体进入位点(IRES)序列元件连接,和/或独立可操作地连接到单独的启动子。

[0405] 在一个实例中,存在的元件包括其中b＝1,d＝1,e＝1,g＝1,h＝1,X＝18,Y＝2,并且载体骨架包含ChAdV68载体,a＝1,P是CMV启动子,存在至少一种第二聚(A)序列,其中第二聚(A)序列是载体骨架的外源聚(A)序列,并且任选地其中所述外源聚(A)序列包含SV40聚(A)信号序列或BGH聚(A)信号序列,并且每个N编码长度为7-15个氨基酸的MHC I类表位、MHC II类表位、能够刺激B细胞应答的表位或其组合,L5是编码表位的原生N末端氨基酸序列的原生5'接头序列,并且其中所述5'接头序列编码长度为至少3个氨基酸的肽,L3是编码表位的原生C末端氨基酸序列的原生3'接头序列,并且其中3'接头序列编码长度为至少3个氨基酸的肽,并且U是PADRE II类序列和破伤风类毒素MHC II类序列中的每一者。在一些情况下,上述抗原编码序列式仅描述了抗原盒中编码串联的表位序列、例如串联的T细胞表位的部分。

[0406] 在一个实例中,存在的元件包括其中b＝1,d＝1,e＝1,g＝1,h＝1,X＝18,Y＝2,并且载体骨架包含委内瑞拉马脑炎病毒载体,a＝0,并且抗原盒与内源26S启动子可操作地连接,并且至少一种聚腺苷酸化聚(A)序列是由骨架提供的至少80个连续A核苷酸的聚(A)序列(SEQ ID NO:27940),并且每个N编码长度为7-15个氨基酸的MHC I类表位、MHC II类表位、能够刺激B细胞应答的表位或其组合,L5是编码表位的原生N末端氨基酸序列的原生5'接头序列,并且其中5'接头序列编码长度为至少3个氨基酸的肽,L3是编码表位的原生C末端氨基酸序列的原生3'接头序列,并且其中所述3'接头序列编码长度为至少3个氨基酸的肽,并且U是PADRE II类序列和破伤风类毒素MHC II类序列中的每一者。

[0407] 可使用下式描述抗原编码序列以描述从5'到3'的每个元件的有序序列:

[0408] $(P_a\text{-}(L5_b\text{-}N_c\text{-}L3_d)_X)_Z\text{-}(P2_h\text{-}(G5_e\text{-}U_f)_Y)_W\text{-}G3_g$

[0409] 其中P和P2包含启动子核苷酸序列,N包含本文所述的SARS-CoV-2衍生核酸序列之一(例如,N编码如表A、表B、表C和/或表10中所示的多肽序列),L5包含5'接头序列,L3包含3'接头序列,G5包含编码氨基酸接头的核酸序列,G3包含编码氨基酸接头的至少一个核酸序列中的一者,U包含MHC II类抗原编码核酸序列,其中对于每个X,相应Nc是SARS-CoV-2衍生核酸序列,其中对于每个Y,相应的U_f是(1)通用的MHC II类表位编码核酸序列,任选地其中所述至少一种通用序列包含破伤风类毒素和PADRE中的至少一者,或(2)MHC II类SARS-CoV-2衍生的表位编码核酸序列。所述组合物和有序序列可进一步通过选择存在元件的数

目来定义,例如其中a＝0或1,其中b＝0或1,其中c＝1,其中d＝0或1,其中e＝0或1,其中f＝1,其中g＝0或1,其中h＝0或1,X＝1至400,Y＝0、1、2、3、4或5,Z＝1至400,并且W＝0、1、2、3、4或5。

[0410] 在一个实例中,存在的元件包括其中a＝0,b＝1,d＝1,e＝1,g＝1,h＝0,X＝10,Y＝2,Z＝1,和W＝1,其描述其中无额外启动子存在(例如,仅存在由载体骨架如RNA甲病毒骨架提供的启动子核苷酸序列),存在10个表位,每个N存在5'接头,每个N存在3'接头,存在2个MHC II类表位,存在连接两个MHC II类表位的接头,存在将两个MHC II类表位的5'端连接到最终MHC I类表位的3'接头的接头,并且存在将两个MHC II类表位的3'端连接到载体骨架的接头。将抗原盒的3'端连接到载体骨架的实例包括直接连接到由载体骨架提供的3'UTR元件(例如3'19-nt CSE)。将抗原盒的5'端连接到载体骨架的实例包括直接连接到载体骨架的启动子或5'UTR元件,例如甲病毒载体骨架的26S启动子序列、甲病毒5'UTR、51-nt CSE或24-nt CSE。

[0411] 其他实例包括:其中a＝1,描述其中存在除载体骨架所提供的启动子核苷酸序列以外的启动子;其中a＝1并且Z大于1,其中存在除载体骨架所提供的启动子核苷酸序列以外的多个启动子,其各自驱动1个或更多个不同MHC I类表位编码核酸序列的表达;其中h＝1,描述其中存在单独启动子以驱动MHC II类表位编码核酸序列的表达;以及其中g＝0,描述MHC II类表位编码核酸序列(如果存在)直接连接到载体骨架。

[0412] 其他实例包括其中所存在的每个MHC I类表位可具有5'接头、3'接头,两者都不具有,或具有两者。在其中同一抗原盒中存在超过一种MHC I类表位的实例中,一些MHC I类表位可具有5'接头和3'接头两者,而其他MHC I类表位可具有5'接头、3'接头或两者均不具有。在其中同一抗原盒中存在超过一种MHC I类表位的其他实例中,一些MHC I类表位可具有5'接头或3'接头,而其他MHC I类表位可具有5'接头、3'接头或两者均不具有。

[0413] 在其中同一抗原盒中存在超过一种MHC II类表位的实例中,一些MHC II类表位可具有5'接头和3'接头两者,而其他MHC II类表位可具有5'接头、3'接头或两者均不具有。在其中同一抗原盒中存在超过一种MHC II类表位的其他实例中,一些MHC II类表位可具有5'接头或3'接头,而其他MHC II类表位可具有5'接头、3'接头或两者均不具有。

[0414] 其他实例包括其中所存在的每个抗原可具有5'接头、3'接头,两者都不具有,或具有两者。在其中同一抗原盒中存在超过一种抗原的实例中,一些抗原可具有5'接头和3'接头两者,而其他抗原可具有5'接头、3'接头或两者均不具有。在其中同一抗原盒中存在超过一种抗原的其他实例中,一些抗原可具有5'接头或3'接头,而其他抗原可具有5'接头、3'接头或两者均不具有。

[0415] 启动子核苷酸序列P和/或P2可与载体骨架如RNA甲病毒骨架所提供的启动子核苷酸序列相同。例如,由载体骨架提供的启动子序列Pn和P2可各自包含26S次基因组启动子或CMV启动子。启动子核苷酸序列P和/或P2可不同于载体骨架所提供的启动子核苷酸序列,以及可彼此不同。

[0416] 5'接头L5可为原生序列或非天然序列。非天然序列包括但不限于AAY、RR和DPP。3'接头L3也可为原生序列或非天然序列。另外,L5和L3可两者均为原生序列,两者均为非天然序列,或者一者可为原生的并且另一者可为非天然的。对于每个X,氨基酸接头的长度可为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、

30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或更多个氨基酸。对于每个X，氨基酸接头的长度也可为至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少26、至少27、至少28、至少29、或至少30个氨基酸。

[0417] 对于每个Y，氨基酸接头G5的长度可为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或更多个氨基酸。对于每个Y，氨基酸接头的长度也可为至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少26、至少27、至少28、至少29、或至少30个氨基酸。

[0418] 氨基酸接头G3的长度可为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或更多个氨基酸。G3的长度也可为至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少26、至少27、至少28、至少29、或至少30个氨基酸。

[0419] 对于每个X，每个N可编码MHC I类表位、MHC II类表位、能够刺激B细胞应答的表位，或其组合。对于每个X，N可编码MHC I类表位、MHC II类表位和能够刺激B细胞应答的表位的组合。对于每个X，N可编码MHC I类表位和MHC II类表位的组合。对于每个X，N可编码MHC I类表位和能够刺激B细胞应答的表位的组合。对于每个X，N可编码MHC II类表位和能够刺激B细胞应答的表位的组合。对于每个X，每个N可编码长度为7-15个氨基酸的MHC I类表位。对于每个X，每个N也可编码长度为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸的MHC I类表位。对于每个X，每个N也可编码长度为至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少26、至少27、至少28、至少29或至少30个氨基酸的MHC I类表位。对于每个X，每个N可编码MHC II类表位。对于每个X，每个N可编码能够刺激B细胞应答的表位。

[0420] 编码一种或多种抗原的盒可以是700个核苷酸或更少。编码一种或多种抗原的盒可以是700个核苷酸或更少并编码2个不同的表位编码核酸序列(例如，编码2个不同的SARS-CoV-2衍生的编码免疫原性多肽的核酸序列)。编码一种或多种抗原的盒可以是700个核苷酸或更少并编码至少2个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒可以是700个核苷酸或更少并编码3个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒可以是

700个核苷酸或更少并编码至少3个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒可以是700个核苷酸或更少并且包括1-10、1-5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种抗原。

[0421] 编码一种或多种抗原的盒的长度可在375-700个核苷酸之间。编码一种或多种抗原的盒的长度可在375-700个核苷酸之间并编码2个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒的长度可在375-700个核苷酸之间并编码至少2个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒的长度可在375-700个核苷酸之间并编码3个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒的长度在375-700个核苷酸之间并编码至少3个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒的长度可在375-700个核苷酸之间并且包括1-10、1-5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种抗原。

[0422] 编码一种或多种抗原的盒的长度可以是600、500、400、300、200或100个核苷酸或更短。编码一种或多种抗原的盒的长度可以是600、500、400、300、200或100个核苷酸或更短并编码2个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒的长度可以是600、500、400、300、200或100个核苷酸或更短并编码至少2个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒的长度可以是600、500、400、300、200或100个核苷酸或更短并编码3个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒的长度可以是600、500、400、300、200或100个核苷酸或更短并编码至少3个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒的长度可以是600、500、400、300、200或100个核苷酸或更短并且包括1-10、1-5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种抗原。

[0423] 编码一种或多种抗原的盒的长度可为375-600、375-500或375-400个核苷酸。编码一种或多种抗原的盒的长度可为375-600、375-500或375-400个核苷酸并编码2个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒的长度可为375-600、375-500或375-400个核苷酸并编码至少2个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒的长度可为375-600、375-500或375-400个核苷酸并编码3个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒的长度可为375-600、375-500或375-400个核苷酸并编码至少3个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒的长度可为375-600、375-500或375-400个核苷酸并且包括1-10、1-5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种抗原。

[0424] V.B.疫苗设计和制造的额外考虑因素

[0425] 在应用了所有上述抗原过滤器之后，可能仍有比疫苗技术支持的更多候选抗原可用于疫苗包涵。另外，可保留关于抗原分析的各个方面的不确定性，并且候选疫苗抗原的不同特性之间可存在折衷。因此，可考虑整合式多维模型代替选择过程的每个步骤中的预定过滤器，将候选抗原置于具有至少以下轴的空间中并使用整合方法优化选择。

[0426] 1.自身免疫或耐受性的风险(生殖系的风险)(自身免疫的风险较低通常是优选的)

[0427] 2.测序伪影的概率(伪影的概率较低通常是优选的)

[0428] 3.免疫原性的概率(免疫原性的概率较高通常是优选的)

[0429] 4.呈递的概率(呈递的概率较高通常是优选的)

[0430] 5.基因表达(较高表达通常是优选的)

[0431] 6.HLA基因的覆盖率(参与抗原集合呈递的HLA分子数目较大可降低受感染细胞经由HLA分子的下调或突变逃避免疫攻击的概率)

[0432] 7.HLA类别的覆盖率(覆盖HLA-I和HLA-II两者可增加治疗应答的概率并降低感染性疾病逃避的概率)

[0433] 另外,任选地,如果预测抗原将由在患者的全部或部分受感染细胞中丢失或失活的HLA等位基因呈递,则可从疫苗接种去除所述抗原的优先排序(例如排除所述抗原)。HLA等位基因损失可通过体细胞突变、杂合性缺失或基因座的同型接合缺失发生。用于检测HLA等位基因体细胞突变的方法是本领域中所熟知,例如(Shukla等人,2015)。用于检测体细胞LOH和同型接合缺失(包括HLA基因座)的方法同样被充分描述。(Carter等人,2012;McGranahan等人,2017;Van Loo等人,2010)。如果质谱数据表明所预测的抗原未被预测的HLA等位基因呈递,则还可去除抗原的优先排序。

[0434] V.C.自扩增RNA载体

[0435] 一般来说,所有自扩增RNA(SAM)载体都含有源自自我复制病毒的自扩增骨架。术语"自扩增骨架"是指允许病毒基因组自我复制的自我复制病毒的最小序列。例如,允许甲病毒自我复制的最小序列可包括用于非结构蛋白介导的扩增的保守序列(例如,非结构蛋白1(nsP1)基因、nsP2基因、nsP3基因、nsP4基因和/或聚A序列)。自扩增骨架还可包括用于表达亚基因组病毒RNA的序列(例如,甲病毒的26S启动子元件)。SAM载体可以是正义RNA多核苷酸或负义RNA多核苷酸,例如具有源自正义或负义自我复制病毒的骨架的载体。自我复制病毒包括但不限于甲病毒、黄病毒(例如昆津病毒(Kunjin virus))、麻疹病毒和弹状病毒(例如狂犬病病毒和水疱性口炎病毒)。源自自我复制病毒的SAM载体系统的实例更详细地描述于Lundstrom(Molecules.2018年12月13日;23(12).pii:E3310.doi:10.3390/molecules23123310),其出于所有目的通过引用并入本文。

[0436] V.C.1.甲病毒生物学

[0437] 甲病毒是披膜病毒科的成员,并且是正义单链RNA病毒。成员通常分类为旧世界,例如辛德毕斯、罗斯河、马雅罗、基孔肯尼亚和塞姆利基森林病毒,或新世界,例如东部马脑炎、奥拉、摩根堡、或委内瑞拉马脑炎及其衍生菌株TC-83(Strauss Microbrial Review 1994)。天然甲病毒基因组通常约12kb长,其中前三分之二含有编码非结构蛋白(nsP)的基因,所述非结构蛋白形成用于病毒基因组自我复制的RNA复制复合物,并且最后三分之一含有编码用于病毒粒子产生的结构蛋白的亚基因组表达盒(Frolov RNA 2001)。

[0438] 甲病毒的模型生命周期涉及数个不同步骤(Strauss Microbrial Review 1994,Jose Future Microbiol 2009)。在病毒附着于宿主细胞后,病毒粒子与内饮区室内的膜融合,导致基因组RNA最终释放至细胞溶质中。以正链定向并包含5'甲基鸟苷酸帽和3'聚A尾部的基因组RNA被翻译以产生形成复制复合物的非结构蛋白nsP1-4。在感染早期,正链然后由复合物复制成负链模板。在当前模型中,复制复合物随着感染进展被进一步加工,使得所得经加工的复合物转换成将负链转录成全长正链基因组RNA以及含有结构基因的26S亚基因组正链RNA。甲病毒的数个保守序列元件(CSE)已鉴定为可能在各种RNA复制步骤中起作用,包括:负链模板的正链RNA复制中的5'UTR的互补序列、基因组模板的负链合成复制中的51-nt CSE、负链的亚基因组RNA转录中的在nsP与26S RNA之间的接合区中的24-nt CSE、和正链模板的负链合成中的3'19-nt CSE。

[0439] 在各种RNA物种复制后,病毒颗粒然后通常在病毒的天然生命周期中组装。26S RNA被翻译并且所得蛋白质经进一步加工以产生结构蛋白,其包括衣壳蛋白、糖蛋白E1和E2

以及两个小多肽E3和6K(Strauss 1994)。发生病毒RNA的衣壳化,衣壳蛋白通常仅特异性针对所包装的基因组RNA,然后病毒粒子组装并在膜表面出芽。

[0440] V.C.2.作为递送载体的甲病毒

[0441] 甲病毒(包括甲病毒序列、特征和其他元件)可用于产生基于甲病毒的递送载体(也称为甲病毒载体、甲病毒病毒载体、甲病毒疫苗载体、自我复制RNA(srRNA)载体或自扩增RNA(samRNA)载体)。甲病毒先前已被工程化以用作表达载体系统(Pushko 1997,Rheme2004)。甲病毒提供数种优势,特别是在可能需要异源抗原表达的疫苗环境中。由于在宿主细胞溶质中自我复制的能力,因此甲病毒载体一般能够在细胞内产生高拷贝数的表达盒,从而导致高水平的异源抗原产生。另外,载体一般是瞬时的,从而使得生物安全性得以提高以及减少对载体的免疫耐受性的诱导。与其他标准病毒载体(例如人类腺病毒)相比,公众通常还缺乏对甲病毒载体预先存在的免疫性。基于甲病毒的载体也通常导致对受感染细胞的细胞毒性应答。在一定程度上,细胞毒性在疫苗环境中对于适当引发对所表达的异源抗原的免疫应答可为重要的。然而,所需细胞毒性的程度可为平衡作用,并且因此已开发数种减毒甲病毒,包括VEE的TC-83菌株。因此,本文所述的抗原表达载体的实例可利用甲病毒骨架,其允许高水平的抗原表达、刺激对抗原的强大免疫应答、不刺激对载体本身的免疫应答,并且可以安全方式使用。此外,抗原表达盒可经设计以经由优化载体使用的甲病毒序列(包括但不限于源自VEE或其减毒衍生物TC-83的序列)而刺激不同水平的免疫应答。

[0442] 已使用甲病毒序列对数种表达载体设计策略进行工程化(Pushko1997)。在一个策略中,甲病毒载体设计包括在结构蛋白基因下游插入26S启动子序列元件的第二拷贝,接着是异源基因(Frolov 1993)。因此,除天然非结构蛋白和结构蛋白之外,还产生表达异源蛋白的额外亚基因组RNA。在这种系统中,存在用于产生感染性病毒粒子的所有元件,并且因此可能发生在非感染细胞中表达载体的反复轮感染。

[0443] 另一种表达载体设计利用辅助病毒系统(Pushko 1997)。在这种策略中,结构蛋白由异源基因代替。因此,在由仍完整的非结构基因介导病毒RNA的自我复制之后,26S亚基因组RNA提供异源蛋白的表达。传统上,表达结构蛋白的额外载体然后例如通过细胞系的共转染以反式供应,以产生感染性病毒。系统详细描述于USPN 8,093,021中,其出于所有目的通过引用整体并入本文。辅助载体系统提供限制形成感染性颗粒的可能性的益处,因此提高生物安全性。另外,辅助载体系统减小总载体长度,潜在提高复制和表达效率。因此,本文所述的抗原表达载体的实例可利用结构蛋白由抗原盒代替的甲病毒骨架,所得载体降低生物安全问题,同时由于整体表达载体尺寸减小而促进有效表达。

[0444] V.C.3.体外自扩增病毒产生

[0445] 本领域中熟知的用于产生RNA的便利技术是体外转录(IVT)。在这种技术中,首先通过本领域技术人员熟知的技术产生所需载体的DNA模板,包括标准分子生物学技术,例如克隆、限制性消化、连接、基因合成和聚合酶链反应(PCR)。

[0446] DNA模板在需要转录为RNA的序列的5'端含有一个RNA聚合酶启动子(例如SAM)。启动子包括但不限于噬菌体聚合酶启动子,例如T3、T7、K11或SP6。取决于所选的特定RNA聚合酶启动子序列,除了所需序列外,还可转录额外的5'核苷酸。例如,典型的T7启动子可用序列TAATACGACTCACTATAGG(SEQ ID NO:118)提及,其中使用DNA模板TAATACGACTCACTATAGGN(SEQ ID NO:119)用于产生所需序列N的IVT反应将产生mRNA序列GG-N。一般来说,并且不希

望受理论束缚,T7聚合酶更有效地转录以鸟苷开始的RNA转录物。在不具有额外的5'核苷酸(例如,不具有额外GG)的情况下,包含在DNA模板中的RNA聚合酶启动子可以是导致仅含有所需序列的5'核苷酸的转录物的序列,例如,具有SAM载体所源自的自我复制病毒的原生5'序列的SAM。例如,最小T7启动子可称为序列TAATACGACTCACTATA(SEQ ID NO:120),其中使用DNA模板TAATACGACTCACTATAN(SEQ ID NO:121)用于产生所需序列N的IVT反应将产生mRNA序列N。同样,由序列ATTTAGGTGACACTATA(SEQ ID NO:122)提及的最小SP6启动子可用于产生不具有额外5'核苷酸的转录物。在典型的IVT反应中,DNA模板与适当的RNA聚合酶、缓冲剂和核苷酸(NTP)一起孵育。

[0447] 所得的RNA多核苷酸可任选地进一步经修饰,包括但不限于添加5'帽结构,例如7-甲基鸟苷或相关结构,以及任选地修饰3'端以包括聚腺苷酸(聚A)尾。在改进的IVT反应中,通过在IVT期间添加帽类似物,RNA以5'帽结构共转录加帽。帽类似物可包括二核苷酸(m^7G-ppp-N)帽类似物或三核苷酸(m^7G-ppp-N-N)帽类似物,其中N表示核苷酸或经修饰的核苷酸(例如,核糖核苷,包括但不限于腺苷、鸟苷、胞苷和尿嘧啶)。示例性的帽类似物及其在IVT反应中的用途也更详细地描述于美国专利第10,519,189号中,其出于所有目的通过引用并入本文。如所讨论的,T7聚合酶更有效地转录以鸟苷开始的RNA转录物。为了提高不以鸟苷开始的模板中的转录效率,可使用三核苷酸帽类似物(m^7G-ppp-N-N)。三核苷酸帽类似物可相对于使用二核苷酸帽类似物(m^7G-ppp-N)的IVT反应提高转录效率2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20倍或更多倍。

[0448] 转录后也可添加5'帽结构,例如使用含有mRNA 2'-O-甲基转移酶和S-腺苷甲硫氨酸的牛痘加帽系统(例如,NEB目录号M2080)。

[0449] 所得的RNA多核苷酸可任选地与所述的加帽技术分开或除了所述加帽技术之外进行进一步修饰,包括但不限于修饰3'端以包括聚腺苷酸(聚A)尾。

[0450] RNA然后可使用本领域熟知的技术(例如苯酚-氯仿提取)纯化。

[0451] V.C.4.经由脂质纳米粒子递送

[0452] 在疫苗载体设计中考虑的一个重要方面是针对载体本身的免疫性(Riley 2017)。这可呈对载体本身(例如某些人类腺病毒系统)预先存在的免疫性形式,或呈在疫苗施用后对载体产生免疫性的形式。如果进行相同疫苗的多次施用(例如分开的初免和增强剂量),或者如果使用相同疫苗载体系统递送不同抗原盒,则后者是重要的考虑因素。

[0453] 在甲病毒载体的情况下,标准的传递方法是前面讨论的辅助病毒系统,其以反式提供衣壳、E1和E2蛋白以产生感染性病毒颗粒。然而,重要的是要注意E1和E2蛋白通常是中和抗体的主要靶标(Strauss1994)。因此,如果感染性颗粒被中和抗体靶向,则使用甲病毒载体将目标抗原递送至靶细胞的功效可能会降低。

[0454] 病毒颗粒介导的基因递送的替代方案是使用纳米材料递送表达载体(Riley 2017)。重要的是,纳米材料媒介物可由非免疫原性材料制成并且通常避免刺激对递送载体本身的免疫性。这些材料可包括(但不限于)脂质、无机纳米材料和其他聚合材料。脂质可为阳离子、阴离子或中性的。材料可为合成或天然来源的,并且在一些情况下是可生物降解的。脂质可包括脂肪、胆固醇、磷脂、脂质缀合物,包括(但不限于)聚乙二醇(PEG)缀合物(聚乙二醇化脂质)、蜡、油、甘油酯和脂溶性维生素。

[0455] 脂质纳米粒子(LNP)是有吸引力的递送系统,因为脂质的两亲性使得能够形成膜

和囊泡状结构(Riley 2017)。一般来说,这些囊泡通过吸收至靶细胞的膜中并且将核酸释放至细胞溶质中来递送表达载体。另外,LNP可经进一步修饰或官能化以有助于靶向特定细胞类型。LNP设计中的另一个考虑因素是靶向效率与细胞毒性之间的平衡。脂质组合物一般包括阳离子、中性、阴离子和两性脂质的限定混合物。在一些情况下,包括特定脂质以防止LNP聚集、防止脂质氧化、或提供有助于额外部分附着的功能性化学基团。脂质组合物可影响整体LNP大小和稳定性。在一个实例中,脂质组合物包含二亚油基甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(MC3)和MC3样分子。MC3和MC3样脂质组合物可经配制以包括一种或多种其他脂质,例如PEG或PEG缀合的脂质、固醇或中性脂质。

[0456] 直接暴露于血清的核酸载体(例如表达载体)可具有数种不期望的结果,包括核酸由血清核酸酶降解或游离核酸对免疫系统的脱靶刺激。因此,包封甲病毒载体可用于避免降解,同时还避免潜在的脱靶影响。在某些实例中,甲病毒载体完全包封在递送媒介物内,例如在LNP的含水内部。甲病毒载体包封在LNP内可通过本领域技术人员熟知的技术来进行,例如在微流体液滴生成装置上进行的微流体混合和液滴生成。此类装置包括(但不限于)标准T形接头装置或流动聚焦装置。在一个实例中,所需脂质制剂(例如含有MC3或MC3样的组合物)与甲病毒递送载体和其他所需药剂并行提供至液滴生成装置,使得递送载体和所需药剂完全包封在基于MC3或MC3样的LNP内部。在一个实例中,液滴生成装置可控制所产生的LNP的尺寸范围和尺寸分布。例如,LNP的尺寸可在1至1000纳米直径范围内,例如1、10、50、100、500或1000纳米。在液滴生成后,包封表达载体的递送媒介物可经进一步处理或修饰以使其准备用于施用。

[0457] V.D.黑猩猩腺病毒(ChAd)

[0458] V.D.1.用黑猩猩腺病毒进行的病毒递送

[0459] 用于递送一种或多种抗原的疫苗组合物(例如,经由抗原盒)可通过提供黑猩猩来源的腺病毒核苷酸序列、多种新颖载体和表达黑猩猩腺病毒基因的细胞系来产生。黑猩猩C68腺病毒(在本文中也称为ChAdV68)的核苷酸序列可用于抗原递送的疫苗组合物中(参见SEQ ID NO:1)。源自C68腺病毒的载体的使用进一步详细描述于USPN 6,083,716中,其出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0460] 在另一方面,本文提供了包含黑猩猩腺病毒的DNA序列的重组腺病毒(例如C68)和以操作方式连接到引导其表达的调控序列的抗原盒。重组病毒能够感染哺乳动物细胞、优选人类细胞,并且能够在细胞中表达抗原盒产物。在这种载体中,原生黑猩猩E1基因和/或E3基因和/或E4基因可缺失。抗原盒可插入至这些基因缺失位点中的任一者中。抗原盒可包括抗原,针对其引发的免疫应答是所需的。

[0461] 在另一方面,本文提供了一种经黑猩猩腺病毒(例如C68)感染的哺乳动物细胞。

[0462] 在另一方面,提供了一种新颖的哺乳动物细胞系,其表达黑猩猩腺病毒基因(例如来自C68)或其功能片段。

[0463] 在另一方面,本文提供了一种用于将抗原盒递送至哺乳动物细胞中的方法,其包括以下步骤:向细胞中引入有效量的已被工程化以表达抗原盒的黑猩猩腺病毒,例如C68。

[0464] 另一方面提供了一种用于在哺乳动物宿主中刺激免疫应答的方法。所述方法可包括向宿主施用有效量的重组黑猩猩腺病毒,例如C68的步骤,所述重组黑猩猩腺病毒包含抗原盒,所述抗原盒编码免疫应答所针对的感染的一种或多种抗原。

[0465] 另一方面提供了一种用于在哺乳动物宿主中刺激免疫应答以治疗或预防受试者疾病例如感染性疾病的方法。所述方法可包括向宿主施用有效量的重组黑猩猩腺病毒例如C68的步骤，所述重组黑猩猩腺病毒包含抗原盒，所述抗原盒编码例如来自免疫应答所针对的感染性疾病的一种或多种抗原。

[0466] 还公开了一种非猿猴哺乳动物细胞，其表达获自SEQ ID NO:1序列的黑猩猩腺病毒基因。所述基因可选自由以下组成的组：SEQ ID NO:1的腺病毒E1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4、L1、L2、L3、L4和L5。

[0467] 还公开了一种包含黑猩猩腺病毒DNA序列的核酸分子，所述黑猩猩腺病毒DNA序列包含获自SEQ ID NO:1序列的基因。所述基因可选自由以下组成的组：SEQ ID NO:1的所述黑猩猩腺病毒E1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4、L1、L2、L3、L4和L5基因。在一些方面，核酸分子包含SEQ ID NO:1。在一些方面，核酸分子包含SEQ ID NO:1序列，缺少选自由以下组成的组的至少一个基因：SEQ ID NO:1的E1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4、L1、L2、L3、L4和L5基因。

[0468] 还公开了一种载体，其包含获自SEQ ID NO:1的黑猩猩腺病毒DNA序列和可操作地连接到一个或多个调控序列的抗原盒，所述一个或多个调控序列引导所述盒在异源宿主细胞中的表达，任选地其中所述黑猩猩腺病毒DNA序列包含至少用于复制和病毒粒子衣壳化所必需的顺式元件，所述顺式元件侧接抗原盒和调控序列。在一些方面，黑猩猩腺病毒DNA序列包含选自由以下组成的组的基因：SEQ ID NO:1的E1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4、L1、L2、L3、L4和L5基因序列。在一些方面，载体可缺乏E1A和/或E1B基因。

[0469] 本文还公开了一种腺病毒载体，其包含：部分缺失的E4基因，其包含缺失或部分缺失的E4orf2区和缺失或部分缺失的E4orf3区，以及任选地缺失或部分缺失的E4orf4区。所述部分缺失的E4可包含SEQ ID NO:1所示序列的至少34,916至35,642位核苷酸的E4缺失，并且其中所述载体包含以SEQ ID NO:1所示序列的至少2至36,518位核苷酸。所述部分缺失的E4可包含SEQ ID NO:1所示序列的34,916至34,942位核苷酸的至少部分缺失、SEQ ID NO:1所示序列的34,952至35,305位核苷酸的至少部分缺失和SEQ ID NO:1所示序列的35,302至35,642位核苷酸的至少部分缺失的E4缺失，并且其中所述载体包含以SEQ ID NO:1所示序列的至少2至36,518位核苷酸。所述部分缺失的E4可包含SEQ ID NO:1所示序列的至少34,980至36,516位核苷酸的E4缺失，并且其中所述载体包含以SEQ ID NO:1所示序列的至少2至36,518位核苷酸。所述部分缺失的E4可包含SEQ ID NO:1所示序列的至少34,979至35,642位核苷酸的E4缺失，并且其中所述载体包含SEQ ID NO:1所示序列的至少2至36,518位核苷酸。所述部分缺失的E4可包含至少部分缺失E4Orf2、完全缺失E4Orf3和至少部分缺失E4Orf4的E4缺失。所述部分缺失的E4可包含至少部分缺失E4Orf2、至少部分缺失E4Orf3和至少部分缺失E4Orf4的E4缺失。所述部分缺失的E4可包含至少部分缺失E4Orf1、完全缺失E4Orf2和至少部分缺失E4Orf3的E4缺失。所述部分缺失的E4可包含至少部分缺失E4Orf2和至少部分缺失E4Orf3的E4缺失。所述部分缺失的E4可包含E4Orf1的起始位点与E4Orf5的起始位点之间的E4缺失。所述部分缺失的E4可以是与E4Orf1的起始位点相邻的E4缺失。所述部分缺失的E4可以是与E4Orf2的起始位点相邻的E4缺失。所述部分缺失的E4可以是与E4Orf3的起始位点相邻的E4缺失。所述部分缺失的E4可以是与E4Orf4的起始位点相邻的E4缺失。所述E4缺失可以是至少50、至少100、至少200、至少300、至少400、至少500、至少600、至少700、至少800、至少900、至少1000、至少1100、至少1200、至少1300、至少1400、至少

1500、至少1600、至少1700、至少1800、至少1900或至少2000个核苷酸。所述E4缺失可以是至少700个核苷酸。所述E4缺失可以是至少1500个核苷酸。所述E4缺失可以是50个或更少、100个或更少、200个或更少、300个或更少、400个或更少、500个或更少、600个或更少、700个或更少、800个或更少、900个或更少、1000个或更少、1100个或更少、1200个或更少、1300个或更少、1400个或更少、1500个或更少、1600个或更少、1700个或更少、1800个或更少、1900个或更少、或2000或更少的核苷酸。所述E4缺失可以是750个核苷酸或更少。所述E4缺失可以是至少1550个核苷酸或更少。

[0470] 本文还公开了一种用本文公开的载体转染的宿主细胞，所述载体例如被工程化以表达抗原盒的C68载体。本文还公开了一种经由将本文公开的载体引入细胞中而表达其中引入的所选择基因的人类细胞。

[0471] 本文还公开了一种用于将抗原盒递送至哺乳动物细胞的方法，所述方法包括向所述细胞中引入有效量的本文公开的载体，例如被工程化以表达抗原盒的C68载体。

[0472] 本文还公开了一种用于产生抗原的方法，所述方法包括将本文公开的载体引入哺乳动物细胞中，在合适的条件下培养细胞并产生抗原。

[0473] V.D.2.表达E1的互补细胞系

[0474] 为了产生缺失本文所述的基因中的任一者的重组黑猩猩腺病毒(Ad)，缺失基因区的功能如果对于病毒的复制和感染性必不可少，则可通过辅助病毒或细胞系(即互补或包装细胞系)供应至重组病毒。例如，为了产生复制缺陷型黑猩猩腺病毒载体，可使用表达人类或黑猩猩腺病毒的E1基因产物的细胞系；这种细胞系可包括HEK293或其变体。可遵循产生表达黑猩猩E1基因产物的细胞系的方案(USPN 6,083,716的实施例3和4)，以产生表达任何所选择的黑猩猩腺病毒基因的细胞系。

[0475] AAV增强测定可用于鉴定表达黑猩猩腺病毒E1的细胞系。这种测定可用于鉴定通过使用例如来自其他物种的其他未表征的腺病毒的E1基因制备的细胞系中的E1功能。所述测定描述于USPN 6,083,716的实施例4B中。

[0476] 所选择的黑猩猩腺病毒基因(例如E1)可在启动子的转录控制下用于在所选择的亲本细胞系中表达。诱导型或组成型启动子可用于此目的。在诱导型启动子中包括可由锌诱导的绵羊金属硫蛋白启动子，或可由糖皮质激素、特别是地塞米松(dexamethasone)诱导的小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子。其他诱导型启动子，例如通过引用并入本文的国际专利申请WO95/13392中所鉴定的那些诱导型启动子，还可用于产生包装细胞系。还可采用控制黑猩猩腺病毒基因表达的组成型启动子。

[0477] 亲本细胞可经选择以产生表达任何所需C68基因的新颖细胞系。此类亲本细胞系可为(但不限于)HeLa[ATCC登录号CCL 2]、A549[ATCC登录号CCL 185]、KB[CCL 17]、Detroit[例如Detroit 510、CCL 72]和WI-38[CCL 75]细胞。其他合适的亲本细胞系可获自其他来源。亲本细胞系可包括CHO、HEK293或其变体、911、HeLa、A549、LP-293、PER.C6或AE1-2a。

[0478] 表达E1的细胞系可用于产生重组黑猩猩腺病毒E1缺失的载体。使用基本上相同的程序构建的表达一种或多种其他黑猩猩腺病毒基因产物的细胞系用于产生缺失编码那些产物的基因的重组黑猩猩腺病毒载体。另外，表达其他人类Ad E1基因产物的细胞系还可用于产生黑猩猩重组Ad。

[0479] V.D.3.作为载体的重组病毒颗粒

[0480] 本文公开的组合物可包含病毒载体,其将至少一种抗原递送至细胞。此类载体包含黑猩猩腺病毒DNA序列(例如C68)和可操作地连接到引导盒表达的调控序列的抗原盒。C68载体能够在经感染的哺乳动物细胞中表达盒。C68载体可功能性缺失一个或多个病毒基因。抗原盒包含至少一个在一个或多个调控序列(例如启动子)控制下的抗原。任选的辅助病毒和/或包装细胞系可向黑猩猩病毒载体供应缺失的腺病毒基因的任何必需产物。

[0481] 术语“功能性缺失”意指去除或以其他方式改变(例如通过突变或修饰)足够量的基因区,使得基因区不再能够产生一种或多种基因表达的功能性产物。可导致功能性缺失的突变或修饰包括但不限于无义突变,例如引入提前终止密码子和去除典型和非典型的起始密码子,改变mRNA剪接或其他转录加工的突变,或其组合。如果需要,可去除整个基因区。

[0482] 形成本文公开的载体的核酸序列的修饰,包括序列缺失、插入和其他突变,可使用标准分子生物学技术产生并且在本发明的范围内。

[0483] V.D.4.病毒质粒载体的构建

[0484] 可用于本发明的黑猩猩腺病毒C68载体包括重组缺陷型腺病毒,即在E1a或E1b基因中功能性缺失并且任选地携带其他突变(例如其他基因中的温度敏感性突变或缺失)的黑猩猩腺病毒序列。预期这些黑猩猩序列也可用于形成来自其他腺病毒和/或腺相关病毒序列的杂交载体。由人类腺病毒制备的同源腺病毒载体描述于公开文献中[参见例如上文所引用的Kozarsky I和II,和其中引用的参考文献,美国专利第5,240,846号]。

[0485] 在构建可用于将抗原盒递送至人类(或其他哺乳动物)细胞的有用黑猩猩腺病毒C68载体时,可将一系列腺病毒核酸序列用于载体。包含最小黑猩猩C68腺病毒序列的载体可与辅助病毒结合使用以产生感染性重组病毒颗粒。辅助病毒提供最小黑猩猩腺病毒载体的病毒感染性和繁殖所需的基本基因产物。当在另外的功能性病毒载体中仅产生黑猩猩腺病毒基因的一个或多个所选择的缺失时,可通过在所选择的包装细胞系中繁殖病毒而在病毒载体生产过程中供应缺失的基因产物,所述包装细胞系提供反式缺失的基因功能。

[0486] V.D.5.重组最小腺病毒

[0487] 最小的黑猩猩Ad C68病毒是仅含有复制和病毒粒子衣壳化所必需的腺病毒顺式元件的病毒颗粒。也就是说,载体含有腺病毒的顺式作用5’和3’反向末端重复序列(ITR)序列(其充当复制起点)和原生5’包装/增强子结构域(其含有用于包装线性Ad基因组所必需的序列和E1启动子的增强子元件)。参见例如在国际专利申请WO96/13597中所描述并通过引用并入本文的用于制备“最小”人类Ad载体的技术。

[0488] V.D.6.其他缺陷型腺病毒

[0489] 重组复制缺陷型腺病毒也可比最小黑猩猩腺病毒序列含有更多。这些其他Ad载体可通过病毒基因区的各个部分的缺失和通过任选地使用辅助病毒和/或包装细胞系形成的感染性病毒颗粒来表征。

[0490] 作为一个实例,合适的载体可通过使C68腺病毒立即早期基因E1a和延迟早期基因E1b的全部或足够部分缺失来形成,从而消除其正常的生物功能。当在含有提供相应反式基因产物的功能性腺病毒E1a和E1b基因的黑猩猩腺病毒转化的互补细胞系上生长时,复制缺陷型E1缺失病毒能够复制并产生感染性病毒。基于已知腺病毒序列的同源性,预期正如本领域的人类重组E1缺失腺病毒,所得重组黑猩猩腺病毒能够感染许多细胞类型并且可表达

抗原,但除非以极高感染倍率感染细胞,否则无法在不携带黑猩猩E1区DNA的大多数细胞中复制。

[0491] 作为另一个实例,C68腺病毒延迟早期基因E3的全部或一部分可从形成重组病毒的一部分的黑猩猩腺病毒序列消除。

[0492] 还可构建具有E4基因缺失的黑猩猩腺病毒C68载体。另一个载体可在延迟早期基因E2a中含有缺失。

[0493] 还可在黑猩猩C68腺病毒基因组的晚期基因L1至L5中的任一者中获得缺失。类似地,中间基因IX和IVa2中的缺失可用于一些目的。可在其他结构性或非结构性腺病毒基因中获得其他缺失。

[0494] 上述缺失可单独使用,即腺病毒序列可仅含有E1缺失。或者,可以任何组合使用有效破坏或降低其生物活性的完整基因或其部分的缺失。例如,在一个示例性载体中,腺病毒C68序列可缺失E1基因和E4基因,或缺失E1、E2a和E3基因,或缺失E1和E3基因,或在缺失或不缺失E3的情况下缺失E1、E2a和E4基因等等。如上文所论述,此类缺失可与其他突变(例如温度敏感性突变)组合使用,以达到所需结果。

[0495] 包含一种或多种抗原的盒任选地插入至黑猩猩C68 Ad病毒的任何缺失区中。或者,如果需要,可将盒插入至现有基因区中以破坏所述区的功能。

[0496] V.D.7.辅助病毒

[0497] 取决于用于携带抗原盒的病毒载体的黑猩猩腺病毒基因含量,可使用辅助腺病毒或非复制性病毒片段来提供足够的黑猩猩腺病毒基因序列以产生含有所述盒的感染性重组病毒颗粒。

[0498] 有用的辅助病毒含有所选择的腺病毒基因序列,其不存在于腺病毒载体构建体中和/或不由载体转染的包装细胞系表达。辅助病毒可为复制缺陷型并且除上述序列之外,还含有多种腺病毒基因。辅助病毒可与本文所述的表达E1的细胞系组合使用。

[0499] 对于C68,“辅助”病毒可为通过用SspI剪切C68基因组的C末端形成的片段,其从病毒的左端去除约1300bp。这种经剪切的病毒然后与质粒DNA共转染至表达E1的细胞系中,由此通过与质粒中的C68序列同源重组形成重组病毒。

[0500] 辅助病毒还可形成聚阳离子缀合物,如Wu等人,J.Biol.Chem.,264:16985-16987(1989);K.J.Fisher和J.M.Wilson,Biochem.J.,299:49(1994年4月1日)中所述。辅助病毒可任选地含有报告子。许多此类报告子是本领域已知的。与腺病毒载体上的抗原盒不同,辅助病毒上报告子的存在允许独立地监测Ad载体和辅助病毒。这种第二报告子用于纯化后能够将所得重组病毒与辅助病毒分离。

[0501] V.D.8.病毒颗粒的组装和细胞系的感染

[0502] 将腺病毒的经选择DNA序列、抗原盒和其他载体元件组装于各种中间质粒和穿梭载体中,以及使用质粒和载体制造重组病毒颗粒均可使用常规技术实现。此类技术包括cDNA的常规克隆技术、体外重组技术(例如吉布森组装(Gibson assembly))、腺病毒基因组的重叠寡核苷酸序列的使用、聚合酶链反应和提供所需核苷酸序列的任何合适的方法。采用标准转染和共转染技术,例如CaPO4沉淀技术或脂质体介导的转染方法,例如脂染胺。所采用的其他常规方法包括病毒基因组的同源重组、琼脂覆层中病毒的蚀斑、测量信号产生的方法等。

[0503] 例如,在构建和组装所需含抗原盒的病毒载体之后,可在辅助病毒存在下将载体转染于包装细胞系中。同源重组发生在辅助序列与载体序列之间,其允许载体中的腺病毒-抗原序列被复制并包装至病毒粒子衣壳中,从而产生重组病毒载体颗粒。

[0504] 所得重组黑猩猩C68腺病毒可用于将抗原盒转移至所选择的细胞中。在使用包装细胞系中生长的重组病毒的体内实验中,E1缺失的重组黑猩猩腺病毒在将盒转移至非黑猩猩(优选人类)细胞中展现效用。

[0505] V.D.9.重组病毒载体的用途

[0506] 所得含有抗原盒(如上所述,通过腺病毒载体和辅助病毒或腺病毒载体和包装细胞系的合作产生)的重组黑猩猩C68腺病毒因此提供可在体内或离体将一种或多种抗原递送至受试者的有效基因转移媒介物。

[0507] 上述重组载体根据基因疗法的公开方法施用于人类。携带抗原盒的黑猩猩病毒载体可施用于患者,优选悬浮于生物相容性溶液或药学上可接受的递送媒介物中。合适的媒介物包括无菌盐水。已知为药学上可接受的载剂并且为本领域技术人员所熟知的其他水性和非水性等渗无菌注射溶液以及水性和非水性无菌悬浮液可用于此目的。

[0508] 黑猩猩腺病毒载体是以足以转导人类细胞并提供足够水平的抗原转移和表达的量施用,从而提供治疗益处而无过度不良效应或具有医学上可接受的生理效应,其可由医药领域的技术人员来确定。常规和药学上可接受的施用途径包括(但不限于)直接递送至肝脏、鼻内、静脉内、肌肉内、皮下、皮内、口服和其他肠胃外施用途径。如果需要,可组合施用途径。

[0509] 病毒载体的剂量将主要取决于以下因素,例如所治疗的疾患、患者的年龄、体重和健康状况,并且因此可在患者当中变化。剂量将经调节以平衡治疗益处与任何副作用,并且此类剂量可根据采用重组载体的治疗应用而变化。可监测抗原表达水平以确定剂量施用频率。

[0510] 重组复制缺陷型腺病毒可以“药学有效量”施用,即在施用途径中有效转染所需细胞并提供所选择的基因的足够表达水平以提供疫苗益处(即一些可测量的保护性免疫水平)的重组腺病毒的量。包含抗原盒的C68载体可与佐剂共同施用。佐剂可与载体分开(例如明矾)或在载体内编码,特别是在佐剂为蛋白质时。佐剂是本领域中所熟知的。

[0511] 常规且药学上可接受的施用途径包括(但不限于)鼻内、肌肉内、气管内、皮下、皮内、经直肠、口服和其他肠胃外施用途径。如果需要,可组合或调整施用途径,取决于免疫原或疾病。例如,在狂犬病预防中,皮下、气管内和鼻内途径是优选的。施用途径主要将取决于所治疗的疾病的性质。

[0512] 可监测对抗原的免疫水平以确定是否需要加强剂。例如,在评估血清中的抗体滴度后,可能需要任选的加强免疫。

[0513] VI.治疗和制造方法

[0514] 还提供了一种在受试者中诱导感染性疾病生物体特异性(例如SARS-CoV-2特异性)免疫应答、针对感染性疾病生物体进行疫苗接种、通过向受试者施用一种或多种抗原(例如使用本文公开的方法鉴定的多种抗原)来治疗和/或减轻与感染性疾病生物体相关的感染症状的方法。

[0515] 在一些方面,受试者已被诊断患有感染或处于感染(例如由于SARS-CoV-2感染的

Covid-19)风险中,例如年龄、地理/旅行和/或工作相关的感染风险或易感性增加,或处于季节性和/或新型疾病感染风险中。

[0516] 可以足以刺激CTL应答的量施用抗原。可以足以刺激T细胞应答的量施用抗原。可以足以刺激B细胞应答的量施用抗原。

[0517] 抗原可以单独施用或与其他治疗剂组合施用。治疗剂可包括靶向感染性疾病生物体的那些,例如抗病毒剂或抗生素剂。

[0518] 可确定疫苗组合物中每种抗原的最佳量和最佳给药方案。例如,抗原或其变体可制备用于静脉内(i.v.)注射、皮下(s.c.)注射、皮内(i.d.)注射、腹膜内(i.p.)注射、肌肉内(i.m.)注射。注射方法包括s.c.、i.d.、i.p.、i.m.和i.v.。DNA或RNA注射方法包括i.d.、i.m.、s.c.、i.p.和i.v.。其他施用疫苗组合物的方法是本领域技术人员已知的。

[0519] 可对疫苗进行编译,使得组合物中存在的抗原的选择、数目和/或量具组织、感染性疾病和/或患者特异性。例如,肽的精确选择可由给定组织中亲本蛋白的表达模式指导,或者由患者的突变或疾病状态指导。选择可取决于特定的感染性疾病(例如,受试者感染或有感染风险的特定SARS-CoV-2分离株)、疾病状态、疫苗接种的目标(例如,预防性或针对正在进行的疾病)、早期治疗方案、患者的免疫状态,当然还有患者的HLA单倍型。此外,根据特定患者的个人需要,疫苗可含有个性化组分。实施例包括根据特定患者中抗原的表达来改变抗原的选择或在第一轮或治疗方案之后调整二次治疗。

[0520] 通过使用各种诊断方法,例如下文进一步描述的患者选择方法,可鉴定患者是否施用抗原疫苗。患者选择可涉及鉴定一种或多种基因的突变或表达模式。患者选择可涉及鉴定正在进行的感染的感染性疾病(例如存在SARS-CoV-2感染和/或特定SARS-CoV-2分离株)。患者选择可涉及鉴定感染性疾病感染的风险。在一些情况下,患者选择涉及鉴定患者的单倍型。可并行执行各种患者选择方法,例如,测序诊断可鉴定患者的突变和单倍型。各种患者选择方法可按顺序进行,例如,一种诊断测试鉴定突变并且另一种诊断测试鉴定患者的单倍型,并且其中每个测试可以相同(例如,高通量测序)或不同(例如,一种高通量测序和另一种Sanger测序)诊断方法。

[0521] 对于用作感染性疾病疫苗的组合物,在本文所述的组合物中可避免或以低量存在在正常组织中大量表达的具有类似正常自身肽的抗原。另一方面,如果已知患者的受感染细胞表达大量的某种抗原,则用于治疗这种感染的相应药物组合物可以大量存在和/或可包括多于一种对这种特定抗原或这种抗原途径具特异性的抗原。

[0522] 可将包含抗原的组合物施用于已经患有感染的个体。在治疗性应用中,将组合物以足以刺激对感染性疾病生物体抗原的有效CTL应答并治愈或至少部分阻遏症状和/或并发症的量施用于患者。足以实现这一点的量被定义为“治疗有效剂量”。对该用途有效的量将取决于例如组合物、施用方式、所治疗疾病的阶段和严重程度、患者的体重和一般健康状况以及处方医生的判断。应记住,组合物通常可用于严重疾病状态,即危及生命或可能危及生命的情况,尤其是当感染性疾病生物体已诱发器官损伤和/或其他免疫病理学时。在这些情况下,鉴于外来物质的最小化和抗原的相对无毒性质,主治医师可以并且认为需要施用实质过量的这些组合物。

[0523] 对于治疗用途,可在检测或治疗感染时开始施用。这之后可为加强剂量直到至少症状基本上减轻并且持续此后一段时间。

[0524] 用于治疗性治疗的药物组合物(例如疫苗组合物)旨在用于肠胃外、局部、经鼻、口服或局部施用。药物组合物可经肠胃外施用,例如静脉内、皮下、皮内或肌肉内施用。可施用组合物以靶向受试者的特定感染组织和/或细胞。本文公开了用于肠胃外施用的组合物,其包含抗原溶液,并且将疫苗组合物溶解或悬浮在可接受的载剂例如水性载剂中。可使用多种水性载剂,例如水、缓冲水、0.9%生理食盐水、0.3%甘氨酸、透明质酸等。这些组合物可通过常规的熟知灭菌技术灭菌,或者可经无菌过滤。所得水溶液可以原样包装使用,或冻干,冻干制剂在施用之前与无菌溶液组合。组合物可根据需要含有药学上可接受的辅助物质以接近生理条件,例如pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂、润湿剂等,例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、脱水山梨糖醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯等。

[0525] 抗原也可经由脂质体施用,脂质体将它们靶向特定的细胞组织,例如淋巴组织。脂质体也可用于增加半衰期。脂质体包括乳液、发泡体、胶束、不溶性单层、液晶、磷脂分散体、层状层等。在这些制剂中,待递送的抗原作为脂质体的一部分被并入,单独或联合与结合于例如淋巴样细胞中普遍存在的受体的分子,例如结合于CD45抗原的单克隆抗体,或联合其他治疗性或免疫原性组合物。因此,可将填充有所需抗原的脂质体导向淋巴样细胞的部位,然后所述脂质体在该部位递送选定的治疗性/免疫原性组合物。脂质体可由标准的囊泡形成脂质形成,其通常包括中性和带负电荷的磷脂和固醇,例如胆固醇。脂质的选择通常通过考虑例如脂质体大小、酸不稳定性和脂质体在血流中的稳定性来指导。多种方法可用于制备脂质体,如例如Szoka等人,Ann.Rev.Biophys.Bioeng.9;467(1980),美国专利第4,235,871号、第4,501,728号、第4,501,728号、第4,837,028号和第5,019,369号中所述。

[0526] 为了靶向免疫细胞,要并入脂质体中的配体可包括例如对所需免疫系统细胞的细胞表面决定簇特异的抗体或其片段。脂质体悬浮液可以静脉内、局部等施用,其剂量尤其根据施用方式、所递送的肽和所治疗疾病的阶段而变化。

[0527] 出于治疗或免疫目的,编码肽和任选地一种或多种本文所述肽的核酸也可施用于患者。许多方法可方便地用于将核酸递送至患者。例如,核酸可作为“裸DNA”直接递送。例如在Wolff等人,Science 247:1465-1468(1990)以及美国专利第5,580,859号和第5,589,466号中描述了这种方法。核酸也可使用弹道递送来施用,如例如美国专利第5,204,253号中所述。可施用仅由DNA组成的粒子。或者,可将DNA粘附到粒子例如金粒子上。用于递送核酸序列的方法可包括带有或不带有电穿孔的病毒载体、mRNA载体和DNA载体。

[0528] 还可将核酸与阳离子化合物例如阳离子脂质复合递送。脂质介导的基因递送方法描述于例如9618372WOAWO 96/18372;9324640WOAWO 93/24640;Mannino和Gould-Fogerite,BioTechniques 6(7):682-691(1988);美国专利第5,279,833号Rose美国专利第5,279,833号;9106309WOAWO 91/06309;和Felgner等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:7413-7414(1987)。

[0529] 抗原还可包括在基于病毒载体的疫苗平台中,例如牛痘、禽痘、自我复制甲病毒、马拉巴病毒、腺病毒(参见例如Tatsis等人,Adenoviruses,Molecular Therapy(2004)10,616-629)或慢病毒,包括(但不限于)第二、第三或杂交第二/第三代慢病毒和任一代的重组慢病毒,其设计成靶向特定细胞类型或受体(参见例如Hu等人,Immunization Delivered by Lentiviral Vectors for Cancer and Infectious Diseases,Immunol Rev.(2011)239(1):45-61;Sakuma等人,Lentiviral vectors:basic to translational,Biochem J.

(2012)443(3):603-18;Cooper等人,Rescue of splicing-mediated intron loss maximizes expression in lentiviral vectors containing the human ubiquitin C promoter,Nucl.Acids Res.(2015)43(1):682-690;Zufferey等人,Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient In Vivo Gene Delivery,J.Virol.(1998)72(12):9873-9880)。取决于上述基于病毒载体的疫苗平台的包装能力,这种方法可递送编码一种或多种抗原肽的一种或多种核苷酸序列。序列可侧接非突变序列,可由接头分开或者可在前面有一种或多种靶向亚细胞区室的序列(参见例如Gros等人,Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients,Nat Med.(2016)22(4):433-8;Stronen等人,Targeting of cancer neoantigens with donor-derived T cell receptor repertoires,Science.(2016)352(6291):1337-41;Lu等人,Efficient identification of mutated cancer antigens recognized by T cells associated with durable tumor regressions,Clin Cancer Res.(2014)20(13):3401-10)。在引入宿主中后,受感染细胞表达抗原,从而刺激针对一种或多种肽的宿主免疫(例如CTL)应答。可用于免疫方案中的牛痘载体和方法描述于例如美国专利第4,722,848号中。另一种载体是卡介苗(Bacille Calmet te Guerin,BCG)。BCG载体描述于Stover等人(Nature 351:456-460(1991))中。根据本文描述,可用于抗原的治疗性施用或免疫接种的各种其他疫苗载体,例如伤寒沙门氏菌载体等,对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0530] 一种施用核酸的方法使用编码一个或多个表位的微型基因构建体。为了创建编码所选CTL表位(微型基因)以在人类细胞中表达的DNA序列,将表位的氨基酸序列进行反向翻译。人类密码子使用表用于指导每个氨基酸的密码子选择。这些表位编码DNA序列直接相连,形成一个连续的多肽序列。为了优化表达和/或免疫原性,可在微型基因设计中并入额外的元件。可反向翻译并包括在微型基因序列中的氨基酸序列的实例包括:辅助T淋巴细胞、表位、前导(信号)序列和内质网保留信号。此外,可通过包括与CTL表位相邻的合成(例如聚丙氨酸)或天然存在的侧翼序列来改进CTL表位的MHC呈递。通过组装编码微型基因正链和负链的寡核苷酸,将微型基因序列转化为DNA。使用熟知技术在适当的条件下合成、磷酸化、纯化和退火重叠的寡核苷酸(30-100个碱基长)。使用T4 DNA连接酶连接寡核苷酸的末端。然后可将这种编码CTL表位多肽的合成微型基因克隆到所需的表达载体中。

[0531] 纯化的质粒DNA可使用多种配方制备用于注射。其中最简单的是在无菌磷酸盐缓冲盐水(PBS)中重建冻干DNA。已经描述了多种方法,并且可使用新技术。如上所述,核酸方便地与阳离子脂质一起配制。此外,糖脂、融合脂质体、肽和统称为保护性、相互作用、非缩合(PINC)的化合物也可与纯化的质粒DNA复合,以影响例如稳定性、肌肉内分散或运输到特定器官或细胞类型的变量。

[0532] 还公开了一种制造疫苗的方法,所述方法包括执行本文公开的方法的步骤;以及生产包含多种抗原或多种抗原子集的疫苗。

[0533] 本文公开的抗原可使用本领域已知的方法制造。例如,本文公开的产生抗原或载体(例如,包括至少一种编码一种或多种抗原的序列的载体)的方法可包括在适合表达抗原或载体的条件下培养宿主细胞,其中所述宿主细胞包含至少一种编码抗原或载体的多核苷酸,并纯化所述抗原或载体。标准纯化方法包括色谱技术、电泳、免疫学、沉淀、透析、过滤、

浓缩和色谱聚焦技术。

[0534] 宿主细胞可包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NS0细胞、酵母或HEK293细胞。宿主细胞可用一种或多种多核苷酸转化，所述多核苷酸包含至少一种编码本文公开的抗原或载体的核酸序列，任选地其中经分离的多核苷酸还包含可操作地连接到至少一种编码所述抗原或载体的核酸序列的启动子序列。在某些实施方案中，经分离的多核苷酸可为cDNA。

[0535] VII.抗原使用和施用

[0536] 疫苗接种方案可用于向受试者施用一种或多种抗原。可使用初免疫苗和加强疫苗对受试者进行给药。

[0537] 免疫监测可在疫苗施用之前、期间和/或之后进行。这种监测可告知安全性和功效以及其他参数。

[0538] 为了进行免疫监测，通常使用PBMC。PBMC可在初免疫苗接种之前和在初免疫苗接种之后(例如4周和8周)分离。PBMC可在即将加强疫苗接种之前和在每次加强疫苗接种之后(例如4周和8周)收集。

[0539] T细胞应答可作为免疫监测方案的一部分进行评估。例如，可监测和/或评估本文所述的疫苗组合物刺激免疫应答的能力。如本文所用，“刺激免疫应答”是指免疫应答的任何增加，例如引发免疫应答(例如，在未接受过治疗的受试者中刺激引发免疫应答的初免疫苗)或增强免疫应答(例如，在对抗原具有预先存在的免疫应答，例如由初免疫苗引发的预先存在的免疫应答的受试者中刺激免疫应答增强的加强疫苗)。可使用本领域中已知的一种或多种方法测量T细胞应答，例如ELISpot、细胞内细胞因子染色、细胞因子分泌和细胞表面捕捉、T细胞增殖、MHC多聚体染色或通过细胞毒性测定。针对疫苗中编码的表位的T细胞应答可通过使用ELISpot测定来测量细胞因子(例如IFN-γ)的诱导而从PBMC监测。针对疫苗中编码的表位的特异性CD4或CD8 T细胞应答可通过使用流式细胞术测量胞内或胞外捕捉的细胞因子(例如IFN-γ)的诱导而从PBMC监测。针对疫苗中编码的表位的特异性CD4或CD8 T细胞应答可通过使用MHC多聚体染色测量表达特异性针对表位/MHC I类复合物的T细胞受体的T细胞群体而从PBMC监测。针对疫苗中编码的表位的特异性CD4或CD8 T细胞应答可通过在3H-胸苷、溴脱氧尿苷和羧基荧光素-二乙酸酯-琥珀酰亚胺酯(CFSE)并入后测量T细胞群的离体扩增而从PBMC监测。特异性针对疫苗中编码的表位的源自PBMC的T细胞的抗原识别能力和溶解活性可通过铬释放测定或替代性比色细胞毒性测定来功能性评估。

[0540] B细胞应答可使用本领域已知的一种或多种方法测量，例如用于确定B细胞分化(例如，分化为浆细胞)、B细胞或浆细胞增殖、B细胞或浆细胞活化(例如，共刺激标志物如CD80或CD86的上调)、抗体类别转换和/或抗体产生(例如，ELISA)的测定法。

[0541] VIII.HLA肽的分离和检测

[0542] 在组织样品裂解和溶解后，使用经典的免疫沉淀(IP)方法进行HLA-肽分子的分离(55-58)。实施例和方法更详细地描述于国际专利申请公开WO/2018/208856中，其出于所有目的通过引用并入本文。

[0543] IX.呈递模型

[0544] 呈递模型可用于鉴定在患者中肽呈递的可能性。本领域技术人员已知各种呈递模型，例如在美国专利第10,055,540号、美国申请公开第US20200010849A1号和第US20110293637号以及国际专利申请公开WO/2018/195357、WO/2018/208856和

WO2016187508中更详细描述的呈递模型,所述文献出于所有目的各自通过引用整体并入本文。

[0545] X.训练模块

[0546] 训练模块可用于基于训练数据集构建一个或多个呈递模型,所述模型产生肽序列是否会被与所述肽序列相关联的MHC等位基因呈递的可能性。各种训练模块是本领域技术人员已知的,例如更详细地描述于美国专利第10,055,540号、美国申请公开第US20200010849A1号和国际专利申请公开WO/2018/195357和WO/2018/208856中的呈递模型,所述文献出于所有目的各自通过引用整体并入本文。训练模块可在独立等位基因(per-allele)基础上构建呈递模型以预测肽的呈递可能性。训练模块也可在存在两种或更多种MHC等位基因的多等位基因环境中构建呈递模型以预测肽的呈递可能性。

[0547] XI.预测模块

[0548] 预测模块可用于接收序列数据并使用呈递模型在序列数据中选择候选抗原。具体地,序列数据可以是从患者的受感染细胞或感染性疾病生物体本身(例如SARS-CoV-2)中提取的DNA序列、RNA序列和/或蛋白质序列。预测模块可例如通过比较从患者的正常组织细胞中提取的序列数据与从患者的受感染细胞中提取的序列数据以鉴定含有一种或多种感染性疾病生物体相关抗原的部分,从而鉴定作为病原体衍生肽(例如,SARS-CoV-2衍生)的候选抗原。预测模块可通过将从患者的正常组织细胞中提取的序列数据与从患者的受感染组织细胞中提取的序列数据进行比较以鉴定表达的候选抗原(例如,鉴定感染性疾病特异的表达的多核苷酸和/或多肽),从而鉴定与正常细胞或组织相比在受感染细胞或受感染组织中表达的候选抗原。

[0549] 呈递模块可将一种或多种呈递模型应用于处理过的肽序列以估计肽序列的呈递可能性。具体地,预测模块以通过将呈递模型应用于候选抗原来选择一种或多种候选抗原肽序列,所述候选抗原肽序列可能在受感染细胞HLA分子上呈递。在一种实现方式中,呈递模块选择估计呈递可能性高于预定阈值的候选抗原序列。在另一个实现方式中,呈递模型选择具有最高估计呈递可能性的N个候选抗原序列(其中N通常是可在疫苗中递送的表位的最大数量)。可将包含针对给定患者选择的候选抗原的疫苗注射到患者体内以刺激免疫应答。

[0550] XI.B.盒设计模块

[0551] XI.B.1概述

[0552] 盒设计模块可用于基于所选择的候选肽产生疫苗盒序列以注射到患者体内。例如,盒设计模块可用于产生编码串联表位序列的序列,例如串联T细胞表位。各种盒设计模块是本领域技术人员已知的,例如更详细地描述于美国专利第10,055,540号、美国申请公开第US20200010849A1号以及国际专利申请公开WO/2018/195357和WO/2018/208856中的盒设计模块,所述文献各自出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0553] 可基于由预测模块确定的与超过预定阈值的呈递可能性相关联的所选肽产生治疗性表位集合,其中所述呈递可能性是由呈递模型确定。然而,应了解,在其他实施方案中,可基于多种方法中的任一种或多种(单独或组合形式),例如基于针对患者的HLA I类或II类等位基因的结合亲和力或预测的结合亲和力、针对患者的HLA I类或II类等位基因的结合稳定性或预测的结合稳定性、随机取样等产生治疗性表位的集合。

[0554] 治疗性表位可对应于自身选择的肽。除所选肽外，治疗性表位还可包括C末端和/或N末端侧接序列。N末端和C末端侧接序列可为治疗性疫苗表位在其源蛋白的背景下的原生N末端和C末端侧接序列。治疗性表位可表示固定长度的表位。治疗性表位可表示可变长度的表位，其中表位的长度可根据例如C-侧接序列或N-侧接序列的长度而改变。例如，C末端侧接序列和N末端侧接序列可各自具有2-5个残基的变化长度，由此产生16种可能的表位选择。

[0555] 盒设计模块也可通过考虑横跨所述盒中一对治疗性表位之间的接合点的接合点表位的呈递来产生盒序列。接合点表位是由于在所述盒中串联治疗性表位和接头序列的过程而在所述盒中产生的新颖非自身但不相关的表位序列。接合点表位的新颖序列不同于所述盒的治疗性表位本身。

[0556] 盒设计模块可产生降低在患者中呈递接合点表位的可能性的盒序列。具体来说，当将盒注射至患者体内时，接合点表位有可能被患者的I类HLA或II类HLA等位基因呈递，并且分别刺激CD8或CD4T细胞应答。由于T细胞与接合点表位的反应没有治疗益处，并且可能因抗原竞争而减弱针对所述盒中所选治疗性表位的免疫应答，因此此类反应常常是不合需要的。[76]

[0557] 盒设计模块可迭代一个或多个候选盒，并确定与盒序列相关联的接合点表位的呈递评分低于数字阈值的盒序列。接合点表位呈递评分是与所述盒中接合点表位的呈递可能性相关联的量，并且较高的接合点表位呈递评分值指示所述盒的接合点表位将由I类HLA或II类HLA或两者呈递的可能性较高。

[0558] 在一个实施方案中，盒设计模块可确定候选盒序列中与最低接合点表位呈递评分相关联的盒序列。

[0559] 盒设计模块可迭代一个或多个候选盒序列，确定候选盒的接合点表位呈递评分，并且鉴定与低于阈值的接合点表位呈递评分相关联的最佳盒序列。

[0560] 盒设计模块可进一步检查所述一个或多个候选盒序列以鉴定候选盒序列中的接合点表位中的任一个是否是设计使用所述疫苗的给定患者的自身表位。为了实现此目的，盒设计模块针对已知数据库，例如BLAST检查接合点表位。在一个实施方案中，盒设计模块可被配置以设计避免接合点自身表位的盒。

[0561] 盒设计模块可执行蛮力方法并且迭代所有或大部分可能的候选盒序列以选择具有最小接合点表位呈递评分的序列。然而，由于疫苗容量增加，此类候选盒的数量可能极大。例如，对于20个表位的疫苗容量，盒设计模块必须迭代约10^{18}个可能的候选盒，才能确定具有最低接合点表位呈递评分的盒。对于盒设计模块在合理的时间量内完成以产生用于患者的疫苗而言，这种确定在计算上可能较为繁琐(就所需的计算处理资源而言)并且有时难以处理。另外，考虑到每个候选盒的可能接合点表位，甚至可能更繁琐。因此，盒设计模块可基于迭代明显少于蛮力方法中的候选盒序列数量的候选盒数量来选择盒序列。

[0562] 盒设计模块可产生随机产生或至少伪随机产生的候选盒子集，并且选择与低于预定阈值的接合点表位呈递评分相关联的候选盒作为盒序列。另外，盒设计模块可从所述子集中选择具有最低接合点表位呈递评分的候选盒作为盒序列。例如，盒设计模块可针对20个所选表位的集合产生约1百万个候选盒的子集，并且选出具有最小接合点表位呈递评分的候选盒。尽管产生随机盒序列的子集并从所述子集中选出具有低接合点表位呈递评分的

盒序列可能不如蛮力方法好，但其需要明显较少的计算资源，由此使其实施在技术上是可行的。另外，相对于这种更高效的技术，执行蛮力法可能仅引起接合点表位呈递评分的微小或甚至可忽略的改进，因此，从资源分配的观点看，蛮力法是不值得实施的。盒设计模块可通过将盒的表位序列用非对称旅行商问题(TSP)公式表示来确定改进的盒配置。根据节点列表和每对节点之间的距离，TSP确定与最短总距离相关联的节点的序列以访问每个节点恰好一次并返回至原始节点。例如，鉴于彼此之间距离已知的城市A、B和C，TSP的解决方案产生一个闭合的城市序列，对于所述序列，访问每个城市恰好一次所行进的总距离是可能途径当中最短的。TSP的非对称形式确定当一对节点之间的距离不对称时节点的最佳序列。例如，从节点A行进至节点B的“距离”可以不同于从节点B行进至节点A的“距离”。通过使用非对称TSP解决改进的最佳盒，盒设计模块可找到使所述盒的表位之间的接合点的呈递评分降低的盒序列。非对称TSP解决方案指示对应于应当在盒中串联表位以使所述盒的所有接合点的接合点表位呈递评分减到最小的次序的治疗性表位序列。相较于随机取样方法，通过这种方法确定的盒序列可产生具有明显较少接合点表位呈递的序列，同时可能需要明显较少的计算资源，尤其是在所产生的候选盒序列数量很大时。不同计算方法和用于优化盒设计的比较的说明性实例更详细地描述于美国专利第10,055,540号、美国申请公开第US20200010849A1号以及国际专利申请公开WO/2018/195357和WO/2018/208856中，所述文献出于所有目的各自通过引用整体并入本文。

[0563] 盒设计模块还可通过考虑疫苗中编码的额外蛋白质序列来产生盒序列。例如，用于产生编码串联T细胞表位的序列的盒设计模块可考虑已经由疫苗中存在的额外蛋白质序列(例如，全长蛋白质序列)编码的T细胞表位，例如通过去除已由候选序列列表中的额外蛋白质序列编码的T细胞表位。

[0564] 盒设计模块还可通过考虑序列的大小来产生盒序列。不希望受理论束缚，一般来说，增加的盒大小会对疫苗方面产生负面影响，例如疫苗生产和/或疫苗功效。在一个实例中，盒设计模块可考虑重叠序列，例如重叠的T细胞表位序列。一般来说，含有重叠T细胞表位序列的单个序列(也称为“框架”)比分别连接个别T细胞表位序列更有效，因为它减少了编码多个肽所需的序列大小。因此，在一个说明性实例中，用于产生编码串联T细胞表位的序列的盒设计模块可考虑扩展候选T细胞表位以编码一个或多个额外T细胞表位的成本/效益，例如确定与增加序列大小的成本相比，呈递额外T细胞表位的MHC在额外群体覆盖中获得的效益。

[0565] 盒设计模块还可通过考虑由验证表位产生的免疫应答的刺激量值来生成盒序列。

[0566] 盒设计模块还可通过考虑编码表位在群体中的呈递来生成盒序列，例如至少一个免疫原性表位由至少一个HLA在群体的一部分中呈递，例如至少85％、90％或95％的群体(例如，四个主要族群即欧洲人(EUR)、非裔美国人(AFA)、亚洲和太平洋岛民(APA)和西班牙裔(HIS)的HLA-A、HLA-B和HLA-C基因)。作为一个说明性的非限制性实例，盒设计模块还可生成盒序列，使得至少一个HLA存在于至少85％、90％或95％的群体中，所述群体呈递至少一个验证表位或存在于至少4、5、6或7个预测表位。

[0567] 盒设计模块还可通过考虑提高潜在安全性的其他方面来产生盒序列，例如限制编码或编码功能性蛋白质、功能性蛋白质结构域、功能性蛋白质亚基或功能性蛋白质片段的可能呈递安全性风险的可能性。在一些情况下，盒设计模块可限制编码肽的序列大小，使得

其为经翻译的相应全长蛋白质的小于50%、小于49%、小于48%、小于47%、小于46%、小于45%、小于45%、小于43%、小于42%、小于41%、小于40%、小于39%、小于38%、小于37%、小于36%、小于35%、小于34%或小于33%。在一些情况下，盒设计模块可限制编码肽的序列大小，使得单个连续序列小于经翻译的相应全长蛋白质的50%，但超过一个的序列可能源自相同的经翻译的相应全长蛋白质并且共同编码超过50%。在一个说明性实例中，如果含有重叠T细胞表位序列的单个序列(“框架”)大于经翻译的相应全长蛋白质的50%，则可将框架拆分为多个框架(例如，f1、f2等)，使得每个框架小于经翻译的相应全长蛋白质的50%。盒设计模块还可限制编码肽的序列大小，使得单个连续序列为经翻译的相应全长蛋白质的小于49%、小于48%、小于47%、小于46%、小于45%、小于45%、小于43%、小于42%、小于41%、小于40%、小于39%、小于38%、小于37%、小于36%、小于35%、小于34%或小于33%。在编码来自同一基因的多个框架的情况下，多个框架可具有彼此重叠的序列，换句话说，每个框架分别编码相同的序列。在编码来自同一基因的多个框架的情况下，可对源自同一基因的两个或更多个核酸序列进行排序，使得如果第二核酸序列跟随在相应基因中的第一核酸序列之后(紧跟与否)，则所述第一核酸序列不能之后紧跟着所述第二核酸序列或连接到所述第二核酸序列。例如，如果在同一基因内有3个框架(按氨基酸位置升序排列为f1、f2、f3)，则：

[0568] -不允许以下盒排序：

[0569] of1之后紧根着f2

[0570] of2之后紧根着f3

[0571] of1之后紧根着f3

[0572] -允许以下盒排序：

[0573] of3之后紧根着f2

[0574] of2之后紧根着f1

[0575] XIII.示例计算机

[0576] 计算机可用于计算本文所述的方法中的任一者。本领域技术人员将认识到计算机可具有不同架构。计算机的实例是本领域技术人员已知的，例如更详细地描述于美国专利第10,055,540号、美国申请公开第US20200010849A1号以及国际专利申请公开WO/2018/195357和WO/2018/208856中的计算机，所述文献出于所有目的各自通过引用整体并入本文。

[0577] XIV.实施例

[0578] 下文是执行本发明的特定实施方案的实施例。所述实施例仅出于说明性目的提供，并且不意在以任何方式限制本发明的范围。已作出努力以确保关于所使用数字的精确性(例如，量、温度等)，但一些实验性误差和偏差当然应是允许的。

[0579] 除非另外指明，否则本发明将采用本领域的技能范围内的蛋白质化学、生物化学、重组DNA技术和药理学常规方法实施。在文献中充分解释此类技术。参见例如T.E.Creighton,Proteins:Structures and Molecular Properties(W.H.Freeman and Company,1993);A.L.Lehninger,Biochemistry(Worth Publishers,Inc.,现行版);Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第2版,1989);Methods In Enzymology(S.Colowick和N.Kaplan编,Academic Press,Inc.);Remington's

Pharmaceutical Sciences,第18版(Easton,Pennsylvania:Mack Publishing Company,1990);Carey和Sundberg Advanced Organic Chemistry第3版.(Plenum Press)第A卷和第B卷(1992)。

[0580] XIV.A.SARS-CoV-2 MHC表位预测和疫苗盒构建

[0581] SARS-CoV-2属于冠状病毒家族并且其参考基因组是29,903个碱基对的单链RNA序列。所述基因组含有至少14个开放阅读框(ORF),如图1所示。在编码的基因中,必需基因是复制酶ORF1ab、刺突(S)、包膜(E)、膜(M)和核衣壳(N)。复制酶ORF1ab(位置266-21555)编码两种蛋白质,即orf1a和orf1b,后者在位置13468处通过核糖体移码-1进行翻译。这两种蛋白质共含有16个非结构蛋白(nsp1-nsp16),如图2所描绘,即ORF1a和ORF1b被切割成16个nsp。刺突蛋白被认为与人类细胞的ACE2受体结合,使病毒进入人类细胞,以利用其复制机制产生和传播更多的病毒拷贝。

[0582] 由于已知RNA病毒具有高突变率,因此分析了大量SARS-CoV-2基因组以识别蛋白质组中可变的区域。截至2020年4月19日,获得了存储在GISAID数据库[https://www.gisaid.org]中的超过8000个SARS-CoV-2完整基因组。对每个基因组与SARS-CoV-2参考基因组(Genbank登录号NC_045512;SEQ ID NO:76)进行了成对全局比对。这些基因组上与参考基因组的编码区对齐的序列被专门定位。然后翻译这些序列以获得这些SARS-CoV-2的蛋白质序列。然后将这些蛋白质序列与各自的参考蛋白质序列比对以鉴定变体。

[0583] 该分析鉴定了变异率大于1%的蛋白质序列上的20个位点。这些位点如表1所示。在选择T细胞表位时,排除了穿过这些可变位点的候选表位。

[0584] 使用我们的机器学习EDGE平台(参见美国专利第10,055,540号,其出于所有目的通过引用并入本文)预测CD8+表位,该平台被证明是同类中最好的[Bulik-Sullivan等人,(2018).Deep learning using tumor HLA peptide mass spectrometry datasets improves neoantigen identification.Nature Biotechnology 2018,37(1),其出于所有目的通过引用并入本文]。用于预测I类表位的模型最近对398个样品的质谱中呈现的507,502个肽进行训练,并且涵盖116个已识别的等位基因,其中112个等位基因(表2,图7)在下面描述的单倍型分布数据集中表示。

[0585] 为了生成候选CD8+ T细胞表位列表,orf1ab蛋白在图2中所示的切割位点处被分裂。研究表明,刺突蛋白在位置681-684处具有弗林蛋白酶样切割基序,其中切割事件发生在位置684之后[Wrapp等人,(2020).Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation.Science,367(6483),1260-1263;Ou等人,(2020).Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV.Nature Communications,11(1),1620]。将刺突蛋白切割为S1和S2被认为有助于细胞进入,从而促进病毒传播。因此,刺突蛋白在弗林蛋白酶切割位点处被分裂以产生候选CD8+T细胞表位。然后所有8-11聚体肽均由切割的蛋白质和其他蛋白质产生,侧接有它们的原生N末端和C末端5聚体。

[0586] EDGE机器学习模型在每个HLA I类等位基因的这些候选表位上运行。也就是说,候选表位的呈递评分被赋予每个HLA等位基因的EDGE评分。通常,肽被呈递的概率受包含肽的蛋白质家族和蛋白质表达水平的影响。EDGE模型还在人类肽组数据集上进行了训练。鉴于SARS-CoV-2没有等效的蛋白质家族,为了预测给定Sar-CoV-2肽的呈递,随机蛋白质家族被

分配给所有肽。分配相同的蛋白质家族，尽管是随机的，仍将对所有SARS-CoV-2肽产生相同的影响。还使用了高水平的表达(tpm＝10)。表A中显示了HLA等位基因的EDGE评分为0.001及以上的候选表位列表，以及预测EDGE评分大于0.001的同源HLA等位基因，每个同源配对评级为H(EDGE评分>0.1)、M(EDGE评分介于0.01和0.1之间)和L(EDGE评分<0.01)。

[0587] 为了解释SARS-CoV-2基因的不同表达水平，所报告的来自SARS-CoV-2基因组的基因中T细胞应答的比率[Li等人,(2008)T Cell Responses to Whole SARS Coronavirus in Humans.The Journal of Immunology,181(8),5490-5500]被用作基因表达水平比率的代表。然后对来自SARS-CoV-2基因的所有表位的评分进行缩放，使得选定基因中第99个百分位的表位与刺突基因中第99个百分位的表位之间的比率遵循如下中报告的比率：[Li等人,(2008).T Cell Responses to Whole SARS Coronavirus in Humans.The Journal of Immunology,181(8),5490-5500]。

[0588] 然后通过选择缩放EDGE评分大于或等于t＝0.01阈值的那些来选择一组候选CD8+表位。所述阈值是从HIV LANL数据集的分析中选择的(数据未示出)，因此T细胞表位的PPV估计为0.2且召回率为0.5。也包括与IEDB[Vita等人,(2019).The Immune Epitope Database(IEDB):2018年更新Nucleic Acids Research,47(D1),D339-D343]中报告的已知SARs-Cov T细胞表位同源性>＝90％的集合序列，类似于Grifoni等人,[(2020).A Sequence Homology and Bioinformatic Approach Can Predict Candidate Targets for Immune Responses to SARS-CoV-2.Cell Host&Microbe,27(4),671-680.e2]中描述的方法。

[0589] 候选表位集合排除那些包含至少一个可变率大于0.01的位点的序列，如上文所提及和表1所示。

[0590] 为了最大限度地提高疫苗在世界人口中的覆盖率，HLA-A、HLA-B和HLA-C基因在四个主要族群即欧洲裔(EUR)、非裔美国人(AFA)、亚洲和太平洋岛民裔(APA)和西班牙裔(HIS)中的等位基因频率获自可公开获得的美国国家骨髓捐赠计划数据集(National Marrow Donor Program dataset)[https://bioinformatics.bethematchclinical.org/hla-resources/haplotype-frequencies/high-resolution-hla-alleles-and-haplotypes-in-the-us-population]。然后进行模拟以估计由这些HLA等位基因组合构成的单倍型的频率。

[0591] 盒优化如下进行：

[0592] 表位选择定义

[0593] -候选表位集合E:缩放EDGE评分大于或等于阈值t＝0.01的候选CD8+表位集合

[0594] -群体覆盖标准P:对于如上所述的四个族群(EUR/AFA/APA/HIS)中的每一者，该族群中95％的模拟人在其双倍型中具有至少30个候选表位

[0595] -解框架集合F-当前解中封装添加的候选表位的所有氨基酸范围

[0596] o对于添加到解中的每个表位，表位和每端的5个侧接原生氨基酸必须完全包含在框架F中

[0597] o每个框架仅跨越蛋白质区域(包括orflab中的单个NSP)

[0598] 表位选择方法

[0599] -群体覆盖标准P以初始添加的整个基因中的所有表位计算开始

[0600] -如果不满足群体覆盖标准P,则继续选择SARS-CoV-2蛋白质组中最有效地最大化进展为P的氨基酸框架f

[0601] o定义为额外群体覆盖率C/添加的额外氨基酸碱基AA的最高比率。(C/AA)。

[0602] o所有候选框架是新的25aa框架(AA＝25),或者可与现有解中的框架F重叠-在这种情况下,它可以添加小于25aa的任何数量(AA<25)

[0603] o额外的群体覆盖率C是对于具有<20个覆盖表位的单倍型,表位计数从E增加,由所有四个族群中单倍型的群体频率总和加权(相乘)

[0604] o确定(实验选择)每个单倍型20个表位作为达到每个双倍型30个候选表位的总体覆盖标准的有效代表

[0605] o将f添加到解框架集合F。从E中删除f内的候选表位。

[0606] -选择框架后,创建最终集合F:

[0607] o首先合并重叠框架,产生连续序列(即表位“热点”)

[0608] o接下来确保所有框架小于该框架总基因大小的50%。如果框架大于此大小,则将它们分成较小(可能重叠)的框架,每个框架都小于此要求。可测试额外更严格的尺寸限制

[0609] -为了说明较大盒尺寸的边际值,当满足P时,框架选择可以继续过去-但不影响标准P的所选盒的组成。

[0610] 盒排序

[0611] 解框架集合F中的框架被排序以最小化连接表位(并非解的一部分的非预期表位,由相邻框架创建)的EDGE评分。一个基因内的连续框架也被禁止在盒中立即相互跟随(基因内限制)。换句话说,基因内限制要求如果有两个或更多个编码衍生自同一SARS-CoV-2基因的表位的SARS-CoV-2衍生核酸序列,则对这两条序列进行排序,使得如果第二核酸序列跟随在相应的SARS-CoV-2基因中的第一核酸序列之后,则所述第一核酸序列不能之后紧跟着所述第二核酸序列或连接到所述第二核酸序列。例如,如果同一基因内有3个框架(f1、f2、f3,按氨基酸位置升序排列)

[0612] -以下盒排序是不可能的:

[0613] of1之后紧跟着f2

[0614] of2之后紧跟着f3

[0615] of1之后紧跟着f3

[0616] -以下盒排序是可能的:

[0617] of3之后紧跟着f2

[0618] of2之后紧跟着f1

[0619] 盒排序方法

[0620] 谷歌优化路线工具[https://developers.google.com/optimization/routing]用于执行旅行商优化路线,其中F中每对框架之间的距离为:

[0621] -根据上述基因内限制,如果不允许框架按此顺序相互跟随,则为无限的,

[0622] -否则,所有等位基因中的连接表位EDGE评分总和,由群体中的等位基因频率加权

[0623] 最小路径距离的路线查找产生盒中框架的最佳排序,以最小化连接表位并避免基因内的连续框架。

[0624] 结果

[0625] 群体覆盖标准P是通过将SARS-CoV-2刺突蛋白(SEQ ID NO:59)提供的所有初始表位拆分为S1和S2计算得出的。应用上述优化算法产生了具有18个表位编码框的594个氨基酸盒序列,如表3A所示。表C呈现了盒中包含的每个额外表位(不包括衍生自刺突蛋白的表位)。根据经验,当所有框架的大小阈值设置为小于该框架总基因大小的42%时,就会产生最佳框架集合F。图5显示了设计的盒在四个群体中的覆盖率,其中第一栏提供了预测呈递的SARS-CoV-2表位的数量,而第二栏提供了基于0.2PPV的预期呈递的表位数量。如果使用一定数量的表位,则每行显示每个群体的保护覆盖率。

[0626] 还预测了来自SARS-CoV-2蛋白质组的潜在HLA-DRB、HLA-DQ和HLA-DP MHC II类表位。所描述的用于生成候选CD8/MHC I类表位的方法用于生成大小在9到20个氨基酸之间的肽。对II类运行EDGE模型以计算这些肽中的每一者针对每个可识别等位基因的EDGE评分(参见例如美国申请第16/606,577号和国际专利申请PCT/US2020/021508,其各自出于所有目的通过引用整体并入本文)。EDGE评分大于0.001的CD4表位的列表以及预测EDGE评分大于0.001的同源HLA等位基因呈现于表B中,每个同源配对评级为H(EDGE评分＞0.1)、M(EDGE评分介于0.01和0.1之间)和L(EDGE评分＜0.01)。HLA-DQ和HLA-DP以其在分析中使用的α和β链提及,而HLA-DR以其β链提及,因为α链在人类群体中通常是不变的,其中HLA-DR肽接触区域特别不变。

[0627] 然后识别获得包含在上面确定的优化的MHC I盒框架中的评分＞0.02的肽。选择0.02的阈值是因为模型预测在预测质谱数据中的PPV为0.2,且阳性对比阴性的流行率比为1:100。图6A说明了每个检查的MHC II类等位基因所呈递的预测表位的数量。图6B显示了MHC II类在二倍体水平上的群体覆盖率。

[0628] 使用上述表位预测和框架排序算法设计额外的盒,其中初始群体覆盖标准P是使用由SARS-CoV-2膜(SEQ ID NO:61)、SARS-CoV-2核衣壳(SEQ ID NO:62)、SARS-CoV-2包膜(SEQ ID NO:63)或其组合(包括与SARS-CoV-2刺突的组合)或其序列变体提供的所有初始表位计算的。

[0629] 表1-已识别的SARS-CoV-2突变(＞1%)

[0630]

基因	位置	参考氨基酸	替代氨基酸	可变率
orf1ab	265	T	I	0.12474
orf1ab	378	V	I	0.022349
orf1ab	392	G	D	0.015073
orf1ab	448	D	缺失	0.030146
orf1ab	739	I	V	0.011435
orf1ab	765	P	S	0.012474
orf1ab	876	A	T	0.015073
orf1ab	3353	K	R	0.023909
orf1ab	3606	L	F	0.130977
orf1ab	4715	P	L	0.448025
orf1ab	5828	P	L	0.193867
orf1ab	5865	Y	C	0.199584
S	614	D	G	0.439815

ORF3a	57	Q	H	0.150943
ORF3a	251	G	V	0.086003
M	3	D	G	0.013508
M	175	T	M	0.051416
ORF8	84	L	S	0.267563
N	203	R	K	0.124507
N	204	G	R	0.124068

[0631] 表2-可识别的I类等位基因列表

[0632]

HLA-A*01:01	HLA-A*25:01	HLA-A*68:01	HLA-B*15:13	HLA-B*40:06	HLA-B*55:02	HLA-C*07:02
HLA-A*02:01	HLA-A*26:01	HLA-A*68:02	HLA-B*18:01	HLA-B*41:02	HLA-B*56:01	HLA-C*07:04
HLA-A*02:02	HLA-A*26:02	HLA-A*74:01	HLA-B*27:02	HLA-B*42:01	HLA-B*57:01	HLA-C*07:27
HLA-A*02:03	HLA-A*26:03	HLA-B*07:02	HLA-B*27:05	HLA-B*44:02	HLA-B*57:03	HLA-C*08:01
HLA-A*02:04	HLA-A*29:01	HLA-B*07:04	HLA-B*35:01	HLA-B*44:03	HLA-B*58:01	HLA-C*08:02
HLA-A*02:05	HLA-A*29:02	HLA-B*07:05	HLA-B*35:02	HLA-B*44:05	HLA-B*58:02	HLA-C*08:03
HLA-A*02:06	HLA-A*30:01	HLA-B*08:01	HLA-B*35:03	HLA-B*45:01	HLA-C*01:02	HLA-C*12:02
HLA-A*02:07	HLA-A*30:02	HLA-B*13:01	HLA-B*35:08	HLA-B*46:01	HLA-C*02:02	HLA-C*12:03
HLA-A*02:11	HLA-A*31:01	HLA-B*13:02	HLA-B*35:12	HLA-B*48:01	HLA-C*03:02	HLA-C*12:05
HLA-A*03:01	HLA-A*32:01	HLA-B*14:01	HLA-B*37:01	HLA-B*49:01	HLA-C*03:03	HLA-C*14:02
HLA-A*03:02	HLA-A*33:01	HLA-B*14:02	HLA-B*38:01	HLA-B*50:01	HLA-C*03:04	HLA-C*14:03
HLA-A*11:01	HLA-A*33:03	HLA-B*15:01	HLA-B*38:02	HLA-B*51:01	HLA-C*04:01	HLA-C*15:02
HLA-A*11:02	HLA-A*34:01	HLA-B*15:02	HLA-B*39:01	HLA-B*52:01	HLA-C*04:03	HLA-C*15:05
HLA-A*23:01	HLA-A*34:02	HLA-B*15:03	HLA-B*39:06	HLA-B*53:01	HLA-C*05:01	HLA-C*16:01
HLA-A*24:02	HLA-A*36:01	HLA-B*15:10	HLA-B*40:01	HLA-B*54:01	HLA-C*06:02	HLA-C*16:04
HLA-A*24:07	HLA-A*66:01	HLA-B*15:11	HLA-B*40:02	HLA-B*55:01	HLA-C*07:01	HLA-C*17:01

[0633]

HLA-A*01:01	HLA-A*25:01	HLA-A*68:01	HLA-B*15:13	HLA-B*40:06	HLA-B*55:02	HLA-C*07:02
HLA-A*02:01	HLA-A*26:01	HLA-A*68:02	HLA-B*18:01	HLA-B*41:02	HLA-B*56:01	HLA-C*07:04
HLA-A*02:02	HLA-A*26:02	HLA-A*74:01	HLA-B*27:02	HLA-B*42:01	HLA-B*57:01	HLA-C*07:27
HLA-A*02:03	HLA-A*26:03	HLA-B*07:02	HLA-B*27:05	HLA-B*44:02	HLA-B*57:03	HLA-C*08:01
HLA-A*02:04	HLA-A*29:01	HLA-B*07:04	HLA-B*35:01	HLA-B*44:03	HLA-B*58:01	HLA-C*08:02
HLA-A*02:05	HLA-A*29:02	HLA-B*07:05	HLA-B*35:02	HLA-B*44:05	HLA-B*58:02	HLA-C*08:03
HLA-A*02:06	HLA-A*30:01	HLA-B*08:01	HLA-B*35:03	HLA-B*45:01	HLA-C*01:02	HLA-C*12:02
HLA-A*02:07	HLA-A*30:02	HLA-B*13:01	HLA-B*35:08	HLA-B*46:01	HLA-C*02:02	HLA-C*12:03
HLA-A*02:11	HLA-A*31:01	HLA-B*13:02	HLA-B*35:12	HLA-B*48:01	HLA-C*03:02	HLA-C*12:05
HLA-A*03:01	HLA-A*32:01	HLA-B*14:01	HLA-B*37:01	HLA-B*49:01	HLA-C*03:03	HLA-C*14:02
HLA-A*03:02	HLA-A*33:01	HLA-B*14:02	HLA-B*38:01	HLA-B*50:01	HLA-C*03:04	HLA-C*14:03
HLA-A*11:01	HLA-A*33:03	HLA-B*15:01	HLA-B*38:02	HLA-B*51:01	HLA-C*04:01	HLA-C*15:02
HLA-A*11:02	HLA-A*34:01	HLA-B*15:02	HLA-B*39:01	HLA-B*52:01	HLA-C*04:03	HLA-C*15:05
HLA-A*23:01	HLA-A*34:02	HLA-B*15:03	HLA-B*39:06	HLA-B*53:01	HLA-C*05:01	HLA-C*16:01
HLA-A*24:02	HLA-A*36:01	HLA-B*15:10	HLA-B*40:01	HLA-B*54:01	HLA-C*06:02	HLA-C*16:04
HLA-A*24:07	HLA-A*66:01	HLA-B*15:11	HLA-B*40:02	HLA-B*55:01	HLA-C*07:01	HLA-C*17:01

[0634] 表3A-与刺突蛋白结合的盒表位框架

[0635]

框架	基因	基因起始	基因结束	氨基酸长度
1	M	172	204	33
2	orf1ab	4154	4178	25
3	N	301	345	45
4	N	151	175	25
5	N	71	95	25
6	ORF3a	106	130	25
7	orf1ab	4419	4443	25
8	N	259	283	25

9	orf1ab	5371	5395	25
10	M	85	140	56
11	N	352	393	42
12	orf1ab	2580	2604	25
13	ORF3a	1	47	47
14	M	34	60	27
15	ORF3a	53	86	34
16	orf1ab	2794	2818	25
17	ORF3a	199	255	57
18	E	44	71	28

[0636] XIV.B.SARS-CoV-2疫苗设计

[0637] 一系列针对SARS-CoV-2的疫苗经设计用于产生平衡的免疫应答,从而诱导中和抗体(来自B细胞)以及效应和记忆CD8+T细胞应答,以实现最大功效。一般而言,针对病毒表面蛋白的中和抗体可用于防止病毒进入细胞,而病毒表位特异性CD8+T细胞杀死了病毒感染的细胞。此外,针对SARS-CoV-2的疫苗被设计用于最大化疫苗在世界人口中的覆盖率,即在所有主要祖先群体中针对大多数个体(例如,>95%)接受大量(例如,>=30)候选CD8+表位,同时最大限度地减少我们的盒序列足迹。

[0638] 抗原和盒

[0639] 构建了编码使用上述表位预测和框架排序算法设计的MHC表位编码盒的疫苗。生成了一个示例性盒(本文称为串联EDGE预测的SARS-CoV-2MHC I类表位盒或EDGE预测表位(EPE)),其中使用由SARS-CoV-2刺突提供的所有初始表位计算初始群体覆盖标准P,如上所述。

[0640] 还设计了单独或组合编码各种全长蛋白质、通常用于刺激B细胞应答目的的疫苗。全长蛋白质包括SARS-CoV-2刺突(SEQ ID NO:59)、SARS-CoV-2膜(SEQ ID NO:61)、SARS-CoV-2核衣壳(SEQ ID NO:62)和SARS-CoV-2包膜(SEQ ID NO:63),其序列示于表3B。

[0641] 关于刺突蛋白,对流行的SARS-CoV-2变体(如上所述,参见表1)的初步分析确定了近44%的基因组中存在刺突蛋白变体。随后对超过8000个SARS-CoV-2完整基因组的分析在位置614处鉴定一个显性变异,其中野生型氨基酸天冬氨酸(D)突变为甘氨酸(G)。该突变称为D614G,在全世界60.05%的测序基因组中发现,并在欧洲和北美分别为70.46%和58.49%的序列(图4)。因此,使用关于参考刺突蛋白(SEQ ID NO:59)含有流行性D614G刺突变体的刺突蛋白。此外,一种修饰的刺突蛋白被工程化为使刺突蛋白偏向于保持在主要融合前状态,因为融合前刺突状态可能是抗体介导的病毒中和的更好靶标。选择了以下突变:破坏弗林蛋白酶切割位点的R682V;破坏S2内的切割位点的R815N,以及干扰刺突的二级结构的K986P和V987P。因此,使用关于参考刺突蛋白(SEQ ID NO:59)含有一种或多种以下突变的"修饰的"刺突蛋白:D614G突变、R682V突变、R815N突变、K986P突变、或V987P突变。对于参考,证明具有所有刺突突变的修饰刺突显示在SEQ ID NO:60中。

[0642] 各种疫苗设计及其各自的盒核苷酸序列更详细地呈现于表4中。对于基于SAM的疫苗,可去除启动子和/或聚(A)信号序列,因为盒通常可操作地连接到由载体骨架提供的内源26S启动子和聚(A)序列。根据盒特征和配置,翻译的蛋白质(例如,表3B中的那些)还可包

括与特定表达策略相关的一条或多条额外序列，诸如2A核糖体跳跃序列元件(或其翻译后的片段)和额外的26S启动子序列。

[0643] 表3B-SARS-CoV-2蛋白

[0644]

肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
串联 EDGE 预测的 SARS-CoV-2 MHC I 类表位盒	TSRTLSYYKLGASQRVAGDSGFAAYSRYRIGNYC AAGTTQTACTDDNALAYYNTTKGGWPQIAQFAPS ASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTGAIKLDDKDP NPANNAAIVLQLPQGTTLPKGFYAEGGVPINTNSS PDDQIGYYRRATRRIRLYLYALVYFLQSINFVRIIM RLWLCSTDVVYRAFDIYNDKVAGFAKFLKTRQKR TATKAYNVTQAFGRRGPEQTQPYVCNAPGCDVT DVTQLYLGGMSYYACLVGLMWLSYFIASFRLFAR TRSMWSFNPETNILLNVPLHGTILTRPLLESELVILL NKHIDAYKTFPPTEPKKDKKKKADETQALPQRQK KQQTVTVGDSAEVAVKMFDAYVNTFSSTFNVMD LFMRIFTIGTVTLKQGEIKDATPSDFVRATATIPIQA SLPFGWLILLQFAYANRNRFLYIIKLIFLWLLWPVL AVFQSASKIITLKKRWQLALSKGVHFVCNLLLLHV MSKHTDFSSEIIGYKAIDGGVTRDCVVLHSYFTSD YYQLYSTQLSTDTGVEHVTFFIYNKIVDEPEEHVQI HTIDGSSGVCNIVNVSLVKPSFYVYSRVKNLNSSR VP	57
具有 N 末端前导序列(粗体)和 C 末端通用 MHC II 类与 GPGPG 接头(SEQ ID NO: 56) (粗	MAGTSRTLSYYKLGASQRVAGDSGFAAYSRYRIG NYCAAGTTQTACTDDNALAYYNTTKGGWPQIAQ FAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTGAIKLDD KDPNPANNAAIVLQLPQGTTLPKGFYAEGGVPINT NSSPDDQIGYYRRATRRIRLYLYALVYFLQSINFVR IIMRLWLCSTDVVYRAFDIYNDKVAGFAKFLKTR QKRTATKAYNVTQAFGRRGPEQTQPYVCNAPGC	58

[0645]

斜体)的串联EDGE预测的SARS-CoV-2 MHC I 类表位盒	DVTDVTQLYLGGMSYYACLVGLMWLSYFIASFRL FARTRSMWSFNPETNILLNVPLHGTILTRPLLESEL VILLNKHIDAYKTFPPTEPKKDKKKKADETQALPQ RQKKQQTVTVGDSAEVAVKMFDAYVNTFSSTFN VMDLFMRIFTIGTVTLKQGEIKDATPSDFVRATATI PIQASLPFGWLILLQFAYANRNRFLYIIKLIFLWLL WPVLAVFQSASKIITLKKRWQLALSKGVHFVCNL LLLHVMSKHTDFSSEIIGYKAIDGGVTRDCVVLHS YFTSDYYQLYSTQLSTDTGVEHVTFFIYNKIVDEPE EHVQIHTIDGSSGVCNIVNVSLVKPSFYVYSRVKN LNSSRVP***GPGPGAKFVAAWTLKAAAGPGPGQYIK ANSKFIGITELGPGPG***	
SARS-CoV-2 刺突	MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRG VYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHV SGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIF GTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFL GVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPF LMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPI NLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHR SYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYN ENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTS NFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYA WNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKL NDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYN YKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLF RKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPL QSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCG PKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFL PFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVS VITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTP TWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPI GAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSIIAYTMSLGA ENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDC TMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVE QDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDP SKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIA ARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAG TITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQN VLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQ DVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRL DKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRA SANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFP QSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKA HFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFV SGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFK NHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKN LNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIV MVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSE PVLKGVKLHYT	**59**
SARS-CoV-2	MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRG	**60**

[0646]

修饰刺突(潜在突变呈粗斜体小写字母。修饰可在单独或组合构建体中)	VYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHV SGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIF GTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFL GVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPF LMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPI NLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHR SYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYN ENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTS NFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYA WNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKL NDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYN YKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLF RKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPL QSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCG PKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFL PFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVS VITPGTNTSNQVAVLYQ***g***VNCTEVPVAIHADQLTP TWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPI GAGICASYQTQTNSP***v***RARSVASQSIIAYTMSLGAE NSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCT MYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQ DKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPS KPSK***n***SFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAA RDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTI TSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVL YENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDV VNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLD***pp*** EAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASAN LAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAP HGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPR EGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNC DVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTS PDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESL IDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTI MLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLK GVKLHYT	
SARS-CoV-2膜	MADSNGTITVEELKKLLEQWNLVIGFLFLTWICLL QFAYANRNRFLYIIKLIFLWLLWPVTLACFVLAAV YRINWITGGIAIAMACLVGLMWLSYFIASFRLFAR TRSMWSFNPETNILLNVPLHGTILTRPLLESELVIG AVILRGHLRIAGHHLGRCDIKDLPKEITVATSRTLS YYKLGASQRVAGDSGFAAYSRYRIGNYKLNTDHS SSSDNIALLVQ	**61**
SARS-CoV-2核衣壳	MSDNGPQNQRNAPRITFGGPSDSTGSNQNGERSG ARSKQRRPQGLPNNTASWFTALTQHGKEDLKFPR GQGVPINTNSSPDDQIGYYRRATRRIRGGDGKMK DLSPRWYFYYLGTGPEAGLPYGANKDGIIWVATE GALNTPKDHIGTRNPANNAAIVLQLPQGTTLPKGF YAEGSRGGSQASSRSSSRSRNSSRNSTPGSSRGTSP ARMAGNGGDAALALLLLDRLNQLESKMSGKGQQ	**62**

[0647]

	QQGQTVTKKSAAEASKKPRQKRTATKAYNVTQA FGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKHWPQIAQF APSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTGAIKLDDK DPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPPTEPKKDKKKKAD ETQALPQRQKKQQTVTLLPAADLDDFSKQLQQSM SSADSTQA	
SARS-CoV-2包膜	MYSFVSEETGTLIVNSVLLFLAFVVFLLVTLAILTA LRLCAYCCNIVNVSLVKPSFYVYSRVKNLNSSRVP DLLV	**63**

[0648] 表4-SARS-CoV-2疫苗设计

[0649]

载体插入物	SEQ ID NO:
EDGE 预测表位(EPE): 具有 5'表达前导序列(粗体)和 3'通用 MHC II 类与 GPGPG 接头(SEQ ID NO: 56) (粗斜体)的串联 EDGE 预测的 SARS-CoV-2 MHC I 类表位盒	64
CMV-EPE-BGH	65
CMV-刺突(IDT)-T2A-膜蛋白-SV40	66
CMV-刺突(IDT)-T2A-膜蛋白-BGH	67
CMV-刺突(IDT)-SV40-CMV-EPE-BGH	68
CMV-刺突(IDT)-SV40	69
CMV-修饰刺突(IDT)-SV40	70
CMV-刺突(IDT)-T2A-包膜-SV40-CMV-核衣壳-T2A-膜蛋白-SV40	71
CMV-刺突(IDT)-SV40-CMV-核衣壳-T2A-膜蛋白-BGH	72
CMV-刺突(IDT)-T2A-包膜蛋白-T2A-膜蛋白-SV40	73
CMV-刺突(IDT)-T2A-包膜蛋白-T2A-膜蛋白-SV40-CMV-EPE-BGH	74

[0650] SAM载体

[0651] 用于抗原表达系统的RNA甲病毒骨架由自我复制的委内瑞拉马脑炎(VEE)病毒(Kinney,1986,Virology 152:400-413)通过缺失位于26S亚基因组启动子3′的VEE的结构蛋白(VEE序列7544至11,175缺失;编号基于Kinney等人,1986;SEQ ID NO:6)而生成。为了生成自扩增mRNA(“SAM”)载体,缺失的序列被抗原序列替换。含有20种模型抗原的代表性SAM载体是“VEE-MAG25聚体”(SEQ ID NO:4)。特征在于所述具有MAG25聚体盒的抗原盒的载体可被本文所述的SARS-CoV-2盒和/或全长蛋白质替换。

[0652] 体外转录以产生SAM

[0653] 对于体内研究:SAM载体作为“AU-SAM”载体生成。修饰的T7RNA聚合酶启动子(TAATACGACTCACTATA;SEQ ID NO:120),缺乏典型的3′二核苷酸GG,被添加到SAM载体的5′端以产生体外转录模板DNA(SEQ ID NO:77;7544至11,175缺失,无插入的抗原盒)。反应条件描述如下:

[0654] -使用最终浓度为1x T7 RNA聚合酶混合物(E2040S)的1x转录缓冲液(40mM Tris-HCL[pH7.9]、10mM二硫苏糖醇、2mM亚精胺、0.002%Triton X-100和27mM氯化镁);0.025mg/mL DNA转录模板(通过限制性消化线性化);8mM CleanCap试剂AU(目录号N-7114)和各10mM的ATP、三磷酸胞苷(CTP)、GTP和三磷酸尿苷(UTP)

[0655] -将转录反应物在37℃下孵育2小时并在37℃用DNA酶I缓冲液中的最终2U DNA酶I(AM2239)/0.001mg DNA转录模板处理1小时。

[0656] -SAM由RNeasy Maxi(QIAGEN,75162)纯化

[0657] 作为5′帽结构的共转录添加的替代方法,7-甲基鸟苷或相关的5′帽结构可在使用含有mRNA 2′-O-甲基转移酶和S-腺苷甲硫氨酸的牛痘加帽系统(NEB目录号M2080)转录后酶促添加。

[0658] 腺病毒载体

[0659] 用于抗原表达系统的经修饰ChAdV68载体(“chAd68-空-E4缺失”SEQ ID NO:75)是基于AC_000011.1生成的,其中E1(nt 577至34 03)、E3(nt 27,125-31,825)和E4区(nt 34,916至35,642)序列缺失并且相应的ATCC VR-594(独立测序的全长VR-594C68 SEQ ID NO:10)核苷酸在五个位置被取代。在五个位置被相应ATCC VR-594核苷酸取代的全长ChAdV68

AC_000011.1序列被称为“ChAdV68.5WTnt”(SEQ ID NO:1)。插入在CMV启动子/增强子控制下的抗原盒代替缺失的E1序列。

[0660] 293F细胞中的腺病毒产生

[0661] ChAdV68病毒产生在293F细胞中进行,所述细胞在293FreeStyle™(ThermoFisher)培养基中在8%CO_2的孵育箱中生长。在感染当天,细胞被稀释至每毫升10^6个细胞,具有98%的存活率并且每次生产操作在1L摇瓶(Corning)中使用400mL。每次感染使用4mL的目标MOI>3.3的三级病毒原液。将细胞孵育48-72小时,直到通过台盼蓝测量的存活率<70%。然后通过离心、全速台式离心机收获受感染细胞并在1XPBS中洗涤,重新离心,然后重悬在20mL的10mM Tris pH7.4中。通过冻融3次来裂解细胞团块并通过在4,300Xg下离心5分钟来澄清。

[0662] 通过CsCl离心进行腺病毒纯化

[0663] 通过CsCl离心使病毒DNA纯化。执行两次不连续梯度操作。第一次是从细胞组分中纯化出病毒并且第二次是从细胞组分进一步优化分离并且将缺陷性粒子与感染性粒子分离。

[0664] 将10mL的1.2(26.8g CsCl溶解于92mL的10mM Tris pH 8.0中)CsCl添加至异质同晶聚合物管中。然后,小心地添加8mL的1.4CsCl(53g CsCl溶解于87mL的10mM Tris pH 8.0中),使用移液管递送至管底部。将澄清的病毒小心地铺在所述1.2层的顶部上。如果需要,再添加10mM Tris以使各管平衡。然后将管置于SW-32Ti旋转器中并在10℃下离心2小时30分钟。然后将管移至层流柜中并且使用18号针和10mL注射器抽吸病毒带。注意避免取出污染性宿主细胞DNA和蛋白质。然后用10mM Tris pH 8.0将所述带稀释至少2倍并如前所述铺在如上所述的不连续梯度上。如前所述进行操作,然而,此时进行所述操作过夜。第二天,小心抽吸所述带以避免抽吸出任何缺陷性粒子带。然后使用Slide-a-LyzerT™盒(Pierce)针对ARM缓冲液(20mM Tris pH 8.0、25mM NaCl、2.5%甘油)透析病毒。进行此操作3次,每次更换缓冲液保持1小时。然后将病毒等分以在-80℃下储存。

[0665] 腺病毒病毒测定

[0666] 基于1.1×10^{12}个病毒颗粒(VP)的消光系数相当于在OD260nm下的吸光度值1,通过使用OD 260测定来确定VP浓度。在病毒裂解缓冲液(0.1%SDS、10mM Tris pH 7.4、1mM EDTA)中制备腺病毒的两种稀释液(1:5和1:10)。一式两份测量所述两种稀释液中的OD并通过用OD260值乘以稀释因子乘以1.1×10^{12}VP来测量每毫升VP浓度。

[0667] 利用病毒原液的限制性稀释测定来计算感染单位(IU)滴度。病毒起初在DMEM/5%NS/1X PS中稀释100倍并且然后使用10倍稀释法随后稀释至1×10^{-7}。然后,将100μL这些稀释液添加至在之前至少一小时以3e5个细胞/孔接种于24孔板中的293A细胞中。一式两份地执行此操作。将板在37℃下在CO2(5%)孵育箱中孵育48小时。然后用1XPBS洗涤细胞,并且然后用100%冷甲醇(-20℃)固定。将板然后在-20℃孵育最少20分钟。用1XPBS洗涤各孔,然后在室温下在1XPBS/0.1%BSA中封闭1小时。添加兔抗Ad抗体(Abcam,Cambridge,MA)于封闭缓冲液中的1:8,000稀释液(每孔0.25ml)并在室温下孵育1小时。用每孔0.5mL PBS洗涤各孔4次。每孔添加1000倍稀释的HRP缀合的山羊抗兔抗体(Bethyl Labs,Montgomery Texas)并孵育1小时,然后进行最后一轮洗涤。进行5次PBS洗涤并使用于含0.01%H_2O_2的Tris缓冲盐水中的二氨基联苯胺四盐酸盐(Diaminobenzidine tetrahydrochloride,DAB)

底物(0.67mg/mL DAB于50mM Tris pH 7.5、150mM NaCl)使所述板显色。使各孔显色5分钟，然后计数。使用产生每个视野4-40个经染色细胞的稀释液，在10X物镜下对细胞计数。所用视野是0.32mm^2栅格，其中相当于在24孔板上每个视野有625个栅格。可通过每个栅格中经染色细胞的数量乘以每个视野的栅格数量乘以稀释因子10来确定每毫升中感染性病毒的数量。类似地，当用GFP表达细胞操作时，可使用荧光而非衣壳染色来确定每毫升中GFP表达病毒粒子的数量。

[0668] XIV.C.使用ChAdV68载体在小鼠中进行疫苗功效评价

[0669] 评价了含有编码SARS-CoV-2刺突的盒的疫苗的高剂量和低剂量的功效。通过监测T细胞应答来评估功效。

[0670] 免疫

[0671] 对于Balb/c小鼠中的ChAdV68疫苗，100uL体积中的$5x10^8$或$1x10^{10}$个病毒颗粒(VP)作为双侧肌肉内注射(每条腿50uL)施用。

[0672] 脾细胞解离

[0673] 免疫后14天分离脾细胞。将每只小鼠的脾脏汇集于3mL完全RPMI(RPMI、10％FBS、青霉素/链霉素)中。使用gentleMACS解离器(Miltenyi Biotec)，遵循制造商的方案进行机械解离。通过40微米过滤器过滤解离的细胞并用ACK裂解缓冲液(150mM NH_4Cl、10mM $KHCO_3$、0.1mM Na_2EDTA)裂解红细胞。再次通过30微米过滤器过滤细胞并且然后使其重悬于完全RPMI中。在Cytoflex LX(Beckman Coulter)上使用碘化丙锭染色对细胞计数以排除死亡和细胞凋亡的细胞。然后将细胞调整至适当活细胞浓度以供后续分析。

[0674] 离体酶联免疫斑点(ELISpot)分析

[0675] ELISPOT分析是根据ELISPOT统一准则{DOI:10.1038/nprot.2015.068}，利用小鼠IFNg ELISpotPLUS试剂盒(MABTECH)进行的。在包被有IFNg抗体的96孔板中将5×10^4个脾细胞用10uM跨越刺突抗原的重叠肽池(15个氨基酸长，11个氨基酸重叠)离体刺激16小时。使用碱性磷酸酶使斑点显色。对反应定时10分钟并通过用自来水流过板终止反应。使用AID vSpot读取仪谱图对斑点计数。对于ELISPOT分析，将饱和度＞50％的孔记录为“太多而无法计数”。将重复孔的偏差＞10％的样品从分析中排除。然后，使用下式，针对孔汇合校正斑点计数：斑点计数+2x(斑点计数x汇合％/[100％-汇合％])。通过用抗原刺激的孔减去阴性肽刺激孔中的斑点计数来校正阴性背景。最后，将标记为太多而无法计数的孔设定成最高观测校正值，四舍五入至最接近的百分数。

[0676] 结果

[0677] 用含有编码SARS-CoV-2刺突蛋白(“CMV-刺突-SV40”SEQ ID NO:69;使用IDT算法优化刺突蛋白序列;nb，初始实验盒含有单个D1153G错义突变)的修饰ChAdV68载体(基于chAd68-空-E4缺失”的载体骨架，SEQ ID NO:75)对小鼠进行免疫。通过IFNγELISpot评估T细胞对跨越刺突蛋白的两个肽池的应答的功效。如图8A所示，与来自首次试验的小鼠的脾细胞相比，使用刺突编码ChAdV68载体进行免疫证明T细胞对刺突肽的应答呈剂量依赖性增加(左图-每个单独肽池的每10^6个脾细胞的SFC;右图-两个肽池的总应答的每10^6个脾细胞的SFC)。

[0678] XIV.D.使用SAM载体在小鼠中进行疫苗功效评价

[0679] 评价了含有编码SARS-CoV-2 MHC表位编码盒和/或全长SARS-CoV-2蛋白(例如，参

见表4)的疫苗的功效。通过监测T细胞和/或B细胞应答来评估功效。

[0680] 免疫

[0681] 对于SAM疫苗,100uL体积中的1或10ug RNA-LNP复合物作为双侧肌肉内注射(每条腿50uL)施用。

[0682] 研究组在下表5A中进行了描述。

[0683] 表5A-用于SAM评价的鼠SARS-CoV-2研究组

[0684]

SAM 载体	动物品系和数目	剂量	治疗时间表	免疫读出
SAM-刺突 SAM-刺突-膜 SAM-刺突-T 细胞表位	BALB/c N=10/组 5 只雄性，5 只雌性	1 ug 和 10 ug	第 0 天	第 0 天、第 14 天、第 28 天、第 41 天、第 56 天、第 70 天的血清：抗刺突和抗膜 IgG (ELISA) 和刺突 nAb
SAM-刺突 SAM-刺突-膜 SAM-刺突-T 细胞表位				在第 12-14 天收获脾脏： 利用与刺突和膜的 OLP 根据 ELISpot 和 ICS 的 T 细胞应答
SAM-刺突-T 细胞表位 SAM- T 细胞表位	HLA-A2/A11 转基因小鼠 N=6/组	10 ug	第 0 天	在第 12-14 天收获脾脏： 利用与刺突和 T 细胞表位的 OLP 根据 ELISpot 和 ICS 的 T 细胞应答

[0685]

[0686] 脾细胞解离

[0687] 免疫后2周和10周分离脾细胞。将每只小鼠的脾脏汇集于3mL完全RPMI(RPMI、10%FBS、青霉素/链霉素)中。使用gentleMACS解离器(Miltenyi Biotec),遵循制造商的方案进行机械解离。通过40微米过滤器过滤解离的细胞并用ACK裂解缓冲液(150mM NH_4Cl、10mM $KHCO_3$、0.1mM Na_2EDTA)裂解红细胞。再次通过30微米过滤器过滤细胞并且然后使其重悬于完全RPMI中。在Cytoflex LX(Beckman Coulter)上使用碘化丙锭染色对细胞计数以排除死亡和细胞凋亡的细胞。然后将细胞调整至适当活细胞浓度以供后续分析。

[0688] 离体酶联免疫斑点(ELISpot)分析

[0689] ELISPOT分析是根据ELISPOT统一准则{DOI:10.1038/nprot.2015.068},利用小鼠IFNg ELISpotPLUS试剂盒(MABTECH)进行。在包被有IFNg抗体的96孔板中将5×10^4个脾细胞与10uM跨越整个目标抗原的重叠肽池("OLP";15聚体,11个氨基酸重叠)一起孵育16小时。使用碱性磷酸酶使斑点显色。对反应定时10分钟并通过用自来水流过板终止反应。使用AID vSpot读取仪谱图对斑点计数。对于ELISPOT分析,将饱和度>50%的孔记录为"太多而无法计数"。将重复孔的偏差>10%的样品从分析中排除。然后,使用下式,针对孔汇合校正斑点计数:斑点计数+2x(斑点计数x汇合%/[100%-汇合%])。通过用抗原刺激的孔减去阴性肽刺激孔中的斑点计数来校正阴性背景。最后,将标记为太多而无法计数的孔设定成最高观测校正值,四舍五入至最接近的百分数。

[0690] 离体细胞内细胞因子染色(ICS)和流式细胞术分析

[0691] 将2-5×10^6个细胞/毫升密度的新鲜分离的淋巴细胞与10uM跨越整个目标抗原的重叠肽池(15聚体,11个氨基酸重叠)一起孵育2小时。两小时后,添加布雷菲尔德菌素A(brefeldin A)达到5ug/ml浓度并且将细胞与刺激剂一起再孵育4小时。刺激后,用可固定的活力染料eFluor780,根据制造商的方案标记活细胞,并用以1:400稀释的抗CD8APC(克隆53-6.7,BioLegend)染色。对于细胞内染色,使用1:100的抗IFNg PE(克隆XMG1.2,BioLegend)。还对细胞进行了CD4、TNFα、IL-2、IL-4、IL-10和颗粒酶-B染色。将样品收集在Cytoflex LX(Beckman Coulter)上。使用FlowJo标绘流式细胞术数据并分析。为了评估抗原特异性应答的程度,计算应答于每个肽池的染色细胞的百分比。

[0692] 抗体滴度

[0693] 对于抗体应答监测,每两周采集一次血液。如J.Yu等人(Science 10.1126/science.Abc6284(2020),其出于所有目的通过引用并入本文)所述,测定血清中的抗体滴度。

[0694] 结果

[0695] 用含有编码SARS-CoV-2刺突蛋白(SEQ ID NO:59,IDT优化序列)、膜蛋白(SEQ ID NO:61)和/或SARS-CoV-2MHC表位编码盒(SEQ ID NO:58)的SAM载体对小鼠进行免疫。通过IFNγELISpot评估T细胞对跨越刺突蛋白的两个肽池的应答的功效。如图8B和图8C所示(在表7中量化),与来自首次试验小鼠的脾细胞相比,使用刺突编码SAM载体进行免疫证明T细胞对刺突肽的应答呈剂量依赖性增加(图8A-每个单独的肽池每10^6个脾细胞的SFC;图8B-两个肽池的组合应答的每10^6个脾细胞的SFC)。此外,如下表8所示,用SAM-刺突免疫证明抗体滴度增加,并且特别是中和抗体("Nab")滴度增加。值得注意的是,在从SARS-CoV-2中恢复的27名共病期人类(中值滴度93)的队列中,Nab滴度的量值与Nab滴度相当[J.Yu等人,(Science 10.1126/science.Abc6284(2020)]。因此,结果表明用编码SARS-CoV-2衍生抗原、并且特别是SARS-CoV-2刺突的SAM载体进行疫苗接种,证明了T细胞和B细胞免疫应答。

[0696] 表7-SAM疫苗接种小鼠的细胞免疫应答

[0697]

SAM-SARS-CoV-2 疫苗	小鼠品系	剂量 (ug)	OLP	每 1x10⁶ 个脾细胞的平均 SFC	SD
SAM-刺突	BALB/c	10	刺突	8560	1195
SAM-刺突	BALB/c	1	刺突	7734	2079
SAM-刺突	BALB/c	10	刺突	25033	8722
SAM-刺突	BALB/c	1	刺突	8605	1861
SAM-刺突-膜	BALB/c	10	刺突	19741	5141
SAM-刺突-膜	BALB/c	1	刺突	8212	2093
SAM-刺突-膜	BALB/c	10	膜	93	42
SAM-刺突-膜	BALB/c	1	膜	129	56
SAM-刺突	BALB/c	10	刺突	9798	5434
SAM-刺突	BALB/c	1	刺突	3578	1881
SAM-刺突-T 细胞表位	BALB/c	10	刺突	3484	1849
SAM-刺突-T 细胞表位	BALB/c	1	刺突	1529	466
SAM-刺突-T 细胞表位	HLA-A2	10	刺突	8273	2351
SAM-刺突-T 细胞表位	HLA-A11	10	刺突	7175	734

[0698]

SAM-刺突-T 细胞表位	HLA-A2	10	T 细胞表位	2717	443
SAM-刺突-T 细胞表位	HLA-A11	10	T 细胞表位	2621	664
SAM-T 细胞表位	HLA-A2	10	T 细胞表位	1474	836
SAM-T 细胞表位	HLA-A11	10	T 细胞表位	748	371

[0699] 表8-SAM疫苗接种小鼠的体液免疫应答

[0700]

SAM-SARS-CoV-2 疫苗	小鼠品系	剂量 (ug)	血清采集时间(周)	中值终点滴度	中值假病毒 Nab 滴度
SAM-刺突	BALB/c	10	4	26380	96.5
SAM-刺突	BALB/c	10	6	22953	129
SAM-刺突-膜	BALB/c	10	4	6849	43
SAM-T 细胞表位	BALB/c	10	4	2555	26

[0701] XIV.E.1小鼠中的疫苗功效评价

[0702] 评价含有编码SARS-CoV-2 MHC表位编码盒和/或全长SARS-CoV-2蛋白(例如,参见表4)的疫苗的功效。通过监测T细胞和/或B细胞应答来评估功效。

[0703] 免疫

[0704] 对于Balb/c小鼠中的SAM疫苗,100uL体积中的1或10ug RNA-LNP复合物,双侧肌肉内注射(每条腿50uL)。

[0705] 对于Balb/c小鼠中的ChAdV68疫苗,100uL体积中的$5x10^8$个或$1x10^{10}$个病毒颗粒(VP)作为双侧肌肉内注射(每条腿50uL)施用。

[0706] 小鼠在第6周接受初始初免剂量和随后的加强剂量。使用同源SAM疫苗接种策略、同源ChAdV68疫苗接种策略或异源ChAdV68/SAM疫苗接种策略(ChAdV68初免;SAM加强)对小鼠进行免疫。

[0707] 代表性研究组描述于下表5B中。

[0708] 表5B-鼠SARS-CoV-2研究组

[0709]

载体	动物品系和数目	剂量	治疗时间表	免疫读出
ChAd-刺突	Balb/C N=10/组 5只雄性,5只雌性	1×10^{10} vp 和 5×10^{8} vp	第0天	第0天、第14天、第28天的血清：抗刺突和抗膜IgG (ELISA)和刺突nAb
ChAd-刺突-膜				
ChAd-刺突-T 细胞表位				
ChAd-刺突				在第12天收获脾脏：利用与刺突和膜的OLP根据ELISpot和ICS的T细胞应答
ChAd-刺突-膜				
ChAd-刺突-T 细胞表位				
ChAd-刺突-膜	老年 Balb/c (12至14个月) N=10/组 5只雄性,5只雌性	1×10^{10} vp	第0天	第0天和第14天的血清：抗刺突和抗膜 IgG (ELISA)和刺突nAb
ChAd-刺突-T 细胞表位				
ChAd-刺突-膜				在第12天收获脾脏：利用与刺突和膜的OLP根据ELISpot和ICS的T细胞应答
ChAd-刺突-T 细胞表位				

[0710] 脾细胞解离

[0711] 免疫后2周和8周分离脾细胞。将每只小鼠的脾脏汇集于3mL完全RPMI(RPMI、10％FBS、青霉素/链霉素)中。使用gentleMACS解离器(Miltenyi Biotec)，遵循制造商的方案进行机械解离。通过40微米过滤器过滤解离的细胞并用ACK裂解缓冲液(150mM NH_4Cl、10mM $KHCO_3$、0.1mM Na_2EDTA)裂解红细胞。再次通过30微米过滤器过滤细胞并且然后使其重悬于完全RPMI中。在Cytoflex LX(Beckman Coulter)上使用碘化丙锭染色对细胞计数以排除死亡和细胞凋亡的细胞。然后将细胞调整至适当活细胞浓度以供后续分析。

[0712] 离体酶联免疫斑点(ELISpot)分析

[0713] ELISPOT分析是根据ELISPOT统一准则{DOI:10.1038/nprot.2015.068}，利用小鼠IFNg ELISpotPLUS试剂盒(MABTECH)进行。在包被有IFNg抗体的96孔板中将5×10^{4}个脾细胞与10uM跨越整个目标抗原的重叠肽池(15聚体，11个氨基酸重叠)一起孵育16小时。使用碱性磷酸酶使斑点显色。对反应定时10分钟并通过用自来水流过板终止反应。使用AID vSpot读取仪谱图对斑点计数。对于ELISPOT分析，将饱和度＞50％的孔记录为“太多而无法计数”。将重复孔的偏差＞10％的样品从分析中排除。然后，使用下式，针对孔汇合校正斑点计数：斑点计数+2x(斑点计数x汇合％/[100％-汇合％])。通过用抗原刺激的孔减去阴性肽刺激孔中的斑点计数来校正阴性背景。最后，将标记为太多而无法计数的孔设定成最高观测校正值，四舍五入至最接近的百分数。

[0714] 离体细胞内细胞因子染色(ICS)和流式细胞术分析

[0715] 将2-5×10^{6}个细胞/毫升密度的新鲜分离的淋巴细胞与10uM跨越整个目标抗原的重叠肽池(15聚体，11个氨基酸重叠)一起孵育2小时。两小时后，添加布雷菲尔德菌素A达到5ug/ml浓度并且将细胞与刺激剂一起再孵育4小时。刺激后，用可固定的活力染料eFluor780，根据制造商的方案标记活细胞，并用以1:400稀释的抗CD8 APC(克隆53-6.7，BioLegend)染色。对于细胞内染色，使用1:100的抗IFNg PE(克隆XMG1.2，BioLegend)。还对

细胞进行了CD4、TNFα、IL-2、IL-4、IL-10和颗粒酶-B染色。将样品收集在Cytoflex LX (Beckman Coulter)上。使用FlowJo标绘流式细胞术数据并分析。为了评估抗原特异性应答的程度,计算应答于每个肽池的染色细胞的百分比。

[0716] 抗体滴度

[0717] 对于抗体应答监测,每两周采集一次血液。血清中的抗体滴度(IgG、IgM)是针对刺突和膜蛋白测定的。确定IgG1/IgG2同种型以评估Th1极化。还评估了抗体介导的中和作用。

[0718] 老年小鼠模型

[0719] 用于SARS-CoV-1评价的老年小鼠模型(Bolles 2011)用于评估T细胞免疫原性、B细胞应答和抗体介导的中和作用。对于Balb/c小鼠中的ChAdV68疫苗,100uL体积中的$1x10^{10}$个病毒颗粒(VP)作为双侧肌肉内注射(每条腿50uL)施用。对于老年BALB/c小鼠中的SAM疫苗,100uL体积中的10ug SAM-LNP作为双侧肌肉内注射(每条腿50uL)施用。

[0720] 结果

[0721] 如上所述,对小鼠进行免疫。小鼠中的功效研究如图9所示。根据疫苗设计,含有编码SARS-CoV-2 MHC表位编码盒和/或全长SARS-CoV-2蛋白的盒的疫苗显示出T细胞和B细胞免疫应答两者。还确定了CD4、CD8、Th1和Th2极化。

[0722] XIV.E.2在非人类灵长类动物中的疫苗功效评价

[0723] 评价了含有编码SARS-CoV-2 MHC表位编码盒和/或全长SARS-CoV-2蛋白(例如,参见表4)的疫苗的功效和安全性。通过监测T细胞和/或B细胞应答来评估功效。

[0724] 免疫

[0725] 对于Mamu-A*01印度恒河猴中的SAM疫苗,SAM作为双侧肌肉内注射施用到股四头肌中,剂量为每只动物总共1mg,每条腿1mL。

[0726] 对于Mamu-A*01印度恒河猴中的ChAdV68疫苗,ChAdV68与$1x10^{12}$个病毒颗粒(每次注射$5x10^{11}$个病毒颗粒)一起双侧施用。

[0727] 恒河猴中的免疫监测

[0728] 对于免疫监测,将10-20mL的血液采集到含有肝素的真空采血管中,并保持在室温下直至分离。使用淋巴细胞分离介质(LSM)和Leucosep分离管通过密度梯度离心分离PBMC。PBMC用碘化丙锭染色,并使用Cytoflex LX(Beckman Coulter)对活细胞计数。然后将样品以$4x10^{6}$个细胞/毫升重悬于RPMI完全(10% FBS)中。

[0729] IFNγELISPOT测定使用预包被的96孔板(MAbtech,猴IFNγELISPOT PLUS,ALP(试剂盒批号36,板批号19))按照制造商的方案进行。对于每个样品和刺激物,每孔$1x10^{5}$个PBMC一式三份与10ug/mL肽刺激物(GenScript)一起涂铺,并在完全RPMI中孵育过夜。将样品与和刺突、膜或T细胞表位重叠的肽池或仅DMSO一起孵育过夜。重叠池(GenScript)由15个氨基酸长肽组成,有11个氨基酸重叠,跨越每个蛋白质(刺突、膜、核衣壳)或EDGE确定的表位延伸。每个池被分成各自最多60个肽的小池。DMSO仅用作每个样品的阴性对照。用PBS洗涤板并与抗猴IFNγMAb生物素(MAbtech)一起孵育两小时,接着再次洗涤并与链霉亲和素-ALP(MAbtech)一起孵育一小时。最后一次洗涤后,将板与BCIP/NBT(MAbtech)一起孵育十分钟以使免疫斑点显色并在37℃下干燥过夜。使用AID读取仪(Autoimmun Diagnostika)对斑点进行成像和计数。

[0730] 重复孔变异性(变异性=方差/[中位数+1])大于10且中位数大于10的样品被排除

在外。斑点值根据孔饱和度根据下式进行调整:调整斑点＝原始斑点+2*(原始斑点*饱和度/[100-饱和度])。孔饱和度大于33％的孔被认为“太多而无法计数”(TNTC)并被排除在外。每个样品的背景校正是通过减去阴性对照肽孔的平均值来进行的。通过将校正的斑点数乘以$1x10^6$/涂铺细胞数,将数据相对于每$1x10^6$个PBMC的斑点形成集落(SFC)进行归一化。对于总体总结分析,使用通过以$1x10^5$个细胞/孔涂铺细胞产生的计算值,除非当样品是TNTC时,在这种情况下,以$2.5x10^4$个细胞涂铺细胞产生的值用于该特定样品/刺激物/时间点。使用R编程语言执行数据处理。

[0731] 还进行了细胞内细胞因子测定。PBMC以每孔$1x10^6$个细胞分布到v形底96孔板中。将细胞沉淀并重悬于100μl含有与刺突、膜或EDGE预测的T细胞表位的重叠的上述肽池的完全RPMI中。DMSO用作每个样品的阴性对照。1小时后加入布雷菲尔德菌素A(Biolegend)至最终浓度为5μg/mL,并且将细胞孵育过夜。活力染色后,在FACS缓冲液(PBS+2％FBS+2mM EDTA)中进行细胞外染色。使用eBiosciences固定/透化溶液试剂盒对细胞进行洗涤、固定和透化。进行细胞内染色。评估样品的活力、CD3、CD4、CD8、IFNγ、TNFa、IL-2、穿孔素(Perforin)、CD107a、CCR7和CD45RA。

[0732] 还监测了血清细胞因子标志物。血清细胞因子和趋化因子水平用标准多重测定法测量。在疫苗接种后0小时(基线)、2小时、8小时和48小时采集血清并进行标志物分析。评估的细胞因子是白细胞介素-1β(IL-1β)、白细胞介素-1(IL-10)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)、干扰素γ(IFN-γ)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、干扰素γ诱导蛋白10(IP-10)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、巨噬细胞炎症蛋白1β(MIP-1β)和IFN-α(干扰素-α2a)。

[0733] 测定血清抗体滴度和中和抗体滴度。

[0734] 结果

[0735] 如上所述,NHP被免疫。根据疫苗设计,含有编码SARS-CoV-2 MHC表位编码盒和/或全长SARS-CoV-2蛋白的疫苗显示出T细胞和B细胞免疫应答两者。疫苗策略还导致中和抗体产生。

[0736] XIV.F.刺突蛋白序列优化

[0737] 在ChAdV68疫苗载体中评价了编码刺突蛋白的各种序列优化的核苷酸序列。

[0738] 刺突序列的序列优化

[0739] 通过取代同义密码子对来自SARS-CoV-2分离株NC_045512.2的刺突核苷酸序列(SEQ ID NO:78)进行序列优化,使得氨基酸序列不受影响。IDT算法用于增强人类中的表达并降低复杂性以帮助合成(参见例如SEQ ID NO:66-74)。使用两种另外的算法对刺突序列进行额外的序列优化;(1)使用SGI DNA(La Jolla,CA)生成的单个序列(SEQ ID NO:87);(2)使用COOL生成的6条序列,分别命名为CT1、CT20、CT56、CT83、CT131和CT 199(SEQ ID NO:79-84)(COOL算法生成多条序列并选择了6条)。每条的序列呈现于表6中。

[0740] 在来自用ChAdV68病毒感染或用ChAdV68基因组DNA转染的293A细胞的cDNA中鉴定出剪接事件。具体来说,使用Qiagen的RNeasy柱纯化来自10e5-10e6个细胞的总RNA。通过DNA酶处理去除残留的DNA,并使用SuperScriptIV逆转录酶(Thermo)产生cDNA。随后,使用对Gritstone ChAdV68盒的5′UTR和3′UTR有特异性的引物生成PCR产物,通过琼脂糖凝胶电泳分析,凝胶纯化和进行Sanger测序以识别通过剪接缺失的区域。

[0741] 通过破坏核苷酸序列基序而不干扰氨基酸序列的定点诱变去除剪接供体位点。诱变是通过将上述突变合并到PCR引物中，平行扩增几个片段，并在所述片段上运行Gibson组装(重叠30-60nt)来完成的。优化的克隆CT1-2C(SEQ ID NO:85)在突变的NT385和NT539处具有Sanger序列鉴定的剪接供体基序，并且克隆IDT-4C(SEQ ID NO:86)在NT385、NT539处具有Sanger序列鉴定的剪接供体基序，并在突变的NT2003和NT2473处具有预测供体基序。此外，在IDT-4C克隆中，nt 445处可能的聚腺苷酸化位点AATAAA突变为AAcAAA。

[0742] 所描述的序列呈现于表6中。

[0743] 表6:序列优化的刺突序列

[0744]

刺突序列	核酸序列	SEQ ID NO:
刺突原生；NC_045512.2严重急性呼吸系统综合征冠	atgtttgtttttcttgttttattgccactagtctctagtcagtgtgttaatcttacaacc agaactcaattacccccctgcatacactaattctttcacacgtggtgtttattaccct gacaaagttttcagatcctcagttttacattcaactcaggacttgttcttacctttctt ttccaatgttacttggttccatgctatacatgtctctgggaccaatggtactaaga ggtttgataaccctgtcctaccatttaatgatggtgtttattttgcttccactgagaa	78

[0745]

状病毒 2 分离株 SARS-CoV-2 分 离 株 NC_045512.2	gtctaacataataagaggctggatttttggtactactttagattcgaagacccagt ccctacttattgttaataacgctactaatgttgttattaaagtctgtgaatttcaatttt gtaatgatccatttttgggtgtttattaccacaaaaacaacaaaagttggatggaa agtgagttcagagtttattctagtgcgaataattgcacttttgaatatgtctctcag ccttttcttatggaccttgaaggaaaacagggtaatttcaaaaatcttagggaatt tgtgtttaagaatattgatggttatttttaaaatatattctaagcacacgcctattaatt tagtgcgtgatctccctcagggtttttcggctttagaaccattggtagatttgcca ataggtattaacatcactaggtttcaaactttacttgctttacatagaagttatttga ctcctggtgattcttcttcaggttggacagctggtgctgcagcttattatgtgggtt atcttcaacctaggacttttctattaaaatataatgaaaatggaaccattacagat gctgtagactgtgcacttgaccctctctcagaaacaaagtgtacgttgaaatcct tcactgtagaaaaaggaatctatcaaacttctaactttagagtccaaccaacaga atctattgttagatttcctaatattacaaacttgtgccctttttggtgaagtttttaacg ccaccagatttgcatctgtttatgcttggaacaggaagagaatcagcaactgtgt tgctgattattctgtcctatataattccgcatcattttccacttttaagtgttatggagt gtctcctactaaattaaatgatctctgctttactaatgtctatgcagattcatttgtaa ttagaggtgatgaagtcagacaaatcgctccagggcaaactggaaagattgct gattataattataaattaccagatgattttacaggctgcgttatagcttggaattcta acaatcttgattctaaggttggtggtaattataattacctgtatagattgtttaggaa gtctaatctcaaacctttgagagagatatttcaactgaaatctatcaggccggta gcacaccttgtaatggtgttgaaggttttaattgttactttcctttacaatcatatggt ttccaacccactaatggtgttggttaccaaccatacagagtagtagtactttctttt gaacttctacatgcaccagcaactgtttgtggacctaaaaagtctactaatttggt taaaaacaaatgtgtcaatttcaacttcaatggtttaacaggcacaggtgttctta ctgagtctaacaaaaagtttctgcctttccaacaatttggcagagacattgctga cactactgatgctgtccgtgatccacagacacttgagattcttgacattacacca tgttcttttggtggtgtcagtgttataacaccaggaacaaatacttctaaccaggtt gctgttctttatcaggatgttaactgcacagaagtccctgttgctattcatgcagat caacttactcctacttggcgtgtttattctacaggttctaatgtttttcaaacacgtg caggctgtttaatagggggctgaacatgtcaacaactcatatgagtgtgacatac ccattggtgcaggtatatgcgctagttatcagactcagactaattctcctcggcg ggcacgtagtgtagctagtcaatccatcattgcctacactatgtcacttggtgca gaaaattcagttgcttactctaataactctattgccatacccacaaattttactatta gtgttaccacagaaattctaccagtgtctatgaccaagacatcagtagattgtac aatgtacatttgtggtgattcaactgaatgcagcaatcttttgttgcaatatggca gtttttgtacacaattaaaccgtgctttaactggaatagctgttgaacaagacaaa aacacccaagaagtttttgcacaagtcaaacaaatttacaaaacaccaccaatt aaagattttggtggtttttaatttttcacaaatattaccagatccatcaaaaccaagc aagaggtcatttattgaagatctacttttcaacaaagtgacacttgcagatgctg gcttcatcaaacaatatggtgattgccttggtgatattgctgctagagacctcattt gtgcacaaaagtttaacggccttactgttttgccacctttgctcacagatgaaatg attgctcaatacacttctgcactgttagcgggtacaatcacttctggttggacctt ggtgcaggtgctgcattacaaataccatttgctatgcaaatggcttataggtttaa tggtattggagttacacagaatgttctctatgagaaccaaaaattgattgccaac caatttaatagtgctattggcaaaattcaagactcactttcttccacagcaagtgc acttggaaaacttcaagatgtggtcaaccaaaatgcacaagctttaaacacgct tgttaaacaacttagctccaattttggtgcaatttcaagtgttttaaatgatatccttt cacgtcttgacaaagttgaggctgaagtgcaaattgataggttgatcacaggca gacttcaaagtttgcagacatatgtgactcaacaattaattagagctgcagaaat cagagcttctgctaatcttgctgctactaaaatgtcagagtgtgtacttggacaat	

	caaaaagagttgatttttgtggaaagggctatcatcttatgtccttccctcagtca gcacctcatggtgtagtcttcttgcatgtgacttatgtccctgcacaagaaaaga acttcacaactgctcctgccatttgtcatgatggaaaagcacactttcctcgtga aggtgtctttgtttcaaatggcacacactggtttgtaacacaaaggaatttttatga accacaaatcattactacagacaacacatttgtgtctggtaactgtgatgttgtaa taggaattgtcaacaacacagtttatgatcctttgcaacctgaattagactcattc aaggaggagttagataaatattttaagaatcatacatcaccagatgttgatttag gtgacatctctggcattaatgcttcagttgtaaacattcaaaaagaaattgaccg cctcaatgaggttgccaagaatttaaatgaatctctcatcgatctccaagaactt ggaaagtatgagcagtatataaaatggccatggtacatttggctaggttttatag ctggcttgattgccatagtaatggtgacaattatgctttgctgtatgaccagttgct gtagttgtctcaagggctgttgttcttgtggatcctgctgcaaatttgatgaagac gactctgagccagtgctcaaaggagtcaaattacattacacataa	
优化的刺突CT1	ATGTTTGTCTTCCTGGTCTTGCTGCCGCTGGTGA GCAGCCAGTGCGTGAATCTCACCACCCGCACCC AGCTTCCACCTGCCTACACTAACAGCTTCACCC GAGGGGTGTATTACCCTGACAAGGTATTCCGGT CCTCCGTCCTCCATAGCACGCAGGACCTTTTTCT GCCCTTCTTCTCAAATGTGACATGGTTCCATGC CATTCACGTGAGCGGCACGAATGGAACGAAGC GCTTTGATAACCCCGTGCTGCCTTTCAATGACG GCGTCTACTTCGCCTCCACTGAAAAGTCAAACA TCATCCGGGGCTGGATCTTTGGCACCACTCTTG ATTCAAAGACCCAGTCACTGCTGATTGTGAACA ATGCTACAAACGTGGTTATCAAGGTGTGTGAGT TTCAGTTCTGTAACGATCCATTTTTGGGAGTGT ACTACCACAAGAACAACAAGTCCTGGATGGAG TCTGAGTTCAGAGTGTATAGCTCTGCTAACAAC TGCACCTTCGAGTACGTGTCCCAGCCTTTCCTTA TGGACCTGGAAGGCAAACAGGGCAATTTCAAA AACCTGAGAGAGTTCGTGTTTAAGAACATTGAC GGATACTTCAAAATTTATTCTAAGCACACACCA ATTAACTTAGTGCGGGACCTACCCCAAGGCTTT AGCGCCCTAGAGCCCCTGGTTGACCTGCCCATT GGGATCAATATAACAAGGTTCCAAACTCTACTG GCTCTGCATAGAAGTTATCTGACCCCAGGAGAC AGCTCTAGTGGTTGGACCGCCGGCGCAGCAGCC TACTATGTCGGGTACTTACAGCCACGCACGTTC CTTCTGAAGTACAATGAGAACGGGACAATCACT GACGCAGTAGACTGTGCACTGGACCCGCTAAG CGAGACTAAGTGCACACTTAAATCCTTCACGGT GGAGAAAGGCATTTATCAGACCTCTAACTTCAG GGTGCAGCCAACAGAAAGCATTGTGCGATTCCC AAATATTACTAATCTTTGCCCTTTCGGGGAGGT CTTTAATGCAACTAGATTCGCATCAGTCTATGC GTGGAACCGCAAACGCATTTCCAATTGTGTCGC AGACTACTCAGTGCTGTACAACTCTGCCTCTTT CAGTACGTTCAAGTGTTACGGAGTGTCACCCAC TAAACTGAACGACCTGTGCTTTACAAATGTCTA CGCTGACTCCTTCGTGATTAGGGGAGACGAGGT	79

[0746]

[0747]

GAGACAAATTGCCCCCGGACAGACTGGGAAGA
TTGCCGACTACAATTATAAGCTTCCTGATGATT
TCACTGGCTGTGTTATTGCCTGGAATAGTAACA
ATCTGGATAGCAAGGTGGGAGGCAACTATAAC
TACTTATATCGACTGTTTAGGAAGAGTAATCTG
AAACCATTTGAGCGGGATATTTCCACAGAAATT
TACCAGGCCGGGAGCACACCATGTAATGGGGT
GGAGGGATTTAATTGTTACTTCCCACTCCAGAG
CTATGGTTTCCAACCCACCAATGGAGTGGGTTA
CCAGCCCTATAGAGTCGTGGTGCTTAGTTTTGA
GCTGCTTCACGCCCCAGCAACCGTCTGCGGTCC
CAAAAAGTCGACCAATCTCGTGAAAAACAAAT
GCGTAAACTTCAACTTTAACGGCTTAACAGGAA
CCGGCGTGCTCACCGAAAGCAACAAGAAATTC
CTTCCATTTCAGCAATTCGGAAGGGACATCGCC
GACACAACAGACGCGGTGAGGGACCCACAGAC
TCTGGAGATACTGGACATCACTCCTTGTTCGTTT
GGGGGCGTCTCGGTCATCACACCCGGGACTAAT
ACTAGTAATCAGGTAGCAGTTTTATATCAAGGC
GTCAACTGTACCGAAGTACCTGTGGCCATACAC
GCTGATCAGCTAACGCCAACATGGCGAGTCTAT
TCCACCGGCTCTAACGTTTTTCAGACCAGGGCT
GGGTGCCTGATAGGGGCAGAGCACGTCAATAA
TTCCTATGAGTGTGATATCCCCATAGGTGCGGG
GATCTGTGCCAGCTATCAAACCCAAACCAATTC
ACCAAGGCGAGCACGGTCTGTGGCTTCTCAGAG
CATAATTGCATATACAATGTCACTGGGCGCTGA
GAATAGCGTTGCATACTCTAATAACAGCATAGC
CATTCCCACGAACTTTACTATCAGTGTGACAAC
CGAAATATTGCCAGTTTCGATGACCAAAACTAG
CGTGGATTGCACGATGTACATCTGTGGAGACTC
TACCGAATGCAGCAATCTGCTATTACAATATGG
CAGCTTCTGTACACAGTTAAATCGAGCCTTGAC
AGGCATCGCAGTGGAACAGGACAAAAATACTC
AAGAGGTGTTTGCACAGGTGAAGCAAATCTAC
AAAACGCCCCCCATTAAAGATTTTGGCGGGTTC
AATTTTTCACAAATTCTCCCCGACCCGTCTAAG
CCGAGTAAGCGGTCCTTCATCGAAGATCTGCTC
TTTAACAAAGTAACCCTCGCCGATGCCGGCTTT
ATTAAGCAGTATGGCGACTGCCTGGGGGATATA
GCCGCTCGTGACCTGATTTGCGCCCAGAAGTTC
AATGGTCTGACCGTGTTGCCTCCTTTATTGACC
GATGAAATGATTGCCCAGTACACTAGTGCCCTG
CTGGCCGGCACTATCACGTCTGGGTGGACCTTC
GGAGCTGGTGCCGCCTTGCAGATACCTTTTGCA
ATGCAGATGGCCTATAGGTTTAATGGTATCGGA
GTGACTCAGAACGTACTGTACGAGAACCAGAA
GCTCATCGCTAATCAATTTAACTCCGCTATCGG
AAAAATCCAGGACAGCCTCTCTTCTACAGCTAG
CGCTCTGGGCAAACTGCAGGATGTCGTTAATCA

[0748]

	GAATGCCCAGGCCCTGAACACCTTGGTTAAACA ACTATCTTCCAACTTCGGGGCCATATCCAGTGT GTTGAATGATATTCTCTCCCGCTTGGATAAGGT GGAAGCTGAGGTGCAGATCGATCGCTTGATCAC CGGCAGACTGCAGTCCCTCCAGACATATGTAAC TCAGCAGCTGATTAGAGCCGCCGAGATAAGGG CAAGTGCGAATCTGGCTGCCACCAAGATGAGC GAATGTGTATTGGGCCAGAGCAAACGAGTTGA TTTTTGCGGTAAGGGGTATCATTTAATGTCTTTC CCTCAATCCGCACCTCATGGCGTAGTTTTCCTG CATGTGACTTATGTCCCGGCTCAGGAGAAGAAT TTTACCACAGCCCCCGCGATCTGCCATGACGGA AAGGCCCACTTCCCCCGGGAAGGCGTGTTTGTA TCCAATGGGACTCACTGGTTTGTCACTCAGCGA AATTTTTATGAACCACAGATCATCACCACTGAC AACACATTTGTTAGTGGAAACTGCGATGTGGTC ATCGGCATCGTGAATAACACTGTCTATGATCCA CTGCAACCTGAACTGGATTCTTTTAAAGAGGAA CTCGACAAGTATTTTAAAAACCACACTAGCCCT GACGTGGATCTCGGTGACATTTCTGGCATCAAC GCTAGCGTAGTGAACATTCAGAAAGAGATAGA TAGACTTAATGAGGTGGCCAAGAACCTCAACG AAAGTCTGATCGACCTCCAGGAACTGGGGAAA TACGAGCAGTACATTAAATGGCCTTGGTACATA TGGCTGGGGTTCATTGCTGGGCTGATCGCAATA GTGATGGTGACCATAATGCTCTGTTGCATGACT AGCTGCTGCAGCTGCCTGAAGGGCTGCTGTAGT TGTGGGTCATGTTGTAAGTTTGACGAAGATGAT AGCGAGCCTGTCCTTAAAGGAGTGAAGCTCCAC TACACCTAG	
优化的刺突CT20	参见序列表	**80**
优化的刺突CT56	参见序列表	**81**
优化的刺突CT83	参见序列表	**82**
优化的刺突CT131	参见序列表	**83**
优化的刺突CT199	参见序列表	**84**
刺突 CT1-2C	ATGTTTGTCTTCCTGGTCTTGCTGCCGCTcGTGtct AGCCAGTGCGTGAATCTCACCACCCGCACCCAG CTTCCACCTGCCTACACTAACAGCTTCACCCGA GGGGTGTATTACCCTGACAAGGTATTCCGGTCC TCCGTCCTCCATAGCACGCAGGACCTTTTTCTG CCCTTCTTCTCAAATGTGACATGGTTCCATGCC ATTCACGTGAGCGGCACGAATGGAACGAAGCG CTTTGATAACCCCGTGCTGCCTTTCAATGACGG CGTCTACTTCGCCTCCACTGAAAAGTCAAACAT	**85**

[0749]

	CATCCGGGGCTGGATCTTTGGCACCACTCTTGA TTCAAAGACCCAGTCACTGCTGATTGTGAACAA TGCTACAAACGTGGTTATCAAaGTcTGcGAGTTT CAGTTCTGTAACGATCCATTTTTGGGAGTGTAC TACCACAAGAACAACAAGTCCTGGATGGAGTC TGAGTTCAGAGTGTATAGCTCTGCTAACAACTG CACCTTCGAGTACGTGTCCCAGCCTTTCCTTATG GACCTGGAAGGCAAACAGGGCAATTTCAAAAA CCTGAGAGAGTTCGTGTTTAAGAACATTGACGG ATACTTCAAAATTTATTCTAAGCACACACCAAT TAACTTAGTGCGGGACCTACCCCAAGGCTTTAG CGCCCTAGAGCCCCTGGTTGACCTGCCCATTGG GATCAATATAACAAGGTTCCAAACTCTACTGGC TCTGCATAGAAGTTATCTGACCCCAGGAGACAG CTCTAGTGGTTGGACCGCCGGCGCAGCAGCCTA CTATGTCGGGTACTTACAGCCACGCACGTTCCT TCTGAAGTACAATGAGAACGGGACAATCACTG ACGCAGTAGACTGTGCACTGGACCCGCTAAGC GAGACTAAGTGCACACTTAAATCCTTCACGGTG GAGAAAGGCATTTATCAGACCTCTAACTTCAGG GTGCAGCCAACAGAAAGCATTGTGCGATTCCCA AATATTACTAATCTTTGCCCTTTCGGGGAGGTC TTTAATGCAACTAGATTCGCATCAGTCTATGCG TGGAACCGCAAACGCATTTCCAATTGTGTCGCA GACTACTCAGTGCTGTACAACTCTGCCTCTTTC AGTACGTTCAAGTGTTACGGAGTGTCACCCACT AAACTGAACGACCTGTGCTTTACAAATGTCTAC GCTGACTCCTTCGTGATTAGGGGAGACGAGGTG AGACAAATTGCCCCCGGACAGACTGGGAAGAT TGCCGACTACAATTATAAGCTTCCTGATGATTT CACTGGCTGTGTTATTGCCTGGAATAGTAACAA TCTGGATAGCAAGGTGGGAGGCAACTATAACT ACTTATATCGACTGTTTAGGAAGAGTAATCTGA AACCATTTGAGCGGGATATTTCCACAGAAATTT ACCAGGCCGGGAGCACACCATGTAATGGGGTG GAGGGATTTAATTGTTACTTCCCACTCCAGAGC TATGGTTTCCAACCCACCAATGGAGTGGGTTAC CAGCCCTATAGAGTCGTGGTGCTTAGTTTTGAG CTGCTTCACGCCCCAGCAACCGTCTGCGGTCCC AAAAAGTCGACCAATCTCGTGAAAAACAAATG CGTAAACTTCAACTTTAACGGCTTAACAGGAAC CGGCGTGCTCACCGAAAGCAACAAGAAATTCC TTCCATTTCAGCAATTCGGAAGGGACATCGCCG ACACAACAGACGCcGTcAGGGACCCACAGACTC TGGAGATACTGGACATCACTCCTTGTTCGTTTG GGGGCGTCTCGGTCATCACACCCGGGACTAATA CTAGTAATCAGGTAGCAGTTTTATATCAAGGCG TCAACTGTACCGAAGTACCTGTGGCCATACACG CTGATCAGCTAACGCCAACATGGCGAGTCTATT CCACCGGCTCTAACGTTTTTCAGACCAGGGCTG	

[0750]

	GGTGCCTGATAGGGGCAGAGCACGTCAATAAT TCCTATGAGTGTGATATCCCCATAGGTGCGGGG ATCTGTGCCAGCTATCAAACCCAAACCAATTCA CCAAGGCGAGCACGGTCTGTGGCTTCTCAGAGC ATAATTGCATATACAATGTCACTGGGCGCTGAG AATAGCGTTGCATACTCTAATAACAGCATAGCC ATTCCCACGAACTTTACTATCAGTGTGACAACC GAAATATTGCCAGTTTCGATGACCAAAACTAGC GTGGATTGCACGATGTACATCTGTGGAGACTCT ACCGAATGCAGCAATCTGCTATTACAATATGGC AGCTTCTGTACACAGTTAAATCGAGCCTTGACA GGCATCGCAGTGGAACAGGACAAAAATACTCA AGAGGTGTTTGCACAGGTGAAGCAAATCTACA AAACGCCCCCCATTAAAGATTTTGGCGGGTTCA ATTTTTCACAAATTCTCCCCGACCCGTCTAAGC CGAGTAAGCGGTCCTTCATCGAAGATCTGCTCT TTAACAAAGTAACCCTCGCCGATGCCGGCTTTA TTAAGCAGTATGGCGACTGCCTGGGGGATATAG CCGCTCGTGACCTGATTTGCGCCCAGAAGTTCA ATGGTCTGACCGTGTTGCCTCCTTTATTGACCG ATGAAATGATTGCCCAGTACACTAGTGCCCTGC TGGCCGGCACTATCACGTCTGGGTGGACCTTCG GAGCTGGTGCCGCCTTGCAGATACCTTTTGCAA TGCAGATGGCCTATAGGTTTAATGGTATCGGAG TGACTCAGAACGTACTGTACGAGAACCAGAAG CTCATCGCTAATCAATTTAACTCCGCTATCGGA AAAATCCAGGACAGCCTCTCTTCTACAGCTAGC GCTCTGGGCAAACTGCAGGATGTCGTTAATCAG AATGCCCAGGCCCTGAACACCTTGGTTAAACAA CTATCTTCCAACTTCGGGGCCATATCCAGTGTG TTGAATGATATTCTCTCCCGCTTGGATAAGGTG GAAGCTGAGGTGCAGATCGATCGCTTGATCACC GGCAGACTGCAGTCCCTCCAGACATATGTAACT CAGCAGCTGATTAGAGCCGCCGAGATAAGGGC AAGTGCGAATCTGGCTGCCACCAAGATGAGCG AATGTGTATTGGGCCAGAGCAAACGAGTTGATT TTTGCGGTAAGGGGTATCATTTAATGTCTTTCCC TCAATCCGCACCTCATGGCGTAGTTTTCCTGCA TGTGACTTATGTCCCGGCTCAGGAGAAGAATTT TACCACAGCCCCCGCGATCTGCCATGACGGAAA GGCCCACTTCCCCCGGGAAGGCGTGTTTGTATC CAATGGGACTCACTGGTTTGTCACTCAGCGAAA TTTTTATGAACCACAGATCATCACCACTGACAA CACATTTGTTAGTGGAAACTGCGATGTGGTCAT CGGCATCGTGAATAACACTGTCTATGATCCACT GCAACCTGAACTGGATTCTTTTAAAGAGGAACT CGACAAGTATTTTAAAAACCACACTAGCCCTGA CGTGGATCTCGGTGACATTTCTGGCATCAACGC TAGCGTAGTGAACATTCAGAAAGAGATAGATA GACTTAATGAGGTGGCCAAGAACCTCAACGAA	

[0751]

	AGTCTGATCGACCTCCAGGAACTGGGGAAATA CGAGCAGTACATTAAATGGCCTTGGTACATATG GCTGGGGTTCATTGCTGGGCTGATCGCAATAGT GATGGTGACCATAATGCTCTGTTGCATGACTAG CTGCTGCAGCTGCCTGAAGGGCTGCTGTAGTTG TGGGTCATGTTGTAAGTTTGACGAAGATGATAG CGAGCCTGTCCTTAAAGGAGTGAAGCTCCACTA CACCTAG	
刺突 IDT-4C	参见序列表	**86**
刺突-SGI	参见序列表	**87**

[0752] 序列优化的刺突序列的克隆

[0753] 每条序列优化的刺突序列从IDT订购为一组3个gBlock，每个gblock在1300-1500bp之间并且彼此重叠约100个核苷酸。包含刺突序列的5′端和3′端的gBlock与质粒骨架重叠100个核苷酸。通过PCR和Gibson组装的组合将gblock组装成线性化的pA68-E4d AsisI/PmeI骨架，以生成pA68-E4序列优化的刺突克隆。通过PCR筛选克隆，然后培养正确大小的克隆用于质粒生产和通过NGS或Sanger测序进行测序。一旦正确的克隆经过序列确认，就进行大规模质粒生产和纯化以进行转染。

[0754] 载体生产

[0755] 用PacI消化pA68-E4-刺突质粒DNA，并使用TransIt Lenti转染试剂将2ug DNA转染到293F细胞中。转染后五天，收获细胞和培养基，并通过在-80C和37C下冻融产生裂解物。一部分裂解物用于重新感染30mL的293F细胞并在收获前孵育48-72小时。通过在-80C和37C冻融产生裂解物，并且一部分裂解物用于感染以1e6个细胞/毫升接种的400mL 293F细胞。接下来，48-72小时后收获细胞，在10mM tris pH 8.0/0.1％Triton X-100中裂解，并在37和-80C下冻融1次。然后通过以4300x g离心10分钟来澄清裂解物，之后加载在1.2/1.4CsCl梯度上。梯度运行至少2h，然后在Tris中稀释2-4倍收获条带，然后在1.35CsCl梯度上重新运行至少2h。收获病毒条带，然后在1x ARM缓冲液中透析3次。通过免疫染色滴度测定确定病毒感染滴度，并通过A260nm下的吸光度测量病毒颗粒。

[0756] 蛋白质分析

[0757] 用于刺突表达分析的样品在转染后的指定时间收获，或者在纯化病毒的情况下，通过使用已知病毒MOI建立受控感染实验并在感染后的特定时间(通常为24至48h)收获。1e6个细胞通常在0.5mL含有10％β-巯基乙醇的SDS-PAGE上样缓冲液中收获。将样品在变性和还原条件下煮沸并在4-20％聚丙烯酰胺凝胶上跑。然后使用BioRad快速转移设备将凝胶印迹到PVDF膜上。将所述膜在室温下在TBST中的5％脱脂牛奶中封闭2h。然后用抗刺突S1多克隆抗体(Sino Biologicals)或抗刺突单克隆抗体1A9(GeneTex;目录号GTX632604)探测膜并孵育2h。然后将膜在PBST(5x)中洗涤，并用HRP连接的抗小鼠抗体(Bethyl labs)探测1h。如上所述洗涤膜，然后与化学发光底物ECL plus(ThermoFisher)一起孵育。然后使用Chemidoc(BioRad设备)捕获图像。

[0758] 结果

[0759] 在病毒生产期间，用各种刺突编码载体在293F细胞中评估刺突S2蛋白的表达。如图10A所示，使用编码IDT序列优化的刺突盒的载体，当在SAM载体中表达(图10A，最后一个泳道)而非在两种不同的MOI和时间点下在ChAdV68载体(“CMV-刺突(IDT)”;SEQ ID NO:69)中表达(图10A，泳道1和7)时，使用抗刺突S2抗体(GeneTex)通过蛋白质印迹检测刺突S2蛋白。通过使用S2抗体的Western，经工程化以表达刺突变体D614G的两个克隆(“CMV-刺突(IDT)-D614G”SEQ ID NO:70)也没有表达可检测水平的刺突蛋白(图10A，泳道2和3)。经工程化以与刺突(“CMV-刺突(IDT)-D614G-膜”SEQ ID NO:66)一起共表达SARS-CoV-2膜蛋白或包含R682V突变以破坏弗林蛋白酶切割位点的克隆没有拯救表达表型(图10A，泳道4和5)。相反，如图10B所示，除了未检测到刺突S1蛋白的弗林蛋白酶R682V突变外，所有IDT构建体均检测到刺突S1蛋白，尽管水平较低。

[0760] 为了解卷积IDT序列优化克隆的表达问题是否特定于S1或S2结构域，还评价了仅表达S1或S2结构域的载体。如图10C所示，单独编码IDT序列优化的刺突S1蛋白的ChAdV68载

体表现出强的蛋白质表达，与全长刺突载体观察到的较低表达形成对比(图10C，泳道1对2)。正如预期的那样，对于仅编码S2结构域的载体，没有观察到S1的信号。相反，如图10D中所示，仅编码IDT序列优化的刺突S2蛋白的ChAdV68载体没有表现出可观察到的蛋白质表达，这与用全长刺突载体观察到的信号不存在相当(图10D，泳道1和3)。因此，数据表明IDT序列优化的刺突S2表现出不良表达，包括影响全长刺突序列的表达。

[0761] 为了解决蛋白质表达问题，使用额外的序列优化算法对编码SARS-CoV-2刺突的核苷酸序列进行序列优化；(1)使用SGI DNA(La Jolla,CA)生成的单条序列(SEQ ID NO:87)；(2)使用COOL生成的6条序列，命名为CT1、CT20、CT56、CT83、CT131和CT 199(SEQ ID NO:79-84)(COOL算法生成多条序列并选择了6条)。如图10A和图10B所示，使用COOL算法的序列优化生成序列-CT1(SEQ ID NO:79)，其证明了使用ChAdV68载体的可检测到的表达，如使用抗S2和抗S1抗体通过Western所评估(图10A和图10B，每个相应的泳道6“ChAd-刺突CT1-D614G”)。使用COOL算法和SGI算法生成的额外序列也通过Western评估。如图11所示，SGI克隆和COOL序列CT131也证明了使用抗S2抗体通过Western可检测到的刺突蛋白水平(图11，泳道3和6)，而其他COOL生成的序列除了对照CT1衍生序列之外没有产生可检测的信号(泳道2)。因此，数据表明特定序列优化改善了全长SARS-CoV-2刺突蛋白在ChAdV68载体中的表达。

[0762] SARS-CoV-2是一种编码其自身复制机制的细胞质复制的正义RNA病毒，并因此SARS-CoV-2mRNA不会通过剪接和核输出机制自然加工。如图12A所示，为了评估剪接在从ChAdV68载体表达的SARS-CoV-2刺突编码mRNA中的作用，设计了引物来扩增刺突编码区。在存在mRNA剪接的情况下，扩增子大小将小于预期的全长编码区。如图12B所示，虽然编码SARS-CoV-2刺突盒的质粒的PCR显示了预期的扩增子大小(“刺突质粒”左图，右栏)，但来自感染的293细胞的cDNA的PCR扩增显示了两个较小的扩增子，表明mRNA转录物的剪接(“ChAd-刺突(IDT)cDNA”左图，左栏)。此外，刺突编码序列分为S1和S2编码序列。也如图12B所示，来自感染的293细胞的S1 cDNA的PCR扩增证明了预期的扩增子大小(“刺突S1”右图，左栏)，表明S1可能没有经历不希望的剪接，而S2区域中的序列可能影响剪接。

[0763] 分析了较小的扩增子序列，并通过Sanger测序鉴定了两个剪接供体位点。通过进一步的序列分析预测了另外三个潜在的供体位点。剪接基序序列的位置和身份如下所示(nt三联体对应于密码子，编号关于刺突ATG开始)：

[0764] NT 385-:AAG GTG TGT->AAa GTc TGc(通过测序鉴定)

[0765] NT 539-:AA GGT AAG C->Ag GGc AAa C(通过测序鉴定)

[0766] NT 2003-:CA GGT ATC T->Ct GGa ATC T(预测)

[0767] NT 2473-:AAG GTG ACC->AAa GTc ACC(预测)

[0768] NT 3417-:C CCC CTT CAG CCT GAA CTT GAT TCC (SEQ ID NO:123)->T CCa CTg CAa CCT GAA CTT GAT agt(SEQ ID NO:124)

[0769] 通过破坏核苷酸序列基序而不破坏氨基酸序列的定点诱变去除选定的剪接供体位点。COOL序列优化的克隆CT1用作克隆CT1-2C(SEQ ID NO:85)的参考序列，在突变的NT385和NT539处具有序列鉴定的剪接供体基序。IDT序列优化克隆用作克隆IDT-4C(SEQ ID NO:86)的参考序列，并且在突变的NT385、NT539、NT2003和NT2473处具有序列鉴定的和预测的剪接供体基序两者，以及可能的NT445处的聚腺苷酸化位点AATAAA突变为AAcAAA。如图11

所示，通过Western在克隆中检测到刺突蛋白表达，包括序列鉴定的剪接供体基序(“CT1-2C”泳道2)。通过PCR分析进一步评估构建体中的剪接。如图13所示，仅突变剪接供体基序和/或潜在的聚A位点并不能阻止剪接，这表明剪接可能从次优势剪接位点发生。

[0770] 鉴于从ChAdV68载体表达的全长刺突mRNA中的剪接事件的鉴定，生成额外的构建体并评估改善的蛋白质表达。额外优化包括特征是外源核输出信号的构建体(例如，组成型转运元件(CTE)、RNA转运元件(RTE)或土拨鼠转录后调控元件(WPRE))或通过引入外源剪接供体/分支/受体基序序列添加人工内含子以偏向剪接，诸如在CMV启动子和紧邻刺突基因上游的Kozak序列之间引入SV40微型内含子(SEQ ID NO:88)。还结合额外的序列优化进一步评价已鉴定和预测的剪接供体基序。

[0771] XIV.G.SARS-CoV-2疫苗功效评价

[0772] 评价了各种SARS-CoV-2疫苗设计、构建体和给药方案。疫苗编码了各种优化版本的刺突蛋白、选定的预测T细胞表位(TCE)、或刺突和TCE盒的组合。

[0773] 小鼠免疫

[0774] 所有小鼠研究均在Murigenics根据IACUC批准的方案进行。所有研究均使用6-8周龄的Balb/c小鼠(Envigo)。疫苗储存在-80℃，免疫当天在室温下解冻，然后用PBS稀释至0.1μg/mL，并通过0.2微米过滤器过滤。经过滤的制剂在4℃下储存并在制备后4小时内注射。所有免疫均为胫骨前肌双侧肌肉内注射，注射2次，每次50μL，共100μL。

[0775] 非人类灵长类动物免疫

[0776] 对于Mamu-A*01印度恒河猴中的SAM疫苗，SAM以指定剂量双侧肌肉内注射施用到股四头肌中。

[0777] 对于Mamu-A*01印度恒河猴中的ChAdV68疫苗，ChAdV68以指定剂量(每次注射$5x10^{11}$个病毒颗粒)双侧施用。

[0778] 恒河猴中的免疫监测

[0779] 对于免疫监测，将10-20mL的血液采集到含有肝素的真空采血管中，并保持在室温下直至分离。使用淋巴细胞分离介质(LSM)和Leucosep分离管通过密度梯度离心分离PBMC。PBMC用碘化丙锭染色，并使用Cytoflex LX(Beckman Coulter)对活细胞计数。然后将样品以$4x10^{6}$个细胞/毫升重悬于RPMI完全(10％FBS)中。

[0780] 脾细胞分离

[0781] 对于T细胞应答的评价，在免疫后的不同时间点提取小鼠脾脏。请注意，在一些研究中，免疫是交错的，以便能够同时收集脾脏并进行比较。收集脾脏并通过IFNγELISpot和ICS进行分析。将脾脏悬浮在RPMI完全(RPMI+10％FBS)中，并使用gentleMACS解离器(Miltenyi Biotec)解离。使用40μm滤器过滤解离的细胞，并用ACK裂解缓冲液(150mM NH_4Cl、10mM $KHCO_3$、0.1mM EDTA)裂解红细胞。裂解后，用30μm滤器过滤细胞并重悬浮于RPMI完全中。

[0782] 小鼠血清采集

[0783] 在免疫后的不同时间点抽取200μL血液。血液在室温下以1000g离心10分钟。采集血清并在-80℃下冷冻。

[0784] S1 IgG MSD/ELISA

[0785] 将96孔QuickPlex板(Meso Scale Discovery，Rockville，MD)涂有50μL的1μg/mL

SARS-CoV-2 S1(ACROBiosystems,Newark,DE),在DPBS(Corning,Corning,NY)中稀释,并且在4℃下孵育过夜。使用250μL PBS+0.05%Tween-20(Teknova,Hollister,CA)在搅拌下将孔洗涤三次,并在室温下在轨道摇床上用150μL Superblock PBS(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA)封闭板1小时。测试血清以适当系列稀释在10%物种匹配血清(Innovative Research,Novi,MI)中,并在每个板的单个孔中进行测试。开始稀释1:100,3倍稀释,每个样品11次稀释。洗涤孔并将50uL稀释的样品添加到孔中并在轨道摇床上在室温下孵育1小时。将孔洗涤并在轨道摇床上在室温下与在DPBS+1%BSA(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)中稀释的25μL的1μg/mL SULFO-TAG标记的抗小鼠抗体(MSD)一起孵育1小时。洗涤孔并加入150μL含三丙胺的读取缓冲液(MSD)。使用QPlex SQ 120(MSD)ECL读板仪立即运行板。终点滴度定义为信号是背景值两倍的每个样品的倒数稀释度,并通过在大于背景值两倍的最终两个值之间拟合一条线进行插值。背景值是仅含有10%物种匹配血清的对照孔的平均值(针对每个板计算)。

[0786] 抗体滴度

[0787] 对于抗体应答监测,如出于所有目的通过引用并入本文的J.Yu等人(Science 10.1126/science.Abc6284,2020)中所述测定血清中的抗体滴度,包括中和抗体滴度。

[0788] IFNγ ELISpot分析

[0789] 按照制造商的方案,使用预包被的96孔板(MAbtech,小鼠IFNγELISpot PLUS,ALP)进行IFNγELISpot测定。用各种重叠肽池(长度为15个氨基酸,11个氨基酸重叠)刺激样品过夜,最终浓度为每肽1μg/mL。对于刺突,跨越SARS-CoV-2刺突抗原的八个不同重叠肽池(Genscript,每个池36-40个肽)。对于每个刺突池,脾细胞以每孔1×10^5个细胞一式两份涂铺,而对于刺突池2、4和7,每孔2.5×10^4个细胞(与7.5×10^4个初始细胞混合)。为了测量对TCE盒的应答,一个池跨越核衣壳蛋白(JPT、NCap-1、102种肽),一个跨越膜蛋白(JPT、VME-1、53种肽),并且一个跨越盒中编码的Orf3a区域(Genscript,38种肽)。对于TCE肽池,脾细胞在每个池中以每孔$2x10^5$个细胞一式两份涂铺。肽池的序列呈现于表D(SEQ ID NO.27180-27495)、表E(SEQ ID NO.27496-27603)和表F(SEQ ID NO.27604-27939)。对于每个样品和细胞数量涂铺仅DMSO对照。在37℃孵育过夜后,用PBS洗涤板并与抗猴IFNγmAb生物素(MAbtech)一起孵育两小时,接着再次洗涤并与链霉亲和素-ALP(MAbtech)一起孵育一小时。最后一次洗涤后,将板与BCIP/NBT(MAbtech)一起孵育十分钟以形成免疫斑点。使用AID读取仪(Autoimmun Diagnostika)对斑点进行成像和计数。对于数据处理和分析,重复孔变异性(变异性=方差/(中位数+1))大于10且中位数大于10的样品被排除在外。斑点值根据孔饱和度根据下式进行调整:

[0790] 调整斑点=原始斑点+2*(原始斑点*饱和度/(100-饱和度)

[0791] 通过减去阴性对照肽孔的平均值对每个样品进行背景校正。数据呈现为每1×10^6个脾细胞的斑点形成集落(SFC)。孔饱和度值大于35%的孔被标记为“太多而无法计数”(TNTC)并被排除在外。对于为TNTC的样品和肽,使用以2.5×10^4个细胞/孔测量的值。

[0792] 疫苗构建体

[0793] 评价的各种序列如下:

[0794] -“IDT刺突$_g$”:由IDT优化序列编码的SARS-CoV-2刺突蛋白(参见SEQ ID NO:69),并且包括关于SEQ ID NO:59的D614G突变(参见SEQ ID NO:70中的相应核苷酸突变);也称

为“刺突V1”

[0795] -“CT刺突$_g$”:由Cool Tool优化序列版本1(SEQ ID NO:79)编码的SARS-CoV-2刺突蛋白,包括关于SEQ ID NO:59的D614G突变(参见SEQ ID NO:70中的相应核苷酸突变);也称为“刺突V2”。在称为“CT刺突$_D$”的版本中,D614没有改变。

[0796] -“CT刺突F2P$_g$”:由Cool Tool优化序列版本1(SEQ ID NO:79)编码的SARS-CoV-2刺突蛋白,包括关于参考刺突蛋白(SEQ ID NO:59)的R682V以破坏弗林蛋白酶切割位点(682-685 RRAR[SEQ ID NO:125]至GSAS[SEQ ID NO:126]);以及K986P和V987P以干扰刺突的二级结构。核苷酸序列如SEQ ID NO:89所示并且蛋白质序列如SEQ ID NO:90所示

[0797] -“TCE5”:通过EDGE平台预测的选定CD8+表位将呈递在除刺突之外的SARS-CoV-2蛋白的MHC分子上。15个选定的表位以及其在盒中的顺序呈现于表10中。核苷酸序列如SEQ ID NO:91所示并且蛋白质序列如SEQ ID NO:92所示。图14显示了对TCE5的四个指定群体的估计保护。估计所有群体的覆盖率超过95%,至少达到7个表位的阈值(最后一栏)。

[0798] -SAM载体SAM-SGP1-TCE5-SGP2-CT刺突$_G$F2P如SEQ ID NO:93所示

[0799] -ChAd载体ChAd-CMV-CT刺突GF2P-CMV-TCE5(EPE)如SEQ ID NO:114所示

[0800] -额外的载体和刺突变体被设计用于评价,如SEQ ID NO:109-113所示

[0801] 表9-编码的刺突变体

[0802]

CT 刺突 F2Pg 核苷酸(SEQ ID NO:89);粗斜体弗林蛋白酶突变 682-685 RRAR (SEQ ID NO: 125)至 GSAS (SEQ ID NO: 126),粗体小写字母 K986P 和 V987P
ATGTTTGTCTTCCTGGTCTTGCTGCCGCTGGTGAGCAGCCAGTGCGTGA
ATCTCACCACCCGCACCCAGCTTCCACCTGCCTACACTAACAGCTTCAC
CCGAGGGGTGTATTACCCTGACAAGGTATTCCGGTCCTCCGTCCTCCAT
AGCACGCAGGACCTTTTTCTGCCCTTCTTCTCAAATGTGACATGGTTCC
ATGCCATTCACGTGAGCGGCACGAATGGAACGAAGCGCTTTGATAACC
CCGTGCTGCCTTTCAATGACGGCGTCTACTTCGCCTCCACTGAAAAGTC
AAACATCATCCGGGGCTGGATCTTTGGCACCACTCTTGATTCAAAGACC
CAGTCACTGCTGATTGTGAACAATGCTACAAACGTGGTTATCAAGGTGT
GTGAGTTTCAGTTCTGTAACGATCCATTTTTGGGAGTGTACTACCACAA
GAACAACAAGTCCTGGATGGAGTCTGAGTTCAGAGTGTATAGCTCTGC
TAACAACTGCACCTTCGAGTACGTGTCCCAGCCTTTCCTTATGGACCTG
GAAGGCAAACAGGGCAATTTCAAAAACCTGAGAGAGTTCGTGTTTAAG
AACATTGACGGATACTTCAAAATTTATTCTAAGCACACACCAATTAACT
TAGTGCGGGACCTACCCCAAGGCTTTAGCGCCCTAGAGCCCCTGGTTGA
CCTGCCCATTGGGATCAATATAACAAGGTTCCAAACTCTACTGGCTCTG

[0803]

CATAGAAGTTATCTGACCCCAGGAGACAGCTCTAGTGGTTGGACCGCC
GGCGCAGCAGCCTACTATGTCGGGTACTTACAGCCACGCACGTTCCTTC
TGAAGTACAATGAGAACGGGACAATCACTGACGCAGTAGACTGTGCAC
TGGACCCGCTAAGCGAGACTAAGTGCACACTTAAATCCTTCACGGTGG
AGAAAGGCATTTATCAGACCTCTAACTTCAGGGTGCAGCCAACAGAAA
GCATTGTGCGATTCCCAAATATTACTAATCTTTGCCCTTTCGGGGAGGT
CTTTAATGCAACTAGATTCGCATCAGTCTATGCGTGGAACCGCAAACGC
ATTTCCAATTGTGTCGCAGACTACTCAGTGCTGTACAACTCTGCCTCTTT
CAGTACGTTCAAGTGTTACGGAGTGTCACCCACTAAACTGAACGACCT
GTGCTTTACAAATGTCTACGCTGACTCCTTCGTGATTAGGGGAGACGAG
GTGAGACAAATTGCCCCCGGACAGACTGGGAAGATTGCCGACTACAAT
TATAAGCTTCCTGATGATTTCACTGGCTGTGTTATTGCCTGGAATAGTA
ACAATCTGGATAGCAAGGTGGGAGGCAACTATAACTACTTATATCGAC
TGTTTAGGAAGAGTAATCTGAAACCATTTGAGCGGGATATTTCCACAG
AAATTTACCAGGCCGGGAGCACACCATGTAATGGGGTGGAGGGATTTA
ATTGTTACTTCCCACTCCAGAGCTATGGTTTCCAACCCACCAATGGAGT
GGGTTACCAGCCCTATAGAGTCGTGGTGCTTAGTTTTGAGCTGCTTCAC
GCCCCAGCAACCGTCTGCGGTCCCAAAAAGTCGACCAATCTCGTGAAA
AACAAATGCGTAAACTTCAACTTTAACGGCTTAACAGGAACCGGCGTG
CTCACCGAAAGCAACAAGAAATTCCTTCCATTTCAGCAATTCGGAAGG
GACATCGCCGACACAACAGACGCGGTGAGGGACCCACAGACTCTGGAG
ATACTGGACATCACTCCTTGTTCGTTTGGGGGCGTCTCGGTCATCACAC
CCGGGACTAATACTAGTAATCAGGTAGCAGTTTTATATCAAGGCGTCA
ACTGTACCGAAGTACCTGTGGCCATACACGCTGATCAGCTAACGCCAA
CATGGCGAGTCTATTCCACCGGCTCTAACGTTTTTCAGACCAGGGCTGG
GTGCCTGATAGGGGCAGAGCACGTCAATAATTCCTATGAGTGTGATAT
CCCCATAGGTGCGGGGATCTGTGCCAGCTATCAAACCCAAACCAATTC
ACCA***gGGaGcGCAaGc***TCTGTGGCTTCTCAGAGCATAATTGCATATACAA
TGTCACTGGGCGCTGAGAATAGCGTTGCATACTCTAATAACAGCATAG
CCATTCCCACGAACTTTACTATCAGTGTGACAACCGAAATATTGCCAGT
TTCGATGACCAAAACTAGCGTGGATTGCACGATGTACATCTGTGGAGA
CTCTACCGAATGCAGCAATCTGCTATTACAATATGGCAGCTTCTGTACA
CAGTTAAATCGAGCCTTGACAGGCATCGCAGTGGAACAGGACAAAAAT
ACTCAAGAGGTGTTTGCACAGGTGAAGCAAATCTACAAAACGCCCCCC
ATTAAAGATTTTGGCGGGTTCAATTTTTCACAAATTCTCCCCGACCCGT
CTAAGCCGAGTAAGCGGTCCTTCATCGAAGATCTGCTCTTTAACAAAGT
AACCCTCGCCGATGCCGGCTTTATTAAGCAGTATGGCGACTGCCTGGGG
GATATAGCCGCTCGTGACCTGATTTGCGCCCAGAAGTTCAATGGTCTGA
CCGTGTTGCCTCCTTTATTGACCGATGAAATGATTGCCCAGTACACTAG
TGCCCTGCTGGCCGGCACTATCACGTCTGGGTGGACCTTCGGAGCTGGT
GCCGCCTTGCAGATACCTTTTGCAATGCAGATGGCCTATAGGTTTAATG
GTATCGGAGTGACTCAGAACGTACTGTACGAGAACCAGAAGCTCATCG
CTAATCAATTTAACTCCGCTATCGGAAAAATCCAGGACAGCCTCTCTTC
TACAGCTAGCGCTCTGGGCAAACTGCAGGATGTCGTTAATCAGAATGC
CCAGGCCCTGAACACCTTGGTTAAACAACTATCTTCCAACTTCGGGGCC
ATATCCAGTGTGTTGAATGATATTCTCTCCCGCTTGGAT**ccacct**GAAGCT
GAGGTGCAGATCGATCGCTTGATCACCGGCAGACTGCAGTCCCTCCAG
ACATATGTAACTCAGCAGCTGATTAGAGCCGCCGAGATAAGGGCAAGT
GCGAATCTGGCTGCCACCAAGATGAGCGAATGTGTATTGGGCCAGAGC
AAACGAGTTGATTTTTGCGGTAAGGGGTATCATTTAATGTCTTTCCCTC

AATCCGCACCTCATGGCGTAGTTTTCCTGCATGTGACTTATGTCCCGGC
TCAGGAGAAGAATTTTACCACAGCCCCCGCGATCTGCCATGACGGAAA
GGCCCACTTCCCCCGGGAAGGCGTGTTTGTATCCAATGGGACTCACTGG
TTTGTCACTCAGCGAAATTTTTATGAACCACAGATCATCACCACTGACA
ACACATTTGTTAGTGGAAACTGCGATGTGGTCATCGGCATCGTGAATAA
CACTGTCTATGATCCACTGCAACCTGAACTGGATTCTTTTAAAGAGGAA
CTCGACAAGTATTTTAAAAACCACACTAGCCCTGACGTGGATCTCGGTG
ACATTTCTGGCATCAACGCTAGCGTAGTGAACATTCAGAAAGAGATAG
ATAGACTTAATGAGGTGGCCAAGAACCTCAACGAAAGTCTGATCGACC
TCCAGGAACTGGGGAAATACGAGCAGTACATTAAATGGCCTTGGTACA
TATGGCTGGGGTTCATTGCTGGGCTGATCGCAATAGTGATGGTGACCAT
AATGCTCTGTTGCATGACTAGCTGCTGCAGCTGCCTGAAGGGCTGCTGT
AGTTGTGGGTCATGTTGTAAGTTTGACGAAGATGATAGCGAGCCTGTCC
TTAAAGGAGTGAAGCTCCACTACACCTAG

CT 刺突 F2Pg 氨基酸(SEQ ID NO:90);粗斜体弗林蛋白酶突变 682-685 RRAR (SEQ ID NO: 125)至 GSAS (SEQ ID NO: 126),粗体小写字母 K986P 和 V987P

[0804]

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHST
QDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRG
WIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWM
ESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIY
SKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSG
WTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFT
VEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRIS
NCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQI
APGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKS
NLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRV
VVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFL
PFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLY
QGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYEC
DIPIGAGICASYQTQTNSP***GSAS***SVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPT
NFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALT
GIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDL
LFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQ
YTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKL
IANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAI
SSVLNDILSRLD**pp**EAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAA
TKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNF
TTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNC
DVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVV
NIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVM
VTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT*

[0805] 表10-TCE5盒(框架顺序如所示)

[0806]

框架	基因	起始氨基酸	终止氨基酸	SEQ ID NO	氨基酸序列
1	ORF3a	102	152	94	EAPFLYLYALVYFLQSINFVRIIMRLWL

[0807]

					CWKCRSKNPLLYDANYFLCWHTN
2	ORF3a	53	85	95	LAVFQSASKIITLKKRWQLALSKGVHF VCNLLL
3	ORF3a	13	55	96	VTLKQGEIKDATPSDFVRATATIPIQAS LPFGWLIVGVALLAV
4	N	40	94	97	RRPQGLPNNTASWFTALTQHGKEDLK FPRGQGVPINTNSSPDDQIGYYRRATR RI
5	M	84	102	98	MACLVGLMWLSYFIASFRL
6	N	369	408	99	KKDKKKKADETQALPQRQKKQQTVT LLPAADLDDFSKQLQ
7	N	284	338	100	GNFGDQELIRQGTDYKHWPQIAQFAPS ASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTGAI K
8	ORF3a	169	198	101	ITSGDGTTSPISEHDYQIGGYTEKWESG VK
9	N	233	282	102	KMSGKGQQQQGQTVTKKSAAEASKK PRQKRTATKAYNVTQAFGRRGPEQT
10	M	56	75	103	LLWPVTLACFVLAAVYRINW
11	N	346	375	104	FKDQVILLNKHIDAYKTFPPTEPKKDK KKK
12	N	205	239	105	TSPARMAGNGGDAALALLLLDRLNQL ESKMSGKGQ
13	N	100	118	106	KMKDLSPRWYFYYLGTGPE
14	ORF3a	199	254	107	DCVVLHSYFTSDYYQLYSTQLSTDTG VEHVTFFIYNKIVDEPEEHVQIHTIDGS SG
15	N	129	174	108	GIIWVATEGALNTPKDHIGTRNPANNA AIVLQLPQGTTLPKGFYAE

[0808] TCE5核苷酸序列(SEQ ID NO:91)：

[0809] ATGGCTGGCGAGGCCCCCTTCCTTTACCTGTACGCCCTTGTGTATTTCCTGCAGAGCATCAATTTTGTG
AGAATCATCATGAGGCTGTGGCTTTGCTGGAAATGTAGGAGCAAGAACCCCCTGTTGTATGACGCCAACTACTTTCT
GTGTTGGCACACCAATCTCGCCGTGTTCCAGAGTGCCTCTAAGATCATTACACTGAAAAAGCGGTGGCAGCTTGCAC
TTTCTAAGGGAGTGCATTTCGTTTGCAACCTGCTCCTGGTGACACTCAAGCAGGGGGAAATCAAAGACGCCACCCCT
AGCGACTTCGTTAGAGCCACTGCCACAATCCCAATCCAGGCTTCCCTGCCTTTCGGCTGGCTTATCGTGGGTGTGGC
ACTGTTGGCTGTGCGGAGACCACAGGGACTGCCTAATAATACAGCTAGCTGGTTTACCGCTCTGACACAGCATGGCA
AAGAAGACCTCAAGTTCCCTCGCGGTCAGGGGGTGCCTATTAACACTAATAGCTCTCCAGACGACCAAATTGGGTAT
TACAGGCGCGCCACAAGACGGATCATGGCCTGCTTAGTGGGGCTGATGTGGCTATCCTATTTTATTGCTAGCTTTCG
CCTGAAGAAGGACAAGAAGAAGAAAGCTGATGAGACCCAGGCACTGCCCCAGCGCCAAAAGAAGCAGCAGACAGTCA
CACTGCTCCCTGCTGCAGACCTGGATGACTTCAGCAAGCAGCTGCAGGGGAACTTTGGCGACCAGGAGCTGATTAGA
CAGGGGACTGACTATAAGCATTGGCCTCAGATTGCTCAGTTCGCCCCAAGTGCATCCGCCTTCTTCGGGATGTCACG
AATAGGAATGGAAGTGACCCCTTCTGGGACATGGTTGACATACACCGGAGCAATCAAGATTACCTCCGGGGACGGTA
CCACGTCTCCTATTAGCGAACACGATTATCAGATAGGGGGATATACTGAGAAGTGGGAGTCCGGCGTCAAAAAGATG
AGTGGGAAAGGCCAGCAGCAACAAGGCCAAACAGTTACTAAAAAGTCTGCCGCAGAAGCTAGTAAAAAGCCTCGCCA
GAAGCGGACAGCCACCAAAGCTTACAATGTGACTCAGGCCTTCGGCCGCCGGGGGCCTGAACAGACCCTCTTGTGGC
CCGTTACCCTCGCATGTTTCGTGCTTGCAGCTGTGTACAGGATCAATTGGTTTAAGGATCAGGTTATCCTGTTGAAC
AAACATATAGATGCCTATAAGACATTCCCACCCACCGAGCCAAAGAAAGATAAGAAAAAGAAAACTAGTCCTGCAAG
GATGGCCGGCAATGGAGGAGACGCAGCCTTAGCCCTGCTCTTACTCGACAGGCTGAACCAACTTGAGTCTAAAATGA
GCGGTAAAGGGCAGAAGATGAAGGATCTGTCCCCAAGGTGGTATTTCTACTATCTGGGCACCGGCCCTGAGGATTGT

GTCGTCCTCCACTCATACTTCACTAGCGATTATTACCAGCTGTATAGTACACAATTATCTACCGACACAGGCGTCGA
GCACGTGACCTTCTTTATATACAATAAGATCGTGGATGAACCAGAGGAGCATGTGCAGATCCACACTATTGATGGCT
CTAGCGGGGGCATCATCTGGGTGGCAACAGAAGGAGCCCTCAACACCCCAAAGGACCATATCGGCACCAGGAATCCA
GCCAACAATGCCGCCATTGTTCTGCAGCTCCCTCAGGGCACTACTCTCCCTAAAGGCTTCTATGCTGAGGGACCCGG
ACCAGGCGCCAAATTTGTTGCTGCTTGGACACTGAAAGCTGCTGCTGGGCCCGGACCAGGCCAGTACATCAAGGCCA
ACTCTAAGTTTATCGGCATCACCGAATTGGGACCTGGACCCGGCTAG

[0810] TCE5氨基酸序列(SEQ ID NO:92)：

[0811] MAGEAPFLYLYALVYFLQSINFVRIIMRLWLCWKCRSKNPLLYDANYFLCWHTNLAVFQSASKIITLK
KRWQLALSKGVHFVCNLLLVTLKQGEIKDATPSDFVRATATIPIQASLPFGWLIVGVALLAVRRPQGLPNNTASWF
TALTQHGKEDLKFPRGQGVPINTNSSPDDQIGYYRRATRRIMACLVGLMWLSYFIASFRLKKDKKKKADETQALPQ
RQKKQQTVTLLPAADLDDFSKQLQGNFGDQELIRQGTDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTG
AIKITSGDGTTSPISEHDYQIGGYTEKWESGVKKMSGKGQQQQGQTVTKKSAAEASKKPRQKRTATKAYNVTQAFG
RRGPEQTLLWPVTLACFVLAAVYRINWFKDQVILLNKHIDAYKTFPPTEPKKDKKKKTSPARMAGNGGDAALALLL
LDRLNQLESKMSGKGQKMKDLSPRWYFYYLGTGPEDCVVLHSYFTSDYYQLYSTQLSTDTGVEHVTFFIYNKIVDE
PEEHVQIHTIDGSSGGIIWVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAAIVLQLPQGTTLPKGFYAEGPGPGAKFVAAWTLK
AAAGPGPGQYIKANSKFIGITELGPGPG-

[0812] SAM-SGP1-TCE5-SGP2-CT刺突$_G$F2P核苷酸序列(SEQ ID NO:93)：(NT 1-17:T7启动子;NT 62-7543:VEEV非结构蛋白编码区;NT 7518-7560:SGP1;NT 7582-7587和9541-9546:Kozak序列;NT 7588-9474:TCE5盒;NT 9480-9540:SGP2;NT 9547-13368:CT刺突弗林蛋白酶-2P)；参见序列表。

[0813] ChAd-CMV-CT刺突$_G$F2P-CMV-TCE5(EPE)核苷酸序列(SEQ ID NO:114)；参见序列表。

[0814] XIV.G.I SARS-CoV-2疫苗对各种刺突构建体产生应答

[0815] 评估了编码各种版本的SARS-CoV-2刺突蛋白的ChAd和SAM疫苗平台。

[0816] 评估了特征为不同序列优化的刺突编码盒的版本："IDT刺突$_g$"(SEQ ID NO:69,也称为"刺突V1"或"v1")；"CT刺突$_g$"：(SEQ ID NO:79,也称为"刺突V2"或"v2")。如图15所示，ChAd(图15A)和SAM(图15B)疫苗都产生可检测的T细胞应答(左图)、刺突特异性IgG抗体(中图)和中和抗体(右图)。值得注意的是,编码CT刺突$_g$序列版本的ChAd疫苗产生的T细胞应答增加3倍,IgG产量增加100倍,并且中和抗体滴度增加60倍。类似地,编码CT刺突$_g$序列版本的SAM疫苗产生了增加的T细胞应答,IgG产量增加7倍,并且中和抗体滴度增加4倍。因此,数据表明刺突盒的序列优化在针对所检查的每个疫苗平台评估的多个参数中产生了增加的免疫应答。

[0817] 评估了一种具有修饰的刺突的刺突编码盒版本,包括去除弗林蛋白酶位点并在s2结构域中添加脯氨酸："CT刺突F2P$_g$"(SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90)。如图16所示,相对于不具有参考修饰的相应的"CT刺突$_g$"盒,编码F2P修饰的刺突的ChAd(左图)和SAM(右图)疫苗两者分别产生5倍和20倍的刺突特异性IgG抗体。因此,数据表明,刺突盒的修饰对所检查的每个疫苗平台产生了增加的抗体应答。

[0818] XIV.G.II SARS-CoV-2疫苗对T细胞表位产生应答

[0819] 评估了编码各种修饰的SARS-CoV-2刺突蛋白和编码EDGE预测表位(EPE)的T细胞

表位(TCE)盒的ChAd和SAM疫苗平台。

[0820] 评估了修饰的仅编码刺突的盒(“CT刺突F2P$_g$”(SEQ ID NO:89)和修饰的刺突以及额外的非刺突T细胞表位(ChAd SEQ ID NO:114;SAM SEQ ID NO:93;关于“TCE5”,参见表10),以及免疫应答,如上所述。如图17所示,ChAd(图17A)和SAM(图17B),评估的每个疫苗产生可检测的对刺突的T细胞应答(左图),而包括TCE5盒的疫苗通常也产生可检测的对编码的T细胞表位的T细胞应答(右图)。因此,数据表明,对于所检查的每个疫苗平台,添加T细胞表位盒导致整个SARS-CoV-2基因组的广泛T细胞应答。

[0821] XIV.G.III SARS-CoV-2疫苗中的盒顺序影响免疫应答

[0822] 评估了编码各种顺序的修饰的SARS-CoV-2刺突蛋白和编码EDGE预测表位(EPE)的T细胞表位(TCE)盒的SAM疫苗平台。

[0823] 如图18所示,当用各种构建体进行疫苗接种时,产生了对刺突的T细胞应答(上图)、对编码的T细胞表位的T细胞应答(中图)和刺突特异性IgG抗体(下图)。在图18A中,SAM构建体包括单独的“IDT刺突$_g$”(SEQ ID NO:69)(左栏),从第一亚基因组启动子表达的IDT刺突$_g$接着是从第二亚基因组启动子表达的TCE5(中栏),或从第一亚基因组启动子表达的TCE5接着是从第二亚基因组启动子表达的IDT刺突$_g$(右栏),评估免疫应答,如上所述。在图18B中,SAM构建体包括单独的“IDT刺突$_g$”(SEQ ID NO:69)(第一栏),从第一亚基因组启动子表达的IDT刺突$_g$接着是从第二亚基因组启动子表达的TCE6或TCE7(分别为第2栏和第4栏),或从第一亚基因组启动子表达的TCE6或TCE7接着是从第二亚基因组启动子表达的IDT刺突$_g$(分别为第3栏和第5栏),评估免疫应答,如上所述。在图18C中,SAM构建体包括单独的“CT刺突$_g$”(SEQ ID NO:79)(第一栏),从第一亚基因组启动子表达的CT刺突$_g$接着是从第二亚基因组启动子表达的TCE5或TCE8(分别为第2栏和第4栏),或从第一亚基因组启动子表达的TCE5或TCE8接着是从第二亚基因组启动子表达的CT刺突$_g$(分别为第3栏和第5栏),评估免疫应答,如上所述。通常并且特别是对于刺突,当相应的表位从第二亚基因组启动子表达时,T细胞应答增加,包括相对于单独的刺突增加的刺突定向T细胞应答。当从第二亚基因组启动子表达刺突抗原时,通常也观察到类似的趋势,刺突特异性IgG滴度增加,但可能CT刺突$_g$构建体除外。因此,数据表明疫苗平台中抗原盒的序列顺序影响了免疫应答。

[0824] XIV.G.IV SARS-CoV-2疫苗初免剂量对小鼠中的刺突产生应答

[0825] 在小鼠中评估了编码SARS-CoV-2刺突蛋白的ChAd和SAM疫苗平台作为单一/初免疫苗。

[0826] 如上所述,用特征为“CT刺突$_g$”(SEQ ID NO:79)的刺突编码盒对小鼠进行免疫并随时间监测。如图19所示,在单次初免剂量后,ChAd(图19A)和SAM(图19B)疫苗两者在多个刺突T细胞表位池中都产生可检测的T细胞应答(左图),在初免后长达至少16周的刺突特异性IgG抗体(右图)和在初免后长达至少6周的中和抗体(右下图)。因此,数据表明,使用包含刺突盒的疫苗进行的初免免疫产生了广泛且有效的刺突特异性T细胞以及针对每个检查的疫苗平台的持久IgG和中和抗体滴度。

[0827] XIV.G.V SARS-CoV-2异源初免-加强方案对小鼠中的刺突产生应答

[0828] 编码SARS-CoV-2刺突蛋白的ChAd和SAM疫苗平台作为异源初免/加强方案的一部分在小鼠中进行了评估,如图20A所示(上图)。

[0829] 小鼠用包括特征为“CT刺突$_g$”(SEQ ID NO:79)的刺突编码盒的ChAd平台初免剂量

进行免疫,然后用包括特征为“IDT刺突$_g$”(SEQ ID NO:69)的刺突编码盒的SAM平台加强剂量进行免疫并随时间进行监测,如上所述。如图20所示,ChAd施用产生并且SAM施用随后加强了跨多个刺突T细胞表位池的可检测T细胞应答(图20A,下图),初免后长达至少14周的刺突特异性IgG抗体(图20B,左图)和初免后长达至少10周的中和抗体(图20B,右图)。值得注意的是,在加强施用后2周,SAM加强疫苗产生了T细胞应答增加9倍(包括通过ICS评估的Th1偏倚;ICS数据未示出),IgG产量增加100倍,并且中和抗体滴度增加40倍。因此,数据表明用包含刺突盒的疫苗进行免疫在小鼠中产生广泛且有效的刺突特异性T细胞和持久的IgG和中和抗体滴度,包括异源初免/加强疫苗方案在加强剂量施用后产生增加的应答。

[0830] XIV.G.VI SARS-CoV-2异源初免-加强方案对非人类灵长类动物中的刺突产生应答

[0831] 编码SARS-CoV-2刺突蛋白的ChAd和SAM疫苗平台作为异源初免/加强方案的一部分在印度恒河猴中进行了评估,如图21A所示(上图)。

[0832] NHP用包括特征为“CT刺突$_g$”(SEQ ID NO:79)的刺突编码盒的ChAd平台初免剂量进行免疫,然后用包括特征为“IDT刺突$_g$”(SEQ ID NO:69)的刺突编码盒的SAM平台加强剂量进行免疫并随时间进行监测,如上所述。如图21所示,在评估的所有五只NHP动物中,ChAd/SAM初免/加强疫苗方案在多个刺突T细胞表位池中产生可检测的峰值T细胞应答(图21A,中图和下图),初免后长达至少12周的刺突特异性IgG抗体(图21B,左上图)和初免后长达至少12周的中和抗体(图21B,左下图)进行了评估。值得注意的是,峰值刺突T细胞应答高于被认为对SIV和流感针对它们各自的刺突蛋白具有保护作用的水平(图21A,分别为下图顶部和底部虚线)。此外,中和抗体滴度比恢复期人类血清中发现的滴度高至少10倍(图21B,右图)并且高于被认为对SARS-CoV-2感染具有保护性的水平(McMahan等人,Nature 2020)。因此,数据表明,作为异源初免/加强疫苗方案的一部分,用包含刺突盒的疫苗进行免疫在NHP中产生广泛且有效的刺突特异性T细胞以及持久的IgG和中和抗体滴度,包括通常被认为具有保护性的抗体应答。

[0833] XIV.G.VII SARS-CoV-2同源初免-加强方案对小鼠中的刺突产生应答

[0834] 编码SARS-CoV-2刺突蛋白的SAM疫苗平台在小鼠中作为同源初免/加强方案的一部分进行了评估,如图22A所示(上图)。

[0835] 用SAM平台对小鼠进行免疫,所述平台包括特征为“IDT刺突$_D$”(SEQ ID NO:69,除D614外未改变)的刺突编码盒,并随时间监测,如上所述。如图22所示,SAM施用最初均产生并且再次施用随后增强了跨多个刺突T细胞表位池的可检测的T细胞应答(图22A,下图),初免后长达至少15周的刺突特异性IgG抗体(图22B,左图)和初免后长达至少15周的中和抗体(图22B,右图)。值得注意的是,SAM加强疫苗在加强施用后2周产生至少4倍增加的T细胞应答,在加强施用后7周80倍增加的IgG产生,以及在加强施用后7周中和抗体滴度增加25倍。因此,数据表明,用包含刺突盒的疫苗进行免疫可在小鼠中产生广泛且有效的刺突特异性T细胞以及持久的IgG和中和抗体滴度,包括同源初免/加强疫苗方案在加强剂量施用后产生增加的应答。

[0836] XIV.G.VIII SARS-CoV-2同源初免-加强方案对非人类灵长类动物中的刺突产生应答

[0837] 编码SARS-CoV-2刺突蛋白的SAM疫苗平台在印度恒河猴中作为同源初免/加强方

案的一部分进行了评估,如图23所示(上图)。

[0838] NHP用SAM平台进行免疫,所述平台包括特征为“IDT刺突$_g$”(SEQ ID NO:69)的刺突编码盒,并随时间进行监测,如上所述。如图23所示,SAM施用最初均产生并且再次施用随后增强了初免后长达至少12周的刺突特异性IgG抗体(图23,中图)和初免后长达至少10周的中和抗体(图23,下图)。值得注意的是,中和抗体滴度比恢复期人类血清中发现的滴度高至少10倍(图23,右下图)并且高于被认为对SARS-CoV-2感染具有保护性的水平(McMahan等人,Nature 2020)。此外,与高剂量(300μg)SAM施用相比,减剂量(30μg)SAM施用产生了更稳健的应答。因此,数据表明,用包含刺突盒的疫苗进行免疫在NHP中产生高持久IgG和中和抗体滴度,包括同源初免/加强疫苗方案在加强剂量施用后产生增加的应答,特别是在“低”剂量情况下,以及通常被认为具有保护性的抗体应答。

[0839] XIV.H.额外SARS-CoV-2疫苗构建

[0840] 构建疫苗以最大化经预测从验证表位获得总量值大于1000的人的百分比。简而言之,计算起始蛋白(例如,刺突)中所有经过验证的表位以及任何添加到TCE盒中的表位的量值,根据以下内容,预期大小上限约为刺突之外600个氨基酸:(1)个体的量值是其各自双倍型等位基因上所有表位量值的总和;(2)每个表位量值=(应答量值)x(阳性应答频率/100),其值见于Tarke等人,(Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases.Cell Rep Med.2021年2月16日;2(2):100204.doi:10.1016/j.xcrm.2021.100204.电子版2021年1月26日。),出于所有目的通过引用并入本文;(3)除了来自起始蛋白质的表位以外,以>5%频率跨越突变的表位被排除(参见表11,对于频率>1%的所有突变,无论是总体还是特定菌株),但允许在侧接区域中发生突变;以及(4)选择盒顺序以最小化跨相邻框架的非预期连接表位,以及最小化同一蛋白质中的连续框架以减少功能性蛋白质片段的机率,如上所述。

[0841] 产生了以下构造:(A)“TCE10”以完整的刺突蛋白作为起点,并根据上述添加验证表位,除了刺突外,总大小为378个氨基酸(表12A,表位图谱涵盖于图24A-24F中);(B)“TCE9”扩展TCE10并根据上述添加验证表位,只要前提是在SARS和SARS-2之间完全保守(例如,作为泛冠状病毒疫苗),扩展某些框架(所有框架中21个额外氨基酸)以包括额外的等位基因预测表位(即,未经验证的表位),除了刺突外,总大小为556个氨基酸(表12B,表位图谱涵盖于图25A-25G中);(C)“TCE11”以完整的刺突和核衣壳蛋白作为起点,并根据上述添加验证表位,除刺突外,总大小为616个氨基酸(197aa+全N)(表12C,表位图谱覆盖于图26A-26D)。表13A和表13B分别呈现了TCE5、TCE9、TCE10和TCE11中的每一种的跨越各个群体对SARS-CoV-2和SARS/SARS-CoV-2保守表位的量值覆盖率。值得注意的是,每种疫苗构建体覆盖了超过89%的每个指定群体,其经验证的应答量值大于1000并且大于95%的经验证的应答量值大于100,而TCE9覆盖超过74%的每个指定群体,对于SARS和SARS-2之间保守的表位,经验证的应答量值大于1000。图27呈现了SARS-CoV-2和SARS-CoV(左图)以及SARS-CoV-2和MERS(右图)之间共享候选9聚体表位分布的百分比,突出显示了刺突蛋白之外的保守序列的显著数量,证明了评价和包括超出仅由刺突编码的表位的值,特别是在构建泛冠状病毒疫苗的目标上。

[0842] 表11-总体或特定菌株中频率>1%的突变

[0843]

基因	位置	菌株	频率
M	70	b117	0.014
M	155	N501Y_早	0.048
M	162	N501Y_早	0.048
N	3	b117	0.999
N	13	N501Y_早	0.016
N	14	N501Y_早	0.016
N	67		0.028
N	80	P1	1
N	81	N501Y_早	0.033
N	151		0.011
N	194		0.056
N	199		0.041
N	203	b117	1
N	204	b117	1
N	205	N501Y_早	1
N	220		0.218
N	234		0.033
N	235	b117	0.999
N	359	N501Y_早	0.016
N	365		0.021
N	373	N501Y_早	0.016
N	376		0.029
N	377		0.018

[0844]

基因	位置	菌株	频率
N	398		0.015
ORF3a	15	b117	0.089
ORF3a	38		0.011
ORF3a	57	N501Y_早	0.982
ORF3a	90	b117	0.02
ORF3a	131	N501Y_早	0.036
ORF3a	171	N501Y_早	0.589
ORF3a	172		0.039
ORF3a	202		0.012
ORF3a	223		0.016
ORF3a	251		0.017
ORF3a	259	N501Y_早	0.018
S	5		0.012
S	18	N501Y_早	0.381
S	54	N501Y_早	0.016
S	69	b117	1
S	70	b117	1
S	80	N501Y_早	1
S	98		0.012
S	144	b117	1
S	215	N501Y_早	1
S	222		0.198
S	241	N501Y_早	1
S	242	N501Y_早	1
S	243	N501Y_早	1
S	246	N501Y_早	0.016
S	262		0.011
S	316	N501Y_早	0.016
S	384	N501Y_早	0.016
S	417	N501Y_早	0.984
S	439		0.017
S	477		0.048
S	484	N501Y_早	1
S	501	b117	1
S	570	b117	1
S	614	b117	1
S	681	b117	1
S	682	切割	1
S	683	切割	1
S	685	切割	1
S	688	N501Y_早	0.016
S	701	N501Y_早	1
S	706	b117	0.018
S	716	b117	1
S	982	b117	1

基因	位置	菌株	频率
S	1078	N501Y_早	0.016
S	1117	N501Y_早	0.016
S	1118	b117	1
S	1150	N501Y_早	0.016
nsp12	4577		0.026
nsp12	4646		0.01
nsp12	4715		0.885
nsp12	4815		0.011
nsp12	5112		0.016
nsp12	5168		0.025
nsp13	5542		0.025
nsp13	5585		0.026
nsp13	5614		0.022
nsp13	5784		0.027
nsp13	5922		0.017
nsp14	6054		0.024
nsp14	6426		0.011
nsp15	6485		0.015
nsp16	7014		0.028
nsp2	265		0.132
nsp2	300		0.042
nsp3	1001		0.059
nsp3	1113		0.011
nsp3	1246		0.011
nsp3	1361		0.01
nsp3	1708		0.058
nsp3	2230		0.058
nsp3	2501		0.02
nsp3	2606		0.011
nsp4	3087		0.025
nsp5	3278		0.016
nsp5	3352		0.034
nsp5	3353		0.013
nsp5	3371		0.013
nsp6	3606		0.056
nsp6	3675		0.064
nsp6	3676		0.064
nsp6	3677		0.064
nsp6	3711		0.015
nsp7	3884		0.01
nsp9	4241		0.016

[0845]

[0846] 表12A-TCE10盒(框架顺序如所示)

[0847]

基因	基因中的框架起始	基因中的框架终止	框架序列	SEQ ID NO:

[0848]

基因	基因中的框架起始	基因中的框架终止	框架序列	SEQ ID NO:
N	356	378	HIDAYKTFPPTEPKKDKKKKADE	27944
ORF3a	133	149	CRSKNPLLYDANYFLCW	27945
nsp3	1632	1660	FEYYHTTDPSFLGRYMSALNHTKK WKYPQ	27946
nsp3	1360	1377	ISNEKQEILGTVSWNLRE	27947
M	160	203	DIKDLPKEITVATSRTLSYYKLGASQ RVAGDSGFAAYSRYRIGN	27948
ORF3a	29	52	VRATATIPIQASLPFGWLIVGVAL	27949
nsp4	3111	3134	YLTFYLTNDVSFLAHIQWMVMFTP	27950
M	89	109	GLMWLSYFIASFRLFARTRSM	27951
nsp12	4553	4571	DWYDFVENPDILRVYANLG	27952
nsp3	1919	1935	PYPNASFDNFKFVCDNI	27953
nsp12	4806	4826	NFNKDFYDFAVSKGFFKEGSS	27954
nsp12	4728	4745	DGVPFVVSTGYHFRELGV	27955
nsp4	2850	2876	ACPLIAAVITREVGFVVPGLPGTILRT	27956
nsp3	2745	2761	ATTRQVVNVVTTKIALK	27957
N	318	337	SRIGMEVTPSGTWLTYTGAI	27958
M	61	77	TLACFVLAAVYRINWIT	27959
N	96	117	GGDGKMKDLSPRWYFYYLGTGP	27960

[0849] 表12B-TCE9盒(框架顺序如所示)

[0850]

基因	基因中的框架起始	基因中的框架终止	框架序列	SEQ ID NO:
nsp12	4719	4745	GPLVRKIFVDGVPFVVSTGYHFREL GV	27961
nsp4	3096	3134	PVYSFLPGVYSVIYLYLTFYLTNDVS FLAHIQWMVMFTP	27962
M	89	109	GLMWLSYFIASFRLFARTRSM	27951
nsp12	4888	4905	NNLDKSAGFPFNKWGKAR	27963
nsp3	2745	2761	ATTRQVVNVVTTKIALK	27957
M	61	79	TLACFVLAAVYRINWITGG	27964
nsp3	1919	1935	PYPNASFDNFKFVCDNI	27953
nsp3	2676	2692	TYNKVENMTPRDLGACI	27965
ORF3a	29	52	VRATATIPIQASLPFGWLIVGVAL	27949
nsp12	4806	4826	NFNKDFYDFAVSKGFFKEGSS	27954
N	96	117	GGDGKMKDLSPRWYFYYLGTGP	27960
nsp12	5213	5234	KQGDDYVYLPYPDPSRILGAGC	27966
N	356	378	HIDAYKTFPPTEPKKDKKKKADE	27944
ORF3a	133	149	CRSKNPLLYDANYFLCW	27945
nsp6	3643	3668	SLATVAYFNMVYMPASWVMRIMT WLD	27967
nsp12	4529	4545	GNCDTLKEILVTYNCCD	27968
nsp3	1630	1660	EAFEYYHTTDPSFLGRYMSALNHTK	27969

[0851]

			KWKYPQ	
nsp3	1360	1377	ISNEKQEILGTVSWNLRE	27947
M	160	203	DIKDLPKEITVATSRTLSYYKLGASQ RVAGDSGFAAYSRYRIGN	27948
N	301	337	WPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVT PSGTWLTYTGAI	27970
nsp12	4553	4571	DWYDFVENPDILRVYANLG	27952
nsp4	2850	2909	ACPLIAAVITREVGFVVPGLPGTILRT TNGDFLHFLPRVFSAVGNICYTPSKL IEYTDFA	27971

[0852] 表12C-TCE11盒(框架顺序如所示)

[0853]

基因	基因中的框架起始	基因中的框架终止	框架序列	SEQ ID NO:
nsp12	4896	4826	NVAFQTVKPGNFNKDFYDFAVSKGF FKEGSS	27972
M	182	203	GASQRVAGDSGFAAYSRYRIGN	27973
nsp12	4728	4745	DGVPFVVSTGYHFRELGV	27955
nsp4	3111	3134	YLTFYLTNDVSFLAHIQWMVMFTP	27950
M	89	109	GLMWLSYFIASFRLFARTRSM	27951
nsp3	1632	1660	FEYYHTTDPSFLGRYMSALNHTKK WKYPQ	27946
nsp3	1360	1377	ISNEKQEILGTVSWNLRE	27947
nsp3	2745	2761	ATTRQVVNVVTTKIALK	27957
M	61	77	TLACFVLAAVYRINWIT	27959

[0854] 表13A-SARS-CoV-2验证表位的群体覆盖率(不包括>5%的突变)

[0855]

盒	量值	起始蛋白质	AFA	API	EUR	HIS	平均值	最小值
刺突	1	S	0.95	0.89	1	0.98	0.95	0.89
S+N+TCE11	1	S,N	0.97	0.95	1	0.99	0.98	0.95
S+TCE10	1	S	0.97	0.95	1	0.99	0.98	0.95
S+TCE9	1	S	0.97	0.95	1	0.99	0.98	0.95
S+TCE5	1	S	0.95	0.95	1	0.98	0.97	0.95
刺突	100	S	0.92	0.86	1	0.96	0.93	0.86
S+N+TCE11	100	S,N	0.95	0.95	1	0.99	0.97	0.95
S+TCE10	100	S	0.95	0.95	1	0.99	0.97	0.95
S+TCE9	100	S	0.95	0.95	1	0.99	0.97	0.95
S+TCE5	100	S	0.92	0.94	1	0.97	0.96	0.92
刺突	1000	S	0.6	0.62	0.91	0.75	0.72	0.6
S+N+TCE11	1000	S,N	0.89	0.92	1	0.96	0.94	0.89

[0856]

S+TCE10	1000	S	0.9	0.92	1	0.97	0.95	0.9
S+TCE9	1000	S	0.9	0.92	1	0.97	0.95	0.9
S+TCE5	1000	S	0.68	0.7	0.93	0.8	0.78	0.68
刺突	2000	S	0.39	0.49	0.73	0.56	0.54	0.39
S+N+TCE11	2000	S,N	0.66	0.72	0.96	0.82	0.79	0.66
S+TCE10	2000	S	0.72	0.73	0.96	0.85	0.81	0.72
S+TCE9	2000	S	0.76	0.77	0.98	0.9	0.85	0.76
S+TCE5	2000	S	0.49	0.54	0.81	0.66	0.62	0.49

[0857] 表13B-SARS与SARS-CoV-2之间经过验证的保守表位的群体覆盖率(不包括>5%的突变)

[0858]

盒	量值	起始蛋白质	AFA	API	EUR	HIS	平均值	最小值
刺突	1	S	0.74	0.82	0.98	0.91	0.87	0.74
S+N+TCE11	1	S,N	0.89	0.93	1	0.97	0.95	0.89
S+TCE10	1	S	0.94	0.93	1	0.97	0.96	0.93
S+TCE9	1	S	0.94	0.93	0.99	0.97	0.96	0.93
S+TCE5	1	S	0.87	0.91	0.99	0.95	0.93	0.87
刺突	100	S	0.74	0.78	0.98	0.89	0.85	0.74
S+N+TCE11	100	S,N	0.89	0.91	0.99	0.95	0.94	0.89

S+TCE10	100	S	0.94	0.93	0.99	0.97	0.96	0.93
S+TCE9	100	S	0.94	0.92	0.99	0.97	0.96	0.92
S+TCE5	100	S	0.86	0.88	0.98	0.93	0.91	0.86
刺突	1000	S	0.18	0.2	0.46	0.27	0.28	0.18
S+N+TCE11	1000	S,N	0.49	0.67	0.76	0.62	0.63	0.49
S+TCE10	1000	S	0.52	0.56	0.71	0.55	0.59	0.52
S+TCE9	1000	S	0.74	0.81	0.92	0.84	0.83	0.74
S+TCE5	1000	S	0.33	0.42	0.62	0.49	0.47	0.33
刺突	2000	S	0.01	0.03	0.08	0.03	0.04	0.01
S+N+TCE11	2000	S,N	0.24	0.2	0.41	0.28	0.28	0.2
S+TCE10	2000	S	0.2	0.15	0.34	0.17	0.21	0.15
S+TCE9	2000	S	0.4	0.37	0.7	0.51	0.49	0.37
S+TCE5	2000	S	0.21	0.11	0.34	0.24	0.22	0.11

[0859] XIV.I.SARS-CoV-2恢复期人类PBMC显示T细胞对疫苗构建体中编码的T细胞表位的应答

[0860] 在自然感染期间,T细胞在初次暴露后2-3周内引发并扩增,并因此需要数周时间才能有效地开始清除受感染细胞。相比之下,疫苗诱导的T细胞应答能够在暴露后迅速扩增,并因此在疫苗诱导的抗体滴度不再足以预防感染的情况下,可能会预防(严重)感染。因此,分析了来自恢复期SARS-CoV-2受试者的PBMC样品中是否存在对刺突和T细胞表位(TCE5)区域的功能性和细胞毒性记忆T细胞应答,以评估疫苗盒构建体中包含的SARS-CoV-2抗原部分刺激的T细胞应答是否类似于由自然感染刺激的应答,并因此可能与诱导针对SARS-CoV-2感染的保护性免疫有关。

[0861] IFNγELISpot测定

[0862] 产生IFNγ的T细胞的检测通过ELISpot测定法进行[S.Janetzki,J.H.Cox,N.Oden,G.Ferrari,Standardization and validation issues of the ELISPOT assay.Methods Mol Biol 302,51-86(2005)]。简而言之,将细胞收获、计数并以$4x10^6$个细胞/毫升(离体PBMC)或$2x10^6$个细胞/毫升(IVS扩增细胞)重悬于培养基中,并在涂有抗人类IFNγ捕获抗体(Mabtech,Cincinnati,OH,USA)的ELISpot Multiscreen板(EMD Millipore)中在DMSO(VWR International)、植物血凝素-L(PHA-L;Sigma-Aldrich,Natick,MA,USA)或SARS-CoV-2刺突重叠肽池(表D)、TCE5编码的重叠肽池(表E)或TCE5编码的最小表位肽池(表F)的存在下培养。肽池进一步细分为较小的池,按SARS-CoV-2蛋白来源、EDGE预测和/或文献中先前报告/验证(“验证”)分类(例如,如Nelde等人[Nature Immunology第22卷,第74-85页2021];Tarke等人,2021;或Schelien等人[bioRxiv 2020.08.13.249433]中)。在5%CO_2、37℃、加湿孵育箱中孵育18h后,收集上清液,从板中取出细胞,并使用抗人IFNγ检测抗体(Mabtech)、Vectastain亲合素过氧化物酶复合物(Vector Labs,Burlingame,CA,USA)和AEC底物(BD Biosciences,San Jose,CA,USA)检测膜结合的IFNγ。在AID iSpot读取仪(Autoimmun Diagnostika)上对板进行成像和计数。数据呈现为每百万个细胞的斑点形成

单位(SFU)。PBMC是购买的(Tissue Solutions;“队列1”)或获自第二个来源(“队列2”)。

[0863] 体外刺激(IVS)培养物

[0864] 来自恢复期患者PBMC样品的SARS-CoV-2反应性T细胞在存在覆盖刺突(表D)和T细胞表位(TCE)区域(表E)的重叠肽池和低剂量IL-2的情况下进行扩增,如先前所述[B.Bulik-Sullivan等人,Deep learning using tumor HLA peptide mass spectrometry datasets improves neoantigen identification.Nat Biotechnol,(2018)]。简而言之,将解冻的PBMC静置过夜并在48孔或24孔组织培养板中在具有10IU/ml rhIL-2(R&D Systems Inc.,Minneapolis,MN)的ImmunoCult™-XF T细胞扩增培养基(IC media;STEMCELL Technologies)中在组合刺突或总TCE_OLP重叠肽池(4-5μg/ml/肽)的存在下刺激14天。细胞以1-2x10^{6}个细胞/孔接种,并且每2-3天通过用rhIL-2替换2/3培养基进行补料。根据制造商的说明,使用来自Miltenyi(Miltenyi Biotech Inc.,Auburn,CA)的CD4+或CD8+T细胞分离试剂盒进行IVS刺激后和ELISpot测定之前的CD4+和CD8+T细胞耗竭。

[0865] IncuCyte杀伤测定

[0866] 将用红色慢病毒转导的表达HLA的A375细胞(A*01:01、A*02:01、A*03:01、A*11:01和A*30:01)以每孔2.5x10^{4}个细胞的浓度接种在96孔板中或以每孔3.5x10^{4}个细胞的浓度接种在48孔板中的具有10%热灭活FBS的DMEM中。将板置于Incucyte®S3(Essen Biosciences)中,并且在接种24小时后,将效应细胞以每孔2.5x10^{5}个细胞的浓度涂铺在96孔板中或以3.5x10^{5}个细胞/孔的浓度涂铺在48孔板中,使效应子/靶标比率为10:1。将最小表位肽池添加到处理孔中,最终浓度为4μg/mL,并且DMSO用于对照孔。用Incucyte®对板成像总共2-4天,然后使用Incucyte®S3 2018分析软件分析数据。通过红细胞计数评估A375的活力,并从相对于DMSO共培养对照孔的效应子添加时间(0h)计算相对靶标计数。

[0867] 结果

[0868] 通过IFNγELISpot评估T细胞对刺突和TCE5编码表位的应答。如图28所示并在表14中量化,对于直接离体测试(即,没有IVS扩增)的PBMC,在各种指示的刺突肽池和TCE5编码肽池中观察到小的但可检测的表位特异性应答。如图29所示并在表15中量化,IVS扩增的PBMC(队列1)在所检查的各种指示的刺突肽池和TCE5编码的肽池中表现出稳健的表位特异性应答。如图30所示并在表16中量化,IVS扩增的PBMC(队列2)在所检查的各种指示的刺突肽池和TCE5编码的肽池中表现出稳健的表位特异性应答,包括高于定量上限(ULOQ)的应答。图31所示的是来自IVS扩增的PBMC(队列1和队列2两者;参见图29和图30)的样品选择,在所检查的各种指示的最小TCE5编码肽池(经过验证和EDGE预测两者)中表现出稳健的表位特异性应答,包括高于定量上限(ULOQ)的应答。结果表明,在TCE5中包含的刺突和选定的T细胞表位都刺激了广泛且稳健的T细胞应答,类似于由自然感染刺激的应答,表明当作为疫苗施用时,有可能提供针对SARS-CoV-2感染的保护性免疫。

[0869] 进一步检查T细胞对TCE5编码表位的应答以表征T细胞应答。如图32所示并在表17中量化,IVS扩增的PBMC(队列1)在所检查的各种指示的TCE5编码肽池(第1栏)中表现出稳健的表位特异性应答。PBMC的CD8耗竭通常会导致降低但仍可检测到的T细胞应答(下图,第3栏),而PBMC的CD4耗竭在各种池和供体来源(第2栏)中具有不同的影响。结果表明用于包含在TCE5中的选定T细胞表位刺激了混合的CD4/CD8 T细胞应答。

[0870] 进一步检查了T细胞对TCE5编码表位的应答以评估靶细胞的功能性杀伤。如图

33A-L中所示并在表18A-L中量化，在检查的各种指示的TCE5编码肽池中，对于表达HLA等位基因的靶细胞中的每一者，以肽和效应T细胞特异性方式(空心方块)观察靶细胞杀伤。结果表明，选择包含在TCE5中的T细胞表位促进了自然感染期间产生的T细胞介导的T细胞杀伤，表明当作为疫苗施用时，有可能促进针对SARS-CoV-2感染的保护性免疫。

[0871]

表 14 – T 细胞对刺突和 TCE5 编码表位的应答(IFNγ ELISpot; 离体)

PBMC ID	20% H2O 80% DMSO (媒介物)		PHA (阳性对照)		Min EDGE Nuc		Min EDGE ORF3a		Min 验证		OLP Mem		OLP Nuc		OLP ORF3a		Min EDGE Nuc Expl.		Min EDGE ORF3a Expl.		Min Sette		Sp-Wu 1_2		Sp-Wu 3_4		Sp-Wu 5_6		Sp-Wu 7_8	
111120AT	15	10	4355	6500	30	15	0	0	30	5	0	15	90	115	35	50							50	35	10	10	60	15	65	70
120820C	0	0	5150	4865	10	0	0	0	15	10	55	55	35	70	50	15	5	15	10	0	145	80	10	85	110	5	90	70	100	110
111120AR	10	0	5410	5470	45	15	0	0	25	15	20	20	5	10	25	10							25	10	20	20	15			
112020E	90	80	4345	4410	17	24	80	80	135	110	95	75	215	290	100	45	155	95	45	95	45	30	175	55	200	170	85	90	100	75
120820F	5	20	5685	5910	65	20	5	0	45	45	10	10	100	130	30	20							25	35	85	130	40	35		
121520C	90	35	5460	5870	90	125	60	130	80	70	65	50	230	150	115	65							110	60	80					
112020C	15	40	4695	4670	45	45	30	35	15	0	10	15	30	10	5	5	20	35	10	15			0	15	20	40	20	20	5	5
112020D	80	45	6090	6160	75	130	10	70	90	110	55	60	240	50	65	20	75	60	60	30	45	25	30	85	95	130	125	115	45	60
120820A	0	0	3515	4210	60	60	0	0	5	10	20	15	90	70																

[0872]

每 1e6 个细胞的斑点形成单位(SFU)(技术重复试验)

| | | |

[0873]

表 15 – T 细胞对 TCE5 编码表位的应答–队列 1 PBMC (IFNγ ELISpot; IVS 后)

PBMC ID	20% H2O 80% DMSO (媒介物)		PHA (阳性对照)		TCE OLP		OLP Mem		OLP Nuc		OLP ORF3a		Min 验证		Min EDGE Nuc		Min EDGE ORF3a		Min EDGE Nuc Expl.		Min EDGE ORF3a Expl.		Min Sette	
121520C	360	640	6960	6650	5640	5840	980	830	5950	6280	2930	2850	5210	5510	6290	6510	4800	6900						
111120AR	110	190	6510	6330	4970	4630	1010	560	4630	5590	1990	2250	5720	7010	4030	1660	1200	3200						
120820F	290	300	5760	6470	5020	4770	380	180	4840	5430	1990	1690	6310	7010	3760	1190	5700	5800	4750	6480	1920	2460	2740	2330
121520A	400	100	6370	6340	2040	2140	80	140	1940	2020	5100	9600	1740	1100	2690	2950	1100	1200	4940	2970	3400	500	3780	3720
121520A	10	0	6550	6430			160	120																
121520A	200	130	4600	5620					3520	4280					5730	3960			3750	3450				
121520A	280	110	6760	6550							2210	4760					7300	9200			1400	1800		

每 1e6 个细胞的斑点形成单位(SFU)(技术重复试验)

[0874]

表 16 – T 细胞对 TCE5 编码表位的应答–队列 2 (IFNγ ELISpot; IVS 后)

PBMC ID	20% H2O 80% DMSO (媒介物)		PHA (阳性对照)		TCE OLP		OLP Mem	OLP Nuc		OLP ORF3a		Min 验证		Min EDGE Nuc		Min EDGE ORF3a	
169923	910	870	13000	13000	13000	13000	2100	2070	13000	13000	7280	7320	13000	13000	13000	6280	3250
169923	0		980		30								10				
251227	40	30	6530	6620	140	180	0	20	180	120	10	10	2210				
425053	1430	1390	13000	13000	13000	13000	3220	3380	13000	13000	8240	8360	13000	13000	7190	7430	7850	7820
425053	30	70	5450	4990	5000	4330												
548367	120	60	13000	13000	13000	13000	170	110	13000		380							
548367	160	100	10270	9750	3390	3400	60	70	5000	5500	390	490	5940	6020	1840	2050	2890	2970
579992	1470	1510	13000	13000	13000	13000	4840	4670	13000	13000	7130	7240	13000	13000	13000	13000	6210	3560
579992	430	380	6590	6530	7110	6840	450	670	5860	6360	6040	6050	6850	6830	6650	6630	7180	7460
592571	220	210	13000	13000	7030	7220	1760	2010	6850	6760	5520	5510	4270	4560	7180	7710	4650	4570
592571	1640	1710	13000	13000	13000	13000	4020	3670	13000	13000	7970	7750	13000	13000	7110	7140	7060	7080
711280	70	100	9930	9950	1530	1470	60	90	1710	1810	330	230	2470	2400	520	640	120	210
711280	70	80	11710	11380	4750	4840	60	80	6210	6010	380	390	7200	7450	3550	3390	1040	1350
270554	0	10	3830	3540	10	40	20	10										
270554	1060	1200	7650	7120	5730	5890	2610	2700	4620	4580	3790	4200	5760		1570		1050	
277045	300	40	8270	10150	4180	4090												
277045	20	30	6420		1050	1210												
306916	1910	2340	13000	13000	13000	13000	2190	1960	3190	3460	13000	13000	3570	3710	13000	13000	2820	2770
306916	130	30	13000	13000	4290	4180	130											

[0875]

317737	250		13000		6860		5770	5790	6180	6120	2960	2990	5680		3370		2530	
317737	650	960	13000	13000	7150	7130	2470	2550	5850	5760	6780	6690	2560	2410	1340	1160	7360	7070
383468	60		30		10													
383468	1690	1780	13000	13000	13000	13000	5500	5360	13000	13000	5150	5140	6850	7410	4810	5040	5830	6020
389341	490	720	13000	13000	5510	5570	1120	1170	4940	4680	4180	4510	4600					
389341	680	630	13000	13000	4560	4850	1340	1340	3850	3980	4760	4180	4300	4320	5430	5380	1940	2410
849884	610	830	13000	13000	13000	13000	3520	3520	13000	13000	13000	13000	1300 0	1300 0	5210	4930	13000	13000
849884	390		5700		1260													
907902	430	260	5170	13000	3410	3490	900	1280	4500	4510	960	1620	1350	1340	470	780	2890	3080
907902	480	220	13000	13000	7300	7660	1400	1570	7690	7500	7510	7210	1300 0	1300 0	6610	7400	7520	7670
627934	390	310	13000	13000	3490	3440	1060	1070	3580	3570	1670	1810	3950	4040	1680	1680	790	660
627934	480	190	13000	13000	4540	4610	1120	1190	5000	4600	2950	3230	5430	5090	1500	1490	2680	2670
865452	570	510	6800	7040	5580	5680	630	570	13000	13000	1440	1630	850	730	5450	5640	660	830
865452	410	270	13000	13000	4690	4860	620	410	4310	4750	2100	2140	1000	1150	4150	3940	470	450
602232	30	0	5400	5620	3740	4200	20	70	6160	6680	30	30	1300 0	1300 0	30	30	40	30
602232	180	240	5830	5870	2500	2650	260	320	3970	4200	210	160	5890	5910	300	180	190	200
646382	20	20	3650	3670	640	600	50	40	320	300	550	700	1440	1370	250	180	1130	970
646382	0	0	6290	6680	5140	5830	10	30	7070	7100	500	660	1300 0	1300 0	240	150	1050	1030
941176	670	420	6780	6640	5860	5990	710	810	4850	5230	5530	5280	7250	7070	6880	7040	6660	6410

每 1e6 个细胞的斑点形成单位(SFU)(技术重复试验)

[0876]

表 17 – T 细胞对 TCE5 编码表位 CD4/CD8 耗竭的应答–队列 1 (IFNγ ELISpot; 离体)

PBMC ID	条件	20% H2O 80% DMSO (媒介物)		PHA (阳性对照)		TCE OLP		OLP Mem		OLP Nuc		OLP ORF3a		Min 验证		Min EDGE Nuc		Min EDGE ORF3a	
121120C	PBMC	440	350	5950	6270	2590	1540	310	400	1010	1060	650	670	1250	1280	1990	3440	900	1200
121120C	CD4 耗竭	100	140	5520	5980	910	910	260	180	910	880	250	190	1030	1050	1990	1890	710	680
121120F	PBMC	330	150	6190	6090	3720	3810	180	230	3870	3640	510	120	3450	3690	1620	1420	840	1180
121120F	CD4 耗竭	320	310	4680	4730	2760	2650	290	360	3780	4090	520	310	6130	5620	1560	1870	1250	1070
121120F	CD8 耗竭	230	230	5810	5250	1270	1570	220	210	2510	2490	300	280	1820	1920	720	530	410	380

每 1e6 个细胞的斑点形成单位(SFU)(技术重复试验)

[0877] 表18A-杀伤测定(A＊03:01靶标;队列2供体169923;验证池)

[0878]

流逝时间(h)	相对靶细胞计数							
	DMSO +靶标		Min_验证+靶标		Min_验证+ 10:1 E:T		DMSO + 10:1 E:T	
0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	-0.01324	-0.06020	0.01030	-0.04000	0.00821	-0.00603	0	0
8	0.05701	0.04465	0.12453	0.08240	0.00841	-0.01194	0	0
12	0.13986	0.17088	0.28847	0.26613	-0.04966	-0.05472	0	0
16	0.34307	0.38717	0.49053	0.47554	-0.03273	-0.13508	0	0
20	0.50381	0.62799	0.67542	0.74838	-0.13429	-0.18802	0	0
24	0.72815	0.86933	0.96280	1.05832	-0.28017	-0.31067	0	0
28	0.96880	1.15188	1.19516	1.32867	-0.37962	-0.44843	0	0
32	1.20932	1.50413	1.47961	1.68586	-0.48409	-0.51295	0	0
36	1.47688	1.94340	1.89230	2.19941	-0.59226	-0.65697	0	0
40	1.77778	2.33481	2.25071	2.65348	-0.77473	-0.81342	0	0
44	1.99233	2.65702	2.57367	3.23976	-0.95032	-0.99916	0	0
48	2.12635	2.89103	2.94382	3.81998	-1.16628	-1.24008	0	0
52	2.11070	3.01152	3.06229	4.30811	-1.46616	-1.47099	0	0
56	1.95512	3.05273	3.15095	4.66875	-1.75737	-1.70104	0	0
60	1.70074	2.93234	2.98756	4.82178	-2.06228	-2.01444	0	0
64	1.45363	2.72321	2.83818	4.97395	-2.27938	-2.27634	0	0
68	1.04123	2.36000	2.56926	4.88298	-2.52690	-2.57086	0	0

[0879] 表18B-杀伤测定(A＊02:01靶标;队列2供体389341;ORF3a池)

[0880]

流逝时间(h)	相对靶细胞计数			
	DMSO +靶标	Min_ORF3a +靶标	Min_ORF3a + 10:1 E:T	DMSO + 10:1 E:T

[0881]

0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0.01813	0.02413	0.00988	-0.01350	-0.00427	0.00992	0	0
8	0.08048	0.06653	0.04010	0.02566	-0.00763	-0.03750	0	0
12	0.17361	0.10990	0.11690	0.05167	-0.01070	-0.10823	0	0
16	0.31379	0.20136	0.22194	0.13147	-0.04211	-0.20612	0	0
20	0.53036	0.37716	0.40752	0.28054	-0.09218	-0.32701	0	0
24	0.76710	0.55804	0.58343	0.42801	-0.19155	-0.47142	0	0
28	0.95779	0.74903	0.71718	0.56596	-0.32093	-0.62224	0	0
32	1.19255	0.98206	0.88543	0.69975	-0.43939	-0.76130	0	0
36	1.39711	1.17513	0.99709	0.82011	-0.57471	-0.88468	0	0
40	1.52634	1.28181	1.04170	0.87370	-0.71506	-1.04042	0	0
44	1.61547	1.38534	1.02950	0.89848	-0.86036	-1.16624	0	0
48	1.64176	1.45046	0.97523	0.87336	-0.99708	-1.27647	0	0
52	1.59635	1.46211	0.84139	0.83014	-1.16652	-1.35229	0	0
56	1.54683	1.48783	0.70914	0.77852	-1.26086	-1.39289	0	0
60	1.45560	1.45470	0.57591	0.66815	-1.34735	-1.45718	0	0
64	1.33675	1.40186	0.41942	0.58206	-1.41787	-1.46087	0	0
68	1.23903	1.40829	0.22741	0.52066	-1.48594	-1.41489	0	0
72	1.07091	1.35932	0.02513	0.37378	-1.49870	-1.42231	0	0

[0882] 表18C-杀伤测定(A＊02:01靶标;队列2供体941176;验证池)

[0883]

流逝时间(h)	相对靶细胞计数							
	DMSO +靶标		Min_验证+靶标		Min_验证+ 10:1 E:T		DMSO + 10:1 E:T	
0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0.01532	0.05102	0.01980	0.07975	0.01998	-0.00068	0	0
8	0.05280	0.04899	0.07623	0.06806	0.01093	-0.02192	0	0

[0884]

12	0.10320	0.10773	0.11381	0.11013	-0.03526	-0.07110	0	0
16	0.20356	0.14613	0.22404	0.17072	-0.07934	-0.14204	0	0
20	0.26641	0.21665	0.29396	0.19666	-0.17641	-0.22310	0	0
24	0.41793	0.26733	0.38457	0.26444	-0.28684	-0.34405	0	0
28	0.45493	0.30914	0.50778	0.34286	-0.42130	-0.44097	0	0
32	0.53945	0.42156	0.64327	0.42477	-0.52726	-0.56755	0	0
36	0.67100	0.48433	0.76177	0.48536	-0.69071	-0.69946	0	0
40	0.79428	0.56346	0.89700	0.53973	-0.84661	-0.83568	0	0
44	0.92184	0.70204	1.07137	0.62367	-0.95901	-0.94594	0	0
48	1.02424	0.79970	1.20774	0.70555	-1.06150	-0.98164	0	0
52	1.10741	0.89832	1.25933	0.74321	-1.17078	-1.04230	0	0
56	1.19650	1.00048	1.36889	0.80313	-1.22608	-1.06541	0	0
60	1.30822	1.07780	1.46006	0.78342	-1.26770	-1.08377	0	0
64	1.39824	1.22429	1.56200	0.86895	-1.24641	-1.05659	0	0
68	1.50965	1.34178	1.64143	0.95012	-1.24737	-1.04084	0	0
72	1.60292	1.43251	1.73939	1.00085	-1.23876	-1.01696	0	0

[0885] 表18D-杀伤测定(A＊02:01靶标;队列2供体941176;ORF3a池)

[0886]

流逝时间(h)	相对靶细胞计数							
	DMSO +靶标		Min_ORF3a +靶标		Min_ORF3a + 10:1 E:T		DMSO + 10:1 E:T	
0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0.01532	0.05102	0.01368	0.03929	-0.01362	0.02079	0	0
8	0.05280	0.04899	0.03835	0.05745	-0.01528	-0.00445	0	0
12	0.10320	0.10773	0.07735	0.07435	-0.04046	-0.04591	0	0
16	0.20356	0.14613	0.13914	0.11389	-0.06285	-0.06571	0	0

[0887]

20	0.26641	0.21665	0.20388	0.18453	-0.13547	-0.15319	0	0
24	0.41793	0.26733	0.29916	0.23321	-0.19915	-0.22668	0	0
28	0.45493	0.30914	0.36812	0.28277	-0.25720	-0.30765	0	0
32	0.53945	0.42156	0.45725	0.37443	-0.32992	-0.38155	0	0
36	0.67100	0.48433	0.55619	0.42135	-0.44857	-0.44952	0	0
40	0.79428	0.56346	0.64631	0.44819	-0.51089	-0.51524	0	0
44	0.92184	0.70204	0.72227	0.51756	-0.53635	-0.53062	0	0
48	1.02424	0.79970	0.79836	0.57155	-0.56778	-0.54288	0	0
52	1.10741	0.89832	0.83831	0.56846	-0.61847	-0.52513	0	0
56	1.19650	1.00048	0.86442	0.56057	-0.60504	-0.46411	0	0
60	1.30822	1.07780	0.91177	0.56276	-0.63331	-0.40439	0	0
64	1.39824	1.22429	0.96549	0.60834	-0.57249	-0.30643	0	0
68	1.50965	1.34178	1.05166	0.64282	-0.51845	-0.24072	0	0
72	1.60292	1.43251	1.07900	0.65671	-0.51894	-0.17774	0	0

[0888] 表18E-杀伤测定(A＊02:01靶标;队列2供体941176;核衣壳池)

[0889]

流逝时间(h)	相对靶细胞计数							
	DMSO +靶标		Min_Nuc +靶标		Min_Nuc + 10:1 E:T		DMSO + 10:1 E:T	
0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0.01532	0.05102	0.06988	0.06566	0.04388	0.03412	0	0
8	0.05280	0.04899	0.10368	0.08263	0.02480	0.01346	0	0
12	0.10320	0.10773	0.16203	0.14887	-0.03506	-0.01521	0	0
16	0.20356	0.14613	0.27849	0.20725	-0.06824	-0.03866	0	0
20	0.26641	0.21665	0.35316	0.29750	-0.15670	-0.09212	0	0
24	0.41793	0.26733	0.46095	0.37671	-0.26481	-0.15582	0	0

[0890]

28	0.45493	0.30914	0.52183	0.46726	-0.37496	-0.22656	0	0
32	0.53945	0.42156	0.65115	0.57861	-0.49673	-0.29697	0	0
36	0.67100	0.48433	0.74409	0.66137	-0.59813	-0.37287	0	0
40	0.79428	0.56346	0.82654	0.71687	-0.74050	-0.44543	0	0
44	0.92184	0.70204	0.93208	0.80231	-0.79674	-0.46168	0	0
48	1.02424	0.79970	0.99082	0.89097	-0.84785	-0.41341	0	0
52	1.10741	0.89832	0.98485	0.89494	-0.91387	-0.39943	0	0
56	1.19650	1.00048	1.03040	0.90153	-0.93826	-0.34660	0	0
60	1.30822	1.07780	1.03495	0.92227	-0.92267	-0.23926	0	0
64	1.39824	1.22429	1.08957	0.94305	-0.86242	-0.10813	0	0
68	1.50965	1.34178	1.15787	0.95883	-0.79271	-0.00004	0	0
72	1.60292	1.43251	1.15891	1.00420	-0.71833	0.10316	0	0

[0891] 表18F-杀伤测定(A＊01:01靶标;队列2供体941176;验证池)

[0892]

流逝时间(h)	相对靶细胞计数							
	DMSO +靶标		Min_验证+靶标		Min_验证+ 10:1 E:T		DMSO + 10:1 E:T	
0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	-0.00284	0.01628	0.01164	0.02806	-0.00481	-0.00230	0	0
8	0.01606	0.04954	0.02006	0.04011	-0.03412	-0.02824	0	0
12	0.03544	0.06344	0.03761	0.03133	-0.10772	-0.10357	0	0
16	0.03345	0.09939	0.05219	0.03391	-0.21493	-0.20084	0	0
20	0.04076	0.15370	0.05645	0.07571	-0.33537	-0.32725	0	0
24	0.05222	0.17418	0.04442	0.04639	-0.48362	-0.49250	0	0
28	0.04138	0.15250	0.03472	0.01965	-0.65441	-0.69972	0	0
32	0.03916	0.20562	0.00387	-0.01295	-0.80356	-0.88981	0	0
36	-0.00388	0.2169	-0.05668	-0.07407	-0.97688	-1.08562	0	0

[0893]

		5						
40	0.00534	0.21979	-0.08429	-0.14606	-1.13143	-1.30116	0	0
44	-0.05556	0.19879	-0.20322	-0.26276	-1.33045	-1.56024	0	0
48	-0.14279	0.18486	-0.33548	-0.33312	-1.47928	-1.74150	0	0

[0894] 表18G-杀伤测定(A＊01:01靶标;队列2供体941176;ORF3a池)

[0895]

流逝时间(h)	相对靶细胞计数							
	DMSO +靶标		Min_ORF3a +靶标		Min_ORF3a + 10:1 E:T		DMSO + 10:1 E:T	
0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	-0.00284	0.01628	-0.00216	0.00098	-0.02567	-0.02000	0	0
8	0.01606	0.04954	0.01839	0.02279	-0.06198	-0.03657	0	0
12	0.03544	0.06344	0.01086	0.01999	-0.12803	-0.08670	0	0
16	0.03345	0.09939	0.03392	0.02923	-0.24304	-0.19017	0	0
20	0.04076	0.15370	0.07146	0.07884	-0.37250	-0.26712	0	0
24	0.05222	0.17418	0.05489	0.03191	-0.52066	-0.42126	0	0
28	0.04138	0.15250	0.04243	-0.00206	-0.67981	-0.57430	0	0
32	0.03916	0.20562	0.04402	-0.03128	-0.85585	-0.72448	0	0
36	-0.00388	0.21695	-0.02876	-0.09311	-1.05716	-0.93759	0	0
40	0.00534	0.21979	-0.04476	-0.16798	-1.20532	-1.10825	0	0
44	-0.05556	0.19879	-0.18976	-0.31475	-1.40741	-1.29687	0	0
48	-0.14279	0.18486	-0.30639	-0.43802	-1.57375	-1.45681	0	0

[0896] 表18H-杀伤测定(A＊30:01靶标;队列2供体627934;验证池)

[0897]

流逝时间(h)	相对靶细胞计数							
	DMSO +靶标		Min_验证+靶标		Min_验证+ 10:1 E:T		DMSO + 10:1 E:T	
0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0.1447	0.0932	0.16433	0.06812	-0.02616	-0.11036	0	0

	6	7						
8	0.26109	0.24031	0.29409	0.21405	-0.00841	-0.12349	0	0
12	0.41641	0.38357	0.46022	0.33232	-0.04628	-0.17861	0	0
16	0.57109	0.55916	0.64263	0.47700	-0.06324	-0.19195	0	0
20	0.71596	0.74668	0.82375	0.65480	-0.07662	-0.19019	0	0
24	0.85929	0.90606	0.97835	0.77732	-0.10886	-0.24283	0	0
28	0.98584	1.04005	1.13307	0.89219	-0.12589	-0.29120	0	0
32	0.98799	1.14837	1.26068	0.95485	-0.16668	-0.32411	0	0
36	1.07778	1.22604	1.15367	1.00185	-0.19570	-0.40280	0	0
40	0.94477	1.30988	1.28494	0.92435	-0.22909	-0.45282	0	0
44	1.16094	1.37581	1.37739	0.94905	-0.25701	-0.50637	0	0
48	1.19754	1.42495	1.42641	0.95483	-0.28341	-0.56072	0	0
52	1.24927	1.46355	1.46869	0.95714	-0.32908	-0.60275	0	0
56	1.26951	1.51115	1.48650	0.98242	-0.35821	-0.62717	0	0
60	1.29201	1.52120	1.46502	0.93525	-0.40945	-0.66624	0	0
64	1.32653	1.52998	1.49070	0.92126	-0.42804	-0.66927	0	0
68	1.30790	1.53903	1.44162	0.89081	-0.49563	-0.69120	0	0
72	1.27679	1.54121	1.40280	0.88028	-0.53668	-0.68332	0	0

[0898]

[0899] 表18I-杀伤测定(A＊30:01靶标;队列2供体627934;核衣壳池)

流逝时间(h)	相对靶细胞计数							
	DMSO +靶标		Min_Nuc +靶标		Min_Nuc + 10:1 E:T		DMSO + 10:1 E:T	
0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0.14476	0.09327	0.15397	0.10632	-0.06036	-0.07382	0	0
8	0.26109	0.24031	0.30186	0.22025	-0.11788	-0.05358	0	0
12	0.4164	0.3835	0.44388	0.34536	-0.14901	-0.08479	0	0

[0900]

[0901]

	1	7						
16	0.57109	0.55916	0.62546	0.51887	-0.19338	-0.11071	0	0
20	0.71596	0.74668	0.80756	0.69603	-0.20924	-0.06784	0	0
24	0.85929	0.90606	0.96860	0.83152	-0.23543	-0.09405	0	0
28	0.98584	1.04005	1.09160	0.94415	-0.27641	-0.09959	0	0
32	0.98799	1.14837	1.18284	1.01868	-0.32138	-0.13529	0	0
36	1.07778	1.22604	1.26497	0.93323	-0.40293	-0.20220	0	0
40	0.94477	1.30988	1.31387	0.99957	-0.45485	-0.23347	0	0
44	1.16094	1.37581	1.33523	1.02328	-0.47735	-0.25642	0	0
48	1.19754	1.42495	1.35208	1.01466	-0.51604	-0.30221	0	0
52	1.24927	1.46355	1.33143	1.00554	-0.55506	-0.33146	0	0
56	1.26951	1.51115	1.29058	1.00229	-0.60007	-0.33969	0	0
60	1.29201	1.52120	1.23831	0.97154	-0.64282	-0.35910	0	0
64	1.32653	1.52998	1.19719	0.95325	-0.66688	-0.35434	0	0
68	1.30790	1.53903	1.08141	0.94658	-0.70861	-0.33438	0	0
72	1.27679	1.54121	0.96905	0.91293	-0.74903	-0.31328	0	0

[0902] 表18J-杀伤测定(A＊03:01靶标;队列2供体627934;验证池)

[0903]

流逝时间(h)	相对靶细胞计数							
	DMSO +靶标		Min_验证+靶标		Min_验证+ 10:1 E:T		DMSO + 10:1 E:T	
0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0.08781	0.05963	0.11622	0.08086	0.04206	-0.05415	0	0
8	0.14332	0.10822	0.16564	0.13178	0.00529	-0.11096	0	0
12	0.27527	0.18187	0.27835	0.24878	0.01055	-0.15157	0	0
16	0.40269	0.20477	0.42135	0.35832	-0.01181	-0.19062	0	0
20	0.49504	0.35270	0.55662	0.48411	-0.01763	-0.21009	0	0

[0904]

24	0.60978	0.43822	0.67126	0.58290	-0.02953	-0.26287	0	0
28	0.72247	0.47024	0.78706	0.68684	-0.05697	-0.32551	0	0
32	0.80966	0.53925	0.79661	0.76714	-0.05774	-0.35916	0	0
36	0.91979	0.54476	0.87868	0.75431	-0.13110	-0.47610	0	0
40	0.82506	0.59488	0.85789	0.81567	-0.15046	-0.52954	0	0
44	0.89624	0.61217	0.93873	0.71403	-0.18150	-0.57730	0	0
48	0.94128	0.63571	0.99012	0.75434	-0.19083	-0.62099	0	0
52	0.95310	0.65967	1.00391	0.77013	-0.23838	-0.68264	0	0
56	0.97468	0.68263	1.00001	0.78528	-0.26245	-0.72252	0	0
60	0.97790	0.74183	1.00772	0.79326	-0.28918	-0.69767	0	0
64	0.99431	0.75242	1.02235	0.79916	-0.31783	-0.79814	0	0
68	1.01182	0.73655	1.04129	0.80057	-0.30320	-0.78695	0	0
72	1.00329	0.70559	1.07602	0.75102	-0.29658	-0.81701	0	0

[0905] 表18K-杀伤测定(A＊03:01靶标;队列2供体627934;核衣壳池)

[0906]

流逝时间(h)	相对靶细胞计数							
	DMSO +靶标		Min_Nuc +靶标		Min_Nuc + 10:1 E:T		DMSO + 10:1 E:T	
0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0.08781	0.05963	0.13557	0.09417	0.04270	0.00347	0	0
8	0.14332	0.10822	0.19202	0.18754	-0.03953	-0.01646	0	0
12	0.27527	0.18187	0.34927	0.29990	-0.04551	-0.04730	0	0
16	0.40269	0.20477	0.51671	0.45493	-0.08229	-0.07810	0	0
20	0.49504	0.35270	0.69613	0.60546	-0.08281	-0.09829	0	0
24	0.60978	0.43822	0.83645	0.75879	-0.13127	-0.13499	0	0
28	0.72247	0.47024	0.98696	0.91143	-0.15017	-0.16452	0	0

32	0.80966	0.53925	1.12928	1.00969	-0.17858	-0.17565	0	0
36	0.91979	0.54476	1.02635	1.08915	-0.23553	-0.23020	0	0
40	0.82506	0.59488	1.19327	1.15912	-0.25960	-0.25894	0	0
44	0.89624	0.61217	1.26278	1.23350	-0.29894	-0.28136	0	0
48	0.94128	0.63571	1.36362	1.27188	-0.30640	-0.31069	0	0
52	0.95310	0.65967	1.39987	1.27689	-0.36619	-0.36053	0	0
56	0.97468	0.68263	1.41729	1.29205	-0.38330	-0.35798	0	0
60	0.97790	0.74183	1.45720	1.37160	-0.41308	-0.29853	0	0
64	0.99431	0.75242	1.48982	1.17613	-0.48758	-0.30734	0	0
68	1.01182	0.73655	1.53320	1.20548	-0.44282	-0.32877	0	0
72	1.00329	0.70559	1.54367	1.18132	-0.44307	-0.34385	0	0

[0907]

[0908] 表18L-杀伤测定(A＊11:01靶标;队列2供体602232;验证池)

流逝时间(h)	相对靶细胞计数							
	DMSO +靶标		Min_验证+靶标		Min_验证+ 10:1 E:T		DMSO + 10:1 E:T	
0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0.14476	0.09327	0.15397	0.10632	-0.06036	-0.07382	0	0
8	0.26109	0.24031	0.30186	0.22025	-0.11788	-0.05358	0	0
12	0.41641	0.38357	0.44388	0.34536	-0.14901	-0.08479	0	0
16	0.57109	0.55916	0.62546	0.51887	-0.19338	-0.11071	0	0
20	0.71596	0.74668	0.80756	0.69603	-0.20924	-0.06784	0	0
24	0.85929	0.90606	0.96860	0.83152	-0.23543	-0.09405	0	0
28	0.98584	1.04005	1.09160	0.94415	-0.27641	-0.09959	0	0
32	0.98799	1.14837	1.18284	1.01868	-0.32138	-0.13529	0	0
36	1.07778	1.22604	1.26497	0.93323	-0.40293	-0.20220	0	0
40	0.9447	1.3098	1.31387	0.99957	-0.45485	-0.23347	0	0

[0909]

[0910]

	7	8						
44	1.16094	1.37581	1.33523	1.02328	-0.47735	-0.25642	0	0
48	1.19754	1.42495	1.35208	1.01466	-0.51604	-0.30221	0	0
52	1.24927	1.46355	1.33143	1.00554	-0.55506	-0.33146	0	0
56	1.26951	1.51115	1.29058	1.00229	-0.60007	-0.33969	0	0
60	1.29201	1.52120	1.23831	0.97154	-0.64282	-0.35910	0	0
64	1.32653	1.52998	1.19719	0.95325	-0.66688	-0.35434	0	0
68	1.30790	1.53903	1.08141	0.94658	-0.70861	-0.33438	0	0
72	1.27679	1.54121	0.96905	0.91293	-0.74903	-0.31328	0	0

[0911] XIV.J.特征是来自不同分离株的刺突蛋白的SARS-CoV-2初免-加强方案对非人类灵长类动物的刺突产生应答

[0912] 编码不同分离株的SARS-CoV-2刺突蛋白的ChAd和SAM疫苗平台在印度恒河猴中作为同源或异源初免/加强方案的一部分进行了评估,如图34所示并列于表19中。

[0913] 表19-SARS-CoV-2分离株疫苗方案的NHP研究设计

[0914]

组号	初免(第 0 周)	加强 1 (第 6 周或第 8 周)	加强 2 (第 30 周)
1	SAM-S_{D614G}; 300 ug	SAM-S_{D614G}; 300 ug	ChAd-S_{B1351}-TCE5; 5e11 vp
2	SAM-S_{D614G}; 30 ug	SAM-S_{D614G}; 30 ug	SAM-TCE5-S_{B1351}; 30 ug
5	ChAd-S_{D614G}; 1e12 vp	SAM-S_{D614G}; 100 ug	SAM-TCE5-S_{B1351}; 30 ug
6	ChAd.S_{D614G}; 5e10 vp	SAM-S_{D614G}; 100 ug	ChAd-S_{B1351}-TCE5; 5e11 vp

[0915] 初免:ChAdV-“CT刺突$_g$”(SEQ ID NO:79);SAM-“IDT刺突$_g$”(SEQ ID NO:69)

[0916] 加强1:SAM-“IDT刺突$_g$”(SEQ ID NO:69)

[0917] 加强2:刺突变体B.1.351的所有CT-F2P版本;TCE5参见表10

[0918] NHP首先用初免剂量的包括特征为“ChAd-S_{D614G};CT”(SEQ ID NO:79)的刺突编码盒的ChAd平台或包括特征为“SAM-S_{D614G};IDT”(SEQ ID NO:69)的刺突编码盒的SAM平台在指定剂量下进行免疫。然后在第6周或第8周用包括特征为“SAM-S_{D614G};IDT”的刺突编码盒的SAM平台在指定剂量下对NHP施用第一次加强。然后在第30周用包含特征为Cool Tool序列优化(“CT”)和本文所述的F2P修饰(“F2P”)[SEQ ID NO:112]的B.1.351刺突变体编码盒的ChAd平台或包含相同B.1.351刺突变体的SAM平台(每个平台还包括TCE5 T细胞表位盒,参见表10,在所示方向)对NHP施用第二次加强。ChAdV抗原盒显示于SEQ ID NO:113中。如本文所述,随着时间推移监测NHP。

[0919] 如图35A、图35B、图35C和图35D所示,各种疫苗方案(分别为第1组、第2组、第5组和第6组)产生跨多个刺突T细胞表位池的T细胞应答(上图)。针对单个大刺突T细胞表位池的单个NHP的T细胞应答是异源的(中间图并总结在图36上图中),每次加强通常会产生增加的T细胞应答,包括在一些中产生稳健的应答(例如,在加强2后第1组中的两个NHP)。在所评估的所有五只NHP动物中,每次加强后检测到刺突特异性IgG抗体滴度并增加(下图并总结在

图36下图中)。T细胞对TCE5编码表位的应答虽然通常很小,但在加强2(首次施用包括TCE5的疫苗)后呈上升趋势,施用ChAdV平台疫苗时应答通常更强(图36中间图)。因此,数据证明了一种疫苗方案,包括用编码刺突变体的疫苗加强免疫产生T细胞和抗体应答。

[0920] 进一步评估抗体应答以中和针对D614G假病毒和B.1.351假病毒两者的抗体产生。如图37所示,在四组加强1后检测到针对D614G假病毒的中和抗体(Nab)滴度,加强2后的Nab滴度通常相同(左图)。在加强1后,针对B.1.351假病毒的交叉中和抗体滴度虽然被检测到,但明显低于针对D614G假病毒的Nab滴度(右图,第1栏)。然而,在施用编码B.1.351刺突变体的加强2后,针对B.1.351假病毒的Nab滴度显著增加(右图,第2栏),特别是与加强1后针对D614G假病毒的Nab滴度水平相似。这些结果在图38中进一步证明,比较了针对每种假病毒的相对Nab滴度水平,说明在所评估的每个疫苗方案中在加强1后针对B.1.351假病毒的交叉中和能力降低(上图)并且在加强2后拯救其降低(下图)。

[0921] 数据表明,各种疫苗方案产生了针对NHP中编码抗原的T细胞和抗体应答两者,特别是表明随后用刺突变体编码疫苗进行免疫显著提高了针对相应变体假病毒的Nab滴度。

[0922] XIV.K.人类受试者中的SARS-CoV-2疫苗临床评估

[0923] 在健康成人受试者中进行了一项1期、开放标签、剂量递增、非随机的对同源和异源初免-加强疫苗接种计划的研究,以检查研究性黑猩猩腺病毒血清型68(ChAd)和自扩增mRNA(SAM)载体的安全性、耐受性和免疫原性,所述载体单独表达严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)刺突,或表达刺突加上额外的SARS-CoV-2 T细胞表位(TCE),诸如表A-F中呈现的表位或表10、表12A、表12B或表12C中描述的T细胞表位盒。第1阶段在18-60岁受试者中的2组剂量递增试验和60岁以上受试者中的3组剂量递增试验中比较了仅编码刺突蛋白的ChAd和SAM疫苗,重点是异源ChAd初免/SAM加强和同源SAM初免/SAM加强方案,包括哨兵,以及剂量递增的交错登记。第2阶段在同时招募至多达6个组中以接受同源SAM初免/SAM加强、同源ChAd初免/ChAd加强和异源ChAd初免/SAM加强组合的18岁及以上的受试者中比较了编码刺突和TCE两者的ChAd和SAM疫苗(在第1阶段确定)的最佳剂量。最多70名(第1阶段)和最多70名(第2阶段)的年龄>/=18岁、身体健康、SARS-CoV-2感染或严重冠状病毒疾病2019(COVID-19)疾病进展的风险不高并符合所有资格标准的男性和未怀孕女性将被纳入。受试者将在至少4个不同的基于美国的感染性疾病临床研究联盟(US-based Infectious Diseases Clinical Research Consortium,IDCRC)站点之一根据其年龄(18-60岁和>60岁)被纳入不同的组。本研究的主要目的是评估不同剂量的ChAd-S(或ChAd-S-TCE)和SAM-S(或SAM-S-TCE)在健康成人受试者(包括老人受试者)中作为初免和/或加强施用时的安全性和耐受性。

[0924] ChAdV68-S:黑猩猩腺病毒血清型68-刺突(ChAdV68-S)是基于黑猩猩腺病毒68(C68,68/SAdV-25,最初命名为Pan 9)的复制缺陷型、E1、E3 E4Orf2-4缺失的腺病毒载体,其属于E亚组腺病毒家族。在三角肌中施用单次0.5mL或1.0mL肌肉内注射(取决于剂量水平)。在可能的情况下,初免疫苗和加强疫苗在不同的组中施用。

[0925] SAM-LNP-S:自扩增mRNA-脂质纳米粒子-刺突(SAM-LNP-S)是基于委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)的SAM载体。在三角肌中施用单次0.5mL肌肉内注射。在可能的情况下,初免疫苗和加强疫苗在不同的组中施用。

[0926] ChAdV68-S-TCE:黑猩猩腺病毒68-刺突加上额外的SARS-CoV-2T细胞表位

(ChAdV68-S-TCE)是基于黑猩猩腺病毒68(C68,68/SAdV-25,最初命名为Pan 9)的复制缺陷型、E1、E3E4Orf2-4缺失的腺病毒载体,其属于E亚组腺病毒家族。将在三角肌中施用单次0.5或1.0mL肌肉内注射。在可能的情况下,初免疫苗和加强疫苗应在不同的组中施用。

[0927] SAM-LNP-S-TCE:自扩增mRNA-脂质纳米粒子-刺突加上额外的SARS-CoV-2T细胞表位(SAM-S-TCE)是基于委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)的SAM载体。将在三角肌中施用单次0.5mL肌肉内注射。在可能的情况下,初免疫苗和加强疫苗应在不同的组中施用。

[0928] 本研究使用的稀释剂是0.9%氯化钠注射液(USP),并且是氯化钠和注射用水的无菌、无热原、等渗溶液。每毫升(mL)含有氯化钠9mg。它不含抑菌剂、抗微生物剂或添加的缓冲液,并且仅在单剂量容器中供应以稀释或溶解注射用药物。0.308mOsmol/mL(计算值)。0.9%氯化钠注射液,USP不含防腐剂。

[0929] 评估以下组:

[0930] -第1阶段第1组:在18至60岁的参与者中,在第1天通过0.5mL肌肉内注射在三角肌中施用5x10^10个ChAdV68-S病毒颗粒,并在第29天通过0.5mL肌肉内注射在三角肌中施用30mcg SAM-LNP-S。N=10

[0931] -第1阶段第2组:在18至60岁的参与者中,在第1天通过0.5mL肌肉内注射在三角肌中施用1x10^11个ChAdV68-S病毒颗粒,并在第29天通过0.5mL肌肉内注射在三角肌中施用30mcg SAM-LNP-S。N=10

[0932] -第1阶段第3组:在18至60岁的参与者中,在第1天和第29天通过0.5mL肌肉内注射在三角肌中施用30mcg SAM-LNP-S。N=10

[0933] -第1阶段第4组:在18至60岁的参与者中,在第1天和第29天通过0.5mL肌肉内注射在三角肌中施用100mcg SAM-LNP-S。N=10

[0934] -第1阶段第5组:在60岁以上的参与者中,在第1天通过0.5mL肌肉内注射在三角肌中施用5x10^10个ChAdV68-S病毒颗粒并且在第29天通过0.5mL肌肉内注射在三角肌中施用30mcg SAM-LNP-S。N=10

[0935] -第1阶段第6组:在60岁以上的参与者中,在第1天通过0.5mL肌肉内注射在三角肌中施用1x10^11个ChAdV68-S病毒颗粒并且在第29天通过0.5mL肌肉内注射在三角肌中施用30mcg SAM-LNP-S。N=10

[0936] -第1阶段第7组:在60岁以上的参与者中,在第1天通过1.0mL肌肉内注射在三角肌中施用5x10^11个ChAdV68-S病毒颗粒并且在第29天通过0.5mL肌肉内注射在三角肌中施用30mcg SAM-LNP-S。N=10

[0937] -第2阶段第8组:在18至60岁的参与者中,在第1天通过0.5mL肌肉内注射在三角肌中施用5x10^10个ChAdV68-S-TCE病毒颗粒或1x10^11个ChAdV68-S-TCE病毒颗粒并且在第57天通过0.5mL肌肉内注射在三角肌中施用30mcg SAM-LNP-S-TCE。N=10

[0938] -第2阶段第9组:在60岁以上的参与者中,在第1天通过0.5mL或1.0mL(对于5x10^11个病毒颗粒)肌肉内注射在三角肌中施用5x10^10个ChAdV68-S-TCE病毒颗粒或1x10^11个ChAdV68-S-TCE病毒颗粒或5x10^11个ChAdV68-S-TCE病毒颗粒并且在第57天通过0.5mL肌肉内注射在三角肌中施用30mcg SAM-LNP-S-TCE。N=10

[0939] -第2阶段第10组:在18至60岁的参与者中,在第1天和第113天通过0.5mL肌肉内注射在三角肌中施用1x10^11个ChAdV68-S-TCE病毒颗粒。N=10

[0940] -第2阶段第11组:在60岁以上的参与者中,在第1天和第113天通过0.5mL肌肉内注射在三角肌中施用1x10^11个ChAdV68-S-TCE病毒颗粒或在第1天和第113天通过1.0mL肌肉内注射在三角肌中施用5x10^11个ChAdV68-S-TCE病毒颗粒。N=10

[0941] -第2阶段第12组:在18岁或以上的参与者中,在第1天和第57天通过0.5mL肌肉内注射在三角肌中施用10mcg SAM-LNP-S-TCE。N=10。

[0942] -第2阶段第13组:在18岁及以上的参与者中,在第1天和第57天通过0.5mL肌肉内注射在三角肌中施用30mcg SAM-LNP-S-TCE。N=10

[0943] -第2阶段第14组:在18岁及以上的参与者中,在第1天和第57天通过0.5mL肌肉内注射在三角肌中施用100mcg SAM-LNP-S-TCE。N=10

[0944] 评估了以下主要结果:

[0945] -按请求的局部反应原性不良事件(AE)等级划分的频率[时间范围:至每次疫苗接种后7天]

[0946] -按请求的全身反应原性不良事件(AE)等级划分的频率[时间范围:至每次疫苗接种后7天]

[0947] -按非请求的不良事件(AE)等级划分的频率[时间范围:至每次疫苗接种后28天]

[0948] -特殊关注不良事件(AESI)的频率[时间范围:第1天至第478天]。包括潜在的免疫介导医学疾患(PIMMC)、就医不良事件(MAAE)和新发慢性医学疾患(NOCMC)

[0949] -按严重程度分级的临床安全实验室不良事件频率[时间范围:至每次疫苗接种后7天]。要评价的参数包括:白细胞计数(WBC)、血红蛋白(HgB)、血小板(PLT)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(T Bili)、肌酸激酶(CK)和肌酐(Cr)

[0950] -严重不良事件(SAE)的频率[时间范围:第1天至第478天]

[0951] 评估以下次要结果:

[0952] -对于野生型病毒和新出现的病毒株,通过SARS-CoV-2中和测定测量的滴度相比于基线的几何平均上升倍数[时间范围:第1天至第478天]

[0953] -受体结合结构域(RBD)特异性免疫球蛋白G(IgG)滴度相比于基线的几何平均上升倍数[时间范围:第1天至第478天]。通过酶联免疫吸附测定(ELISA)测量来自野生型病毒和新出现的病毒株的RBD

[0954] -刺突特异性免疫球蛋白G(IgG)滴度相比于基线的几何平均上升倍数[时间范围:第1天至第478天]。通过酶联免疫吸附测定(ELISA)测量来自野生型病毒和新出现的病毒株的刺突蛋白

[0955] -通过SARS-CoV-2中和测定测量野生型病毒和新出现的病毒株的几何平均滴度[时间范围:第1天至第478天]

[0956] -受体结合结构域(RBD)特异性免疫球蛋白G(IgG)的几何平均滴度[时间范围:第1天至第478天]。通过酶联免疫吸附测定(ELISA)测量来自野生型病毒和新出现的病毒株的RBD

[0957] -刺突特异性免疫球蛋白G(IgG)的几何平均滴度[时间范围:第1天至第478天]。通过酶联免疫吸附测定(ELISA)测量来自野生型病毒和新出现的病毒株的刺突蛋白

[0958] -按细胞类型(CD4+或CD8+)、细胞因子集合(CD4+的Th1或Th2细胞因子,和CD8+的

CD8+细胞因子或其他目标组合)和肽池(涵盖刺突和T细胞表位区)表达细胞因子的细胞百分比[时间范围:第1天至第478天]。由ICS确定

[0959] -野生型病毒和新出现的病毒株的RBD血清转化的受试者百分比[时间范围:第1天至第478天]。血清转化定义为通过ELISA测量的受体结合结构域(RBD)特异性IgG相比于基线的4倍变化。包括针对新出现的病毒株,例如B.1.1.7.,如在血清中通过一系列测量总刺突特异性免疫球蛋白G(IgG)(基于酶联免疫吸附测定(ELISA))和功能(中和、受体结合结构域(RBD)结合、或类似)的测定所评估

[0960] -野生型病毒和新出现的病毒株的刺突蛋白血清转化的受试者百分比[时间范围:第1天至第478天]。血清转化定义为通过酶联免疫吸附测定(ELISA)测量的刺突特异性免疫球蛋白G(IgG)相比于基线的4倍变化。包括针对新出现的病毒株,例如B.1.1.7.,如在血清中通过一系列测量总刺突特异性免疫球蛋白G(IgG)(基于酶联免疫吸附测定(ELISA))和功能(中和、受体结合结构域(RBD)结合、或类似)的测定所评估

[0961] -野生型病毒和新出现的病毒株血清转化的受试者百分比[时间范围:第1天至第478天]。血清转化定义为通过SARS-CoV-2中和测定法测量的相比于基线的4倍滴度变化。包括针对新出现的病毒株,例如B.1.1.7.,如在血清中通过一系列测量总刺突特异性免疫球蛋白G(IgG)(基于酶联免疫吸附测定(ELISA))和功能(中和、受体结合结构域(RBD)结合、或类似)的测定所评估

[0962] -按肽池划分的每百万个细胞中的斑点形成细胞率(涵盖刺突和T细胞表位区)[时间范围:第1天至第478天]。如通过干扰素(IFN)γ酶联免疫斑点测定(ELISpot)所确定

[0963] -应答者状态,源自每组适用的细胞因子和每个肽池的细胞内细胞因子染色(ICS)细胞计数[时间范围:第1天至第478天]。覆盖刺突和T细胞表位区

[0964] -应答者状态,由每个肽池的干扰素(IFN)γ酶联免疫斑点测定(ELISpot)确定[时间范围:第1天至第478天]。覆盖刺突和T细胞表位区

[0965] -T细胞应答的Th1/Th2细胞因子平衡[时间范围:至加强疫苗接种后28天]。通过使用多重细胞因子测定与酶联免疫斑点测定(ELISpot)上清液在受试者子集中测量白细胞介素(IL)2、肿瘤坏死因子(TNF)α、IL-4、IL-10和IL-13

[0966] 额外序列

[0967] 表A

[0968] 参见序列表,SEQ ID NO.130-8195。呈现了由SARS-CoV-2编码的每个候选MHC I类表位,预测所述表位与给定的HLA等位基因相关,EDGE评分>0.001。每个条目包括候选表位序列和预测EDGE评分大于0.001的同源HLA等位基因,每个同源配对评级为H(EDGE评分>0.1)、M(EDGE评分在0.01和0.1之间)和L(EDGE评分<0.01)。例如,预测候选表位MESLVPGF(SEQ ID NO:127)与HLA-B*18:01、HLA-B*37:01和HLA-B*07:05配对,EDGE评分分别为.019、.032和.008。因此,SEQ ID NO:130的条目是“MESLVPGF:B18:01M;B37:01M;B07:05L。”

[0969] 表B

[0970] 参见序列表,SEQ ID NO.8196-26740。呈现了由SARS-CoV-2编码的每个候选MHC II类表位,预测所述表位与给定的HLA等位基因相关,EDGE评分>0.001。每个条目包括候选表位序列和预测EDGE评分大于0.001的同源HLA等位基因,每个同源配对评级为H(EDGE评分>0.1)、M(EDGE评分在0.01和0.1之间)和L(EDGE评分<0.01)。例如,预测候选表位

VELVAELEGI(SEQ ID NO:128)与HLA-DQA1*03:02-B1*03:03、HLA-DRB1*11:02、HLA-DQA1*05:05-B1*03:19和HLA-DPA1*01:03-B1*104:01配对,EDGE评分分别为0.003145、0.00328、0.041097和0.011613。因此,SEQ ID NO:8219的条目是"VELVAELEGI:DQA1*03:02-B1*03:03L;DRB1*11:02L;DQA1*05:05-B1*03:19M;DPA1*01:03-B1*104:01M。"仅HLA-DQ和HLA-DP以其α和β链指代。HLA-DR仅以其β链指代,因为α链在人类群体中通常是不变的,HLA-DR肽接触区特别不变。

[0971] 表C

[0972] 参见序列表,SEQ ID NO.26741-27179。呈现了额外的MHC I类表位,除了来自刺突蛋白的表位,在优化的盒中编码,预测这些表位与给定的HLA等位基因相关,EDGE评分＞0.001。通过计算群体覆盖标准P来确定额外的表位,其中SARS-CoV-2刺突蛋白(SEQ ID NO:59)提供的所有初始表位分为S1和S2,并应用本文所述的优化算法。

[0973] 表D

[0974] 参见序列表,SEQ ID NO.27180-27495,用于SARS-CoV-2刺突重叠肽池。每个条目包括刺激肽、SARS-CoV-2蛋白来源、肽亚池信息和表格。例如,刺激肽MFVFLVLLPLVSSQC(SEQ ID NO:27180)来源于SARS-CoV-2刺突蛋白(D614G变体),包括在子池S_Wu_1_2中,并见于表D中。因此,SEQ ID NO.27180的条目是"MFVFLVLLPLVSSQC:刺突D614G;S_Wu_1_2;表D"。

[0975] 表E

[0976] 参见序列表,SEQ ID NO.27496-27603,用于TCE5编码的重叠肽池。每个条目包括刺激肽、SARS-CoV-2蛋白来源、肽亚池信息和表格。例如,刺激肽LLWPVTLACFVLAAV(SEQ ID NO:27496)衍生自SARS-CoV-2膜蛋白,包括在子池OLP_Mem中,并见于表E中。因此,SEQ ID NO.27496的条目是"LLWPVTLACFVLAAV:膜;OLP_Mem;表E"。

[0977] 表F

[0978] 参见序列表,SEQ ID NO.27604-27939,用于TCE5编码的最小表位肽池。每个条目包括刺激肽、SARS-CoV-2蛋白来源、肽亚池信息和表格。例如,刺激肽ALSKGVHFV(SEQ ID NO:27604)衍生自SARS-CoV-2ORF3a蛋白(范围52-85),包括在子池Min_验证中,并见于表F中。因此,SEQ ID NO.27604的条目是"ALSKGVHFV:ORF3a 52-85;Min_验证;表F"。

[0979] 本文提及的载体、盒和抗体的某些额外序列描述于下文并由SEQ ID NO提及

[0980]

曲美木单抗 VL (SEQ ID NO:16)
曲美木单抗 VH (SEQ ID NO:17)
曲美木单抗 VH CDR1 (SEQ ID NO:18)
曲美木单抗 VH CDR2 (SEQ ID NO:19)
曲美木单抗 VH CDR3 (SEQ ID NO:20)
曲美木单抗 VL CDR1 (SEQ ID NO:21)
曲美木单抗 VL CDR2 (SEQ ID NO:22)
曲美木单抗 VL CDR3 (SEQ ID NO:23)
德瓦鲁单抗(MEDI4736) VL (SEQ ID NO:24)
MEDI4736 VH (SEQ ID NO:25)
MEDI4736 VH CDR1 (SEQ ID NO:26)
MEDI4736 VH CDR2 (SEQ ID NO:27)
MEDI4736 VH CDR3 (SEQ ID NO:28)
MEDI4736 VL CDR1 (SEQ ID NO:29)
MEDI4736 VL CDR2 (SEQ ID NO:30)
MEDI4736 VL CDR3 (SEQ ID NO:31)
UbA76-25 聚体 PDTT 核苷酸(SEQ ID NO:32)
UbA76-25 聚体 PDTT 多肽(SEQ ID NO:33)
MAG-25 聚体 PDTT 核苷酸(SEQ ID NO:34)
MAG-25 聚体 PDTT 多肽(SEQ ID NO:35)
Ub7625 聚体 PDTT_NoSFL 核苷酸(SEQ ID NO:36)
Ub7625 聚体 PDTT_NoSFL 多肽(SEQ ID NO:37)
ChAdV68.5WTnt.MAG25 聚体 (SEQ ID NO:2); 具有 E1 (nt 577 至 3403)和 E3 (nt 27,125- 31,825)序列缺失的 AC_000011.1; 在五个位置处被取代的相应 ATCC VR-594 核苷酸; 被插入以代替缺失 E1 的 CMV 启动子/增强子控制下的模型新抗原盒; 盒的 SV40 聚 A 3'
委内瑞拉马脑炎病毒[VEE (SEQ ID NO:3) GenBank: L01442.2
VEE-MAG25 聚体 (SEQ ID NO:4); 含有 MAG-25 聚体 PDTT 核苷酸(碱基 30-1755)
委内瑞拉马脑炎病毒株 TC-83 [TC-83(SEQ ID NO:5) GenBank: L01443.1
VEE 递送载体(SEQ ID NO:6); 具有核苷酸 7544-11175 缺失的 VEE 基因组[甲病毒结构蛋白被去除
TC-83 递送载体(SEQ ID NO:7); 具有核苷酸 7544-11175 缺失的 TC-83 基因组[甲病毒结构蛋白被去除
VEE 生产载体(SEQ ID NO:8); 具有核苷酸 7544-11175 缺失的 VEE 基因组, 加 5' T7-启动子, 加 3'限制性位点
TC-83 生产载体(SEQ ID NO:9); 具有核苷酸 7544-11175 缺失的 TC-83 基因组

[0981]

，加 5' T7-启动子，加 3'限制性位点
VEE-UbAAY (SEQ ID NO:14)；具有 MHC I 类小鼠肿瘤表位 SIINFEKL (SEQ ID NO: 129)和 AH1-A5 插入的 VEE 递送载体
VEE-荧光素酶(SEQ ID NO:15)；具有插入在 7545 的荧光素酶基因的 VEE 递送载体
泛素(SEQ ID NO:38)>UbG76 0-228
泛素 A76 (SEQ ID NO:39)>UbA76 0-228
HLA-A2 (MHC I 类)信号肽(SEQ ID NO:40)>MHC 信号肽 0-78
HLA-A2 (MHC I 类)跨膜结构域(SEQ ID NO:41)>HLA A2 TM 结构域 0-201
IgK 前导序列(SEQ ID NO:42)>IgK 前导序列 0-60
人类 DC-Lamp (SEQ ID NO:43)>人类 DCLAMP 0-3178
小鼠 LAMP1 (SEQ ID NO:44)>小鼠 Lamp1 0-1858
人类 Lamp1 cDNA (SEQ ID NO:45)>人类 Lamp1 0-2339
破伤风类毒素核酸序列(SEQ ID NO:46)
破伤风类毒素氨基酸序列(SEQ ID NO:47)
PADRE 核苷酸序列(SEQ ID NO:48)
PADRE 氨基酸序列(SEQ ID NO:49)
WPRE (SEQ ID NO:50)>WPRE 0-593
IRES (SEQ ID NO:51)>eGFP_IRES_SEAP_插入 1746-2335
GFP (SEQ ID NO:52)
SEAP (SEQ ID NO:53)
萤火虫荧光素酶(SEQ ID NO:54)
FMDV 2A (SEQ ID NO:55)
GPGPG 接头(SEQ ID NO:56)
chAd68-空-E4 缺失(SEQ ID NO:75)：具有 E1 (nt 577 至 3403)、E3 (nt 27,125-31,825)和 E4 区(nt 34,916 至 35,642)序列缺失的 AC_000011.1 和在五个位置被取代的相应 ATCC VR-594 (独立测序的全长 VR-594 C68 SEQ ID NO:10)核苷酸
NC_045512.2 严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 分离株 SARS-CoV-2 分离株 NC_045512.2，完全基因组(SEQ ID NO:76)
SAM 体外转录模板 DNA (SEQ ID NO:77); 具有核苷酸 7544-11175 缺失的 VEE 基因组，加上最小 5' T7-启动子
SV40 微型内含子(SEQ ID NO:88)
CMV-CT 刺突-弗林蛋白酶 MT2P-T2A-E-T2A-M-SV40-CMV-EPE-BGH 核苷酸序列(SEQ ID NO:109)
VOC 202012/01 B.1.1.7 UK 刺突变体氨基酸序列(SEQ ID NO:110)
MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHST QDLFLPFFSNVTWFHAISGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWI FGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYHKNNKSWMESE FRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKH TPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTA GAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEK GIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCV ADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPG QTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLK

PFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPYRVVVL SFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQ QFGRDIDDTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQGV NCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPI GAGICASYQTQTNSHGSASSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPINFT ISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIA VEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFN KVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTS ALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIAN QFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSV LNDILARLDPPEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATK MSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTT APAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTHNTFVSGNCDV VIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQ KEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTI MLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT*
CMV-B117 刺突-弗林蛋白酶 MT2P-SV40-CMV-EPE-BGH (SEQ ID NO:111)
B.1.351 刺突-弗林蛋白酶 Mt 氨基酸序列(南非刺突变体) (SEQ ID NO:112)
MFVFLVLLPLVSSQCVNFTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHST QDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFANPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRG WIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWM ESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIY SKHTPINLVRGLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLHISYLTPGDSSSGWTA GAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEK GIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCV ADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPG QTGNIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLK PFERDISTEIYQAGSTPCNGVKGFNCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPYRVVVL SFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQ QFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQGV NCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPI GAGICASYQTQTNSPGSASSVASQSIIAYTMSLGVENSVAYSNNSIAIPTNFT ISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIA VEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFN KVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTS ALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIAN QFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSV LNDILSRLDPPEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATK MSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTT APAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDV VIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQ KEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTI MLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT
CMV-B.1351 刺突-弗林蛋白酶 Mt-2P-CMV-TCE5-BGH (SEQ ID NO:113)；基于 CT1 序列优化的 B.1.351 刺突序列，相关变体突变替换为 COOL 密码子

[0982]

[0983] 参考文献

[0984] 1.Desrichard,A.,Snyder,A.&Chan,T.A.Cancer Neoantigens and Applications for Immunotherapy.Clin.Cancer Res.Off.J.Am.Assoc.Cancer Res.(2015).doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-3175

[0985] 2.Schumacher,T.N.&Schreiber,R.D.Neoantigens in cancer immunotherapy.Science 348,69-74(2015).

[0986] 3.Gubin,M.M.,Artyomov,M.N.,Mardis,E.R.&Schreiber,R.D.Tumor neoantigens:building a framework for personalized cancer immunotherapy.J.Clin.Invest.125,3413-3421(2015).

[0987] 4.Rizvi,N.A.et al.Cancer immunology.Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer.Science 348,124-

128(2015).

[0988] 5.Snyder,A.et al.Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma.N.Engl.,J.Med.371,2189-2199(2014).

[0989] 6.Carreno,B.M.et al.Cancer immunotherapy.A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells.Science 348,803-808(2015).

[0990] 7.Tran,E.et al.Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer.Science 344,641-645(2014).

[0991] 8.Hacohen,N.&Wu,C.J.-Y.United States Patent Application:20110293637-COMPOSITIONS AND METHODS OF IDENTIFYING TUMOR SPECIFIC NEOANTIGENS.(A1).at＜http://appftl.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1＝PTO1&Sect2＝HITOFF&d＝PG01&p＝1&u＝/netahtml/PTO/srchnum.html&r＝1&f＝G&1＝50&s1＝20110293637.PGNR.＞

[0992] 9.Lundegaard,C.,Hoof,I.,Lund,O.&Nielsen,M.State of the art and challenges in sequence based T-cell epitope prediction.Immunome Res.6 Suppl 2,S3(2010).

[0993] 10.Yadav,M.et al.Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing.Nature 515,572-576(2014).

[0994] 11.Bassani-Sternberg,M.,Pletscher-Frankild,S.,Jensen,L.J.&Mann,M.Mass spectrometry of human leukocyte antigen class I peptidomes reveals strong effects of protein abundance and turnover on antigen presentation.Mol.Cell.Proteomics MCP 14,658-673(2015).

[0995] 12.Van Allen,E.M.et al.Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma.Science 350,207-211(2015).

[0996] 13.Yoshida,K.&Ogawa,S.Splicing factor mutations and cancer.Wiley Interdiscip.Rev.RNA 5,445-459(2014).

[0997] 14.Cancer Genome Atlas Research Network.Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma.Nature 511,543-550(2014).

[0998] 15.Rajasagi,M.et al.Systematic identification of personal tumor-specific neoantigens in chronic lymphocytic leukemia.Blood 124,453-462(2014).

[0999] 16.Downing,S.R.et al.United States Patent Application:0120208706-OPTIMIZATION OF MULTIGENE ANALYSIS OF TUMOR SAMPLES.(A1).at<http://appftl.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1＝PTO1&Sect2＝HITOFF&d＝PG01&p＝1&u＝/netahtml/PTO/srchnum.html&r＝1&f＝G&1＝50&sl＝20120208706.PGNR.>

[1000] 17.Target Capture for NextGen Sequencing-IDT.at<http://www.idtdna.com/pages/products/nextgen/target-capture>

[1001] 18.Shukla,S.A.et al.Comprehensive analysis of cancer-associated somatic mutations in class I HLA genes.Nat.Biotechnol.33,1152-1158(2015).

[1002] 19.Cieslik,M.et al.The use of exome capture RNA-seq for highly degraded RNA with application to clinical cancer sequencing.Genome Res.25,

1372-1381(2015).

[1003] 20.Bodini,M.et al.The hidden genomic landscape of acute myeloid leukemia:subclonal structure revealed by undetected mutations.Blood 125,600-605(2015).

[1004] 21.Saunders,C.T.et al.Strelka:accurate somatic small-variant calling from sequenced tumor-normal sample pairs.Bioinforma.Oxf.Engl.28,1811-1817(2012).

[1005] 22.Cibulskis,K.et al.Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples.Nat.Biotechnol.31,213-219(2013).

[1006] 23.Wilkerson,M.D.et al.Integrated RNA and DNA sequencing improves mutation detection in low purity tumors.Nucleic Acids Res.42,e107(2014).

[1007] 24.Mose,L.E.,Wilkerson,M.D.,Hayes,D.N.,Perou,C.M.&Parker,J.S.ABRA:improved coding indel detection via assembly-based realignment.Bioinforma.Oxf.Engl.30,2813-2815(2014).

[1008] 25.Ye,K.,Schulz,M.H.,Long,Q.,Apweiler,R.&Ning,Z.Pindel:a pattern growth approach to detect break points of large deletions and medium sized insertions from paired-end short reads.Bioinforma.Oxf.Engl.25,2865-2871(2009).

[1009] 26.Lam,H.Y.K.et al.Nucleotide-resolution analysis of structural variants using BreakSeq and a breakpoint library.Nat.Biotechnol.28,47-55(2010).

[1010] 27.Frampton,G.M.et al.Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing.Nat.Biotechnol.31,1023-1031(2013).

[1011] 28.Boegel,S.et al.HLA typing from RNA-Seq sequence reads.Genome Med.4,102(2012).

[1012] 29.Liu,C.et al.ATHLATES:accurate typing of human leukocyte antigen through exome sequencing.Nucleic Acids Res.41,e142(2013).

[1013] 30.Mayor,N.P.et al.HLA Typing for the Next Generation.PloS One 10,e0127153(2015).

[1014] 31.Roy,C.K.,Olson,S.,Graveley,B.R.,Zamore,P.D.&Moore,M.J.Assessing long-distance RNA sequence connectivity via RNA-templated DNA-DNA ligation.eLife 4,(2015).

[1015] 32.Song,L.&Florea,L.CLASS:constrained transcript assembly of RNA-seq reads.BMC Bioinformatics 14 Suppl 5,S14(2013).

[1016] 33.Maretty,L.,Sibbesen,J.A.&Krogh,A.Bayesian transcriptome assembly.Genome Biol.15,501(2014).

[1017] 34.Pertea,M.et al.StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads.Nat.Biotechnol.33,290-295(2015).

[1018] 35.Roberts,A.,Pimentel,H.,Trapnell,C.&Pachter,L.Identification of novel transcripts in annotated genomes using RNA-Seq.Bioinforma.Oxf.Engl.(2011).doi:10.1093/bioinformatics/btr355

[1019] 36.Vitting-Seerup,K.,Porse,B.T.,Sandelin,A.&Waage,J.spliceR:an R package for classification of alternative splicing and prediction of coding potential from RNA-seq data.BMC Bioinformatics 15,81(2014).

[1020] 37.Rivas,M.A.et al.Human genomics.Effect of predicted protein-truncating genetic variants on the human transcriptome.Science 348,666-669(2015).

[1021] 38.Skelly,D.A.,Johansson,M.,Madeoy,J.,Wakefield,J.&Akey,J.M.A powerful and flexible statistical framework for testing hypotheses of allele-specific gene expression from RNA-seq data.Genome Res.21,1728-1737(2011).

[1022] 39.Anders,S.,Pyl,P.T.&Huber,W.HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data.Bioinforma.Oxf.Engl.31,166-169(2015).

[1023] 40.Furney,S.J.et al.SF3B1 mutations are associated with alternative splicing in uveal melanoma.Cancer Discov.(2013).doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0330

[1024] 41.Zhou,Q.et al.A chemical genetics approach for the functional assessment of novel cancer genes.Cancer Res.(2015).doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2930

[1025] 42.Maguire,S.L.et al.SF3B1 mutations constitute a novel therapeutic target in breast cancer.J.Pathol.235,571-580(2015).

[1026] 43.Carithers,L.J.et al.A Novel Approach to High-Quality Postmortem Tissue Procurement:The GTEx Project.Biopreservation Biobanking 13,311-319(2015).

[1027] 44.Xu,G.et al.RNA CoMPASS:a dual approach for pathogen and host transcriptome analysis of RNA-seq datasets.PloS One 9,e89445(2014).

[1028] 45.Andreatta,M.&Nielsen,M.Gapped sequence alignment using artificial neural networks:application to the MHC class I system.Bioinforma.Oxf.Engl.(2015).doi:10.1093/bioinformatics/btv639

[1029] 46.Jørgensen,K.W.,Rasmussen,M.,Buus,S.&Nielsen,M.NetMHCstab-predicting stability of peptide-MHC-I complexes;impacts for cytotoxic T lymphocyte epitope discovery.Immunology 141,18-26(2014).

[1030] 47.Larsen,M.V.et al.An integrative approach to CTL epitope prediction:a combined algorithm integrating MHC class I binding,TAP transport efficiency,and proteasomal cleavage predictions.Eur.J.Immunol.35,2295-2303(2005).

[1031] 48.Nielsen,M.,Lundegaard,C.,Lund,O.&Keşmir,C.The role of the proteasome in generating cytotoxic T-cell epitopes:insights obtained from improved

predictions of proteasomal cleavage.Immunogenetics 57,33-41(2005).

[1032] 49.Boisvert,F.-M.et al.A Quantitative Spatial Proteomics Analysis of Proteome Turnover in Human Cells.Mol.Cell.Proteomics 11,M111.011429-M111.011429(2012).

[1033] 50.Duan,F.et al.Genomic and bioinformatic profiling of mutational neoepitopes reveals new rules to predict anticancer immunogenicity.J.Exp.Med.211,2231-2248(2014).

[1034] 51.Janeway's Immunobiology:9780815345312:Medicine&Health Science Books@Amazon.com.at<http://www.amazon.com/Janeways-Immunobiology-Kenneth-Murphy/dp/0815345313>

[1035] 52.Calis,J.J.A.et al.Properties of MHC Class I Presented Peptides That Enhance Immunogenicity.PLoS Comput.Biol.9,e1003266(2013).

[1036] 53.Zhang,J.et al.Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing.Science 346,256-259(2014)

[1037] 54.Walter,M.J.et al.Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia.N.Engl.J.Med.366,1090-1098(2012).

[1038] 55.Hunt DF,Henderson RA,Shabanowitz J,Sakaguchi K,Michel H,Sevilir N,Cox AL,Appella E,Engelhard VH.Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry.Science 1992.255:1261-1263.

[1039] 56.Zarling AL,Polefrone JM,Evans AM,Mikesh LM,Shabanowitz J,Lewis ST,Engelhard VH,Hunt DF.Identification of class I MHC-associated phosphopeptides as targets for cancer immunotherapy.Proc Natl Acad Sci U S A.2006 Oct 3;103(40):14889-94.

[1040] 57.Bassani-Sternberg M,Pletscher-Frankild S,Jensen LJ,Mann M.Mass spectrometry of human leukocyte antigen class I peptidomes reveals strong effects of protein abundance and turnover on antigen presentation.Mol Cell Proteomics.2015 Mar;14(3):658-73.doi:10.1074/mcp.M114.042812.

[1041] 58.Abelin JG,Trantham PD,Penny SA,Patterson AM,Ward ST,Hildebrand WH,Cobbold M,Bai DL,Shabanowitz J,Hunt DF.Complementary IMAC enrichment methods for HLA-associated phosphopeptide identification by mass spectrometry.Nat Protoc.2015 Sep;10(9):1308-18.doi:10.1038/nprot.2015.086.Epub 2015 Aug 6

[1042] 59.Barnstable CJ,Bodmer WF,Brown G,Galfre G,Milstein C,Williams AF,Ziegler A.Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes,HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis.Cell.1978 May;14(1):9-20.

[1043] 60.Goldman JM,Hibbin J,Kearney L,Orchard K,Th'ng KH.HLA-DR monoclonal antibodies inhibit the proliferation of normal and chronic granulocytic leukaemia myeloid progenitor cells.Br J Haematol.1982 Nov;52(3):411-20.

[1044] 61.Eng JK,Jahan TA,Hoopmann MR.Comet:an open-source MS/MS sequence database search tool.Proteomics.2013 Jan;13(1):22-4.doi:10.1002/pmic.201200439.Epub 2012 Dec 4.

[1045] 62.Eng JK,Hoopmann MR,Jahan TA,Egertson JD,Noble WS,MacCoss MJ.A deeper look into Comet--implementation and features.J Am Soc Mass Spectrom.2015 Nov;26(11):1865-74.doi:10.1007/s13361-015-1179-x.Epub 2015 Jun 27.

[1046] 63.Lukas Käll,Jesse Canterbury,Jason Weston,William Stafford Noble and Michael J.MacCoss.Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets.Nature Methods 4:923-925,November 2007

[1047] 64.Lukas Käll,John D.Storey,Michael J.MacCoss and William Stafford Noble.Assigning confidence measures to peptides identified by tandem mass spectrometry.Journal of Proteome Research,7(1):29-34,January 2008

[1048] 65.Lukas Käll,John D.Storey and William Stafford Noble.Nonparametric estimation of posterior error probabilities associated with peptides identified by tandem mass spectrometry.Bioinformatics,24(16):i42-i48,August 2008

[1049] 66.Kinney RM,BJ Johnson,VL Brown,DW Trent.Nucleotide Sequence of the 26 S mRNA of the Virulent Trinidad Donkey Strain of Venezuelan Equine Encephalitis Virus and Deduced Sequence of the Encoded Structural Proteins.Virology 152(2),400-413.1986 Jul 30.

[1050] 67.Jill E Slansky,Frédérique M Rattis,Lisa F Boyd,Tarek Fahmy,Elizabeth M Jaffee,Jonathan P Schneck,David H Margulies,Drew M Pardoll.Enhanced Antigen-Specific Antitumor Immunity with Altered Peptide Ligands that Stabilize the MHC-Peptide-TCR Complex.Immunity,Volume 13,Issue 4,1 October 2000,Pages 529-538.

[1051] 68.A Y Huang,P H Gulden,A S Woods,M C Thomas,C D Tong,W Wang,V H Engelhard,G Pasternack,R Cotter,D Hunt,D M Pardoll,and E M Jaffee.The immunodominant major histocompatibility complex class I-restricted antigen of a murine colon tumor derives from an endogenous retroviral gene product.Proc Natl Acad Sci U S A.;93(18):9730-9735,1996 Sep 3.

[1052] 69.JOHNSON,BARBARA J.B.,RICHARD M.KINNEY,CRYSTLE L.KOST AND DENNIS W.TRENT.Molecular Determinants of Alphavirus Neurovirulence:Nucleotide and Deduced Protein Sequence Changes during Attenuation of Venezuelan Equine Encephalitis Virus.J Gen Virol 67:1951-1960,1986.

[1053] 70.Aarnoudse,C.A.,Krüse,M.,Konopitzky,R.,Brouwenstijn,N.,and Schrier,P.I.(2002).TCR reconstitution in Jurkat reporter cells facilitates the identification of novel tumor antigens by cDNA expression cloning.Int J Cancer 99,7-13.

[1054] 71.Alexander,J.,Sidney,J.,Southwood,S.,Ruppert,J.,Oseroff,C.,Maewal,A.,Snoke,K.,Serra,H.M.,Kubo,R.T.,and Sette,A.(1994).Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides.Immunity 1,751-761.

[1055] 72.Banu,N.,Chia,A.,Ho,Z.Z.,Garcia,A.T.,Paravasivam,K.,Grotenbreg,G.M.,Bertoletti,A.,and Gehring,A.J.(2014).Building and optimizing a virus-specific T cell receptor library for targeted immunotherapy in viral infections.Scientific Reports 4,4166.

[1056] 73.Cornet,S.,Miconnet,I.,Menez,J.,Lemonnier,F.,and Kosmatopoulos,K.(2006).Optimal organization of a polypeptide-based candidate cancer vaccine composed of cryptic tumor peptides with enhanced immunogenicity.Vaccine 24,2102-2109.

[1057] 74.Depla,E.,van der Aa,A.,Livingston,B.D.,Crimi,C.,Allosery,K.,de Brabandere,V.,Krakover,J.,Murthy,S.,Huang,M.,Power,S.,et al.(2008).Rational design of a multiepitope vaccine encoding T-lymphocyte epitopes for treatment of chronic hepatitis B virus infections.Journal of Virology 82,435-450.

[1058] 75.Ishioka,G.Y.,Fikes,J.,Hermanson,G.,Livingston,B.,Crimi,C.,Qin,M.,del Guercio,M.F.,Oseroff,C.,Dahlberg,C.,Alexander,J.,et al.(1999).Utilization of MHC class I transgenic mice for development of minigene DNA vaccines encoding multiple HLA-restricted CTL epitopes.J Immunol 162,3915-3925.

[1059] 76.Janetzki,S.,Price,L.,Schroeder,H.,Britten,C.M.,Welters,M.J.P.,and Hoos,A.(2015).Guidelines for the automated evaluation of Elispot assays.Nat Protoc 10,1098-1115.

[1060] 77.Lyons,G.E.,Moore,T.,Brasic,N.,Li,M.,Roszkowski,J.J.,and Nishimura,M.I.(2006).Influence of human CD8 on antigen recognition by T-cell receptor-transduced cells.Cancer Res 66,11455-11461.

[1061] 78.Nagai,K.,Ochi,T.,Fujiwara,H.,An,J.,Shirakata,T.,Mineno,J.,Kuzushima,K.,Shiku,H.,Melenhorst,J.J.,Gostick,E.,et al.(2012).Aurora kinase A-specific T-cell receptor gene transfer redirects T lymphocytes to display effective antileukemia reactivity.Blood 119,368-376.

[1062] 79.Panina-Bordignon,P.,Tan,A.,Termijtelen,A.,Demotz,S.,Corradin,G.,and Lanzavecchia,A.(1989).Universally immunogenic T cell epitopes:promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells.Eur J Immunol 19,2237-2242.

[1063] 80.Vitiello,A.,Marchesini,D.,Furze,J.,Sherman,L.A.,and Chesnut,R.W.(1991).Analysis of the HLA-restricted influenza-specific cytotoxic T lymphocyte response in transgenic mice carrying a chimeric human-mouse class I major histocompatibility complex.J Exp Med 173,1007-1015.

[1064] 81.Yachi,P.P.,Ampudia,J.,Zal,T.,and Gascoigne,N.R.J.(2006).Altered

peptide ligands induce delayed CD8-T cell receptor interaction--a role for CD8 in distinguishing antigen quality.Immunity 25,203-211.

[1065] 82.Pushko P,Parker M,Ludwig GV,Davis NL,Johnston RE,Smith JF.Replicon-helper systems from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus:expression of heterologous genes in vitro and immunization against heterologous pathogens in vivo.Virology.1997 Dec 22;239(2):389-401.

[1066] 83.Strauss,JH and E G Strauss.The alphaviruses:gene expression, replication,and evolution.Microbiol Rev.1994 Sep;58(3):491-562.

[1067] 84.Rhême C,Ehrengruber MU,Grandgirard D.Alphaviral cytotoxicity and its implication in vector development.Exp Physiol.2005 Jan;90(1):45-52.Epub 2004 Nov 12.

[1068] 85.Riley,Michael K.II,and Wilfred Vermerris.Recent Advances in Nanomaterials for Gene Delivery-A Review.Nanomaterials 2017,7(5),94.

[1069] 86.Frolov I,Hardy R,Rice CM.Cis-acting RNA elements at the 5′end of Sindbis virus genome RNA regulate minus-and plus-strand RNA synthesis.RNA.2001 Nov;7(11):1638-51.

[1070] 87.Jose J,Snyder JE,Kuhn RJ.A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly.Future Microbiol.2009 Sep;4(7):837-56.

[1071] 88.Bo Li and C.olin N.Dewey.RSEM:accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a referenfe genome.BMC Bioinformatics,12: 323,August 2011

[1072] 89.Hillary Pearson,Tariq Daouda,Diana Paola Granados,Chantal Durette, Eric Bonneil,Mathieu Courcelles,Anja Rodenbrock,Jean-Philippe Laverdure, Caroline Côté,Sylvie Mader,Sébastien Lemieux,Pierre Thibault,and Claude Perreault.MHC class I-associated peptides derive from selective regions of the human genome.The Journal of Clinical Investigation,2016,

[1073] 90.Juliane Liepe,Fabio Marino,John Sidney,Anita Jeko,Daniel E.Bunting,Alessandro Sette,Peter M.Kloetzel,Michael P.H.Stumpf,Albert J.R.Heck,Michele Mishto.A large fraction of HLA class I ligands are proteasome-generated spliced peptides.Science,21,October 2016.

[1074] 91.Mommen GP.,Marino,F.,Meiring HD.,Poelen,MC.,van Gaans-van den Brink,JA.,Mohammed S.,Heck AJ.,and van Els CA.Sampling From the Proteome to the Human Leukocyte Antigen-DR(HLA-DR)Ligandome Proceeds Via High Specificity.Mol Cell Proteomics 15(4):1412-1423,April 2016.

[1075] 92.Sebastian Kreiter,Mathias Vormehr,Niels van de Roemer,Mustafa Diken,Martin Löwer,Jan Diekmann,Sebastian Boegel,Barbara Schrörs,Fulvia Vascotto, John C.Castle,Arbel D.Tadmor,Stephen P.Schoenberger,Christoph Huber,Özlem Türeci,and Ugur Sahin.Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to caner.Nature 520,692-696,April 2015.

[1076] 93.Tran E.,Turcotte S.,Gros A.,Robbins P.F.,Lu Y.C.,Dudley M.E.,Wunderlich J.R.,Somerville R.P.,Hogan K.,Hinrichs C.S.,Parkhurst M.R.,Yang J.C.,Rosenberg S.A.Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+T cells in a patient with epithelial cancer.Science 344(6184)641-645,May 2014.

[1077] 94.Andreatta M.,Karosiene E.,Rasmussen M.,Stryhn A.,Buus S.,Nielsen M.Accurate pan-specific prediction of peptide-MHC class II binding affinity with improved binding core identification.Immunogenetics 67(11-12)641-650,November 2015.

[1078] 95.Nielsen,M.,Lund,O.NN-align.An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction.BMC Bioinformatics 10:296,September 2009.

[1079] 96.Nielsen,M.,Lundegaard,C.,Lund,O.Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align,a novel stabilization matrix alignment method.BMC Bioinformatics 8:238,July 2007.

[1080] 97.Zhang,J.,et al.PEAKS DB:de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification.Molecular&Cellular Proteomics.11(4):1-8.1/2/2012.

[1081] 98.Jensen,Kamilla Kjaergaard,et al.“Improved Methods for Prediting Peptide Binding Affinity to MHC Class II Molecules.”Immunology,2018,doi:10.1111/imm.12889.

[1082] 99.Carter,S.L.,Cibulskis,K.,Helman,E.,McKenna,A.,Shen,H.,Zack,T.,Laird,P.W.,Onofrio,R.C.,Winckler,W.,Weir,B.A.,et al.(2012).Absolute quantification of somatic DNAalterations in human cancer.Nat.Biotechnol.30,413-421

[1083] 100.McGranahan,N.,Rosenthal,R.,Hiley,C.T.,Rowan,A.J.,Watkins,T.B.K.,Wilson,G.A.,Birkbak,N.J.,Veeriah,S.,Van Loo,P.,Herrero,J.,et al.(2017).Allele-Specific HLA Loss and Immune Escape in Lung Cancer Evolution.Cell 171,1259-1271.e11.

[1084] 101.Shukla,S.A.,Rooney,M.S.,Rajasagi,M.,Tiao,G.,Dixon,P.M.,Lawrence,M.S.,Stevens,J.,Lane,W.J.,Dellagatta,J.L.,Steelman,S.,et al.(2015).Comprehensive analysis of cancer-associated somatic mutations in class I HLA genes.Nat.Biotechnol.33,1152-1158.

[1085] 102.Van Loo,P.,Nordgard,S.H.,Lingjærde,O.C.,Russnes,H.G.,Rye,I.H.,Sun,W.,Weigman,V.J.,Marynen,P.,Zetterberg,A.,Naume,B.,et al.(2010).Allele-specific copy number analysis of tumors.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.107,16910-16915.

[1086] 103.Van Loo,P.,Nordgard,S.H.,Lingjærde,O.C.,Russnes,H.G.,Rye,I.H.,Sun,W.,Weigman,V.J.,Marynen,P.,Zetterberg,A,Naume,B.,et al.(2010).Allele-specific copynumber analysis of tumors.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.107,16910-16915.。

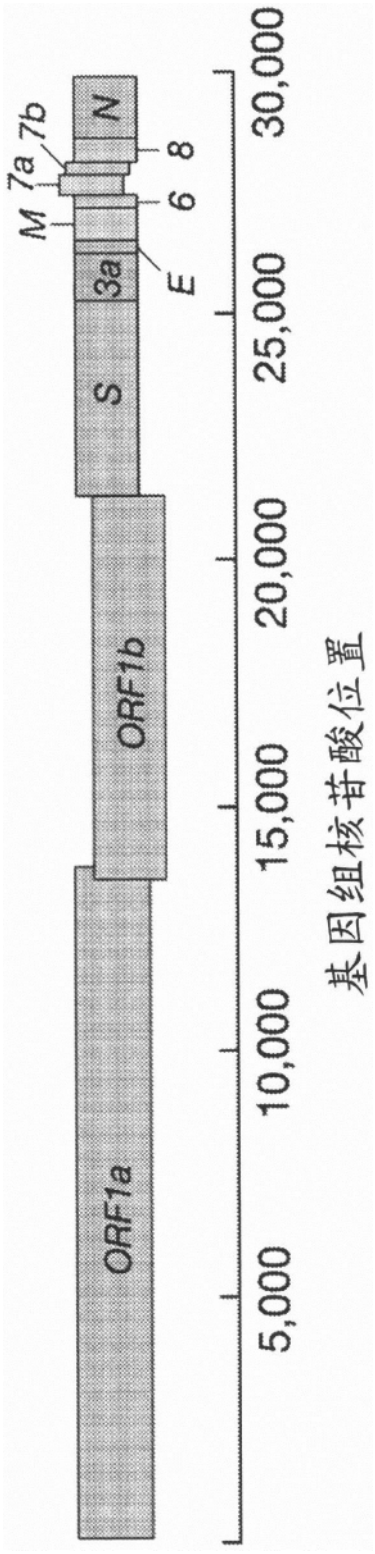

ORF1a
ORF1b
S
3a
E
M
7a
7b
N
8
6
5,000
10,000
15,000
20,000
25,000
30,000
基因组核苷酸位置

图1

切割产物	聚蛋白质pp1a/pp1ab中的位置[a]	蛋白质大小(氨基酸数目)	假定功能结构域[b]
nsp1	1Met-Gly180	180	
nsp2	181Ala-Gly818	638	
nsp3	819Ala-Gly2763	1945	ADRP
nsp4	2764Lys-Gln3263	500	
nsp5	3264Ser-Gln3569	306	3CLpro
nsp6	3570Ser-Gln3859	290	
nsp7	3860Ser-Gln3942	83	
nsp8	3943Ala-Gln4140	198	
nsp9	4141Asn-Gln4253	113	
nsp10	4254Ala-Gln4392	139	
nsp11	4393Ser-Val4405	13	
nsp12	4393Ser-Gln5324	932	RdRp
nsp13	5325Ala-Gln5925	601	Hel
nsp14	5926Ala-Gln6452	527	ExoN
nsp15	6453Ser-Gln6798	346	NendoU
nsp16	6799Ser-Asn7096	298	O-MT

图2

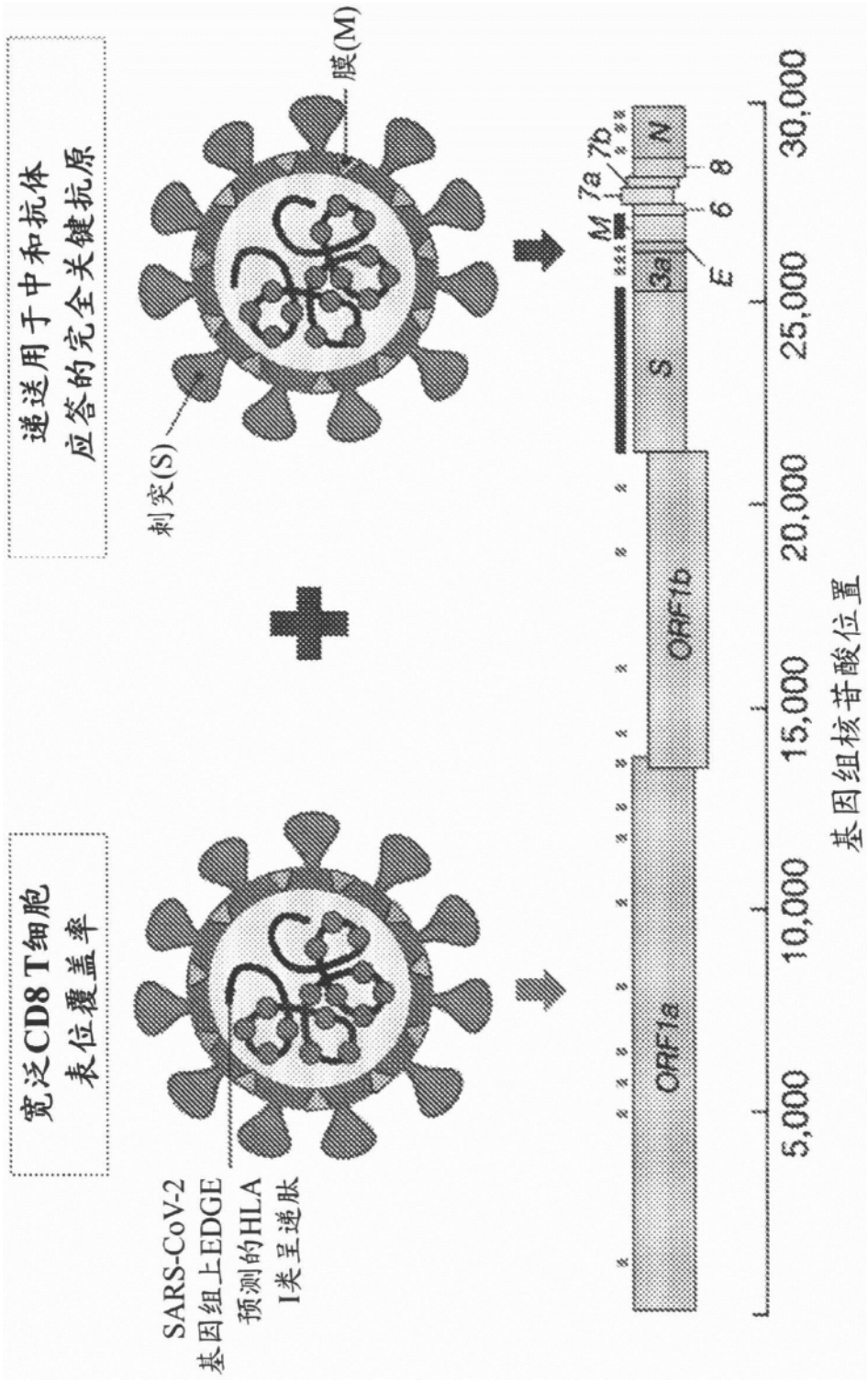

宽泛CD8 T细胞
表位覆盖率
SARS-CoV-2
基因组上EDGE
预测的HLA
I类呈递肽
递送用于中和抗体
应答的完全关键抗原
刺突(S)
膜(M)
ORF1a
ORF1b
S
3a
M
7a
7b
E
6
8
N
5,000
10,000
15,000
20,000
25,000
30,000
基因组核苷酸位置

图3

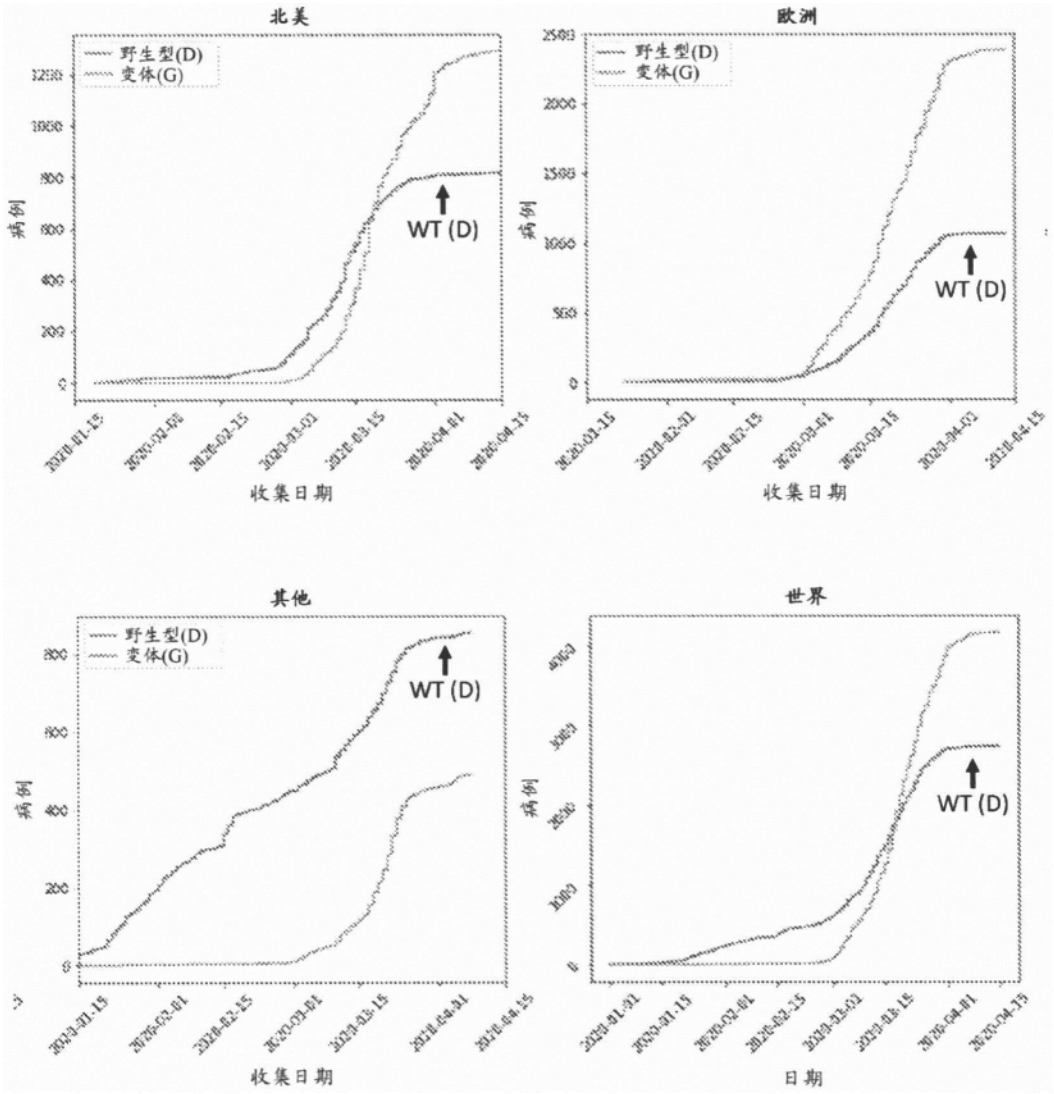
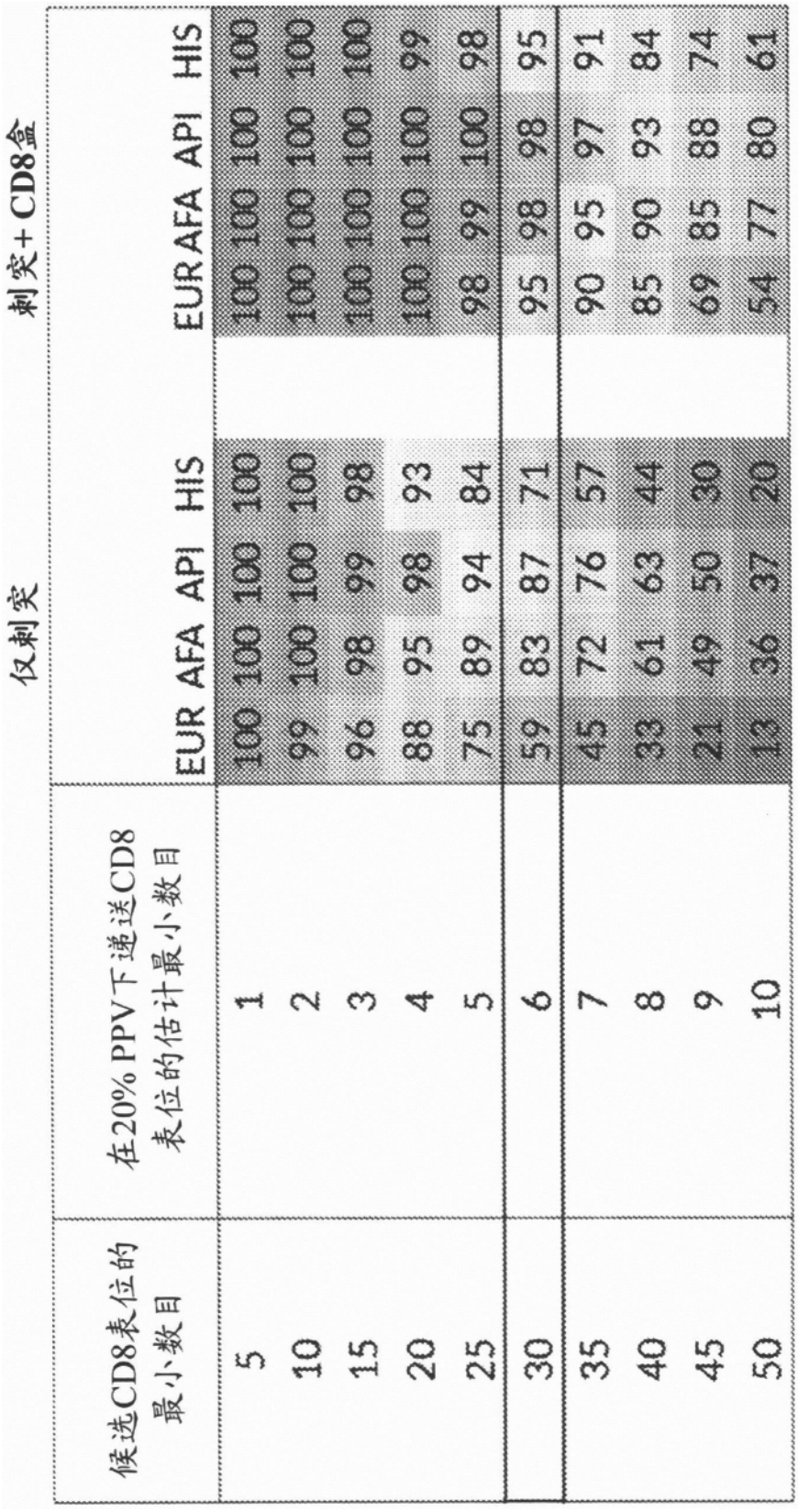

北美
野生型(D)
变体(G)
WT (D)
病例
收集日期
欧洲
野生型(D)
变体(G)
WT (D)
病例
收集日期
其他
野生型(D)
变体(G)
WT (D)
病例
收集日期
世界
WT (D)
病例
日期

图4



候选CD8表位的最小数目	在20% PPV下递送CD8表位的估计最小数目	仅刺突				刺突+CD8盒			
		EUR	AFA	API	HIS	EUR	AFA	API	HIS
5	1	100	100	100	100	100	100	100	100
10	2	99	100	100	100	100	100	100	100
15	3	96	98	99	98	100	100	100	100
20	4	88	95	98	93	100	100	100	99
25	5	75	89	94	84	98	99	100	98
30	6	59	83	87	71	95	98	98	95
35	7	45	72	76	57	90	95	97	91
40	8	33	61	63	44	85	90	93	84
45	9	21	49	50	30	69	85	88	74
50	10	13	36	37	20	54	77	80	61

图5

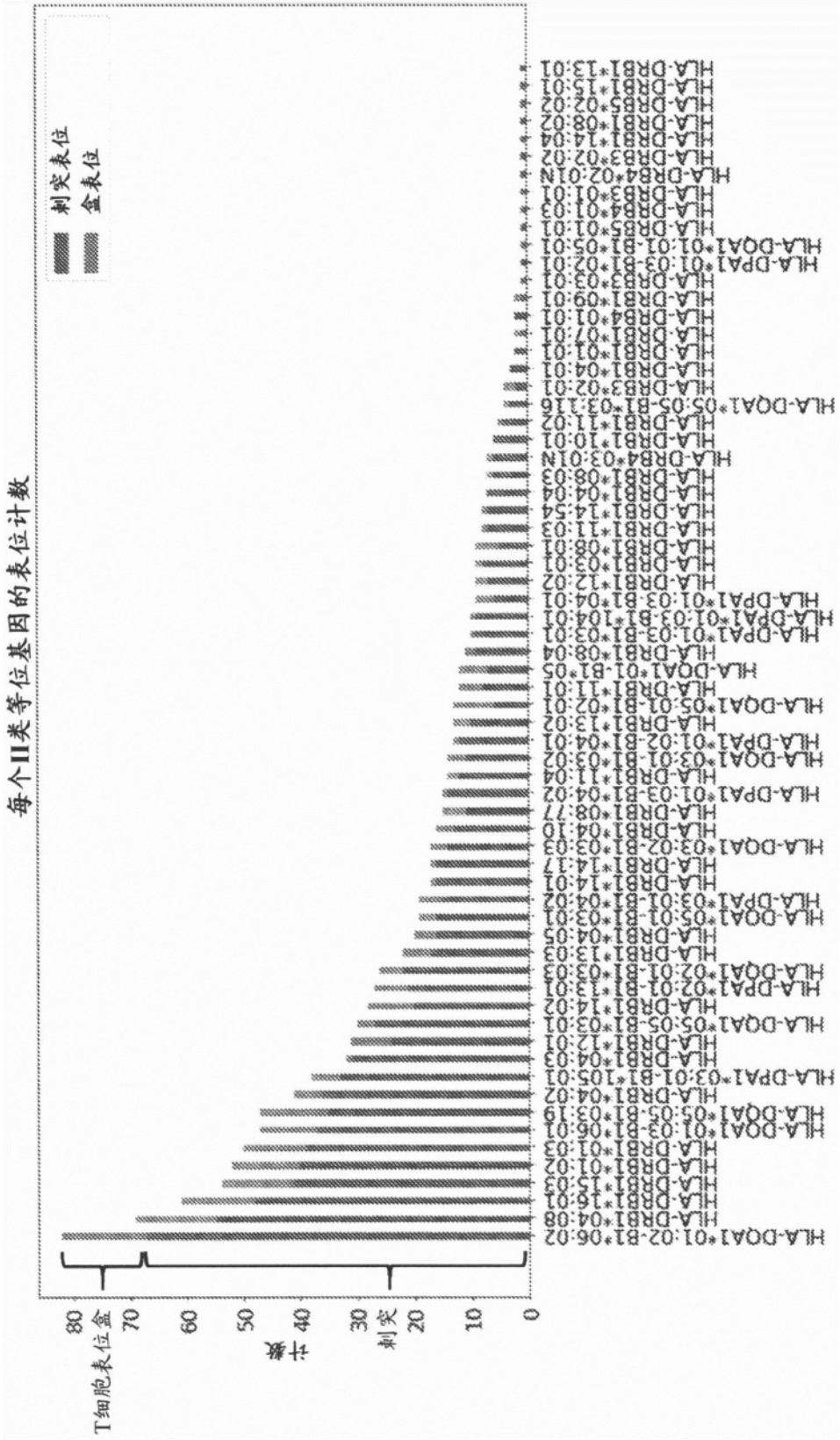

每个II类等位基因的表位计数
刺突表位
盒表位
T细胞表位盒
计数
刺突
0
10
20
30
40
50
60
70
80
HLA-DQA1*01:02-B1*06:02
HLA-DRB1*04:08
HLA-DRB1*16:01
HLA-DRB1*15:03
HLA-DRB1*01:02
HLA-DRB1*01:03
HLA-DQA1*01:03-B1*06:01
HLA-DQA1*05:05-B1*03:19
HLA-DRB1*04:02
HLA-DPA1*03:01-B1*105:01
HLA-DRB1*04:03
HLA-DRB1*12:01
HLA-DQA1*05:05-B1*03:01
HLA-DRB1*14:02
HLA-DPA1*02:01-B1*13:01
HLA-DQA1*02:01-B1*03:03
HLA-DRB1*13:03
HLA-DRB1*04:05
HLA-DQA1*05:01-B1*03:01
HLA-DPA1*03:01-B1*04:02
HLA-DRB1*14:01
HLA-DRB1*14:17
HLA-DQA1*03:02-B1*03:03
HLA-DRB1*04:10
HLA-DRB1*08:77
HLA-DPA1*01:03-B1*04:02
HLA-DRB1*11:04
HLA-DQA1*03:01-B1*03:02
HLA-DPA1*01:02-B1*04:01
HLA-DRB1*13:02
HLA-DQA1*05:01-B1*02:01
HLA-DRB1*11:01
HLA-DQA1*01-B1*05
HLA-DRB1*08:04
HLA-DPA1*01:03-B1*03:01
HLA-DPA1*01:03-B1*104:01
HLA-DPA1*01:03-B1*04:01
HLA-DRB1*12:02
HLA-DRB1*03:01
HLA-DRB1*08:01
HLA-DRB1*11:03
HLA-DRB1*14:54
HLA-DRB1*04:04
HLA-DRB1*08:03
HLA-DRB4*03:01N
HLA-DRB1*10:01
HLA-DRB1*11:02
HLA-DQA1*05:05-B1*03:116
HLA-DRB3*02:01
HLA-DRB1*04:01
HLA-DRB1*01:01
HLA-DRB1*07:01
HLA-DRB4*01:01
HLA-DRB1*09:01
HLA-DRB3*03:01
HLA-DPA1*01:03-B1*02:01
HLA-DQA1*01:01-B1*05:01
HLA-DRB5*01:01
HLA-DRB4*01:03
HLA-DRB3*01:01
HLA-DRB4*02:01N
HLA-DRB3*02:02
HLA-DRB1*14:04
HLA-DRB1*08:02
HLA-DRB5*02:02
HLA-DRB1*15:01
HLA-DRB1*13:01

图6A

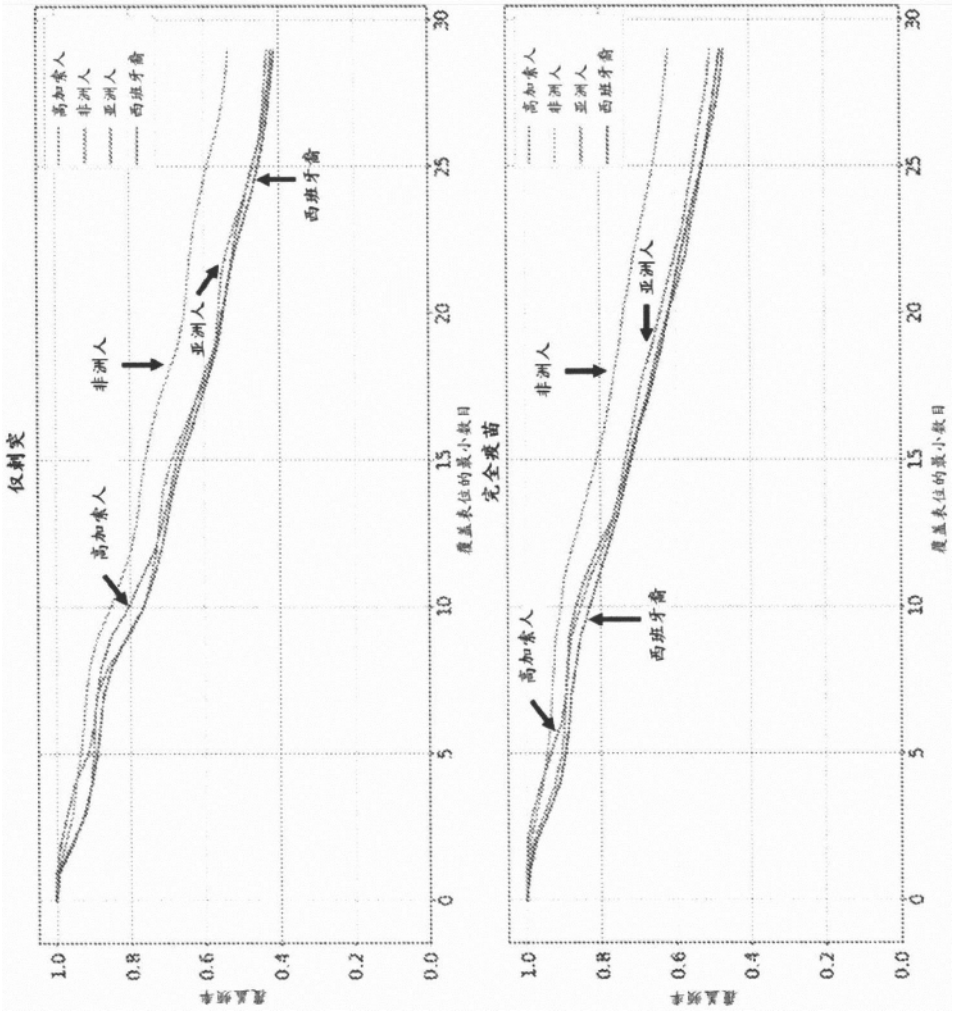

仅刺突
高加索人
非洲人
亚洲人
西班牙裔
高加索人
非洲人
亚洲人
西班牙裔
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
5
10
15
20
25
30
覆盖表位的氨小数目
完全疫苗
高加索人
非洲人
亚洲人
西班牙裔
高加索人
非洲人
亚洲人
西班牙裔
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
5
10
15
20
25
30
覆盖表位的氨小数目

图6B

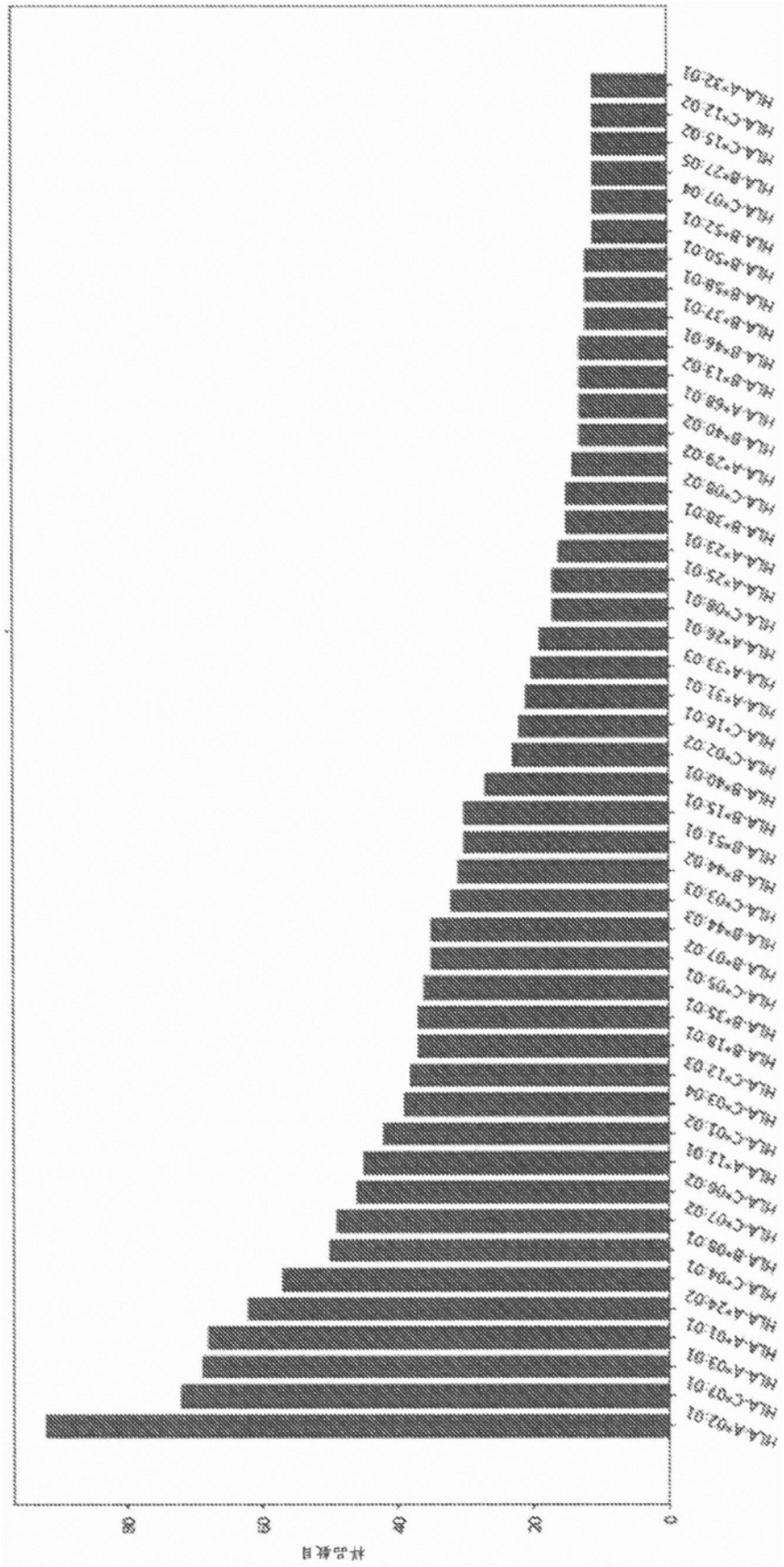

HLA-A*32:01
HLA-C*12:02
HLA-C*15:02
HLA-B*27:05
HLA-C*07:04
HLA-B*52:01
HLA-B*50:01
HLA-B*58:01
HLA-B*37:01
HLA-B*46:01
HLA-B*13:02
HLA-A*68:01
HLA-B*40:02
HLA-A*29:02
HLA-C*08:02
HLA-B*38:01
HLA-A*23:01
HLA-A*25:01
HLA-C*06:01
HLA-A*26:01
HLA-A*33:03
HLA-A*31:01
HLA-C*16:01
HLA-C*02:02
HLA-B*40:01
HLA-B*15:01
HLA-B*51:01
HLA-B*44:02
HLA-C*03:03
HLA-B*44:03
HLA-B*07:02
HLA-C*05:01
HLA-B*35:01
HLA-B*18:01
HLA-C*12:03
HLA-C*03:04
HLA-C*01:02
HLA-A*11:01
HLA-C*08:02
HLA-C*07:02
HLA-B*08:01
HLA-C*04:01
HLA-A*24:02
HLA-A*01:01
HLA-A*03:01
HLA-C*07:01
HLA-A*02:01
样品数目

图7A

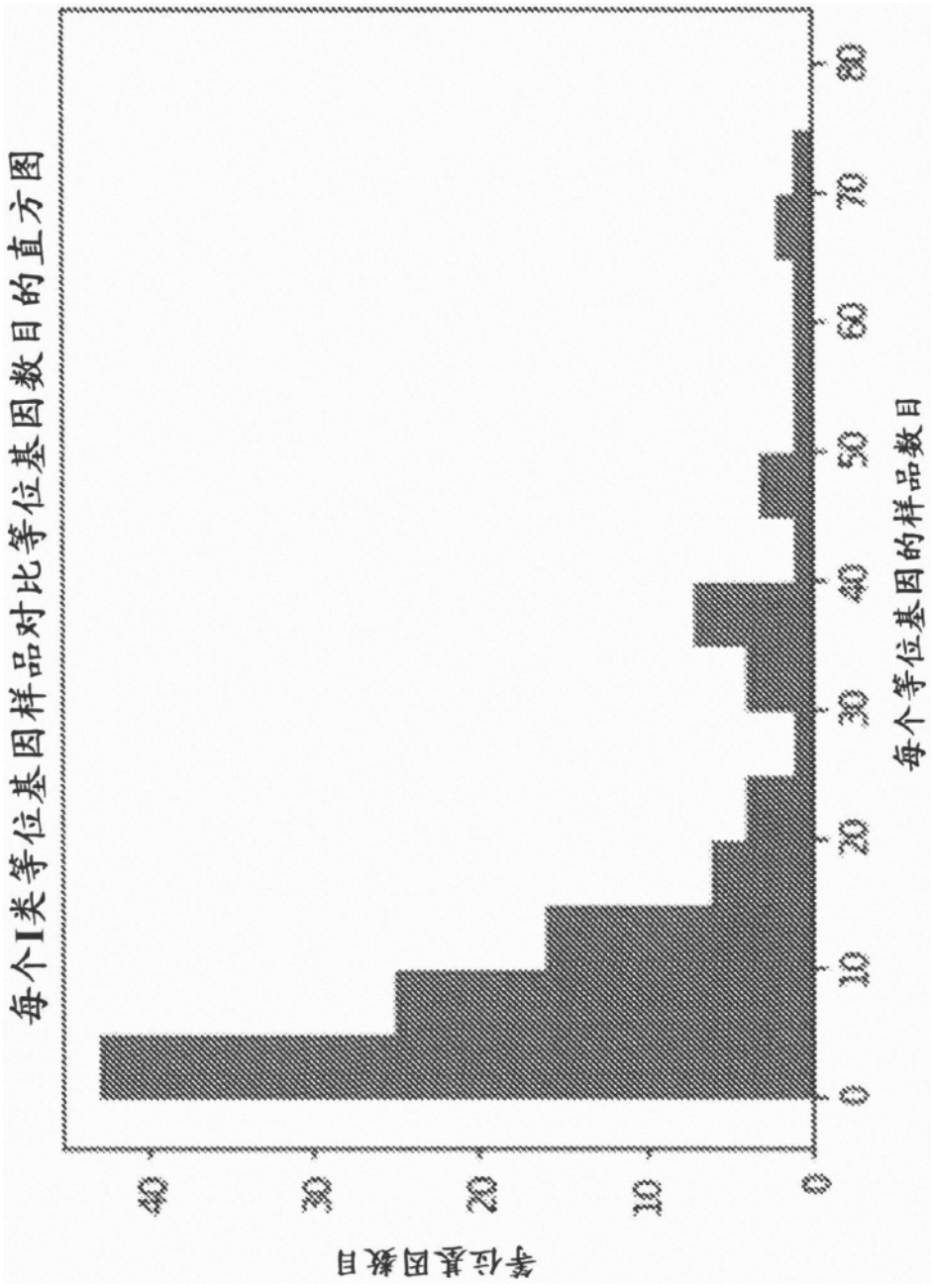

每个I类等位基因样品对比等位基因数目的直方图
等位基因数目
每个等位基因的样品数目
0
10
20
30
40
50
60
70
80

图7B

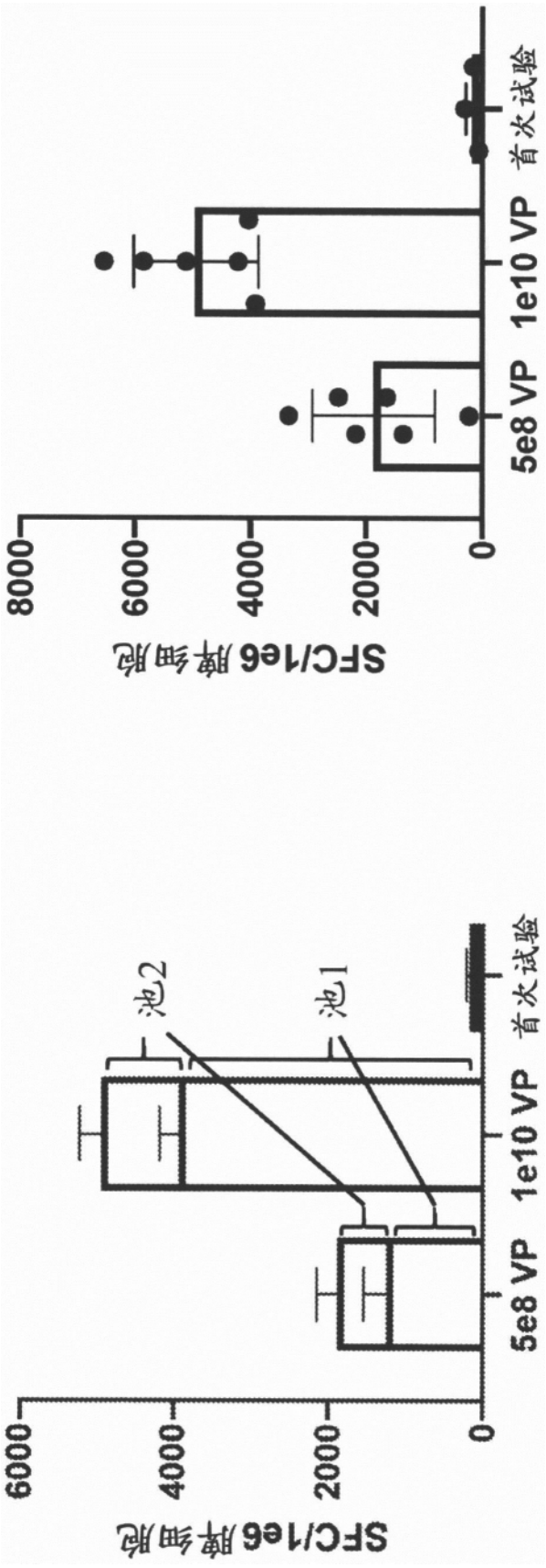


图8A

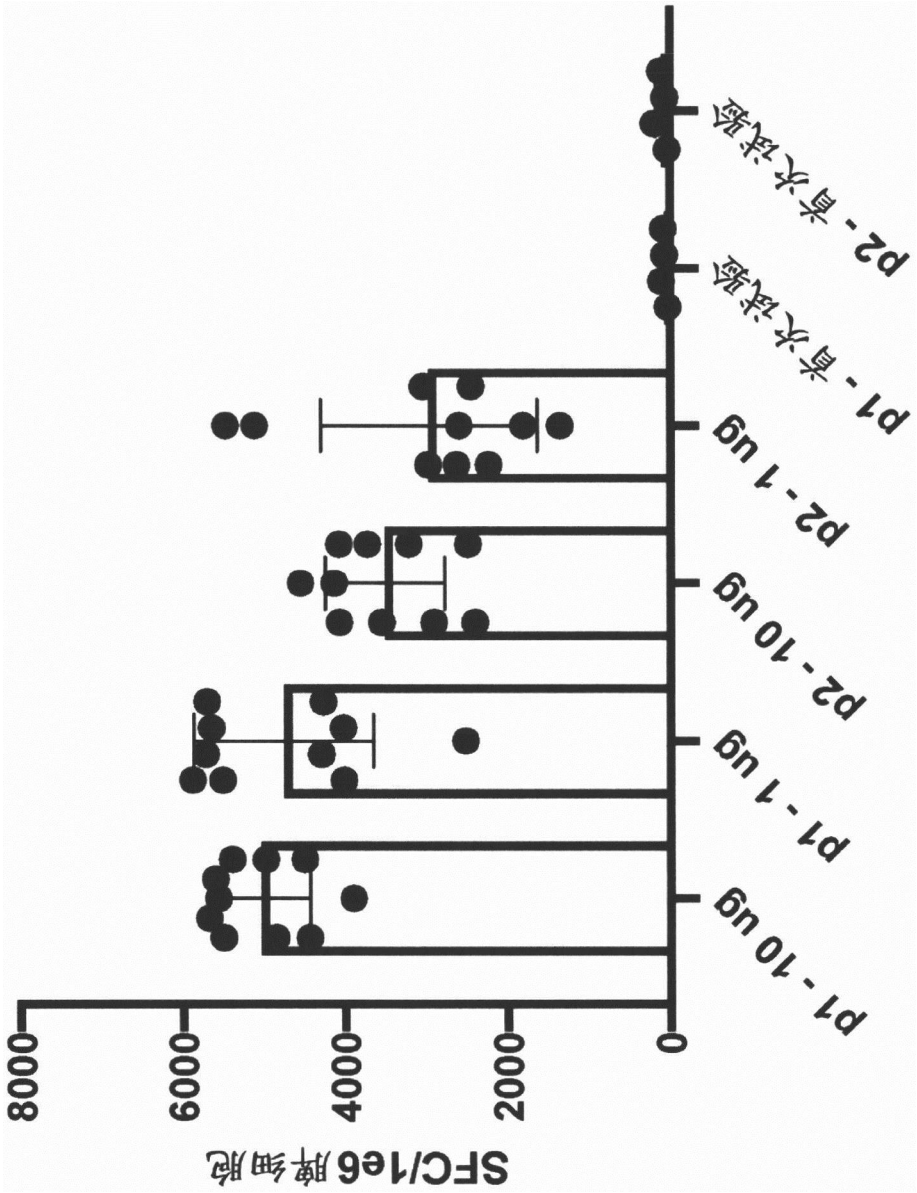

SFC/1e6 脾细胞
8000
6000
4000
2000
0
P1 - 10 ug
P1 - 1 ug
P2 - 10 ug
P2 - 1 ug
P1 - 青水试验
P2 - 青水试验

图8B

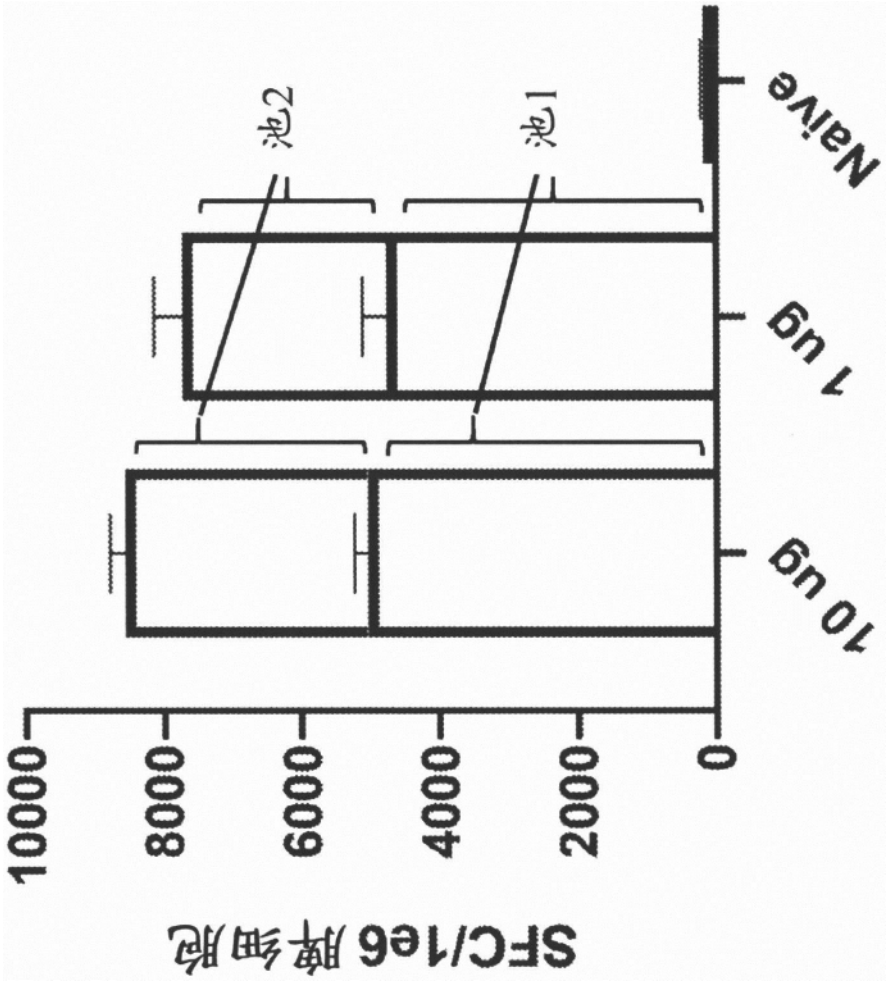


图8C

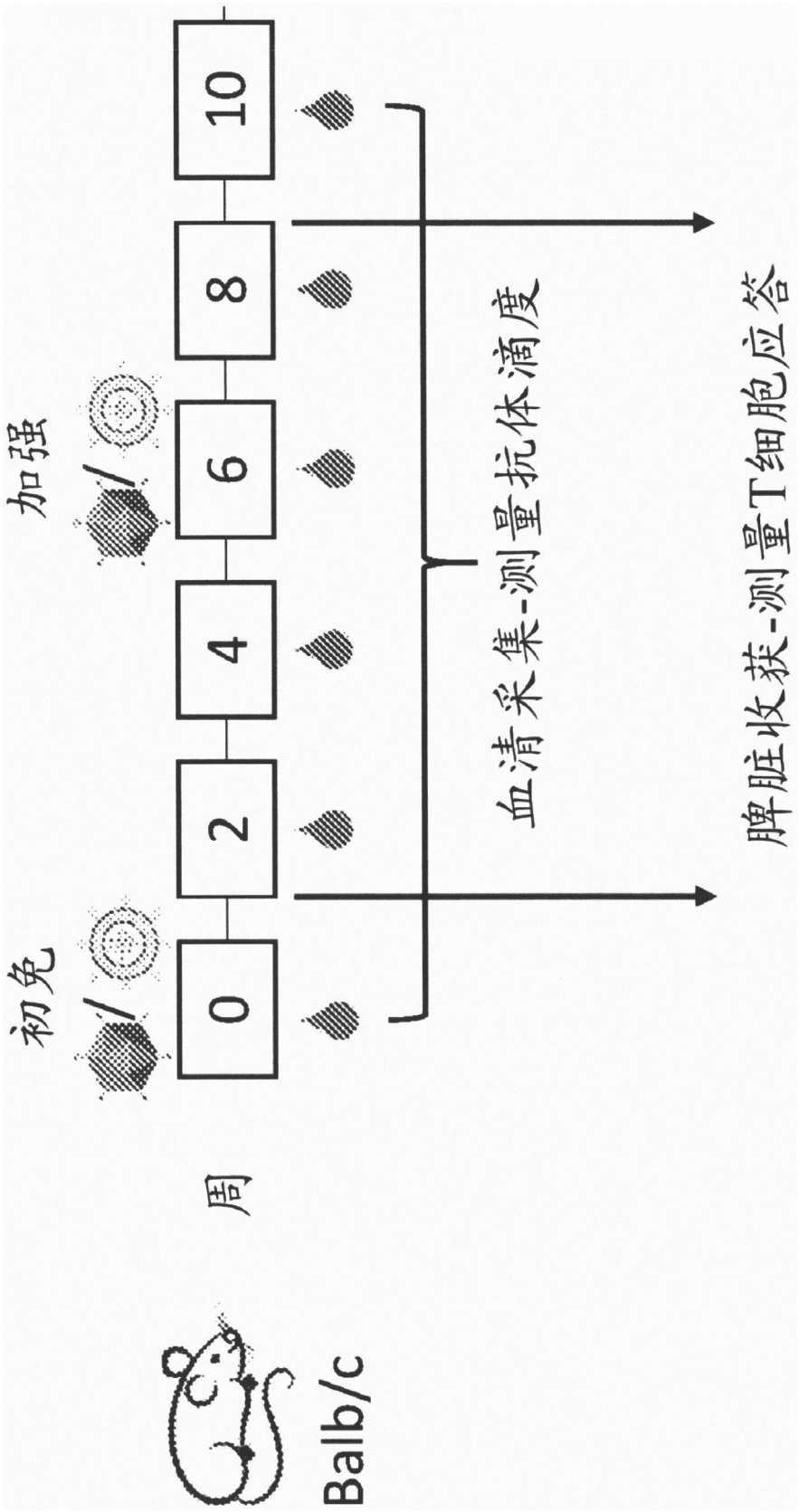


图9

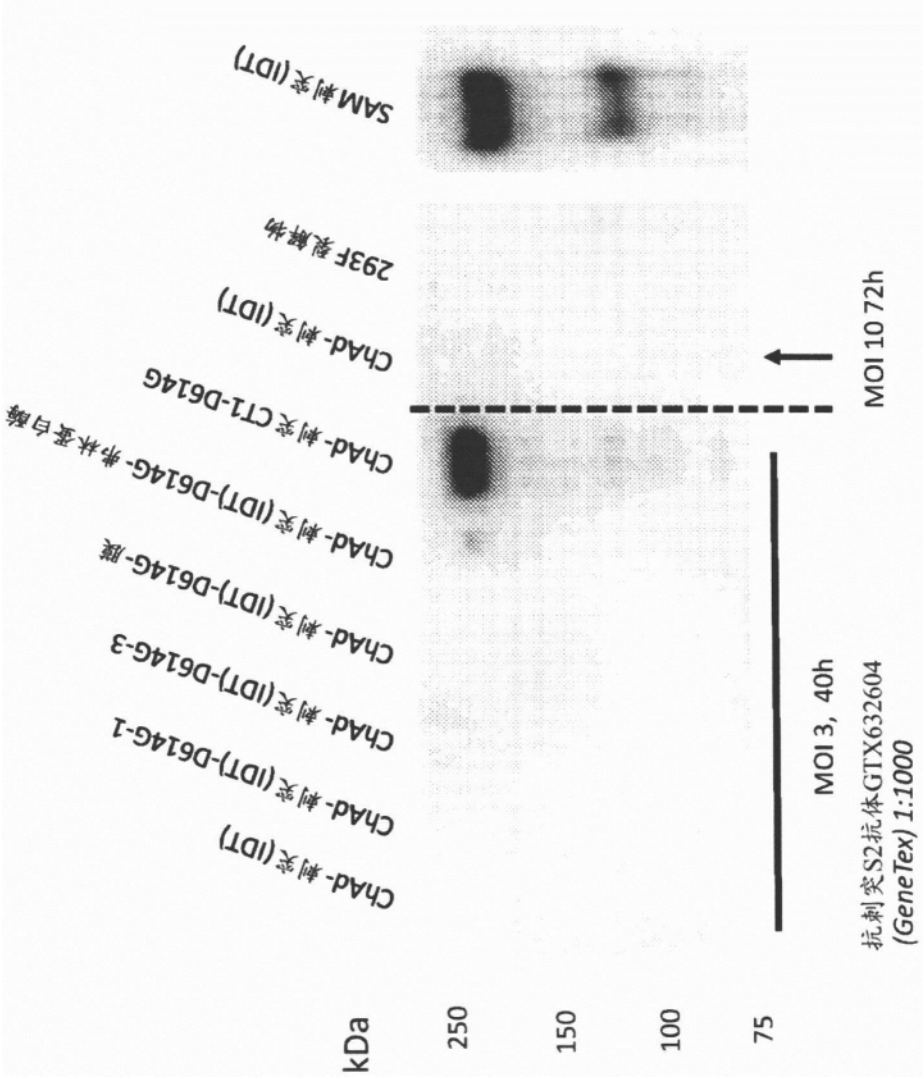

SAM刺突(IDT)
293F裂解物
ChAd-刺突(IDT)
ChAd-刺突CT1-D614G
ChAd-刺突(IDT)-D614G-弗林蛋白酶
ChAd-刺突(IDT)-D614G-脯
ChAd-刺突(IDT)-D614G-3
ChAd-刺突(IDT)-D614G-1
ChAd-刺突(IDT)
kDa
250
150
100
75
MOI 3, 40h
MOI 10 72h
抗刺突S2抗体GTX632604
(GeneTex) 1:1000

图10A

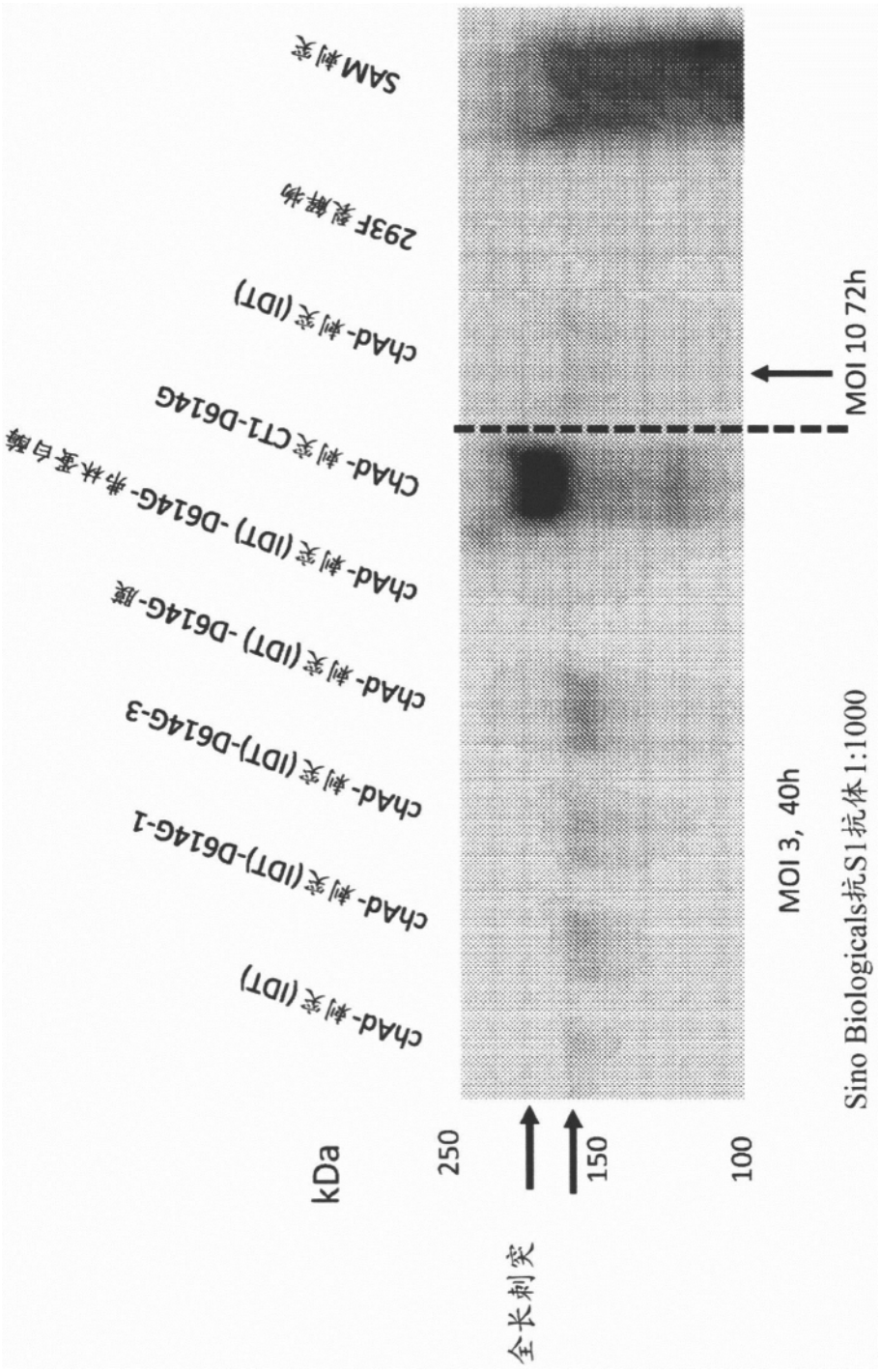

SAM刺突
293F裂解物
cHAd-刺突(IDT)
cHAd-刺突CT1-D614G
cHAd-刺突(IDT)-D614G-弗林蛋白酶
cHAd-刺突(IDT)-D614G-腺
cHAd-刺突(IDT)-D614G-3
cHAd-刺突(IDT)-D614G-1
cHAd-刺突(IDT)
kDa
250
150
100
全长刺突
MOI 3, 40h
MOI 10 72h
Sino Biologicals抗S1抗体1:1000

图10B

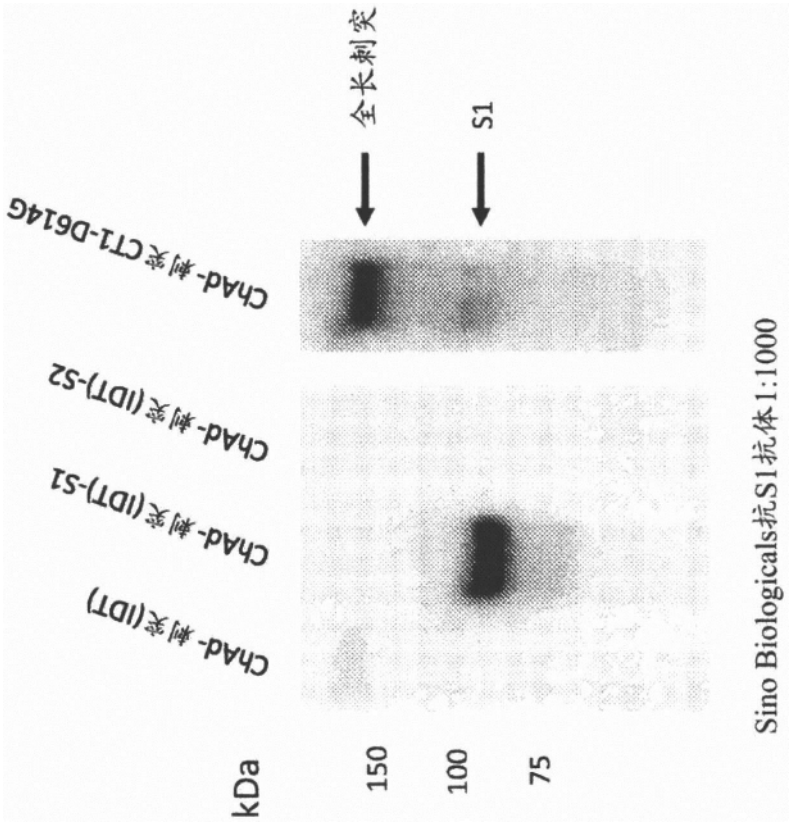

全长刺突
S1
ChAd-刺突CT1-D614G
ChAd-刺突(IDT)-S2
ChAd-刺突(IDT)-S1
ChAd-刺突(IDT)
kDa
150
100
75
Sino Biologicals抗S1抗体1:1000

图10C

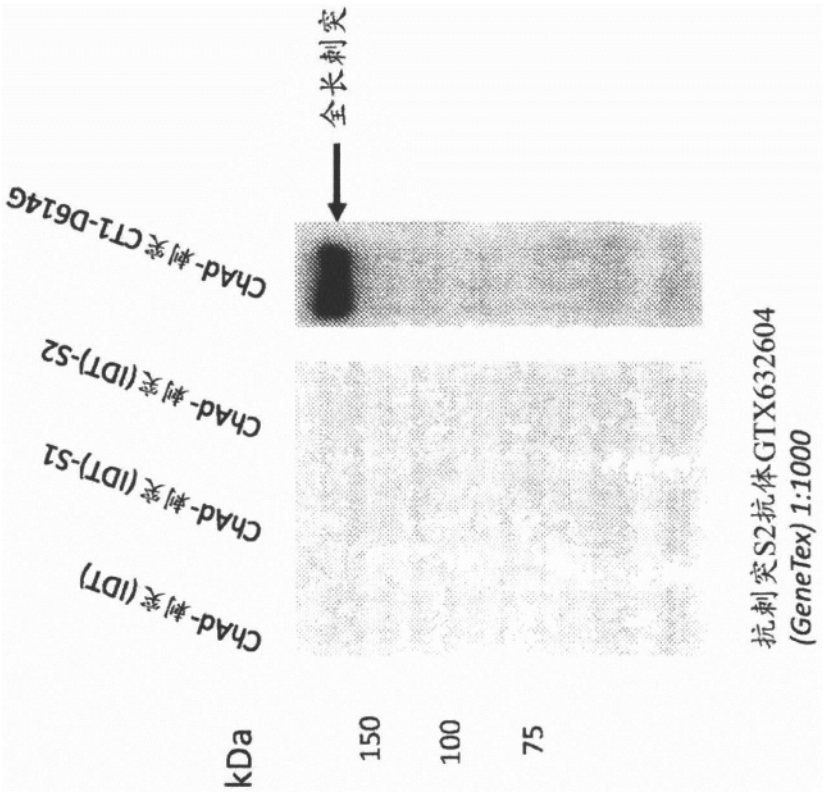

全长刺突
ChAd-刺突CT1-D614G
ChAd-刺突(IDT)-S2
ChAd-刺突(IDT)-S1
ChAd-刺突(IDT)
kDa
150
100
75
抗刺突S2抗体GTX632604
(GeneTex) 1:1000

图10D

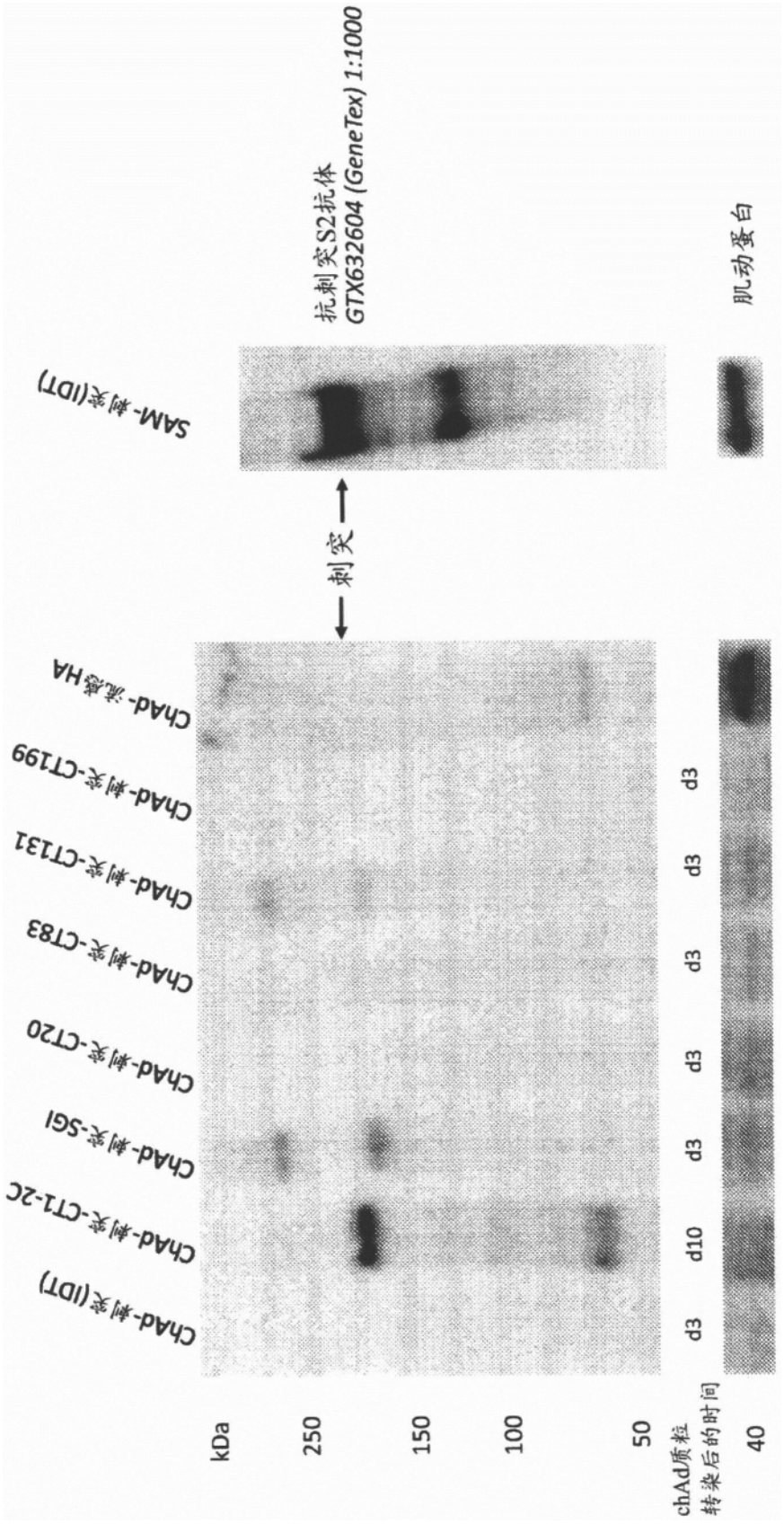

kDa
250
150
100
50
40
chAd质粒
转染后的时间
d3
d10
d3
d3
d3
d3
d3
ChAd-刺突(IDT)
ChAd-刺突-CT1-2C
ChAd-刺突-SGI
ChAd-刺突-CT20
ChAd-刺突-CT83
ChAd-刺突-CT131
ChAd-刺突-CT199
ChAd-刺突HA
刺突
SAM-刺突(IDT)
抗刺突S2抗体
GTX632604 (GeneTex) 1:1000
肌动蛋白

图11

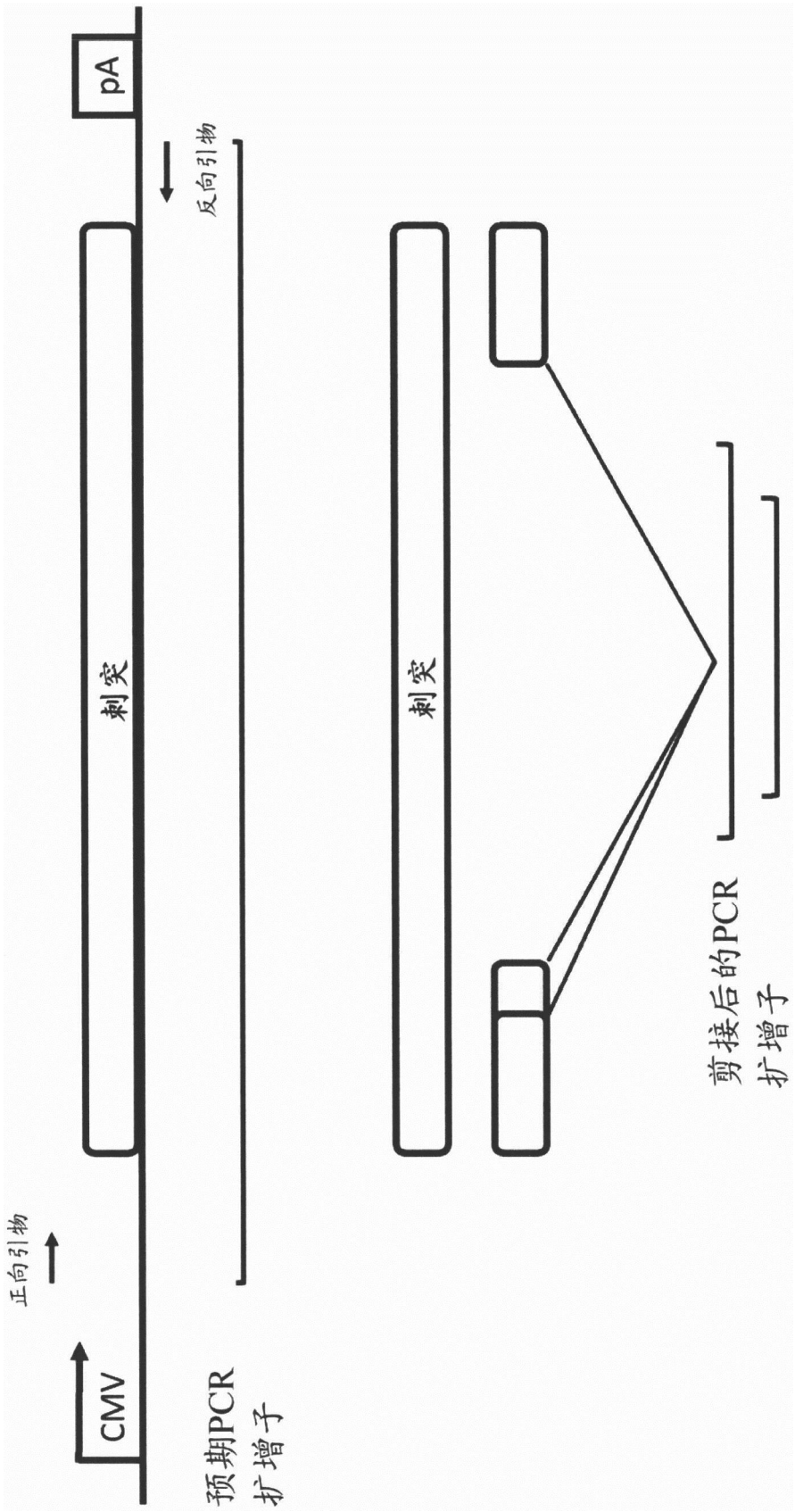


图12A

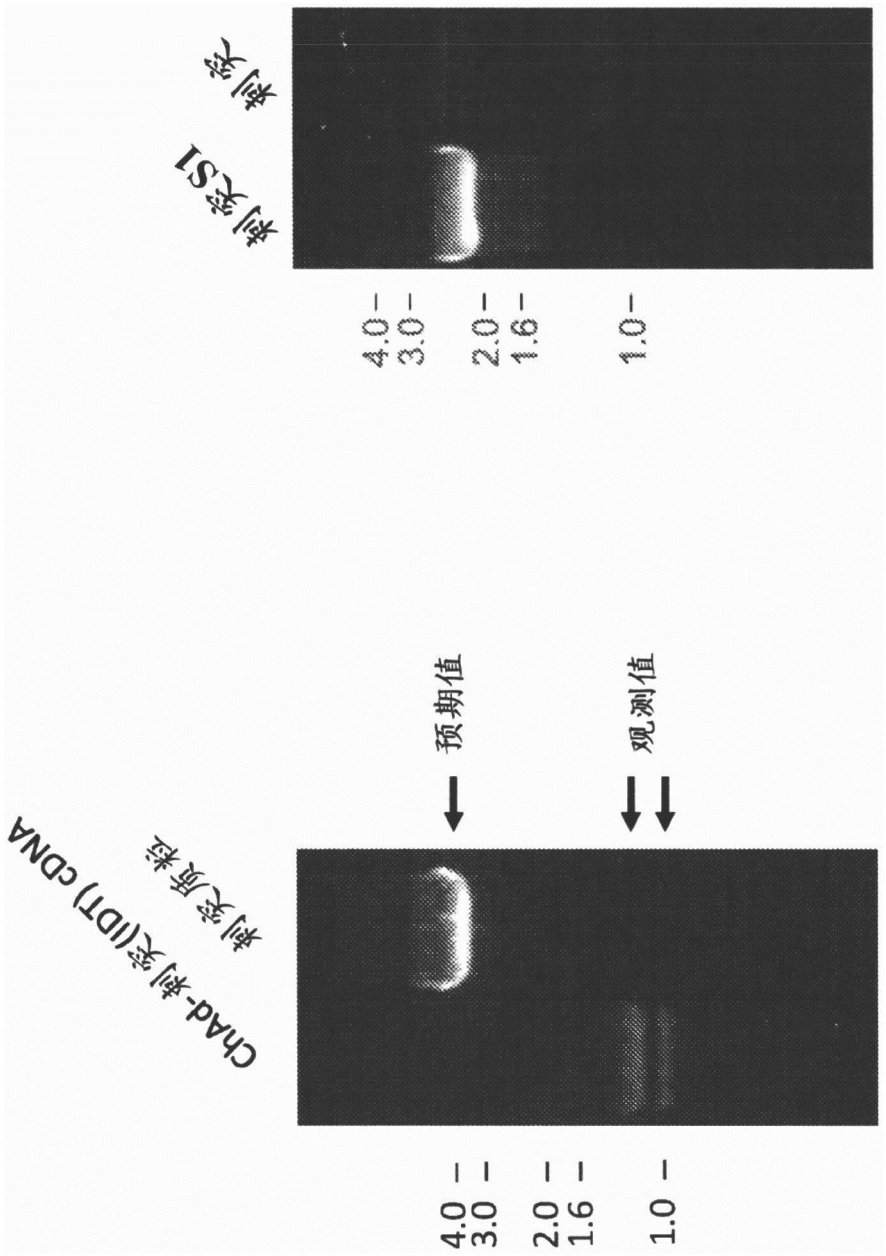


图12B

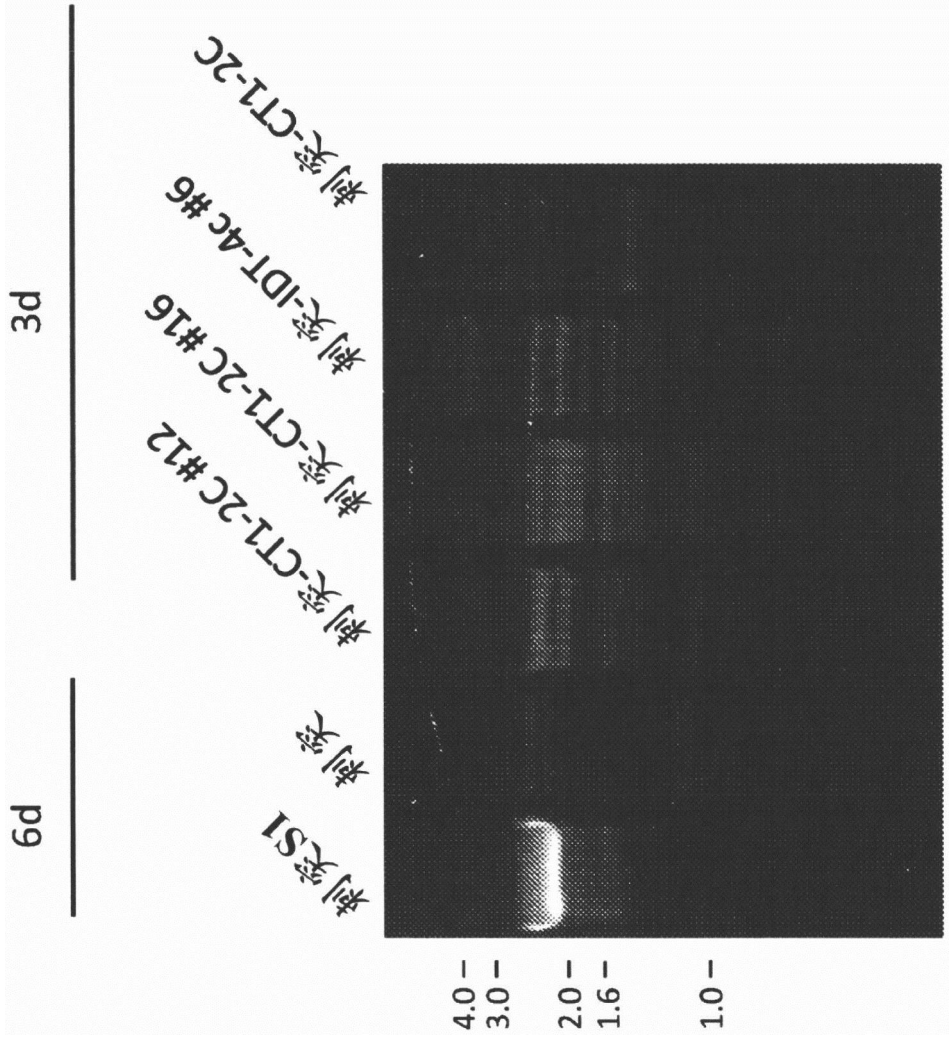

6d
3d
载体SI
载体
载体-CT1-2C#12
载体-CT1-2C#16
载体-IDT-AC#6
载体-CT1-2C
4.0
3.0
2.0
1.6
1.0

图13

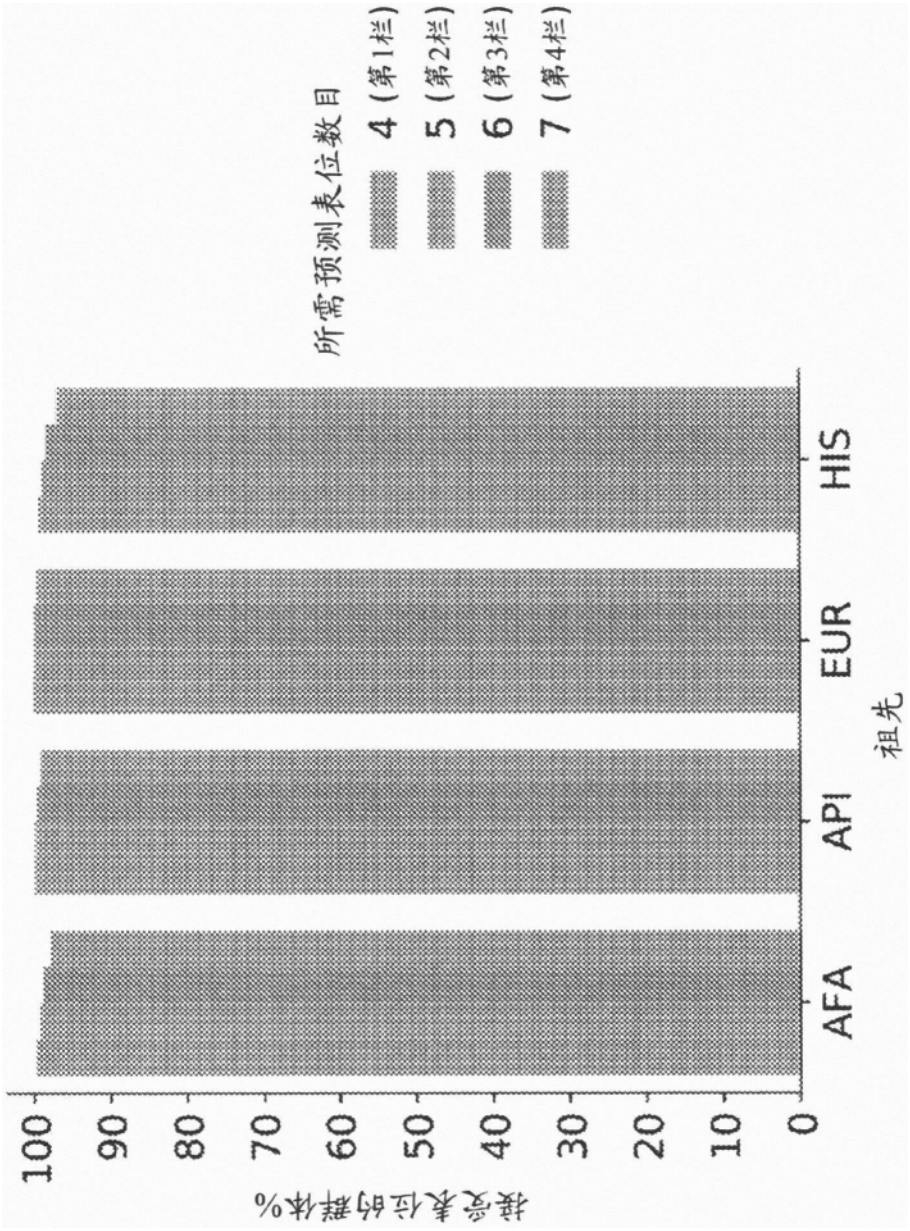

所需预测表位数目
4（第1栏）
5（第2栏）
6（第3栏）
7（第4栏）
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
AFA
API
EUR
HIS
祖先

图14

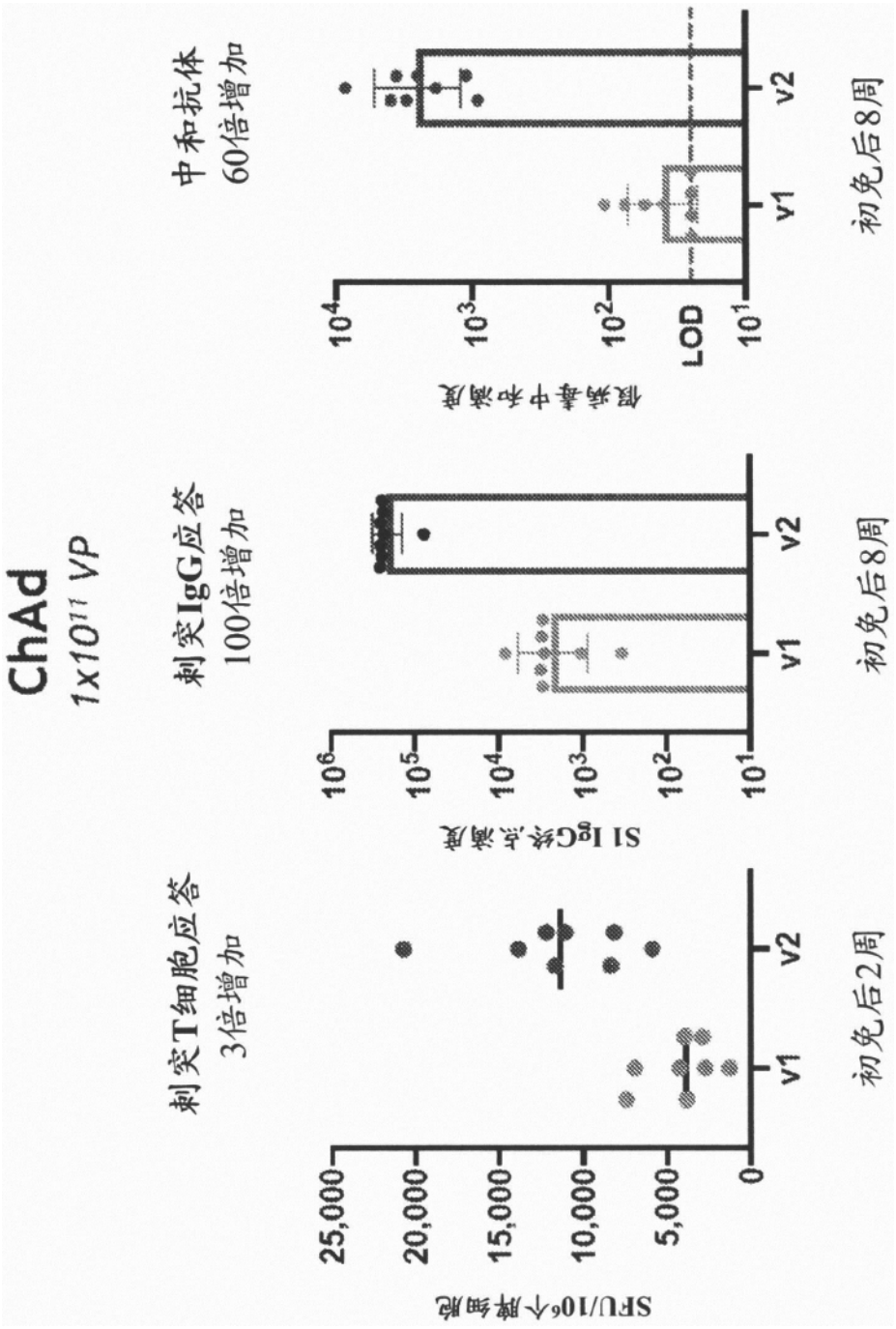

ChAd
1x10^11 VP
刺突T细胞应答
3倍增加
刺突IgG应答
100倍增加
中和抗体
60倍增加
SFU/10^6个脾细胞
SI IgG终点滴度
假病毒中和滴度
LOD
初免后2周
初免后8周
初免后8周
V1
V2

图15A

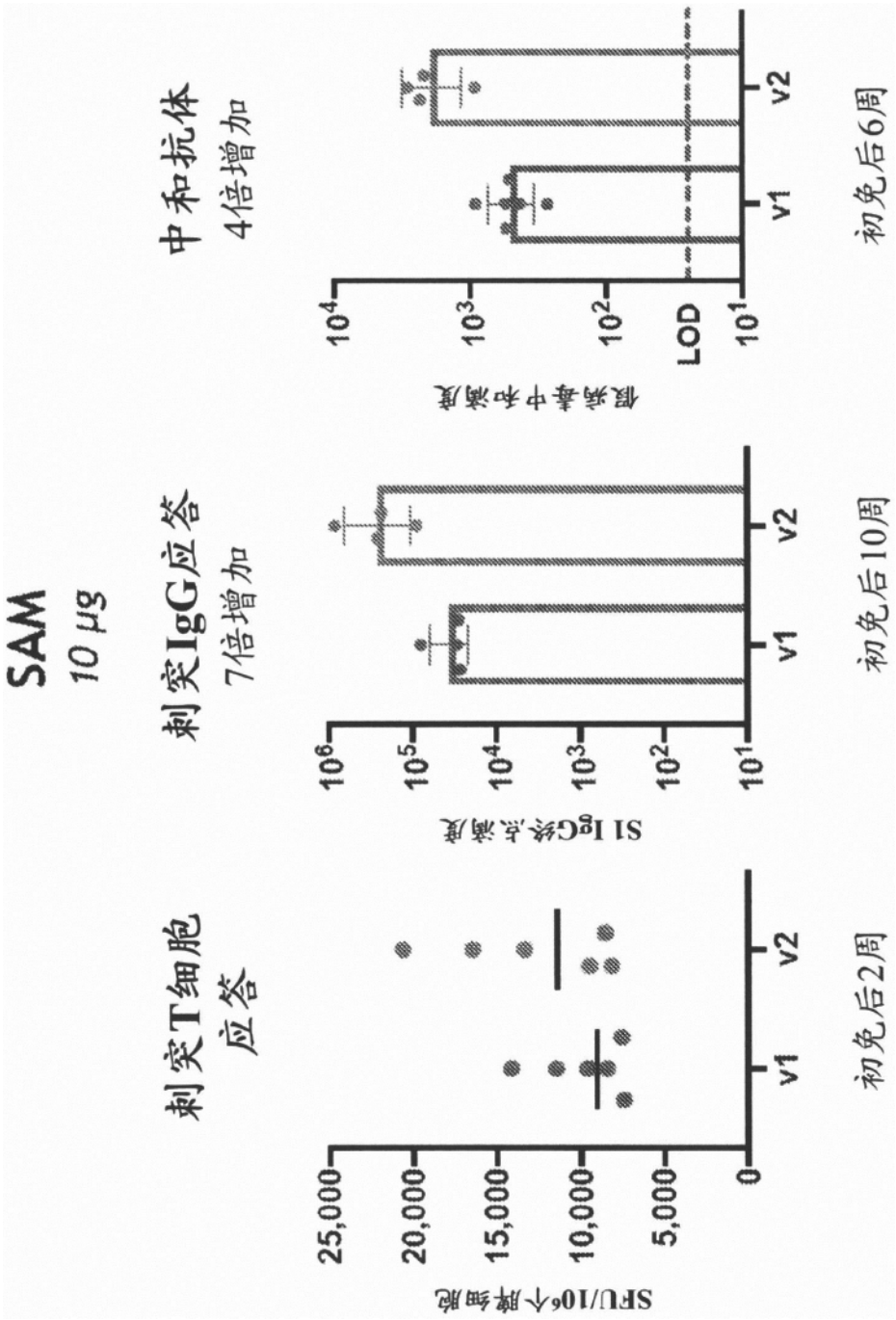

SAM
10 μg
刺突T细胞
应答
刺突IgG应答
7倍增加
中和抗体
4倍增加
SFU/10⁶个脾细胞
25,000
20,000
15,000
10,000
5,000
0
v1
v2
SI IgG终点滴度
10⁶
10⁵
10⁴
10³
10²
10¹
假病毒中和滴度
10⁴
10³
10²
LOD
10¹
初免后2周
初免后10周
初免后6周

图15B

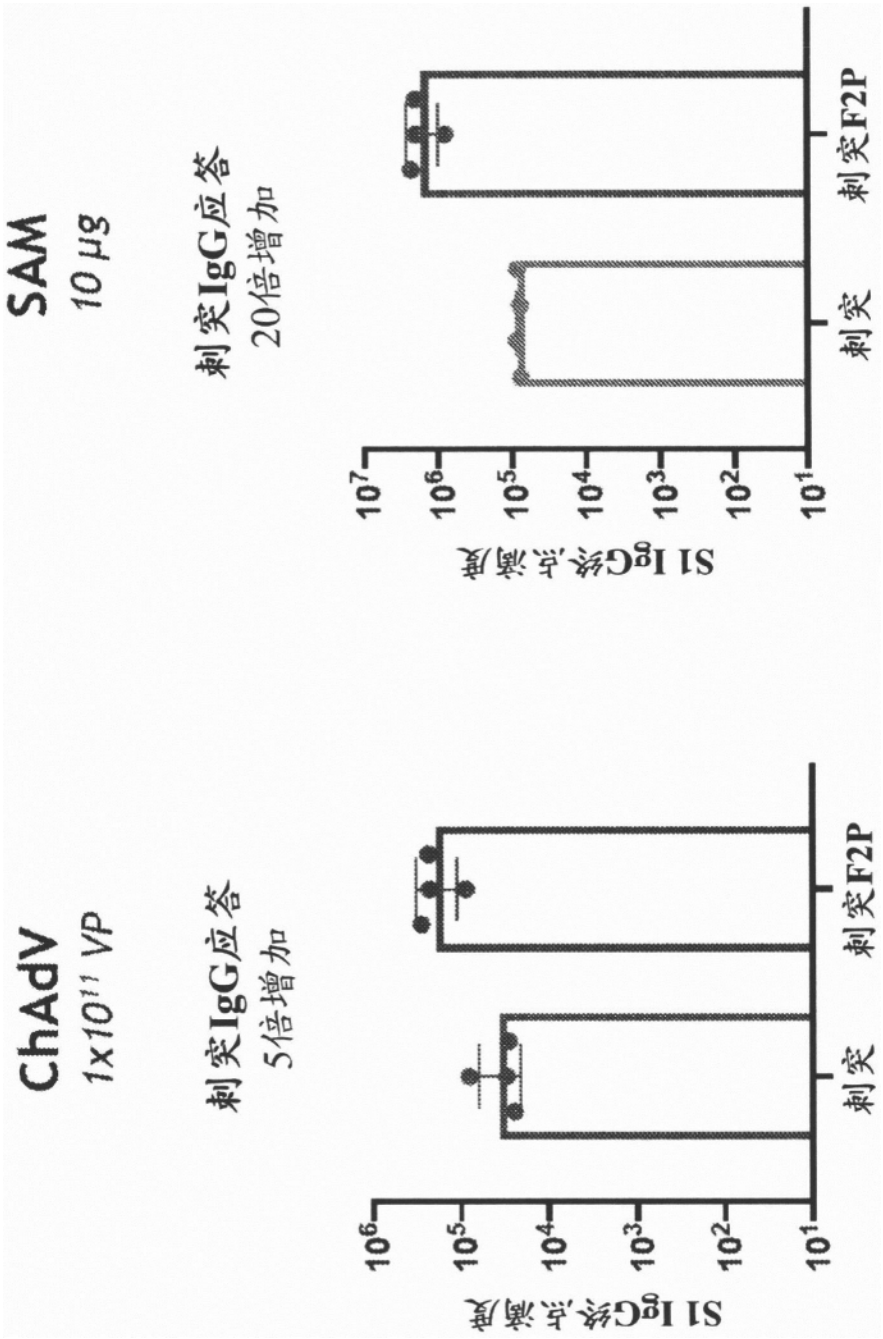

SAM
10 μg
刺突IgG应答
20倍增加
SI IgG终点滴度
刺突
刺突F2P
ChAdV
1x10^11 VP
刺突IgG应答
5倍增加
SI IgG终点滴度
刺突
刺突F2P

图16

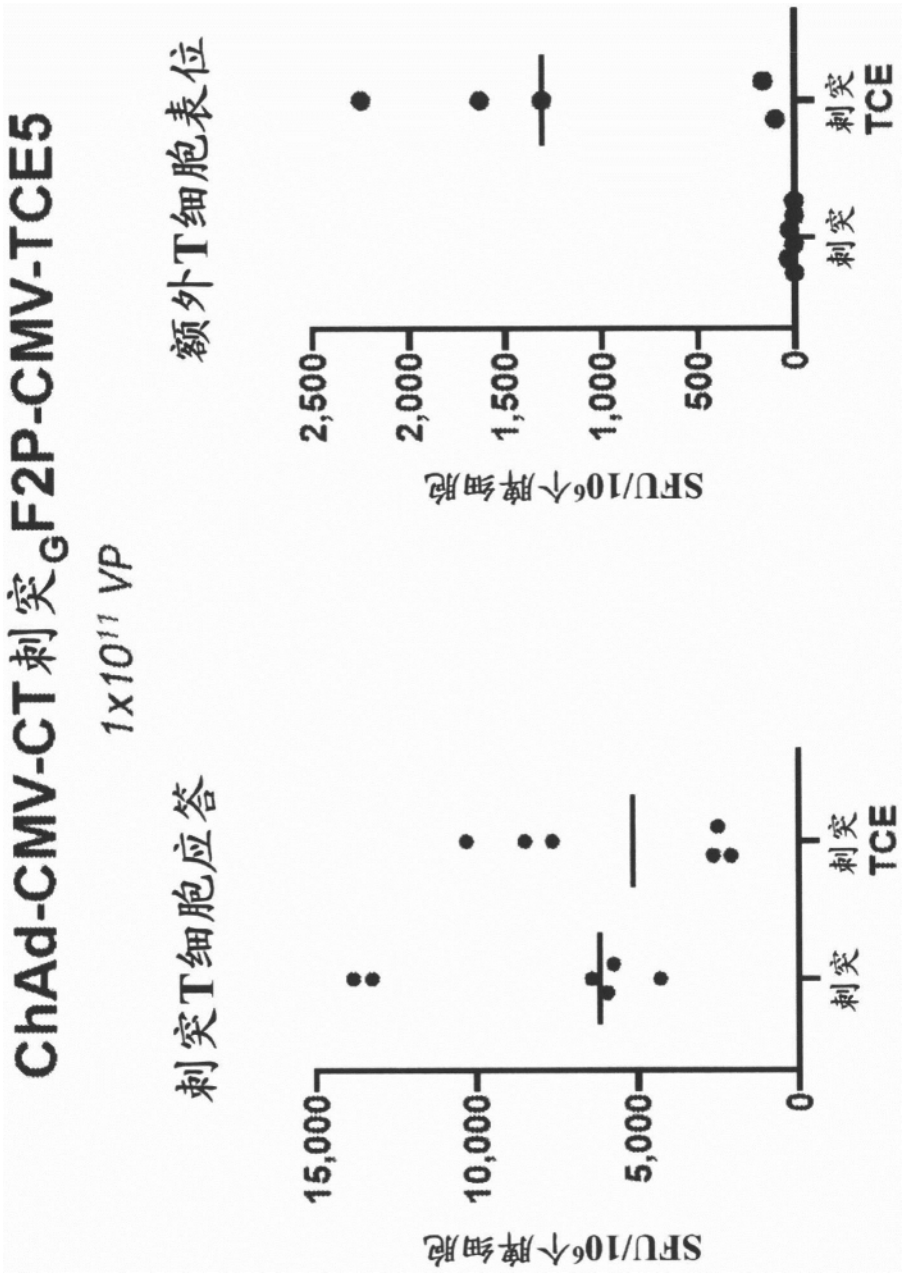

ChAd-CMV-CT刺突$_G$F2P-CMV-TCE5
1x10^{11} VP
刺突T细胞应答
额外T细胞表位
SFU/10^{6}个脾细胞
15,000
10,000
5,000
0
刺突
刺突
TCE
SFU/10^{6}个脾细胞
2,500
2,000
1,500
1,000
500
0
刺突
刺突
TCE

图17A

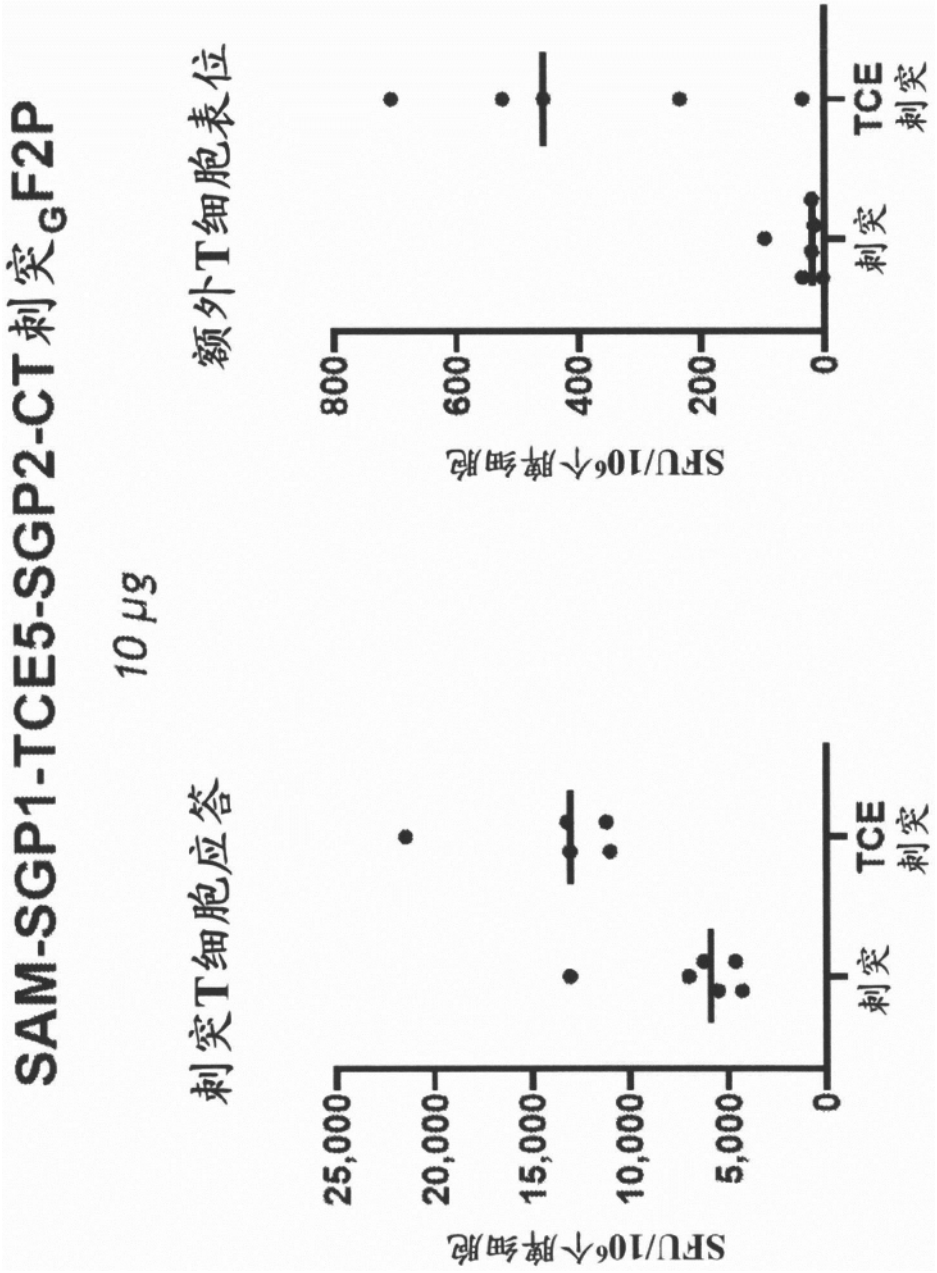

SAM-SGP1-TCE5-SGP2-CT刺突GF2P
10 μg
刺突T细胞应答
SFU/10⁶个脾细胞
25,000
20,000
15,000
10,000
5,000
0
刺突
TCE
刺突
额外T细胞表位
SFU/10⁶个脾细胞
800
600
400
200
0
刺突
TCE
刺突

图17B

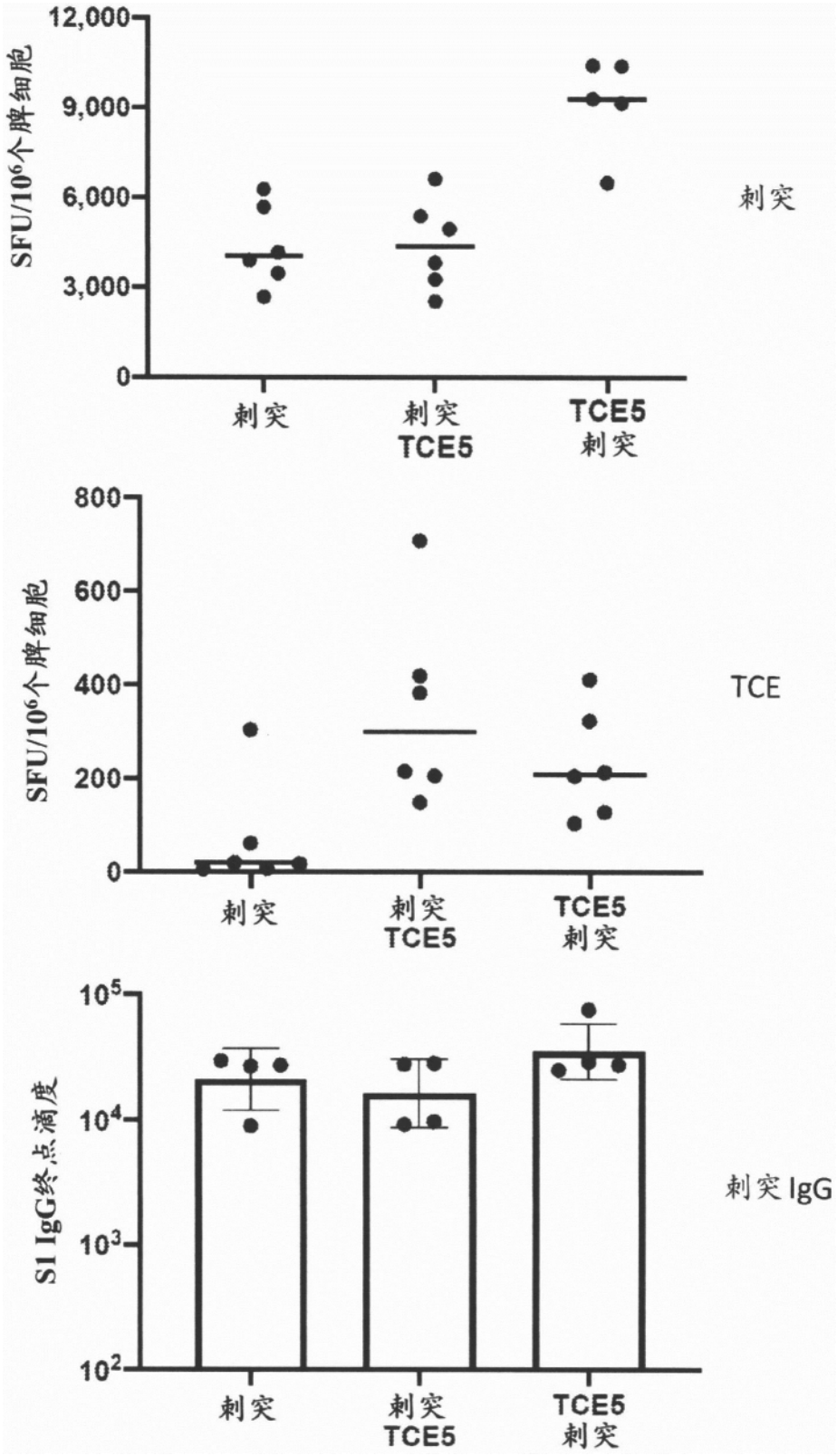

12,000
9,000
6,000
3,000
0
SFU/10⁶个脾细胞
刺突
刺突
TCE5
TCE5
刺突
刺突
800
600
400
200
0
SFU/10⁶个脾细胞
TCE
刺突
刺突
TCE5
TCE5
刺突
10⁵
10⁴
10³
10²
S1 IgG终点滴度
刺突 IgG
刺突
刺突
TCE5
TCE5
刺突

图18A

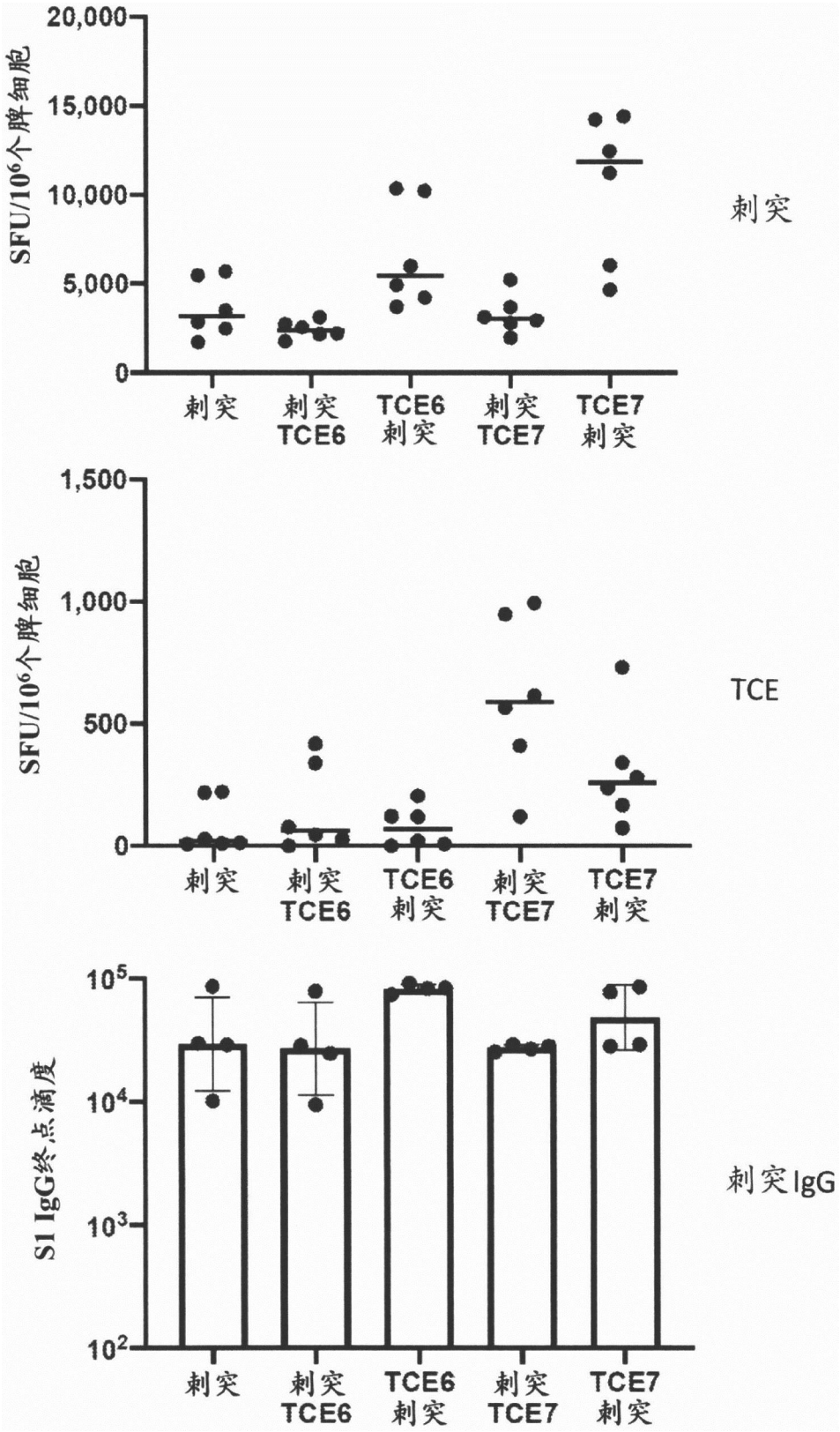

SFU/10⁶个脾细胞
20,000
15,000
10,000
5,000
0
刺突
刺突
刺突 TCE6
TCE6 刺突
刺突 TCE7
TCE7 刺突
SFU/10⁶个脾细胞
1,500
1,000
500
0
TCE
S1 IgG终点滴度
10⁵
10⁴
10³
10²
刺突IgG

图18B

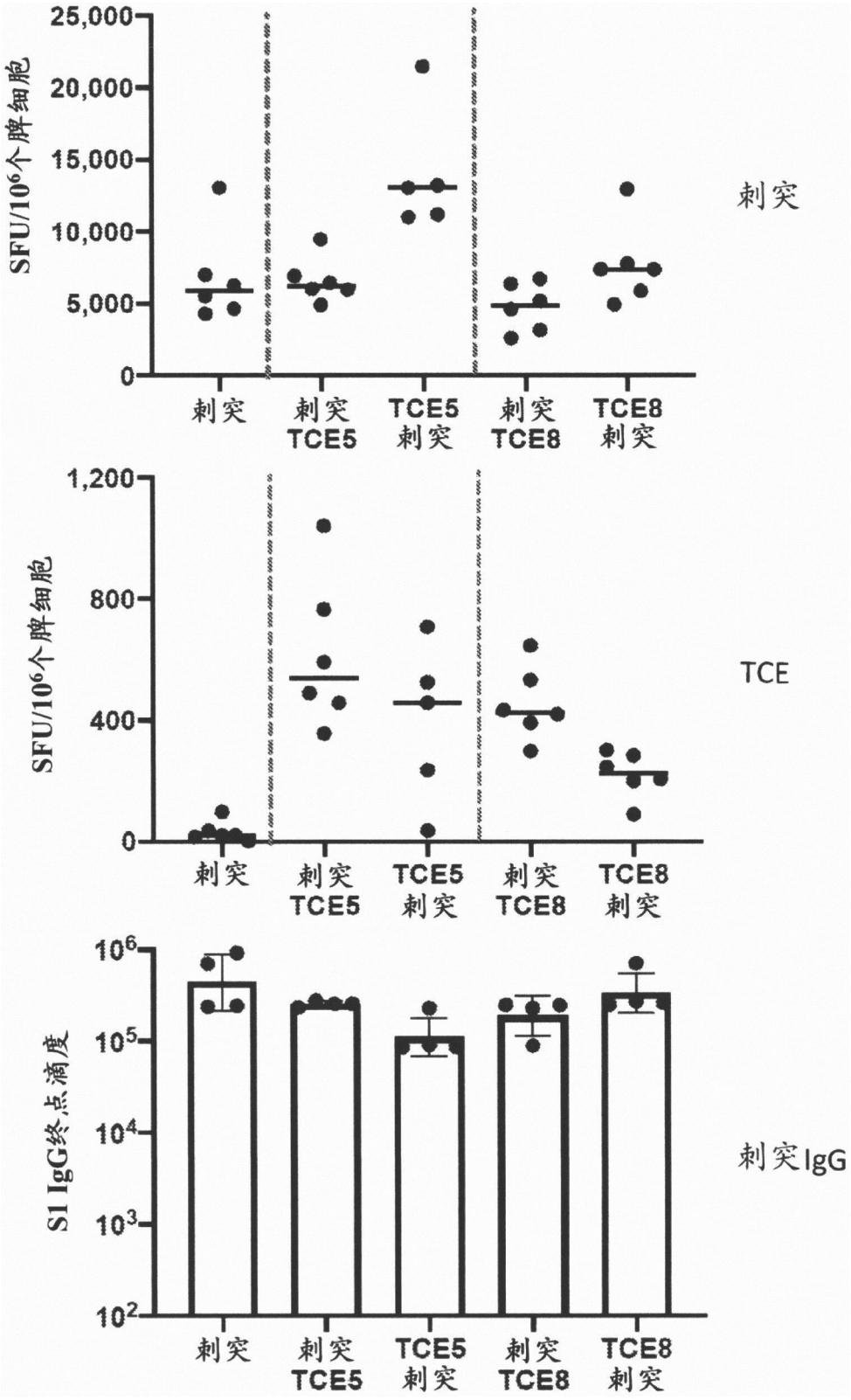

SFU/10⁶个脾细胞
25,000
20,000
15,000
10,000
5,000
0
刺突
刺突 TCE5
TCE5 刺突
刺突 TCE8
TCE8 刺突
刺突
SFU/10⁶个脾细胞
1,200
800
400
0
刺突
刺突 TCE5
TCE5 刺突
刺突 TCE8
TCE8 刺突
TCE
S1 IgG终点滴度
10⁶
10⁵
10⁴
10³
10²
刺突
刺突 TCE5
TCE5 刺突
刺突 TCE8
TCE8 刺突
刺突IgG

图18C

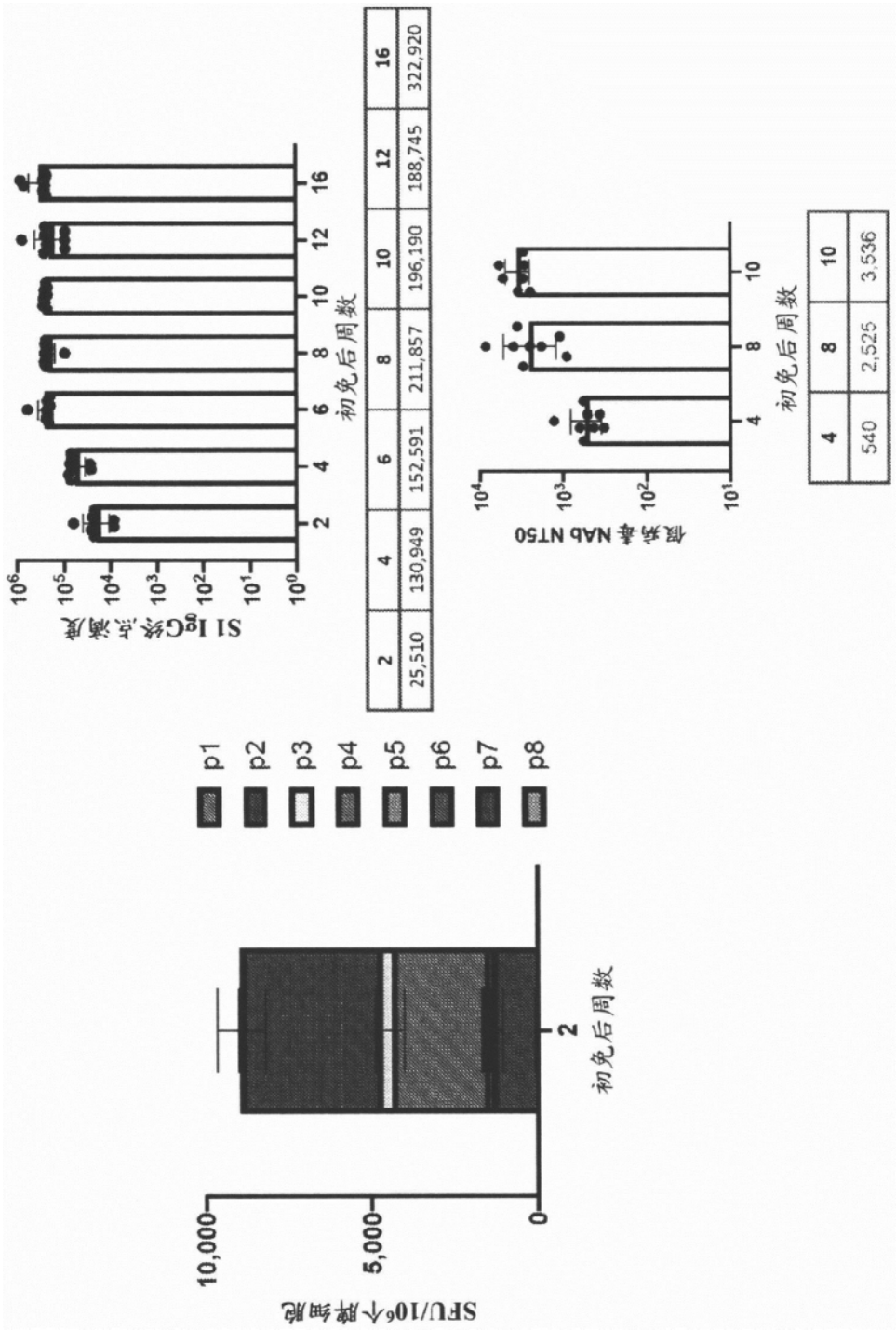

SFU/10⁶个脾细胞
10,000
5,000
0
2
初免后周数
p1
p2
p3
p4
p5
p6
p7
p8
SI IgG终点滴度
初免后周数
2 4 6 8 10 12 16
2 4 6 8 10 12 16
25,510 130,949 152,591 211,857 196,190 188,745 322,920
病毒 NAb NT50
初免后周数
4 8 10
540 2,525 3,536

图19A

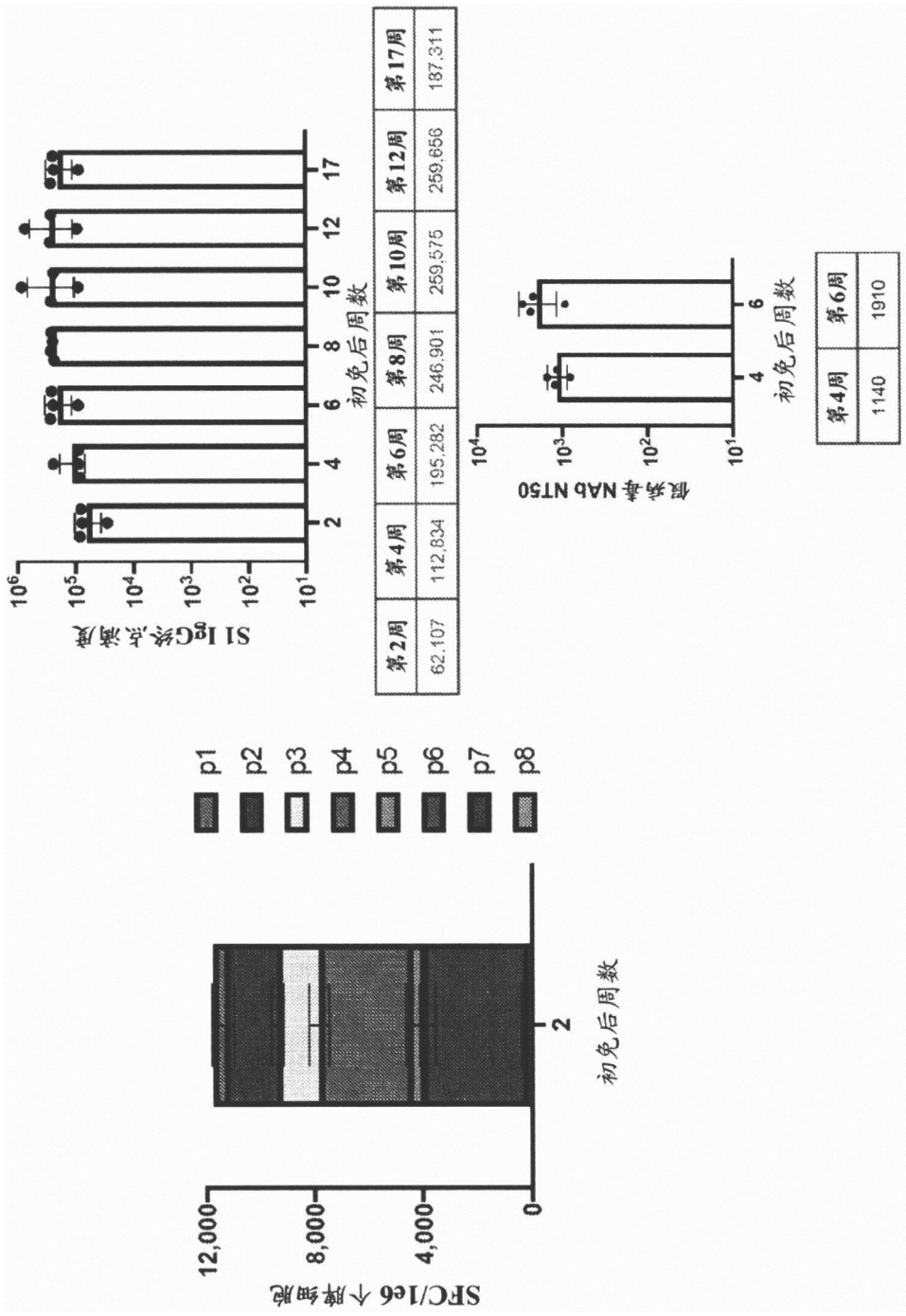

SI IgG终点滴度
初免后周数
第2周 62,107
第4周 112,834
第6周 195,282
第8周 246,901
第10周 259,575
第12周 259,656
第17周 187,311
假病毒 NAb NT50
初免后周数
第4周 1140
第6周 1910
p1
p2
p3
p4
p5
p6
p7
p8
SFC/1e6 个脾细胞
初免后周数

图19B

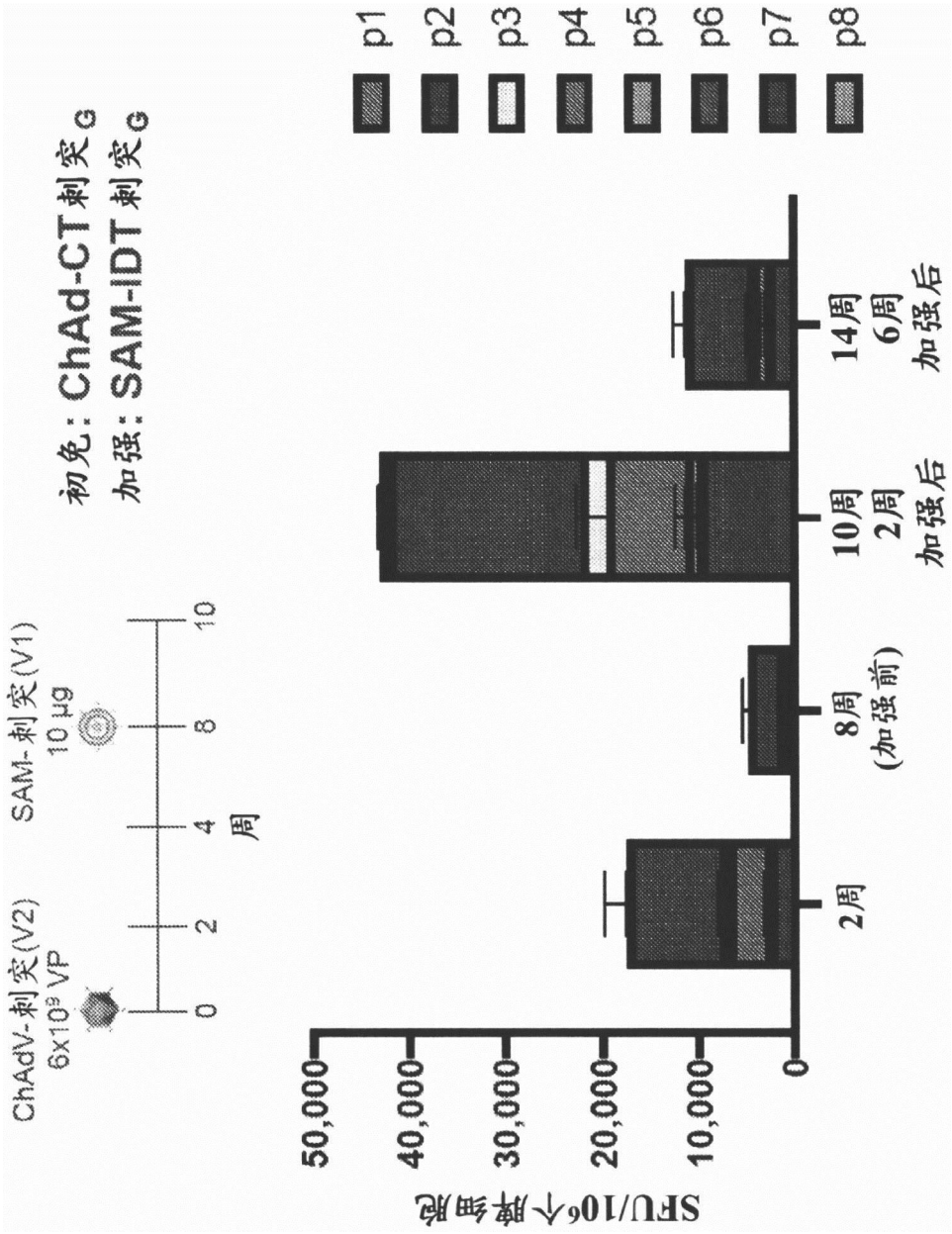
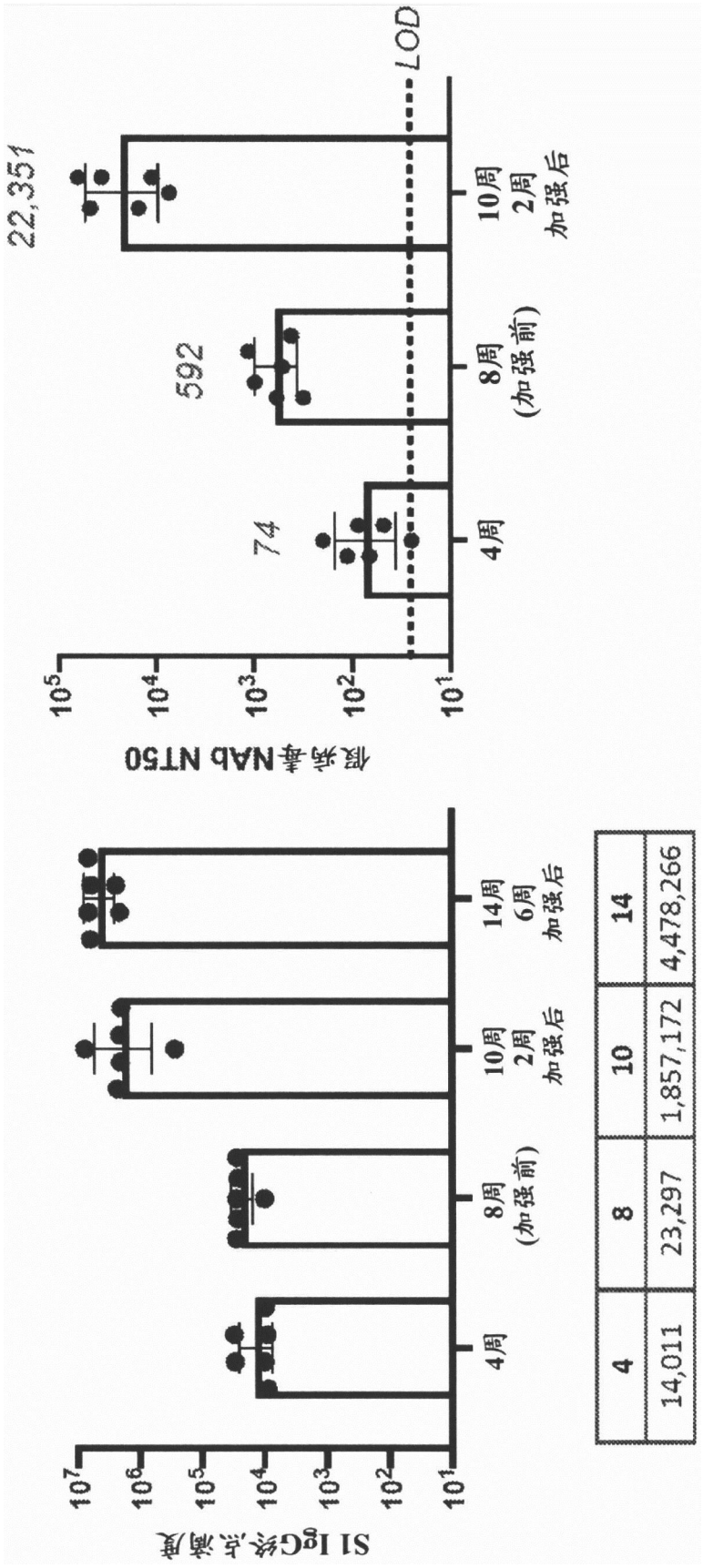

初免：ChAd-CT刺突G
加强：SAM-IDT刺突G
p1
p2
p3
p4
p5
p6
p7
p8
ChAdV-刺突(V2)
6x10⁹ VP
SAM-刺突(V1)
10 μg
0
2
4
8
10
周
50,000
40,000
30,000
20,000
10,000
0
SFU/10⁶个脾细胞
2周
8周
(加强前)
10周
2周
加强后
14周
6周
加强后

图20A



4	8	10	14
14,011	23,297	1,857,172	4,478,266

图20B

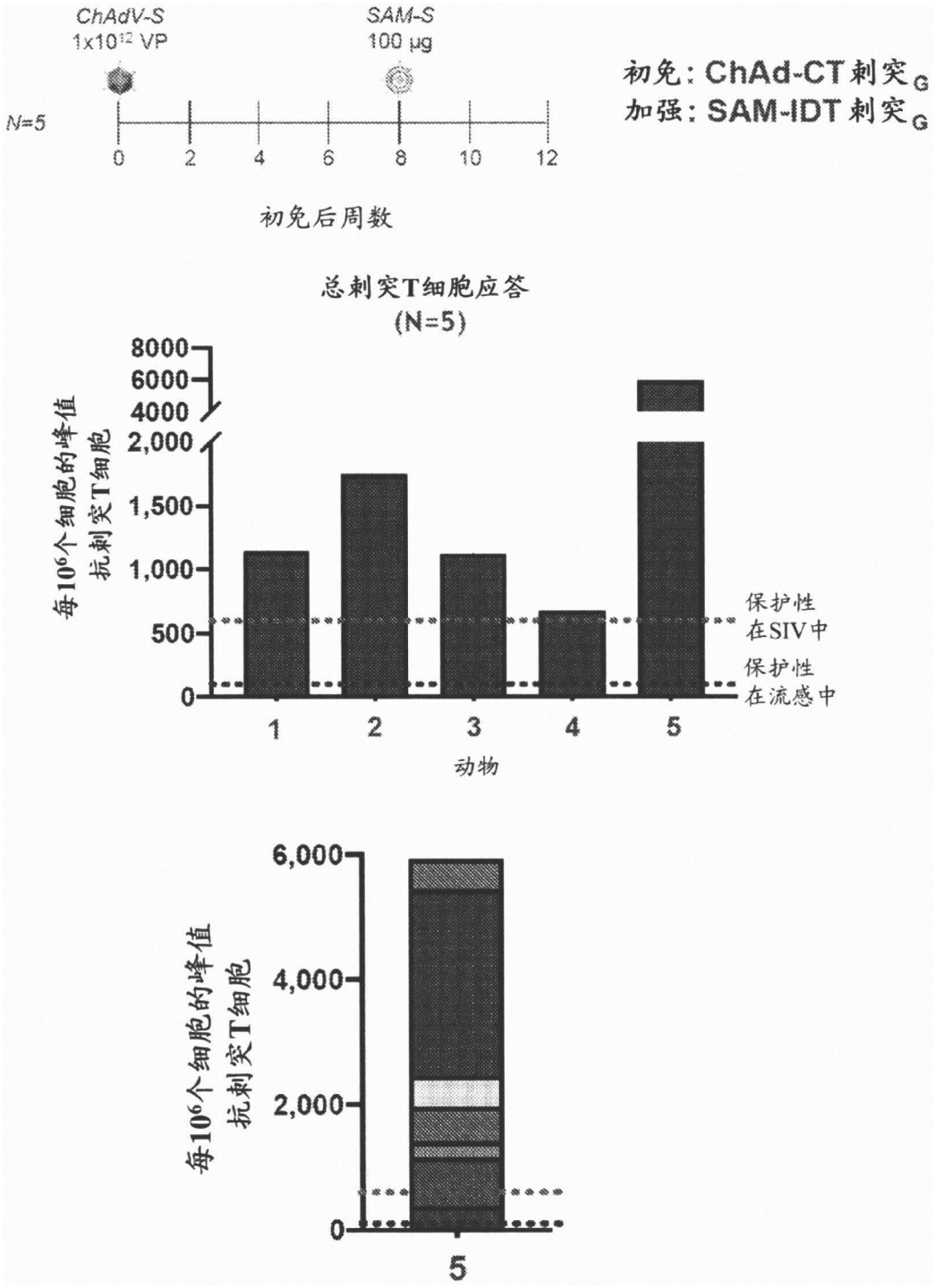

ChAdV-S
1x10^12 VP
SAM-S
100 µg
N=5
0
2
4
6
8
10
12
初免后周数
初免: ChAd-CT刺突G
加强: SAM-IDT刺突G
总刺突T细胞应答
(N=5)
每10^6个细胞的峰值
抗刺突T细胞
8000
6000
4000
2,000
1,500
1,000
500
0
保护性
在SIV中
保护性
在流感中
1
2
3
4
5
动物
6,000
4,000
2,000
0
5

图21A

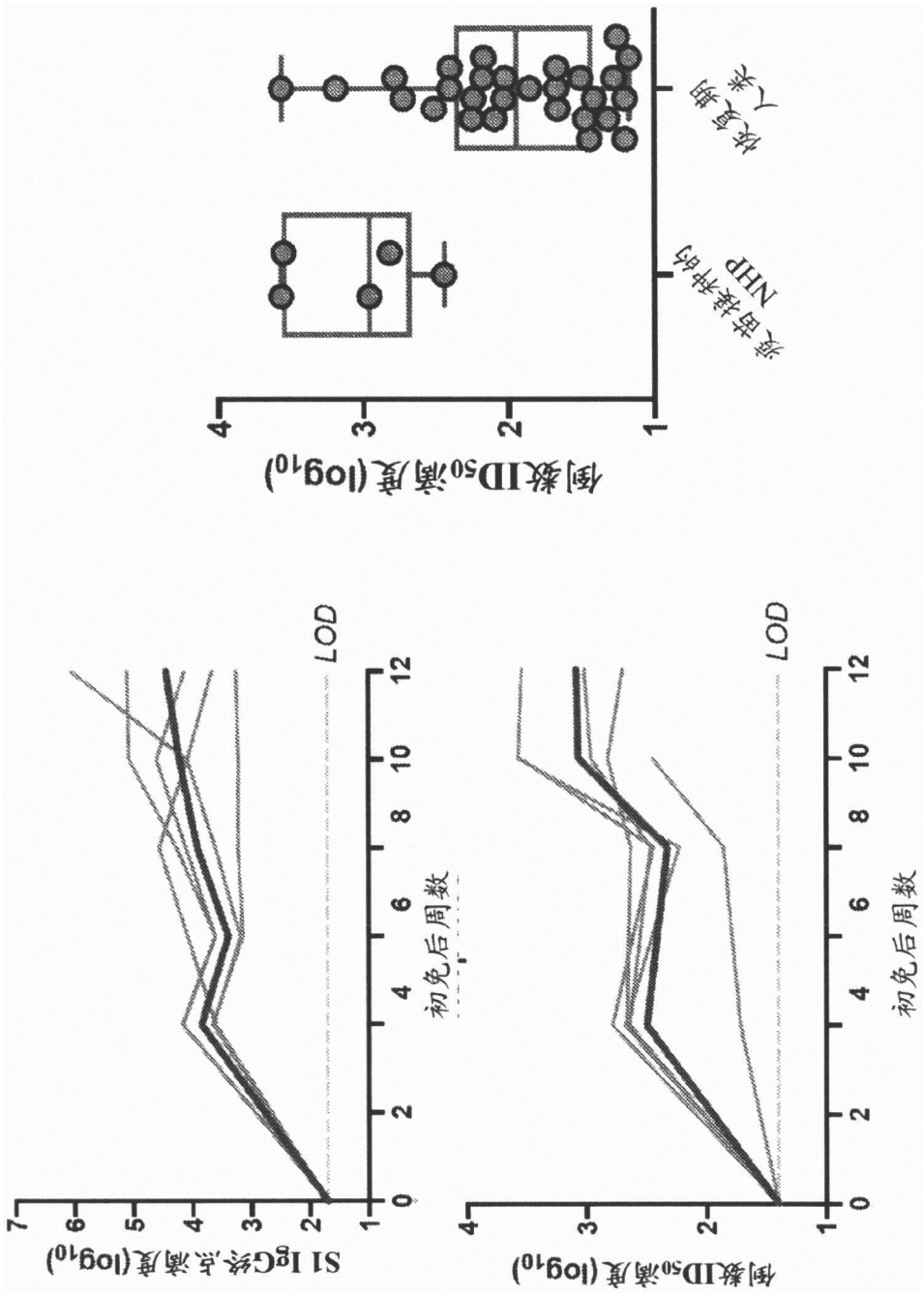

倒数ID50滴度(log10)
疫苗接种的NHP
攻毒后
个体
SI IgG终点滴度(log10)
初免后周数
LOD
倒数ID50滴度(log10)
初免后周数
LOD

图21B

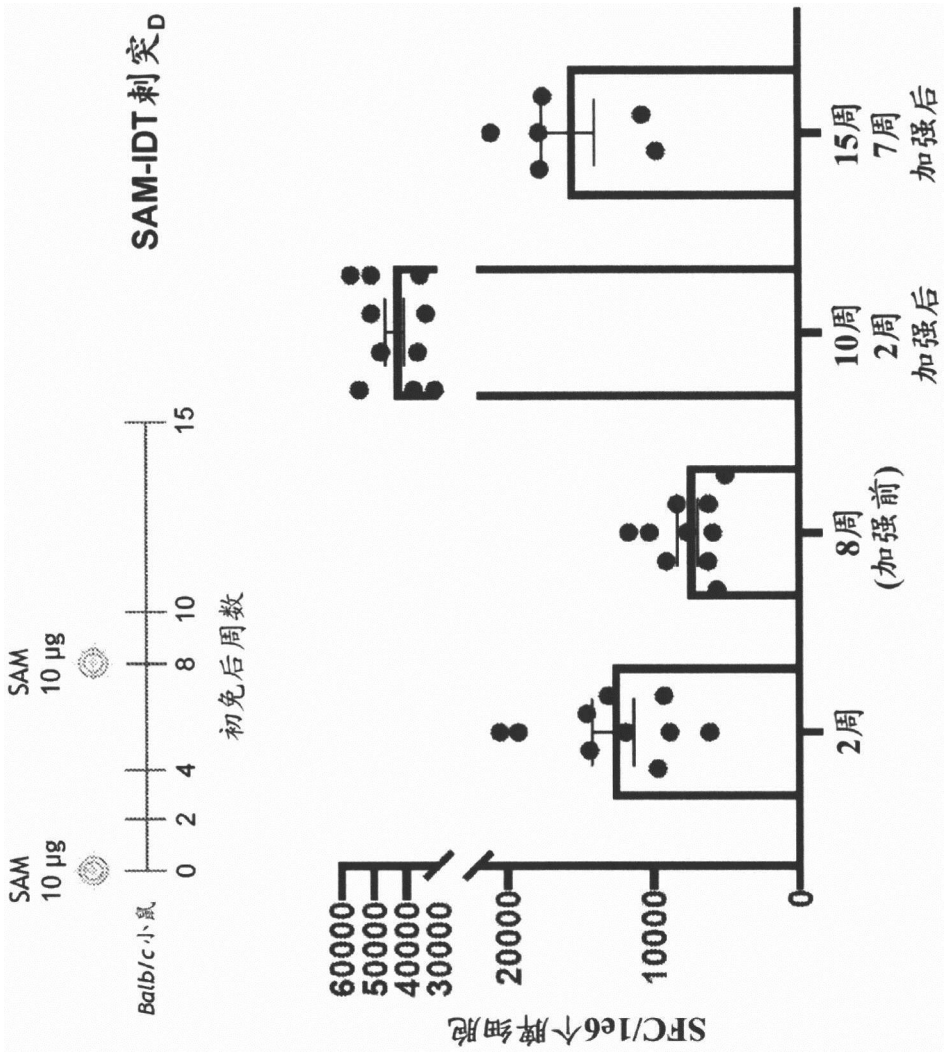
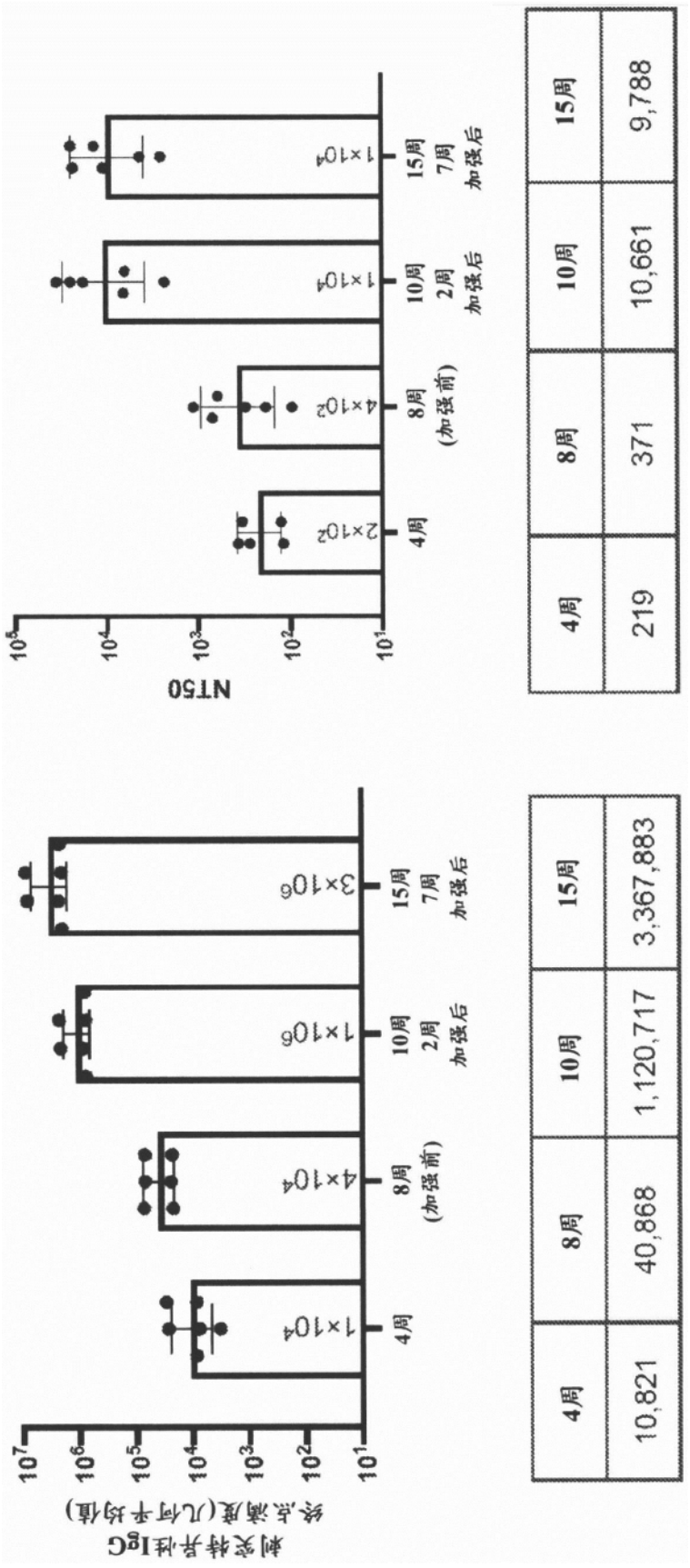

SAM-IDT刺突D
SAM
10 μg
SAM
10 μg
Balb/c小鼠
0 2 4 8 10 15
初免后周数
SFC/1e6个脾细胞
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
2周
8周
(加强前)
10周
2周
加强后
15周
7周
加强后

图22A



4周	8周	10周	15周
219	371	10,661	9,788

4周	8周	10周	15周
10,821	40,868	1,120,717	3,367,883

图22B

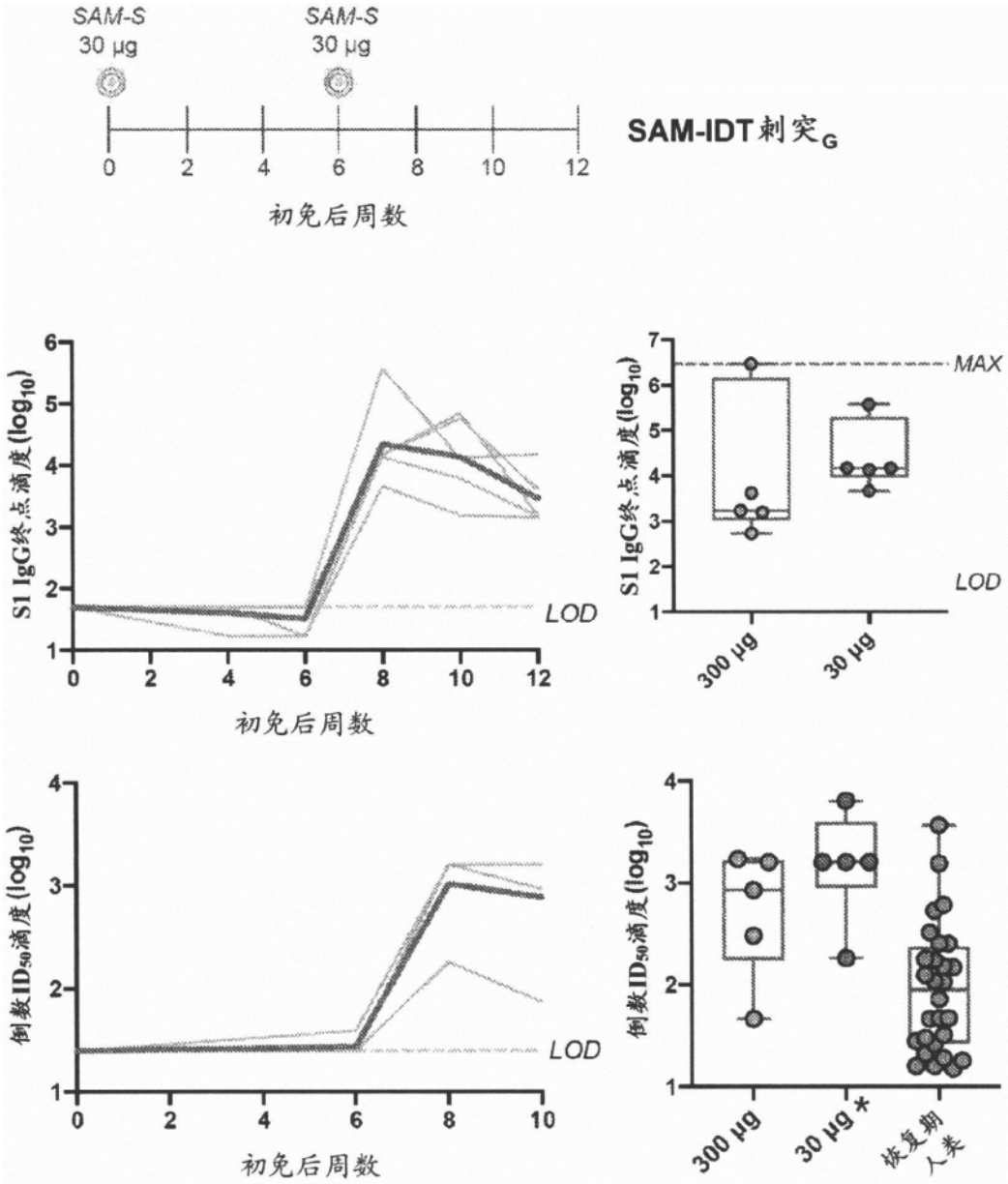

SAM-S
30 μg
SAM-S
30 μg
0 2 4 6 8 10 12
初免后周数
SAM-IDT刺突G
S1 IgG终点滴度(log10)
LOD
初免后周数
MAX
LOD
300 μg
30 μg
倒数ID50滴度(log10)
LOD
初免后周数
300 μg
30 μg *
恢复期人类

图23

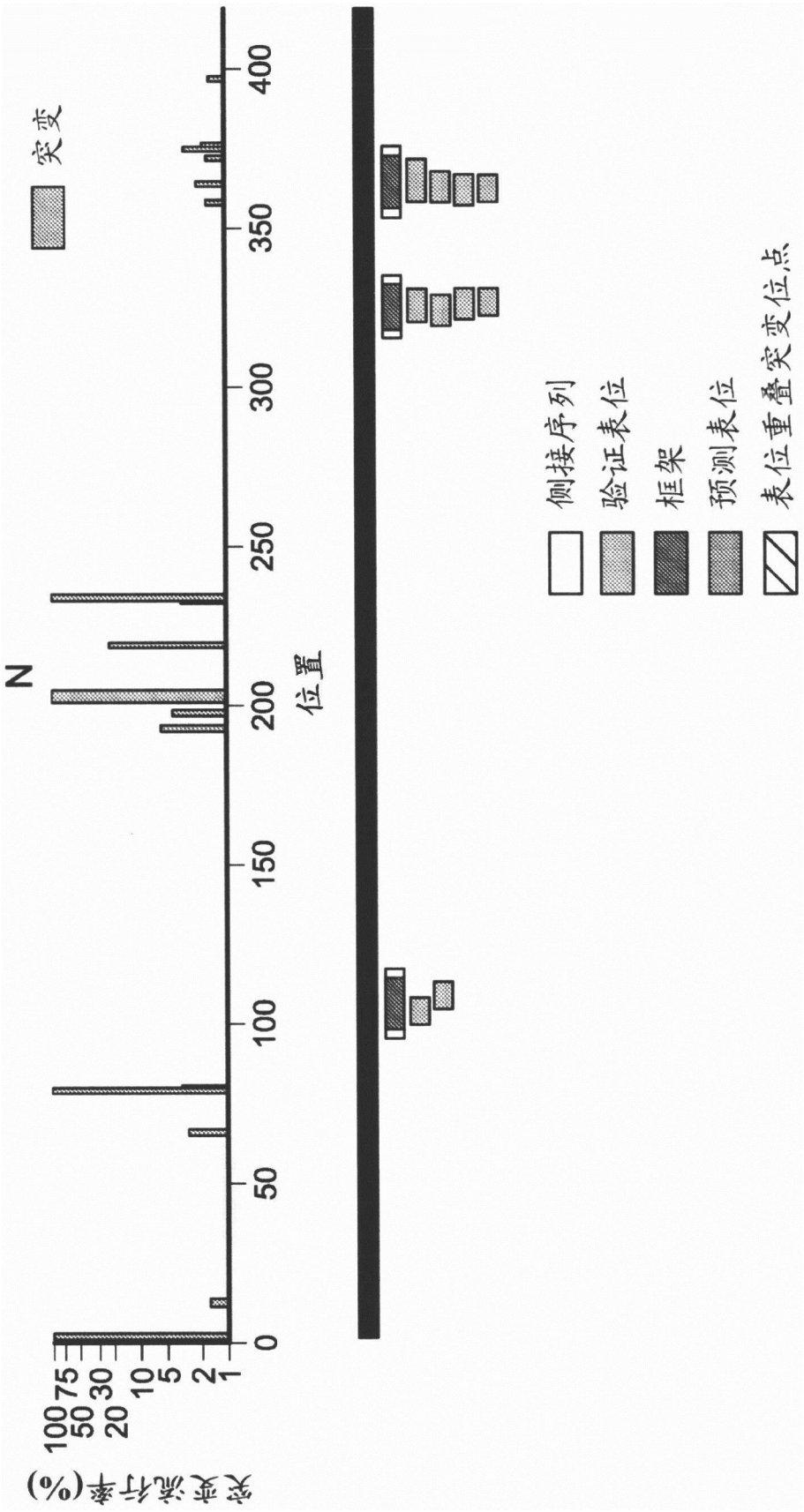

突变
N
位置
0
50
100
150
200
250
300
350
400
突变流行率(%)
100
75
50
30
20
10
5
2
1
侧接序列
验证表位
框架
预测表位
表位重叠突变位点

图24A

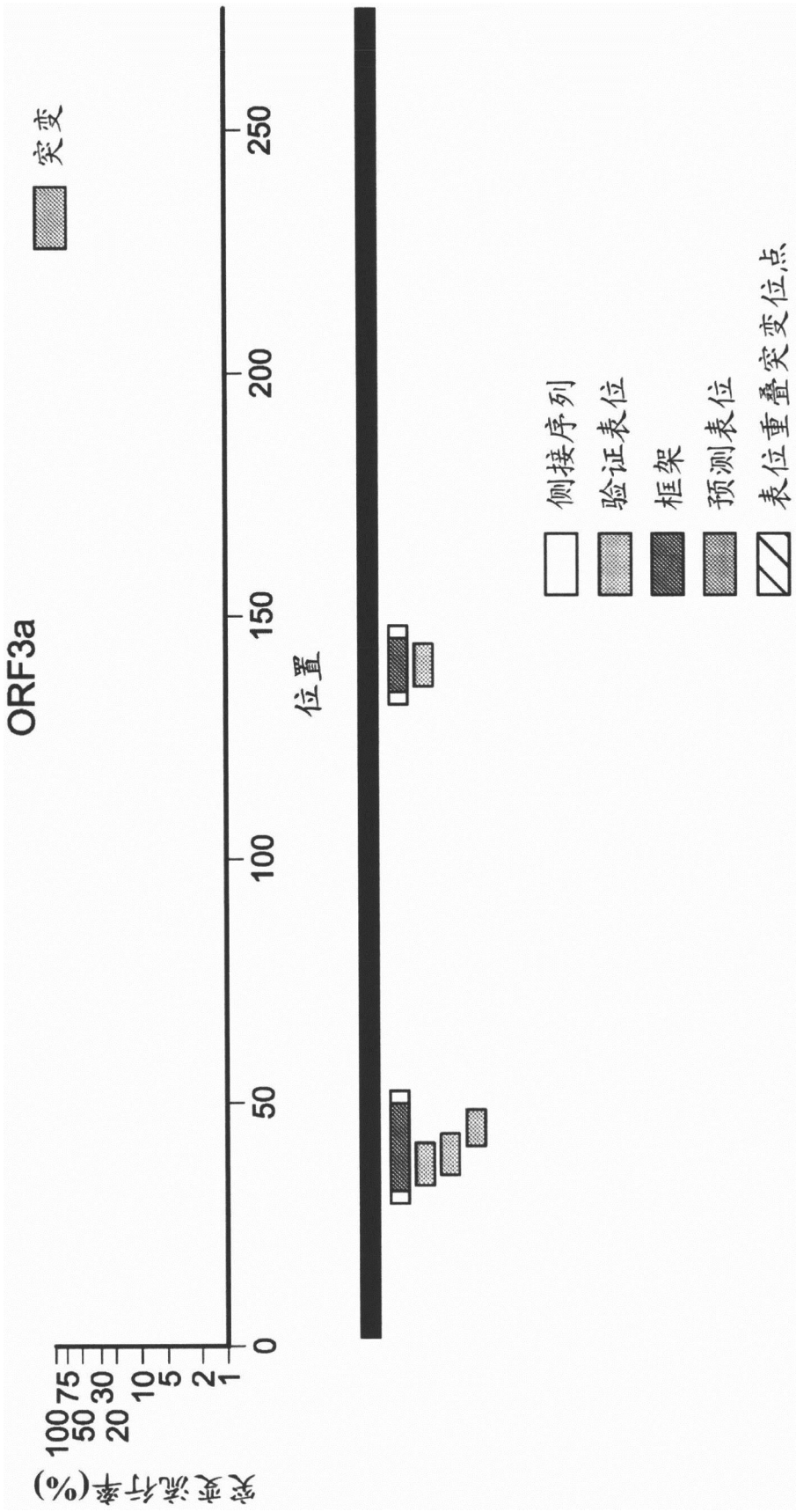

ORF3a
突变
位置
0
50
100
150
200
250
突变流行率(%)
100
75
50
30
20
10
5
2
1
侧接序列
验证表位
框架
预测表位
表位重叠突变位点

图24B

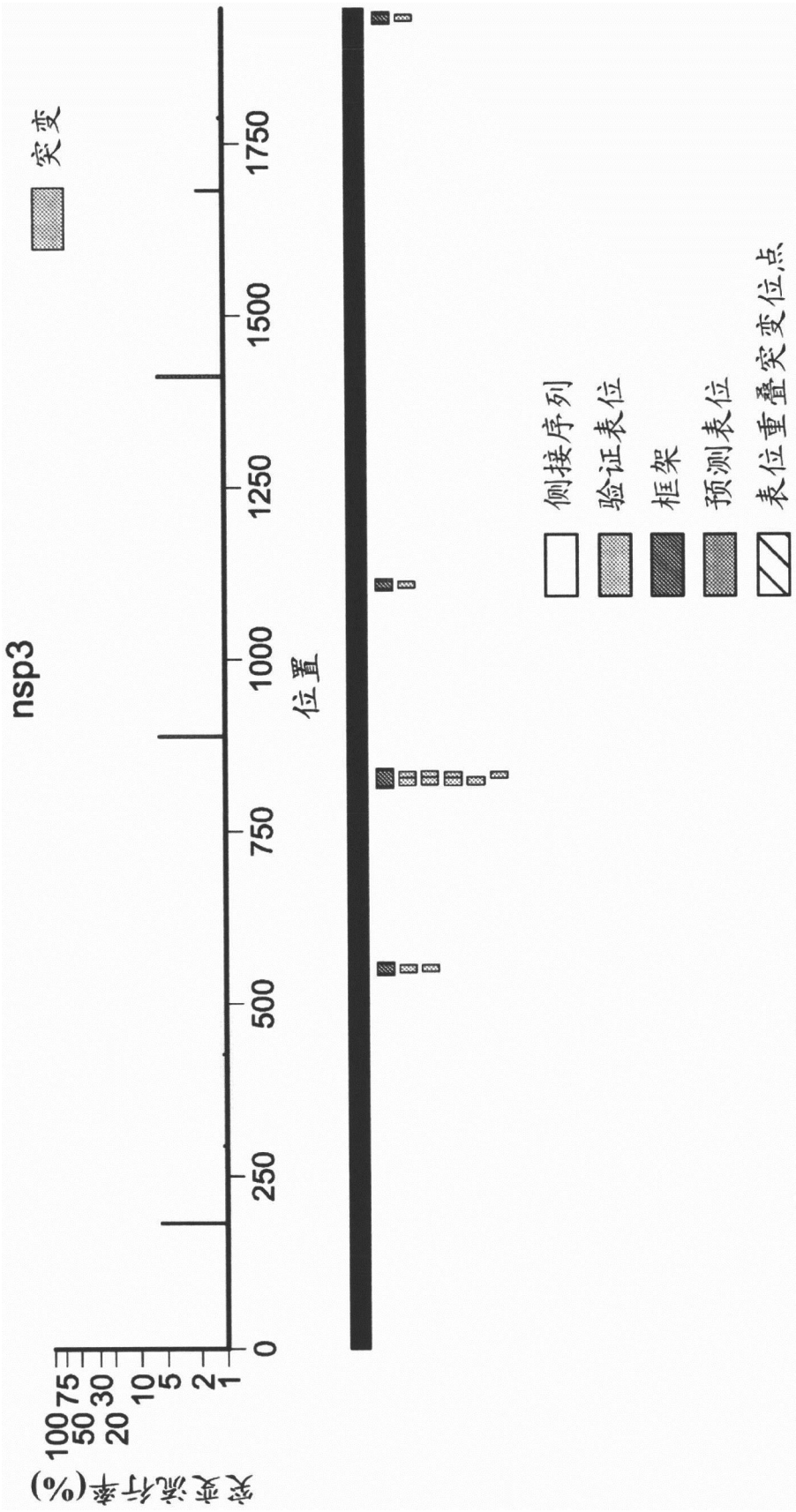

突变
nsp3
位置
0
250
500
750
1000
1250
1500
1750
突变允许率(%)
100
75
50
30
20
10
5
2
1
侧接序列
验证表位
框架
预测表位
表位重叠突变位点

图24C

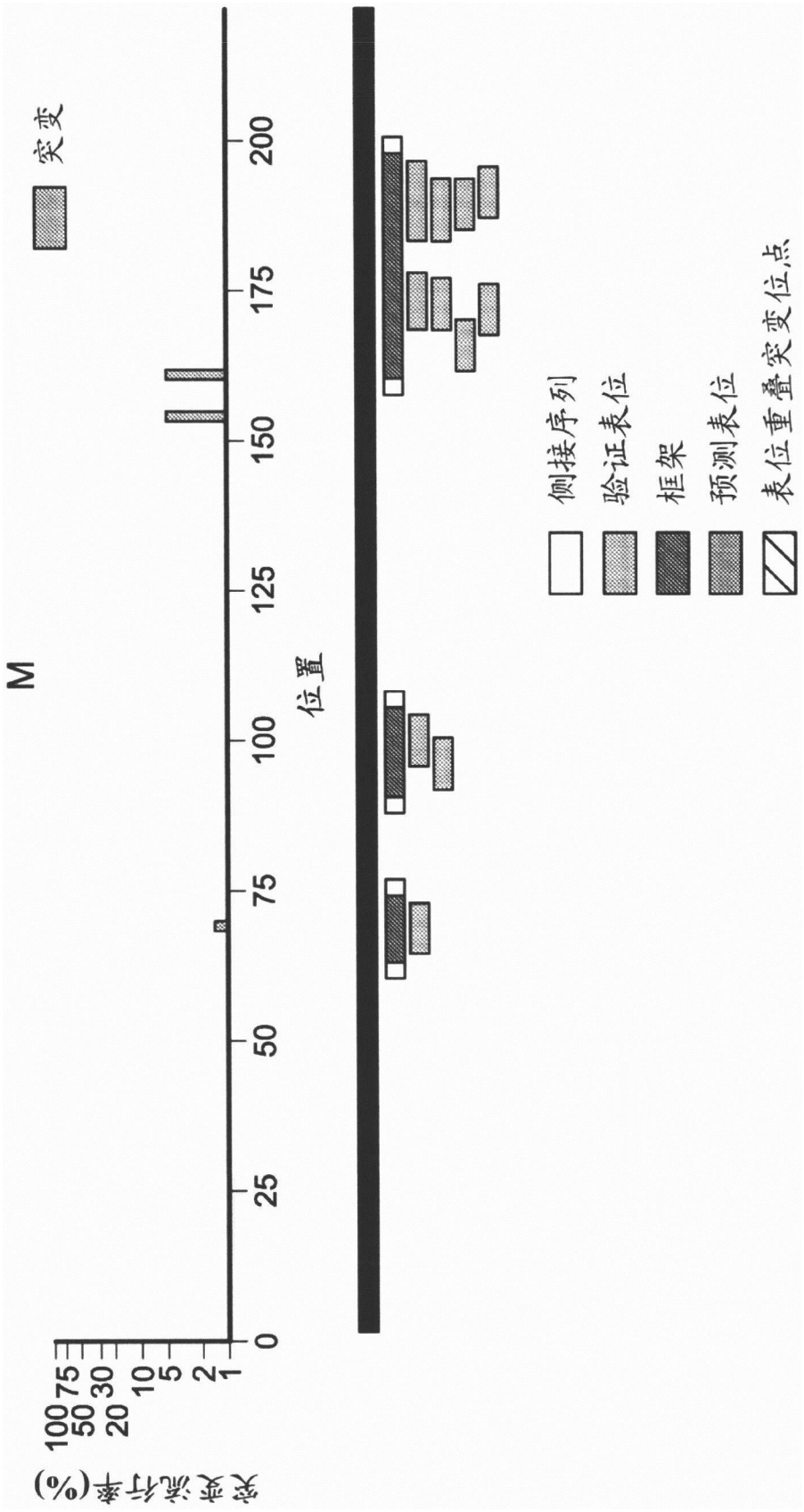

突变
M
位置
0
25
50
75
100
125
150
175
200
1
2
5
10
20
30
50
75
100
突变流行率(%)
侧接序列
验证表位
框架
预测表位
表位重叠突变位点

图24D

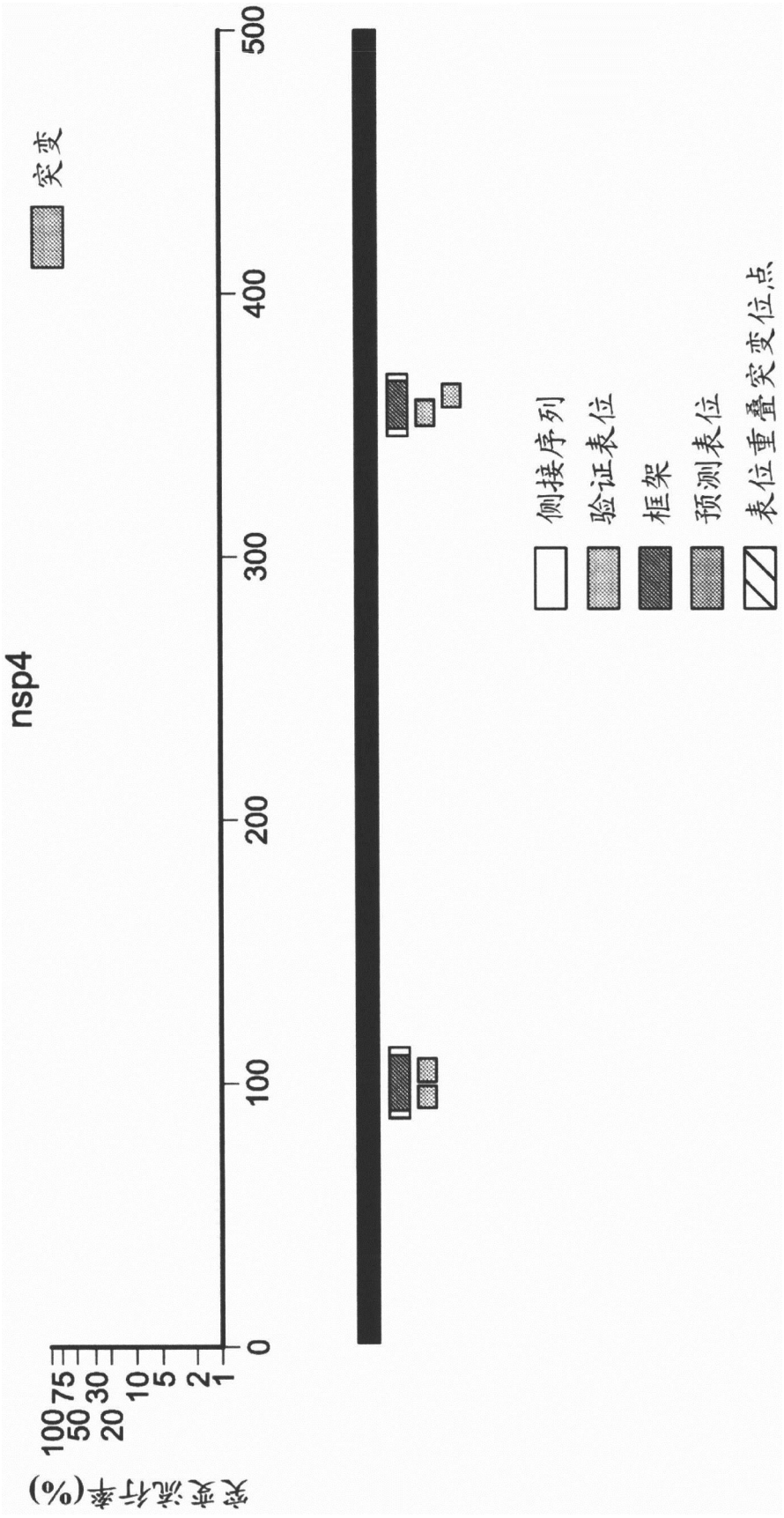

突变
nsp4
500
400
300
200
100
0
侧接序列
验证表位
框架
预测表位
表位重叠突变位点
突变流行率(%)
100
75
50
30
20
10
5
2
1

图24E

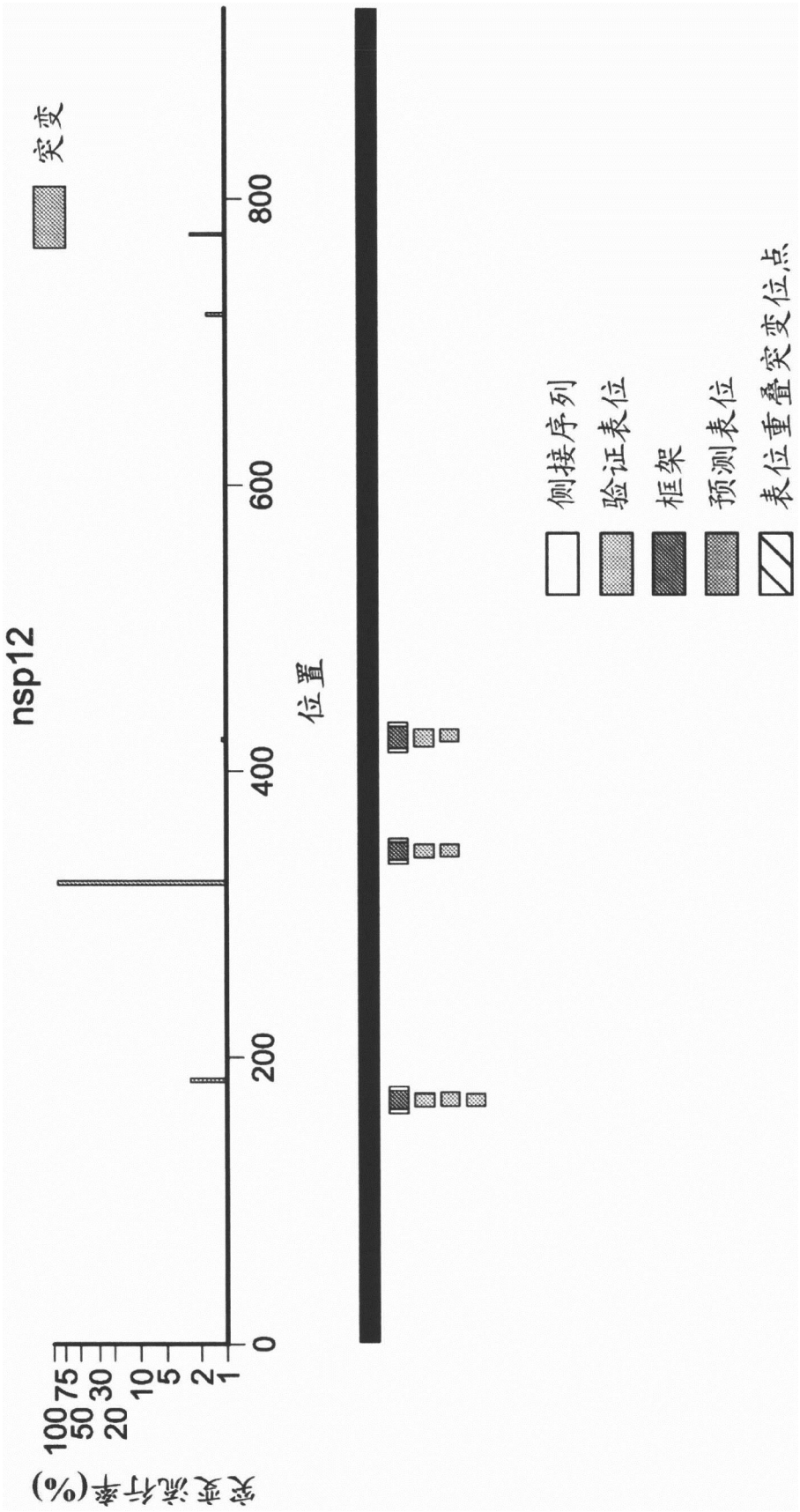

突变
nsp12
位置
0
200
400
600
800
突变允许率(%)
100
75
50
30
20
10
5
2
1
侧接序列
验证表位
框架
预测表位
表位重叠突变位点

图24F

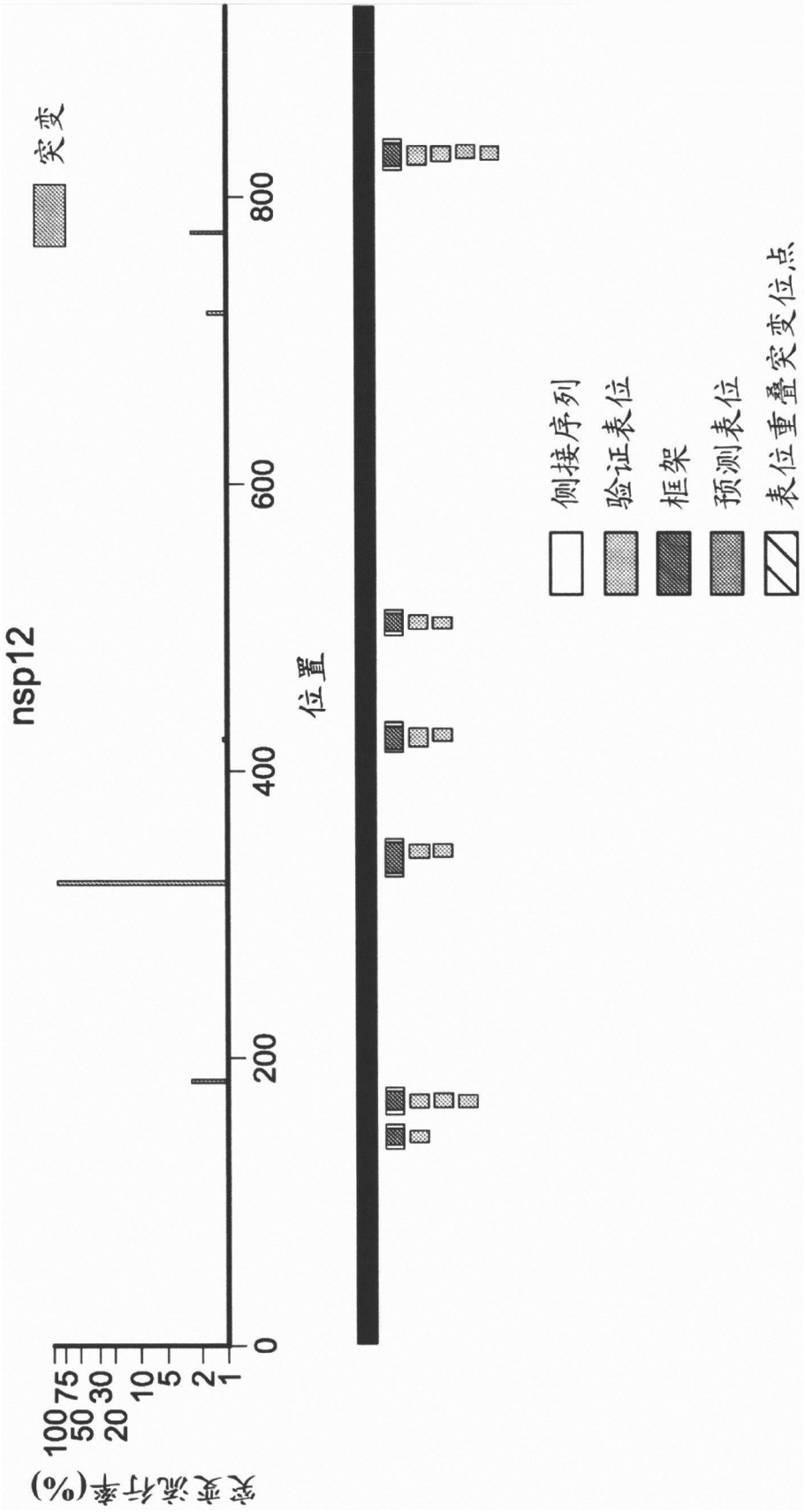

突变
nsp12
位置
0
200
400
600
800
突变流行率(%)
100
75
50
30
20
10
5
2
1
侧接序列
验证表位
框架
预测表位
表位重叠突变位点

图25A

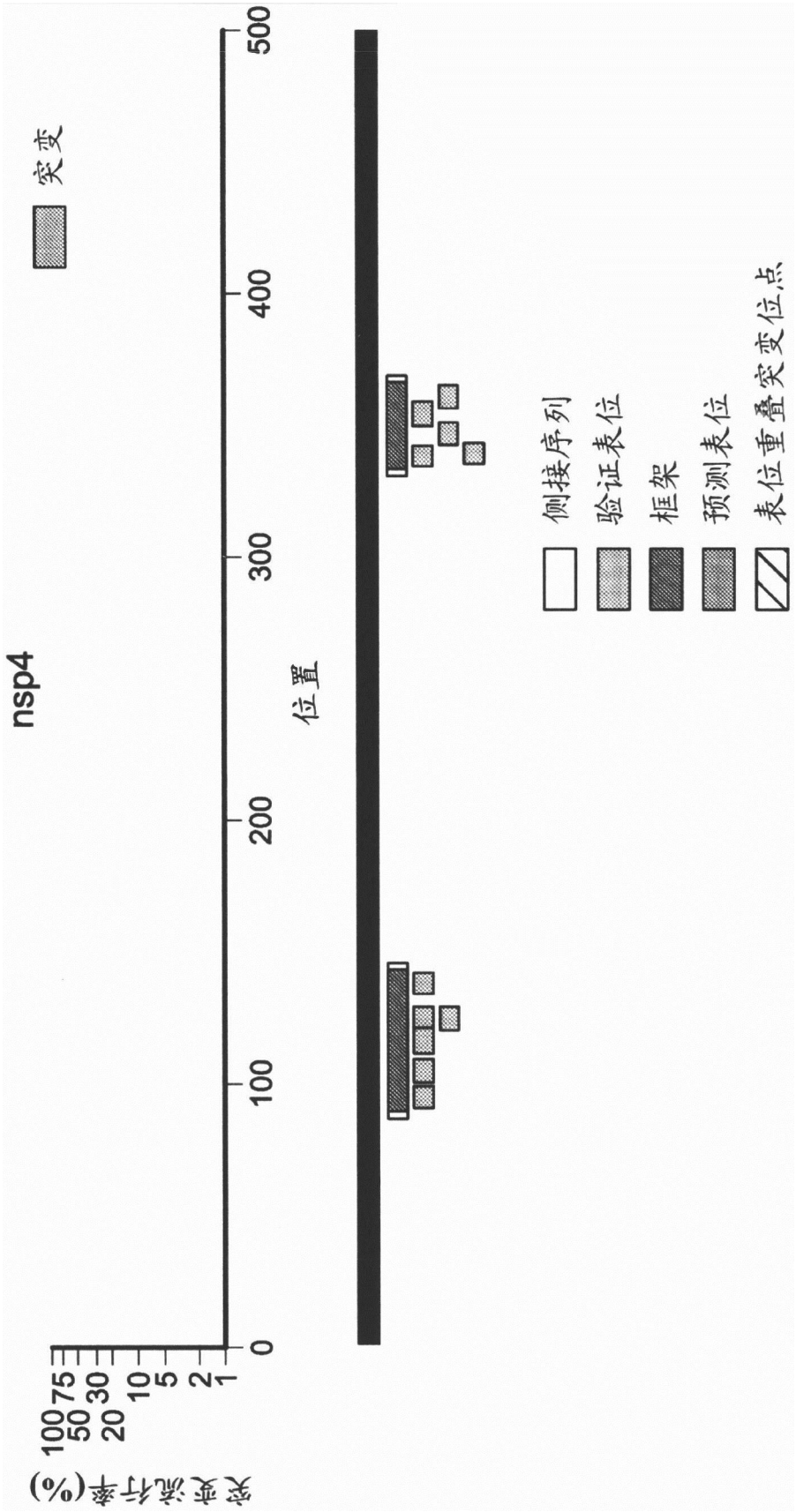

突变
nsp4
位置
0
100
200
300
400
500
突变流行率(%)
100
75
50
30
20
10
5
2
1
侧接序列
验证表位
框架
预测表位
表位重叠突变位点

图25B

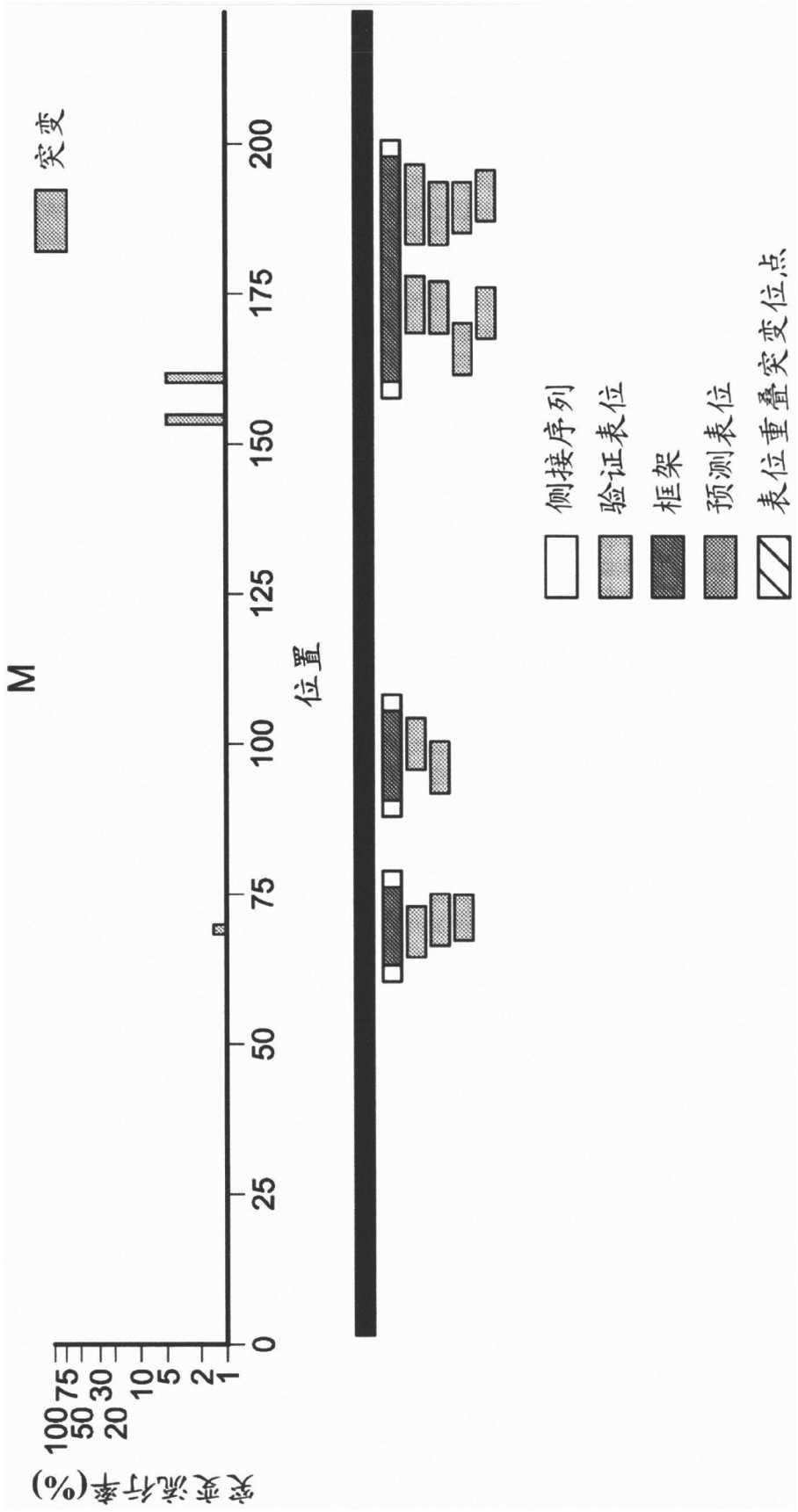

突变
M
位置
0
25
50
75
100
125
150
175
200
突变流行率(%)
100
75
50
30
20
10
5
2
1
侧接序列
验证表位
框架
预测表位
表位重叠突变位点

图25C

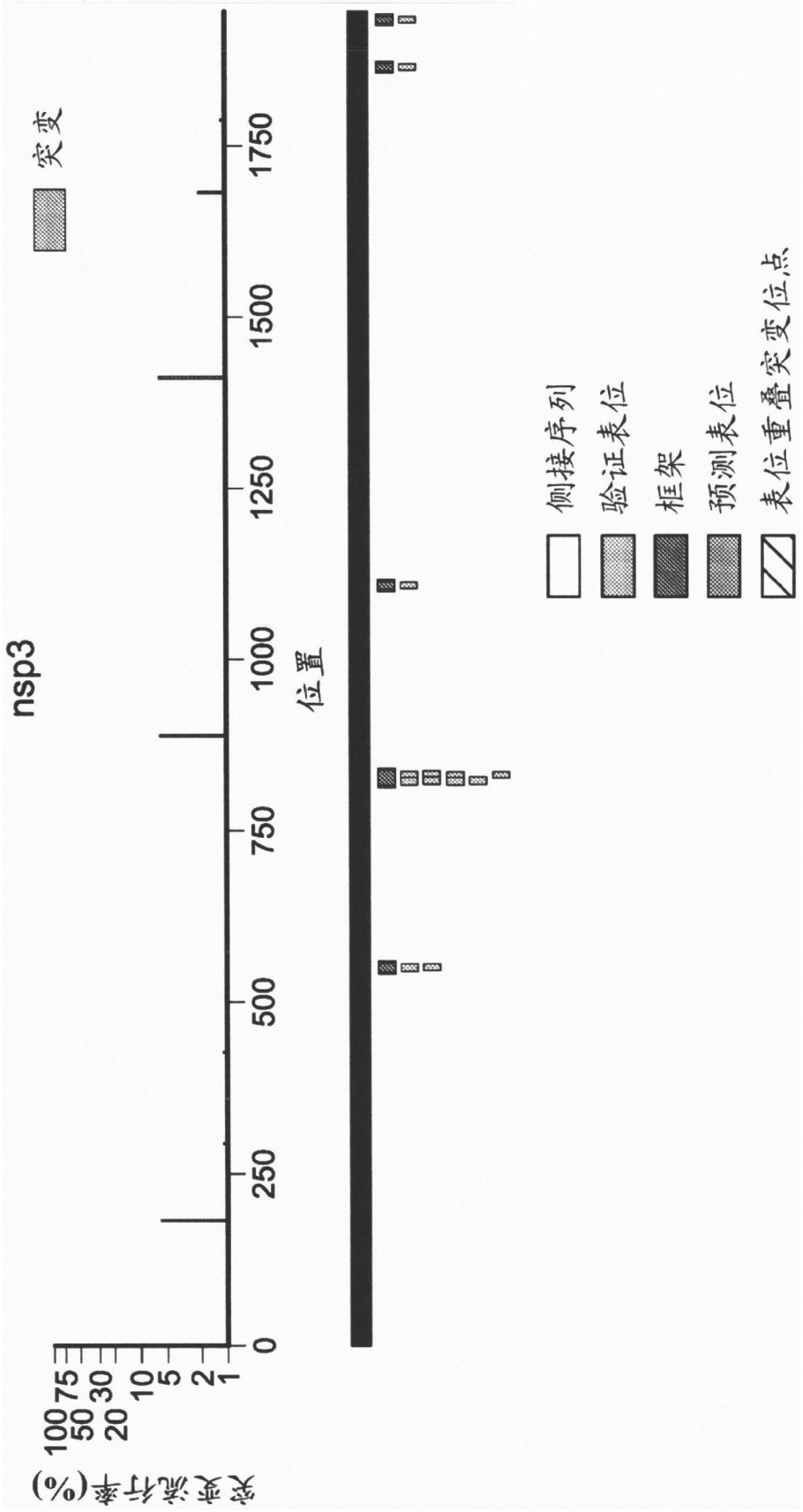

突变
nsp3
位置
0
250
500
750
1000
1250
1500
1750
突变流行率(%)
100
75
50
30
20
10
5
2
1
侧接序列
验证表位
框架
预测表位
表位重叠突变位点

图25D

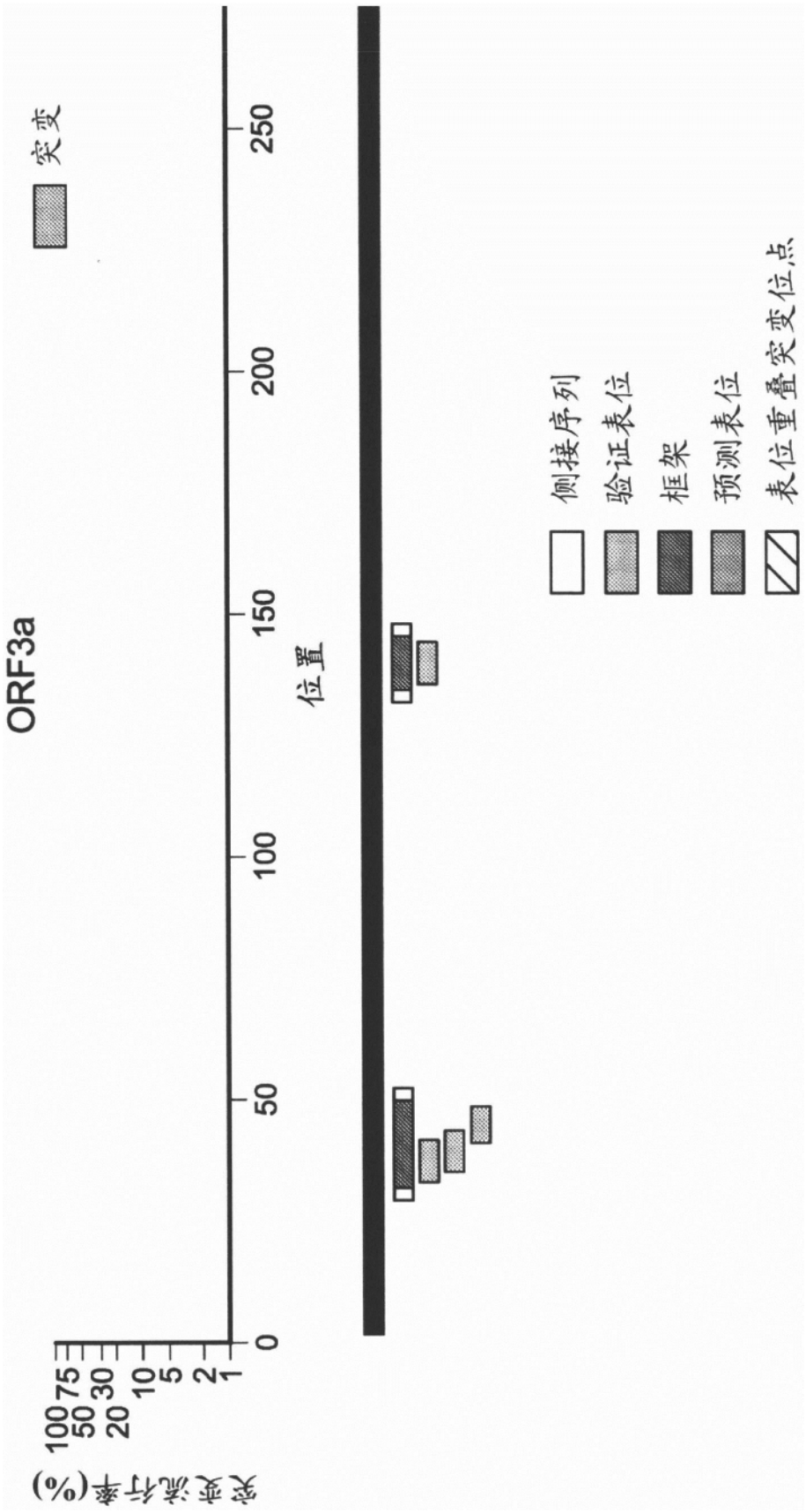

ORF3a
突变
位置
0
50
100
150
200
250
突变流行率(%)
100
75
50
30
20
10
5
2
1
侧接序列
验证表位
框架
预测表位
表位重叠突变位点

图25E

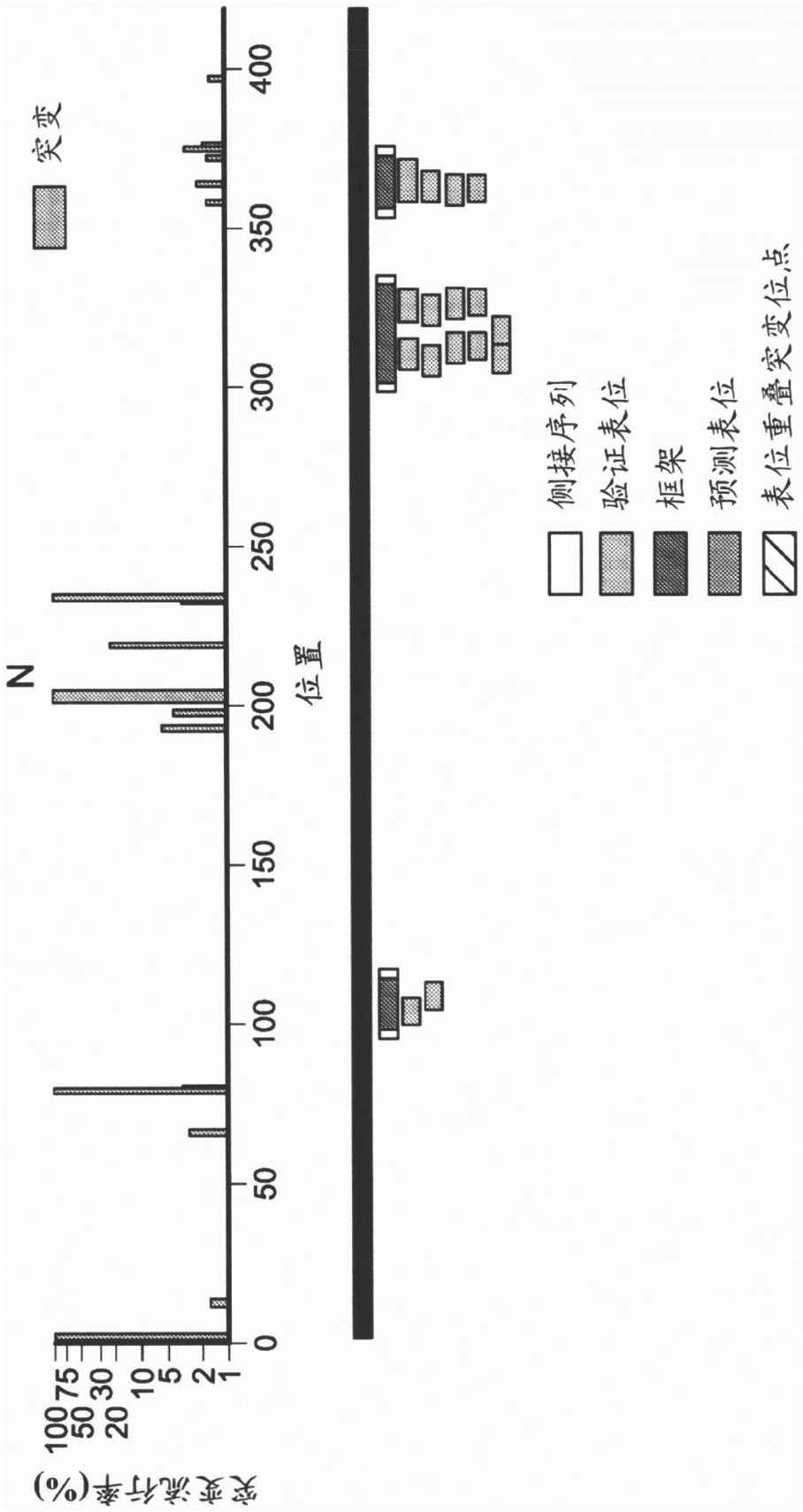

突变
N
位置
0
50
100
150
200
250
300
350
400
突变流行率(%)
100
75
50
30
20
10
5
2
1
侧接序列
验证表位
框架
预测表位
表位重叠突变位点

图25F

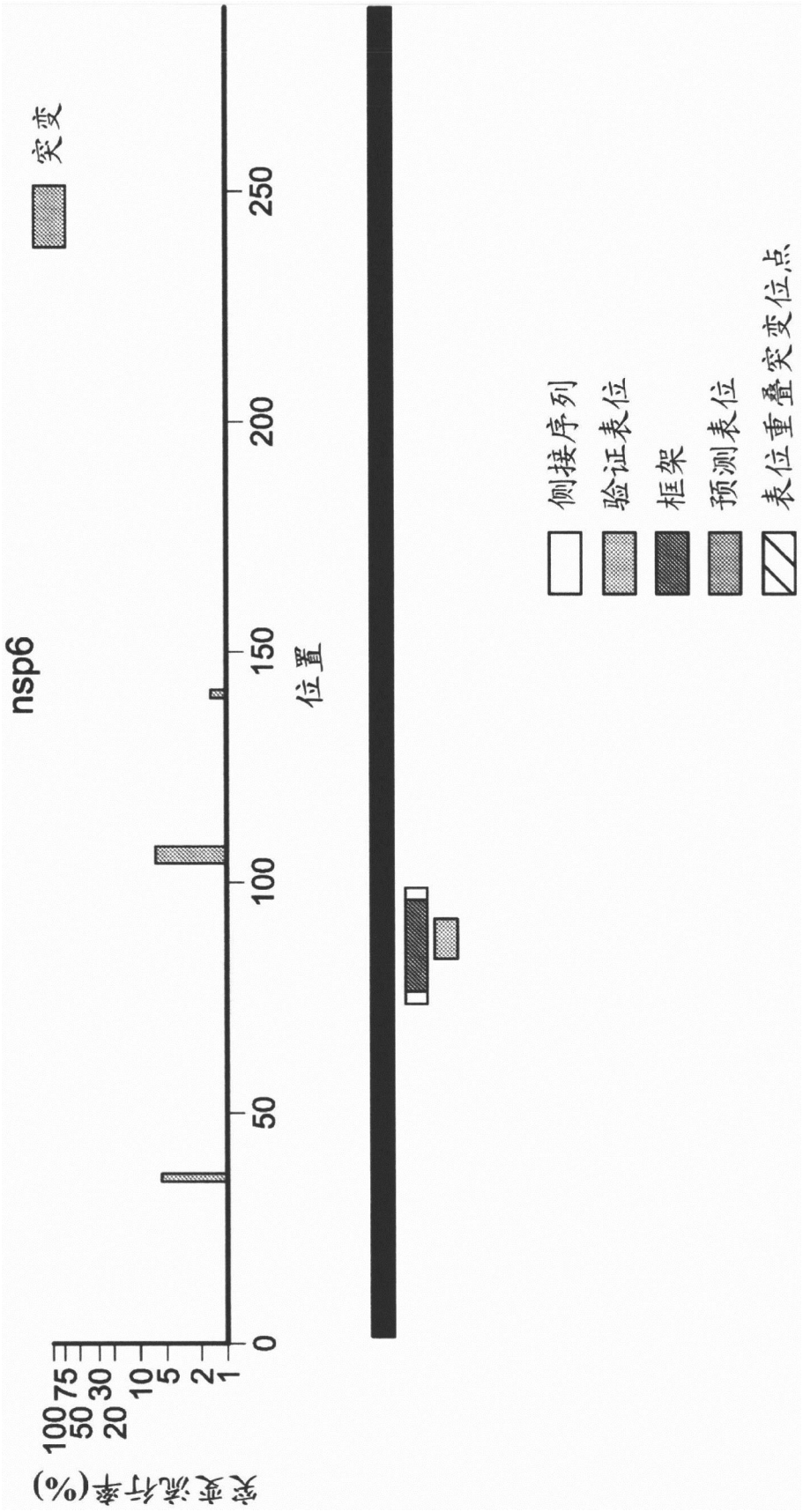

突变
nsp6
位置
0
50
100
150
200
250
突变流行率(%)
100
75
50
30
20
10
5
2
1
侧接序列
验证表位
框架
预测表位
表位重叠突变位点

图25G

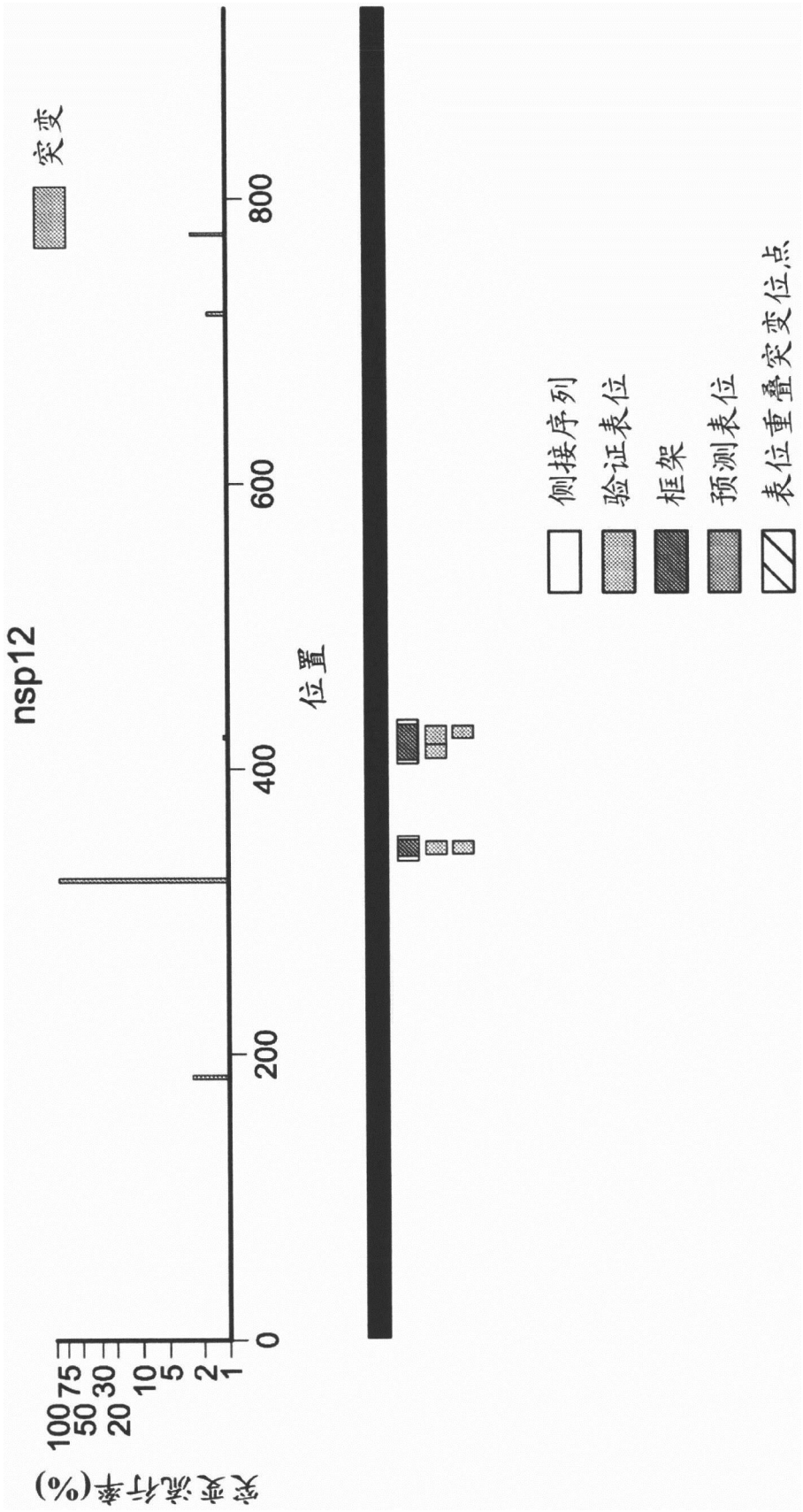

突变
nsp12
位置
0
200
400
600
800
突变流行率(%)
100
75
50
30
20
10
5
2
1
侧接序列
验证表位
框架
预测表位
表位重叠突变位点

图26A

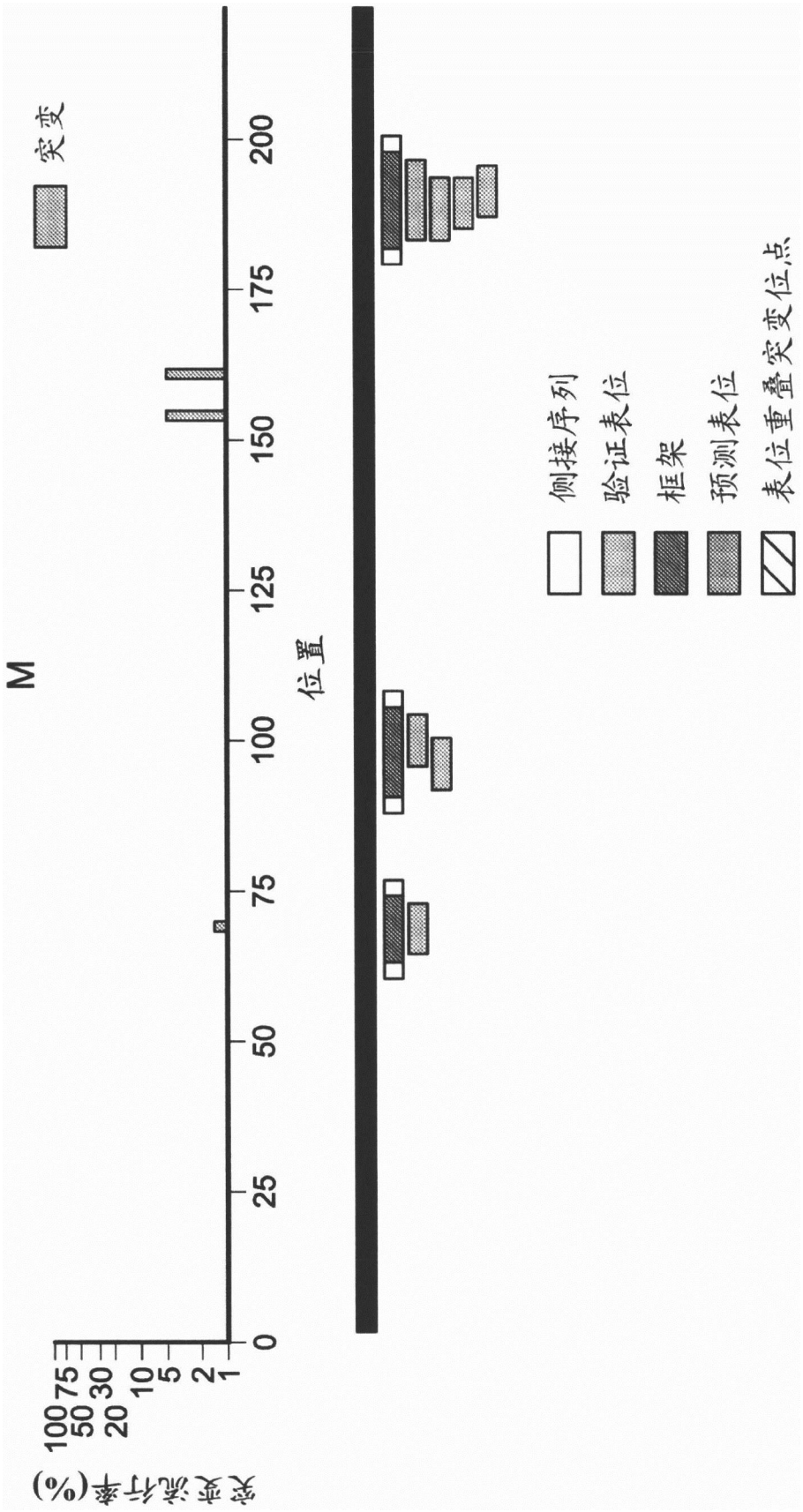

突变
M
位置
0
25
50
75
100
125
150
175
200
突变流行率(%)
100
50
20
10
5
2
1
侧接序列
验证表位
框架
预测表位
表位重叠突变位点

图26B

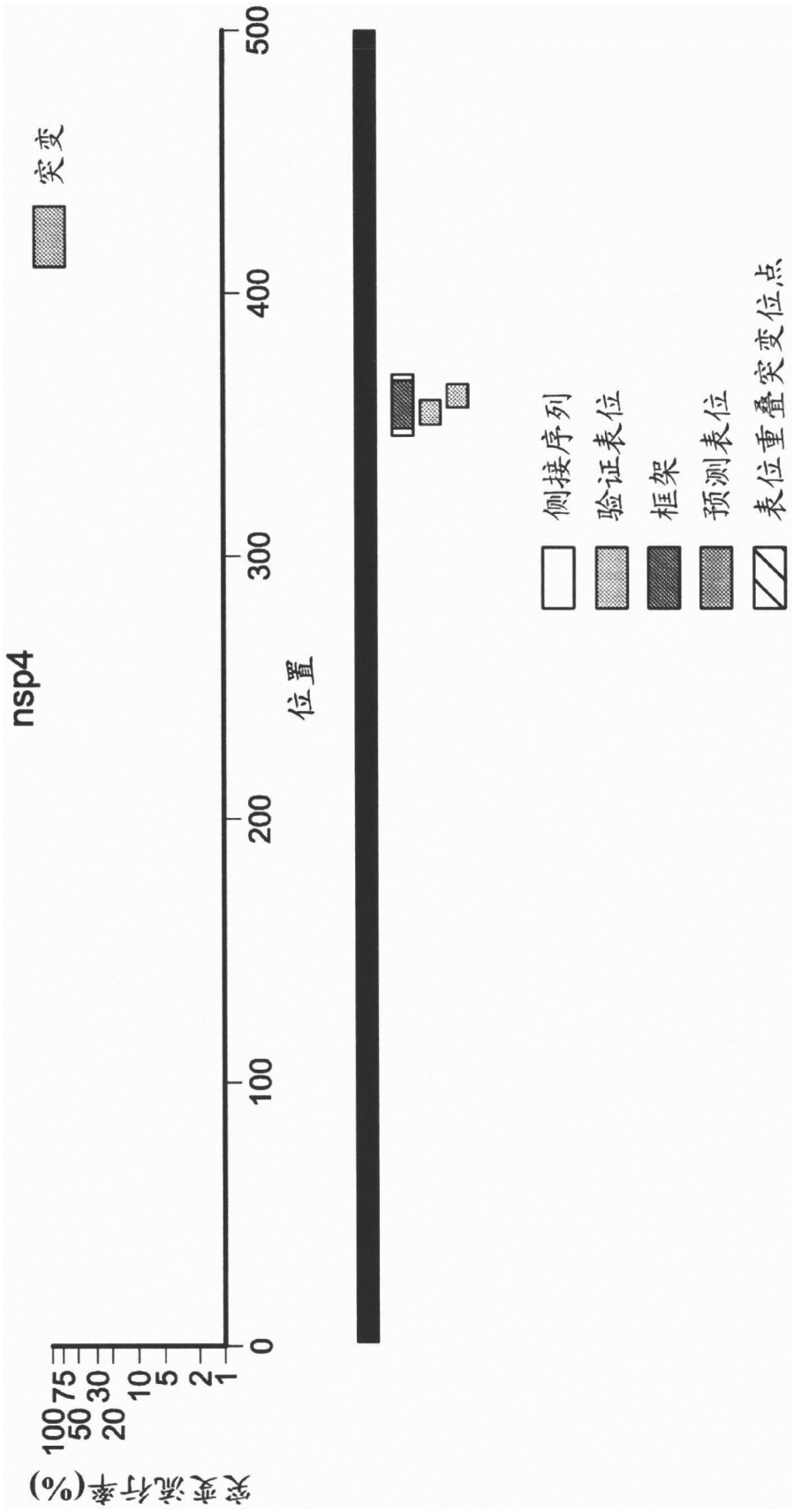

突变
nsp4
位置
0
100
200
300
400
500
突变流行率(%)
100
75
50
30
20
10
5
2
1
侧接序列
验证表位
框架
预测表位
表位重叠突变位点

图26C

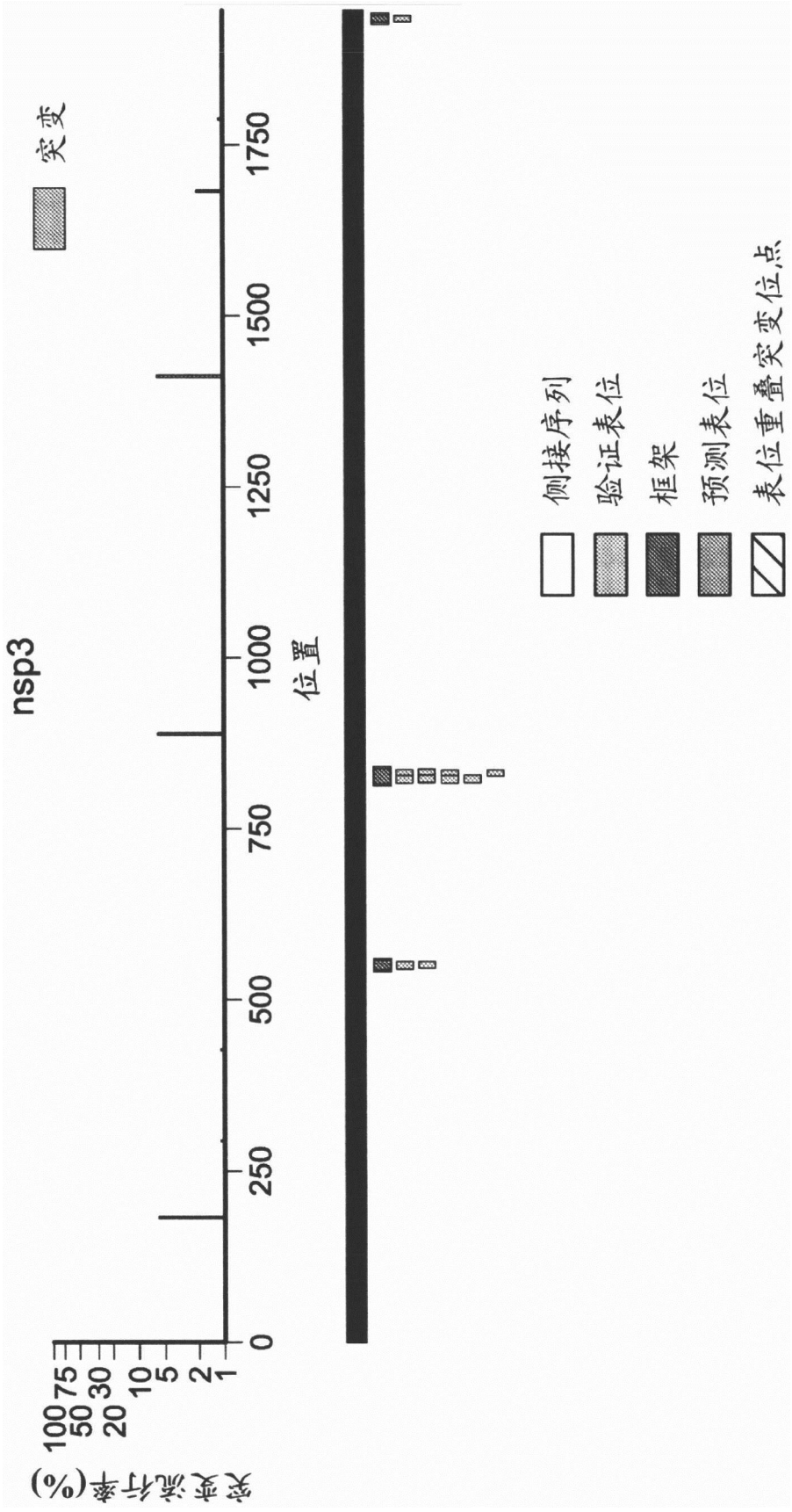

突变
nsp3
位置
0
250
500
750
1000
1250
1500
1750
突变流行率(%)
100
75
50
30
20
10
5
2
1
侧接序列
验证表位
框架
预测表位
表位重叠突变位点

图26D

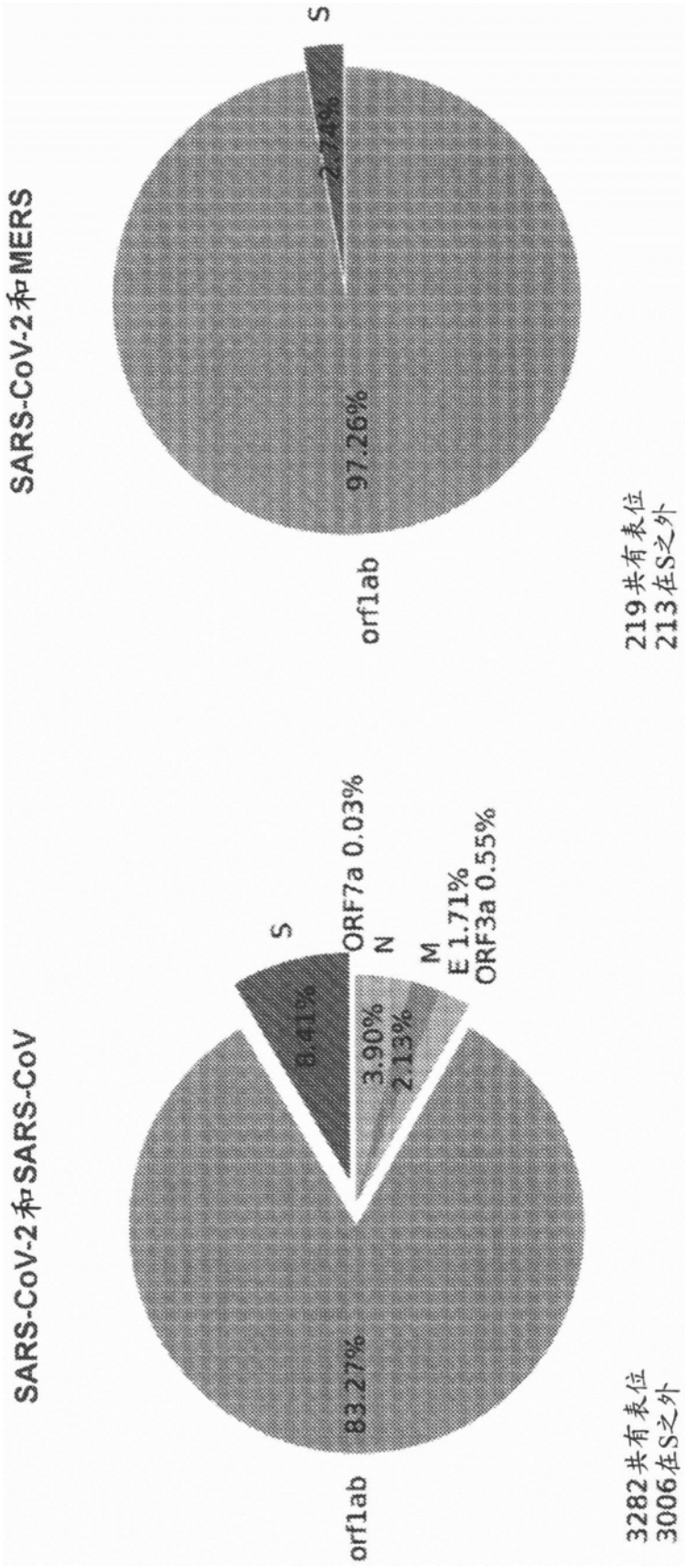

SARS-CoV-2和MERS
S
2.74%
97.26%
orf1ab
219共有表位
213在S之外
SARS-CoV-2和SARS-CoV
S
ORF7a 0.03%
N
M
E 1.71%
ORF3a 0.55%
8.41%
3.90%
2.13%
83.27%
orf1ab
3282共有表位
3006在S之外

图27

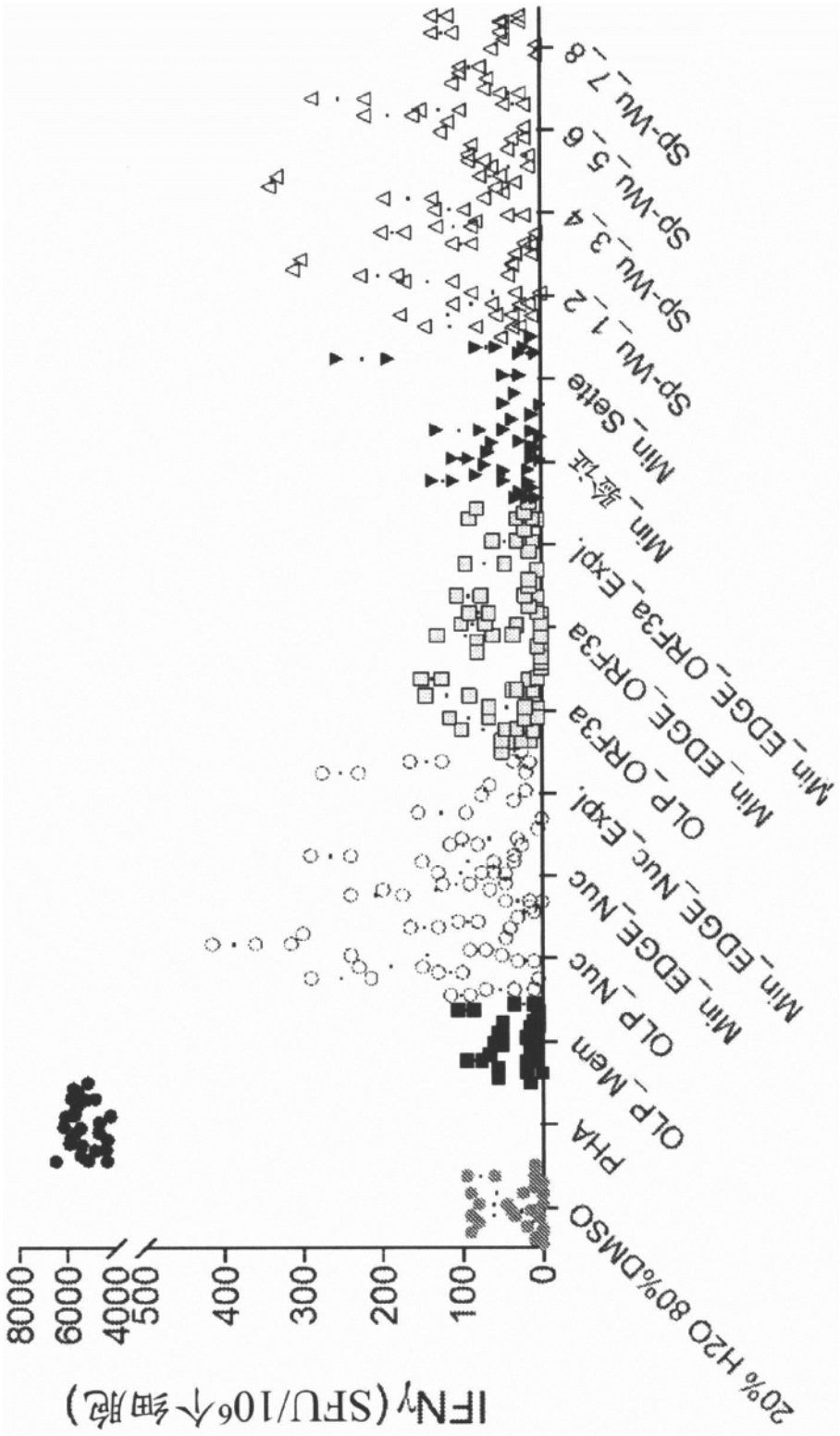

IFNγ(SFU/10⁶个细胞)
8000
6000
4000
500
400
300
200
100
0
20% H2O 80%DMSO
PHA
OLP_Mem
OLP_Nuc
Min_EDGE_Nuc
Min_EDGE_Nuc_Expl
OLP_ORF33
Min_EDGE_ORF33
Min_EDGE_ORF33a_Expl
Min_盐-法
Min_Setta
Sp-Wu_1_2
Sp-Wu_3_4
Sp-Wu_5_6
Sp-Wu_7_8

图28

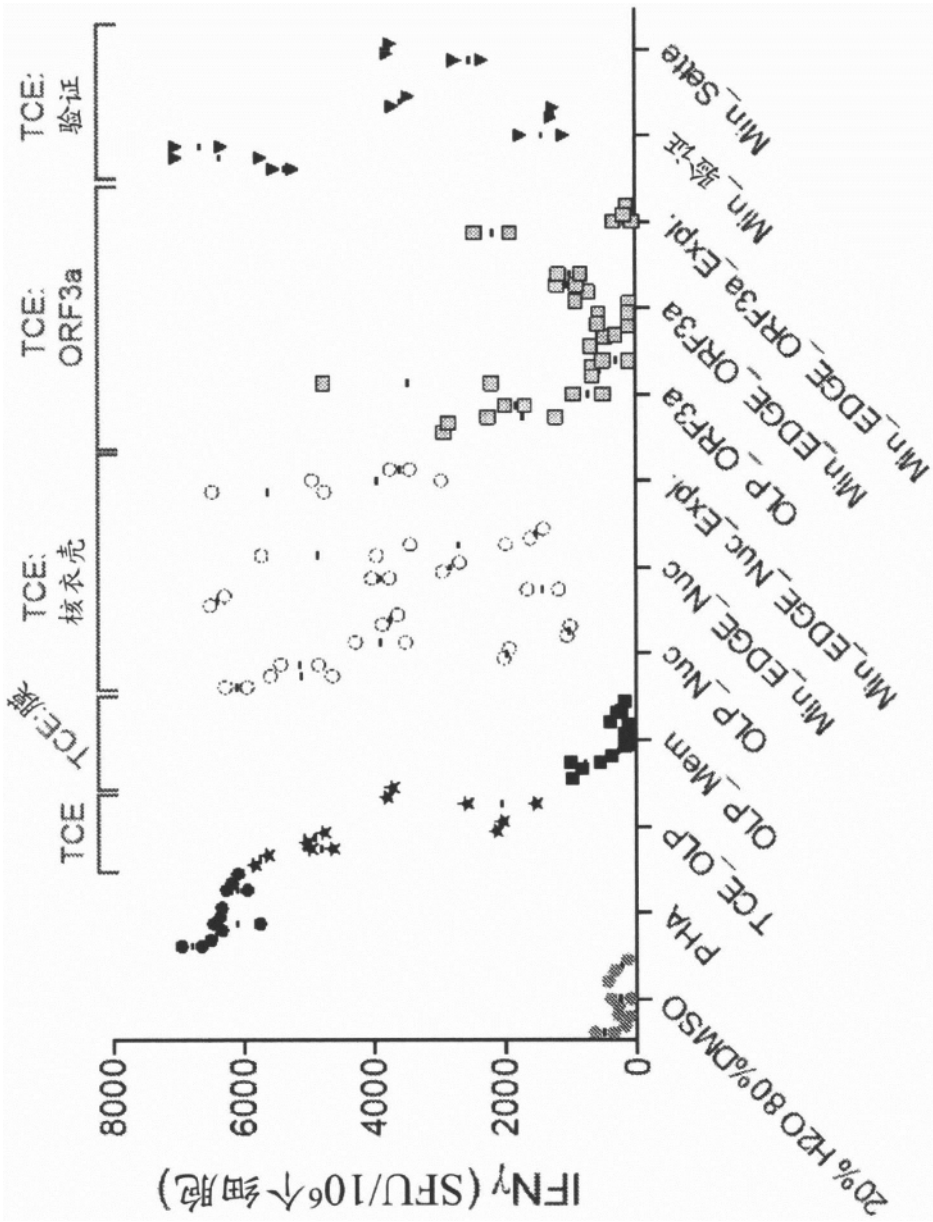

IFNγ (SFU/10⁶个细胞)
8000
6000
4000
2000
0
20% H2O 80% DMSO
PHA
TCE_OLP
OLP_Mem
OLP_Nuc
Min_EDGE_Nuc
Min_EDGE_Nuc_Expl.
OLP_ORF3a
Min_EDGE_ORF3a
Min_EDGE_ORF3a_Expl.
Min_验证
Min_Selle
TCE:膜
TCE:核衣壳
TCE:ORF3a
TCE:验证

图29

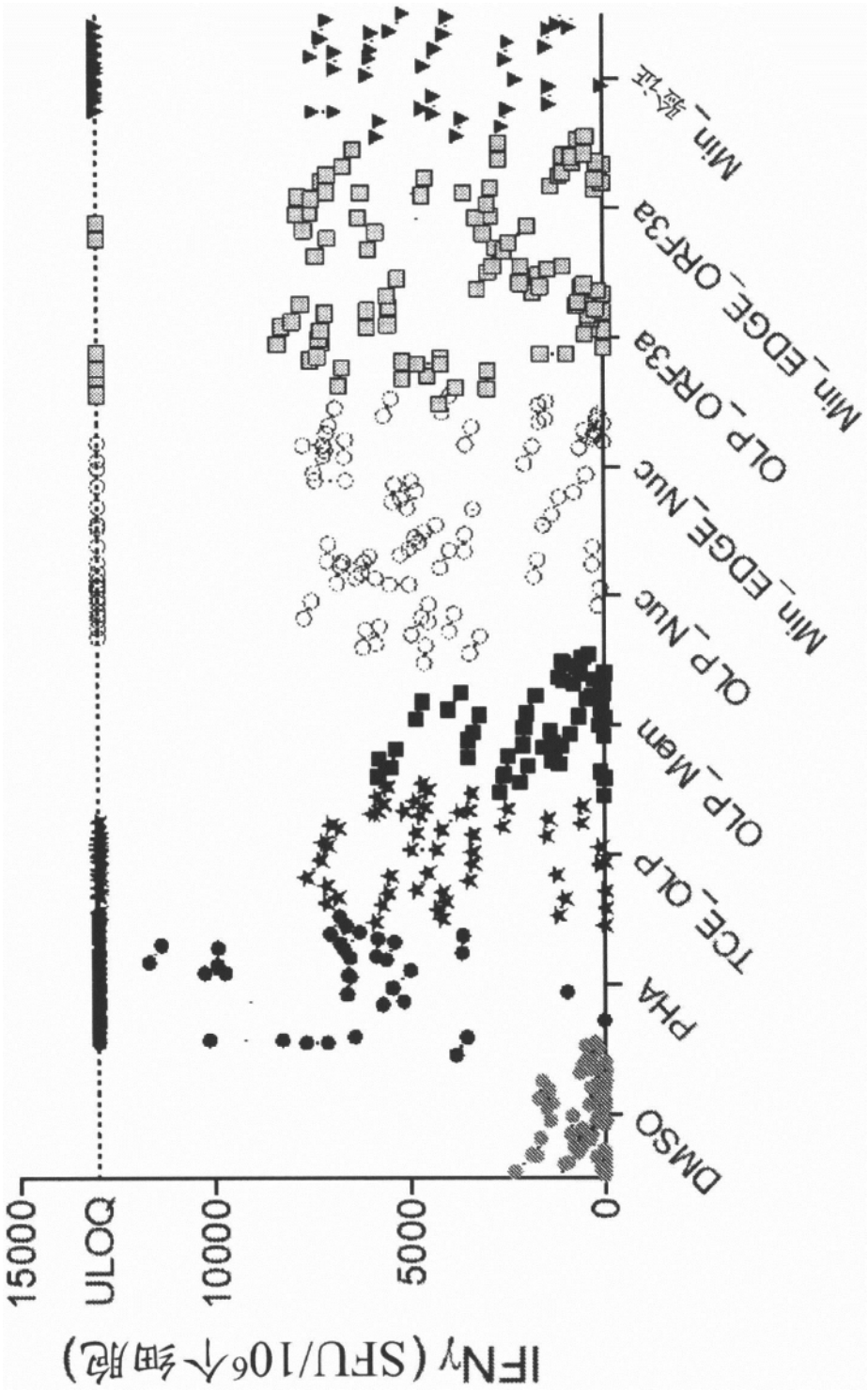

IFNγ（SFU/10⁶个细胞）
15000
ULOQ
10000
5000
0
DMSO
PHA
TCE_OLP
OLP_Mam
OLP_Nuc
Min_EDGE_Nuc
OLP_ORF3a
Min_EDGE_ORF3a
Min_验证

图30

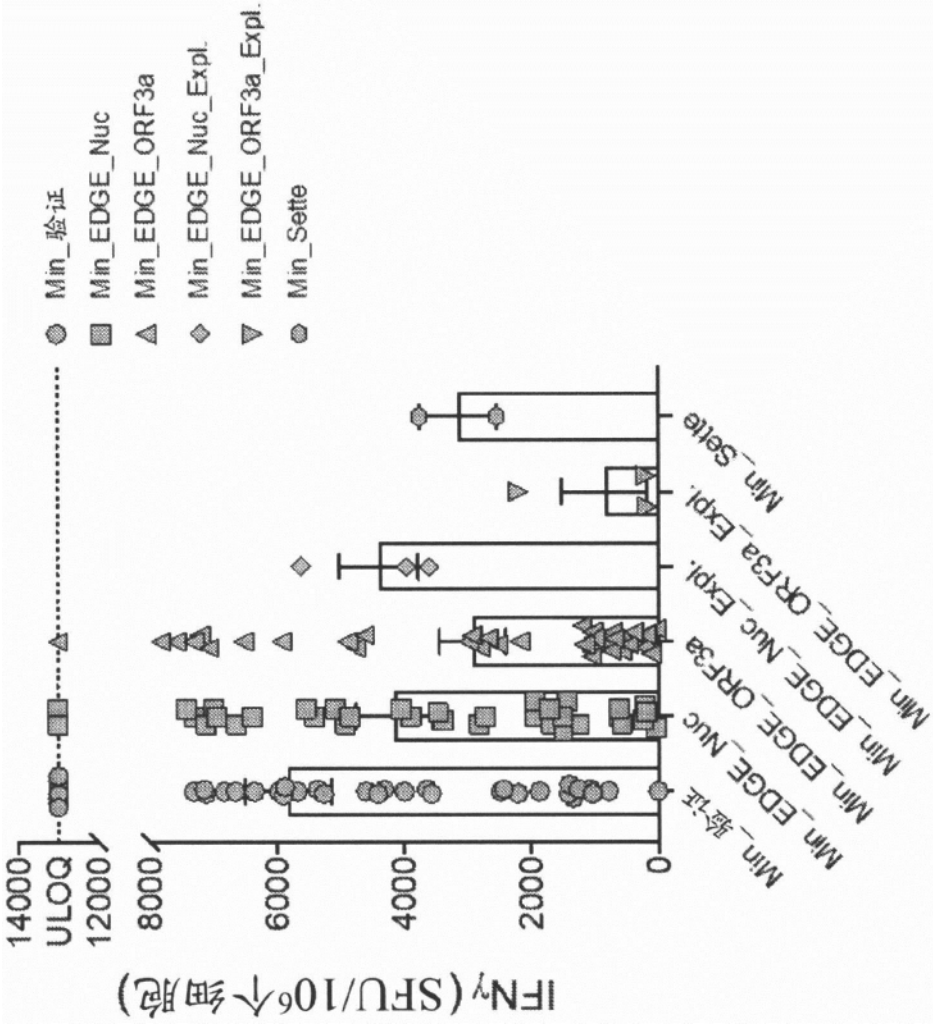

Min_验证
Min_EDGE_Nuc
Min_EDGE_ORF3a
Min_EDGE_Nuc_Expl.
Min_EDGE_ORF3a_Expl.
Min_Sette
14000
ULOQ
12000
8000
6000
4000
2000
0
IFNγ(SFU/10⁶个细胞)
Min_验证
Min_EDGE_Nuc
Min_EDGE_ORF3a
Min_EDGE_Nuc_Expl.
Min_EDGE_ORF3a_Expl.
Min_Sette

图31

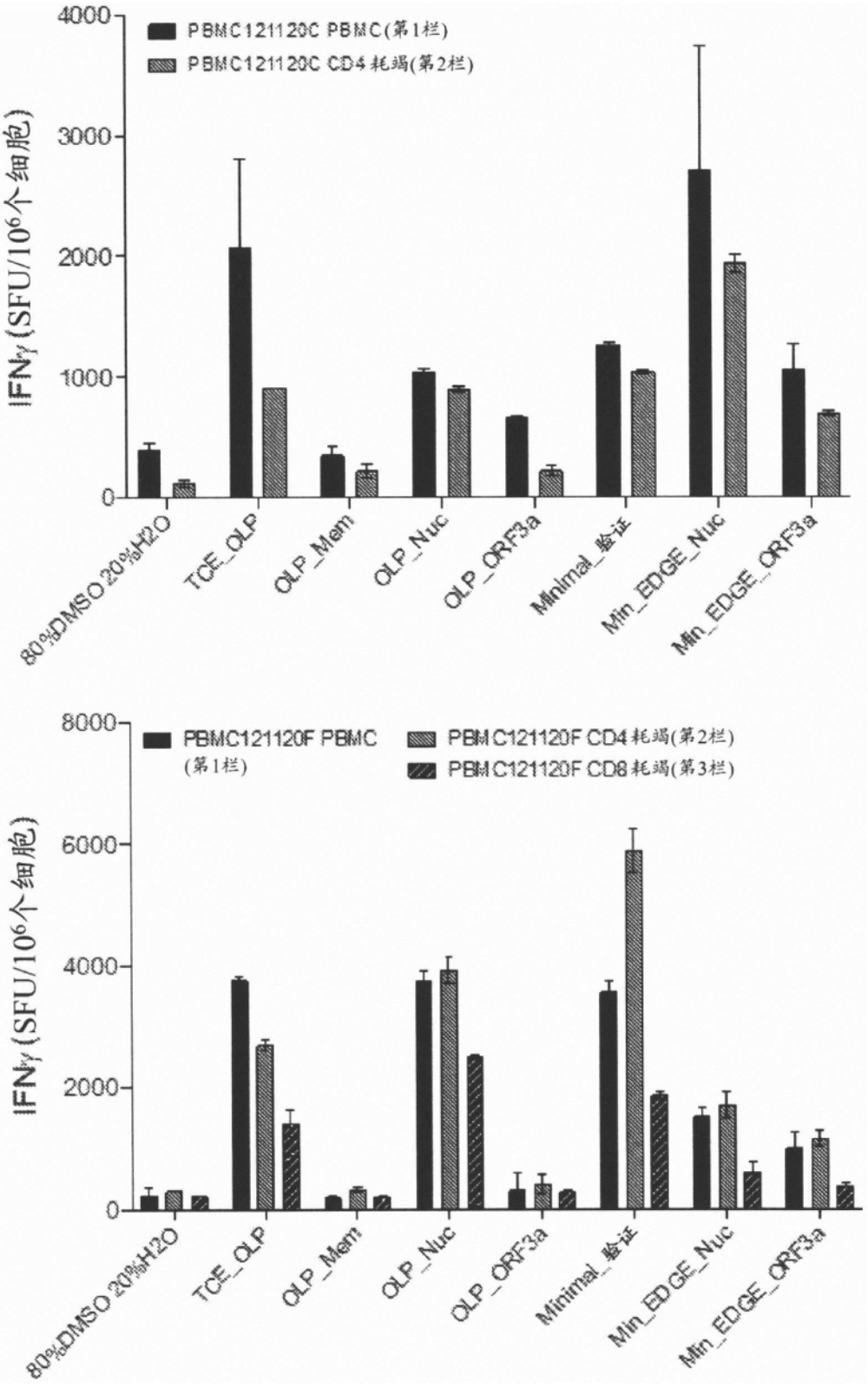

PBMC121120C PBMC(第1栏)
PBMC121120C CD4耗竭(第2栏)
IFNγ(SFU/10⁶个细胞)
4000
3000
2000
1000
0
80%DMSO 20%H2O
TCE_OLP
OLP_Mem
OLP_Nuc
OLP_ORF3a
Minimal_验证
Min_EDGE_Nuc
Min_EDGE_ORF3a
PBMC121120F PBMC (第1栏)
PBMC121120F CD4耗竭(第2栏)
PBMC121120F CD8耗竭(第3栏)
IFNγ(SFU/10⁶个细胞)
8000
6000
4000
2000
0
80%DMSO 20%H2O
TCE_OLP
OLP_Mem
OLP_Nuc
OLP_ORF3a
Minimal_验证
Min_EDGE_Nuc
Min_EDGE_ORF3a

图32

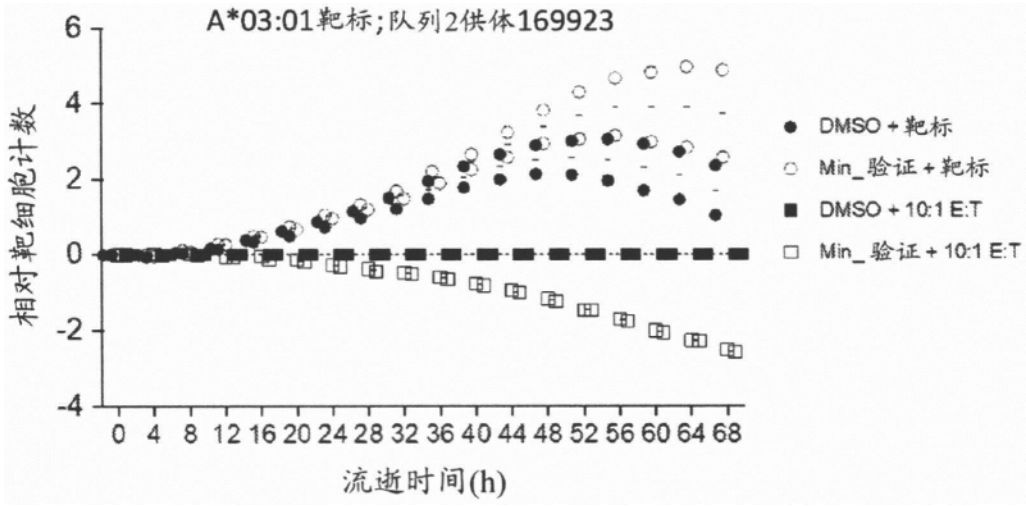

A*03:01靶标;队列2供体169923
相对靶细胞计数
流逝时间(h)
DMSO + 靶标
Min_验证 + 靶标
DMSO + 10:1 E:T
Min_验证 + 10:1 E:T

图33A

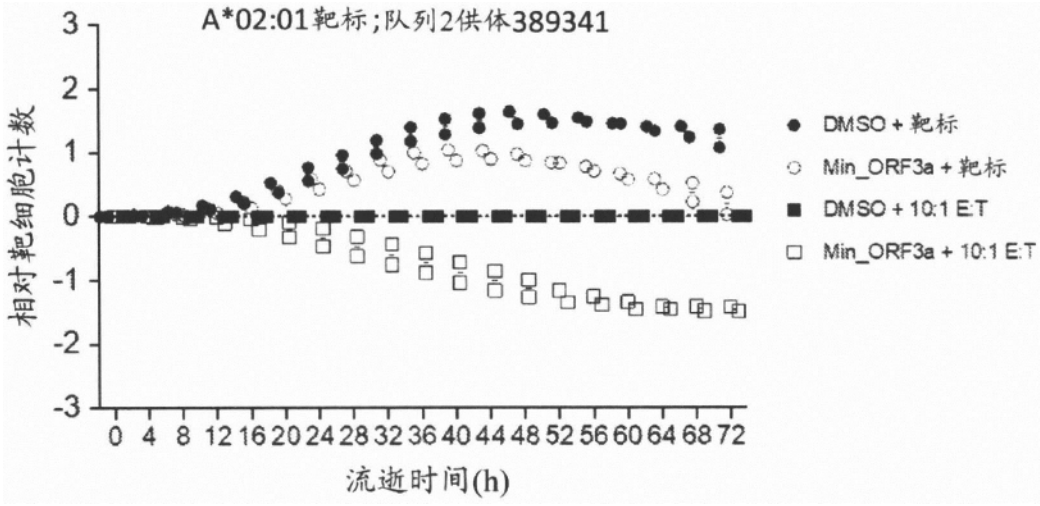

A*02:01靶标;队列2供体389341
相对靶细胞计数
流逝时间(h)
DMSO + 靶标
Min_ORF3a + 靶标
DMSO + 10:1 E:T
Min_ORF3a + 10:1 E:T

图33B

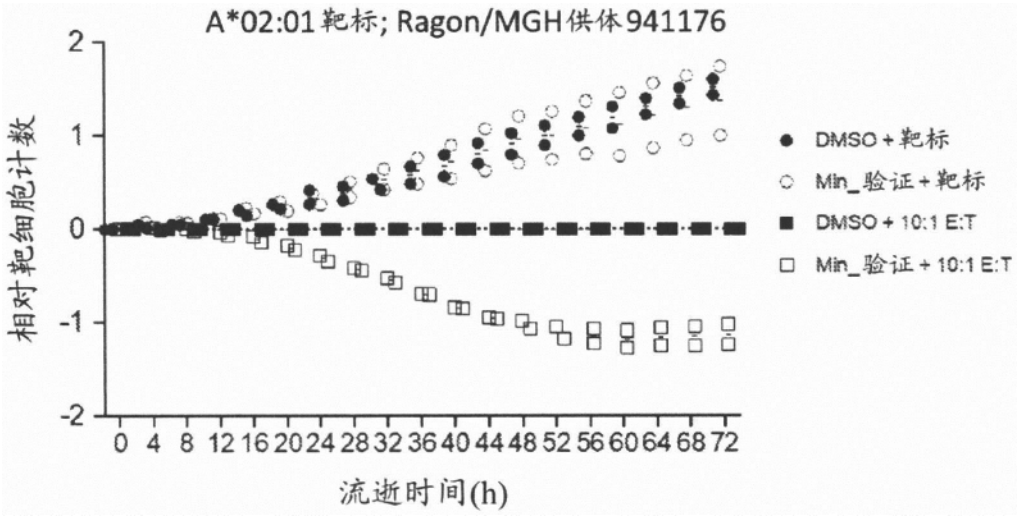

A*02:01靶标; Ragon/MGH供体941176
相对靶细胞计数
流逝时间(h)
DMSO + 靶标
Min_验证 + 靶标
DMSO + 10:1 E:T
Min_验证 + 10:1 E:T

图33C

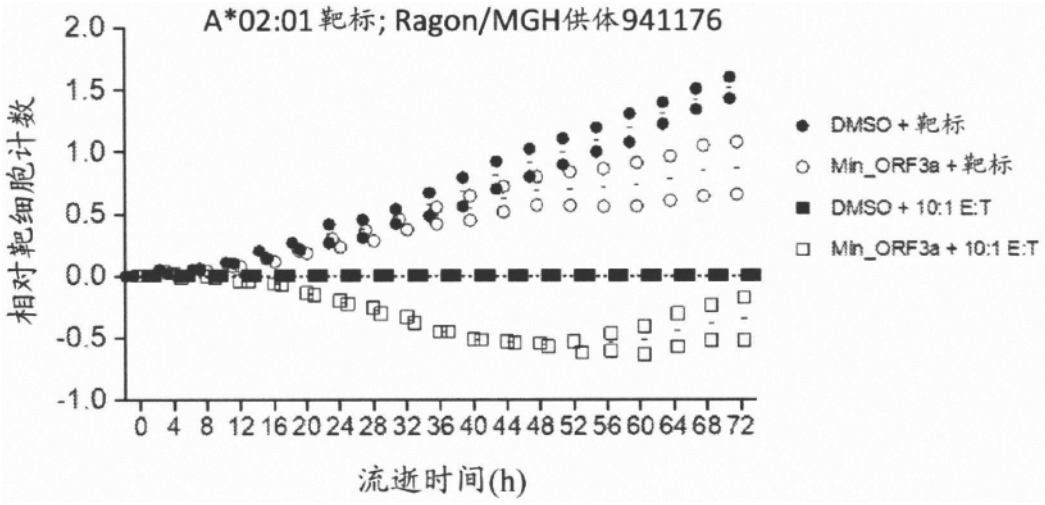

A*02:01靶标; Ragon/MGH供体941176
相对靶细胞计数
流逝时间(h)
DMSO + 靶标
Min_ORF3a + 靶标
DMSO + 10:1 E:T
Min_ORF3a + 10:1 E:T

图33D

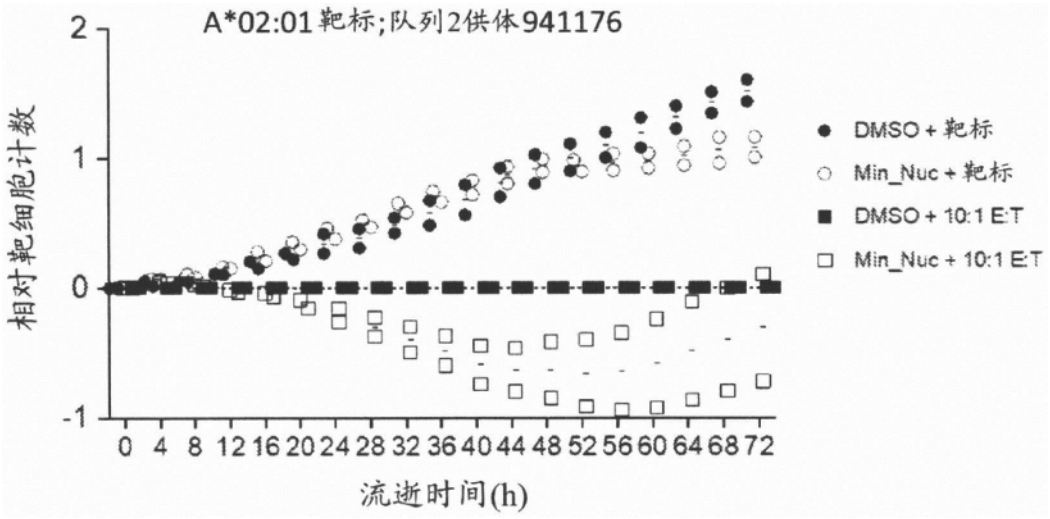

A*02:01靶标;队列2供体941176
相对靶细胞计数
流逝时间(h)
DMSO + 靶标
Min_Nuc + 靶标
DMSO + 10:1 E:T
Min_Nuc + 10:1 E:T

图33E

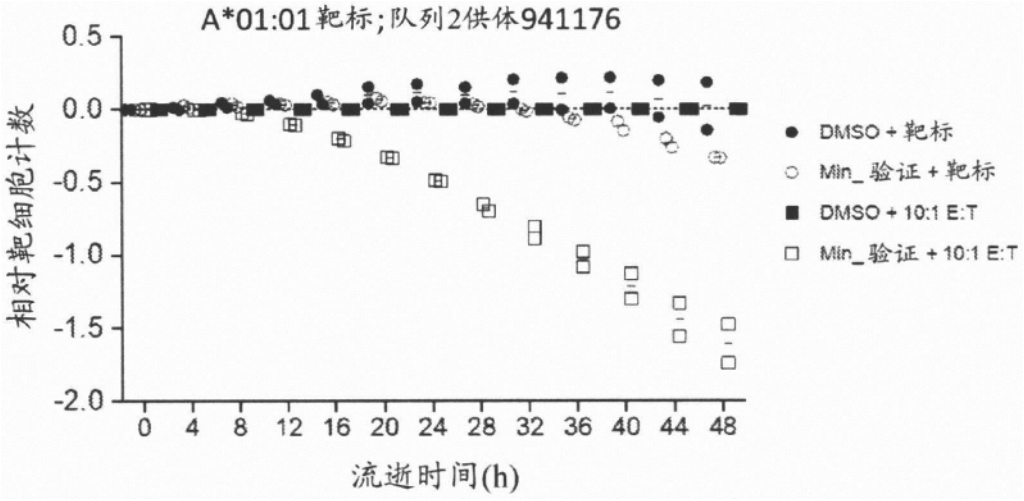

A*01:01靶标;队列2供体941176
相对靶细胞计数
流逝时间(h)
DMSO + 靶标
Min_ 验证 + 靶标
DMSO + 10:1 E:T
Min_ 验证 + 10:1 E:T

图33F

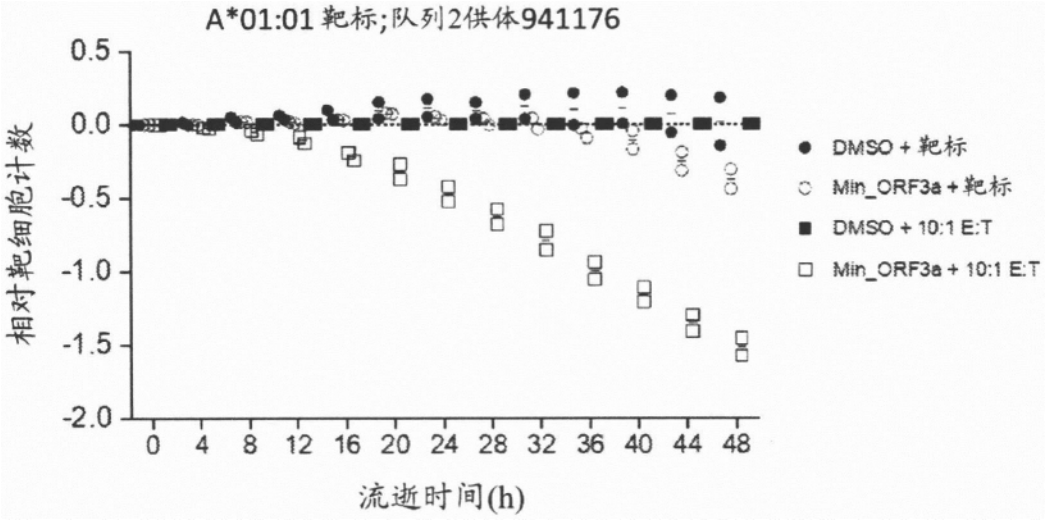

A*01:01靶标;队列2供体941176
相对靶细胞计数
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44 48
流逝时间(h)
DMSO + 靶标
Min_ORF3a + 靶标
DMSO + 10:1 E:T
Min_ORF3a + 10:1 E:T

图33G

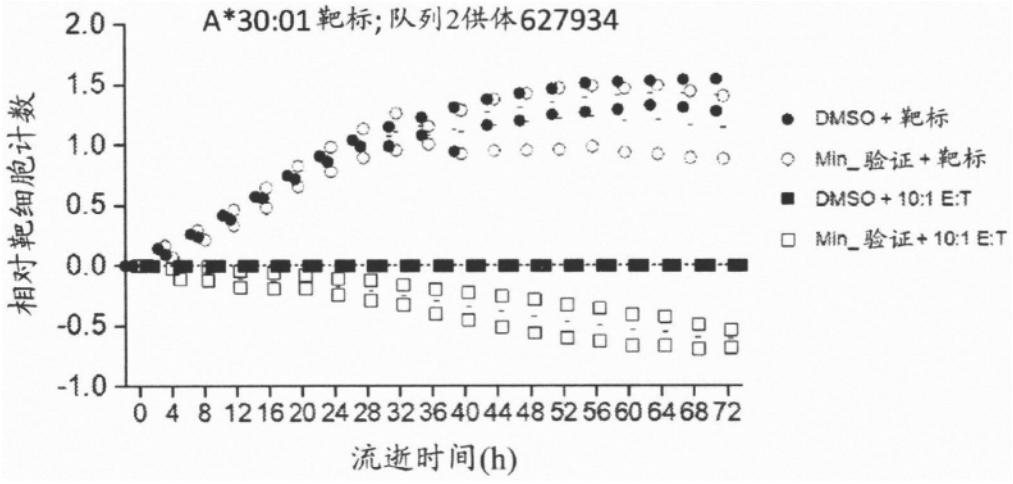

A*30:01靶标;队列2供体627934
相对靶细胞计数
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44 48 52 56 60 64 68 72
流逝时间(h)
DMSO + 靶标
Min_验证 + 靶标
DMSO + 10:1 E:T
Min_验证 + 10:1 E:T

图33H

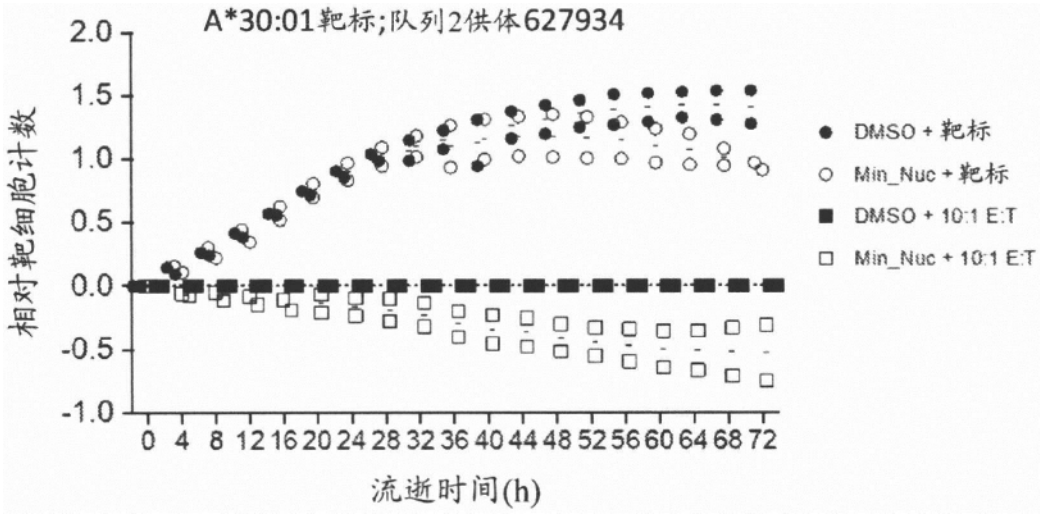

A*30:01靶标;队列2供体627934
相对靶细胞计数
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44 48 52 56 60 64 68 72
流逝时间(h)
DMSO + 靶标
Min_Nuc + 靶标
DMSO + 10:1 E:T
Min_Nuc + 10:1 E:T

图33I

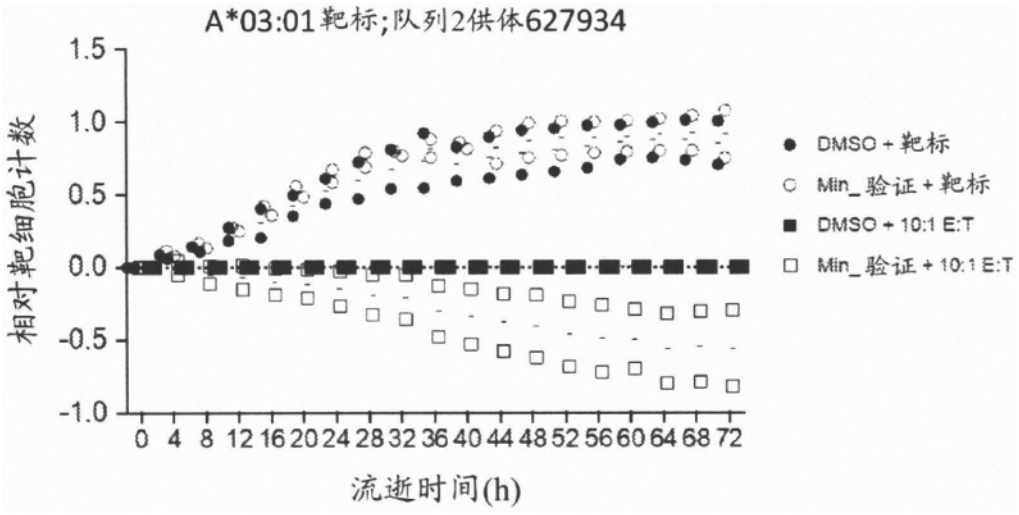

A*03:01靶标;队列2供体627934
相对靶细胞计数
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44 48 52 56 60 64 68 72
流逝时间(h)
DMSO + 靶标
Min_验证 + 靶标
DMSO + 10:1 E:T
Min_验证 + 10:1 E:T

图33J

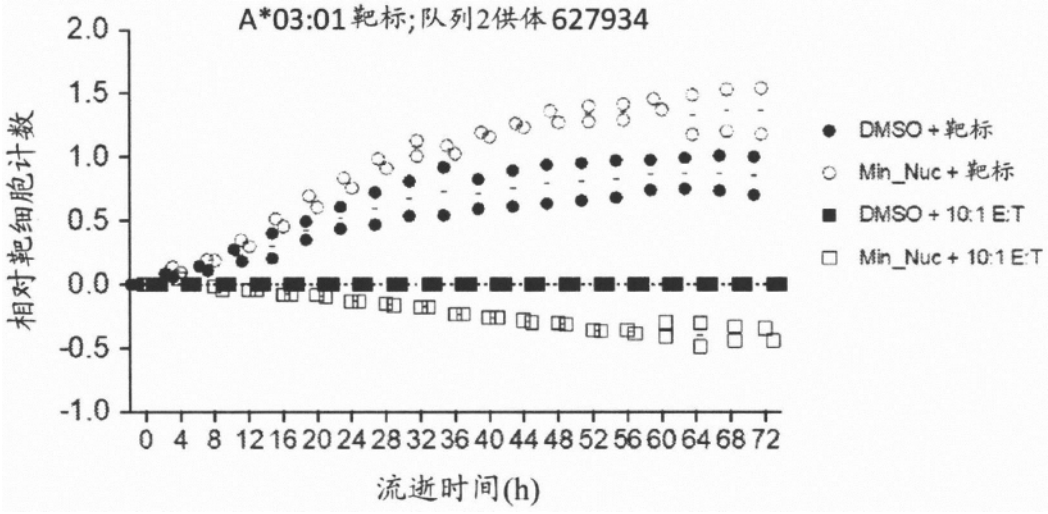

A*03:01靶标;队列2供体627934
相对靶细胞计数
流逝时间(h)
DMSO + 靶标
Min_Nuc + 靶标
DMSO + 10:1 E:T
Min_Nuc + 10:1 E:T

图33K

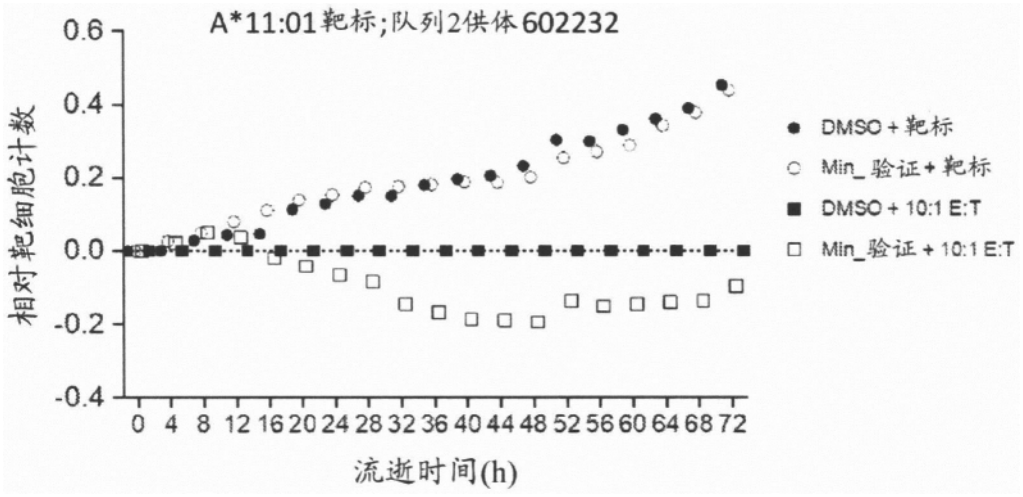

A*11:01靶标;队列2供体602232
相对靶细胞计数
流逝时间(h)
DMSO + 靶标
Min_ 验证 + 靶标
DMSO + 10:1 E:T
Min_验证 + 10:1 E:T

图33L

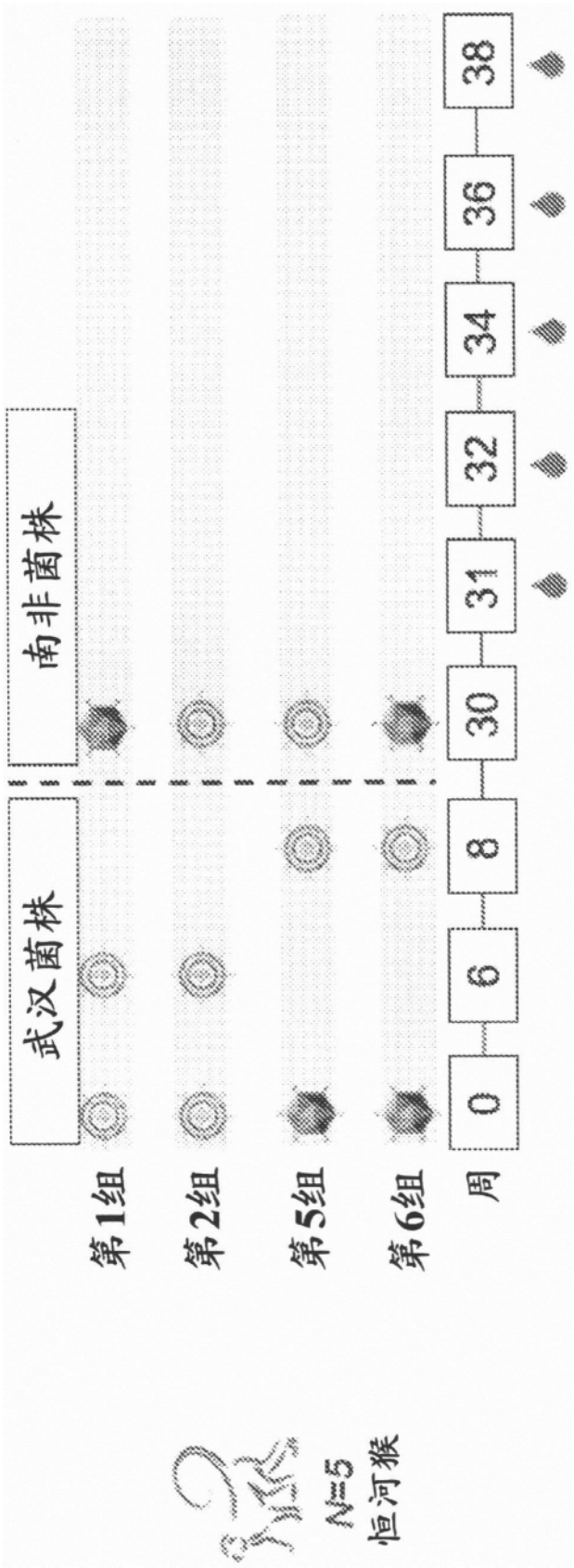


图34

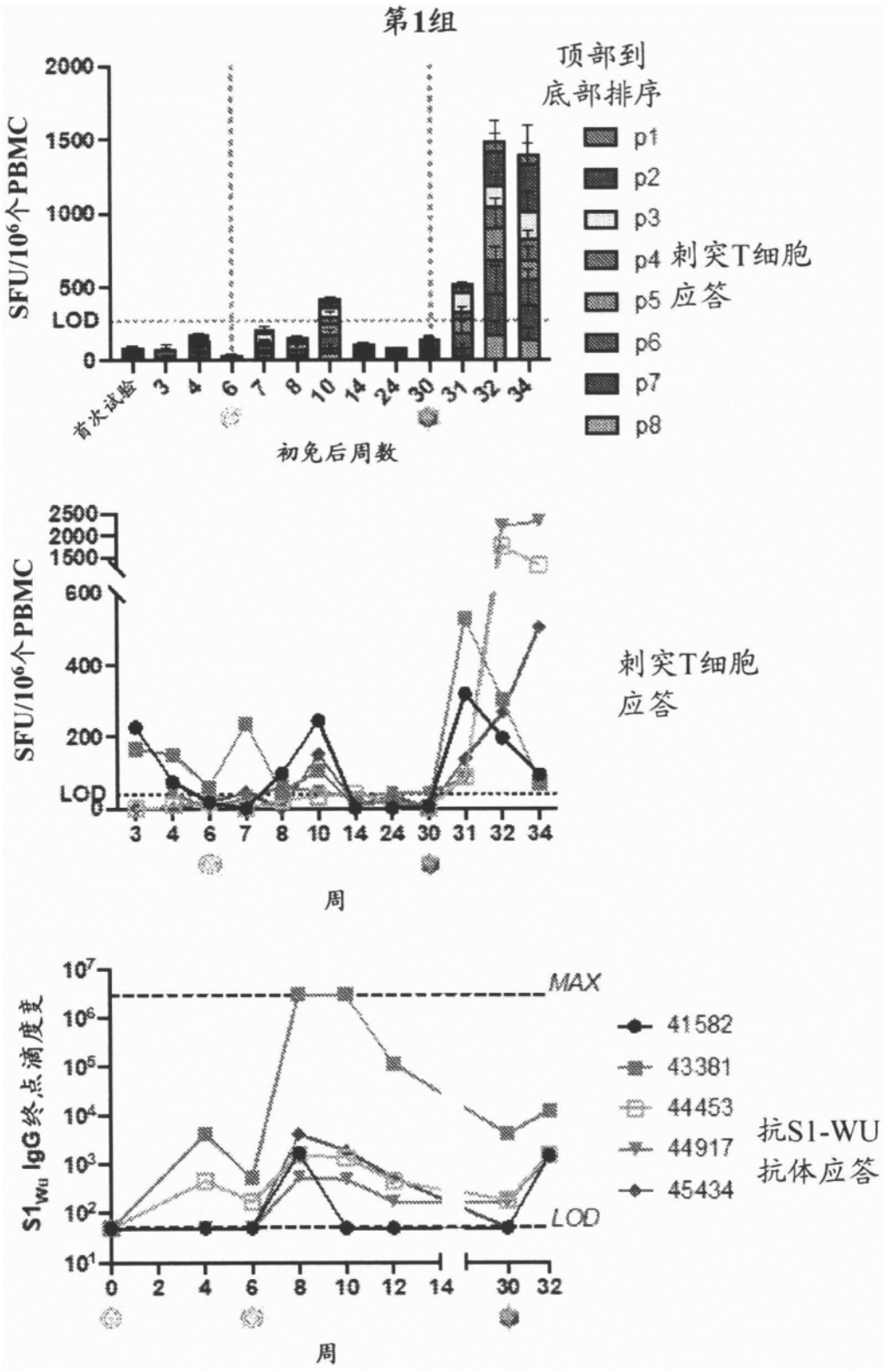

第1组
顶部到
底部排序
p1
p2
p3
p4
p5
p6
p7
p8
刺突T细胞
应答
SFU/10⁶个PBMC
2000
1500
1000
500
LOD
0
首次试验
3 4 6 7 8 10 14 24 30 31 32 34
初免后周数
2500
2000
1500
600
400
200
LOD
0
3 4 6 7 8 10 14 24 30 31 32 34
周
刺突T细胞
应答
S1WU IgG终点滴度
10⁷
10⁶
10⁵
10⁴
10³
10²
10¹
MAX
LOD
0 2 4 6 8 10 12 14 30 32
周
41582
43381
44453
44917
45434
抗S1-WU
抗体应答

图35A

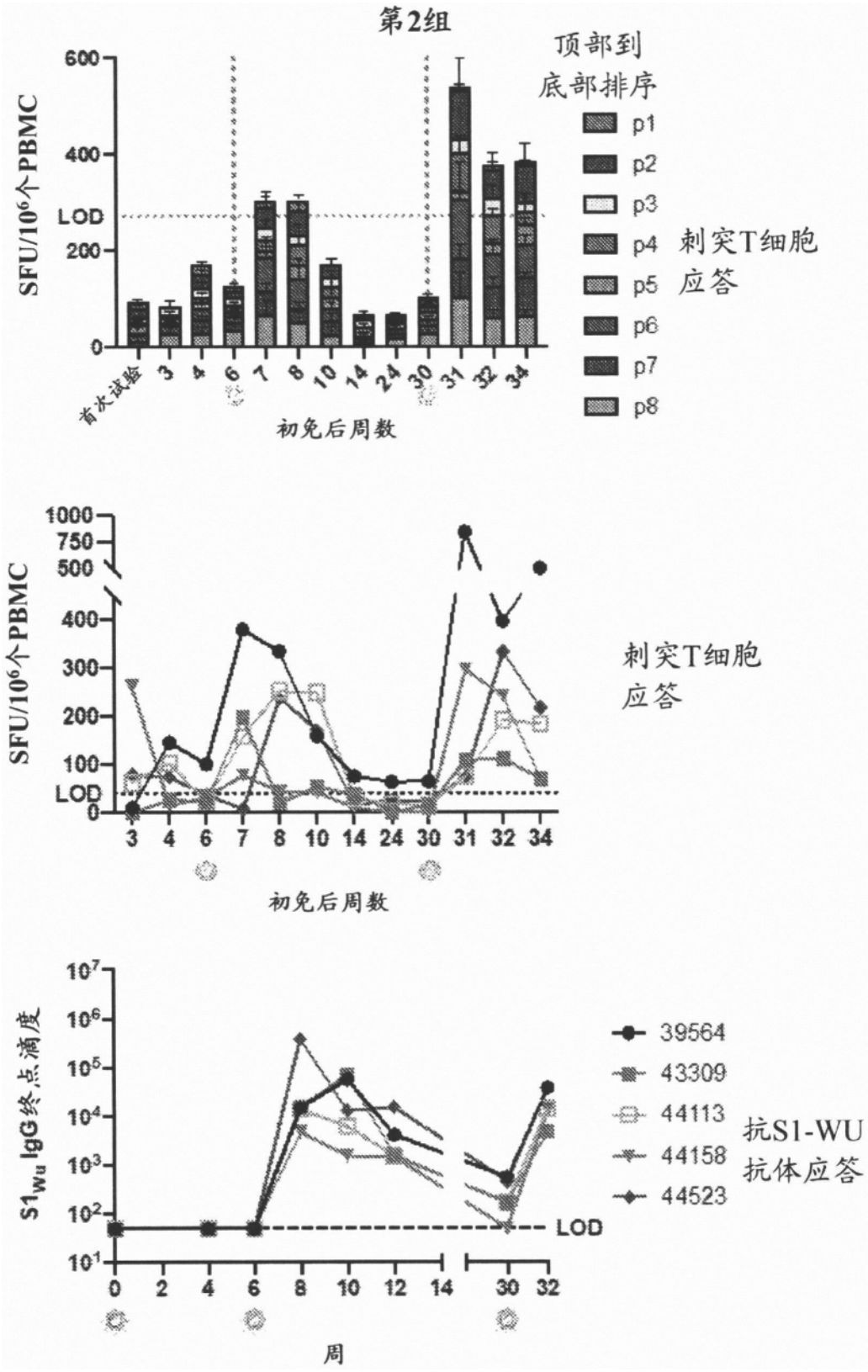

第2组
顶部到
底部排序
p1
p2
p3
p4
p5
p6
p7
p8
刺突T细胞
应答
SFU/10⁶个PBMC
600
400
LOD
200
0
首次试验
3
4
6
7
8
10
14
24
30
31
32
34
初免后周数
1000
750
500
400
300
200
100
LOD
0
刺突T细胞
应答
SFU/10⁶个PBMC
初免后周数
S1Wu IgG终点滴度
10⁷
10⁶
10⁵
10⁴
10³
10²
10¹
39564
43309
44113
44158
44523
抗S1-WU
抗体应答
LOD
0
2
4
6
8
10
12
14
30
32
周

图35B

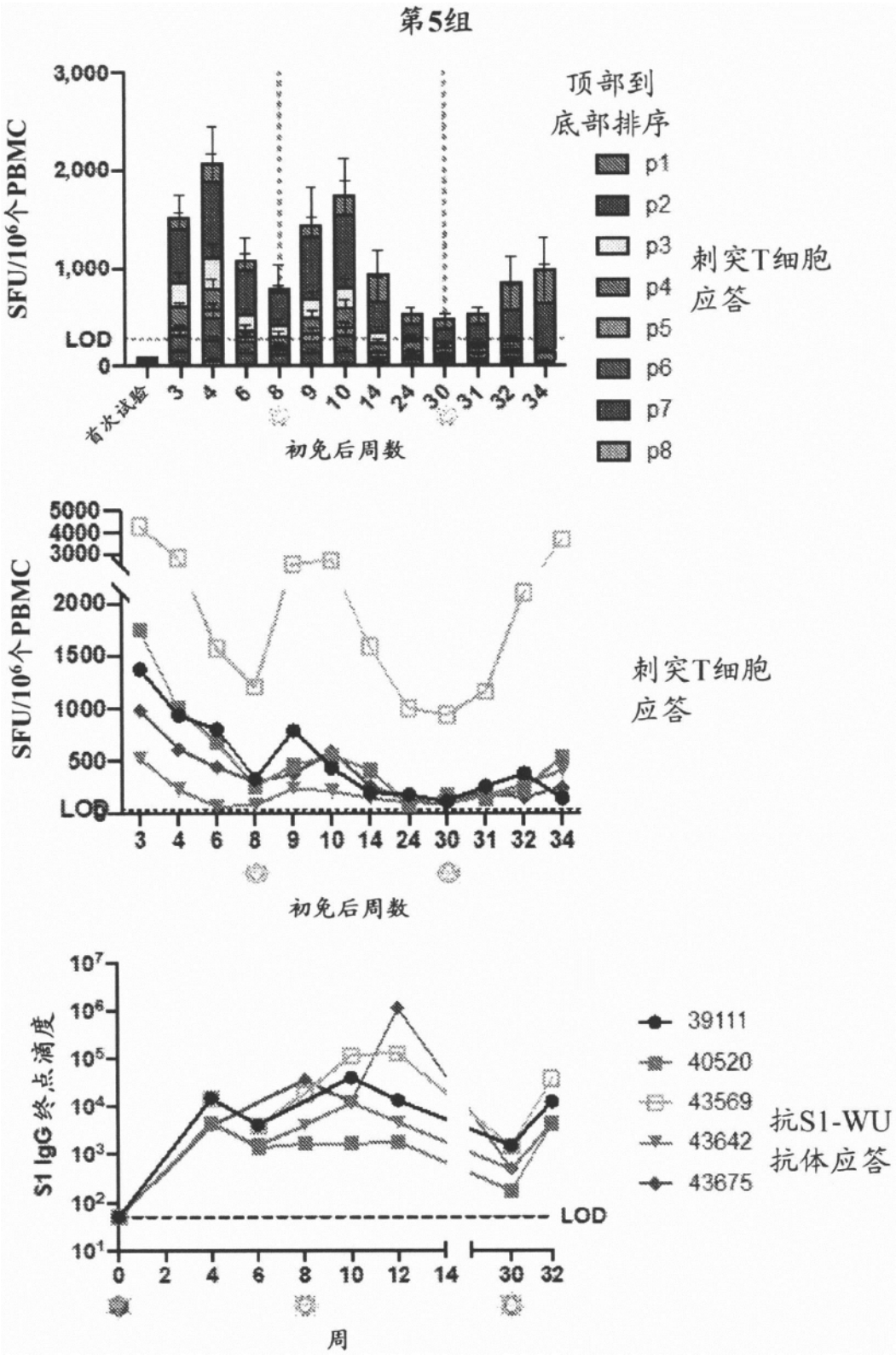

第5组
SFU/10⁶个PBMC
3,000
2,000
1,000
LOD
0
首次试验
3 4 6 8 9 10 14 24 30 31 32 34
初免后周数
顶部到
底部排序
p1
p2
p3
p4
p5
p6
p7
p8
刺突T细胞
应答
5000
4000
3000
2000
1500
1000
500
LOD
3 4 6 8 9 10 14 24 30 31 32 34
初免后周数
刺突T细胞
应答
S1 IgG 终点滴度
10⁷
10⁶
10⁵
10⁴
10³
10²
10¹
LOD
0 2 4 6 8 10 12 14 30 32
周
39111
40520
43569
43642
43675
抗S1-WU
抗体应答

图35C

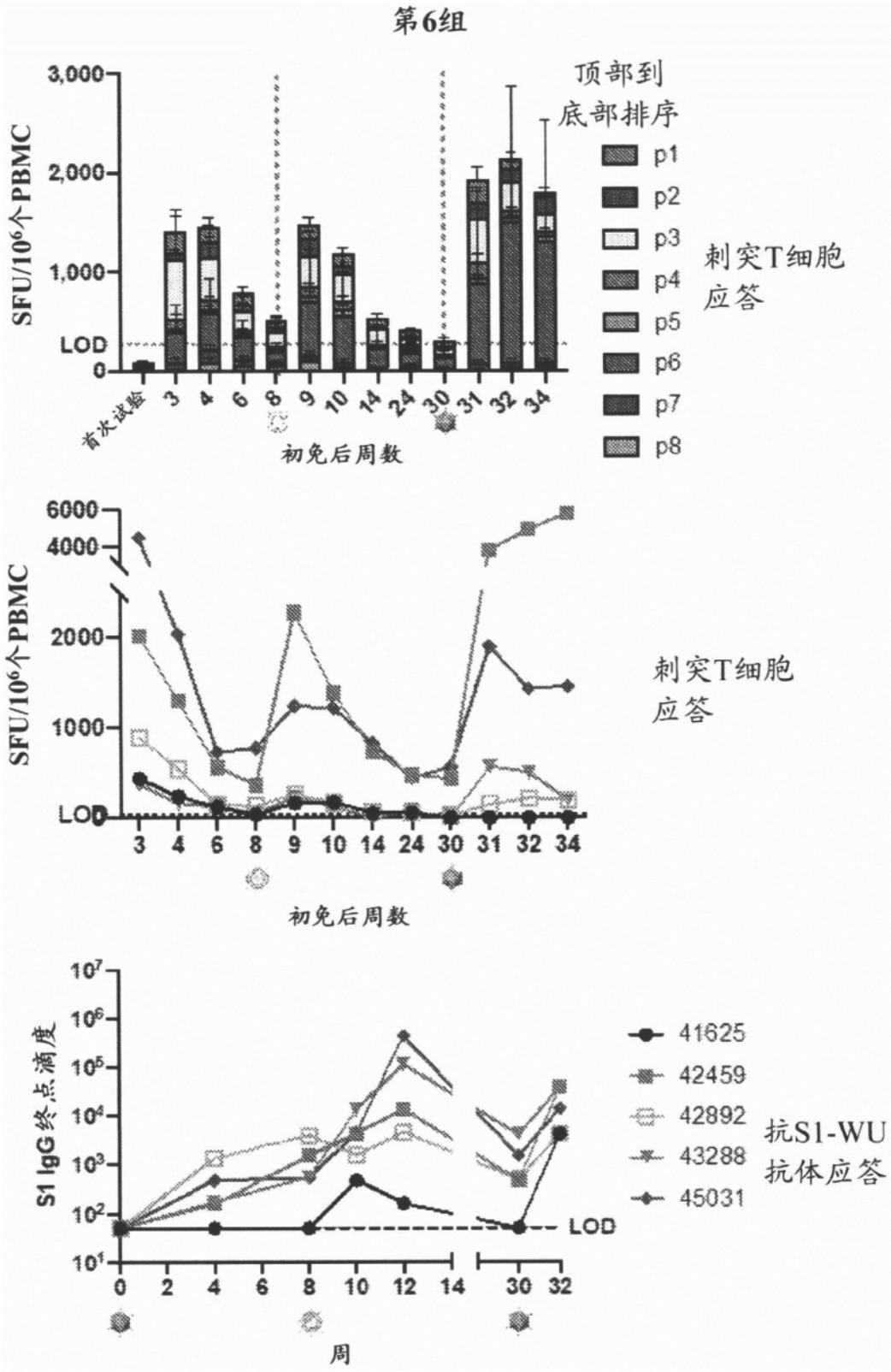

第6组
SFU/10⁶个PBMC
3,000
2,000
1,000
LOD
0
顶部到
底部排序
p1
p2
p3
p4
p5
p6
p7
p8
刺突T细胞
应答
首次试验
3 4 6 8 9 10 14 24 30 31 32 34
初免后周数
6000
4000
2000
1000
LOD
刺突T细胞
应答
初免后周数
S1 IgG终点滴度
10⁷
10⁶
10⁵
10⁴
10³
10²
10¹
41625
42459
42892
43288
45031
抗S1-WU
抗体应答
LOD
0 2 4 6 8 10 12 14 30 32
周

图35D

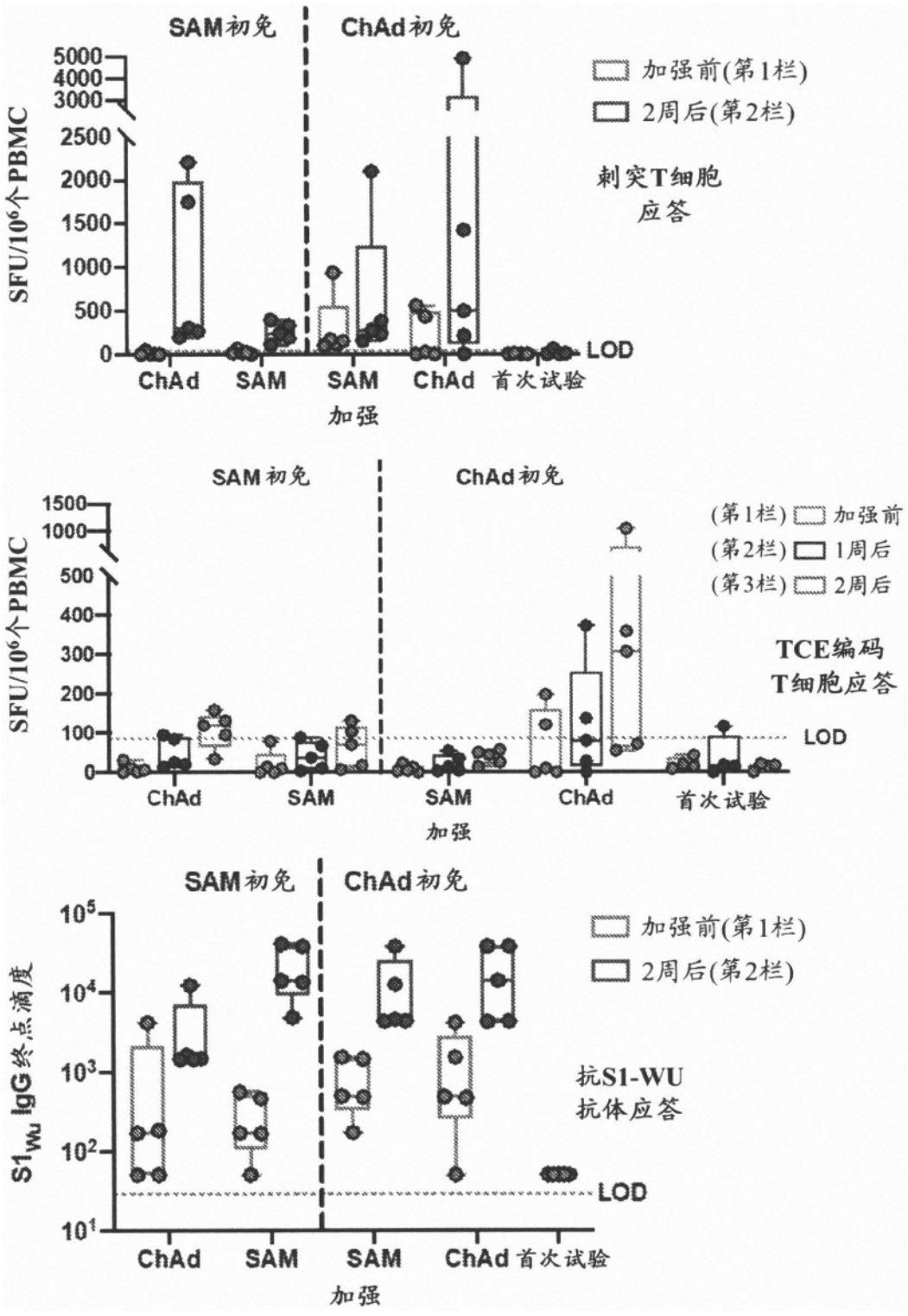

SAM初免
ChAd初免
加强前(第1栏)
2周后(第2栏)
刺突T细胞
应答
SFU/10⁶个PBMC
5000
4000
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
LOD
ChAd
SAM
SAM
ChAd
首次试验
加强
SAM初免
ChAd初免
(第1栏) 加强前
(第2栏) 1周后
(第3栏) 2周后
TCE编码
T细胞应答
SFU/10⁶个PBMC
1500
1000
500
400
300
200
100
0
LOD
ChAd
SAM
SAM
ChAd
首次试验
加强
SAM初免
ChAd初免
加强前(第1栏)
2周后(第2栏)
抗S1-WU
抗体应答
S1WU IgG终点滴度
10⁵
10⁴
10³
10²
10¹
LOD
ChAd
SAM
SAM
ChAd
首次试验
加强

图36

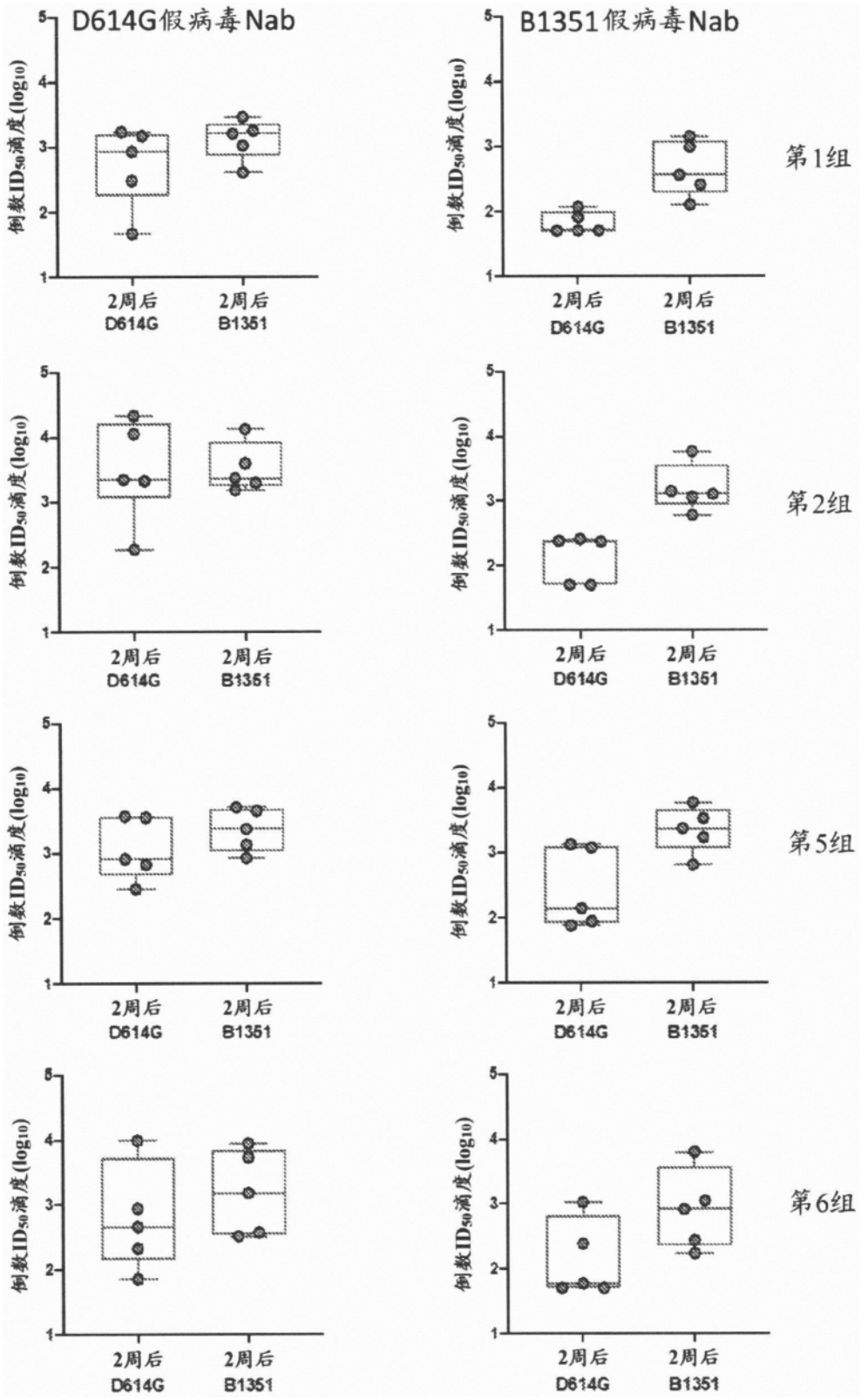

D614G假病毒Nab
B1351假病毒Nab
倒数ID50滴度(log10)
2周后
D614G
2周后
B1351
第1组
第2组
第5组
第6组

图37

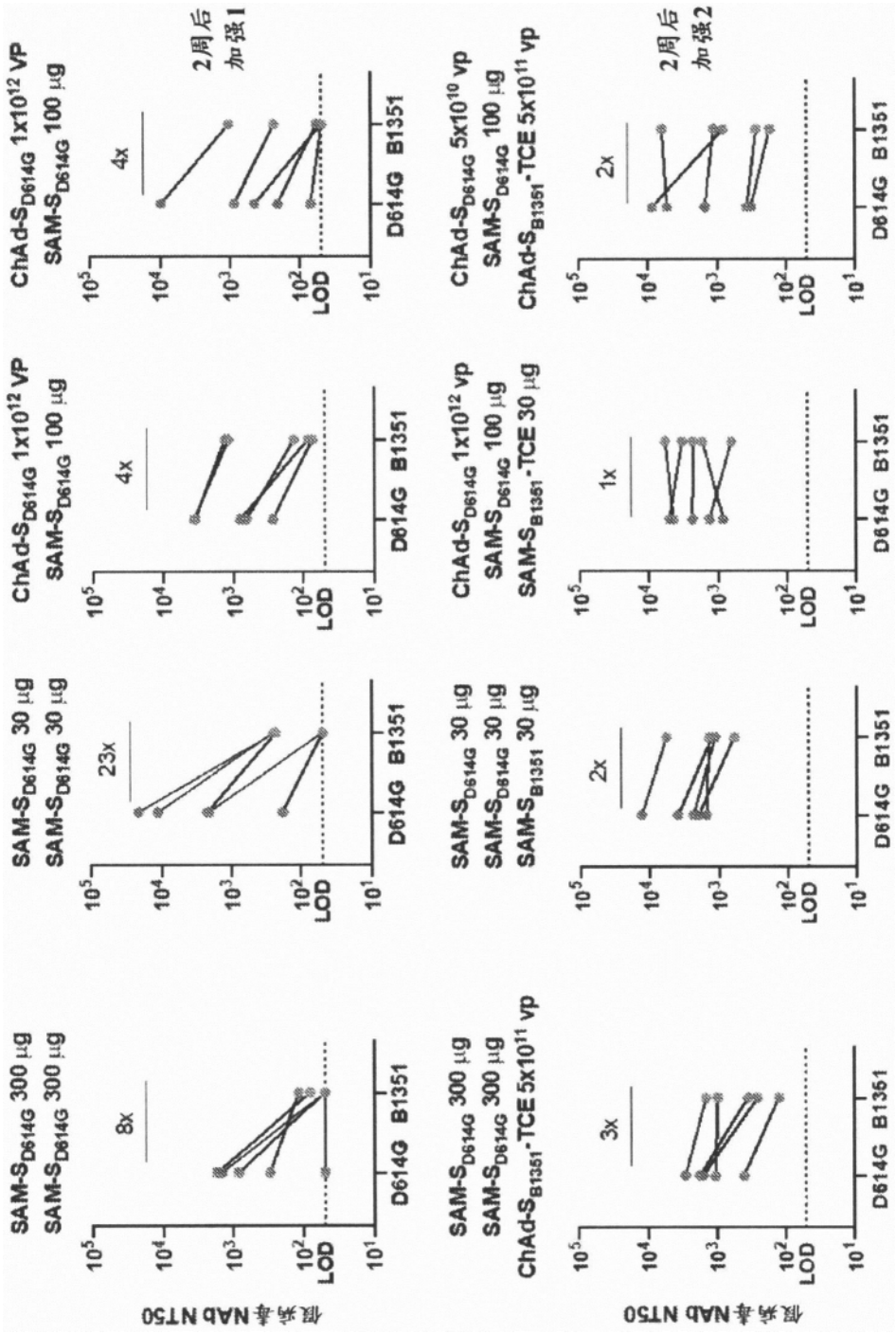

SAM-S$_{D614G}$ 300 μg
SAM-S$_{D614G}$ 300 μg
8x
SAM-S$_{D614G}$ 30 μg
SAM-S$_{D614G}$ 30 μg
23x
ChAd-S$_{D614G}$ 1x10^{12} VP
SAM-S$_{D614G}$ 100 μg
4x
ChAd-S$_{D614G}$ 5x10^{10} vp
SAM-S$_{D614G}$ 100 μg
ChAd-S$_{B1351}$-TCE 5x10^{11} vp
2周后
加强1
SAM-S$_{D614G}$ 30 μg
SAM-S$_{D614G}$ 30 μg
SAM-S$_{B1351}$ 30 μg
2x
ChAd-S$_{D614G}$ 1x10^{12} vp
SAM-S$_{D614G}$ 100 μg
SAM-S$_{B1351}$-TCE 30 μg
1x
ChAd-S$_{D614G}$ 5x10^{10} vp
SAM-S$_{D614G}$ 100 μg
ChAd-S$_{B1351}$-TCE 5x10^{11} vp
2周后
加强2
SAM-S$_{D614G}$ 300 μg
SAM-S$_{D614G}$ 300 μg
ChAd-S$_{B1351}$-TCE 5x10^{11} vp
3x
ChAd-S$_{D614G}$ 1x10^{12} VP
SAM-S$_{D614G}$ 100 μg
4x
2周后
加强1
假病毒NAb NT50
LOD
D614G B1351
假病毒NAb NT50

图38