

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-535163

(P2023-535163A)

(43)公表日 令和5年8月16日(2023.8.16)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00		4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/867	Z Z N A	4 C 0 7 6
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 C 0 8 4
C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01		4 C 0 8 5
A 6 1 P	31/14 (2006.01)	A 6 1 P	31/14		4 C 0 8 7
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全97頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-503013(P2023-503013)	(71)出願人	508029653		
(86)(22)出願日	令和3年7月15日(2021.7.15)		アンスティテュ・パストゥール		
(85)翻訳文提出日	令和5年3月10日(2023.3.10)		フランス・F-75724・パリ・セデ		
(86)国際出願番号	PCT/EP2021/069890		ックス・15・リュ・デュ・ドクトゥー		
(87)国際公開番号	WO2022/013405		ル・ルー・25-28		
(87)国際公開日	令和4年1月20日(2022.1.20)	(71)出願人	510031453		
(31)優先権主張番号	63/052,264		テラヴェクトイス		
(32)優先日	令和2年7月15日(2020.7.15)		THERAVECTYS		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		フランス国、エフ-75724 パリ・		
(31)優先権主張番号	63/130,202		セデックス 15、リュ・デュ・ドクド		
(32)優先日	令和2年12月23日(2020.12.23)		ゥール・ルー 28、パティマン・パス		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100108453		
(31)優先権主張番号	PCT/IB2021/000293		弁理士 村山 靖彦		
		(74)代理人	100110364		
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 SARS-COV-2 免疫原性組成物、ワクチン、及び方法

(57)【要約】

重症急性呼吸器症候群ベータコロナウイルス2(SARS-CoV-2)に対する防御免疫応答を誘導する方法であって、対象の上気道に有効量のSARS-CoV-2に対する防御免疫応答を誘導する薬剤を投与する工程を含む方法。重症急性呼吸器症候群ベータコロナウイルス2(SARS-CoV-2)スパイク(S)タンパク質又はその誘導體若しくは断片をコードするシュードタイプ化レンチウイルスベクター粒子の上気道への投与のための剤形。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象における重症急性呼吸器症候群ベータコロナウイルス2(SARS-CoV-2)に対する防御免疫応答を誘導及び/又は活性化する方法であって、前記対象の上気道に、有効量の、SARS-CoV-2に対する防御免疫応答を誘導する薬剤を投与する工程を含む、方法。

【請求項 2】

SARS-CoV-2に対する防御免疫応答を誘導する前記薬剤が、重症急性呼吸器症候群ベータコロナウイルス2(SARS-CoV-2)スパイク(S)タンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードするシュードタイプ化レンチウイルスベクター粒子である、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記薬剤が、エアロゾル吸入により投与される、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 4】

前記薬剤が、点鼻により投与される、請求項2に記載の方法。

【請求項 5】

前記薬剤が、経鼻吸入により投与される、請求項2に記載の方法。

【請求項 6】

処置コースが、上気道への単回投与からなるか、又は処置コースが、上気道への1回より多くの投与、特に、2回の投与を含む、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

処置コースが、筋肉内、皮内又は皮下経路等の、気道以外での少なくとも1回のプライミング投与、続いて上気道への少なくとも1回のブースティング投与を含む、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 8】

前記防御免疫応答が、前記対象におけるSARS-CoV-2中和抗体の産生を含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記中和抗体が、IgG抗体を含む、請求項8に記載の方法。

【請求項 10】

前記防御免疫応答が、前記対象におけるSARS-CoV-2 S特異的T細胞の産生を含む、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 11】

前記SARS-CoV-2 S特異的T細胞が、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、又はCD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞の両方を含む、請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

前記SARS-CoV-2 S特異的T細胞が、肺CD8⁺T細胞を含む、請求項10又は11に記載の方法。

【請求項 13】

前記SARS-CoV-2 S特異的T細胞が、IFN- γ 産生T細胞を含む、請求項10から12のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 14】

前記CD8⁺T細胞が、エフェクターメモリー(T_{em})及び/又はレジデントメモリー(T_{rm})表現型を有するT細胞を含む、請求項10から13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記SARS-CoV-2 S特異的T細胞が、嗅球に動員される、請求項10から14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記防御免疫応答が、前記対象においてSARS-CoV-2感染に関連する炎症を発症する可能性の低減をもたらす、請求項1から15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

50

前記SARS-CoV-2 Sタンパク質が、配列番号1と同一のアミノ酸配列を有し、前記SARS-CoV-2 Sタンパク質誘導体が、配列番号1と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有する、請求項2から16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

前記SARS-CoV-2 Sタンパク質が、配列番号2と同一のヌクレオチド配列を有するコード配列から発現され、前記SARS-CoV-2 Sタンパク質誘導体が、配列番号2と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列から発現される、請求項2から17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

前記SARS-CoV-2 Sタンパク質誘導体又はその断片が、ペプチド61～75(NVTWFHAIHVS GTNG(配列番号15))、ペプチド536～550(NKCVNFNFNGLTGTG(配列番号16))及びペプチド576～590(VRDPQTLEILDITPC(配列番号17))から選択されるペプチドを含む、請求項2から18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

前記SARS-CoV-2 S誘導体又はその断片が、配列番号1に対するアミノ酸の修飾を含み、前記修飾が、

(i) 986^{K→P}及び987^{V→P}、

(ii) 681^{PRRARS}686(配列番号22)→681^{PGSAGS}686(配列番号23)、並びに

(iii) 986^{K→P}、987^{V→P}、及び675^{QTQTNSPRRAR}685(配列番号24)欠失

から選択される、請求項2から18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

前記重症急性呼吸器症候群ベータコロナウイルス2(SARS-CoV-2)スパイク(S)タンパク質又はその誘導体若しくは断片が、配列番号1、5、8、11、14、108、111、114、117、及び120から選択されるアミノ酸配列を含むか、又はからなる、請求項2から20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

投与される前記レンチウイルスベクター粒子が、組込み型である、請求項2から21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

投与される前記レンチウイルスベクター粒子が、非組込み型である、請求項2から21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

投与される前記非組込み型レンチウイルス粒子が、インテグラーゼコード配列においてD64V変異を含む、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

投与される前記レンチウイルスベクター粒子が、水疱性口内炎ウイルスエンベロープ糖タンパク質(VSV-G)でシュードタイプ化されている、請求項2から24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項26】

レンチウイルスベクター粒子が、前記レンチウイルスベクター粒子及び薬学的に許容される担体を含むワクチン製剤として投与される、請求項2から25のいずれか一項に記載の方法。

【請求項27】

重症急性呼吸器症候群ベータコロナウイルス2(SARS-CoV-2)スパイク(S)タンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードするシュードタイプ化レンチウイルスベクター粒子の対象の上気道への投与のための剤形。

【請求項28】

エアロゾル吸入による投与用である、請求項27に記載の剤形。

【請求項29】

点鼻による投与用である、請求項27に記載の剤形。

10

20

30

40

50

【請求項 30】

経鼻吸入による投与用である、請求項27に記載の剤形。

【請求項 31】

前記SARS-CoV-2 Sタンパク質が、配列番号1と同一のアミノ酸配列を有し、前記SARS-CoV-2 Sタンパク質誘導体が、配列番号1と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有する、請求項27から30のいずれか一項に記載の剤形。

【請求項 32】

前記SARS-CoV-2 Sタンパク質が、配列番号2と同一のヌクレオチド配列を有するコード配列から発現され、前記SARS-CoV-2 Sタンパク質誘導体が、配列番号2と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列から発現される、請求項27から30のいずれか一項に記載の剤形。

10

【請求項 33】

前記SARS-CoV-2 Sタンパク質誘導体又はその断片が、ペプチド61~75(NVTWFHAIHVS GTNG(配列番号15))、ペプチド536~550(NKCVNFNFNGLTGTG(配列番号16))及びペプチド576~590(VRDPQTLEILDITPC(配列番号17))から選択されるペプチドを含む、請求項27から32のいずれか一項に記載の剤形。

【請求項 34】

前記SARS-CoV-2 S誘導体又はその断片が、配列番号1に対するアミノ酸の修飾を含み、前記修飾が、

(i) 986^{K→P}及び987^{V→P}、

20

(ii) 681^{PRRAR}686(配列番号22)→681^{PGSAGS}686(配列番号23)、並びに

(iii) 986^{K→P}、987^{V→P}、及び675^{QTQTNSPRRAR}685(配列番号24)欠失から選択される、請求項27から33のいずれか一項に記載の剤形。

【請求項 35】

前記重症急性呼吸器症候群ベータコロナウイルス2(SARS-CoV-2)スパイク(S)タンパク質又はその誘導体若しくは断片が、配列番号1、5、8、11、14、108、111、114、117、及び120から選択されるアミノ酸配列を含むか、又はからなる、請求項27から34のいずれか一項に記載の剤形。

【請求項 36】

投与される前記レンチウイルスベクター粒子が、組込み型である、請求項27から35のいずれか一項に記載の剤形。

30

【請求項 37】

投与される前記レンチウイルスベクター粒子が、非組込み型である、請求項27から35のいずれか一項に記載の剤形。

【請求項 38】

前記非組込み型レンチウイルス粒子が、インテグラーゼコード配列においてD64V変異を含む、請求項37に記載の剤形。

【請求項 39】

前記レンチウイルスベクター粒子が、水疱性口内炎ウイルスエンベロープ糖タンパク質(VSV-G)でシュードタイプ化されている、請求項27から38のいずれか一項に記載の剤形。

40

【請求項 40】

請求項27から39のいずれか一項に記載のSARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードするシュードタイプ化レンチウイルスベクター粒子の剤形及び上気道への投与のためのアプリケーターを含む、キット。

【請求項 41】

上気道への投与のための前記アプリケーターが、エアロゾル吸入用のアプリケーターである、請求項40に記載のキット。

【請求項 42】

上気道への投与のための前記アプリケーターが、点鼻用のアプリケーターである、請求

50

項40に記載のキット。

【請求項43】

上気道への投与のための前記アプリケーターが、経鼻吸入用のアプリケーターである、請求項470に記載のキット。

【請求項44】

pFlap-ieCMV-S2PデルタF-WPREm(CNCM I-5537)、
pFlap-ieCMV-S2P3F-WPREm(CNCM I-5538)、
pFlap-ieCMV-S2P-WPREm(CNCM I-5539)、
pFlap-ieCMV-SFL-WPREm(CNCM I-5540)、
pFlap-ieCMV-S-B1.1.7-WPREm(CNCM I-5708)、
pFlap-ieCMV-S-B351-WPREm(CNCM I-5709)、
pFlap-ieCMV-S-B351-2P-WPREm(CNCM I-5710)、
pFlap-ieCMV-SFL-D614G-WPREm(CNCM I-5711)、及び
pFlap-ieCMV-S-P1-WPREm(CNCM I-5712)

10

から選択されるベクター。

【請求項45】

請求項38に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項46】

重症急性呼吸器症候群ベータコロナウイルス2(SARS-CoV-2)スパイク(S)タンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードする、シュードタイプ化レンチウイルスベクター粒子。

20

【請求項47】

前記コードされるSARS-CoV-2スパイクタンパク質誘導体又はその断片が、請求項31、32、33、34又は35のいずれか一項に規定の通りである、請求項46に記載のシュードタイプ化レンチウイルスベクター粒子。

【請求項48】

前記SARS-CoV-2スパイクタンパク質が、配列番号1のアミノ酸配列を有するSARS-CoV-2スパイクタンパク質;配列番号1と少なくとも95%同一又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を有するSARS-CoV-2 Sタンパク質誘導体;配列番号8、配列番号11、配列番号108、配列番号111、配列番号114、配列番号117、又は配列番号120のアミノ酸配列を有するSARS-CoV-2スパイクタンパク質誘導体;配列番号8、配列番号11、配列番号108、配列番号111、配列番号114、配列番号117、又は配列番号120と少なくとも95%同一又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を有するSARS-CoV-2 Sタンパク質誘導体;及び配列番号14のアミノ酸配列を有するSARS-CoV-2スパイクタンパク質断片又は配列番号14と少なくとも95%同一若しくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を有するSARS-CoV-2 Sタンパク質誘導体から選択される、請求項46又は47に記載のシュードタイプ化レンチウイルスベクター粒子。

30

【請求項49】

請求項36、37、38、又は39のいずれか一項において規定の通りである、請求項46から48のいずれか一項に記載のシュードタイプ化レンチウイルスベクター粒子。

40

【請求項50】

重症急性呼吸器症候群ベータコロナウイルス2(SARS-CoV-2)スパイク(S)タンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードするシュードタイプ化レンチウイルスベクター粒子であって、

pFlap-ieCMV-S2PデルタF-WPREm(CNCM I-5537)、
pFlap-ieCMV-S2P3F-WPREm(CNCM I-5538)、
pFlap-ieCMV-S2P-WPREm(CNCM I-5539)、
pFlap-ieCMV-SFL-WPREm(CNCM I-5540)、
pFlap-ieCMV-S-B1.1.7-WPREm(CNCM I-5708)、
pFlap-ieCMV-S-B351-WPREm(CNCM I-5709)、

50

pFlap-ieCMV-S-B351-2P-WPREm(CNCM I-5710)、
pFlap-ieCMV-SFL-D614G-WPREm(CNCM I-5711)、及び
pFlap-ieCMV-S-P1-WPREm(CNCM I-5712)

から選択されるベクターでの宿主細胞の同時トランスフェクションを含む方法によって作製される、シュードタイプ化レンチウイルスベクター粒子。

【請求項51】

前記ベクター粒子のゲノムが、

配列番号13のS2PΔF(S2PデルタF)をコードするポリヌクレオチド又は配列番号13と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列、特に、RBDにおいて変異、特に、欠失を有するコード配列、

配列番号10のS2P3Fをコードするポリヌクレオチド又はRBDにおいて変異を有する、配列番号10と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列、特に、変異986^{K→P}及び987^{V→P}を含む、配列番号10と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列、

配列番号7のS2Pをコードするポリヌクレオチド又はRBDにおいて変異を有する、配列番号7と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列、

配列番号2のSFLをコードするポリヌクレオチド又はRBDにおいて変異を有する、配列番号2と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列、

配列番号107のS-B1.1.7をコードするポリヌクレオチド又はRBDにおいて変異を有する、配列番号107と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列、

配列番号110のS-B351をコードするポリヌクレオチド又はRBDにおいて変異を有する、配列番号110と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列、

配列番号113のS-B1.1.7 S-B351-2Pをコードするポリヌクレオチド又はRBDにおいて変異を有する、配列番号113と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列、

配列番号116のSFL-D614Gをコードするポリヌクレオチド又はRBDにおいて変異を有する、配列番号116と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列、及び

配列番号119のS-P1をコードするポリヌクレオチド又はRBDにおいて変異を有する、配列番号119と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列から選択されるポリヌクレオチドを含む、請求項46から49のいずれか一項に記載のシュードタイプ化レンチウイルスベクター粒子。

【請求項52】

請求項27から39のいずれか一項に記載の剤形又は請求項46から51のいずれか一項に記載のシュードタイプ化レンチウイルス粒子を含む免疫原性組成物。

【請求項53】

上気道以外でのプライム投与、特に、全身、特に筋肉内投与及び上気道へのブースト又は標的投与を含む、対象における重症急性呼吸器症候群ベータコロナウイルス2(SARS-CoV-2)に対する防御免疫応答の誘導及び/又は活性化における使用のための、請求項52に記載の免疫原性組成物。

【請求項54】

投与される用量又はLV粒子が、前記プライム及びブースト/標的投与工程において同一であるか、又は前記投与される用量又はLV粒子が、前記プライム及びブースト/標的投与工程において異なる、特に、上気道への前記投与の方が高くてもよい、請求項53に記載の使用のための、請求項52に記載の免疫原性組成物。

【請求項55】

前記レンチウイルスベクター粒子が、LV::SFL、特にNILV::SFLであり、投与レジメンが、全身、特にi.m.プライム及び上気道へのブースト、特にi.n.ブーストで構成される、請求項53又は54に記載の使用のための、請求項52に記載の免疫原性組成物。

【請求項56】

前記レンチウイルスベクター粒子が、LV::S2PΔF(LV::S2デルタF)若しくはNILV::S2PΔF(NILV::S2デルタF)等の、LV::S_{prefusion}、特にNILV::S_{prefusion}、又はLV::S2P3F若しくはNILV::S2P3Fであり、前記投与レジメンが、全身、特にi.m.プライム及び上気道へのブースト、特にi.n.ブーストで構成される、請求項53又は54に記載の使用のための、請求項52に記載の免疫原性組成物。

【請求項57】

対象の上気道においてSARS-CoV-2に対する、及び/又は脳においてSARS-CoV-2に対する防御免疫応答を誘導するための使用のための、請求項52に記載の免疫原性組成物。

【請求項58】

B及びT細胞応答を誘発することによって、SARS-CoV-2武漢株、SARS-CoV-2 D614G株及びSARS-CoV-2 B.1.117株の群から選択されるSARS-CoV-2を含む先祖株並びにSARS-CoV-2 P.1バリエーション等の新興SARS-CoV-2バリエーションに対する肺及び脳の交差防御免疫応答を誘導するための使用のための、請求項52に記載の免疫原性組成物。

【請求項59】

前記剤形又は前記シュードタイプ化レンチウイルス粒子が、請求項46から51のいずれか一項に記載のシュードタイプ化レンチウイルス粒子を含み、前記シュードタイプ化レンチウイルス粒子が、非組込み型である、請求項53から58に記載の使用のための、請求項52に記載の免疫原性組成物。

【請求項60】

SARS-CoV-2 S特異的T細胞、特に、肺CD8⁺T細胞及び/又はIFN-γ産生T細胞を含むSARS-CoV-2 S特異的T細胞を誘発する、SARS-CoV-2に対する防御免疫応答を誘発するための、請求項53又は58に記載の使用のための、請求項52に記載の免疫原性組成物。

【請求項61】

エフェクターメモリー(T_{em})及び/又はレジデントメモリー(T_{rm})表現型を有するT細胞を含むCD8⁺T細胞を誘発する、SARS-CoV-2に対する防御免疫応答を誘発するための、請求項53から60のいずれか一項に記載の使用のための、請求項52に記載の免疫原性組成物。

【請求項62】

前記SARS-CoV-2 S特異的T細胞が、嗅球に動員される、請求項53から61のいずれか一項に記載の使用のための、請求項52に記載の免疫原性組成物。

【請求項63】

前記重症急性呼吸器症候群ベータコロナウイルス2(SARS-CoV-2)スパイク(S)タンパク質又はその誘導体若しくは断片が、配列番号1、5、8、11、14、108、111、114、117、及び120から選択されるアミノ酸配列を含むか、又はからなる、請求項53から62のいずれか一項に記載の使用のための、請求項52に記載の免疫原性組成物。

【請求項64】

前記対象におけるSARS-CoV-2感染に関連する炎症を予防又は緩和するための、請求項53から63のいずれか一項に記載の使用のための、請求項52に記載の免疫原性組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、重症急性呼吸器症候群ベータコロナウイルス2(SARS-CoV-2)に対する防御免疫応答を誘導する方法であって、対象の上気道に有効量のSARS-CoV-2に対する防御免疫応答を誘導する薬剤を投与する工程を含む方法を提供する。本発明は、重症急性呼吸器症候群ベータコロナウイルス2(SARS-CoV-2)スパイク(S)タンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードするシュードタイプ化レンチウイルスベクター粒子の上気道への投与のための剤形を提供する。

【背景技術】

【0002】

中国、武漢で2019年の後期に出現した、新規の重症急性呼吸器症候群ベータコロナウ

10

20

30

40

50

イルス2(SARS-CoV-2)は、非常に伝染性であり、世界中に急速に広がっている(Guoら、2020)。以前に出現したSARS又は中東呼吸器症候群(MERS)コロナウイルスと比較して、SARS-CoV-2は、世界の健康に先例のない脅威をもたらし、途方もない社会経済的影響を及ぼしている。したがって、疫病の広がりを阻止し、有害な炎症及び進行性呼吸不全等の、コロナウイルス疾患2019(COVID-19)の発症を弱めるためには、SARS-CoV-2に対する有効な予防ワクチンの開発が非常に急務である(Amanat及びKrammer、2020)。肺は、SARS-CoV-2にとって好発器官であるが、SARS-CoV及び中東呼吸器症候群(MERS)-CoV(Glassら、2004;Liら、2016;Netlandら、2008)の場合と同様に、その神経向性が報告されている(Aghagoliら、2020;Fotuhiら、2020;Huら、2020;Liura、2020;Politiら、2020;Romanら、2020;von Weyhernら、2020;Whittakerら、2020)。更に、神経細胞及びグリア細胞におけるアンジオテンシン変換酵素2(ACE2)の発現が報告されている(Chenら、2020;Xu及びLazartigues、2020)。したがって、COVID-19ヒト患者は、頭痛、筋痛、嗅覚脱失、味覚異常、意識障害及び急性脳血管疾患のような症状を呈する場合がある(Bourgonjeら、2020;Huら、2020;Maoら、2020)。ウイルスは、神経播種又は血行性経路を介して脳へのアクセスを獲得することができる(Desforgeriesら、2014)。COVID-19により亡くなった患者の剖検の分析は、上咽頭及び脳にSARS-CoV-2が存在し、ウイルスが嗅粘膜の神経と粘膜の境界面を介して中枢神経系(CNS)に侵入することを示した(Meinhardtら、2020)。したがって、以下では、気道だけでなく、脳におけるCOVID-19ワクチン候補の防御特性にも焦点を当てることが重要である。

10

20

【0003】

コロナウイルスは、そのエンベロープ固定スパイク(S)糖タンパク質により特徴付けられる、エンベロープを有する非セグメントプラス鎖RNAウイルスである(Wallsら、2020)。SARS-CoV-2 S(S_{CoV-2})は、宿主細胞で発現した、カルボキシペプチダーゼアンジオテンシン変換酵素2(ACE2)を結合する、(180kDa)₃ホモ三量体クラスIウイルス融合タンパク質である。モノマーの S_{CoV-2} タンパク質は、エクトドメイン、膜貫通型アンカードメイン、及び短い内部の尾部を有する。 S_{CoV-2} は、2工程の連続的タンパク分解性切断により活性化されて、宿主細胞膜との融合を開始する。 S_{CoV-2} -ACE2相互作用に続いて、立体構造再構成が導かれ、 S_{CoV-2} の細胞外ドメインは、遍在性フューリン発現と結び付けられ、ウイルスの病理学的特性を決定する鍵となる因子である(Wangら、2020)、高度に特異的なフューリン682^{RRAR}685(配列番号99)部位でまず切断される(Guoら、2020;Wallsら、2020)。得られたサブユニットは、(i)ACE2タンパク質分解酵素ドメインに制限される原子接合を有する、ACE2受容体結合ドメイン(RBD)を宿し、NAbの、標的化された主要なB細胞エピトープをまた有する、S1(Wallsら、2020)、及び(ii)膜融合エレメントを生じる、S2から構成される。 S_{CoV-1} と同様に、S1のシェディングは、S2'と名付けられた、S2の第二のタンパク分解性切断部位797^Rにアクセス可能とする(Belouzardら、2009)。細胞又は組織タイプにより、フューリン、トリプシン、カテプシン又は膜貫通型タンパク質分解酵素であるセリントキナーゼ(TMPRSS)2若しくは4を含む、1種又は数種の宿主タンパク質分解酵素が、この第二の切断工程に関与し得る(Coutardら、2020)。Sの結果としての「融合生成性」立体構造変化は、宿主細胞膜との融合反応を開始する高度に安定な S_{CoV-2} の融合後形態をもたらす(Sternberg及びNaujokat、2020)、S2'に隣接する、融合ペプチド(FP)の曝露を導く。FPの宿主細胞/小胞膜への挿入は、融合反応、これによる宿主サイトゾルへのウイルスRNA放出をプライムする(Laiら、2017)。 S_{CoV-2} -ACE2相互作用は、SARS-CoV-2による宿主細胞感染についてこれまでに同定されている唯一の機序であるという事実、及びRBDが、多数の立体構造B細胞エピトープを含有する(Wallsら、2020)という事実により、このウイルスエンベロープ糖タンパク質が中和抗体(nAb)の主な標的となる。呼吸器多核体ウイルス、HIV、エボラウイルス、ヒトメタニューモウイルス、及びラッサウイルスを含むいくつかの他のウイルスのエンベロープ糖タンパク質と同様に(Bosら、2020)、S1B細胞エピトープの曝露をより良好に維持する可能性があり、免疫原の利用性を改善する

30

40

50

可能性がある、その融合前の立体構造下でのその立体構造動態及びその安定化を回避するためにS_{CoV-2}を操作することが可能である(McCallumら、2020)。

【0004】

いくつかのワクチン代替物は、重大な弱点を有する。具体的には、(i)弱毒化又は不活化ウイルスワクチン候補は、広範な安全性試験を必要とし、(ii)Sをコードする核酸は、長期間の防護に対する有効性が証明されておらず、(iii)タンパク質ワクチンは、アジュバント及びブーストの使用を必要とし、並びに(iv)既存の免疫が、アデノウイルスベクター等の、ウイルスベクターについて存在し、強力な抗ベクター免疫応答を生じ、それらの免疫原性を大きく低減する可能性がある(Rosenbergら、1998;Schirmbeckら、2008)。

10

【0005】

ウイルスベクターの中でも、レンチウイルスベクターは、ワクチンの対象である最大8 kbの長さの導入遺伝子の挿入に許容的であり、宿主細胞の核への遺伝子導入の顕著な可能性を有する、組み込み(ILV)及び非組み込み(NILV)形態下で存在する(Di Nunzioら、2012;Huら、2011;Kuら、2020;Zennouら、2000)。レンチベクターは、免疫細胞、特に、樹状細胞についてのin vivo向性を呈し、非複製性であり、非細胞傷害性であり、ほとんど炎症性でなく、持続性のB及びT細胞免疫を誘導する(Di Nunzioら、2012;Huら、2011;Kuら、2020;Zennouら、2000)。エンベロープ上でシュードタイプ化され、ヒト集団が、ほとんど曝露されなかった水疱性口内炎ウイルスの表面糖タンパク質を有するLVは、アデノウイルスベクターと正味対照的に、ヒトにおける特異的な既存の免疫の標的ではない(Rosenbergら、1998;Schirmbeckら、2008)。加えて、LVの安全性は、第I/II相ヒト免疫不全ウイルス(HIV)1ワクチン試験(2011-006260-52 EN)においてヒトで確立されている。

20

【0006】

SARS-CoV-2に対する防御免疫応答を誘導する組成物及び方法が必要である。本開示は、これら及び他の必要性を満たす。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】欧州特許出願第EP 2 169 073号

30

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Miyoshi Hら、1998、J Virol. 72(10):8150-7

【非特許文献2】Zuffereyら、1998、J Virol 72(12):9873-80)

【非特許文献3】Kesslerら、2007、Leukemia、21(9):1859-74

【非特許文献4】Paschenら、2004、Cancer Immunol Immunother 12(6):196-203

【非特許文献5】Dullら、1998、J Virol、72(11):8463-71

【非特許文献6】Strangら、2005、J Virol 79(3):1165-71

【非特許文献7】Relanderら、2005、Mol Ther 11(3):452-9

40

【非特許文献8】Stewartら、2009、Gene Ther、16(6):805-14

【非特許文献9】Stuartら、2011、Hum gene Ther

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

COVID-19を予防するか、又はその重症度を減少することができるワクチン候補を開発するために、(i)全長の膜固定形態のS(LV::S_{FL}/LV::S_{FL})、(ii)膜貫通型及び内部の尾部ドメインを有さない、S1-S2エクト-ドメイン(LV::S1-S2)、(iii)S1単独(LV::S1)、(iv)フューリン部位を包含する配列を欠損させ、残基K^{986P}及びV^{987P}にて置換させて、S2(2P変異)において連続プロリン残基を導入され、これにより、安定化(2P)及び融

50

合前(ΔF)形態のタンパク質をもたらす、変異 $S(LV::S_{\Delta F2P})$ をコードするLVが生成された。(i)バリエーションB1.351(いわゆる、南アフリカ又は β バリエーション)のスパイクタンパク質、(ii)バリエーションB1.1.7(いわゆる、UK又はアルファバリエーション)のスパイクタンパク質、(iii)残基 K^{986P} 及び V^{987P} にて置換された、バリエーションB1.351のスパイクタンパク質、(iv) $D614G$ 置換と組合せた、全長、膜固定形態の $S(LV::S_{FL-D614G})$ 、並びに(v)スパイクタンパク質のバリエーションP.1(いわゆる、マナウス又はガンマバリエーション)をコードするLVを含む、更なるワクチン候補が生成された。実施例に示されるデータは、特に、ベクター(i)の組込み又は非組込みバージョンのいずれかにおける $LV::S_{FL}$ 及び $LV::S_{\Delta F2P}$ が、SARS-CoV-2患者のコホートで見られるものと同等の中和活性を有する、COVID-19の病原体である、SARS-CoV-2のスパイク糖タンパク質(S)に特異的な中和抗体を誘導し、(ii)がスパイク特異的 $CD8^+T$ 細胞を誘導したことを確立した。更に、SARS-CoV-2複製に感受性の高いゴールデンハムスターを使用し、SARS-CoV-2臨床単離物の複製に対する $LV::S_{FL}$ 又は $LV::S_{\Delta F2P}$ 免疫の強い予防効果が示された。同様の結果が、ヒトACE2(hACE2)の発現が、アデノウイルスベクター血清型5(Ad5)により、気道において誘導されたマウスモデルにおいて得られた。加えて、脳におけるものを含む、SARS-CoV-2複製に対する前例のない許容性を示す、前臨床モデルとして生成されたトランスジェニックマウスにおいて、本発明者らは、 $LV::S_{\Delta F2P}$ 等のSARS-CoV-2の融合前形態のスパイク糖タンパク質をコードするLVが、SARS-CoV-2に対する気道及びCNSの実質的な防御を誘導することを示すことができた。予想外なことに、生成されたトランスジェニックマウスは、以下で提供する定義及び実験例で説明される定義によるスパイクタンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードする、開発されたLVによって、CNSの防御能に取り組むことを可能にした。加えて、本発明者らは、SARS-CoV-2の融合前形態のスパイク糖タンパク質をコードするLVの単回鼻腔内投与が、感受性ハムスターモデルにおいて、気道の実質的な防御を誘導し、肺の炎症を完全に回避することを示した。また重要なことに、 $LV::S_{FL}$ 又は $LV::S_{\Delta F2P}$ を用いた上気道粘膜のブースト/標的免疫は、生成されたトランスジェニックマウスによって構成される厳密な前臨床モデルにおいて防御有効性に役立った。提示されたウイルス学、免疫学及び病理組織学データは、(i)SARS-CoV-2に対するLVベースのワクチン接種戦略の顕著な予防効果、(ii)LVベースの免疫が、コロナウイルスに対するワクチン候補を開発するための有望な戦略を表すという事実、及び(iii)粘膜免疫が、活発な防御肺免疫及び防御CNS免疫を可能にすることを示す。感染した宿主における複数の器官についての向性を示すSARS-CoV-2の特定の状況において、レンチウイルスベクターはそのいずれの形態においても宿主細胞を標的とし、導入遺伝子、例えば、Bエпитープ及びTエпитープを有するSARS-CoV-2又はその誘導体若しくは断片のスパイクタンパク質をコードする導入遺伝子の発現を可能にするのに必須のレンチウイルス配列を有し、導入遺伝子抗原に対する免疫応答を誘導し、及び/又は活性化する能力を示した。本発明者らは、レンチウイルスベクターが、エпитープ、特に、Bエпитープの、宿主の免疫系への有効な提示を可能にするS抗原(本明細書に開示される野生型又は変異型のいずれか)の立体構造を保持するか、又は支持する能力を特に証明した。加えて、本明細書に開示される実験データは、宿主の上気道への投与工程を含む投与経路が、ウイルスにより標的とされる一部の組織又は器官における免疫応答を改善し得ることを示す。これらの結果は、驚くべきことであり、予想外である。

【0010】

実施例におけるデータはまた、SARS-CoV-2武漢又はSARS-CoV-2 P.1バリエーションでワクチン接種し、負荷したマウスにおいて検出可能な、(i)全身レベルでの、 $NILV::S_{CoV-2}$ 武漢により誘導される強力な $CD8^+T$ 細胞応答、(ii)著しい比率の、いくつかの S_{CoV-2} エпитープに特異的なIFN- γ を産生する肺 $CD8^+T$ 細胞、(iii)高い比率の、エフェクターメモリー(T_{em})及びレジデントメモリー(T_{rm})表現型を有する肺 $CD8^+T$ 細胞、(iv)嗅球における $CD8^+T$ 細胞の動員を示す。注目すべきことに、 S_{CoV-2} 武漢配列上で同定された全てのマウス及びヒト $CD8^+T$ 細胞エпитープは、変異 S_{CoV-2} マナウスP.1において保存されている。これらの知見は、顕著なB及びT細胞応答を誘発することによる、先祖及び

10

20

30

40

50

新興SARS-CoV-2バリエーションに対する肺及び脳の完全な防御を誘導する際のNILVの強力な可能性を示す。NAbの標的であるB細胞エピトープと対照的に、これまでに同定されたT細胞エピトープは、出現するバリエーションのS_{CoV-2}に蓄積される変異によって影響されていない。これらの結果は、驚くべきことであり、予想外である。

【0011】

実施例におけるデータは、(i) LV::S_{CoV-2} B1.1.7で免疫されたマウス由来の血清が、高EC₅₀で、S_{CoV-2}武漢及びLV::S_{CoV-2} B1.1.7を有するシュドウィルスと中和したが、S_{CoV-2} B1.351及びLV::S_{CoV-2} P.1を有するシュドウィルスを不十分に中和したこと

(ii) LV::S_{CoV-2} P.1で免疫されたマウス由来の血清が、高EC₅₀で、S_{CoV-2} P.1及びLV::S_{CoV-2} B1.351を有するシュドウィルスを中和したが、S_{CoV-2}武漢及びLV::S_{CoV-2} B1.1.7を有するシュドウィルスを不十分に中和したこと

(iii) LV::S_{CoV-2} B1.351で免疫されたマウス由来の血清が、高EC₅₀で、S_{CoV-2} P.1及びLV::S_{CoV-2} B1.351を有するシュドウィルスばかりでなく、S_{CoV-2}武漢及びLV::S_{CoV-2} B1.1.7を有するシュドウィルスを中和したことを更に示す。

【0012】

これらの結果は、B1.351(南アフリカ又はβ)バリエーション由来のスパイク配列を、中和抗体に関して最も交差反応性の免疫原として示す。

【0013】

更に、データは、LVの状況において、K986P-V987P置換(2P)によるスパイク安定化が、(交差)中和抗体活性を相当改善することを示した。

【0014】

データをまとめると、驚くべきことに、かつ予想外に、1種の特有な抗原が、2Pを有するB1.351(南アフリカ又はβ)バリエーション由来の全長スパイクであることを示す。

【0015】

したがって、第一の態様では、本発明は、対象の上気道に、有効量の、SARS-CoV-2に対する防御免疫応答を誘導する薬剤を投与する工程を含む、対象における重症急性呼吸器症候群ベータコロナウイルス2(SARS-CoV-2)に対する防御免疫応答を誘導する方法を提供する。ある特定の実施形態では、SARS-CoV-2に対する防御免疫応答を誘導する薬剤は、SARS-CoV-2スパイク(S)糖タンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードするシュドタイプ化LVベクター粒子である。一部の実施形態では、薬剤は、エアロゾル吸入により投与される。一部の実施形態では、薬剤は、点鼻により投与される。一部の実施形態では、薬剤は、経鼻吸入により投与される。一部の実施形態では、処置コースは、上気道への単回投与からなる。一部の実施形態では、処置コースは、気道外での少なくとも1回のプライム投与、続いて上気道への少なくとも1回のブースト投与を含む。一部の実施形態では、防御免疫応答は、対象におけるSARS-CoV-2中和抗体の産生を含む。一部の実施形態では、中和抗体は、IgG抗体を含む。一部の実施形態では、中和抗体は、IgA抗体を含む。一部の実施形態では、防御免疫応答は、対象におけるSARS-CoV-2 S特異的T細胞の産生を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 S特異的T細胞は、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、又はCD4⁺とCD8⁺T細胞の両方を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 S特異的T細胞は、肺CD8⁺T細胞を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 S特異的T細胞は、IFN-γ産生T細胞を含む。一部の実施形態では、CD8⁺T細胞は、エフェクターメモリー(T_{em})及び/又はレジデントメモリー(T_{rm})表現型を有するT細胞を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 S特異的T細胞は、嗅球に動員される。一部の実施形態では、防御免疫応答は、対象においてSARS-CoV-2感染に関連する炎症を発症する可能性の低減をもたらす。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質誘導体は、配列番号1と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質誘導体は、配列番号2と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列から発現される。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質断片は、ペプチド61~75(NVTWFHAIHVSGTNG(配列番号15))、ペプチド536~5

50(NKCVNFNFNGLTGTG(配列番号16))及びペプチド576～590(VRDPQTLEILDITPC(配列番号17))から選択されるペプチドを含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 S誘導体又はその断片は、配列番号1に対するアミノ酸の修飾を含み、修飾は、(i)986^K→^P及び987^V→^P、(ii)681^{PRRAR}S686(配列番号22)→681^{PGSAG}S686(配列番号23)、並びに(iii)986^K→^P、987^V→^P、及び675^{QTQTNSPRRAR}685(配列番号24)欠失から選択される。一部の実施形態では、重症急性呼吸器症候群ベータコロナウイルス2(SARS-CoV-2)スパイク(S)タンパク質又はその誘導体若しくは断片は、配列番号1、5、8、11、14、108、111、114、117、及び120から選択されるアミノ酸配列を含むか、又はからなる。

【0016】

10

一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片は、配列番号1を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片は、配列番号1からなる。

【0017】

一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片は、配列番号5を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片は、配列番号5からなる。

【0018】

一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片は、配列番号8を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片は、配列番号8からなる。

20

【0019】

一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片は、配列番号11を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片は、配列番号11からなる。

【0020】

一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片は、配列番号14を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片は、配列番号14からなる。

【0021】

30

一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片は、配列番号108を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片は、配列番号108からなる。

【0022】

一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片は、配列番号111を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片は、配列番号111からなる。

【0023】

一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片は、配列番号114を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片は、配列番号114からなる。

40

【0024】

一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片は、配列番号117を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片は、配列番号117からなる。

【0025】

一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片は、配列番号120を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片は、配列番号120からなる。

【0026】

50

一部の実施形態では、投与されるLVベクター粒子は、組込み型(ILV)である。一部の実施形態では、投与されるレンチウイルスベクター粒子は、欠損インテグラーゼタンパク質(NILV)を有する非組込み型である。一部の実施形態では、投与されるNILVは、インテグラーゼコード配列におけるD64V変異を含む。一部の実施形態では、投与されるLVベクター粒子は、水疱性口内炎ウイルスエンベロープ糖タンパク質(VSV-G)でシュードタイプ化される。一部の実施形態では、LVベクター粒子は、LVベクター粒子及び薬学的に許容される担体を含むワクチン製剤として投与される。

【0027】

別の態様では、本発明は、SARS-CoV-2スパイク(S)タンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードするシュードタイプ化LVベクター粒子の対象の上気道への投与のための剤形に関する。一部の実施形態では、剤形は、エアロゾル吸入による投与用である。一部の実施形態では、剤形は、点鼻による投与用である。一部の実施形態では、剤形は、経鼻吸入による投与用である。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質誘導体は、配列番号1と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質誘導体は、配列番号2と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列から発現される。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質断片は、ペプチド61~75(NVTWFHAIHVSGTNG(配列番号15))、ペプチド536~550(NKCVNFNFNGLTGTG(配列番号16))及びペプチド576~590(VRDPQTLEILDITPC(配列番号17))から選択されるペプチドを含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 S誘導体又はその断片は、配列番号1に対するアミノ酸の修飾を含み、修飾は、(i)986^{K→P}及び987^{V→P}、(ii)681^{PRRAR}S686(配列番号22)→681^{PGSAG}S686(配列番号23)、並びに(iii)986^{K→P}、987^{V→P}、及び675^{QTQTNSPRRAR}685(配列番号24)欠失から選択される。Sタンパク質の更なる誘導体及び断片は、本発明の様々な態様と共に、以下に開示される。

【0028】

一部の実施形態では、投与されるLVベクター粒子は、組込み型(ILV)である。一部の実施形態では、投与されるLVベクター粒子は、非組込み型(NILV)である。一部の実施形態では、NILV粒子は、インテグラーゼコード配列におけるD64V変異を含む。一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、水疱性口内炎ウイルスエンベロープ糖タンパク質(VSV-G)でシュードタイプ化される。

【0029】

別の態様では、キットが提供される。キットは、本明細書に開示される方法の実施における使用に適し得る。一部の実施形態では、キットは、本開示によるSARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードするシュードタイプ化LVベクター粒子の対象の上気道への投与のための剤形を含む。一部の実施形態では、投与用のアプリケーションは、エアロゾル吸入用のアプリケーションである。一部の実施形態では、対象の上気道への投与用のアプリケーションは、点鼻用のアプリケーションである。一部の実施形態では、対象の上気道への投与用のアプリケーションは、経鼻吸入用のアプリケーションである。

【0030】

新規かつ自明でない、SARS-CoV-2スパイク(S)タンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードするシュードタイプ化LVベクター粒子もまた提供される。一部の実施形態では、シュードタイプ化LVベクター粒子は、対象の上気道に投与される。一部の実施形態では、シュードタイプ化LVベクター粒子は、対象の上気道への投与後に、SARS-CoV-2感染に関連する炎症を発症する可能性の低減する防御免疫応答を誘導する。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質誘導体は、配列番号1と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質誘導体は、配列番号2と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列から発現される。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質断片は、ペプチド61~75(NVTWFHAIHVSGTNG-配列番号15)、ペプチド536~550(NKCVNFNFNGLTGTG-配列番号16)及びペプチド576~590(VRDPQTLEILDITPC-配列番号17)から選択されるペプチドを含む

。一部の実施形態では、そのSARS-CoV-2 S誘導体又は断片は、配列番号1に対するアミノ酸の修飾を含み、修飾は、(i)986^{K→P}及び987^{V→P}、(ii)681^{PRRAR}S686(配列番号22)→681^{PGSAG}S686(配列番号23)、並びに(iii)986^{K→P}、987^{V→P}、及び675^{QTQ}TNSPRRAR685(配列番号24)欠失から選択される。一部の実施形態では、LVベクター粒子は、組込み型(ILV)である。一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、非組込み型(NILV)である。一部の実施形態では、NILV粒子は、インテグラーゼコード配列においてD64V変異を含む。一部の実施形態では、LVベクター粒子は、水疱性口内炎ウイルスエンベロープ糖タンパク質(VSV-G)でシュードタイプ化される。一部の実施形態では、シュードタイプ化LVベクター粒子は、

pFlap-ieCMV-S2PΔF-WPREm(pFlap-ieCMV-S2PデルタF-WPREmとも名付けられる)(CNCM I-5537)、pFlap-ieCMV-S2P3F-WPREm(CNCM I-5538)、pFlap-ieCMV-S2P-WPREm(CNCM I-5539)、pFlap-ieCMV-SFL-WPREm(CNCM I-5540)、pFlap-ieCMV-S-B1.1.7-WPREm(CNCM I-5708)、pFlap-ieCMV-S-B351-WPREm(CNCM I-5709)、pFlap-ieCMV-S-B351-2P-WPREm(CNCM I-5710)、pFlap-ieCMV-SFL-D614G-WPREm(CNCM I-5711)、及びpFlap-ieCMV-S-P1-WPREm(CNCM I-5712)

から選択されるベクターによりコードされる、スパイクタンパク質、又はその断片若しくは誘導体と同じアミノ酸配列を有する、スパイク糖タンパク質、又はその断片若しくは誘導体をコードする。

【0031】

pFlap-ieCMV-S2PΔF-WPREm(pFlap-ieCMV-S2PデルタF-WPREmとも名付けられる)(CNCM I-5537)、pFlap-ieCMV-S2P3F-WPREm(CNCM I-5538)、pFlap-ieCMV-S2P-WPREm(CNCM I-5539)、pFlap-ieCMV-SFL-WPREm(CNCM I-5540)、pFlap-ieCMV-S-B1.1.7-WPREm(CNCM I-5708)、pFlap-ieCMV-S-B351-WPREm(CNCM I-5709)、pFlap-ieCMV-S-B351-2P-WPREm(CNCM I-5710)、pFlap-ieCMV-SFL-D614G-WPREm(CNCM I-5711)、及びpFlap-ieCMV-S-P1-WPREm(CNCM I-5712)から選択されるベクターもまた提供される。

【0032】

pFlap-ieCMV-S2PΔF-WPREm(CNCM I-5537)、pFlap-ieCMV-S2P3F-WPREm(CNCM I-5538)、pFlap-ieCMV-S2P-WPREm(CNCM I-5539)、pFlap-ieCMV-SFL-WPREm(CNCM I-5540)、pFlap-ieCMV-S-B1.1.7-WPREm(CNCM I-5708)、pFlap-ieCMV-S-B351-WPREm(CNCM I-5709)、pFlap-ieCMV-S-B351-2P-WPREm(CNCM I-5710)、pFlap-ieCMV-SFL-D614G-WPREm(CNCM I-5711)、pFlap-ieCMV-S-P1-WPREm(CNCM I-5712)から選択されるベクターを含む宿主細胞もまた提供される。一部の実施形態では、ベクターは、宿主細胞ゲノムに安定的に組込まれ、一方他の実施形態では、組込まれない。

【0033】

SARS-CoV-2スパイク(S)糖タンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードするシュードタイプ化LVベクター粒子もまた提供され、シュードタイプ化LVベクター粒子は、pFlap-ieCMV-S2PΔF-WPREm(CNCM I-5537)、pFlap-ieCMV-S2P3F-WPREm(CNCM I-5538)、pFlap-ieCMV-S2P-WPREm(CNCM I-5539)、pFlap-ieCMV-SFL-WPREm(CNCM I-5540)、pFlap-ieCMV-S-B1.1.7-WPREm(CNCM I-5708)、pFlap-ieCMV-S-B351-WPREm(CNCM I-5709)、pFlap-ieCMV-S-B351-2P-WPREm(CNCM I-5710)、pFlap-ieCMV-SFL-D614G-WPREm(CNCM I-5711)、及びpFlap-ieCMV-S-P1-WPREm(CNCM I-5712)から選択されるベクターを用いた宿主細胞の同時トランスフェクションを含む方法によって作製される。

【0034】

図面は、カラーの図面として提出される。

【図面の簡単な説明】

【0035】

10

20

30

40

50

【図1】LVによる抗S_{CoV-2} Ab応答の誘導を示す図である。(A)マウスに注射されるLVによりコードされるS_{CoV-2}タンパク質(S_{FL}、S1-S2及びS1)の3種の形態の略図。RBD、S1/S2及びS2'切断部位、融合ペプチド(FP)、膜貫通型(TM)及び短い内部の尾部(T)が示される。(B)LV免疫後の抗S_{CoV-2} Ab応答の動態。C57BL/6マウス(n=4/群)は、 1×10^7 TUの陰性対照としてのLV::GFP、LV::S1、LV::S1-S2、又はLV::S_{FL}をi.p.注入された。血清は、免疫の2、3、4及び6週後に集められた。抗S_{CoV-2} IgG応答は、ELISAにより評価され、平均エンドポイント希釈タイターとして表された。(C)LV::S_{FL}免疫により誘導される抗S_{CoV-2} Abの中和。マウス血清を血清中和アッセイにおいて評価して、50%有効な濃度(EC50)を中和するタイターを決定した。(D)様々な実験群におけるAbタイターと中和活性の間の相関。統計学的有意性は、両側スピアマンの順位相関検定により決定された。NS:有意ではない。(E) 1:40希釈での、免疫の3又は4週間後に採取したマウス血清とCrepy-en-Valois、Ile de Franceに住んでいる症状の穏やかな個体のコホートの間の直接比較。これらの患者は、医学的処置を求めず、COVID-19から回復した。結果は、ルシフェラーゼ活性の阻害の平均±SEMパーセンテージとして表される。

10

【図2】LV::S_{FL}によるT細胞応答の誘導を示す図である。C57BL/6マウス(n=3)は、 1×10^7 TUのLV::S_{FL}又は陰性対照LVでi.p.免疫された。(A)免疫の2週間後に集められた脾細胞は、S_{CoV-2}全体(1~1273 a.a.)にわたり、10個のa.a.残基により互いに重複する15merのペプチドの16種の別個のプールを使用したIFN- γ ELISPOTの対象にした。SFU=スポット形成細胞。(B)3匹のLV::S_{FL}又は対照LVで免疫されたマウスからプールされた脾細胞に適用されたELISPOTによる16種の陽性ペプチドプールの逆重畳積分。(C)免疫優性エピトープを包含する個々のペプチドを用いた刺激後のCD4⁺又はCD8⁺T脾細胞の細胞内IFN- γ 対IL-2染色。

20

【図3】気道におけるhACE2を発現するマウスモデルの設定を示す図である。(A)形質導入の2日後の、Ad5::hACE2を形質導入されたHEK293T細胞におけるRT-PCRによるhACE2発現の検出。NT:形質導入されていない。(B)C57BL/6マウスへのAd5::hACE2又は空のAd5のi.n.滴下注入の4日後に回収された肺細胞抽出物におけるウエスタンブロットによるhACE2タンパク質検出(n=2/群)。(C)CD45⁺造血細胞又はEpCam⁺上皮細胞においてフローサイトメトリーにより評価される、C57BL/6マウスへのAd5::GFP又はPBSのi.n.滴下注入の4日後に調製された肺細胞におけるGFP発現。(D) 2.5×10^9 IGUのAd5::hACE2、対照の空のAd5又はPBSを用いて事前処理され、続いて4日後に、 1×10^5 のTCID₅₀のSARS-CoV-2をi.n.接種されたマウスにおける肺ウイルス負荷量。1つの群では、Ad5::hACE2で事前処置されたマウスに同等量の熱殺傷された(HK)ウイルスを接種して、ウイルス複製の非存在下でのインプットウイルスRNAを測定した。2、4又は7dpiでの肺ホモジネートにおけるqRT-PCRによるウイルス負荷定量化。赤色の線は、検出限界を示す。(E)様々な用量のAd5::hACE2を用いた事前処置の4日後に決定された、肺におけるCD45⁺細胞のパーセンテージ。(F)様々な用量のAd5::hACE2を用いて事前処置され、続いて4日後に、 1×10^5 のSARS-CoV-2のTCID₅₀をi.n.接種されたマウスにおける肺ウイルス負荷量。ウイルス負荷量は、3dpiで決定された。

30

【図4】マウスにおけるSARS-CoV-2に対するLV::S_{FL}を用いた全身免疫の防御可能性を示す図である。(A)LVの単回i.p.注射によるワクチン接種に続くAd5::hACE2事前処置及びi.n.SARS-CoV-2負荷のタイムライン。(B)3dpiでの、ワクチン接種されていないマウス(PBS)、LV::S_{FL}又は偽ワクチン接種されたマウスにおける肺ウイルス負荷量。ウイルス負荷量における統計学的有意差は、両側独立t検定により評価された;* = p < 0.0139。

40

【図5】LV::S_{FL}を用いた鼻腔内ブーストは、マウスにおいてSARS-CoV-2に対して強力に防御することを示す図である。(A)LV、続いてAd5::hACE2事前処置及びSARS-CoV-2負荷に基づくプライム-ブーストストラテジーのタイムライン。(B)0週目にi.p.プライミングされ、3週目にi.p.又はi.n.ブースティングされたC57BL/6マウスの血清におけるELISAにより定量された、抗S_{CoV-2} IgGのタイター(左)。タイターは、ブースト(3

50

週目)及び負荷(4週目)前の平均エンドポイント希釈として決定された。 $***p < 0.001$ 、 $****p < 0.0001$;二元ANOVA、続いてシダック多重比較検定。NS:有意ではない。EC50として示される、これらの血清の中和能(右)。(C)LV::S_{FL}でプライミング(i.p.)され、ブースティングされた(i.p.又はi.n.)マウスにおける、3dpiでの肺ウイルス負荷量。偽ワクチン接種されたものは、空のLVを受けた。赤色の線は、検出限界を示す。ウイルス負荷量における統計学的有意差は、両側独立t検定により評価された; $*=p < 0.0139$ 、 $**=p < 0.0088$ 。(D)コーティングのためフォルドン三量体形成されたS_{CoV-2}の使用による、ELISAにより澄んだ肺ホモジネートにおいて決定された抗S_{CoV-2} IgG及びIgA Abのタイター。(E)1/5希釈について決定された、澄んだ肺ホモジネートの中和活性。統計学的有意差は、マン・ホイットニーのU検定により評価された($*=p < 0.0159$)。

10

【図6】LV::S_{FL}ワクチン接種は、マウスにおけるSARS-CoV-2介在性肺炎症を低減することを示す図である。(A)別個の肺自然免疫細胞サブセットを同定し、定量するためのフローサイトメトリーストラテジー。肺造血CD45⁺細胞は、表面マーカー、又は表面マーカーの組み合わせに特異的な抗体の使用によって分析され、これにより、3種の別個の経路を介して、連続的ゲーティングにより、自然免疫細胞集団の特徴決定が可能になった。細胞集団は、灰色で強調される。(B)PBSのみを受けた無感染(NI)対照と比較して、様々なプライム-ブーストレジメンに従って、偽ワクチン接種されたか、又はLV::S_{FL}でワクチン接種されたマウスにおける3dpiでのそれぞれの自然免疫サブセット対総肺CD45⁺細胞のパーセンテージ。全てのマウスは、SARS-CoV-2接種の4日前に、Ad5::hACE-2で事前処置された。(C)3dpiでの様々なプライム-ブーストレジメンに従って、偽ワクチン接種されたか、又はLV::S_{FL}でワクチン接種されたマウスにおけるサイトカイン及びケモカインmRNA発現の相対的log₂倍率変化。データは、PBSで処置された負荷されていない対照に対して正規化された。統計学的有意性は、両側独立t検定により評価された; $*=p < 0.05$ 、 $**=p < 0.01$ 、 $***=p < 0.001$ 及び $****=p < 0.0001$ 。

20

【図7】LV::S_{FL}を用いた鼻腔内ワクチン接種は、ゴールデンハムスターにおいてSARS-CoV-2に対して強力に防御することを示す図である。(A)ハムスターにおけるLV::S_{FL}プライム-ブースト/標的免疫レジメン及びSARS-CoV-2負荷のタイムライン。偽ワクチン接種されたものは、空のLVを受けた。(B)LV免疫後の抗S_{CoV-2} Ab応答の動態。血清は、プライム注射の3、5(ブースト前)、及び6(ブースト後)週後に、偽又はLVワクチン接種されたハムスターから集められた。抗S_{CoV-2} IgG応答は、ELISAにより評価され、平均エンドポイント希釈タイターとして表された。(C)ブースト後、無症状(AS)、微症候性(PS)、症候性(S)COVID-19症例又は入院した(H)ヒトのコホート由来の血清と比較して、ハムスターの血清において決定された、ブースト後/標的EC50中和タイター。(D)多様なレジメンを用いて偽又はLV::S_{FL}ワクチン接種されたハムスターにおける重量の経過観察。更に明確にするため、4dpiに至る個体のみが示される。2dpiで殺されたマウスは、0~2dpiの同じ群のそれらの対応物と同じ平均重量を有していた。(E)LV::S_{FL}でワクチン接種されたハムスターにおけるSARS-CoV-2を用いた2又は4dpiでの肺ウイルス負荷量。ウイルス負荷量における統計学的有意差は、両側独立t検定により評価された; $*=p < 0.0402$ 、 $****=p < 0.0001$ 。図S4Cも参照のこと。(F)総肺ホモジネート及び正規化された対無処置の対照においてqRT-PCRにより4dpiで決定される、LV::S_{FL}でワクチン接種され、防護されたハムスター対防護されていない偽ワクチン接種された個体におけるサイトカイン及びケモカイン発現の相対的log₂倍率変化。サイトカイン及びケモカインレベルにおける統計学的有意差は、一元ANOVAにより評価された; $*=p < 0.05$ 、 $**=p < 0.01$ 。

30

40

【図8】LV::S_{FL}ワクチン接種は、ゴールデンハムスターにおけるSARS-CoV-2介在性病理組織を低減することを示す図である。動物は、図6において詳細に記載されるものである。(A)様々なプライム-ブーストレジメンに従い、偽ワクチン接種された、又はLV::S_{FL}でワクチン接種されたマウスにおけるサイトカイン及びケモカインmRNA発現のlog₂倍率変化の決定。それぞれの構築物及びレジメンについて同じ順序の見かけを、それぞれの決定において適用する。(B)2及び4dpiについて示された組織学的解析HE&S肺。元々

50

の拡大率:×10、スケールバー:100 μm。Br:気管支又は細気管支。Bv:血管。矢印:単核炎症細胞浸潤。星印:呼吸上皮における変性変化。(C)2又は4dpiでの同じ群の個体について決定された、それぞれの定義されるパラメーターについての組織学的スコアのヒートマップ再現平均。

【図9】ゴールデンハムスターにおける全身プライム及び鼻腔内ブーストレジメンでのNILV::S_{FL}の防護有効性を示す図である。(A)ハムスターにおけるNILV::S_{FL}プライム-ブースト/標的免疫レジメン及びSARS-CoV-2負荷のタイムライン。(B)NILV::S_{FL}での単回(i.m.)注射又はプライム(i.m.)-ブースト(i.n.)後の血清抗S_{CoV-2} IgG応答の特性。抗S_{CoV-2} IgG応答は、平均エンドポイント希釈タイターとして表された。(C)対照又はNILV::S_{FL}でワクチン接種されたハムスターにおけるSARS-CoV-2を用いた4dpiでの肺ウイルス負荷量。ウイルス負荷量における統計学的有意差は、両側独立t検定により評価された; **=p<0.01。(D)ハムスターの血清において決定された、ブースト後/標的EC50中和タイター。(E)肺組織学的解析は、H&Eにより行われた。4dpiでの様々な群の個体について決定された、それぞれのパラメーターについての、組織学的スコアを再現するヒートマップ。(F、G)4dpiでのNILV::S_{FL} i.m.-NILV::S_{FL} i.n.(F)又は偽i.m.-偽i.n.(G)ハムスター由来の代表的な肺切片全体。

10

【図10】S_{FL}、S1-S2又はS1抗原をコードするLVの産生に使用されたプラスミドのマップである。

【図11】LVによりコードされるS_{FL}及びS_{ΔF2P}の略図である。RBD、S1/S2及びS2'切断部位、融合ペプチド(FP)、膜貫通型ドメイン(TM)並びに短い内部の尾部(T)、RRAR(配列番号99)フューリン切断部位を包含する675QTQTNSPRRAR685(配列番号24)配列、並びにK^{986P}及びV^{987P}連続置換が示される。

20

【図12】LV::S_{ΔF2P}の単回i.n.注射は、SARS-CoV-2に対してゴールデンハムスターを完全に防護することを示す図である。(A)ハムスターにおけるLV::S_{ΔF2P}プライム-ブーストワクチン接種レジメン及びSARS-CoV-2負荷のタイムライン。(B)ELISAにより決定された、平均エンドポイント希釈タイターとして表された血清抗S_{CoV-2} IgG応答。(C)LV::S_{ΔF2P}で免疫されたハムスターの血清及び肺ホモジネートにおいて決定された、EC50中和タイターとして表される、抗S_{CoV-2} Abの中和能。(D)4dpiでのLV::S_{ΔF2P}又は偽ワクチン接種されたハムスターにおける体重喪失のパーセンテージ。(E)4dpiでの全E又はEsg qRT-PCRにより定量された肺ウイルス負荷量。統計学的有意差は、両側独立t検定により評価された; *=p<0.0402、****=p<0.0001。赤色の線は、それぞれのアッセイの検出限界を示す。

30

【図13】LV::S_{ΔF2P}でワクチン接種されたハムスターにおける感染による肺炎の大きな低減を示す図である。(A)全肺ホモジネートから抽出され、無処置の対照由来の試料に対して正規化されたRNAの使用により4dpiで分析された、S_{ΔF2P}又は偽ワクチン接種された個体における炎症関連メディエーターの発現における相対的log₂倍率変化を再現するヒートマップ。1群当たり6匹の個々のハムスターが、ヒートマップにおいて示される。(B)4dpiでの研究としての、肺組織学的H&E分析。

【図14】SARS-CoV-2複製に対するK18-hACE2^{IP-THV}トランスジェニックマウスの肺及び脳の高い許容性を示す図である。(A)1ゲノムあたりのそれらのhACE2遺伝子コピー数を決定するためのqPCRにより行われた、15匹のN1 B6.K18-hACE2^{IP-THV}マウスの代表的な遺伝子型判定結果。(B)5~7週齢で、0.3×10⁵TCID₅₀でi.n.接種された同じマウスの表現型判定、及び従来のE特異的qRT-PCRによる、3dpiでのそれらの様々な器官におけるウイルス負荷量の決定。(C)従来のE特異的又はサブゲノムEsg特異的qRT-PCRにより、3dpiで決定された、SARS-CoV-2複製に対するK18-hACE2^{IP-THV}及びB6.K18-ACE2^{2PrImn/JAX}トランスジェニックマウス由来の多様な器官の比較許容性。赤色の線は、qRT-PCRの検出限界を示す。統計学的有意差は、マン・ホイットニーのU検定により評価された(*=p<0.01、**=p<0.00)。(D)B6.K18-hACE2^{IP-THV}及びB6.K18-ACE2^{2PrImn/JAX}トランスジェニックマウスの肺及び脳におけるhACE-2 mRNAの比較的定量。(E)3dpiでのB6.K18-hACE2^{IP-THV}及びB6.K18-ACE2^{2PrImn/JA}

40

50

Xトランスジェニックマウスの肺又は脳におけるサイトカイン及びケモカインmRNA発現の $\log_2$ 倍率変化を再現するヒートマップ。データは、無処置の対照に対して正規化された。

【図15】LV::S Δ F2Pでのワクチン接種は、K18-hACE2^{IP-THV}トランスジェニックマウスにおけるSARS-CoV-2感染から肺と中枢神経系の両方を防御することを示す図である。(A)K18-hACE2^{IP-THV}マウスにおけるプライム-ブーストLV::S Δ F2Pワクチン接種及びSARS-CoV-2負荷のタイムライン。(B)LV::S Δ F2Pでワクチン接種されたマウスにおける抗S_{CoV-2} Abの血清中和能。(C)従来のE特異的又はサブゲノムEsg特異的qRT-PCRの使用による、3dpiでの多様な器官において決定されたウイルス負荷量。赤色の線は、qRT-PCRの検出限界を示す。統計学的有意差は、マン・ホイットニーのU検定により評価された(*=p<0.01、**=p<0.001)。(D)3dpiで、LV::S Δ F2P又は偽ワクチン接種され、SARS-CoV-2を負荷されたK18-hACE2^{IP-THV}トランスジェニックマウスの肺における肺NK細胞及び好中球を同定し、定量するために決定される細胞数測定のパライミングストラテジー。NK及び好中球サブセットのパーセンテージは、全肺CD45⁺細胞に対して計算された。(E)3dpiでの、LV::S Δ F2P又は偽ワクチン接種され、SARS-CoV-2負荷されたK18-hACE2^{IP-THV}トランスジェニックマウスの脳におけるサイトカイン及びケモカインmRNA発現の相対的 $\log_2$ 倍率変化。データは、無処置の対照に対して正規化された。統計学的有意性は、両側独立t検定により評価された；*=p<0.05、**=p<0.01)。

10

【図16】i.n.経路を介したLV::S Δ F2Pでのワクチン接種は、CNSのSARS-CoV-2感染からの完全な防御を誘発することを示す図である。(A)B6.K18-hACE2^{IP-THV}マウスにおける様々なLV::S Δ F2Pワクチン接種レジメン及びSARS-CoV-2負荷のタイムライン。(B)従来のE特異的又はサブゲノムEsg特異的qRT-PCRにより決定された、3dpiでの脳におけるウイルス負荷量。赤色の線は、qRT-PCRの検出限界を示す。統計学的有意差は、マン・ホイットニーのU検定により評価された(*=p<0.01)。(C~E)LV::S Δ F2P i.m./i.n.ワクチン接種され、防御されたマウス対偽ワクチン接種され、防御されていないマウスのプールされた嗅球又は脳から抽出された細胞において、3dpiで行われた細胞数測定分析。(C)嗅球における養子免疫細胞及び(D)自然免疫細胞。(E)脳における自然免疫細胞。

20

【図17】S_{FL}、S1-S2、S1、S2P、S2P3FS Δ F2Pをコードするレンチウイルスプラスミドのマップである。

30

【図18】Ad5::hACE2で事前処置され、SARS-CoV-2を負荷されたC57BL/6マウスにおけるILV::S_{FL}又はILV::S Δ F2Pの防護の可能性の直接比較。C57BL/6マウスは、実施例1に記載される通り、i.m.プライミングされ、i.n.ブースティングされた。動物に、SARS-CoV-2がi.n.負荷され、ウイルス負荷量が、3dpiで測定された。結果は、複製ウイルスを測定するサブゲノムqRT-PCRにより評価されたとき、有意であるとみなされず、消滅しさえすべきである、2種の比較されたLV由来の構築物の間の若干の差を示す。

【図19】pFLAP K18-hACE2 WPREについてのプラスミドマップである。

【図20】pFlap-CMV-S-2019-nCoV-WPREm、pFlap-ieCMV-S2P-WPREm、pFlap-ieCMV-S2P3F-WPREm、pFlap-ieCMV-S2P- Δ F-WPREm、pFLAP K18-hACE2 WPREの配列及び導入遺伝子配列を示す図である。

40

【図21】pFlap-CMV-S-2019-nCoV-WPREm、pFlap-ieCMV-S2P-WPREm、pFlap-ieCMV-S2P3F-WPREm、pFlap-ieCMV-S2P- Δ F-WPREm、pFLAP K18-hACE2 WPREの配列及び導入遺伝子配列を示す図である。

【図22】pFlap-CMV-S-2019-nCoV-WPREm、pFlap-ieCMV-S2P-WPREm、pFlap-ieCMV-S2P3F-WPREm、pFlap-ieCMV-S2P- Δ F-WPREm、pFLAP K18-hACE2 WPREの配列及び導入遺伝子配列を示す図である。

【図23】pFlap-CMV-S-2019-nCoV-WPREm、pFlap-ieCMV-S2P-WPREm、pFlap-ieCMV-S2P3F-WPREm、pFlap-ieCMV-S2P- Δ F-WPREm、pFLAP K18-hACE2 WPREの配列及び導入遺伝子配列を示す図である。

50

【図24】 pFlap-CMV-S-2019-nCoV-WPREm、pFlap-ieCMV-S2P-WPREm、pFlap-ieCMV-S2P3F-WPREm、pFlap-ieCMV-S2P-ΔF-WPREm、pFLAP K18-hACE2 WPREの配列及び導入遺伝子配列を示す図である。

【図25】 マウスP.1 SARS-CoV-2バリエントに対するNILV::S_{CoV-2}の完全な防御能を示す図である。(A) B6.K18-hACE2^{IP-THV}マウスにおけるNILV::S_{CoV-2} i.m.-i.n.免疫及びマウスP.1 SARS-CoV-2での負荷のタイムライン(n=5/群)。脳及び肺は、3dpiで集められた。(B) 3dpiで、従来のE特異的又はサブゲノムEsg特異的qRT-PCRにより決定された、脳又は肺ウイルスRNA含有量。5匹のうち2匹の偽ワクチン接種されたマウスは、脳における高いウイルス及び同じ群における他のマウスと同等のhACE2 mRNA発現レベルにも関わらず、肺における検出可能なウイルス負荷量を有さなかった。(C) 個々のNILV::S_{CoV-2}でワクチン接種されたマウス由来の血清の、先祖武漢株又はD614G、B.1.1.7、B.1.351若しくはP.1バリエント由来のS_{CoV-2}を有するシュードウイルスに対する中和活性(EC50)。統計学的有意性は、マン・ホイットニーのU検定により評価された(*=p<0.05、**=p<0.01)。赤色のアスタリスク(下部)は、先祖武漢との有意差を示し、青色のアスタリスク(中部)は、D614Gバリエントとの有意差を示し、一方、橙色のアスタリスク(上部)は、B.1.1.7バリエントとの有意差を示す。統計上の比較は、それぞれのブースト時間点でなされた。

【図26】 T細胞応答は、SARS-CoV-2に対するNILV::S_{CoV-2}介在性防御において大きな役割を果たすことを示す図である。(A) 野生型又はμMT KOマウス(n=5~9/群)に、(図1A)に示されるタイムラインに従いLV::S_{CoV-2}又は偽が注入され、次いで、SARS-CoV-2武漢株での負荷の4日前に、Ad5::hACE2で事前処置された。肺のウイルスRNA含有量は、3dpiで決定された。統計学的有意差は、マン・ホイットニーのU検定により評価された(**=p<0.01、****=p<0.0001)。(B) S_{CoV-2} MHC-I拘束性エペトープを包含する15merのペプチドを使用した、IFN-γ ELISPOTにより評価された、NILV::S_{CoV-2}でプライムされ、ブーストされたC57BL/6 WTマウス又は偽対照におけるT脾細胞応答。(C) 示されるS_{CoV-2}由来ペプチドでのin vitro刺激後の、肺CD8⁺T細胞によるIFN-γ 応答の代表的なドットプロット。(D) LV::S i.m.-i.n.ワクチン接種されたマウス又は偽マウスにおける、肺CD8⁺Tセントラルメモリー(T_{cm}、CD44⁺CD62L⁺CD69⁻)、Tエフェクターメモリー(T_{em}、CD44⁺CD62L⁻CD69⁻)及びTレジデントメモリー(T_{rm}、CD44⁺CD62L⁻CD69⁺CD103⁺)(上部)を検出するための細胞数測定ストラテジー。

【図27】 防護された、NILV::S_{CoV-2}又は防護されていない偽ワクチン接種されたK18-hACE2^{IP-THV}マウスにおける嗅球の特性を示す図である。マウスは、図2に詳述されるものである。(A~B) NILV::S_{CoV-2} i.m.-i.n.ワクチン接種され、防護されたマウス又は防護されていない、偽ワクチン接種されたマウス由来の嗅球のCD3免疫組織化学及びSARS-CoV-2武漢を用いた3dpiでのこれらの群の代表的な結果。(C) 同じ群由来のプールされた嗅球から抽出された細胞の細胞数測定分析。(D~E) NILV::S_{CoV-2} i.m.-i.n.ワクチン接種され、防護されたマウス又は防護されていない、偽ワクチン接種されたマウス由来の嗅球の免疫組織化学によって決定されたCD3⁺T細胞の密度及びSARS-CoV-2マウスP.1を用いた3dpiでのこれらの群の代表的な結果。(E) 同じ群由来のプールされた嗅球から抽出された細胞の細胞数測定分析。

【図28】 それぞれの重要なスパイクをコードするLVでプライミングされ、ブースティングされたマウスにおける交差血清中和可能性を示す図である。(A) C57BL/6マウスにおけるi.p.-i.p.免疫のタイムライン(n=5/群)。(B) 使用された血清中和試験を示す、スキーム。(C) 個々のワクチン接種されたマウス由来の血清の、先祖武漢株又はD614G、B.1.1.7、B.1.351若しくはP.1バリエント由来のS_{CoV-2}を有するシュードウイルスに対する中和活性(EC50)。

【図29】 (交差)中和抗体活性に対するK^{986P}-V^{987P}置換(2P)によるスパイク安定化の効果を示す図である。(A) C57BL/6マウスにおけるi.p.-i.p.免疫のタイムライン(n=5/群)。(B) 個々のワクチン接種されたマウス由来の血清の、先祖武漢株又はD614G、B.1.1.7、B.1.351若しくはP.1バリエント由来のS_{CoV-2}を有するシュードウイルスに対する

中和活性(EC50)。

【図30】 pFlap-ieCMV-S-B1.1.7-WPREm、pFlap-ieCMV-S-B351-WPREm、pFlap-ieCMV-S-B351-2P-WPREm、pFlap-ieCMV-SFL-D614G-WPREm、pFlap-ieCMV-S-P1-WPREmの配列及び導入遺伝子の配列である。

【図31】 pFlap-ieCMV-S-B1.1.7-WPREm、pFlap-ieCMV-S-B351-WPREm、pFlap-ieCMV-S-B351-2P-WPREm、pFlap-ieCMV-SFL-D614G-WPREm、pFlap-ieCMV-S-P1-WPREmの配列及び導入遺伝子の配列である。

【図32】 pFlap-ieCMV-S-B1.1.7-WPREm、pFlap-ieCMV-S-B351-WPREm、pFlap-ieCMV-S-B351-2P-WPREm、pFlap-ieCMV-SFL-D614G-WPREm、pFlap-ieCMV-S-P1-WPREmの配列及び導入遺伝子の配列である。

10

【図33】 pFlap-ieCMV-S-B1.1.7-WPREm、pFlap-ieCMV-S-B351-WPREm、pFlap-ieCMV-S-B351-2P-WPREm、pFlap-ieCMV-SFL-D614G-WPREm、pFlap-ieCMV-S-P1-WPREmの配列及び導入遺伝子の配列である。

【図34】 pFlap-ieCMV-S-B1.1.7-WPREm、pFlap-ieCMV-S-B351-WPREm、pFlap-ieCMV-S-B351-2P-WPREm、pFlap-ieCMV-SFL-D614G-WPREm、pFlap-ieCMV-S-P1-WPREmの配列及び導入遺伝子の配列である。

【発明を実施するための形態】

【0036】

導入遺伝子構築物と関連する本明細書に開示される配列は、以下の通り、それらの配列番号により特定される。

20

【0037】

30

40

50

【表 1】

配列番号	起源	以下において開示される配列
1	Genbank: YP_009724390.1	テキスト
2	Genbank: YP_009724390.1	テキスト
3	pFlap-CMV-S-2019-nCoV-WPREm	図 20
4	SARS-CoV-2 S (nt)	図 20
5	SARS-CoV-2 S (aa)	図 20
6	pFlap-ieCMV-S2P-WPREm	図 21
7	S2P (nt)	図 21
8	S2P (aa)	図 21
9	pFlap-ieCMV-S2P3F-WPREm	図 22
10	S2P3F (nt)	図 22
11	S2P3F (aa)	図 22
12	pFlap-ieCMV-S2P-ΔF-WPREm	図 23
13	S2PΔF (nt)	図 23
14	S2PΔF(aa)	図 23
15	SARS-CoV-2 S - ペプチド 61~75	NVTWFHAIHVSGTNG
16	SARS-CoV-2 S - ペプチド 536~550	NKCVNFNFNGLTGTG
17	SARS-CoV-2 S - ペプチド 576~590	VRDPQTLEILDITPC
18	SARS-CoV-2 S - ペプチド 441~455	LDSKVGGNYNLYRL
19	SARS-CoV-2 S - ペプチド 671~685	CASYQTQTNSPRRAR
20	SARS-CoV-2 S - ペプチド 991~1005	VQIDRLITGRLQSLQ
21	SARS-CoV-2 S - ペプチド 256~275	SGWTAGAAAYYVGYLQPRTF
22	SARS-CoV-2 S - ペプチド 681~686	PRRARS
23	SARS-CoV-2 S - 変異型ペプチド 681~686	PGSAGS
24	SARS-CoV-2 S - ペプチド 675~685	QTQTNSPRRAR
25	pFLAP K18-hACE2 WPRE	図 24A
26	K18 プロモーター	図 24A
27	修飾されたスプライシングドナー部位	AAGTGGTAG
28	アクセプター部位	CTTTTTCCTTCCAGGT
29	hACE2 コード配列(nt)	図 24C
30	hACE2 タンパク質	図 24D
31	WPRE 野生型(nt)	図 24E
98	WPRE 変異型(nt)	図 24G
33	Kan/neoR 遺伝子のポリペプチド	図 24F

【0038】

本明細書に記載される発明は、実施例に示される強力なワクチン接種戦略に一部基づく。実施例は、ある特定の実施形態では、レンチウイルスベクター(LV)に基づく、ワクチン戦略の有用性が、コロナウイルス疾患2019(COVID-19)の病原体である、SARS-CoV-2のスパイク糖タンパク質(S)に特異的な中和抗体を誘導することができることを示す。Sの別個のバリエーションをコードするいくつかのLVの中でも、全長の膜固定S(LV::S_{FL})をコードするもの及びLV::S_{ΔF2P}(LV::S2PΔF又はLV::S2PDF又はLV::S2PデルタFとも命名される)等の変異した融合前(任意選択で、安定化される)形態をコードするものは、マウス及びハムスターにおける高い抗体タイトルのトリガーとなり、

これは、SARS-CoV-2進入のための受容体である、ヒトアンギオテンシン変換酵素2(hACE2)を発現している、宿主細胞へのin vitro及びin vivoウイルス浸潤を阻害するための実質的な能力を伴った。S特異的T細胞はまた、LV::S_{FL}又はLV::S_{ΔF2P}をワクチン接種された個体において十分に誘導された。hACE2の発現が、5型アデノウイルス(Ad5)ベクターによる気道細胞の形質導入により、又はLVベクターによりベクター化されたhACE2を用いた遺伝子組換えにより誘導されたマウス(B6.K18-hACE2^{IP-THV}マウス)において、並びにハムスターにおいて、LV::S_{FL}又はLV::S_{ΔF2P}が、全身プライム免疫、続いて鼻腔内粘膜ブースト/標的において使用されたとき、肺のSARS-CoV-2複製に対する実質的又は完全な防御効果が提供された。付与された防御により、肺の炎症を回避し、組織損傷を予防した。加えて、SARS-CoV-2複製に対する実質的な脳許容性を有するB6.K18-hACE2^{IP-THV}マウスにおいて、防御が、脳及びCNSに拡大することが示された。提示された結果は、前臨床動物モデルにおけるSARS-CoV-2に対するLVベースのワクチン接種戦略の顕著な予防効果を示し、特に、鼻腔内LV::S_{FL}ベースの免疫をCOVID-19に対する活発かつ有望なワクチンアプローチと選定する。LVベースのワクチンを用いた全身プライム後のi.n.ブーストは、脳のSARS-CoV-2複製に対する特に高い許容性を有する、SARS-CoV-2感染の厳密なモデルである、開発されたトランスジェニックモデルにおいてCNSの完全な防御に至ることが要求される。

10

【0039】

A.重症急性呼吸器症候群ベータコロナウイルス2スパイクタンパク質

本開示の様々な態様は、SARS-CoV-2 Sタンパク質を具体化する。好ましい実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質は、以下のアミノ酸配列(Genbank:YP_009724390.1;配列番号1)を含む。

20

【0040】

【化1】

```

1 MFVFLVLLPL VSSQCVNLTT RTQLPPAYTN SFTRGVYYPD KVRSSVLHS TQDLFLPFFS
61 NVTWFHAIHV SGTNGTKRFD NPVLPFNDGV YFASTEKSN IIRGWIFGTTL DSKTQSLIIV
121 NNATNVVIVK CEFQFCNDPF LGVYYHKNNK SWMESEFRVY SSANNCTFEY VSQPFLMDLE
181 GKQGNFKNLR EFVFNIDGY FKIYSKHTPI NLVRDLPPQGF SALEPLVDLP IGINITRFQT
241 LLALHRSYLT PGDSSSGWTA GAAAYYVGYL QPRTFLLKYN ENGTITDAVD CALDPLSETK
301 CTLKSFTVEK GIYQTSNFRV QPTESIVRFP NITNLCPFGE VFNATRFASV YAWNRRKRISN
361 CVADYSVLYN SASFSTFKCY GVSPTKLNLD CFTNVYADSF VIRGDEVQRQI APGQTGKIAD
421 YNYKLDDFT GCVIAWNSNN LDSKVGNYN YLYRLFRKSN LKPFERDIST EIQAGSTPC
481 NGVEGFNCYF PLQSYGFQPT NGVGYQPYRV VVLSFELLHA PATVCGPKKS TNLVKNKCVN
541 FNFNGLTGTG VLTESNKKFL PFQQFGRDIA DTTDAVRDPQ TLEILDITPC SFGGVSVITP
601 GTNTSNQVAV LYQDVNCTEV PVAIHADQLT PTWRVYSTGS NVFQTRAGCL IGAHVNNNSY
661 ECDIPGAGI CASYQTQTN PRRARSVASQ SIIAYTMSLG AENSVAYSNN SIAIPTNFTI
721 SVTTEILPVS MTKTSVDCTM YICGDSTECN NLLQYGSFC TQLNRALTGI AVEQDKNTQE
781 VFAQVKQIYK TPPIKDFGGF NFSQILPDPS KPSKRSFIED LFNKVTILAD AGFIKQYGDC
841 LGDIAARDLI CAQKFNGLTV LPPLLTDEMI AQYTSALLAG TITSGWTFGA GAALQIPFAM
901 QMAYRFNGIG VTQNVLYENQ KLIANQFNSA IGKIQDSLSS TASALGKLQD VVNQNAQALN
961 TLVKQLSSNF GAISSVLNDI LSRLDKVEAE VQIDRLITGR LQSLQTYVTQ QLIRAAEIRA
1021 SANLAATKMS ECVLGQSKRV DFCGKGYHLM SFPQSAPHGV VFLHVTYVPA QEKNFETTAPA
1081 ICHDGAHFH REGVFVSNGT HWFVTQRNFY EPQIITDNT FVSGNCDVVI GIVNNTVYDP
1141 LQPELDSFKE ELDKYFKNHT SPDVDLGDIS GINASVUNIQ KEIDRLNEVA KNLNESLIDL
1201 QELGKYEQYI KWPWYIWLGF IAGLIAIVMV TIMLCCMTSC CSCLKGCCSC GSCCKFDEDD
1261 SEPVLKGVKL HYT

```

30

40

50

【0041】

別の好ましい実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質は、アミノ酸配列(Genbank: YP_009724390.1;配列番号1)からなる。

【0042】

当業者にとって技術的に許容可能でないと明らかにならない限り、SARS-CoV-2 Sタンパク質又はSARS-CoV-2 Sタンパク質をコードするポリヌクレオチドについて本明細書に提供される定義は、配列番号1又はそれぞれ、配列番号2の配列に関して定義されるSARS-CoV-2 Sタンパク質の誘導体又は断片に同様に適用されることが、指摘される。

【0043】

一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質は、配列番号1と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列を含む。このようなSARS-CoV-2 Sタンパク質は、得られた配列が、配列番号1より短い場合、SARS-CoV-2 Sタンパク質誘導体及び/又はSARS-CoV-2 Sタンパク質断片とみなし得る。それはまた、元々同定された単離物である武漢-Hu-1(受託番号MN908947)と異なるウイルス株により発現されるSARS-CoV-2 Sタンパク質の配列であり得る。

【0044】

一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質は、配列番号1と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列からなる。このようなSARS-CoV-2 Sタンパク質は、得られた配列が、配列番号1より短い場合、SARS-CoV-2 Sタンパク質誘導体及び/又はSARS-CoV-2 Sタンパク質断片とみなし得る。それはまた、元々同定された単離物である武漢-Hu-1(受託番号MN908947)と異なるウイルス株により発現されるSARS-CoV-2 Sタンパク質の配列であり得る。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質誘導体は、配列番号1と少なくとも95%同一又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を有する。一実施形態では、SARS-CoV-2スパイクタンパク質誘導体又は断片は、配列番号8、配列番号11、配列番号108、配列番号111、配列番号114、配列番号117、若しくは配列番号120のアミノ酸配列を有するか、又はSARS-CoV-2 Sタンパク質誘導体は、配列番号8、配列番号11、配列番号108、配列番号111、配列番号114、配列番号117、若しくは配列番号120のアミノ酸配列と少なくとも95%同一若しくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を有するか、又はSARS-CoV-2スパイクタンパク質断片は、配列番号14のアミノ酸配列を有するか、又はSARS-CoV-2 Sタンパク質誘導体は、配列番号14と少なくとも95%同一若しくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を有する。

【0045】

一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質は、配列番号1に対する1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個のアミノ酸変化を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質は、配列番号1に対する1個以下、2個以下、3個以下、4個以下、5個以下、6個以下、7個以下、8個以下、9個以下又は10個以下のアミノ酸変化を有するアミノ酸配列を含む。このようなSARS-CoV-2 Sタンパク質は、得られた配列が、配列番号1より短い場合、SARS-CoV-2 Sタンパク質誘導体及び/又はSARS-CoV-2 Sタンパク質断片とみなし得る。それはまた、元々同定された単離物である武漢-Hu-1(受託番号MN908947)と異なるウイルスバリエントにより発現されるSARS-CoV-2 Sタンパク質の配列であり得る。

【0046】

一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質は、配列番号1に対する1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個のアミノ酸変化を有するアミノ酸配列からなる。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質は、配列番号1に対する1個以下、2個以下、3個以下、4個以下、5個以下、6個以下、7個以下、8個以下、9個以下又は10個以下のアミノ酸変化、特に、タンパク質における単一の位置に10個以下のアミノ酸変化を有するアミノ酸配列からなる。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質は、S2PΔF又はS2P3Fをコードするヌクレオチド配列の変異等の変異を有する。一部の実施形態では、S

10

20

30

40

50

ARS-CoV-2スパイクタンパク質は、タンパク質の受容体結合ドメインにおける変異を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2スパイクタンパク質は、D614G等の残基614での置換を有するか、又はこのような置換を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2スパイクタンパク質は、いわゆる、バリエーションSARS-CoV-2 VUI 2020 12/01 Sタンパク質において同定された変異、すなわち、欠失69～70、欠失144、N501Y、置換A570D、D614G、P681H、T716I、S982A及びD1118H等のスパイクタンパク質のアミノ酸残基の置換又は欠失による変異を有する。一部の実施形態では、SARS-CoV-2スパイクタンパク質は、配列番号108、配列番号111、配列番号114、配列番号117、又は配列番号120に存在する変異を有する。

【0047】

好ましい実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質は、Genbank:NC_045512.2(配列番号2)のヌクレオチド21563～25384を含むヌクレオチド配列によりコードされる。

【0048】

10

20

30

40

50

【化 2 A】

21541 atgtttgt ttttcttggt ttattgccac tagtctctag
 21601 tcagtgtggt aatctttacaa ccagaactca attacccoct gcatacacta attcctttcac
 21661 acgtgggtgtt tattaccctg acaaagtttt cagatccctca gttttacatt caactcagga
 21721 cttgtttctta cctttctttt ccaatgttac ttgggtccat gctatacatg tctctgggac
 21781 caatgggtact aagagggttg ataaccctgt cctaccattt aatgatgggtg tttatttttgc
 21841 ttccactgag aagtctaaca taataagagg ctggattttt ggtactactt tagattcgaa
 21901 gacccagtcc ctacttattg ttaataacgc tactaatgtt gttattaaag tctgtgaatt
 21961 tcaattttgt aatgatccat ttttgggtgt ttattaccac aaaaacaaca aaagttggat
 22021 ggaaagtgtg ttcagagttt attctagtgc gaataattgc acttttgaat atgtctctca
 22081 gccttttctt atggaccttg aaggaaaaca gggtaatttc aaaaatctta gggaatttgt
 22141 gtttaagaat attgatgggt attttaaaat atattctaag cacacgccta ttaatttagt
 22201 gcgtgatctc cctcagggtt tttcggtt agaacattg gtagatttgc caataggtat
 22261 taacatcact aggtttcaaa ctttacttgc tttacataga agttatttga ctctgggtga
 22321 ttcttcttca ggttggtgacag ctgggtgctgc agcttattat gtgggttatc ttcaacctag
 22381 gacttttctta ttaaaatata atgaaaatgg aaccattaca gatgctgtag actgtgcaact
 22441 tgaccctctc tcagaaacaa agtgtacgtt gaaatccttc actgtagaaa aaggaatcta
 22501 tcaaacttct aacttttagag tccaaccaac agaactctatt gttagatttc ctaatattac
 22561 aaacttgtgc ccttttgggt aagtttttaa cgccaccaga tttgcacatg tttatgcttg
 22621 gaacaggaag agaatcagca actgtgttgc tgattattct gtcctatata attccgcac
 22681 attttccact ttttaagtgt atggagtgtc tcctactaaa ttaaatgatc tctgctttac
 22741 taatgtctat gcagattcat ttgtaattag aggtgatgaa gtcagacaaa tcgctccagg
 22801 gcaaactgga aagattgtct attataatta taaattacca gatgatttta caggctgcgt
 22861 tatagcttgg aattctaaca atcttgattc taagggttgg ggtaattata attacctgta
 22921 tagattgttt aggaagtcta atctcaaac ttttgagaga gatatttcaa ctgaaatcta
 22981 tcaggccggt agcacacctt gtaatggtgt tgaaggtttt aattgttact ttcttttaca
 23041 atcatatggt ttccaacca ctaatggtgt tggttacca ccatcacag tagtagtact
 23101 ttcttttgaa cttctacatg caccagcaac tgtttgtgga cctaaaaagt ctactaattt
 23161 gggttaaaaac aaatgtgtca atttcaactt caatggttta acaggcacag gtgttcttac
 23221 tgagtctaac aaaaagtttc tgcctttcca acaatttggc agagacattg ctgacactac
 23281 tgatgctgtc cgtgatccac agacacttga gattcttgac attacaccat gttcttttgg
 23341 tgggtgtcagt gttataacac caggaacaaa tacttctaac cagggttctg ttctttatca
 23401 ggatgttaac tgcacagaag tccctgttgc tattcatgca gatcaactta ctctacttgc
 23461 gcgtgtttat tctacaggtt ctaatgtttt tcaaacacgt gcaggctgtt taataggggc
 23521 tgaacatgtc aacaactcat atgagtgtga cataccatt ggtgcaggta tatgcgctag
 23581 ttatcagact cagactaatt ctctcggcg ggcacgtagt gtagctagtc aatccatcat
 23641 tgcctacact atgtcacttg gtgcagaaaa ttcagttgct tactctaata actctattgc
 23701 catacccaca aattttacta ttagtggttac cacagaaatt ctaccagtgt ctatgaccaa

10

20

30

40

【0 0 4 9】

【化 2 B】

23761 gacatcagta gattgtacaa tgtacatttg tgggtgattca actgaatgca gcaatctttt
 23821 gttgcaatat ggcagttttt gtacacaatt aaaccgtgct ttaactggaa tagctgttga
 23881 acaagacaaa aacacccaag aagtttttgc acaagtcaaa caaatttaca aaacaccacc
 23941 aattaaagat tttggtggtt ttaatttttc acaaataatta ccagatccat caaaaccaag
 24001 caagaggtca tttattgaag atctactttt caacaaagtg acacttgacag atgctggctt
 24061 catcaaacaa tatggtgatt gccttggtga tattgctgct agagacctca tttgtgcaca
 24121 aaagtttaac ggcccttactg ttttgccacc tttgctcaca gatgaaatga ttgctcaata
 24181 cacttctgca ctggttagcg gtacaatcac ttctgggttg acctttggtg cagggtgctgc
 24241 attacaaata ccatttgcta tgcaaatggc ttatagggtt aatggtattg gagttacaca
 24301 gaatgttctc tatgagaacc aaaaattgat tgccaaccaa ttaatatgtg ctattggcaa
 24361 aattcaagac tcactttctt ccacagcaag tgcacttgga aaacttcaag atgtggtcaa
 24421 ccaaaatgca caagctttaa acacgcttgt taaacaactt agctccaatt ttggtgcaat
 24481 ttcaagtgtt ttaaattgata tcctttcacg tcttgacaaa gttgaggctg aagtgc aaat
 24541 tgataggttg atcacaggca gacttcaaag tttgcagaca tatgtgactc aacaattaat
 24601 tagagctgca gaaatcagag cttctgctaa tcttgctgct actaaaatgt cagagtgtgt
 24661 acttgacaaa tcaaaaagag ttgatttttg tggaaagggc tatcatctta tgccttccc
 24721 tcagtcagca cctcatggtg tagtcttctt gcatgtgact tatgtccctg cacaagaaaa
 24781 gaacttcaca actgctcctg ccatttgtca tgatggaaaa gcacactttc ctggtgaagg
 24841 tgtctttgtt tcaaatggca cacactggtt tgtaacacaa aggaattttt atgaaccaca
 24901 aatcattact acagacaaca catttgtgtc tggtaactgt gatgttgtaa taggaattgt
 24961 caacaacaca gtttatgatc ctttgcaacc tgaattagac tcattcaagg aggagttaga
 25021 taaatatattt aagaatcata catcaccaga tgttgattta ggtgacatct ctggcattaa
 25081 tgcttcagtt gtaaacattc aaaaagaaat tgaccgcctc aatgaggttg ccaagaattt
 25141 aaatgaatct ctcatcgatc tccaagaact tggaaagtat gagcagtata taaaatggcc
 25201 atggtacatt tggctagggt ttatagctgg cttgattgcc atagtaattg tgacaattat
 25261 gctttgctgt atgaccagtt gctgtagttg tctcaagggc tgttgttctt gtggatcctg
 25321 ctgcaaatat gatgaagacg actctgagcc agtgctcaaa ggagtcaaat tacattacac
 25381 ataa

10

20

30

【0050】

好ましい実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質は、Genbank:NC_045512.2(配列番号2)のヌクレオチド21563～25384からなるヌクレオチド配列によりコードされる。

【0051】

一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質は、配列番号2と少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるヌクレオチド配列によりコードされる。このようなSARS-CoV-2 Sタンパク質は、このような定義されるパーセンテージの同一性を有するヌクレオチド配列が、配列番号2より短い場合、SARS-CoV-2 Sタンパク質誘導体及び/又はSARS-CoV-2 Sタンパク質断片とみなし得る。それはまた、元々同定された単離物である武漢-Hu-1(受託番号MN908947)と異なるウイルス株を起源とするSARS-CoV-2 Sタンパク質をコードする配列であり得る。一部の実施形態では、SARS-CoV-2スパイクタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、少なくとも1個の非同義変異を包含する変異を有する。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質は、S2PΔF又はS2P3Fをコードするヌクレオチド配列の変異等の変異を有するヌクレオチド配列によりコードされる。一部の実施形態では、SARS-CoV-2スパイクタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、配列番号2

40

50

の配列における位置23403に変異を有し、コドンGGTが変異し、特に、コドンGAT(コードされるタンパク質における位置614での変異、特に、D614G置換に対応する)が置換されている。一部の実施形態では、ヌクレオチド配列は、いわゆる、バリエーションSARS-CoV-2 VUI 2020 12/01のスパイクタンパク質をコードする配列であり、スパイクタンパク質は、ヌクレオチドの置換又は欠失による複数の変異を有し、コードされるスパイクタンパク質のアミノ酸残基における以下の変化:欠失69~70、欠失144、置換N501Y、A570D、D614G、P681H、T716I、S982A及びD1118Hを導く。

【0052】

一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質は、配列番号2のコドン最適化バリエーション等の、コドン最適化されているヌクレオチド配列によりコードされる。

10

【0053】

一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質は、K986P及びV987Pアミノ酸置換を含む。

【0054】

一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質は、アミノ酸681~686が、PRRAS(配列番号22)からPGSAGS(配列番号23)に変化している、修飾を含む。

【0055】

一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質は、アミノ酸675~685(QTQTNSP RRAR(配列番号24))が欠損されている、修飾を含む。

【0056】

B.重症急性呼吸器症候群ベータコロナウイルス2(SARS-CoV-2)スパイク(S)タンパク質をコードするレンチウイルスベクター及びシュードタイプ化レンチウイルスベクター粒子

20

本発明の状況において、「レンチウイルスベクター」は、シス作用性レンチウイルスRNA又はDNA配列を含み、トランスにおいて提供されるレンチウイルスタンパク質(例えば、Gag、Pol、及び/又はEnv)を要求する、導入遺伝子を用いた宿主細胞の形質導入のための非複製性ベクターを意味する。レンチウイルスベクターは、機能的Gag、Pol、及びEnvタンパク質の発現を欠く。レンチウイルスベクターは、当該レトロウイルスベクターの産生又は開発の段階に応じて、RNA又はDNA分子の形態で存在してもよい。

【0057】

レンチウイルスベクターは、プラスミド等の、組換えDNA分子の形態であることができる。レンチウイルスベクターは、レンチウイルスの他のタンパク質の複合体内のRNA分子等の、レンチウイルスベクター粒子の形態であることができる。典型的には、修飾された、又は組換えレンチウイルス粒子に対応する、レンチウイルス粒子ベクターは、2コピーの一本鎖RNAから組成されるゲノムを含む。これらのRNA配列は、宿主細胞ゲノム(プロウイルスベクターDNA)に挿入された二本鎖DNA配列からの転写により得ることができるか、又は形質転換された宿主細胞におけるプラスミドDNA(プラスミドベクターDNA)の一過性発現から得ることができる。

30

【0058】

レンチウイルスベクター粒子は、組込みのための能力を有し得る。そうであるから、それらは、機能的インテグラーゼタンパク質を含有する。或いは、レンチウイルスベクター粒子は、組込みのための障害された能力を有するか、又は有さなくてもよい。非組込み型ベクター粒子は、レンチウイルスベクター粒子の組込み能力の大部分又は全てを排除する1個又は複数の変異を有する。例えば、非組込み型ベクター粒子は、組込み能力の低減を引き起こすレンチウイルスpol遺伝子によりコードされるインテグラーゼにおける変異を含有することができる。対照的に、組込みベクター粒子は、レンチウイルスベクター粒子の組込み能力の大部分又は全てを排除する変異を含有しない機能的インテグラーゼタンパク質を含む。

40

【0059】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、組込み型(ILV)である。

【0060】

50

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、非組込み型(NILV)である。

【0061】

レンチウイルスベクターは、レンチウイルス、特に、ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1又はHIV-2)、サル免疫不全ウイルス(SIV)、ウマ感染性脳炎ウイルス(EIAV)、ヤギ関節炎脳炎ウイルス(CAEV)、ウシ免疫不全ウイルス(BIV)及びネコ免疫不全ウイルス(FIV)に由来し、病原性に関与する遺伝的決定因子を取り除き、治療効果を得るのに有用な新規の決定因子を導入するよう修飾されている。好ましくは、レンチウイルスベクターは、HIV-1に由来する。

【0062】

このようなベクターは、シス及びトランス作用性配列の分離に基づく。複製欠損ベクターを生成するために、トランス作用性配列(例えば、gag、pol、tat、rev、及びenv遺伝子)は、導入遺伝子をコードする発現カセットにより欠損され、置換され得る。

【0063】

非分裂細胞における効率的な組込み及び複製は、一般的に、レンチウイルスゲノムの中心における2つのシス作用性配列、セントラルポリプリン配列(cPPT)及びセントラル終結配列(CTS)の存在を要求する。これらは、セントラルDNA「フラップ」と呼ばれる三本鎖DNA構造の形成を導き、核膜孔における組込み前複合体の脱コート及び樹状細胞等の、非分裂細胞の核への発現カセットの効率的な移入のシグナルとして作用する。

【0064】

一実施形態では、本発明は、特に、欧州特許出願第EP 2 169 073号に記載されるcPPT/CTS配列として言及されるセントラルポリプリン配列及びセントラル終結配列を含むレンチウイルスベクターを包含する。

【0065】

更なる配列は、ベクタープロウイルスDNA配列の宿主細胞ゲノムへの組込みに関与する長い末端反復(LTR)等の、通常、シスで存在する。ベクターは、例えば、前記LTR(Δ U3)のドメインU3におけるLTR配列を変異させることによって得られてもよい(Miyoshi Hら、1998、J Virol. 72(10):8150-7; Zuffereyら、1998、J Virol 72(12):9873-80)。

【0066】

一部の実施形態では、ベクターは、エンハンサーを含有しない。一部の実施形態では、レンチウイルスベクターは、LTR配列、好ましくは、プロモーターを取り除く変異U3領域(Δ U3)を有するLTR配列及び3'LTRにおけるエンハンサー配列を含む。

【0067】

パッケージング配列 Ψ (psi)をまた組み込んで、ポリヌクレオチド配列のベクター粒子へのキャプシド形成を助けることができる(Kesslerら、2007、Leukemia、21(9):1859-74; Paschenら、2004、Cancer Immunol Immunother 12(6):196-203)。

【0068】

一部の実施形態では、本発明は、レンチウイルスパッケージング配列 Ψ (psi)を含むレンチウイルスベクターを包含する。

【0069】

変異が、Xタンパク質ペプチドの発現を回避するために、WPREにおけるタンパク質の開始コドンに導入されている、輸送RNA結合部位若しくはプライマー結合部位(PBS)又はウッドチャック転写後制御エレメント(WPRE)野生型若しくは変異型(WPREm)等の、更なる追加の機能的配列はまた、レンチウイルスベクターポリヌクレオチド配列に含むことができ、一部の実施形態では、in vivoでの導入遺伝子のより安定的な発現を可能にする。

【0070】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターは、PBSを含む。一実施形態では、本発明は、WPRE及び/又はIRESを含むレンチウイルスベクターを包含する。

【0071】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターは、サイトメガロウイルス(CMV)最初期プロモーター、 $\beta 2m$ プロモーター又はクラスI MHCプロモーターの転写調節下に、少なくとも1種のcPPT/CTS配列、1種の Ψ 配列、1(好ましくは、2)種のLTR配列、及び導入遺伝子を含む発現カセットを含む。

【0072】

レンチウイルスベクター粒子及びレンチウイルスベクター粒子を産生する方法がまた提供される。レンチウイルスベクター粒子(又はレンチウイルス粒子ベクター)は、ウイルスタンパク質と関連してレンチウイルスベクターを含む。ベクターは、組込み型gベクター(IL)(特に、以下で説明されるトランスジェニックマウスの調製のため)であってもよい、又は特に、ヒト対象への投与のための非組込み型ベクター(NIL)であってもよい。

10

【0073】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、本明細書に開示される実施形態のいずれかによるSARS-CoV-2スタンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードする。

【0074】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、配列番号1、5、8、11、14、108、111、114、117、及び120から選択されるアミノ酸配列を含むか、又はからなるSARS-CoV-2スタンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードする。

【0075】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、配列番号1のアミノ酸配列を含むか、又はからなるSARS-CoV-2スタンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードする。

20

【0076】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、配列番号5のアミノ酸配列を含むか、又はからなるSARS-CoV-2スタンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードする。

【0077】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、配列番号8のアミノ酸配列を含むか、又はからなるSARS-CoV-2スタンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードする。

【0078】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、配列番号11のアミノ酸配列を含むか、又はからなるSARS-CoV-2スタンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードする。

30

【0079】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、配列番号14のアミノ酸配列を含むか、又はからなるSARS-CoV-2スタンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードする。

【0080】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、配列番号108のアミノ酸配列を含むか、又はからなるSARS-CoV-2スタンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードする。

40

【0081】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、配列番号111のアミノ酸配列を含むか、又はからなるSARS-CoV-2スタンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードする。

【0082】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、配列番号114のアミノ酸配列を含むか、又はからなるSARS-CoV-2スタンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードする。

【0083】

50

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、配列番号117のアミノ酸配列を含むか、又はからなるSARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードする。

【0084】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、配列番号120のアミノ酸配列を含むか、又はからなるSARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードする。

【0085】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、アミノ酸配列Genbank:YP_009724390.1(配列番号1)からなるSARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードする。

【0086】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、配列番号1と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列を含むSARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードする。このようなタンパク質S誘導体又は断片の特定の実施形態はまた、レンチウイルスベクター粒子のこれらの実施形態に包含される。

【0087】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、配列番号5、8、11、14、108、111、114、117、又は120と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列を含むSARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードする。このようなタンパク質S誘導体又は断片の特定の実施形態はまた、レンチウイルスベクター粒子のこれらの実施形態に包含される。

【0088】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、配列番号1と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列からなるSARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードする。本明細書に開示されるこのようなタンパク質S誘導体又は断片の特定の実施形態はまた、レンチウイルスベクター粒子のこれらの実施形態に包含される。

【0089】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、配列番号5、8、11、14、108、111、114、117、又は120に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列からなるSARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードする。このようなタンパク質S誘導体又は断片の特定の実施形態はまた、レンチウイルスベクター粒子のこれらの実施形態に包含される。

【0090】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、配列番号1に対する1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個のアミノ酸変化を有するアミノ酸配列を含むSARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードする。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質は、配列番号1に対する1個以下、2個以下、3個以下、4個以下、5個以下、6個以下、7個以下、8個以下、9個以下又は10個以下のアミノ酸変化を有するアミノ酸配列を含む。

【0091】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、配列番号5、8、11、14、108、111、114、117、又は120に対する1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個のアミノ酸変化を有するアミノ酸配列を含むSARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードする。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質は、配列番号1に対する1個以下、2個以下、3個以下、4個以下、5個以下、6個以下、7個以下、8個

10

20

30

40

50

以下、9個以下又は10個以下のアミノ酸変化を有するアミノ酸配列を含む。

【0092】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、配列番号1に対する1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個のアミノ酸変化を有するアミノ酸配列からなるSARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードする。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質は、配列番号1に対する1個以下、2個以下、3個以下、4個以下、5個以下、6個以下、7個以下、8個以下、9個以下又は10個以下のアミノ酸変化を有するアミノ酸配列からなる。

【0093】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、配列番号5、8、11、14、108、111、114、117、又は120に対する1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個のアミノ酸変化を有するアミノ酸配列からなるSARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードする。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質は、配列番号1に対する1個以下、2個以下、3個以下、4個以下、5個以下、6個以下、7個以下、8個以下、9個以下又は10個以下のアミノ酸変化を有するアミノ酸配列からなる。

【0094】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、S2PΔF(S2PデルタF)又はS2P3FTタンパク質誘導体に含有される変異等の変異を有するSARS-CoV-2スパイクタンパク質をコードする。

【0095】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、D614G等の残基614における置換を有するか、又はこのような置換を含む、SARS-CoV-2スパイクタンパク質をコードする。一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、いわゆる、バリエーションSARS-CoV-2 VUI 2020 12/01 Sタンパク質において同定された変異、すなわち、欠失69～70、欠失144、N501Y、置換A570D、D614G、P681H、T716I、S982A及びD1118H等のスパイクタンパク質のアミノ酸残基の置換又は欠失による変異を有するSARS-CoV-2スパイクタンパク質をコードする。

【0096】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、配列番号2を含むヌクレオチド配列によりコードされるSARS-CoV-2 Sタンパク質をコードする。

【0097】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、Genbank:NC_045512.2(配列番号2)のヌクレオチド21563～25384からなるヌクレオチド配列によりコードされるSARS-CoV-2 Sタンパク質をコードする。

【0098】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、配列番号2と少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるヌクレオチド配列を含む。

【0099】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、配列番号2の配列に対して変異を有するヌクレオチド配列によりコードされるSARS-CoV-2 Sタンパク質をコードし、変異は、少なくとも1個の非同義変異を包含する。一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、ヌクレオチド配列が、配列番号2の配列における位置23403に変異を有するSARS-CoV-2 Sタンパク質をコードし、コドンGGTは、変異し、特に、コドンGAT(配列番号1のコードされるSタンパク質における位置614での変異、特に、D614G置換に対応する)を置換している。一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、いわゆる、バリエーションSARS-CoV-2 VUI 2020 12/01のスパイクタンパク質をコードし、スパイクタンパク質は、配列番号2の配列に関してヌクレオチドの置換又は欠失による複数の変異を有し、ヌクレオチド変異は、コードされるスパイクタンパク質のアミノ酸残基における以下の変異:欠失69～70、欠失144、置換N501Y、A570D、D614G、P

10

20

30

40

50

681H、T716I、S982A及びD1118Hを導く。

【0100】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、配列番号2のコドン最適化バリエーション又はS2PΔF(S2PデルタF)若しくはS2P3F誘導体をコードするヌクレオチド配列のコドン最適化バリエーション等の、コドン最適化されているヌクレオチド配列を含む。

【0101】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、K986P及びV987Pアミノ酸置換を含むSARS-CoV-2 Sタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0102】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、アミノ酸681～686のPRRAR S(配列番号22)が、例えば、LV::S2P3FにおいてPGSAGS(配列番号23)に変化している修飾を含むSARS-CoV-2 Sタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。

10

【0103】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、アミノ酸675～685(QTQTNS PRRAR)(配列番号24)が、例えば、LV::S2PΔF(LV::S2PデルタF)において欠損している修飾を含むSARS-CoV-2 Sタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0104】

一部の実施形態では、シュードタイプ化レンチウイルスベクター粒子は、

- 配列番号13のS2PΔF(S2PデルタF)をコードするポリヌクレオチド又は配列番号13と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列、特に、RBDにおける変異、特に、欠失を有するコード配列、

20

- 配列番号10のS2P3Fをコードするポリヌクレオチド又はRBDにおける変異を有する、配列番号10と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列、特に、配列番号10と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列は、変異986K→P及び987V→Pを含む、

- 配列番号7のS2Pをコードするポリヌクレオチド又はRBDにおける変異を有する、配列番号7と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列、

- 配列番号2のSFLをコードするポリヌクレオチド又はRBDにおける変異を有する、配列番号2と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列、

- 配列番号107のS-B1.1.7をコードするポリヌクレオチド又はRBDにおける変異を有する、配列番号107と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列、

30

- 配列番号110のS-B351をコードするポリヌクレオチド又はRBDにおける変異を有する、配列番号110と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列、

- 配列番号113のS-B1.1.7 S-B351-2Pをコードするポリヌクレオチド又はRBDにおける変異を有する、配列番号113と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列、

- 配列番号116のSFL-D614Gをコードするポリヌクレオチド又はRBDにおける変異を有する、配列番号116と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列、及び

- 配列番号119のS-P1をコードするポリヌクレオチド又はRBDにおける変異を有する、配列番号119と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列から選択されるポリヌクレオチドを含む。

40

【0105】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、HIV-1 Gag及びPolタンパク質を含む。一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、サブタイプD、特に、HIV-1_{NDK}、Gag及びPolタンパク質を含む。

【0106】

一部の実施形態によると、レンチウイルスベクター粒子は、DNAプラスミドを用いて形質転換された宿主細胞において得られる。

【0107】

50

このようなDNAプラスミドは、

- 細菌の複製起源(例えば、pUC ori);
- 選択のための抗生物質耐性遺伝子(例えば、KanR);及びより具体的には:
- CMVプロモーターに転写で連結された、SARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導

体若しくは断片をコードする少なくとも1種の核酸を含むレンチウイルスベクターを含むことができる。

【0108】

このような方法により、以下の工程:

i) 適当な宿主細胞をレンチウイルスベクターでトランスフェクションする工程;

ii) 当該宿主細胞を、レトロウイルス(好ましくは、レンチウイルス)の少なくとも構造及びポリメラーゼ(+インテグラーゼ)活性をコードするウイルスDNA配列を含有するパッケージングプラスミドベクターでトランスフェクションする工程;このようなパッケージングプラスミドは、当該技術分野で記載されている(Dullら、1998、J Virol、72(11):8463-71;Zuffereyら、1998、J Virol 72(12):9873-80)、

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

iv) 当該培養された宿主細胞における工程iii)の発現及びパッケージングから得られるレンチウイルスベクター粒子を回収する工程

を含む、本発明による組換えベクター粒子の産生が可能になる。

【0109】

異なる理由のため、特に、ヒト対象への投与のため、得られたレトロウイルス粒子をシュードタイプ化する、すなわち、特定の粒子エンベロップタンパク質を付加するか、又は置換することは役立ち得る。一部の実施形態では、シュードタイプ化は、ヒト集団における既存の免疫の標的となることを回避しながら、形質導入され得る細胞タイプのスペクトルを拡大する。

【0110】

本発明のレトロウイルス粒子をシュードタイプ化するために、宿主細胞は、ウイルスエンベロップタンパク質、好ましくは、VSV-Gエンベロップタンパク質をコードする1種又はいくつかのエンベロップDNAプラスミドを用いて更にトランスフェクションすることができる。

【0111】

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

【0112】

或いは、ベクター粒子を産生する方法は、ゲノムが、以下の構成要素:レンチウイルスベクターDNA配列、パッケージング遺伝子、及びエンベロップ遺伝子のうちの1種又は複数を用いて安定的に形質転換されている宿主細胞において行われる。このようなDNA配列は、ベクター配列の転写を可能にし、粒子産生率を改善するための追加のプロモーターを含む、本発明によるプロウイルスベクターに類似するとみなされてもよい。

【0113】

好ましい実施形態では、宿主細胞は、細胞全体を膨潤又は乾燥させることなく、連続する方法で培養培地においてウイルス粒子を産生することができるよう更に改変される。ウイルス粒子を産生するためのこのような技術に関して、Strangら、2005、J Virol 79(3):1165-71;Relanderら、2005、Mol Ther 11(3):452-9;Stewartら、2009、Gene Ther、16(6):805-14;及びStuartら、2011、Hum gene Therに言及してもよい。

【0114】

本発明の目的は、レンチウイルス粒子ベクターで形質転換された宿主細胞からなる。

【0115】

レンチウイルス粒子ベクターは、既に定義された、以下のエレメント:

- cPPT/CTSポリヌクレオチド配列;及び
- $\beta 2m$ 又はMHCIプロモーターの調整下のCARをコードする核酸、及び任意選択で、
上で記載された追加の要素のうちの1種
を含むことができる。

【0116】

好ましくは、レンチウイルス粒子は、 10^6 、 2×10^6 、 5×10^6 、 10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 10^8 、 2×10^8 、 5×10^8 、又は 10^9 TUの用量である。

【0117】

本開示は、本開示によるSARS-CoV-2 Sタンパク質を生じるシュードタイプ化レンチウイルス粒子を提供する。レンチウイルスは、組込み型又は非組込み型であることができる。レンチウイルス粒子は、SARS-CoV-2 Sタンパク質を生じるシュードタイプ化レンチウイルス粒子(すなわち、「レンチウイルス粒子」)である。 10

【0118】

本開示はまた、本開示によるSARS-CoV-2 Sタンパク質を生じるレンチウイルス粒子を含む免疫原性組成物を提供する。本明細書に開示されるレンチウイルス粒子に関する全ての実施形態は、免疫原性組成物の定義に適用される。

【0119】

一部の実施形態では、免疫原性組成物は、SARS-CoV-2によるヒト対象の感染の予防方法における使用のためである。一部の実施形態では、免疫原性組成物は、SARS-CoV-2に曝露されるか、又はSARS-CoV-2が感染するリスクのあるヒト対象におけるSARS-CoV-2複製に対する防御方法における使用のためのものである。一部の実施形態では、免疫原性組成物は、SARS-CoV-2に曝露されるか、又はSARS-CoV-2が感染するリスクのあるヒト対象におけるCOVID-19等のSARS-CoV-2による感染と関連する症状の発生又は疾患の発生を予防する方法における使用のためのものである。一部の実施形態では、免疫原性組成物は、SARS-CoV-2に曝露されるか、又はSARS-CoV-2が感染するリスクのあるヒト対象におけるSARS-CoV-2による感染と関連する神経学的転帰の発症を予防する方法における使用のためのものである。一部の実施形態では、SARS-CoV-2に曝露されるか、又はSARS-CoV-2が感染するリスクのあるヒト対象の中枢神経系(CNS)を防御する方法における使用のためのものである。一部の実施形態では、開示される方法における使用のためのこれらの適用のいずれかにおいて、免疫原性組成物は、SARS-CoV-2に対する免疫応答の誘発のための有効量で、予防薬剤として対象に投与されてもよい。 20 30

【0120】

一部の実施形態では、免疫原性組成物は、SARS-CoV-2感染に対する、又はSARS-CoV-2感染と関連する症状若しくは疾患(COVID-19)の発症に対する、ヒト対象の防御方法における使用のためのものであり、対象は、肺及び/又はCNS病理発生のリスクがある。特に、ヒト対象は、合併状態、特に、CNSに罹っている合併状態に罹っているため、CNSのSARS-CoV-2複製からの免疫防御を必要とする。

【0121】

本開示はまた、本開示によるSARS-CoV-2 Sタンパク質を生じるレンチウイルス粒子及び担体を含むワクチン組成物を提供する。一部の実施形態では、ワクチンは、ワクチン接種された対象、特に、ヒト対象が、COVID-19を発症する可能性を低減する。一部の実施形態では、低減は、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、又は90%である。一部の実施形態では、ワクチンは、対象におけるCOVID-19疾患の重症度を、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、又は90%低減する。一部の実施形態では、低減は、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、又は90%である。 40

【0122】

一部の実施形態では、ワクチンは、SARS-CoV-2による感染に対する防御、特に、無菌化防御をもたらす。一部の実施形態では、ワクチンは、免疫原性組成物に関して、本明 50

細書に開示される方法において使用するものである。

【0123】

本明細書に開示される免疫原性組成物及びワクチンは、本明細書に開示される投与経路及び投与レジメンに従い、特に、以下のCに開示される特定の実施形態に従い、特に、説明される実施形態に従い、投与されてもよい。

【0124】

C.重症急性呼吸器症候群ベータコロナウイルス2(SARS-CoV-2)に対する防御免疫応答を誘導し、及び/又は活性化する方法

対象の上気道への、有効量のSARS-CoV-2に対する防御免疫応答を誘導する薬剤を投与する工程を含む、重症急性呼吸器症候群ベータコロナウイルス2(SARS-CoV-2)に対する防御免疫応答を誘導するか、又は活性化する方法もまた提供される。ある特定の実施形態では、SARS-CoV-2に対する防御免疫応答を誘導する薬剤は、重症急性呼吸器症候群ベータコロナウイルス2(SARS-CoV-2)スパイク(S)タンパク質又はその誘導體若しくは断片をコードするシュードタイプ化レンチウイルスベクター粒子である。本明細書における方法の本開示は、同様に、本開示に開示される方法における使用のための免疫原性組成物又は本開示に開示される方法における使用のためのワクチンに適用可能である。

【0125】

一部の実施形態では、薬剤は、鼻吸入により投与される。

【0126】

本明細書に使用される場合、「上気道に投与される」は、上気道の粘膜裏層への送達をもたらす任意のタイプの投与を含み、特に、鼻への投与を含む。上気道への投与は、エアロゾル吸入、点鼻、経鼻吸入、及び全てのその組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、投与は、エアロゾル吸入による。一部の実施形態では、投与は、点鼻による。一部の実施形態では、投与は、経鼻吸入による。

【0127】

一部の実施形態では、処置コースは、上気道への単回投与からなる。一部の実施形態では、処置コースは、複数回の上気道への投与を含む。一部の実施形態では、処置コースは、上気道への少なくとも1回の投与及び気道以外での少なくとも1回の投与を含む。一部の実施形態では、処置コースは、気道以外の経路を介した少なくとも1回のプライミング投与、続いて上気道への少なくとも1回のブースティング投与を含む。気道以外での投与は、筋肉内、皮内又は皮下であってもよい。一部の実施形態では、処置コースは、少なくともプライム/ブースト又はプライム/標的投与を含む。一部の実施形態では、投与レジメンは、全身(特に、筋肉内)投与等の、上気道以外でのプライム投与及び上気道へのブースト又は標的投与を含むか、又はからなる。投与される薬剤の用量は、プライム及びブースト/標的投与工程における用量と同一であってもよいが、又は異なってもよく、特に、上気道への投与の方がより高くてもよい。上気道への投与の詳細は、以下で提供される。

【0128】

特定の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、LV::SFL、特に、NILV::SFLであり、投与レジメンは、全身プライム、特に、i.m.プライム及び特に、i.n.ブーストによる上気道へのブーストで構成される。

【0129】

特定の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、LV::S2PΔF若しくはNILV::S2PΔF、又はLV::S2P3F若しくはNILV::S2P3F等の、LV::Sprefusion、特に、NILV::Sprefusionであり、投与レジメンは、全身プライム、特に、i.m.プライム及び特に、i.n.ブーストによる上気道へのブーストで構成される。

【0130】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、

- 配列番号13のS2PΔF(S2PデルタF)をコードするポリヌクレオチド又は配列番号13と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列、特に、RBDにおける変

10

20

30

40

50

異、特に、欠失を有するコード配列、

- 配列番号10のS2P3Fをコードするポリヌクレオチド又はRBDにおける変異を有する、配列番号10と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列、特に、配列番号10と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列は、変異986K→P及び987V→Pを含む、

- 配列番号7のS2Pをコードするポリヌクレオチド又はRBDにおける変異を有する、配列番号7と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列、

- 配列番号2のSFLをコードするポリヌクレオチド又はRBDにおける変異を有する、配列番号2と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列、

- 配列番号107のS-B1.1.7をコードするポリヌクレオチド又はRBDにおける変異を有する、配列番号107と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列、

- 配列番号110のS-B351をコードするポリヌクレオチド又はRBDにおける変異を有する、配列番号110と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列、

- 配列番号113のS-B1.1.7 S-B351-2Pをコードするポリヌクレオチド又はRBDにおける変異を有する、配列番号113と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列、

- 配列番号116のSFL-D614Gをコードするポリヌクレオチド又はRBDにおける変異を有する、配列番号116と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列、及び

- 配列番号119のS-P1をコードするポリヌクレオチド又はRBDにおける変異を有する、配列番号119と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列から選択されるポリヌクレオチドを含む。

【0131】

一部の実施形態では、防御免疫応答は、対象におけるSARS-CoV-2中和抗体の産生を含む。一部の実施形態では、中和抗体は、IgG抗体を含む。一部の実施形態では、防御免疫応答は、対象におけるSARS-CoV-2 S特異的T細胞の産生を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 S特異的T細胞は、CD4⁺T細胞を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 S特異的T細胞は、CD8⁺T細胞を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 S特異的T細胞は、CD4⁺T細胞及びCD8⁺T細胞を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 S特異的T細胞は、肺CD8⁺T細胞を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 S特異的T細胞は、IFN-γ産生T細胞を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 S特異的T細胞は、エフェクターメモリー(T_{em})及び/又はレジデントメモリー(T_{rm})表現型を有するT細胞を含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 S特異的T細胞は、嗅球に動員される。一部の実施形態では、防御免疫応答は、SARS-CoV-2感染のうちの少なくとも1つの症状の発症を低減する。一部の実施形態では、防御免疫応答は、感染した対象が、SARS-CoV-2感染のうちの少なくとも1つの症状に罹患する期間を低減する。一部の実施形態では、防御免疫応答は、対象におけるSARS-CoV-2感染に関連する炎症を発症する可能性を低減する。

【0132】

様々な実施形態では、シュードタイプ化レンチウイルスベクター粒子は、レンチウイルスベクター粒子の説明に関する上の実施形態で本明細書に開示される、任意の重症急性呼吸器症候群ベータコロナウイルス2(SARS-CoV-2)スパイク(S)タンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードしてもよい。

【0133】

一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質誘導体は、配列番号1と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質誘導体は、配列番号2と少なくとも80%同一のヌクレオチド配列を有するコード配列から発現される。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 Sタンパク質断片は、ペプチド61~75(NVTWFAIHVSGTNG(配列番号15))、ペプチド536~550(NKCVNFNFNGLTGTG(配列番号16))及びペプチド576~590(VRDPQTLEILDITPC(配列番号17))から選択され

10

20

30

40

50

るペプチドを含む。一部の実施形態では、SARS-CoV-2 S誘導体又はその断片は、配列番号1に対するアミノ酸の修飾を含み、修飾は、(i)986^{K→P}及び987^{V→P}、(ii)681^{PR}RARS686(配列番号22)→681^{PGSAGS}686(配列番号23)、並びに(iii)986^{K→P}、987^{V→P}、及び675QTQTNSPRRAR685(配列番号24)欠失から選択される。一部の実施形態では、重症急性呼吸器症候群ベータコロナウイルス2(SARS-CoV-2)スパイク(S)タンパク質又はその誘導体若しくは断片は、配列番号1、5、8、11、14、108、111、114、117、及び120から選択されるアミノ酸配列を含むか、又はからなる。

【0134】

一部の実施形態では、投与されるレンチウイルスベクター粒子は、組込み型である。一部の実施形態では、投与されるレンチウイルスベクター粒子は、非組込み型である。一部の実施形態では、投与される非組込み型レンチウイルス粒子は、インテグラーゼコード配列におけるD64V変異を含む。一部の実施形態では、投与されるレンチウイルスベクター粒子は、水疱性口内炎ウイルスエンベロープ糖タンパク質(VSV-G)でシュードタイプ化されている。一部の実施形態では、レンチウイルスベクター粒子は、レンチウイルスベクター粒子及び薬学的に許容される担体を含むワクチン製剤として投与される。

10

【0135】

一部の実施形態では、レンチベクターは、重症急性呼吸器症候群ベータコロナウイルス2(SARS-CoV-2)スパイク(S)タンパク質又はその誘導体若しくは断片の高発現をもたらす、誘導される免疫応答による排除に十分な量の発現をもたらすプロモーターを含有する。一部の実施形態では、プロモーターは、挿入作用を回避するためのエンハンサーエレメントを欠く。

20

【0136】

一部の実施形態では、投与の4日後のマウス又はハムスター動物モデルの細胞において組込まれたレンチウイルスDNAのうちの少なくとも95%、99%、99.9%、又は99.99%は、投与の21日後までに排除される。

【0137】

一部の実施形態では、レンチベクター粒子は、 10^6 、 2×10^6 、 5×10^6 、 10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 10^8 、 2×10^8 、 5×10^8 、又は 10^9 TUの用量である。

【0138】

レンチウイルスベクターにより誘導される免疫応答は、B細胞応答、CD4⁺T細胞応答、及び/又はCD8⁺T細胞応答であることができる。

30

【0139】

したがって、本発明は、特に、上気道への投与のための医薬又はワクチンとして有用であるベクターを提供する。

【0140】

開示されるレンチウイルスベクターは、メモリーCTL応答を含む、B細胞応答、CD4⁺T細胞応答、及び/又はCD8⁺T細胞応答を誘導するか、改善するか、又は一般に、B細胞応答、CD4⁺T細胞応答、及び/又はCD8⁺T細胞応答の発生と関連する能力を有する。

【0141】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターは、アジュバント、他の免疫原性組成物、及び/又は任意の他の治療処置と組み合わせて使用される。

40

【0142】

一部の実施形態によると、本明細書で定義されるか、又は説明される免疫原性組成物は、対象のSARS-CoV-2に対する、上気道及び/又は脳におけるSARS-CoV-2に対する防御免疫応答を誘導するために使用するためのものである。

【0143】

一部の実施形態によると、免疫原性組成物は、B及びT細胞応答を誘発することによる、SARS-CoV-2武漢株、SARS-CoV-2 D614G株及びSARS-CoV-2 B.1.117株の群から選択されるSARS-CoV-2を含む先祖並びにSARS-CoV-2 P.1バリエーション等の新興SARS-CoV-2バリエーションに対する肺及び脳の交差防御免疫応答を誘導するために使用するた

50

めのものである。

【0144】

一部の実施形態によると、免疫原性組成物は、本明細書に定義される使用のためのものであり、剤形又はシュードタイプ化レンチウイルス粒子が、本明細書で定義されるシュードタイプ化レンチウイルス粒子を含み、シュードタイプ化レンチウイルス粒子は、非組込み型であることを特徴とする。

【0145】

一部の実施形態では、これらの免疫原性組成物は、SARS-CoV-2に対する防御免疫応答を誘発するために使用するためのものであり、応答は、SARS-CoV-2 S特異的T細胞、特に、肺CD8⁺T細胞及び/又はIFN- γ 産生T細胞を含むSARS-CoV-2 S特異的T細胞を誘発する。

10

【0146】

一部の実施形態によると、免疫原性組成物は、SARS-CoV-2に対する防御免疫応答を誘発するために使用するためのものであり、応答は、エフェクターメモリー(T_{em})及び/又はレジデントメモリー(T_{rm})表現型を有するT細胞を含むCD8⁺T細胞を誘発する。

【0147】

一部の実施形態によると、免疫原性組成物は、本明細書に定義される使用するためのものであり、SARS-CoV-2 S特異的T細胞は、嗅球に動員される。

【0148】

一部の実施形態によると、本発明による使用のための免疫原性組成物は、重症急性呼吸器症候群ベータコロナウイルス2(SARS-CoV-2)スパイク(S)タンパク質又はその誘導体若しくは断片が、配列番号1、5、8、11、14、108、111、114、117、及び120から選択されるアミノ酸配列を含むか、又はからなることを特徴とする。

20

【0149】

一部の実施形態によると、免疫原性組成物は、対象におけるSARS-CoV-2感染に関連する炎症を予防するか、又は緩和するために使用するためのものである。

【0150】

D. 上気道への投与用の剤形

本開示の免疫原性組成物は、対象の上気道への投与に適した剤形で提供されてもよい。適切な製剤は、当該技術分野で公知である。一部の実施形態では、剤形は、エアロゾル吸入に適合する。一部の実施形態では、剤形は、点鼻に適合する。一部の実施形態では、鼻の剤形は、経鼻吸入に適合する。一部の実施形態では、剤形は、単回用量にアリコートされる。一部の実施形態では、剤形は、単回用量でパッケージングされる。

30

【0151】

E. キット

本明細書に開示される方法を実施するための使用に適したキットがまた提供される。一部の実施形態では、キットは、本開示によるSARS-CoV-2 Sタンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードするシュードタイプ化レンチウイルスベクター粒子の対象の上気道への投与用の剤形、及びアプリケーションを含む。一部の実施形態では、アプリケーションは、エアロゾル吸入用のアプリケーションである。一部の実施形態では、アプリケーションは、点鼻用のアプリケーションである。一部の実施形態では、アプリケーションは、経鼻吸入用のアプリケーションである。それぞれの適当な例が、当該技術分野で公知であり、使用され得る。

40

【0152】

F. レンチウイルスベクター

新規かつ自明でないレンチウイルスベクター及びそれを生成するためのプラスミドがまた提供される。LV及びプラスミドは、重症急性呼吸器症候群ベータコロナウイルス2(SARS-CoV-2)スパイク(S)タンパク質又はその誘導体若しくは断片をコードする。

【0153】

したがって、本発明の異なる実施形態を記載し、本明細書における本開示は例示のみで

50

あること、及び様々な他の代替物、適合、及び改変が、本発明の範囲内でなされ得ることは、当業者により注意されるべきである。したがって、本発明は、本明細書で説明される特定の実施形態に制限されない。

【実施例】

【0154】

G. 実施例

(実施例1)

ヒトACE2を発現するよう処置したゴールデンハムスター及びマウスの前臨床動物モデルにおけるSARS-CoV-2に対するLVを用いた鼻腔内ワクチン接種

(実施例1.1)

材料及び方法

1.1.1 SCoV-2に由来するSFL、S1-S2、又はS1をコードするトランスファーpFLAPプラスミドの構築

コドン最適化全長S(1~1273)配列を、pMK-RQ_S-2019-nCoVから増幅し、pFlap-ieCMV-WPREmのBamHIとXhoI部位の間に挿入した。S1-S2(1~1211)又はS1(1~681)をコードする配列を、PCRにより、pFlap-ieCMV-SFL-WPREmプラスミドから増幅し、BamHIとXhoI制限部位の間にpFlap-ieCMV-WPREmにサブクローニングした。PCR産物のそれぞれを、天然のヒトieCMVプロモーターと変異WPRE(ウッドチャック転写後制御エレメント)配列の間に挿入し、変異を、WPREにおけるタンパク質Xの開始コドンに導入して、Xタンパク質ペプチドの発現を回避した。プラスミドを、50 µg/mlカナマイシンを添加した溶原培地(LB)において大腸菌(*Escherichia coli*) DH5aで増幅させ、NucleoBond Xtra Maxi EF Kit(Macherey Nagel社)を使用して精製し、トリス-EDTAエンドトキシンプリー(TE-EF)バッファーに一晩再懸濁した。プラスミドを、NanoDrop 2000c分光光度計(Thermo Scientific社)を用いて定量し、TE-EFバッファー中1 µg/µlに調節し、アリコートし、-20℃で保存した。プラスミドDNAを、(i)制限酵素切断を用いた診断チェック、及び(ii)導入遺伝子挿入部位に近い配列領域により検証した。

【0155】

1.1.2 LVベクターの産生及びタイトレーション

従前に詳述される通り(Zennouら、2000)、非複製組込み型LVベクターを、ヒト胚腎臓(HEK)-293T細胞において産生させた。6×10⁶個細胞/ペトリディッシュを、DMEMにおいて培養し、125mM Ca(ClO₃)₂上清を含有するHepes 1×中の(i)コドン最適化gag-pol-tat-rre-revをコードする、2.5 µg/ml pSD-GP-NDKパッケージングプラスミド、(ii)10 µg/ml VSV-Gインディアナエンベローププラスミド、及び(iii)10 µg/mlトランスファーpFLAPプラスミドの混合物1mlで、3つの要素の形で同時トランスフェクションし、トランスフェクションの48時間後に回収し、4℃、2500rpmでの6分間の遠心分離により、清澄化し、次いで、2mMのMgCl₂を含有するHepes緩衝化溶液において、37℃で、最終濃度10U/mlのベンゾナーゼを用いて、30分間処理して、最終的に、残るDNAを排除した。LVベクターをアリコートし、-80℃で保存した。LV調製物のタイターを決定するために、HEK-293Tを、細胞増殖を遮断する8 µMアフィディコリン(Sigma社)の存在下で、完全DMEM中、平底6ウェルプレートにおいて4×10⁵個細胞/ウェルで分配した。次いで、細胞を、LV調製物の連続希釈液で形質導入した。他で記載される通り(Iglesiasら、2006)、核遺伝子導入の有効性に比例したタイターを、pFLAPプラスミドに特異的なフォワード5'-TGG AGG AGG AGA TAT GAG GG-3'(配列番号100)及びリバー5'-CTG CTG CAC TAT ACC AGA CA-3'(配列番号101)プライマー、並びに宿主ハウスキーピング遺伝子gadhに特異的なフォワード5'-TCT CCT CTG ACT TCA ACA GC-3'(配列番号102)及びリバー5'-CCC TGC ACT TTT TAA GAG CC-3'(配列番号103)プライマーの使用により、形質導入の3日後に、総溶解物について、qPCRにより、形質導入単位(TU)/mlとして決定する。

【0156】

1.1.3 マウス研究

6～10週齢のメスC57BL/6Jマウス(Janvier社、Le Genest Saint Isle、フランス)を使用した。成体、すなわち、体重80～90gのゴールデンハムスター(*Mesocricetus auratus*) (Janvier社、Le Genest Saint Isle、フランス)を購入した。免疫レジメンの開始時に、それらは、体重100～120gであった。地元の倫理委員会(CETEA #DAP20007)及びMinistry of High Education and Research APAFIS#24627-2020031117362508 v1によるプロトコル合意、Institut Pasteur Safety, Animal Care and Use Committeeによる承認後に、欧州及びフランスのガイドライン(1987年10月19日の指令86/609/CEE及び法令87-848)に従い、動物での実験法を行った。マウスに、腹腔内(i.p.)注射を介して、示したTUのLVを用いてワクチン接種した。血清を免疫後の様々な時間点で集めて、結合及び中和活性をモニターした。

10

【0157】

1.1.4 SARS-CoV-2接種

Ad5::hACE2で予め処置したマウス又はハムスターを、ケタミンとキシラジンの混合物の腹膜注射により麻酔し、PSM-IIIに移し、フランスのCentre National de Reference des Virus Respiratoiresが提供した、VeroE6細胞において増幅した、 1×10^5 個TCID₅₀のSARS-CoV-2臨床単離物を接種した。ウイルス接種菌液を、マウスについて20 µl及びハムスターについて50 µlにおいて含有させた。次いで、動物を、Institut PasteurのBSL3動物施設中の隔離飼育器に収容した。生きたSARS-CoV-2を有する、感染させたマウスから回収した器官及び体液を、バイオセーフティーレベルBSL3施設の承認された標準操作法に従い操作した。

20

【0158】

1.1.5 組換えScov-2タンパク質バリエーション

マウスIgKリーダーペプチド、続いて8×Hisタグ(配列番号104)が先行する、安定化フォルドン三量体化バージョンのSARS-CoV-2 Sエクトドメイン(a.a.1～1208)、S1モノマー(a.a.16～681)及びRBDサブドメイン(アミノ酸331～519)をコードするコドン最適化ヌクレオチド断片を合成し、pcDNA(商標)3.1/Zeo⁽⁺⁾発現ベクター(Thermo Fisher Scientific社)にクローニングした。既に記載された(Lorin及びMouquet、2015)ポリエチレンイミン(PEI)沈殿法を使用して、指数関数的に成長しているFreestyle(商標)293-F懸濁細胞(Thermo Fisher Scientific社、Waltham、MA)の一過性同時トランスフェクションにより、タンパク質を産生した。組換えScov-2タンパク質を、製造元の指示(Thermo Fisher Scientific社)に従い、Ni Sepharose(登録商標)Excel樹脂を使用して、アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。NuPAGE(商標)3～8%トリス酢酸塩ゲル(Life Technologies社)を使用した還元及び非還元条件下でのSDS-PAGE後に、Pierce Silver Stainキット(Thermo Fisher Scientific社)を使用して、ゲル内タンパク質銀染色により、タンパク質純度を評価した。精製したタンパク質を、Slide-A-Lyzer(登録商標)透析カセット(10kDa MWカットオフ、Thermo Fisher Scientific社)を使用して、一晚、PBSに対して透析した。タンパク質濃度を、NanoDrop(商標)One装置(Thermo Fisher Scientific社)を使用し決定した。

30

【0159】

1.1.6 ELISA

96ウェルNunc Polysorpプレート(Nunc、Thermo Scientific社)を、炭酸バッファー、pH9.6中の100ng/ウェルの精製したトリ-Sタンパク質を用いて、4℃で一晩コーティングした。0.1% Tween 20(PBST)を含有するPBSで洗浄後、プレートのウェルを、室温で2時間、1% Tween₂₀及び10% FBSを含有するPBSでブロッキングした。PBSTで洗浄後、10% FBSを含有するPBST中の1:100希釈した血清及び4つの連続1:10希釈液を加え、37℃で、2時間インキュベートした。PBSTで洗浄後、プレートを、1,000倍希釈したペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗マウスIgG/IgM(Jackson Immuno Research Europe Ltd社、Cambridgeshire、英国)と共に、1時間インキュベートした。PBSTで洗浄後、TMB発色基質(TMB、Eurobio Scientific社)100 µlを加えるこ

50

とによって、プレートをあらわにした。30分間のインキュベーション後、PR3100リーダーにおいて450nm/620nmで光学密度を測定した。

【0160】

1.1.7 nAb検出

血漿の連続希釈液を、天然のSARS-CoV-2ウイルスの融合工程を模倣することによる、宿主細胞浸潤の定量を可能にする、ヒトACE2を安定的に発現するよう形質導入したヒト胚腎臓(HEK)293-T細胞及びレポータールシフェラーゼホタル遺伝子を有する安全な非複製S_{CoV-2}シュードタイプ化LV粒子を使用する阻害アッセイを介して、nAbについて評価した(Sterlinら)。まず、 1.5×10^2 TUのS_{CoV-2}シュードタイプ化LVを、DMEM中50 μ lの最終容量のそれぞれの血清の連続希釈液と共に、U底プレートにおいて、室温で30分間ブレインキュベートし、10%熱不活化FCS及び100 U/mlペニシリン及び100 μ g/mlストレプトマイシンで完了させた。次いで、試料を、透明の平底96ウェル黒色プレートに移し、それぞれのウェルに、50 μ lで含有した 2×10^4 個のhACE2⁺HEK293-T細胞を与えた。37°C、5% CO₂で2日間のインキュベーション後、シュードタイプ化LV粒子によるhACE2⁺HEK293-T細胞の形質導入効率を、レポーター溶解バッファー(Pro mega社)を用いて、ルシフェラーゼアッセイシステムキットを使用して、ルシフェラーゼ活性を測定することによって、決定した。それを行うために、上清を、培養ウェルから完全に取り除き、レポーター溶解バッファー1 $\times$ 40 μ l及びルシフェラーゼアッセイ試薬(ホタルルシフェラーゼ)50 μ lを、それぞれの培養ウェルに順次加えた。生物発光シグナルを、LB 960プレートリーダー(Berthold社)を使用して、定量した。

10

20

【0161】

1.1.8 S_{FL}T細胞エピトープマッピング

免疫優性エピトープをマッピングするために、スパイクタンパク質全体にわたるペプチドを、10個のプールにプールし、それぞれが、10個のアミノ酸が重複する15個のアミノ酸残基を含有する。合成ペプチドを、Mimotopes社(Australia)から購入した。既に記載された通り(Dionら、2013)、IFN-g ELISpotアッセイを行った。これらの異なるセットのプールしたペプチドを、基質アッセイにおいて使用して、それぞれの構築物が誘導したエピトープ応答を、ICSによりマッピングした。ペプチドを、2 mg/mlの濃度で、DMSO中に溶解し、それぞれ、ELISpot及びICSアッセイでの使用前に、培養培地で1 μ g/ml及び2~5 μ g/mlで、使用前に希釈した。トリプリケートのウェルにおけるスポット形成細胞の平均数が、対照ウェルにおいて観察したものの少なくとも2倍であり、100万個の脾細胞当たり少なくとも50個のスポット形成細胞を、バックグラウンドの減算後に検出した場合、ELISpotにおける応答を、陽性とみなした。

30

【0162】

1.1.9 Ad5遺伝子トランスファーベクターの生成及びマウスの鼻腔内事前処置

Ad5遺伝子トランスファーベクターを、ViraPowerアデノウイルスプロモーターレス Gateway Expressionキット(Thermo Fisher Scientific社、フランス)の使用によって生成した。(i)5'末端にattB1をコードする、フォワードプライマー、及び(ii)5'末端にattB2とSV40ポリAシグナル配列の両方をコードする、リバープライマーの使用により、pTRIP Δ U3CMVプラスミドから、pCMV-BamH1-Xho1-WPRE配列をPCR増幅した。attb-PCR産物を、BP Clonase反応を介して、ゲートウェイpDORN207ドナーベクターにクローニングして、pDORN207-CMV-BamH1-Xho1-WPRE-SV40ポリAを形成させた。hACE2を、hACE2発現pcDNA3.1¹のプラスミド誘導體(Nicolas Escriouからの寛大な贈り物)から増幅し、一方、egfpを、pTRIP-ieCMV-eGFP-WPRE²から増幅した。増幅したPCR産物を、BamH1及びXho1制限酵素部位を介して、pDORN207-CMV-BamH1-Xho1-WPRE-SV40ポリAプラスミドにクローニングした。最終Ad5プラスミドを得るために、hACE2又はgfp遺伝子を有するpDORN207ベクターを、LR Clonase反応を介して、pAd/PL-DEST(商標)ベクターに更に挿入した。

40

【0163】

製造元のプロトコール(ViraPower Adenoviral Promoterless Gateway Expres

50

sion Kit、Thermo Fisher Scientific社)に従い、E3-トランス相補性HEK-293A細胞株をpAd CMV-GFP-WPRE-SV40ポリA又はpAd CMV-hACE2-WPRE-SV40ポリAプラスミドでトランスフェクションし、続いてベクター増幅することによって、Ad5ビリオンを生成した。Ad5粒子を、Adeno-X迅速Maxi精製キットを使用して精製し、Amicon Ultra-4 10k遠心フィルターユニットを用いて濃縮した。ベクターを、2.5%グルコースを添加したPIPESバッファー、pH7.5中で再懸濁し、-80℃で保存した。HEK-293T細胞に適合した、Gallagher et al³により記載されるqRT-PCRプロトコルを使用して、Ad5をタイトレーションした。

【0164】

負荷の4日前に、マウスに、ケタミン(Imalgene、100mg/kg)とキシラジン(Rompun、10mg/kg)の混合物のi.p.注射により得た全身麻酔下で、PBS15μl中に再懸濁した 2.4×10^9 IGUのAd5::hACE2、Ad5::GFP又は対照の空のベクターをi.n.注入した。

【0165】

1.1.10 ウエスタンブロット

Ad5::hACE2を形質導入したマウスの肺におけるhACE2の発現を、ウエスタンブロットティングにより評価した。肺ホモジネート由来の 1×10^6 個の細胞を、4~12% NuPAGEビス-トリスタンパク質ゲル(Thermo Fisher Scientific社、フランス)上で分解し、次いで、ニトロセルロース膜(Biorad社、フランス)に移した。ニトロセルロース膜を、室温で2時間、0.5% Tween PBS(PBS-T)中の5%無脂肪乳においてブロッキングし、1μg/mLのヤギ抗hACE2一次Ab(AF933、R&D systems社)を用いて一晚探索した。PBS-Tを用いた、10分間隔の3回の洗浄後、膜を、HRPコンジュゲート抗ヤギ二次Ab及びHRPコンジュゲート抗βアクチン(ab197277、Abcam社)と室温で1時間、インキュベートした。膜を、PBS-Tで3回洗浄後、Chemidoc XRS+(Biorad社、フランス)においてスーパーシグナルウエストフェムト最大感度基質(ThermoFisher社、フランス)を介して強化した化学発光を用いて可視化した。PageRuler Plus着色タンパク質ラダーを、大きさの参照として使用した。

【0166】

1.1.11 肺におけるSARS-CoV-2ウイルス負荷量の決定

それぞれの肺葉の半分を、無菌的に取り出し、-80℃で凍結した。器官を融解し、氷冷したPBS 500μlにおいて溶解基質D(MP Biomedical社)を使用して、4.0m/秒で20秒間、2回ホモジネートした。ホモジネートを、MP Biomedical Fastprep 24 Tissue Homogenizerにおいて行った。粒子状のウイルスRNAを、製造元の手法に従い、QIAamp Viral RNA Mini Kit(Qiagen社)を使用し、肺ホモジネート70μlから抽出した。SuperScript(商標)III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System(Invitrogen社)並びに(Table 1(表2))に挙げるSARS-CoV-2エンベロープ(E)遺伝子を標的とするプライマー及びプローブを使用し、本質的に、Cormanら(Cormanら、2020)により記載される逆転写及びリアルタイムTaqMan(登録商標)PCR後に、ウイルス負荷量を決定した。プラスミドpCI/SARS-CoV E由来のin vitro転写RNAを、T7 Ribomax Express Large Scale RNA産生システム(Promega社)を使用して合成し、次いで、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノールを用いた2回の連続沈殿により精製した。RNA濃度を、光学密度測定により決定し、次いで、RNAを、100μg/mL tRNA担体を含むRNAseフリー水中の10ゲノム相当物/μLに希釈し、-80℃で単回使用のアリコートで保存した。このin vitro転写RNAの連続希釈液を、10μg/mL tRNA担体を含むRNAseフリー水において調製し、これを使用して、それぞれのアッセイにおいて標準曲線を確立した。サーマルサイクル条件は、(i)55℃で10分間の逆転写、(ii)95℃で3分間の酵素不活性化、及び(iii)45サイクルの、95℃で15秒間、58℃で30秒間の変性/増幅であった。産物を、ABI 7500 Fast real-time PCRシステム(Applied Biosystems社)において分析した。

【0167】

1.1.12 肺自然免疫細胞の細胞数測定分析

個々のマウス由来の肺を、コラゲナーゼ-DNAse-Iとの37℃で30分間のインキュベーションで処理し、GentleMacsを使用してホモジネートした。細胞を、100 μmの孔のフィルターを通して濾過し、1200rpmで8分間、遠心分離した。次いで、細胞を、Red Blood Cell Lysing Buffer(Sigma社)で処理し、PBS中で2回洗浄した。次いで、細胞を、以下の通り染色した。(i)DC、単球、肺胞及び間質性マクロファージを検出するため、Near IR Live/Dead(Invitrogen社)、FcγII/III受容体ブロッキング抗CD16/CD32(BD Biosciences社)、BV605-抗CD45(BD Biosciences社)、PE-抗CD11b(eBioscience社)、PE-Cy7-抗CD11c(eBioscience社)、BV450-抗CD64(BD Biosciences社)、FITC-抗CD24(BD Biosciences社)、BV711-抗CD103(BioLegend社)、AF700-抗MHC-II(BioLegend社)、PerCP-Cy5.5-抗Ly6C(eBioscience社)及びAPC抗Ly-6G(Miltenyi社)mAb、(ii)好中球又は好酸球を検出するため、Near IR DL(Invitrogen社)、FcγII/III受容体ブロッキング抗CD16/CD32(BD Biosciences社)、PerCP-Vio700-抗CD45(Miltenyi社)、APC-抗CD11b(BD Biosciences社)、PE-Cy7-抗CD11c(eBioscience社)、FITC-抗CD24(BD Biosciences社)、AF700-抗MHC-II(BioLegend社)、PE-抗Ly6G(BioLegend社)、BV421-抗Siglec-F(BD Biosciences社)、(iii)マスト細胞、好塩基球、NKを検出するため、FcγII/III受容体ブロッキング抗CD16/CD32ではなく、Near IR DL(Invitrogen社)、BV605-抗CD45(BD Biosciences社)、PE-抗CD11b(eBioscience社)、eF450-抗CD11c(eBioscience社)、PE-Cy7-抗CD117(BD Biosciences社)、APC-抗FcER1(BioLegend社)、AF700-抗NKp46(BD Biosciences社)、FITC-抗CCR3(BioLegend社)。細胞を、適切な混合物と、4℃で25分間、インキュベートした。次いで、細胞を、3% FCSを含有するPBS中で2回洗浄し、次いで、4℃での一晩のインキュベーションで、4% PFAで固定した。細胞を、Attune NxT cytometer system(Invitrogen社)において取得し、データを、FlowJoソフトウェア(Treestar、OR、USA)により分析した。

10

20

30

40

【0168】

1.1.13 肺における炎症性サイトカイン及びケモカインのqRT-PCR検出

肺試料を、TRIzol試薬1mLを含有する溶解基質D(MP Biomedical社)に加え、MP Biomedical Fastprep 24 Tissue Homogenizerを使用し、6.0m/秒で30秒間、2回ホモジネートした。全RNAを、製造元の手法に従い、TRIzol試薬(ThermoFisher Scientific社、フランス)を使用し、抽出した。cDNAを、20 μlの反応液中、2.5 μM オリゴ(dT)18プライマー (配列番号105)、0.5mMデオキシリボヌクレオチド、2.0U RNase阻害剤及びSuperScript IV Reverse Transcriptase(ThermoFisher Scientific社、フランス)の存在下で、RNA4 μgから合成した。リアルタイムPCRを、QuantStudio(商標)7 Flex Real-Time PCR System(ThermoFisher Scientific社、フランス)において行った。反応を、iQ(商標)SYBR(登録商標)Green Supermix (Biorad社、フランス)5 μl、DEPC水中の1:15希釈したcDNA4 μl並びに0.5 μMの最終濃度の、それぞれのフォワード及びリバースプライマー0.5 μlを含有する最終反応容積10 μlで、トリプリケートで行った(Table 2 (表3))。以下のサーマル特性を使用した:単回サイクルの95℃で3分間のポリメラーゼ活性化、続いて、95℃で15秒間、及び60℃で30秒間の40増幅サイクル(アニーリング-伸長工程)。平均CT値を、標的サイトカイン/ケモカインの相対量についての技術複製物から計算した。CTサイトカイン/ケモカイン増幅産物の差及びΔCTと呼ばれる、参照β-グロブリンのCTを計算して、核酸量の差について正規化した。実験条件のΔCTを、比較ΔΔCT法を使用して、PBSで処置したマウスと相対的に比較した。遺伝子発現の倍率変化を、2-ΔΔCTを使用して更に計算した。

【0169】

(実施例1.2)

SARS-CoV-2スパイクタンパク質バリエーションをコードするLVによる抗体応答の誘導

Scov-2に特異的なnAbを誘導することができるワクチン候補を開発するために、本発明者らは、全てがRBDを有し(図1A)、予測立体構造不均一性を伴う、(i)S(LV::S_{FL})の全長の膜固定形態、(ii)膜貫通型及びC末端の短い内部の尾部(LV::S1-S2)を有さない、

50

S1-S2エクト-ドメイン、又は(iii)S1単独(LV::S1)のコドン最適化配列をコードするLVを、サイトメガロウイルス(CMV)最初期プロモーターの転写調節下で生成した。これらのベクターが誘導した液性応答を評価するために、C57BL/6マウス(n=4/群)を、 1×10^7 TU/マウスのLV、又は陰性対照としてGFPをコードするLVのいずれかの単回i.p.注射により免疫した。S_{CoV-2}特異的Ab応答を、免疫の1、2、3、4及び6週後に血清において評価した。LV::S_{FL}又はLV::S1-S2で免疫したマウスにおいて、S_{CoV-2}特異的免疫グロブリンG(IgG)は、早くも免疫の1週間後に検出可能であり、それらの量は、それぞれ、 $(4.5 \pm 2.9) \times 10^6$ 又は $(1.5 \pm 1) \times 10^6$ の平均タイター $\pm$ SEMでの免疫の6週後まで累加を示した。比較して、S_{CoV-2}特異的IgGタイターは、それらのLV::S1で免疫した対応物において、 $100 \times$ 低く、すなわち、 $(7.1 \pm 6.1) \times 10^4$ であった(図1B)。

10

【0170】

次いで、血清を、S_{CoV-2}でシュードタイプ化した非複製LV粒子代替物による、hACE2⁺細胞浸潤のnAb介在性阻害に基づく信頼できる中和アッセイを使用して、SARS-CoV-2を中和するそれらの能力について評価した(Sterlinら)。このようなS_{CoV-2}シュードタイプ化LV粒子は、生体体液に含有される可能性のあるnAbの中和効率に反比例的である、hACE2⁺宿主細胞浸潤の定量を可能にする、レポーターシフェラーゼ遺伝子を有する。LV::S_{FL}、LV::S1-S2又はLV::S1で免疫したマウス由来の血清の50%有効濃度(EC50)の分析は、LV::S_{FL}が、S_{CoV-2}特異的nAbの誘導の際、最も強力なベクターであることを明確に示した(図1C)。更に、nAbタイターは、LV::S_{FL}で免疫したマウスの血清において、S_{CoV-2}特異的IgGタイターのみと相関した($p < 0.0001$ 、 $R^2 = 0.645$ 、両側スピアマンの順位相関検定)(図1E)。これらの結果は、S1-S2又はS1ポリペプチドにおいて、関連のB細胞エ피トープの立体構造が、天然のS_{FL}の立体構造と異なり、後者は、S_{CoV-2}-hACE2相互作用及び宿主細胞浸潤を阻害することができるnAbを誘導するバリエーションのみを表すことを強く示唆する。LV::S_{FL}で免疫したマウスと、フランスで出現した最初の伝染領域の1つである、Crepy en Valoisに住んでいる症状の穏やかな感染した人のコホート由来の血清の中和能の比較は、同等の中和活性平均を示した(図1D)。これらのデータは、LV::S_{FL}により誘導した液性応答の防御の可能性を予測した。

20

【0171】

中和Abの誘導の際のLV::Sベクターの免疫原性を潜在的に増加させるために、本発明者らは、以下の通り操作した、安定化融合前S_{CoV-2}をコードするLVベクターを生成した：

30

(i)2個の986K->P及び987V->P連続a.a.置換を有する、予測安定性の増加を有するS_{CoV-2}。実際、強固なプロリン残基へのa.a.置換が、立体構造エントロピーを減少することによって、タンパク質安定性を増加させることが確立される、

(ii)フューリン切断部位で681PRRARS686(配列番号22)->681PGSAGS686(配列番号23)a.a.置換を有し、これにより、このタンパク質分解酵素が認識できなくなる、S_{CoV-2}、

(iii)986K->P及び987V->P連続a.a.置換を有し、675QTQTNSPRRAR685(配列番号24)が欠損し、フューリン切断部位を包含する、S_{CoV-2}。

40

【0172】

図17Aは、pFlap-ieCMV-S_{FL}-WPReMのプラスミドマップを示す。

【0173】

pFlap-ieCMV-S_{FL}-WPReMのヌクレオチド配列を、図20Aに示し、配列番号3として同定する。このベクターに存在するSタンパク質をコードするヌクレオチド配列を、図20Bに示し、配列番号4として同定する。このベクターに存在するSタンパク質をコードするアミノ酸配列を、図20Cに示し、配列番号5として同定する。

【0174】

図17Bは、pFlap-ieCMV-S2P-WPReMのプラスミドマップを示す。

【0175】

pFlap-ieCMV-S2P-WPReMのヌクレオチド配列を、図21Aに示し、配列番号6とし

50

て同定する。このベクターに存在するSタンパク質をコードするヌクレオチド配列を、図21Bに示し、配列番号7として同定する。このベクターに存在するSタンパク質をコードするアミノ酸配列を、図21Cに示し、配列番号8として同定する。

【0176】

図17Cは、pFlap-ieCMV-S2P3F-WPREmのプラスミドマップを示す。

【0177】

pFlap-ieCMV-S2P3F-WPREmのヌクレオチド配列を、図22Aに示し、配列番号9として同定する。このベクターに存在するSタンパク質をコードするヌクレオチド配列を、図22Bに示し、配列番号10として同定する。このベクターに存在するSタンパク質をコードするアミノ酸配列を、図22Cに示し、配列番号11として同定する。

10

【0178】

図17Dは、pFlap-ieCMV-S2PデルタF-WPREmのプラスミドマップを示す。

【0179】

pFlap-ieCMV-S2PデルタF-WPREmのヌクレオチド配列を、図23Aに示し、配列番号12として同定する。このベクターに存在するSタンパク質をコードするヌクレオチド配列を、図23Bに示し、配列番号13として同定する。このベクターに存在するSタンパク質をコードするアミノ酸配列を、図23Cに示し、配列番号14として同定する。

【0180】

COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES(CNCM)は、特許手続上の微生物の寄託の国際承認に関するブダペスト条約の下、国際寄託局の地位を有する。CNCMは、Institut Pasteur、25-28 rue du Docteur Roux、75724 Paris Cedex 15 FRANCEに位置する。

20

【0181】

以下の材料を、2020年7月15日に寄託した:pFlap-ieCMV-S2PデルタF-WPREm(CNCM I-5537)、pFlap-ieCMV-S2P3F-WPREm(CNCM I-5538)、pFlap-ieCMV-S2P-WPREm(CNCM I-5539)、及びpFlap-ieCMV-SFL-WPREm(CNCM I-5540)。寄託受領書を、本明細書と共に提出する。

【0182】

以下の材料を、2021年7月6日にCNCMに寄託した:pFlap-ieCMV-S-B1.1.7-WPREm(CNCM I-5708)、pFlap-ieCMV-S-B351-WPREm(CNCM I-5709)、pFlap-ieCMV-S-B351-2P-WPREm(CNCM I-5710)、pFlap-ieCMV-SFL-D614G-WPREm(CNCM I-5711)、pFlap-ieCMV-S-P1-WPREm(CNCM I-5712)。寄託受領書を、本明細書と共に提出する。

30

【0183】

LV::S_{FL}で免疫したC57BL/6マウス(n=3)はまた、全長S_{CoV-2}にわたる15merのペプチドの別個のプールを用いて刺激した脾細胞に適用した、IFN γ ELISPOTベースのエピトープマッピングによる免疫の2週間後に検出した、強力な抗S_{CoV-2} T細胞応答を呈した(図2A)。有意な量の応答T細胞を、16種のうち6種のペプチドプールについて検出した。この陽性プールの逆重畳積分により、> 2000スポット形成単位(SFU)/1 $\times$ 10⁶個の脾細胞に上昇する、S:256~275(SGWTAGAAAYVGYLQPRTF-配列番号32)、S:536~550(NKCVNFNFNGLTGTG-配列番号16)及びS:576:590(VRDPQTLEILDITPC-配列番号17)免疫優性エピトープの同定が可能になった(図2B)。これらのエピトープは、CD8⁺T細胞を誘発したが、CD4⁺T細胞を誘発せず、これを、細胞内サイトカイン染色により評価した(図2C)。これらのT細胞の優性CD8⁺表現型は、LVがコードする抗原のMHC-I提示経路に対する好ましい向きと一致する(Huら、2011)。本発明者らはまた、ELISPOTアッセイにおいて<2000SFU/1 $\times$ 10⁶個の脾細胞まで上昇する、S:441~455(LDSKVGGNYNYLYRL-配列番号18)、S:671~685(CASYQTQTNSPRRAR 配列番号19)及びS:991~1005(VQIDRLITGRLQSLQ-配列番号20)準優位エピトープを同定した(図2B)。

40

【0184】

50

(実施例1.3)

Ad5遺伝子送達ベクターを使用した、気道においてヒトACE2を発現するマウスモデルの設定

Scov-2は、マウスACE2と効率的に相互作用しないため、野生型実験マウスは、SARS-CoV-2臨床単離物の複製を許容しない。LV::SFLワクチン有効性を評価するための本研究の進行中、欧州においてhACE2トランスジェニックマウスが入手できなかったため、本発明者らは、hACE2発現が、気道及び肺粘膜において誘導されている、マウスモデルを作り上げようとした。それを行うために、本発明者らは、CMVプロモーター(Ad5::hACE2)の転写調節下にhACE2をコードする遺伝子である、非組込み型エピソームにおけるビヒクルへのAd5遺伝子送達ベクターを生成した。本発明者らは、RT-PCRにより、Ad5::hACE2ベクターがHEK293Tを形質導入する可能性をまずin vitroで調べた(図3A)。気道細胞のin vivo形質導入を達成するために、本発明者らは、 2.5×10^9 IGU/マウスのAd5::hACE2をC57BL/6マウスにi.n.注入した。4日後、hACE2タンパク質発現は、ウエスタンブロットにより、肺細胞ホモジネートにおいて検出可能であった(図3B)。これらの条件下で投与した導入遺伝子のin vivo発現特性へのより多くの見通しを得るために、本発明者らは、同じ用量のAd5::GFPレポーターベクターをC57BL/6マウスにi.n.注入した。細胞数測定により評価した通り、滴下注入の4日後に、GFPレポーターを、肺上皮EpCam⁺細胞においてばかりでなく、肺免疫細胞において発現し、これは、CD45汎造血マーカーによって追跡し(図3C)、これが、このアプローチが、これらの細胞に限定されない、上皮細胞への効率的な形質導入を可能にすることを示している。

10

20

【0185】

このようなhACE2を形質導入したマウスのSARS-CoV-2感染に対する許容性を評価するために、Ad5::hACE2又は空の対照Ad5ベクターのいずれかをを用いたi.n.事前処置の4日後に、C57BL/6マウスに、National Reference Centre for Respiratory Viruses (Institut Pasteur、フランス)により、COVID-19患者から2020年2月に単離した、 1×10^5 TCID₅₀のSARS-CoV-2臨床単離物をi.n.接種した。接種の2日後(dpi)に決定した肺ウイルス負荷量は、空のAd5で事前処置したマウスにおけるわずかに(6.2 ± 0.5) $\times 10^5$ コピー/マウス、又は事前処置していないマウスにおける(4.0 ± 2.9) $\times 10^5$ コピー/マウスと比較して、Ad5::hACE2で事前処置したマウスにおいて、(4.4 ± 1.8) $\times 10^9$ コピーのSARS-CoV-2 RNA/マウスと高かった(図3D)。4dpiで、肺ウイルス負荷量は、Ad5::hACE2で事前処置したマウス($2.8 \pm 1.3 \times 10^9$ コピー/マウス)において維持され、一方、(1.7 ± 2.3) $\times 10^4$ 又は(3.9 ± 5.1) $\times 10^3$ コピー/マウスへの低下を、それぞれ、空のAd5で事前処置したマウス又は事前処置したマウスにおいて観察した。7dpiで、Ad5::hACE2で事前処置したマウスにおいて、ウイルス負荷量は、有意に減少したが、依然としてほとんど検出可能であった(1.33 ± 0.9) $\times 10^6$ コピー/マウス)。

30

【0186】

Ad5::hACE-2のi.n.滴下注入は、肺へのCD45⁺細胞の動員を誘導したが、この効果は、ベクター用量が減少するにつれ低減し、これは、滴下注入の4日後に決定した。用量 4×10^8 IGU/マウスは、PBSで処置した対照と比較して、CD45⁺細胞の動員を引き起こさず(図3E)、一方、SARS-CoV-2複製に対する完全な許容性を依然として付与した(図3F)。Ad5-hACE2で事前処置したマウスのSARS-CoV-2複製に対する許容性及びこのモデルの設定は、マウスにおけるSARS-CoV-2に対するワクチン又は薬物有効性のin vivo評価の道を整える。

40

【0187】

(実施例1.4)

マウスにおけるSARS-CoV-2に対するLV::SFLの防御可能性の評価

SARS-CoV-2に対するLV::SFLの予防可能性を調べるために、C57BL/6マウス(n=4/群)に、単回用量の 1×10^7 TU/マウスのLV::SFL又は陰性対照LV(偽)をi.p.注射した。免疫の6週後、マウスを、Ad5::hACE2で事前処置し、4日後、 1×10^5 TCID₅₀のSARS-CoV-2をi.n.接種した(図4A)。3dpiで、LV::SFLをワクチン接種したマウスにおける

50

肺ウイルス負荷量を、それぞれ、ワクチン接種していないマウス又は偽ワクチン接種したマウスにおける $(1.7 \pm 0.9) \times 10^9$ 又は $(2.4 \pm 1.6) \times 10^9$ コピー/マウスと比較して、約 $1 \log_{10}$ 、すなわち、 $(3.2 \pm 2.2) \times 10^8$ SARS-CoV-2 RNA コピー/マウスの平均 $\pm$ SEM に低減した(図4B)。したがって、単回LV::S_{FL}注射は、肺におけるウイルス複製の約90%の阻害を与えた。

【0188】

予防効果を更に改善するために、本発明者らは、プライム-ブースト又はプライム-標的アプローチを評価した。C57BL/6マウス(n=4~5/群)を、0週目に、 1×10^7 TUのLV::S_{FL}又は対照LVでi.p.プライミングし、次いで、3週目に、(i)i.p.経路を介して 1×10^7 TUの同じLV(「LV::S_{FL} i.p.-i.p.」、プライム-ブースト)、又は(ii)i.n.経路を介して 3×10^7 TU(「LV::S_{FL} i.p.-i.n.」、プライム-標的)でブースティングして、肺粘膜に対する全身免疫のメディエーターを誘引した(図5A)。i.p.を介したLV::S_{FL}での全身ブーストは、抗S_{CoV-2} IgGタイターの有意な増加をもたらした(図5B、左)。対照的に、i.n.を介したLV::S_{FL}での粘膜標的化は、全身レベルで抗S_{CoV-2} IgGタイターの統計上有意な改善を導かなかった(図5B左)。血清の中和の可能性に関して、たとえ、増加する傾向を、i.p.又はi.n.ブースト後に観察しても、差は、統計上有意に至らなかった(図5B右)。

【0189】

次いで、全てのマウスを、Ad5::hACE2で事前処置し、プライムの4週後に、 0.3×10^5 TCID₅₀のSARS-CoV-2をi.n.負荷した。3dpiで、肺ウイルス負荷量は、偽ワクチン接種したマウス $(13.7 \pm 7.5) \times 10^8$ コピーのSARS-CoV-2 RNAにおいてより、LV::S_{FL} i.p.-i.p.免疫したマウスにおいて有意に低く、すなわち、平均 $\pm$ SD $(2.3 \pm 3.2) \times 10^8$ であった(図5C)。このウイルス負荷の低減は、単回LV::S_{FL}投与で観察したものと類似していた(図5C)。最も重要なことに、i.n.LV::S_{FL}標的免疫後、ウイルス負荷量の $> 3 \log_{10}$ の減少を観察し、5匹のうち2匹のマウスは、検出不可能な肺ウイルス負荷量を有し、これは、qRT-PCRアッセイにより決定した。抗S_{CoV-2} IgGを、部分的(LV::S_{FL} i.p.-i.p.)又は完全(LV::S_{FL} i.p.-i.n.)に防御したマウスの澄んだ肺ホモジネートにおいて実際検出した。対照的に、抗S_{CoV-2} IgAは、完全に防御したLV::S_{FL} i.p.-i.n.マウスにおいてのみ検出可能であった(図5D)。LV::S_{FL} i.p.-i.p.対応物の中和活性より、高い中和活性を、LV::S_{FL} i.p.-i.n.マウスの澄んだ肺ホモジネートにおいて検出した(図5E)。したがって、全身レベルでのIgGアイソタイプのNAbのタイターの増加は、SARS-CoV-2に対する防御を改善しなかった。しかしながら、ウイルスの宿主生物への進入点に免疫エフェクターを誘引し、局所IgA Abを誘導する項とができる可能性を伴う、粘膜i.n.標的免疫は、SARS-CoV-2複製の阻害と相関した。

【0190】

COVID-19における急性肺損傷における自然免疫活性亢進の説得力のある証拠に基づき(Vabretら、2020)、本発明者らは、無感染対照、SARS-CoV-2を接種した、偽ワクチン接種又はLV::S_{FL}ワクチン接種したマウスにおいて、可能性のある様々な肺自然免疫細胞サブセットを調べた(図6A)。3dpiで、本発明者らは、様々な実験群の中でも、好塩基球又はNK細胞対全肺CD45⁺細胞の比率の差を検出しなかった(図6B)。正味対照的に、本発明者らは、最も多い肺ウイルス負荷量を呈した偽ワクチン接種したマウスにおける、肺胞マクロファージ、樹状細胞、マスト細胞、好酸球、Ly6C⁺若しくはLy6C⁻単球/マクロファージ又は好中球対全肺CD45⁺細胞の比率の増加を検出した。これらの知見は、このマウスモデルにおいて、肺SARS-CoV-2負荷量の増加が、いくつかの炎症関連自然免疫細胞の動員と相関すること、及びワクチン介在性抗ウイルス防御が、このような炎症を弱めるか、又は回避することを示す。これは、LV::S_{FL}でプライム-ブースト/標的によりワクチン接種したマウスの肺におけるサイトカイン及びケモカイン含有量の低減によって実証され、これは、全肺ホモジネートから抽出したRNAに適用したqRT-PCRにより評価した(図6C)。したがって、付与した防御はまた、SARS-CoV-2感染と関連する肺の炎症を回避した。

【0191】

10

20

30

40

50

(実施例1.5)

ゴールデンハムスターにおけるSARS-CoV-2に対するLV::S_{FL}の防御の可能性の評価

非近交系メソクリセタス・アウラタス、いわゆる、ゴールデンハムスターは、この種のACE2オルソログが、S_{CoV-2}と効率的に相互作用し、これにより、宿主細胞が浸潤し、ウイルス複製するため、COVID-19病理を研究するための適当な前臨床モデルをもたらす(Siaら、2020)。したがって、本発明者らは、この適切なモデルにおいてSARS-CoV-2感染のLV::S_{FL}ワクチン接種の予防効果を調べた。組込み型LV::S_{FL}に加えて、組込み型LVベクターは、大部分は安全であり、第1相臨床試験(2011-006260-52 EN)を順調に通過したが、本発明者らはまた、将来的な臨床試験における適用を予想し、インテグラーゼ欠損の非組込み型バージョンのLV::S_{FL}を評価した。

10

【0192】

ブライム-ブースト/標的レジメンに従ったワクチン接種の予防効果を評価するために、ゴールデンハムスター(n=6/群)を、(i)低用量の 1×10^6 TUの組込み型LV::S_{FL}でi.p.プライミングし、4週目に、 3×10^7 TUの組込み型LV::S_{FL}でi.n.ブーストするか(「int LV::S_{FL} i.p.-i.n.低」)、(ii)高用量の 1×10^7 TUの組込み型LV::S_{FL}でi.p.プライミングし、4週目に、 3×10^7 TUの組込み型LV::S_{FL}でi.n.ブースティングするか(「int LV::S_{FL} i.p.-i.n.高」)、又は(iii) 1×10^8 TUの非組込み型LV::S_{FL}で筋肉内(i.m.)プライミングし、4週目に、 3×10^7 TUの非組込み型LV::S_{FL}でi.n.ブースティングした(「non int LV::S_{FL} i.m.-i.n.」)(図7A)。偽ワクチン接種した対照は、i.p.及びi.n.経路を介して同量の空の組込み型LVを受けた。同等のS_{CoV-2}特異的IgG抗体を、i.n.ブースト前及び後の、様々なワクチン接種群のハムスターの血清において、ELISAにより検出した(図7B)。ブースト/標的後の血清学は、全ての群において中和活性を検出し、これは、「int LV::S_{FL} i.p.-i.n.高」群において観察した最大EC50平均を伴った。このようなレベルは、ヒトにおける無症状、微症候性、症候性又は健康なCOVID-19接触において検出したものと同等であった(図7C)。全てのハムスターを、5週目で、 0.3×10^5 TCID₅₀のSARS-CoV-2でi.n.負荷した。全てのLV::S_{FL}ワクチン接種群における有意でない喪失と比較して、偽ワクチン接種した個体において、4dpiで、最大16%の体重の喪失に徐々に至った(図7D)。2dpiで、約 $1.5 \sim 3 \log_{10}$ の減少を、偽ワクチン接種したハムスターと比較して、「int LV::S_{FL} i.p.-i.n.低」、「int LV::S_{FL} i.p.-i.n.高」及び「non int LV::S_{FL} i.m.-i.n.」群の肺ウイルス負荷量において観察した(図7E、F)。4dpiで、ワクチン接種した群におけるウイルス負荷量の低減の大きさは、偽ワクチン接種した個体と比較して、依然としてより高く、 $> 4 \log_{10}$ に達した。更なる免疫学及び病理組織学研究により、ハムスターモデルにおけるLVワクチン接種による実質的な肺防御を確認した(図8)。

20

30

【0193】

更なる実験において(図9A)、本発明者らは、(i)NILV::S_{FL}の単回i.m.注射は、高タイトーの血清抗S Abを誘導し(図9B)、肺において、有意だが、部分的なレベルの防御を開始し(図9C)、(ii)血清NAb活性を改善しなかった(図9D)、NILV::S_{FL}でのi.n.ブーストは、SARS-CoV-2に対する有意に改善した防御を誘導し、これは、4dpiで検出した、qRT-PCRに基づき肺ウイルス負荷量により決定した(図9C)ことを示した。4dpiで、偽ワクチン接種し、負荷したハムスターにおいて、実質的な肺の病変、重篤な実質の炎症、肺実質の硬化、細気管支上皮の顕著な変化及び細気管支上皮の中度の展退を検出した(図9E)。ブースティングした、又はしていない、それらのNILV::S_{FL}ワクチン接種した対応物において、肺の病変は、明らかに、より低い重症度であった(図9E、F、G)。

40

【0194】

単回i.n.NILV::S_{ΔF2P}投与によるハムスターモデルにおける無菌化防御

本発明者らは、サイトメガロウイルスプロモーターの転写調節下に、融合前形態のS_{CoV-2}をコードするLVを生成した。この融合前S_{CoV-2}バリエーション(S_{ΔF2P})は、S1/S2サブユニットの境界に、多塩基RRAR(配列番号99)フューリン切断部位を包含する、675QTQTNSPRRAR685(配列番号24)配列の欠失を有し、7アミノ酸繰返し1と中心らせんと

50

の間のヒンジループ内で、S2におけるK⁹⁸⁶P及びV⁹⁸⁷P連続プロリン置換を有する(図11)。

【0195】

本発明者らはまた、ハムスターモデルにおいて、NILV::S_{ΔF2P}の単回i.n.投与のみでのワクチン接種の予防効果を評価した。

【0196】

ハムスター(n=6/群)を、(i)陽性防御対照として、0週目に、 1×10^8 TUのNILV::S_{ΔF2P}でプライミングし、5週目に、同量のベクターでブースティングするか、(ii)0週目に、 1×10^8 TUのNILV::S_{ΔF2P}の単回注射でi.n.免疫するか、又は(iii)5週目に、 1×10^8 TUのNILV::S_{ΔF2P}の単回注射でi.n.免疫した(図12A)。偽ワクチン接種した対照は、0及び5週目に、i.n.を介して同等量の空のNILVを受け取った。同等及び高タイトーの抗S_{CoV-2} IgG Abを、5週目に、最初の2群における血清中で検出した(図12B)。7週目に、血清Abタイトーは、NILV::S_{ΔF2P} i.m.-i.n.群において高く維持され、一方、それは、「NILV::S_{ΔF2P} i.n. wk 0」群の一部の個体において若干減少した。この時間点で、「NILV::S_{ΔF2P} i.n. wk 5」群において、より低い血清Abタイトーを検出した(図12B)。ウイルス中和活性は、2種の他のワクチン接種群と比較して、「NILV::S_{ΔF2P} i.n. wk 5」ハムスターの血清において有意により低かったが、これらの個体は、それらの肺ホモジネートにおいて同等な中和能を有していた(図12C)。

10

【0197】

7週目に、全ての動物を、 0.3×10^5 TCID₅₀のSARS-CoV-2でi.n.負荷した。接種の4日後(dpi)、偽ワクチン接種したハムスターにおける12%と比較して、2~3%のみの体重喪失を、NILV::S_{ΔF2P}ワクチン接種群において検出した(図12D)。この時間点で、SARS-CoV-2エンベロープ(E_{CoV-2})RNAを検出するqRT-PCRにより決定した通り、偽ワクチン接種した群と比較して、約2~3log₁₀の減少を、i.m.-i.n.又は単回i.n.群のいずれかのNILV::S_{ΔF2P}ワクチン接種個体において観察した(図12E)。活性なウイルス複製の指標である、サブゲノムE_{CoV-2} RNA(E_{sg})を検出するqRT-PCRによる肺ウイルス負荷量の評価(Chandrashekarら、2020;Tostanoskiら、2020;Wolfelら、2020)は、3種のワクチン接種した群における複製ウイルスの非存在対偽ワクチン接種した群における $(1.24 \pm 0.99) \times 10^9$ コピーのE_{sg} RNAのSARS-CoV-2/肺の平均±SDを示した(図12E)。

20

30

【0198】

4dpiで、全肺ホモジネートにおいてqRT-PCRにより評価した通り、免疫レジメン、すなわち、0又は5週目で与えた、i.m.-i.n.プライム-ブースト又は単回i.n.注射にも関わらず、それらの偽ワクチン接種した対照物と比較して、炎症の実質的な減少を、NILV::S_{ΔF2P}ワクチン接種したハムスターにおいて検出した(図13A)。組織病理学的肺分析は、NILV::S_{ΔF2P}で免疫したハムスターにおいて、肺の病変は、稀であるか、又は検出不可能であり、一方、偽ワクチン接種した対照において、かなりの実質浸潤及び硬化、並びに顕著な細気管支上皮の変化及び展退を検出したことを示した(図13B、C)。

【0199】

これらのデータは、まとめると、NILV::S_{ΔF2P}の単回i.n.投与が、全身プライム及びi.n.ブーストレジメンと同等の防御であり、SARS-CoV-2に対する無菌の肺の免疫を付与し、感受性のあるハムスターモデルにおいて肺炎及び病原性組織損傷を容易に予防したことを示した。

40

【0200】

まとめると、ウイルス学、免疫学及び予測病理組織学データ(後者は進行中)の完全なセットに基づき、LV::S_{FL}ベクターは、2種の適切な動物モデルにおいて、特に、粘膜i.n.投与の際に、SARS-CoV-2感染に対する実質的なレベルの防御と相関して、S_{CoV-2}特異的nAb及びT細胞応答を誘発する。

【0201】

(実施例1.6)

50

考察

予防戦略は、パンデミックになって6ヶ月、遅くなる兆候もなく、依然として指数関数的に広がり続けるSARS-CoV-2感染を制御するために必要である。現在、アカゲザルにおけるSARS-CoV-2での一次感染が、再曝露に対する防御免疫を導くことが示されている(Chandrashekarら、2020)。ネイキッドDNA(Yuら、2020)若しくはmRNA、組換えタンパク質、アデノウイルスAd5ベクター(Zhuら、2020)を含む、複製若しくは非複製ウイルスベクター、又はミョウバン-アジュバント不活化ウイルス(Gaoら、2020)に基づく、多数のワクチン候補は、COVID-19予防のため活発な開発下にある。SARS-CoV-2抗原をコードする遺伝子を送達するためのLVベクターを選択するための本発明者らの免疫学的根拠は、*in situ*での異種遺伝子発現の有効性について得られた知見、並びにこの免疫プラットフォームにより誘発された体液性及び細胞介在性免疫の寿命及び複合性質に基づく。LVに固有なのは、増殖し、静止する細胞を形質導入する能力であり(Esslingerら、2002;Heら、2005)、これにより、LVは、強く、かつ持続性の適応応答を誘発するための強力なワクチン接種戦略として働く(Beignonら、2009;Buffaら、2006;Coutantら、2012;Gallinaroら、2018;Iglesiasら、2006)。特に、多くの他のウイルスベクターと正味対照的に、LVベクターは、ヒトがかろうじて曝露されている、水疱性口内炎ウイルス由来の糖タンパク質エンベロープでのそれらのシュードタイプ化と関連して、集団における既存の免疫に悩まされない。本発明者らは、最近、Zikaエンベロープを発現しているLVの単回注射が、Zika感染に対する迅速かつ耐久性の防御をもたらすことを示した(Kuら、2020)。本発明者らの最近の、絶対的基準であるAd5免疫ベクターに対するLVの包括的系統比較はまた、マウスモデルにおける多機能及び中心メモリーT細胞、並びに非近交系ラットにおけるより強い免疫原性を誘導するLVの優れた能力を実証し(Kuら、2021(PMID: 33357418))、これは、ワクチン適用のためのLVの大きいに適合した特性を強調している。

10

20

【0202】

本発明者らは、それぞれが、Sのバリエーションのうちの1つ、すなわち、全長、膜固定(LV::S_{FL})、S1-S2エクトドメイン、膜貫通型及びC末端の短い内部の尾部(LV::S1-S2)を欠く、又はS1単独(LV::S1)をコードするLVの有効性を評価した。これらのLVのそれぞれの単回投与が、高い抗SARS-CoV-2 Abタイターを誘導することができても、LV::S_{FL}のみが、高い機能的nAbを誘導することができた。LVベースのワクチンのこのような単回注入は、中和活性を誘導し、それは平均で、軽度の症状を示しているSARS-CoV-2患者のコホートに見られるものと同等であった。この知見は、LV::S_{FL}ベクターにより誘導される液性応答の防御可能性を予測した。並行して、S特異的CD4⁺及びCD8⁺T細胞応答をまた、本発明者らが、C57BL/6(H-2^b)マウスにおいて同定した多数のMHC-I又はII拘束性免疫原性領域に対して検出可能である、単回LV::S_{FL}注射の2週間後という早さで、マウスの脾臓において観察した。

30

【0203】

実験マウスのSARS-CoV-2複製物に対する許容性がないこと、及び欧州においてhACE2トランスジェニックマウスを入手できないことと関連して、本発明者らは、hACE2発現を、SARS-CoV-2接種に先立ち*i.n.* Ad5::hACE2事前処置により、気道において誘導する*in vivo*感染マウスモデルを設定する。このアプローチは、マウスを、肺におけるSARS-CoV-2複製に対してほぼ許容にし、このウイルスに対するワクチン又は薬物有効性の評価を可能にする。この方法をまたうまく使用して、MERS-CoVでのマウス感染の研究のためのヒトDPP4の発現を確立した(Zhaoら、2014)。Ad5::hACE2モデルが、生理学的ACE2発現特性を完全には模倣せず、そのためSARS-CoV-2感染の病態生理学の全ての態様を反映し得なくても、それは、抗ウイルス薬物、ワクチン候補、様々な変異又はSARS-CoV-2複製についての遺伝子バックグラウンドの*in vivo*効果を評価するための適切なモデルをもたらす。低用量のAd5::hACE2/マウスを使用することによって、滴下注入の4日後に、SARS-CoV-2の接種前のAd5関連炎症が存在しないことの指標である、検出可能な特定のCD45⁺細胞動員は存在しなかった。

40

50

【0204】

高率のSARS-CoV-2複製を可能にする形質導入したマウスモデルにおいて、ウイルス接種の6週間前の、 1×10^7 TUのLV::S_{FL}の単回i.p.投与によるワクチン接種は、ウイルス複製を約1log₁₀阻害するのに十分であった。全身経路を介した更なるブースティングは、単回投与と比較したとき、防御率の改善を与えなかった。しかしながら、全身経路によるプライミング及び粘膜経路を介したブースティングは、ウイルス複製を効率的に阻害し、肺炎症を回避した。このような防御は、血清における高タイトーの抗S_{CoV-2} IgG及び強い中和活性と相関した。S特異的T細胞応答をまた、ELISPOTにより評価して、LV::S_{FL}で免疫したマウスの脾臓において検出し、続いて重複する15merのペプチドのプールで脾細胞を刺激した。適当なKOマウスにおけるずっと長期の実験又は養子免疫細胞トランスファーアプローチは、疾患の重症度又はSARS-CoV-2に対する防御に関与する免疫学経路を同定するのに必要である。一緒にLVベースのワクチン候補で非常に効率的に誘導した、nAbと細胞介在性免疫の両方は、協同して、感染及びウイルス複製を阻害する。

10

【0205】

粘膜の炎症及び肺組織損傷の徹底的な低減により成し遂げられる、SARS-CoV-2感染に対する実質的な程度の防御を、組込み型又は非組込み型LV::S_{FL}のいずれかを用いたプライム-ブースト/標的レジメン後に免疫したメソクリセタス・アウラタスゴールデンハムスターにおいて観察した。この非常に感受性のある種での防御結果の確認は、特に、その非組込み型バリエーション下で、臨床試験に将来導入するためのLV::S_{FL}ワクチン候補を更に支持する。

20

【0206】

コロナウイルスの宿主細胞への進入のAb依存性強化(ADE)は、コロナウイルスに対するワクチン接種における障壁となり得る機序として誘発される。マカクにおけるDNA(Yuら、2020)又は不活化SARS-CoV-2ウイルス(Gaoら、2020)ワクチン接種を用いると、免疫病理学的憎悪は観察されなかったが、除外することはできなかった。Abタイトーの減衰後でさえ、長期観察は、このような仮説を排除するために必要であり得る。MERS-CoVの場合、ウイルス受容体ヒトDPP4を模倣し、S_{MERS}の立体構造再構成を誘導することにより、1つの特定のRBD特異的中和モノクローナルAb(Mersmab1)は、MERS-CoVの宿主細胞へのin vitro ADEを仲介することができることが報告されている(Wanら、2020)。本発明者らは、パラトプレパートリー複雑さを有する、ポリクローナルAb応答を、ワクチンにより誘導されるポリクローナル応答を表し得ない、モノクローナルAbの特異な特性と比較することは困難であると考えている。加えて、同じチームの非常に矛盾する結果は、Mersmab1のヒト化バージョンを用いた単回投薬処置が、ヒト化トランスジェニックマウスモデルの致死的なMERS負荷からの完全な防御を与えることを報告した(Qiuら、2016)。したがって、一部の条件でin vitroで細胞宿主の浸潤を促進し得るAbを用いてすら、in vivoでの感染の憎悪が存在しないだけでなく、著しい防御が存在する。実際、Abが、in vivoでADEを引き起こし得ることを確認するために、彼らが、このようなAbの生成の確率を推定するまで、それは、大規模B細胞融合により、必要である。

30

40

【0207】

予防ワクチン接種は、感染性疾患、特に、新興コロナウイルスに対する、最もコスト上有効であり、かつ効率的な戦略である。本発明者らの結果は、ワクチン接種の粘膜経路を介して使用されるSARS-CoV-2のS_{FL}タンパク質をコードするLVベクターが、COVID-19に対する有望なワクチン候補を表すという強力な証拠をもたらす。

【0208】

50

【表 2】

Table 1. SARS-CoV-2 ウイルス負荷量決定のためのプライマー及びプローブの配列

プライマー/プローブ名 及び配列番号	DNA 配列
「E-Sarbeco」 Fw -番号 34	5'-ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT-3'
「E-Sarbeco」 Rv -番号 35	5'-ATATTGCAGCAGTACGCACACA-3'
「E-Sarbeco」 プローブ- 番号 36	5'-FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BHQ- 1-3'

10

20

30

40

50

【 0 2 0 9 】

【表 3 A】

Table 2 qRT-PCR によるマウスサイトカイン及びケモカインを定量するために使用されるプライマーの配列

遺伝子及び配列番号	配列	
β-グロビン - 番号 37	F : 5'- ATGGGAAGCCGAACATACTG -3'	
- 番号 38	R : 5'- CAGTCTCAGTGGGGGTGAAT -3'	
GAPDH - 番号 39	F : 5'- TTCACCACCATGGAGAAGGC -3'	10
- 番号 40	R : 5'- GGCATGGACTGTGGTCATGA -3'	
IFNα - 番号 41	F : 5'- GGATGTGACCTTCCTCAGACTC -3'	
- 番号 42	R : 5'- ACCTTCTCCTGCGGGAATCCAA -3'	
IFNγ - 番号 43	F : 5'- TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA -3'	
- 番号 44	R : 5'- TGGCTCTGCAGGATTTTCATG -3'	
TNFα - 番号 45	F : 5'- CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA -3'	
- 番号 46	R : 5'- TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC -3'	
TGFβ - 番号 47	F : 5'- TGACGTCACTGGAGTTGTACGG -3'	20
- 番号 48	R : 5'- GGTTTCATGTCATGGATGGTGC -3'	
IL1β - 番号 49	F : 5'- TGGACCTTCCAGGATGAGGACA -3'	
- 番号 50	R : 5'- GTTCATCTCGGAGCCTGTAGTG -3'	
IL2 - 番号 51	F : 5'- CCTGAGCAGGATGGAGAATTACA -3'	
- 番号 52	R : 5'- TCCAGAACATGCCGCAGAG -3'	
IL4 - 番号 53	F : 5'- CGAGGTCACAGGAGAAGGGA -3'	
- 番号 54	R : 5'- AAGCCCTACAGACGAGCTCACT -3'	30
IL5 - 番号 55	F : 5'- GATGAGGCTTCCTGTCCCTACT -3'	
- 番号 56	R : 5'- TGACAGGTTTTGGAATAGCATTTCC -3'	
IL6 - 番号 57	F : 5'- CTGCAAGTGCATCATCGTTGTTG -3'	
- 番号 58	R : 5'- TACCACTTCACAAGTCGGAGGC -3'	
IL10 - 番号 59	F : 5'- GGTTGCCAAGCCTTATCGGA -3'	
- 番号 . 60	R : 5'- ACCTGCTCCACTGCCTTGCT -3'	
IL12p40 - 番号 61	F : 5'- GGAAGCACGGCAGCAGAATA -3'	
- 番号 62	R : 5'- AACTTGAGGGAGAAGTAGGAATGG -3'	40

【 0 2 1 0 】

【表 3 B】

IL17A - 番号 63	F : 5'- GAAGCTCAGTGCCGCCA -3'
- 番号 64	R : 5'- TTCATGTGGTGGTCCAGCTTT -3'
IL18 - 番号 65	F : 5'- GACAGCCTGTGTTTCGAGGATATG -3'
- 番号 66	R : 5'- TGTTCTTACAGGAGAGGGTAGAC -3'
IL33 - 番号 67	F : 5'- CTACTGCATGAGACTCCGTTCTG -3'
- 番号 68	R : 5'- AGAATCCCGTGGATAGGCAGAG -3'
CCL2 - 番号 69	F : 5'- AGGTCCCTGTCATGCTTCTG -3'
- 番号 70	R : 5'- TCTGGACCCATTCTTCTTG -3'
CCL3 - 番号 71	F : 5'- CCTCTGTCACCTGCTCAACA -3'
- 番号 72	R : 5'- GATGAATTGGCGTGGAATCT -3'
CCL5 - 番号 73	F : 5'- GTGCCCACGTCAAGGAGTAT -3'
- 番号 74	R : 5'- GGGAAAGCGTATACAGGGTCA -3'
CXCL5 - 番号 75	F : 5'- GCATTTCTGTTGCTGTTACGCTG -3'
- 番号 76	R : 5'- CCTCCTTCTGGTTTTTCAGTTTAGC -3'
CXCL9 - 番号 77	F : 5'- AAAATTTTCATCACGCCCTTG -3'
- 番号 78	R : 5'- TCTCCAGCTTGGTGAGGTCT -3'
CXCL10 - 番号 79	F : 5'- GGATGGCTGTCCTAGCTCTG -3'
- 番号 80	R : 5'- ATAACCCCTTGG GAAGATGG -3'

10

20

【0211】

(実施例2)

30

ヒトACE2遺伝子を有するトランスジェニックマウスの生成

これまで、別個の転写及び発現調節配列下に、hACE2遺伝子を発現する異なる系統のいく匹かのトランスジェニック(Tg)マウスがもたらされ、そのうちの一部は、2003年のSARS-CoV流行の出現のときに生じた要件を満たすために行われた開発を起源とする。これらの以前に開発されたTgマウス及び更なるモデルを、SARS-CoVの病原性の研究及び理解のため評価し、ウイルス複製、時に、ある程度の疾患の症状又は臨床上的病気に許容であることを示したが、SARS-CoV-2を接種したTgマウスにおける観察した様々な臨床特性は、感染の転帰の全ての態様を再現するのに適当であることは依然として判明しておらず、特に、ヒト患者において観察された広がったウイルス、特に、脳まで広がったウイルス等の、器官及び気道を超えて広がったウイルスを十分には示さなかった。また入手可能なTgマウスは、ヒト患者において観察された症状を再現する全ての一貫した疾患の症状を示していない。

40

【0212】

A B6.K18-ACE2^{2PrImn}/JAXマウス系統は、JAX Laboratories(Jackson Laboratories社、Bar Harbor、ME)に既に寄託されている。しかしながら、本発明者らが、本発明に従い作製した新規のB6.K18-hACE2^{1P-THV}トランスジェニックマウスは、SARS-CoV-2鼻腔内(i.n.)接種後に同定した別個の特徴を呈した。事実、それらの肺のSARS-CoV-2複製に対する大いなる許容性及び抹消器官へのウイルス播種に加えて、B6.K18-hACE2^{1P-THV}マウスは、驚くべきことに、脳における実質的なウイルス複製を可能にし、それは、以前に入手可能であったB6.K18-ACE2^{2PrImn}/JAX系統において観察さ

50

れた複製範囲より、約 $4\log_{10}$ 高い(McCrayら、2007)。この新規マウスモデルは、COVID-19ワクチン又はCOVID-19治療有効性の研究における広範な適用だけでなく、COVID-19免疫/神経生理病理を解明するための実験モデルをもたらす。SARS-CoV-2の神経向性が示され、一部のCOVID-19ヒト患者は、頭痛、錯乱、嗅覚脱失、味覚異常、吐き気、及び嘔吐のような症状を呈する(Bourgonjeら、2020)。嗅覚粘膜貫通型SARS-CoV-2浸潤はまた、ごく最近、COVID-19を有するヒト個体における中枢神経系進入の入口として記載されている(<https://doi.org/10.1038/s41593-020-00758-5>)。コロナウイルスは、中枢神経系に感染することができるため(Bergmannら、2006)、B6.K18-hACE2^{IP-THV}の小さいげっ歯類実験モデルは、(i)脳の免疫防御の調査及び(ii)COVID-19由来の神経病理の探索についての主要な興味の貴重な前臨床又は同時臨床動物モデルを表す。

10

【0213】

1. ヒトケラチン18プロモーターの構築

ヒトK18プロモーター(GenBank:AF179904.1ヌクレオチド90~2579)を、既に記載された通り(Chowら、1997; Koehlerら、2000)、A549細胞溶解物からネステッドPCRにより増幅した。「i6x7」イントロン(GenBank:AF179904.1ヌクレオチド2988~3740)を、Genscriptにより合成した。B6.K18-ACE2^{2PrImn}/JAX系統を生成するために以前使用した、「K18i6x7PA」プロモーターは、K18プロモーター、hACE2遺伝子の5'に「i6x7」イントロン及び3'にエンハンサー/ポリA配列(PA)を含む。ここで使用したK18^{IP-THV}プロモーターは、PAの代わりに、hACE2遺伝子の3'により強力な野生型ウッドチャック肝炎ウイルス転写後制御エレメント(WPRE)を含有する。ポリA配列を含有する3'制御領域を有するK18i6x7PA構築物と対照的に、K18^{IP-THV}構築物は、遺伝子組換えのため使用したpFLAP LVプラスミドの3'末端反復配列(LTR)内に既に存在するポリA配列の恩恵を受ける。i6x7イントロン部分を修飾して、コンセンサス5'スプライシングドナー及び3'ドナー部位配列を導入した。AAGGGG(配列番号97)ドナー部位を、AAGTGG(配列番号95)コンセンサス部位について更に修飾した。コンセンサス配列ロゴに基づき(Doganら、2007)、スプライシングアクセプター部位(本来の配列GenBank AF179904.1におけるTACAATCCCTC(配列番号82)及びK18^{JAX}におけるTTTTTTTTTTT(配列番号83))の前にあるポリ-ピリミジントラクトをCTTTTTCCTTCC(配列番号96)で置換して、形質導入中の逆転写工程との不適合性を制限した。更に

20

30

【0214】

2. 遺伝子組換え

高いタイター(8.32×10^9 TU/ml)の組込み型LV::K18-hACE2^{IP-THV}を、偽妊娠B6 CBAF1メス(Charles Rivers社)に移植した受精卵の透明部に微量注入した。尾部生検から調製したゲノムDNAに適用したPCRにおいてhACE2-フォワード:5'-TCC TAA CCA GCC CCC TGT T-3'(配列番号85)及びhACE2-リバース:5'-TGA CAA TGC CAA CCA CTA TCA CT-3'(配列番号86)プライマーを使用することによって、N0マウスを、組込み及び1ゲノム当たりのhACE2遺伝子のコピー数について調べた。子孫の安定化のため、次いで、導入遺伝子陽性オスを、WT C57BL/6メス(Charles Rivers社)と交雑させた。組込み型LV::K18-hACE2^{IP-THV}の受精卵の核への微量注入による、導入遺伝子トランスファーが、特に効率的であった。N0世代で、得られたマウスのうちの約11%、すなわち、139匹のうち15匹は、1ゲノム当たり少なくとも1コピーの導入遺伝子を有していた。導入遺伝子を有する8匹のN0オスを、メスC57BL/6 WTマウス(Janvier社、Le Genest Saint Isle、フランス)と交雑させた。N1世代で、得られたマウスのうち

40

50

の約62%、すなわち、147匹のうちの91匹が、1ゲノム当たり少なくとも1コピーの導入遺伝子を有していた。導入遺伝子を有する10匹のN1オスを、メスC57BL/6 WTマウスと更に交雑させた。

【0215】

免疫期間中、メス又はオストランスジェニックマウスを、特定の病原体のない条件下で、個別に換気したケージに収容した。マウスを、Institut Pasteur動物施設において、SARS-CoV-2接種のための隔離飼育器において個別にフィルターしたケージに移した。i.n.注射に先立ち、マウスを、ケタミン(Imalgene社、80mg/kg)及びキシラジン(Rompun社、5mg/kg)のi.p.注射により麻酔した。

【0216】

3. トランスジェニックマウスにおけるhACE2遺伝子の遺伝子型判定及びhACE2遺伝子コピー数/ゲノムの定量

トランスジェニックマウス由来のゲノムDNA(gDNA)を、フェノール-クロロホルム抽出により、尾部生検から調製した。gDNA60ngを、Table 3(表4)にあげる特異的なプライマーを使用した、SyBr Greenを用いたqPCRの鑄型として使用した。同じ鑄型を使用し、同様の反応プレートにおいて、マウスPKD1(多発性嚢胞腎1)及びGAPDHをまた定量した。全ての試料を、以下の通り、10µlの反応液において4重で実行した:95℃で10分間、95℃で15秒間及び60℃で30秒間の40サイクル。導入遺伝子のコピー数を計算するために、PKD1を標準物質として、及びGAPDHを内部対照として使用する、 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法を適用した。 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ は、PKD1遺伝子に関するhACE2遺伝子のコピー数の倍率変化をもたらす。

【0217】

【表4】

Table 3. B6.K18-hACE2^{IP-THV} トランスジェニックマウスを遺伝子型判定するために使用されるプライマーの配列

プライマー及び配列番号	
hACE2 Fw - 配列番号 85	TCCTAACCAGCCCCCTGTT
hACE2 Rv- 配列番号 86	TGACAATGCCAACCA CTATCACT
PKD1 Fw- 配列番号 87	GGCTGCTGAGCGTCTGGTA
PKD1 Rv- 配列番号 88	CCAGGTCCTGCGTGTCTGA
GAPDH-ACE2 Fw- 配列番号 89	GCCCAGAACATCATCCCTGC
GAPDH-ACE2 Rv- 配列番号 90	CCGTTTCAGCTCTGGGATGACC

【0218】

4. SARS-CoV-2複製に対するK18-hACE2^{IP-THV}許容性

N1マウスのSARS-CoV-2複製に対する許容性を、子孫から試料採取した個体において評価した。1ゲノム当たり様々な数の導入遺伝子コピーを有するN1メスを試料採取し(図

14A)、SARS-CoV-2複製に対するそれらの許容性について評価した(図14B)。それを行うために、選択したマウスに、全身麻酔下で、National Reference Centre for Respiratory Viruses hosted by Institut Pasteur (Paris、フランス)が供給する、 0.3×10^5 TCID₅₀のBetaCoV/フランス/IDF0372/2020 SARS-CoV-2臨床単離物をi.n.接種した(Lescureら、2020)。マウスのため、20 μ lにウイルス接種菌液を含有させた。次いで、動物を、Institut Pasteurのバイオセーフティーレベル3の動物施設において隔離飼育器に収容した。

【0219】

生きたSARS-CoV-2が感染した動物から回収した器官を、これらの施設の承認された標準的な操作手法に従い操作した。

【0220】

接種の3日後(dpi)、肺ウイルス負荷量の平均 $\pm$ SDは、許容マウスにおいて、 $(3.3 \pm 1.6) \times 10^{10}$ コピーのSARS-CoV-2 RNA/マウスと、高かった(図14B)。1ゲノム当たりの導入遺伝子のコピー数(図14A)は、肺におけるSARS-CoV-2複製率に比例的ではなく(図14B)、したがって、この表現型に影響しなかったことに注意されたい。肺ウイルス負荷量は、本発明者らが、ワクチン有効性アッセイも可能にする適当なモデルとして既に記載した、hCAE2 (Ad5::hACE2)をコードするアデノウイルスベクター血清型5でi.n.で事前処置した陽性対照マウスにおいて検出したものより高かった。注目すべきことに、実質的なウイルス負荷量、すなわち、 $(5.7 \pm 7.1) \times 10^{10}$ コピーのSARS-CoV-2 RNA/マウスをまた、許容マウスの脳において検出した(図14B)。ウイルス接種後のこの時間点で、心臓及び腎臓において、より低い程度までではあったが、ウイルス散在をまた観察した。

【0221】

5. SARS-CoV-2複製に対する許容性に関するB6.K18-ACE2^{2PrImn}/JAXとK18-hACE2^{1P-THV}系統の比較

本発明者らは、更に、B6.K18-hACE2^{1P-THV}及びB6.K18-ACE2^{2PrImn}/JAXマウスにおいて、SARS-CoV-2の肺及び脳における複製並びに様々な器官への播種を比較して評価した(図14C)。肺ウイルス負荷量は、B6.K18-ACE2^{2PrImn}/JAXマウスにおける $(18.3 \pm 13.3) \times 10^{10}$ コピーと比較して、B6.K18-hACE2^{1P-THV}マウスにおいてより低く、すなわち、 $(2.1 \pm 2.2) \times 10^{10}$ コピーのSARS-CoV-2 RNA/マウスであった。しかしながら、B6.K18-hACE2^{1P-THV}マウスの脳におけるウイルス複製、すなわち、 $(7.4 \pm 7.9) \times 10^{10}$ コピーのSARS-CoV-2 RNA/マウスは、それらのB6.K18-ACE2^{2PrImn}/JAX対応物における $(1.9 \pm 74.3) \times 10^8$ コピーと比較して、実質的により高かった。サブゲノムECoV-2 mRNA(Esg)に特異的なqRT-PCRによる脳ウイルス負荷量の測定により、B6.K18-hACE2^{1P-THV}マウスにおいて $(7.55 \pm 7.74) \times 10^9$ コピーのSARS-CoV-2 RNAの平均 $\pm$ SDを検出し、5匹のうち4匹のB6.K18-ACE2^{2PrImn}/JAXマウスにおいてウイルス複製を検出できなかった。サブゲノムECoV-2 mRNA(Esg)に特異的なqRT-PCRによるウイルス負荷量の測定により、複製/感染性SARS-CoV-2ウイルス粒子のみを特徴付けることに注意されたい。したがって、脳における高率のSARS-CoV-2複製及び多い負荷量の感染性ウイルス粒子は、新規のB6.K18-hACE2^{1P-THV}系統の主要な別個の表現型である。脳においてqRT-PCRにより行ったhACE2 mRNA発現の比較は、B6.K18-ACE2^{2PrImn}/JAXマウスと比較して、B6.K18-hACE2^{1P-THV}マウスの脳におけるずっと多い導入遺伝子の発現量を示した(図14C)。トランスジェニック系統における頸部SARS-CoV-2複製間のこの実質的な差は、B6.K18-hACE2^{1P-THV}マウスの脳における有意により高いhACE2 mRNA発現によって実証された(図14D)。しかしながら、B6.K18-hACE2^{1P-THV}マウスの肺におけるhACE2 mRNA発現はまた、B6.K18-ACE2^{2PrImn}/JAXマウスにおけるものより高く、前者におけるより少ないウイルス複製を説明することはできない。差は、統計上有意に至らなかったが、より多いウイルス負荷量への傾向をまた、B6.K18-ACE2^{2PrImn}/JAXマウスと比較して、B6.K18-hACE2^{1P-THV}の腎臓及び心臓において観察した(図14C)。差は、統計上有意に至らなかったが、より多

10

20

30

40

50

ウイルス負荷量への傾向をまた、B6.K18-hACE2^{IP-THV}の腎臓及び心臓において観察した。

【0222】

脳ウイルス負荷量と関連し、ずっと強い炎症を、3dpiで、B6.K18-ACE2^{2Prlmn/JAX}マウスと比較して、B6.K18-hACE2^{IP-THV}マウスの脳において、qRT-PCRにより検出し、これは、前者の中枢神経系における免疫学/炎症症状を示したが、後者において示さなかった(図14C)。全肺ホモジネートに適用したqRT-PCRにより評価した、肺ウイルス負荷量と一致し、B6.K18-hACE2^{IP-THV}マウスは、B6.K18-ACE2^{2Prlmn/JAX}マウスより弱い肺の炎症を呈した(図14E)。注目すべきことに、全脳ホモジネートに適用したこのアッセイは、B6.K18-hACE2^{IP-THV}において実質的な程度の炎症を検出したが、B6.K18-ACE2^{2Prlmn/JAX}マウスにおいて検出しなかった(図14E)。加えて、B6.K18-hACE2^{IP-THV}マウスは、3~4dpiに、人道的エンドポイントに至り、したがって、それらのB6.K18-ACE2^{2Prlmn/JAX}対応物より急激な致死性SARS-CoV-2介在性疾患を呈する{Winkler、2020 #102}。

10

【0223】

したがって、肺とCNSの両方でのSARS-CoV-2複製に対する大きな許容性、顕著な脳炎症及び急激な致死性疾患は、新規のB6.K18-hACE2^{IP-THV}トランスジェニックモデルの主要な別個の特性である。

【0224】

動物研究の倫理的承認

20

全ての実施例において、地元の倫理委員会(CETEA #DAP20007、CETEA #DAP200058)及びMinistry of High Education and Research APAFIS#24627-2020031117362508 v1によるプロトコール合意、Institut Pasteur Safety, Animal Care and Use Committeeによる承認後に、欧州及びフランスのガイドライン(1987年10月19日の指令86/609/CEE及び法令87-848)に従い、マウス及びハムスターでの実験法を行った。

【0225】

(実施例3)

鼻腔内レンチベクターワクチン接種によるSARS-CoV-2に対する完全なCNS及び肺予防
ここで、本発明者らは、脳のSARS-CoV-2複製に対する前例のない許容性を有する新規のhACE2トランスジェニックマウス系統を生成した。この固有の前臨床動物モデルの使用により、本発明者らは、SARS-CoV-2に対する肺ばかりでなく、CNSの完全な防御に達するためのこのLVベースのワクチン候補でのi.n.ブースト免疫の重要性を示した。本発明者らの結果は、非細胞傷害性LV及び非炎症性LVを用いたi.n.ワクチン接種工程は、COVID-19により影響される主要な解剖学的部位における無菌免疫を誘発するための高性能かつ安全な戦略であると思われることを示す。

30

【0226】

方法

LV::S_{ΔF2P}の構築及び産生

コドン最適化S_{ΔF2P}配列(1~1262)(配列番号14)を、pMK-RQ_S-2019-nCoVから増幅し、天然のヒトieCMVプロモーターと変異ウッドチャック転写後制御エレメント(WPRE)配列の間の、BamHIとXhoI部位の間の制限酵素/ライゲーションによりpFlapに挿入した。WPREのatg開始コドンは、安全性の懸念のため、ウッドチャック肝炎ウイルスの下流の切断型「X」タンパク質の転写を回避するために変異(mWPRE)させた(図17)。プラスミドを増幅し、それを使用して、実施例1で既に記載した通り、LVを産生した。

40

【0227】

マウス

トランスジェニックマウスを、実施例2に詳細に開示した通り、生成した。

【0228】

液性及びT細胞免疫、炎症

50

最近他で詳述された通り(Kuら、2021)、T脾細胞応答を、IFN-g ELISPOTにより定量し、抗S IgG又はIgA Abを、組換え安定化Scov-2を使用したELISAにより検出した。NAbの定量を、最近記載された通り(Annaら、2020;Sterlinら、2020)、Scov-2シールドタイプ化LVの使用により行った。ハムスター及びマウスの肺及び脳における炎症性メディエーターのqRT-PCR定量を、実施例1に詳述した通り、TRIzol試薬により抽出した全RNAにおいて行った。

【0229】

SARS-CoV-2接種

ハムスター又はトランスジェニックB6.K18-hACE2^{IP-THV}若しくはB6.K18-ACE2^{2Pr1mn/JAX}を、ケタミンとキシラジンの混合物のi.p.注射により麻酔し、バイオセーフティキャビネット3に移し、 0.3×10^5 TCID₅₀のBetaCoV/フランス/IDF0372/2020 SARS-CoV-2臨床単離物をi.n.接種した(Lescureら、2020)。この臨床単離物は、Pr. van der Werfを長とする、Institut Pasteur(Paris、フランス)が主催するNational Reference Centre for Respiratory Virusesの贈り物であった。この株を単離したヒト試料を、Bichat Hospital、Paris、フランスのDr. Lescure及びPr. Yazdanpanahが提供した。マウスについて20 µl、ハムスターについて50 µlに、ウイルス接種菌液を含有させた。動物を、Institut Pasteurのバイオセーフティーレベル3動物施設において、隔離飼育器に収容した。感染した動物から回収した器官を、これらの施設の承認された標準的な手法に従い操作した。

【0230】

器官におけるウイルス負荷量の決定

マウス又はハムスター由来の器官を、無菌的に取り出し、直ぐに-80℃で冷凍した。循環SARS-CoV-2由来のRNAを、最近記載された通り(Kuら)、肺から調製した。簡単に言うと、肺ホモジネートを、MP Biomedical Fastprep 24 Tissue Homogenizerにおいて、氷冷したPBS500 µl中の溶解基質M(MP Biomedical社)を使用して、器官を融解し、ホモジネートすることによって調製した。RNAを、2000gで10分間、遠心分離した肺ホモジネートの上清から抽出した。或いは、全RNAを、TRIzol試薬1mLを含有する溶解基質D(MP Biomedical社)を加え、MP Biomedical Fastprep 24 Tissue Homogenizerを使用して、6.0m/秒で30秒間、2回ホモジネートすることによって、肺又は他の器官から調製した。全RNAを、TRIzol試薬(ThermoFisher社)を使用して抽出した。SARS-CoV-2 E遺伝子(Cormanら、2020)又はEサブゲノムmRNA(sgmRNA)(Wolfelら、2020)を、SuperScript(商標)III Platinum One-Step qRT-PCR System(Invitrogen社)並びに特異的なプライマー及びプローブ(Eurofins社)を使用した、逆転写及びリアルタイム定量TaqMan(登録商標)PCR後に定量した(Table 4(表5))。EsgmRNAアッセイの標準曲線を、「T7 SARS-CoV-2 E-sgmRNA」のPCR断片に由来するin vitroで転写したRNAを使用して行った。in vitroで転写したRNAを、T7 RibomAX Express Large Scale RNA産生システム(Promega社)を使用して合成し、フェノール/クロロホルム抽出並びにイソプロパノール及びエタノールを用いた2回の連続沈殿により精製した。RNAの濃度を、光学密度測定により決定し、100 µg/mL tRNA担体を含有するRNaseフリー水中の 10^9 ゲノム相当物/µLに希釈し、-80℃で保存した。このin vitroで転写したRNAの連続希釈液を、10 µg/ml tRNA担体を含有するRNaseフリー水において調製して、それぞれのアッセイについて標準曲線を構築した。PCR条件は、(i)55℃で10分間の逆転写、(ii)95℃で3分間の酵素不活性化、及び(iii)45サイクルの、95℃で15秒間、58℃で30秒間の変性/増幅であった。PCR産物を、ABI 7500 Fast real-time PCRシステム(Applied Biosystems社)において分析した。

【0231】

10

20

30

40

50

【表 5】

Table 4. qRT-PCR による SARS-CoV-2 負荷量を定量するために使用されるプライマーの配列

プライマー/プローブ 配列番号	DNA 配列
"E-Sarbeco" Fw 番号 91	5'-ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT-3'
"E-Sarbeco" Rv 番号 92	5'-ATATTGCAGCAGTACGCACACA-3'
"E-Sarbeco" 番号 93	5'-FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BHQ-1-3'
"E-sgmRNA" Fw 番号 94	5'-CGATCTCTTGTAGATCTGTTCTC-3'

10

20

【0232】

肺及び脳の免疫細胞の細胞測定分析

肺自然免疫細胞の単離及び染色を、実施例1に非常に詳述した。マウスのそれぞれの群由来の頸部リンパ節、嗅球及び脳をプールし、37℃で30分間のインキュベーション、400U/ml IV型コラゲナーゼ及びDNase I(Roche社)で処理した。次いで、頸部リンパ節及び嗅球を、ガラスホモジナイザーでホモジネートし、一方、脳を、GentleMacs(Miltenyi Biotech社)の使用によりホモジネートした。次いで、細胞懸濁液を、100µmの孔のフィルターを通して濾過し、洗浄し、1200rpmで8分間遠心分離した。脳由来の細胞懸濁液を、RT、1360gで25分間の遠心分離後、Percoll勾配で免疫細胞を富化した。肺から回収した細胞を、最近他で記載された通り(Kura、2021)、染色した。脳から回収した細胞を、以下の通り、適切なmAb混合物により染色した。(i)自然免疫細胞を検出するために、Near IR Live/Dead(Invitrogen社)、FcγII/III受容体ブロッキング抗CD16/CD32(BD Biosciences社)、BV605-抗CD45(BD Biosciences社)、PE-抗CD11b(eBioscience社)、PE-Cy7-抗CD11c(eBioscience社)、(ii)NK、好中球、Ly-6C^{+/+}単球及びマクロファージを検出するために、Near IR DL(Invitrogen社)、FcγII/III受容体ブロッキング抗CD16/CD32(BD Biosciences社)、BV605-抗CD45(BD Biosciences社)、PE-抗CD11b(eBioscience社)、PE-Cy7-抗CD11c(eBioscience社)、APC-抗Ly6G(Miltenyi社)、BV711-抗Siglec-F(BD社)、AF700-抗NKp46(BD Biosciences社)、FITC-抗Ly6C(Abcam社)、(iii)養子免疫細胞を検出するために、Near IR Live/Dead(Invitrogen社)、FcγII/III受容体ブロッキング抗CD16/CD32(BD Biosciences社)、APC-抗CD45(BD社)、PerCP-Cy5.5-抗CD3(eBioscience社)、FITC-抗CD4(BD Pharmingen社)、BV711-抗CD8(BD Horizon社)、BV605-抗CD69(Biolegend社)、PE-抗CCR7(eBioscience社)及びVioBlue-抗B220(Miltenyi社)。細胞を、適切な混合物と共に、4℃で25分間インキュベートし、3% FCSを含有するPBSにおいて洗浄し、4℃、一晩の4%パラフォルムアルデヒドとのイン

30

40

50

キュベーションで固定した。試料を、Attune NxT cytometer(Invitrogen社)で取得し、FlowJoソフトウェア(Treestar社、OR、USA)により分析した。

【0233】

結果

SARS-CoV-2複製に対する実質的な脳の許容性を有する新規のhACE2トランスジェニックマウス

B6.K18-hACE2^{IP-THV}マウスを、実施例2に開示した通り、生成した。これらのマウスのSARS-CoV-2複製に対する許容性を評価し、肺とCNSの両方でSARS-CoV-2複製に対して高い許容性、顕著な脳炎症及び急激な致死性疾患が、この新規B6.K18-hACE2^{IP-THV}トランスジェニックモデルの主要な別個の特性であると決定した。

10

【0234】

LV::S_{ΔF2P}で免疫したB6.K18-hACE2^{IP-THV}マウスにおける肺及び脳の完全な防御

次いで、本発明者らは、B6.K18-hACE2^{IP-THV}マウスにおけるLV::S_{ΔF2P}のワクチン有効性を評価した。0週目に、 1×10^7 TU/マウスのLV::S_{ΔF2P}又は空のLV(偽)でi.m.プライミングし、次いで、3週目に、同用量の同じベクターでi.n.ブースティングした個体(図15A)。次いで、マウスに、5週目にSARS-CoV-2を負荷した。高い血清中和活性、すなわち、 5466 ± 6792 のEC50平均±SDを、LV::S_{ΔF2P}をワクチン接種したマウスにおいて検出した(図15B)。このワクチン接種は、肺ばかりでなく、脳においてもSARS-CoV-2複製に対する実質的な程度の防御を与えた(図15C)。特に、Esg qRT-PCRによる脳のウイルス負荷量の定量により、LV::S_{ΔF2P}をワクチン接種したマウスにおいてこの複製関連SARS-CoV-2 RNAのコピーが検出されなかったのに対して、偽ワクチン接種した対照の脳において(7.55 ± 7.84) $\times 10^9$ コピーを検出した。

20

【0235】

3dpiで、肺自然免疫細胞サブセットの細胞数測定調査(図15D)により、偽ワクチン接種した対照と比較して、LV::S_{ΔF2P}ワクチン接種したB6.K18-hACE2^{IP-THV}マウスにおいて、肺CD45⁺細胞のうちのNK細胞及び好中球の比率の有意な減少を検出した(図15D)。3dpiで、脳ホモジネートに適用したqRT-PCRにより評価した通り、NILV::S_{ΔF2P}ワクチン接種したB6.K18-hACE2^{IP-THV}マウスは、偽群と比較して、IFN- $\square$ 、TNF- $\square$ 、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12p40、CCL2、CCL3、CXCL9及びCXCL10の発現レベルの有意な減少を有していた(図15E)。肺炎症における注目すべき変化を、2群の間で記録した(示していない)。

30

【0236】

したがって、NILV::S_{ΔF2P}を用いたi.m.-i.n.プライム-ブーストは、肺とCNSの解剖学的範囲の両方において、SARS-CoV-2複製を妨げ、ウイルス介在性肺病理及び神経炎症を阻害する。

【0237】

B6.K18-hACE2^{IP-THV}マウスにおける脳の完全な防御のためのi.n.ブーストの要件

ハムスターモデルと類似する、B6.K18-hACE2^{IP-THV}マウスにおける以下の実験において、LVの防御特性の特徴決定を更に進めるために、本発明者らは、非組込みバージョン型のLVを使用した。SARS-CoV-2に対する観察した脳の防御は、この呼吸性及び神経向性ウイルスに対するLV投与のi.n.経路の恩恵を反映し得る。この仮説に取り組むために、B6.K18-hACE2^{IP-THV}マウスに、(i)陽性対照として、0週目にi.m.及び5週目にi.n.、(ii)0週目にi.n.、又は(iii)5週目にi.m.でNILV::S_{ΔF2P}をワクチン接種した。偽ワクチン接種した対照は、0及び5週目に、空のNILVをi.n.で受け取った(図16A)。次いで、マウスに、7週目にSARS-CoV-2を負荷し、ウイルス負荷量を、3dpiで、E又はEsg特異的qRT-PCRにより脳において決定した(図16B)。この高度に厳密な前臨床モデルにおいて、NILV::S_{ΔF2P}の高性能の単回のi.n.又はi.m.注射でさえ、それぞれの群の全ての動物における完全な防御を誘導しなかった。i.m.プライムに続いてi.n.ブーストした場合のみが、全ての動物における完全な防御を与え、これは、脳の完全な防御に達するためのi.n.ブーストの要件を示している。

40

50

【0238】

細胞数測定により分析した通り、頸部リンパ節における自然及び養子免疫細胞の組成物は、NILV::S_{ΔF2P}i.m.-i.n.防護群、偽i.m.-i.n.非防護群及び未処置対照において変化しなかった(データは示していない)。特に、本発明者らは、非防護群と比較して、NILV::S_{ΔF2P}i.m.-i.n.防護群の嗅球におけるCD8⁺T細胞の比率の増加を検出した(図16C)。嗅球におけるCD4⁺T細胞は、それぞれ、CD69又はCCR7のそれらの発現に基づき、別個の活性又は遊走性表現型を有さなかった。本発明者らは、炎症及び/又は活性なウイルス複製と相関するバイオマーカーとして、NILV::S_{ΔF2P}i.m.-i.n.防護群と比較して、非防護マウスの嗅球における好中球の量の増加(図16D)及び脳におけるCD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁺炎症性単球の量の増加を検出した(図16E)。

10

【0239】

まとめると、高度に厳密なB6.K18-hACE2^{IP-THV}マウスモデルにおいて生成した本発明者らのデータは、SARS-CoV-2複製並びにその結果生じる浸潤及び神経炎症からのCNSの免疫防護におけるNILV::S_{ΔF2P}i.n.ブーストの利点を支持する。鼻腔及び嗅球、すなわち、ウイルスについての進入点における粘膜免疫応答の局所誘導及び/又は活性化は、高性能なストラテジーである。

【0240】

考察

LVベースのプラットフォームは、特に、前臨床動物モデルにおける肺SARS-CoV-2感染に対する無菌化免疫を誘導することができる、全身プライム、続いて粘膜i.n.ブーストにおいて使用されるとき、COVID-19に対する強力なワクチン接種アプローチとして、出現する。本発明者らは、S_{ΔF2P}融合前形態のS_{CoV-2}をコードするLVの単回i.n.投与が、ウイルス学、免疫学及び病理組織学パラメーターにより評価した、高感受性のハムスターモデルにおける気道の完全な防御を、i.m.-i.n.プライム-ブーストレジメンと同じくらい効率的に与えることをまず示す。ハムスターACE2オルソログは、S_{CoV-2}と効率的に相互作用し、容易に、SARS-CoV-2による宿主細胞の浸潤及びその高い複製率を可能にする。SARS-CoV-2接種後の急激な体重喪失及び重篤な肺病理の発症を伴い、この種は、例えば、軽度のCOVID-19病理のみを発症するアカゲザルと比較して、薬物又はワクチン候補の有効性を評価するための感受性モデルをもたらす(Munoz-Fontelaら、2020; Siaら、2020)。SARS-CoV-2負荷の7又は2週間前のいずれかでの、単回のi.n.LV投与が、この感受性モデルにおいて無菌化防御を誘発するという事実は、このLVベースのワクチンを用いた来たる臨床試験の設定において価値があり、集団ワクチン接種の顕著な社会経済的利点をもたらすことができる。

20

30

【0241】

本発明者らのワクチン候補の有効性を更に調べるために、本発明者らは、LVベースの遺伝子組換えアプローチの使用により、新規のトランスジェニックマウスモデルを生成した(Nakagawa及びHoogenraad、2011)。このストラテジーにおいて使用したILVは、サイトケラチンK18プロモーター、すなわち、レンチウイルスFLAPトランスファープラスミドへのいくつかの適応を伴う、B6.K18-ACE2^{2PrImn/JAX}マウスを生成するためにPerlmanのチームが既に使用したのと同じプロモーター(McCrayら、2007)が制御するhACE2をコードする。しかしながら、新規のB6.K18-hACE2^{IP-THV}マウスは、感染の<4日後の実質的な脳炎症及び致死性疾患の発症と並行して、脳においてずっと高いレベルのhACE2 mRNAを発現し、SARS-CoV-2複製に対する脳の許容性の顕著な増加を呈するため、ある特定の別個の特性を有する。これらの別個の特徴は、それぞれ、B6.K18-hACE2^{IP-THV}及びB6.K18-ACE2^{2PrImn/JAX}動物における、(i)ネイキッドDNAと比較して、ILVの染色体への代替の挿入部位、及び/又は(ii)ウッドチャック転写後制御エレメント(WPRE)対アルファルファウイルス翻訳エンハンサーの異なる効果(McCrayら、2007)に起因して、異なるhACE2発現特性から生じ得る。他の報告されたhACE2ヒト化マウスは、(i)脳において報告されたhACE2 mRNAを発現することなく(Yangら、2007)、マウスACE2プロモーター、(ii)「肝細胞核因子3/フォークヘッド相団体4」

40

50

(HFH4)プロモーター、すなわち、肺が感染及び病理の主要部位である「HFH4-hACE2」C3B6マウス(Jiangら、2020;Menacheryら、2016)、及び(iii)「CAG」混合プロモーター、すなわち、hACE2 mRNAが、肺及び脳を含む様々な器官で発現している、「AC70」C3H×C57BL/6マウス(Tsengら、2007)下で、導入遺伝子を発現する。AC70とB6.K18-hACE2^{IP-THV}マウスの比較は、これら2種のモデルの類似性及び区別を評価するのに有益であり得る。しかしながら、ここで、本発明者らは、B6.K18-ACE2^{2Pr^lmn}/JAXマウスと比較して、B6.K18-hACE2^{IP-THV}マウスのSARS-CoV-2複製に対する脳のずっと高い許容性を報告する。B6.K18-hACE2^{IP-THV}マウスモデルは、COVID-19ワクチン研究における広範な適用を有するばかりでなく、COVID-19に由来する神経病理の探索のための固有のげっ歯類モデルをもたらす。これらのトランスジェニックマウスによる脳のSARS-CoV-2複製に対する実質的な許容性及び致死性疾患の発症に基づき、この前臨床モデルは、ゴールデンハムスターモデルより厳密とみなすことができる。

10

【0242】

この研究では、高度に厳密なB6.K18-hACE2^{IP-THV}マウスの使用により、SARS-CoV-2に対して開発したLVベースのワクチン候補によるCNSの無菌化防御の誘導のためのi.n.ブースト免疫の重要性を示した。嗅球は、局所自然及び養子免疫の作用を通じて、ウイルスCNS感染を制御し得(Durrantら、2016)、本発明者らは、i.m.-i.n.ワクチン接種し、防御されたマウスにおけるこの解剖学的に戦略的な範囲でのCD8⁺T細胞の頻度の増加を観察した。炎症メディエーターの実質的な低減をまた、それぞれ、嗅球及び脳における好中球及び炎症性単球の減少と共に、これらのワクチン接種し、防御されたマウスの脳において示した。

20

【0243】

合併状態を有する患者におけるCOVID-19と関連する神経学的徴候の源は、(i)SARS-CoV-2のCNSに対する直接的な衝撃、(ii)脳血管内皮の感染、及び(iii)CNS内での非制御の抗ウイルス免疫反応であり得る。ACE2は、中側頭回及び後帯状皮質に位置する、ヒトニューロン、アストロサイト及びオリゴデンドロサイトにおいて発現し、患者におけるSARS-CoV-2に対する脳の許容性を説明し得る(Songら、2020;Huら、2020)。ウイルスは、神経播種又は血行性経路を介して脳に侵入することができる(Bohmwaldら、2018;Desforagesら、2019、2014)。嗅覚系は、前頭皮質を介してCNSへの直接的な関連を確立する(Moriら、2005)。ウイルスのCNSへの神経伝達は、嗅粘膜における軸索輸送を通じた直接的なニューロン浸潤の結果として生じることができる。ニューロン内複製に続き、ウイルスは、シナプスに広がり、嗅索投射を受け取る、解剖学的CNSゾーンに播種する(Koyuncuら、2013;Zubairら、2020;Berth、2009;Koyuncuら、2013;Romanら、2020)。しかしながら、嗅粘膜と結びつかないCNS領域におけるウイルスRNAの検出は、血液-脳関門を超えるSARS-CoV-2が感染した免疫細胞の遊走又はCNS血管内皮を介した直接的なウイルス侵入経路を含む、CNSへの別のウイルス侵入の存在を示唆する(Meinhardtら、2020)。定常状態で、ウイルスは、無傷の血液-脳関門を通じて脳に浸透することができないが(Berth、2009)、サイトカイン/ケモカインストーム中に大量に産生される炎症性メディエーター、特に、TNF- α 及びCCL2は、血液-脳関門の完全性を破壊するか、又はその透過性を増加させ、これにより、ウイルス又はウイルスに感染した白血球の傍細胞の血液から脳への輸送を可能にする(Aghagholi、2020 #77;Hu、2011 #15)。脳へのSARS-CoV-2進入の機序に関わらず、本発明者らは、NILV::S Δ F2Pを用いたi.n.ブースト免疫によるCNSのSARS-CoV-2に対する完全な防御の証拠をもたらす。

30

40

【0244】

本発明者らは、SARS-CoV-2感染に対する肺における無菌化防御の誘導の際の、LV::S_{FL}の強力な予防能を示す、実施例1における結果を報告した。臨床アッセイに移行する、本研究において、本発明者らは、ワクチン対象を示す更なる形態のSタンパク質として、安定化融合前S Δ F2P形態のS_{CoV-2}をコードするLVを使用した。この選択は、それらの融合前形態でのウイルスエンベロープ糖タンパク質の安定化が、その最適な免疫原性の形

50

での抗原の有効性を上昇させることによって、サブユニットワクチンの産業製造における組換えタンパク質としてのそれらの産生の収量及び核酸ベースのワクチンの有効性を改善することを示すデータに基づく(Hsiehら、2020)。融合前安定化アプローチは、これまでに、HKU1-CoV、SARS-CoV、及びMERS-CoVを含む、いくつかのコロナウイルスのSタンパク質に適用されている。安定化S_{MERS-CoV}は、前臨床動物モデルにおいてずっと高いNAb応答及び防御を誘発することが示されている(Hsiehら、2020)。

【0245】

単回i.n.投与により与えられる肺の無菌化防御及びi.n.ブーストにより与えられるCNSの完全な防御は、主要な重要な利点である。SARS-CoV-2の先祖又は出現するバリエーションのいずれか由来の、全長、又は安定化形態のS_{CoV-2}のいずれかをコードする非細胞傷害性及び非炎症性LVは、第2世代の有望なCOVID-19ワクチン候補をもたらす。COVID-19と関連する複数かつ時に重篤な神経病理学的徴候を考慮しながら、他のワクチンストラテジーによりこれまで直接的には取り組まれていない脳の防御を考慮しなければならない。

【0246】

(実施例4)

遺伝的に異なるP.1(いわゆる、マナウス、ブラジル又はγ)バリエーションに対するNILV::S_{CoV-2}武漢が誘導する完全な交差防御

現在使用中のCOVID-19ワクチンに関する重大な課題は、出現するバリエーションに対する防御効力である。NILV::S_{CoV-2}武漢ワクチン候補を用いてこの課題を評価するために、B6.K18-hACE2^{IP-THV}トランスジェニックマウスを、i.m.プライミング(0週)し、NILV::S_{CoV-2}又は偽でi.n.ブースティングした(5週)(図25A)。次いで、マウスに、7週目に、これまでに記載された(Bussら、2021)、最も遺伝的に離れたバリエーションである、 0.3×10^5 TCID₅₀/マウスのP.1(いわゆる、マナウス、ブラジル又はγ)SARS-CoV-2でi.n.負荷した。3dpiでの脳及び肺ウイルス負荷量の決定は、NILV::S_{CoV-2}武漢でのi.m.-i.n.プライム-ブーストが、この遺伝的に離れたP.1バリエーションに対する脳及び肺の完全な交差防御を誘導したことを示した(図25B)。本発明者らは、S_{武漢}、S_{D614G}又はS_{B.1.17}シュードウイルスと比較して、S_{B.1.351}又はS_{マナウスP.1}シュードウイルスを中和する、NILV::S_{CoV-2}武漢でワクチン接種したマウスの血清の能力の顕著な減少を観察した(図25C)。

【0247】

顕著な防護に関わらず、この徹底的に低減した防御であるB細胞応答は、このNILV::S_{CoV-2}武漢介在性の完全な防御におけるT細胞関与の可能性を上昇させた。この可能性を評価するために、本発明者らは、同じプロトコルに従い(図25A)、C57BL/6 WT又はμMT KOマウスをワクチン接種した。μMT KOマウスは、成熟B細胞コンパートメントが欠損し、したがって、Ig/抗体応答を欠く(Kitamuraら、1991)。SARS-CoV-2複製に対して許容性のこれらの非トランスジェニックマウスを作製するために、本発明者らが既に記載した通り(Kuら、2021)、それらを、hACE2(Ad5::hACE2)をコードする 3×10^8 IGUのアデノウイルスベクター血清型5で、SARS-CoV-2負荷の4日前に事前処置した。3dpiでの肺ウイルス負荷量の決定は、ワクチン接種したWTマウスにおける肺の完全な防御並びにワクチン接種したμMT KOマウスにおける高度に有意な防御を示した(図26A)。この知見は、B細胞依存性免疫及び抗原特異性細胞免疫、すなわち、T細胞応答が、SARS-CoV-2に対するNILV::S_{CoV-2}介在性防御における主要な役割を果たすことを示す。

【0248】

これは、(i)全身レベルでの、NILV::S_{CoV-2}武漢が誘導した強力なCD8⁺T細胞応答(図26B)、(ii)著しい比率の、いくつかのS_{CoV-2}エピトープに特異的なIFN-γ産生肺CD8⁺T細胞(図26C)、(iii)高い比率の、エフェクターメモリー(T_{em})及びレジデントメモリー(T_{rm})表現型を有する肺CD8⁺T細胞(図26D)、(iv)ワクチン接種し、SARS-CoV-2武漢(図27A-C)又はSARS-CoV-2 P.1バリエーション(図27D、E)を負荷したマウスにおいて検

出可能な、嗅球におけるCD8⁺T細胞の動員と一致する。

【0249】

注目すべきことに、S_{CoV-2}武漢配列で同定した全てのマウス及びヒトCD8⁺T細胞エピトープは、変異S_{CoV-2}マナウスP.1において保存された(Table 5(表6))。これらの知見は、顕著なB及びT細胞応答を誘発することによって、先祖及び新興SARS-CoV-2バリエーションに対する肺及び脳の完全な防御の誘導の際のNILVの大きな可能性を示す。NAbsの標的であるB細胞エピトープと対照的に(Hoffmannら、2021)、これまでに同定されたT細胞エピトープは、S_{CoV-2}の新興バリエーションにおいて蓄積された変異によって影響されていない。

【0250】

10

20

30

40

50

【表 6】

Table 5. SCoV-2 由来のマウス及びヒト T 細胞エピートープ

マウス	配列の aa	配列番号	a.a 置換/欠失
H-2D ^b	LDSKVGGN ~~Y~~ NYLYRL	18	
H-2D ^b	NKCVN ~~F~~ NFNGLTGTG	16	
H-2D ^b	VRDPQTLEILDITPC	17	
H-2D ^b	CASYQTQTNSPRRAR	19	B1.1.7 における P → H
H-2D ^b	VQIDRLITGRLQSLQ	20	
ヒト	同定(Immudex データベース)		知見
A*0101	LTDEMI ~~A~~ QY	121	
A*0201	FLHVTYVPA	122	
A*0201	KIYSKH ~~T~~ PI	123	
A*0201	KLPDDFTGCV	124	
A*0201	LLFNKVT ~~L~~ A	125	
A*0201	RLDKVEAEV	126	
A*0201	RLITGRLQSL	127	
A*0201	RLQSLQTYV	128	
A*0201	TLDSKTQSL	129	
A*0201	VLNDILSRL	130	B1.1.7 における S → A
A*0201	YLQPRTFLL	131	
A*0201	RLNEVAKNL	132	
A*0201	VVFLHVTYV	133	
A*0201	NLNE ~~S~~ LIDL	134	
A*0201	FIAGLIAIV	135	
A*0301	KCYGVSP ~~T~~ K	136	
A*0301	GVYFASTEK	137	
A*1101	RLFRKSNLK	138	
A*1101	GTHWFVTQR	139	
A*1101	GVYFASTEK	137	
A*2402	KWPWYIWLGF	140	
A*2402	QYIKWPWYI	141	
A*2402	NYNYLYRLF	142	
A*2402	RFDNPVLPF	143	B1.351 における D → A
B*0702	SPRRARSVA	144	B1.1.7 における P → H
B*0702	APHGVVFL	145	
B*3501	QPTESIVRF	146	
B*3501	LPFNDGVYF	147	
B*3501	IPFAMQMAY	148	
B*4403	YEQYIKWPW	149	
DR	ITRFQTL ~~L~~ ALHRSYL	150	B1.351 における LAL 欠失
DR	FNGLTVLPPLLTDEM	151	
DRB1*0101 DRB1*0401 DRB1*0701 DRB1*1501	QLIRAAEIRASANLAATK	152	P.1 における A → I

【0251】

(実施例5)

広範な防御LVワクチンについての最も適当な抗原としてのSARS-CoV-2 B1.351(いわゆる、南アフリカ又はβ)バリエント由来のスパイクの同定

実施例4に示した通り、本発明者らは、NILV::SCoV-2武漢が、先祖武漢と最も遺伝的に離れたマナウスP.1 SARS-CoV-2バリエントの両方に対する非常に感受性のB6.K18-hACE2^{IP-THV}トランスジェニックマウスを大いに保護することを示した。治療剤の確立のため、抗原を更に改善するために、公知のバリエントのウイルス伝播の動態を最も考慮することができる、最も適当なスパイクバリエントの使用を考慮した。

【0252】

最も交差防御性のスパイクバリエーションを同定するために、本発明者らは、対象であるそれぞれのスパイクをコードするLVでC57BL/6マウスをプライミングし、ブースティングし(図28A)、それぞれのスパイクを有するシュードウィルスの使用により、それらの交差-血清-中和の可能性を評価した(図28B)。図28Cに示す通り、本発明者らは、以下を観察した:

(i) LV::SCoV-2 B1.1.7で免疫したマウス由来の血清は、SCoV-2武漢及びLV::SCoV-2 B1.1.7を有するシュードウィルスを高EC50で中和したが、SCoV-2 B1.351及びLV::SCoV-2 P.1を有するシュードウィルスは不十分に中和した、

(ii) LV::SCoV-2 P.1で免疫したマウス由来の血清は、SCoV-2 P.1及びLV::SCoV-2 B1.351を有するシュードウィルスを高EC50で中和したが、SCoV-2武漢及びLV::SCoV-2 B1.1.7を有するシュードウィルスは不十分に中和した、

(iii) LV::SCoV-2 B1.351で免疫したマウス由来のは、SCoV-2 P.1及びLV::SCoV-2 B1.351を有するシュードウィルスを高EC50で中和したのみならず、SCoV-2武漢及びLV::SCoV-2 B1.1.7を有するシュードウィルスをも中和した。

【0253】

これらの結果は、中和抗体に関して最も交差反応性の免疫原として、B1.351(南アフリカ又はβ)バリエーション由来のスパイク配列を選定する。

【0254】

更に、本発明者らは、LVの状況において、K⁹⁸⁶P-V⁹⁸⁷P置換(2P)によるスパイク安定化が、(交差)中和抗体活性を相当改善することを示した(図29A-C)。

【0255】

したがって、本発明者らの将来のリード抗原候補は、2Pを有するB1.351(南アフリカ又はβ)バリエーション由来の全長スパイクである。

【0256】

[参考文献]

10

20

30

40

50

実施例 1 の参考文献

- Amanat, F., and F. Krammer. 2020. SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report. *Immunity* 52:583-589.
- Beignon, A.S., K. Mollier, C. Liard, F. Coutant, S. Munier, J. Riviere, P. Souque, and P. Charneau. 2009. Lentiviral vector-based prime/boost vaccination against AIDS: pilot study shows protection against Simian immunodeficiency virus SIVmac251 challenge in macaques. *J Virol* 83:10963-10974.
- Belouzard, S., V.C. Chu, and G.R. Whittaker. 2009. Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:5871-5876.
- Bourguine, M., S. Crabe, Y. Lobaina, G. Guillen, J.C. Aguilar, and M.L. Michel. 2018. Nasal route favors the induction of CD4(+) T cell responses in the liver of HBV-carrier mice immunized with a recombinant hepatitis B surface- and core-based therapeutic vaccine. *Antiviral Res* 153:23-32.
- Buffa, V., D.R. Negri, P. Leone, M. Borghi, R. Bona, Z. Michelini, D. Compagnoni, C. Sgadari, B. Ensoli, and A. Cara. 2006. Evaluation of a self-inactivating lentiviral vector expressing simian immunodeficiency virus gag for induction of specific immune responses in vitro and in vivo. *Viral Immunol* 19:690-701.
- Chandrasekar, A., J. Liu, A.J. Martinot, K. McMahan, N.B. Mercado, L. Peter, L.H. Tostanoski, J. Yu, Z. Maliga, M. Nekorchuk, K. Busman-Sahay, M. Terry, L.M. Wrijil, S. Ducat, D.R. Martinez, C. Atyeo, S. Fischinger, J.S. Burke, M.D. Stein, L. Pessaint, A. Van Ry, J. Greenhouse, T. Taylor, K. Blade, A. Cook, B. Finneyfrock, R. Brown, E. Teow, J. Velasco, R. Zahn, F. Wegmann, P. Abbink, E.A. Bondzie, G. Dagotto, M.S. Gebre, X. He, C. Jacob-Dolan, N. Kordana, Z. Li, M.A. Lifton, S.H. Mahrokhian, L.F. Maxfield, R. Nityanandam, J.P. Nkolola, A.G. Schmidt, A.D. Miller, R.S. Baric, G. Alter, P.K. Sorger, J.D. Estes, H. Andersen, M.G. Lewis, and D.H. Barouch. 2020. SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques. *Science*, May 2020:eabc4776. doi: 10.1126/science.abc4776. Online ahead of print. PMID: 32434946.
- Corman, V., T. Bleicker, S. Brünink, and C. Drosten. 2020. Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR. <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf>
- Cousin, C., M. Oberkamp, T. Felix, P. Rosenbaum, R. Weil, S. Fabrega, V. Morante, D. Negri, A. Cara, G. Dadaglio, and C. Leclerc. 2019. Persistence of Integrase-Deficient Lentiviral Vectors Correlates with the Induction of STING-Independent CD8(+) T Cell Responses. *Cell Rep* 26:1242-1257 e1247.
- Coutant, F., R.Y. Sanchez David, T. Felix, A. Boulay, L. Caleechurn, P. Souque, C. Thouvenot, C. Bourguoin, A.S. Beignon, and P. Charneau. 2012. A nonintegrative lentiviral vector-based vaccine provides long-term sterile protection against malaria. *PLoS One* 7:e48644.
- Coutard, B., C. Valle, X. de Lamballerie, B. Canard, N.G. Seidah, and E. Decroly. 2020. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res* 176:104742.
- Di Nunzio, F., T. Felix, N.J. Arhel, S. Nisole, P. Charneau, and A.S. Beignon. 2012. HIV-derived vectors for therapy and vaccination against HIV. *Vaccine* 30:2499-2509.
- Esslinger, C., P. Romero, and H.R. MacDonald. 2002. Efficient transduction of dendritic cells and induction of a T-cell response by third-generation lentivectors. *Hum Gene Ther* 13:1091-1100.
- Gallinaro, A., M. Borghi, R. Bona, F. Grasso, L. Calzoletti, L. Palladino, S. Cecchetti, M.F. Vescio, D. Macchia, V. Morante, A. Canitano, N. Temperton, M.R. Castrucci, M. Salvatore, Z. Michelini, A. Cara, and D. Negri. 2018. Integrase Defective Lentiviral Vector as a Vaccine Platform for Delivering Influenza Antigens. *Front Immunol* 9:171.
- Gao, Q., L. Bao, H. Mao, L. Wang, K. Xu, M. Yang, Y. Li, L. Zhu, N. Wang, Z. Lv, H. Gao, X. Ge, B. Kan, Y. Hu, J. Liu, F. Cai, D. Jiang, Y. Yin, C. Qin, J. Li, X. Gong, X. Lou, W. Shi, D. Wu, H. Zhang, L. Zhu, W. Deng, Y. Li, J. Lu, C. Li, X. Wang, W. Yin, Y. Zhang, and C. Qin. 2020. Rapid development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science* 2020 Jul 3;369(6499):77-81. doi: 10.1126/science.abc1932. Epub 2020 May 6. PMID: 32376603.
- Guo, Y.R., Q.D. Cao, Z.S. Hong, Y.Y. Tan, S.D. Chen, H.J. Jin, K.S. Tan, D.Y. Wang, and Y. Yan. 2020. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. *Mil Med Res* 7:11.
- He, Y., J. Zhang, Z. Mi, P. Robbins, and L.D. Faló, Jr. 2005. Immunization with lentiviral vector-transduced dendritic cells induces strong and long-lasting T cell responses and therapeutic immunity. *J Immunol* 174:3808-3817.
- Hu, B., A. Tai, and P. Wang. 2011. Immunization delivered by lentiviral vectors for cancer and infectious diseases. *Immunol Rev* 239:45-61.
- Iglesias, M.C., M.P. Frenkiel, K. Mollier, P. Souque, P. Despres, and P. Charneau. 2006. A single immunization with a minute dose of a lentiviral vector-based vaccine is highly effective at eliciting protective humoral immunity against West Nile virus. *J Gene Med* 8:265-274.
- Ku, M.W., F. Anna, F. Souque, S. Petres, M. Prot, E. Simon-Loriere, P. Charneau, and M. Bourguine. 2020. A Single Dose of NILV-Based Vaccine Provides Rapid and Durable Protection against Zika Virus. *Mol Ther* 2020 May 20;S1525-0016(20)30250-1. doi: 10.1016/j.ymthe.2020.05.016.
- Ku, M.W., P. Authié, P. Souque, M. Bourguine, M. Romano, P. Charneau, and L. Majlessi. Submitted. High-Quality Memory T Cells by Programmed Antigen Expression in Dendritic Cells Induced by Lentiviral Vector. (in revision)
- Lai, A.L., J.K. Millet, S. Daniel, J.H. Freed, and G.R. Whittaker. 2017. The SARS-CoV Fusion Peptide Forms an Extended Bipartite Fusion Platform that Perturbs Membrane Order in a Calcium-Dependent Manner. *J Mol Biol* 429:3875-3892.
- Lorin, V., and H. Mouquet. 2015. Efficient generation of human IgA monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 422:102-110.
- Qiu, H., S. Sun, H. Xiao, J. Feng, Y. Guo, W. Tai, Y. Wang, L. Du, G. Zhao, and Y. Zhou. 2016. Single-dose treatment with a humanized neutralizing antibody affords full protection of a human transgenic mouse model from lethal Middle East respiratory syndrome (MERS)-coronavirus infection. *Antiviral Res* 132:141-148.
- Rosenberg, S.A., Y. Zhai, J.C. Yang, D.J. Schwartzentruber, P. Hwu, F.M. Marincola, S.L. Topalian, N.P. Restifo, C.A. Seipp, J.H. Einhorn, B. Roberts, and D.E. White. 1998. Immunizing patients with metastatic melanoma using recombinant adenoviruses encoding MART-1 or gp100 melanoma antigens. *J Natl Cancer Inst* 90:1894-1900.
- Schirmbeck, R., J. Reimann, S. Kochanek, and F. Kreppel. 2008. The immunogenicity of adenovirus vectors limits the multispecificity of CD8 T-cell responses to vector-encoded transgenic antigens. *Mol Ther* 16:1609-1616.
- Sia, S.F., L.M. Yan, A.W.H. Chin, K. Fung, K.T. Choy, A.Y.L. Wong, P. Kaewpreedee, R. Perera, L.L.M. Poon, J.M. Nicholls, M. Peiris, and H.L. Yen. 2020. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature* 2020 May 14. doi: 10.1038/s41586-020-2342-5. Online ahead of print. PMID: 32408338.

10

20

30

40

50

- Sterlin, D., A. Mathian, M. Miyara, A. Mohr, F. Anna, L. Claër, P. Quentric, J. Fadlallah, P. Ghillani, C. Gunn, R. Hockett, S. Mudumba, A. Guihot, C. Luyt, J. Mayaux, A. Beurton, S. Fourati, J. Lacorte, H. Yssel, C. Parizot, K. Dorgham, P. Charneau, Z. Amoura, and G. Gorochov. IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2. (in preparation).
- Vabret, N., G.J. Britton, C. Gruber, S. Hegde, J. Kim, M. Kuksin, R. Levantovsky, L. Malle, A. Moreira, M.D. Park, L. Pia, E. Risson, M. Saffern, B. Salome, M. Esai Selvan, M.P. Spindler, J. Tan, V. van der Heide, J.K. Gregory, K. Alexandropoulos, N. Bhardwaj, B.D. Brown, B. Greenbaum, Z.H. Gumus, D. Homann, A. Horowitz, A.O. Kamphorst, M.A. Curotto de Lafaille, S. Mehandru, M. Merad, R.M. Samstein, and P. Sinai Immunology Review. 2020. Immunology of COVID-19: Current State of the Science. *Immunity* 52:910-941.
- Walls, A.C., Y.J. Park, M.A. Tortorici, A. Wall, A.T. McGuire, and D. Veerler. 2020. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* 181:281-292 e286.
- Wan, Y., J. Shang, S. Sun, W. Tai, J. Chen, Q. Geng, L. He, Y. Chen, J. Wu, Z. Shi, Y. Zhou, L. Du, and F. Li. 2020. Molecular Mechanism for Antibody-Dependent Enhancement of Coronavirus Entry. *J Virol* 94: 2020. Molecular Mechanism for Antibody-Dependent Enhancement of Coronavirus Entry. *J Virol* 94: 2020.
- Wang, Q., Y. Qiu, J.Y. Li, Z.J. Zhou, C.H. Liao, and X.Y. Ge. 2020. A Unique Protease Cleavage Site Predicted in the Spike Protein of the Novel Pneumonia Coronavirus (2019-nCoV) Potentially Related to Viral Transmissibility. *Viro Sin* 2020 Jun;35(3):337-339. doi: 10.1007/s12250-020-00212-7. Epub 2020 Mar 20.
- Yu, J., L.H. Tostanoski, L. Peter, N.B. Mercado, K. McMahan, S.H. Mahrokhian, J.P. Nkolola, J. Liu, Z. Li, A. Chandrashekar, D.R. Martinez, C. Loos, C. Atyeo, S. Fischinger, J.S. Burke, M.D. Slein, Y. Chen, A. Zuiani, N.L. FJ, M. Travers, S. Habibi, L. Pessaint, A. Van Ry, K. Blade, R. Brown, A. Cook, B. Finneyfrock, A. Dodson, E. Teow, J. Velasco, R. Zahn, F. Wegmann, E.A. Bondzie, G. Dagotto, M.S. Gebre, X. He, C. Jacob-Dolan, M. Kirilova, N. Kordana, Z. Lin, L.F. Maxfield, F. Nampanya, R. Nityanandam, J.D. Ventura, H. Wan, Y. Cai, B. Chen, A.G. Schmidt, D.R. Wesemann, R.S. Baric, G. Alter, H. Andersen, M.G. Lewis, and D.H. Barouch. 2020. DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Science* 2020 May 20:eabc6284. doi: 10.1126/science.abc6284. PMID: 32434945.
- Zennou, V., C. Petit, D. Guetard, U. Nerhass, L. Montagnier, and P. Charneau. 2000. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 101:173-185.
- Zhao, J., K. Li, C. Wohlford-Lenane, S.S. Agnihothram, C. Fett, J. Zhao, M.J. Gale, Jr., R.S. Baric, L. Enjuanes, T. Gallagher, P.B. McCray, Jr., and S. Perlman. 2014. Rapid generation of a mouse model for Middle East respiratory syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:4970-4975.
- Zhu, F.C., Y.H. Li, X.H. Guan, L.H. Hou, W.J. Wang, J.X. Li, S.P. Wu, B.S. Wang, Z. Wang, L. Wang, S.Y. Jia, H.D. Jiang, L. Wang, T. Jiang, Y. Hu, J.B. Gou, S.B. Xu, J.J. Xu, X.W. Wang, W. Wang, and W. Chen. 2020. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. *Lancet*. 2020 Jun 13;395(10240):1845-1854. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31208-3. Epub 2020 May 22. P.
- 実施例 2 及び 3 の参考文献**
- Aghagholi, G., Gallo Marin, B., Katchur, N.J., Chaves-Sell, F., Asaad, W.F., and Murphy, S.A. (2020). Neurological Involvement in COVID-19 and Potential Mechanisms: A Review. *Neurocrit Care*.
- Bergmann, C.C., T.E. Lane, and S.A. Stohman. 2006. Coronavirus infection of the central nervous system: host-virus stand-off. *Nat Rev Microbiol* 4:121-132.
- Anna, F., Goyard, S., Lalanne, A.I., Nevo, F., Gransagne, M., Souque, P., Louis, D., Gillon, V., Turbiez, I., Bidard, F.C., et al. (2020). High seroprevalence but short-lived immune response to SARS-CoV-2 infection in Paris. *Eur J Immunol*.
- Bos, R., Rutten, L., van der Lubbe, J.E.M., Bakkers, M.J.G., Hardenberg, G., Wegmann, F., Zuijdgheest, D., de Wilde, A.H., Koornneef, A., Verwilligen, A., et al. (2020). Ad26 vector-based COVID-19 vaccine encoding a prefusion-stabilized SARS-CoV-2 Spike immunogen induces potent humoral and cellular immune responses. *NPJ Vaccines* 5, 91.
- Bourgonje, A.R., Abdulle, A.E., Timens, W., Hillebrands, J.L., Navis, G.J., Gordijn, S.J., Bolling, M.C., Dijkstra, G., Voors, A.A., Osterhaus, A.D., et al. (2020). Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), SARS-CoV-2 and the pathophysiology of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *J Pathol* 251, 228-248.
- Chandrashekar, A., Liu, J., Martinot, A.J., McMahan, K., Mercado, N.B., Peter, L., Tostanoski, L.H., Yu, J., Maliga, Z., Nekorchuk, M., et al. (2020). SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques. *Science* May 2020:eabc4776 doi: 10.1126/science.abc4776 PMID: 32434946.
- Chen, R., Wang, K., Yu, J., Howard, D., French, L., Chen, Z., Wen, C., and Xu, Z. (2020). The spatial and cell-type distribution of SARS-CoV-2 receptor ACE2 in human and mouse brain. *BioRxiv*.
- Chow, Y.H., O'Brodoovich, H., Plumb, J., Wen, Y., Sohn, K.J., Lu, Z., Zhang, F., Lukacs, G.L., Tanswell, A.K., Hui, C.C., et al. (1997). Development of an epithelium-specific expression cassette with human DNA regulatory elements for transgene expression in lung airways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14695-14700.
- Corman, V., Bleicker, T., Brünink, S., and Drosten, C. (2020). Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR. <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1pdf>.
- Cupovic, J., Onder, L., Gil-Cruz, C., Weiler, E., Caviezel-Firner, S., Perez-Shibayama, C., Rulicke, T., Bechmann, I., and Ludewig, B. (2016). Central Nervous System Stromal Cells Control Local CD8(+) T Cell Responses during Virus-Induced Neuroinflammation. *Immunity* 44, 622-633.
- Desforges, M., Le Coupanec, A., Stodola, J.K., Meessen-Pinard, M., and Talbot, P.J. (2014). Human coronaviruses: viral and cellular factors involved in neuroinvasiveness and neuropathogenesis. *Virus Res* 194, 145-158.
- Di Nunzio, F., Felix, T., Arhel, N.J., Nisole, S., Charneau, P., and Beignon, A.S. (2012). HIV-derived vectors for therapy and vaccination against HIV. *Vaccine* 30, 2499-2509.
- Dogan, R.I., Getoor, L., Wilbur, W.J., and Mount, S.M. (2007). Features generated for computational splice-site prediction correspond to functional elements. *BMC Bioinformatics* 8, 410.
- Firat H. et al. The Journal of Gene Medicine 2002; 4: 38-45
- Fotuhi, M., Mian, A., Meysami, S., and Raji, C.A. (2020). Neurobiology of COVID-19. *J Alzheimers Dis* 76, 3-19.
- Glass, W.G., Subbarao, K., Murphy, B., and Murphy, P.M. (2004). Mechanisms of host defense following severe acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) pulmonary infection of mice. *J Immunol* 173, 4030-4039.
- Guo, Y.R., Cao, Q.D., Hong, Z.S., Tan, Y.Y., Chen, S.D., Jin, H.J., Tan, K.S., Wang, D.Y., and Yan, Y. (2020). The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. *Mil Med Res* 7, 11.
- Hsieh, C.L., Goldsmith, J.A., Schaub, J.M., DiVenere, A.M., Kuo, H.C., Javanmardi, K., Le, K.C., Wrapp, D., Lee, A.G., Liu, Y., et al. (2020). Structure-based design of prefusion-stabilized SARS-CoV-2 spikes. *Science* 369, 1501-1505.
- Hu, B., Tai, A., and Wang, P. (2011). Immunization delivered by lentiviral vectors for cancer and infectious diseases. *Immunol Rev* 239, 45-61.

10

20

30

40

50

- Hu, J., Jolkonen, J., and Zhao, C. (2020). Neurotropism of SARS-CoV-2 and its neuropathological alterations: Similarities with other coronaviruses. *Neurosci Biobehav Rev* 119, 184-193.
- Hoffmann, M., H. Kleine-Weber, S. Schroeder, N. Kruger, T. Herrler, S. Erichsen, T.S. Schiergens, G. Herrler, N.H. Wu, A. Nitsche, M.A. Muller, C. Drosten, and S. Pohlmann. 2020. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 181:271-280 e278
- Jiang, R.D., Liu, M.Q., Chen, Y., Shan, C., Zhou, Y.W., Shen, X.R., Li, Q., Zhang, L., Zhu, Y., Si, H.R., et al. (2020). Pathogenesis of SARS-CoV-2 in Transgenic Mice Expressing Human Angiotensin-Converting Enzyme 2. *Cell* 182, 50-58 e58.
- Koehler, D.R., Chow, Y.H., Plumb, J., Wen, Y., Rafii, B., Belcastro, R., Haardt, M., Lukacs, G.L., Post, M., Tanswell, A.K., et al. (2000). A human epithelium-specific vector optimized in rat pneumocytes for lung gene therapy. *Pediatr Res* 48, 184-190.
- Ku, M.W., Anna, F., Souque, F., Petres, S., Prot, M., Simon-Loriere, E., Charneau, P., and Bourguine, M. (2020). A Single Dose of NILV-Based Vaccine Provides Rapid and Durable Protection against Zika Virus. *Mol Ther* 2020 May 20;S1525-0016(20)30250-1 doi: 10.1016/j.ymthe.2020.05.016.
- Ku, M.W., Bourguine, M., Authié, P., Lopez, J., Nemirov, N., Moncoq, F., Noirat, A., Vesin, B., Nevo, F., Blanc, C., et al. (2021). Intranasal Vaccination with a Lentiviral Vector Protects against SARS-CoV-2 in Preclinical Animal Models. *Cell Host and Microbe* in press. PMID: 33357418
- Lescure, F.X., Bouadma, L., Nguyen, D., Parisey, M., Wicky, P.H., Behillil, S., Gaymard, A., Bouscambert-Duchamp, M., Donati, F., Le Hingrat, Q., et al. (2020). Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. *Lancet Infect Dis* 20, 697-706.
- Li, K., Wohlford-Lenane, C., Perlman, S., Zhao, J., Jewell, A.K., Reznikov, L.R., Gibson-Corley, K.N., Meyerholz, D.K., and McCray, P.B., Jr. (2016). Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Causes Multiple Organ Damage and Lethal Disease in Mice Transgenic for Human Dipeptidyl Peptidase 4. *J Infect Dis* 213, 712-722.
- Liu, J., Li, S., Liu, J., Liang, B., Wang, X., Wang, H., Li, W., Tong, Q., Yi, J., Zhao, L., et al. (2020). Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine* 55, 102763.
- Lopez, J., Anna, F., Authié, P., Pawlik, A., Ku, M.W., Blanc, C., Souque, P., Moncoq, F., Noirat, A., Sougakoff, W., et al. (in preparation). An Optimized Poly-antigenic Lentiviral Vector Induces Protective CD4+ T-Cell Immunity and Predicts a Booster Vaccine against *Mycobacterium tuberculosis*.
- Mao, L., Jin, H., Wang, M., Hu, Y., Chen, S., He, Q., Chang, J., Hong, C., Zhou, Y., Wang, D., et al. (2020). Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol* 77, 683-690.
- McCallum, M., Walls, A.C., Bowen, J.E., Corti, D., and Veesler, D. (2020). Structure-guided covalent stabilization of coronavirus spike glycoprotein trimers in the closed conformation. *Nat Struct Mol Biol* 27, 942-949.
- McCray, P.B., Jr., Pewe, L., Wohlford-Lenane, C., Hickey, M., Manzel, L., Shi, L., Netland, J., Jia, H.P., Halabi, C., Sigmund, C.D., et al. (2007). Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol* 81, 813-821.
- Meinhardt, J., Radke, J., Dittmayer, C., Franz, J., Thomas, C., Mothes, R., Laue, M., Schneider, J., Brunink, S., Greuel, S., et al. (2020). Olfactory transnucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat Neurosci*.
- Menachery, V.D., Yount, B.L., Jr., Sims, A.C., Debink, K., Agnihotram, S.S., Gralinski, L.E., Graham, R.L., Scobey, T., Plante, J.A., Royal, S.R., et al. (2016). SARS-like WIV1-CoV poised for human emergence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 3048-3053.
- Munoz-Fontela, C., Dowling, W.E., Funnell, S.G.P., Gsell, P.S., Riveros-Balta, A.X., Albrecht, R.A., Andersen, H., Baric, R.S., Carroll, M.W., Cavaleri, M., et al. (2020). Animal models for COVID-19. *Nature* 586, 509-515.
- Nakagawa, T., and Hoogenraad, C.C. (2011). Lentiviral transgenesis. *Methods Mol Biol* 693, 117-142.
- Netland, J., Meyerholz, D.K., Moore, S., Cassell, M., and Perlman, S. (2008). Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection causes neuronal death in the absence of encephalitis in mice transgenic for human ACE2. *J Virol* 82, 7264-7275.
- Park, F. 2007. Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? *Physiol Genomics* 31:159-173
- Politi, L.S., Salsano, E., and Grimaldi, M. (2020). Magnetic Resonance Imaging Alteration of the Brain in a Patient With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) and Anosmia. *JAMA Neurol* 77, 1028-1029.
- Roman, G.C., Spencer, P.S., Reis, J., Buguet, A., Faris, M.E.A., Katrak, S.M., Lainez, M., Medina, M.T., Meshram, C., Mizusawa, H., et al. (2020). The neurology of COVID-19 revisited: A proposal from the Environmental Neurology Specialty Group of the World Federation of Neurology to implement international neurological registries. *J Neurol Sci* 414, 116884.
- Rosenberg, S.A., Zhai, Y., Yang, J.C., Schwartzentruber, D.J., Hwu, P., Marincola, F.M., Topalian, S.L., Restifo, N.P., Seipp, C.A., Einhorn, J.H., et al. (1998). Immunizing patients with metastatic melanoma using recombinant adenoviruses encoding MART-1 or gp100 melanoma antigens. *J Natl Cancer Inst* 90, 1894-1900.
- Sayes, F., C. Blanc, L.S. Ates, N. Deboosere, M. Orgeur, F. Le Chevalier, M.I. Groschel, W. Frigui, O.R. Song, R. Lo-Man, F. Brossier, W. Sougakoff, D. Bottai, P. Brodin, P. Charneau, R. Brosch, and L. Majlessi. 2018. Multiplexed Quantitation of Intraphagocyte *Mycobacterium tuberculosis* Secreted Protein Effectors. *Cell Rep* 23:1072-1084
- Schirmbeck, R., Reimann, J., Kochanek, S., and Kreppel, F. (2008). The immunogenicity of adenovirus vectors limits the multispecificity of CD8 T-cell responses to vector-encoded transgenic antigens. *Mol Ther* 16, 1609-1616.
- Sia, S.F., Yan, L.M., Chin, A.W.H., Fung, K., Choy, K.T., Wong, A.Y.L., Kaewpreedee, P., Perera, R., Poon, L.L.M., Nicholls, J.M., et al. (2020). Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature* 2020 May 14 doi: 10.1038/s41586-020-2342-5 Online ahead of print PMID: 32408338.
- Song, E., Zhang, C., Israelow, B., Lu-Culligan, A., Prado, A.V., Skriabine, S., Lu, P., Weizman, O.E., Liu, F., Dai, Y., et al. (2020). Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in human and mouse brain. *bioRxiv*.
- Sterlin, D., Mathian, A., Miyara, M., Mohr, A., Anna, F., Claer, L., Quentric, P., Fadlallah, J., Devilliers, H., Ghillani, P., et al. (2020). IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2. *Sci Transl Med*.
- Sternberg, A., and Naujokat, C. (2020). Structural features of coronavirus SARS-CoV-2 spike protein: Targets for vaccination. *Life Sci* 257, 118056.
- Tostanoski, L.H., Wegmann, F., Martinot, A.J., Loos, C., McMahan, K., Mercado, N.B., Yu, J., Chan, C.N., Bondoc, S., Starke, C.E., et al. (2020). Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 severe clinical disease in hamsters. *Nat Med* 26, 1694-1700.
- Tseng, C.T., Huang, C., Newman, P., Wang, N., Narayanan, K., Watts, D.M., Makino, S., Packard, M.M., Zaki, S.R., Chan, T.S., et al. (2007). Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of mice transgenic for the human Angiotensin-converting enzyme 2 virus receptor. *J Virol* 81, 1162-1173. VandenDriessche T. et al. *Blood*, 1 August 2002; vol. 100, n° 3, p. 813-822

10

20

30

40

50

von Weyhern, C.H., Kaufmann, I., Neff, F., and Kremer, M. (2020). Early evidence of pronounced brain involvement in fatal COVID-19 outcomes. *Lancet* 395, e109.

Walls, A.C., Park, Y.J., Tortorici, M.A., Wall, A., McGuire, A.T., and Veesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* 181, 281-292 e286.

Whittaker, A., Anson, M., and Harky, A. (2020). Neurological Manifestations of COVID-19: A systematic review and current update. *Acta Neurol Scand* 142, 14-22.

Wölfel, R., Corman, V.M., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Müller, M.A., Niemeyer, D., Jones, T.C., Vollmar, P., Rothe, C., et al. (2020). Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* 581, 465-469.

Xu, J., and Lazartigues, E. (2020). Expression of ACE2 in Human Neurons Supports the Neuro-Invasive Potential of COVID-19 Virus. *Cell Mol Neurobiol*.

Yang, X.H., Deng, W., Tong, Z., Liu, Y.X., Zhang, L.F., Zhu, H., Gao, H., Huang, L., Liu, Y.L., Ma, C.M., et al. (2007). Mice transgenic for human angiotensin-converting enzyme 2 provide a model for SARS coronavirus infection. *Comp Med* 57, 450-459.

Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhass, U., Montagnier, L., and Charneau, P. (2000). HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 101, 173-185.

実施例4及び5の参考文献

Buss, L.F., Prete, C.A., Jr., Abraham, C.M.M., Mendrone, A., Jr., Salomon, T., de Almeida-Neto, C., Franca, R.F.O., Belotti, M.C., Carvalho, M., Costa, A.G., et al. (2021). Three-quarters attack rate of SARS-CoV-2 in the Brazilian Amazon during a largely unmitigated epidemic. *Science* 371, 288-292.

Hoffmann, M., Arora, P., Gross, R., Seidel, A., Hornich, B.F., Hahn, A.S., Kruger, N., Graichen, L., Hofmann-Winkler, H., Kempf, A., et al. (2021). SARS-CoV-2 variants B.1.351 and P.1 escape from neutralizing antibodies. *Cell*.

Kitamura, D., Roes, J., Kuhn, R., and Rajewsky, K. (1991). A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* 350, 423-426.

Ku, M.W., Bourguin, M., Authie, P., Lopez, J., Nemirov, K., Moncoq, F., Noirat, A., Vesin, B., Nevo, F., Blanc, C., et al. (2021). Intranasal vaccination with a lentiviral vector protects against SARS-CoV-2 in preclinical animal models. *Cell Host Microbe* 29, 236-249 e236.

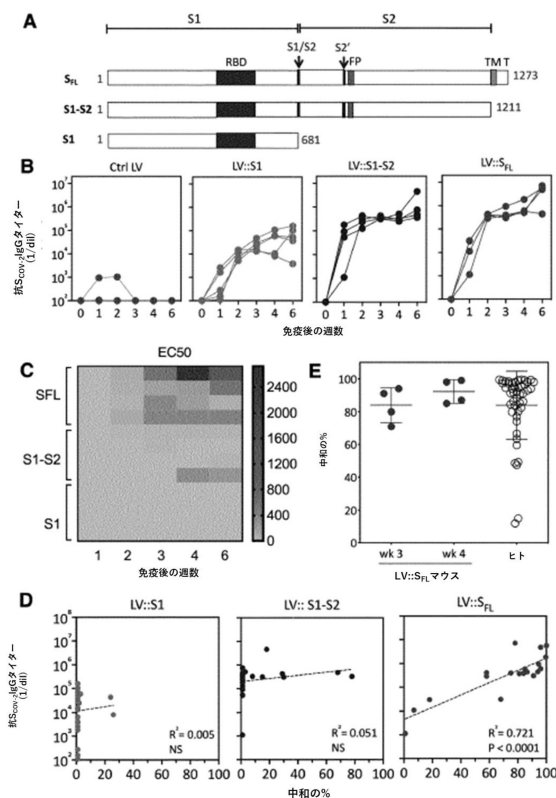
10

20

【図面】

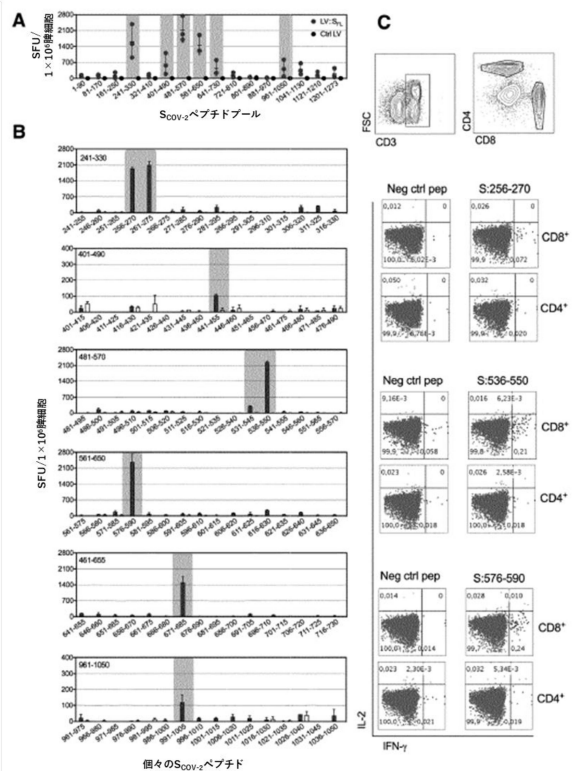
【図 1】

図 1



【図 2】

図 2

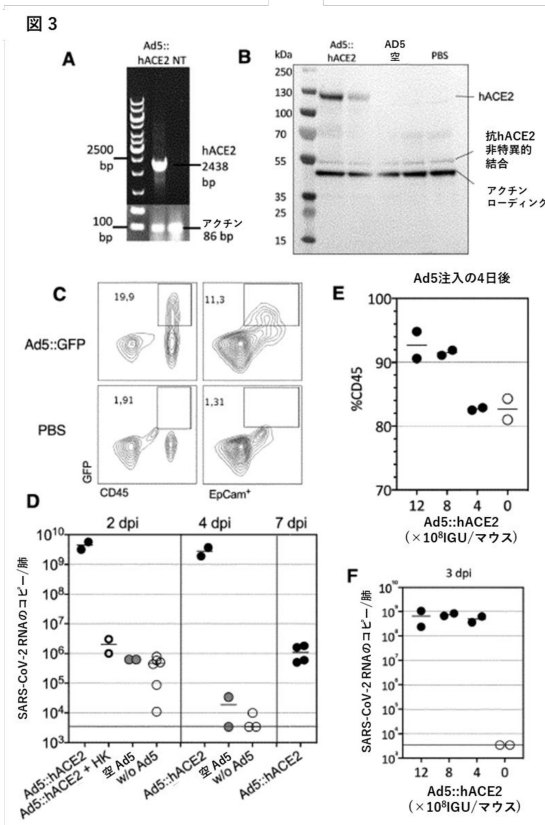


30

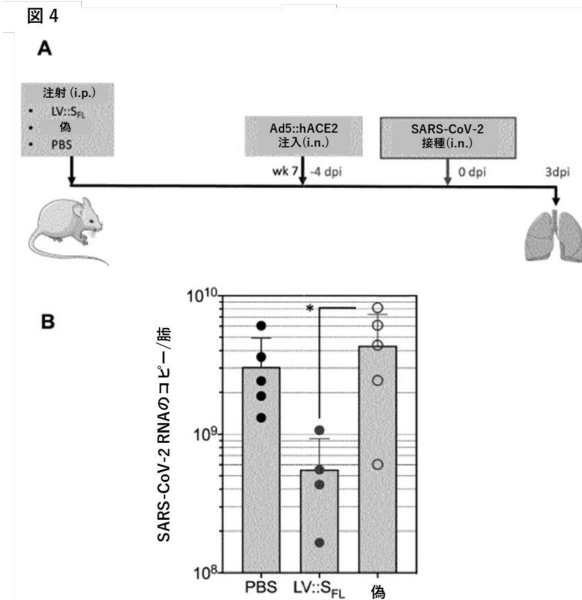
40

50

【圖 3】



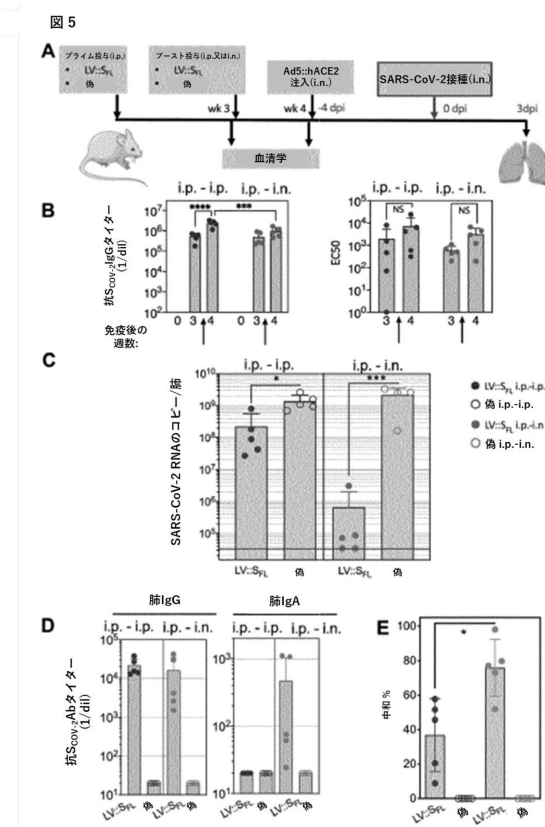
【圖 4】



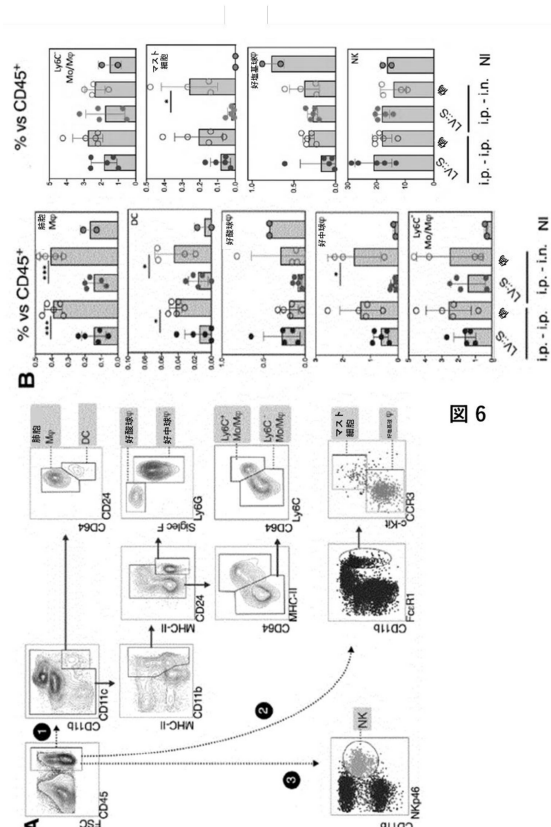
10

20

【図 5】



【図 6 - 1】

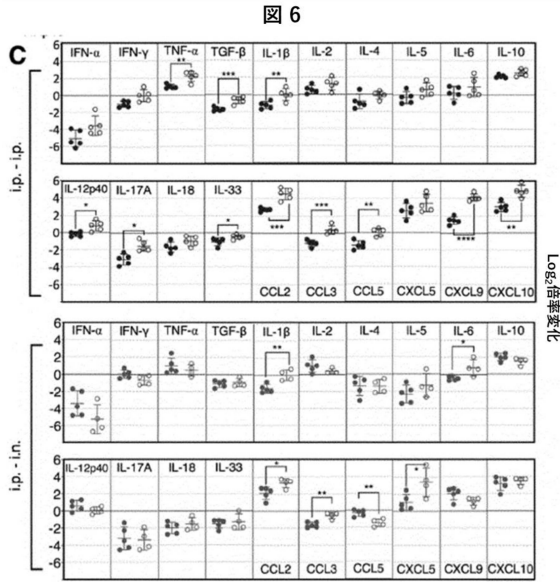


30

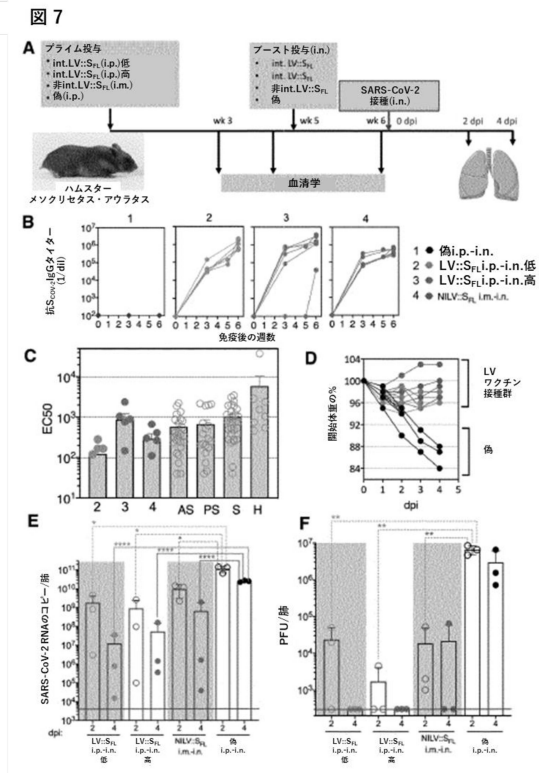
40

50

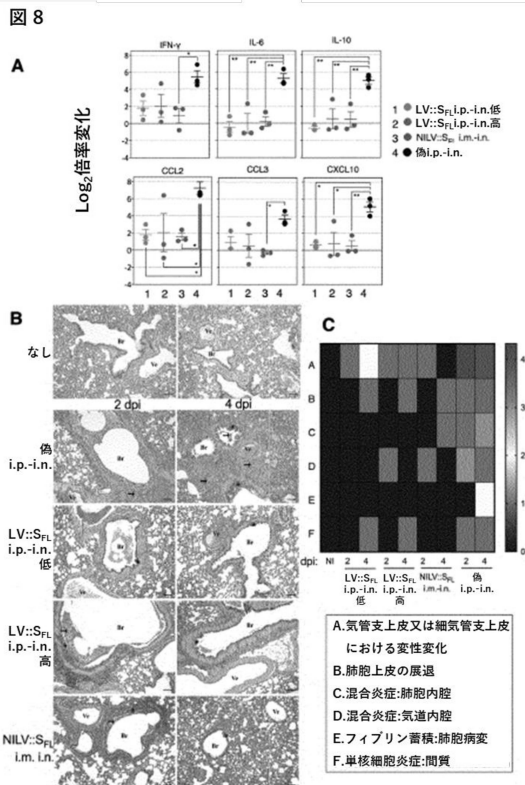
【図 6 - 2】



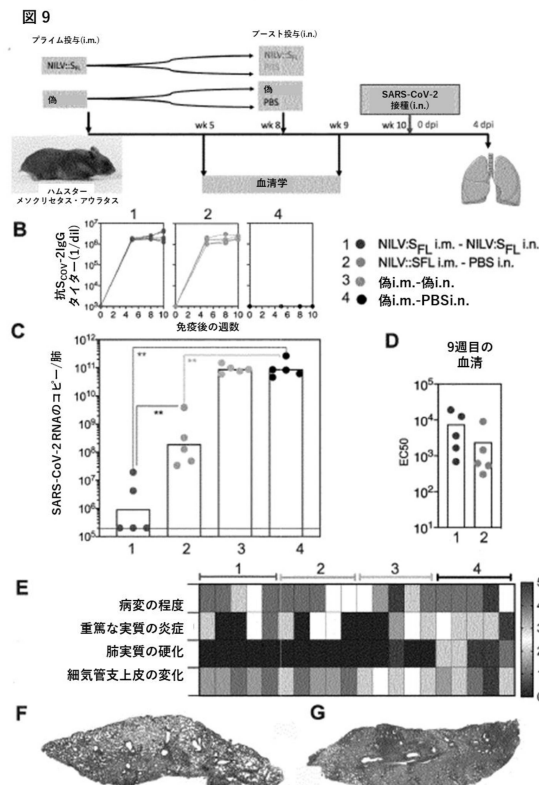
【図 7】



【図 8】



【図 9】



10

20

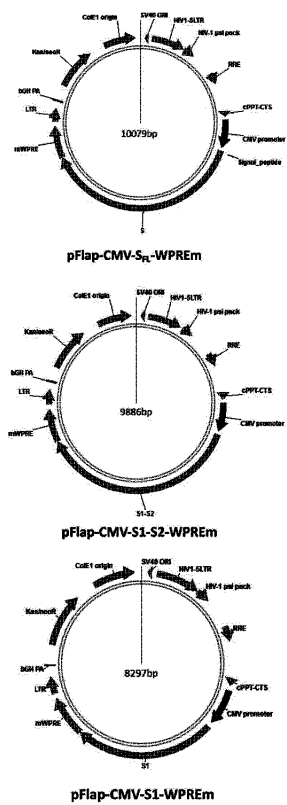
30

40

50

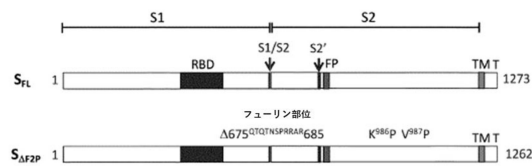
【図 10】

Figure 10



【図 11】

図 11

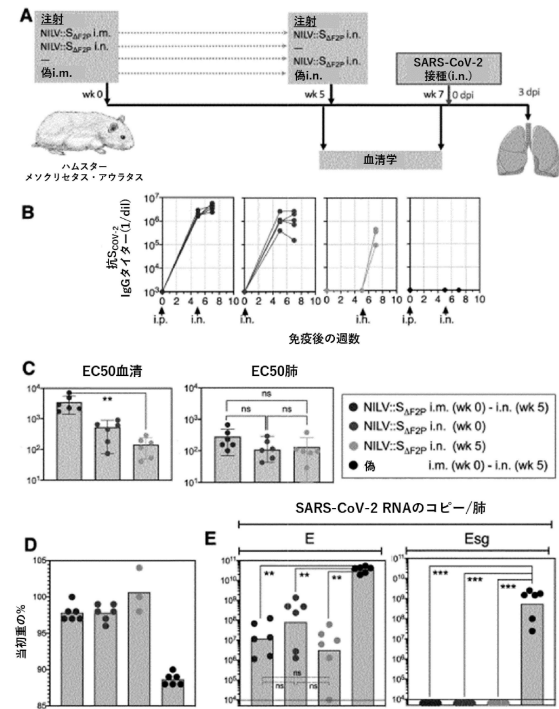


10

20

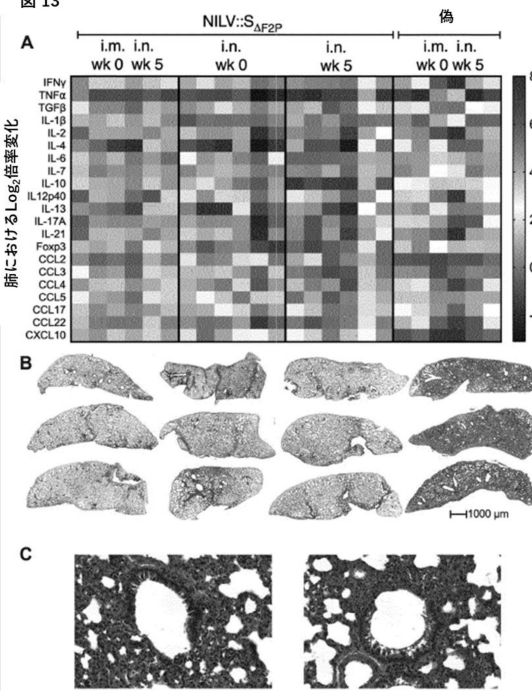
【図 12】

図 12



【図 13】

図 13

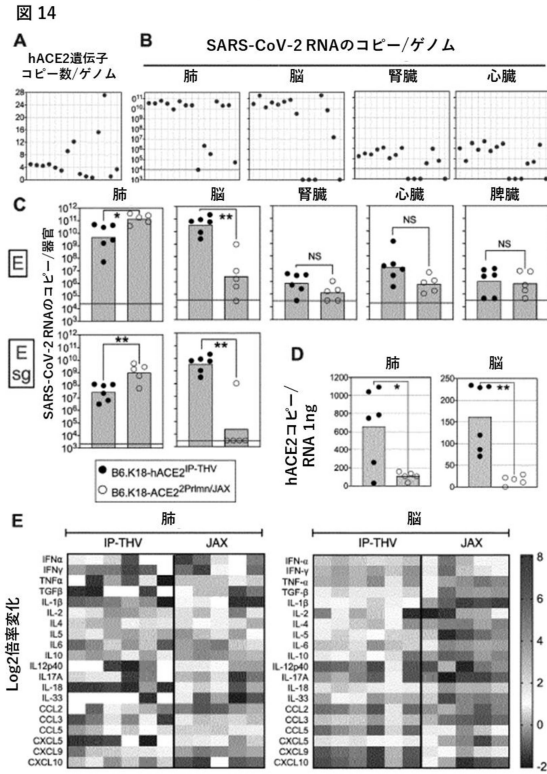


30

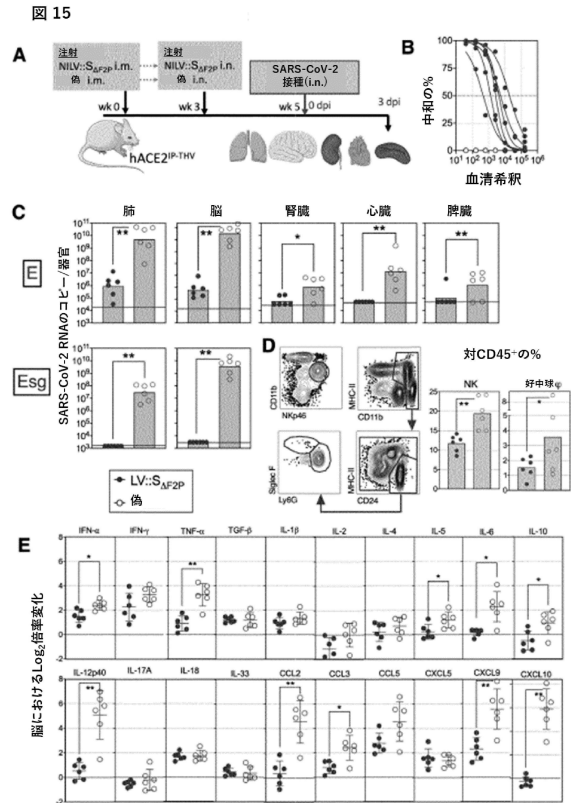
40

50

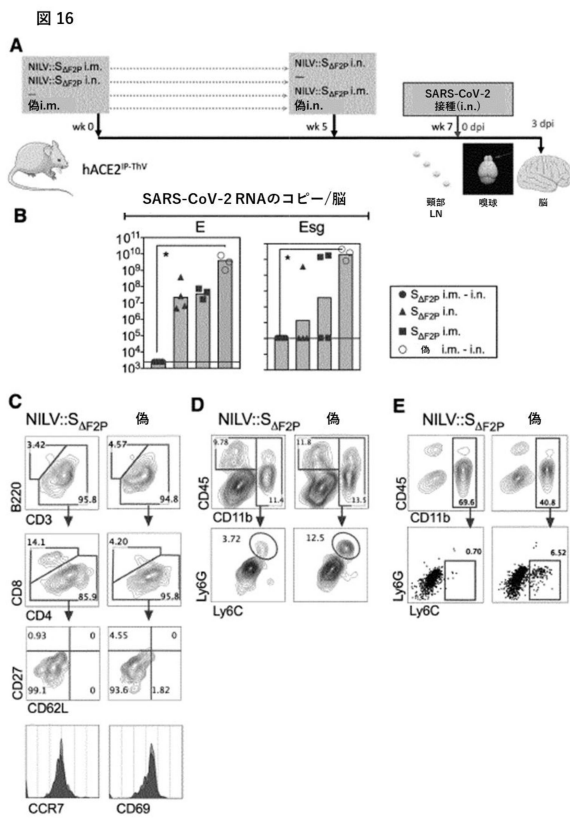
【図 14】



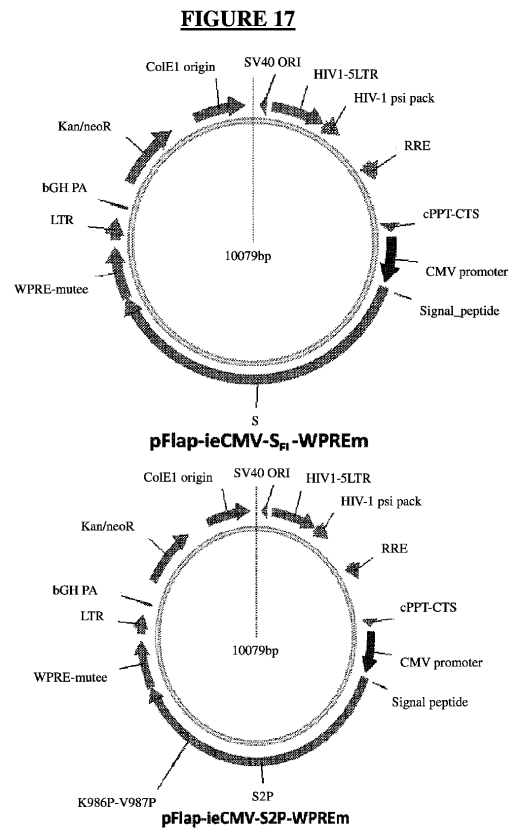
【図 15】



【図 16】



【図 17】



10

20

30

40

50

【圖 20-3】

Figure 20

[illegible]

10

【圖 2 1 - 1】

Figure 21

30

40

【図 2 1 - 2】

Figure 21

[illegible]

【図 2 1 - 4】

Figure 21

ACGCTTGTTAAEGCACTGAGGCAACTTCGGCCGCACTCGATGAGTGCTGACAGATATCTTGACGGCGCTGGATCCAC
AGACCGAGCTGCGTAGCATAGCTGCTGTTAATGACGAGCGCTGACGATGCTTGACAGCATTTGTGTACACAGCAAGCATCC
GAGCGGCCGAGATCTGACGTGACTGACTTATGTGGCCGCGCAAGATGAGCGAATGTGTGCTGGGACAGCAAGCGCG
GACTTTTGGCGGAGGATAGCCCACTGATGAGCTTCCCAAGAGTGCTTCCACAGCGGTGGTCTTTGCGATGCACTTA
GTGCTGCTCCCAAGGAGAATTTTCCAGCTGCTCAGGCACTGACGACGAGGAAAGGCCCATTTTCCACGAGGAGGCG
GTTGGCCGATACCGGCGCATCATTCGCTGCTCACCAGCGCACTTTCAGCGGCCCCAGATCATCCACGACGACAAAC
TTTGCTAGCGGCAACTGCGAGCTGCTGATGCGCAATTTGAACACAGCTGCTAGCATCTGCTCAGCGCGCTGCGAGCAAG
TCTCAAAGAGAGATGGACAGATCTTAAGAAGAAACAGACGCCGCACTGAGCTGCTGGGAGACATTAAGGAGAAATCAAGC
CGAGCTGTGTCAATCTCAGAAGAAAGTGAACCCGCTGAAGCAGAGTGGGCAACAGATTAACAGGACAGGCTGATCAGCTG
CAAGAAGTGGGCAAACTGACGAGCATTAATGAGGCGTGTGATCATTGGCTGGGGCTTGTGCTGCGGACGTATGTCATC
GTGCTGATGCTGACCAATATGCTGCTGATCAGCAATTTGCTGACGCTGCTGGAAGGCTGCTGACGTTGCTGGGAGAGCTGCT
CGAAGTGTGACGAGGTGATAGCGAGGACGAGTGTGAAGGCGCTCAAGCTGCTACAGCTCATGATA

Fig 21C : >S2P (1274aa) – SEQ ID No. 8

MVFLVFLVLPSVCCNVLLDLPILPATYTNSTRGQVYVYKDFVRSSVLVLQDLPFFSVMTVAHIAHVSTGKTRFD
NPFVFNDFVYFASTEKSNIRIGWFTLDSKTQSLVNNATVNVKICEFGQCNDFPLGVYHHKNWSMSESEFRV
SSANRTHSEYFSQPLMDLEKGQNFKNRFLVEFKNIDGYKFNITKHPINLVLDPOGSAFLEPLDPLIGINTRFQT
LHLSHRYSLPTGSSSGWATGQVYVYQPLTRFLFVYKTSITGADLADLPLETEKTLSFVEKYKQSVNMFVR
QTSFVRFPINLCPGFEVFNATRFASVAYWNRRKSNVADYSLVNSASFTCSQGYPTKLVLDCLFNTVYAGSD
VIRGEDEVRIQAPTGKIADYNNLDTGQVCAIWNSSDVGNNYVILRFRKSNLCPFERDISEIYVNS
QNGVEGFCPLDQYFGPTNQNGVLDYPTVFLVSEHAPPAHTCPGKKSTLVNKKVNCVNFNGLTGTWVSSNKKFL
PQOQGFQNDLTDVAPRDQDGLDITGFCSSGVYPTGNTSNQAQVLDQVNCVEVPAHVAHQDGLTPTWVRYSTGS
NVFQATGCLGAHEVNNVSECDIPAGICAQSYQOTQNSPRRARSASOIAITMSGAENSVYNSNIAIPTNT
VITVSPMTSSMTCTCTMYGCDSESNLLQDTSCTNLRALTGAIEVEDOEDQFQVAKYQIKLCPGDFGG
NSOILPQSPKPSRKFIEDLNNLTLADAGAFQYDGLDGLQADLCAQKFNLSLPLPITDMEQVYASALLAG
TITSGTGFGAALQAPFMQMYRNGFQVNTVLYNQKIAQLNNSAIGIKDLSLTSASALGKLQDTSVNNQAQNL
TLQKLSNFGAISVNDLILSRDLFPEVAFQIDRITGLRQLQYVYTTQILRAIFARSANLAKMTKMSCEVLSQKRV
DFCGKQSVLSPSQAPGHVHVTYVPAQEKNTLPAIACHGKAHPREGVYVNGTWHVYVOTRNFVQPTDITNT
FVSGCNDVIGVNNITVGLIQLPDSFKELDKYFNKTSVPDVLGDGSCSNVNVNVIQKEDIRNEVAKHNLN
QELGKEQYIKVWPWYVYLDGAPJLQVNTLCCMTSCSLKIGGSCSCCKDFDSEPLVYKGLVXHL

【図 2 1 - 3】

Figure 2

[illegible]

Fig 21B: >S2P (3825pb) – SEQ ID No. 7

[illegible]

【圖 2 2 - 1】

Figure 2

[illegible]

【图 22-2】

Figure 22

[illegible]

Figure 22

ACCTGCTTAAGCAGCTGAAGCAGCAATCGCGGCCATCAGTACGTGCTGTAACAGATCTTCGAGCCGCTGATCCAC
AGAAAGCGGCTGCAGATGATCGTCCGTAATCCAGCGAGCTCTGACCTCTGCAGACATATGTGTACACAGACAGATCGT
GAGCGCCGCGAGATTCGAGTATGCTGATCTGCGGCCAGCAAGATGAGCGAATGTGTGCTGGGACAGAGCAAGCGCGT
CTGCTTGGCGAGCAAGGATAGCAATGATGATGATCCACAGATGCTGCAACGGCTGTGCTGGTGTTCTTGCTGATGACTA
CGTGGCTGCTCAAGAGAAAGTTTACCACCGCTTCGACCATGCTCCACAGCGGAAGAGGCCATTTCTTCAGCGGAGGCGG
TGTTGTTGAGCAAGGSCATCTATGTTGTCCTCCAGCGCAATCTCTACAGCGCCGAGATCATCCACACGACCAACAT
TCTGTCAGCAAGCTCGCATCGCTGATGCTGATGAGCAATGCTGAACAAACGCTGTAGCATATCATCTGACGAGAGCTGGAGAC
TCTCAAGAGAGCATGGCAAGTAACTTGAAGAAAGACAGCCCGCAGCTGGAGCATCTGGAGACATATAGCGGAATCAACG
CCAGCTGTGCTCAATCATCCAGAAAGATTCAGCCCTGAAAGAGGTGGCCAAAGTTTACGACAGAGAGCTGATCGACTCT
CAAGAACTGGCAATATGACGATGATCATTAAGGAGGCGCTGTGACTGCTGCTGGGCTGCTGCGGACGTATGGCAT
CTGCTGATGTCACCATATGCTGCTGCTGCTGACCTGCTGACGTGCTGAGGAGTCTGATGCTTTCGGAAGCTG

Fig 22C: >S2P3F (1274aa) – SEQ ID No. 11

MFVFLVFLVSSQCNLITRTLPQALVFNSTFRGYYVPKFRSSVLVLTQDLFLFPNSFVTHFAHVSVTGTRKFD
NPLVFNPDVGFYASTEKNISRWENWIGFTLDSKTLQSLNINWIKVCFECSFQDFGVYVHNKMSWSESFERY
SSANCTCFEVSOPFLMDLEKGVLNPEFVKVINDGFKYSHKPTINLVRDQPGSAFLPDLPIGINTRFT
LHLRSYLPDGDSSSGWGAAGAAVYGNLQRTPLKYNENGTIDVADCAOLDPSETKCTFVKGVQYNSFRV
QPTESVFRNLTINMLCFGEVFNATRFASVAVKRIKSNCAVDSVLSVNASFSTCFGVSPTLCLDCTFVNIASF
VDEVRVQAPQGTAKIADYNKLPDFTGFWNIASSNLNDKSGVNGYVILFRKSNLKFPERDISTEYVQAGST
VWGFNGFCYQPLQSGFYQTNQGVQSPYRWVLSPELLAHAPVTCGPKNLTINVKVNCNINFGSLTGTVTESKNFL
PQQFGDQNDTDAVRDPTLIEDLTCFCGSGSVYPTGNTSNAGVLYQDNCVTEFVPAHQAOLDTPTRVYSV
NYTEPFRAGCLMAGHVSCTCDIGACIGASVQYQTQNSPGSASVOSIATJLSLGAENSVNSNSIAPINTFI
SVFTFLPVSIAKTSVDCMTYGCSDZETCNLLGYSDCTQLNRAJLIEVDQNKTEFEVAGQKIVYKTPDGGF
NLPQSDPPSKSRFIEDLKNVTLADFAIKGYQDGLDGAARLDLNFCAKGLTVLPLTDEMAQYTSALLAG
TTSQWTFGAGAALQIPFMQAYAFNRVIGDVTGNLYVENKQALJNSAIGKNDZSLASLGAQLQDVYNQQAAL
TLQLKSSNFGAISVNDILSRDLPVEAFVQIDRLTRGLSQSLTVQTLRIAEIRASNLAAKTMSESVQSKSRV
DFCKGKYLMSFPQSAHPDGHVFTVYFAQENKFTTAPCHDQGAHCPREGVFSNGTHVFTORNFVEPQITTDN
FVSGNCGVIGVNTNVPDLOPELDSFKLEDKYKXNITSPDVLQDINSAGSVYNIOKEDRLNENKALNSJDL
OIFKGYEYQKWPWYVILFELGALIGVYVNLCTMTSCSFCCKGCSGCFHFDSESVLKVGLVHYT*

【図 22-3】

Figure 22

CCGCTCTTCGTCAGTACAGATATCTTGGCAGGAAGCATACAGGGCTCGGCCACCGGAACCTGTGCCGAGGCTACAGGCG
 AAGCATGCCGACGGCGAGAGATCTGCTGTACCCATCCGCGATCTGTCGCAATATCATGTCGGAATAAGAGCCGCTCT
 TCTGGATATCTCACTGTGGCCGCTGGGTGTGGCGGACGATCATAGGACATAGGCTGGTGCATCGGCTGATTAATGTCTG
 AAGAGCTGGCGCGGAGACGGGTGACGCTCTCTTGGGGAAATCTTCCGATTCAGGTCGCGCTCCGAGTCGACGAGCATCCGCTT
 TACGCTGCTTCTGAGCGATGTTCTGAATTAATCAAGCTTACAATTCCTGATCGGATTAATCTCTCTACGAGTATGTG
 CGGTAATTCACACCGCATACAGTGGCGACCTTTCTGGGGAAATCTTCCGAGGAGACCCCTATTTGTTATTTTAAATACAT
 TCCAAATATGTATCGCTCATGAGAACAACCTGGTAATATCGTCCATAATAGACAGCTGCTAAACCTGATCTTTTAAT
 TAAAGAGGATCGAGTAAGGAATCTTTTGTAATATCTGATACCAAAATCCCTTCAAGTAAATTTGCTTGCTCCAGTACG
 TACAGCCGCTGACGAAAGATACGAAGGATCTTGGAGTATCTTTCTTCTGCGGTAAATCTGCTGCTGCGCAACAAACAA
 ACACCGCTACGACGGGTGGTTGTCTTGGCGATACAGAGTACCAACTCTTTTCCGAAGAGTAAGCTGGTCTACGAGAG
 CGCATATGATCAATCTGCTGCTTCTGTGTACGGCTAGATCTGATGATCTTCAAGATCTGATGACGATCTGATGACAT
 GATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
 GTATCCGATGAGAAGGCGACGCTCGGCGTACACGGGGGGTCTGCGACACAGCCAGCTGGAGACGACGACCTACCG
 ACTGAGATATCTACAGCGTAGCTATGAGAAGAACGCCCACTCCCGAAGAGGAGGAGTAAAGTACAGCAGGTCTACGCTGAAC
 GCGAGGCTGGGACAGGACGAGGCGAGGAGGACTTACAGGGGAGACCGCTGGTATCTTGGTGTCTCTCGGGTTGCTG
 CCACCTCTGACCTTGAACGATGCTTATTTGTATGTGCTCGAGGGGGGGAGCATCTGAGAAACAGCCGACCAAGCGGCCCT
 TTTACGGTTCTGGGCTTTCTGTGCGCTTTGCTGCATGTTCTGCACTTTCGCGATTCGCGATGACGGCCAGATATACCG

Fig 22B: >S2P3F (3825pb) – SEQ ID No. 10

[illegible]

【图 22-4】

【図 23-1】

Figure 23

[illegible]

【図 23-3】

Figure 23

[illegible]

10

20

【図 24-1】

Figure 24

```

LOCUS       Exported                         11342 bp ds-DNA             circular synth
DEFINITION  synthetic circular DNA
ACCESSION   pFLAP_CMV_EGFP_WPRE.xdna
SOURCE      synthetic DNA construct
            ORGANISM  synthetic DNA construct

REFERENCE   1 (bases 1 to 11342)
COMMENT     Serial Cloner Genbank Format
            SerialCloner_Type=DNA
            SerialCloner_Comments=
            SerialCloner_Ends=0,0,,0,
FEATURES             Location/Qualifiers
     source           1..11342
                     /organism="synthetic DNA construct"
                     /mol_type="other DNA"
     misc_feature     complement(87..164)
                     /label=SV40 ORI
     misc_feature     233..868
                     /label=HIV1-5LTR
     misc_feature     870..1086
                     /label=HIV-1 psi pack
     misc_feature     1533..1766
                     /label=RRE
     misc_feature     2288..2411
                     /label=cPPT-CTS
     primer_bind      2446..2476
                     /label=Primer 1
     misc_feature     2453..5701
                     /label=K18 promoter
     misc_feature     4961..4966
                     /label=Modified Splicing Donor Site
     misc_feature     5686..5697
                     /label=Modified Poly-pyrimidine tract
     misc_feature     5697..5701
                     /label=Modified Splicing acceptor site
     CDS              5714..8131
                     /codon_start=1
                     /label=hACE2
                     /note="type=CDS"
                     /note="vntifkey=4"
                     /translation (SEQ ID No. 26)

     misc_feature     8149..8753
                     /label=WPRE
                     /label=WPRE-WT
     misc_feature     8838..9099

```

30

40

【図 2 4 - 2】

Figure 24

```

/label=LTR
terminator      9136..9363
                 /label=bGH PA
CDS              9539..10330
                 /codon_start=1
                 /label=Kan/neoR
                 /translation (SEQ ID No. 28)

rep_origin       10634..11262
                 /label=ColE1 origin

```

SEQ ID No. 25:

```

1 cgcgttgga gctttttga aaagctagg cctccaaaa agcctctca ctactctg
61 aatagctag aggcagagc ggcctcgcc tcgtcataa taaaaaaat tagtcagca
121 tggggcggag aatgggcgga actggcgga gttagggcg gtagggcg agttagggc
181 gggactatgg ttgctgact attagatgc ccagcattg ttatgacta gttgaaagg
241 ctaattcact cccaacgaag acaagatct ctgtatctg ggalctacca cacacaaggc
301 tacttccctg attagcaga ctacacacca gggcgaggga tcatatctc actgacctt
361 ggaigtgctc acaagctagt accagttag ccagagaagt tagaagaagc caacaaggga
421 gagaacacca gcttgttaca acctgtgac ctgcatggga tggatgacc ggagagagaa
481 gtgttagagt ggaagtttga cagccctca gcatcttcc acgttgccc gagagctga
541 tccggagtag tcaagaact gctgatatgc agcttgctac aagggacttt cgcctgggg
601 actttccagg gagcgtctc ctggcgagg ctggagagt ggcagcctc agatcttga
661 tataagcagc tgccttttc ctgactggg tctctctgt tagaccagat ctgagctgg
721 gactctctg gtaactagg gaaccactg cttagctc aataaagct gctgttagt
781 ctcaagtag tgtgtgccc tctgttgtt gactctgta actagagat cctcagacc
841 ttttagctag tgtgaaaaat ctctgacgt ggcgcgcga cagggacttg aaagcgaag
901 ggaacacga ggaagctctc cgacgcagga ctgcgcttg tgaagcggc acgcaagag
961 gggggggcgc gcgactggtc agtcagcaca aaattttgac tagcgaggc tagaaggaga
1021 gagatgggtg cgagagctgc agttaaagc gggggagagt tagatcgga tgggaaaaaa
1081 ttccgttaag gccaggggga aaaaaaaat ataattaaa acatatagta tgggcaagca
1141 gggagctaga tcaactgca gttaatctg cgcctgttaga aacatagaa ggcctgtagc
1201 aaatacggg acagctacca ccatccttc agacgagtc agaagaact agatcattt
1261 ataatacagt agcaaccctc ttgtgtgca ctcaaggat agagataaaa gaccacaagg
1321 aagctttaga caagtagag gagagcaaaa acaaaagtaa gaccacgca cagcaagcg
1381 cgcgtgatct tcagactgg agggagagat atgaggacca atlgagagaag tgaatttat
1441 aaataaag tagtaaaaat tgaacatta ggagtagcac ccacaaggc aaagagaaga
1501 gtgtgtgaga gagaaaaaag agcagtggga ataggagctt tgttcttgg gttcttggga
1561 gcagcaggaa gcactatagg ccagcagctga atgacgtga cgtatagcgc cagacaatta
1621 ttgtctgta tagtgcagca gcagacaact ttgtcgagg ctattgaagg gcaacgcat
1681 ctgttgcaac taagctctg gggcatcag cagctcagg caagaactct ggccttggaa
1741 agatacctaa agatgacaa cctctggg agttgggtt gctctggaaa actcatttg
1801 accactgctg tgccttgaa tgcattggg agtaataat ctctggaac gatttggat

```

【図 2 4 - 4】

Figure 24

```

4501 cgcccacta ggcctccaa agtctgaga ttacaggct ggcgcctgc gcccgctcaa
4561 gactccaaa ctttaacct gccagacct cctccactg gggagagaga gctaataca
4621 gtaattctt gccctgaag cagctcgag gccacaac actcgtctc ggtgtccag
4681 cccggttgc caccgtttt ctgggggtg agcggggtc ggcggggct cgcgggggc
4741 gcggggggtg gcccggggc agagcgccc gggcgaggg gcgcgggct cgagcgctc
4801 accttggtc cggctctcg aagcgctcc gggcggggg cggggcctca ctctcgata
4861 taactgggt cgcgcgctc gcgcagcgc ccaacgtct cgcaaaagcc tgaactcgt
4921 cttctctct tocccggca gcaatcgta ggcctcagt aagtgttagg agggacctca
4981 atccagcc ctctgtgac ttactatct aactcattt gctctctt gtaactcat
5041 aaccaccca accctactc caccggagg ggggtggga tactggatt tcaatcggc
5101 cactagcca cagggtccct aagagacca gcactagcg atgggaggc tctttccag
5161 gagaggggg gaagggggca ggtttagag cttacagag gaagtggaca gcatggagg
5221 agttaaggaa agcgctgtaa agggagagag acactgctc tggcgaae gggactgg
5281 gaggtttag cggatgtgc taaggctag tcatgtaga gtaaaagaa ggccttctt
5341 tggagagagc caatccagc tttaggggg ccagagtcg cagtgcatc agggaaaaaa
5401 tggcaggaga gggcgaggaa gaggactgt tagtagcac tactcttgg gcaggcaggc
5461 cagcgacta gtcagctgc tgaagcttc caagggggc agagtgctg gatctggga
5521 tccaggaaag gagggaatgg ggtggggcta gatgaaaag gatagggtc caggagagc
5581 ctctggcat tctgggagc aggaatttt cactaggata catacaact ttacacact
5641 caccacccc acctcggtc ttactatct ggaacaact ctcctttt tcttccagg
5701 tggatccgc accatgtca gctctctg cctctctc agccttgtt ctgtaactg
5761 tgcctagtc accattgagc aacaggcaa gacattgtt gacaagtta accaggaagc
5821 cgaagactg ttatcaaa gttcacttg tcttggat tatacacca atattactga
5881 agagaatgtc caaaactga ataactg ggcacaattg tctccttt taaggaaaca
5941 gtccacactt gcccaatgt atcaactca agaatcagc aatctcacg tcaagctta
6001 gctcgagct cttagcaaaa atgggtctc agtctctca gaagcaaga gcaaacggt
6061 gaacacactt ctaatacaa tgaacacct ctacgtact ggaanaatt gtaaccaga
6121 taatccaaa gaatgttat tacttgaac agtttgat gaaataalg caaacgttt
6181 agactacaat gagaggtct gggctggga aagctggga tctgagtcg gcaagcagct
6241 gagggcatta tatgaagat agtgggtct gaaaaatag atggcaagc caaatcatta
6301 tgaagactat gggagtatt ggaagagaga cttagaata aatggggtag atggctaga
6361 ctacagcgc gccacgttga ttgaagat ggaacacact ttgaagaga ttaaacatt
6421 atatgaact cttaactc atgtgact agtggggc aaagttagt aatgcattc ctctat
6481 cagtcaatt ggaactctc ctctcatt gctgtgat atgtgggta gattttgac
6541 aaactgtac tcttgagc tctcttgg acagaaaaa aacatagat ttactgagc
6601 aatgtggac caggcttgg atgcacagc aatattcac gaggcgaga agtctttgt
6661 atctgttgt cttctaata tgaactaagc atctggga aattcaatc taacgacc
6721 aggaattgt cagaagcag tctgcatcc cagacttgg gacttggga agggcgact
6781 caggatcct atgtgcaca aagtgaact ggaagact ctgacgct atcatgagat
6841 gggcctatc cagtatgata tggcatatg tgcacaact ttctgtca gaaatggagc
6901 taatgaaga tccatgaag ctgtgggga aatcatgta ctttctgc ccacactaa
6961 gatttaaaa tcaattgtc tctgtacc gatttcaa gaagcaatg aaacgaat
7021 aaactctg ctcaaaag cactacgat tgttggact ctgcattta cttaactgt
7081 agagaatgg agtggatgg tctttaaag ggaattccc aaagaccagt ggaatgaaa
7141 gtgtgggag atgaagcg agatattgg ggtggggga cctgtccc atgatgaac

```

【図 2 4 - 3】

Figure 24

```

1861 cacacgacct ggaaggagtg ggcagagaaa ataaccaatt acacaagctt aatacactcc
1921 ttaattgaag aatgcacaaa ccagcaagaa agaatgaac aagaattatt ggaattagat
1981 aaatgggcaa gttgttgga ttggtttac ataaccaatt ggcgttgga tataaatta
2041 ttcataatga tagtagagg cttgtagtg ttaagaatg ttttctgt actttctta
2101 gtgaatagat taggcaggg atattacca ttatcgttc agaccacct cccaacccc
2161 aggggaccgc acaggccga aggaataga gaagaagtg gagagagaga cagagacaga
2221 tccattcag tagtgaacg atctgacgg tatcgcgaa ttcacaatg gcagtattca
2281 tcccaattt taaaaaaaa ggggggattg gggggctacg tgcaggggaa agaatagat
2341 acataatgc aacagacata caaactaag aattacaaa acaattaca aaattcaaa
2401 attttcgggt ttattacag gcacagagc atccattg gctgatacg gtatocagt
2461 ggggaataa aagtgaaag cagagagac cctctgact ggaactctt acctccaga
2521 agccttgtat gcaaaaccag tggcattca ttgtatgtt atttgatc cggttgcct
2581 ccagccttc agcaggccc gacctccc tggcagctt ccacctgac tgcacctg
2641 ctggctcca ttgagcact tggcctccc ccacattag gtgacagatc aggaacaatc
2701 caggctcagg ctctttatc gtgtctgccc tccacatgg caggtccat ggccaggtt
2761 ttcaagggt cttctctc caggtctgc ctatattg tctccctt cccctcagc
2821 tggtagctc ataagaatca ataggtcac tccagcaa agaacacagc caaatgttc
2881 ataccagcc ctgcagaaa aacgagctg tggagctgc aaactgaag gccaaacacc
2941 taaggtttc cccaacact cattcagc ggaatgctat tcatctttag gggcagsga
3001 catgaagc cctccact ccatcttct cacacagag ctggggagag catcttggag
3061 gatcgactc cctggggca gcttctaata ccagacagc cttacaagg gggcagggg
3121 aaggactggc ttgagaaaa gctctagaaa agaggggagg ggcactggc accaggcgctg
3181 ggtcgtctg atgatggctc taggagtgc tgccttct ctacggccc atcgatgta
3241 ggcacatta cttttatta ttattattt tattttagt cagagttag ctctgttgc
3301 ccaggctgca gcgcagcgc acgatcttg ctactgcaa cctctgctc ctgggtcaa
3361 gcatcttc tgcctagc tctgtagt ctgggattc aggcacac tgtctgatt
3421 aattttgta ttttagtag agaagggtg tcaactgtt ggtcaggctg gctcfaat
3481 tttttttt tttttttt tttttaga agagtctgc tctgttgtt agcgttagt
3541 gcagtggaat gaaactctg acctcaagt atccaccgc ctgcctcc caaagtgtt
3601 ggaattacag catgagcac tgcggcgc gatgtgagc acattatcat ctcttgaga
3661 gattttgtt ctttttgc accgccttc tctccagct ctgagactc ggcctgctc
3721 acagttagt ctgaatcat actgtttgaa ttgtaaatg tcaagattt ttaattaa
3781 gatcgagaa aggtgatata cgggtgtgca gaagtgcaga tgcattctg tgcctaact
3841 cagtgttca ctgagcag cccttggga gtagagctgc gagaggggag ggtgtgtgag
3901 ggggtcaga gactgggtt gttttggga gctgcact attttagt tgaattgat
3961 tgtgtgta ttgagaga cactctga tgaatgggt gtagtgtgt gtgagaaaac
4021 gggcgaggc gggaggtgt tggagccag gtcagctgc ggtgtgagtg tgaagcaag
4081 cagctatag gctgggact gcttctctc ctctctca gctccaccg tttctctc
4141 gggactctg ggcctcagc atgcccaca gatcccctc accagtgat aattgggct
4201 cagggttag gcagctaga gggactaca ggcattcca cccagacc agcagccccc
4261 caaatttct tttttttt tttttaga agagtctac tctgtgca ggcctgac
4321 gcgcgctc gctcactg aactcgcg tccagggtc aagcattc cctctcag
4381 cctccaagt agctgagat caggcgctg acctacagt cggctaat ttttgtatt
4441 tagtagagag ggttttacc atgttggta ggaatgctc gatctctga cctgtgact

```

【図 2 4 - 5】

Figure 24

```

7201 atactgtac ccgcatctc tgttcaatg ttctaagat tactcattca ttcatatta
7261 cacaaggacc ctttaacct tcaatttca agaagcact tgcacagc ctacaatga
7321 aggcctctg cacaatgt acatctcaa ctacagaa gctgacaga aactgtcaa
7381 tatgtcagg ctggaaaaat cagaacctg gacctaga ttgaaaaat tttagagc
7441 aaagaacat aaltgaagg cactctcaa ctatttgc ctttattta cttgtgaa
7501 agacagaa aagaattct ttgtggatg gagtaccag tgaatgct atgcagaca
7561 aagcatcaa gtgaggaaa gcttaaatc agctctgga gataaagat atgaatgaa
7621 cgacaatga atgacctgt tccatcatc tgttcatat gctatgggc agtactttt
7681 aaaaatgaaa aatcagatga ttcttttg agggaggat gtcagatg ctaatttga
7741 accaagaat ctttattt tcttgtac tgcactaaa aatgtgtct atatactc
7801 tagaatgaa gttgaaagg ccatcagat gttccggag cgtataagt atgcttgc
7861 tctgaatag aacagcctg agtttctgg gatacagca acacttgcg ctcttaaca
7921 cccctgtt tcatatgc tgaattttt tgaattgtg atggagtga tagtgttgg
7981 cattgtatc ctgacttca ctggatcag agatcggaag aagaaaaaa aagaagaag
8041 tggagaaaat cttatgct ccatgatat tagcaagga gaaataatc caggatga
8101 aaacatgat gatgttcaa cttcttta actcagctc aagttcaa tcccagtaa
8161 tcaactctg gattacaaa ttgtgaaag attgactgt atttcaat atgtgtcc
8221 tttaactga tgtgatac ctgtttaa gctttgat catgtatt cttccgat
8281 ggtttcat ttctctct tgaataatc ctgttgtc tcttttgg agagtttg
8341 gcccgtgtc aggaacgtg gcgtgtgtg cactgttt gctgacgaa ccccactg
8401 tggggcat gccacacct gtcactct tccggact ttgcttcc cctctcat
8461 tgcacggcg gaactatg cgcctgct tgcgcgtc tggacaggg ctgctgtt
8521 gggcactgac aattcgttg tgttctgg gaagctgac tcttccat ggcctgac
8581 ctgtgtgc acctggatc tgcgggag ctctcttc tgcactcct cggccctca
8641 tccagggag cttctccc gcgcgtct gcgcgtcgc cggctcttc cgcgtctg
8701 ccttccct cagacagtc ggaactcct tggcgccc tcccgcac tgggaatttg
8761 cagtgcagc tacttttaa accaatgat tacaaggc ctgtagatc tagccattt
8821 taaagaaa agggggact ggaaggcta attcctcc aacgaaga agatctga
8881 gagatctgc atataagc ctgctttt ctgtactg gctctctg ttgacagca
8941 tctgagctg ggaactctt ggtcaactg ggaacccat gcttaagct caataaact
9001 tgcattagt gcttaagta gtgtgtcc gctgtgtg tgaacttgt aactagat
9061 cctcagagc ctttagtca gtgtgaaa tcttagcag tcttagagg cccgtttaa
9121 cccgtgac agctcact gtgcttca tggcgacc atctgtt tgcctccc
9181 cgtgtcttc ctgacctg gaagtgcca cttcaact ctttctaa taaatagg
9241 aatgtcat cgttgtc agtaggtg atctattt gggggggg gtggggcag
9301 acagcaagg ggaagattg gaagacaa gcaggatgc tgggagtc gteggctta
9361 tggcttca tggcggttt tatggacag aagcgaac gaattgcag ctggcgccc
9421 ctctgttag gttgggaag cctcgaag aactgagat gcttctgc cccaagat
9481 ctgagtcgc aggggata gcttgata agagacaga tgaagatgc tgcagtagt
9541 tgaacaagt ggaatgcag caggttctc gggcgttg gtgagagc tattcgcta
9601 tgaatggca caacagaca tggctgct tgaatggc gtttccgg tgcagcga
9661 gggcgccc gttctttt tcaagacca cgttccgt gctcgaat aactgaaga
9721 cgaggcagc cgtatcgt ggtgccc acaggcggt ccttgcag ctgtgctga
9781 cgttgtact gaaggggaa ggaactgct gtaattggc gaatgccc ggcagact
9841 cgtgtact cacttctc ctgcagaa agtatcat atgtgtat caatcgcg

```

10

20

30

40

50

【図 24-6】

Figure 24

9901 gctgcatacg cttgatccgg ctactctgcc attcgaccac caagcgaaac atcgcatgca
9961 gcgagcagct actcgatgct aagccggtct tgcctcatag gatgatctgg acgaagagca
10021 tcaggggctc gcgcacatcg aactgttgc cagcgctaac gcgacgatcg ccgacggcca
10081 ggcattctgt gcgaccatcg cgcgatcgtc ctgcctgaat atcatgggg aaatggcgga
10141 cttttcgtga ttcatcact gtggccggct ggggtggcgc gaccctatc aggcataatc
10201 gtggctacc cgtgatctc ctgaagactc tggcgcgcaa tggctgacac gttctcgtc
10261 gttcaggct actgcgttc cgcattcgca gcgcctgac ttctcgctg tttctgaca
10321 gttctctga attattaacg cttacaattt cctgatcggg tattttctcc ttacgatct
10381 gtgcgggtat ttacacgca tacagggtgc acttttcgg gaaatgtgc cggaaacctt
10441 attgtttt ttctctaaat acattcaat atgtatctc tcatgagca ataaccttga
10501 taaatgtct aataataga cgtctgaaaa cttcatttt taattaaag gatcatggg
10561 aagatctct ttgatatact catgacaaaa atccctaac gtgagtittc gttccatcg
10621 gcgtcagcc ccgtagaaaa gatcaaaagg tatctttgat atctttttt tctgcgcga
10681 atctcgtct tgcatacaa aaaacaccgc ctacacggcg tggtttgtt gcgcgatcaa
10741 gagctaccac cttcttttc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcatag accaaatct
10801 gtctttctg ttgatcgcta gttagggcac catctcaaga actctgtacg accgcctaca
10861 tactctgct tgcatactc gttaccagc gcttcgca gtggccgata tgcgtgtctt
10921 accgggttg actcaagacg atagtattcg gataaagcgc agcggctggg ctiaacgggg
10981 ggttcgtgca cacagccag cttggagcga acgaactaca ccgaactgag atacctacg
11041 cgtgacgat gagaaagac cagcttccc gaaggagaaa aggcggacag gttatcggt
11101 agcgcgcagg tgcgaagcgc agagcgcag agggagcttc cagggggaaa cgctcggtat
11161 cttatagtc ctgcgggtt tgcgcacct tgcattgag cgtgatatt gtgatctgc
11221 tcagggggcg ggagctgat gaaaaacgc agcaacggcg ctttttacg gttctggcg
11281 ttgtctggc ctttgccta catgttctg actcttcgc atgtacggcg cagatatacg
11341 cg

//

【図 24-8】

Figure 24

ACTGGTCTGCGCGAAATGGGGCTATGAGGAGGTCCAGCGGATGTGGCTAGCCTGAGTCACTAGGAGTAACACAGGGCCCTT
 CTCTTGAGGAGAGGCAATCAGAGGTGTAGGGGGGTCACGAGTGACCTAGGAAAATAAGTCAGGAGGAGGCGCAGAAA
 GAGCACTCTTTGATAGCACTCACTCTGGGCGAGCGAGCAGCGACCTAGCTCAGGCGCTCTGAGGGCTCCCAAGGGGCGAC
 TGGTGGGATCTGGGAAAACAGGAAAGGAAATGGGTGGGGCTAGATGAAAGAAAGTAGGTGTCTCAGGAGGAGGCTCTTGCT
 ATTCCTGGGACAGGAAGTTCTTCACTAGGATACATAACACTTTTACACACTCACCCACGCCATCCCTGGCTTCTATTACATGG
 AACACTCTGCTCCTCTCTCTCAGGAT

Figure 24C: hACE2- SEQ ID No.29 nucleotides 5714 to 8131 in SEQ ID No.25

[illegible]

【圖 24-7】

Figure 24

Figure 24B: K18 PROMOTER (SEQ ID No. 26) (BOLD UNDERLINED = MODIFIED SPLICING DONOR (SEQ ID No. 27) AND ACCEPTOR SITES (SEQ ID No. 28)) (nucleotides 2453 to 3249 in SEQ ID No. 25)

[illegible]

10

【圖 24-9】

Figure 24

[illegible]

Figure 2A: WPRE WT CSEA ID No.31 nucleotides 8149 to 8753 in SEQ ID No.225
 AATCCCGGATAACCAACCTCGGATACAAATAATGTGGAAGATGACTGCGATTCTCTATGATGTTGCTCTCTTTA
 CGCTAGCGGAGACAGGCTGCTTAATCGCTTGATATCATGATCTGCTCCGGATAGGCTTCATTTCTCTCTCTCTCT
 TATAAATCTGCTGCTGCTGCTGTCTTATGAGAGATGTGGCCGCTTGCAGGACAGTCGCTGCTGCTGCTGCTGT
 TCGTAGCAGCAACCCGACCTGTGGGGAGCTGACCAACCTGTGACGACTCTTCTCGGAGGACTTCGCTTCTCCCTCT
 TCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
 TCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
 GTCTCTGCTGCAATGCTCTCGGAGCTCAAGATCGAGGAGTCTCCCTTCCGCGGAGCTGCTGCGGCTCTGCGGAGCTC
 TCTCCGGGCTCTGCGCTTGGCCCTCAAGACATCGGAGATCTCCCTTTGGGCGGCTCTCCGAGATCGGG

Figure 24F: polypeptide encoded by Kan/neoR gene (SEQ ID No. 33)
 IEQDQLHAGSPAAMVERLFGYDWAQQTIGCSDAAVFLRLSAQGRV
 LFLVKTDLSGALNELQDEAARLSLWLTGVPCEAVLDVVVTEGRDWLLLGEVPGQDLSS
 HLAPEAKVSIADAMRRLHLTDLPATCFPDHQAKHRIERARTMEAGLVDQDDLBEHQG
 LAPAELPARIKASMPDGEDVLVTHGDACLNTIMVENGRSGFIDCGRLGVADRYQDIAL
 ATPDIAEELGGEWADRVFLVGLTAAAPDSQRIAFYRLDLEFF"

[illegible]

20

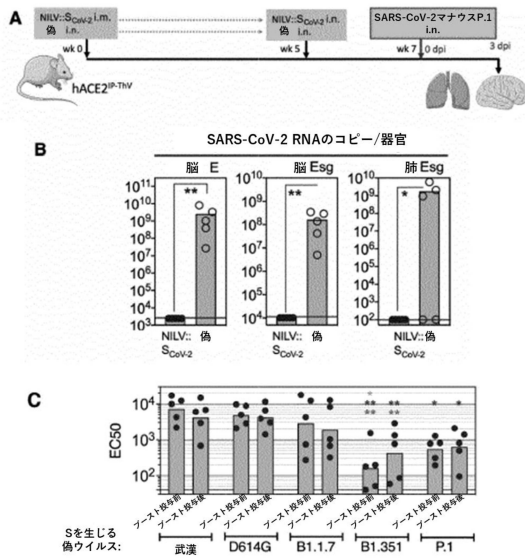
30

40

50

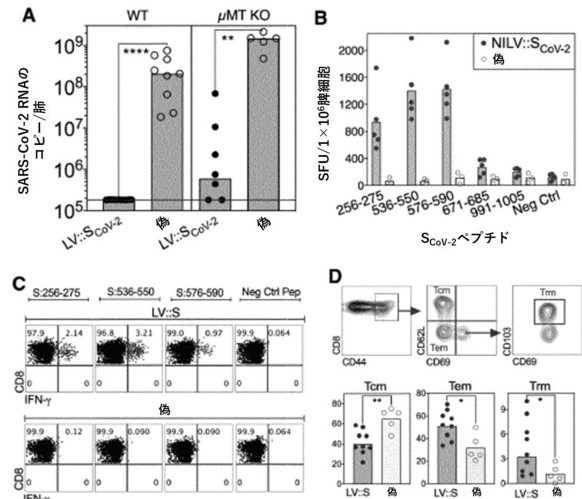
【図 25】

図 25



【図 26】

図 26

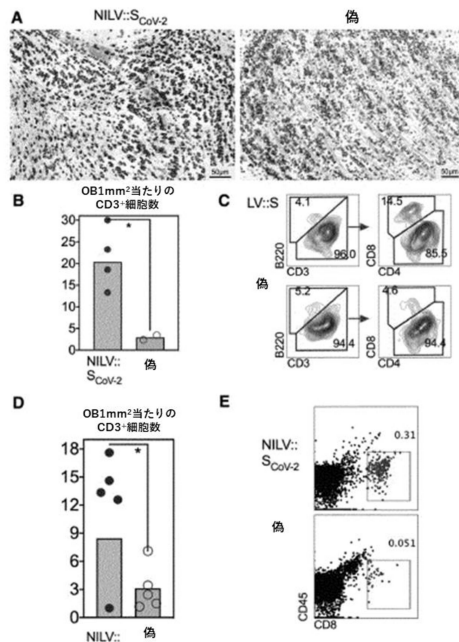


10

20

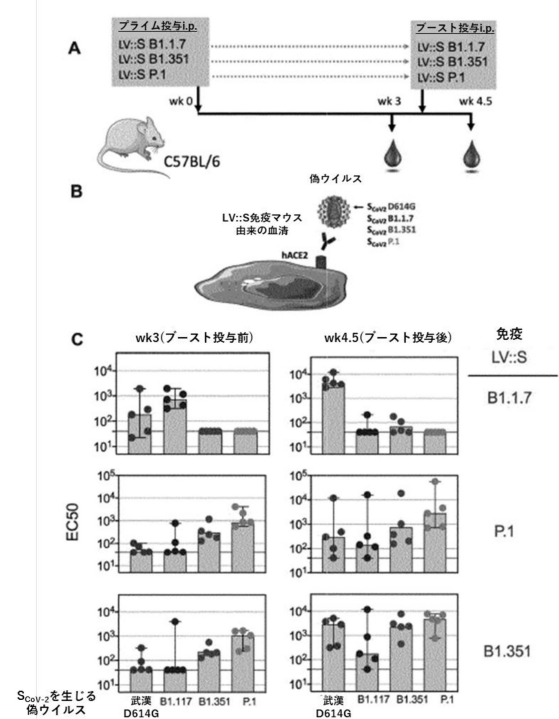
【図 27】

図 27



【図 28】

図 28



30

40

50

【図 30-5】

Fig. 30C: Amino-Acid sequence of Spike SARS-Cov2 B.1.1.7 gene (codon optimized) (SEQ ID NO: 108)
S-B117 (1270aa)

[illegible]

20

【圖 3 1 - 2】

Figure 31A (CON'T)

Figure 31A (CON'T)

Figure 31A (CON'T)

Figure 31A (CONT)

40

50

【圖】

cagaccccgtagaa

[illegible]

【図 3 1 - 5】

Fig. 31C: Amino-Acid sequence of Spike SARS-Cov2 B.351 gene (codon optimized) (SEQ ID NO: 111)

[illegible]

【図 3 2 - 2】

Figure 32A (CON'T)

Figure 32A (CON'T)

[illegible]

【圖 3 2 - 4】

Fig. 32B: Nucleotide sequence of Spike SARS-Cov2 B.351-2P gene (codon optimized)
(SEQ ID NO: 113)
S-B351-2P (3813pb)

[illegible]

【図 3 2 - 5】

Fig. 32C: Amino-Acid sequence of Spike SARS-Cov2 B.351-2P gene (codon optimized)
(SEQ ID NO: 114)
S-B351-2P (1270aa)
K986P-V987P = 2P

[illegible]

【図 3 3 - 1】

Figure 33

pFlap-ieCMV-S_{FL}-D614G-WPRE_{int}

Fig. 33A: Complete nucleotide sequence of pFlap-icMV-S_{FL}-D614G-WPREm (10064pb) (SEQ ID NO: 115)

D614G

[illegible]

10

【図 3 3 - 2】

Figure 33A (CON'T)

[illegible]

【図 3 3 - 3】

Figure 33A (CON'T)

gatacaggtgagcttttttggggaaagtgctgcgggaaccccatattggttatatttttataataacatgatactgaccc
tcctgtgagcaacaacccgagataaaagctgaataaagcaatgacgaacactcttatttaataaataaggaatgaggg
tgaaagtatttttataatcttcgacgacaaaaccccttaacgtgagttttgttcacaaagtcgcagaccccgatgaa
gagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
gggtgtttcttgcggcagcaagctacaacactttcttcggaagtgaaactgcttcagcagcagcagcagcaacaata
ctgcttccttcgctgtagctgctgtagcttaggcacacactccaagacactccaagacactccaagctcctgtctgatac
ctgttaacagctgctgctgcagctgggtgataaagctgctgtctacccgggttgagctacaagagataatgactacggaatgc
gcagcgttcgggtgataagcgggggtctctgcagcaaacgagctggagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
cagctgagctgataagaaagcgcagcgttcgcgaaggggaagagcgcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
gagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
ggtggttttttgatgctgctgcagcgggggggcagctatgaaaacgcgcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
cgttcgttcgctgctgttcgaatgtttctgactcttcgcgagtgacggcgacataacggc

20

【圖 3 3 - 5】

Figure 33C: Amino-Acid sequence of Spike (Wuhan) SARS-Cov2 D614G gene (codon optimized) (SEQ ID NO: 117)

[illegible]

20

【図 3 4 - 2】

Figure 34A (CON'T)

[illegible][illegible]

40

【図 3 4 - 3】

Figure 34A (CON'T)

[illegible]

【圖 3 4 - 4】

Fig. 34B: Nucleotide sequence of Spike SARS-Cov2 P.1 gene (codon optimized) (SEQ ID NO: 119)

[illegible]

10

【図 3 4 - 5】

Fig. 34C: Amino-Acid sequence of Spike SARS-Cov2 P.1 gene (codon optimized) (SEQ ID NO: 120)

[illegible]

【配列表】

2023535163000001.app

20

30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP2021/069890

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/069890

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/12 A61P31/14 C07K14/005 C12N15/86 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61P C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	Ku Min-Wen ET AL: "Intranasal vaccination with a lentiviral vector strongly protects against SARS-CoV-2 in mouse and golden hamster preclinical methods", bioRxiv, 3 September 2020 (2020-09-03), XP055852779, DOI: 10.1101/2020.07.21.214049 Retrieved from the Internet: URL: https://doi.org/10.1101/2020.07.21.214049 [retrieved on 2021-10-19] the whole document figures 4, 5 line 525 - line 528 ----- -/--	1-64
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
26 October 2021		16/11/2021
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Irion, Andrea

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/069890

Q(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y,P	Amanat Fatima ET AL: "Introduction of two prolines and removal of the polybasic cleavage site leads to optimal efficacy of a recombinant spike based SARS-CoV-2 vaccine in the mouse model", bioRxiv, 17 September 2020 (2020-09-17), XP055822821, DOI: 10.1101/2020.09.16.300970 Retrieved from the Internet: URL:https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.09.16.300970v1.full.pdf [retrieved on 2021-07-09] abstract line 72 - line 92	1-64
Y,P	----- YANG YONGPING ET AL: "Newcastle Disease Virus-Like Particles Displaying Prefusion-Stabilized SARS-CoV-2 Spikes Elicit Potent Neutralizing Responses", VACCINES, vol. 9, no. 2, 21 January 2021 (2021-01-21), page 73, XP055806654, DOI: 10.3390/vaccines9020073 abstract page 3, paragraph 3	1-64
Y,P	----- US 2020/407402 A1 (HE LINLING [US] ET AL) 31 December 2020 (2020-12-31) paragraph [0123] paragraph [0016] claims 1, 18-22 sequences 33, 38, 39	1-64
X,P	----- Ku Min-Wen ET AL: "Brain and Lung Cross-Protection against Ancestral or Emerging SARS-CoV-2 by Intranasal Lentiviral Vaccination in a New hACE2 Transgenic Murine Model", 12 April 2021 (2021-04-12), XP55853687, Retrieved from the Internet: URL:https://assets.researchsquare.com/file/s/rs-415309/v1_covered.pdf?c=1631862018 [retrieved on 2021-10-21] the whole document ----- -/--	1-64

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/069890

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CRAWFORD KATHARINE H. D. ET AL: "Protocol and Reagents for Pseudotyping Lentiviral Particles with SARS-CoV-2 Spike Protein for Neutralization Assays", VIRUSES, vol. 12, no. 5, 6 May 2020 (2020-05-06), page 513, XP055854276, CH ISSN: 1999-4915, DOI: 10.3390/v12050513 abstract page 3, paragraph 1	27-34, 44-48, 50-52
Y	----- KU MIN WEN ET AL: "A Single Dose of NILV-Based Vaccine Provides Rapid and Durable Protection against Zika Virus", MOLECULAR THERAPY, vol. 28, no. 8, 20 May 2020 (2020-05-20), pages 1772-1782, XP55854319, US ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.05.016 abstract	1-64
Y	----- GALLINARO ALESSANDRA ET AL: "Integrase Defective Lentiviral Vector as a Vaccine Platform for Delivering Influenza Antigens", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 9, 5 February 2018 (2018-02-05), XP55854325, DOI: 10.3389/fimmu.2018.00171 abstract	1-64
Y	----- Yahalom-Ronen Yfat ET AL: "A single dose of recombinant VSV-deltaG-spike vaccine provides protection against SARS-CoV-2 challenge", bioRxiv, 19 June 2020 (2020-06-19), XP055827074, DOI: 10.1101/2020.06.18.160655 Retrieved from the Internet: URL:https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.06.18.160655v1.full.pdf [retrieved on 2021-07-22] abstract page 11, paragraph 2 - page 12, paragraph 2 ----- -/--	1-26, 53-64

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2021/069890

Q(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WALLS ALEXANDRA C ET AL: "Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein", CELL, ELSEVIER, AMSTERDAM NL, vol. 181, no. 2, 9 March 2020 (2020-03-09), page 281, XP086136222, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/J.CELL.2020.02.058 [retrieved on 2020-03-09] the whole document	1-64
Y	STERNBERG ARIANE ET AL: "Structural features of coronavirus SARS-CoV-2 spike protein: Targets for vaccination", LIFE SCIENCE, vol. 257, 6 July 2020 (2020-07-06), page 118056, XP55854328, GB ISSN: 0024-3205, DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118056 the whole document	1-64
Y	YU JINGYOU ET AL: "DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques", SCIENCE, vol. 369, no. 6505, 20 May 2020 (2020-05-20), pages 806-811, XP55854426, US ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.abc6284 the whole document	1-64
Y	FATHI ANAHITA ET AL: "Recombinant vesicular stomatitis virus vector vaccines for WHO blueprint priority pathogens", HUMAN VACCINES & IMMUNOTHERAPEUTICS, vol. 15, no. 10, 3 October 2019 (2019-10-03), pages 2269-2285, XP055827075, US ISSN: 2164-5515, DOI: 10.1080/21645515.2019.1649532 page 2270, right-hand column, paragraph 3 page 2279, left-hand column, paragraph 4	1,3,6-21
Y	JUDITH M. FONTANA ET AL: "Mucosal Immunization with Integrase-Defective Lentiviral Vectors Protects against Influenza Virus Challenge in Mice", PLOS ONE, vol. 9, no. 5, 13 May 2014 (2014-05-13), page e97270, XP055193388, DOI: 10.1371/journal.pone.0097270 abstract	2,4,5, 22-26, 53-64

2

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

page 4 of 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2021/069890

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2020407402 A1	31-12-2020	CN 112300253 A	02-02-2021
		CN 112538105 A	23-03-2021
		US 2020407402 A1	31-12-2020
		US 2021139543 A1	13-05-2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	H
A 6 1 K 9/12 (2006.01)	A 6 1 K 9/12	
A 6 1 K 9/72 (2006.01)	A 6 1 K 9/72	
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
(32)優先日 令和3年2月2日(2021.2.2)		
(33)優先権主張国・地域又は機関 国際事務局(IB)		
(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,T,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW		
弁理士 実広 信哉		
(74)代理人 100133400		
弁理士 阿部 達彦		
(72)発明者 ピエール・シャルノー		
フランス・7 5 7 2 4・パリ・セデックス・1 5・リュ・デュ・ドクトゥール・ルー・2 8・パストゥールーテラヴェクティス・ジョイント・ラボ・アンスティテュ・パストゥール		
(72)発明者 ミン・ウェン・ク		
フランス・7 5 7 2 4・パリ・セデックス・1 5・リュ・デュ・ドクトゥール・ルー・2 8・パストゥールーテラヴェクティス・ジョイント・ラボ・アンスティテュ・パストゥール		
(72)発明者 ピエール・オーティエ		
フランス・7 5 7 2 4・パリ・セデックス・1 5・リュ・デュ・ドクトゥール・ルー・2 8・パストゥールーテラヴェクティス・ジョイント・ラボ・アンスティテュ・パストゥール		
(72)発明者 ニコラ・エスクリウ		
フランス・7 5 7 2 4・パリ・セデックス・1 5・リュ・デュ・ドクトゥール・ルー・2 8・パストゥールーテラヴェクティス・ジョイント・ラボ・アンスティテュ・パストゥール		
(72)発明者 マリリーヌ・ブルジーヌ		
フランス・7 5 7 2 4・パリ・セデックス・1 5・リュ・デュ・ドクトゥール・ルー・2 8・パストゥールーテラヴェクティス・ジョイント・ラボ・アンスティテュ・パストゥール		
(72)発明者 ラレー・マジレッシ		
フランス・7 5 7 2 4・パリ・セデックス・1 5・リュ・デュ・ドクトゥール・ルー・2 8・パストゥールーテラヴェクティス・ジョイント・ラボ・アンスティテュ・パストゥール		
F ターム (参考) 4B065 AA90X AA95X AB01 BA01 CA24 CA44		
4C076 AA24 AA93 BB15 BB21 BB25 CC04 CC06 CC35 FF70		
4C084 AA17 MA13 MA56 MA59 MA66 NA14 ZB09 ZB11 ZB33		
4C085 AA03 BA51 BB11 EE01 GG03 GG10		
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA13 MA56 MA59 MA66 NA14 ZB09 ZB11 ZB33		