

## Développement d'un vaccin à spectre élargi de protection contre le SRAS-CoV-2 basé sur l'utilisation du peptide extracellulaire de la protéine M comme antigène vaccinal.

### Résumé

La population québécoise est composée de personnes non-vaccinées ou vaccinées 1, 2 ou 3 fois contre le virus SRAS-CoV-2. Ainsi, on retrouve dans la population québécoise une grande variété dans les niveaux d'anticorps anti-spicule (S). Il est établi que le variant omicron est capable d'infecter les personnes vaccinées qui ont un faible niveau d'anticorps anti-S. Conséquemment, le virus évolue présentement dans un contexte immunologique qui est favorable à la sélection d'un nouveau variant dérivé d'Omicron et capable de contourner la protection offerte par les vaccins contre SRAS-CoV-2. Il est donc important de modifier rapidement les formulations vaccinales afin de prévenir les infections contre de nouveaux variants. En réponse à ce besoin, nous proposons de tirer profit d'une plateforme vaccinale en forme de nanoparticules (nanos), pour créer un vaccin qui dirigera une réponse immunitaire à spectre élargi de protection contre SRAS-CoV-2. La région extracellulaire de la protéine de la matrice (Me), conservée chez tous les variants connus à ce jour, a été choisie comme antigène vaccinal. Un vaccin se composant de nanos couplées à Me sera produit pour induire la production d'anticorps anti-Me qui neutraliseront l'infection par Omicron et protégeront les animaux contre une infection par ce virus. Le potentiel de cette approche à induire une protection à spectre élargi sera étudié.

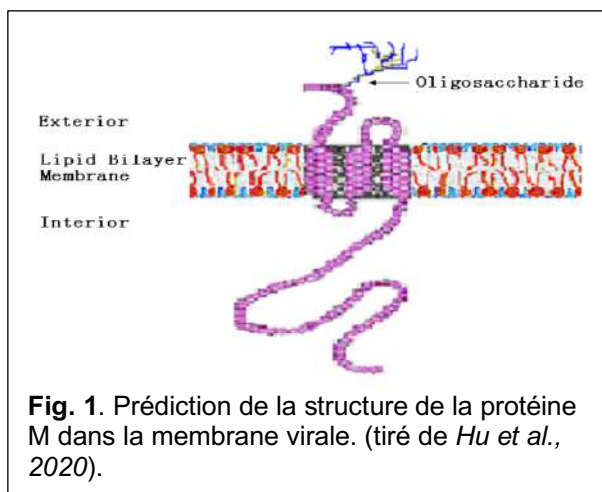
### Mise en contexte

Tous les vaccins développés à ce jour pour lutter contre le virus du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV-2) sont basés sur l'utilisation de la protéine de la spicule (S) du virus<sup>13</sup>. La protection induite par tous ces vaccins provient de la neutralisation du virus par les anticorps dirigés contre la protéine S<sup>3,22</sup>. L'émergence récente du variant Omicron, qui origine d'Afrique du Sud, a atteint le Canada et a remplacé le variant Delta dans la population<sup>11</sup>. Une neutralisation efficace d'Omicron est possible seulement si les niveaux d'anticorps sont élevés, d'où la nécessité de la troisième dose vaccinale<sup>10</sup>. Les personnes vaccinées avec des niveaux plus faibles d'anticorps peuvent être infectées par Omicron, mais ils montrent des symptômes moins sévères qui mènent rarement à des hospitalisations, sauf pour les personnes immunosupprimées qui sont plus à risque<sup>7,10,28</sup>. La population québécoise est présentement composée de personnes non-vaccinées, vaccinées 1, 2 ou 3 fois, offrant une vaste gamme de niveaux d'anticorps anti-S. Ce contexte est favorable à la sélection de nouveaux variants dérivés d'Omicron qui sont susceptibles de contourner la protection offerte par les vaccins, une situation préoccupante pour la santé publique.

#### -Le choix d'un antigène vaccinal universel

Le choix de protéines virales génétiquement plus stables que la protéine S dans la formulation des vaccins contre le SARS-CoV-2 augmentera les chances de produire des vaccins à spectre élargi de protection<sup>6,16</sup>. Les protéines virales les plus abondantes produites lors du cycle réplcatif sont les protéines structurales qui conséquemment, sont de bonnes cibles vaccinales. Les protéines structurales du SRAS-CoV-2 sont : la protéine N (nucléocapside), S ('spike' ou glycoprotéine de surface), M (matrice) et E (enveloppe) qui se retrouvent dans la particule virale mature du virus<sup>12</sup>. Le choix de la protéine M comme antigène vaccinal suscite de l'intérêt puisqu'il s'agit de la protéine la plus abondante du virus<sup>12</sup>. M est une protéine membranaire impliquée dans le bourgeonnement du virus et la structure de la particule virale mature<sup>12</sup>. L'extrémité N-terminale de la protéine M (Me) est composée de 20 acides aminés et est glycosylée en position N5<sup>12</sup>. Me est localisé à la surface du virus et de la cellule infectée

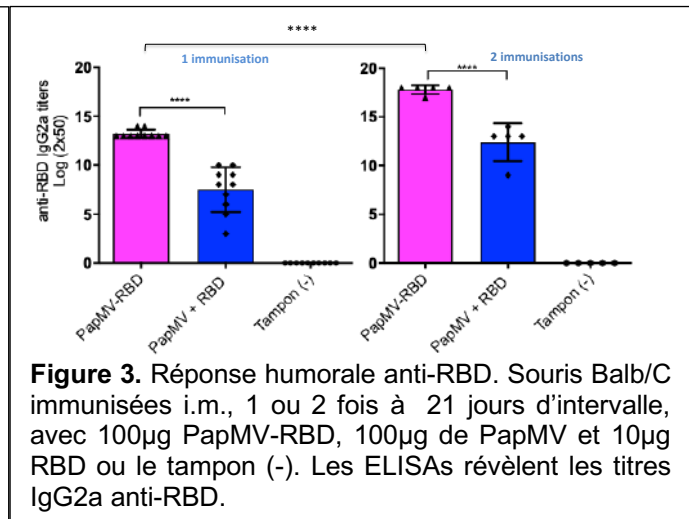
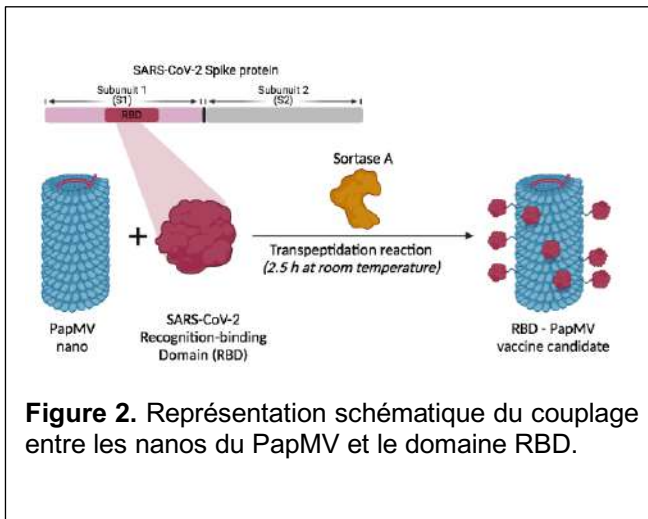
(Fig. 1)<sup>25</sup>. Me est conservé à 100% entre tous les variants connus à ce jour, incluant le SRAS-CoV responsable de l'éclosion de 2003-2004<sup>26</sup>. Des anticorps anti-Me ont été détectés chez les patients convalescents de la COVID-19, suggérant que ce peptide est immunogénique<sup>14</sup>. De plus, des anticorps dirigés contre le peptide Me chez un coronavirus murin (murine hepatitis virus; MHV), se sont avérés efficaces pour neutraliser l'infection par MHV<sup>9</sup>, démontrant le potentiel de cet antigène dans le développement d'un vaccin à spectre élargi de protection. Il est attendu que les anticorps anti-Me pourront contrer l'infection virale via : (1) la neutralisation du virus et/ou (2) par le phénomène de la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps ('antibody dependant cell mediated cytotoxicity'/ADCC), permettant de diriger une réponse cellulaire ciblant les cellules infectées par le virus qui présentent à leur surface le peptide Me.



**Fig. 1.** Prédiction de la structure de la protéine M dans la membrane virale. (tiré de *Hu et al., 2020*).

### -La plateforme vaccinale du PapMV

Une nanoparticule (nano) en forme de bâtonnet flexible<sup>23</sup> s'est avérée être une plateforme vaccinale efficace grâce à sa capacité à induire la réponse immunitaire innée via la stimulation des récepteurs toll 7 et 8 (TLR7/8)<sup>15,20,27</sup>. La nano est composée de la nucléocapside (NC) du virus de la mosaïque du papayer (PapMV) assemblée autour d'un ARN simple brin (ARNsb) de 1500 nucléotides. Les nanos du PapMV servent de véhicule pour acheminer les ARNs vers l'endosome des cellules immunitaires. Grâce à l'environnement acide de l'endosome, les nanos du PapMV se dégradent et libèrent les ARNs qui activent les TLR7/8, responsables du déclenchement de la réponse immunitaire innée<sup>15,20,27</sup>. Les nanos du PapMV sont utiles pour stabiliser les peptides fusionnés à leur



surface et pour favoriser le développement d'une réponse humorale efficace contre ces peptides. La multimérisation des peptides à la surface des nanos crée un contexte idéal pour optimiser la présentation

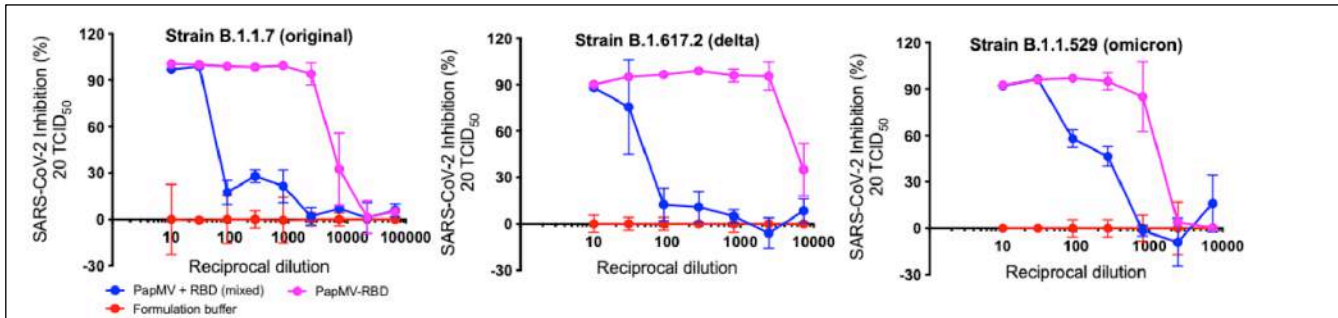
antigénique aux cellules B<sup>4,5,17,18,23</sup>. Finalement, les nanos du PapMV ont été testés en clinique lors d'une phase 1 chez l'humain et se sont avérées très sécuritaires<sup>19</sup>.

Récemment, notre équipe a développé une approche de couplage de peptides à la surface des nanos du PapMV basée sur l'utilisation d'une transpeptidase bactérienne, la sortase A (SrtA) (Fig. 2). Cette approche permet d'associer des peptides<sup>23</sup> ainsi que des protéines complètes<sup>17</sup> à la surface des nanos. Cette technologie nous permet d'éviter les limitations imposées par les fusions génétiques sur la NC du PapMV qui trop souvent, mènent à la formation de chimères incapables de s'auto-assembler en nanos, un événement essentiel à l'augmentation de l'immunogénicité. Le couplage des protéines à la plateforme vaccinale a permis d'augmenter la réponse humorale et cellulaire envers l'antigène, menant à la génération de vaccins efficaces<sup>4,23</sup>.

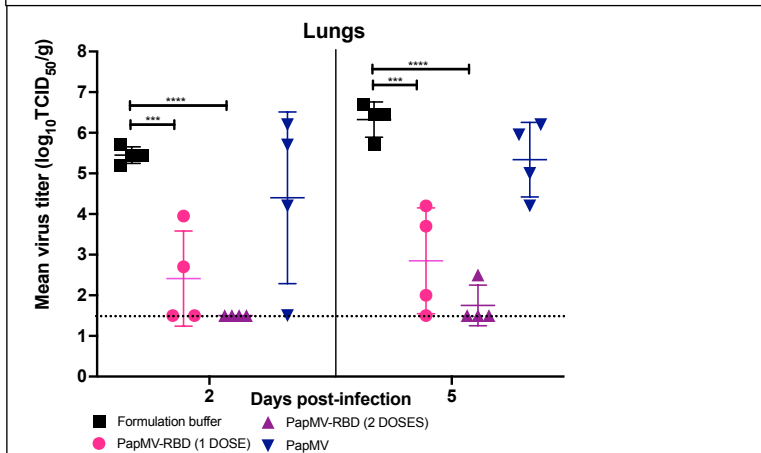
Cette approche a été utilisée pour mettre au point un vaccin contre le SRAS-CoV-2. Le vaccin résulte du couplage du domaine RBD ('receptor binding domain') de la protéine S produit dans des cellules humaines<sup>8</sup>, sur les nanos du PapMV pour générer le vaccin PapMV-RBD (Fig. 2). La réponse humorale (IgG2a) contre RBD induite par PapMV-RBD s'est avérée supérieure à la formulation non-couplée PapMV + RBD, après une ou deux immunisations (Fig. 3). De plus, la deuxième immunisation a augmenté de façon significative les titres contre RBD dans le groupe PapMV-RBD (Fig. 3). Les anticorps anti-RBD générés par la vaccination chez les souris ont été efficaces pour neutraliser l'infection par le SRAS-CoV-2 (souche originale), le variant Delta et le variant Omicron sur des cellules humaines *in vitro* (Fig. 4)<sup>21</sup>. Plus de 94% de neutralisation a été obtenue avec des sérums dilués 2430 fois dans les essais de micro-neutralisation (MNA) effectués avec la souche SRAS-CoV-2 d'origine et le variant Delta. Dans le cas d'Omicron, 90% de neutralisation a été obtenue avec le sérum dilué 810 fois, démontrant que des titres 3 x plus élevés en anticorps sont nécessaires pour neutraliser l'infection par le variant Omicron par rapport aux variants Delta ou originale. Omicron comporte plus de 34 mutations différentes dans la protéine S par rapport à la souche originale, ce qui le rend plus résistant à la neutralisation. Ces résultats sont consistants avec les observations cliniques qui montrent la capacité de Omicron à se répliquer chez les personnes vaccinées montrant un taux faible d'anticorps neutralisants<sup>7</sup>.

Le vaccin PapMV-RBD a induit la production de titres plus élevés d'anticorps que le vaccin PapMV + RBD (Fig. 3) et conséquemment, a été plus efficace à neutraliser l'infection (Fig. 4). En se basant sur les titres en anticorps anti-RBD obtenus avec les vaccins PapMV-RBD et PapMV + RBD, et les niveaux de neutralisation, il a été possible d'évaluer le plus petit titre capable de générer plus de 90% de neutralisation pour chacun des vaccins. Les calculs révèlent qu'il faut des titres en anticorps 3,93 plus élevés avec le vaccin PapMV + RBD pour neutraliser

les virus d'origine ou Delta qu'avec le vaccin PapMV-RBD, suggérant que le pouvoir neutralisant des anticorps générés avec PapMV-RBD sont supérieurs au vaccin PapMV+RBD. Le couplage à la plateforme vaccinale semble



**Figure 4.** Micro-neutralisation *in vitro*. Une dilution 1:10 suivie de dilutions 1:30 avec les sérums de souris immunisées avec tampon ('formulation buffer'), PapMV + RBD et PapMV-RBD, ont été utilisés pour neutraliser l'infection sur des cellules VeroE6 avec la souche originale, Delta et Omicron du SARS-CoV-2.



**Figure 5.** Titres viraux (SARS-CoV-2) dans les poumons de souris K18 vaccinées avec tampon ('formulation buffer'), une ou deux doses de PapMV-RBD ou PapMV seul et infectées avec la souche originale. \*\*\*\*<0,0001, \*\*\*<0,001

donc avoir un impact positif sur la qualité et le pouvoir neutralisant des anticorps qui sont produits par la vaccination en plus d'augmenter les niveaux d'anticorps.

Finalement, l'infection de souris transgéniques exprimant le récepteur ACE2 humain (K18), vaccinées avec le PapMV-RBD, ont montré une excellente protection contre l'infection au SRAS-CoV-2. Les titres viraux dans les poumons de souris vaccinées à deux reprises sont nuls au jour 2 et très faibles au jour 5 après infection. Les souris ACE2 immunisées une seule fois ont montré une diminution significative des titres viraux, quoique plus élevés que les souris vaccinées 2 fois. Comme anticipé, les souris immunisées avec le PapMV seul ou le tampon ont été infectées et montrent des niveaux très élevés de virus dans les poumons (Fig. 5)<sup>21</sup>.

### Objectif du projet

Démontrer le potentiel du vaccin PapMV-Me en protection contre le SRAS-CoV-2.

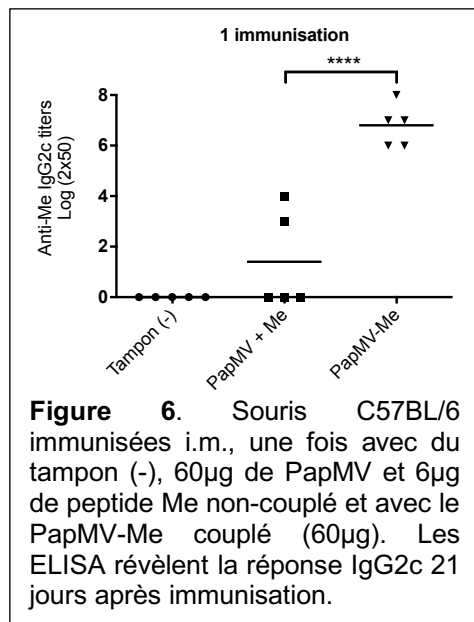
#### Sous-objectifs

- Optimisation du couplage du peptide Me sur les nanos du PapMV
- Essais d'immunogénicité
- Essais de micro-neutralisation
- Valider la capacité des anticorps anti-Me à reconnaître la surface de cellules infectées au SRAS-CoV-2
- Valider que les anticorps anti-Me de patients convalescents reconnaissent la structure de Me présentée à la surface des nanoparticules.
- Essais de protection dans le modèle animal K18-ACE2

### Méthodologie

La production de nanoparticules, le couplage de peptides à leur surface, les techniques pour analyser les réponses immunitaires, les micro-neutralisations, les infections au SRAS-CoV-2 chez les animaux vaccinés ainsi que les accès au laboratoire de niveau NC3 nécessaires à l'exécution de ce projet sont déjà des acquis et ont été développés lors du développement du vaccin PapMV-RBD.

1- *Optimisation du couplage du peptide Me sur les nanos du PapMV*: Un lot de PapMV nanos, le peptide Me ainsi qu'un lot de sortase A sont déjà disponibles pour faire ces expériences. Le couplage sera effectué comme déjà décrit<sup>17,18,21,23</sup>. Des résultats préliminaires démontre qu'un niveau de couplage de 20% du peptide Me sur les nanos du PapMV est bien toléré et mène à la production de PapMV-Me stable et immunogénique après seulement



une immunisation (Fig. 6). Ce résultat préliminaire est encourageant. Il nous reste à optimiser les niveaux de couplage et tenter d'obtenir des PapMV-Me possédant un niveau plus élevé pour en augmenter l'immunogénicité<sup>18</sup>. En bref, des essais de couplage ou les ratios entre les quantités de peptides Me, les quantités de SrtA, la température ainsi que la période de réaction seront effectués pour augmenter les niveaux de couplage de Me sur les nanos du PapMV. Les conditions de couplage permettant d'atteindre les niveaux les plus élevés sans affecter l'intégrité et la stabilité des nanoparticules seront sélectionnées pour les expériences suivantes. Une fois les conditions gagnantes révélées, un lot de 50mg de PapMV-Me sera produit pour effectuer les expériences subséquentes. Cette étape ne devrait être facilement réalisable considérant les résultats préliminaires déjà obtenus.

**2- Immunogénicité des PapMV-Me :** Afin de générer une dose-réponse, 10 groupes de souris C57BL/6, 5 par groupe, seront immunisées avec 10, 30 ou 90µg du PapMV-Me sélectionné à l'étape 1. Deux immunisations à 21 jours d'intervalle, par la voie intramusculaire (i.m.) seront effectuées. Les groupes seront vaccinés avec des formulations contenant le PapMV-Me optimisé, le PapMV + Me non-couplé, le peptide Me seul (même quantité que celle couplée sur le PapMV-Me),

le PapMV ou le tampon. Les prises sanguines seront effectuées au jours -1 et 21. Au jour 42, le sang sera récolté par ponction cardiaque. Les sérums issus des extraits sanguins serviront aux essais de MNA. Des ELISA dirigés envers le peptide Me seront effectués pour évaluer les titres en anticorps (IgG totaux et IgG2c). L'affinité des anticorps générés par les immunisations sera évaluée par résonance plasmonique de surface (SPR) afin de quantifier l'augmentation de l'affinité des anticorps générés par la multimérisation à la surface des nanoparticules dans le vaccin PapMV-Me.

**3- Essais de micro-neutralisation (MNA):** Brièvement, 20 TCID<sub>50</sub> du SRAS-CoV-2 Omicron sera pré-incubé pendant une heure avec un sérum dilué inactivé par la chaleur dans un rapport 1:10, suivi d'une série de dilutions (rapport 1:3). Le mélange virus/sérum sera ensuite utilisé pour infecter des cellules VeroE6 pendant une heure à 37°C sous 5% CO<sub>2</sub>. Après les lavages, les cellules seront incubées pour 72 heures pour laisser le virus se répliquer dans les cellules infectées. Le taux d'infection des cellules sera révélé en utilisant un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la protéine N et un anticorps anti-lapin conjugué à la peroxydase dans un essai de type ELISA modifié<sup>2</sup>. Ces essais sont effectués dans la laboratoire NC3.

**4- Valider la capacité des anticorps anti-Me à reconnaître la surface de cellules infectées au SRAS-CoV-2 :** En bref, des cellules VeroE6 infectées avec le SARS-CoV-2 (Omicron) seront fixées sur une lamelle et utilisées en 'immunodétection' utilisant le sérum des souris vaccinées avec le PapMV-Me. Les lamelles et les infections sont effectuées dans le laboratoires NC3. Après fixation et inactivation du virus avec des détergents, les lamelles sont acheminées au laboratoire de microscopie localisé dans un environnement NC2. Le complexe anticorps-Me sera révélé avec un anticorps anti-souris couplé à un fluorophore. En microscopie confocale, la localisation de Me à la surface de la cellule infectée sera confirmée. Ce résultat permettra de valider les observations d'autres laboratoires<sup>12</sup> qui ont montré la présence de Me en surface des cellules infectées.

**5- Valider que les anticorps anti-Me de patients convalescents reconnaissent la structure de Me présentée à la surface des nanoparticules :** Les sérums de 5 patients qui n'ont jamais été infectés par le virus de la COVID-19 et 5 patients convalescents de la COVID-19 seront utilisés pour faire des ELISA dirigés contre le vaccin PapMV-Me, le peptide Me ou les nanos du PapMV. Si la structure de Me présentée sur le vaccin PapMV-Me est similaire à celle du Me produit par le virus lors de l'infection, il est attendu que les sérums de patients convalescents réagissent avec le PapMV-Me, validant ainsi que la structure du Me présentée à la surface du PapMV-Me est adéquate.

**6- Essais de protection dans le modèle animal K18-ACE2 :** Des souris K18 (transgénique exprimant le récepteur ACE2), 5/groupe, seront immunisées 2 fois à 21 jours d'intervalle, i.m., avec le vaccin PapMV-Me, PapMV, ou le tampon. Au jour 42, les souris vaccinées seront infectées avec le SRAS-CoV-2 (variant Omicron). Au jour 5 après infection, les animaux seront sacrifiés et les titres viraux seront évalués dans des broyats de poumons infectés pour révéler l'efficacité du vaccin. Ces essais sont effectués dans le laboratoire NC3.

## Résultats escomptés et plan de transfert de connaissances

Basé sur nos résultats préliminaires, il est attendu les nanos du PapMV couplées à de hautes densités (>50%) de peptides Me, seront plus immunogéniques que les nanos couplées à 20% présentée à la Fig. 4. Selon nos prédictions, les titres d'anticorps anti-Me augmenteront proportionnellement avec la densité de couplage<sup>18</sup>. Les sérums des animaux ayant été vaccinés avec PapMV-Me permettront de révéler le potentiel neutralisant de ces anticorps contre le variant Omicron. Considérant que M est abondant dans la particule virale, les anticorps anti-Me devraient neutraliser efficacement l'infection virale par Omicron. Si c'est le cas, l'efficacité du vaccin testé en protection contre les infections par Omicron confirmeront ce résultat. Si les essais de neutralisation sont négatifs, le potentiel de protection du vaccin sera tout de même testé car il est probable que l'ADCC, via la production d'anticorps anti-Me, permette de protéger les animaux vaccinés. Des essais *in vitro* d'ADCC seront effectués si c'est le cas, mais ces essais ne seront pas couverts par le financement du RQCP. La validation de la présence du peptide Me à la surface des cellules infectées par le virus Omicron supportera le concept que l'ADCC est un mécanisme immunologique de protection possible pour contrer l'infection, comme précédemment démontré avec un vaccin PapMV-M2e capable d'induire une protection contre une infection par le virus influenza A<sup>5,23</sup>. La détection du peptide Me à la surface du PapMV-Me avec des sérums de patients convalescents permettra de valider que la structure du Me utilisée à la surface du PapMV-Me est similaire à celle du virus chez les personnes infectées. Ces résultats seront publiés et partagés sur le réseau RQCP et feront l'objet d'une présentation publique aux autres membres du réseau.

Ce projet est complémentaire à d'autres projets de développement de vaccins dans notre laboratoire contre le SRAS-CoV-2 qui sont en cours et financés par les IRSC, couvrant la période de mars 2020-mars 2022. Ces vaccins sont basés sur l'utilisation du domaine RBD et la protéine N comme antigène vaccinal. La production du vaccin PapMV-Me n'est pas financé. Cependant, le développement de ce vaccin nous permettra de produire un vaccin à spectre élargi de protection contre le SRAS-CoV-2 en mélangeant PapMV-RBD (Fig.2-5) avec PapMV-Me dans une formulation contenant les deux types de nanoparticules. Ces résultats supporteront le renouvellement de notre prochaine demande de subvention dédiée au développement d'un vaccin à spectre élargi contre le SRAS-CoV-2. La validation de la cible Me en protection contre les coronavirus est importante car cette approche pourrait être utile pour le développement rapide d'un vaccin contre un nouveau coronavirus non apparenté au SRAS-CoV-2. Finalement, si le vaccin PapMV-Me est efficace, il pourrait aussi être utilisé pour compléter les vaccins courants sur le marché dans le but d'en augmenter le spectre de protection.

---

### Equipe et répartition des tâches

Les personnes de mon équipe de recherche qui seront impliquées dans ce projet seront Mme Marilène Bolduc, une professionnelle de recherche avec plus de 20 ans d'expérience dans mon laboratoire. Elle sera entre autres impliquée dans la rédaction de protocoles BPL, du contrôle de qualité des expériences effectuées dans le laboratoire et des essais ELISA. La technicienne Caroline Garneau sera responsable des immunisations chez les souris et des infections avec le virus SARS-CoV-2 Omicron dans le laboratoire NC3. Une étudiante au PhD, Santa-Mariela Olivera-Ugarte sera impliquée dans divers aspects de ce programme de recherche comme le contrôle de qualité des nanoparticules, la microscopie confocale et l'immunolocalisation de Me sur les cellules infectées et finalement, la validation de la structure du peptide Me avec les sérums de patients ayant subi une infection au SARS-CoV-2. Ce sont les mêmes membres de mon équipe qui ont généré les résultats présentés dans les figures 2-6.

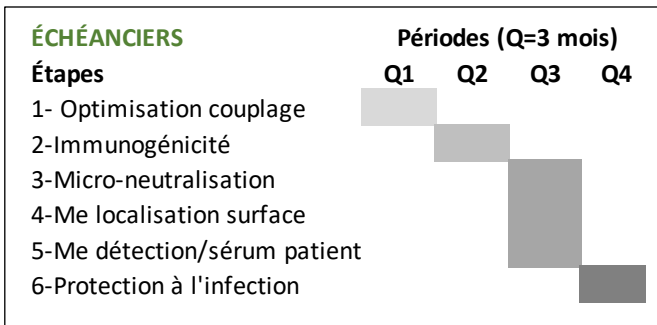
---

### Conclusion

La fabrication du vaccin candidat PapMV-Me est basé sur une production dans des bactéries, qui est l'approche la plus économique et la plus efficace de production de protéines pharmaceutiques. De plus, les nanos du PapMV ont montré une stabilité à 4°C sur plus de 7 années sans perte d'activité ou d'intégrité. Le PapMV-Me produit pour les expériences préliminaires, a montré une stabilité de plus d'un mois à 4°C et il est attendu que ce bénéfice soit une caractéristique de ce nouveau vaccin. C'est un avantage important pour la distribution du vaccin et son entreposage. Si montré efficace en neutralisation et en protection, le PapMV-Me a le potentiel de compléter les vaccins courants contre le SARS-CoV-2 pour en augmenter le spectre de protection contre les variants émergents.

La validation de l'utilisation du peptide Me comme antigène vaccinal est très importante car une approche similaire pourrait être utilisée pour le développement de vaccins contre d'autres coronavirus, comme un MERS-CoV-like par exemple, si jamais cette situation se présente. Le peptide Me du MERS-CoV diffère de celui du SARS-CoV-2. Cependant, un peptide de 20 acides aminés peut être rapidement fabriqué en période de pandémie et couplé à la plateforme du PapMV dans le but de produire rapidement un vaccin à spectre élargi. Sachant que les nanos du PapMV peuvent être entreposés pendant plusieurs années sans perte d'intégrité, le système de production de vaccins proposé dans cette demande a le potentiel de répondre à un besoin important pour protéger les Québécois contre d'autres coronavirus qui pourraient émerger dans le futur.

**Echéancier**



En bref, la première étape (Q1) du projet sera d'optimiser le couplage du peptide Me à la surface des nanoparticules, de produire un lot de 50mg, de valider la stabilité des nanoparticules du PapMV-Me, compléter leurs caractérisations biochimiques, biophysiques et le contrôle de qualité. La deuxième étape (Q2) consiste à valider l'immunogénicité du vaccin PapMV-Me et générer les sérums qui seront utilisés en Q3 pour effectuer les essais de micro-neutralisation, de localisation de Me en surface des cellules infectées et finalement, en Q4, les essais de protection contre une infection avec Omicron.

**Budget**

En bref, Mme Bolduc, professionnelle de recherche de mon laboratoire ainsi que Mme Garneau, technicienne, travailleront respectivement l'équivalent de 1 mois à temps plein, répartis sur toute l'année, pour effectuer les opérations présentées dans cette demande de financement. Mme Olivera-Ugarte, étudiante au PhD qui a déjà obtenu un support financier du FRQS, participera activement à ce programme de recherche et sera impliquée dans toutes les opérations du projet. Des souris C57BL/6 (60 x 35\$) seront utilisées pour faire les essais d'immunogénicité et la dose-réponse. Des souris K18 (15 x 65\$), transgéniques et exprimant le récepteur humain ACE2 seront utilisées pour les essais de protection. Les frais d'hébergement (1,67\$/jour/cage de 5 souris) à l'animalerie ont été calculés pour une période de 50 jours pour 75 souris. L'achat d'un IgG anti-souris couplé à la peroxydase sera nécessaire pour les essais d'ELISA. Les frais d'entrée dans le laboratoire NC3 (300\$/jour) pour 9 jours sont nécessaires pour les essais de micro-neutralisation, la production de lames avec des cellules infectées et fixées ainsi que pour les essais de protection. Les coûts du projet sont minimaux, considérant que nous avons déjà plusieurs activités de recherche et développement de vaccins contre la COVID-19 dans le laboratoire et que plusieurs réactifs et protéines recombinantes sont déjà disponibles. Les financements obtenus à ce jour sur le développement de vaccins contre la COVID-19 n'inclut pas le vaccin PapMV-Me décrit dans ce programme de recherche. Notre intention est de profiter de cette opportunité pour générer des résultats préliminaires sur le potentiel de l'utilisation du peptide Me en vaccination qui nous permettront de renforcer notre position et appliquer pour un financement plus important aux IRSC à une date ultérieure.

| <b>BUDGET</b>                 |                     |
|-------------------------------|---------------------|
| <i>Salaires</i>               |                     |
| -Marilène Bolduc              | 6 300,00 \$         |
| -Caroline Garneau             | 3 920,00 \$         |
| -Santa-Mariela Olivera-Ugarte | - \$                |
| <i>Animaux</i>                |                     |
| -Souris C57BL/6               | 2 100,00 \$         |
| -Souris K18                   | 975,00 \$           |
| -Accommodation                | 1 260,00 \$         |
| <i>Consommables</i>           |                     |
| -ELISA (IgG anti-souris)      | 600,00 \$           |
| -Frais NC3                    | 2 700,00 \$         |
| -autres                       | 145,00 \$           |
| <b>TOTAL</b>                  | <b>18 000,00 \$</b> |

**BIBLIOGRAPHIE (en gras, articles de notre laboratoire)**

- 1- Abdelzaher, H. M., Gabr, A. S., Saleh, B. M., Abdel Gawad, R. M., Nour, A. A., & Abdelanser, A. (2021). RNA Vaccines against Infectious Diseases: Vital Progress with Room for Improvement. *Vaccines*, 9(11), 1211. <https://doi.org/10.3390/vaccines9111211>
- 2- Amanat F, White KM, Miorin L, Strohmeier S, McMahon M, Meade P, Liu WC, Albrecht RA, Simon V, Martinez-Sobrido L, Moran T, García-Sastre A, Krammer F. An In Vitro Microneutralization Assay for SARS-CoV-2 Serology and Drug Screening. *Curr Protoc Microbiol*. 2020 Sep;58(1):e108. doi: 10.1002/cpmc.108. PMID: 32585083; PMCID: PMC7361222.
- 3- Arashkia, A., Jalilvand, S., Mohajel, N., Afchangi, A., Azadmanesh, K., Salehi-Vaziri, M., Fazlalipour, M., Pouriayevali, M. H., Jalali, T., Mousavi Nasab, S. D., Roohvand, F., Shoja, Z., & SARS CoV-2 Rapid Response Team of Pasteur Institute of Iran (PII) (2021). Severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 spike (S) protein based vaccine candidates: State of the art and future prospects. *Reviews in medical virology*, 31(3), e2183. <https://doi.org/10.1002/rmv.2183>
- 4- Bolduc M, Baz M, Laliberté-Gagné MÈ, Carignan D, Garneau C, Russel A, Boivin G, Savard P and Leclerc D. The quest for a nanoparticle-based vaccine inducing broad protection to influenza viruses. *Nanomedicine*. 2018 Nov;14(8):2563-2574. doi: 10.1016/j.nano.2018.08.010. Epub 2018 Sep 5. PMID: 30193813.**
- 5- Carignan D, Thérien A, Rioux G, Paquet G, Gagné ML, Bolduc M, Savard P and Leclerc D. Engineering of the PapMV vaccine platform with a shortened M2e peptide leads to an effective one dose influenza vaccine. *Vaccine*. 2015 Dec 16;33(51):7245-7253. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.10.123. Epub 2015 Nov 6. PMID: 26549362.**
- 6- Cuspoca, A. F., Díaz, L. L., Acosta, A. F., Peñaloza, M. K., Méndez, Y. R., Clavijo, D. C., & Yosa Reyes, J. (2021). An Immunoinformatics Approach for SARS-CoV-2 in Latam Populations and Multi-Epitope Vaccine Candidate Directed towards the World's Population. *Vaccines*, 9(6), 581. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060581>
- 7- Dejnirattisai, W., Huo, J., Zhou, D., Zahradník, J., Supasa, P., Liu, C., Duyvesteyn, H., Ginn, H. M., Mentzer, A. J., Tuekprakhon, A., Nutalai, R., Wang, B., Dijokaite, A., Khan, S., Avinoam, O., Bahar, M., Skelly, D., Adele, S., Johnson, S. A., Amini, A., ... Sreaton, G. R. (2021). Omicron-B.1.1.529 leads to widespread escape from neutralizing antibody responses. *bioRxiv : the preprint server for biology*, 2021.12.03.471045. <https://doi.org/10.1101/2021.12.03.471045>
- 8-Farnós, O., Venereo-Sánchez, A., Xu, X., Chan, C., Dash, S., Chaabane, H., Sauvageau, J., Brahimi, F., Saragovi, U., Leclerc, D., & Kamen, A. A. (2020). Rapid High-Yield Production of Functional SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain by Viral and Non-Viral Transient Expression for Pre-Clinical Evaluation. *Vaccines*, 8(4), 654. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040654>**
- 9-8-Fleming JO, Shubin RA, Sussman MA, Casteel N, Stohlman SA. Monoclonal antibodies to the matrix (E1) glycoprotein of mouse hepatitis virus protect mice from encephalitis. *Virology*. 1989 Jan;168(1):162-7. doi: 10.1016/0042-6822(89)90415-7. PMID: 2535900; PMCID: PMC7131138.
- 10-9-Garcia-Beltran, W. F., St Denis, K. J., Hoelzemer, A., Lam, E. C., Nitido, A. D., Sheehan, M. L., Berrios, C., Ofoman, O., Chang, C. C., Hauser, B. M., Feldman, J., Roederer, A. L., Gregory, D. J., Poznansky, M. C., Schmidt, A. G., Iafate, A. J., Naranbhai, V., & Balazs, A. B. (2022). mRNA-based COVID-19 vaccine boosters induce neutralizing immunity against SARS-CoV-2 Omicron variant. *Cell*, S0092-8674(21)01496-3. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.033>
- 11-10-Gingras, AM. COVAR-Net conference-report/ Status on the epidemiology of the Omicron variant in Canada. Jan 14-2022.
- 12-11-Gorkhali, R., Koirala, P., Rijal, S., Mainali, A., Baral, A., & Bhattarai, H. K. (2021). Structure and Function of Major SARS-CoV-2 and SARS-CoV Proteins. *Bioinformatics and biology insights*, 15, 11779322211025876. <https://doi.org/10.1177/11779322211025876>

- 13-12-He, Q., Mao, Q., Zhang, J., Bian, L., Gao, F., Wang, J., Xu, M., & Liang, Z. (2021). COVID-19 Vaccines: Current Understanding on Immunogenicity, Safety, and Further Considerations. *Frontiers in immunology*, 12, 669339. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.669339>
- 14-Jörrißen P, Schütz P, Weiland M, Vollenberg R, Schrepf IM, Ochs K, Frömmel C, Tepasse PR, Schmidt H, Zibert A. Antibody Response to SARS-CoV-2 Membrane Protein in Patients of the Acute and Convalescent Phase of COVID-19. *Front Immunol*. 2021 Aug 4;12:679841. doi: 10.3389/fimmu.2021.679841. PMID: 34421894; PMCID: PMC8371319.
- 15-Lebel MÈ, Daudelin JF, Chartrand K, Tarrab E, Kalinke U, Savard P, Labrecque N, Leclerc D, Lamarre A. Nanoparticle adjuvant sensing by TLR7 enhances CD8+ T cell-mediated protection from *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol*. 2014 Feb 1;192(3):1071-8. doi: 10.4049/jimmunol.1302030. PMID: 24376264.**
- 16-Kar, T., Narsaria, U., Basak, S., Deb, D., Castiglione, F., Mueller, D. M., & Srivastava, A. P. (2020). A candidate multi-epitope vaccine against SARS-CoV-2. *Scientific reports*, 10(1), 10895. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67749-1>
- 17-Laliberté-Gagné, M. È., Bolduc, M., Thérien, A., Garneau, C., Casault, P., Savard, P., Estaquier, J., & Leclerc, D. (2019). Increased Immunogenicity of Full-Length Protein Antigens through Sortase-Mediated Coupling on the PapMV Vaccine Platform. *Vaccines*, 7(2), 49. <https://doi.org/10.3390/vaccines7020049>**
- 18-Laliberté-Gagné, M. E., Bolduc, M., Garneau, C., Olivera-Ugarte, S. M., Savard, P., & Leclerc, D. (2021). Modulation of Antigen Display on PapMV Nanoparticles Influences Its Immunogenicity. *Vaccines*, 9(1), 33. <https://doi.org/10.3390/vaccines9010033>**
- 19-Langley, J., Pastural, E., Halperin, S., McNeil, S., ElSherif, M., MacKinnon-Cameron, D., Ye, L., Grange, C., Thibodeau, V., Cailhier, J. F., Lapointe, R., McElhaney, J., Martin, L., Bolduc, M., Laliberté-Gagné, M. E., Leclerc, D., & Savard, P. (2020). A Randomized Controlled Study to Evaluate the Safety and Reactogenicity of a Novel rVLP-Based Plant Virus Nanoparticle Adjuvant Combined with Seasonal Trivalent Influenza Vaccine Following Single Immunization in Healthy Adults 18-50 Years of Age. *Vaccines*, 8(3), 393. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030393>**
- 20-Mathieu C, Rioux G, Dumas MC, Leclerc D. Induction of innate immunity in lungs with virus-like nanoparticles leads to protection against influenza and *Streptococcus pneumoniae* challenge. *Nanomedicine*. 2013 Oct;9(7):839-48. doi: 10.1016/j.nano.2013.02.009. Epub 2013 Mar 8. PMID: 23499666.
- 21-Olivera-Ugarte, SM, Bolduc, M., Laliberté-Gagné, ME, Garneau, C, Fillion, M, Blanchette, LJ, Farnos, O, Kamen, AA and Leclerc, D. (2022). A nanoparticle based vaccine against SARS-CoV-2 based on the use of the RBD as the antigen. In preparation.**
- 22-Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W., & Weissman, D. (2018). mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nature reviews. Drug discovery*, 17(4), 261–279. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>
- 23-Thérien, A., Bédard, M., Carignan, D., Rioux, G., Gauthier-Landry, L., Laliberté-Gagné, M. È., Bolduc, M., Savard, P., & Leclerc, D. (2017). A versatile papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform based on sortase-mediated antigen coupling. *Journal of nanobiotechnology*, 15(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0289-y>**
- 24-Thye, A. Y., Law, J. W., Pusparajah, P., Letchumanan, V., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2021). Emerging SARS-CoV-2 Variants of Concern (VOCs): An Impending Global Crisis. *Biomedicines*, 9(10), 1303. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9101303>
- 25-Voss, D., Pfefferle, S., Drosten, C., Stevermann, L., Traggiai, E., Lanzavecchia, A., & Becker, S. (2009). Studies on membrane topology, N-glycosylation and functionality of SARS-CoV membrane protein. *Virology journal*, 6, 79. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-79>



26-WHO Update: Outbreak of severe acute respiratory syndrome – worldwide, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2003;**52**:241–246

**27-Yang, S., Wang, T., Bohon, J., Gagné, M. È., Bolduc, M., Leclerc, D., & Li, H. (2012). Crystal structure of the coat protein of the flexible filamentous papaya mosaic virus. *Journal of molecular biology*, 422(2), 263–273. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.05.032>**

28-27-Zeng, C., Evans, J. P., Qu, P., Faraone, J., Zheng, Y. M., Carlin, C., Bednash, J. S., Zhou, T., Lozanski, G., Mallampalli, R., Saif, L. J., Oltz, E. M., Mohler, P., Xu, K., Gumina, R. J., & Liu, S. L. (2021). Neutralization and Stability of SARS-CoV-2 Omicron Variant. *bioRxiv : the preprint server for biology*, 2021.12.16.472934. <https://doi.org/10.1101/2021.12.16.472934>