(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-502630
(P2025-502630A)
(43)公表日　令和7年1月28日(2025.1.28)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ　39/00　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	39/00	Ｇ	４Ｃ０７６
Ａ６１Ｐ　37/04　(2006.01)		Ａ６１Ｐ	37/04	ＺＮＡ	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｐ　43/00　(2006.01)		Ａ６１Ｐ	43/00	１２１	４Ｃ０８５
Ａ６１Ｋ　48/00　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	48/00		
Ａ６１Ｋ　39/145 (2006.01)		Ａ６１Ｐ	43/00	１０７	

審査請求　有　予備審査請求　未請求　（全231頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-534314(P2024-534314)
(86)(22)出願日　令和4年12月8日(2022.12.8)
(85)翻訳文提出日　令和6年8月6日(2024.8.6)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/081199
(87)国際公開番号　WO2023/108083
(87)国際公開日　令和5年6月15日(2023.6.15)
(31)優先権主張番号　63/287,410
(32)優先日　令和3年12月8日(2021.12.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/290,042
(32)優先日　令和3年12月15日(2021.12.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/292,200
最終頁に続く

(71)出願人　504026203
イエール・ユニバーシテイ
アメリカ合衆国コネチカツト州０６５１０・ニユーヘブン・ツーホイツトニーアベニユー・６階
(74)代理人　110001173
弁理士法人川口國際特許事務所
(72)発明者　イワサキ，アキコ
アメリカ合衆国、コネチカット・０６５１１、ニュー・ヘブン、テンプル・ストリート・４３３、イェール・ベンチャーズ、イェール・ユニバーシティ気付
(72)発明者　マオ，ティアンヤン
アメリカ合衆国、コネチカット・０６５１１、ニュー・ヘブン、テンプル・スト
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ナノ粒子免疫原性組成物及びワクチン接種法

(57)【要約】
対象において抗原に対する防御的粘膜免疫を誘導するための組成物及び方法は、粒子（例えば、ＰＡＣＥから形成された固体ナノ粒子）の形態のポリ（アミン－コ－エステル）ポリマー又はＰＡＣＥコポリマー及び／又はブレンドなどの担体内に結合又は封入された抗原又は抗原をコードするポリヌクレオチドを含むワクチン組成物の有効量を、粘膜組織に投与するステップを含む。通常、対象は、例えば、同一対象に全身性又は粘膜投与経路を介してプライミング抗原を投与することによって抗原に事前に曝露されている。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドベースのワクチンは、ウイルス抗原、例えば、コロナウイルススパイクタンパク質配列又はその一部分をコードするメッセンジャーＲＮＡである。好ましい実施形態では、ワクチン組成物は、鼻腔内に投与される。

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
対象において抗原に対する粘膜免疫を増強する方法であって、
対象における粘膜組織に、担体中に（ａ）抗原又は（ｂ）抗原をコードするポリヌクレオチドを含むワクチン組成物の有効量を投与すること
を含み、
対象は、抗原に事前に曝露されている、方法。
【請求項２】
対象における抗原の反復提示に対する粘膜免疫を増強する方法であって、
（ｉ）全身性又は粘膜投与経路を介してプライミング抗原の有効量を投与するステップ、並びに
（ｉｉ）その後、担体中に（ａ）抗原又は（ｂ）抗原をコードするポリヌクレオチドを含むブースティング組成物の有効量を粘膜経路によって対象に投与するステップ
を含む、方法。
【請求項３】
担体が、ポリ（アミン－コ－エステル）（ＰＡＣＥ）ポリマー、ポリ（アミン－コ－エステル）ポリマー若しくはポリ（アミン－コ－アミド）ポリマーを含む、又はリポソーム、リポソーム様ナノ粒子、固体脂質ナノ粒子、ナノ構造脂質担体、吸収脂質－ポリマーハイブリッドナノ粒子、封入脂質－ポリマーハイブリッドナノ粒子、カチオンナノエマルジョン、エキソソーム、天然リポタンパク質及び合成リポタンパク質からなる群から選択される担体材料である、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
抗原に対する事前の曝露が、全身性又は粘膜投与経路を介してプライミング抗原の有効量を投与することを含み、
プライミング抗原が、ポリヌクレオチドによってコードされる抗原と１つ以上の抗原性部位を共有する、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
全身性投与経路が、筋肉内又は皮内投与であり、及び／又は粘膜投与経路が、肺、鼻腔、口腔、消化器系、膣、及び直腸粘膜からなる群から選択される１つ以上の粘膜組織を介するものであり、任意選択的に、粘膜投与経路が、鼻腔内又は肺投与であり、任意選択的に、鼻腔内投与が、呼吸器飛沫及びエアロゾルを介するものである、請求項２～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
粘膜組織へ投与するステップの前の細胞数と比較して増強された数の、ＣＤ８$^{+}$組織常在記憶（T_{RM}）細胞、ＣＤ４$^{+}$組織常在記憶（T_{RM}）細胞及び記憶Ｂ細胞からなる群から選択される細胞を、対象における粘膜組織で抗原に対して誘導する、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
粘膜組織へ投与するステップの前のＩｇＡ力価と比較して、粘膜ＩｇＡのより高い力価を誘導する、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
プライミング抗原が、脂質ナノ粒子内に結合又は封入された抗原をコードするメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を含む、請求項２～７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
粘膜組織が、肺、鼻腔、口腔、消化器系、膣、及び直腸粘膜からなる群から選択される１つ以上である、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
粘膜組織が、肺及び鼻腔粘膜である、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
抗原が、オルソミクソウイルス、パラミクソウイルス、コロナウイルス、アデノウイル

ス、ヘルペスウイルス及びヒトボカウイルスからなる群から選択される１つ以上の呼吸器系ウイルスに由来する又はそれに対する防御的免疫応答を生じさせる、請求項１～９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１２】

抗原が、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス及び呼吸器合胞体ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、重症急性呼吸器症候群（ＳＡＲＳ）ウイルス、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、エプスタイン－バーウイルス（ＥＢＶ）及び水痘帯状疱疹ウイルス（ＶＺＶ）からなる群から選択される１つ以上の呼吸器系ウイルスに由来する又はそれに対する防御的免疫応答を生じさせる、請求項１～１１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３】

抗原が、インフルエンザウイルスに由来する又はそれに対する防御的免疫応答を生じさせる、請求項１～１２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４】

抗原が、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスに由来し又はそれに対する防御的免疫応答を生じさせ、任意選択的に、抗原が、コロナウイルススパイクタンパク質に由来し、コロナウイルスが、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のバリアントである、請求項１～１２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１５】

抗原をコードするポリヌクレオチドが、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）又はリボ核酸（ＲＮＡ）分子である、請求項１～１４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１６】

抗原をコードするポリヌクレオチドが、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）である、請求項１～１５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１７】

ｍＲＮＡが、スパイクタンパク質配列をコードするオープンリーディングフレームを含み、スパイクタンパク質配列が、コロナウイルススパイクタンパク質のすべて又は一部分を含み、コロナウイルスが、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のバリアントである、請求項１～１６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１８】

バリアントが、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｂ．１．１．７（アルファバリアント）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｂ．１．３５１（ベータバリアント）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｐ．１（ガンマバリアント）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｂ．１．６１７から選択される、請求項１７に記載の方法。

【請求項１９】

バリアントが、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｂ．１．６１７．１（カッパバリアント）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｂ．１．６１７．２（デルタバリアント）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｂ．１．６１７．３及びＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｂ．１．１．５２９（オミクロンバリアント）から選択される、請求項１７に記載の方法。

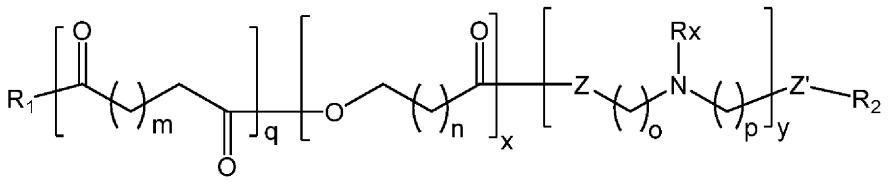
【請求項２０】

ワクチン組成物が、粘膜組織で抗原に対するＣＤ８$^{+}$組織常在記憶（T_{RM}）細胞、ＣＤ４$^{+}$組織常在記憶（T_{RM}）細胞及び記憶Ｂ細胞からなる群から選択される１つ以上の細胞を誘導するのに有効な量で投与される、請求項１～１９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２１】

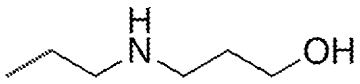
ワクチン組成物が、同一投与経路を介してポリ（アミン－コ－エステル）（ＰＡＣＥ）ポリマーの不在下で送達されたワクチン組成物と比較して増大した数の、ＣＤ８$^{+}$組織常在記憶（T_{RM}）細胞、ＣＤ４$^{+}$組織常在記憶（T_{RM}）細胞及び記憶Ｂ細胞からなる群から選択される細胞を、粘膜組織で抗原に対して誘導する、請求項１～２０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２２】
ワクチン組成物が、抗原に対する粘膜免疫グロブリンＡ（ＩｇＡ）を誘導するのに有効な量で投与される、請求項１～２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３】
ワクチン組成物が、同一投与経路を介してポリ（アミン－コ－エステル）（ＰＡＣＥ）ポリマーの不在下で送達されたワクチン組成物と比較して増大した量で、抗原に対する粘膜ＩｇＡを誘導する、請求項１～２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４】
ＩｇＡが、気管支肺胞洗浄液、腸洗浄液、腸管洗浄液及び膣洗浄液から選択される粘膜洗浄液における分泌ＩｇＡである、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
ＰＡＣＥポリマー及び抗原をコードするポリヌクレオチドが、微粒子及びナノ粒子からなる群から選択される粒子の形態にあり、任意選択的に、ＰＡＣＥポリマーが、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）コンジュゲートＰＡＣＥポリマーである、請求項３～２４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６】
ＰＡＣＥポリマーが、式Ｉ：
【化１】

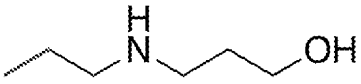


式Ｉ

［式中、ｎは１～３０の整数であり、ｍ、ｏ及びｐは独立に、１～２０の整数であり、ｘ、ｙ及びｑは独立に、１～１０００の整数であり、Ｒｘは、水素、置換若しくは非置換アルキル又は置換若しくは非置換アリール又は置換若しくは非置換アルコキシであり、Ｚ及びＺ’は独立に、Ｏ又はＮＲ’であり、Ｒ’は、水素、置換若しくは非置換アルキル又は置換若しくは非置換アリールであり、
R_1及びR_2は、存在しない又はヒドロキシル基、第一級アミン基、第二級アミン基、第三級アミン基若しくはそれらの組合せを含有する化学実体である］
のポリマーを含む、請求項３～２５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７】
Ｒ１及び／又はＲ２が、
【化２】

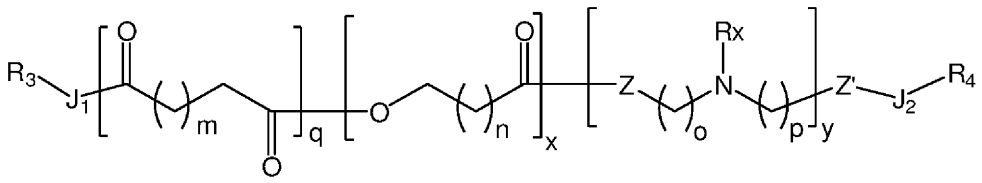


ではない、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
R_1及び／又はR_2が、
【化３】



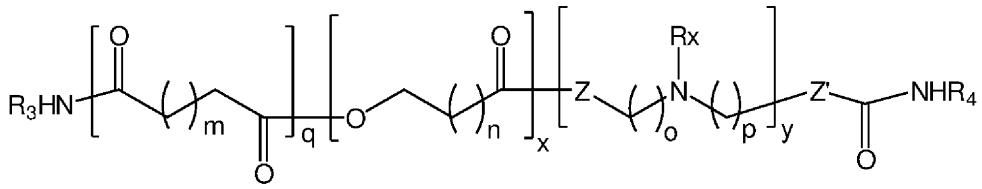
からなる、微粒子及びナノ粒子からなる群から選択される対応する粒子と比べて、ポリマーから形成された粒子（例えば、微粒子及び／又はナノ粒子）が、ｍＲＮＡの、負荷の改善、細胞トランスフェクションの改善、細胞内エンドソーム放出の改善又はそれらの組合

せを示す、請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
ポリマーが、式ＩＩ：
【化４】



式 II

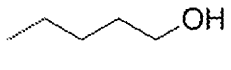
［式中、Ｊ$_1$及びＪ$_2$は独立に連結部分であり又は存在せず、
Ｒ$_3$及びＲ$_4$は、ヒドロキシル基、第一級アミン基、第二級アミン基、第三級アミン基又はそれらの組合せを含有する置換アルキルである］
の構造を有する、請求項２７に記載の方法。
【請求項３０】
ポリマーが、式ＩＩＩ：
【化５】



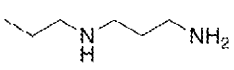
の構造を有する、請求項２７に記載の方法。
【請求項３１】
（ａ）Ｚが、Ｚ’と同一であり、（ｂ）ｎが、４、１０、１３又は１４であり、（ｃ）ｍが、５、６又は７であり、又は（ｄ）Ｒ$_x$が、置換若しくは非置換アルキルである、請求項２７に記載の方法。
【請求項３２】
狭い多分散のポリスチレン標準物質を使用してゲル浸透クロマトグラフィーによって測定される重量平均分子量が、約２，０００ダルトン～２０，０００ダルトンの間、好ましくは、約２，０００ダルトン～約１０，０００ダルトンの間、最も好ましくは、約２０００ダルトン～約７，０００ダルトンの間である、請求項２７に記載の方法。
【請求項３３】
Ｒ$_3$が、Ｒ$_4$と同一である、請求項２９に記載の方法。
【請求項３４】
Ｒ$_3$及び／又はＲ$_4$が独立に

【化６】

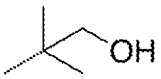
1



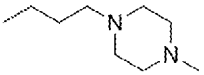
2



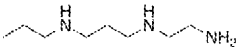
3



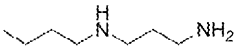
4



5



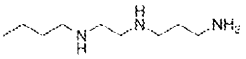
6



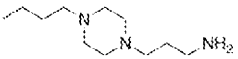
7



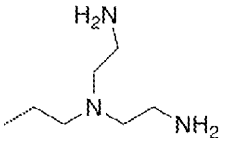
8



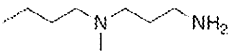
9



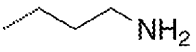
10



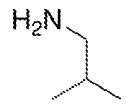
11



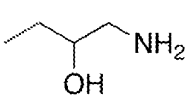
12



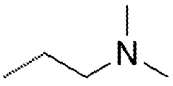
13



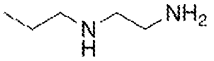
14



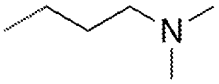
15



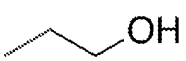
16



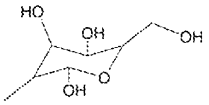
17



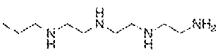
18



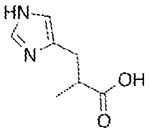
19



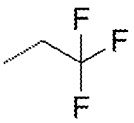
20



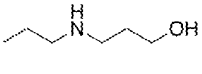
21



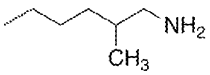
22



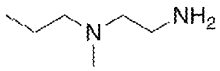
23



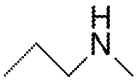
24



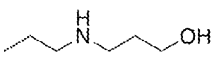
25



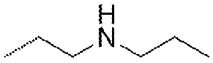
26



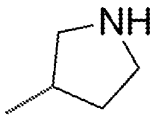
27



28



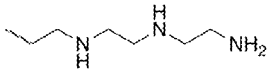
29



30



31

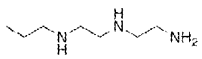


30



及び

31

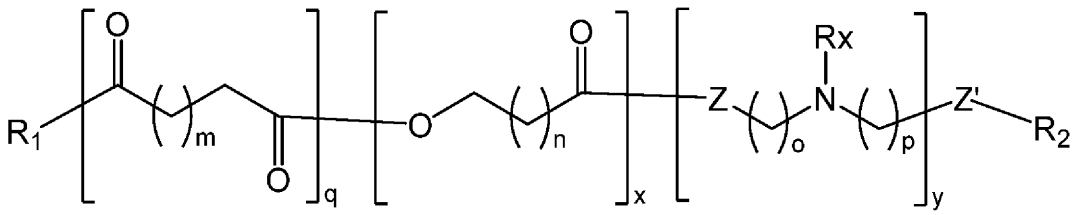


からなる群から選択される、請求項２９に記載の方法。

【請求項３５】

（ａ）Ｊ$_1$が－Ｏ－若しくは－ＮＨであり、Ｊ$_2$が－Ｃ（Ｏ）ＮＨ－若しくは－Ｃ（Ｏ）Ｏ－若しくはそれらの組合せであり、（ｂ）Ｒ$_3$、Ｒ$_4$若しくは両方が、第一級アミン基、任意選択的に、１つ以上の第二級又は第三級アミン基を含有し、（ｃ）Ｒ$_3$、Ｒ$_4$若しくは両方が、ヒドロキシル基、任意選択的に、１つ以上のアミン基を含有し、（ｄ）Ｒ$_3$、Ｒ$_4$若しくは両方が、ヒドロキシル基を含有し、アミン基を含有せず、又は（ｅ）Ｒ$_3$及びＲ$_4$の少なくとも一方が、ヒドロキシル基を含有しない、請求項２９に記載の方法。

【請求項３６】
Ｒ３、Ｒ４又は両方が、－非置換Ｃ１～Ｃ１０アルキレン－Ａｑ－非置換Ｃ１～Ｃ１０アルキレン－Ｂｑ、－非置換Ｃ１～Ｃ１０アルキレン－Ａｑ－置換Ｃ１～Ｃ１０アルキレン－Ｂｑ、－置換Ｃ１～Ｃ１０アルキレン－Ａｑ－非置換Ｃ１～Ｃ１０アルキレン－Ｂｑ又は－置換Ｃ１～Ｃ１０アルキレン－Ａｑ－置換Ｃ１～Ｃ１０アルキレン－Ｂｑであり、Ａｑは、存在せず又は－ＮＲ５－であり、Ｂｑは、ヒドロキシル、第一級アミン、第二級アミン又は第三級アミンであり、Ｒ５は、水素、置換若しくは非置換アルキル又は置換若しくは非置換アリールである、請求項２９に記載の方法。
【請求項３７】
担体が、以下の構造
【化７】



式Ｉ

［式中、ｎは、１～３０の整数であり、
ｍ、ｏ及びｐは独立に、１～２０の整数であり、
ｘ、ｙ及びｑは独立に、１～１０００の整数であり、
Ｒｘは、水素、置換若しくは非置換アルキル又は置換若しくは非置換アリール又は置換若しくは非置換アルコキシであり、
Ｚ及びＺ’は独立に、Ｏ又はＮＲ’であり、Ｒ’は、水素、置換若しくは非置換アルキル又は置換若しくは非置換アリールであり、
Ｒ１及びＲ２は、ヒドロキシル基、第一級アミン基、第二級アミン基、第三級アミン基又はそれらの組合せを含有する化学実体である］
を有する、ポリ（アミン－コ－エステル）又はポリ（アミン－コ－アミド）を含む、請求項２６に記載の方法。
【請求項３８】
（ａ）Ｚが、Ｚ’と同一であり、（ｂ）ＺがＯでありかつＺ’がＮＲ’であるか、又はＺがＮＲ’でありかつＺ’がＯである、（ｃ）Ｚ’がＯであり、ｎが１～２４の整数、例えば、４、１０、１３又は１４であり、任意選択的に、ＺもまたＯである、又は（ｄ）Ｚ’がＯであり、ｎが、１～２４の整数、例えば、４、１０、１３又は１４であり、ｍが１～１０の整数、例えば、４、５、６、７又は８であり、ｏ及びｐが、２、３又は４のような１～６の同一の整数であり、任意選択的に、ＺもＯである、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
ＺがＯであり、Ｚ’がＯであり、ＺがＮＲ’であり、Ｚ’がＮＲ’である、請求項３８に記載の方法。
【請求項３９】
ｍが１～１０の整数、例えば、４、５、６、７又は８であり、任意選択的に、ＺもＯである、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
Ｚ’がＯであり、ｎが、１～２４の整数、例えば、４、１０、１３又は１４であり、ｍが、１～１０の整数、例えば、４、５、６、７又は８であり、Ｒが、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、ｔ－ブチル、イソブチル、ｓｅｃ－ブチル、シクロヘキシル、（シクロヘキシル）メチル、シクロプロピルメチルのようなアルキル、又はその相同体及び異性体、例えば、ｎ－ペンチル、ｎ－ヘキシル、ｎ－ヘプチル及びｎ－

オクチル又はアリール、例えば、フェニル、ナフタリル、アントラセニル、フェナントリル、クリセニル、ピレニル、トリル又はキシリルであり、任意選択的に、ＺもＯである、請求項３７に記載の方法。

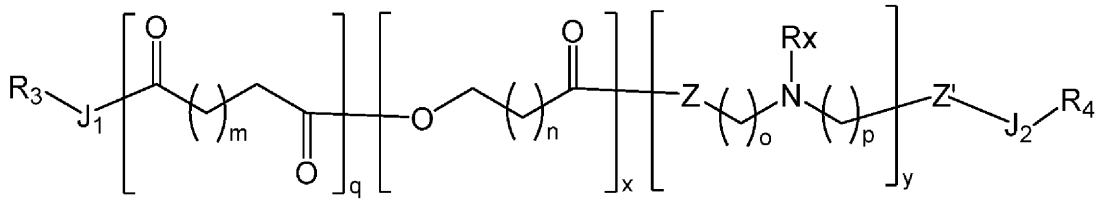
【請求項４１】

ｎが１４、任意選択的に、ペンタデカラクトン（ＰＤＬ）であり、ｍが７、任意選択的に、セバシン酸であり、ｏ及びｐが２、任意選択的に、Ｎ－メチルジエタノールアミン（ＭＤＥＡ）である、請求項３７に記載の方法。

【請求項４２】

ポリマーが、式ＩＩ：

【化８】



式 II

［式中、Ｒｘ、Ｚ、Ｚ’、ｍ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｘ及びｙは、式Ｉについて上述したとおりであり、

$Ｊ_1$及び$Ｊ_2$は独立に、存在せず又は連結部分、例えば、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｏ－及び－ＮＨ－であり、

式ＩＩ中の$Ｒ_3$及び$Ｒ_4$は独立に、ヒドロキシル基、第一級アミン基、第二級アミン基、第三級アミン基又はそれらの組合せを含有する置換アルキルである］

の構造を有する、請求項２６に記載の方法。

【請求項４３】

（ａ）$Ｊ_1$が、－Ｏ－若しくは－ＮＨ－であり、$Ｊ_2$が、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）ＮＨ－若しくは－Ｃ（Ｏ）Ｏ－である、又は（ｂ）$Ｒ_3$が、$Ｒ_4$と同一であり、任意選択的に、$Ｒ_3$及び／又は$Ｒ_4$が直鎖状である、請求項４２に記載の方法。

【請求項４４】

$Ｒ_3$、$Ｒ_4$又は両方が、ヒドロキシル基を含有し、任意選択的に、$Ｒ_3$、$Ｒ_4$又は両方が、ヒドロキシル基及び１つ以上のアミン基、任意選択的に、第二級又は第三級アミン基を含有する、請求項４３に記載の方法。

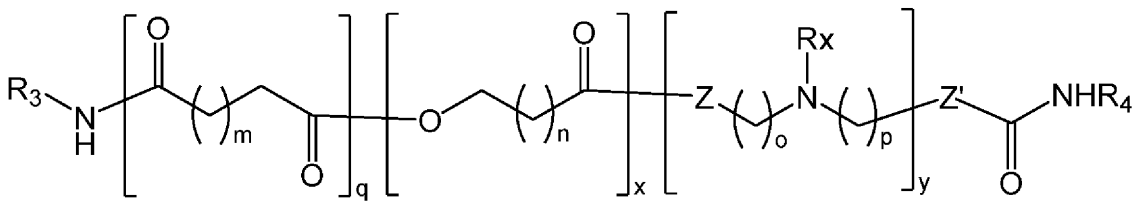
【請求項４５】

（ａ）$Ｒ_3$、$Ｒ_4$又は両方が、ヒドロキシル基を含有しかつアミン基を含有しない、又は（ｂ）$Ｒ_3$及び$Ｒ_4$の少なくとも一方は、ヒドロキシル基を含有しない、請求項４２に記載の方法。

【請求項４６】

ポリマーが、式ＩＩＩ：

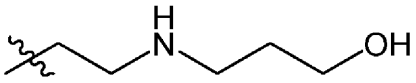
【化９】



式 III

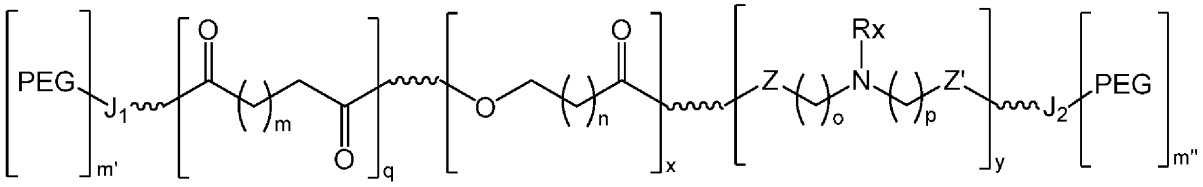
［式中、Ｒｘ、Ｚ、Ｚ’、ｍ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｘ及びｙは、式Ｉについて上述されたとおりであり、

Ｊ$_1$及びＪ$_2$は独立に、存在せず又は連結部分、例えば、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｏ－及び－ＮＨ－であり、
式ＩＩ中のＲ$_3$及びＲ$_4$は独立に、ヒドロキシル基、第一級アミン基、第二級アミン基、第三級アミン基又はそれらの組合せを含有する置換アルキルである］
の構造を有する、請求項２６に記載の方法。
【請求項４７】
（ａ）Ｊ$_1$が、－Ｏ－若しくは－ＮＨ－であり、Ｊ$_2$が、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）ＮＨ－若しくは－Ｃ（Ｏ）Ｏ－である、（ｂ）Ｒ$_3$がＲ$_4$と同一であり、任意選択的に、Ｒ$_3$及び／又はＲ$_4$が直鎖状である、（ｃ）Ｒ$_3$、Ｒ$_4$又は両方が、ヒドロキシル基を含有し、任意選択的に、Ｒ$_3$、Ｒ$_4$又は両方が、ヒドロキシル基及び１つ以上のアミン基、任意選択的に、第二級若しくは第三級アミン基を含有する、（ｄ）Ｒ$_3$、Ｒ$_4$又は両方が、ヒドロキシル基を含有しかつアミン基を含有しない、又は（ｄ）Ｒ$_3$及びＲ$_4$の少なくとも一方が、ヒドロキシル基を含有しない、請求項４６に記載の方法。
【請求項４８】
ポリマーの重量平均分子量が、２０，０００ダルトンより大きい、１５，０００ダルトンより大きい、１０，０００ダルトンより大きい、５，０００ダルトンより大きい、２，０００ダルトンより大きい、請求項３７～４７のいずれかに記載の方法。
【請求項４９】
ポリマーの重量平均分子量が、約２，０００ダルトン～約２０，０００ダルトンの間、より好ましくは、約５，０００ダルトン～約１０，０００ダルトンの間である、請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
１つ以上のラクトン、１つ以上のアミン－ジオール（Ｚ及びＺ’＝Ｏ）又はトリアミン（Ｚ及びＺ’＝ＮＲ’）、及び１つ以上の二酸若しくはジエステルから調製され、２つ以上の異なるラクトン、二酸又はジエステル及び／又はトリアミン又はアミン－ジオールモノマーが使用される場合には、ｎ、ｏ、ｐ、及び／又はｍの値が、同一である又は異なる場合がある、請求項３７～４９のいずれかに記載の方法。
【請求項５１】
微粒子及びナノ粒子からなる群から選択される粒子に形成される、請求項３７～５０のいずれかに記載の方法。
【請求項５２】
中に１つ以上の核酸が封入されている、微粒子及びナノ粒子からなる群から選択される粒子に形成される、請求項５１に記載の方法。
【請求項５３】
微粒子及びナノ粒子からなる群から選択される粒子が、Ｒ$_1$及び／又はＲ$_2$が
【化１０】



からならないポリマー又はそれを含まないポリマーから形成される、請求項５２に記載の方法。
【請求項５４】
微粒子及びナノ粒子からなる群から選択される粒子に形成され、ポリ（アミン－コ－エステル）又はポリ（アミン－コ－アミド）が、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）にコンジュゲートされたポリ（アミン－コ－エステル）又はポリ（アミン－コ－アミド）、すなわち、ＰＥＧコンジュゲートポリ（アミン－コ－エステル）又はポリ（アミン－コ－アミド）を含有する混合物中にある、請求項５３に記載の方法。
【請求項５５】
ＰＥＧコンジュゲートポリ（アミン－コ－エステル）又はポリ（アミン－コ－アミド）

が、式ＸＩ：
【化１１】



式XI

［式中、ｍ’及びｍ”は独立に、０又は１であり、ただし、ｍ’＋ｍ”は、１又は２であり、
式ＸＩ中のＪ$_1$及びＪ$_2$は独立に、存在せず又は連結部分、例えば、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｏ－及び－ＮＨ－である］
の構造を有し、
式ＸＩの一部の形態では、Ｊ$_1$が、－Ｏ－又は－ＮＨ－であり、
式ＸＩの一部の形態では、Ｊ$_2$が、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）ＮＨ－又は－Ｃ（Ｏ）Ｏ－である、請求項５４に記載の方法。
【請求項５６】
請求項１～５５のいずれか一項において使用するための医薬組成物。
【請求項５７】
ウイルスによる感染に対して対象を免疫化する方法であって、
対象においてウイルスに対する全身性Ｔ及び／又はＢ細胞応答を誘発するのに十分な量で第１の抗原を含む第１の組成物を対象に非経口的に投与すること、並びに鼻腔内、吸入性、気管内、肺内及び気管支内を含む投与経路によって、対象においてウイルスに対して特異的な肺常在Ｔ及び／又はＢ細胞の確立をもたらすのに十分な量で、ウイルスタンパク質を含む第２の組成物を対象に投与することを含み、ウイルスが、コロナウイルス、インフルエンザウイルス及び単純ヘルペスウイルスからなる群から選択される少なくとも１つを含む、方法。
【請求項５８】
対象においてウイルスによる感染を処置する、寛解させる、及び／又は防止する方法であって、
対象においてコロナウイルスに対する全身性Ｔ及び／又はＢ細胞応答を誘発するのに十分な量で第１の抗原を含む第１の組成物を対象に非経口的に投与すること、並びに鼻腔内、吸入性、気管内、肺内及び気管支内を含む投与経路によって、対象においてウイルスに対して特異的な肺常在Ｔ及び／又はＢ細胞の確立をもたらすのに十分な量で、ウイルスタンパク質を含む第２の組成物を対象に投与することを含み、ウイルス感染症が、コロナウイルス、インフルエンザウイルス及び単純ヘルペスウイルスからなる群から選択される少なくとも１つのウイルスによって引き起こされる、方法。
【請求項５９】
ウイルスがコロナウイルスを含み、コロナウイルスが、アルファコロナウイルス、ベータコロナウイルス、ガンマコロナウイルス及びデルタコロナウイルスからなる群から選択される少なくとも１つのウイルスである、請求項５７又は５８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６０】
ウイルスがコロナウイルスを含み、コロナウイルスが、ＭＥＲＳ－ＣｏＶ、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ及びＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２からなる群から選択される少なくとも１つのウイルスである、請求項５７～５９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６１】
ウイルスがコロナウイルスを含み、コロナウイルスがＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２である、請

求項５７～６０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６２】
ウイルスがコロナウイルスを含み、コロナウイルスがＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２であり、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２が、Ｂ．１．１．７（アルファ）、Ｂ．１．３５１（ベータ）、Ｐ．１（ガンマ）、Ｂ．１．６１７．２（デルタ）、Ｂ．１．４２９／Ｂ．１．４２７（イプシロン）、Ｂ．１．６１７．１（カッパ）、Ｂ．１．５２５（エータ）、Ｂ．１．５２６（イオタ）、Ｐ．３（シータ）、Ｐ．２（ゼータ）及びＢ．１．１．５２９（オミクロン）からなる群から選択される少なくとも１つのバリアントを含む、請求項５７～６１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６３】
ウイルスがコロナウイルスを含み、コロナウイルスがＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２であり、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２が、Ａ．１～Ａ．６、Ｂ．３～Ｂ．７、Ｂ．９、Ｂ．１０、Ｂ．１３～Ｂ．１６、Ｂ．２、Ｂ．１系統、Ｐ．１、Ｐ．２、Ｐ．３及びＲ．１からなる群から選択される少なくとも１つのバリアントを含む、請求項５７～６２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６４】
ウイルスがコロナウイルスを含み、コロナウイルスがＢ．１系統ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２であり、Ｂ．１系統が、Ｂ．１、Ｂ．１．１、Ｂ．１．１．７、Ｅ４８４Ｋを有するＢ．１．１．７、Ｂ．１．２、Ｂ．１．５～Ｂ．１．７２、Ｂ．１．９、Ｂ．１．１３、Ｂ．１．２２、Ｂ．１．２６、Ｂ．１．３７、Ｂ．１．３～Ｂ．１．６６、Ｂ．１．１７７、Ｂ．１．２４３、Ｂ．１．３１３、Ｂ．１．３５１、Ｂ．１．４２７、Ｂ．１．４２９、Ｂ．１．５２５、Ｂ．１．５２６、Ｂ．１．５２６．１、Ｂ．１．５２６．２、Ｂ．１．６１７、Ｂ．１．６１７．１、Ｂ．１．６１７．２、Ｂ．１．６１７．３、Ｂ．１．６１９、Ｂ．１．６２０及びＢ．１．６２１のうち少なくとも１つを含む、請求項５７～６３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６５】
第１の組成物が感染に対するワクチンを含む、請求項５７～６４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６６】
第１の組成物が、感染に対するｍＲＮＡ－脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）ベースのワクチン、感染に対するウイルスベクターワクチン、感染に対する不活化ウイルスワクチン、感染に対するウイルスサブユニット／ペプチドワクチン、感染に対するウイルス様粒子（ＶＬＰ）ベースのワクチン及び感染に対するＤＮＡワクチンからなる群から選択される少なくとも１つを含む、請求項５７～６５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６７】
ウイルスがコロナウイルスを含み、第２の組成物が、コロナウイルススパイクタンパク質を含む、請求項５７～６６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６８】
ウイルスが第１のコロナウイルスを含み、第２の組成物が、第２のコロナウイルス由来のスパイクタンパク質を含む、請求項５７～６７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６９】
（ａ）第１のコロナウイルス及び第２のコロナウイルスが同一である、又は（ｂ）第１のコロナウイルス及び第２のコロナウイルスが異なる、請求項６８に記載の方法。
【請求項７０】
第１のコロナウイルスがＳＡＲＳ－ＣｏＶであり、第２のコロナウイルスがＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２である、又は第１のコロナウイルスがＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２であり、第２のコロナウイルスがＳＡＲＳ－ＣｏＶである、請求項６９に記載の方法。
【請求項７１】
第２の組成物が、アジュバントを含まない、請求項５７～７０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項７２】
第２の組成物が、第２の組成物の鼻腔内、吸入性、気管内、肺内及び／又は気管支内投与に適した薬学的に許容される担体を含む、請求項５７～７１のいずれかに記載の方法。
【請求項７３】
対象の肺柔組織及び気道においてウイルスに対する抗原特異的組織常在記憶Ｔ及び／又はＢ細胞応答の拡大をもたらす、請求項５７～７２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７４】
方法を用いて免疫化された対象が、第２の組成物の鼻腔内、吸入性、気管内、肺内、及び／又は気管支内投与を用いずに免疫化されている対照対象と比較して、ウイルスに対するより高いレベルの気道及び全身性ＩｇＡ及びＩｇＧ抗体を発生する、請求項５７～７３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７５】
上気道及び下気道においてウイルスの力価を低減し、対象において致死性コロナウイルスウイルス感染症の発生を最小にする及び／又は防止する、請求項５７～７４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７６】
対象が哺乳動物である、請求項５７～７５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７７】
対象がヒトである、請求項５７～７６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７８】
対象においてウイルスによる感染症に対する既存の免疫をブースティングする組成物であって、
ポリ（アミン－コ－エステル）（ＰＡＣＥ）ポリマーを含む担体材料、又はリポソーム、リポソーム様ナノ粒子、固体脂質ナノ粒子、ナノ構造脂質担体、吸収脂質－ポリマーハイブリッドナノ粒子、封入脂質－ポリマーハイブリッドナノ粒子、カチオンナノエマルジョン、エキソソーム、天然リポタンパク質及び合成リポタンパク質からなる群から選択される担体材料である、担体材料の中／上にあるウイルスタンパク質又はウイルスタンパク質をコードするポリヌクレオチド、並びに
コロナウイルスのタンパク質の鼻腔内、吸入性、気管内、肺内及び／又は気管支内投与に適した薬学的に許容される担体であって、ウイルスが、コロナウイルス、インフルエンザウイルス及び単純ヘルペスウイルスからなる群から選択される少なくとも１つを含む、薬学的に許容される担体
を含む、組成物。
【請求項７９】
ウイルスがコロナウイルスを含み、コロナウイルスが、アルファコロナウイルス、ベータコロナウイルス、ガンマコロナウイルス及びデルタコロナウイルスからなる群から選択される少なくとも１つのウイルスである、請求項７８に記載の組成物。
【請求項８０】
ウイルスがコロナウイルスを含み、コロナウイルスが、ＭＥＲＳ　ＣｏＶ、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ及びＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２からなる群から選択される少なくとも１つのウイルスである、請求項７８～７９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８１】
ウイルスがコロナウイルスを含み、コロナウイルスがＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２である、請求項７８～８０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８２】
ウイルスがコロナウイルスを含み、コロナウイルスがＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２であり、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２が、Ｂ．１．１．７（アルファ）、Ｂ．１．３５１（ベータ）、Ｐ．１（ガンマ）、Ｂ．１．６１７．２（デルタ）、Ｂ．１．４２９／Ｂ．１．４２７（イプシロン）、Ｂ．１．６１７．１（カッパ）、Ｂ．１．５２５（エータ）、Ｂ．１．５２６（イオタ）、Ｐ．３（シータ）、Ｐ．２（ゼータ）及びＢ．１．１．５２９（オミクロン

）からなる群から選択される少なくとも１つのバリアントを含む、請求項７８～８０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８３】
ウイルスがコロナウイルスを含み、コロナウイルスがＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２であり、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２が、Ａ．１～Ａ．６、Ｂ．３～Ｂ．７、Ｂ．９、Ｂ．１０、Ｂ．１３～Ｂ．１６、Ｂ．２、Ｂ．１系統、Ｐ．１、Ｐ．２、Ｐ．３及びＲ．１からなる群から選択される少なくとも１つのバリアントを含む、請求項７８～８２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８４】
ウイルスがコロナウイルスを含み、コロナウイルスがＢ．１系統ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２であり、Ｂ．１系統が、Ｂ．１、Ｂ．１．１、Ｂ．１．１．７、Ｅ４８４Ｋを有するＢ．１．１．７、Ｂ．１．２、Ｂ．１．５～Ｂ．１．７２、Ｂ．１．９、Ｂ．１．１３、Ｂ．１．２２、Ｂ．１．２６、Ｂ．１．３７、Ｂ．１．３～Ｂ．１．６６、Ｂ．１．１７７、Ｂ．１．２４３、Ｂ．１．３１３、Ｂ．１．３５１、Ｂ．１．４２７、Ｂ．１．４２９、Ｂ．１．５２５、Ｂ．１．５２６、Ｂ．１．５２６．１、Ｂ．１．５２６．２、Ｂ．１．６１７、Ｂ．１．６１７．１、Ｂ．１．６１７．２、Ｂ．１．６１７．３、Ｂ．１．６１９、Ｂ．１．６２０及びＢ．１．６２１のうち少なくとも１つを含む、請求項７８～８３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８５】
ウイルスがコロナウイルスを含み、コロナウイルスタンパク質が、コロナウイルススパイクタンパク質を含む、請求項７８～８４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８６】
ウイルスが第１のコロナウイルスを含み、ウイルスタンパク質が、第２のコロナウイルス由来のスパイクタンパク質である、請求項７８～８５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８７】
（ａ）第１のコロナウイルス及び第２のコロナウイルスが同一ウイルスである、又は（ｂ）第１のコロナウイルス及び第２のコロナウイルスが異なる、請求項８６に記載の組成物。
【請求項８８】
第１のコロナウイルスがＳＡＲＳ－ＣｏＶであり、第２のコロナウイルスがＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２である、又は第１のコロナウイルスがＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２であり、第２のコロナウイルスがＳＡＲＳ－ＣｏＶである、請求項８６に記載の組成物。
【請求項８９】
アジュバントを含まない、請求項７８～８８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９０】
対象が哺乳動物である、請求項７８～８９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９１】
対象がヒトである、請求項７８～９０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９２】
請求項２６～５５のいずれか一項に記載のポリマー又は粒子を含む、請求項７８に記載の組成物。
【請求項９３】
ウイルスによる感染症に対して対象に対して対象を免疫化するキットであって、
対象においてウイルスに対する全身性Ｔ及び／又はＢ細胞応答を誘発するのに十分な量で第１の抗原を含む第１の組成物であって、対象に非経口的に投与されるように製剤化されている第１の組成物、並びに対象においてウイルスに対する肺常在Ｔ及び／又はＢ細胞の確立をもたらすのに十分な量でウイルスタンパク質を含む第２の組成物であって、鼻腔内に、吸入性に、気管内に、肺内に、及び／又は気管支内に投与されるように製剤化されている第２の組成物を含み、ウイルスが、コロナウイルス、インフルエンザウイルス及び単純ヘルペスウイルスからなる群から選択される少なくとも１つを含む、キット。

【請求項９４】
ウイルスがコロナウイルスを含み、コロナウイルスが、ＭＥＲＳ－ＣｏＶ、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ及びＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２からなる群から選択される少なくとも１つのウイルスである、請求項９３に記載のキット。
【請求項９５】
ウイルスがコロナウイルスを含み、コロナウイルスがＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２である、請求項９３～９４のいずれか一項に記載のキット。
【請求項９６】
ウイルスがコロナウイルスを含み、コロナウイルスがＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２であり、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２が、Ｂ．１．１．７（アルファ）、Ｂ．１．３５１（ベータ）、Ｐ．１（ガンマ）、Ｂ．１．６１７．２（デルタ）、Ｂ．１．４２９／Ｂ．１．４２７（イプシロン）、Ｂ．１．６１７．１（カッパ）、Ｂ．１．５２５（エータ）、Ｂ．１．５２６（イオタ）、Ｐ．３（シータ）、Ｐ．２（ゼータ）及びＢ．１．１．５２９（オミクロン）からなる群から選択される少なくとも１つのバリアントを含む、請求項９３～９５のいずれか一項に記載のキット。
【請求項９７】
ウイルスがコロナウイルスを含み、コロナウイルスがＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２であり、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２が、Ａ．１～Ａ．６、Ｂ．３～Ｂ．７、Ｂ．９、Ｂ．１０、Ｂ．１３～Ｂ．１６、Ｂ．２、Ｂ．１系統、Ｐ．１、Ｐ．２、Ｐ．３及びＲ．１からなる群から選択される少なくとも１つのバリアントを含む、請求項９３～９６のいずれか一項に記載のキット。
【請求項９８】
ウイルスがコロナウイルスを含み、コロナウイルスが、Ｂ．１系統ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２であり、Ｂ．１系統が、Ｂ．１、Ｂ．１．１、Ｂ．１．１．７、Ｅ４８４Ｋを有するＢ．１．１．７、Ｂ．１．２、Ｂ．１．５～Ｂ．１．７２、Ｂ．１．９、Ｂ．１．１３、Ｂ．１．２２、Ｂ．１．２６、Ｂ．１．３７、Ｂ．１．３～Ｂ．１．６６、Ｂ．１．１７７、Ｂ．１．２４３、Ｂ．１．３１３、Ｂ．１．３５１、Ｂ．１．４２７、Ｂ．１．４２９、Ｂ．１．５２５、Ｂ．１．５２６、Ｂ．１．５２６．１、Ｂ．１．５２６．２、Ｂ．１．６１７、Ｂ．１．６１７．１、Ｂ．１．６１７．２、Ｂ．１．６１７．３、Ｂ．１．６１９、Ｂ．１．６２０及びＢ．１．６２１のうち少なくとも１つを含む、請求項９３～９７のいずれか一項に記載のキット。
【請求項９９】
ウイルスがコロナウイルスを含み、第１の組成物が、コロナウイルス感染に対するワクチンを含む、請求項９３～９８のいずれか一項に記載のキット。
【請求項１００】
第１の組成物が、感染に対するｍＲＮＡ－脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）ベースのワクチン、感染に対するウイルスベクターワクチン、感染に対する不活化ウイルスワクチン、感染に対するウイルスサブユニット／ペプチドワクチン、感染に対するウイルス様粒子（ＶＬＰ）ベースのワクチン及び感染に対するＤＮＡワクチンからなる群から選択される少なくとも１つを含む、請求項９３～９９のいずれか一項に記載のキット。
【請求項１０１】
ウイルスがコロナウイルスを含み、第２の組成物が、コロナウイルススパイクタンパク質を含む、請求項９３～１００のいずれか一項に記載のキット。
【請求項１０２】
ウイルスが、第１のコロナウイルスを含み、ウイルスタンパク質が、第２のコロナウイルス由来のスパイクタンパク質である、請求項９３～１０１のいずれか一項に記載のキット。
【請求項１０３】
（ａ）第１のコロナウイルス及び第２のコロナウイルスが同一ウイルスである、又は（ｂ）第１のコロナウイルス及び第２のコロナウイルスが異なる、請求項１０２に記載のキ

ット。
【請求項１０４】
第１のコロナウイルスがＳＡＲＳ－ＣｏＶであり、第２のコロナウイルスがＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２である、又は第１のコロナウイルスがＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２であり、第２のコロナウイルスがＳＡＲＳ－ＣｏＶである、請求項１０２に記載のキット。
【請求項１０５】
第２の組成物が、アジュバントを含まない、請求項９３～１０４のいずれか一項に記載のキット。
【請求項１０６】
第２の組成物が、第２の組成物の鼻腔内、吸入性、気管内、肺内及び／又は気管支内投与に適した薬学的に許容される担体を含む、請求項９３～１０５のいずれか一項に記載のキット。
【請求項１０７】
取り扱い説明書をさらに含む、請求項９３～１０６のいずれか一項に記載のキット。
【請求項１０８】
対象が哺乳動物、任意選択的に、ヒトである、請求項９３～１０７のいずれか一項に記載のキット。
【請求項１０９】
請求項５６又は７８～９２のいずれか一項に記載の組成物を含む、請求項３８～５４のいずれか一項に記載のキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、２０２１年１２月８日に出願された米国特許出願第６３／２８７，４１０号、２０２１年１２月１５日に出願された米国特許出願第６３／２９０，０４２号、２０２１年１２月２１日に出願された米国特許出願第６３／２９２，２００号、２０２２年１月２１日に出願された米国特許出願第６３／３０１，９４２号、２０２２年１月２４日に出願された米国特許出願第６３／３０２，４１３号及び２０２２年１０月２４日に出願された米国特許出願第６３／４１８，７４４号の利益及び優先権を主張し、これらは、その全体で参照により本明細書に明確に組み込まれる。
【０００２】
連邦政府による資金提供を受けた研究開発の記載
本発明は、米国国立衛生研究所及び米国国立アレルギー感染症研究所から授与されたＫ０８ＡＩ１６３４９３、及び米国国立衛生研究所から授与された５ＵＧ３ＨＬ１４７３５２－０３の政府支援を受けて行われた。政府は、本発明において一定の権利を有する。
【０００３】
配列表への言及
「ＹＵ＿８２７７＿ＰＣＴ＿ＳＴ２６．ｘｍｌ」と名付けられ、２０２２年１２月８日に作出され、１９，８３０バイトのサイズを有するテキストファイルとして２０２２年１２月８日に提出された配列表は、３７　Ｃ．Ｆ．Ｒ．１．８３４（ｃ）（１）に準拠して参照により本明細書に組み込まれる。
【０００４】
発明の分野
本発明の分野は、概して、投与して免疫応答を誘導するための改善されたワクチン、特に核酸ベースの薬剤のための組成物及び方法に関する。
【背景技術】
【０００５】
呼吸器病原体、例えば、流行性のインフルエンザウイルス及びコロナウイルスは、重大かつ再発性の公衆衛生上の問題に相当する。米国では毎年、数百万の入院並びに３５，０００を超える死亡がインフルエンザに関連する疾病によるものである。最近、コロナウイ

ルスは、ヒト集団において重症の流行性及び大流行性呼吸器疾患を引き起こし、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）によって、世界保健機関（ＷＨＯ）が２０２０年３月中旬に世界的大流行を宣言することとなった。

【０００６】

これらの病原体に対する主な防御は、宿主における防御的抗体応答に基づいて「集団免疫」を作り出すための集団の集団ワクチン接種である。現在、呼吸器系ウイルスのための臨床開発において承認されたワクチン及びワクチン候補のほとんどは、筋肉内に投与される。このような非経口ワクチンは、循環においてウイルス特異的ＩｇＧ及びＴ細胞応答を誘導することによって良好な全身性免疫をもたらすが、それらは、感染が最初に確立され、後に伝播される気道では、記憶Ｔ細胞及び粘膜ＩｇＡを極めて少ししか生成しない。

【０００７】

呼吸器系ウイルスは、呼吸器粘膜を介して身体に侵入し、次いで、呼吸器飛沫及びエアロゾルを介して伝播する。したがって、これらの部位で防御免疫エフェクター機序を誘発することを目的とするワクチン戦略は、呼吸器ウイルス侵入及び播種に対する最前線の防御を提供するために大いに必要とされ、伝播阻止ワクチン戦略として役立つ可能性がある。強力な粘膜細胞性及び体液性免疫応答は、上皮表面への結合及びそれを超える取り込みを妨害することによって殺菌免疫を誘導する可能性を有する。しかし、粘膜ワクチン開発への大きなハードルがある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

したがって、本発明の目的は、呼吸器病原体、特に、ＳＡＲＳ及びＣＯＶＩＤ－１９などのコロナウイルス並びにインフルエンザウイルスに対する有効な防御を提供できる、改善されたワクチン及び免疫化戦略を提供することである。

【０００９】

本発明の目的は、呼吸器病原体に対する防御的粘膜免疫を提供できる、改善されたワクチン試薬及びその使用方法を提供することである。

【００１０】

本発明のさらなる目的は、非経口免疫化によって誘導された全身性免疫を呼吸器感染に対する防御免疫に変換することである。

【００１１】

また、本発明の目的は、パンデミックＳＡＲＳ及びインフルエンザウイルスに対する有効な免疫化のための試薬及び方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【００１２】

（発明の要旨）

呼吸器系ウイルスに対する粘膜免疫応答及び／又は持続性の粘膜免疫を誘導する、及び／又はそれらのウイルスに対する既存の免疫をブーストするための免疫原性組成物及び方法が提供される。一実施形態では、組成物は、ウイルス抗原を粘膜送達に適した形態で含む。ウイルス抗原は、担体中／担体上に提供されるタンパク質若しくはペプチド又はウイルス抗原をコードするポリヌクレオチドであり得る。

【００１３】

好ましい実施形態では、組成物は、ミセル（ｍｉｃｅｌｌｕｌａｒ）粒子又は固体ポリマーナノ粒子の形態のポリ（アミン－コ－エステル）ポリマー内に結合又は封入されたポリヌクレオチドベースの抗原を含み、これらは、対象において抗原に対して特異的な粘膜免疫応答及び／又は持続性の、防御的粘膜免疫の誘導において有効である。他の実施形態では、核酸は、リソソーム、脂質ナノ粒子、脂質エマルジョン又はオルガノゲル製剤中で提供される。

【００１４】

一部の実施形態では、製剤は、対象におけるウイルスによる感染に対する既存の免疫を

ブーストする又は増強するために投与される。一部の実施形態では、ウイルスは、呼吸器感染を引き起こすものである。一部の実施形態では、ウイルスは、コロナウイルス、インフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス又はそれらの任意の組合せである。

【００１５】

対象において抗原に対する粘膜免疫を増強する方法は、対象中の粘膜組織に、抗原又はポリ（アミン－コ－エステル）ポリマー及び抗原をコードするポリヌクレオチドを含むワクチン組成物の有効量を投与するステップを含む。対象は、好ましくは、例えば、全身性又は粘膜投与経路を介して同一対象に、抗原（又はポリヌクレオチドによってコードされる抗原）と１つ以上の抗原性部位を共有するプライミング抗原を投与することによって抗原に事前に曝露されている。したがって、一部の実施形態では、対象の免疫系は、抗原に対する事前の曝露によって「プライム」されている。一部の実施形態では、事前の曝露は、全身性曝露、例えば、対象への全身性経路を介した、例えば、筋肉内又は皮内投与を介したワクチンの事前投与である。他の実施形態では、事前の曝露は、粘膜曝露、例えば、対象への粘膜ワクチンの事前投与、又は粘膜部位での事前の自然感染である。

【００１６】

一部の実施形態では、全身性又は粘膜投与経路を介した事前の曝露は、防御的粘膜免疫を誘導しない。一部の実施形態では、全身性又は粘膜投与経路を介した事前の曝露は、粘膜組織で抗原に対する検出可能な数のＣＤ８$^{+}$組織常在記憶（T_{RM}）細胞、ＣＤ４$^{+}$組織常在記憶（T_{RM}）細胞及び／又は記憶Ｂ細胞を誘導しない。一部の実施形態では、全身性又は粘膜投与経路を介した事前の曝露は、抗原に対する検出可能な粘膜ＩｇＡを誘導しない。好ましい実施形態では、プライミング抗原は、脂質ナノ粒子内に結合又は封入された抗原をコードするメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を含む。

【００１７】

開示された組成物を投与するための例示的粘膜組織として、肺、鼻腔、口腔、消化器系、膣、及び直腸粘膜がある。好ましい実施形態では、粘膜組織は、肺及び／又は鼻腔粘膜である。適した抗原は、１つ以上の呼吸器系ウイルス、例えば、オルソミクソウイルス、パラミクソウイルス、コロナウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス及びヒトボカウイルスに由来する又はそれに対する防御的免疫応答を生じさせる。

【００１８】

抗原は、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、麻疹ウイルス（麻疹モルビリウイルス）、ムンプスウイルス及び呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）、ヒトメタニューモウイルス、重症急性呼吸器症候群（ＳＡＲＳ）ウイルス、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、エプスタイン－バーウイルス（ＥＢＶ）及び水痘帯状疱疹ウイルス（ＶＺＶ）のうち１つ以上に由来する又はそれに対する防御的免疫応答を生じさせる。好ましい実施形態では、抗原は、インフルエンザウイルス、ＳＡＲＳ－Ｃｏｖ－２ウイルス又はＲＳＶに由来する。通常、抗原をコードするポリヌクレオチドは、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）又はリボ核酸（ＲＮＡ）分子である。好ましい実施形態では、抗原をコードするポリヌクレオチドは、コロナウイルススパイクタンパク質配列又はその一部分をコードするオープンリーディングフレームを含むメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）である。一部の実施形態では、コロナウイルスは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のバリアント、例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｂ．１．１．７（アルファバリアント）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｂ．１．３５１（ベータバリアント）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｐ．１（ガンマバリアント）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｂ．１．６１７、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｂ．１．６１７．１（カッパバリアント）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｂ．１．６２１（ミューバリアント）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｂ．１．６１７．２（デルタバリアント）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｂ．１．６１７．３及びＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｂ．１．１．５２９（オミクロンバリアント）である。

【００１９】

有効量の免疫原性組成物は、対象において抗原に対して特異的な粘膜免疫応答及び／又は持続性の、防御的粘膜免疫を誘導する。一部の実施形態では、免疫原性組成物は、粘膜

組織で抗原に対するＣＤ８$^{+}$組織常在記憶（T_{RM}）細胞、ＣＤ４$^{+}$組織常在記憶（T_{RM}）細胞及び／又は記憶Ｂ細胞のうち１つ以上を誘導するのに有効な量で投与される。好ましい実施形態では、免疫原性組成物は、同一投与経路を介してポリ（アミン－コ－エステル）ポリマーの不在下で送達された免疫原性組成物と比較して増大した数の、ＣＤ８$^{+}$組織常在記憶（T_{RM}）細胞、ＣＤ４$^{+}$組織常在記憶（T_{RM}）細胞及び／又は記憶Ｂ細胞を、粘膜組織で抗原に対して誘導する。一部の実施形態では、免疫原性組成物は、抗原に対する粘膜免疫グロブリンＡ（ＩｇＡ）及び／又は免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）を誘導するのに有効な量で投与される。好ましい実施形態では、免疫原性組成物は、同一投与経路を介してポリ（アミン－コ－エステル）ポリマーの不在下で送達された免疫原性組成物と比較して増大した量で、抗原に対する粘膜ＩｇＡ及び／又は粘膜ＩｇＧを誘導する。例示的粘膜ＩｇＡは、例えば、気管支肺胞洗浄液、腸洗浄液、腸管洗浄液及び膣洗浄液から選択される粘膜洗浄液において検出される、分泌性ＩｇＡである。

【００２０】

対象における抗原の反復提示に対する粘膜免疫を増強する方法は、（ｉ）全身性又は粘膜投与経路を介してプライミング抗原の有効量を投与するステップ並びに（ｉｉ）その後、（ｉ）抗原又は（ｉｉ）ポリ（アミン－コ－エステル）若しくはポリ（アミン－コ－アミド）、（ＰＡＣＥ）、ＰＡＣＥ－ＰＥＧブロックコポリマー及び／若しくはナノ粒子をより酸感受性にする追加のモノマーを含み得るＰＡＣＥポリマーブレンド、及び抗原若しくは同一抗原をコードするポリヌクレオチドを含有するブースティング組成物の有効量を対象に鼻腔内投与するステップを含む。一実施形態では、方法は、（ｉ）筋肉内（ＩＭ）注射を介して、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）及び抗原をコードするポリヌクレオチドを含有するプライミング抗原の有効量を投与するステップ並びに（ｉｉ）その後、抗原、又はポリ（アミン－コ－エステル）若しくはポリ（アミン－コ－アミド）、（ＰＡＣＥ）、ＰＡＣＥ－ＰＥＧブロックコポリマー及び／若しくはナノ粒子をより酸感受性にする追加のモノマーを含み得るＰＡＣＥポリマーブレンド、及び抗原若しくは抗原をコードするポリヌクレオチドを含有するブースティング組成物の有効量を対象に鼻腔内（ＩＮ）投与するステップを含む。別の実施形態では、方法は、ポリ（アミン－コ－エステル）若しくはポリ（アミン－コ－アミド）、（ＰＡＣＥ）、ＰＡＣＥ－ＰＥＧブロックコポリマー及び／若しくはナノ粒子をより酸感受性にする追加のモノマーを含み得るＰＡＣＥポリマーブレンド、及び抗原をコードするポリヌクレオチドを含有するプライミング抗原の有効量を鼻腔内（ＩＮ）投与するステップ、並びに（ｉｉ）その後、ポリ（アミン－コ－エステル）若しくはポリ（アミン－コ－アミド）、（ＰＡＣＥ）、ＰＡＣＥ－ＰＥＧブロックコポリマー及び／若しくはナノ粒子をより酸感受性にする追加のモノマーを含み得るＰＡＣＥポリマーブレンド、及び同一抗原をコードするポリヌクレオチドを含有するブースティング組成物の有効量を対象に鼻腔内（ＩＮ）投与するステップを含む。

【００２１】

対象において１つ以上の呼吸器病原体に対する防御免疫を提供する方法は、（ｉ）全身性投与経路を介してプライミング免疫原性組成物の有効量を投与するステップ、並びにその後ｉｉ）全身性若しくは好ましくは、粘膜経路を介して、抗原若しくはポリ（アミン－コ－エステル）若しくはポリ（アミン－コ－アミド）、（ＰＡＣＥ）、ＰＡＣＥ－ＰＥＧブロックコポリマー及び／若しくはナノ粒子をより酸感受性にする追加のモノマーを含み得るＰＡＣＥポリマーブレンド、及び同一抗原をコードするポリヌクレオチドを含有するブースティング免疫原性組成物の有効量を対象に投与するステップを含む。例示的全身性投与経路には、筋肉内及び皮内投与が含まれる。一実施形態では、方法は、（ｉ）筋肉内（ＩＭ）注射を介して、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）及び抗原をコードするポリヌクレオチドを含有するプライミング抗原の有効量を投与するステップ、並びに（ｉｉ）その後、筋肉内（ＩＭ）注射を介してポリ（アミン－コ－エステル）若しくはポリ（アミン－コ－アミド）、（ＰＡＣＥ）、ＰＡＣＥ－ＰＥＧブロックコポリマー及び／若しくはナノ粒子をより酸感受性にする追加のモノマーを含み得るＰＡＣＥポリマーブレンド、及び同一抗原をコードするポリヌクレオチドを含有するブースティング組成物の有効量を対象に投与する

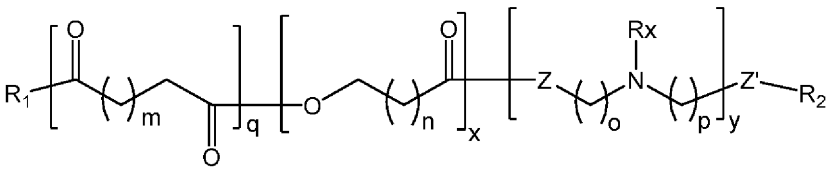
ステップを含む。一部の実施形態では、プライミング抗原は、脂質ナノ粒子内に結合又は封入された抗原をコードするメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を含む。例示的粘膜投与経路は、鼻腔の若しくは肺の系を含む又は粘膜表面（膣の、直腸の、頬側の、舌下の）に投与される。一部の実施形態では、粘膜又は鼻腔内投与のための組成物は、水性懸濁液、呼吸器飛沫又はエアロゾルを介するものである。一部の実施形態では、ＰＡＣＥポリマー及び抗原をコードするポリヌクレオチドは、粒子の形態にあり、任意選択的に、ＰＡＣＥポリマーは、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）コンジュゲートＰＡＣＥポリマーである。

【００２２】

一部の実施形態では、ＰＡＣＥポリマーは、式Ｉ：

【００２３】

【化１】



式I

［式中、ｎは、１～３０の整数であり、ｍ、ｏ及びｐは独立に、１～２０の整数であり、ｘ、ｙ及びｑは独立に、１～１０００の整数であり、Ｒは、水素、置換若しくは非置換アルキル、又は置換若しくは非置換アリール、又は置換若しくは非置換アルコキシであり、Ｚ及びＺ’は独立に、Ｏ又はＮＲ’であり、ここで、Ｒ’は、水素、置換若しくは非置換アルキル、又は置換若しくは非置換アリールであり、

R_1及びR_2は、存在しない又はヒドロキシル基、第一級アミン基、第二級アミン基、第三級アミン基若しくはそれらの組合せを含有する化学実体である］

のポリマーを含有する。固体ナノ粒子を形成するために、ラクトン含量の高いＰＡＣＥポリマーが使用される。

【００２４】

抗原に対する粘膜免疫を増強する方法において使用するための医薬組成物及びキットも提供される。

【図面の簡単な説明】

【００２５】

【図１Ａ】図１Ａ～１Ｎは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングが、粘膜体液性記憶を誘導することを示す。図１Ａは、実験スキーマである。マウスは、１μｇの全長ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（ＳＣＶ２）スパイクタンパク質をコードするｍＲＮＡ－ＬＮＰ（Ｐｆｉｚｅｒ／ＢｉｏＮＴｅｃｈ　ＢＮＴ１６２ｂ２）を用いて筋肉内に免疫化され、続いて、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ免疫化の１４日後に１μｇの融合前（ｐｒｅｆｕｓｉｏｎ）安定化型（Ｈｅｘａｐｒｏ）、三量体、組換えＳＣＶ２スパイクタンパク質を用いてＩＮ免疫化された。ＩＮブーストの１４日後、血清、ＢＡＬＦ及び鼻腔洗浄液を採取して、結合及び中和抗体応答を評価した。血管外Ｂ細胞分析のために肺組織を採取した。図１Ｂ～１Ｇは、未処置マウス、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭを用いて免疫化されたマウス（ＩＭプライム）、スパイクタンパク質ＩＮを用いて免疫化されたマウス（ＩＮスパイク）又はスパイクを用いてＩＭプライミングされ、ＩＮブーストされたマウス（Ｐ＆Ｓ）における、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図１Ｂ）鼻腔洗浄液ＩｇＡ、（図１Ｃ）鼻腔洗浄液ＩｇＧ、（図１Ｄ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図１Ｅ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図１Ｆ）血清ＩｇＡ及び（図１Ｇ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図１Ｈ～１Ｋは、ＢＡＬＦ（図１Ｈ）及び血清（図１Ｋ）におけるＳＣＶ２スパイク偽型水泡性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）に対する中和力価の測定値を示す。図１Ｊ～１Ｎは、ＣＤ４５　ＩＶ標識を使用して、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織においてＲＢＤ四量体結

合性Ｂ細胞、ＩｇＡ$^{+}$ Ｂ$_{RM}$細胞、ＩｇＧ$^{+}$ Ｂ$_{RM}$細胞、ＩｇＡ$^{+}$ ＡＳＣ及びＩｇＧ$^{+}$ ＡＳＣを含む種々の血管外（ＩＶ標識抗体陰性）Ｂ細胞サブセットが測定されたことを示す。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図１Ｂ）～（１Ｇ）］一元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）又は［（図１Ｈ）～（図１Ｎ）］スチューデントのｔ検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図１Ｂ】図１Ａ～１Ｎは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングが、粘膜体液性記憶を誘導することを示す。図１Ａは、実験スキーマである。マウスは、１μｇの全長ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（ＳＣＶ２）スパイクタンパク質をコードするｍＲＮＡ－ＬＮＰ（Ｐｆｉｚｅｒ／ＢｉｏＮＴｅｃｈ ＢＮＴ１６２ｂ２）を用いて筋肉内に免疫化され、続いて、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ免疫化の１４日後に１μｇの融合前（ｐｒｅｆｕｓｉｏｎ）安定化型（Ｈｅｘａｐｒｏ）、三量体、組換えＳＣＶ２スパイクタンパク質を用いてＩＮ免疫化された。ＩＮブーストの１４日後、血清、ＢＡＬＦ及び鼻腔洗浄液を採取して、結合及び中和抗体応答を評価した。血管外Ｂ細胞分析のために肺組織を採取した。図１Ｂ～１Ｇは、未処置マウス、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ ＩＭを用いて免疫化されたマウス（ＩＭプライム）、スパイクタンパク質ＩＮを用いて免疫化されたマウス（ＩＮスパイク）又はスパイクを用いてＩＭプライミングされ、ＩＮブーストされたマウス（Ｐ＆Ｓ）における、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図１Ｂ）鼻腔洗浄液ＩｇＡ、（図１Ｃ）鼻腔洗浄液ＩｇＧ、（図１Ｄ）ＢＡＬＦ ＩｇＡ、（図１Ｅ）ＢＡＬＦ ＩｇＧ、（図１Ｆ）血清ＩｇＡ及び（図１Ｇ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図１Ｈ～１Ｋは、ＢＡＬＦ（図１Ｈ）及び血清（図１Ｋ）におけるＳＣＶ２スパイク偽型水泡性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）に対する中和力価の測定値を示す。図１Ｊ～１Ｎは、ＣＤ４５ ＩＶ標識を使用して、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織においてＲＢＤ四量体結合性Ｂ細胞、ＩｇＡ$^{+}$ Ｂ$_{RM}$細胞、ＩｇＧ$^{+}$ Ｂ$_{RM}$細胞、ＩｇＡ$^{+}$ ＡＳＣ及びＩｇＧ$^{+}$ ＡＳＣを含む種々の血管外（ＩＶ標識抗体陰性）Ｂ細胞サブセットが測定されたことを示す。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図１Ｂ）～（１Ｇ）］一元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）又は［（図１Ｈ）～（図１Ｎ）］スチューデントのｔ検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図１Ｃ】図１Ａ～１Ｎは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングが、粘膜体液性記憶を誘導することを示す。図１Ａは、実験スキーマである。マウスは、１μｇの全長ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（ＳＣＶ２）スパイクタンパク質をコードするｍＲＮＡ－ＬＮＰ（Ｐｆｉｚｅｒ／ＢｉｏＮＴｅｃｈ ＢＮＴ１６２ｂ２）を用いて筋肉内に免疫化され、続いて、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ免疫化の１４日後に１μｇの融合前（ｐｒｅｆｕｓｉｏｎ）安定化型（Ｈｅｘａｐｒｏ）、三量体、組換えＳＣＶ２スパイクタンパク質を用いてＩＮ免疫化された。ＩＮブーストの１４日後、血清、ＢＡＬＦ及び鼻腔洗浄液を採取して、結合及び中和抗体応答を評価した。血管外Ｂ細胞分析のために肺組織を採取した。図１Ｂ～１Ｇは、未処置マウス、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ ＩＭを用いて免疫化されたマウス（ＩＭプライム）、スパイクタンパク質ＩＮを用いて免疫化されたマウス（ＩＮスパイク）又はスパイクを用いてＩＭプライミングされ、ＩＮブーストされたマウス（Ｐ＆Ｓ）における、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図１Ｂ）鼻腔洗浄液ＩｇＡ、（図１Ｃ）鼻腔洗浄液ＩｇＧ、（図１Ｄ）ＢＡＬＦ ＩｇＡ、（図１Ｅ）ＢＡＬＦ ＩｇＧ、（図１Ｆ）血清ＩｇＡ及び（図１Ｇ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図１Ｈ～１Ｋは、ＢＡＬＦ（図１Ｈ）及び血清（図１Ｋ）におけるＳＣＶ２スパイク偽型水泡性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）に対する中和力価の測定値を示す。図１Ｊ～１Ｎは、ＣＤ４５ ＩＶ標識を使用して、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織においてＲＢＤ四量体結合性Ｂ細胞、ＩｇＡ$^{+}$ Ｂ$_{RM}$細胞、ＩｇＧ$^{+}$ Ｂ$_{RM}$細胞、ＩｇＡ$^{+}$ ＡＳＣ及びＩｇＧ$^{+}$ ＡＳＣを含む種々の血管外（ＩＶ標識抗体陰性）Ｂ細胞サブセットが測定されたことを示す。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図１Ｂ）～（１Ｇ）］一元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）又は［（図１Ｈ）～（図１Ｎ）］スチューデントのｔ検定によって算出され

た；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図１Ｄ】図１Ａ～１Ｎは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングが、粘膜体液性記憶を誘導することを示す。図１Ａは、実験スキーマである。マウスは、１μｇの全長ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（ＳＣＶ２）スパイクタンパク質をコードするｍＲＮＡ－ＬＮＰ（Ｐｆｉｚｅｒ／ＢｉｏＮＴｅｃｈ　ＢＮＴ１６２ｂ２）を用いて筋肉内に免疫化され、続いて、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ免疫化の１４日後に１μｇの融合前（ｐｒｅｆｕｓｉｏｎ）安定化型（Ｈｅｘａｐｒｏ）、三量体、組換えＳＣＶ２スパイクタンパク質を用いてＩＮ免疫化された。ＩＮブーストの１４日後、血清、ＢＡＬＦ及び鼻腔洗浄液を採取して、結合及び中和抗体応答を評価した。血管外Ｂ細胞分析のために肺組織を採取した。図１Ｂ～１Ｇは、未処置マウス、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭを用いて免疫化されたマウス（ＩＭプライム）、スパイクタンパク質ＩＮを用いて免疫化されたマウス（ＩＮスパイク）又はスパイクを用いてＩＭプライミングされ、ＩＮブーストされたマウス（Ｐ＆Ｓ）における、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図１Ｂ）鼻腔洗浄液ＩｇＡ、（図１Ｃ）鼻腔洗浄液ＩｇＧ、（図１Ｄ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図１Ｅ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図１Ｆ）血清ＩｇＡ及び（図１Ｇ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図１Ｈ～１Ｋは、ＢＡＬＦ（図１Ｈ）及び血清（図１Ｋ）におけるＳＣＶ２スパイク偽型水泡性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）に対する中和力価の測定値を示す。図１Ｊ～１Ｎは、ＣＤ４５　ＩＶ標識を使用して、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織においてＲＢＤ四量体結合性Ｂ細胞、ＩｇＡ$^{+}$　$Ｂ_{RM}$細胞、ＩｇＧ$^{+}$　$Ｂ_{RM}$細胞、ＩｇＡ$^{+}$　ＡＳＣ及びＩｇＧ$^{+}$　ＡＳＣを含む種々の血管外（ＩＶ標識抗体陰性）Ｂ細胞サブセットが測定されたことを示す。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図１Ｂ）～（１Ｇ）］一元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）又は［（図１Ｈ）～（図１Ｎ）］スチューデントのｔ検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図１Ｅ】図１Ａ～１Ｎは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングが、粘膜体液性記憶を誘導することを示す。図１Ａは、実験スキーマである。マウスは、１μｇの全長ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（ＳＣＶ２）スパイクタンパク質をコードするｍＲＮＡ－ＬＮＰ（Ｐｆｉｚｅｒ／ＢｉｏＮＴｅｃｈ　ＢＮＴ１６２ｂ２）を用いて筋肉内に免疫化され、続いて、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ免疫化の１４日後に１μｇの融合前（ｐｒｅｆｕｓｉｏｎ）安定化型（Ｈｅｘａｐｒｏ）、三量体、組換えＳＣＶ２スパイクタンパク質を用いてＩＮ免疫化された。ＩＮブーストの１４日後、血清、ＢＡＬＦ及び鼻腔洗浄液を採取して、結合及び中和抗体応答を評価した。血管外Ｂ細胞分析のために肺組織を採取した。図１Ｂ～１Ｇは、未処置マウス、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭを用いて免疫化されたマウス（ＩＭプライム）、スパイクタンパク質ＩＮを用いて免疫化されたマウス（ＩＮスパイク）又はスパイクを用いてＩＭプライミングされ、ＩＮブーストされたマウス（Ｐ＆Ｓ）における、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図１Ｂ）鼻腔洗浄液ＩｇＡ、（図１Ｃ）鼻腔洗浄液ＩｇＧ、（図１Ｄ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図１Ｅ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図１Ｆ）血清ＩｇＡ及び（図１Ｇ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図１Ｈ～１Ｋは、ＢＡＬＦ（図１Ｈ）及び血清（図１Ｋ）におけるＳＣＶ２スパイク偽型水泡性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）に対する中和力価の測定値を示す。図１Ｊ～１Ｎは、ＣＤ４５　ＩＶ標識を使用して、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織においてＲＢＤ四量体結合性Ｂ細胞、ＩｇＡ$^{+}$　$Ｂ_{RM}$細胞、ＩｇＧ$^{+}$　$Ｂ_{RM}$細胞、ＩｇＡ$^{+}$　ＡＳＣ及びＩｇＧ$^{+}$　ＡＳＣを含む種々の血管外（ＩＶ標識抗体陰性）Ｂ細胞サブセットが測定されたことを示す。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図１Ｂ）～（１Ｇ）］一元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）又は［（図１Ｈ）～（図１Ｎ）］スチューデントのｔ検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図１Ｆ】図１Ａ～１Ｎは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングが、粘膜体液性記憶を誘導することを示す。図１Ａは、実験スキーマである

。マウスは、１μｇの全長ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（ＳＣＶ２）スパイクタンパク質をコードするｍＲＮＡ－ＬＮＰ（Ｐｆｉｚｅｒ／ＢｉｏＮＴｅｃｈ　ＢＮＴ１６２ｂ２）を用いて筋肉内に免疫化され、続いて、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ免疫化の１４日後に１μｇの融合前（ｐｒｅｆｕｓｉｏｎ）安定化型（Ｈｅｘａｐｒｏ）、三量体、組換えＳＣＶ２スパイクタンパク質を用いてＩＮ免疫化された。ＩＮブーストの１４日後、血清、ＢＡＬＦ及び鼻腔洗浄液を採取して、結合及び中和抗体応答を評価した。血管外Ｂ細胞分析のために肺組織を採取した。図１Ｂ～１Ｇは、未処置マウス、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭを用いて免疫化されたマウス（ＩＭプライム）、スパイクタンパク質ＩＮを用いて免疫化されたマウス（ＩＮスパイク）又はスパイクを用いてＩＭプライミングされ、ＩＮブーストされたマウス（Ｐ＆Ｓ）における、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図１Ｂ）鼻腔洗浄液ＩｇＡ、（図１Ｃ）鼻腔洗浄液ＩｇＧ、（図１Ｄ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図１Ｅ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図１Ｆ）血清ＩｇＡ及び（図１Ｇ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図１Ｈ～１Ｋは、ＢＡＬＦ（図１Ｈ）及び血清（図１Ｋ）におけるＳＣＶ２スパイク偽型水泡性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）に対する中和力価の測定値を示す。図１Ｊ～１Ｎは、ＣＤ４５　ＩＶ標識を使用して、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織においてＲＢＤ四量体結合性Ｂ細胞、IgA^+ B_{RM}細胞、IgG^+ B_{RM}細胞、IgA^+ ＡＳＣ及びIgG^+ ＡＳＣを含む種々の血管外（ＩＶ標識抗体陰性）Ｂ細胞サブセットが測定されたことを示す。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図１Ｂ）～（１Ｇ）］一元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）又は［（図１Ｈ）～（図１Ｎ）］スチューデントのｔ検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図１Ｇ】図１Ａ～１Ｎは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングが、粘膜体液性記憶を誘導することを示す。図１Ａは、実験スキーマである。マウスは、１μｇの全長ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（ＳＣＶ２）スパイクタンパク質をコードするｍＲＮＡ－ＬＮＰ（Ｐｆｉｚｅｒ／ＢｉｏＮＴｅｃｈ　ＢＮＴ１６２ｂ２）を用いて筋肉内に免疫化され、続いて、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ免疫化の１４日後に１μｇの融合前（ｐｒｅｆｕｓｉｏｎ）安定化型（Ｈｅｘａｐｒｏ）、三量体、組換えＳＣＶ２スパイクタンパク質を用いてＩＮ免疫化された。ＩＮブーストの１４日後、血清、ＢＡＬＦ及び鼻腔洗浄液を採取して、結合及び中和抗体応答を評価した。血管外Ｂ細胞分析のために肺組織を採取した。図１Ｂ～１Ｇは、未処置マウス、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭを用いて免疫化されたマウス（ＩＭプライム）、スパイクタンパク質ＩＮを用いて免疫化されたマウス（ＩＮスパイク）又はスパイクを用いてＩＭプライミングされ、ＩＮブーストされたマウス（Ｐ＆Ｓ）における、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図１Ｂ）鼻腔洗浄液ＩｇＡ、（図１Ｃ）鼻腔洗浄液ＩｇＧ、（図１Ｄ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図１Ｅ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図１Ｆ）血清ＩｇＡ及び（図１Ｇ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図１Ｈ～１Ｋは、ＢＡＬＦ（図１Ｈ）及び血清（図１Ｋ）におけるＳＣＶ２スパイク偽型水泡性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）に対する中和力価の測定値を示す。図１Ｊ～１Ｎは、ＣＤ４５　ＩＶ標識を使用して、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織においてＲＢＤ四量体結合性Ｂ細胞、IgA^+ B_{RM}細胞、IgG^+ B_{RM}細胞、IgA^+ ＡＳＣ及びIgG^+ ＡＳＣを含む種々の血管外（ＩＶ標識抗体陰性）Ｂ細胞サブセットが測定されたことを示す。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図１Ｂ）～（１Ｇ）］一元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）又は［（図１Ｈ）～（図１Ｎ）］スチューデントのｔ検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図１Ｈ】図１Ａ～１Ｎは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングが、粘膜体液性記憶を誘導することを示す。図１Ａは、実験スキーマである。マウスは、１μｇの全長ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（ＳＣＶ２）スパイクタンパク質をコードするｍＲＮＡ－ＬＮＰ（Ｐｆｉｚｅｒ／ＢｉｏＮＴｅｃｈ　ＢＮＴ１６２ｂ２）を用いて筋肉内に免疫化され、続いて、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ免疫化の１４日後に１μｇの融合前（ｐｒｅｆｕｓｉｏｎ）安定化型（Ｈｅｘａｐｒｏ）、三量体、組換えＳＣＶ２スパイクタ

ンパク質を用いてＩＮ免疫化された。ＩＮブーストの１４日後、血清、ＢＡＬＦ及び鼻腔洗浄液を採取して、結合及び中和抗体応答を評価した。血管外Ｂ細胞分析のために肺組織を採取した。図１Ｂ～１Ｇは、未処置マウス、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭを用いて免疫化されたマウス（ＩＭプライム）、スパイクタンパク質ＩＮを用いて免疫化されたマウス（ＩＮスパイク）又はスパイクを用いてＩＭプライミングされ、ＩＮブーストされたマウス（Ｐ＆Ｓ）における、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図１Ｂ）鼻腔洗浄液ＩｇＡ、（図１Ｃ）鼻腔洗浄液ＩｇＧ、（図１Ｄ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図１Ｅ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図１Ｆ）血清ＩｇＡ及び（図１Ｇ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図１Ｈ～１Ｋは、ＢＡＬＦ（図１Ｈ）及び血清（図１Ｋ）におけるＳＣＶ２スパイク偽型水泡性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）に対する中和力価の測定値を示す。図１Ｊ～１Ｎは、ＣＤ４５　ＩＶ標識を使用して、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織においてＲＢＤ四量体結合性Ｂ細胞、ＩｇＡ$^{+}$　B_{RM}細胞、ＩｇＧ$^{+}$　B_{RM}細胞、ＩｇＡ$^{+}$　ＡＳＣ及びＩｇＧ$^{+}$　ＡＳＣを含む種々の血管外（ＩＶ標識抗体陰性）Ｂ細胞サブセットが測定されたことを示す。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図１Ｂ）～（１Ｇ）］一元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）又は［（図１Ｈ）～（図１Ｎ）］スチューデントのｔ検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図１Ｉ】図１Ａ～１Ｎは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングが、粘膜体液性記憶を誘導することを示す。図１Ａは、実験スキーマである。マウスは、１μｇの全長ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（ＳＣＶ２）スパイクタンパク質をコードするｍＲＮＡ－ＬＮＰ（Ｐｆｉｚｅｒ／ＢｉｏＮＴｅｃｈ　ＢＮＴ１６２ｂ２）を用いて筋肉内に免疫化され、続いて、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ免疫化の１４日後に１μｇの融合前（ｐｒｅｆｕｓｉｏｎ）安定化型（Ｈｅｘａｐｒｏ）、三量体、組換えＳＣＶ２スパイクタンパク質を用いてＩＮ免疫化された。ＩＮブーストの１４日後、血清、ＢＡＬＦ及び鼻腔洗浄液を採取して、結合及び中和抗体応答を評価した。血管外Ｂ細胞分析のために肺組織を採取した。図１Ｂ～１Ｇは、未処置マウス、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭを用いて免疫化されたマウス（ＩＭプライム）、スパイクタンパク質ＩＮを用いて免疫化されたマウス（ＩＮスパイク）又はスパイクを用いてＩＭプライミングされ、ＩＮブーストされたマウス（Ｐ＆Ｓ）における、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図１Ｂ）鼻腔洗浄液ＩｇＡ、（図１Ｃ）鼻腔洗浄液ＩｇＧ、（図１Ｄ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図１Ｅ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図１Ｆ）血清ＩｇＡ及び（図１Ｇ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図１Ｈ～１Ｋは、ＢＡＬＦ（図１Ｈ）及び血清（図１Ｋ）におけるＳＣＶ２スパイク偽型水泡性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）に対する中和力価の測定値を示す。図１Ｊ～１Ｎは、ＣＤ４５　ＩＶ標識を使用して、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織においてＲＢＤ四量体結合性Ｂ細胞、ＩｇＡ$^{+}$　B_{RM}細胞、ＩｇＧ$^{+}$　B_{RM}細胞、ＩｇＡ$^{+}$　ＡＳＣ及びＩｇＧ$^{+}$　ＡＳＣを含む種々の血管外（ＩＶ標識抗体陰性）Ｂ細胞サブセットが測定されたことを示す。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図１Ｂ）～（１Ｇ）］一元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）又は［（図１Ｈ）～（図１Ｎ）］スチューデントのｔ検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図１Ｊ】図１Ａ～１Ｎは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングが、粘膜体液性記憶を誘導することを示す。図１Ａは、実験スキーマである。マウスは、１μｇの全長ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（ＳＣＶ２）スパイクタンパク質をコードするｍＲＮＡ－ＬＮＰ（Ｐｆｉｚｅｒ／ＢｉｏＮＴｅｃｈ　ＢＮＴ１６２ｂ２）を用いて筋肉内に免疫化され、続いて、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ免疫化の１４日後に１μｇの融合前（ｐｒｅｆｕｓｉｏｎ）安定化型（Ｈｅｘａｐｒｏ）、三量体、組換えＳＣＶ２スパイクタンパク質を用いてＩＮ免疫化された。ＩＮブーストの１４日後、血清、ＢＡＬＦ及び鼻腔洗浄液を採取して、結合及び中和抗体応答を評価した。血管外Ｂ細胞分析のために肺組織を採取した。図１Ｂ～１Ｇは、未処置マウス、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭを用いて免疫化されたマウス（ＩＭプライム）、スパイクタンパク質ＩＮを用いて免疫化されたマウス（Ｉ

Ｎスパイク）又はスパイクを用いてＩＭプライミングされ、ＩＮブーストされたマウス（Ｐ＆Ｓ）における、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図１Ｂ）鼻腔洗浄液ＩｇＡ、（図１Ｃ）鼻腔洗浄液ＩｇＧ、（図１Ｄ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図１Ｅ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図１Ｆ）血清ＩｇＡ及び（図１Ｇ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図１Ｈ～１Ｋは、ＢＡＬＦ（図１Ｈ）及び血清（図１Ｋ）におけるＳＣＶ２スパイク偽型水泡性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）に対する中和力価の測定値を示す。図１Ｊ～１Ｎは、ＣＤ４５　ＩＶ標識を使用して、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織においてＲＢＤ四量体結合性Ｂ細胞、ＩｇＡ$^{+}$　B_{RM}細胞、ＩｇＧ$^{+}$　B_{RM}細胞、ＩｇＡ$^{+}$　ＡＳＣ及びＩｇＧ$^{+}$　ＡＳＣを含む種々の血管外（ＩＶ標識抗体陰性）Ｂ細胞サブセットが測定されたことを示す。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図１Ｂ）～（１Ｇ）］一元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）又は［（図１Ｈ）～（図１Ｎ）］スチューデントのｔ検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図１Ｋ】図１Ａ～１Ｎは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングが、粘膜体液性記憶を誘導することを示す。図１Ａは、実験スキーマである。マウスは、１μｇの全長ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（ＳＣＶ２）スパイクタンパク質をコードするｍＲＮＡ－ＬＮＰ（Ｐｆｉｚｅｒ／ＢｉｏＮＴｅｃｈ　ＢＮＴ１６２ｂ２）を用いて筋肉内に免疫化され、続いて、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ免疫化の１４日後に１μｇの融合前（ｐｒｅｆｕｓｉｏｎ）安定化型（Ｈｅｘａｐｒｏ）、三量体、組換えＳＣＶ２スパイクタンパク質を用いてＩＮ免疫化された。ＩＮブーストの１４日後、血清、ＢＡＬＦ及び鼻腔洗浄液を採取して、結合及び中和抗体応答を評価した。血管外Ｂ細胞分析のために肺組織を採取した。図１Ｂ～１Ｇは、未処置マウス、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭを用いて免疫化されたマウス（ＩＭプライム）、スパイクタンパク質ＩＮを用いて免疫化されたマウス（ＩＮスパイク）又はスパイクを用いてＩＭプライミングされ、ＩＮブーストされたマウス（Ｐ＆Ｓ）における、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図１Ｂ）鼻腔洗浄液ＩｇＡ、（図１Ｃ）鼻腔洗浄液ＩｇＧ、（図１Ｄ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図１Ｅ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図１Ｆ）血清ＩｇＡ及び（図１Ｇ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図１Ｈ～１Ｋは、ＢＡＬＦ（図１Ｈ）及び血清（図１Ｋ）におけるＳＣＶ２スパイク偽型水泡性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）に対する中和力価の測定値を示す。図１Ｊ～１Ｎは、ＣＤ４５　ＩＶ標識を使用して、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織においてＲＢＤ四量体結合性Ｂ細胞、ＩｇＡ$^{+}$　B_{RM}細胞、ＩｇＧ$^{+}$　B_{RM}細胞、ＩｇＡ$^{+}$　ＡＳＣ及びＩｇＧ$^{+}$　ＡＳＣを含む種々の血管外（ＩＶ標識抗体陰性）Ｂ細胞サブセットが測定されたことを示す。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図１Ｂ）～（１Ｇ）］一元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）又は［（図１Ｈ）～（図１Ｎ）］スチューデントのｔ検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図１Ｌ】図１Ａ～１Ｎは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングが、粘膜体液性記憶を誘導することを示す。図１Ａは、実験スキーマである。マウスは、１μｇの全長ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（ＳＣＶ２）スパイクタンパク質をコードするｍＲＮＡ－ＬＮＰ（Ｐｆｉｚｅｒ／ＢｉｏＮＴｅｃｈ　ＢＮＴ１６２ｂ２）を用いて筋肉内に免疫化され、続いて、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ免疫化の１４日後に１μｇの融合前（ｐｒｅｆｕｓｉｏｎ）安定化型（Ｈｅｘａｐｒｏ）、三量体、組換えＳＣＶ２スパイクタンパク質を用いてＩＮ免疫化された。ＩＮブーストの１４日後、血清、ＢＡＬＦ及び鼻腔洗浄液を採取して、結合及び中和抗体応答を評価した。血管外Ｂ細胞分析のために肺組織を採取した。図１Ｂ～１Ｇは、未処置マウス、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭを用いて免疫化されたマウス（ＩＭプライム）、スパイクタンパク質ＩＮを用いて免疫化されたマウス（ＩＮスパイク）又はスパイクを用いてＩＭプライミングされ、ＩＮブーストされたマウス（Ｐ＆Ｓ）における、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図１Ｂ）鼻腔洗浄液ＩｇＡ、（図１Ｃ）鼻腔洗浄液ＩｇＧ、（図１Ｄ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図１Ｅ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図１Ｆ）血清ＩｇＡ及び（図１Ｇ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図１Ｈ～１Ｋ

は、ＢＡＬＦ（図１Ｈ）及び血清（図１Ｋ）におけるＳＣＶ２スパイク偽型水泡性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）に対する中和力価の測定値を示す。図１Ｊ～１Ｎは、ＣＤ４５　ＩＶ標識を使用して、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織においてＲＢＤ四量体結合性Ｂ細胞、ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ$_{RM}$細胞、ＩｇＧ$^{+}$　Ｂ$_{RM}$細胞、ＩｇＡ$^{+}$　ＡＳＣ及びＩｇＧ$^{+}$　ＡＳＣを含む種々の血管外（ＩＶ標識抗体陰性）Ｂ細胞サブセットが測定されたことを示す。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図１Ｂ）～（１Ｇ）］一元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）又は［（図１Ｈ）～（図１Ｎ）］スチューデントのｔ検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図１Ｍ】図１Ａ～１Ｎは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングが、粘膜体液性記憶を誘導することを示す。図１Ａは、実験スキーマである。マウスは、１μｇの全長ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（ＳＣＶ２）スパイクタンパク質をコードするｍＲＮＡ－ＬＮＰ（Ｐｆｉｚｅｒ／ＢｉｏＮＴｅｃｈ　ＢＮＴ１６２ｂ２）を用いて筋肉内に免疫化され、続いて、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ免疫化の１４日後に１μｇの融合前（ｐｒｅｆｕｓｉｏｎ）安定化型（Ｈｅｘａｐｒｏ）、三量体、組換えＳＣＶ２スパイクタンパク質を用いてＩＮ免疫化された。ＩＮブーストの１４日後、血清、ＢＡＬＦ及び鼻腔洗浄液を採取して、結合及び中和抗体応答を評価した。血管外Ｂ細胞分析のために肺組織を採取した。図１Ｂ～１Ｇは、未処置マウス、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭを用いて免疫化されたマウス（ＩＭプライム）、スパイクタンパク質ＩＮを用いて免疫化されたマウス（ＩＮスパイク）又はスパイクを用いてＩＭプライミングされ、ＩＮブーストされたマウス（Ｐ＆Ｓ）における、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図１Ｂ）鼻腔洗浄液ＩｇＡ、（図１Ｃ）鼻腔洗浄液ＩｇＧ、（図１Ｄ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図１Ｅ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図１Ｆ）血清ＩｇＡ及び（図１Ｇ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図１Ｈ～１Ｋは、ＢＡＬＦ（図１Ｈ）及び血清（図１Ｋ）におけるＳＣＶ２スパイク偽型水泡性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）に対する中和力価の測定値を示す。図１Ｊ～１Ｎは、ＣＤ４５　ＩＶ標識を使用して、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織においてＲＢＤ四量体結合性Ｂ細胞、ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ$_{RM}$細胞、ＩｇＧ$^{+}$　Ｂ$_{RM}$細胞、ＩｇＡ$^{+}$　ＡＳＣ及びＩｇＧ$^{+}$　ＡＳＣを含む種々の血管外（ＩＶ標識抗体陰性）Ｂ細胞サブセットが測定されたことを示す。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図１Ｂ）～（１Ｇ）］一元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）又は［（図１Ｈ）～（図１Ｎ）］スチューデントのｔ検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図１Ｎ】図１Ａ～１Ｎは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングが、粘膜体液性記憶を誘導することを示す。図１Ａは、実験スキーマである。マウスは、１μｇの全長ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（ＳＣＶ２）スパイクタンパク質をコードするｍＲＮＡ－ＬＮＰ（Ｐｆｉｚｅｒ／ＢｉｏＮＴｅｃｈ　ＢＮＴ１６２ｂ２）を用いて筋肉内に免疫化され、続いて、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ免疫化の１４日後に１μｇの融合前（ｐｒｅｆｕｓｉｏｎ）安定化型（Ｈｅｘａｐｒｏ）、三量体、組換えＳＣＶ２スパイクタンパク質を用いてＩＮ免疫化された。ＩＮブーストの１４日後、血清、ＢＡＬＦ及び鼻腔洗浄液を採取して、結合及び中和抗体応答を評価した。血管外Ｂ細胞分析のために肺組織を採取した。図１Ｂ～１Ｇは、未処置マウス、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭを用いて免疫化されたマウス（ＩＭプライム）、スパイクタンパク質ＩＮを用いて免疫化されたマウス（ＩＮスパイク）又はスパイクを用いてＩＭプライミングされ、ＩＮブーストされたマウス（Ｐ＆Ｓ）における、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図１Ｂ）鼻腔洗浄液ＩｇＡ、（図１Ｃ）鼻腔洗浄液ＩｇＧ、（図１Ｄ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図１Ｅ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図１Ｆ）血清ＩｇＡ及び（図１Ｇ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図１Ｈ～１Ｋは、ＢＡＬＦ（図１Ｈ）及び血清（図１Ｋ）におけるＳＣＶ２スパイク偽型水泡性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）に対する中和力価の測定値を示す。図１Ｊ～１Ｎは、ＣＤ４５　ＩＶ標識を使用して、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織においてＲＢＤ四量体結合性Ｂ細胞、ＩｇＡ$^{+}$　Ｂ$_{RM}$細胞、ＩｇＧ$^{+}$　Ｂ$_{RM}$細胞、ＩｇＡ$^{+}$　ＡＳＣ及びＩｇＧ

$^{+}$ ＡＳＣを含む種々の血管外（ＩＶ標識抗体陰性）Ｂ細胞サブセットが測定されたことを示す。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図１Ｂ）～（１Ｇ）］一元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）又は［（図１Ｈ）～（図１Ｎ）］スチューデントのｔ検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図２Ａ】図２Ａ～２Ｏは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングが粘膜Ｔ細胞記憶を誘導することを示す。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、１４日後、１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブーストされた。血管外Ｔ細胞分析のために、肺組織、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介を採取した。肺組織はブーストの１４日後に採取したが、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介は、ブーストの７日後に得た。図２Ａ～２Ｉは、血管外ＣＤ８Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ａ）～（図２Ｃ）］肺組織、［（図２Ｄ）～（図２Ｆ）］ＢＡＬＦ又は［（図２Ｇ）～（図２Ｉ）］鼻腔の鼻甲介における、ＳＣＶ２スパイク特異的四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化が示されている。図２Ｊ～２Ｏは、血管外ＣＤ４Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ｊ）～（図２Ｌ）］肺組織又は［（図２Ｍ）～（図２Ｏ）］ＢＡＬＦにおける、活性化ポリクローナルＣＤ４Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化が示されている。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図２Ｂ）～（図２Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図２Ｂ】図２Ａ～２Ｏは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングが粘膜Ｔ細胞記憶を誘導することを示す。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、１４日後、１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブーストされた。血管外Ｔ細胞分析のために、肺組織、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介を採取した。肺組織はブーストの１４日後に採取したが、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介は、ブーストの７日後に得た。図２Ａ～２Ｉは、血管外ＣＤ８Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ａ）～（図２Ｃ）］肺組織、［（図２Ｄ）～（図２Ｆ）］ＢＡＬＦ又は［（図２Ｇ）～（図２Ｉ）］鼻腔の鼻甲介における、ＳＣＶ２スパイク特異的四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化が示されている。図２Ｊ～２Ｏは、血管外ＣＤ４Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ｊ）～（図２Ｌ）］肺組織又は［（図２Ｍ）～（図２Ｏ）］ＢＡＬＦにおける、活性化ポリクローナルＣＤ４Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化が示されている。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図２Ｂ）～（図２Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図２Ｃ】図２Ａ～２Ｏは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングが粘膜Ｔ細胞記憶を誘導することを示す。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、１４日後、１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブーストされた。血管外Ｔ細胞分析のために、肺組織、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介を採取した。肺組織はブーストの１４日後に採取したが、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介は、ブーストの７日後に得た。図２Ａ～２Ｉは、血管外ＣＤ８Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ａ）～（図２Ｃ）］肺組織、［（図２Ｄ）～（図２Ｆ）］ＢＡＬＦ又は［（図２Ｇ）～（図２Ｉ）］鼻腔の鼻甲介における、ＳＣＶ２スパイク特異的四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９

＋ＣＤ１０３－四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞の定量化が示されている。図２Ｊ～２Ｏは、血管外ＣＤ４Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ｊ）～（図２Ｌ）］肺組織又は［（図２Ｍ）～（図２Ｏ）］ＢＡＬＦにおける、活性化ポリクローナルＣＤ４Ｔ細胞、ＣＤ６９＋ＣＤ１０３－ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋ＣＤ４Ｔ細胞の定量化が示されている。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図２Ｂ）～（図２Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図２Ｄ】図２Ａ～２Ｏは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングが粘膜Ｔ細胞記憶を誘導することを示す。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、１４日後、１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブーストされた。血管外Ｔ細胞分析のために、肺組織、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介を採取した。肺組織はブーストの１４日後に採取したが、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介は、ブーストの７日後に得た。図２Ａ～２Ｉは、血管外ＣＤ８Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ａ）～（図２Ｃ）］肺組織、［（図２Ｄ）～（図２Ｆ）］ＢＡＬＦ又は［（図２Ｇ）～（図２Ｉ）］鼻腔の鼻甲介における、ＳＣＶ２スパイク特異的四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９＋ＣＤ１０３－四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞の定量化が示されている。図２Ｊ～２Ｏは、血管外ＣＤ４Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ｊ）～（図２Ｌ）］肺組織又は［（図２Ｍ）～（図２Ｏ）］ＢＡＬＦにおける、活性化ポリクローナルＣＤ４Ｔ細胞、ＣＤ６９＋ＣＤ１０３－ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋ＣＤ４Ｔ細胞の定量化が示されている。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図２Ｂ）～（図２Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図２Ｅ】図２Ａ～２Ｏは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングが粘膜Ｔ細胞記憶を誘導することを示す。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、１４日後、１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブーストされた。血管外Ｔ細胞分析のために、肺組織、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介を採取した。肺組織はブーストの１４日後に採取したが、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介は、ブーストの７日後に得た。図２Ａ～２Ｉは、血管外ＣＤ８Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ａ）～（図２Ｃ）］肺組織、［（図２Ｄ）～（図２Ｆ）］ＢＡＬＦ又は［（図２Ｇ）～（図２Ｉ）］鼻腔の鼻甲介における、ＳＣＶ２スパイク特異的四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９＋ＣＤ１０３－四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞の定量化が示されている。図２Ｊ～２Ｏは、血管外ＣＤ４Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ｊ）～（図２Ｌ）］肺組織又は［（図２Ｍ）～（図２Ｏ）］ＢＡＬＦにおける、活性化ポリクローナルＣＤ４Ｔ細胞、ＣＤ６９＋ＣＤ１０３－ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋ＣＤ４Ｔ細胞の定量化が示されている。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図２Ｂ）～（図２Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図２Ｆ】図２Ａ～２Ｏは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングが粘膜Ｔ細胞記憶を誘導することを示す。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、１４日後、１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブーストされた。血管外Ｔ細胞分析のために、肺組織、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介を採取した。肺組織はブーストの１４日後に採取したが、ＢＡＬＦ

及び鼻腔の鼻甲介は、ブーストの７日後に得た。図２Ａ～２Ｉは、血管外ＣＤ８Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ａ）～（図２Ｃ）］肺組織、［（図２Ｄ）～（図２Ｆ）］ＢＡＬＦ又は［（図２Ｇ）～（図２Ｉ）］鼻腔の鼻甲介における、ＳＣＶ２スパイク特異的四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化が示されている。図２Ｊ～２Ｏは、血管外ＣＤ４Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ｊ）～（図２Ｌ）］肺組織又は［（図２Ｍ）～（図２Ｏ）］ＢＡＬＦにおける、活性化ポリクローナルＣＤ４Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化が示されている。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図２Ｂ）～（図２Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図２Ｇ】図２Ａ～２Ｏは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングが粘膜Ｔ細胞記憶を誘導することを示す。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、１４日後、１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブーストされた。血管外Ｔ細胞分析のために、肺組織、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介を採取した。肺組織はブーストの１４日後に採取したが、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介は、ブーストの７日後に得た。図２Ａ～２Ｉは、血管外ＣＤ８Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ａ）～（図２Ｃ）］肺組織、［（図２Ｄ）～（図２Ｆ）］ＢＡＬＦ又は［（図２Ｇ）～（図２Ｉ）］鼻腔の鼻甲介における、ＳＣＶ２スパイク特異的四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化が示されている。図２Ｊ～２Ｏは、血管外ＣＤ４Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ｊ）～（図２Ｌ）］肺組織又は［（図２Ｍ）～（図２Ｏ）］ＢＡＬＦにおける、活性化ポリクローナルＣＤ４Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化が示されている。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図２Ｂ）～（図２Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図２Ｈ】図２Ａ～２Ｏは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングが粘膜Ｔ細胞記憶を誘導することを示す。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、１４日後、１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブーストされた。血管外Ｔ細胞分析のために、肺組織、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介を採取した。肺組織はブーストの１４日後に採取したが、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介は、ブーストの７日後に得た。図２Ａ～２Ｉは、血管外ＣＤ８Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ａ）～（図２Ｃ）］肺組織、［（図２Ｄ）～（図２Ｆ）］ＢＡＬＦ又は［（図２Ｇ）～（図２Ｉ）］鼻腔の鼻甲介における、ＳＣＶ２スパイク特異的四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化が示されている。図２Ｊ～２Ｏは、血管外ＣＤ４Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ｊ）～（図２Ｌ）］肺組織又は［（図２Ｍ）～（図２Ｏ）］ＢＡＬＦにおける、活性化ポリクローナルＣＤ４Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化が示されている。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図２Ｂ）～（図２Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図２Ｉ】図２Ａ～２Ｏは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブ

ースティングが粘膜Ｔ細胞記憶を誘導することを示す。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、１４日後、１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブーストされた。血管外Ｔ細胞分析のために、肺組織、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介を採取した。肺組織はブーストの１４日後に採取したが、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介は、ブーストの７日後に得た。図２Ａ～２Ｉは、血管外ＣＤ８Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ａ）～（図２Ｃ）］肺組織、［（図２Ｄ）～（図２Ｆ）］ＢＡＬＦ又は［（図２Ｇ）～（図２Ｉ）］鼻腔の鼻甲介における、ＳＣＶ２スパイク特異的四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化が示されている。図２Ｊ～２Ｏは、血管外ＣＤ４Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ｊ）～（図２Ｌ）］肺組織又は［（図２Ｍ）～（図２Ｏ）］ＢＡＬＦにおける、活性化ポリクローナルＣＤ４Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化が示されている。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図２Ｂ）～（図２Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図２Ｊ】図２Ａ～２Ｏは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングが粘膜Ｔ細胞記憶を誘導することを示す。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、１４日後、１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブーストされた。血管外Ｔ細胞分析のために、肺組織、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介を採取した。肺組織はブーストの１４日後に採取したが、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介は、ブーストの７日後に得た。図２Ａ～２Ｉは、血管外ＣＤ８Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ａ）～（図２Ｃ）］肺組織、［（図２Ｄ）～（図２Ｆ）］ＢＡＬＦ又は［（図２Ｇ）～（図２Ｉ）］鼻腔の鼻甲介における、ＳＣＶ２スパイク特異的四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化が示されている。図２Ｊ～２Ｏは、血管外ＣＤ４Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ｊ）～（図２Ｌ）］肺組織又は［（図２Ｍ）～（図２Ｏ）］ＢＡＬＦにおける、活性化ポリクローナルＣＤ４Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化が示されている。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図２Ｂ）～（図２Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図２Ｋ】図２Ａ～２Ｏは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングが粘膜Ｔ細胞記憶を誘導することを示す。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、１４日後、１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブーストされた。血管外Ｔ細胞分析のために、肺組織、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介を採取した。肺組織はブーストの１４日後に採取したが、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介は、ブーストの７日後に得た。図２Ａ～２Ｉは、血管外ＣＤ８Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ａ）～（図２Ｃ）］肺組織、［（図２Ｄ）～（図２Ｆ）］ＢＡＬＦ又は［（図２Ｇ）～（図２Ｉ）］鼻腔の鼻甲介における、ＳＣＶ２スパイク特異的四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化が示されている。図２Ｊ～２Ｏは、血管外ＣＤ４Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ｊ）～（図２Ｌ）］肺組織又は［（図２Ｍ）～（図２Ｏ）］ＢＡＬＦにおける、活性化ポリクローナルＣＤ４Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化が示されている。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図２Ｂ）～（図２Ｏ）］一元配

置ＡＮＯＶＡと、続いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図２Ｌ】図２Ａ～２Ｏは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングが粘膜Ｔ細胞記憶を誘導することを示す。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、１４日後、１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブーストされた。血管外Ｔ細胞分析のために、肺組織、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介を採取した。肺組織はブーストの１４日後に採取したが、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介は、ブーストの７日後に得た。図２Ａ～２Ｉは、血管外ＣＤ８Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ａ）～（図２Ｃ）］肺組織、［（図２Ｄ）～（図２Ｆ）］ＢＡＬＦ又は［（図２Ｇ）～（図２Ｉ）］鼻腔の鼻甲介における、ＳＣＶ２スパイク特異的四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化が示されている。図２Ｊ～２Ｏは、血管外ＣＤ４Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ｊ）～（図２Ｌ）］肺組織又は［（図２Ｍ）～（図２Ｏ）］ＢＡＬＦにおける、活性化ポリクローナルＣＤ４Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化が示されている。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図２Ｂ）～（図２Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図２Ｍ】図２Ａ～２Ｏは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングが粘膜Ｔ細胞記憶を誘導することを示す。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、１４日後、１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブーストされた。血管外Ｔ細胞分析のために、肺組織、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介を採取した。肺組織はブーストの１４日後に採取したが、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介は、ブーストの７日後に得た。図２Ａ～２Ｉは、血管外ＣＤ８Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ａ）～（図２Ｃ）］肺組織、［（図２Ｄ）～（図２Ｆ）］ＢＡＬＦ又は［（図２Ｇ）～（図２Ｉ）］鼻腔の鼻甲介における、ＳＣＶ２スパイク特異的四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化が示されている。図２Ｊ～２Ｏは、血管外ＣＤ４Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ｊ）～（図２Ｌ）］肺組織又は［（図２Ｍ）～（図２Ｏ）］ＢＡＬＦにおける、活性化ポリクローナルＣＤ４Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化が示されている。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図２Ｂ）～（図２Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図２Ｎ】図２Ａ～２Ｏは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングが粘膜Ｔ細胞記憶を誘導することを示す。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、１４日後、１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブーストされた。血管外Ｔ細胞分析のために、肺組織、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介を採取した。肺組織はブーストの１４日後に採取したが、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介は、ブーストの７日後に得た。図２Ａ～２Ｉは、血管外ＣＤ８Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ａ）～（図２Ｃ）］肺組織、［（図２Ｄ）～（図２Ｆ）］ＢＡＬＦ又は［（図２Ｇ）～（図２Ｉ）］鼻腔の鼻甲介における、ＳＣＶ２スパイク特異的四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化が示されている。図２Ｊ～２Ｏは、血管外ＣＤ４Ｔ細胞応答を示す。未処置、Ｉ

Ｍプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ｊ）～（図２Ｌ）］肺組織又は［（図２Ｍ）～（図２Ｏ）］ＢＡＬＦにおける、活性化ポリクローナルＣＤ４Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化が示されている。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図２Ｂ）～（図２Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図２Ｏ】図２Ａ～２Ｏは、安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングが粘膜Ｔ細胞記憶を誘導することを示す。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、１４日後、１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブーストされた。血管外Ｔ細胞分析のために、肺組織、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介を採取した。肺組織はブーストの１４日後に採取したが、ＢＡＬＦ及び鼻腔の鼻甲介は、ブーストの７日後に得た。図２Ａ～２Ｉは、血管外ＣＤ８Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ａ）～（図２Ｃ）］肺組織、［（図２Ｄ）～（図２Ｆ）］ＢＡＬＦ又は［（図２Ｇ）～（図２Ｉ）］鼻腔の鼻甲介における、ＳＣＶ２スパイク特異的四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化が示されている。図２Ｊ～２Ｏは、血管外ＣＤ４Ｔ細胞応答を示す。未処置、ＩＭプライム、ＩＮスパイク又はＰ＆Ｓマウスから得た［（図２Ｊ）～（図２Ｌ）］肺組織又は［（図２Ｍ）～（図２Ｏ）］ＢＡＬＦにおける、活性化ポリクローナルＣＤ４Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化が示されている。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図２Ｂ）～（図２Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つ又は３つの独立実験から表され、プールされている。

【図３Ａ】図３Ａ～３Ｌは、ＩＮ　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクブーストがＣＯＶＩＤ－１９様疾患に対して保護することを示す。図３Ａは、実験スキーマである。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、ＩＭプライミングの１４日後に１μｇのスパイクを用いて鼻腔内にブーストされた。ブーストの６週間後、マウスに６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２（２０１９ｎ－ＣｏＶ／ＵＳＡ＿ＷＡ１／２０２０）を曝露した。第１のコホートを使用して、感染後１４日まで体重減少及び生存を評価した。第２のコホートを使用して、ウイルス力価測定のために、感染の２日後に肺及び鼻腔の鼻甲介組織を採取した。第３のコホートを使用して、組織学的評価のために、感染の５日後に肺組織を採取した。図３Ｂ～３Ｄは、感染後１～１４日の未処置、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスの体重減少及び生存を示す。図３Ｅ及び３Ｆは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。図３Ｇは、Ｈ＆Ｅ染色による感染の５日後の肺切片の病理スコアを示す。図３Ｈは、非感染、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスからの代表的なＨ＆Ｅ染色を示す。スケールバー、２５０ｍｍ。切片は、群あたり少なくとも５匹のマウスからの複数の切片の代表である。図３Ｉは、実験スキーマである。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、ＩＭプライミングの１４日後に１０μｇのＰＡＣＥによって封入されたｍＲＮＡを用いて鼻腔内にブーストされた（ＩＮ　ＰＡＣＥ－Ｓｐｉｋｅ）。ブーストの６週間後、マウスに６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２（２０１９ｎ－ＣｏＶ／ＵＳＡ＿ＷＡ１／２０２０）を曝露した。感染後１４日まで体重減少及び生存を評価した。図３Ｊ～３Ｌは、感染後１～１４日の未処置、ＩＭプライム又はプライム及びＰＡＣＥ－スパイクＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスの体重減少及び生存を示す。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図３Ｄ）及び（図３Ｌ）］ログランクマンテルコックス検定、［（図３Ｅ）及び（図３Ｆ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正、又は（図３Ｇ）スチューデントのｔ検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデー

タ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。
【図３Ｂ】図３Ａ～３Ｌは、ＩＮ　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクブーストがＣＯＶＩＤ－１９様疾患に対して保護することを示す。図３Ａは、実験スキーマである。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、ＩＭプライミングの１４日後に１μｇのスパイクを用いて鼻腔内にブーストされた。ブーストの６週間後、マウスに６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２（２０１９ｎ－ＣｏＶ／ＵＳＡ＿ＷＡ１／２０２０）を曝露した。第１のコホートを使用して、感染後１４日まで体重減少及び生存を評価した。第２のコホートを使用して、ウイルス力価測定のために、感染の２日後に肺及び鼻腔の鼻甲介組織を採取した。第３のコホートを使用して、組織学的評価のために、感染の５日後に肺組織を採取した。図３Ｂ～３Ｄは、感染後１～１４日の未処置、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスの体重減少及び生存を示す。図３Ｅ及び３Ｆは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。図３Ｇは、Ｈ＆Ｅ染色による感染の５日後の肺切片の病理スコアを示す。図３Ｈは、非感染、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスからの代表的なＨ＆Ｅ染色を示す。スケールバー、２５０ｍｍ。切片は、群あたり少なくとも５匹のマウスからの複数の切片の代表である。図３Ｉは、実験スキーマである。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、ＩＭプライミングの１４日後に１０μｇのＰＡＣＥによって封入されたｍＲＮＡを用いて鼻腔内にブーストされた（ＩＮ　ＰＡＣＥ－Ｓｐｉｋｅ）。ブーストの６週間後、マウスに６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２（２０１９ｎ－ＣｏＶ／ＵＳＡ＿ＷＡ１／２０２０）を曝露した。感染後１４日まで体重減少及び生存を評価した。図３Ｊ～３Ｌは、感染後１～１４日の未処置、ＩＭプライム又はプライム及びＰＡＣＥ－スパイクＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスの体重減少及び生存を示す。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図３Ｄ）及び（図３Ｌ）］ログランクマンテルコックス検定、［（図３Ｅ）及び（図３Ｆ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正、又は（図３Ｇ）スチューデントのｔ検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。
【図３Ｃ】図３Ａ～３Ｌは、ＩＮ　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクブーストがＣＯＶＩＤ－１９様疾患に対して保護することを示す。図３Ａは、実験スキーマである。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、ＩＭプライミングの１４日後に１μｇのスパイクを用いて鼻腔内にブーストされた。ブーストの６週間後、マウスに６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２（２０１９ｎ－ＣｏＶ／ＵＳＡ＿ＷＡ１／２０２０）を曝露した。第１のコホートを使用して、感染後１４日まで体重減少及び生存を評価した。第２のコホートを使用して、ウイルス力価測定のために、感染の２日後に肺及び鼻腔の鼻甲介組織を採取した。第３のコホートを使用して、組織学的評価のために、感染の５日後に肺組織を採取した。図３Ｂ～３Ｄは、感染後１～１４日の未処置、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスの体重減少及び生存を示す。図３Ｅ及び３Ｆは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。図３Ｇは、Ｈ＆Ｅ染色による感染の５日後の肺切片の病理スコアを示す。図３Ｈは、非感染、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスからの代表的なＨ＆Ｅ染色を示す。スケールバー、２５０ｍｍ。切片は、群あたり少なくとも５匹のマウスからの複数の切片の代表である。図３Ｉは、実験スキーマである。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、ＩＭプライミングの１４日後に１０μｇのＰＡＣＥによって封入されたｍＲＮＡを用いて鼻腔内にブーストされた（ＩＮ　ＰＡＣＥ－Ｓｐｉｋｅ）。ブーストの６週間後、マウスに６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２（２０１９ｎ－ＣｏＶ／ＵＳＡ＿ＷＡ１／２０２０）を曝露した。感染後１４日まで体重減少及び生存を評価した。図３Ｊ～３Ｌは、感染後１～１４日の未処置、ＩＭプライム又はプライム及びＰＡＣＥ－スパイクＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスの体重減少及び生存を示す。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図３Ｄ）及び（図３Ｌ）］ログランクマンテルコックス検定、［（図３Ｅ）及び（図３Ｆ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチュ

ーキー補正、又は（図３Ｇ）スチューデントのｔ検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図３Ｄ】図３Ａ～３Ｌは、ＩＮ　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクブーストがＣＯＶＩＤ－１９様疾患に対して保護することを示す。図３Ａは、実験スキーマである。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、ＩＭプライミングの１４日後に１μｇのスパイクを用いて鼻腔内にブーストされた。ブーストの６週間後、マウスに６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２（２０１９ｎ－ＣｏＶ／ＵＳＡ＿ＷＡ１／２０２０）を曝露した。第１のコホートを使用して、感染後１４日まで体重減少及び生存を評価した。第２のコホートを使用して、ウイルス力価測定のために、感染の２日後に肺及び鼻腔の鼻甲介組織を採取した。第３のコホートを使用して、組織学的評価のために、感染の５日後に肺組織を採取した。図３Ｂ～３Ｄは、感染後１～１４日の未処置、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスの体重減少及び生存を示す。図３Ｅ及び３Ｆは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。図３Ｇは、Ｈ＆Ｅ染色による感染の５日後の肺切片の病理スコアを示す。図３Ｈは、非感染、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスからの代表的なＨ＆Ｅ染色を示す。スケールバー、２５０ｍｍ。切片は、群あたり少なくとも５匹のマウスからの複数の切片の代表である。図３Ｉは、実験スキーマである。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、ＩＭプライミングの１４日後に１０μｇのＰＡＣＥによって封入されたｍＲＮＡを用いて鼻腔内にブーストされた（ＩＮ　ＰＡＣＥ－Ｓｐｉｋｅ）。ブーストの６週間後、マウスに６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２（２０１９ｎ－ＣｏＶ／ＵＳＡ＿ＷＡ１／２０２０）を曝露した。感染後１４日まで体重減少及び生存を評価した。図３Ｊ～３Ｌは、感染後１～１４日の未処置、ＩＭプライム又はプライム及びＰＡＣＥ－スパイクＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスの体重減少及び生存を示す。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図３Ｄ）及び（図３Ｌ）］ログランクマンテルコックス検定、［（図３Ｅ）及び（図３Ｆ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正、又は（図３Ｇ）スチューデントのｔ検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図３Ｅ】図３Ａ～３Ｌは、ＩＮ　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクブーストがＣＯＶＩＤ－１９様疾患に対して保護することを示す。図３Ａは、実験スキーマである。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、ＩＭプライミングの１４日後に１μｇのスパイクを用いて鼻腔内にブーストされた。ブーストの６週間後、マウスに６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２（２０１９ｎ－ＣｏＶ／ＵＳＡ＿ＷＡ１／２０２０）を曝露した。第１のコホートを使用して、感染後１４日まで体重減少及び生存を評価した。第２のコホートを使用して、ウイルス力価測定のために、感染の２日後に肺及び鼻腔の鼻甲介組織を採取した。第３のコホートを使用して、組織学的評価のために、感染の５日後に肺組織を採取した。図３Ｂ～３Ｄは、感染後１～１４日の未処置、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスの体重減少及び生存を示す。図３Ｅ及び３Ｆは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。図３Ｇは、Ｈ＆Ｅ染色による感染の５日後の肺切片の病理スコアを示す。図３Ｈは、非感染、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスからの代表的なＨ＆Ｅ染色を示す。スケールバー、２５０ｍｍ。切片は、群あたり少なくとも５匹のマウスからの複数の切片の代表である。図３Ｉは、実験スキーマである。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、ＩＭプライミングの１４日後に１０μｇのＰＡＣＥによって封入されたｍＲＮＡを用いて鼻腔内にブーストされた（ＩＮ　ＰＡＣＥ－Ｓｐｉｋｅ）。ブーストの６週間後、マウスに６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２（２０１９ｎ－ＣｏＶ／ＵＳＡ＿ＷＡ１／２０２０）を曝露した。感染後１４日まで体重減少及び生存を評価した。図３Ｊ～３Ｌは、感染後１～１４日の未処置、ＩＭプライム又はプライム及びＰＡＣＥ－スパイクＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスの体重減少及び生

存を示す。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図３Ｄ）及び（図３Ｌ）］ログランクマンテルコックス検定、［（図３Ｅ）及び（図３Ｆ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正、又は（図３Ｇ）スチューデントのｔ検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図３Ｆ】図３Ａ～３Ｌは、ＩＮ　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクブーストがＣＯＶＩＤ－１９様疾患に対して保護することを示す。図３Ａは、実験スキーマである。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、ＩＭプライミングの１４日後に１μｇのスパイクを用いて鼻腔内にブーストされた。ブーストの６週間後、マウスに６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２（２０１９ｎ－ＣｏＶ／ＵＳＡ＿ＷＡ１／２０２０）を曝露した。第１のコホートを使用して、感染後１４日まで体重減少及び生存を評価した。第２のコホートを使用して、ウイルス力価測定のために、感染の２日後に肺及び鼻腔の鼻甲介組織を採取した。第３のコホートを使用して、組織学的評価のために、感染の５日後に肺組織を採取した。図３Ｂ～３Ｄは、感染後１～１４日の未処置、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスの体重減少及び生存を示す。図３Ｅ及び３Ｆは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。図３Ｇは、Ｈ＆Ｅ染色による感染の５日後の肺切片の病理スコアを示す。図３Ｈは、非感染、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスからの代表的なＨ＆Ｅ染色を示す。スケールバー、２５０ｍｍ。切片は、群あたり少なくとも５匹のマウスからの複数の切片の代表である。図３Ｉは、実験スキーマである。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、ＩＭプライミングの１４日後に１０μｇのＰＡＣＥによって封入されたｍＲＮＡを用いて鼻腔内にブーストされた（ＩＮ　ＰＡＣＥ－Ｓｐｉｋｅ）。ブーストの６週間後、マウスに６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２（２０１９ｎ－ＣｏＶ／ＵＳＡ＿ＷＡ１／２０２０）を曝露した。感染後１４日まで体重減少及び生存を評価した。図３Ｊ～３Ｌは、感染後１～１４日の未処置、ＩＭプライム又はプライム及びＰＡＣＥ－スパイクＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスの体重減少及び生存を示す。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図３Ｄ）及び（図３Ｌ）］ログランクマンテルコックス検定、［（図３Ｅ）及び（図３Ｆ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正、又は（図３Ｇ）スチューデントのｔ検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図３Ｇ】図３Ａ～３Ｌは、ＩＮ　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクブーストがＣＯＶＩＤ－１９様疾患に対して保護することを示す。図３Ａは、実験スキーマである。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、ＩＭプライミングの１４日後に１μｇのスパイクを用いて鼻腔内にブーストされた。ブーストの６週間後、マウスに６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２（２０１９ｎ－ＣｏＶ／ＵＳＡ＿ＷＡ１／２０２０）を曝露した。第１のコホートを使用して、感染後１４日まで体重減少及び生存を評価した。第２のコホートを使用して、ウイルス力価測定のために、感染の２日後に肺及び鼻腔の鼻甲介組織を採取した。第３のコホートを使用して、組織学的評価のために、感染の５日後に肺組織を採取した。図３Ｂ～３Ｄは、感染後１～１４日の未処置、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスの体重減少及び生存を示す。図３Ｅ及び３Ｆは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。図３Ｇは、Ｈ＆Ｅ染色による感染の５日後の肺切片の病理スコアを示す。図３Ｈは、非感染、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスからの代表的なＨ＆Ｅ染色を示す。スケールバー、２５０ｍｍ。切片は、群あたり少なくとも５匹のマウスからの複数の切片の代表である。図３Ｉは、実験スキーマである。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、ＩＭプライミングの１４日後に１０μｇのＰＡＣＥによって封入されたｍＲＮＡを用いて鼻腔内にブーストされた（ＩＮ　ＰＡＣＥ－Ｓｐｉｋｅ）。ブーストの６週間後、マウスに６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２（２０１９ｎ－ＣｏＶ／ＵＳＡ＿ＷＡ１／２０２０）を曝露した。感染後１４日

まで体重減少及び生存を評価した。図３Ｊ～３Ｌは、感染後１～１４日の未処置、ＩＭプライム又はプライム及びＰＡＣＥ－スパイクＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスの体重減少及び生存を示す。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図３Ｄ）及び（図３Ｌ）］ログランクマンテルコックス検定、［（図３Ｅ）及び（図３Ｆ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正、又は（図３Ｇ）スチューデントのｔ検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図３Ｈ】図３Ａ～３Ｌは、ＩＮ　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクブーストがＣＯＶＩＤ－１９様疾患に対して保護することを示す。図３Ａは、実験スキーマである。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、ＩＭプライミングの１４日後に１μｇのスパイクを用いて鼻腔内にブーストされた。ブーストの６週間後、マウスに６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２（２０１９ｎ－ＣｏＶ／ＵＳＡ＿ＷＡ１／２０２０）を曝露した。第１のコホートを使用して、感染後１４日まで体重減少及び生存を評価した。第２のコホートを使用して、ウイルス力価測定のために、感染の２日後に肺及び鼻腔の鼻甲介組織を採取した。第３のコホートを使用して、組織学的評価のために、感染の５日後に肺組織を採取した。図３Ｂ～３Ｄは、感染後１～１４日の未処置、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスの体重減少及び生存を示す。図３Ｅ及び３Ｆは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。図３Ｇは、Ｈ＆Ｅ染色による感染の５日後の肺切片の病理スコアを示す。図３Ｈは、非感染、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスからの代表的なＨ＆Ｅ染色を示す。スケールバー、２５０ｍｍ。切片は、群あたり少なくとも５匹のマウスからの複数の切片の代表である。図３Ｉは、実験スキーマである。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、ＩＭプライミングの１４日後に１０μｇのＰＡＣＥによって封入されたｍＲＮＡを用いて鼻腔内にブーストされた（ＩＮ　ＰＡＣＥ－Ｓｐｉｋｅ）。ブーストの６週間後、マウスに６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２（２０１９ｎ－ＣｏＶ／ＵＳＡ＿ＷＡ１／２０２０）を曝露した。感染後１４日まで体重減少及び生存を評価した。図３Ｊ～３Ｌは、感染後１～１４日の未処置、ＩＭプライム又はプライム及びＰＡＣＥ－スパイクＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスの体重減少及び生存を示す。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図３Ｄ）及び（図３Ｌ）］ログランクマンテルコックス検定、［（図３Ｅ）及び（図３Ｆ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正、又は（図３Ｇ）スチューデントのｔ検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図３Ｉ】図３Ａ～３Ｌは、ＩＮ　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクブーストがＣＯＶＩＤ－１９様疾患に対して保護することを示す。図３Ａは、実験スキーマである。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、ＩＭプライミングの１４日後に１μｇのスパイクを用いて鼻腔内にブーストされた。ブーストの６週間後、マウスに６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２（２０１９ｎ－ＣｏＶ／ＵＳＡ＿ＷＡ１／２０２０）を曝露した。第１のコホートを使用して、感染後１４日まで体重減少及び生存を評価した。第２のコホートを使用して、ウイルス力価測定のために、感染の２日後に肺及び鼻腔の鼻甲介組織を採取した。第３のコホートを使用して、組織学的評価のために、感染の５日後に肺組織を採取した。図３Ｂ～３Ｄは、感染後１～１４日の未処置、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスの体重減少及び生存を示す。図３Ｅ及び３Ｆは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。図３Ｇは、Ｈ＆Ｅ染色による感染の５日後の肺切片の病理スコアを示す。図３Ｈは、非感染、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスからの代表的なＨ＆Ｅ染色を示す。スケールバー、２５０ｍｍ。切片は、群あたり少なくとも５匹のマウスからの複数の切片の代表である。図３Ｉは、実験スキーマである。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、ＩＭプライミングの１４日後に１０μｇのＰＡＣＥによって封入されたｍＲＮＡを用いて鼻腔内にブーストされた

（ＩＮ　ＰＡＣＥ－Ｓｐｉｋｅ）。ブーストの６週間後、マウスに６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２（２０１９ｎ－ＣｏＶ／ＵＳＡ＿ＷＡ１／２０２０）を曝露した。感染後１４日まで体重減少及び生存を評価した。図３Ｊ～３Ｌは、感染後１～１４日の未処置、ＩＭプライム又はプライム及びＰＡＣＥ－スパイクＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスの体重減少及び生存を示す。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図３Ｄ）及び（図３Ｌ）］ログランクマンテルコックス検定、［（図３Ｅ）及び（図３Ｆ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正、又は（図３Ｇ）スチューデントのｔ検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図３Ｊ】図３Ａ～３Ｌは、ＩＮ　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクブーストがＣＯＶＩＤ－１９様疾患に対して保護することを示す。図３Ａは、実験スキーマである。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、ＩＭプライミングの１４日後に１μｇのスパイクを用いて鼻腔内にブーストされた。ブーストの６週間後、マウスに６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２（２０１９ｎ－ＣｏＶ／ＵＳＡ＿ＷＡ１／２０２０）を曝露した。第１のコホートを使用して、感染後１４日まで体重減少及び生存を評価した。第２のコホートを使用して、ウイルス力価測定のために、感染の２日後に肺及び鼻腔の鼻甲介組織を採取した。第３のコホートを使用して、組織学的評価のために、感染の５日後に肺組織を採取した。図３Ｂ～３Ｄは、感染後１～１４日の未処置、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスの体重減少及び生存を示す。図３Ｅ及び３Ｆは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。図３Ｇは、Ｈ＆Ｅ染色による感染の５日後の肺切片の病理スコアを示す。図３Ｈは、非感染、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスからの代表的なＨ＆Ｅ染色を示す。スケールバー、２５０ｍｍ。切片は、群あたり少なくとも５匹のマウスからの複数の切片の代表である。図３Ｉは、実験スキーマである。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、ＩＭプライミングの１４日後に１０μｇのＰＡＣＥによって封入されたｍＲＮＡを用いて鼻腔内にブーストされた（ＩＮ　ＰＡＣＥ－Ｓｐｉｋｅ）。ブーストの６週間後、マウスに６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２（２０１９ｎ－ＣｏＶ／ＵＳＡ＿ＷＡ１／２０２０）を曝露した。感染後１４日まで体重減少及び生存を評価した。図３Ｊ～３Ｌは、感染後１～１４日の未処置、ＩＭプライム又はプライム及びＰＡＣＥ－スパイクＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスの体重減少及び生存を示す。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図３Ｄ）及び（図３Ｌ）］ログランクマンテルコックス検定、［（図３Ｅ）及び（図３Ｆ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正、又は（図３Ｇ）スチューデントのｔ検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図３Ｋ】図３Ａ～３Ｌは、ＩＮ　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクブーストがＣＯＶＩＤ－１９様疾患に対して保護することを示す。図３Ａは、実験スキーマである。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、ＩＭプライミングの１４日後に１μｇのスパイクを用いて鼻腔内にブーストされた。ブーストの６週間後、マウスに６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２（２０１９ｎ－ＣｏＶ／ＵＳＡ＿ＷＡ１／２０２０）を曝露した。第１のコホートを使用して、感染後１４日まで体重減少及び生存を評価した。第２のコホートを使用して、ウイルス力価測定のために、感染の２日後に肺及び鼻腔の鼻甲介組織を採取した。第３のコホートを使用して、組織学的評価のために、感染の５日後に肺組織を採取した。図３Ｂ～３Ｄは、感染後１～１４日の未処置、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスの体重減少及び生存を示す。図３Ｅ及び３Ｆは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。図３Ｇは、Ｈ＆Ｅ染色による感染の５日後の肺切片の病理スコアを示す。図３Ｈは、非感染、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスからの代表的なＨ＆Ｅ染色を示す。スケールバー、２５０ｍｍ。切片は、群あたり少なくとも５匹のマウスからの複数の切片の代表である。図３Ｉは、実験スキーマである。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０

５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、ＩＭプライミングの１４日後に１０μｇのＰＡＣＥによって封入されたｍＲＮＡを用いて鼻腔内にブーストされた（ＩＮ　ＰＡＣＥ－Ｓｐｉｋｅ）。ブーストの６週間後、マウスに６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２（２０１９ｎ－ＣｏＶ／ＵＳＡ＿ＷＡ１／２０２０）を曝露した。感染後１４日まで体重減少及び生存を評価した。図３Ｊ～３Ｌは、感染後１～１４日の未処置、ＩＭプライム又はプライム及びＰＡＣＥ－スパイクＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスの体重減少及び生存を示す。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図３Ｄ）及び（図３Ｌ）］ログランクマンテルコックス検定、［（図３Ｅ）及び（図３Ｆ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正、又は（図３Ｇ）スチューデントのｔ検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図３Ｌ】図３Ａ～３Ｌは、ＩＮ　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクブーストがＣＯＶＩＤ－１９様疾患に対して保護することを示す。図３Ａは、実験スキーマである。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、ＩＭプライミングの１４日後に１μｇのスパイクを用いて鼻腔内にブーストされた。ブーストの６週間後、マウスに６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２（２０１９ｎ－ＣｏＶ／ＵＳＡ＿ＷＡ１／２０２０）を曝露した。第１のコホートを使用して、感染後１４日まで体重減少及び生存を評価した。第２のコホートを使用して、ウイルス力価測定のために、感染の２日後に肺及び鼻腔の鼻甲介組織を採取した。第３のコホートを使用して、組織学的評価のために、感染の５日後に肺組織を採取した。図３Ｂ～３Ｄは、感染後１～１４日の未処置、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスの体重減少及び生存を示す。図３Ｅ及び３Ｆは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。図３Ｇは、Ｈ＆Ｅ染色による感染の５日後の肺切片の病理スコアを示す。図３Ｈは、非感染、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスからの代表的なＨ＆Ｅ染色を示す。スケールバー、２５０ｍｍ。切片は、群あたり少なくとも５匹のマウスからの複数の切片の代表である。図３Ｉは、実験スキーマである。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、ＩＭプライミングの１４日後に１０μｇのＰＡＣＥによって封入されたｍＲＮＡを用いて鼻腔内にブーストされた（ＩＮ　ＰＡＣＥ－Ｓｐｉｋｅ）。ブーストの６週間後、マウスに６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２（２０１９ｎ－ＣｏＶ／ＵＳＡ＿ＷＡ１／２０２０）を曝露した。感染後１４日まで体重減少及び生存を評価した。図３Ｊ～３Ｌは、感染後１～１４日の未処置、ＩＭプライム又はプライム及びＰＡＣＥ－スパイクＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスの体重減少及び生存を示す。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図３Ｄ）及び（図３Ｌ）］ログランクマンテルコックス検定、［（図３Ｅ）及び（図３Ｆ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正、又は（図３Ｇ）スチューデントのｔ検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図４Ａ】図４Ａ～４Ｕは、ＩＮスパイクブースティングが粘膜免疫の増強を誘発し、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰブースティングと同様の全身性体液性応答を有することを示す。図４Ａ、実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、続いて、１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭ又は１μｇのＳＣＶ２スパイクＩＮを用いてブースティングされた。プライミングの４５日後、フローサイトメトリーによるＴ細胞分析のために肺組織を、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血清を採取した。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、１４日後、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされ、プライミングの１１８日後に、６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２が曝露された。図４Ｂ～４Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｅ及び４Ｆは、肺組織に

おける総四量体＋ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｇ～４Ｋは、パーコール勾配によって単離され、ＳＣＶ２由来のスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激された肺リンパ球を示す。細胞内サイトカイン染色を実施して、血管外ＩＶ$^{-}$ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成を評価した。図４Ｌ～４Ｏは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスにおける、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図４Ｌ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図４Ｍ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図４Ｎ）血清ＩｇＡ及び（図４Ｏ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図４Ｐは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。図４Ｑ～４Ｓは、感染後１～１４日のｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスの体重減少、生存及び無病生存期間（＜５％最大体重減少）を示す。図４Ｔ及び４Ｕは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。使用される実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライム－ブーストからの対照データ点は、図４及び６に共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図４Ｂ）～（図４Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡによって、続いて、チューキー補正又は［（図４Ｐ）、（図４Ｔ）及び（図４Ｕ）］スチューデントのｔ検定、及び［（図４Ｒ）及び（図４Ｓ）］ログランクマンテルコックス検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図４Ｂ】図４Ａ～４Ｕは、ＩＮスパイクブースティングが粘膜免疫の増強を誘発し、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰブースティングと同様の全身性体液性応答を有することを示す。図４Ａ、実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、続いて、１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭ又は１μｇのＳＣＶ２スパイクＩＮを用いてブースティングされた。プライミングの４５日後、フローサイトメトリーによるＴ細胞分析のために肺組織を、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血清を採取した。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、１４日後、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされ、プライミングの１１８日後に、6×10^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２が曝露された。図４Ｂ～４Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｅ及び４Ｆは、肺組織における総四量体＋ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｇ～４Ｋは、パーコール勾配によって単離され、ＳＣＶ２由来のスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激された肺リンパ球を示す。細胞内サイトカイン染色を実施して、血管外ＩＶ$^{-}$ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成を評価した。図４Ｌ～４Ｏは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスにおける、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図４Ｌ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図４Ｍ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図４Ｎ）血清ＩｇＡ及び（図４Ｏ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図４Ｐは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。図４Ｑ～４Ｓは、感染後１～１４日のｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスの体重減少、生存及び無病生存期間（＜５％最大体重減少）を示す。図４Ｔ及び４Ｕは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。使用される実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライム－ブーストからの対照データ点は、図４及び６に共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図４Ｂ）～（図４Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡによって、続いて、チューキー補正又は［（図４Ｐ）、（図４Ｔ）及び（図４Ｕ）］スチューデントのｔ検定、及び［（図４Ｒ）及び（図４Ｓ）］ログランクマンテルコックス検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２

つの独立実験から表され、プールされている。
【図４Ｃ】図４Ａ～４Ｕは、ＩＮスパイクブースティングが粘膜免疫の増強を誘発し、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰブースティングと同様の全身性体液性応答を有することを示す。図４Ａ、実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、続いて、１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭ又は１μｇのＳＣＶ２スパイクＩＮを用いてブースティングされた。プライミングの４５日後、フローサイトメトリーによるＴ細胞分析のために肺組織を、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血清を採取した。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、１４日後、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされ、プライミングの１１８日後に、６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２が曝露された。図４Ｂ～４Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｅ及び４Ｆは、肺組織における総四量体＋ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｇ～４Ｋは、パーコール勾配によって単離され、ＳＣＶ２由来のスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激された肺リンパ球を示す。細胞内サイトカイン染色を実施して、血管外ＩＶ$^{-}$ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成を評価した。図４Ｌ～４Ｏは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスにおける、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図４Ｌ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図４Ｍ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図４Ｎ）血清ＩｇＡ及び（図４Ｏ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図４Ｐは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。図４Ｑ～４Ｓは、感染後１～１４日のｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスの体重減少、生存及び無病生存期間（＜５％最大体重減少）を示す。図４Ｔ及び４Ｕは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。使用される実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライム－ブーストからの対照データ点は、図４及び６に共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図４Ｂ）～（図４Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡによって、続いて、チューキー補正又は［（図４Ｐ）、（図４Ｔ）及び（図４Ｕ）］スチューデントのｔ検定、及び［（図４Ｒ）及び（図４Ｓ）］ログランクマンテルコックス検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。
【図４Ｄ】図４Ａ～４Ｕは、ＩＮスパイクブースティングが粘膜免疫の増強を誘発し、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰブースティングと同様の全身性体液性応答を有することを示す。図４Ａ、実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、続いて、１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭ又は１μｇのＳＣＶ２スパイクＩＮを用いてブースティングされた。プライミングの４５日後、フローサイトメトリーによるＴ細胞分析のために肺組織を、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血清を採取した。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、１４日後、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされ、プライミングの１１８日後に、６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２が曝露された。図４Ｂ～４Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｅ及び４Ｆは、肺組織における総四量体＋ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｇ～４Ｋは、パーコール勾配によって単離され、ＳＣＶ２由来のスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激された肺リンパ球を示す。細胞内サイトカイン染色を実施して、血管外ＩＶ$^{-}$ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２

、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成を評価した。図４Ｌ～４Ｏは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスにおける、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図４Ｌ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図４Ｍ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図４Ｎ）血清ＩｇＡ及び（図４Ｏ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図４Ｐは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。図４Ｑ～４Ｓは、感染後１～１４日のｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスの体重減少、生存及び無病生存期間（＜５％最大体重減少）を示す。図４Ｔ及び４Ｕは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。使用される実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライム－ブーストからの対照データ点は、図４及び６に共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図４Ｂ）～（図４Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡによって、続いて、チューキー補正又は［（図４Ｐ）、（図４Ｔ）及び（図４Ｕ）］スチューデントのｔ検定、及び［（図４Ｒ）及び（図４Ｓ）］ログランクマンテルコックス検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図４Ｅ】図４Ａ～４Ｕは、ＩＮスパイクブースティングが粘膜免疫の増強を誘発し、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰブースティングと同様の全身性体液性応答を有することを示す。図４Ａ、実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、続いて、１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭ又は１μｇのＳＣＶ２スパイクＩＮを用いてブースティングされた。プライミングの４５日後、フローサイトメトリーによるＴ細胞分析のために肺組織を、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血清を採取した。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、１４日後、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされ、プライミングの１１８日後に、6×10^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２が曝露された。図４Ｂ～４Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｅ及び４Ｆは、肺組織における総四量体＋ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｇ～４Ｋは、パーコール勾配によって単離され、ＳＣＶ２由来のスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激された肺リンパ球を示す。細胞内サイトカイン染色を実施して、血管外ＩＶ$^{-}$ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成を評価した。図４Ｌ～４Ｏは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスにおける、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図４Ｌ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図４Ｍ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図４Ｎ）血清ＩｇＡ及び（図４Ｏ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図４Ｐは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。図４Ｑ～４Ｓは、感染後１～１４日のｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスの体重減少、生存及び無病生存期間（＜５％最大体重減少）を示す。図４Ｔ及び４Ｕは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。使用される実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライム－ブーストからの対照データ点は、図４及び６に共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図４Ｂ）～（図４Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡによって、続いて、チューキー補正又は［（図４Ｐ）、（図４Ｔ）及び（図４Ｕ）］スチューデントのｔ検定、及び［（図４Ｒ）及び（図４Ｓ）］ログランクマンテルコックス検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図４Ｆ】図４Ａ～４Ｕは、ＩＮスパイクブースティングが粘膜免疫の増強を誘発し、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰブースティングと同様の全身性体液性応答を有することを示す。図４Ａ、実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて

ＩＭプライミングされ、続いて、１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭ又は１μｇのＳＣＶ２スパイクＩＮを用いてブースティングされた。プライミングの４５日後、フローサイトメトリーによるＴ細胞分析のために肺組織を、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血清を採取した。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、１４日後、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされ、プライミングの１１８日後に、６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２が曝露された。図４Ｂ～４Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｅ及び４Ｆは、肺組織における総四量体＋ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｇ～４Ｋは、パーコール勾配によって単離され、ＳＣＶ２由来のスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激された肺リンパ球を示す。細胞内サイトカイン染色を実施して、血管外ＩＶ$^{-}$ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成を評価した。図４Ｌ～４Ｏは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスにおける、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図４Ｌ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図４Ｍ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図４Ｎ）血清ＩｇＡ及び（図４Ｏ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図４Ｐは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。図４Ｑ～４Ｓは、感染後１～１４日のｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスの体重減少、生存及び無病生存期間（＜５％最大体重減少）を示す。図４Ｔ及び４Ｕは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。使用される実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライム－ブーストからの対照データ点は、図４及び６に共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図４Ｂ）～（図４Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡによって、続いて、チューキー補正又は［（図４Ｐ）、（図４Ｔ）及び（図４Ｕ）］スチューデントのｔ検定、及び［（図４Ｒ）及び（図４Ｓ）］ログランクマンテルコックス検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図４Ｇ】図４Ａ～４Ｕは、ＩＮスパイクブースティングが粘膜免疫の増強を誘発し、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰブースティングと同様の全身性体液性応答を有することを示す。図４Ａ、実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、続いて、１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭ又は１μｇのＳＣＶ２スパイクＩＮを用いてブースティングされた。プライミングの４５日後、フローサイトメトリーによるＴ細胞分析のために肺組織を、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血清を採取した。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、１４日後、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされ、プライミングの１１８日後に、６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２が曝露された。図４Ｂ～４Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｅ及び４Ｆは、肺組織における総四量体＋ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｇ～４Ｋは、パーコール勾配によって単離され、ＳＣＶ２由来のスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激された肺リンパ球を示す。細胞内サイトカイン染色を実施して、血管外ＩＶ$^{-}$ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成を評価した。図４Ｌ～４Ｏは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスにおける、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図４Ｌ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図４Ｍ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図４Ｎ）血清ＩｇＡ及び（図４Ｏ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図４Ｐは、ＳＣＶ２

スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。図４Ｑ～４Ｓは、感染後１～１４日のｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスの体重減少、生存及び無病生存期間（＜５％最大体重減少）を示す。図４Ｔ及び４Ｕは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。使用される実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライム－ブーストからの対照データ点は、図４及び６に共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図４Ｂ）～（図４Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡによって、続いて、チューキー補正又は［（図４Ｐ）、（図４Ｔ）及び（図４Ｕ）］スチューデントのｔ検定、及び［（図４Ｒ）及び（図４Ｓ）］ログランクマンテルコックス検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図４Ｈ】図４Ａ～４Ｕは、ＩＮスパイクブースティングが粘膜免疫の増強を誘発し、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰブースティングと同様の全身性体液性応答を有することを示す。図４Ａ、実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、続いて、１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭ又は１μｇのＳＣＶ２スパイクＩＮを用いてブースティングされた。プライミングの４５日後、フローサイトメトリーによるＴ細胞分析のために肺組織を、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血清を採取した。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、１４日後、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされ、プライミングの１１８日後に、６×10^4　ＰＦＵ　ＳＣＶ２が曝露された。図４Ｂ～４Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総四量体$^+$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^+$ＣＤ１０３$^-$四量体$^+$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^+$ＣＤ１０３$^+$四量体$^+$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｅ及び４Ｆは、肺組織における総四量体＋ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^+$ＣＤ１０３$^-$四量体$^+$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｇ～４Ｋは、パーコール勾配によって単離され、ＳＣＶ２由来のスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激された肺リンパ球を示す。細胞内サイトカイン染色を実施して、血管外ＩＶ$^-$ＣＤ４５$^-$ＣＤ４４$^+$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成を評価した。図４Ｌ～４Ｏは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスにおける、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図４Ｌ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図４Ｍ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図４Ｎ）血清ＩｇＡ及び（図４Ｏ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図４Ｐは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。図４Ｑ～４Ｓは、感染後１～１４日のｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスの体重減少、生存及び無病生存期間（＜５％最大体重減少）を示す。図４Ｔ及び４Ｕは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。使用される実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライム－ブーストからの対照データ点は、図４及び６に共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図４Ｂ）～（図４Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡによって、続いて、チューキー補正又は［（図４Ｐ）、（図４Ｔ）及び（図４Ｕ）］スチューデントのｔ検定、及び［（図４Ｒ）及び（図４Ｓ）］ログランクマンテルコックス検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図４Ｉ】図４Ａ～４Ｕは、ＩＮスパイクブースティングが粘膜免疫の増強を誘発し、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰブースティングと同様の全身性体液性応答を有することを示す。図４Ａ、実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、続いて、１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭ又は１μｇのＳＣＶ２スパイクＩＮを用いてブースティングされた。プライミングの４５日後、フローサイトメトリーによるＴ細胞分析のために肺組織を、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血清を採取した。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用い

て筋肉内にプライミングされ、続いて、１４日後、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされ、プライミングの１１８日後に、６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２が曝露された。図４Ｂ～４Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｅ及び４Ｆは、肺組織における総四量体＋ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｇ～４Ｋは、パーコール勾配によって単離され、ＳＣＶ２由来のスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激された肺リンパ球を示す。細胞内サイトカイン染色を実施して、血管外ＩＶ$^{-}$ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成を評価した。図４Ｌ～４Ｏは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスにおける、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図４Ｌ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図４Ｍ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図４Ｎ）血清ＩｇＡ及び（図４Ｏ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図４Ｐは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。図４Ｑ～４Ｓは、感染後１～１４日のｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスの体重減少、生存及び無病生存期間（＜５％最大体重減少）を示す。図４Ｔ及び４Ｕは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。使用される実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライム－ブーストからの対照データ点は、図４及び６に共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図４Ｂ）～（図４Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡによって、続いて、チューキー補正又は［（図４Ｐ）、（図４Ｔ）及び（図４Ｕ）］スチューデントのｔ検定、及び［（図４Ｒ）及び（図４Ｓ）］ログランクマンテルコックス検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図４Ｊ】図４Ａ～４Ｕは、ＩＮスパイクブースティングが粘膜免疫の増強を誘発し、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰブースティングと同様の全身性体液性応答を有することを示す。図４Ａ、実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、続いて、１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭ又は１μｇのＳＣＶ２スパイクＩＮを用いてブースティングされた。プライミングの４５日後、フローサイトメトリーによるＴ細胞分析のために肺組織を、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血清を採取した。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、１４日後、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされ、プライミングの１１８日後に、６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２が曝露された。図４Ｂ～４Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｅ及び４Ｆは、肺組織における総四量体＋ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｇ～４Ｋは、パーコール勾配によって単離され、ＳＣＶ２由来のスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激された肺リンパ球を示す。細胞内サイトカイン染色を実施して、血管外ＩＶ$^{-}$ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成を評価した。図４Ｌ～４Ｏは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスにおける、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図４Ｌ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図４Ｍ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図４Ｎ）血清ＩｇＡ及び（図４Ｏ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図４Ｐは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。図４Ｑ～４Ｓは、感染後１～１４日のｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスの体重減少、生存及び無病生存期間（＜５％最大体重減少）を示す。図４Ｔ及び４Ｕは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。使用さ

れる実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライム－ブーストからの対照データ点は、図４及び６に共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図４Ｂ）～（図４Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡによって、続いて、チューキー補正又は［（図４Ｐ）、（図４Ｔ）及び（図４Ｕ）］スチューデントのｔ検定、及び［（図４Ｒ）及び（図４Ｓ）］ログランクマンテルコックス検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図４Ｋ】図４Ａ～４Ｕは、ＩＮスパイクブースティングが粘膜免疫の増強を誘発し、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰブースティングと同様の全身性体液性応答を有することを示す。図４Ａ、実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、続いて、１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭ又は１μｇのＳＣＶ２スパイクＩＮを用いてブースティングされた。プライミングの４５日後、フローサイトメトリーによるＴ細胞分析のために肺組織を、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血清を採取した。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、１４日後、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされ、プライミングの１１８日後に、６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２が曝露された。図４Ｂ～４Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｅ及び４Ｆは、肺組織における総四量体＋ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｇ～４Ｋは、パーコール勾配によって単離され、ＳＣＶ２由来のスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激された肺リンパ球を示す。細胞内サイトカイン染色を実施して、血管外ＩＶ$^{-}$ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成を評価した。図４Ｌ～４Ｏは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスにおける、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図４Ｌ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図４Ｍ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図４Ｎ）血清ＩｇＡ及び（図４Ｏ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図４Ｐは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。図４Ｑ～４Ｓは、感染後１～１４日のｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスの体重減少、生存及び無病生存期間（＜５％最大体重減少）を示す。図４Ｔ及び４Ｕは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。使用される実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライム－ブーストからの対照データ点は、図４及び６に共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図４Ｂ）～（図４Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡによって、続いて、チューキー補正又は［（図４Ｐ）、（図４Ｔ）及び（図４Ｕ）］スチューデントのｔ検定、及び［（図４Ｒ）及び（図４Ｓ）］ログランクマンテルコックス検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図４Ｌ】図４Ａ～４Ｕは、ＩＮスパイクブースティングが粘膜免疫の増強を誘発し、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰブースティングと同様の全身性体液性応答を有することを示す。図４Ａ、実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、続いて、１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭ又は１μｇのＳＣＶ２スパイクＩＮを用いてブースティングされた。プライミングの４５日後、フローサイトメトリーによるＴ細胞分析のために肺組織を、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血清を採取した。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、１４日後、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされ、プライミングの１１８日後に、６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２が曝露された。図４Ｂ～４Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織にお

ける、総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｅ及び４Ｆは、肺組織における総四量体＋ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｇ～４Ｋは、パーコール勾配によって単離され、ＳＣＶ２由来のスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激された肺リンパ球を示す。細胞内サイトカイン染色を実施して、血管外ＩＶ$^{-}$ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成を評価した。図４Ｌ～４Ｏは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスにおける、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図４Ｌ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図４Ｍ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図４Ｎ）血清ＩｇＡ及び（図４Ｏ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図４Ｐは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。図４Ｑ～４Ｓは、感染後１～１４日のｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスの体重減少、生存及び無病生存期間（＜５％最大体重減少）を示す。図４Ｔ及び４Ｕは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。使用される実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライム－ブーストからの対照データ点は、図４及び６に共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図４Ｂ）～（図４Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡによって、続いて、チューキー補正又は［（図４Ｐ）、（図４Ｔ）及び（図４Ｕ）］スチューデントのｔ検定、及び［（図４Ｒ）及び（図４Ｓ）］ログランクマンテルコックス検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図４Ｍ】図４Ａ～４Ｕは、ＩＮスパイクブースティングが粘膜免疫の増強を誘発し、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰブースティングと同様の全身性体液性応答を有することを示す。図４Ａ、実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、続いて、１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭ又は１μｇのＳＣＶ２スパイクＩＮを用いてブースティングされた。プライミングの４５日後、フローサイトメトリーによるＴ細胞分析のために肺組織を、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血清を採取した。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、１４日後、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされ、プライミングの１１８日後に、6×10^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２が曝露された。図４Ｂ～４Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｅ及び４Ｆは、肺組織における総四量体＋ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｇ～４Ｋは、パーコール勾配によって単離され、ＳＣＶ２由来のスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激された肺リンパ球を示す。細胞内サイトカイン染色を実施して、血管外ＩＶ$^{-}$ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成を評価した。図４Ｌ～４Ｏは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスにおける、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図４Ｌ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図４Ｍ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図４Ｎ）血清ＩｇＡ及び（図４Ｏ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図４Ｐは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。図４Ｑ～４Ｓは、感染後１～１４日のｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスの体重減少、生存及び無病生存期間（＜５％最大体重減少）を示す。図４Ｔ及び４Ｕは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。使用される実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライム－ブーストからの対照データ点は、図４及び６に共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図４Ｂ）～（図４Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡによって、続いて、チューキー補正又は［（図４Ｐ）、（図４Ｔ）及び（図４Ｕ）］スチューデントのｔ検定、及び［（図４Ｒ）及び（図

４Ｓ）］ログランクマンテルコックス検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図４Ｎ】図４Ａ～４Ｕは、ＩＮスパイクブースティングが粘膜免疫の増強を誘発し、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰブースティングと同様の全身性体液性応答を有することを示す。図４Ａ、実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、続いて、１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭ又は１μｇのＳＣＶ２スパイクＩＮを用いてブースティングされた。プライミングの４５日後、フローサイトメトリーによるＴ細胞分析のために肺組織を、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血清を採取した。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、１４日後、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされ、プライミングの１１８日後に、６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２が曝露された。図４Ｂ～４Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｅ及び４Ｆは、肺組織における総四量体＋ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｇ～４Ｋは、パーコール勾配によって単離され、ＳＣＶ２由来のスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激された肺リンパ球を示す。細胞内サイトカイン染色を実施して、血管外ＩＶ$^{-}$ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成を評価した。図４Ｌ～４Ｏは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスにおける、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図４Ｌ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図４Ｍ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図４Ｎ）血清ＩｇＡ及び（図４Ｏ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図４Ｐは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。図４Ｑ～４Ｓは、感染後１～１４日のｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスの体重減少、生存及び無病生存期間（＜５％最大体重減少）を示す。図４Ｔ及び４Ｕは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。使用される実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライム－ブーストからの対照データ点は、図４及び６に共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図４Ｂ）～（図４Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡによって、続いて、チューキー補正又は［（図４Ｐ）、（図４Ｔ）及び（図４Ｕ）］スチューデントのｔ検定、及び［（図４Ｒ）及び（図４Ｓ）］ログランクマンテルコックス検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図４Ｏ】図４Ａ～４Ｕは、ＩＮスパイクブースティングが粘膜免疫の増強を誘発し、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰブースティングと同様の全身性体液性応答を有することを示す。図４Ａ、実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、続いて、１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭ又は１μｇのＳＣＶ２スパイクＩＮを用いてブースティングされた。プライミングの４５日後、フローサイトメトリーによるＴ細胞分析のために肺組織を、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血清を採取した。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、１４日後、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされ、プライミングの１１８日後に、６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２が曝露された。図４Ｂ～４Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｅ及び４Ｆは、肺組織における総四量体＋ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｇ～４Ｋは、パーコール勾配によって単離され、ＳＣＶ２由来のスパイク

ペプチドメガプールを用いて再刺激された肺リンパ球を示す。細胞内サイトカイン染色を実施して、血管外ＩＶ－ＣＤ４５－ＣＤ４４＋ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成を評価した。図４Ｌ～４Ｏは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスにおける、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図４Ｌ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図４Ｍ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図４Ｎ）血清ＩｇＡ及び（図４Ｏ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図４Ｐは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。図４Ｑ～４Ｓは、感染後１～１４日のｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスの体重減少、生存及び無病生存期間（＜５％最大体重減少）を示す。図４Ｔ及び４Ｕは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。使用される実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライム－ブーストからの対照データ点は、図４及び６に共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図４Ｂ）～（図４Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡによって、続いて、チューキー補正又は［（図４Ｐ）、（図４Ｔ）及び（図４Ｕ）］スチューデントのｔ検定、及び［（図４Ｒ）及び（図４Ｓ）］ログランクマンテルコックス検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図４Ｐ】図４Ａ～４Ｕは、ＩＮスパイクブースティングが粘膜免疫の増強を誘発し、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰブースティングと同様の全身性体液性応答を有することを示す。図４Ａ、実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、続いて、１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭ又は１μｇのＳＣＶ２スパイクＩＮを用いてブースティングされた。プライミングの４５日後、フローサイトメトリーによるＴ細胞分析のために肺組織を、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血清を採取した。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、１４日後、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされ、プライミングの１１８日後に、６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２が曝露された。図４Ｂ～４Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９＋ＣＤ１０３－四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｅ及び４Ｆは、肺組織における総四量体＋ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９＋ＣＤ１０３－四量体＋ＣＤ４Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｇ～４Ｋは、パーコール勾配によって単離され、ＳＣＶ２由来のスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激された肺リンパ球を示す。細胞内サイトカイン染色を実施して、血管外ＩＶ－ＣＤ４５－ＣＤ４４＋ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成を評価した。図４Ｌ～４Ｏは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスにおける、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図４Ｌ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図４Ｍ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図４Ｎ）血清ＩｇＡ及び（図４Ｏ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図４Ｐは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。図４Ｑ～４Ｓは、感染後１～１４日のｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスの体重減少、生存及び無病生存期間（＜５％最大体重減少）を示す。図４Ｔ及び４Ｕは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。使用される実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライム－ブーストからの対照データ点は、図４及び６に共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図４Ｂ）～（図４Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡによって、続いて、チューキー補正又は［（図４Ｐ）、（図４Ｔ）及び（図４Ｕ）］スチューデントのｔ検定、及び［（図４Ｒ）及び（図４Ｓ）］ログランクマンテルコックス検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図４Ｑ】図４Ａ～４Ｕは、ＩＮスパイクブースティングが粘膜免疫の増強を誘発し、Ｉ

Ｍ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰブースティングと同様の全身性体液性応答を有することを示す。図４Ａ、実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、続いて、１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭ又は１μｇのＳＣＶ２スパイクＩＮを用いてブースティングされた。プライミングの４５日後、フローサイトメトリーによるＴ細胞分析のために肺組織を、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血清を採取した。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、１４日後、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされ、プライミングの１１８日後に、６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２が曝露された。図４Ｂ～４Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｅ及び４Ｆは、肺組織における総四量体＋ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｇ～４Ｋは、パーコール勾配によって単離され、ＳＣＶ２由来のスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激された肺リンパ球を示す。細胞内サイトカイン染色を実施して、血管外ＩＶ$^{-}$ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成を評価した。図４Ｌ～４Ｏは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスにおける、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図４Ｌ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図４Ｍ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図４Ｎ）血清ＩｇＡ及び（図４Ｏ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図４Ｐは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。図４Ｑ～４Ｓは、感染後１～１４日のｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスの体重減少、生存及び無病生存期間（＜５％最大体重減少）を示す。図４Ｔ及び４Ｕは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。使用される実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライム－ブーストからの対照データ点は、図４及び６に共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図４Ｂ）～（図４Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡによって、続いて、チューキー補正又は［（図４Ｐ）、（図４Ｔ）及び（図４Ｕ）］スチューデントのｔ検定、及び［（図４Ｒ）及び（図４Ｓ）］ログランクマンテルコックス検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図４Ｒ】図４Ａ～４Ｕは、ＩＮスパイクブースティングが粘膜免疫の増強を誘発し、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰブースティングと同様の全身性体液性応答を有することを示す。図４Ａ、実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、続いて、１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭ又は１μｇのＳＣＶ２スパイクＩＮを用いてブースティングされた。プライミングの４５日後、フローサイトメトリーによるＴ細胞分析のために肺組織を、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血清を採取した。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、１４日後、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされ、プライミングの１１８日後に、６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２が曝露された。図４Ｂ～４Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｅ及び４Ｆは、肺組織における総四量体＋ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｇ～４Ｋは、パーコール勾配によって単離され、ＳＣＶ２由来のスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激された肺リンパ球を示す。細胞内サイトカイン染色を実施して、血管外ＩＶ$^{-}$ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成を評価した。図４Ｌ～４Ｏは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスにおける、ＳＣＶ２スパ

イクＳ１サブユニット特異的（図４Ｌ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図４Ｍ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図４Ｎ）血清ＩｇＡ及び（図４Ｏ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図４Ｐは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。図４Ｑ～４Ｓは、感染後１～１４日のｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスの体重減少、生存及び無病生存期間（＜５％最大体重減少）を示す。図４Ｔ及び４Ｕは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。使用される実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライム－ブーストからの対照データ点は、図４及び６に共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図４Ｂ）～（図４Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡによって、続いて、チューキー補正又は［（図４Ｐ）、（図４Ｔ）及び（図４Ｕ）］スチューデントのｔ検定、及び［（図４Ｒ）及び（図４Ｓ）］ログランクマンテルコックス検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図４Ｓ】図４Ａ～４Ｕは、ＩＮスパイクブースティングが粘膜免疫の増強を誘発し、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰブースティングと同様の全身性体液性応答を有することを示す。図４Ａ、実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、続いて、１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭ又は１μｇのＳＣＶ２スパイクＩＮを用いてブースティングされた。プライミングの４５日後、フローサイトメトリーによるＴ細胞分析のために肺組織を、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血清を採取した。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、１４日後、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされ、プライミングの１１８日後に、6×10^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２が曝露された。図４Ｂ～４Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｅ及び４Ｆは、肺組織における総四量体＋ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｇ～４Ｋは、パーコール勾配によって単離され、ＳＣＶ２由来のスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激された肺リンパ球を示す。細胞内サイトカイン染色を実施して、血管外ＩＶ$^{-}$ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成を評価した。図４Ｌ～４Ｏは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスにおける、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図４Ｌ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図４Ｍ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図４Ｎ）血清ＩｇＡ及び（図４Ｏ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図４Ｐは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。図４Ｑ～４Ｓは、感染後１～１４日のｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスの体重減少、生存及び無病生存期間（＜５％最大体重減少）を示す。図４Ｔ及び４Ｕは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。使用される実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライム－ブーストからの対照データ点は、図４及び６に共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図４Ｂ）～（図４Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡによって、続いて、チューキー補正又は［（図４Ｐ）、（図４Ｔ）及び（図４Ｕ）］スチューデントのｔ検定、及び［（図４Ｒ）及び（図４Ｓ）］ログランクマンテルコックス検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図４Ｔ】図４Ａ～４Ｕは、ＩＮスパイクブースティングが粘膜免疫の増強を誘発し、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰブースティングと同様の全身性体液性応答を有することを示す。図４Ａ、実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、続いて、１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭ又は１μｇのＳＣＶ２スパイクＩＮを用いてブースティングされた。プライミングの４５日後、フ

ローサイトメトリーによるＴ細胞分析のために肺組織を、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血清を採取した。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、１４日後、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされ、プライミングの１１８日後に、６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２が曝露された。図４Ｂ～４Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｅ及び４Ｆは、肺組織における総四量体＋ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｇ～４Ｋは、パーコール勾配によって単離され、ＳＣＶ２由来のスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激された肺リンパ球を示す。細胞内サイトカイン染色を実施して、血管外ＩＶ$^{-}$ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成を評価した。図４Ｌ～４Ｏは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスにおける、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図４Ｌ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図４Ｍ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図４Ｎ）血清ＩｇＡ及び（図４Ｏ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図４Ｐは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。図４Ｑ～４Ｓは、感染後１～１４日のｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスの体重減少、生存及び無病生存期間（＜５％最大体重減少）を示す。図４Ｔ及び４Ｕは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。使用される実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライム－ブーストからの対照データ点は、図４及び６に共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図４Ｂ）～（図４Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡによって、続いて、チューキー補正又は［（図４Ｐ）、（図４Ｔ）及び（図４Ｕ）］スチューデントのｔ検定、及び［（図４Ｒ）及び（図４Ｓ）］ログランクマンテルコックス検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図４Ｕ】図４Ａ～４Ｕは、ＩＮスパイクブースティングが粘膜免疫の増強を誘発し、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰブースティングと同様の全身性体液性応答を有することを示す。図４Ａ、実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、続いて、１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＩＭ又は１μｇのＳＣＶ２スパイクＩＮを用いてブースティングされた。プライミングの４５日後、フローサイトメトリーによるＴ細胞分析のために肺組織を、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血清を採取した。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、１４日後、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされ、プライミングの１１８日後に、６×１０^{4}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２が曝露された。図４Ｂ～４Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｅ及び４Ｆは、肺組織における総四量体＋ＣＤ４Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞の定量化を示す。図４Ｇ～４Ｋは、パーコール勾配によって単離され、ＳＣＶ２由来のスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激された肺リンパ球を示す。細胞内サイトカイン染色を実施して、血管外ＩＶ$^{-}$ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成を評価した。図４Ｌ～４Ｏは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスにおける、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的（図４Ｌ）ＢＡＬＦ　ＩｇＡ、（図４Ｍ）ＢＡＬＦ　ＩｇＧ、（図４Ｎ）血清ＩｇＡ及び（図４Ｏ）血清ＩｇＧの測定値を示す。図４Ｐは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。図４Ｑ～４Ｓは、感染後１～１４日のｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスの体重減少、生存及び無病生

存期間（＜５％最大体重減少）を示す。図４Ｔ及び４Ｕは、プラークアッセイによる感染の２日後の肺及び鼻腔の鼻甲介組織における感染性ウイルス力価の測定値を示す。使用される実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライム－ブーストからの対照データ点は、図４及び６に共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図４Ｂ）～（図４Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡによって、続いて、チューキー補正又は［（図４Ｐ）、（図４Ｔ）及び（図４Ｕ）］スチューデントのｔ検定、及び［（図４Ｒ）及び（図４Ｓ）］ログランクマンテルコックス検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図５Ａ】図５Ａ～５Ｏは、ＩＮスパイクブースティングがハムスターモデルにおいてウイルス伝播の低減につながることを示す。図５Ａは、実験スキーマである。シリアンハムスターは０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、２１日後に、０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされた（図５Ｂ及び５Ｃ）。プライムの６０日後、ＥＬＩＳＡによって血清ＩｇＧ及びＩｇＡが評価された。プライム後９３日で、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト及びＰ＆Ｓハムスターに6×10^3 ＰＦＵ ＳＣＶ２を感染させた。図５Ｄは、出発のパーセントとしての体重減少を示す。図５Ｄは、感染後７日での肺試料の病理組織学的解析を示す。図５Ｆ～５Ｈは、中咽頭スワブからのウイルス力価が、平均（記号）及び標準偏差（網掛け領域）、同一時点での対照に対するＰ値として示されていることを示す。図５Ｉは、感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析を示す。（図５Ｊ）伝播実験スキーマ。上記のとおりにワクチン接種されたシリアンハムスターを、２４時間前に6×10^3 ＰＦＵ ＳＣＶ２を感染させた未処置ドナーハムスターと４時間共飼育した。（図５Ｋ）曝露後７日での肺試料の病理組織学的解析。（図５Ｌ～５Ｎ）中咽頭スワブからのウイルス力価が平均（記号）及び標準偏差（網掛け）、同一時点での対照に対するＰ値として示されている。（図５Ｏ）感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図５Ｂ）、（図５Ｃ）、（図５Ｅ）、（図５Ｉ）、（図５Ｋ）及び（図５Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正、［（図５Ｆ）～（図５Ｈ）］混合効果解析と、続いてチューキーの多重比較検定、又は［（図５Ｌ）～（図５Ｎ）］二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてダネットの多重比較検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、１つの独立実験から表されている。

【図５Ｂ】図５Ａ～５Ｏは、ＩＮスパイクブースティングがハムスターモデルにおいてウイルス伝播の低減につながることを示す。図５Ａは、実験スキーマである。シリアンハムスターは０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、２１日後に、０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされた（図５Ｂ及び５Ｃ）。プライムの６０日後、ＥＬＩＳＡによって血清ＩｇＧ及びＩｇＡが評価された。プライム後９３日で、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト及びＰ＆Ｓハムスターに6×10^3 ＰＦＵ ＳＣＶ２を感染させた。図５Ｄは、出発のパーセントとしての体重減少を示す。図５Ｄは、感染後７日での肺試料の病理組織学的解析を示す。図５Ｆ～５Ｈは、中咽頭スワブからのウイルス力価が、平均（記号）及び標準偏差（網掛け領域）、同一時点での対照に対するＰ値として示されていることを示す。図５Ｉは、感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析を示す。（図５Ｊ）伝播実験スキーマ。上記のとおりにワクチン接種されたシリアンハムスターを、２４時間前に6×10^3 ＰＦＵ ＳＣＶ２を感染させた未処置ドナーハムスターと４時間共飼育した。（図５Ｋ）曝露後７日での肺試料の病理組織学的解析。（図５Ｌ～５Ｎ）中咽頭スワブからのウイルス力価が平均（記号）及び標準偏差（網掛け）、同一時点での対照に対するＰ値として示されている。（図５Ｏ）感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図５Ｂ）、（図５Ｃ）、（図５Ｅ）、（図５Ｉ）、（図５Ｋ）及び（図５Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正、［（図５Ｆ）～（図５Ｈ）］混合効果解析と、続いてチューキーの多重比

較検定、又は［（図５Ｌ）～（図５Ｎ）］二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてダネットの多重比較検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、１つの独立実験から表されている。

【図５Ｃ】図５Ａ～５Ｏは、ＩＮスパイクブースティングがハムスターモデルにおいてウイルス伝播の低減につながることを示す。図５Ａは、実験スキーマである。シリアンハムスターは０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、２１日後に、０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされた（図５Ｂ及び５Ｃ）。プライムの６０日後、ＥＬＩＳＡによって血清ＩｇＧ及びＩｇＡが評価された。プライム後９３日で、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト及びＰ＆Ｓハムスターに６×１０^{3}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２を感染させた。図５Ｄは、出発のパーセントとしての体重減少を示す。図５Ｄは、感染後７日での肺試料の病理組織学的解析を示す。図５Ｆ～５Ｈは、中咽頭スワブからのウイルス力価が、平均（記号）及び標準偏差（網掛け領域）、同一時点での対照に対するＰ値として示されていることを示す。図５Ｉは、感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析を示す。（図５Ｊ）伝播実験スキーマ。上記のとおりにワクチン接種されたシリアンハムスターを、２４時間前に６×１０^{3}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２を感染させた未処置ドナーハムスターと４時間共飼育した。（図５Ｋ）曝露後７日での肺試料の病理組織学的解析。（図５Ｌ～５Ｎ）中咽頭スワブからのウイルス力価が平均（記号）及び標準偏差（網掛け）、同一時点での対照に対するＰ値として示されている。（図５Ｏ）感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図５Ｂ）、（図５Ｃ）、（図５Ｅ）、（図５Ｉ）、（図５Ｋ）及び（図５Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正、［（図５Ｆ）～（図５Ｈ）］混合効果解析と、続いてチューキーの多重比較検定、又は［（図５Ｌ）～（図５Ｎ）］二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてダネットの多重比較検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、１つの独立実験から表されている。

【図５Ｄ】図５Ａ～５Ｏは、ＩＮスパイクブースティングがハムスターモデルにおいてウイルス伝播の低減につながることを示す。図５Ａは、実験スキーマである。シリアンハムスターは０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、２１日後に、０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされた（図５Ｂ及び５Ｃ）。プライムの６０日後、ＥＬＩＳＡによって血清ＩｇＧ及びＩｇＡが評価された。プライム後９３日で、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト及びＰ＆Ｓハムスターに６×１０^{3}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２を感染させた。図５Ｄは、出発のパーセントとしての体重減少を示す。図５Ｄは、感染後７日での肺試料の病理組織学的解析を示す。図５Ｆ～５Ｈは、中咽頭スワブからのウイルス力価が、平均（記号）及び標準偏差（網掛け領域）、同一時点での対照に対するＰ値として示されていることを示す。図５Ｉは、感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析を示す。（図５Ｊ）伝播実験スキーマ。上記のとおりにワクチン接種されたシリアンハムスターを、２４時間前に６×１０^{3}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２を感染させた未処置ドナーハムスターと４時間共飼育した。（図５Ｋ）曝露後７日での肺試料の病理組織学的解析。（図５Ｌ～５Ｎ）中咽頭スワブからのウイルス力価が平均（記号）及び標準偏差（網掛け）、同一時点での対照に対するＰ値として示されている。（図５Ｏ）感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図５Ｂ）、（図５Ｃ）、（図５Ｅ）、（図５Ｉ）、（図５Ｋ）及び（図５Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正、［（図５Ｆ）～（図５Ｈ）］混合効果解析と、続いてチューキーの多重比較検定、又は［（図５Ｌ）～（図５Ｎ）］二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてダネットの多重比較検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、１つの独立実験から表されている。

【図５Ｅ】図５Ａ～５Ｏは、ＩＮスパイクブースティングがハムスターモデルにおいてウイルス伝播の低減につながることを示す。図５Ａは、実験スキーマである。シリアンハムスターは０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、２

１日後に、０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされた（図５Ｂ及び５Ｃ）。プライムの６０日後、ＥＬＩＳＡによって血清ＩｇＧ及びＩｇＡが評価された。プライム後９３日で、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト及びＰ＆Ｓハムスターに６×１０^{3}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２を感染させた。図５Ｄは、出発のパーセントとしての体重減少を示す。図５Ｄは、感染後７日での肺試料の病理組織学的解析を示す。図５Ｆ～５Ｈは、中咽頭スワブからのウイルス力価が、平均（記号）及び標準偏差（網掛け領域）、同一時点での対照に対するＰ値として示されていることを示す。図５Ｉは、感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析を示す。（図５Ｊ）伝播実験スキーマ。上記のとおりにワクチン接種されたシリアンハムスターを、２４時間前に６×１０^{3}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２を感染させた未処置ドナーハムスターと４時間共飼育した。（図５Ｋ）曝露後７日での肺試料の病理組織学的解析。（図５Ｌ～５Ｎ）中咽頭スワブからのウイルス力価が平均（記号）及び標準偏差（網掛け）、同一時点での対照に対するＰ値として示されている。（図５Ｏ）感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図５Ｂ）、（図５Ｃ）、（図５Ｅ）、（図５Ｉ）、（図５Ｋ）及び（図５Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正、［（図５Ｆ）～（図５Ｈ）］混合効果解析と、続いてチューキーの多重比較検定、又は［（図５Ｌ）～（図５Ｎ）］二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてダネットの多重比較検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、１つの独立実験から表されている。

【図５Ｆ】図５Ａ～５Ｏは、ＩＮスパイクブースティングがハムスターモデルにおいてウイルス伝播の低減につながることを示す。図５Ａは、実験スキーマである。シリアンハムスターは０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、２１日後に、０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされた（図５Ｂ及び５Ｃ）。プライムの６０日後、ＥＬＩＳＡによって血清ＩｇＧ及びＩｇＡが評価された。プライム後９３日で、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト及びＰ＆Ｓハムスターに６×１０^{3}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２を感染させた。図５Ｄは、出発のパーセントとしての体重減少を示す。図５Ｄは、感染後７日での肺試料の病理組織学的解析を示す。図５Ｆ～５Ｈは、中咽頭スワブからのウイルス力価が、平均（記号）及び標準偏差（網掛け領域）、同一時点での対照に対するＰ値として示されていることを示す。図５Ｉは、感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析を示す。（図５Ｊ）伝播実験スキーマ。上記のとおりにワクチン接種されたシリアンハムスターを、２４時間前に６×１０^{3}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２を感染させた未処置ドナーハムスターと４時間共飼育した。（図５Ｋ）曝露後７日での肺試料の病理組織学的解析。（図５Ｌ～５Ｎ）中咽頭スワブからのウイルス力価が平均（記号）及び標準偏差（網掛け）、同一時点での対照に対するＰ値として示されている。（図５Ｏ）感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図５Ｂ）、（図５Ｃ）、（図５Ｅ）、（図５Ｉ）、（図５Ｋ）及び（図５Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正、［（図５Ｆ）～（図５Ｈ）］混合効果解析と、続いてチューキーの多重比較検定、又は［（図５Ｌ）～（図５Ｎ）］二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてダネットの多重比較検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、１つの独立実験から表されている。

【図５Ｇ】図５Ａ～５Ｏは、ＩＮスパイクブースティングがハムスターモデルにおいてウイルス伝播の低減につながることを示す。図５Ａは、実験スキーマである。シリアンハムスターは０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、２１日後に、０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされた（図５Ｂ及び５Ｃ）。プライムの６０日後、ＥＬＩＳＡによって血清ＩｇＧ及びＩｇＡが評価された。プライム後９３日で、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト及びＰ＆Ｓハムスターに６×１０^{3}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２を感染させた。図５Ｄは、出発のパーセントとしての体重減少を示す。図５Ｄは、感染後７日での肺試料の病理組織学的解析を示す。図５Ｆ～５Ｈは、中咽頭スワブからのウ

イルス力価が、平均（記号）及び標準偏差（網掛け領域）、同一時点での対照に対するＰ値として示されていることを示す。図５Ｉは、感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析を示す。（図５Ｊ）伝播実験スキーマ。上記のとおりにワクチン接種されたシリアンハムスターを、２４時間前に６×１０^{3}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２を感染させた未処置ドナーハムスターと４時間共飼育した。（図５Ｋ）曝露後７日での肺試料の病理組織学的解析。（図５Ｌ～５Ｎ）中咽頭スワブからのウイルス力価が平均（記号）及び標準偏差（網掛け）、同一時点での対照に対するＰ値として示されている。（図５Ｏ）感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図５Ｂ）、（図５Ｃ）、（図５Ｅ）、（図５Ｉ）、（図５Ｋ）及び（図５Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正、［（図５Ｆ）～（図５Ｈ）］混合効果解析と、続いてチューキーの多重比較検定、又は［（図５Ｌ）～（図５Ｎ）］二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてダネットの多重比較検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、１つの独立実験から表されている。

【図５Ｈ】図５Ａ～５Ｏは、ＩＮスパイクブースティングがハムスターモデルにおいてウイルス伝播の低減につながることを示す。図５Ａは、実験スキーマである。シリアンハムスターは０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、２１日後に、０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされた（図５Ｂ及び５Ｃ）。プライムの６０日後、ＥＬＩＳＡによって血清ＩｇＧ及びＩｇＡが評価された。プライム後９３日で、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト及びＰ＆Ｓハムスターに６×１０^{3}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２を感染させた。図５Ｄは、出発のパーセントとしての体重減少を示す。図５Ｄは、感染後７日での肺試料の病理組織学的解析を示す。図５Ｆ～５Ｈは、中咽頭スワブからのウイルス力価が、平均（記号）及び標準偏差（網掛け領域）、同一時点での対照に対するＰ値として示されていることを示す。図５Ｉは、感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析を示す。（図５Ｊ）伝播実験スキーマ。上記のとおりにワクチン接種されたシリアンハムスターを、２４時間前に６×１０^{3}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２を感染させた未処置ドナーハムスターと４時間共飼育した。（図５Ｋ）曝露後７日での肺試料の病理組織学的解析。（図５Ｌ～５Ｎ）中咽頭スワブからのウイルス力価が平均（記号）及び標準偏差（網掛け）、同一時点での対照に対するＰ値として示されている。（図５Ｏ）感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図５Ｂ）、（図５Ｃ）、（図５Ｅ）、（図５Ｉ）、（図５Ｋ）及び（図５Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正、［（図５Ｆ）～（図５Ｈ）］混合効果解析と、続いてチューキーの多重比較検定、又は［（図５Ｌ）～（図５Ｎ）］二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてダネットの多重比較検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、１つの独立実験から表されている。

【図５Ｉ】図５Ａ～５Ｏは、ＩＮスパイクブースティングがハムスターモデルにおいてウイルス伝播の低減につながることを示す。図５Ａは、実験スキーマである。シリアンハムスターは０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、２１日後に、０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされた（図５Ｂ及び５Ｃ）。プライムの６０日後、ＥＬＩＳＡによって血清ＩｇＧ及びＩｇＡが評価された。プライム後９３日で、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト及びＰ＆Ｓハムスターに６×１０^{3}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２を感染させた。図５Ｄは、出発のパーセントとしての体重減少を示す。図５Ｄは、感染後７日での肺試料の病理組織学的解析を示す。図５Ｆ～５Ｈは、中咽頭スワブからのウイルス力価が、平均（記号）及び標準偏差（網掛け領域）、同一時点での対照に対するＰ値として示されていることを示す。図５Ｉは、感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析を示す。（図５Ｊ）伝播実験スキーマ。上記のとおりにワクチン接種されたシリアンハムスターを、２４時間前に６×１０^{3}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２を感染させた未処置ドナーハムスターと４時間共飼育した。（図５Ｋ）曝露後７日での肺試料の病理組織学的解析。（図５Ｌ～５Ｎ）中咽頭スワブからのウイルス力価が平均（記号）及び標準偏差（網掛け）

、同一時点での対照に対するＰ値として示されている。（図５Ｏ）感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図５Ｂ）、（図５Ｃ）、（図５Ｅ）、（図５Ｉ）、（図５Ｋ）及び（図５Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正、［（図５Ｆ）～（図５Ｈ）］混合効果解析と、続いてチューキーの多重比較検定、又は［（図５Ｌ）～（図５Ｎ）］二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてダネットの多重比較検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、１つの独立実験から表されている。

【図５Ｊ】図５Ａ～５Ｏは、ＩＮスパイクブースティングがハムスターモデルにおいてウイルス伝播の低減につながることを示す。図５Ａは、実験スキーマである。シリアンハムスターは０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、２１日後に、０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされた（図５Ｂ及び５Ｃ）。プライムの６０日後、ＥＬＩＳＡによって血清ＩｇＧ及びＩｇＡが評価された。プライム後９３日で、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト及びＰ＆Ｓハムスターに６×１０^{3}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２を感染させた。図５Ｄは、出発のパーセントとしての体重減少を示す。図５Ｄは、感染後７日での肺試料の病理組織学的解析を示す。図５Ｆ～５Ｈは、中咽頭スワブからのウイルス力価が、平均（記号）及び標準偏差（網掛け領域）、同一時点での対照に対するＰ値として示されていることを示す。図５Ｉは、感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析を示す。（図５Ｊ）伝播実験スキーマ。上記のとおりにワクチン接種されたシリアンハムスターを、２４時間前に６×１０^{3}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２を感染させた未処置ドナーハムスターと４時間共飼育した。（図５Ｋ）曝露後７日での肺試料の病理組織学的解析。（図５Ｌ～５Ｎ）中咽頭スワブからのウイルス力価が平均（記号）及び標準偏差（網掛け）、同一時点での対照に対するＰ値として示されている。（図５Ｏ）感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図５Ｂ）、（図５Ｃ）、（図５Ｅ）、（図５Ｉ）、（図５Ｋ）及び（図５Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正、［（図５Ｆ）～（図５Ｈ）］混合効果解析と、続いてチューキーの多重比較検定、又は［（図５Ｌ）～（図５Ｎ）］二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてダネットの多重比較検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、１つの独立実験から表されている。

【図５Ｋ】図５Ａ～５Ｏは、ＩＮスパイクブースティングがハムスターモデルにおいてウイルス伝播の低減につながることを示す。図５Ａは、実験スキーマである。シリアンハムスターは０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、２１日後に、０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされた（図５Ｂ及び５Ｃ）。プライムの６０日後、ＥＬＩＳＡによって血清ＩｇＧ及びＩｇＡが評価された。プライム後９３日で、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト及びＰ＆Ｓハムスターに６×１０^{3}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２を感染させた。図５Ｄは、出発のパーセントとしての体重減少を示す。図５Ｄは、感染後７日での肺試料の病理組織学的解析を示す。図５Ｆ～５Ｈは、中咽頭スワブからのウイルス力価が、平均（記号）及び標準偏差（網掛け領域）、同一時点での対照に対するＰ値として示されていることを示す。図５Ｉは、感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析を示す。（図５Ｊ）伝播実験スキーマ。上記のとおりにワクチン接種されたシリアンハムスターを、２４時間前に６×１０^{3}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２を感染させた未処置ドナーハムスターと４時間共飼育した。（図５Ｋ）曝露後７日での肺試料の病理組織学的解析。（図５Ｌ～５Ｎ）中咽頭スワブからのウイルス力価が平均（記号）及び標準偏差（網掛け）、同一時点での対照に対するＰ値として示されている。（図５Ｏ）感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図５Ｂ）、（図５Ｃ）、（図５Ｅ）、（図５Ｉ）、（図５Ｋ）及び（図５Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正、［（図５Ｆ）～（図５Ｈ）］混合効果解析と、続いてチューキーの多重比較検定、又は［（図５Ｌ）～（図５Ｎ）］二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてダネットの多重比較検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００

１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、１つの独立実験から表されている。【図５Ｌ】図５Ａ～５Ｏは、ＩＮスパイクブースティングがハムスターモデルにおいてウイルス伝播の低減につながることを示す。図５Ａは、実験スキーマである。シリアンハムスターは０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、２１日後に、０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされた（図５Ｂ及び５Ｃ）。プライムの６０日後、ＥＬＩＳＡによって血清ＩｇＧ及びＩｇＡが評価された。プライム後９３日で、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト及びＰ＆Ｓハムスターに６×１０^{3}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２を感染させた。図５Ｄは、出発のパーセントとしての体重減少を示す。図５Ｄは、感染後７日での肺試料の病理組織学的解析を示す。図５Ｆ～５Ｈは、中咽頭スワブからのウイルス力価が、平均（記号）及び標準偏差（網掛け領域）、同一時点での対照に対するＰ値として示されていることを示す。図５Ｉは、感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析を示す。（図５Ｊ）伝播実験スキーマ。上記のとおりにワクチン接種されたシリアンハムスターを、２４時間前に６×１０^{3}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２を感染させた未処置ドナーハムスターと４時間共飼育した。（図５Ｋ）曝露後７日での肺試料の病理組織学的解析。（図５Ｌ～５Ｎ）中咽頭スワブからのウイルス力価が平均（記号）及び標準偏差（網掛け）、同一時点での対照に対するＰ値として示されている。（図５Ｏ）感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図５Ｂ）、（図５Ｃ）、（図５Ｅ）、（図５Ｉ）、（図５Ｋ）及び（図５Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正、［（図５Ｆ）～（図５Ｈ）］混合効果解析と、続いてチューキーの多重比較検定、又は［（図５Ｌ）～（図５Ｎ）］二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてダネットの多重比較検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、１つの独立実験から表されている。【図５Ｍ】図５Ａ～５Ｏは、ＩＮスパイクブースティングがハムスターモデルにおいてウイルス伝播の低減につながることを示す。図５Ａは、実験スキーマである。シリアンハムスターは０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、２１日後に、０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされた（図５Ｂ及び５Ｃ）。プライムの６０日後、ＥＬＩＳＡによって血清ＩｇＧ及びＩｇＡが評価された。プライム後９３日で、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト及びＰ＆Ｓハムスターに６×１０^{3}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２を感染させた。図５Ｄは、出発のパーセントとしての体重減少を示す。図５Ｄは、感染後７日での肺試料の病理組織学的解析を示す。図５Ｆ～５Ｈは、中咽頭スワブからのウイルス力価が、平均（記号）及び標準偏差（網掛け領域）、同一時点での対照に対するＰ値として示されていることを示す。図５Ｉは、感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析を示す。（図５Ｊ）伝播実験スキーマ。上記のとおりにワクチン接種されたシリアンハムスターを、２４時間前に６×１０^{3}　ＰＦＵ　ＳＣＶ２を感染させた未処置ドナーハムスターと４時間共飼育した。（図５Ｋ）曝露後７日での肺試料の病理組織学的解析。（図５Ｌ～５Ｎ）中咽頭スワブからのウイルス力価が平均（記号）及び標準偏差（網掛け）、同一時点での対照に対するＰ値として示されている。（図５Ｏ）感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図５Ｂ）、（図５Ｃ）、（図５Ｅ）、（図５Ｉ）、（図５Ｋ）及び（図５Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正、［（図５Ｆ）～（図５Ｈ）］混合効果解析と、続いてチューキーの多重比較検定、又は［（図５Ｌ）～（図５Ｎ）］二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてダネットの多重比較検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、１つの独立実験から表されている。【図５Ｎ】図５Ａ～５Ｏは、ＩＮスパイクブースティングがハムスターモデルにおいてウイルス伝播の低減につながることを示す。図５Ａは、実験スキーマである。シリアンハムスターは０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、２１日後に、０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされた（図５Ｂ及び５Ｃ）。プライムの６０日後、

ＥＬＩＳＡによって血清ＩｇＧ及びＩｇＡが評価された。プライム後９３日で、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト及びＰ＆ＳハムスターにＰＦＵ　ＳＣＶ２を感染させた。図５Ｄは、出発のパーセントとしての体重減少を示す。図５Ｄは、感染後７日での肺試料の病理組織学的解析を示す。図５Ｆ～５Ｈは、中咽頭スワブからのウイルス力価が、平均（記号）及び標準偏差（網掛け領域）、同一時点での対照に対するＰ値として示されていることを示す。図５Ｉは、感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析を示す。（図５Ｊ）伝播実験スキーマ。上記のとおりにワクチン接種されたシリアンハムスターを、２４時間前にＰＦＵ　ＳＣＶ２を感染させた未処置ドナーハムスターと４時間共飼育した。（図５Ｋ）曝露後７日での肺試料の病理組織学的解析。（図５Ｌ～５Ｎ）中咽頭スワブからのウイルス力価が平均（記号）及び標準偏差（網掛け）、同一時点での対照に対するＰ値として示されている。（図５Ｏ）感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図５Ｂ）、（図５Ｃ）、（図５Ｅ）、（図５Ｉ）、（図５Ｋ）及び（図５Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正、［（図５Ｆ）～（図５Ｈ）］混合効果解析と、続いてチューキーの多重比較検定、又は［（図５Ｌ）～（図５Ｎ）］二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてダネットの多重比較検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、１つの独立実験から表されている。

【図５Ｏ】図５Ａ～５Ｏは、ＩＮスパイクブースティングがハムスターモデルにおいてウイルス伝播の低減につながることを示す。図５Ａは、実験スキーマである。シリアンハムスターは０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、２１日後に、０．５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇのＳＣＶ２スパイクを用いて鼻腔内にブースティングされた（図５Ｂ及び５Ｃ）。プライムの６０日後、ＥＬＩＳＡによって血清ＩｇＧ及びＩｇＡが評価された。プライム後９３日で、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト及びＰ＆ＳハムスターにＰＦＵ　ＳＣＶ２を感染させた。図５Ｄは、出発のパーセントとしての体重減少を示す。図５Ｄは、感染後７日での肺試料の病理組織学的解析を示す。図５Ｆ～５Ｈは、中咽頭スワブからのウイルス力価が、平均（記号）及び標準偏差（網掛け領域）、同一時点での対照に対するＰ値として示されていることを示す。図５Ｉは、感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析を示す。（図５Ｊ）伝播実験スキーマ。上記のとおりにワクチン接種されたシリアンハムスターを、２４時間前にＰＦＵ　ＳＣＶ２を感染させた未処置ドナーハムスターと４時間共飼育した。（図５Ｋ）曝露後７日での肺試料の病理組織学的解析。（図５Ｌ～５Ｎ）中咽頭スワブからのウイルス力価が平均（記号）及び標準偏差（網掛け）、同一時点での対照に対するＰ値として示されている。（図５Ｏ）感染後６日にわたるウイルス力価のＡＵＣ解析。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、［（図５Ｂ）、（図５Ｃ）、（図５Ｅ）、（図５Ｉ）、（図５Ｋ）及び（図５Ｏ）］一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正、［（図５Ｆ）～（図５Ｈ）］混合効果解析と、続いてチューキーの多重比較検定、又は［（図５Ｌ）～（図５Ｎ）］二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてダネットの多重比較検定によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、１つの独立実験から表されている。

【図６Ａ】図６Ａ～６Ｘは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いる異種ＩＮブースティングが、既存のＳＣＶ２特異的免疫を増強し、ＳＣＶ１に対する応答性を広げることを示す。（図６Ａ）実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、プライムの１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇの融合前安定化型、三量体、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（ＳＣＶ１）スパイクＩＮを用いて（ＩＮ　ＳｐｉｋｅＸ）ブースティングされた。図６Ｂ～６Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。（図６Ｅ～６Ｎ）パーコール勾配精製された肺リンパ球は、［（図６Ｅ）～（図６Ｉ）］ＳＣＶ１又は［（図６Ｊ）～（図６Ｎ）］ＳＣＶ２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺

激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成が評価された。図６Ｏ～６Ｓは、ＳＣＶ１スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。（図６Ｓ）ＳＣＶ１スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値。図６Ｔ～６Ｗは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。図６Ｘは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。使用された実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライムブーストからの対照データ点は、図４Ａ～４Ｕ及び図６Ａ～６Ｘに共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、［（図６Ｓ）及び（図６Ｘ）］スチューデントのｔ検定を除いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図６Ｂ】図６Ａ～６Ｘは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いる異種ＩＮブースティングが、既存のＳＣＶ２特異的免疫を増強し、ＳＣＶ１に対する応答性を広げることを示す。（図６Ａ）実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、プライムの１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇの融合前安定化型、三量体、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（ＳＣＶ１）スパイクＩＮを用いて（ＩＮ　ＳｐｉｋｅＸ）ブースティングされた。図６Ｂ～６Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。（図６Ｅ～６Ｎ）パーコール勾配精製された肺リンパ球は、［（図６Ｅ）～（図６Ｉ）］ＳＣＶ１又は［（図６Ｊ）～（図６Ｎ）］ＳＣＶ２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成が評価された。図６Ｏ～６Ｓは、ＳＣＶ１スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。（図６Ｓ）ＳＣＶ１スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値。図６Ｔ～６Ｗは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。図６Ｘは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。使用された実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライムブーストからの対照データ点は、図４Ａ～４Ｕ及び図６Ａ～６Ｘに共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、［（図６Ｓ）及び（図６Ｘ）］スチューデントのｔ検定を除いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図６Ｃ】図６Ａ～６Ｘは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いる異種ＩＮブースティングが、既存のＳＣＶ２特異的免疫を増強し、ＳＣＶ１に対する応答性を広げることを示す。（図６Ａ）実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、プライムの１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇの融合前安定化型、三量体、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（ＳＣＶ１）スパイクＩＮを用いて（ＩＮ　ＳｐｉｋｅＸ）ブースティングされた。図６Ｂ～６Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。（図６Ｅ～６Ｎ）パーコール勾配精製された肺リンパ球は、［（図６Ｅ）～（図６Ｉ）］ＳＣＶ１又は［（図６Ｊ）～（図６Ｎ）］ＳＣＶ２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異

的生成が評価された。図６Ｏ～６Ｓは、ＳＣＶ１スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。（図６Ｓ）ＳＣＶ１スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値。図６Ｔ～６Ｗは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。図６Ｘは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。使用された実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライムブーストからの対照データ点は、図４Ａ～４Ｕ及び図６Ａ～６Ｘに共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、［（図６Ｓ）及び（図６Ｘ）］スチューデントのｔ検定を除いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図６Ｄ】図６Ａ～６Ｘは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いる異種ＩＮブースティングが、既存のＳＣＶ２特異的免疫を増強し、ＳＣＶ１に対する応答性を広げることを示す。（図６Ａ）実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、プライムの１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇの融合前安定化型、三量体、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（ＳＣＶ１）スパイクＩＮを用いて（ＩＮ　ＳｐｉｋｅＸ）ブースティングされた。図６Ｂ～６Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。（図６Ｅ～６Ｎ）パーコール勾配精製された肺リンパ球は、［（図６Ｅ）～（図６Ｉ）］ＳＣＶ１又は［（図６Ｊ）～（図６Ｎ）］ＳＣＶ２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成が評価された。図６Ｏ～６Ｓは、ＳＣＶ１スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。（図６Ｓ）ＳＣＶ１スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値。図６Ｔ～６Ｗは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。図６Ｘは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。使用された実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライムブーストからの対照データ点は、図４Ａ～４Ｕ及び図６Ａ～６Ｘに共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、［（図６Ｓ）及び（図６Ｘ）］スチューデントのｔ検定を除いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図６Ｅ】図６Ａ～６Ｘは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いる異種ＩＮブースティングが、既存のＳＣＶ２特異的免疫を増強し、ＳＣＶ１に対する応答性を広げることを示す。（図６Ａ）実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、プライムの１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇの融合前安定化型、三量体、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（ＳＣＶ１）スパイクＩＮを用いて（ＩＮ　ＳｐｉｋｅＸ）ブースティングされた。図６Ｂ～６Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。（図６Ｅ～６Ｎ）パーコール勾配精製された肺リンパ球は、［（図６Ｅ）～（図６Ｉ）］ＳＣＶ１又は［（図６Ｊ）～（図６Ｎ）］ＳＣＶ２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成が評価された。図６Ｏ～６Ｓは、ＳＣＶ１スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。（図６Ｓ）ＳＣＶ１

スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値。図６Ｔ～６Ｗは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。図６Ｘは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。使用された実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライムブーストからの対照データ点は、図４Ａ～４Ｕ及び図６Ａ～６Ｘに共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、［（図６Ｓ）及び（図６Ｘ）］スチューデントのｔ検定を除いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図６Ｆ】図６Ａ～６Ｘは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いる異種ＩＮブースティングが、既存のＳＣＶ２特異的免疫を増強し、ＳＣＶ１に対する応答性を広げることを示す。（図６Ａ）実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、プライムの１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇの融合前安定化型、三量体、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（ＳＣＶ１）スパイクＩＮを用いて（ＩＮ　ＳｐｉｋｅＸ）ブースティングされた。図６Ｂ～６Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。（図６Ｅ～６Ｎ）パーコール勾配精製された肺リンパ球は、［（図６Ｅ）～（図６Ｉ）］ＳＣＶ１又は［（図６Ｊ）～（図６Ｎ）］ＳＣＶ２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成が評価された。図６Ｏ～６Ｓは、ＳＣＶ１スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。（図６Ｓ）ＳＣＶ１スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値。図６Ｔ～６Ｗは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。図６Ｘは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。使用された実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライムブーストからの対照データ点は、図４Ａ～４Ｕ及び図６Ａ～６Ｘに共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、［（図６Ｓ）及び（図６Ｘ）］スチューデントのｔ検定を除いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図６Ｇ】図６Ａ～６Ｘは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いる異種ＩＮブースティングが、既存のＳＣＶ２特異的免疫を増強し、ＳＣＶ１に対する応答性を広げることを示す。（図６Ａ）実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、プライムの１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇの融合前安定化型、三量体、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（ＳＣＶ１）スパイクＩＮを用いて（ＩＮ　ＳｐｉｋｅＸ）ブースティングされた。図６Ｂ～６Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。（図６Ｅ～６Ｎ）パーコール勾配精製された肺リンパ球は、［（図６Ｅ）～（図６Ｉ）］ＳＣＶ１又は［（図６Ｊ）～（図６Ｎ）］ＳＣＶ２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成が評価された。図６Ｏ～６Ｓは、ＳＣＶ１スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。（図６Ｓ）ＳＣＶ１スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値。図６Ｔ～６Ｗは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を

示す。図６Ｘは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。使用された実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライムブーストからの対照データ点は、図４Ａ～４Ｕ及び図６Ａ～６Ｘに共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、［（図６Ｓ）及び（図６Ｘ）］スチューデントのｔ検定を除いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図６Ｈ】図６Ａ～６Ｘは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いる異種ＩＮブースティングが、既存のＳＣＶ２特異的免疫を増強し、ＳＣＶ１に対する応答性を広げることを示す。（図６Ａ）実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、プライムの１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇの融合前安定化型、三量体、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（ＳＣＶ１）スパイクＩＮを用いて（ＩＮ　ＳｐｉｋｅＸ）ブースティングされた。図６Ｂ～６Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。（図６Ｅ～６Ｎ）パーコール勾配精製された肺リンパ球は、［（図６Ｅ）～（図６Ｉ）］ＳＣＶ１又は［（図６Ｊ）～（図６Ｎ）］ＳＣＶ２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成が評価された。図６Ｏ～６Ｓは、ＳＣＶ１スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。（図６Ｓ）ＳＣＶ１スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値。図６Ｔ～６Ｗは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。図６Ｘは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。使用された実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライムブーストからの対照データ点は、図４Ａ～４Ｕ及び図６Ａ～６Ｘに共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、［（図６Ｓ）及び（図６Ｘ）］スチューデントのｔ検定を除いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図６Ｉ】図６Ａ～６Ｘは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いる異種ＩＮブースティングが、既存のＳＣＶ２特異的免疫を増強し、ＳＣＶ１に対する応答性を広げることを示す。（図６Ａ）実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、プライムの１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇの融合前安定化型、三量体、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（ＳＣＶ１）スパイクＩＮを用いて（ＩＮ　ＳｐｉｋｅＸ）ブースティングされた。図６Ｂ～６Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。（図６Ｅ～６Ｎ）パーコール勾配精製された肺リンパ球は、［（図６Ｅ）～（図６Ｉ）］ＳＣＶ１又は［（図６Ｊ）～（図６Ｎ）］ＳＣＶ２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成が評価された。図６Ｏ～６Ｓは、ＳＣＶ１スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。（図６Ｓ）ＳＣＶ１スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値。図６Ｔ～６Ｗは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。図６Ｘは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。使用された実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライムブーストからの対

照データ点は、図４Ａ～４Ｕ及び図６Ａ～６Ｘに共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、［（図６Ｓ）及び（図６Ｘ）］スチューデントのｔ検定を除いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図６Ｊ】図６Ａ～６Ｘは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いる異種ＩＮブースティングが、既存のＳＣＶ２特異的免疫を増強し、ＳＣＶ１に対する応答性を広げることを示す。（図６Ａ）実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、プライムの１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇの融合前安定化型、三量体、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（ＳＣＶ１）スパイクＩＮを用いて（ＩＮ　ＳｐｉｋｅＸ）ブースティングされた。図６Ｂ～６Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。（図６Ｅ～６Ｎ）パーコール勾配精製された肺リンパ球は、［（図６Ｅ）～（図６Ｉ）］ＳＣＶ１又は［（図６Ｊ）～（図６Ｎ）］ＳＣＶ２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成が評価された。図６Ｏ～６Ｓは、ＳＣＶ１スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。（図６Ｓ）ＳＣＶ１スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値。図６Ｔ～６Ｗは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。図６Ｘは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。使用された実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライムブーストからの対照データ点は、図４Ａ～４Ｕ及び図６Ａ～６Ｘに共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、［（図６Ｓ）及び（図６Ｘ）］スチューデントのｔ検定を除いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図６Ｋ】図６Ａ～６Ｘは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いる異種ＩＮブースティングが、既存のＳＣＶ２特異的免疫を増強し、ＳＣＶ１に対する応答性を広げることを示す。（図６Ａ）実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、プライムの１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇの融合前安定化型、三量体、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（ＳＣＶ１）スパイクＩＮを用いて（ＩＮ　ＳｐｉｋｅＸ）ブースティングされた。図６Ｂ～６Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。（図６Ｅ～６Ｎ）パーコール勾配精製された肺リンパ球は、［（図６Ｅ）～（図６Ｉ）］ＳＣＶ１又は［（図６Ｊ）～（図６Ｎ）］ＳＣＶ２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成が評価された。図６Ｏ～６Ｓは、ＳＣＶ１スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。（図６Ｓ）ＳＣＶ１スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値。図６Ｔ～６Ｗは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。図６Ｘは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。使用された実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライムブーストからの対照データ点は、図４Ａ～４Ｕ及び図６Ａ～６Ｘに共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、［（図６Ｓ）及び（図６Ｘ）］スチューデント

のｔ検定を除いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図６Ｌ】図６Ａ～６Ｘは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いる異種ＩＮブースティングが、既存のＳＣＶ２特異的免疫を増強し、ＳＣＶ１に対する応答性を広げることを示す。（図６Ａ）実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、プライムの１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇの融合前安定化型、三量体、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（ＳＣＶ１）スパイクＩＮを用いて（ＩＮ　ＳｐｉｋｅＸ）ブースティングされた。図６Ｂ～６Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。（図６Ｅ～６Ｎ）パーコール勾配精製された肺リンパ球は、［（図６Ｅ）～（図６Ｉ）］ＳＣＶ１又は［（図６Ｊ）～（図６Ｎ）］ＳＣＶ２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成が評価された。図６Ｏ～６Ｓは、ＳＣＶ１スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。（図６Ｓ）ＳＣＶ１スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値。図６Ｔ～６Ｗは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。図６Ｘは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。使用された実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライムブーストからの対照データ点は、図４Ａ～４Ｕ及び図６Ａ～６Ｘに共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、［（図６Ｓ）及び（図６Ｘ）］スチューデントのｔ検定を除いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図６Ｍ】図６Ａ～６Ｘは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いる異種ＩＮブースティングが、既存のＳＣＶ２特異的免疫を増強し、ＳＣＶ１に対する応答性を広げることを示す。（図６Ａ）実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、プライムの１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇの融合前安定化型、三量体、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（ＳＣＶ１）スパイクＩＮを用いて（ＩＮ　ＳｐｉｋｅＸ）ブースティングされた。図６Ｂ～６Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。（図６Ｅ～６Ｎ）パーコール勾配精製された肺リンパ球は、［（図６Ｅ）～（図６Ｉ）］ＳＣＶ１又は［（図６Ｊ）～（図６Ｎ）］ＳＣＶ２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成が評価された。図６Ｏ～６Ｓは、ＳＣＶ１スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。（図６Ｓ）ＳＣＶ１スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値。図６Ｔ～６Ｗは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。図６Ｘは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。使用された実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライムブーストからの対照データ点は、図４Ａ～４Ｕ及び図６Ａ～６Ｘに共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、［（図６Ｓ）及び（図６Ｘ）］スチューデントのｔ検定を除いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独

立実験から表され、プールされている。
【図６Ｎ】図６Ａ～６Ｘは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いる異種ＩＮブースティングが、既存のＳＣＶ２特異的免疫を増強し、ＳＣＶ１に対する応答性を広げることを示す。（図６Ａ）実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、プライムの１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇの融合前安定化型、三量体、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（ＳＣＶ１）スパイクＩＮを用いて（ＩＮ　ＳｐｉｋｅＸ）ブースティングされた。図６Ｂ～６Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。（図６Ｅ～６Ｎ）パーコール勾配精製された肺リンパ球は、［（図６Ｅ）～（図６Ｉ）］ＳＣＶ１又は［（図６Ｊ）～（図６Ｎ）］ＳＣＶ２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成が評価された。図６Ｏ～６Ｓは、ＳＣＶ１スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。（図６Ｓ）ＳＣＶ１スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値。図６Ｔ～６Ｗは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。図６Ｘは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。使用された実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライムブーストからの対照データ点は、図４Ａ～４Ｕ及び図６Ａ～６Ｘに共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、［（図６Ｓ）及び（図６Ｘ）］スチューデントのｔ検定を除いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。
【図６Ｏ】図６Ａ～６Ｘは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いる異種ＩＮブースティングが、既存のＳＣＶ２特異的免疫を増強し、ＳＣＶ１に対する応答性を広げることを示す。（図６Ａ）実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、プライムの１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇの融合前安定化型、三量体、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（ＳＣＶ１）スパイクＩＮを用いて（ＩＮ　ＳｐｉｋｅＸ）ブースティングされた。図６Ｂ～６Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。（図６Ｅ～６Ｎ）パーコール勾配精製された肺リンパ球は、［（図６Ｅ）～（図６Ｉ）］ＳＣＶ１又は［（図６Ｊ）～（図６Ｎ）］ＳＣＶ２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成が評価された。図６Ｏ～６Ｓは、ＳＣＶ１スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。（図６Ｓ）ＳＣＶ１スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値。図６Ｔ～６Ｗは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。図６Ｘは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。使用された実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライムブーストからの対照データ点は、図４Ａ～４Ｕ及び図６Ａ～６Ｘに共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、［（図６Ｓ）及び（図６Ｘ）］スチューデントのｔ検定を除いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。
【図６Ｐ】図６Ａ～６Ｘは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いる異種ＩＮブースティ

ングが、既存のＳＣＶ２特異的免疫を増強し、ＳＣＶ１に対する応答性を広げることを示す。（図６Ａ）実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、プライムの１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇの融合前安定化型、三量体、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（ＳＣＶ１）スパイクＩＮを用いて（ＩＮ　ＳｐｉｋｅＸ）ブースティングされた。図６Ｂ～６Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。（図６Ｅ～６Ｎ）パーコール勾配精製された肺リンパ球は、［（図６Ｅ）～（図６Ｉ）］ＳＣＶ１又は［（図６Ｊ）～（図６Ｎ）］ＳＣＶ２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成が評価された。図６Ｏ～６Ｓは、ＳＣＶ１スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。（図６Ｓ）ＳＣＶ１スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値。図６Ｔ～６Ｗは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。図６Ｘは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。使用された実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライムブーストからの対照データ点は、図４Ａ～４Ｕ及び図６Ａ～６Ｘに共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、［（図６Ｓ）及び（図６Ｘ）］スチューデントのｔ検定を除いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図６Ｑ】図６Ａ～６Ｘは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いる異種ＩＮブースティングが、既存のＳＣＶ２特異的免疫を増強し、ＳＣＶ１に対する応答性を広げることを示す。（図６Ａ）実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、プライムの１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇの融合前安定化型、三量体、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（ＳＣＶ１）スパイクＩＮを用いて（ＩＮ　ＳｐｉｋｅＸ）ブースティングされた。図６Ｂ～６Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。（図６Ｅ～６Ｎ）パーコール勾配精製された肺リンパ球は、［（図６Ｅ）～（図６Ｉ）］ＳＣＶ１又は［（図６Ｊ）～（図６Ｎ）］ＳＣＶ２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成が評価された。図６Ｏ～６Ｓは、ＳＣＶ１スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。（図６Ｓ）ＳＣＶ１スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値。図６Ｔ～６Ｗは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。図６Ｘは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。使用された実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライムブーストからの対照データ点は、図４Ａ～４Ｕ及び図６Ａ～６Ｘに共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、［（図６Ｓ）及び（図６Ｘ）］スチューデントのｔ検定を除いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図６Ｒ】図６Ａ～６Ｘは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いる異種ＩＮブースティングが、既存のＳＣＶ２特異的免疫を増強し、ＳＣＶ１に対する応答性を広げることを示す。（図６Ａ）実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰ

を用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、プライムの１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇの融合前安定化型、三量体、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（ＳＣＶ１）スパイクＩＮを用いて（ＩＮ　ＳｐｉｋｅＸ）ブースティングされた。図６Ｂ～６Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。（図６Ｅ～６Ｎ）パーコール勾配精製された肺リンパ球は、［（図６Ｅ）～（図６Ｉ）］ＳＣＶ１又は［（図６Ｊ）～（図６Ｎ）］ＳＣＶ２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成が評価された。図６Ｏ～６Ｓは、ＳＣＶ１スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。（図６Ｓ）ＳＣＶ１スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値。図６Ｔ～６Ｗは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。図６Ｘは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。使用された実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライムブーストからの対照データ点は、図４Ａ～４Ｕ及び図６Ａ～６Ｘに共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、［（図６Ｓ）及び（図６Ｘ）］スチューデントのｔ検定を除いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図６Ｓ】図６Ａ～６Ｘは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いる異種ＩＮブースティングが、既存のＳＣＶ２特異的免疫を増強し、ＳＣＶ１に対する応答性を広げることを示す。（図６Ａ）実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、プライムの１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇの融合前安定化型、三量体、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（ＳＣＶ１）スパイクＩＮを用いて（ＩＮ　ＳｐｉｋｅＸ）ブースティングされた。図６Ｂ～６Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。（図６Ｅ～６Ｎ）パーコール勾配精製された肺リンパ球は、［（図６Ｅ）～（図６Ｉ）］ＳＣＶ１又は［（図６Ｊ）～（図６Ｎ）］ＳＣＶ２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成が評価された。図６Ｏ～６Ｓは、ＳＣＶ１スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。（図６Ｓ）ＳＣＶ１スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値。図６Ｔ～６Ｗは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。図６Ｘは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。使用された実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライムブーストからの対照データ点は、図４Ａ～４Ｕ及び図６Ａ～６Ｘに共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、［（図６Ｓ）及び（図６Ｘ）］スチューデントのｔ検定を除いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図６Ｔ】図６Ａ～６Ｘは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いる異種ＩＮブースティングが、既存のＳＣＶ２特異的免疫を増強し、ＳＣＶ１に対する応答性を広げることを示す。（図６Ａ）実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、プライムの１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇの融合前安定化型、三量体、組換えＳＡＲＳ－Ｃ

ｏＶ－１（ＳＣＶ１）スパイクＩＮを用いて（ＩＮ　ＳｐｉｋｅＸ）ブースティングされた。図６Ｂ～６Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスから得た肺組織における総四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９＋ＣＤ１０３－四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。（図６Ｅ～６Ｎ）パーコール勾配精製された肺リンパ球は、［（図６Ｅ）～（図６Ｉ）］ＳＣＶ１又は［（図６Ｊ）～（図６Ｎ）］ＳＣＶ２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、血管外ＩＶ－ＣＤ４５－ＣＤ４４＋ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成が評価された。図６Ｏ～６Ｓは、ＳＣＶ１スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。（図６Ｓ）ＳＣＶ１スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値。図６Ｔ～６Ｗは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。図６Ｘは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。使用された実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライムブーストからの対照データ点は、図４Ａ～４Ｕ及び図６Ａ～６Ｘに共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、［（図６Ｓ）及び（図６Ｘ）］スチューデントのｔ検定を除いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図６Ｕ】図６Ａ～６Ｘは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いる異種ＩＮブースティングが、既存のＳＣＶ２特異的免疫を増強し、ＳＣＶ１に対する応答性を広げることを示す。（図６Ａ）実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、プライムの１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇの融合前安定化型、三量体、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（ＳＣＶ１）スパイクＩＮを用いて（ＩＮ　ＳｐｉｋｅＸ）ブースティングされた。図６Ｂ～６Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスから得た肺組織における総四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９＋ＣＤ１０３－四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。（図６Ｅ～６Ｎ）パーコール勾配精製された肺リンパ球は、［（図６Ｅ）～（図６Ｉ）］ＳＣＶ１又は［（図６Ｊ）～（図６Ｎ）］ＳＣＶ２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、血管外ＩＶ－ＣＤ４５－ＣＤ４４＋ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成が評価された。図６Ｏ～６Ｓは、ＳＣＶ１スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。（図６Ｓ）ＳＣＶ１スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値。図６Ｔ～６Ｗは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。図６Ｘは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。使用された実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライムブーストからの対照データ点は、図４Ａ～４Ｕ及び図６Ａ～６Ｘに共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、［（図６Ｓ）及び（図６Ｘ）］スチューデントのｔ検定を除いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図６Ｖ】図６Ａ～６Ｘは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いる異種ＩＮブースティングが、既存のＳＣＶ２特異的免疫を増強し、ＳＣＶ１に対する応答性を広げることを示す。（図６Ａ）実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、プライムの１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇの融合前安定化型、三量体、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（ＳＣＶ１）スパイクＩＮを用いて（ＩＮ　ＳｐｉｋｅＸ）ブースティングされた。図６Ｂ～６Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウス

から得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。（図６Ｅ～６Ｎ）パーコール勾配精製された肺リンパ球は、［（図６Ｅ）～（図６Ｉ）］ＳＣＶ１又は［（図６Ｊ）～（図６Ｎ）］ＳＣＶ２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成が評価された。図６Ｏ～６Ｓは、ＳＣＶ１スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。（図６Ｓ）ＳＣＶ１スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値。図６Ｔ～６Ｗは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。図６Ｘは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。使用された実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライムブーストからの対照データ点は、図４Ａ～４Ｕ及び図６Ａ～６Ｘに共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、［（図６Ｓ）及び（図６Ｘ）］スチューデントのｔ検定を除いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図６Ｗ】図６Ａ～６Ｘは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いる異種ＩＮブースティングが、既存のＳＣＶ２特異的免疫を増強し、ＳＣＶ１に対する応答性を広げることを示す。（図６Ａ）実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、プライムの１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇの融合前安定化型、三量体、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（ＳＣＶ１）スパイクＩＮを用いて（ＩＮ　ＳｐｉｋｅＸ）ブースティングされた。図６Ｂ～６Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。（図６Ｅ～６Ｎ）パーコール勾配精製された肺リンパ球は、［（図６Ｅ）～（図６Ｉ）］ＳＣＶ１又は［（図６Ｊ）～（図６Ｎ）］ＳＣＶ２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成が評価された。図６Ｏ～６Ｓは、ＳＣＶ１スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。（図６Ｓ）ＳＣＶ１スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値。図６Ｔ～６Ｗは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。図６Ｘは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。使用された実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライムブーストからの対照データ点は、図４Ａ～４Ｕ及び図６Ａ～６Ｘに共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、［（図６Ｓ）及び（図６Ｘ）］スチューデントのｔ検定を除いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図６Ｘ】図６Ａ～６Ｘは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いる異種ＩＮブースティングが、既存のＳＣＶ２特異的免疫を増強し、ＳＣＶ１に対する応答性を広げることを示す。（図６Ａ）実験スキーマ。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングされ、続いて、プライムの１４日後に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に、又は５μｇの融合前安定化型、三量体、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（ＳＣＶ１）スパイクＩＮを用いて（ＩＮ　ＳｐｉｋｅＸ）ブースティングされた。図６Ｂ～６Ｄは、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。（図６Ｅ～

６Ｎ）パーコール勾配精製された肺リンパ球は、［（図６Ｅ）～（図６Ｉ）］ＳＣＶ１又は［（図６Ｊ）～（図６Ｎ）］ＳＣＶ２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７及びＩＬ－４の抗原特異的生成が評価された。図６Ｏ～６Ｓは、ＳＣＶ１スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。（図６Ｓ）ＳＣＶ１スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値。図６Ｔ～６Ｗは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧの測定値を示す。図６Ｘは、ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定値を示す。使用された実験動物の全体数を低減するために、未処置及びｍＲＮＡプライムブーストからの対照データ点は、図４Ａ～４Ｕ及び図６Ａ～６Ｘに共通している。平均±ＳＥＭ。統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いて、［（図６Ｓ）及び（図６Ｘ）］スチューデントのｔ検定を除いて、チューキー補正によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図７Ａ】図７Ａ～７Ｉは、粘膜免疫によって媒介されたＩＮスパイクブーストが、宿主遺伝子型、ブースティング間隔又は鼻腔内体積によって影響を受けないことを示す。（図７Ａ）実験スキーマ：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２又はＣ５７ＢＬ／６Ｊ（Ｂ６Ｊ）マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、２５又は５０μｌの接種体積でＩＭプライムの２又は４週後に１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いてＩＮブーストされた。ブーストの１４日後、肺組織をフローサイトメトリーによるＴ細胞解析のために採取し、ＢＡＬＦ及び血液を抗体測定のために採取した。図７Ｂ～７Ｄは、肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図７Ｅ～７Ｈは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図７Ｅ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図７Ｆ）、血清ＩｇＡ（図７Ｇ）及び血清ＩｇＧ（図７Ｈ）の測定値を示す。ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定（図７Ｉ）平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって算出された（図７Ｂ～７Ｈ）；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図７Ｂ】図７Ａ～７Ｉは、粘膜免疫によって媒介されたＩＮスパイクブーストが、宿主遺伝子型、ブースティング間隔又は鼻腔内体積によって影響を受けないことを示す。（図７Ａ）実験スキーマ：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２又はＣ５７ＢＬ／６Ｊ（Ｂ６Ｊ）マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、２５又は５０μｌの接種体積でＩＭプライムの２又は４週後に１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いてＩＮブーストされた。ブーストの１４日後、肺組織をフローサイトメトリーによるＴ細胞解析のために採取し、ＢＡＬＦ及び血液を抗体測定のために採取した。図７Ｂ～７Ｄは、肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図７Ｅ～７Ｈは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図７Ｅ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図７Ｆ）、血清ＩｇＡ（図７Ｇ）及び血清ＩｇＧ（図７Ｈ）の測定値を示す。ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定（図７Ｉ）平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって算出された（図７Ｂ～７Ｈ）；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図７Ｃ】図７Ａ～７Ｉは、粘膜免疫によって媒介されたＩＮスパイクブーストが、宿主遺伝子型、ブースティング間隔又は鼻腔内体積によって影響を受けないことを示す。（図７Ａ）実験スキーマ：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２又はＣ５７ＢＬ／６Ｊ（Ｂ６Ｊ）マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、２５又は５０μｌの接種体積でＩＭプライムの２又は４週後に１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いてＩＮブーストされた。

ブーストの１４日後、肺組織をフローサイトメトリーによるＴ細胞解析のために採取し、ＢＡＬＦ及び血液を抗体測定のために採取した。図７Ｂ～７Ｄは、肺組織における総四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９＋ＣＤ１０３－四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図７Ｅ～７Ｈは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図７Ｅ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図７Ｆ）、血清ＩｇＡ（図７Ｇ）及び血清ＩｇＧ（図７Ｈ）の測定値を示す。ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定（図７Ｉ）平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって算出された（図７Ｂ～７Ｈ）；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図７Ｄ】図７Ａ～７Ｉは、粘膜免疫によって媒介されたＩＮスパイクブーストが、宿主遺伝子型、ブースティング間隔又は鼻腔内体積によって影響を受けないことを示す。（図７Ａ）実験スキーマ：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２又はＣ５７ＢＬ／６Ｊ（Ｂ６Ｊ）マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、２５又は５０μｌの接種体積でＩＭプライムの２又は４週後に１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いてＩＮブーストされた。ブーストの１４日後、肺組織をフローサイトメトリーによるＴ細胞解析のために採取し、ＢＡＬＦ及び血液を抗体測定のために採取した。図７Ｂ～７Ｄは、肺組織における総四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９＋ＣＤ１０３－四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図７Ｅ～７Ｈは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図７Ｅ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図７Ｆ）、血清ＩｇＡ（図７Ｇ）及び血清ＩｇＧ（図７Ｈ）の測定値を示す。ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定（図７Ｉ）平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって算出された（図７Ｂ～７Ｈ）；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図７Ｅ】図７Ａ～７Ｉは、粘膜免疫によって媒介されたＩＮスパイクブーストが、宿主遺伝子型、ブースティング間隔又は鼻腔内体積によって影響を受けないことを示す。（図７Ａ）実験スキーマ：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２又はＣ５７ＢＬ／６Ｊ（Ｂ６Ｊ）マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、２５又は５０μｌの接種体積でＩＭプライムの２又は４週後に１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いてＩＮブーストされた。ブーストの１４日後、肺組織をフローサイトメトリーによるＴ細胞解析のために採取し、ＢＡＬＦ及び血液を抗体測定のために採取した。図７Ｂ～７Ｄは、肺組織における総四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９＋ＣＤ１０３－四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図７Ｅ～７Ｈは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図７Ｅ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図７Ｆ）、血清ＩｇＡ（図７Ｇ）及び血清ＩｇＧ（図７Ｈ）の測定値を示す。ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定（図７Ｉ）平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって算出された（図７Ｂ～７Ｈ）；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図７Ｆ】図７Ａ～７Ｉは、粘膜免疫によって媒介されたＩＮスパイクブーストが、宿主遺伝子型、ブースティング間隔又は鼻腔内体積によって影響を受けないことを示す。（図７Ａ）実験スキーマ：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２又はＣ５７ＢＬ／６Ｊ（Ｂ６Ｊ）マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、２５又は５０μｌの接種体積でＩＭプライムの２又は４週後に１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いてＩＮブーストされた。ブーストの１４日後、肺組織をフローサイトメトリーによるＴ細胞解析のために採取し、ＢＡＬＦ及び血液を抗体測定のために採取した。図７Ｂ～７Ｄは、肺組織における総四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９＋ＣＤ１０３－四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図７Ｅ～７Ｈは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図７Ｅ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図７Ｆ）、血清Ｉｇ

Ａ（図７Ｇ）及び血清ＩｇＧ（図７Ｈ）の測定値を示す。ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定（図７Ｉ）平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって算出された（図７Ｂ～７Ｈ）；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図７Ｇ】図７Ａ～７Ｉは、粘膜免疫によって媒介されたＩＮスパイクブーストが、宿主遺伝子型、ブースティング間隔又は鼻腔内体積によって影響を受けないことを示す。（図７Ａ）実験スキーマ：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２又はＣ５７ＢＬ／６Ｊ（Ｂ６Ｊ）マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、２５又は５０μｌの接種体積でＩＭプライムの２又は４週後に１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いてＩＮブーストされた。ブーストの１４日後、肺組織をフローサイトメトリーによるＴ細胞解析のために採取し、ＢＡＬＦ及び血液を抗体測定のために採取した。図７Ｂ～７Ｄは、肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図７Ｅ～７Ｈは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図７Ｅ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図７Ｆ）、血清ＩｇＡ（図７Ｇ）及び血清ＩｇＧ（図７Ｈ）の測定値を示す。ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定（図７Ｉ）平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって算出された（図７Ｂ～７Ｈ）；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図７Ｈ】図７Ａ～７Ｉは、粘膜免疫によって媒介されたＩＮスパイクブーストが、宿主遺伝子型、ブースティング間隔又は鼻腔内体積によって影響を受けないことを示す。（図７Ａ）実験スキーマ：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２又はＣ５７ＢＬ／６Ｊ（Ｂ６Ｊ）マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、２５又は５０μｌの接種体積でＩＭプライムの２又は４週後に１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いてＩＮブーストされた。ブーストの１４日後、肺組織をフローサイトメトリーによるＴ細胞解析のために採取し、ＢＡＬＦ及び血液を抗体測定のために採取した。図７Ｂ～７Ｄは、肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図７Ｅ～７Ｈは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図７Ｅ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図７Ｆ）、血清ＩｇＡ（図７Ｇ）及び血清ＩｇＧ（図７Ｈ）の測定値を示す。ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定（図７Ｉ）平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって算出された（図７Ｂ～７Ｈ）；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図７Ｉ】図７Ａ～７Ｉは、粘膜免疫によって媒介されたＩＮスパイクブーストが、宿主遺伝子型、ブースティング間隔又は鼻腔内体積によって影響を受けないことを示す。（図７Ａ）実験スキーマ：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２又はＣ５７ＢＬ／６Ｊ（Ｂ６Ｊ）マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、２５又は５０μｌの接種体積でＩＭプライムの２又は４週後に１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いてＩＮブーストされた。ブーストの１４日後、肺組織をフローサイトメトリーによるＴ細胞解析のために採取し、ＢＡＬＦ及び血液を抗体測定のために採取した。図７Ｂ～７Ｄは、肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図７Ｅ～７Ｈは、ＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図７Ｅ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図７Ｆ）、血清ＩｇＡ（図７Ｇ）及び血清ＩｇＧ（図７Ｈ）の測定値を示す。ＳＣＶ２スパイク偽型ＶＳＶに対する中和力価の測定（図７Ｉ）平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって算出された（図７Ｂ～７Ｈ）；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図８Ａ】図８Ａ～８Ｋは、ＩＮスパイクを用いる遅延されたブースティングが、永続的な粘膜免疫を誘導することを示す。図８Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１２週間後に１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いてＩＮブーストされた。ブーストの７日後及び５６日後に、肺組織をフローサイトメトリーによるＴ細胞解析のために採取し、ＢＡＬＦ及び血液を抗体測定のために採取した。図８Ｂ～８Ｄは、ブーストの７日後及び５６日後の、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｂ）、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｃ）又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｄ）の定量化を示す。（図８Ｅ～８Ｇ）ブーストの７日後及び５６日後のＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総合の活性化されたポリクローナルＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｅ）、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$ＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｆ）又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｇ）の定量化。図８Ｈ～８Ｋは、ブーストの７日後及び５６日後のＩＭプライム又はＰ＆ＳマウスにおけるＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図８Ｈ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図８Ｉ）、血清ＩｇＡ（図８Ｊ）及び血清ＩｇＧ（図８Ｋ）の測定を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（Ｈ～Ｋ）によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．０００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図８Ｂ】図８Ａ～８Ｋは、ＩＮスパイクを用いる遅延されたブースティングが、永続的な粘膜免疫を誘導することを示す。図８Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１２週間後に１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いてＩＮブーストされた。ブーストの７日後及び５６日後に、肺組織をフローサイトメトリーによるＴ細胞解析のために採取し、ＢＡＬＦ及び血液を抗体測定のために採取した。図８Ｂ～８Ｄは、ブーストの７日後及び５６日後の、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｂ）、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｃ）又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｄ）の定量化を示す。（図８Ｅ～８Ｇ）ブーストの７日後及び５６日後のＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総合の活性化されたポリクローナルＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｅ）、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$ＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｆ）又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｇ）の定量化。図８Ｈ～８Ｋは、ブーストの７日後及び５６日後のＩＭプライム又はＰ＆ＳマウスにおけるＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図８Ｈ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図８Ｉ）、血清ＩｇＡ（図８Ｊ）及び血清ＩｇＧ（図８Ｋ）の測定を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（Ｈ～Ｋ）によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．０００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図８Ｃ】図８Ａ～８Ｋは、ＩＮスパイクを用いる遅延されたブースティングが、永続的な粘膜免疫を誘導することを示す。図８Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１２週間後に１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いてＩＮブーストされた。ブーストの７日後及び５６日後に、肺組織をフローサイトメトリーによるＴ細胞解析のために採取し、ＢＡＬＦ及び血液を抗体測定のために採取した。図８Ｂ～８Ｄは、ブーストの７日後及び５６日後の、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｂ）、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｃ）又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｄ）の定量化を示す。（図８Ｅ～８Ｇ）ブーストの７日後及び５６日後のＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総合の活性化されたポリクローナルＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｅ）、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$ＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｆ）又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｇ）の定量化。図８Ｈ～８Ｋは、ブーストの７日後及び５６日後のＩＭプライム又はＰ＆ＳマウスにおけるＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図８Ｈ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図８

Ｉ）、血清ＩｇＡ（図８Ｊ）及び血清ＩｇＧ（図８Ｋ）の測定を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（Ｈ～Ｋ）によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図８Ｄ】図８Ａ～８Ｋは、ＩＮスパイクを用いる遅延されたブースティングが、永続的な粘膜免疫を誘導することを示す。図８Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１２週間後に１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いてＩＮブーストされた。ブーストの７日後及び５６日後に、肺組織をフローサイトメトリーによるＴ細胞解析のために採取し、ＢＡＬＦ及び血液を抗体測定のために採取した。図８Ｂ～８Ｄは、ブーストの７日後及び５６日後の、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｂ）、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｃ）又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｄ）の定量化を示す。（図８Ｅ～８Ｇ）ブーストの７日後及び５６日後のＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総合の活性化されたポリクローナルＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｅ）、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$ＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｆ）又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｇ）の定量化。図８Ｈ～８Ｋは、ブーストの７日後及び５６日後のＩＭプライム又はＰ＆ＳマウスにおけるＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図８Ｈ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図８Ｉ）、血清ＩｇＡ（図８Ｊ）及び血清ＩｇＧ（図８Ｋ）の測定を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（Ｈ～Ｋ）によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図８Ｅ】図８Ａ～８Ｋは、ＩＮスパイクを用いる遅延されたブースティングが、永続的な粘膜免疫を誘導することを示す。図８Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１２週間後に１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いてＩＮブーストされた。ブーストの７日後及び５６日後に、肺組織をフローサイトメトリーによるＴ細胞解析のために採取し、ＢＡＬＦ及び血液を抗体測定のために採取した。図８Ｂ～８Ｄは、ブーストの７日後及び５６日後の、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｂ）、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｃ）又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｄ）の定量化を示す。（図８Ｅ～８Ｇ）ブーストの７日後及び５６日後のＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総合の活性化されたポリクローナルＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｅ）、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$ＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｆ）又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｇ）の定量化。図８Ｈ～８Ｋは、ブーストの７日後及び５６日後のＩＭプライム又はＰ＆ＳマウスにおけるＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図８Ｈ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図８Ｉ）、血清ＩｇＡ（図８Ｊ）及び血清ＩｇＧ（図８Ｋ）の測定を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（Ｈ～Ｋ）によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図８Ｆ】図８Ａ～８Ｋは、ＩＮスパイクを用いる遅延されたブースティングが、永続的な粘膜免疫を誘導することを示す。図８Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１２週間後に１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いてＩＮブーストされた。ブーストの７日後及び５６日後に、肺組織をフローサイトメトリーによるＴ細胞解析のために採取し、ＢＡＬＦ及び血液を抗体測定のために採取した。図８Ｂ～８Ｄは、ブーストの７日後及び５６日後の、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｂ）、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｃ）又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｄ）の定量化を示す。（図８Ｅ～８Ｇ）ブーストの７日後及び５６日後のＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総合の活

性化されたポリクローナルＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｅ）、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$ＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｆ）又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｇ）の定量化。図８Ｈ～８Ｋは、ブーストの７日後及び５６日後のＩＭプライム又はＰ＆ＳマウスにおけるＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図８Ｈ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図８Ｉ）、血清ＩｇＡ（図８Ｊ）及び血清ＩｇＧ（図８Ｋ）の測定を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（Ｈ～Ｋ）によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図８Ｇ】図８Ａ～８Ｋは、ＩＮスパイクを用いる遅延されたブースティングが、永続的な粘膜免疫を誘導することを示す。図８Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１２週間後に１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いてＩＮブーストされた。ブーストの７日後及び５６日後に、肺組織をフローサイトメトリーによるＴ細胞解析のために採取し、ＢＡＬＦ及び血液を抗体測定のために採取した。図８Ｂ～８Ｄは、ブーストの７日後及び５６日後の、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｂ）、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｃ）又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｄ）の定量化を示す。（図８Ｅ～８Ｇ）ブーストの７日後及び５６日後のＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総合の活性化されたポリクローナルＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｅ）、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$ＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｆ）又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｇ）の定量化。図８Ｈ～８Ｋは、ブーストの７日後及び５６日後のＩＭプライム又はＰ＆ＳマウスにおけるＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図８Ｈ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図８Ｉ）、血清ＩｇＡ（図８Ｊ）及び血清ＩｇＧ（図８Ｋ）の測定を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（Ｈ～Ｋ）によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図８Ｈ】図８Ａ～８Ｋは、ＩＮスパイクを用いる遅延されたブースティングが、永続的な粘膜免疫を誘導することを示す。図８Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１２週間後に１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いてＩＮブーストされた。ブーストの７日後及び５６日後に、肺組織をフローサイトメトリーによるＴ細胞解析のために採取し、ＢＡＬＦ及び血液を抗体測定のために採取した。図８Ｂ～８Ｄは、ブーストの７日後及び５６日後の、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｂ）、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｃ）又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｄ）の定量化を示す。（図８Ｅ～８Ｇ）ブーストの７日後及び５６日後のＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総合の活性化されたポリクローナルＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｅ）、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$ＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｆ）又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｇ）の定量化。図８Ｈ～８Ｋは、ブーストの７日後及び５６日後のＩＭプライム又はＰ＆ＳマウスにおけるＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図８Ｈ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図８Ｉ）、血清ＩｇＡ（図８Ｊ）及び血清ＩｇＧ（図８Ｋ）の測定を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（Ｈ～Ｋ）によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図８Ｉ】図８Ａ～８Ｋは、ＩＮスパイクを用いる遅延されたブースティングが、永続的な粘膜免疫を誘導することを示す。図８Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１２週間後に１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いてＩＮブーストされた。ブーストの７日後及び５６日後に、肺組織をフローサイトメトリーによるＴ細胞解析のために採取し、ＢＡＬＦ及び血液を抗体測定のために採取した。図８Ｂ～８Ｄは、ブーストの７日後及び５６日

後の、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における総四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｂ）、ＣＤ６９＋ＣＤ１０３－四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｃ）又はＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｄ）の定量化を示す。（図８Ｅ～８Ｇ）ブーストの７日後及び５６日後のＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総合の活性化されたポリクローナルＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｅ）、ＣＤ６９＋ＣＤ１０３－ＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｆ）又はＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋ＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｇ）の定量化。図８Ｈ～８Ｋは、ブーストの７日後及び５６日後のＩＭプライム又はＰ＆ＳマウスにおけるＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図８Ｈ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図８Ｉ）、血清ＩｇＡ（図８Ｊ）及び血清ＩｇＧ（図８Ｋ）の測定を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（Ｈ～Ｋ）によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図８Ｊ】図８Ａ～８Ｋは、ＩＮスパイクを用いる遅延されたブースティングが、永続的な粘膜免疫を誘導することを示す。図８Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１２週間後に１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いてＩＮブーストされた。ブーストの７日後及び５６日後に、肺組織をフローサイトメトリーによるＴ細胞解析のために採取し、ＢＡＬＦ及び血液を抗体測定のために採取した。図８Ｂ～８Ｄは、ブーストの７日後及び５６日後の、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における総四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｂ）、ＣＤ６９＋ＣＤ１０３－四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｃ）又はＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｄ）の定量化を示す。（図８Ｅ～８Ｇ）ブーストの７日後及び５６日後のＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総合の活性化されたポリクローナルＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｅ）、ＣＤ６９＋ＣＤ１０３－ＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｆ）又はＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋ＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｇ）の定量化。図８Ｈ～８Ｋは、ブーストの７日後及び５６日後のＩＭプライム又はＰ＆ＳマウスにおけるＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図８Ｈ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図８Ｉ）、血清ＩｇＡ（図８Ｊ）及び血清ＩｇＧ（図８Ｋ）の測定を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（Ｈ～Ｋ）によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図８Ｋ】図８Ａ～８Ｋは、ＩＮスパイクを用いる遅延されたブースティングが、永続的な粘膜免疫を誘導することを示す。図８Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１２週間後に１μｇのＳＣＶ２スパイクを用いてＩＮブーストされた。ブーストの７日後及び５６日後に、肺組織をフローサイトメトリーによるＴ細胞解析のために採取し、ＢＡＬＦ及び血液を抗体測定のために採取した。図８Ｂ～８Ｄは、ブーストの７日後及び５６日後の、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における総四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｂ）、ＣＤ６９＋ＣＤ１０３－四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｃ）又はＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞（図８Ｄ）の定量化を示す。（図８Ｅ～８Ｇ）ブーストの７日後及び５６日後のＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における、総合の活性化されたポリクローナルＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｅ）、ＣＤ６９＋ＣＤ１０３－ＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｆ）又はＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋ＣＤ４Ｔ細胞（図８Ｇ）の定量化。図８Ｈ～８Ｋは、ブーストの７日後及び５６日後のＩＭプライム又はＰ＆ＳマウスにおけるＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図８Ｈ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図８Ｉ）、血清ＩｇＡ（図８Ｊ）及び血清ＩｇＧ（図８Ｋ）の測定を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（Ｈ～Ｋ）によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図９Ａ】図９Ａ～９Ｈは、ポリ（アミン－コ－エステル）（ＰＡＣＥ）ターポリマー中に封入されたＳＣＶ２スパイクｍＲＮＡのＩＮ送達が、粘膜ブースティングを媒介するこ

とを示す。図９Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、続いて、ＩＭプライムの１４日後に１μｇの裸のｍＲＮＡ（ＩＮ裸のｍＲＮＡ）又は１μｇのＰＡＣＥによって封入されたｍＲＮＡ（ＩＮ　ＰＡＣＥ－スパイク）を用いてＩＮブースティングされた。ＩＮブーストの１４日後、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血液を採取した。肺組織をＣＤ８Ｔ細胞解析のために採取した。図９Ｂ～９Ｄは、未処置、ＩＭプライム、ＩＮ　ＰＡＣＥ－スパイク、ＩＭプライム＋ＩＮ裸のｍＲＮＡ又はプライム及びＰＡＣＥ－スパイクマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図９Ｂ）、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図９Ｃ）又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図９Ｄ）の定量化を示す。図９Ｅ～９Ｈは、未処置、ＩＭプライム、ＩＮ　ＰＡＣＥ－スパイク、ＩＭプライム＋ＩＮ裸のｍＲＮＡ又はプライム及びＰＡＣＥ－スパイクマウスにおけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図９Ｅ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図９Ｆ）、血清ＩｇＡ（図９Ｇ）及び血清ＩｇＧ（図９Ｈ）の測定値を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（図９Ｂ～９Ｄ）又は二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（図９Ｅ～９Ｈ）によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．０００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。データは、２つの独立実験からプールされている。

【図９Ｂ】図９Ａ～９Ｈは、ポリ（アミン－コ－エステル）（ＰＡＣＥ）ターポリマー中に封入されたＳＣＶ２スパイクｍＲＮＡのＩＮ送達が、粘膜ブースティングを媒介することを示す。図９Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、続いて、ＩＭプライムの１４日後に１μｇの裸のｍＲＮＡ（ＩＮ裸のｍＲＮＡ）又は１μｇのＰＡＣＥによって封入されたｍＲＮＡ（ＩＮ　ＰＡＣＥ－スパイク）を用いてＩＮブースティングされた。ＩＮブーストの１４日後、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血液を採取した。肺組織をＣＤ８Ｔ細胞解析のために採取した。図９Ｂ～９Ｄは、未処置、ＩＭプライム、ＩＮ　ＰＡＣＥ－スパイク、ＩＭプライム＋ＩＮ裸のｍＲＮＡ又はプライム及びＰＡＣＥ－スパイクマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図９Ｂ）、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図９Ｃ）又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図９Ｄ）の定量化を示す。図９Ｅ～９Ｈは、未処置、ＩＭプライム、ＩＮ　ＰＡＣＥ－スパイク、ＩＭプライム＋ＩＮ裸のｍＲＮＡ又はプライム及びＰＡＣＥ－スパイクマウスにおけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図９Ｅ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図９Ｆ）、血清ＩｇＡ（図９Ｇ）及び血清ＩｇＧ（図９Ｈ）の測定値を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（図９Ｂ～９Ｄ）又は二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（図９Ｅ～９Ｈ）によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．０００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。データは、２つの独立実験からプールされている。

【図９Ｃ】図９Ａ～９Ｈは、ポリ（アミン－コ－エステル）（ＰＡＣＥ）ターポリマー中に封入されたＳＣＶ２スパイクｍＲＮＡのＩＮ送達が、粘膜ブースティングを媒介することを示す。図９Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、続いて、ＩＭプライムの１４日後に１μｇの裸のｍＲＮＡ（ＩＮ裸のｍＲＮＡ）又は１μｇのＰＡＣＥによって封入されたｍＲＮＡ（ＩＮ　ＰＡＣＥ－スパイク）を用いてＩＮブースティングされた。ＩＮブーストの１４日後、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血液を採取した。肺組織をＣＤ８Ｔ細胞解析のために採取した。図９Ｂ～９Ｄは、未処置、ＩＭプライム、ＩＮ　ＰＡＣＥ－スパイク、ＩＭプライム＋ＩＮ裸のｍＲＮＡ又はプライム及びＰＡＣＥ－スパイクマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図９Ｂ）、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図９Ｃ）又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図９Ｄ）の定量化を示す。図９Ｅ～９Ｈは、未処置、ＩＭプライム、ＩＮ　ＰＡＣＥ－スパイク、ＩＭプライム＋ＩＮ裸のｍＲＮＡ又はプライム及びＰＡＣＥ－スパイクマウスにおけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図９Ｅ）、ＢＡＬＦ　Ｉｇ

Ｇ（図９Ｆ）、血清ＩｇＡ（図９Ｇ）及び血清ＩｇＧ（図９Ｈ）の測定値を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（図９Ｂ～９Ｄ）又は二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（図９Ｅ～９Ｈ）によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．０００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。データは、２つの独立実験からプールされている。

【図９Ｄ】図９Ａ～９Ｈは、ポリ（アミン－コ－エステル）（ＰＡＣＥ）ターポリマー中に封入されたＳＣＶ２スパイクｍＲＮＡのＩＮ送達が、粘膜ブースティングを媒介することを示す。図９Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、続いて、ＩＭプライムの１４日後に１μｇの裸のｍＲＮＡ（ＩＮ裸のｍＲＮＡ）又は１μｇのＰＡＣＥによって封入されたｍＲＮＡ（ＩＮ　ＰＡＣＥ－スパイク）を用いてＩＮブースティングされた。ＩＮブーストの１４日後、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血液を採取した。肺組織をＣＤ８Ｔ細胞解析のために採取した。図９Ｂ～９Ｄは、未処置、ＩＭプライム、ＩＮ　ＰＡＣＥ－スパイク、ＩＭプライム＋ＩＮ裸のｍＲＮＡ又はプライム及びＰＡＣＥ－スパイクマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図９Ｂ）、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図９Ｃ）又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図９Ｄ）の定量化を示す。図９Ｅ～９Ｈは、未処置、ＩＭプライム、ＩＮ　ＰＡＣＥ－スパイク、ＩＭプライム＋ＩＮ裸のｍＲＮＡ又はプライム及びＰＡＣＥ－スパイクマウスにおけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図９Ｅ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図９Ｆ）、血清ＩｇＡ（図９Ｇ）及び血清ＩｇＧ（図９Ｈ）の測定値を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（図９Ｂ～９Ｄ）又は二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（図９Ｅ～９Ｈ）によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．０００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。データは、２つの独立実験からプールされている。

【図９Ｅ】図９Ａ～９Ｈは、ポリ（アミン－コ－エステル）（ＰＡＣＥ）ターポリマー中に封入されたＳＣＶ２スパイクｍＲＮＡのＩＮ送達が、粘膜ブースティングを媒介することを示す。図９Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、続いて、ＩＭプライムの１４日後に１μｇの裸のｍＲＮＡ（ＩＮ裸のｍＲＮＡ）又は１μｇのＰＡＣＥによって封入されたｍＲＮＡ（ＩＮ　ＰＡＣＥ－スパイク）を用いてＩＮブースティングされた。ＩＮブーストの１４日後、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血液を採取した。肺組織をＣＤ８Ｔ細胞解析のために採取した。図９Ｂ～９Ｄは、未処置、ＩＭプライム、ＩＮ　ＰＡＣＥ－スパイク、ＩＭプライム＋ＩＮ裸のｍＲＮＡ又はプライム及びＰＡＣＥ－スパイクマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図９Ｂ）、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図９Ｃ）又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図９Ｄ）の定量化を示す。図９Ｅ～９Ｈは、未処置、ＩＭプライム、ＩＮ　ＰＡＣＥ－スパイク、ＩＭプライム＋ＩＮ裸のｍＲＮＡ又はプライム及びＰＡＣＥ－スパイクマウスにおけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図９Ｅ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図９Ｆ）、血清ＩｇＡ（図９Ｇ）及び血清ＩｇＧ（図９Ｈ）の測定値を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（図９Ｂ～９Ｄ）又は二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（図９Ｅ～９Ｈ）によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．０００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。データは、２つの独立実験からプールされている。

【図９Ｆ】図９Ａ～９Ｈは、ポリ（アミン－コ－エステル）（ＰＡＣＥ）ターポリマー中に封入されたＳＣＶ２スパイクｍＲＮＡのＩＮ送達が、粘膜ブースティングを媒介することを示す。図９Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、続いて、ＩＭプライムの１４日後に１μｇの裸のｍＲＮＡ（ＩＮ裸のｍＲＮＡ）又は１μｇのＰＡＣＥによって封入されたｍＲＮＡ（ＩＮ　ＰＡＣＥ－スパイク）を用いてＩＮブースティングされた。ＩＮブーストの１４日後、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血液を採取した。肺組織をＣＤ８Ｔ細胞解析のため

に採取した。図９Ｂ～９Ｄは、未処置、ＩＭプライム、ＩＮ　ＰＡＣＥ－スパイク、ＩＭプライム＋ＩＮ裸のｍＲＮＡ又はプライム及びＰＡＣＥ－スパイクマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図９Ｂ）、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図９Ｃ）又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図９Ｄ）の定量化を示す。図９Ｅ～９Ｈは、未処置、ＩＭプライム、ＩＮ　ＰＡＣＥ－スパイク、ＩＭプライム＋ＩＮ裸のｍＲＮＡ又はプライム及びＰＡＣＥ－スパイクマウスにおけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図９Ｅ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図９Ｆ）、血清ＩｇＡ（図９Ｇ）及び血清ＩｇＧ（図９Ｈ）の測定値を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（図９Ｂ～９Ｄ）又は二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（図９Ｅ～９Ｈ）によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．０００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。データは、２つの独立実験からプールされている。

【図９Ｇ】図９Ａ～９Ｈは、ポリ（アミン－コ－エステル）（ＰＡＣＥ）ターポリマー中に封入されたＳＣＶ２スパイクｍＲＮＡのＩＮ送達が、粘膜ブースティングを媒介することを示す。図９Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、続いて、ＩＭプライムの１４日後に１μｇの裸のｍＲＮＡ（ＩＮ裸のｍＲＮＡ）又は１μｇのＰＡＣＥによって封入されたｍＲＮＡ（ＩＮ　ＰＡＣＥ－スパイク）を用いてＩＮブースティングされた。ＩＮブーストの１４日後、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血液を採取した。肺組織をＣＤ８Ｔ細胞解析のために採取した。図９Ｂ～９Ｄは、未処置、ＩＭプライム、ＩＮ　ＰＡＣＥ－スパイク、ＩＭプライム＋ＩＮ裸のｍＲＮＡ又はプライム及びＰＡＣＥ－スパイクマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図９Ｂ）、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図９Ｃ）又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図９Ｄ）の定量化を示す。図９Ｅ～９Ｈは、未処置、ＩＭプライム、ＩＮ　ＰＡＣＥ－スパイク、ＩＭプライム＋ＩＮ裸のｍＲＮＡ又はプライム及びＰＡＣＥ－スパイクマウスにおけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図９Ｅ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図９Ｆ）、血清ＩｇＡ（図９Ｇ）及び血清ＩｇＧ（図９Ｈ）の測定値を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（図９Ｂ～９Ｄ）又は二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（図９Ｅ～９Ｈ）によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．０００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。データは、２つの独立実験からプールされている。

【図９Ｈ】図９Ａ～９Ｈは、ポリ（アミン－コ－エステル）（ＰＡＣＥ）ターポリマー中に封入されたＳＣＶ２スパイクｍＲＮＡのＩＮ送達が、粘膜ブースティングを媒介することを示す。図９Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、続いて、ＩＭプライムの１４日後に１μｇの裸のｍＲＮＡ（ＩＮ裸のｍＲＮＡ）又は１μｇのＰＡＣＥによって封入されたｍＲＮＡ（ＩＮ　ＰＡＣＥ－スパイク）を用いてＩＮブースティングされた。ＩＮブーストの１４日後、抗体測定のためにＢＡＬＦ及び血液を採取した。肺組織をＣＤ８Ｔ細胞解析のために採取した。図９Ｂ～９Ｄは、未処置、ＩＭプライム、ＩＮ　ＰＡＣＥ－スパイク、ＩＭプライム＋ＩＮ裸のｍＲＮＡ又はプライム及びＰＡＣＥ－スパイクマウスから得た肺組織における総四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図９Ｂ）、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図９Ｃ）又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞（図９Ｄ）の定量化を示す。図９Ｅ～９Ｈは、未処置、ＩＭプライム、ＩＮ　ＰＡＣＥ－スパイク、ＩＭプライム＋ＩＮ裸のｍＲＮＡ又はプライム及びＰＡＣＥ－スパイクマウスにおけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図９Ｅ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図９Ｆ）、血清ＩｇＡ（図９Ｇ）及び血清ＩｇＧ（図９Ｈ）の測定値を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（図９Ｂ～９Ｄ）又は二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（図９Ｅ～９Ｈ）によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．０００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。データは、２つの独立実験からプールされている。

【図１０Ａ】図１０Ａ～１０Ｈは、ＣＯＶＩＤ－１９に対するＩＮスパイクブーストによって誘導された防御が、粘膜免疫の増強と相関することを示す。図１０Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１４日後に１μｇのスパイクＩＮを用いてＩＮブーストされた。ブーストの６週間後に、肺組織をフローサイトメトリーによるＣＤ８Ｔ細胞解析のために採取し、ＢＡＬＦ及び血液を抗体測定のために採取した。図１０Ｂ～１０Ｄは、未処置、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における総四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図１０Ｅ～１０Ｈは、未処置、ＩＭプライム又はＰ＆ＳマウスにおけるＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図１０Ｅ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図１０Ｆ）、血清ＩｇＡ（図１０Ｇ）及び血清ＩｇＧ（図１０Ｈ）の測定値を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって（図１０Ｂ～１０Ｄ）又は二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって（図１０Ｅ～１０Ｈ）算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、１つの独立実験から表されている。

【図１０Ｂ】図１０Ａ～１０Ｈは、ＣＯＶＩＤ－１９に対するＩＮスパイクブーストによって誘導された防御が、粘膜免疫の増強と相関することを示す。図１０Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１４日後に１μｇのスパイクＩＮを用いてＩＮブーストされた。ブーストの６週間後に、肺組織をフローサイトメトリーによるＣＤ８Ｔ細胞解析のために採取し、ＢＡＬＦ及び血液を抗体測定のために採取した。図１０Ｂ～１０Ｄは、未処置、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における総四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図１０Ｅ～１０Ｈは、未処置、ＩＭプライム又はＰ＆ＳマウスにおけるＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図１０Ｅ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図１０Ｆ）、血清ＩｇＡ（図１０Ｇ）及び血清ＩｇＧ（図１０Ｈ）の測定値を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって（図１０Ｂ～１０Ｄ）又は二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって（図１０Ｅ～１０Ｈ）算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、１つの独立実験から表されている。

【図１０Ｃ】図１０Ａ～１０Ｈは、ＣＯＶＩＤ－１９に対するＩＮスパイクブーストによって誘導された防御が、粘膜免疫の増強と相関することを示す。図１０Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１４日後に１μｇのスパイクＩＮを用いてＩＮブーストされた。ブーストの６週間後に、肺組織をフローサイトメトリーによるＣＤ８Ｔ細胞解析のために採取し、ＢＡＬＦ及び血液を抗体測定のために採取した。図１０Ｂ～１０Ｄは、未処置、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における総四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図１０Ｅ～１０Ｈは、未処置、ＩＭプライム又はＰ＆ＳマウスにおけるＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図１０Ｅ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図１０Ｆ）、血清ＩｇＡ（図１０Ｇ）及び血清ＩｇＧ（図１０Ｈ）の測定値を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって（図１０Ｂ～１０Ｄ）又は二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって（図１０Ｅ～１０Ｈ）算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、１つの独立実験から表されている。

【図１０Ｄ】図１０Ａ～１０Ｈは、ＣＯＶＩＤ－１９に対するＩＮスパイクブーストによって誘導された防御が、粘膜免疫の増強と相関することを示す。図１０Ａは、実験スキー

マを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１４日後に１μｇのスパイクＩＮを用いてＩＮブーストされた。ブーストの６週間後に、肺組織をフローサイトメトリーによるＣＤ８Ｔ細胞解析のために採取し、ＢＡＬＦ及び血液を抗体測定のために採取した。図１０Ｂ～１０Ｄは、未処置、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における総四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図１０Ｅ～１０Ｈは、未処置、ＩＭプライム又はＰ＆ＳマウスにおけるＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図１０Ｅ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図１０Ｆ）、血清ＩｇＡ（図１０Ｇ）及び血清ＩｇＧ（図１０Ｈ）の測定値を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって（図１０Ｂ～１０Ｄ）又は二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって（図１０Ｅ～１０Ｈ）算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、１つの独立実験から表されている。

【図１０Ｅ】図１０Ａ～１０Ｈは、ＣＯＶＩＤ－１９に対するＩＮスパイクブーストによって誘導された防御が、粘膜免疫の増強と相関することを示す。図１０Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１４日後に１μｇのスパイクＩＮを用いてＩＮブーストされた。ブーストの６週間後に、肺組織をフローサイトメトリーによるＣＤ８Ｔ細胞解析のために採取し、ＢＡＬＦ及び血液を抗体測定のために採取した。図１０Ｂ～１０Ｄは、未処置、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における総四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図１０Ｅ～１０Ｈは、未処置、ＩＭプライム又はＰ＆ＳマウスにおけるＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図１０Ｅ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図１０Ｆ）、血清ＩｇＡ（図１０Ｇ）及び血清ＩｇＧ（図１０Ｈ）の測定値を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって（図１０Ｂ～１０Ｄ）又は二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって（図１０Ｅ～１０Ｈ）算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、１つの独立実験から表されている。

【図１０Ｆ】図１０Ａ～１０Ｈは、ＣＯＶＩＤ－１９に対するＩＮスパイクブーストによって誘導された防御が、粘膜免疫の増強と相関することを示す。図１０Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１４日後に１μｇのスパイクＩＮを用いてＩＮブーストされた。ブーストの６週間後に、肺組織をフローサイトメトリーによるＣＤ８Ｔ細胞解析のために採取し、ＢＡＬＦ及び血液を抗体測定のために採取した。図１０Ｂ～１０Ｄは、未処置、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における総四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図１０Ｅ～１０Ｈは、未処置、ＩＭプライム又はＰ＆ＳマウスにおけるＳＣＶ２スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図１０Ｅ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図１０Ｆ）、血清ＩｇＡ（図１０Ｇ）及び血清ＩｇＧ（図１０Ｈ）の測定値を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって（図１０Ｂ～１０Ｄ）又は二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって（図１０Ｅ～１０Ｈ）算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、１つの独立実験から表されている。

【図１０Ｇ】図１０Ａ～１０Ｈは、ＣＯＶＩＤ－１９に対するＩＮスパイクブーストによって誘導された防御が、粘膜免疫の増強と相関することを示す。図１０Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１４日後に１μｇのスパイクＩＮを用いてＩＮブース

トされた。ブーストの６週間後に、肺組織をフローサイトメトリーによるＣＤ８Ｔ細胞解析のために採取し、ＢＡＬＦ及び血液を抗体測定のために採取した。図１０Ｂ～１０Ｄは、未処置、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における総四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図１０Ｅ～１０Ｈは、未処置、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスにおける$SCV2$スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図１０Ｅ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図１０Ｆ）、血清ＩｇＡ（図１０Ｇ）及び血清ＩｇＧ（図１０Ｈ）の測定値を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって（図１０Ｂ～１０Ｄ）又は二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって（図１０Ｅ～１０Ｈ）算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、１つの独立実験から表されている。

【図１０Ｈ】図１０Ａ～１０Ｈは、ＣＯＶＩＤ－１９に対するＩＮスパイクブーストによって誘導された防御が、粘膜免疫の増強と相関することを示す。図１０Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１４日後に１μｇのスパイクＩＮを用いてＩＮブーストされた。ブーストの６週間後に、肺組織をフローサイトメトリーによるＣＤ８Ｔ細胞解析のために採取し、ＢＡＬＦ及び血液を抗体測定のために採取した。図１０Ｂ～１０Ｄは、未処置、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスから得た肺組織における総四量体＋ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞又はＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の定量化を示す。図１０Ｅ～１０Ｈは、未処置、ＩＭプライム又はＰ＆Ｓマウスにおける$SCV2$スパイクＳ１サブユニット特異的ＢＡＬＦ　ＩｇＡ（図１０Ｅ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＧ（図１０Ｆ）、血清ＩｇＡ（図１０Ｇ）及び血清ＩｇＧ（図１０Ｈ）の測定値を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって（図１０Ｂ～１０Ｄ）又は二元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって（図１０Ｅ～１０Ｈ）算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、１つの独立実験から表されている。

【図１１Ａ】図１１Ａ～１１Ｇは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク特異的ＣＤ８及びＣＤ４Ｔ細胞のＭＨＣ－ペプチド四量体ベースの同定を示す。図１１Ａは、サルベコウイルスのスパイクタンパク質由来のＣＤ４エピトープ（ＶＴＷＦＨＡＩＨＶＳＧＴＮＧＴ（配列番号５）、スパイク$_{62-76}$）及びＣＤ８エピトープ（ＶＮＦＮＦＮＧＬ（配列番号６）、スパイク$_{539-546}$）の配列を示す。ＭＨＣクラスＩＩ配列は、配列番号８～１７として示され、ＭＨＣクラスＩ配列は、配列番号１８～２２として示されている。図１１Ｂ～１１Ｄは、ＩＭプライムの４２日後及びＩＮスパイクブーストの２８日後の、肺におけるスパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞（図１１Ｃ）及びＣＤ４Ｔ細胞（図１１Ｄ）の同定及び表現型解析を示す。図１１Ｅ～１１Ｇは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染の１４日後の、肺におけるスパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞（図１１Ｆ）及びＣＤ４Ｔ細胞（図１１Ｇ）の同定及び表現型解析を示す。等高線図（図１１Ｃ及び１１Ｆ）は、２つの独立実験の代表的なものである。

【図１１Ｂ】図１１Ａ～１１Ｇは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク特異的ＣＤ８及びＣＤ４Ｔ細胞のＭＨＣ－ペプチド四量体ベースの同定を示す。図１１Ａは、サルベコウイルスのスパイクタンパク質由来のＣＤ４エピトープ（ＶＴＷＦＨＡＩＨＶＳＧＴＮＧＴ（配列番号５）、スパイク$_{62-76}$）及びＣＤ８エピトープ（ＶＮＦＮＦＮＧＬ（配列番号６）、スパイク$_{539-546}$）の配列を示す。ＭＨＣクラスＩＩ配列は、配列番号８～１７として示され、ＭＨＣクラスＩ配列は、配列番号１８～２２として示されている。図１１Ｂ～１１Ｄは、ＩＭプライムの４２日後及びＩＮスパイクブーストの２８日後の、肺におけるスパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞（図１１Ｃ）及びＣＤ４Ｔ細胞（図１１Ｄ）の同定及び表現型解析を示す。図１１Ｅ～１１Ｇは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染の１４日後の、肺におけるスパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞（図１１Ｆ）及びＣＤ４Ｔ細胞（図１１Ｇ）の同定

及び表現型解析を示す。等高線図（図１１Ｃ及び１１Ｆ）は、２つの独立実験の代表的なものである。

【図１１Ｃ】図１１Ａ～１１Ｇは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク特異的ＣＤ８及びＣＤ４Ｔ細胞のＭＨＣ－ペプチド四量体ベースの同定を示す。図１１Ａは、サルベコウイルスのスパイクタンパク質由来のＣＤ４エピトープ（ＶＴＷＦＨＡＩＨＶＳＧＴＮＧＴ（配列番号５）、スパイク$_{62-76}$）及びＣＤ８エピトープ（ＶＮＦＮＦＮＧＬ（配列番号６）、スパイク$_{539-546}$）の配列を示す。ＭＨＣクラスＩＩ配列は、配列番号８～１７として示され、ＭＨＣクラスＩ配列は、配列番号１８～２２として示されている。図１１Ｂ～１１Ｄは、ＩＭプライムの４２日後及びＩＮスパイクブーストの２８日後の、肺におけるスパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞（図１１Ｃ）及びＣＤ４Ｔ細胞（図１１Ｄ）の同定及び表現型解析を示す。図１１Ｅ～１１Ｇは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染の１４日後の、肺におけるスパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞（図１１Ｆ）及びＣＤ４Ｔ細胞（図１１Ｇ）の同定及び表現型解析を示す。等高線図（図１１Ｃ及び１１Ｆ）は、２つの独立実験の代表的なものである。

【図１１Ｄ】図１１Ａ～１１Ｇは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク特異的ＣＤ８及びＣＤ４Ｔ細胞のＭＨＣ－ペプチド四量体ベースの同定を示す。図１１Ａは、サルベコウイルスのスパイクタンパク質由来のＣＤ４エピトープ（ＶＴＷＦＨＡＩＨＶＳＧＴＮＧＴ（配列番号５）、スパイク$_{62-76}$）及びＣＤ８エピトープ（ＶＮＦＮＦＮＧＬ（配列番号６）、スパイク$_{539-546}$）の配列を示す。ＭＨＣクラスＩＩ配列は、配列番号８～１７として示され、ＭＨＣクラスＩ配列は、配列番号１８～２２として示されている。図１１Ｂ～１１Ｄは、ＩＭプライムの４２日後及びＩＮスパイクブーストの２８日後の、肺におけるスパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞（図１１Ｃ）及びＣＤ４Ｔ細胞（図１１Ｄ）の同定及び表現型解析を示す。図１１Ｅ～１１Ｇは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染の１４日後の、肺におけるスパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞（図１１Ｆ）及びＣＤ４Ｔ細胞（図１１Ｇ）の同定及び表現型解析を示す。等高線図（図１１Ｃ及び１１Ｆ）は、２つの独立実験の代表的なものである。

【図１１Ｅ】図１１Ａ～１１Ｇは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク特異的ＣＤ８及びＣＤ４Ｔ細胞のＭＨＣ－ペプチド四量体ベースの同定を示す。図１１Ａは、サルベコウイルスのスパイクタンパク質由来のＣＤ４エピトープ（ＶＴＷＦＨＡＩＨＶＳＧＴＮＧＴ（配列番号５）、スパイク$_{62-76}$）及びＣＤ８エピトープ（ＶＮＦＮＦＮＧＬ（配列番号６）、スパイク$_{539-546}$）の配列を示す。ＭＨＣクラスＩＩ配列は、配列番号８～１７として示され、ＭＨＣクラスＩ配列は、配列番号１８～２２として示されている。図１１Ｂ～１１Ｄは、ＩＭプライムの４２日後及びＩＮスパイクブーストの２８日後の、肺におけるスパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞（図１１Ｃ）及びＣＤ４Ｔ細胞（図１１Ｄ）の同定及び表現型解析を示す。図１１Ｅ～１１Ｇは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染の１４日後の、肺におけるスパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞（図１１Ｆ）及びＣＤ４Ｔ細胞（図１１Ｇ）の同定及び表現型解析を示す。等高線図（図１１Ｃ及び１１Ｆ）は、２つの独立実験の代表的なものである。

【図１１Ｆ】図１１Ａ～１１Ｇは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク特異的ＣＤ８及びＣＤ４Ｔ細胞のＭＨＣ－ペプチド四量体ベースの同定を示す。図１１Ａは、サルベコウイルスのスパイクタンパク質由来のＣＤ４エピトープ（ＶＴＷＦＨＡＩＨＶＳＧＴＮＧＴ（配列番号５）、スパイク$_{62-76}$）及びＣＤ８エピトープ（ＶＮＦＮＦＮＧＬ（配列番号６）、スパイク$_{539-546}$）の配列を示す。ＭＨＣクラスＩＩ配列は、配列番号８～１７として示され、ＭＨＣクラスＩ配列は、配列番号１８～２２として示されている。図１１Ｂ～１１Ｄは、ＩＭプライムの４２日後及びＩＮスパイクブーストの２８日後の、肺におけるスパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞（図１１Ｃ）及びＣＤ４Ｔ細胞（図１１Ｄ）の同定及び表現型解析を示す。図１１Ｅ～１１Ｇは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染の１４日後の、肺におけるスパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞（図１１Ｆ）及びＣＤ４Ｔ細胞（図１１Ｇ）の同定及び表現型解析を示す。等高線図（図１１Ｃ及び１１Ｆ）は、２つの独立実験の代表的なものである。

【図１１Ｇ】図１１Ａ～１１Ｇは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク特異的ＣＤ８及びＣＤ４Ｔ細胞のＭＨＣ－ペプチド四量体ベースの同定を示す。図１１Ａは、サルベコウイルスのスパイクタンパク質由来のＣＤ４エピトープ（ＶＴＷＦＨＡＩＨＶＳＧＴＮＧＴ（配列番号５）、スパイク$_{62-76}$）及びＣＤ８エピトープ（ＶＮＦＮＦＮＧＬ（配列番号６）、スパイク$_{539-546}$）の配列を示す。ＭＨＣクラスＩＩ配列は、配列番号８～１７として示され、ＭＨＣクラスＩ配列は、配列番号１８～２２として示されている。図１１Ｂ～１１Ｄは、ＩＭプライムの４２日後及びＩＮスパイクブーストの２８日後の、肺におけるスパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞（図１１Ｃ）及びＣＤ４Ｔ細胞（図１１Ｄ）の同定及び表現型解析を示す。図１１Ｅ～１１Ｇは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染の１４日後の、肺におけるスパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞（図１１Ｆ）及びＣＤ４Ｔ細胞（図１１Ｇ）の同定及び表現型解析を示す。等高線図（図１１Ｃ及び１１Ｆ）は、２つの独立実験の代表的なものである。

【図１２Ａ】図１２Ａ～１２Ｅは、ＩＮスパイクブーストが、肺柔組織において多機能性スパイク特異的ＣＤ４Ｔ細胞の拡大増殖を媒介することを示す。図１２Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１４日後に、１μｇのスパイクＩＮを用いてＩＮブーストされる又は１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭブーストされた。プライミングの４５日後、肺組織をフローサイトメトリーによる抗原特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞サイトカイン生成の評価のために採取した。パーコール勾配精製された肺リンパ球は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスにおける血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$Ｔ細胞によるサイトカイン生成が評価された。図１２Ｂ～１２Ｅは、ＴＮＦ－α及びＩＬ－２（図１２Ｂ）、ＴＮＦ－α及びＩＦＮ－γ（図１２Ｃ）、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１２Ｄ）又はＴＮＦ－α、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１２Ｅ）の同時生成の評価を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって算出された（図１２Ｂ～１２Ｅ）；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図１２Ｂ】図１２Ａ～１２Ｅは、ＩＮスパイクブーストが、肺柔組織において多機能性スパイク特異的ＣＤ４Ｔ細胞の拡大増殖を媒介することを示す。図１２Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１４日後に、１μｇのスパイクＩＮを用いてＩＮブーストされる又は１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭブーストされた。プライミングの４５日後、肺組織をフローサイトメトリーによる抗原特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞サイトカイン生成の評価のために採取した。パーコール勾配精製された肺リンパ球は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスにおける血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$Ｔ細胞によるサイトカイン生成が評価された。図１２Ｂ～１２Ｅは、ＴＮＦ－α及びＩＬ－２（図１２Ｂ）、ＴＮＦ－α及びＩＦＮ－γ（図１２Ｃ）、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１２Ｄ）又はＴＮＦ－α、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１２Ｅ）の同時生成の評価を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって算出された（図１２Ｂ～１２Ｅ）；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図１２Ｃ】図１２Ａ～１２Ｅは、ＩＮスパイクブーストが、肺柔組織において多機能性スパイク特異的ＣＤ４Ｔ細胞の拡大増殖を媒介することを示す。図１２Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１４日後に、１μｇのスパイクＩＮを用いてＩＮブーストされる又は１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭブーストされた。プライミングの４５日後、肺組織をフローサイトメトリーによる抗原特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞サイトカイン生成の

評価のために採取した。パーコール勾配精製された肺リンパ球は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスにおける血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$Ｔ細胞によるサイトカイン生成が評価された。図１２Ｂ～１２Ｅは、ＴＮＦ－α及びＩＬ－２（図１２Ｂ）、ＴＮＦ－α及びＩＦＮ－γ（図１２Ｃ）、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１２Ｄ）又はＴＮＦ－α、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１２Ｅ）の同時生成の評価を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって算出された（図１２Ｂ～１２Ｅ）；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図１２Ｄ】図１２Ａ～１２Ｅは、ＩＮスパイクブーストが、肺柔組織において多機能性スパイク特異的ＣＤ４Ｔ細胞の拡大増殖を媒介することを示す。図１２Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１４日後に、１μｇのスパイクＩＮを用いてＩＮブーストされる又は１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭブーストされた。プライミングの４５日後、肺組織をフローサイトメトリーによる抗原特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞サイトカイン生成の評価のために採取した。パーコール勾配精製された肺リンパ球は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスにおける血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$Ｔ細胞によるサイトカイン生成が評価された。図１２Ｂ～１２Ｅは、ＴＮＦ－α及びＩＬ－２（図１２Ｂ）、ＴＮＦ－α及びＩＦＮ－γ（図１２Ｃ）、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１２Ｄ）又はＴＮＦ－α、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１２Ｅ）の同時生成の評価を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって算出された（図１２Ｂ～１２Ｅ）；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図１２Ｅ】図１２Ａ～１２Ｅは、ＩＮスパイクブーストが、肺柔組織において多機能性スパイク特異的ＣＤ４Ｔ細胞の拡大増殖を媒介することを示す。図１２Ａは、実験スキーマを示す：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１４日後に、１μｇのスパイクＩＮを用いてＩＮブーストされる又は１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭブーストされた。プライミングの４５日後、肺組織をフローサイトメトリーによる抗原特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞サイトカイン生成の評価のために採取した。パーコール勾配精製された肺リンパ球は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、未処置、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓマウスにおける血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$Ｔ細胞によるサイトカイン生成が評価された。図１２Ｂ～１２Ｅは、ＴＮＦ－α及びＩＬ－２（図１２Ｂ）、ＴＮＦ－α及びＩＦＮ－γ（図１２Ｃ）、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１２Ｄ）又はＴＮＦ－α、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１２Ｅ）の同時生成の評価を示す。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正によって算出された（図１２Ｂ～１２Ｅ）；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図１３Ａ】図１３Ａ～１３Ｈは、ＩＮスパイクブーストが、肺柔組織において多機能性スパイク特異的ＣＤ４Ｔ細胞の拡大増殖を媒介することを示す。図１３Ａ～１３Ｈ、実験スキーマ：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１４日後に、５μｇのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いてＩＮブーストされる又は１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭブーストされた。プライミングの４５日後、肺組織をフローサイトメトリーによる抗原特異的ＣＤ４Ｔ細胞サイトカイン生成の評価のために採取した。パーコール勾配精製した肺リンパ球は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（図１３Ａ～１３Ｄ）又はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（図１３Ｅ～１３Ｈ）からの

スパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、未処置、ｍＲＮＡプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスにおける血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるサイトカイン生成が評価された。図１３Ａ～１３Ｄは、血管外ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１　スパイク特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞によるＴＮＦ－α及びＩＬ－２（図１３Ａ）、ＴＮＦ－α及びＩＦＮ－γ（図１３Ｂ）、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｃ）又はＴＮＦ－α、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｄ）の同時生成の評価を示す。（図１３Ｅ～１３Ｈ）血管外ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞による、ＴＮＦ－α及びＩＬ－２（図１３Ｅ）、ＴＮＦ－α及びＩＦＮ－γ（図１３Ｆ）、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｇ）又はＴＮＦ－α、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｈ）の同時生成の評価。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（図１３Ａ～１３Ｈ）によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図１３Ｂ】図１３Ａ～１３Ｈは、ＩＮスパイクブーストが、肺柔組織において多機能性スパイク特異的ＣＤ４Ｔ細胞の拡大増殖を媒介することを示す。図１３Ａ～１３Ｈ、実験スキーマ：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１４日後に、５μｇのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いてＩＮブーストされる又は１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭブーストされた。プライミングの４５日後、肺組織をフローサイトメトリーによる抗原特異的ＣＤ４Ｔ細胞サイトカイン生成の評価のために採取した。パーコール勾配精製した肺リンパ球は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（図１３Ａ～１３Ｄ）又はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（図１３Ｅ～１３Ｈ）からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、未処置、ｍＲＮＡプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスにおける血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるサイトカイン生成が評価された。図１３Ａ～１３Ｄは、血管外ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１　スパイク特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞によるＴＮＦ－α及びＩＬ－２（図１３Ａ）、ＴＮＦ－α及びＩＦＮ－γ（図１３Ｂ）、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｃ）又はＴＮＦ－α、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｄ）の同時生成の評価を示す。（図１３Ｅ～１３Ｈ）血管外ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞による、ＴＮＦ－α及びＩＬ－２（図１３Ｅ）、ＴＮＦ－α及びＩＦＮ－γ（図１３Ｆ）、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｇ）又はＴＮＦ－α、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｈ）の同時生成の評価。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（図１３Ａ～１３Ｈ）によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図１３Ｃ】図１３Ａ～１３Ｈは、ＩＮスパイクブーストが、肺柔組織において多機能性スパイク特異的ＣＤ４Ｔ細胞の拡大増殖を媒介することを示す。図１３Ａ～１３Ｈ、実験スキーマ：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１４日後に、５μｇのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いてＩＮブーストされる又は１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭブーストされた。プライミングの４５日後、肺組織をフローサイトメトリーによる抗原特異的ＣＤ４Ｔ細胞サイトカイン生成の評価のために採取した。パーコール勾配精製した肺リンパ球は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（図１３Ａ～１３Ｄ）又はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（図１３Ｅ～１３Ｈ）からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、未処置、ｍＲＮＡプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスにおける血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるサイトカイン生成が評価された。図１３Ａ～１３Ｄは、血管外ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１　スパイク特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞によるＴＮＦ－α及びＩＬ－２（図１３Ａ）、ＴＮＦ－α及びＩＦＮ－γ（図１３Ｂ）、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｃ）又はＴＮＦ－α、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｄ）の同時生成の評価を示す。（図１３Ｅ～１３Ｈ）血管外ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞による、ＴＮＦ－α及びＩＬ－２（図１３Ｅ）、ＴＮＦ－α及びＩＦＮ－γ（図１３Ｆ）

、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｇ）又はＴＮＦ－α、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｈ）の同時生成の評価。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（図１３Ａ～１３Ｈ）によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図１３Ｄ】図１３Ａ～１３Ｈは、ＩＮスパイクブーストが、肺柔組織において多機能性スパイク特異的ＣＤ４Ｔ細胞の拡大増殖を媒介することを示す。図１３Ａ～１３Ｈ、実験スキーマ：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１４日後に、５μｇのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いてＩＮブーストされる又は１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭブーストされた。プライミングの４５日後、肺組織をフローサイトメトリーによる抗原特異的ＣＤ４Ｔ細胞サイトカイン生成の評価のために採取した。パーコール勾配精製した肺リンパ球は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（図１３Ａ～１３Ｄ）又はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（図１３Ｅ～１３Ｈ）からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、未処置、ｍＲＮＡプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスにおける血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるサイトカイン生成が評価された。図１３Ａ～１３Ｄは、血管外ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１　スパイク特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞によるＴＮＦ－α及びＩＬ－２（図１３Ａ）、ＴＮＦ－α及びＩＦＮ－γ（図１３Ｂ）、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｃ）又はＴＮＦ－α、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｄ）の同時生成の評価を示す。（図１３Ｅ～１３Ｈ）血管外ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞による、ＴＮＦ－α及びＩＬ－２（図１３Ｅ）、ＴＮＦ－α及びＩＦＮ－γ（図１３Ｆ）、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｇ）又はＴＮＦ－α、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｈ）の同時生成の評価。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（図１３Ａ～１３Ｈ）によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図１３Ｅ】図１３Ａ～１３Ｈは、ＩＮスパイクブーストが、肺柔組織において多機能性スパイク特異的ＣＤ４Ｔ細胞の拡大増殖を媒介することを示す。図１３Ａ～１３Ｈ、実験スキーマ：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１４日後に、５μｇのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いてＩＮブーストされる又は１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭブーストされた。プライミングの４５日後、肺組織をフローサイトメトリーによる抗原特異的ＣＤ４Ｔ細胞サイトカイン生成の評価のために採取した。パーコール勾配精製した肺リンパ球は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（図１３Ａ～１３Ｄ）又はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（図１３Ｅ～１３Ｈ）からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、未処置、ｍＲＮＡプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスにおける血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるサイトカイン生成が評価された。図１３Ａ～１３Ｄは、血管外ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１　スパイク特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞によるＴＮＦ－α及びＩＬ－２（図１３Ａ）、ＴＮＦ－α及びＩＦＮ－γ（図１３Ｂ）、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｃ）又はＴＮＦ－α、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｄ）の同時生成の評価を示す。（図１３Ｅ～１３Ｈ）血管外ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞による、ＴＮＦ－α及びＩＬ－２（図１３Ｅ）、ＴＮＦ－α及びＩＦＮ－γ（図１３Ｆ）、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｇ）又はＴＮＦ－α、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｈ）の同時生成の評価。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（図１３Ａ～１３Ｈ）によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図１３Ｆ】図１３Ａ～１３Ｈは、ＩＮスパイクブーストが、肺柔組織において多機能性スパイク特異的ＣＤ４Ｔ細胞の拡大増殖を媒介することを示す。図１３Ａ～１３Ｈ、実験スキーマ：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミ

ングされ、ＩＭプライムの１４日後に、５μｇのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いてＩＮブーストされる又は１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭブーストされた。プライミングの４５日後、肺組織をフローサイトメトリーによる抗原特異的ＣＤ４Ｔ細胞サイトカイン生成の評価のために採取した。パーコール勾配精製した肺リンパ球は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（図１３Ａ～１３Ｄ）又はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（図１３Ｅ～１３Ｈ）からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、未処置、ｍＲＮＡプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスにおける血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるサイトカイン生成が評価された。図１３Ａ～１３Ｄは、血管外ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１　スパイク特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞によるＴＮＦ－α及びＩＬ－２（図１３Ａ）、ＴＮＦ－α及びＩＦＮ－γ（図１３Ｂ）、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｃ）又はＴＮＦ－α、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｄ）の同時生成の評価を示す。（図１３Ｅ～１３Ｈ）血管外ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞による、ＴＮＦ－α及びＩＬ－２（図１３Ｅ）、ＴＮＦ－α及びＩＦＮ－γ（図１３Ｆ）、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｇ）又はＴＮＦ－α、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｈ）の同時生成の評価。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（図１３Ａ～１３Ｈ）によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図１３Ｇ】図１３Ａ～１３Ｈは、ＩＮスパイクブーストが、肺柔組織において多機能性スパイク特異的ＣＤ４Ｔ細胞の拡大増殖を媒介することを示す。図１３Ａ～１３Ｈ、実験スキーマ：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１４日後に、５μｇのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いてＩＮブーストされる又は１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭブーストされた。プライミングの４５日後、肺組織をフローサイトメトリーによる抗原特異的ＣＤ４Ｔ細胞サイトカイン生成の評価のために採取した。パーコール勾配精製した肺リンパ球は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（図１３Ａ～１３Ｄ）又はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（図１３Ｅ～１３Ｈ）からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、未処置、ｍＲＮＡプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスにおける血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるサイトカイン生成が評価された。図１３Ａ～１３Ｄは、血管外ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１　スパイク特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞によるＴＮＦ－α及びＩＬ－２（図１３Ａ）、ＴＮＦ－α及びＩＦＮ－γ（図１３Ｂ）、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｃ）又はＴＮＦ－α、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｄ）の同時生成の評価を示す。（図１３Ｅ～１３Ｈ）血管外ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞による、ＴＮＦ－α及びＩＬ－２（図１３Ｅ）、ＴＮＦ－α及びＩＦＮ－γ（図１３Ｆ）、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｇ）又はＴＮＦ－α、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｈ）の同時生成の評価。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（図１３Ａ～１３Ｈ）によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図１３Ｈ】図１３Ａ～１３Ｈは、ＩＮスパイクブーストが、肺柔組織において多機能性スパイク特異的ＣＤ４Ｔ細胞の拡大増殖を媒介することを示す。図１３Ａ～１３Ｈ、実験スキーマ：Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭプライミングされ、ＩＭプライムの１４日後に、５μｇのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いてＩＮブーストされる又は１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてＩＭブーストされた。プライミングの４５日後、肺組織をフローサイトメトリーによる抗原特異的ＣＤ４Ｔ細胞サイトカイン生成の評価のために採取した。パーコール勾配精製した肺リンパ球は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（図１３Ａ～１３Ｄ）又はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（図１３Ｅ～１３Ｈ）からのスパイクペプチドメガプールを用いて再刺激され、細胞内サイトカイン染色が実施されて、未処置、ｍＲＮＡプライム－ブースト又はＰ＆Ｓｘマウスにおける血管外ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞によるサイトカイン生成が評価された。図１３Ａ～１３Ｄは

、血管外ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１　スパイク特異的ＣＤ４＋Ｔ細胞によるＴＮＦ－α及びＩＬ－２（図１３Ａ）、ＴＮＦ－α及びＩＦＮ－γ（図１３Ｂ）、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｃ）又はＴＮＦ－α、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｄ）の同時生成の評価を示す。（図１３Ｅ～１３Ｈ）血管外ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク特異的ＣＤ４＋Ｔ細胞による、ＴＮＦ－α及びＩＬ－２（図１３Ｅ）、ＴＮＦ－α及びＩＦＮ－γ（図１３Ｆ）、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｇ）又はＴＮＦ－α、ＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（図１３Ｈ）の同時生成の評価。平均±ｓ．ｅ．ｍ．；統計的有意性は、一元配置ＡＮＯＶＡと、続いてチューキー補正（図１３Ａ～１３Ｈ）によって算出された；＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．０００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１。個々のデータ点は、２つの独立実験から表され、プールされている。

【図１４】図１４は、コミナティｍＲＮＡ－ＬＮＰから抽出されたｍＲＮＡの完全性の確認を示す。抽出されたｍＲＮＡの長さ及び完全性は、アガロースゲル電気泳動を使用して解析された。抽出されたｍＲＮＡは、ＳＹＢＲ　Ｓａｆｅ色素と混合され、その後、１％アガロースゲル上にロードされ、ＴＡＥバッファー中で流され、ゲルイメージングシステムを用いて画像化された。

【図１５Ａ】図１５Ａ～１５Ｃは、気道における血管外適応免疫応答の解析のためのゲーティング戦略を示す。図１５Ａは、血管外スパイク特異的ＣＤ８及びＣＤ４Ｔ細胞を同定するためのゲーティング戦略を示す。図１５Ｂは、血管外抗原特異的及びポリクローナルＢ細胞を同定するためのゲーティング戦略を示す。図１５Ｃは、サイトカイン産生性血管外スパイク特異的ＣＤ４Ｔ細胞を同定するためのゲーティング戦略を示す。

【図１５Ｂ】図１５Ａ～１５Ｃは、気道における血管外適応免疫応答の解析のためのゲーティング戦略を示す。図１５Ａは、血管外スパイク特異的ＣＤ８及びＣＤ４Ｔ細胞を同定するためのゲーティング戦略を示す。図１５Ｂは、血管外抗原特異的及びポリクローナルＢ細胞を同定するためのゲーティング戦略を示す。図１５Ｃは、サイトカイン産生性血管外スパイク特異的ＣＤ４Ｔ細胞を同定するためのゲーティング戦略を示す。

【図１５Ｃ】図１５Ａ～１５Ｃは、気道における血管外適応免疫応答の解析のためのゲーティング戦略を示す。図１５Ａは、血管外スパイク特異的ＣＤ８及びＣＤ４Ｔ細胞を同定するためのゲーティング戦略を示す。図１５Ｂは、血管外抗原特異的及びポリクローナルＢ細胞を同定するためのゲーティング戦略を示す。図１５Ｃは、サイトカイン産生性血管外スパイク特異的ＣＤ４Ｔ細胞を同定するためのゲーティング戦略を示す。

【図１６】図１６は、ｍＲＮＡカーゴの肺への、ＰＥＧコンジュゲートＰＡＣＥによって媒介される送達及び発現の棒グラフであり、対照及びそれぞれ０％、０．２５％、１％、５％、１０％又は５０％のＰＡＣＥ－ＰＥＧを含有する試料の各々の、ＰＡＣＥ－ＰＥＧ含量％（０～５０％）にわたるＲＬＵ／ｍｇタンパク質（０～１０，０００）を示す。

【図１７】図１７は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対する組織常在免疫を確立するための粘膜ブースト剤としてｍＲＮＡ－ＰＡＣＥを使用する方法論を示す模式図である。下部パネルは、Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスモデルに適用された方法の模式図であり、それぞれ、－１４日目でのプライミングステップ（１マイクログラムのＲＮＡのｍＲＮＡ－ＬＮＰ（脂質ナノ粒子）を筋肉内（ＩＭ）経路を介して注射すること）；０日目でのブースティングステップ（１マイクログラムＲＮＡのｍＲＮＡ－ＰＡＣＥ粒子を筋肉内（ＩＭ）又は鼻腔内（ＩＮ）経路を介して注射すること：プライミングの２週間後）；及び１４日目での免疫表現型解析（ＩＶ抗体標識と、続いて肺、気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬＦ）及び血清採取からなる；ブースティングの２週間後）を含む。上部右側のパネルは、ＩＶ抗体標識及びフローサイトメトリー解析のプロセスの模式図である。

【図１８Ａ】図１８Ａ～１８Ｃは、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライミング及びＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングによって誘導された肺常在（ＩＶ－）スパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞免疫の棒グラフであり、それぞれ、総スパイク特異的（ＩＶ－四量体＋ＣＤ８＋Ｔ　細胞）（図１８Ａ）；抗原を経験した活性化された（ＩＶ－四量体＋ＣＤ６９＋ＣＤ８＋Ｔ細胞）（図１８Ｂ）及び組織常在記憶（T_{RM}）（ＩＶ－四量体（ｅｔｒａｍｅｒ）＋ＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋ＣＤ８＋Ｔ細胞）（図１８Ｃ）細胞の各々の、それぞれ、Ｉ

Ｍ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライミング；ＩＮ裸のｍＲＮＡブースティング；ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティング及びＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングの各々のあり／なし（＋／－）で獲得された、それぞれ、未処置（丸）；ＩＭ　ＬＮＰ（上三角）；ＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＮ裸のｍＲＮＡ（
【化２】
✖

）；ＩＮ　ＰＡＣＥ（四角）；ＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＭ　ＰＡＣＥ（
【化３】
●

）；及びＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（下三角）細胞の試料の各々の絶対細胞数（＃１０^{0}～１０^{5}）を示す。
【図１８Ｂ】図１８Ａ～１８Ｃは、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライミング及びＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングによって誘導された肺常在（ＩＶ$^{-}$）スパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞免疫の棒グラフであり、それぞれ、総スパイク特異的（ＩＶ$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ　細胞）（図１８Ａ）；抗原を経験した活性化された（ＩＶ$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞）（図１８Ｂ）及び組織常在記憶（T_{RM}）（ＩＶ$^{-}$四量体（ｅｔｒａｍｅｒ）$^{+}$ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞）（図１８Ｃ）細胞の各々の、それぞれ、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライミング；ＩＮ裸のｍＲＮＡブースティング；ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティング及びＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングの各々のあり／なし（＋／－）で獲得された、それぞれ、未処置（丸）；ＩＭ　ＬＮＰ（上三角）；ＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＮ裸のｍＲＮＡ（
【化４】
✖

）；ＩＮ　ＰＡＣＥ（四角）；ＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＭ　ＰＡＣＥ（
【化５】
●

）；及びＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（下三角）細胞の試料の各々の絶対細胞数（＃１０^{0}～１０^{5}）を示す。
【図１８Ｃ】図１８Ａ～１８Ｃは、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライミング及びＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングによって誘導された肺常在（ＩＶ$^{-}$）スパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞免疫の棒グラフであり、それぞれ、総スパイク特異的（ＩＶ$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ　細胞）（図１８Ａ）；抗原を経験した活性化された（ＩＶ$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞）（図１８Ｂ）及び組織常在記憶（T_{RM}）（ＩＶ$^{-}$四量体（ｅｔｒａｍｅｒ）$^{+}$ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞）（図１８Ｃ）細胞の各々の、それぞれ、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライミング；ＩＮ裸のｍＲＮＡブースティング；ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティング及びＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングの各々のあり／なし（＋／－）で獲得された、それぞれ、未処置（丸）；ＩＭ　ＬＮＰ（上三角）；ＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＮ裸のｍＲＮＡ（
【化６】
✖

）；ＩＮ　ＰＡＣＥ（四角）；ＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＭ　ＰＡＣＥ（
【化７】
●

）；及びＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（下三角）細胞の試料の各々の絶対細胞数（＃１

０^{0}～１０^{5}）を示す。
【図１９Ａ】図１９Ａ～１９Ｃは、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライミングと、続いてＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングが、循環（ＩＶ＋）ＣＤ８Ｔ細胞応答に影響を及ぼさなかったことを示す棒グラフであり、グラフは、それぞれ、総スパイク特異的（ＩＶ$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞）（図１９Ａ）；抗原を経験した活性化された（ＩＶ$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞）（図１９Ｂ）及び組織常在記憶（ＩＶ$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞）（図１９Ｃ）細胞の各々の、それぞれ、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライミング；ＩＮ裸のｍＲＮＡブースティング；ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティング及びＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングの各々のあり／なし（＋／－）で獲得された、それぞれ、未処置（丸）；ＩＭ　ＬＮＰ（上三角）；ＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＮ裸のｍＲＮＡ（
【化８】

）；ＩＮ　ＰＡＣＥ（四角）；ＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＭ　ＰＡＣＥ（
【化９】

）及びＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（下三角）細胞の試料の各々の絶対細胞数（＃１０^{0}～１０^{5}）を示す。
【図１９Ｂ】図１９Ａ～１９Ｃは、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライミングと、続いてＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングが、循環（ＩＶ＋）ＣＤ８Ｔ細胞応答に影響を及ぼさなかったことを示す棒グラフであり、グラフは、それぞれ、総スパイク特異的（ＩＶ$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞）（図１９Ａ）；抗原を経験した活性化された（ＩＶ$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞）（図１９Ｂ）及び組織常在記憶（ＩＶ$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞）（図１９Ｃ）細胞の各々の、それぞれ、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライミング；ＩＮ裸のｍＲＮＡブースティング；ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティング及びＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングの各々のあり／なし（＋／－）で獲得された、それぞれ、未処置（丸）；ＩＭ　ＬＮＰ（上三角）；ＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＮ裸のｍＲＮＡ（
【化１０】

）；ＩＮ　ＰＡＣＥ（四角）；ＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＭ　ＰＡＣＥ（
【化１１】

）及びＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（下三角）細胞の試料の各々の絶対細胞数（＃１０^{0}～１０^{5}）を示す。
【図１９Ｃ】図１９Ａ～１９Ｃは、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライミングと、続いてＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングが、循環（ＩＶ＋）ＣＤ８Ｔ細胞応答に影響を及ぼさなかったことを示す棒グラフであり、グラフは、それぞれ、総スパイク特異的（ＩＶ$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞）（図１９Ａ）；抗原を経験した活性化された（ＩＶ$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞）（図１９Ｂ）及び組織常在記憶（ＩＶ$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞）（図１９Ｃ）細胞の各々の、それぞれ、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライミング；ＩＮ裸のｍＲＮＡブースティング；ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティング及びＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングの各々のあり／なし（＋／－）で獲得された、それぞれ、未処置（丸）；ＩＭ　ＬＮＰ（上三角）；ＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＮ裸のｍＲＮＡ（

【化１２】


）；ＩＮ　ＰＡＣＥ（四角）；ＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＭ　ＰＡＣＥ（
【化１３】


）及びＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（下三角）細胞の試料の各々の絶対細胞数（＃１０^{0}～１０^{5}）を示す。
【図２０Ａ】図２０Ａ～２０Ｄは、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライミングと、続いてＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングが、頑強な粘膜及び全身スパイク特異的ＩｇＡ及びＩｇＧを誘発したことを示すグラフであり、グラフは、それぞれ、１：３６（図２０Ａ）又は１：２１６（図２０Ｂ）の希釈のＢＡＬＦ及び１：１２５０（図２０Ｃ）又は１：６２５００（図２０Ｄ）の希釈の血清から得られた、それぞれ、未処置（丸）；ＩＭ　ＬＮＰ（上三角）；ＩＮ　ＰＡＣＥ（四角）；ＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＭ　ＰＡＣＥ（
【化１４】


）及びＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（下三角）細胞の試料の各々の抗Ｓ１　ＩｇＡの光学濃度（ＯＤ）（１～４）を示す。
【図２０Ｂ】図２０Ａ～２０Ｄは、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライミングと、続いてＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングが、頑強な粘膜及び全身スパイク特異的ＩｇＡ及びＩｇＧを誘発したことを示すグラフであり、グラフは、それぞれ、１：３６（図２０Ａ）又は１：２１６（図２０Ｂ）の希釈のＢＡＬＦ及び１：１２５０（図２０Ｃ）又は１：６２５００（図２０Ｄ）の希釈の血清から得られた、それぞれ、未処置（丸）；ＩＭ　ＬＮＰ（上三角）；ＩＮ　ＰＡＣＥ（四角）；ＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＭ　ＰＡＣＥ（
【化１５】

）及びＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（下三角）細胞の試料の各々の抗Ｓ１　ＩｇＡの光学濃度（ＯＤ）（１～４）を示す。
【図２０Ｃ】図２０Ａ～２０Ｄは、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライミングと、続いてＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングが、頑強な粘膜及び全身スパイク特異的ＩｇＡ及びＩｇＧを誘発したことを示すグラフであり、グラフは、それぞれ、１：３６（図２０Ａ）又は１：２１６（図２０Ｂ）の希釈のＢＡＬＦ及び１：１２５０（図２０Ｃ）又は１：６２５００（図２０Ｄ）の希釈の血清から得られた、それぞれ、未処置（丸）；ＩＭ　ＬＮＰ（上三角）；ＩＮ　ＰＡＣＥ（四角）；ＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＭ　ＰＡＣＥ（
【化１６】


）及びＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（下三角）細胞の試料の各々の抗Ｓ１　ＩｇＡの光学濃度（ＯＤ）（１～４）を示す。
【図２０Ｄ】図２０Ａ～２０Ｄは、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライミングと、続いてＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングが、頑強な粘膜及び全身スパイク特異的ＩｇＡ及びＩｇＧを誘発したことを示すグラフであり、グラフは、それぞれ、１：３６（図２０Ａ）又は１：２１６（図２０Ｂ）の希釈のＢＡＬＦ及び１：１２５０（図２０Ｃ）又は１：６２５００（図２０Ｄ）の希釈の血清から得られた、それぞれ、未処置（丸）；ＩＭ　ＬＮＰ（上三角）；ＩＮ　ＰＡＣＥ（四角）；ＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＭ　ＰＡＣＥ（
【化１７】


）及びＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（下三角）細胞の試料の各々の抗Ｓ１　ＩｇＡの光学濃度（ＯＤ）（１～４）を示す。
【図２１】図２１は、Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスモデルに適用された方法の模式図であり、０日目でのプライミングステップ（０．０５マイクログラムＲＮＡのｍＲＮＡ－ＬＮＰ（脂質ナノ粒子）を筋肉内（ＩＭ）経路を介して注射すること）；１４日目でのブースティングステップ（１０マイクログラムＲＮＡのｍＲＮＡ－ＰＡＣＥ粒子を筋肉内（ＩＭ）又は鼻腔内（ＩＮ）経路を介して注射すること；プライミングの２週間後）；４９日目での感染前出血；５６日目でのＩＮ　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２曝露及び７０日目までの体重減少及び生存の２週間のモニタリングを含む。
【図２２Ａ】図２２Ａ～２２Ｃは、未処置（丸）；ＩＭプライミング（上三角）；ＩＭプライミング＞ＩＭ　ＰＡＣＥ（
【化１８】

）及びＩＭプライミング＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（下三角）の試料の各々における、２～５の対数希釈の関数としてのＯ．Ｄ．抗Ｓ１　ＩｇＧ（図２２Ａ）、感染後０日目から１４日目の１４日の期間にわたる０日目の体重の％（図２２Ｂ）及び感染後０日目から１４日目の１４日の期間にわたる生存％（図２２Ｃ）を示す線グラフである。
【図２２Ｂ】図２２Ａ～２２Ｃは、未処置（丸）；ＩＭプライミング（上三角）；ＩＭプライミング＞ＩＭ　ＰＡＣＥ（
【化１９】


）及びＩＭプライミング＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（下三角）の試料の各々における、２～５の対数希釈の関数としてのＯ．Ｄ．抗Ｓ１　ＩｇＧ（図２２Ａ）、感染後０日目から１４日目の１４日の期間にわたる０日目の体重の％（図２２Ｂ）及び感染後０日目から１４日目の１４日の期間にわたる生存％（図２２Ｃ）を示す線グラフである。
【図２２Ｃ】図２２Ａ～２２Ｃは、未処置（丸）；ＩＭプライミング（上三角）；ＩＭプライミング＞ＩＭ　ＰＡＣＥ（
【化２０】


）及びＩＭプライミング＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（下三角）の試料の各々における、２～５の対数希釈の関数としてのＯ．Ｄ．抗Ｓ１　ＩｇＧ（図２２Ａ）、感染後０日目から１４日目の１４日の期間にわたる０日目の体重の％（図２２Ｂ）及び感染後０日目から１４日目の１４日の期間にわたる生存％（図２２Ｃ）を示す線グラフである。
【図２３】図２３は、Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスモデルに適用された方法の模式図であり、それぞれ、０日目のプライミングステップ（１０マイクログラムＲＮＡのｍＲＮＡ－ＰＡＣＥ粒子の鼻腔内（ＩＮ）経路を介した投与）；２８日目のブースティングステップ（１０マイクログラムＲＮＡのｍＲＮＡ－ＰＡＣＥ粒子の鼻腔内（ＩＮ）経路を介した投与；プライミングの４週間後）及び４２日目の免疫表現型解析（ＩＶ抗体標識と、続いて肺、気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬＦ）及び血清採取からなる；ブースティングの２週間後）を含む。
【図２４Ａ】図２４Ａ～２４Ｆは、ＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥプライミング及びＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングによって誘導された組織常在（ＩＶ$^{-}$）スパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞免疫の棒グラフであり、それぞれ、総スパイク特異的（ＩＶ$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞）（図２４Ａ）；抗原を経験した活性化された（ＩＶ$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞）（図２４Ｂ）及び組織常在記憶（T_{RM}）（ＩＶ$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞）（図２４Ｃ）細胞の各々の未処置（丸）及びＩＮ　ＰＡＣＥ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（上三角）群の肺における絶対細胞数並びにそれぞれ、総スパイク特異

的（ＩＶ－四量体＋ＣＤ８＋Ｔ細胞）（図２４Ｄ）；抗原を経験した活性化された（ＩＶ－四量体＋ＣＤ６９＋ＣＤ８＋Ｔ細胞）（図２４Ｅ）及び組織常在記憶（T_{RM}）（ＩＶ－四量体＋ＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋ＣＤ８＋Ｔ細胞）（図２４Ｆ）細胞の各々の、未処置（丸）及びＩＮ　ＰＡＣＥ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（上三角）群の縦隔リンパ節における絶対細胞数を示す。

【図２４Ｂ】図２４Ａ～２４Ｆは、ＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥプライミング及びＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングによって誘導された組織常在（ＩＶ－）スパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞免疫の棒グラフであり、それぞれ、総スパイク特異的（ＩＶ－四量体＋ＣＤ８＋Ｔ細胞）（図２４Ａ）；抗原を経験した活性化された（ＩＶ－四量体＋ＣＤ６９＋ＣＤ８＋Ｔ細胞）（図２４Ｂ）及び組織常在記憶（T_{RM}）（ＩＶ－四量体＋ＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋ＣＤ８＋Ｔ細胞）（図２４Ｃ）細胞の各々の未処置（丸）及びＩＮ　ＰＡＣＥ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（上三角）群の肺における絶対細胞数並びにそれぞれ、総スパイク特異的（ＩＶ－四量体＋ＣＤ８＋Ｔ細胞）（図２４Ｄ）；抗原を経験した活性化された（ＩＶ－四量体＋ＣＤ６９＋ＣＤ８＋Ｔ細胞）（図２４Ｅ）及び組織常在記憶（T_{RM}）（ＩＶ－四量体＋ＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋ＣＤ８＋Ｔ細胞）（図２４Ｆ）細胞の各々の、未処置（丸）及びＩＮ　ＰＡＣＥ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（上三角）群の縦隔リンパ節における絶対細胞数を示す。

【図２４Ｃ】図２４Ａ～２４Ｆは、ＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥプライミング及びＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングによって誘導された組織常在（ＩＶ－）スパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞免疫の棒グラフであり、それぞれ、総スパイク特異的（ＩＶ－四量体＋ＣＤ８＋Ｔ細胞）（図２４Ａ）；抗原を経験した活性化された（ＩＶ－四量体＋ＣＤ６９＋ＣＤ８＋Ｔ細胞）（図２４Ｂ）及び組織常在記憶（T_{RM}）（ＩＶ－四量体＋ＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋ＣＤ８＋Ｔ細胞）（図２４Ｃ）細胞の各々の未処置（丸）及びＩＮ　ＰＡＣＥ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（上三角）群の肺における絶対細胞数並びにそれぞれ、総スパイク特異的（ＩＶ－四量体＋ＣＤ８＋Ｔ細胞）（図２４Ｄ）；抗原を経験した活性化された（ＩＶ－四量体＋ＣＤ６９＋ＣＤ８＋Ｔ細胞）（図２４Ｅ）及び組織常在記憶（T_{RM}）（ＩＶ－四量体＋ＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋ＣＤ８＋Ｔ細胞）（図２４Ｆ）細胞の各々の、未処置（丸）及びＩＮ　ＰＡＣＥ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（上三角）群の縦隔リンパ節における絶対細胞数を示す。

【図２４Ｄ】図２４Ａ～２４Ｆは、ＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥプライミング及びＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングによって誘導された組織常在（ＩＶ－）スパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞免疫の棒グラフであり、それぞれ、総スパイク特異的（ＩＶ－四量体＋ＣＤ８＋Ｔ細胞）（図２４Ａ）；抗原を経験した活性化された（ＩＶ－四量体＋ＣＤ６９＋ＣＤ８＋Ｔ細胞）（図２４Ｂ）及び組織常在記憶（T_{RM}）（ＩＶ－四量体＋ＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋ＣＤ８＋Ｔ細胞）（図２４Ｃ）細胞の各々の未処置（丸）及びＩＮ　ＰＡＣＥ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（上三角）群の肺における絶対細胞数並びにそれぞれ、総スパイク特異的（ＩＶ－四量体＋ＣＤ８＋Ｔ細胞）（図２４Ｄ）；抗原を経験した活性化された（ＩＶ－四量体＋ＣＤ６９＋ＣＤ８＋Ｔ細胞）（図２４Ｅ）及び組織常在記憶（T_{RM}）（ＩＶ－四量体＋ＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋ＣＤ８＋Ｔ細胞）（図２４Ｆ）細胞の各々の、未処置（丸）及びＩＮ　ＰＡＣＥ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（上三角）群の縦隔リンパ節における絶対細胞数を示す。

【図２４Ｅ】図２４Ａ～２４Ｆは、ＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥプライミング及びＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングによって誘導された組織常在（ＩＶ－）スパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞免疫の棒グラフであり、それぞれ、総スパイク特異的（ＩＶ－四量体＋ＣＤ８＋Ｔ細胞）（図２４Ａ）；抗原を経験した活性化された（ＩＶ－四量体＋ＣＤ６９＋ＣＤ８＋Ｔ細胞）（図２４Ｂ）及び組織常在記憶（T_{RM}）（ＩＶ－四量体＋ＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋ＣＤ８＋Ｔ細胞）（図２４Ｃ）細胞の各々の未処置（丸）及びＩＮ　ＰＡＣＥ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（上三角）群の肺における絶対細胞数並びにそれぞれ、総スパイク特異的（ＩＶ－四量体＋ＣＤ８＋Ｔ細胞）（図２４Ｄ）；抗原を経験した活性化された（ＩＶ－四量体＋ＣＤ６９＋ＣＤ８＋Ｔ細胞）（図２４Ｅ）及び組織常在記憶（T_{RM}）（ＩＶ－

四量体$^{+}$ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞）（図２４Ｆ）細胞の各々の、未処置（丸）及びＩＮ　ＰＡＣＥ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（上三角）群の縦隔リンパ節における絶対細胞数を示す。

【図２４Ｆ】図２４Ａ～２４Ｆは、ＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥプライミング及びＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングによって誘導された組織常在（ＩＶ$^{-}$）スパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞免疫の棒グラフであり、それぞれ、総スパイク特異的（ＩＶ$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞）（図２４Ａ）；抗原を経験した活性化された（ＩＶ$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞）（図２４Ｂ）及び組織常在記憶（T_{RM}）（ＩＶ$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞）（図２４Ｃ）細胞の各々の未処置（丸）及びＩＮ　ＰＡＣＥ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（上三角）群の肺における絶対細胞数並びにそれぞれ、総スパイク特異的（ＩＶ$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞）（図２４Ｄ）；抗原を経験した活性化された（ＩＶ$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞）（図２４Ｅ）及び組織常在記憶（T_{RM}）（ＩＶ$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞）（図２４Ｆ）細胞の各々の、未処置（丸）及びＩＮ　ＰＡＣＥ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（上三角）群の縦隔リンパ節における絶対細胞数を示す。

【図２５Ａ】図２５Ａ～２５Ｄは、流入領域リンパ節におけるＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥプライミング及びＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングによって誘導された体液性免疫応答の棒グラフであり、それぞれ、ＣＸＣＲ５$^{+}$ＰＤ１$^{+}$$T_{FH}$細胞（図２５Ａ）；ＧＬ７＋胚中心（ＧＣ）Ｂ細胞（図２５Ｂ）；ＣＤ１３８＋抗体分泌細胞（ＡＳＣ）（図２５Ｃ）及び四量体＋Ｂ細胞（図２５Ｄ）の各々の、未処置（丸）及びＩＮ　ＰＡＣＥ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（上三角）群の絶対細胞数を示す。

【図２５Ｂ】図２５Ａ～２５Ｄは、流入領域リンパ節におけるＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥプライミング及びＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングによって誘導された体液性免疫応答の棒グラフであり、それぞれ、ＣＸＣＲ５$^{+}$ＰＤ１$^{+}$$T_{FH}$細胞（図２５Ａ）；ＧＬ７＋胚中心（ＧＣ）Ｂ細胞（図２５Ｂ）；ＣＤ１３８＋抗体分泌細胞（ＡＳＣ）（図２５Ｃ）及び四量体＋Ｂ細胞（図２５Ｄ）の各々の、未処置（丸）及びＩＮ　ＰＡＣＥ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（上三角）群の絶対細胞数を示す。

【図２５Ｃ】図２５Ａ～２５Ｄは、流入領域リンパ節におけるＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥプライミング及びＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングによって誘導された体液性免疫応答の棒グラフであり、それぞれ、ＣＸＣＲ５$^{+}$ＰＤ１$^{+}$$T_{FH}$細胞（図２５Ａ）；ＧＬ７＋胚中心（ＧＣ）Ｂ細胞（図２５Ｂ）；ＣＤ１３８＋抗体分泌細胞（ＡＳＣ）（図２５Ｃ）及び四量体＋Ｂ細胞（図２５Ｄ）の各々の、未処置（丸）及びＩＮ　ＰＡＣＥ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（上三角）群の絶対細胞数を示す。

【図２５Ｄ】図２５Ａ～２５Ｄは、流入領域リンパ節におけるＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥプライミング及びＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングによって誘導された体液性免疫応答の棒グラフであり、それぞれ、ＣＸＣＲ５$^{+}$ＰＤ１$^{+}$$T_{FH}$細胞（図２５Ａ）；ＧＬ７＋胚中心（ＧＣ）Ｂ細胞（図２５Ｂ）；ＣＤ１３８＋抗体分泌細胞（ＡＳＣ）（図２５Ｃ）及び四量体＋Ｂ細胞（図２５Ｄ）の各々の、未処置（丸）及びＩＮ　ＰＡＣＥ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（上三角）群の絶対細胞数を示す。

【図２６Ａ】図２６Ａ～２６Ｄは、ＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥプライミングと、続いてＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングが、頑強な粘膜及び全身スパイク特異的ＩｇＡ及びＩｇＧを誘発したことを示す棒グラフであり、グラフは、それぞれ、希釈１：３６又は１：２１６のＢＡＬＦ（図２６Ａ）及び希釈１：１２５０又は１：６２５００の血清（図２６Ｂ）から得られた、未処置（丸）及びＩＮ　ＰＡＣＥ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（上三角）の試料の各々の抗Ｓ１　ＩｇＧの光学濃度（ＯＤ）（１～３）；それぞれ、希釈１：６又は１：３６のＢＡＬＦ（図２６Ｃ）及び希釈１：２５０又は１：１２５０の血清（図２６Ｄ）から得られた、未処置（丸）及びＩＮ　ＰＡＣＥ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（上三角）の試料の各々の抗Ｓ１　ＩｇＡの光学濃度（ＯＤ）（１～３）を示す。

【図２６Ｂ】図２６Ａ～２６Ｄは、ＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥプライミングと、続いてＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングが、頑強な粘膜及び全身スパイク特異的ＩｇＡ及

びＩｇＧを誘発したことを示す棒グラフであり、グラフは、それぞれ、希釈１：３６又は１：２１６のＢＡＬＦ（図２６Ａ）及び希釈１：１２５０又は１：６２５００の血清（図２６Ｂ）から得られた、未処置（丸）及びＩＮ　ＰＡＣＥ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（上三角）の試料の各々の抗Ｓ１　ＩｇＧの光学濃度（ＯＤ）（１～３）；それぞれ、希釈１：６又は１：３６のＢＡＬＦ（図２６Ｃ）及び希釈１：２５０又は１：１２５０の血清（図２６Ｄ）から得られた、未処置（丸）及びＩＮ　ＰＡＣＥ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（上三角）の試料の各々の抗Ｓ１　ＩｇＡの光学濃度（ＯＤ）（１～３）を示す。

【図２６Ｃ】図２６Ａ～２６Ｄは、ＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥプライミングと、続いてＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングが、頑強な粘膜及び全身スパイク特異的ＩｇＡ及びＩｇＧを誘発したことを示す棒グラフであり、グラフは、それぞれ、希釈１：３６又は１：２１６のＢＡＬＦ（図２６Ａ）及び希釈１：１２５０又は１：６２５００の血清（図２６Ｂ）から得られた、未処置（丸）及びＩＮ　ＰＡＣＥ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（上三角）の試料の各々の抗Ｓ１　ＩｇＧの光学濃度（ＯＤ）（１～３）；それぞれ、希釈１：６又は１：３６のＢＡＬＦ（図２６Ｃ）及び希釈１：２５０又は１：１２５０の血清（図２６Ｄ）から得られた、未処置（丸）及びＩＮ　ＰＡＣＥ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（上三角）の試料の各々の抗Ｓ１　ＩｇＡの光学濃度（ＯＤ）（１～３）を示す。

【図２６Ｄ】図２６Ａ～２６Ｄは、ＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥプライミングと、続いてＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングが、頑強な粘膜及び全身スパイク特異的ＩｇＡ及びＩｇＧを誘発したことを示す棒グラフであり、グラフは、それぞれ、希釈１：３６又は１：２１６のＢＡＬＦ（図２６Ａ）及び希釈１：１２５０又は１：６２５００の血清（図２６Ｂ）から得られた、未処置（丸）及びＩＮ　ＰＡＣＥ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（上三角）の試料の各々の抗Ｓ１　ＩｇＧの光学濃度（ＯＤ）（１～３）；それぞれ、希釈１：６又は１：３６のＢＡＬＦ（図２６Ｃ）及び希釈１：２５０又は１：１２５０の血清（図２６Ｄ）から得られた、未処置（丸）及びＩＮ　ＰＡＣＥ＞ＩＮ　ＰＡＣＥ（上三角）の試料の各々の抗Ｓ１　ＩｇＡの光学濃度（ＯＤ）（１～３）を示す。

【図２７Ａ】図２７Ａは、一部の実施形態によれば「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、肺常在スパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞免疫を誘導したことを実証する。「ＩＶ－」は、細胞が、事実上血管ではなく組織（例えば、肺）中にあることを示す。「四量体＋」は、ＣＤ８Ｔ細胞が、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクペプチド（「ＶＮＦＮＦＮＧＬ」配列番号６）との複合体中の四量体クラスＩ　ＭＨＣタンパク質と反応性であることを示す。「ＣＤ６９＋」とは、細胞がＣＤ６９陽性であることを意味し、これは、ＣＤ８Ｔ細胞が、抗原を経験したＣＤ８Ｔ細胞であることを示す。「ＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋」とは、細胞がＣＤ６９陽性及びＣＤ１０３陽性の両方であることを意味し、これは、ＣＤ８Ｔ細胞が、組織常在記憶ＣＤ８Ｔ細胞であることを示す。図２７Ｂは、一部の実施形態によれば「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、肺常在ＣＤ４Ｔ細胞の拡大増殖を誘導したことを実証する。「ＣＤ４４＋」とは、細胞がＣＤ４４陽性であることを意味し、これは、ＣＤ４Ｔ細胞がポリクローナルに活性化されていることを示す。「ＣＤ６９＋」とは、細胞がＣＤ６９陽性であることを意味し、これは、ＣＤ４Ｔ細胞が抗原を経験したＣＤ４Ｔ細胞であることを示す「ＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋」とは、細胞がＣＤ６９陽性及びＣＤ１０３陽性の両方であることを意味し、これは、ＣＤ４Ｔ細胞が、組織常在記憶ＣＤ４Ｔ細胞であることを示す。図２７Ｃ～２７Ｆは、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、一部の実施形態によれば、抗体分泌細胞、常在記憶Ｂ細胞及び胚中心様Ｂ細胞を含む、多様な血管外Ｂ細胞応答の抗原特異的及びポリクローナル拡大増殖を誘導したことを実証する。

【図２７Ｂ】図２７Ａは、一部の実施形態によれば「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、肺常在スパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞免疫を誘導したことを実証する。「ＩＶ－」は、細胞が、事実上血管ではなく組織（例えば、肺）中にあることを示す。「四量体＋」は、ＣＤ８Ｔ細胞が、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクペプチド（「ＶＮＦＮＦＮＧＬ」配列番号６）との複合体中の四量体クラスＩ　ＭＨＣタンパク質と反応性であることを示す。「ＣＤ６９＋」とは、細胞がＣＤ６９陽性であることを意味し、これは、ＣＤ８Ｔ細

胞が、抗原を経験したＣＤ８Ｔ細胞であることを示す。「ＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋」とは、細胞がＣＤ６９陽性及びＣＤ１０３陽性の両方であることを意味し、これは、ＣＤ８Ｔ細胞が、組織常在記憶ＣＤ８Ｔ細胞であることを示す。図２７Ｂは、一部の実施形態によれば「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、肺常在ＣＤ４Ｔ細胞の拡大増殖を誘導したことを実証する。「ＣＤ４４＋」とは、細胞がＣＤ４４陽性であることを意味し、これは、ＣＤ４Ｔ細胞がポリクローナルに活性化されていることを示す。「ＣＤ６９＋」とは、細胞がＣＤ６９陽性であることを意味し、これは、ＣＤ４Ｔ細胞が抗原を経験したＣＤ４Ｔ細胞であることを示す「ＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋」とは、細胞がＣＤ６９陽性及びＣＤ１０３陽性の両方であることを意味し、これは、ＣＤ４Ｔ細胞が、組織常在記憶ＣＤ４Ｔ細胞であることを示す。図２７Ｃ～２７Ｆは、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、一部の実施形態によれば、抗体分泌細胞、常在記憶Ｂ細胞及び胚中心様Ｂ細胞を含む、多様な血管外Ｂ細胞応答の抗原特異的及びポリクローナル拡大増殖を誘導したことを実証する。

【図２７Ｃ】図２７Ａは、一部の実施形態によれば「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、肺常在スパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞免疫を誘導したことを実証する。「ＩＶ－」は、細胞が、事実上血管ではなく組織（例えば、肺）中にあることを示す。「四量体＋」は、ＣＤ８Ｔ細胞が、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクペプチド（「ＶＮＦＮＦＮＧＬ」配列番号６）との複合体中の四量体クラスＩ　ＭＨＣタンパク質と反応性であることを示す。「ＣＤ６９＋」とは、細胞がＣＤ６９陽性であることを意味し、これは、ＣＤ８Ｔ細胞が、抗原を経験したＣＤ８Ｔ細胞であることを示す。「ＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋」とは、細胞がＣＤ６９陽性及びＣＤ１０３陽性の両方であることを意味し、これは、ＣＤ８Ｔ細胞が、組織常在記憶ＣＤ８Ｔ細胞であることを示す。図２７Ｂは、一部の実施形態によれば「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、肺常在ＣＤ４Ｔ細胞の拡大増殖を誘導したことを実証する。「ＣＤ４４＋」とは、細胞がＣＤ４４陽性であることを意味し、これは、ＣＤ４Ｔ細胞がポリクローナルに活性化されていることを示す。「ＣＤ６９＋」とは、細胞がＣＤ６９陽性であることを意味し、これは、ＣＤ４Ｔ細胞が抗原を経験したＣＤ４Ｔ細胞であることを示す「ＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋」とは、細胞がＣＤ６９陽性及びＣＤ１０３陽性の両方であることを意味し、これは、ＣＤ４Ｔ細胞が、組織常在記憶ＣＤ４Ｔ細胞であることを示す。図２７Ｃ～２７Ｆは、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、一部の実施形態によれば、抗体分泌細胞、常在記憶Ｂ細胞及び胚中心様Ｂ細胞を含む、多様な血管外Ｂ細胞応答の抗原特異的及びポリクローナル拡大増殖を誘導したことを実証する。

【図２７Ｄ】図２７Ａは、一部の実施形態によれば「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、肺常在スパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞免疫を誘導したことを実証する。「ＩＶ－」は、細胞が、事実上血管ではなく組織（例えば、肺）中にあることを示す。「四量体＋」は、ＣＤ８Ｔ細胞が、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクペプチド（「ＶＮＦＮＦＮＧＬ」配列番号６）との複合体中の四量体クラスＩ　ＭＨＣタンパク質と反応性であることを示す。「ＣＤ６９＋」とは、細胞がＣＤ６９陽性であることを意味し、これは、ＣＤ８Ｔ細胞が、抗原を経験したＣＤ８Ｔ細胞であることを示す。「ＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋」とは、細胞がＣＤ６９陽性及びＣＤ１０３陽性の両方であることを意味し、これは、ＣＤ８Ｔ細胞が、組織常在記憶ＣＤ８Ｔ細胞であることを示す。図２７Ｂは、一部の実施形態によれば「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、肺常在ＣＤ４Ｔ細胞の拡大増殖を誘導したことを実証する。「ＣＤ４４＋」とは、細胞がＣＤ４４陽性であることを意味し、これは、ＣＤ４Ｔ細胞がポリクローナルに活性化されていることを示す。「ＣＤ６９＋」とは、細胞がＣＤ６９陽性であることを意味し、これは、ＣＤ４Ｔ細胞が抗原を経験したＣＤ４Ｔ細胞であることを示す「ＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋」とは、細胞がＣＤ６９陽性及びＣＤ１０３陽性の両方であることを意味し、これは、ＣＤ４Ｔ細胞が、組織常在記憶ＣＤ４Ｔ細胞であることを示す。図２７Ｃ～２７Ｆは、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、一部の実施形態によれば、抗体分泌細胞、常在記憶Ｂ細胞及び胚中心様Ｂ細胞を含む、多様な血管外Ｂ細胞応答の抗原特異的及びポリクローナル拡大増殖を誘導した

ことを実証する。
【図２７Ｅ】図２７Ａは、一部の実施形態によれば「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、肺常在スパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞免疫を誘導したことを実証する。「ＩＶ－」は、細胞が、事実上血管ではなく組織（例えば、肺）中にあることを示す。「四量体＋」は、ＣＤ８Ｔ細胞が、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクペプチド（「ＶＮＦＮＦＮＧＬ」配列番号６）との複合体中の四量体クラスＩ　ＭＨＣタンパク質と反応性であることを示す。「ＣＤ６９＋」とは、細胞がＣＤ６９陽性であることを意味し、これは、ＣＤ８Ｔ細胞が、抗原を経験したＣＤ８Ｔ細胞であることを示す。「ＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋」とは、細胞がＣＤ６９陽性及びＣＤ１０３陽性の両方であることを意味し、これは、ＣＤ８Ｔ細胞が、組織常在記憶ＣＤ８Ｔ細胞であることを示す。図２７Ｂは、一部の実施形態によれば「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、肺常在ＣＤ４Ｔ細胞の拡大増殖を誘導したことを実証する。「ＣＤ４４＋」とは、細胞がＣＤ４４陽性であることを意味し、これは、ＣＤ４Ｔ細胞がポリクローナルに活性化されていることを示す。「ＣＤ６９＋」とは、細胞がＣＤ６９陽性であることを意味し、これは、ＣＤ４Ｔ細胞が抗原を経験したＣＤ４Ｔ細胞であることを示す「ＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋」とは、細胞がＣＤ６９陽性及びＣＤ１０３陽性の両方であることを意味し、これは、ＣＤ４Ｔ細胞が、組織常在記憶ＣＤ４Ｔ細胞であることを示す。図２７Ｃ～２７Ｆは、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、一部の実施形態によれば、抗体分泌細胞、常在記憶Ｂ細胞及び胚中心様Ｂ細胞を含む、多様な血管外Ｂ細胞応答の抗原特異的及びポリクローナル拡大増殖を誘導したことを実証する。
【図２７Ｆ】図２７Ａは、一部の実施形態によれば「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、肺常在スパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞免疫を誘導したことを実証する。「ＩＶ－」は、細胞が、事実上血管ではなく組織（例えば、肺）中にあることを示す。「四量体＋」は、ＣＤ８Ｔ細胞が、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクペプチド（「ＶＮＦＮＦＮＧＬ」配列番号６）との複合体中の四量体クラスＩ　ＭＨＣタンパク質と反応性であることを示す。「ＣＤ６９＋」とは、細胞がＣＤ６９陽性であることを意味し、これは、ＣＤ８Ｔ細胞が、抗原を経験したＣＤ８Ｔ細胞であることを示す。「ＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋」とは、細胞がＣＤ６９陽性及びＣＤ１０３陽性の両方であることを意味し、これは、ＣＤ８Ｔ細胞が、組織常在記憶ＣＤ８Ｔ細胞であることを示す。図２７Ｂは、一部の実施形態によれば「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、肺常在ＣＤ４Ｔ細胞の拡大増殖を誘導したことを実証する。「ＣＤ４４＋」とは、細胞がＣＤ４４陽性であることを意味し、これは、ＣＤ４Ｔ細胞がポリクローナルに活性化されていることを示す。「ＣＤ６９＋」とは、細胞がＣＤ６９陽性であることを意味し、これは、ＣＤ４Ｔ細胞が抗原を経験したＣＤ４Ｔ細胞であることを示す「ＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋」とは、細胞がＣＤ６９陽性及びＣＤ１０３陽性の両方であることを意味し、これは、ＣＤ４Ｔ細胞が、組織常在記憶ＣＤ４Ｔ細胞であることを示す。図２７Ｃ～２７Ｆは、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、一部の実施形態によれば、抗体分泌細胞、常在記憶Ｂ細胞及び胚中心様Ｂ細胞を含む、多様な血管外Ｂ細胞応答の抗原特異的及びポリクローナル拡大増殖を誘導したことを実証する。
【図２８Ａ】図２８Ａ～２８Ｄは、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、一部の実施形態によれば、頑強な気道及び全身スパイクタンパク質Ｓ１サブユニット特異的ＩｇＡ及びＩｇＧ応答を誘発したことを実証する。「ＢＡＬ」とは、気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬＦ）を意味し、これは、ＢＡＬＦにおいて、示されたＩｇのレベルが測定されたことを示す。図２８Ｅ～２８Ｇは、一部の実施形態によれば、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、鼻腔組織及び鼻腔洗浄液測定値に基づいて鼻腔において上気道Ｔ細胞及び抗体応答を誘発したことを実証する。
【図２８Ｂ】図２８Ａ～２８Ｄは、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、一部の実施形態によれば、頑強な気道及び全身スパイクタンパク質Ｓ１サブユニット特異的ＩｇＡ及びＩｇＧ応答を誘発したことを実証する。「ＢＡＬ」とは、気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬＦ）を意味し、これは、ＢＡＬＦにおいて、示されたＩｇのレベルが測定されたこと

を示す。図２８Ｅ～２８Ｇは、一部の実施形態によれば、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、鼻腔組織及び鼻腔洗浄液測定値に基づいて鼻腔において上気道Ｔ細胞及び抗体応答を誘発したことを実証する。

【図２８Ｃ】図２８Ａ～２８Ｄは、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、一部の実施形態によれば、頑強な気道及び全身スパイクタンパク質Ｓ１サブユニット特異的ＩｇＡ及びＩｇＧ応答を誘発したことを実証する。「ＢＡＬ」とは、気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬＦ）を意味し、これは、ＢＡＬＦにおいて、示されたＩｇのレベルが測定されたことを示す。図２８Ｅ～２８Ｇは、一部の実施形態によれば、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、鼻腔組織及び鼻腔洗浄液測定値に基づいて鼻腔において上気道Ｔ細胞及び抗体応答を誘発したことを実証する。

【図２８Ｄ】図２８Ａ～２８Ｄは、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、一部の実施形態によれば、頑強な気道及び全身スパイクタンパク質Ｓ１サブユニット特異的ＩｇＡ及びＩｇＧ応答を誘発したことを実証する。「ＢＡＬ」とは、気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬＦ）を意味し、これは、ＢＡＬＦにおいて、示されたＩｇのレベルが測定されたことを示す。図２８Ｅ～２８Ｇは、一部の実施形態によれば、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、鼻腔組織及び鼻腔洗浄液測定値に基づいて鼻腔において上気道Ｔ細胞及び抗体応答を誘発したことを実証する。

【図２８Ｅ】図２８Ａ～２８Ｄは、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、一部の実施形態によれば、頑強な気道及び全身スパイクタンパク質Ｓ１サブユニット特異的ＩｇＡ及びＩｇＧ応答を誘発したことを実証する。「ＢＡＬ」とは、気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬＦ）を意味し、これは、ＢＡＬＦにおいて、示されたＩｇのレベルが測定されたことを示す。図２８Ｅ～２８Ｇは、一部の実施形態によれば、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、鼻腔組織及び鼻腔洗浄液測定値に基づいて鼻腔において上気道Ｔ細胞及び抗体応答を誘発したことを実証する。

【図２８Ｆ】図２８Ａ～２８Ｄは、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、一部の実施形態によれば、頑強な気道及び全身スパイクタンパク質Ｓ１サブユニット特異的ＩｇＡ及びＩｇＧ応答を誘発したことを実証する。「ＢＡＬ」とは、気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬＦ）を意味し、これは、ＢＡＬＦにおいて、示されたＩｇのレベルが測定されたことを示す。図２８Ｅ～２８Ｇは、一部の実施形態によれば、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、鼻腔組織及び鼻腔洗浄液測定値に基づいて鼻腔において上気道Ｔ細胞及び抗体応答を誘発したことを実証する。

【図２８Ｇ】図２８Ａ～２８Ｄは、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、一部の実施形態によれば、頑強な気道及び全身スパイクタンパク質Ｓ１サブユニット特異的ＩｇＡ及びＩｇＧ応答を誘発したことを実証する。「ＢＡＬ」とは、気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬＦ）を意味し、これは、ＢＡＬＦにおいて、示されたＩｇのレベルが測定されたことを示す。図２８Ｅ～２８Ｇは、一部の実施形態によれば、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、鼻腔組織及び鼻腔洗浄液測定値に基づいて鼻腔において上気道Ｔ細胞及び抗体応答を誘発したことを実証する。

【図２９Ａ】図２９Ａ～２９Ｃは、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、従来のｍＲＮＡ－ＬＮＰ「プライム及びブースト」戦略よりもかなり強力な粘膜Ｔ細胞及び抗体応答を誘導したことを実証する。図中、「ＩＶ－ＣＤ４４＋四量体＋ＣＤ８＋ＴＲＭ」は、血管外（「ＩＶ－」）、活性化された（「ＣＤ４４＋」）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクペプチドと反応性である（「四量体＋」）ＣＤ８組織常在記憶Ｔ細胞を意味する。「ＩＶ－ＣＤ４４＋ＣＤ４＋ＴＲＭ」とは、血管外（「ＩＶ－」）、活性化された（「ＣＤ４４＋」）ＣＤ４組織常在記憶Ｔ細胞を意味する。「ＢＡＬ抗スパイクＳ１　ＩｇＡ」とは、ＢＡＬＦからの抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質Ｓ１ドメインに対するＩｇＡを意味する。図２９Ｄは、一部の実施形態によれば、投与間間隔を延長した後、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、従来のｍＲＮＡ－ＬＮＰ「プライム及びブースト」ワクチン接種戦略よりも強力な粘膜ＩｇＡ応答を誘導したことを実証する。図２９Ｅ～２９Ｇは、一部の実施形態によれば、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、未処

置マウス又はＩＭプライムのみを受けていたマウスと比較して、下気道（肺柔組織）及び上気道（鼻腔の鼻甲介）において優れた抗ウイルス制御剤ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を提供したことを実証する。図２９Ｈは、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、ＳＣＶ１スパイクを用いてさらにＩＮブーストされ、ＳＣＶ１及びＳＣＶ２の間で共有される保存されたエピトープ（ＶＮＦＮＦＮＧＬ、配列番号６）に対して特異的な高レベルの組織常在記憶ＣＤ８Ｔ細胞を生じたマウスでのデータを示す。

【図２９Ｂ】図２９Ａ～２９Ｃは、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、従来のｍＲＮＡ－ＬＮＰ「プライム及びブースト」戦略よりもかなり強力な粘膜Ｔ細胞及び抗体応答を誘導したことを実証する。図中、「ＩＶ－ＣＤ４４＋四量体＋ＣＤ８＋ＴＲＭ」は、血管外（「ＩＶ－」）、活性化された（「ＣＤ４４＋」）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクペプチドと反応性である（「四量体＋」）ＣＤ８組織常在記憶Ｔ細胞を意味する。「ＩＶ－ＣＤ４４＋ＣＤ４＋ＴＲＭ」とは、血管外（「ＩＶ－」）、活性化された（「ＣＤ４４＋」）ＣＤ４組織常在記憶Ｔ細胞を意味する。「ＢＡＬ抗スパイクＳ１　ＩｇＡ」とは、ＢＡＬＦからの抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質Ｓ１ドメインに対するＩｇＡを意味する。図２９Ｄは、一部の実施形態によれば、投与間間隔を延長した後、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、従来のｍＲＮＡ－ＬＮＰ「プライム及びブースト」ワクチン接種戦略よりも強力な粘膜ＩｇＡ応答を誘導したことを実証する。図２９Ｅ～２９Ｇは、一部の実施形態によれば、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、未処置マウス又はＩＭプライムのみを受けていたマウスと比較して、下気道（肺柔組織）及び上気道（鼻腔の鼻甲介）において優れた抗ウイルス制御剤ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を提供したことを実証する。図２９Ｈは、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、ＳＣＶ１スパイクを用いてさらにＩＮブーストされ、ＳＣＶ１及びＳＣＶ２の間で共有される保存されたエピトープ（ＶＮＦＮＦＮＧＬ、配列番号６）に対して特異的な高レベルの組織常在記憶ＣＤ８Ｔ細胞を生じたマウスでのデータを示す。

【図２９Ｃ】図２９Ａ～２９Ｃは、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、従来のｍＲＮＡ－ＬＮＰ「プライム及びブースト」戦略よりもかなり強力な粘膜Ｔ細胞及び抗体応答を誘導したことを実証する。図中、「ＩＶ－ＣＤ４４＋四量体＋ＣＤ８＋ＴＲＭ」は、血管外（「ＩＶ－」）、活性化された（「ＣＤ４４＋」）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクペプチドと反応性である（「四量体＋」）ＣＤ８組織常在記憶Ｔ細胞を意味する。「ＩＶ－ＣＤ４４＋ＣＤ４＋ＴＲＭ」とは、血管外（「ＩＶ－」）、活性化された（「ＣＤ４４＋」）ＣＤ４組織常在記憶Ｔ細胞を意味する。「ＢＡＬ抗スパイクＳ１　ＩｇＡ」とは、ＢＡＬＦからの抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質Ｓ１ドメインに対するＩｇＡを意味する。図２９Ｄは、一部の実施形態によれば、投与間間隔を延長した後、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、従来のｍＲＮＡ－ＬＮＰ「プライム及びブースト」ワクチン接種戦略よりも強力な粘膜ＩｇＡ応答を誘導したことを実証する。図２９Ｅ～２９Ｇは、一部の実施形態によれば、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、未処置マウス又はＩＭプライムのみを受けていたマウスと比較して、下気道（肺柔組織）及び上気道（鼻腔の鼻甲介）において優れた抗ウイルス制御剤ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を提供したことを実証する。図２９Ｈは、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、ＳＣＶ１スパイクを用いてさらにＩＮブーストされ、ＳＣＶ１及びＳＣＶ２の間で共有される保存されたエピトープ（ＶＮＦＮＦＮＧＬ、配列番号６）に対して特異的な高レベルの組織常在記憶ＣＤ８Ｔ細胞を生じたマウスでのデータを示す。

【図２９Ｄ】図２９Ａ～２９Ｃは、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、従来のｍＲＮＡ－ＬＮＰ「プライム及びブースト」戦略よりもかなり強力な粘膜Ｔ細胞及び抗体応答を誘導したことを実証する。図中、「ＩＶ－ＣＤ４４＋四量体＋ＣＤ８＋ＴＲＭ」は、血管外（「ＩＶ－」）、活性化された（「ＣＤ４４＋」）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクペプチドと反応性である（「四量体＋」）ＣＤ８組織常在記憶Ｔ細胞を意味する。

「ＩＶ－ＣＤ４４＋ＣＤ４＋ＴＲＭ」とは、血管外（「ＩＶ－」）、活性化された（「ＣＤ４４＋」）ＣＤ４組織常在記憶Ｔ細胞を意味する。「ＢＡＬ抗スパイクＳ１　ＩｇＡ」とは、ＢＡＬＦからの抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質Ｓ１ドメインＩｇＡを意味する。図２９Ｄは、一部の実施形態によれば、投与間間隔を延長した後、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、従来のｍＲＮＡ－ＬＮＰ「プライム及びブースト」ワクチン接種戦略よりも強力な粘膜ＩｇＡ応答を誘導したことを実証する。図２９Ｅ～２９Ｇは、一部の実施形態によれば、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、未処置マウス又はＩＭプライムのみを受けていたマウスと比較して、下気道（肺柔組織）及び上気道（鼻腔の鼻甲介）において優れた抗ウイルス制御剤ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を提供したことを実証する。図２９Ｈは、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、ＳＣＶ１スパイクを用いてさらにＩＮブーストされ、ＳＣＶ１及びＳＣＶ２の間で共有される保存されたエピトープ（ＶＮＦＮＦＮＧＬ、配列番号６）に対して特異的な高レベルの組織常在記憶ＣＤ８Ｔ細胞を生じたマウスでのデータを示す。

【図２９Ｅ】図２９Ａ～２９Ｃは、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、従来のｍＲＮＡ－ＬＮＰ「プライム及びブースト」戦略よりもかなり強力な粘膜Ｔ細胞及び抗体応答を誘導したことを実証する。図中、「ＩＶ－ＣＤ４４＋四量体＋ＣＤ８＋ＴＲＭ」は、血管外（「ＩＶ－」）、活性化された（「ＣＤ４４＋」）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクペプチドと反応性である（「四量体＋」）ＣＤ８組織常在記憶Ｔ細胞を意味する。「ＩＶ－ＣＤ４４＋ＣＤ４＋ＴＲＭ」とは、血管外（「ＩＶ－」）、活性化された（「ＣＤ４４＋」）ＣＤ４組織常在記憶Ｔ細胞を意味する。「ＢＡＬ抗スパイクＳ１　ＩｇＡ」とは、ＢＡＬＦからの抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質Ｓ１ドメインＩｇＡを意味する。図２９Ｄは、一部の実施形態によれば、投与間間隔を延長した後、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、従来のｍＲＮＡ－ＬＮＰ「プライム及びブースト」ワクチン接種戦略よりも強力な粘膜ＩｇＡ応答を誘導したことを実証する。図２９Ｅ～２９Ｇは、一部の実施形態によれば、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、未処置マウス又はＩＭプライムのみを受けていたマウスと比較して、下気道（肺柔組織）及び上気道（鼻腔の鼻甲介）において優れた抗ウイルス制御剤ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を提供したことを実証する。図２９Ｈは、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、ＳＣＶ１スパイクを用いてさらにＩＮブーストされ、ＳＣＶ１及びＳＣＶ２の間で共有される保存されたエピトープ（ＶＮＦＮＦＮＧＬ、配列番号６）に対して特異的な高レベルの組織常在記憶ＣＤ８Ｔ細胞を生じたマウスでのデータを示す。

【図２９Ｆ】図２９Ａ～２９Ｃは、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、従来のｍＲＮＡ－ＬＮＰ「プライム及びブースト」戦略よりもかなり強力な粘膜Ｔ細胞及び抗体応答を誘導したことを実証する。図中、「ＩＶ－ＣＤ４４＋四量体＋ＣＤ８＋ＴＲＭ」は、血管外（「ＩＶ－」）、活性化された（「ＣＤ４４＋」）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクペプチドと反応性である（「四量体＋」）ＣＤ８組織常在記憶Ｔ細胞を意味する。「ＩＶ－ＣＤ４４＋ＣＤ４＋ＴＲＭ」とは、血管外（「ＩＶ－」）、活性化された（「ＣＤ４４＋」）ＣＤ４組織常在記憶Ｔ細胞を意味する。「ＢＡＬ抗スパイクＳ１　ＩｇＡ」とは、ＢＡＬＦからの抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質Ｓ１ドメインＩｇＡを意味する。図２９Ｄは、一部の実施形態によれば、投与間間隔を延長した後、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、従来のｍＲＮＡ－ＬＮＰ「プライム及びブースト」ワクチン接種戦略よりも強力な粘膜ＩｇＡ応答を誘導したことを実証する。図２９Ｅ～２９Ｇは、一部の実施形態によれば、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、未処置マウス又はＩＭプライムのみを受けていたマウスと比較して、下気道（肺柔組織）及び上気道（鼻腔の鼻甲介）において優れた抗ウイルス制御剤ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を提供したことを実証する。図２９Ｈは、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、ＳＣＶ１スパイクを用いてさらにＩＮブーストされ、ＳＣＶ１及びＳＣＶ２の間で共有される保存されたエピトープ（ＶＮＦＮＦＮＧＬ、配列番号

６）に対して特異的な高レベルの組織常在記憶ＣＤ８Ｔ細胞を生じたマウスでのデータを示す。
【図２９Ｇ】図２９Ａ～２９Ｃは、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、従来のｍＲＮＡ－ＬＮＰ「プライム及びブースト」戦略よりもかなり強力な粘膜Ｔ細胞及び抗体応答を誘導したことを実証する。図中、「ＩＶ－ＣＤ４４＋四量体＋ＣＤ８＋ＴＲＭ」は、血管外（「ＩＶ－」）、活性化された（「ＣＤ４４＋」）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクペプチドと反応性である（「四量体＋」）ＣＤ８組織常在記憶Ｔ細胞を意味する。「ＩＶ－ＣＤ４４＋ＣＤ４＋ＴＲＭ」とは、血管外（「ＩＶ－」）、活性化された（「ＣＤ４４＋」）ＣＤ４組織常在記憶Ｔ細胞を意味する。「ＢＡＬ抗スパイクＳ１　ＩｇＡ」とは、ＢＡＬＦからの抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質Ｓ１ドメインＩｇＡを意味する。図２９Ｄは、一部の実施形態によれば、投与間間隔を延長した後、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、従来のｍＲＮＡ－ＬＮＰ「プライム及びブースト」ワクチン接種戦略よりも強力な粘膜ＩｇＡ応答を誘導したことを実証する。図２９Ｅ～２９Ｇは、一部の実施形態によれば、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、未処置マウス又はＩＭプライムのみを受けていたマウスと比較して、下気道（肺柔組織）及び上気道（鼻腔の鼻甲介）において優れた抗ウイルス制御剤ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を提供したことを実証する。図２９Ｈは、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、ＳＣＶ１スパイクを用いてさらにＩＮブーストされ、ＳＣＶ１及びＳＣＶ２の間で共有される保存されたエピトープ（ＶＮＦＮＦＮＧＬ、配列番号６）に対して特異的な高レベルの組織常在記憶ＣＤ８Ｔ細胞を生じたマウスでのデータを示す。
【図２９Ｈ】図２９Ａ～２９Ｃは、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、従来のｍＲＮＡ－ＬＮＰ「プライム及びブースト」戦略よりもかなり強力な粘膜Ｔ細胞及び抗体応答を誘導したことを実証する。図中、「ＩＶ－ＣＤ４４＋四量体＋ＣＤ８＋ＴＲＭ」は、血管外（「ＩＶ－」）、活性化された（「ＣＤ４４＋」）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクペプチドと反応性である（「四量体＋」）ＣＤ８組織常在記憶Ｔ細胞を意味する。「ＩＶ－ＣＤ４４＋ＣＤ４＋ＴＲＭ」とは、血管外（「ＩＶ－」）、活性化された（「ＣＤ４４＋」）ＣＤ４組織常在記憶Ｔ細胞を意味する。「ＢＡＬ抗スパイクＳ１　ＩｇＡ」とは、ＢＡＬＦからの抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質Ｓ１ドメインＩｇＡを意味する。図２９Ｄは、一部の実施形態によれば、投与間間隔を延長した後、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、従来のｍＲＮＡ－ＬＮＰ「プライム及びブースト」ワクチン接種戦略よりも強力な粘膜ＩｇＡ応答を誘導したことを実証する。図２９Ｅ～２９Ｇは、一部の実施形態によれば、「プライム及びスパイク」ワクチン接種戦略が、未処置マウス又はＩＭプライムのみを受けていたマウスと比較して、下気道（肺柔組織）及び上気道（鼻腔の鼻甲介）において優れた抗ウイルス制御剤ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を提供したことを実証する。図２９Ｈは、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、ＳＣＶ１スパイクを用いてさらにＩＮブーストされ、ＳＣＶ１及びＳＣＶ２の間で共有される保存されたエピトープ（ＶＮＦＮＦＮＧＬ、配列番号６）に対して特異的な高レベルの組織常在記憶ＣＤ８Ｔ細胞を生じたマウスでのデータを示す。
【図３０Ａ】図３０Ａ～３０Ｄは、一部の実施形態によれば、ＳＣＶ１スパイクタンパク質を用いてＩＭプライミングされ、ＩＮブーストされたマウスが、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ　ＳＣＶ１スパイク、ＩＮ　ＳＣＶ２スパイク又はＩＭ　ＳＣＶ２スパイクを用いて、ＩＭプライミングされ、後にブーストされたマウスと比較して、ＢＡＬＦ（図３０Ａ～３０Ｂ）及び血清（図３０Ｃ～３０Ｄ）の両方において抗ＳＣＶ１　ＩｇＡ（図３０Ａ及び３０Ｃ）及びＩｇＧ（図３０Ｂ及び３０Ｄ）の有意に高い力価を有していたことを実証する。ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、ＳＣＶ１スパイクを用いてさらにＩＮブーストされたマウスが、ＩＭプライミングされ、ＩＮ　ＳＣＶ１スパイクブーストされたマウスと比較して、粘膜及び循環抗ＳＣＶ１　ＩｇＡ及びＩｇＧのさらなる増大を有していた。図３０Ｅ～３

０Ｈは、一部の実施形態によれば、ＩＭプライミングされ、ＳＣＶ１又はＳＣＶ２スパイクタンパク質を用いてＩＮブーストされたマウスが、ＩＭプライミングされ、後にＩＭ ｍＲＮＡ－ＬＮＰ ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ ＳＣＶ１スパイク又はＩＭ ＳＣＶ２スパイクを用いてブーストされたマウスと比較して、ＢＡＬＦ（図３０Ｅ～３０Ｆ）において抗ＳＣＶ２ ＩｇＡの有意に高い力価を有していた（図３０Ｅ及び３０Ｇ）ことを実証する。ＩＭプライミングされ、ＩＮ ＳＣＶ２ブーストされたマウスでは、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされたマウスと比較して、同等レベルのＢＡＬＦ抗ＳＣＶ２ ＩｇＧ、血清抗ＳＣＶ２ ＩｇＡ及び血清抗ＳＣＶ２ ＩｇＧが生じた。ＩＭ「プライミングされ」ＩＮ ＳＣＶ１「スパイクされた」マウスではまた、頑強なレベルのＢＡＬＦ 抗ＳＣＶ２ ＩｇＧ、血清抗ＳＣＶ２ ＩｇＡ及び血清抗ＳＣＶ２ ＩｇＧが生じた。抗ＳＣＶ１抗体応答と同様に、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、ＳＣＶ１スパイクを用いてさらにＩＮブーストされたマウスでは、すべての他の群と比較して最高レベルの粘膜及び循環抗ＳＣＶ２ ＩｇＡ及びＩｇＧを生じた。図３０Ｉは、一部の実施形態によれば、ＩＮ ＳＣＶ１又はＩＭ ＳＣＶ１スパイクタンパク質を用いてＩＭプライミングされ、後にブーストされたマウスは、ＩＭ ｍＲＮＡ－ＬＮＰ ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ ＳＣＶ２スパイク又はＩＮ ＳＣＶ２スパイクを用いて、ＩＭプライミングされ、後にブーストされたマウスと比較して、水泡性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）偽型ＳＣＶ１に対して有意に高い血清中和力価（ＩＣ５０）を有していたことを実証する。図２２で示されるように、ＩＭプライミングされ、後にＩＮ ＳＣＶ２スパイク又はＩＭ ｍＲＮＡ－ＬＮＰ ＳＣＶ２ワクチンを用いてブーストされたマウスは、ＩＭプライミングされ、ＩＭ ＳＣＶ２スパイク、ＩＭ ＳＣＶ１スパイク又はＩＮ ＳＣＶ１スパイクを用いて後にブーストされたマウスと比較してＶＳＶ偽型ＳＣＶ２に対して有意に高い血清中和力価（ＩＣ５０）を有していた。結合抗体力価と一致して、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、さらにＳＣＶ１スパイクを用いてＩＮブーストされたたマウスでは、ＶＳＶ偽型ＳＣＶ１及びＳＣＶ２の両方に対して高い血清中和力価（ＩＣ５０）が生じた。

【図３０Ｂ】図３０Ａ～３０Ｄは、一部の実施形態によれば、ＳＣＶ１スパイクタンパク質を用いてＩＭプライミングされ、ＩＮブーストされたマウスが、ＩＭ ｍＲＮＡ－ＬＮＰ ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ ＳＣＶ１スパイク、ＩＮ ＳＣＶ２スパイク又はＩＭ ＳＣＶ２スパイクを用いて、ＩＭプライミングされ、後にブーストされたマウスと比較して、ＢＡＬＦ（図３０Ａ～３０Ｂ）及び血清（図３０Ｃ～３０Ｄ）の両方において抗ＳＣＶ１ ＩｇＡ（図３０Ａ及び３０Ｃ）及びＩｇＧ（図３０Ｂ及び３０Ｄ）の有意に高い力価を有していたことを実証する。ｍＲＮＡ－ＬＮＰ ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、ＳＣＶ１スパイクを用いてさらにＩＮブーストされたマウスが、ＩＭプライミングされ、ＩＮ ＳＣＶ１スパイクブーストされたマウスと比較して、粘膜及び循環抗ＳＣＶ１ ＩｇＡ及びＩｇＧのさらなる増大を有していた。図３０Ｅ～３０Ｈは、一部の実施形態によれば、ＩＭプライミングされ、ＳＣＶ１又はＳＣＶ２スパイクタンパク質を用いてＩＮブーストされたマウスが、ＩＭプライミングされ、後にＩＭ ｍＲＮＡ－ＬＮＰ ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ ＳＣＶ１スパイク又はＩＭ ＳＣＶ２スパイクを用いてブーストされたマウスと比較して、ＢＡＬＦ（図３０Ｅ～３０Ｆ）において抗ＳＣＶ２ ＩｇＡの有意に高い力価を有していた（図３０Ｅ及び３０Ｇ）ことを実証する。ＩＭプライミングされ、ＩＮ ＳＣＶ２ブーストされたマウスでは、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされたマウスと比較して、同等レベルのＢＡＬＦ抗ＳＣＶ２ ＩｇＧ、血清抗ＳＣＶ２ ＩｇＡ及び血清抗ＳＣＶ２ ＩｇＧが生じた。ＩＭ「プライミングされ」ＩＮ ＳＣＶ１「スパイクされた」マウスではまた、頑強なレベルのＢＡＬＦ 抗ＳＣＶ２ ＩｇＧ、血清抗ＳＣＶ２ ＩｇＡ及び血清抗ＳＣＶ２ ＩｇＧが生じた。抗ＳＣＶ１抗体応答と同様に、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、ＳＣＶ１スパイクを用いてさらにＩＮブーストされたマウスでは、すべての他の群と比較して最高レベルの粘膜

及び循環抗ＳＣＶ２　ＩｇＡ及びＩｇＧを生じた。図３０Ｉは、一部の実施形態によれば、ＩＮ　ＳＣＶ１又はＩＭ　ＳＣＶ１スパイクタンパク質を用いてＩＭプライミングされ、後にブーストされたマウスは、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ　ＳＣＶ２スパイク又はＩＮ　ＳＣＶ２スパイクを用いて、ＩＭプライミングされ、後にブーストされたマウスと比較して、水泡性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）偽型ＳＣＶ１に対して有意に高い血清中和力価（ＩＣ５０）を有していたことを実証する。図２２で示されるように、ＩＭプライミングされ、後にＩＮ　ＳＣＶ２スパイク又はＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてブーストされたマウスは、ＩＭプライミングされ、ＩＭ　ＳＣＶ２スパイク、ＩＭ　ＳＣＶ１スパイク又はＩＮ　ＳＣＶ１スパイクを用いて後にブーストされたマウスと比較してＶＳＶ偽型ＳＣＶ２に対して有意に高い血清中和力価（ＩＣ５０）を有していた。結合抗体力価と一致して、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、さらにＳＣＶ１スパイクを用いてＩＮブーストされたたマウスでは、ＶＳＶ偽型ＳＣＶ１及びＳＣＶ２の両方に対して高い血清中和力価（ＩＣ５０）が生じた。

【図３０Ｃ】図３０Ａ～３０Ｄは、一部の実施形態によれば、ＳＣＶ１スパイクタンパク質を用いてＩＭプライミングされ、ＩＮブーストされたマウスが、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ　ＳＣＶ１スパイク、ＩＮ　ＳＣＶ２スパイク又はＩＭ　ＳＣＶ２スパイクを用いて、ＩＭプライミングされ、後にブーストされたマウスと比較して、ＢＡＬＦ（図３０Ａ～３０Ｂ）及び血清（図３０Ｃ～３０Ｄ）の両方において抗ＳＣＶ１　ＩｇＡ（図３０Ａ及び３０Ｃ）及びＩｇＧ（図３０Ｂ及び３０Ｄ）の有意に高い力価を有していたことを実証する。ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、ＳＣＶ１スパイクを用いてさらにＩＮブーストされたマウスが、ＩＭプライミングされ、ＩＮ　ＳＣＶ１スパイクブーストされたマウスと比較して、粘膜及び循環抗ＳＣＶ１　ＩｇＡ及びＩｇＧのさらなる増大を有していた。図３０Ｅ～３０Ｈは、一部の実施形態によれば、ＩＭプライミングされ、ＳＣＶ１又はＳＣＶ２スパイクタンパク質を用いてＩＮブーストされたマウスが、ＩＭプライミングされ、後にＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ　ＳＣＶ１スパイク又はＩＭ　ＳＣＶ２スパイクを用いてブーストされたマウスと比較して、ＢＡＬＦ（図３０Ｅ～３０Ｆ）において抗ＳＣＶ２　ＩｇＡの有意に高い力価を有していた（図３０Ｅ及び３０Ｇ）ことを実証する。ＩＭプライミングされ、ＩＮ　ＳＣＶ２ブーストされたマウスでは、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされたマウスと比較して、同等レベルのＢＡＬＦ抗ＳＣＶ２　ＩｇＧ、血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＡ及び血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＧが生じた。ＩＭ「プライミングされ」ＩＮ　ＳＣＶ１「スパイクされた」マウスではまた、頑強なレベルのＢＡＬＦ　抗ＳＣＶ２　ＩｇＧ、血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＡ及び血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＧが生じた。抗ＳＣＶ１抗体応答と同様に、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、ＳＣＶ１スパイクを用いてさらにＩＮブーストされたマウスでは、すべての他の群と比較して最高レベルの粘膜及び循環抗ＳＣＶ２　ＩｇＡ及びＩｇＧを生じた。図３０Ｉは、一部の実施形態によれば、ＩＮ　ＳＣＶ１又はＩＭ　ＳＣＶ１スパイクタンパク質を用いてＩＭプライミングされ、後にブーストされたマウスは、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ　ＳＣＶ２スパイク又はＩＮ　ＳＣＶ２スパイクを用いて、ＩＭプライミングされ、後にブーストされたマウスと比較して、水泡性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）偽型ＳＣＶ１に対して有意に高い血清中和力価（ＩＣ５０）を有していたことを実証する。図２２で示されるように、ＩＭプライミングされ、後にＩＮ　ＳＣＶ２スパイク又はＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてブーストされたマウスは、ＩＭプライミングされ、ＩＭ　ＳＣＶ２スパイク、ＩＭ　ＳＣＶ１スパイク又はＩＮ　ＳＣＶ１スパイクを用いて後にブーストされたマウスと比較してＶＳＶ偽型ＳＣＶ２に対して有意に高い血清中和力価（ＩＣ５０）を有していた。結合抗体力価と一致して、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、さらにＳＣＶ１スパイクを用いてＩＮブーストされたたマウスでは、ＶＳＶ偽型ＳＣＶ１及びＳＣＶ２の両方に対して高い血清中和力

価（ＩＣ５０）が生じた。
【図３０Ｄ】図３０Ａ～３０Ｄは、一部の実施形態によれば、ＳＣＶ１スパイクタンパク質を用いてＩＭプライミングされ、ＩＮブーストされたマウスが、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ　ＳＣＶ１スパイク、ＩＮ　ＳＣＶ２スパイク又はＩＭ　ＳＣＶ２スパイクを用いて、ＩＭプライミングされ、後にブーストされたマウスと比較して、ＢＡＬＦ（図３０Ａ～３０Ｂ）及び血清（図３０Ｃ～３０Ｄ）の両方において抗ＳＣＶ１　ＩｇＡ（図３０Ａ及び３０Ｃ）及びＩｇＧ（図３０Ｂ及び３０Ｄ）の有意に高い力価を有していたことを実証する。ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、ＳＣＶ１スパイクを用いてさらにＩＮブーストされたマウスが、ＩＭプライミングされ、ＩＮ　ＳＣＶ１スパイクブーストされたマウスと比較して、粘膜及び循環抗ＳＣＶ１　ＩｇＡ及びＩｇＧのさらなる増大を有していた。図３０Ｅ～３０Ｈは、一部の実施形態によれば、ＩＭプライミングされ、ＳＣＶ１又はＳＣＶ２スパイクタンパク質を用いてＩＮブーストされたマウスが、ＩＭプライミングされ、後にＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ　ＳＣＶ１スパイク又はＩＭ　ＳＣＶ２スパイクを用いてブーストされたマウスと比較して、ＢＡＬＦ（図３０Ｅ～３０Ｆ）において抗ＳＣＶ２　ＩｇＡの有意に高い力価を有していた（図３０Ｅ及び３０Ｇ）ことを実証する。ＩＭプライミングされ、ＩＮ　ＳＣＶ２ブーストされたマウスでは、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされたマウスと比較して、同等レベルのＢＡＬＦ抗ＳＣＶ２　ＩｇＧ、血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＡ及び血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＧが生じた。ＩＭ「プライミングされ」ＩＮ　ＳＣＶ１「スパイクされた」マウスではまた、頑強なレベルのＢＡＬＦ　抗ＳＣＶ２　ＩｇＧ、血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＡ及び血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＧが生じた。抗ＳＣＶ１抗体応答と同様に、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、ＳＣＶ１スパイクを用いてさらにＩＮブーストされたマウスでは、すべての他の群と比較して最高レベルの粘膜及び循環抗ＳＣＶ２　ＩｇＡ及びＩｇＧを生じた。図３０Ｉは、一部の実施形態によれば、ＩＮ　ＳＣＶ１又はＩＭ　ＳＣＶ１スパイクタンパク質を用いてＩＭプライミングされ、後にブーストされたマウスは、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ　ＳＣＶ２スパイク又はＩＮ　ＳＣＶ２スパイクを用いて、ＩＭプライミングされ、後にブーストされたマウスと比較して、水泡性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）偽型ＳＣＶ１に対して有意に高い血清中和力価（ＩＣ５０）を有していたことを実証する。図２２で示されるように、ＩＭプライミングされ、後にＩＮ　ＳＣＶ２スパイク又はＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてブーストされたマウスは、ＩＭプライミングされ、ＩＭ　ＳＣＶ２スパイク、ＩＭ　ＳＣＶ１スパイク又はＩＮ　ＳＣＶ１スパイクを用いて後にブーストされたマウスと比較してＶＳＶ偽型ＳＣＶ２に対して有意に高い血清中和力価（ＩＣ５０）を有していた。結合抗体力価と一致して、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、さらにＳＣＶ１スパイクを用いてＩＮブーストされたたマウスでは、ＶＳＶ偽型ＳＣＶ１及びＳＣＶ２の両方に対して高い血清中和力価（ＩＣ５０）が生じた。
【図３０Ｅ】図３０Ａ～３０Ｄは、一部の実施形態によれば、ＳＣＶ１スパイクタンパク質を用いてＩＭプライミングされ、ＩＮブーストされたマウスが、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ　ＳＣＶ１スパイク、ＩＮ　ＳＣＶ２スパイク又はＩＭ　ＳＣＶ２スパイクを用いて、ＩＭプライミングされ、後にブーストされたマウスと比較して、ＢＡＬＦ（図３０Ａ～３０Ｂ）及び血清（図３０Ｃ～３０Ｄ）の両方において抗ＳＣＶ１　ＩｇＡ（図３０Ａ及び３０Ｃ）及びＩｇＧ（図３０Ｂ及び３０Ｄ）の有意に高い力価を有していたことを実証する。ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、ＳＣＶ１スパイクを用いてさらにＩＮブーストされたマウスが、ＩＭプライミングされ、ＩＮ　ＳＣＶ１スパイクブーストされたマウスと比較して、粘膜及び循環抗ＳＣＶ１　ＩｇＡ及びＩｇＧのさらなる増大を有していた。図３０Ｅ～３０Ｈは、一部の実施形態によれば、ＩＭプライミングされ、ＳＣＶ１又はＳＣＶ２スパイクタンパク質を用いてＩＮブーストされたマウスが、ＩＭプライミングされ、後にＩＭ

ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ　ＳＣＶ１スパイク又はＩＭ　ＳＣＶ２スパイクを用いてブーストされたマウスと比較して、ＢＡＬＦ（図３０Ｅ～３０Ｆ）において抗ＳＣＶ２　ＩｇＡの有意に高い力価を有していた（図３０Ｅ及び３０Ｇ）ことを実証する。ＩＭプライミングされ、ＩＮ　ＳＣＶ２ブーストされたマウスでは、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされたマウスと比較して、同等レベルのＢＡＬＦ抗ＳＣＶ２　ＩｇＧ、血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＡ及び血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＧが生じた。ＩＭ「プライミングされ」ＩＮ　ＳＣＶ１「スパイクされた」マウスではまた、頑強なレベルのＢＡＬＦ　抗ＳＣＶ２　ＩｇＧ、血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＡ及び血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＧが生じた。抗ＳＣＶ１抗体応答と同様に、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、ＳＣＶ１スパイクを用いてさらにＩＮブーストされたマウスでは、すべての他の群と比較して最高レベルの粘膜及び循環抗ＳＣＶ２　ＩｇＡ及びＩｇＧを生じた。図３０Ｉは、一部の実施形態によれば、ＩＮ　ＳＣＶ１又はＩＭ　ＳＣＶ１スパイクタンパク質を用いてＩＭプライミングされ、後にブーストされたマウスは、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ　ＳＣＶ２スパイク又はＩＮ　ＳＣＶ２スパイクを用いて、ＩＭプライミングされ、後にブーストされたマウスと比較して、水泡性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）偽型ＳＣＶ１に対して有意に高い血清中和力価（ＩＣ５０）を有していたことを実証する。図２２で示されるように、ＩＭプライミングされ、後にＩＮ　ＳＣＶ２スパイク又はＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてブーストされたマウスは、ＩＭプライミングされ、ＩＭ　ＳＣＶ２スパイク、ＩＭ　ＳＣＶ１スパイク又はＩＮ　ＳＣＶ１スパイクを用いて後にブーストされたマウスと比較してＶＳＶ偽型ＳＣＶ２に対して有意に高い血清中和力価（ＩＣ５０）を有していた。結合抗体力価と一致して、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、さらにＳＣＶ１スパイクを用いてＩＮブーストされたたマウスでは、ＶＳＶ偽型ＳＣＶ１及びＳＣＶ２の両方に対して高い血清中和力価（ＩＣ５０）が生じた。

【図３０Ｆ】図３０Ａ～３０Ｄは、一部の実施形態によれば、ＳＣＶ１スパイクタンパク質を用いてＩＭプライミングされ、ＩＮブーストされたマウスが、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ　ＳＣＶ１スパイク、ＩＮ　ＳＣＶ２スパイク又はＩＭ　ＳＣＶ２スパイクを用いて、ＩＭプライミングされ、後にブーストされたマウスと比較して、ＢＡＬＦ（図３０Ａ～３０Ｂ）及び血清（図３０Ｃ～３０Ｄ）の両方において抗ＳＣＶ１　ＩｇＡ（図３０Ａ及び３０Ｃ）及びＩｇＧ（図３０Ｂ及び３０Ｄ）の有意に高い力価を有していたことを実証する。ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、ＳＣＶ１スパイクを用いてさらにＩＮブーストされたマウスが、ＩＭプライミングされ、ＩＮ　ＳＣＶ１スパイクブーストされたマウスと比較して、粘膜及び循環抗ＳＣＶ１　ＩｇＡ及びＩｇＧのさらなる増大を有していた。図３０Ｅ～３０Ｈは、一部の実施形態によれば、ＩＭプライミングされ、ＳＣＶ１又はＳＣＶ２スパイクタンパク質を用いてＩＮブーストされたマウスが、ＩＭプライミングされ、後にＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ　ＳＣＶ１スパイク又はＩＭ　ＳＣＶ２スパイクを用いてブーストされたマウスと比較して、ＢＡＬＦ（図３０Ｅ～３０Ｆ）において抗ＳＣＶ２　ＩｇＡの有意に高い力価を有していた（図３０Ｅ及び３０Ｇ）ことを実証する。ＩＭプライミングされ、ＩＮ　ＳＣＶ２ブーストされたマウスでは、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされたマウスと比較して、同等レベルのＢＡＬＦ抗ＳＣＶ２　ＩｇＧ、血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＡ及び血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＧが生じた。ＩＭ「プライミングされ」ＩＮ　ＳＣＶ１「スパイクされた」マウスではまた、頑強なレベルのＢＡＬＦ　抗ＳＣＶ２　ＩｇＧ、血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＡ及び血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＧが生じた。抗ＳＣＶ１抗体応答と同様に、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、ＳＣＶ１スパイクを用いてさらにＩＮブーストされたマウスでは、すべての他の群と比較して最高レベルの粘膜及び循環抗ＳＣＶ２　ＩｇＡ及びＩｇＧを生じた。図３０Ｉは、一部の実施形態によれば、ＩＮ　ＳＣＶ１又はＩＭ　ＳＣＶ１スパイクタンパク質を用いてＩＭプライミングされ

、後にブーストされたマウスは、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ　ＳＣＶ２スパイク又はＩＮ　ＳＣＶ２スパイクを用いて、ＩＭプライミングされ、後にブーストされたマウスと比較して、水泡性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）偽型ＳＣＶ１に対して有意に高い血清中和力価（ＩＣ５０）を有していたことを実証する。図２２で示されるように、ＩＭプライミングされ、後にＩＮ　ＳＣＶ２スパイク又はＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてブーストされたマウスは、ＩＭプライミングされ、ＩＭ　ＳＣＶ２スパイク、ＩＭ　ＳＣＶ１スパイク又はＩＮ　ＳＣＶ１スパイクを用いて後にブーストされたマウスと比較してＶＳＶ偽型ＳＣＶ２に対して有意に高い血清中和力価（ＩＣ５０）を有していた。結合抗体力価と一致して、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、さらにＳＣＶ１スパイクを用いてＩＮブーストされたたマウスでは、ＶＳＶ偽型ＳＣＶ１及びＳＣＶ２の両方に対して高い血清中和力価（ＩＣ５０）が生じた。

【図３０Ｇ】図３０Ａ～３０Ｄは、一部の実施形態によれば、ＳＣＶ１スパイクタンパク質を用いてＩＭプライミングされ、ＩＮブーストされたマウスが、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ　ＳＣＶ１スパイク、ＩＮ　ＳＣＶ２スパイク又はＩＭ　ＳＣＶ２スパイクを用いて、ＩＭプライミングされ、後にブーストされたマウスと比較して、ＢＡＬＦ（図３０Ａ～３０Ｂ）及び血清（図３０Ｃ～３０Ｄ）の両方において抗ＳＣＶ１　ＩｇＡ（図３０Ａ及び３０Ｃ）及びＩｇＧ（図３０Ｂ及び３０Ｄ）の有意に高い力価を有していたことを実証する。ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、ＳＣＶ１スパイクを用いてさらにＩＮブーストされたマウスが、ＩＭプライミングされ、ＩＮ　ＳＣＶ１スパイクブーストされたマウスと比較して、粘膜及び循環抗ＳＣＶ１　ＩｇＡ及びＩｇＧのさらなる増大を有していた。図３０Ｅ～３０Ｈは、一部の実施形態によれば、ＩＭプライミングされ、ＳＣＶ１又はＳＣＶ２スパイクタンパク質を用いてＩＮブーストされたマウスが、ＩＭプライミングされ、後にＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ　ＳＣＶ１スパイク又はＩＭ　ＳＣＶ２スパイクを用いてブーストされたマウスと比較して、ＢＡＬＦ（図３０Ｅ～３０Ｆ）において抗ＳＣＶ２　ＩｇＡの有意に高い力価を有していた（図３０Ｅ及び３０Ｇ）ことを実証する。ＩＭプライミングされ、ＩＮ　ＳＣＶ２ブーストされたマウスでは、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされたマウスと比較して、同等レベルのＢＡＬＦ抗ＳＣＶ２　ＩｇＧ、血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＡ及び血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＧが生じた。ＩＭ「プライミングされ」ＩＮ　ＳＣＶ１「スパイクされた」マウスではまた、頑強なレベルのＢＡＬＦ　抗ＳＣＶ２　ＩｇＧ、血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＡ及び血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＧが生じた。抗ＳＣＶ１抗体応答と同様に、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、ＳＣＶ１スパイクを用いてさらにＩＮブーストされたマウスでは、すべての他の群と比較して最高レベルの粘膜及び循環抗ＳＣＶ２　ＩｇＡ及びＩｇＧを生じた。図３０Ｉは、一部の実施形態によれば、ＩＮ　ＳＣＶ１又はＩＭ　ＳＣＶ１スパイクタンパク質を用いてＩＭプライミングされ、後にブーストされたマウスは、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ　ＳＣＶ２スパイク又はＩＮ　ＳＣＶ２スパイクを用いて、ＩＭプライミングされ、後にブーストされたマウスと比較して、水泡性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）偽型ＳＣＶ１に対して有意に高い血清中和力価（ＩＣ５０）を有していたことを実証する。図２２で示されるように、ＩＭプライミングされ、後にＩＮ　ＳＣＶ２スパイク又はＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてブーストされたマウスは、ＩＭプライミングされ、ＩＭ　ＳＣＶ２スパイク、ＩＭ　ＳＣＶ１スパイク又はＩＮ　ＳＣＶ１スパイクを用いて後にブーストされたマウスと比較してＶＳＶ偽型ＳＣＶ２に対して有意に高い血清中和力価（ＩＣ５０）を有していた。結合抗体力価と一致して、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、さらにＳＣＶ１スパイクを用いてＩＮブーストされたたマウスでは、ＶＳＶ偽型ＳＣＶ１及びＳＣＶ２の両方に対して高い血清中和力価（ＩＣ５０）が生じた。

【図３０Ｈ】図３０Ａ～３０Ｄは、一部の実施形態によれば、ＳＣＶ１スパイクタンパク

質を用いてＩＭプライミングされ、ＩＮブーストされたマウスが、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ　ＳＣＶ１スパイク、ＩＮ　ＳＣＶ２スパイク又はＩＭ　ＳＣＶ２スパイクを用いて、ＩＭプライミングされ、後にブーストされたマウスと比較して、ＢＡＬＦ（図３０Ａ～３０Ｂ）及び血清（図３０Ｃ～３０Ｄ）の両方において抗ＳＣＶ１　ＩｇＡ（図３０Ａ及び３０Ｃ）及びＩｇＧ（図３０Ｂ及び３０Ｄ）の有意に高い力価を有していたことを実証する。ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、ＳＣＶ１スパイクを用いてさらにＩＮブーストされたマウスが、ＩＭプライミングされ、ＩＮ　ＳＣＶ１スパイクブーストされたマウスと比較して、粘膜及び循環抗ＳＣＶ１　ＩｇＡ及びＩｇＧのさらなる増大を有していた。図３０Ｅ～３０Ｈは、一部の実施形態によれば、ＩＭプライミングされ、ＳＣＶ１又はＳＣＶ２スパイクタンパク質を用いてＩＮブーストされたマウスが、ＩＭプライミングされ、後にＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ　ＳＣＶ１スパイク又はＩＭ　ＳＣＶ２スパイクを用いてブーストされたマウスと比較して、ＢＡＬＦ（図３０Ｅ～３０Ｆ）において抗ＳＣＶ２　ＩｇＡの有意に高い力価を有していた（図３０Ｅ及び３０Ｇ）ことを実証する。ＩＭプライミングされ、ＩＮ　ＳＣＶ２ブーストされたマウスでは、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされたマウスと比較して、同等レベルのＢＡＬＦ抗ＳＣＶ２　ＩｇＧ、血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＡ及び血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＧが生じた。ＩＭ「プライミングされ」ＩＮ　ＳＣＶ１「スパイクされた」マウスではまた、頑強なレベルのＢＡＬＦ　抗ＳＣＶ２　ＩｇＧ、血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＡ及び血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＧが生じた。抗ＳＣＶ１抗体応答と同様に、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、ＳＣＶ１スパイクを用いてさらにＩＮブーストされたマウスでは、すべての他の群と比較して最高レベルの粘膜及び循環抗ＳＣＶ２　ＩｇＡ及びＩｇＧを生じた。図３０Ｉは、一部の実施形態によれば、ＩＮ　ＳＣＶ１又はＩＭ　ＳＣＶ１スパイクタンパク質を用いてＩＭプライミングされ、後にブーストされたマウスは、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ　ＳＣＶ２スパイク又はＩＮ　ＳＣＶ２スパイクを用いて、ＩＭプライミングされ、後にブーストされたマウスと比較して、水泡性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）偽型ＳＣＶ１に対して有意に高い血清中和力価（ＩＣ５０）を有していたことを実証する。図２２で示されるように、ＩＭプライミングされ、後にＩＮ　ＳＣＶ２スパイク又はＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてブーストされたマウスは、ＩＭプライミングされ、ＩＭ　ＳＣＶ２スパイク、ＩＭ　ＳＣＶ１スパイク又はＩＮ　ＳＣＶ１スパイクを用いて後にブーストされたマウスと比較してＶＳＶ偽型ＳＣＶ２に対して有意に高い血清中和力価（ＩＣ５０）を有していた。結合抗体力価と一致して、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、さらにＳＣＶ１スパイクを用いてＩＮブーストされたたマウスでは、ＶＳＶ偽型ＳＣＶ１及びＳＣＶ２の両方に対して高い血清中和力価（ＩＣ５０）が生じた。

【図３０Ｉ】図３０Ａ～３０Ｄは、一部の実施形態によれば、ＳＣＶ１スパイクタンパク質を用いてＩＭプライミングされ、ＩＮブーストされたマウスが、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ　ＳＣＶ１スパイク、ＩＮ　ＳＣＶ２スパイク又はＩＭ　ＳＣＶ２スパイクを用いて、ＩＭプライミングされ、後にブーストされたマウスと比較して、ＢＡＬＦ（図３０Ａ～３０Ｂ）及び血清（図３０Ｃ～３０Ｄ）の両方において抗ＳＣＶ１　ＩｇＡ（図３０Ａ及び３０Ｃ）及びＩｇＧ（図３０Ｂ及び３０Ｄ）の有意に高い力価を有していたことを実証する。ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、ＳＣＶ１スパイクを用いてさらにＩＮブーストされたマウスが、ＩＭプライミングされ、ＩＮ　ＳＣＶ１スパイクブーストされたマウスと比較して、粘膜及び循環抗ＳＣＶ１　ＩｇＡ及びＩｇＧのさらなる増大を有していた。図３０Ｅ～３０Ｈは、一部の実施形態によれば、ＩＭプライミングされ、ＳＣＶ１又はＳＣＶ２スパイクタンパク質を用いてＩＮブーストされたマウスが、ＩＭプライミングされ、後にＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ　ＳＣＶ１スパイク又はＩＭ　ＳＣＶ２スパイクを用いてブーストされたマウスと比較して、ＢＡＬＦ（図３０Ｅ～３０Ｆ）において

抗ＳＣＶ２　ＩｇＡの有意に高い力価を有していた（図３０Ｅ及び３０Ｇ）ことを実証する。ＩＭプライミングされ、ＩＮ　ＳＣＶ２ブーストされたマウスでは、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされたマウスと比較して、同等レベルのＢＡＬＦ抗ＳＣＶ２　ＩｇＧ、血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＡ及び血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＧが生じた。ＩＭ「プライミングされ」ＩＮ　ＳＣＶ１「スパイクされた」マウスではまた、頑強なレベルのＢＡＬＦ　抗ＳＣＶ２　ＩｇＧ、血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＡ及び血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＧが生じた。抗ＳＣＶ１抗体応答と同様に、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、ＳＣＶ１スパイクを用いてさらにＩＮブーストされたマウスでは、すべての他の群と比較して最高レベルの粘膜及び循環抗ＳＣＶ２　ＩｇＡ及びＩｇＧを生じた。図３０Ｉは、一部の実施形態によれば、ＩＮ　ＳＣＶ１又はＩＭ　ＳＣＶ１スパイクタンパク質を用いてＩＭプライミングされ、後にブーストされたマウスは、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ　ＳＣＶ２スパイク又はＩＮ　ＳＣＶ２スパイクを用いて、ＩＭプライミングされ、後にブーストされたマウスと比較して、水泡性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）偽型ＳＣＶ１に対して有意に高い血清中和力価（ＩＣ５０）を有していたことを実証する。図２２で示されるように、ＩＭプライミングされ、後にＩＮ　ＳＣＶ２スパイク又はＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてブーストされたマウスは、ＩＭプライミングされ、ＩＭ　ＳＣＶ２スパイク、ＩＭ　ＳＣＶ１スパイク又はＩＮ　ＳＣＶ１スパイクを用いて後にブーストされたマウスと比較してＶＳＶ偽型ＳＣＶ２に対して有意に高い血清中和力価（ＩＣ５０）を有していた。結合抗体力価と一致して、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭプライミングされ、ブーストされ、さらにＳＣＶ１スパイクを用いてＩＮブーストされたたマウスでは、ＶＳＶ偽型ＳＣＶ１及びＳＣＶ２の両方に対して高い血清中和力価（ＩＣ５０）が生じた。

【発明を実施するための形態】

【００２６】

Ｉ．定義

「約」とは、本明細書で使用される場合、測定可能な値、例えば、量、時間的持続期間などに言及する場合に、特定の値から±２０％又は±１０％、ある特定の実施形態では±５％、ある特定の実施形態では±１％、ある特定の実施形態では±０．１％の変動を、このような変動が開示された方法を実施するために適切であるので包含するものとする。

【００２７】

「生体適合性」という用語は、本明細書で使用される場合、宿主（例えば、動物又はヒト）に対してそれ自体毒性ではなく、宿主において毒性濃度で単量体又はオリゴマーサブユニット又は他の副生成物を生成する速度で分解しない（材料が分解する場合に）１つ以上の材料を指す。

【００２８】

「生分解性」という用語は、本明細書で使用される場合、材料が構成成分サブユニットに分解若しくは崩壊すること又は例えば、材料のより小さい（例えば、非ポリマー）サブユニットへの生化学的プロセスによる消化を意味する。

【００２９】

「構築物」という用語は、１つ以上の単離されたポリヌクレオチド配列を有する組換え遺伝子分子を指す。

【００３０】

「発現制御配列」という用語は、別の核酸配列の転写及び／又は翻訳を制御及び調節する核酸配列を指す。原核生物に適している制御配列は、例えば、プロモーター、任意選択的に、オペレーター配列、リボソーム結合部位などを含む。真核細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを利用すると知られている。

【００３１】

疾患又は障害の症状の重症度、患者がこのような症状を経験する頻度又は両方が低減される場合に、疾患又は障害は「軽減」される。

【００３２】
「遺伝子」という用語は、その鋳型又はメッセンジャーＲＮＡを介して、特定のペプチド、ポリペプチド又はタンパク質を特徴とするアミノ酸の配列をコードするＤＮＡ配列を指す。「遺伝子」という用語はまた、ＲＮＡ産物をコードするＤＮＡ配列を指す。遺伝子という用語は、ゲノムＤＮＡに関して本明細書で使用される場合、介在領域、非コード領域並びに調節領域を含み、５’及び３’末端を含む場合がある。
【００３３】
「オープンリーディングフレーム」又は「ＯＲＦ」という用語は、ポリペプチド又はタンパク質をコードする可能性がある塩基の配列を含有する一連のヌクレオチドである。オープンリーディングフレームは、開始コード配列（開始コドン（ｉｎｉｔｉａｔｉｏｎ　ｃｏｄｏｎ）又は開始コドン（ｓｔａｒｔ　ｃｏｄｏｎ））と停止コドン配列（終結コドン）の間に位置する。
【００３４】
「非経口投与」及び「非経口的に投与される」という語句は、技術分野で認識された用語であり、経腸及び局所投与以外の、通常、注射による投与様式を含み、静脈内、筋肉内、胸膜内、血管内、皮内、腹腔内、経気管及び皮下注射及び注入を含み得る。
【００３５】
「粒子」という用語は、微粒子（ミクロスフェア及びマイクロカプセルを含む）（寸法直径平均１ミクロン～約１０００ミクロン未満）及びナノ粒子（ナノスフェア及びナノカプセル）（直径１ミクロン未満）を含む。粒子は、球状である場合も、非球状である場合もあり、規則的な形状若しくは不規則的な形状を有する場合がある。ある特定の実施形態では、ナノ粒子の集団は、約５００ｎｍ、２００ｎｍ、１００ｎｍ、５０ｎｍ又は１０ｎｍの平均直径を有する。一部の実施形態では、粒子の平均直径は、約２００ｎｍ～約６００ｎｍ、好ましくは、約２００～約５００ｎｍである。「直径」という用語は、本明細書において、物理的直径又は流体力学直径のいずれかを指すために使用される。本質的に球状の粒子の直径は、物理的又は流体力学直径を指す場合がある。非球状粒子の直径は、優先的に流体力学直径を指す場合がある。非球状粒子の直径は、粒子の表面上の２点間の最大直線距離を指す場合がある。複数の粒子を指す場合には、粒子の直径は通常、粒子の平均直径を指す。粒子直径は、それだけには限らないが、動的光散乱を含む当技術分野におけるさまざまな技術を使用して測定され得る。
【００３６】
「薬学的に許容される」という語句は、健全な医学的判断の範囲内で、合理的なリスク・ベネフィット比に見合う、過度の毒性、刺激作用、アレルギー反応又は他の問題又は合併症を伴わずにヒト及び動物の組織、臓器及び／又は体液と接触させて使用するのに適している化合物、材料、組成物及び／又は投与形を指す。
【００３７】
「ポリ（Ａ）」とは、ｍＲＮＡにポリアデニル化によって結合されている一連のアデノシンを指す。一過性発現のための構築物の好ましい実施形態では、ポリＡは、５０～５０００の間、好ましくは、６４より多い、より好ましくは、１００より多い、最も好ましくは、３００又は４００より多い。ポリ（Ａ）配列は、ｍＲＮＡ機能性、例えば、局在性、安定性又は翻訳の効率をモジュレートするために化学的に又は酵素的に改変され得る。
【００３８】
本明細書で使用される場合、「プライミングする」という用語は、ワクチンを非経口的に投与して、対象におけるウイルス感染に対する全身性Ｔ及び／又はＢ細胞応答を誘発することによって、対象を免疫化することを指す。本明細書で使用される場合、「ブーストする」という用語は、「プライミング」後に同一対象に同一又は関連ウイルス感染に対するワクチンを非経口的に投与することを指す。
【００３９】
ポリペプチドという用語は、タンパク質及びその断片を含む。ポリペプチドは、それらが「異種」である、すなわち、細菌細胞によって産生されるヒトポリペプチドなどの、利

用されている宿主細胞にとって外来であることを意味する「外因性」である場合がある。ポリペプチドは、アミノ酸として含有している。アミノ酸配列は、アミノからカルボキシ末端の方向で左から右に書かれており、三文字又は一文字コードのいずれかによって以下に示されるように命名されている：アラニン（Ａｌａ、Ａ）、アルギニン（Ａｒｇ、Ｒ）、アスパラギン（Ａｓｎ、Ｎ）、アスパラギン酸（Ａｓｐ、Ｄ）、システイン（Ｃｙｓ、Ｃ）、グルタミン（Ｇｌｎ、Ｑ）、グルタミン酸（Ｇｌｕ、Ｅ）、グリシン（Ｇｌｙ、Ｇ）、ヒスチジン（Ｈｉｓ、Ｈ）、イソロイシン（Ｉｌｅ、Ｉ）、ロイシン（Ｌｅｕ、Ｌ）、リシン（Ｌｙｓ、Ｋ）、メチオニン（Ｍｅｔ、Ｍ）、フェニルアラニン（Ｐｈｅ、Ｆ）、プロリン（Ｐｒｏ、Ｐ）、セリン（Ｓｅｒ、Ｓ）、トレオニン（Ｔｈｒ、Ｔ）、トリプトファン（Ｔｒｐ、Ｗ）、チロシン（Ｔｙｒ、Ｙ）及びバリン（Ｖａｌ、Ｖ）。

【００４０】

本明細書で使用される場合、「スパイクする」という用語は、対象にウイルス抗原、例えば、ウイルスタンパク質又はウイルスタンパク質をコードするポリヌクレオチドを鼻腔内に投与することを指す。「スパイクする」ステップは、「プライミング」ステップ後に起こることが多いが、必ずしもそうである必要はない。ウイルスタンパク質は、Ｔ細胞及び／又はＢ細胞の免疫原性標的である任意のウイルスタンパク質であり得るが、ウイルスの表面上に露出されたタンパク質、例えば、エンベロープウイルスのスパイクタンパク質、例えば、コロナウイルスのスパイクタンパク質であることもある。

【００４１】

「界面活性剤」という用語は、本明細書で使用される場合、液体の表面張力を低下させる薬剤を指す。

【００４２】

「徐放」という語句は、物質の大部分が一度に生物学的に利用可能になるボーラス型投与と対照的に、長期間にわたる物質の放出を指す。

【００４３】

「プロモーター部位」とは、ＲＮＡポリメラーゼ、例えば、Ｄａｖａｎｌｏｏら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８１：２０３５～３９頁（１９８４年）によって記載されるバクテリオファージから、又は別の供給源から元々単離されたＤＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼが、Ｃｈａｍｂｅｒｌｉｎら、Ｎａｔｕｒｅ、２２８：２２７～２３１頁（１９７０年）によって記載されるように高い特異性で結合するヌクレオチドの配列を指す。

【００４４】

「一過性の」という用語は、数時間、数日又は数週間の期間の、組み込まれていない導入遺伝子の発現を指し、発現の期間は、宿主細胞においてゲノムに組み込まれた場合又は安定なプラスミドレプリコン内に含有された場合の遺伝子の発現の期間よりも少ない。

【００４５】

「バリアント」とは、参照ポリペプチド又はポリヌクレオチドとは異なるが、本質的な特性を保持するポリペプチド又はポリヌクレオチドを指す。ポリペプチドの通常のバリアントは、別の参照ポリペプチドとはアミノ酸配列が異なる。一般に、相違は、参照ポリペプチド及びバリアントの配列が全体に密接に同様であり、多くの領域において同一であるように限定される。バリアント及び参照ポリペプチドは、１つ以上の改変（例えば、置換、付加及び／又は欠失）によってアミノ酸配列が異なっている場合がある。置換又は挿入されたアミノ酸残基は、遺伝暗号によってコードされるものである場合も、そうではない場合もある。ポリペプチドのバリアントは、対立遺伝子バリアントなど、天然に存在する場合があり、又は天然に存在すると知られていないバリアントである場合がある。

【００４６】

ポリペプチドの構造において、ポリペプチドの特徴を有意に変更しない改変及び変更（例えば、保存的アミノ酸置換）が行われ得る。例えば、ある特定のアミノ酸は、明らかな活性の喪失を伴わずに配列中の他のアミノ酸と置換され得る。ポリペプチドの生物学的機能活性を規定するのは、ポリペプチドの相互作用的能力及び性質であるので、ポリペプチ

ド配列中である特定のアミノ酸配列置換が行われ、それにもかかわらず、同様の特性を有するポリペプチドを得ることができる。このような変更を行う際、アミノ酸の疎水性親水性指標指数が考慮され得る。相互作用的生物学的機能をポリペプチドに付与することにおける疎水性親水性指標アミノ酸指数の重要性は、当技術分野で一般に理解されている。ある特定のアミノ酸は、同様の疎水性親水性指標指数又はスコアを有する他のアミノ酸と置換され、依然として、同様の生物活性を有するポリペプチドをもたらすことができると知られている。同様のアミノ酸の置換はまた、特に、それによって作出される生物学的機能的に同等のポリペプチド又はペプチドが免疫学的実施形態における使用のために意図される場合には、親水性に基づいて行われ得る。アミノ酸置換は、一般に、アミノ酸側鎖置換基、例えば、その疎水性、親水性、電荷及びサイズの相対的類似性に基づいている。

【００４７】

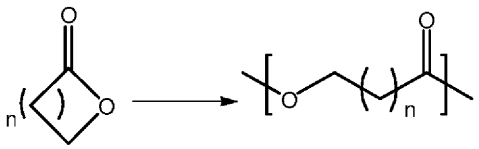
「配列同一性パーセント（％）」という用語は、配列をアラインして、必要に応じて、最大配列同一性パーセントを達成するためにギャップを導入した後に、参照核酸配列中のヌクレオチド又はアミノ酸と同一である候補配列中のヌクレオチド又はアミノ酸のパーセンテージとして規定される。配列同一性パーセントを決定することを目的としたアラインメントは、当技術分野の技術の範囲内である種々の方法で、例えば、公的に入手可能なコンピュータソフトウェア、例えば、ＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮ、ＡＬＩＧＮ－２又はＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェアを使用して達成され得る。比較されている配列の全長にわたって最大アラインメントを達成するために必要とされる任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータは、公知の方法によって決定され得る。

【００４８】

「ラクトン」及び「ラクトンユニット」という用語は、環状エステルを含む化学物質、又は環状エステル中のエステル結合の切断に起因する鎖式化学構造を説明するために使用される。例えば、ラクトンは、以下に示される環状エステル及び対応するラクトン由来鎖式構造：

【００４９】

【化２１】



［ｎは整数である］

を説明するために使用される。鎖式構造は、それだけには限らないが、可溶媒分解、例えば、加水分解及び酵素的切断を含む当技術分野で公知の方法によって形成される。

【００５０】

「アルキル」という用語は、直鎖アルキル基、分岐鎖アルキル基、シクロアルキル（脂環式）基、アルキル置換シクロアルキル基及びシクロアルキル置換アルキル基を含む飽和脂肪族基の基を指す。

【００５１】

好ましい実施形態では、直鎖又は分枝鎖アルキルは、その骨格中に３０個以下の炭素原子（例えば、直鎖についてＣ$_1$～Ｃ$_{30}$、分枝鎖についてＣ$_3$～Ｃ$_{30}$）、好ましくは、２０個以下、より好ましくは、１５個以下、最も好ましくは、１０個以下を有する。直鎖又は分枝鎖アルキルについて、１～３０個の間の骨格炭素原子の数のすべての整数値が企図され、開示される。同様に、好ましいシクロアルキルは、その環構造中に３～１０個の炭素原子を有する、より好ましくは、環構造中に５、６又は７個の炭素を有する。シクロアルキルについて、３～１０個の間の環炭素原子の数のすべての整数値が、企図され、開示される。

【００５２】

「アルキル」（又は「低級アルキル」）という用語は、本明細書、実施例及び特許請求の範囲を通じて使用される場合、「非置換アルキル」及び「置換アルキル」の両方を含むように意図され、その後者は、炭化水素骨格の１個以上の炭素上の水素と置き換わる１つ以上の置換基を有するアルキル部分を指す。このような置換基として、それだけには限らないが、ハロゲン、ヒドロキシル、カルボニル（例えば、カルボキシル、アルコキシカルボニル、ホルミル又はアシル）、チオカルボニル（例えば、チオエステル、チオアセテート又はチオホルメート）、アルコキシル、ホスホリル、ホスフェート、ホスホネート、ホスフィネート、アミノ、アミド、アミジン、イミン、シアノ、ニトロ、アジド、スルフヒドリル、アルキルチオ、スルフェート、スルホネート、スルファモイル、スルホンアミド、スルホニル、ヘテロシクリル、アラルキル又は芳香族若しくは複素芳香族部分が挙げられる。

【００５３】

炭素数がそれ以外に指定されない限り、「低級アルキル」とは、本明細書で使用される場合、上記で定義されるとおりであるが、骨格構造中に１～１０個の炭素、より好ましくは、１～６個の炭素原子を有するアルキル基を意味する。同様に、「低級アルケニル」及び「低級アルキニル」は、同様の鎖長を有する。本出願を通じて、好ましいアルキル基は、低級アルキルである。好ましい実施形態では、アルキルと本明細書で称される置換基は、低級アルキルである。

【００５４】

炭化水素鎖上の置換される部分は、適切な場合にはそれ自体置換される場合があるということは当業者によって理解される。例えば、置換されたアルキルの置換基は、ハロゲン、ヒドロキシ、ニトロ、チオール、アミノ、アジド、イミノ、アミド、ホスホリル（ホスホネート及びホスフィネートを含む）、スルホニル（スルフェート、スルホンアミド、スルファモイル及びスルホネートを含む）及びシリル基並びにエーテル、アルキルチオ、カルボニル（ケトン、アルデヒド、カルボキシレート及びエステルを含む）、－ＣＦ$_3$、－ＣＮなどを含み得る。シクロアルキルは、同様の方法で置換され得る。

【００５５】

「アリール」とは、Ｃ$_5$～Ｃ$_{10}$員の芳香族、複素環式、縮合芳香族、縮合複素環式、二芳香族（ｂｉａｒｏｍａｔｉｃ）又は二複素環式（ｂｉｈｅｔｅｒｅｏｃｙｃｌｉｃ）環系を指す。一部の形態では、環系は、３～５０個の炭素原子を有する。広義に定義される「アリール」は、本明細書で使用される場合、０～４個のヘテロ原子を含み得る、５、６、７、８、９、１０及び２４員の単環芳香族基、例えば、ベンゼン、ナフタレン、アントラセン、フェナントレン、クリセン、ピレン、コランニュレン、コロネン、ピロール、フラン、チオフェン、イミダゾール、オキサゾール、チアゾール、トリアゾール、ピラゾール、ピリジン、ピラジン、ピリダジン及びピリミジンなどを含む。環構造中にヘテロ原子を有するそれらのアリール基はまた、「アリール複素環」又は「ヘテロ芳香族化合物」と呼ばれる場合もある。芳香環は、１つ以上の環位置で、それだけには限らないが、ハロゲン、アジド、アルキル、アラルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヒドロキシル、アルコキシル、アミノ（又は四級化アミノ）、ニトロ、スルフヒドリル、イミノ、アミド、ホスホネート、ホスフィネート、カルボニル、カルボキシル、シリル、エーテル、アルキルチオ、スルホニル、スルホンアミド、ケトン、アルデヒド、エステル、ヘテロシクリル、芳香族又は複素芳香族部分、－ＣＦ$_3$、－ＣＮ及びそれらの組合せを含む、１つ以上の置換基で置換され得る。

【００５６】

「アリール」という用語はまた、２個以上の炭素が２つの隣接する環に共通する（すなわち、「縮合環」）２つ以上の環式環を有する多環式環系を含み、環のうち少なくとも１つは芳香族であり、例えば、他の環式環（単数又は複数）は、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール及び／又は複素環であり得る。複素環式環の例として、それだけには限らないが、ベンゾイミダゾリル、ベンゾフラニル、ベンゾチオフラニル、ベンゾチオフェニル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾオキサゾリニル、ベンゾチアゾ

リル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾテトラゾリル、ベンゾイソオキサゾリル、ベンゾイソチアゾリル、ベンゾイミダゾリニル、カルバゾリル、４ａＨカルバゾリル、カルボリニル、クロマニル、クロメニル、シンノリニル、デカヒドロキノリニル、２Ｈ，６Ｈ－１，５，２－ジチアジニル、ジヒドロフロ［２，３－ｂ］テトラヒドロフラン、フラニル、フラザニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリル、１Ｈ－インダゾリル、インドレニル、インドリニル、インドリジニル、インドリル、３Ｈ－インドリル、イサチノイル、イソベンゾフラニル、イソクロマニル、イソインダゾリル、イソインドリニル、イソインドリル、イソキノリニル、イソチアゾリル、イソオキサゾリル、メチレンジオキシフェニル、モルホリニル、ナフチリジニル、オクタヒドロイソキノリニル、オキサジアゾリル、１，２，３－オキサジアゾリル、１，２，４－オキサジアゾリル、１，２，５－オキサジアゾリル、１，３，４－オキサジアゾリル、オキサゾリジニル、オキサゾリル、オキシンドリル、ピリミジニル、フェナントレジニル、フェナントロリニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサチニル、フェノキサジニル、フタラジニル、ピペラジニル、ピペリジニル、ピペリドニル、４－ピペリドニル、ピペロニル、プテリジニル、プリニル、ピラニル、ピラジニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリル、ピリダジニル、ピリドオキサゾール、ピリドイミダゾール、ピリドチアゾール、ピリジニル、ピリジル、ピリミジニル、ピロリジニル、ピロリニル、２Ｈ－ピロリル、ピロリル、キナゾリニル、キノリニル、４Ｈ－キノリジニル、キノキサリニル、キヌクリジニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロイソキノリニル、テトラヒドロキノリニル、テトラゾリル、６Ｈ－１，２，５－チアジアジニル、１，２，３－チアジアゾリル、１，２，４－チアジアゾリル、１，２，５－チアジアゾリル、１，３，４－チアジアゾリル、チアントレニル、チアゾリル、チエニル、チエノチアゾリル、チエノオキサゾリル、チエノイミダゾリル、チオフェニル及びキサンテニルが挙げられる。環のうち１つ以上は、「アリール」について上記で定義されたように置換され得る。

【００５７】

「アルコキシ」とは、示された数の炭素原子が酸素橋を介して結合している上記で定義されたようなアルキル基を指す。アルコキシの例として、それだけには限らないが、メトキシ、エトキシ、ｎ－プロポキシ、ｉ－プロポキシ、ｎ－ブトキシ、ｓ－ブトキシ、ｎ－ペントキシ、ｓ－ペントキシ及びそれらの誘導体が挙げられる。

【００５８】

第一級アミンは、アンモニア中の３個の水素原子のうち１個が置換若しくは非置換アルキル又は置換若しくは非置換アリール基によって置き換えられる場合に生じる。第二級アミンは、１個の水素と一緒に窒素に結合している２つの有機置換基（置換若しくは非置換アルキル、置換若しくは非置換アリール又はそれらの組合せ）を有する。第三級アミンでは、窒素は、３つの有機置換基を有する。

【００５９】

「置換された」は、本明細書で使用される場合、モノマー上の１つ以上の原子又は原子の群が、置き換えられている原子又は原子の群とは異なっている１つ以上の原子又は原子の群と置き換えられていることを意味する。一部の実施形態では、モノマー上の１つ以上の水素が、１つ以上の原子又は原子の群と置き換えられている。水素と置き換わることができる官能基の例は、定義において上記で列挙されている。一部の実施形態では、得られるモノマー／ポリマーの化学的及び／又は物理的特性、例えば、電荷又は親水性／疎水性などを変える１つ以上の官能基が付加され得る。例示的置換基として、それだけには限らないが、ハロゲン、ヒドロキシル、カルボニル（例えば、カルボキシル、アルコキシカルボニル、ホルミル又はアシル）、チオカルボニル（例えば、チオエステル、チオアセテート又はチオホルメート）、アルコキシル、ホスホリル、ホスフェート、ホスホネート、ホスフィネート、アミノ、アミド、アミジン、イミン、シアノ、ニトロ、アジド、スルフヒドリル、アルキルチオ、スルフェート、スルホネート、スルファモイル、スルホンアミド、スルホニル、ニトロ、ヘテロシクリル、アラルキル又は芳香族若しくは複素芳香族部分が挙げられる。

【００６０】
「ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２」及び「重症急性呼吸器症候群コロナウイルス２」という用語は、２０１９年後半にアジアで出現した人畜共通感染症起源のベーターコロナウイルスに由来する亜属サルベコウイルスの病原体コロナウイルス株を指し、ヒトにおけるパンデミックコロナウイルス疾患２０１９（ＣＯＶＩＤ－１９）の原因病原体である。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスは、ゲノム内に高率の遺伝子突然変異を有し、複数のバリアントＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルス株の迅速な発生をもたらす。英国で同定されたＢ．１．１．７と呼ばれるバリアント、南アフリカにおいて同定されたＢ．１．３５１と呼ばれるバリアント及びブラジルにおいて同定されたＰ．１と呼ばれるバリアントを含む、ＣＯＶＩＤ－１９を引き起こすウイルスの複数のバリアントが、このパンデミックの間に世界中で実証されている。
【００６１】
「インフルエンザウイルス（ｉｎｆｌｕｅｎｚａ　ｖｉｒｕｓ）」、「インフルエンザ」及び「インフルエンザウイルス（ｆｌｕ　ｖｉｒｕｓ）」という用語は、同義的に使用され、インフルエンザウイルスＡ、インフルエンザウイルスＢ、インフルエンザウイルスＣ及びインフルエンザウイルスＤの群を指す。ヒトインフルエンザＡ及びＢウイルスは、米国ではほぼ毎冬ヒトにおいて疾患の季節的な流行（「インフルエンザの流行期」と呼ばれる）を引き起こす。インフルエンザ疾患の世界的な流行は、「インフルエンザ大流行」と呼ばれ、通常、ヒトに感染し、ヒトの間で効率的に伝播する能力を有する、新規の極めて異なるインフルエンザＡウイルスが出現する場合に生じる。インフルエンザＡウイルスは、関与するタンパク質に基づいて、血球凝集素サブタイプ又はノイラミニダーゼサブタイプのいずれかとして分類される。血球凝集素１８の別個のサブタイプ及びノイラミニダーゼの１１の別個のサブタイプが存在する。インフルエンザＡは、インフルエンザ流行の根本原因である。
【００６２】
「免疫性」、「免疫学的」又は「免疫」応答という用語は、免疫原に対して向けられる有益な体液性（抗体媒介性）及び／又は細胞性（抗原特異的Ｔ細胞又はその分泌産物によって媒介される）応答の発生を指す。このような応答は、免疫原の投与による能動的応答である場合も、抗体若しくはプライミングされたＴ細胞の投与によって誘導される受動的応答である場合もある。細胞性免疫応答は、クラスＩ又はクラスＩＩ　ＭＨＣ分子と関連してポリペプチドエピトープを提示することによって誘発されて、抗原特異的ＣＤ４$^{+}$ヘルパーＴ細胞及び／又はＣＤ８$^{+}$細胞傷害性Ｔ細胞を活性化する。応答はまた、単球、マクロファージ、ＮＫ細胞、好塩基球、樹状細胞、星状細胞、ミクログリア細胞、好酸球又は自然免疫の他の構成成分の活性化を伴う場合もある。細胞媒介性免疫学的応答の存在は、増殖アッセイ（ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞）又はＣＴＬ（細胞傷害性Ｔリンパ球）アッセイによって決定され得る。免疫原の防御的又は治療的効果に対する体液性及び細胞性応答の相対的寄与は、免疫化された同系動物から抗体及びＴ細胞を別々に単離すること及び第２の対象において防御的又は治療的効果を測定することによって区別され得る。
【００６３】
「Ｔ細胞抗原」という用語は、クラスＩ　ＭＨＣ、クラスＩＩ　ＭＨＣ、非古典的ＭＨＣ又はＣＤ１ファミリー分子（まとめて、抗原提示分子）のいずれかに結合でき、この組合せで、Ｔ細胞上のＴ細胞受容体に結合できるペプチドに処理され得るタンパク質又はその断片を指す。したがって、Ｔ細胞媒介性免疫応答は、抗原提示細胞の細胞表面上の抗原提示分子に結合しているＴ細胞抗原の認識の結果として生じる応答であり、Ｔ細胞上の共刺激分子とＡＰＣの間の他の相互作用と関連して生じる。この応答は、Ｔ細胞増殖、解剖学的移動並びにサイトカイン及び細胞を損傷し得る他の因子を含むエフェクター分子の生成を誘導するように働く。
【００６４】
疾患が発生することから又は感染に対して感受性になることから対象を「防御する」又は対象「の防御」という用語は、疾患、感染及び／又は症状から対象を部分的又は完全に

防御することを意味する。例えば、「完全に防御する」ことは、処置された対象が病原因子、例えば、呼吸器系病原体によって引き起こされる疾患又は感染を発生しないことを意味する。「部分的に防御する」ことは、本明細書で使用される場合、対象のある特定のサブセットが処置後に疾患若しくは感染の発生から完全に防御され得ること、又は対象が未処置対象と同じ重症度で疾患若しくは感染を発生しないことを意味する。

【００６５】

「阻害する」又は「低減する」という用語は、一般に、活性及び量を低減する又は減少させることを意味する。これは、活性若しくは量の完全な阻害又は低減である場合も、又は部分的な阻害若しくは低減である場合もある。阻害若しくは低減は、対照と、又は標準レベルと比較され得る。阻害は、５、１０、２５、５０、７５、８０、８５、９０、９５、９９又は１００％又はその間の整数であり得る。一部の実施形態では、阻害及び低減は、ｍＲＮＡ、タンパク質、細胞、組織及び／又は臓器レベルで比較される。

【００６６】

「防ぐ」、「防止」、「防ぐこと」という用語は、疾患若しくは障害の１つ以上の症状を発生する可能性を減少させるために、又は疾患若しくは障害の１つ以上の症状の重症度、持続期間若しくは発症の時間を低減するために、疾患若しくは障害によって引き起こされる１つ以上の症状のリスクにある、又はその素因を有する対象に組成物又は方法を投与することを意味する。

【００６７】

ＩＩ．免疫原性組成物

実施例では、ウイルスに対する既存の免疫を有する対象にウイルスタンパク質の鼻腔内投与（例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質の鼻腔内投与）に適した組成物を「スパイクすること」及び組成物を投与することによって、特に、対象の鼻腔及び肺柔組織並びに気道において頑強な免疫を有意に誘導できることが実証された。一部の実施形態では、ウイルスは、呼吸器感染を引き起こすものである。したがって、一部の態様では、本発明は、対象においてコロナウイルス感染に対する既存の免疫をブーストするための組成物を対象とする。

【００６８】

ポリ（アミン－コ－エステル）ポリマーの粒子（例えば、微粒子及び／又はナノ粒子）及び抗原をコードするポリヌクレオチドを含有する免疫原性組成物が開発された。

【００６９】

本発明の組成物及び／又は方法は、本発明内で企図される疾患又は障害を処置するのに有用な１つ以上の追加の化合物と組み合わせて、本発明の方法において有用であるように意図される。これらの追加の化合物は、本発明の化合物又は本発明内で企図される疾患若しくは障害の症状を処置、防止又は低減すると知られている化合物、例えば、市販の化合物を含み得る。

【００７０】

相乗作用は、例えば、Ｓｉｇｍｏｉｄ－E_{max}方程式（Ｈｏｌｆｏｒｄ　＆　Ｓｃｈｅｉｎｅｒ、１９９８１、Ｃｌｉｎ．Ｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅｔ．６：４２９～４５３頁）、Ｌｏｅｗｅ相加性の方程式（Ｌｏｅｗｅ　＆　Ｍｕｉｓｃｈｎｅｋ、１９２６、Ａｒｃｈ．Ｅｘｐ．Ｐａｔｈｏｌ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．１１４：３１３～３２６頁）及び半有効（ｍｅｄｉａｎ－ｅｆｆｅｃｔ）方程式（Ｃｈｏｕ　＆　Ｔａｌａｌａｙ、１９８４、Ａｄｖ．Ｅｎｚｙｍｅ　Ｒｅｇｕｌ．２２：２７～５５頁）などの適した方法を使用して例えば算出され得る。上記で言及された各方程式は、薬物組合せの効果の評価を補助するために実験データに適用され得る。上記で言及された方程式と関連する対応するグラフは、それぞれ、濃度－効果曲線、アイソボログラム曲線及び組合せ指数曲線である。

【００７１】

Ａ．ポリアルキレンオキシドで改変された、ポリ（アミン－コ－エステル）又はポリ（アミン－コ－アミド）を含有する粒子

一実施形態では、粒子は、ポリアルキレンオキシドで改変された、ポリ（アミン－コ－

エステル）又はポリ（アミン－コ－アミド）（ＰＡＣＥ）（ＰＡＣＥ－ＰＡＯ）を含有する。好ましくは、ポリアルキレンオキシドは、ポリ（エチレングリコール）（ＰＥＧ）である。ＰＡＣＥ－ＰＡＯポリマーは、任意選択的に末端基改変を含有する第２のＰＡＣＥポリマーと任意選択的にブレンドされる。

【００７２】

１．第２のＰＡＣＥポリマーとブレンドされていないＰＡＣＥ－ＰＡＯを含有する粒子

一部の形態では、粒子は、ナノ粒子の総重量に対するＰＡＣＥ－ＰＡＯポリマーの重量の点で表される、約０．１ｗｔ／ｗｔ％～約９５ｗｔ／ｗｔ％の間、約０．１ｗｔ／ｗｔ％～約５０ｗｔ／ｗｔ％の間、約０．１ｗｔ／ｗｔ％～約１０ｗｔ／ｗｔ％の間、約０．１ｗｔ／ｗｔ％～約５ｗｔ／ｗｔ％の間のＰＡＣＥ－ＰＡＯ、約１．０ｗｔ／ｗｔ％～約５ｗｔ／ｗｔ％の間のＰＡＣＥ－ＰＡＯ、例えば、ＰＡＣＥ－ＰＥＧを含有する。

【００７３】

ＰＡＣＥ－ＰＡＯポリマーは、一般式：

$((A)_x-(B)_y-(C)_q-(D)_w-(E)_f)_h$

式Ｉａ’

［式中、Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ及びＥは独立に、ラクトン、例えば、ペンタデカラクトン、多機能性分子、例えば、Ｎ－メチルジエタノールアミン、二酸又はジエステル、例えば、ジエチルセバケート又はポリアルキレンオキシド、例えば、ポリエチレングリコールに由来するモノマーユニットを含み、ＰＡＣＥ－ＰＡＯポリマーは、少なくともラクトン、多機能性分子、二酸又はジエステルモノマーユニット及びポリアルキレンオキシド、例えば、ポリエチレングリコールを含む］

を有する。一般に、多機能性分子は、１つ以上のカチオン、１つ以上の正イオン化できる原子又はそれらの組合せを含有する。１つ以上のカチオンは、塩基性窒素原子のプロトン化から、又は第四級窒素原子から形成される。

【００７４】

一般に、ＰＡＣＥ－ＰＡＯポリマーについて、ｘ、ｙ、ｑ、ｗ及びｆは独立に、０～１０００の整数であり、ただし、合計（ｘ＋ｙ＋ｑ＋ｗ＋ｆ）は、１より大きい。ｈは、１～１０００の整数である。

【００７５】

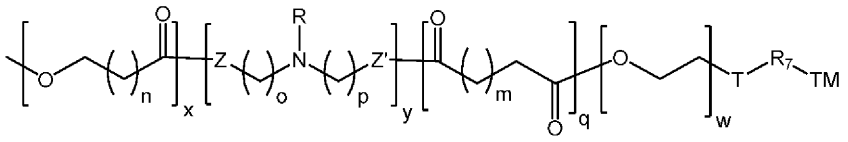
ＰＡＣＥ－ＰＡＯポリマーの一部の形態では、ラクトンユニットの組成パーセントは、（ラクトンユニット＋ジエステル／二酸）に対するラクトンユニットで算出される約１０％～約１００％の間である。モル比の点で表されると、（ラクトンユニット＋ジエステル／二酸）含量に対するラクトンユニットは、約０．１～約１の間である、すなわち、ｘ／（ｘ＋ｑ）は、約０．１～約１の間である。好ましくは、ＰＡＣＥ－ＰＡＯポリマーの一部の形態では、ラクトンユニットの組成パーセントは、（ラクトンユニット＋ジエステル／二酸）に対するラクトンユニットで算出される、約３０％～約１００％の間である。モル比の点で表されると、（ラクトンユニット＋ジエステル／二酸）含量に対するラクトンユニットは、約０．３～約１の間である、すなわち、ｘ／（ｘ＋ｑ）は、約０．３～約１の間である。好ましくは、ラクトンユニット中の炭素原子数は、約１０～約２４の間である、より好ましくは、ラクトンユニット中の炭素原子数は、約１２～約１６の間である。最も好ましくは、ラクトンユニット中の炭素原子数は、１２（ドデカラクトン）、１５（ペンタデカラクトン）又は１６（ヘキサデカラクトン）である。

【００７６】

ポリマーを含有するＰＡＣＥ－ＰＥＧの構造は、以下に示されている：

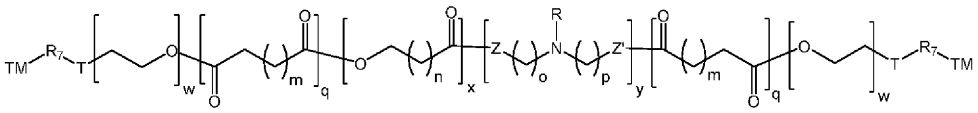
【００７７】

【化２２】



式Ｉ’

又は



式ＩＩ’

好ましくは、式Ｉ’、
［式中、ｎは１～３０の整数であり、ｍ、ｏ及びｐは独立に１～２０の整数であり、ｘ、ｙ及びｑは独立に１～１０００の整数であり、ｗは独立に０～１０００の整数であり、ただし式Ｉ’では、ｗは０より大きく、式ＩＩ’では、少なくとも１つのｗはゼロ（０）ではなく、
Ｚ及びＺ’は独立に、Ｏ又はＮＲ’であり、Ｒ及びＲ’は独立に水素、置換若しくは非置換アルキル又は置換若しくは非置換アリールであり、
Ｔは独立に、存在しない、酸素、硫黄、アルキル、置換アルキル、アミド、置換アミド、アミン、置換アミン、カルボニル、置換カルボニルであり、
R_7は独立に、水素、アルキル、置換アルキル、アミド、置換アミド、置換スルホン、非置換スルホン、アリール、置換アリール、シクロアルキル、置換シクロアルキル、マレイミド、アミン、置換アミン、チオール、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル、スクシンイミド、アジド、アクリレート、メタクリレート、アルキン、ヒドロキシド又はイソシアネート（ｉｓｏｃｙｎａｔｅ）であり、
ＴＭは独立に、存在しない又は標的化部分である］。

【００７８】
ＰＡＣＥ－ＰＥＧポリマーの一部の形態では、Ｚは、Ｚ’と同一である。

【００７９】
ＰＡＣＥ－ＰＥＧポリマーの一部の形態では、ＺはＯであり、Ｚ’はＯである。ＰＡＣＥ－ＰＥＧポリマーの一部の形態では、ＺはＮＲ’であり、Ｚ’はＮＲ’である。ＰＡＣＥ－ＰＥＧポリマーの一部の形態では、ＺはＯであり、Ｚ’はＮＲ’である。ＰＡＣＥ－ＰＥＧポリマーの一部の形態では、ＺはＮＲ’であり、Ｚ’はＯである。

【００８０】
ＰＡＣＥ－ＰＥＧポリマーの一部の形態では、Ｚ’はＯであり、ｎは１～２４の整数、例えば、４、１０、１３又は１４である。ＰＡＣＥ－ＰＥＧポリマーの一部の形態では、ＺもまたＯである。

【００８１】
ＰＡＣＥ－ＰＥＧポリマーの一部の形態では、Ｚ’はＯであり、ｎは１～２４の整数、例えば、４、１０、１３又は１４であり、ｍは１～１０の整数、例えば、４、５、６、７又は８である。ＰＡＣＥ－ＰＥＧポリマーの一部の形態では、ＺもまたＯである。

【００８２】
ＰＡＣＥ－ＰＥＧポリマーの一部の形態では、Ｚ’はＯであり、ｎは１～２４の整数、例えば、４、１０、１３又は１４であり、ｍは１～１０の整数、例えば、４、５、６、７又は８であり、ｏ及びｐは、２、３又は４のような１～６の同一の整数である。ＰＡＣＥ－ＰＥＧポリマーの一部の形態では、ＺもまたＯである。

【００８３】

ＰＡＣＥ－ＰＥＧポリマーの一部の形態では、Ｚ’はＯであり、ｎは１～２４の整数、例えば、４、１０、１３又は１４であり、ｍは１～１０の整数、例えば、４、５、６、７又は８であり、Ｒは、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、ｔ－ブチル、イソブチル、ｓｅｃ－ブチル、シクロヘキシル、（シクロヘキシル）メチル、シクロプロピルメチルのようなアルキル並びにその相同体及び異性体、例えば、ｎ－ペンチル、ｎ－ヘキシル、ｎ－ヘプチル及びｎ－オクチル又はアリール、例えば、フェニル、ナフタリル、アントラセニル、フェナントリル、クリセニル、ピレニル、トリル又はキシリルである。一部の形態では、ＺもまたＯである。

【００８４】

ＰＡＣＥ－ＰＥＧポリマーの一部の形態では、ｎは１４であり（例えば、ペンタデカラクトン、ＰＤＬ）、ｍは７であり（例えば、セバシン酸）、ｏ及びｐは、２である（例えば、Ｎ－メチルジエタノールアミン、ＭＤＥＡ）。

【００８５】

特定の実施形態では、ｘ、ｙ、ｑ及びｗの値は、ＰＡＣＥ－ＰＥＧポリマーの重量平均分子量が、５，０００ダルトン、例えば、５，０００ダルトン～５０ｋＤａの間、又は５，０００ダルトン～３０ｋＤａの間より大きいようなものである。この重量平均分子量は、任意の標的化部分の分子量を含まない。Ｒ及びＲ’基の例として、それだけには限らないが、水素、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、ｔ－ブチル、イソブチル、ｓｅｃ－ブチル、シクロヘキシル、（シクロヘキシル）メチル、シクロプロピルメチル及びその相同体及び異性体、例えば、ｎ－ペンチル、ｎ－ヘキシル、ｎ－ヘプチル、ｎ－オクチル、フェニル、ナフタリル、アントラセニル、フェナントリル、クリセニル、ピレニル、トリル、キシリルなどが挙げられる。

【００８６】

ポリアルキレンオキシドのブロックは、ポリマーの末端に（すなわち、ヒドロキシ基が遮断されているＰＥＧを、例えば、メトキシ基と反応させることによって）、ポリマー骨格内に（すなわち、両ヒドロキシル基がブロックされていない）に位置する、又はそれらの組合せの場合がある。

【００８７】

一部の形態では、粒子は、上記のような式Ｉ’及び／又は式ＩＩ’のＰＡＣＥ－ＰＥＧポリマーを含有し、少なくとも標的化部分（ＴＭ）が式Ｉ及び／又は式ＩＩ’中に存在する。好ましくは、共有結合コンジュゲーションは、Ｔ、R_7又はそれらの組合せを介して生じる。

【００８８】

標的化部分、例えば、タンパク質又はペプチドがある場合などの一部の形態では、コンジュゲーションは、タンパク質又はペプチド上の反応性基（例えば、チオール）と、ポリマー上のマレイミド基の間の容易な「クリック」反応によって進行して、標的化部分をポリマーのＰＥＧ末端に連結するスクシンイミド基を形成する。

【００８９】

２．第２のＰＡＣＥポリマーとブレンドされた、ＰＡＣＥ－ＰＡＯを含有する粒子

一部の形態では、粒子は、ＰＡＣＥ－ＰＡＯポリマー（第２のＰＡＣＥポリマーとブレンドされていない、ＰＡＣＥ－ＰＡＯを含有する粒子と題された節のもとで上述したとおり）及び第２のＰＡＣＥポリマーのブレンドを含有する。

【００９０】

ＰＡＣＥポリマー粒子は、それから形成された固体コア粒子を含めて公知である。例えば、米国特許第９，２７２，０４３号、同９，５６７，４３０号、同１０，６８２，４２２号、同１０，４６５，０４２号、同１１，１３６，５９７号、同１０，７６５，６３８号を参照されたい。

【００９１】

遺伝物質を送達するために使用される場合、ポリマーのトランスフェクション効率は、ポリマー上の末端基に強く左右される。ポリマー中のジエステルモノマーを二酸、例えば

、セバシン酸と置換する場合、ヒドロキシル及びカルボキシル末端基の混合物を有するポリマーが得られる。これらの２つ末端基の両方とも１，１’－カルボジイミダゾールを用いて活性化され得る。活性化された産物は、アミン含有分子と反応でき、新規末端基を有するポリマーが生じる。

【００９２】

ポリマーは、さらに加水分解されて、より活性な末端基、例えば、－ＯＨ及び－ＣＯＯＨを放出でき、その両方とも、通常、ポリマーを、例えば、制御温度（例えば、３７℃又は１００℃）で数日又は数週間インキュベートすることによって、ポリマー中のエステル結合を加水分解すること（本明細書において「作動」とも呼ばれる）に起因し得る。一部の実施形態では、ポリマーは、加水分解されておらず、したがって、「非作動型」と呼ばれる場合がある。

【００９３】

一部の実施形態では、ポリマー中の疎水性モノマーの含量は、粒子を形成するために使用される同一疎水性モノマーの含量に対して増大している。ポリマー中の疎水性モノマーの含量を増大すると、ＲＮＡを含む核酸の存在下で固体コアナノ粒子を形成できるポリマーが形成される。好ましい粒子は、ＰＡＣＥポリマー中に１０～２０％のＰＤＬを含有する。固体コア粒子は、好ましくは、６０％のＰＤＬを含有する。

【００９４】

これらの粒子は、動物への投与（例えば、注射）の際に緩衝水又は血清中で長期のインキュベーションの間安定している。それらはまた、核酸（例えば、ｓｉＲＮＡ）の徐放を提供し、これは長期の活性（例えば、ｓｉＲＮＡ媒介性ノックダウン）につながる。

【００９５】

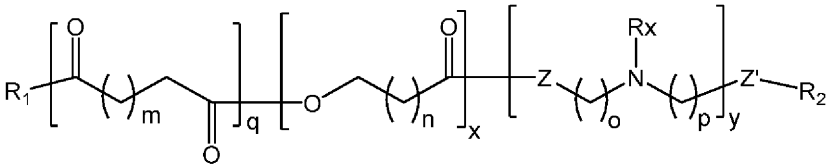
好ましくは、第２のＰＡＣＥポリマーは、ＰＥＧ改変を含有しない。第２のＰＡＣＥポリマーは、ＰＡＣＥ－ＰＡＯ（例えば、ＰＡＣＥ－ＰＥＧ）ポリマー中のＰＡＣＥポリマーセグメントと同一又は異なる場合があり、類似性又は相違は、ＰＡＣＥポリマー中の構成成分の重量平均分子量又はモル組成パーセントに基づいて評価され得る。第２のＰＡＣＥポリマーは、任意選択的に末端基改変を含有する。第２のＰＡＣＥポリマーが末端基改変を含有しない場合には、「第２のＰＡＣＥａｂ」と表される。少なくとも１つの末端基改変が存在する場合には、第２のＰＡＣＥポリマーは、「第２のＰＡＣＥｎｇ」と表される。

【００９６】

一部の形態では、第２のＰＡＣＥポリマーは、式Ｉ：

【００９７】

【化２３】



式Ｉ

［式中、ｎは、１～３０の整数であり、

ｍ、ｏ及びｐは独立に、１～２０の整数であり、

ｘ、ｙ及びｑは独立に、１～１０００の整数であり、

R_xは、水素、置換若しくは非置換アルキル又は置換若しくは非置換アリール又は置換若しくは非置換アルコキシであり、

Ｚ及びＺ’は独立に、Ｏ又はＮＲ’であり、Ｒ’は、水素、置換若しくは非置換アルキル又は置換若しくは非置換アリールであり、

R_1及びR_2は独立に、存在しない又はヒドロキシル基、第一級アミン基、第二級アミン基、第三級アミン基又はそれらの組合せを含有する化学実体である］

で示される構造を有する。

【００９８】

式Ｉの一部の形態では、R_1及びR_2は存在しない。式Ｉの一部の形態では、R_1及びR_2のうち少なくとも一方は存在する。R_1及びR_2が存在しない場合には、ＰＡＣＥポリマーは、「第２のＰＡＣＥａｂポリマー」と表される。R_1及びR_2の少なくとも一方が存在する場合には、ＰＡＣＥポリマーは、「第２のＰＡＣＥｎｇポリマー」と表される。

【００９９】

R_x及びＲ’基の例として、それだけには限らないが、水素、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、ｔ－ブチル、イソブチル、ｓｅｃ－ブチル、シクロヘキシル、（シクロヘキシル）メチル、シクロプロピルメチル並びにその相同体及び異性体、例えば、ｎ－ペンチル、ｎ－ヘキシル、ｎ－ヘプチル、ｎ－オクチル、フェニル、ナフタリル、アントラセニル、フェナントリル、クリセニル、ピレニル、トリル、キシリルなどが挙げられる。

【０１００】

特定の実施形態では、ｘ、ｙ及び／又はｑの値は、第２のＰＡＣＥポリマー（すなわち、第２のＰＡＣＥａｂポリマー又は第２のＰＡＣＥｎｇポリマー）の重量平均分子量が２０，０００ダルトンより大きい、１５，０００ダルトンより大きい、１０，０００ダルトンより大きい、５，０００ダルトンより大きい、２，０００ダルトンより大きいようなものである。一部の形態では、第２のＰＡＣＥポリマー（すなわち、第２のＰＡＣＥａｂポリマー又は第２のＰＡＣＥｎｇポリマー）の重量平均分子量は、約２，０００ダルトン～約２０，０００ダルトンの間、より好ましくは、約５，０００ダルトン～約１０，０００ダルトンの間である。

【０１０１】

第２のＰＡＣＥポリマー（すなわち、第２のＰＡＣＥａｂポリマー又は第２のＰＡＣＥｎｇポリマー）は、１つ以上のラクトン、１つ以上のアミン－ジオール（Ｚ及びＺ’＝Ｏ）、トリアミン（Ｚ及びＺ’＝ＮＲ’）又はヒドロキシ－ジアミン（Ｚ＝Ｏ及びＺ’＝ＮＲ’又はＺ＝ＮＲ’及びＺ’＝Ｏ）及び１つ以上の二酸若しくはジエステルから調製され得る。２つ以上の異なるラクトン、二酸又はジエステル及び／又はトリアミン、アミン－ジオール又はヒドロキシ－ジアミンモノマーが使用される実施形態では、ｎ、ｏ、ｐ及び／又はｍの値は、同一又は異なる場合がある。

【０１０２】

第２のＰＡＣＥポリマー（すなわち、第２のＰＡＣＥａｂポリマー又は第２のＰＡＣＥｎｇポリマー）の一部の形態では、ラクトンユニットの組成パーセントは、（ラクトンユニット＋ジエステル／二酸）に対するラクトンユニットで算出される約１０％～約１００％の間である。モル比の点で表されると、（ラクトンユニット＋ジエステル／二酸）含量に対するラクトンユニットは、約０．１～約１の間である、すなわち、ｘ／（ｘ＋ｑ）は、約０．１～約１の間である。第２のＰＡＣＥポリマー（すなわち、第２のＰＡＣＥａｂポリマー又は第２のＰＡＣＥｎｇポリマー）の一部の形態では、ラクトンユニットの組成パーセントは、（ラクトンユニット＋ジエステル／二酸）に対するラクトンユニットで算出される約３０％～約１００％の間である。モル比の点で表されると、（ラクトンユニット＋ジエステル／二酸）含量に対するラクトンユニットは、約０．３～約１の間である、すなわち、ｘ／（ｘ＋ｑ）は、約０．１～約１の間である。好ましくは、ラクトンユニット中の炭素原子数は、約１０～約２４の間である、より好ましくは、ラクトンユニット中の炭素原子数は、約１２～約１６の間である。最も好ましくは、ラクトンユニット中の炭素原子数は、１２（ドデカラクトン）、１５（ペンタデカラクトン）又は１６（ヘキサデカラクトン）である。

【０１０３】

第２のＰＡＣＥポリマー（すなわち、第２のＰＡＣＥａｂポリマー又は第２のＰＡＣＥｎｇポリマー）の一部の形態では、Ｚは、Ｚ’と同一である。

【０１０４】
第２のＰＡＣＥポリマー（すなわち、第２のＰＡＣＥａｂポリマーｏｒ第２のＰＡＣＥｎｇポリマー）の一部の形態では、ＺはＯであり、Ｚ’はＯである。第２のＰＡＣＥポリマー（すなわち第２のＰＡＣＥａｂポリマー又は第２のＰＡＣＥｎｇポリマー）の一部の形態では、ＺはＮＲ’であり、Ｚ’はＮＲ’である。第２のＰＡＣＥポリマー（すなわち、第２のＰＡＣＥａｂポリマー又は第２のＰＡＣＥｎｇポリマー）の一部の形態では、ＺはＯであり、Ｚ’はＮＲ’である。一部の形態では、ＺはＮＲ’であり、Ｚ’はＯである。
【０１０５】
第２のＰＡＣＥポリマー（すなわち、第２のＰＡＣＥａｂポリマー又は第２のＰＡＣＥｎｇポリマー）の一部の形態では、Ｚ’はＯであり、ｎは１～２４の整数、例えば、４、１０、１３又は１４である。第２のＰＡＣＥポリマー（すなわち、第２のＰＡＣＥａｂポリマー又は第２のＰＡＣＥｎｇポリマー）の一部の形態では、ＺもまたＯである。
【０１０６】
第２のＰＡＣＥポリマー（すなわち、第２のＰＡＣＥａｂポリマー又は第２のＰＡＣＥｎｇポリマー）の一部の形態では、Ｚ’はＯであり、ｎは、１～２４の整数、例えば、４、１０、１３又は１４であり、ｍは、１～１０の整数、例えば、４、５、６、７又は８である。第２のＰＡＣＥポリマー（すなわち、第２のＰＡＣＥａｂポリマー又は第２のＰＡＣＥｎｇポリマー）の一部の形態では、ＺもまたＯである。
【０１０７】
第２のＰＡＣＥポリマー（すなわち、第２のＰＡＣＥａｂポリマー又は第２のＰＡＣＥｎｇポリマー）の一部の形態では、Ｚ’はＯであり、ｎは、１～２４の整数、例えば、４、１０、１３又は１４であり、ｍは１～１０の整数、例えば、４、５、６、７又は８であり、ｏ及びｐは、２、３又は４のような１～６の同一の整数である。一部の形態では、ＺもまたＯである。
【０１０８】
第２のＰＡＣＥポリマー（すなわち、第２のＰＡＣＥａｂポリマー又は第２のＰＡＣＥｎｇポリマー）の一部の形態では、Ｚ’はＯであり、ｎは、１～２４の整数、例えば、４、１０、１３又は１４であり、ｍは１～１０の整数、例えば、４、５、６、７又は８であり、Ｒは、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、ｔ－ブチル、イソブチル、ｓｅｃ－ブチル、シクロヘキシル、（シクロヘキシル）メチル、シクロプロピルメチルのようなアルキル並びにその相同体及び異性体、例えば、ｎ－ペンチル、ｎ－ヘキシル、ｎ－ヘプチル及びｎ－オクチル又はアリール、例えば、フェニル、ナフタリル、アントラセニル、フェナントリル、クリセニル、ピレニル、トリル又はキシリルである。第２のＰＡＣＥポリマー（すなわち、第２のＰＡＣＥａｂポリマー又は第２のＰＡＣＥｎｇポリマー）の一部の形態では、ＺもまたＯである。
【０１０９】
第２のＰＡＣＥポリマー（すなわち、第２のＰＡＣＥａｂポリマー又は第２のＰＡＣＥｎｇポリマー）の一部の形態では、ｎは１４であり（例えば、ペンタデカラクトン、ＰＤＬ）、ｍは７であり（例えば、セバシン酸）、ｏ及びｐは、２である（例えば、Ｎ－メチルジエタノールアミン、ＭＤＥＡ）。
【０１１０】
一部の形態では、粒子は、R_1及び／又はR_2が
【０１１１】
【化２４】

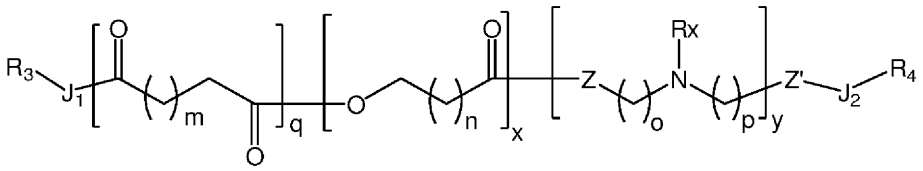


からなる又はそれを含む対応する粒子と比べて、R_1及び／又はR_2がそれでない第２のＰＡＣＥｎｇポリマーを含有する。

【０１１２】
一部の実施形態では、ポリマーから形成された粒子は、Ｒ１及び／又はＲ２が
【０１１３】
【化２５】



からなる又はそれを含む対応する粒子と比べて、核酸カーゴ、例えば、ＲＮＡ、より詳しくは、ｍＲＮＡの、負荷の改善、細胞トランスフェクションの改善、細胞内エンドソーム放出の改善又はそれらの組合せを示す。
【０１１４】
一部の形態では、第２のＰＡＣＥｎｇポリマーは、式ＩＩ
【０１１５】
【化２６】



式II

［式中、Ｊ１及びＪ２は独立に連結部分であり又は存在せず、
Ｒ３及びＲ４は独立に、ヒドロキシル基、第一級アミン基、第二級アミン基、第三級アミン基又はそれらの組合せを含有する置換アルキルである］
の構造を有する。一部の形態では、Ｒ３、Ｒ４又は両方の分子量は、５００ダルトン以下又は２００ダルトン以下又は１００ダルトン以下である。
【０１１６】
第２のＰＡＣＥｎｇポリマーの一部の形態では、Ｊ１は、－Ｏ－又は－ＮＨ－である。
【０１１７】
第２のＰＡＣＥｎｇポリマーの一部の形態では、Ｊ２は、－Ｃ（Ｏ）ＮＨ－又は－Ｃ（Ｏ）Ｏ－である。
【０１１８】
第２のＰＡＣＥｎｇポリマーの一部の形態では、Ｒ３は、Ｒ４と同一である。
【０１１９】
好ましくは、Ｒ３及び／又はＲ４は、直鎖状である。
【０１２０】
第２のＰＡＣＥｎｇポリマーの一部の形態では、Ｒ３、Ｒ４又は両方は、第一級アミン基を含有する。一部の形態では、Ｒ３、Ｒ４又は両方は、第一級アミン基及び１つ以上の第二級又は第三級アミン基を含有する。
【０１２１】
第２のＰＡＣＥｎｇポリマーの一部の形態では、Ｒ３、Ｒ４又は両方は、ヒドロキシル基を含有する。第２のＰＡＣＥｎｇポリマーの一部の形態では、Ｒ３、Ｒ４又は両方は、ヒドロキシル基及び１つ以上のアミン基、好ましくは、第二級又は第三級アミン基を含有する。第２のＰＡＣＥｎｇポリマーの一部の形態では、Ｒ３、Ｒ４又は両方は、ヒドロキシル基を含有しかつアミン基を含有しない。
【０１２２】
第２のＰＡＣＥｎｇポリマーの一部の形態では、Ｒ３及びＲ４の少なくとも一方は、ヒドロキシル基を含有しない。
【０１２３】

第２のＰＡＣＥｎｇポリマーの一部の形態では、Ｒ３、Ｒ４又は両方は、－非置換Ｃ１～Ｃ１０アルキレン－Ａｑ－非置換Ｃ１～Ｃ１０アルキレン－Ｂｑ、－非置換Ｃ１～Ｃ１０アルキレン－Ａｑ－置換Ｃ１－Ｃ１０アルキレン－Ｂｑ、－置換Ｃ１～Ｃ１０アルキレン－Ａｑ－非置換Ｃ１～Ｃ１０アルキレン－Ｂｑ又は－置換Ｃ１～Ｃ１０アルキレン－Ａｑ－置換Ｃ１～Ｃ１０アルキレン－Ｂｑであり、Ａｑは存在せず又は－ＮＲ５－であり、Ｂｑは、ヒドロキシル、第一級アミン、第二級アミン又は第三級アミンであり、Ｒ５は、水素、置換若しくは非置換アルキル又は置換若しくは非置換アリールである。

【０１２４】

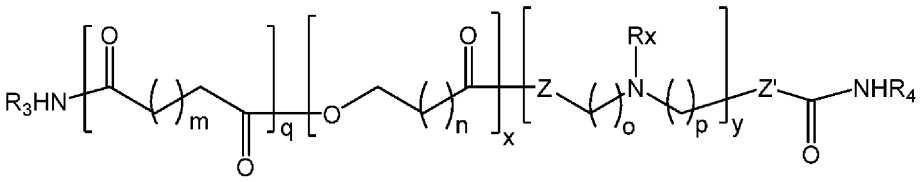
第２のＰＡＣＥｎｇポリマーの一部の形態では、Ｒ３、Ｒ４又は両方は、図１に示される群から選択される。

【０１２５】

一部の形態では、第２のＰＡＣＥｎｇポリマーは、第２のＰＡＣＥｎｇポリマーが、式ＩＩＩ

【０１２６】

【化２７】



式 III

の構造を有する点を除いて上記のとおりである。

【０１２７】

モノマーユニットは、１つ以上の位置で１つ以上の置換基で置換され得る。例示的置換基として、それだけには限らないが、アルキル基、環状アルキル基、アルケン基、環状アルケン基、アルキン、ハロゲン、ヒドロキシル、カルボニル（例えば、カルボキシル、アルコキシカルボニル、ホルミル又はアシル）、チオカルボニル（例えば、チオエステル、チオアセテート又はチオホルメート）、アルコキシル、ホスホリル、ホスフェート、ホスホネート、ホスフィネート、アミノ、アミド、アミジン、イミン、シアノ、ニトロ、アジド、スルフヒドリル、アルキルチオ、スルフェート、スルホネート、スルファモイル、スルホンアミド、スルホニル、ニトロ、ヘテロシクリル、アラルキル又は芳香族若しくは複素芳香族部分が挙げられる。

【０１２８】

第２のＰＡＣＥポリマー（すなわち、第２のＰＡＣＥａｂポリマー又は第２のＰＡＣＥｎｇポリマー）は、生体適合性である。種々の環サイズの容易に入手可能なラクトンが、低い毒性を有することは公知である：例えば、小さいラクトン、例えば、ポリ（カプロラクトン）及びポリ（ｐ－ジオキサノン）から調製されたポリエステルは、臨床適用において使用されている市販の生体材料である。大きな（例えば、Ｃ１６～Ｃ２４）ラクトン及びそのポリエステル誘導体は、生物、例えば、ミツバチにおいて同定されている天然物である。１６～２４の間の環炭素原子を含有するラクトンが具体的に企図され、開示されている。

【０１２９】

一部の形態では、第２のＰＡＣＥポリマー（すなわち、第２のＰＡＣＥａｂポリマー又は第２のＰＡＣＥｎｇポリマー）は、温度制御された加水分解によってさらに活性化され、それによって、１つ以上の活性化された末端基が露出する場合がある。１つ以上の活性化された末端基は、例えば、ヒドロキシル又はカルボン酸末端基である場合があり、その両方ともポリマー内のエステル結合の加水分解によって生成され得る。活性化された第２のＰＡＣＥ　ポリマー（すなわち、第２のＰＡＣＥａｂポリマー又は第２のＰＡＣＥｎｇポリマー）は、約５～２５ｋＤａの間、好ましくは、約５～１０ｋＤａの間の重量平均分

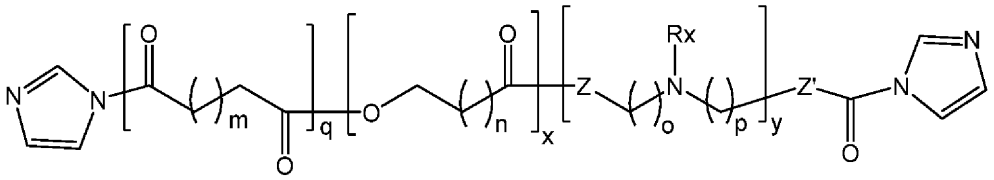
子量を有し得る。本明細書で使用される場合、「約」という用語は、許容されるパラメータ内のわずかな変動を意味する。明確にするために、「約」とは、所与の値の±１０％を指す。一部の形態では、活性化された第２のＰＡＣＥポリマーは、加水分解によって生じた、一方の末端で表されるＲ$_1$又はＲ$_2$（例えば、Ｒ$_3$又はＲ$_4$で表される限定されない部分によって例示される、ヒドロキシル基、第一級アミン基、第二級アミン基、第三級アミン基又はそれらの組合せを含有する化学実体）、及びもう一方の末端にヒドロキシル又はカルボン酸末端基を含有する。

【０１３０】

一部の形態では、第２のＰＡＣＥｎｇポリマーは、式ＩＶ

【０１３１】

【化２８】



式IV

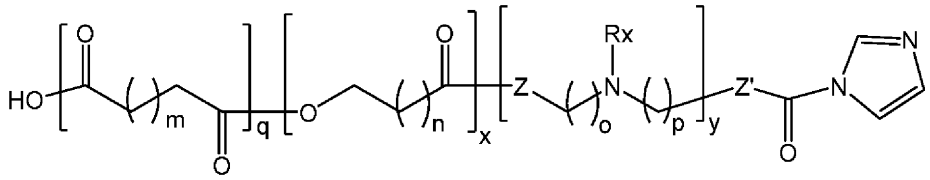
の構造を有する。

【０１３２】

一部の形態では、第２のＰＡＣＥｎｇポリマーは、式Ｖ

【０１３３】

【化２９】



式Ｖ

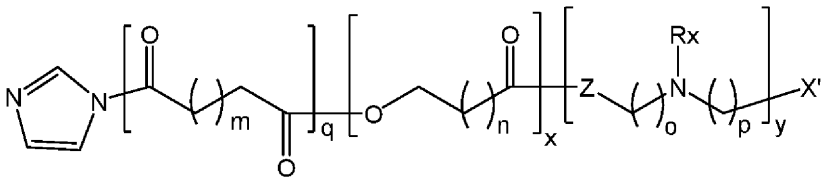
の構造を有する。

【０１３４】

一部の形態では、第２のＰＡＣＥｎｇポリマーは、式ＶＩ

【０１３５】

【化３０】



式VI

［式中、Ｘ’は、－ＯＨ又は－ＮＨＲ’である］

の構造を有する。

【０１３６】

式ＶＩ、Ｖ及びＶＩは、中間生成物の構造である。それらは、式Ｉ、ＩＩ又はＩＩＩの構造を有する多種多様な第２のＰＡＣＥｎｇポリマーを合成するために使用される場合があり、Ｒ$_1$及びＲ$_2$の少なくとも一方が存在する。

【０１３７】

３．表面に非共有結合的にコンジュゲートされた界面活性剤を含有する粒子

別の態様では、粒子は、粒子の表面に非共有結合的にコンジュゲートされた界面活性剤を含有する。これらの形態では、粒子は、第２のＰＡＣＥポリマーとブレンドされた、ＰＡＣＥ－ＰＡＯを含有する粒子と題された節の下で上述されたような、第２のＰＡＣＥポリマーを含有する。

【０１３８】

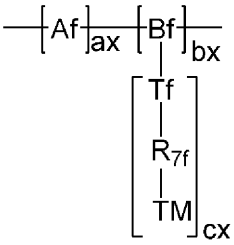
好ましくは、界面活性剤は、ポリマー系界面活性剤である。

【０１３９】

好ましくは、これらの形態では、粒子の表面は、標的化部分が共有結合によってコンジュゲートされる界面活性剤を含有する。標的化部分を含有する界面活性剤は、以下の構造：

【０１４０】

【化３１】



式III’

［式中、各Ａｆは独立に、疎水性又は親水性モノマー残基であり、

Ｂｆは、置換アルキル、置換アリール、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクリル、置換アミン、置換カルボニル、置換アミド又は置換スルホンであり、

Ｔｆは独立に、酸素であり又は存在せず、

R_{7f}は独立に、水素、アルキル、置換アルキル、アミド、置換アミド、置換スルホン、非置換スルホン、アリール、置換アルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、マレイミド、アミン、置換アミン、チオール、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル、スクシンイミド、アジド、アクリレート、メタクリレート、アルキン、ヒドロキシド又はイソシアネート（ｉｓｏｃｙｎａｔｅ）であり、

ＴＭは、標的化部分であり、

ａｘは独立に、０～１０，０００の間、０～５，０００の間又は０～１，０００の間の整数であり、

ｂｘ及びｃｘは独立に、１～１０，０００の間、１～５０００の間又は１～１，０００の間の整数である］

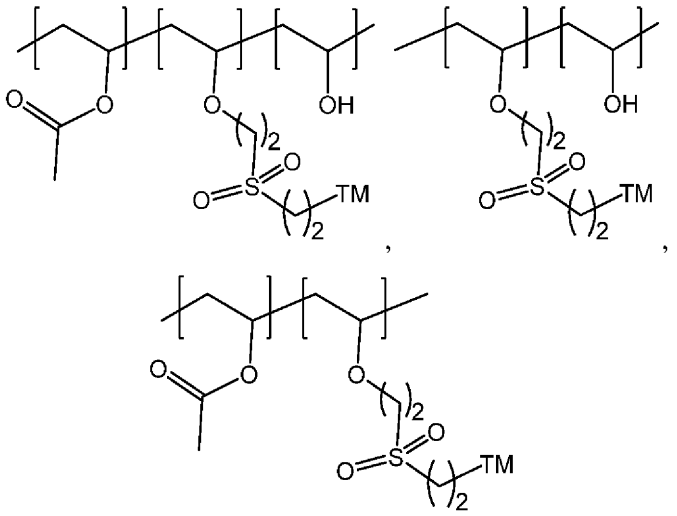
を含有する。

【０１４１】

一部の形態では、標的化部分を含有する界面活性剤は、界面活性剤が以下の構造：

【０１４２】

【化３２】



を含有する点を除いて上記のとおりである。

【０１４３】

標的化部分をナノ粒子にコンジュゲートするいずれかのアプローチでは、標的化部分は、小分子（２００Ｄａ～２，５００Ｄａの間の分子量）、アプタマー、タンパク質又はペプチドを含む。

【０１４４】

肺への送達を含む送達のための特性が改善されたポリ（アミン－コ－エステル）又はポリ（アミン－コ－アミド）が、開発された。

【０１４５】

一部の形態では、これらのＰＡＣＥポリマーは、ポリアルキレンオキシドを用いて改変される。これらのＰＡＣＥ－ＰＡＯポリマーは、第２のＰＡＣＥポリマーとブレンドされていない、ＰＡＣＥ－ＰＡＯを含有する粒子と題された節のもとで上述したように、ＰＡＣＥ－ＰＡＯポリマー構造を含有する。

【０１４６】

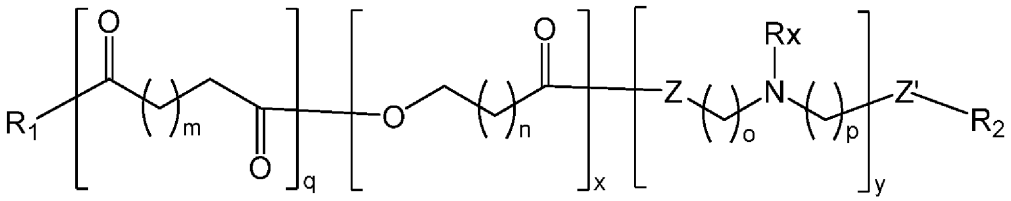
一部の形態では、ＰＡＣＥポリマーは、ポリアルキレンオキシドで改変されない。これらの形態では、ＰＡＣＥポリマーは、第２のＰＡＣＥポリマーとブレンドされた、ＰＡＣＥ－ＰＡＯを含有する粒子と題された節のもとで上述したように第２のＰＡＣＥポリマーと類似のＰＡＣＥポリマー構造を含有する。

【０１４７】

一部の形態では、ＰＡＣＥポリマーは、以下の構造

【０１４８】

【化３３】



式Ｉ

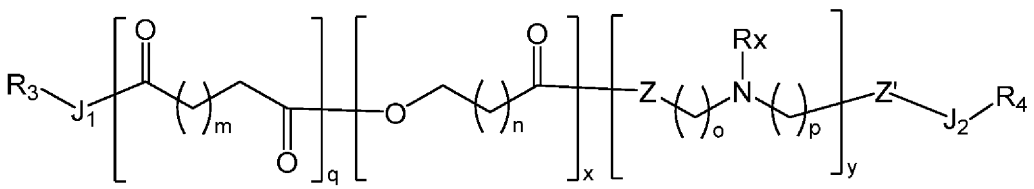
［式中、ｎは１～３０の整数であり、

ｍ、ｏ及びｐは独立に、１～２０の整数であり、

ｘ、ｙ及びｑは独立に、１～１０００の整数であり、

R_xは、水素、置換若しくは非置換アルキル又は置換若しくは非置換アリール又は置換

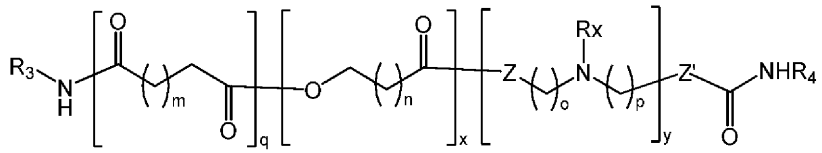
若しくは非置換アルコキシであり、
Ｚ及びＺ’は独立に、Ｏ又はＮＲ’であり、Ｒ’は、水素、置換若しくは非置換アルキル又は置換若しくは非置換アリールであり、
R_1及びR_2は、ヒドロキシル基、第一級アミン基、第二級アミン基、第三級アミン基又はそれらの組合せを含有する化学実体である］
を含有する。
【０１４９】
一部の形態では、Ｚは、Ｚ’と同一である。
【０１５０】
一部の形態では、ＺはＯであり、Ｚ’はＯである。一部の形態では、ＺはＮＲ’であり、Ｚ’はＮＲ’である。一部の形態では、ＺはＯであり、Ｚ’はＮＲ’である。一部の形態では、ＺはＮＲ’であり、Ｚ’はＯである。
【０１５１】
一部の形態では、Ｚ’はＯであり、ｎは１～２４の整数、例えば、４、１０、１３又は１４である。一部の形態では、ＺもまたＯである。
【０１５２】
一部の形態では、Ｚ’はＯであり、ｎは、１～２４の整数、例えば、４、１０、１３又は１４であり、ｍは１～１０の整数、例えば、４、５、６、７又は８である。一部の形態では、ＺもまたＯである。
【０１５３】
一部の形態では、Ｚ’はＯであり、ｎは、１～２４の整数、例えば、４、１０、１３又は１４であり、ｍは、１～１０の整数、例えば、４、５、６、７又は８であり、ｏ及びｐは、２、３又は４のような１～６の同一の整数である。一部の形態では、ＺもまたＯである。
【０１５４】
一部の実施形態では、Ｚ’はＯであり、ｎは、１～２４の整数、例えば、４、１０、１３又は１４であり、ｍは、１～１０の整数、例えば、４、５、６、７又は８であり、Ｒは、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、ｔ－ブチル、イソブチル、ｓｅｃ－ブチル、シクロヘキシル、（シクロヘキシル）メチル、シクロプロピルメチルのようなアルキル並びにその相同体及び異性体、例えば、ｎ－ペンチル、ｎ－ヘキシル、ｎ－ヘプチル及びｎ－オクチル又はアリール、例えば、フェニル、ナフタリル、アントラセニル、フェナントリル、クリセニル、ピレニル、トリル又はキシリルである。一部の形態では、ＺもまたＯである。
【０１５５】
一部の形態では、ｎは１４であり（例えば、ペンタデカラクトン、ＰＤＬ）、ｍは７であり（例えば、セバシン酸）、ｏ及びｐは２である（例えば、Ｎ－メチルジエタノールアミン、ＭＤＥＡ）。
【０１５６】
一部の形態では、ポリマーは、式ＩＩ：
【０１５７】
【化３４】



式II

［式中、Ｒｘ、Ｚ、Ｚ’、ｍ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｘ及びｙは、式Ｉについて上述したとお

りであり、
　Ｊ$_1$及びＪ$_2$は独立に、存在せず又は連結部分、例えば、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｏ－及び－ＮＨ－であり、
　式ＩＩ中のＲ$_3$及びＲ$_4$は独立に、ヒドロキシル基、第一級アミン基、第二級アミン基、第三級アミン基又はそれらの組合せを含有する置換アルキルである］
の構造を含有する。
【０１５８】
　一部の形態では、Ｊ$_1$は、－Ｏ－又は－ＮＨ－である。
【０１５９】
　一部の形態では、Ｊ$_2$は、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）ＮＨ－又は－Ｃ（Ｏ）Ｏ－である。
【０１６０】
　一部の形態では、Ｒ$_3$は、Ｒ$_4$と同一である。
【０１６１】
　好ましくは、Ｒ$_3$及び／又はＲ$_4$は、直鎖状である。
【０１６２】
　一部の形態では、Ｒ$_3$、Ｒ$_4$又は両方は、ヒドロキシル基を含有する。一部の形態では、Ｒ$_3$、Ｒ$_4$又は両方は、ヒドロキシル基及び１つ以上のアミン基、好ましくは、第二級又は第三級アミン基を含有する。一部の形態では、Ｒ$_3$、Ｒ$_4$又は両方は、ヒドロキシル基を含有しかつアミン基を含有しない。
【０１６３】
　一部の形態では、Ｒ$_3$及びＲ$_4$の少なくとも一方は、ヒドロキシル基を含有しない。
【０１６４】
　一部の形態では、ポリマーは、式ＩＩＩ：
【０１６５】
【化３５】



式III

［式中、Ｒ$_3$、Ｒ$_4$、Ｒｘ、Ｚ、Ｚ’、ｍ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｘ及びｙは、式ＩＩについて上述したとおりである］
の構造を含有する。
【０１６６】
　特定の実施形態では、ｘ、ｙ及び／又はｑの値は、ポリマーの重量平均分子量が、２０，０００ダルトンより大きい、１５，０００ダルトンより大きい、１０，０００ダルトンより大きい、５，０００ダルトンより大きい、２，０００ダルトンより大きいようなものである。一部の形態では、ポリマーの重量平均分子量は、約２，０００ダルトン～約２０，０００ダルトンの間、より好ましくは、約５，０００ダルトン～約１０，０００ダルトンの間である。
【０１６７】
　ポリマーは、１つ以上のラクトン、１つ以上のアミン－ジオール（Ｚ及びＺ’＝Ｏ）又はトリアミン（Ｚ及びＺ’＝ＮＲ’）及び１つ以上の二酸若しくはジエステルから調製され得る。２つ以上の異なるラクトン、二酸又はジエステル及び／又はトリアミン又はアミン－ジオールモノマーが使用される実施形態では、ｎ、ｏ、ｐ及び／又はｍの値は、同一又は異なる場合がある。
【０１６８】

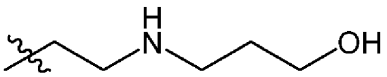
一部の実施形態では、ポリマーは、約２ｋＤａ～２０ｋＤａの間又は約２ｋＤａ～約１０ｋＤａの間又は約２ｋＤａ～約５ｋＤａの間である。

【０１６９】

ポリ（アミン－コ－エステル）又はポリ（アミン－コ－アミド）は、好ましくは、１つ以上のメッセンジャーリボ核酸がその中に封入されている、粒子、例えば、微粒子及び／又はナノ粒子を形成するために使用され得る。一部の形態では、粒子は、R_1及び／又はR_2が

【０１７０】

【化３６】



からなる又はそれを含むことがないポリマーから形成される。

【０１７１】

一部の形態では、粒子は、粒子の表面に非共有結合的にコンジュゲートされた界面活性剤を含有する。界面活性剤の構造は、含有する粒子は、表面上に界面活性剤を非共有結合的にコンジュゲートすると題された節のもとで上述されたとおりであり得る。

【０１７２】

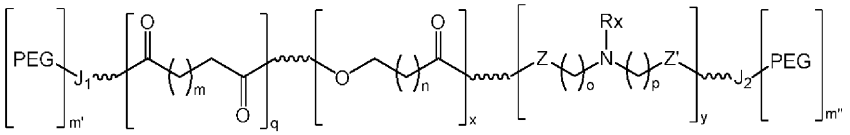
一部の形態では、ポリ（アミン－コ－エステル）又はポリ（アミン－コ－アミド）は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）にコンジュゲートされたポリ（アミン－コ－エステル）又はポリ（アミン－コ－アミド）、すなわち、ＰＥＧコンジュゲートポリ（アミン－コ－エステル）又はポリ（アミン－コ－アミド）を含有する混合物中にある。

【０１７３】

一部の形態では、ＰＥＧコンジュゲートポリ（アミン－コ－エステル）又はポリ（アミン－コ－アミド）は、以下の構造

【０１７４】

【化３７】



式XI

［式中、ｍ’及びｍ”は独立に、０又は１であり、ただし、ｍ’＋ｍ”は、１又は２であり、

式ＸＩ中のJ_1及びJ_2は独立に、存在しない又は連結部分、例えば、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｏ－及び－ＮＨ－である］

を含有する。

【０１７５】

式ＸＩの一部の形態では、J_1は－Ｏ－又は－ＮＨ－である。式ＸＩの一部の形態では、J_2は－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）ＮＨ－又は－Ｃ（Ｏ）Ｏ－である。

【０１７６】

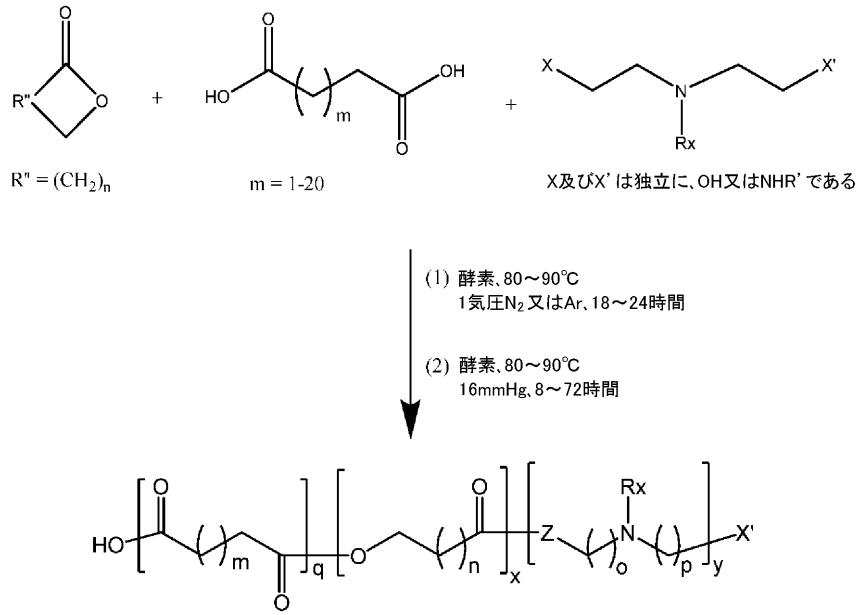
４．ポリマーの供給源

ポリマーは一般に、合成ポリマーから改変される。例示的合成ポリマーとして、ラクトン、ジアルキル酸及びジアルキルアミンから形成されるポリ（アミン－コ－エステル）が挙げられる。酵素触媒、例えば、リパーゼを使用する、ラクトン、ジアルキル酸及びジアルキルアミンからのポリ（アミン－コ－エステル）の合成のための方法が提供される。例示的ラクトンは、米国特許出願公開第２０１７０１２１４５４号明細書に開示されている。一部の形態では、ポリ（アミン－コ－エステル）は、スキーム１に示されるように調製される。：

スキーム１：未改変ポリ（アミン－コ－エステル）の調製

【０１７７】

【化３８】



式VII

【０１７８】

モノマー（例えば、ラクトン：アミノジオール：二酸）のモル比は、例えば、約１０：９０：９０～約９０：１０：１０で変わり得る。一部の実施形態では、比は、１０：９０：９０、２０：８０：８０、４０：６０：６０、６０：４０：４０又は８０：２０：２０である。狭い多分散のポリスチレン標準物質を使用してＧＰＣによって決定される重量平均分子量は、例えば、約２，０００ダルトン～約５０，０００ダルトン、好ましくは、約２，０００ダルトン～約２０，０００ダルトン、より好ましくは、約５０００ダルトン～約２０，０００ダルトン、最も好ましくは、約５０００ダルトン～約１０，０００ダルトンで変わり得る。

【０１７９】

ポリマーの疎水性は、ラクトンのパーセンテージを、約１０％～約１００％（（ラクトンユニット＋ジエステル／二酸）に対するラクトンユニットで算出される）で変えることによって調整され得る。ポリマーの分子量は、第２段階の反応時間を例えば、約８～約７２時間の間に合わせることによって調整され得る。

【０１８０】

酵素的方法によって、多様な鎖構造及び合わせることができる疎水性を有するポリマーの合成が可能になる。一部の実施形態では、疎水性は、ラクトンモノマーの環のサイズ及び／又はモル量を変えることによって変えられる。さまざまな環のサイズ（例えば、C_4～C_{24}、好ましくは、C_6～C_{24}、より好ましくは、C_6～C_{16}）を有するラクトンが、コモノマーとして使用され得る。反応は、アミノ基（複数可）の保護及び脱保護を行わずに単一ステップで実施され得る。このようなアミノを有するコポリエステルは、従来の有機金属触媒を使用して調製することが極端に困難であるが、これは、このような触媒は有機アミンに対して感受性である又はそれによって不活化されることが多いからである。これらの触媒はまた、大きなラクトン環モノマーのポリマー化には非効率的であるとも知られている。酵素的触媒には、酵素の高い活性及び選択性並びに結果として得られる、金属を含まない産物の高い純度のために、生物医学的ポリマーを生成するための明確な利点がある。

【０１８１】

式ＩＶ、Ｖ又はＶＩの構造を有するポリマーは、式ＶＩＩの未改変ポリマーを１，１’－カルボニルジイミダゾール（ＣＤＩ）と約１：１０～約１：６０のモル比で、好ましくは、約１：４０で反応させることによって合成され得る。

【０１８２】

式Ｉ又はＩＩの構造を有するポリマーは、当技術分野で公知のカップリング反応を使用する式ＶＩＩの未改変ポリマーの末端基の改変によって得ることができる。例えば、式ＩＩＩの構造を有するポリマーは、（１）式ＶＩＩの未改変ポリマーをＣＤＩと反応させて、式ＩＶのポリマーを得ること、及び（２）式ＩＶのポリマーをR_3-NH_2及びR_4-NH_2と反応させることによって合成され得る。一部の形態では、R_3、R_4又は両方は、図１に示されるものから選択される。好ましくは、R_3及びR_4は同一である。

【０１８３】

あるいは、式ＩＩＩの構造を有するポリマーは、（１）式ＶＩＩの未改変ポリマーをＣＤＩと反応させて、式Ｖ又はＶＩのポリマーを得ること、（２）ステップ（１）から得たポリマー中の－ＣＯＯＨ基又は－Ｘ’基を保護すること、（３）ステップ（２）から得た保護されたポリマーをR_4-NH_2又はR_3-NH_2と反応させること、（４）ステップ（３）から得たポリマー中の－ＣＯＯＨ基又は－Ｘ’基を脱保護すること、及び（５）ステップ（４）から得た脱保護されたポリマーをR_3-NH_2又はR_4-NH_2と反応させることによって合成され得る。

【０１８４】

式Ｉ、ＩＩ又はＩＩＩのポリマーの加水分解媒介性活性化は、温度制御方法で最大３０日間又はそれより長く実施され得る。加水分解の長さは、活性化されるポリマーの分子量に応じて変わり得る。より大きな分子量のポリマー（例えば、約２０～２５ｋＤａ）は、長期間、例えば、約３０～４０日間最適に加水分解される。より小さい分子量のポリマー（例えば、約５～７ｋＤａ）は、より短期間、例えば、約４～１０日間最適に加水分解される。

【０１８５】

一部の形態では、ポリマーは、約３０℃～４２℃の温度、又は最高約１００℃の範囲のいずれかで加水分解される。ＰＡＣＥポリマーは、約３５℃～４０℃の温度、例えば、約３７℃で加水分解され得る。

【０１８６】

一部の形態では、ポリマーは、例えば、約１気圧で加水分解される。より高圧は、プロセスを加速する（例えば、約１～約１００気圧の圧力）。プロセスの速度は、製造されている特定の製剤について当業者によって決定される。

【０１８７】

得られた加水分解産物の重量平均分子量は、約５ｋＤａ～約２５ｋＤａ、好ましくは、約５～約１０ｋＤａの間で変わり得る。

【０１８８】

好ましくは、ポリマー中のエステル結合のうち１つ以上が加水分解される。加水分解産物は、加水分解によって生成された、一方の末端にR_1又はR_2を、もう一方の末端にカルボキシル又はヒドロキシル基を有し得る。

【０１８９】

ＰＥＧコンジュゲートポリ（アミン－コ－エステル）又はポリ（アミン－コ－アミド）は、（ｉ）ラクトン、（ｉｉ）二酸／ジエステル、及び（ｉｉｉ）アミンジオール及び／又はトリアミンに加えて、ＰＥＧ含有末端カルボキシル、ヒドロキシル又はアミン基が反応物に添加される場合がある点を除いて、スキーム１に記載されたものと同様の条件下で合成され得る。

【０１９０】

５．ポリマーから形成されたミセル

ポリマー、例えば、ＰＥＧ－ブロック含有ポリマーが、ミセルを調製するために使用され得る。平均ミセルサイズは、通常、約１００～約５００ｎｍ、好ましくは、約１００～

約４００ｎｍ、より好ましくは、約１００～約３００ｎｍ、より好ましくは、約１５０～約２００ｎｍ、最も好ましくは、約１６０～約１９０ｎｍの範囲であり、これらは血清タンパク質の存在下で７．４の生理学的ｐＨで安定である。コポリマーは、高い血液適合性を有し、溶血及び凝集を誘導する最小活性を示す。

【０１９１】

ミセルを収容する水性媒体のｐＨが変えられると、ミセルのサイズ及びゼータ電位が大きく変化するとわかった。例えば、異なるＰＤＬ含量（１１％、３０％及び５１％）の３種のＰＥＧ２Ｋ－ＰＰＭＳコポリマーのミセルについて、サイズ－ｐＨ及びゼーター－ｐＨ曲線の傾向は著しく類似している。ミセル試料の平均サイズが、媒体ｐＨが７．４から５．０へ低下すると徐々に増大し、次いで、ｐＨ値が５．０未満であるとほぼ一定のままであることは明らかである。ミセルについて観察されたこのｐＨ応答挙動は、ｐＨが７．４から５．０へ低下する際に予測され、ミセルのＰＰＭＳコアは、プロトン化され、より親水性になり、したがって、水性媒体からより多くの水分子を吸収して、ミセルの膨潤を引き起こす。ミセルコアは５．０のｐＨですでに十分にプロトン化されており、結果として、ミセルのサイズは、ｐＨを５．０からさらに低下させてもほとんど一定のままである。７．４～５．０のｐＨ値の間のミセルサイズ変化の規模に対するＰＥＧ２Ｋ－ＰＰＭＳコポリマー中のＰＤＬ含量の効果も注目すべきものである。コポリマー中のＰＤＬ含量を低下させ、第三級アミノ基含量を増大させるにつれ、ミセルコアのプロトン及び水分子を吸収する能力は、増大すると予測される。したがって、ｐＨを７．４から５．０に低下させると、平均ミセルサイズの変化は、ＰＥＧ２Ｋ－ＰＰＭＳ－３０％ＰＤＬ（１８４ｎｍから２１４ｎｍへ）及びＰＥＧ２Ｋ－ＰＰＭＳ－５１％ＰＤＬ（１６３ｎｍから１８２ｎｍへ）と比較してＰＥＧ２Ｋ－ＰＰＭＳ－１１％ＰＤＬについてより大きい（２００ｎｍから２３４ｎｍへ）。

【０１９２】

水性媒体中でのミセルのゼータ電位も、かなりのｐＨ依存を示す。生理学的及びアルカリｐＨ（７．４～８．５）で、ブランクＰＥＧ２Ｋ－ＰＰＭＳコポリマーミセルの表面電荷は負であり、媒体のｐＨが酸性範囲（４．０～６．０）に低下すると正に変化した。例えば、ＰＥＧ２Ｋ－ＰＰＭＳ－１１％ＰＤＬ、ＰＥＧ２Ｋ－ＰＰＭＳ－３０％ＰＤＬ及びＰＥＧ２Ｋ－ＰＰＭＳ－５１％ＰＤＬのミセルは、７．４のｐＨでそれぞれ－５．８、－７．１、－５．１ｍＶのゼータ電位を有しており、これは、５．０の低いｐＨでそれに応じて＋７．６、＋５．８、＋４．０ｍＶに変わった。上記の議論に基づいて、ｐＨに対するこの表面電荷依存は、異なる媒体ｐＨでのミセルのＰＰＭＳコアのプロトン化又は脱保護に起因する。アルカリｐＨ（７．４～８．５）では、ミセル中のアミノ基のほとんどはおそらくプロトン化されておらず、ミセルによるＰＢＳ中のHPO_4^{2-}及び／又は$H_2PO_4^-$アニオンの吸収のためにミセル粒子は負電荷を有するままである。特に、８．５のｐＨで、ゼータ電位の値は、それぞれＰＥＧ２Ｋ－ＰＰＭＳ－１１％ＰＤＬ、ＰＥＧ２Ｋ－ＰＰＭＳ－３０％ＰＤＬ及びＰＥＧ２Ｋ－ＰＰＭＳ－５１％ＰＤＬについて－８．１ｍＶ、－７．９ｍＶ、－９．０ｍＶであった。ｐＨを７．４から５．０へ低下させると、ミセルＰＰＭＳコア中の第三級アミノ部分はほとんどプロトン化されるようになり、ミセルは正電荷を有する粒子に変わる。一貫して、３種のミセル試料の中で、４．０～５．０のｐＨでは、プロトンを吸収する最大の能力を有するＰＥＧ２Ｋ－ＰＰＭＳ－１１％ＰＤＬミセルが、最高のゼータ電位の値を示し、最小のプロトン化能力を有するＰＥＧ２Ｋ－ＰＰＭＳ－５１％ＰＤＬミセルが最低のゼータ電位を示した。媒体ｐＨに対する観察されたミセル表面電荷応答は、生理学的ｐＨでのミセルの負の表面電荷が、ミセルの血液中の血清タンパク質との相互作用を軽減し、そのインビボ循環時間を延長できるので高度に望ましいものである。他方、およそ６．５の腫瘍細胞外ｐＨでの正の表面電荷への反転は、標的腫瘍細胞によるミセルの取り込みを増強する可能性がある。

【０１９３】

ＰＢＳ溶液（０．０１Ｍ、ｐＨ＝７．４）における粒子／ミセルの表面電荷は、わずかに負であり、これはミセルのインビボ薬物送達適用にとって有益である。ほぼ中性の表面

電荷（－１０～＋１０ｍＶの間のゼータ電位）を有するナノ粒子は、細網内皮系（ＲＥＳ）によるその取り込みを減少させ、血液におけるその循環を延長することができると知られている。ミセルの負の表面電荷は、アニオンと、ＰＥＧシェルのエーテル基又はＰＰＭＳコアのアミノ基の間の水素結合相互作用を介した、ミセル粒子によるＰＢＳ中のHPO_4^{2-}及び／又は$H_2PO_4^-$アニオンの吸収に起因する可能性がある。両親媒性のブロックコポリマーミセルについて、ミセルの外側シェル中の親水性鎖セグメント（例えば、ＰＥＧ）は、ミセルコアにおける電荷をシールドでき、長鎖ブロックが短鎖ブロックよりもゼータ電位の低減においてより有効であると予想される。したがって、ＰＥＧ５Ｋ－ＰＰＭＳコポリマーミセルについて、ＰＥＧ２Ｋ－ＰＰＭＳコポリマーミセルと比較して有意に低いゼータ電位の値が観察された。

【０１９４】

コポリマーミセルは、ｐＨ応答性である：媒体ｐＨを７．４から５．０へ低下させると、ミセルのサイズはミセルサイズを有意に増大し、ミセル表面電荷は負電荷から正電荷に反転した。対応して、ＤＴＸが封入されたコポリマーミセルは、７．４のｐＨでは緩やかな持続的薬物放出を示したが、５．０の酸性ｐＨではＤＴＸ放出を著しく加速した。腫瘍微小環境は通常、不十分な酸素灌流による乳酸蓄積の結果として弱酸性（例えば、５．７～７．０）であると知られているので、この現象は、腫瘍部位での薬剤の放出の改善に利用され得る。対照的に、正常組織及び血液の細胞外ｐＨは、わずかに塩基性（７．２～７．４のｐＨ）である。したがって、ｐＨ応答性であり、酸性ｐＨによって、薬物放出を加速することが引き起こされ得る、抗がん薬物が負荷されたミセルについて、薬物送達効率の増強が見込まれる。さらに、エンドサイトーシス経路を介した腫瘍細胞によるミセルの取り込み後にエンドソーム及びリソソームにおいていっそうより酸性の条件（ｐＨ＝４．０～６．０）に遭遇し、これは、薬物が封入されたミセルの細胞毒性をさらに増大し得る。

【０１９５】

６．ポリマー微粒子

通常、ポリマー及び抗原構成成分は、ポリマーマイクロ－及び／又はナノ－粒子に組み合わされ、その中に１つ以上の抗原並びに任意選択的に１つ以上の追加の活性薬剤が封入されている。抗原は粒子内に封入される場合も、粒子を形成するポリマーマトリックス内に分散される場合も、粒子の表面に共有結合によって、若しくは非共有結合によって結合される場合も、又はそれらの組合せである場合もある。一般に、抗原は、核酸の形態にある。

【０１９６】

通常、ポリマーは、生体適合性であり、生分解性である。粒子に封入される及び／又はそれと結合している核酸（複数可）は、ポリマーマトリックスの拡散及び分解を含む異なる機序によって放出され得る。放出速度は、ポリマーのモノマー組成、したがって、分解速度を変更することによって制御され得る。例えば、単純な加水分解が分解の主な機序である場合、ポリマーの疎水性を高めることによって、分解の速度を減速し、したがって、放出の期間を増大する可能性がある。すべての場合において、ポリマー組成は、所望の目的／アウトカムを達成するために有効量の核酸（複数可）が放出されるように選択される。

【０１９７】

７．制御放出材料

一部の実施形態では、粒子は、粒子に封入されたか、そうでなければそれと結合している活性薬剤の制御放出を提供する。例えば、変更されていない粒子は、粒子からの薬物の核酸の速度及び／又はポリマーの分解の速度に基づいて有効量の薬物の放出を経時的に提供し得る。ポリマー組成は、ポリマーの分解挙動を、したがって、放出速度／薬剤が送達される時間を操作するように変えられる場合がある。あるいは、粒子は、送達されるべき薬剤（単数又は複数）の制御放出、例えば、徐放又は遅延放出を提供するように１つ以上の材料でコーティングされてもよい。

【０１９８】
徐放及び遅延放出材料は、当技術分野で周知である。リパーゼによって加水分解される脂肪酸の固体エステルは、微粒子又は薬物粒子上にスプレーコーティングされ得る。ゼインは、天然に水不溶性のタンパク質の一例である。スプレーコーティングによって、又は湿式造粒技術によって薬物含有微粒子又は薬物粒子上にコーティングされ得る。天然に水不溶性の材料に加えて、いくつかの消化酵素の基質が架橋手順を用いて処置されて、非可溶性ネットワークの形成をもたらし得る。化学的及び物理的手段の両方によって開始されるタンパク質を架橋する多数の方法が報告されている。架橋を得るための最も一般的な方法の１つとして、化学的架橋剤の使用がある。化学的架橋剤の例として、アルデヒド（グルタルアルデヒド（ｇｌｕｔｅｒａｌｄｅｈｙｄｅ）及びホルムアルデヒド）、エポキシ化合物、カルボジイミド及びゲニピンが挙げられる。これらの架橋剤に加えて、ゼラチンを架橋するために酸化糖及び未変性糖が使用されてきた。架橋はまた、酵素的手段を使用して達成され得る；例えば、トランスグルタミナーゼが水産物を架橋するためのＧＲＡＳ物質として承認されている。最後に、架橋は、物理的手段、例えば、熱処置、ＵＶ照射及びガンマ照射によって開始され得る。

【０１９９】
薬物含有微粒子又は薬物粒子を取り囲む架橋されたタンパク質のコーティング層を生成するために、水溶性タンパク質が微粒子上にスプレーコーティングされ、その後、上記の方法のうち１つによって架橋される。あるいは、薬物含有微粒子は、コアセルベーション相分離（例えば、塩の添加による）によってタンパク質内にマイクロカプセル化され、その後、架橋され得る。この目的のためのいくつかの適したタンパク質として、ゼラチン、アルブミン、カゼイン及びグルテンが挙げられる。

【０２００】
多糖もまた架橋されて、水に不溶性のネットワークを形成し得る。これは、多数の多糖では、主ポリマー鎖と架橋するカルシウム塩又は多価カチオンとの反応によって達成され得る。ペクチン、アルギン酸塩、デキストラン、アミロース及びグアーガムは、多価カチオンの存在下で架橋を受ける。反対の電荷を有する多糖との間の複合体も形成され得る；ペクチン及びキトサンは、例えば、静電相互作用によって複合体形成され得る。

【０２０１】
当技術分野で公知の制御放出ポリマーとして、アクリル酸及びメタクリル酸コポリマー、メチルメタクリレート、メチルメタクリレートコポリマー、エトキシエチルメタクリレート、シアノエチルメタクリレート、アミノアルキルメタクリレートコポリマー、ポリ（アクリル酸）、ポリ（メタクリル酸）、メタクリル酸アルキルアミンコポリマーポリ（メチルメタクリレート）、ポリ（メタクリル酸）（無水物）、ポリメタクリレート、ポリアクリルアミド、ポリ（メタクリル酸無水物）及びグリシジルメタクリレートコポリマーが挙げられる。

【０２０２】
ある特定の好ましい実施形態では、アクリルポリマーには、１つ以上のアンモニオメタクリレートコポリマーが含まれる。アンモニオメタクリレートコポリマーは、当技術分野で周知であり、第四級アンモニウム基の含量が少ないアクリル酸及びメタクリル酸エステルの完全ポリマー化コポリマーとしてＮＦ　ＸＶＩＩに記載されている。

【０２０３】
１つの好ましい実施形態では、アクリルポリマーは、アクリル樹脂ラッカー、例えば、Ｒｏｈｍ　ＰｈａｒｍａからＥＵＤＲＡＧＩＴ（登録商標）のもとで市販されているものである。さらに好ましい実施形態では、アクリルポリマーは、それぞれＲｏｈｍ　ＰｈａｒｍａからＥＵＤＲＡＧＩＴ（登録商標）ＲＬ３０Ｄ及びＥＵＤＲＡＧＩＴ（登録商標）ＲＳ３０Ｄのもとで市販されている２種のアクリル樹脂ラッカーの混合物を含む。ＥＵＤＲＡＧＩＴ（登録商標）ＲＬ３０Ｄ及びＥＵＤＲＡＧＩＴ（登録商標）ＲＳ３０Ｄは、第四級アンモニウム基の含量が低いアクリル及びメタクリルエステルのコポリマーであり、アンモニウム基対残存する中性（メタ）アクリルエステルのモル比が、ＥＵＤＲＡＧＩＴ

（登録商標）ＲＬ３０Ｄにおいて１：２０であり、ＥＵＤＲＡＧＩＴ（登録商標）ＲＳ３０Ｄにおいて１：４０である。平均分子量は、約１５０，０００である。ＥＵＤＲＡＧＩＴ（登録商標）Ｓ－１００及びＥＵＤＲＡＧＩＴ（登録商標）Ｌ－１００も好ましい。コード指定ＲＬ（高透過性）及びＲＳ（低透過性）とは、これらの薬剤の透過性特性を指す。ＥＵＤＲＡＧＩＴ（登録商標）ＲＬ／ＲＳ混合物は、水及び消化液に不溶性である。しかし、それを含むように形成される多粒子系は、水溶液及び消化流体液中で膨潤性であり、浸透性である。

【０２０４】

ＥＵＤＲＡＧＩＴ（登録商標）ＲＬ／ＲＳなどのポリマーは、望ましい溶解プロファイルを有する徐放製剤を最終的に得るために任意の所望の比率で一緒に混合され得る。望ましい徐放多粒子系は、例えば、１００％のＥＵＤＲＡＧＩＴ（登録商標）ＲＬ、５０％のＥＵＤＲＡＧＩＴ（登録商標）ＲＬ及び５０％のＥＵＤＲＡＧＩＴ（登録商標）ＲＳ並びに１０％のＥＵＤＲＡＧＩＴ（登録商標）ＲＬ及び９０％のＥＵＤＲＡＧＩＴ（登録商標）ＲＳから得ることができる。当業者は、他のアクリルポリマー、例えば、ＥＵＤＲＡＧＩＴ（登録商標）Ｌなども使用され得ることを認識する。

【０２０５】

他の制御放出材料として、メチルアクリレート－メチルメタクリレート、ポリ塩化ビニル及びポリエチレンが挙げられる。親水性ポリマーとして、それだけには限らないが、セルロース系ポリマー、例えば、メチル及びエチルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロース及びＣａｒｂｏｐｏｌ（登録商標）９３４、ポリエチレンオキシド及びそれらの混合物が挙げられる。脂肪化合物として、それだけには限らないが、種々のワックス、例えば、カルナウバロウ及びトリステアリン酸グリセリル及び水素添加ヒマシ油又は水素添加植物油又はそれらの混合物を含むワックス系物質が挙げられる。

【０２０６】

遅延放出を達成するための適したコーティング材料として、それだけには限らないが、セルロース系ポリマー、例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートスクシネート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、メチルセルロース、エチルセルロース、酢酸セルロース、酢酸セルロースフタレート、酢酸セルローストリメリテート及びカルボキシメチルセルロースナトリウム；好ましくは、アクリル酸、メタクリル酸、メチルアクリレート、エチルアクリレート、メチルメタクリレート及び／又はエチルメタクリレート及びＥＵＤＲＡＧＩＴ（登録商標）Ｌ３０Ｄ－５５及びＬ１００－５５（ｐＨ５．５以上で可溶性）、ＥＵＤＲＡＧＩＴ（登録商標）Ｌ－１００（ｐＨ６．０以上で可溶性）、ＥＵＤＲＡＧＩＴ（登録商標）Ｓ（ｐＨ７．０以上で可溶性、高度のエステル化の結果としてエステル化）及びＥＵＤＲＡＧＩＴａ（登録商標）ＮＥ、ＲＬ及びＲＳ（異なる程度の透過性及び拡張性を有する水に不溶性のポリマー）を含む、商品名ＥＵＤＲＡＧＩＴ（登録商標）（Ｒｏｈｍ　Ｐｈａｒｍａ；Ｗｅｓｔｅｒｓｔａｄｔ、ドイツ）のもとで市販されている、他のメタクリル樹脂から形成される、アクリル酸ポリマー及びコポリマー；ビニルポリマー及びコポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン、酢酸ビニル、酢酸ビニルフタレート、酢酸ビニルクロトン酸コポリマー及びエチレン－酢酸ビニルコポリマー；酵素分解性ポリマー、例えば、アゾポリマー、ペクチン、キトサン、アミロース及びグアーガム；ゼイン及びセラックが挙げられる。

【０２０７】

Ｂ．ワクチンウイルス抗原

ビリオンは、核酸コア、外側タンパク質コーティング及び場合によっては、宿主細胞由来のタンパク質及びリン脂質膜でできた外側エンベロープからなる。ウイルスファミリーの膜の間の最も眼に見える相違は、その形態であり、これはかなり多様である。ウイルス

複雑性の興味深い特徴は、宿主の複雑性はビリオンの複雑性と相関しないということである。最も複雑なビリオン構造の一部は、最も単純な生物である細菌に感染するウイルスであるバクテリオファージにおいて観察される。

【０２０８】

ウイルスは、多数の形状及びサイズで現れるが、各ウイルスファミリーについて一貫しており、別個のものである。すべてのビリオンは、カプシドと呼ばれるタンパク質の保護層によって覆われた核酸ゲノムを有する。カプシドは、カプソメアと呼ばれるタンパク質サブユニットでできている。一部のウイルスカプシドは、単純な多角体の「球」であるが、他のものは構造がかなり複雑である。一部のウイルスのカプシドを取り囲む外側構造は、ウイルスエンベロープと呼ばれる。すべてのウイルスは、ウイルス受容体と呼ばれる細胞上の分子でその宿主細胞に付着するある種の糖タンパク質を使用する。ウイルスは、細胞が特定の細胞種を認識し、感染する方法としていくつかの他の目的のために使用しているこれらの細胞表面分子を利用する。例えば、麻疹ウイルスは、通常、免疫反応において、おそらくは、受精での精子・卵相互作用において機能するヒトにおける細胞表面糖タンパク質を使用する。細胞膜に後に侵入し、ウイルスゲノムを注入し、細胞の内側でその複製を完了するために、付着は必要条件である。

【０２０９】

免疫系を刺激して、特定の抗原に干渉することによって、感染を阻害できる（通常、ウイルスエンベロープ又はカプシドタンパク質を用いる免疫化、細胞の感染を防ぐこと又は溶解、出芽若しくは感染細胞からの他の放出後の新規細胞の伝播及び感染を制限することによって。

【０２１０】

上記のポリマーは、ポリマーから形成される又はそれを含む固体コア粒子又はミセル又は粒子を形成し、これらは、宿主において病原体による感染に対する防御免疫を刺激又は誘導する目的で、１つ以上の病原体に由来する抗原を標的細胞に送達するのに有用である。したがって、好ましい実施形態では、ポリマー組成物は、１つ以上の外因性抗原を標的細胞に送達する。一部の実施形態では、ポリマーは、さまざまな抗原性又は免疫原性分子のいずれかを、封入する、それと混合される、又はそれにイオン的に若しくは共有結合によってカップリングされるために使用される。

【０２１１】

１つ以上の外因性抗原と組み合わせたポリマーの粘膜組織への投与は、対象において抗原に対して特異的な、粘膜免疫応答並びに／又は持続性の及び防御的な粘膜免疫を誘導することが確立された。通常、組織常在粘膜適応免疫を誘導するための組成物には、ポリ（アミン－コ－エステル）ポリマー及び抗原性又は免疫原性タンパク質断片又はエピトープが含まれる。一部の実施形態では、抗原は、全タンパク質、タンパク質の免疫原性ペプチド画分又はタンパク質若しくはペプチドをコードするＤＮＡ若しくはＲＮＡなどの核酸である。好ましい実施形態では、抗原は、タンパク質又はペプチドをコードするｍＲＮＡである。例示的抗原として、細菌抗原、ウイルス抗原又は腫瘍抗原が挙げられる。

【０２１２】

抗原は、例えば、タンパク質、核酸、脂質及び多糖であり得る又はそれを含み得る。例示的抗原として、Ｂ細胞抗原及びＴ細胞抗原が挙げられる。Ｂ細胞抗原は、ペプチド、タンパク質、多糖、糖類、脂質、核酸、小分子（単独又はハプテンと組み合わせた）又はそれらの組合せであり得る。好ましい実施形態では、抗原は、ポリペプチド又はポリペプチドをコードする核酸である。抗原は、ウイルス、細菌、寄生生物、植物、原生動物、真菌、組織又は形質転換された細胞、例えば、がん（例えば、白血病細胞）及びその免疫原性構成成分、例えば、その細胞壁構成成分又は分子構成成分に由来し得る。したがって、抗原は、腫瘍特異的抗原であり得る。抗原は、アレルゲン又は環境抗原又は腫瘍抗原であり得る。抗原は、１つ以上の疾患又は状態、例えば、感染性疾患及び自己免疫疾患と関連する場合がある。

【０２１３】

適した抗原は、当技術分野で公知であり、商業的な政府及び科学的供給源から入手可能である。抗原は、腫瘍又はウイルス若しくは細菌供給源に由来する精製又は部分精製ポリペプチドであり得る。抗原は、異種発現系においてポリペプチド抗原をコードするＤＮＡ又はｍＲＮＡを発現させることによって生成される組換えポリペプチドであり得る。抗原は、単一抗原として提供され得る又は組合せで提供され得る。抗原はまた、ポリペプチド又は核酸の複雑な混合物として提供され得る。

【０２１４】

粒子はまた、抗原及び／又はアジュバント（すなわち、免疫応答を増強する分子）を含み得る。ペプチド、タンパク質及びＤＮＡベースのワクチンは、種々の疾患又は状態に対する免疫を誘導するために使用され得る。細胞性免疫は、ウイルス感染細胞を検出し、破壊するために必要とされる。最も伝統的なワクチン（例えば、タンパク質ベースのワクチン）は、体液性免疫のみを誘導できる。ＤＮＡベースのワクチンは、体液性及び細胞性免疫の両方を誘導できるので、ウイルス又は寄生生物に対してワクチン接種する独特な手段に相当する。さらに、ＤＮＡベースのワクチンは、伝統的なワクチンよりも潜在的により安全である。ＤＮＡワクチンは、相対的により安全であり、製造及び保存のための対費用効果がより高い。ＤＮＡワクチンは、２つの主要な構成成分：ＤＮＡ担体（又は送達媒体）及び抗原をコードするＤＮＡを含む。ＤＮＡ担体は、ＤＮＡを分解から保護し、特定の組織又は細胞へのＤＮＡ侵入及び効率的なレベルでの発現を促進できる。

【０２１５】

好ましい実施形態では、抗原は、核酸、例えば、ポリペプチド抗原又はその一部分をコードする核酸の形態にある。したがって、一部の実施形態では、ポリマーは、インビボでの１つ以上の細胞への送達及び１つ以上のタンパク質抗原の発現のための核酸を含む。したがって、ポリマー及び１つ以上のポリヌクレオチドを含む粒子も開示される。ポリヌクレオチドは、１つ以上のタンパク質、機能的核酸又はそれらの組合せをコードできる。ポリヌクレオチドは、モノシストロニックである場合も、ポリシストロニックである場合もある。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、多重遺伝子性である。例えば、ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドは、生物に予防効果を提供するポリペプチド抗原であり得る。例えば、寄生生物性、ウイルス性、細菌性、真菌性又はその他の感染症などの感染に対する免疫化のために、発現されるポリヌクレオチド（複数可）は、免疫系を刺激して、生物の免疫系を刺激する病原体、例えば、呼吸器系病原体に対する免疫を提供する抗原をコードし得る。

【０２１６】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、細胞にトランスフェクトされ、染色体外のままである。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、宿主細胞中に導入され、宿主細胞のゲノム中に組み込まれる。以下により詳細に論じられるように、組成物は、遺伝子療法の方法において使用され得る。遺伝子療法の方法は、細胞の遺伝子型を変更するポリヌクレオチドの細胞への導入を含み得る。ポリヌクレオチドの導入によって、遺伝子組換えを介して内因性遺伝子を修正、置き換え、又はそうでなければ変更できる。方法は、欠陥遺伝子、異種遺伝子又は小さい核酸分子、例えば、オリゴヌクレオチドの置き換えコピー全体の導入を含み得る。例えば、修正遺伝子が宿主のゲノム内の非特異的位置に導入され得る。

【０２１７】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、ベクター中に組み込まれる又はベクターの一部である。遺伝子配列及び適切な転写及び翻訳制御エレメントを含有する発現ベクターを構築する方法は、当技術分野で周知である。これらの方法には、インビトロ組換えＤＮＡ技術、合成技術及びインビボ遺伝子組換えが含まれる。発現ベクターは、一般に、例えば、目的のポリヌクレオチドであり得る挿入されたコード配列の翻訳及び／又は転写のための調節配列及び必須エレメントを含有する。コード配列は、所望の遺伝子産物の発現の制御に役立つようにプロモーター及び／又はエンハンサーに作動可能に連結され得る。バイオテクノロジーにおいて使用されるプロモーターは、遺伝子発現の制御の意図される種

類に従って異なる種類のものである。それらは、一般に、構成的プロモーター、組織特異的又は発達段階特異的プロモーター、誘導プロモーター及び合成プロモーターに分けることができる。

【０２１８】

例えば、一部の実施形態では、抗原核酸は、当技術分野で公知のプロモーター又は他の調節エレメントに作動可能に連結される。したがって、ポリヌクレオチドは、発現ベクターなどのベクターであり得る。原核生物又は真核生物系における発現のためにポリヌクレオチドを操作することは、組換え発現において当業者に一般に知られている技術によって実施され得る。発現ベクターは、通常、１つ以上のプロモーターの制御下に組成物の１つを含む。コード配列をプロモーター「の制御下」に置くために、リーディングフレームの翻訳開始部位の５’末端を、一般に、選択されたプロモーターの約１～５０ヌクレオチドの間「下流」に（すなわち、３’に）位置付ける。「上流」プロモーターは、挿入されたＤＮＡの転写を刺激し、コードされた組換えタンパク質の発現を促進する。これは、本明細書で使用される文脈では「組換え発現」の意味である。

【０２１９】

多数の標準技術は、さまざまな宿主発現系においてタンパク質又はペプチド発現を達成するために適切な核酸及び転写／翻訳制御配列を含有する発現ベクターを構築するために利用可能である。発現のために利用可能な細胞種として、それだけには限らないが、組換えファージＤＮＡ、プラスミドＤＮＡ又はコスミドＤＮＡ発現ベクターで形質転換された細菌、例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）及びＢ．スブチリス（ｓｕｂｔｉｌｉｓ）が挙げられる。これらのベクターのいずれも、ポリマーを使用してパッケージングされ、送達され得るということが認められる。

【０２２０】

哺乳動物細胞において使用するための発現ベクターは、普通、複製起点（必要に応じて）、発現される発現遺伝子の前に位置するプロモーターを、任意の必要なリボソーム結合部位、ＲＮＡスプライス部位、ポリアデニル化部位及び転写終結配列とともに含む。複製起点は、例えば、ＳＶ４０又は他のウイルス（例えば、ポリオーマ、アデノ、ＶＳＶ、ＢＰＶ）供給源に由来し得る外因性起点を含むようなベクターの構築によって提供され得る又は宿主細胞染色体複製機序によって提供され得る。ベクターが宿主細胞染色体中に組み込まれる場合には、後者は、十分であることが多い。

【０２２１】

プロモーターは、哺乳動物細胞のゲノムに（例えば、メタロチオネインプロモーター）又は哺乳動物ウイルスに（例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス７．５Ｋプロモーター）由来し得る。さらに、通常、所望の遺伝子配列と関連するプロモーター又は制御配列を、このような制御配列が宿主細胞系と適合するという条件で利用することも可能であり、望ましい場合がある。

【０２２２】

いくつかのウイルスベースの発現系が利用され得る、例えば、一般に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス２、サイトメガロウイルス及びサルウイルス４０（ＳＶ４０）に由来する。ＳＶ４０の初期及び後期プロモーターは、両方ともＳＶ４０ウイルス性複製起点も含有するウイルスから断片として容易に得られるので有用である。より小さい又はより大きいＳＶ４０断片も、ウイルス複製起点に位置するＨｉｎｄＩＩＩ部位からＢｇｌＩ部位に伸びるおよそ２５０ｂｐの配列が含まれるという条件で、使用され得る。

【０２２３】

アデノウイルスが発現ベクターとして使用される場合には、コード配列は、アデノウイルス転写／翻訳制御複合体、例えば、後期プロモーター及び三要素リーダー配列にライゲートされ得る。このキメラ遺伝子は、次いで、インビトロ又はインビボ組換えによってアデノウイルスゲノム中に挿入され得る。ウイルスゲノムの非必須領域（例えば、Ｅ１又はＥ３領域）中の挿入は、感染宿主において生存可能であり、タンパク質を発現可能である

組換えウイルスをもたらす。
【０２２４】
特定の開始シグナルもまた、組成物の効率的な翻訳のために必要とされ得る。これらのシグナルには、ＡＴＧ開始コドン及び隣接する配列が含まれる。ＡＴＧ開始コドンを含む外因性翻訳制御シグナルが提供されることはさらに必要であり得る。当業者は、この必要性を容易に判断し、必要なシグナルを提供することが可能である。開始コドンは、全挿入部分の翻訳を確実にするためには所望のコード配列のリーディングフレームとインフレーム（又はインフェーズ（ｉｎ－ｐｈａｓｅ）でなければならないということは周知である。これらの外因性翻訳制御シグナル及び開始コドンは、天然及び合成両方のさまざまな起源のものであり得る。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメント又は転写ターミネーターを含めることによって増強され得る。
【０２２５】
真核生物の発現では、通常、適切なポリアデニル化部位を、元のクローニングされたセグメント内に含まれていない場合、転写ユニット中に組み込むことが望ましい。通常、ポリＡ付加部位は、転写終結の前の位置にタンパク質の終結部位の約３０～２０００ヌクレオチド「下流」に配置される。
【０２２６】
好ましい実施形態では、ポリヌクレオチドカーゴは、ＲＮＡ、例えば、ｍＲＮＡである。ｍＲＮＡは、目的のポリペプチドをコードできる。
【０２２７】
一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、５’末端及び／又は３’ポリ（Ａ）にキャップを有し、これによって、細胞においてリボソーム結合、翻訳の開始及び安定性ｍＲＮＡを調節できる。
【０２２８】
一部の実施形態では、抗原は、ポリペプチド、例えば、タンパク質抗原の形態である。したがって、一部の実施形態では、ポリマーは、インビボで１つ以上の細胞中へ送達するためのポリペプチドを含む。ポリペプチドは、任意のポリペプチドであり得る。例えば、ポリペプチドは、生物に治療効果又は予防効果を提供するポリペプチド又は生物において疾患若しくは障害を診断するために使用され得るポリペプチドであり得る。例えば、がん、自己免疫障害、寄生生物性、ウイルス性、細菌性、真菌性又はその他の感染症の処置のために、発現されるポリヌクレオチド（複数可）は、免疫系の細胞のリガンド若しくは受容体として機能するポリペプチドをコードし得る又は生物の免疫系を刺激又は阻害するように機能し得る。
【０２２９】
１．病原体
抗原は、通常、１つ以上の病原体、例えば、気道の病原体から得られる又は１つ以上の病原体、例えば、気道の病原体に対する防御的免疫応答を引き起こす。一部の実施形態では、抗原はウイルス抗原である。ウイルス抗原は、任意のウイルスから単離され得る。例示的な実施形態では、抗原は、天然ウイルスカプシド構造である。
【０２３０】
一部の実施形態では、抗原は、細菌性抗原である。細菌性抗原は、任意の細菌を起源とし得る。一部の実施形態では、抗原は、寄生生物抗原である。一部の実施形態では、抗原は、アレルゲン又は環境抗原である。例示的アレルゲン及び環境抗原として、それだけには限らないが、天然に存在するアレルゲン、例えば、花粉アレルゲン（樹木、草本、雑草、及び牧草花粉アレルゲン）、昆虫アレルゲン（吸入抗原、唾液及び毒液アレルゲン）、動物の毛及びフケアレルゲン及び食物アレルゲンに由来する抗原が挙げられる。一部の実施形態では、抗原は、例えば、自己免疫又は関連障害、例えば、多発性硬化症のための免疫寛容適用における自己抗原である。一部の実施形態では、抗原は腫瘍抗原である。例示的腫瘍抗原として、腫瘍関連又は腫瘍特異的抗原が挙げられる。好ましい抗原には、呼吸器病原体、例えば、コロナウイルス及びインフルエンザウイルスから得られるウイルス性

抗原が含まれる。

【０２３１】

一部の実施形態では、抗原は、粘膜病原体、例えば、ウイルス、細菌、線虫、原生動物、真菌又は粘膜表面を介して身体に侵入及び／若しくは感染する他の病原体から得られた抗原であり、又は粘膜病原体、例えば、ウイルス、細菌、線虫、原生動物、真菌又は粘膜表面を介して身体に侵入及び／若しくは感染する他の病原体に対する免疫学的応答を引き起こす。

【０２３２】

ａ．ウイルス抗原

一部の実施形態では、抗原は、それだけには限らないが、以下のウイルス科：アレナウイルス科（Ａｒｅｎａｖｉｒｉｄａｅ）、アルテリウイルス（Ａｒｔｅｒｉｖｉｒｕｓ）、アストロウイルス科（Ａｓｔｒｏｖｉｒｉｄａｅ）、バキュロウイルス科（Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｉｄａｅ）、バドナウイルス（Ｂａｄｎａｖｉｒｕｓ）、バルナウイルス科（Ｂａｒｎａｖｉｒｉｄａｅ）、ビルナウイルス科（Ｂｉｒｎａｖｉｒｉｄａｅ）、ブロモウイルス科（Ｂｒｏｍｏｖｉｒｉｄａｅ）、ブニヤウイルス科（Ｂｕｎｙａｖｉｒｉｄａｅ）、カリシウイルス科（Ｃａｌｉｃｉｖｉｒｉｄａｅ）、カピロウイルス（Ｃａｐｉｌｌｏｖｉｒｕｓ）、カルラウイルス（Ｃａｒｌａｖｉｒｕｓ）、カリモウイルス（Ｃａｕｌｉｍｏｖｉｒｕｓ）、サーコウイルス科（Ｃｉｒｃｏｖｉｒｉｄａｅ）、クロステロウイルス（Ｃｌｏｓｔｅｒｏｖｉｒｕｓ）、コモウイルス科（Ｃｏｍｏｖｉｒｉｄａｅ）、コルチコウイルス科（Ｃｏｒｔｉｃｏｖｉｒｉｄａｅ）、シストウイルス科（Ｃｙｓｔｏｖｉｒｉｄａｅ）、デルタウイルス（Ｄｅｌｔａｖｉｒｕｓ）、ダイアンソウイルス（Ｄｉａｎｔｈｏｖｉｒｕｓ）、エナモウイルス（Ｅｎａｍｏｖｉｒｕｓ）、フィロウイルス科（Ｆｉｌｏｖｉｒｉｄａｅ）（例えば、マールブルグウイルス及びエボラウイルス（例えば、ザイール（Ｚａｉｒｅ）、レストン（Ｒｅｓｔｏｎ）、アイボリーコースト（Ｉｖｏｒｙ　Ｃｏａｓｔ）又はスーダン（Ｓｕｄａｎ）株））、フラビウイルス科（Ｆｌａｖｉｖｉｒｉｄａｅ）、（例えば、Ｃ型肝炎ウイルス、デングウイルス１、デングウイルス２、デングウイルス３及びデングウイルス４）、ヘパドナウイルス科（Ｈｅｐａｄｎａｖｉｒｉｄａｅ）、ヘルペスウイルス科（Ｈｅｒｐｅｓｖｉｒｉｄａｅ）（例えば、ヒトヘルペスウイルス１、３、４、５及び６並びにサイトメガロウイルス）、ハイポウイルス科（Ｈｙｐｏｖｉｒｉｄａｅ）、イリドウイルス科（Ｉｒｉｄｏｖｉｒｉｄａｅ）、レビウイルス科（Ｌｅｖｉｖｉｒｉｄａｅ）、リポスリクスウイルス科（Ｌｉｐｏｔｈｒｉｘｖｉｒｉｄａｅ）、ミクロウイルス科（Ｍｉｃｒｏｖｉｒｉｄａｅ）、オルトミクソウイルス科（Ｏｒｔｈｏｍｙｘａｖｉｒｉｄａｅ）（例えば、インフルエンザウイルスＡ及びＢ及びＣ）、パポバウイルス科（Ｐａｐｏｖａｖｉｒｉｄａｅ）、パラミクソウイルス科（例えば、麻疹、ムンプス及びヒト呼吸器合胞体ウイルス）、パルボウイルス科（Ｐａｒｖｏｖｉｒｉｄａｅ）、ピコルナウイルス科（Ｐｉｃｏｒｎａｖｉｒｉｄａｅ）（例えば、ポリオウイルス、ライノウイルス、ヘパトウイルス及びアフトウイルス）、ポックスウイルス科（Ｐｏｘｖｉｒｉｄａｅ）（例えば、ワクシニア及び天然痘ウイルス）、レオウイルス科（Ｒｅｏｖｉｒｉｄａｅ）（例えば、ロタウイルス）、レトロウイルス科（Ｒｅｔｒｏｖｉｒｉｄａｅ）（例えば、レンチウイルス、例えば、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）１及びＨＩＶ２）、ラブドウイルス科（例えば、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルスなど）、トガウイルス科（Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅ）（例えば、風疹ウイルス、デングウイルスなど）及びトティウイルス科（Ｔｏｔｉｖｉｒｉｄａｅ）のいずれかからのウイルスを含むウイルスから単離されたウイルス抗原である。適したウイルス抗原はまた、デングタンパク質Ｍ、デングタンパク質Ｅ、デングＤ１ＮＳ１、デングＤ１ＮＳ２及びデングＤ１ＮＳ３のすべて又は一部を含む。

【０２３３】

ウイルス抗原は、特定の株、例えば、パピローマウイルス、ヘルペスウイルス、例えば、単純ヘルペス１及び２；肝炎ウイルス、例えば、肝炎Ａウイルス（ＨＡＶ）、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）、Ｄ型デルタ肝炎ウイルス（ＨＤＶ）

、Ｅ型肝炎ウイルス（ＨＥＶ）及びＧ型肝炎ウイルス（ＨＧＶ）、ダニ媒介脳炎ウイルス；パラインフルエンザ、水痘帯状疱疹、サイトメガロウイルス（ｃｙｔｏｍｅｇｌａｖｉｒｕｓ）、エプスタイン・バー、ロタウイルス、ライノウイルス、アデノウイルス、コクサッキーウイルス、ウマ脳炎、日本脳炎、黄熱、リフトバレー熱及びリンパ球性脈絡髄膜炎に由来するものである場合がある。

【０２３４】

例示的ウイルス抗原として、アデノウイルスのＥ１Ａ、Ｅ１Ｂ、Ｅ２、Ｅ３、Ｅ４、Ｅ５、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、Ｌ４、Ｌ；ニューモウイルス科（Ｐｎｅｕｍｏｎｏｖｉｒｉｄａｅ）（例えば、ニューモウイルス、ヒト呼吸器合胞体ウイルス）：パポバウイルス科（Ｐａｐｏｖａｖｉｒｉｄａｅ）（ポリオーマウイルス及びパピローマウイルス）：Ｅ１、Ｅ２、Ｅ３、Ｅ４、Ｅ５ａ、Ｅ５ｂ、Ｅ６、Ｅ７、Ｅ８、Ｌ１、Ｌ２；ヒト呼吸器合胞体ウイルス：ヒト呼吸器合胞体ウイルス：Ｇ糖タンパク質、ＲＳＶ－ウイルスタンパク質、例えば、ＲＳＶ　Ｆ糖タンパク質；デングウイルス：デングウイルスのコアタンパク質、マトリックスタンパク質又は他のタンパク質；麻疹：麻疹ウイルス血球凝集素；ヘルペスウイルス科（例えば、単純ヘルペスウイルス１、単純ヘルペスウイルス２、単純ヘルペスウイルス５及び単純ヘルペスウイルス６：単純ヘルペスウイルス２型糖タンパク質ｇＢ、ｇＢ、ｇＣ、ｇＤ及びｇＥ、ＨＩＶ（ＧＰ－１２０、ｐ１７、ＧＰ－１６０、ｇａｇ、ｐｏ１、ｑｐ４１、ｇｐ１２０、ｖｉｆ、ｔａｔ、ｒｅｖ、ｎｅｆ、ｖｐｒ、ｖｐｕ、ｖｐｘ抗原）、リボヌクレオチドレダクターゼ、α－ＴＩＦ、ＩＣＰ４、ＩＣＰ８、１ＣＰ３５、ＬＡＴ関連タンパク質、ｇＢ、ｇＣ、ｇＤ、ｇＥ、ｇＨ、ｇＩ、ｇＪ及びｄＤ抗原；レンチウイルス（例えば、ヒト免疫不全ウイルス１及びヒト免疫不全ウイルス２）：ＨＩＶ　Ｉピコルナウイルス科（Ｐｉｃｏｒｎａｖｉｒｉｄａｅ）（例えば、エンテロウイルス、ライノウイルス、ヘパトウイルス（例えば、ヒトＡ型肝炎ウイルス）のエンベロープ糖タンパク質；カルジオウイルス；アフトウイルス（Ａｐｔｈｏｖｉｒｕｓ）；レオウイルス科（オルトレオウイルス、オルビウイルス、ロタウイルス、サイポウイルス、フィジーウイルス（ｆｉｊｉｖｉｒｕｓ）、フィトレオウイルス（ｐｈｙｔｏｒｅｏｖｉｒｕｓ）及びオリザウイルス（ｏｒｙｚａｖｉｒｕｓ））、レトロウイルス科（Ｒｅｔｒｏｖｉｒｉｄａｅ）（哺乳動物Ｂ型レトロウイルス、哺乳動物Ｃ型レトロウイルス、鳥類Ｃ型レトロウイルス、Ｄ型レトロウイルスグループ、ＢＬＶ－ＨＴＬＶレトロウイルス）；スプーマウイルス、フラビウイルス科（例えば、Ｃ型肝炎ウイルス）、ヘパドナウイルス科（Ｈｅｐａｄｎａｖｉｒｉｄａｅ）（例えば、Ｂ型肝炎ウイルス）、トガウイルス科（例えば、アルファウイルス（例えば、シンドビスウイルス）及びルビウイルス（例えば、風疹ウイルス）、ラブドウイルス科（例えば、ベジクロウイルス、リッサウイルス、エフェメロウイルス、サイトラブドウイルス（ｃｙｔｏｒｈａｂｄｏｖｉｒｕｓ）及びネクレオラブドウイルス（ｎｅｃｌｅｏｒｈａｂｄｏｖｉｒｕｓ））、アレナウイルス科（Ａｒｅｎａｖｉｒｉｄａｅ）（例えば、アレナウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、イッピイ（Ｉｐｐｙ）ウイルス及びラッサ熱ウイルス）及びコロナウイルス科（例えば、コロナウイルス及びトロウイルス）；ポリオウイルス：Ｉ　ＶＰ１；Ｂ型肝炎ウイルス：Ｂ型肝炎表面抗原Ｂ型肝炎ウイルスコアタンパク質及び／又はＢ型肝炎ウイルス表面抗原又はその断片又は誘導体、肝炎（Ｈｅｐ　Ｂ表面抗原（ｇｐ２７Ｓ、ｇｐ３６Ｓ、ｇｐ４２Ｓ、ｐ２２ｃ、ｐｏｌ、ｘ））が挙げられる。さらなるウイルスとして、エボラ、マールブルグ、狂犬病、ハンタウイルス感染、ウエストナイルウイルス、ＳＡＲＳ様コロナウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、エプスタイン－バーウイルス、アルファウイルス、セントルイス脳炎、アデノウイルス科（Ａｄｅｎｏｖｉｒｄｉａｅ）（マストアデノウイルス及びアビアデノウイルス）、レビウイルス科（レビウイルス、腸内細菌フェーズＭＳ２、アロレビウイルス（ａｌｌｏｌｅｖｉｒｕｓ））、ポックスウイルス科（Ｐｏｘｙｉｒｉｄａｅ）（例えば、コードポックスウイルス亜科（ｃｈｏｒｄｏｐｏｘｙｉｒｉｎａｅ）、パラポックスウイルス、トリポックスウイルス、カプリポックスウイルス、レポリポックスウイルス、ブタポックスウイルス、モルシポックスウイルス及びエントモポックスウイルス亜科（ｅｎｔｏｍｏｐｏｘｙｉｒｉｎａｅ））、パポバウイルス科（ポリオーマウイルス及び

パピローマウイルス）；パラミクソウイルス科（パラミクソウイルス、パラインフルエンザウイルス１）、モルビリウイルス（Ｍｏｂｉｌｌｉｖｉｒｕｓ）（麻疹ウイルス）、ルブラウイルス（ムンプスウイルス）、メタニューモウイルス（例えば、鳥類ニューモウイルス及びヒトメタニューモウイルス）；仮性狂犬病：仮性狂犬病ウイルスｇ５０（ｇｐＤ）、仮性狂犬病ウイルスＩＩ（ｇｐＢ）、仮性狂犬病ウイルスｇＩＩＩ（ｇｐＣ）、仮性狂犬病ウイルス糖タンパク質Ｈ、仮性狂犬病ウイルス糖タンパク質Ｅ；伝染性胃腸炎糖タンパク質１９５、伝染性胃腸炎マトリックスタンパク質を含む伝染性胃腸炎；ニューカッスル病ウイルス血球凝集素－ノイラミニダーゼを含むニューカッスルウイルス；感染性喉頭気管炎ウイルス糖タンパク質Ｇ又は糖タンパク質１などのウイルス抗原を含む感染性喉頭気管炎ウイルス；ラクロスウイルスの糖タンパク質などのウイルス抗原を含むラクロスウイルスが挙げられる。

【０２３５】

ｉ．コロナウイルス抗原

一部の実施形態では、抗原は、１つ以上のコロナウイルスに由来する。コロナウイルス（ニドウイルス目（Ｎｉｄｏｖｉｒａｌｅｓ）、コロナウイルス科（Ｃｏｒｏｎａｖｉｒｉｄａｅ）及びコロナウイルス属（Ｃｒｏｎａｖｉｒｕｓ））は、ヒト及び他の動物において呼吸器及び腸疾患を引き起こす、大型のエンベロープ型プラス鎖ＲＮＡウイルスの多様なグループである。

【０２３６】

コロナウイルスは、通常、狭い宿主特異性を有し、多数の動物において重症疾患を引き起こす可能性があり、感染性気管支炎ウイルス、ネコ感染性腹膜炎ウイルス及び伝染性胃腸炎ウイルスを含むいくつかのウイルスは、重要な獣医学病原体である。ヒトコロナウイルス（ＨＣｏＶ）は、グループ１（ＨＣｏＶ－２２９Ｅ）及びグループ２（ＨＣｏＶ－ＯＣ４３）の両方に見出され、歴史的に軽度の上気道疾病の約３０％を占める。

【０２３７】

約３０，０００ヌクレオチドで、そのゲノムは、ＲＮＡウイルスのいずれかにおいて見られる最大のものである。コロナウイルスの３つのグループがある；グループ１及び２は、哺乳動物ウイルスを含有し、グループ３は、鳥類ウイルスのみを含有する。各グループ内で、コロナウイルスは、宿主域、抗原関係性及びゲノム構成によって別個の種に分類される。ゲノム構成は、コロナウイルスの典型的なものであり、特徴的な遺伝子順序（５’－レプリカーゼ［ｒｅｐ］、スパイク［Ｓ］、エンベロープ［Ｅ］、膜［Ｍ］、ヌクレオカプシド［Ｎ］－３’）及び両末端の短い非翻訳領域を有する。ゲノムのおよそ３分の２を含むＳＡＲＳ－ＣｏＶ　ｒｅｐ遺伝子は、２つのポリタンパク質をコードし（ＯＲＦ１ａ及びＯＲＦ１ｂによってコードされる）、これらは、同時翻訳的タンパク質分解プロセシングを受ける。ｒｅｐの下流に、構造タンパク質Ｓ、Ｅ、Ｍ及びＮをコードすると予測される４つのオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）があり、これらはすべての既知コロナウイルスに共通である。

【０２３８】

一部の実施形態では、抗原は、亜属サルベコウイルスの重症急性呼吸器症候群コロナウイルス－２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）ベータコロナウイルス由来の抗原である。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスは、２００３年に同定されたＳＡＲＳ－ＣｏＶウイルスと、およそ７９％のゲノム配列同一性を共有する。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＯＲＦ１ａ／ｂ遺伝子の例示的核酸配列は、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＭＮ９０８９４７．３に示されている。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスのゲノム構成は、他のベータコロナウイルスと共有され、６つの機能的オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）は、５’から３’に、レプリカーゼ（ＯＲＦ１ａ／ＯＲＦ１ｂ）、スパイク（Ｓ）、エンベロープ（Ｅ）、膜（Ｍ）及びヌクレオカプシド（Ｎ）の順序で配置されている。さらに、アクセサリータンパク質をコードする７つの推定ＯＲＦが構造遺伝子の間に散在している。

【０２３９】

一部の好ましい実施形態では、抗原は、構造（Ｓ、Ｅ、Ｍ、Ｎ）又は非構造（ＮＳＰ）

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質をコードする遺伝子のうち１つ以上に由来する１つ以上のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２抗原を含む。一部の実施形態では、抗原は、複数の異なるコロナウイルスの間で保存されているＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ゲノム中の選択されたエピトープを有する、１つ以上のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２遺伝子又は遺伝子発現産物を含む。さらに好ましい実施形態では、抗原は、１つ以上の構造（Ｓ、Ｍ、Ｎ）及び非構造（ＮＳＰ）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質を含み、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ゲノムの保存された領域中に選択されたエピトープを有し、１つ以上のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２抗原に対して特異的な免疫応答を誘発する。一部の実施形態では、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｂ．１．１．７（アルファバリアント）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｂ．１．３５１（ベータバリアント）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｐ．１（ガンマバリアント）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｂ．１．６１７、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｂ．１．６１７．１（カッパバリアント）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｂ．１．６２１（ミューバリアント）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｂ．１．６１７．２（デルタバリアント）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｂ．１．６１７．３及びＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｂ．１．１．５２９（オミクロンバリアント）から選択される。

【０２４０】

ｉｉ．インフルエンザウイルス抗原

一部の実施形態では、抗原は、インフルエンザウイルス抗原である。インフルエンザウイルス抗原は、特定のインフルエンザクレード又は株に由来する場合がある又は複数の異なるインフルエンザウイルス株の間で高度に保存されたエピトープと対応するように設計された合成抗原である場合がある。

【０２４１】

４つの種類のインフルエンザウイルス：Ａ、Ｂ、Ｃ及びＤがある。ヒトインフルエンザＡ及びＢウイルスは、疾患の季節的な流行を引き起こす。インフルエンザＡウイルスは、インフルエンザパンデミック、すなわち、インフルエンザ疾患の世界的な流行を引き起こすと知られている唯一のインフルエンザウイルスである。インフルエンザＣ型感染は、一般に、軽度の疾病を引き起こし、ヒトインフルエンザ流行を引き起こすとは考えられておらず、インフルエンザＤウイルスは、主にウシに影響を及ぼし、人々において感染し、疾病を引き起こすとは知られていない（ｗ．ｗ．ｗ．ｃｄｃ．ｇｏｖ／ｆｌｕ／ａｂｏｕｔ／ｖｉｒｕｓｅｓ／ｔｙｐｅｓ．ｈｔｍを参照されたい）。

【０２４２】

インフルエンザＡビリオンには、宿主細胞由来脂質膜から突出する、血球凝集素（ＨＡ）及びノイラミニダーゼ（ＮＡ）の糖タンパク質スパイクがおよそ４対１の比率でちりばめられている。少数のマトリックス（Ｍ２）イオンチャンネルが脂質エンベロープを横切り、１０１～１０２のＨＡ分子あたり１のＭ２チャンネルほどのＭ２：ＨＡ比率を有する。エンベロープ及びその３つの内在性膜タンパク質ＨＡ、ＮＡ及びＭ２が、ビリオンコアを囲むＭ１タンパク質のマトリックスを覆う。Ｍ１マトリックスの内部に、核外輸送タンパク質（ＮＥＰ；非構造タンパク質２、ＮＳ２とも呼ばれる）及びリボヌクレオタンパク質（ＲＮＰ）複合体が見い出され、これは、ヌクレオタンパク質（ＮＰ）でコーティングされたウイルスＲＮＡセグメント並びに２つの「ポリメラーゼ塩基性」及び１つの「ポリメラーゼ酸性」サブユニット（ＰＢ１、ＰＢ２及びＰＡ）から構成されるヘテロ三量体ＲＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼを含む。インフルエンザＢビリオンの構成は類似しており、４つのエンベロープタンパク質：ＨＡ、ＮＡと、Ｍ２の代わりにＮＢ及びＢＭ２を有する。したがって、一部の実施形態では、抗原は、任意のインフルエンザＡ又はＢウイルスのＨＡ、ＮＡ、Ｍ２、ＮＳ２、ＮＢ、ＰＢ１、ＰＢ２、ＰＡ又はＮＰ遺伝子のうち１つ以上に由来する。特定の実施形態では、抗原は、インフルエンザＡ又はＢウイルスのＮＰ遺伝子に由来する（Ｂｏｕｖｉｅｒ　ａｎｄ　Ｐａｌｅｓｅ　Ｐ、Ｖａｃｃｉｎｅ．２００８年；２６　付録４（付録４）：Ｄ４９－Ｄ５３．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｖａｃｃｉｎｅ．２００８．０７．０３９）。

【０２４３】

インフルエンザＡ及びＢウイルスゲノムは各々、８のマイナス鎖一本鎖ウイルスＲＮＡ（ｖＲＮＡ）セグメントを含み、一方でインフルエンザＣウイルスは、７つのセグメントのゲノムを有する。インフルエンザＡ及びＢウイルスの８つのセグメント（及びインフルエンザＣウイルスの７つのセグメント）は、長さが減少する順に番号付けされている。インフルエンザＡ及びＢウイルスでは、セグメント１、３、４及び５は、セグメントあたりちょうど１つのタンパク質：ＰＢ２、ＰＡ、血球凝集素（ＨＡ）及びヌクレオタンパク質（ＮＰ）タンパク質をコードする。すべてのインフルエンザウイルスは、セグメント２上にポリメラーゼサブユニットＰＢ１をコードし、インフルエンザＡウイルスの一部の株では、このセグメントはまた、＋１代替リーディングフレームでアポトーシス促進活性を有する小さい８７アミノ酸のタンパク質であるアクセサリータンパク質ＰＢ１－Ｆ２もコードする。インフルエンザＢ又はＣウイルスではＰＢ１－Ｆ２の類似物は同定されていない。逆に、インフルエンザＡウイルスのセグメント６は、ＮＡタンパク質のみをコードするが、インフルエンザＢウイルスのものは、ＮＡタンパク質と、－１代替リーディングフレームで、インフルエンザＡウイルスＭ２タンパク質に相当する膜内在性タンパク質であるＮＢマトリックスタンパク質の両方をコードする。インフルエンザＡ及びＢウイルス両方のセグメント７は、Ｍ１マトリックスタンパク質をコードする。インフルエンザＡゲノムでは、ＲＮＡスプライシングによって、Ｍ２イオンチャンネルもセグメント７から発現され、一方でインフルエンザＢウイルスは、＋２代替リーディングフレームでそのＢＭ２膜タンパク質をコードする。最後に、インフルエンザＡ及びＢウイルスの両方は、インターフェロン－アンタゴニストＮＳ１タンパク質を、ｍＲＮＡスプライシングによって、宿主細胞核からのウイルスＲＮＰ輸送に関与するＮＥＰ／ＮＳ２を発現する単一ＲＮＡセグメントであるセグメント８を有する。インフルエンザＡウイルスは、ウイルスの表面上の血球凝集素（Ｈ）及びノイラミニダーゼ（Ｎ）タンパク質に基づいてサブタイプに分けられる。１８の異なる血球凝集素サブタイプ及び１１の異なるノイラミニダーゼサブタイプがある（それぞれＨ１からＨ１８及びＮ１からＮ１１）。したがって、一部の実施形態では、抗原は、Ｈ１からＨ１８のサブタイプのうち任意の１つ以上からのインフルエンザウイルスインフルエンザのＨＡ遺伝子に由来する。他の実施形態では、抗原は、Ｎ１からＮ１１サブタイプのうち任意の１つ以上からのインフルエンザウイルスのＮＡ遺伝子に由来する。潜在的に１９８種の異なるインフルエンザＡサブタイプの組合せが存在するが、自然界では１３１サブタイプのみが検出されている。人々の間で日常的に循環するインフルエンザＡウイルスの現在のサブタイプとして、Ａ（Ｈ１Ｎ１）及びＡ（Ｈ３Ｎ２）が挙げられる。したがって、一部の実施形態では、抗原は、Ａ（Ｈ１Ｎ１）インフルエンザウイルス又はＡ（Ｈ３Ｎ２）インフルエンザウイルスに由来する又はそれに対する免疫を提供する。一部の実施形態では、抗原は、すべてのＡ（Ｈ１Ｎ１）インフルエンザウイルスの間で保存されているか、及び／又はすべてのＡ（Ｈ１Ｎ１）インフルエンザウイルスに対する免疫を提供する。一部の実施形態では、抗原は、すべてのＡ（Ｈ３Ｎ２）インフルエンザウイルスの間で保存されているか、及び／又はすべてのＡ（Ｈ３Ｎ２）インフルエンザウイルスに対する免疫を提供する。好ましい実施形態では、抗原は、Ａ（Ｈ１Ｎ１）インフルエンザウイルス及びＡ（Ｈ３Ｎ２）インフルエンザウイルス両方の間で保存されているか、並びに／又はＡ（Ｈ１Ｎ１）インフルエンザウイルス及びＡ（Ｈ３Ｎ２）インフルエンザウイルス両方に対する免疫を提供する。

【０２４４】

インフルエンザＡウイルスは、複数のサブタイプ（例えば、Ｈ１Ｎ１又はＨ３Ｎ２）にさらに分類されるが、インフルエンザＢウイルスは、２つの系統：Ｂ／Ｙａｍａｇａｔａ及びＢ／Ｖｉｃｔｏｒｉａのうちの１つに分類される。インフルエンザＡ及びＢウイルス両方は、特定のクレード及びサブクレードにさらに分類され得る。クレード及びサブクレードは、代わりに、それぞれ「グループ」及び「サブグループ」と呼ばれることもある。インフルエンザクレード又はグループは、そのＨＡ遺伝子配列の類似性に基づいたインフルエンザウイルスのさらなる再区分（サブタイプ又は系統を超えた）である。クレード及びサブクレードは、普通、類似の遺伝子変化（すなわち、ヌクレオチド又はアミノ酸の変

化）を有し、樹のノードとして表される単一の共通祖先を有するウイルスのグループとして進化系統樹に示されている。他のものとは遺伝的に異なっているクレード及びサブクレードは、必ずしも抗原的に異なっているわけではない（すなわち、特定のクレード又はサブクレードからのウイルスは、他のクレード又はサブクレードと比較して、宿主免疫に影響を及ぼす変化を有さない場合もある）。一部の実施形態では、抗原は、同一サブタイプ及び／若しくはサブクレード内の２つ以上のインフルエンザウイルスの間で保存されている、並びに／又は同一サブタイプ及び／若しくはサブクレード内の２つ以上のインフルエンザウイルスに対する免疫を提供する。好ましい実施形態では、抗原は、異なるサブタイプ及び／若しくはサブクレード内の２つ以上のインフルエンザウイルスの間で保存されている、並びに／又は異なるサブタイプ及び／若しくはサブクレード内の２つ以上のインフルエンザウイルスに対する免疫を提供する。一部の実施形態では、抗原は、同一サブタイプ及び／若しくはサブクレード内のすべてのインフルエンザウイルスの間で保存されている、並びに／又は同一サブタイプ及び／若しくはサブクレード内のすべてのインフルエンザウイルスに対する免疫を提供する。好ましい実施形態では、抗原は、異なるサブタイプ及び／若しくはサブクレード内の複数のインフルエンザウイルスの間で保存されている、並びに／又は異なるサブタイプ及び／若しくはサブクレード内の複数のインフルエンザウイルスに対する免疫を提供する。

【０２４５】

現在、循環インフルエンザＡ（Ｈ１Ｎ１）ウイルスは、２００９年の春に出現し、インフルエンザパンデミックを引き起こしたパンデミック２００９　Ｈ１Ｎ１ウイルスと関連している（ｗ．ｗ．ｗ．ｃｄｃ．ｇｏｖ／ｆｌｕ／ａｂｏｕｔ／ｖｉｒｕｓｅｓ／ｔｙｐｅｓ．ｈｔｍを参照されたい）。このウイルスは、「Ａ（Ｈ１Ｎ１）ｐｄｍ０９ウイルス」又は「２００９　Ｈ１Ｎ１」として知られており、２００９年から２０２１年まで季節的に循環し続けた。これらのＨ１Ｎ１ウイルスは、比較的小さい遺伝子変化及びその抗原特性の変化を経時的に受けた。

【０２４６】

循環し、ヒト疾患を引き起こすインフルエンザウイルスのうち、インフルエンザＡ（Ｈ３Ｎ２）ウイルスは、遺伝的及び抗原的の両方でより急速に変化する傾向があり、共循環し続ける多数の別個の遺伝的に異なるクレードを形成した。したがって、一部の実施形態では、抗原は、すべての現在循環しているＨ１Ｎ１インフルエンザウイルスに由来し、及び／又はすべての現在循環しているＨ１Ｎ１インフルエンザウイルスに対する免疫を提供する。一部の実施形態では、抗原は、すべての現在循環しているＨ３Ｎ２インフルエンザウイルスに由来し、及び／又はすべての現在循環しているＨ３Ｎ２インフルエンザウイルスに対する免疫を提供する。好ましい実施形態では、抗原は、すべての現在循環しているＨ１Ｎ１インフルエンザウイルス及びＨ３Ｎ２インフルエンザウイルスに由来し、並びに／又はすべての現在循環しているＨ１Ｎ１インフルエンザウイルス及びＨ３Ｎ２インフルエンザウイルスに対する免疫を提供する。一部の実施形態では、抗原は、インフルエンザＡウイルスＮＰ遺伝子又はインフルエンザＡウイルスＮＰ遺伝子発現産物に由来する。

【０２４７】

インフルエンザＢウイルスは、２つの系統：Ｂ／Ｙａｍａｇａｔａ及びＢ／Ｖｉｃｔｏｒｉａに分類される。インフルエンザＢウイルスは、特定のクレード及びサブクレードにさらに分類される。インフルエンザＢウイルスは、インフルエンザＡウイルスよりも遺伝的及び抗原的特性の点でよりゆっくりと変化する。近年の監視データは、米国及び世界中での両系統由来のインフルエンザＢウイルスの共循環を示している。したがって、一部の実施形態では、抗原は、インフルエンザＢウイルスに由来し、及び／又はインフルエンザＢウイルスに対する免疫を提供する。一部の実施形態では、抗原は、すべての現在循環しているインフルエンザＢウイルスに由来し、及び／又はすべての現在循環しているインフルエンザＢウイルスに対する免疫を提供する。一部の実施形態では、抗原は、インフルエンザＢウイルスＮＰ遺伝子又はインフルエンザＢウイルスＮＰ遺伝子発現産物に由来する。

【０２４８】
一部の実施形態では、抗原は、Ｂ／Ｙａｍａｇａｔａ及びＢ／Ｖｉｃｔｏｒｉａインフルエンザウイルスに由来し、及び／又はＢ／Ｙａｍａｇａｔａ及びＢ／Ｖｉｃｔｏｒｉａインフルエンザウイルスに対する免疫を提供する。他の実施形態では、抗原は、１つ以上のＨ１Ｎ１インフルエンザウイルス及び１つ以上のインフルエンザＢウイルスに由来し、並びに／又は１つ以上のＨ１Ｎ１インフルエンザウイルス及び１つ以上のインフルエンザＢウイルスに対する免疫を提供する。他の実施形態では、抗原は、１つ以上のＨ３Ｎ２インフルエンザウイルス及び１つ以上のインフルエンザＢウイルスに由来し、並びに／又は１つ以上のＨ３Ｎ２インフルエンザウイルス及び１つ以上のインフルエンザＢウイルスに対する免疫を提供する。他の実施形態では、抗原は、１つ以上のＨ１Ｎ１インフルエンザウイルス、１つ以上のＨ３Ｎ２インフルエンザウイルス及び１つ以上のインフルエンザＢウイルスに由来し、並びに／又は１つ以上のＨ１Ｎ１インフルエンザウイルス、１つ以上のＨ３Ｎ２インフルエンザウイルス及び１つ以上のインフルエンザＢウイルスに対する粘膜免疫を提供する。
【０２４９】
例示的抗原として、インフルエンザウイルスのインフルエンザウイルス血球凝集素（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号ＪＯ２１３２；Ａｉｒ、１９８１、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７８：７６３９～７６４３頁；Ｎｅｗｔｏｎら、１９８３年、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　１２８：４９５～５０１頁）、インフルエンザウイルスノイラミニダーゼ、ＰＢ１、ＰＢ２、ＰＡ、ＮＰ、$Ｍ_1$、$Ｍ_2$、$ＮＳ_1$、$ＮＳ_2$））；ブタインフルエンザ血球凝集素及びブタインフルエンザノイラミニダーゼなどの抗原を含むブタインフルエンザが挙げられる。例示的ウマウイルスとして、ウマインフルエンザウイルス又はウマヘルペスウイルス：ウマインフルエンザウイルスＡ／Ａｌａｓｋａ　９１ノイラミニダーゼ型、ウマインフルエンザウイルスＡ／Ｍｉａｍｉ　６３ノイラミニダーゼ型、ウマインフルエンザウイルスＡ／Ｋｅｎｔｕｃｋｙ　８１ノイラミニダーゼ型が挙げられる。例示的ウシウイルスとして、ウシパラインフルエンザウイルス３融合タンパク質型及びウシパラインフルエンザウイルス３血球凝集素ノイラミニダーゼ型）が挙げられる。
【０２５０】
ｂ．細菌性病原体
一部の実施形態では、抗原は、細菌性抗原である。細菌性抗原は、それだけには限らないが、アクチノマイセス属（Ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｓ）、アナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）、バチルス属（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）、バクテロイデス属（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ）、デロビブリオ属（Ｂｄｅｌｌｏｖｉｂｒｉｏ）、ボルデテラ属（Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ）、ボレリア属（Ｂｏｒｒｅｌｉａ）、カンピロバクター属（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ）、カウロバクター属（Ｃａｕｌｏｂａｃｔｅｒ）、クラミジア属（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ）、クロロビウム属（Ｃｈｌｏｒｏｂｉｕｍ）、クロマチウム属（Ｃｈｒｏｍａｔｉｕｍ）、クロストリジウム属（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ）、コリネバクテリウム属（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、サイトファーガ属（Ｃｙｔｏｐｈａｇａ）、ディノコッカス属（Ｄｅｉｎｏｃｏｃｃｕｓ）、エシェリキア属（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）、フランシセラ属（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ）、ハロバクテリウム属（Ｈａｌｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、ヘリコバクター属（Ｈｅｌｉｏｂａｃｔｅｒ）、ヘモフィルス属（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ）、ヘモフィルス・インフルエンザＢ型（ＨＩＢ）、ハイフォミクロビウム属（Ｈｙｐｈｏｍｉｃｒｏｂｉｕｍ）、レジオネラ属（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ）、レプトスピラ属（Ｌｅｐｔｓｐｉｒｏｓｉｓ）、リステリア属（Ｌｉｓｔｅｒｉａ）、髄膜炎菌（Ｍｅｎｉｎｇｏｃｏｃｃｕｓ）Ａ、Ｂ及びＣ、メタノバクテリウム属（Ｍｅｔｈａｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、ミクロコッカス属（Ｍｉｃｒｏｃｏｃｃｕｓ）、マイコバクテリウム属（Ｍｙｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、マイコプラズマ属（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ）、ミキソコッカス属（Ｍｙｘｏｃｏｃｃｕｓ）、ナイセリア属（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ）、硝酸菌（Ｎｉｔｒｏｂａｃｔｅｒ）、オシラトリア属（Ｏｓｃｉｌｌａｔｏｒｉａ）、プロクロロン属（Ｐｒｏｃｈｌｏｒｏｎ）、プロテウス属（Ｐｒｏｔｅｕｓ）、シュードモナス属（Ｐ

ｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）、ロドスピリラム属（Ｐｈｏｄｏｓｐｉｒｉｌｌｕｍ）、リケッチア属（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ）、サルモネラ属（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）、シゲラ属（Ｓｈｉｇｅｌｌａ）、スピリルム属（Ｓｐｉｒｉｌｌｕｍ）、スピロヘータ属（Ｓｐｉｒｏｃｈａｅｔａ）、スタフィロコッカス属（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ）、ストレプトコッカス属（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）、ストレプトマイセス属（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ）、スルホロブス属（Ｓｕｌｆｏｌｏｂｕｓ）、サーモプラズマ属（Ｔｈｅｒｍｏｐｌａｓｍａ）、チオバチルス属（Ｔｈｉｏｂａｃｉｌｌｕｓ）及びトレポネーマ属（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ）、ビブリオ属（Ｖｉｂｒｉｏ）及びエルシニア属（Ｙｅｒｓｉｎｉａ）を含む任意の細菌を起源とし得る。

【０２５１】

一部の実施形態では、抗原性又は免疫原性タンパク質断片又はエピトープは、病原性細菌、例えば、炭疽菌；クラミジア：クラミジアプロテアーゼ様活性因子（ＣＰＡＦ）、主要外膜タンパク質（ＭＯＭＰ）；マイコバクテリア；レジオネラ（Ｌｅｇｉｏｎｉｅｌｌａ）：レジオネラペプチドグリカン関連リポタンパク質（ＰＡＬ）、ｍｉｐ、鞭毛、ＯｍｐＳ、ｈｓｐ６０、主要分泌タンパク質（ＭＳＰ）；ジフテリア（Ｄｉｐｔｈｅｒｉａ）：ジフテリア（ｄｉｐｔｈｅｒｉａ）毒素；ストレプトコッカス２４Ｍエピトープ；淋菌（Ｇｏｎｏｃｏｃｃｕｓ）：淋菌性ピリン；マイコプラズマ：マイコプラズマ・ハイオニューモニエ（ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ　ｈｙｏｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）；マイコバクテリウム・ツベルクローシス（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）：Ｍ．ツベルクローシス抗原８５Ａ、８５Ｂ、ＭＰＴ５１、ＰＰＥ４４、マイコバクテリア６５ｋＤａ熱ショックタンパク質（ＤＮＡ－ｈｓｐ６５）、６ｋＤａ早期分泌性抗原標的（ＥＳＡＴ－６）；サルモネラ・チフィ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｔｙｐｈｉ）；バシラス・アンスラシス（Ｂａｃｃｉｌｌｕｓ　ａｎｔｈｒａｃｉｓ）Ｂ．アンスラシス防御抗原（ＰＡ）；エルシニア・ペスティス（Ｙｅｒｓｉｎｉａ　ｐｅｒｓｔｉｓ）：Ｙ．ペスティス低カルシウム応答タンパク質Ｖ（ＬｃｒＶ）、Ｆ１及びＦ１－Ｖ融合タンパク質；フランシセラ・ツラレンシス（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ）；リケッチア・チフィ（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ　ｔｙｐｈｉ）；梅毒トレポネーマ（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ　ｐａｌｌｉｄｕｍ）；サルモネラ属：ＳｐａＯ及びＨ１ａ、外膜タンパク質（ＯＭＰ）；及びシュードモナス属：Ｐ．エルギノーサ（ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）ＯＭＰ、ＰｃｒＶ、ＯｐｒＦ、ＯｐｒＩ、ＰｉｌＡ及び突然変異ＴｏｘＡに由来する。

【０２５２】

ｃ．真菌性病原体

一部の実施形態では、抗原性又は免疫原性タンパク質断片又はエピトープは、病原性真菌に由来し、それだけには限らないが、コクシジオイデス・イミチス（Ｃｏｃｃｉｄｉｏｉｄｅｓ　ｉｍｍｉｔｉｓ）：コクシジオイデスＡｇ２／Ｐｒａ１０６、Ｐｒｐ２、ホスホリパーゼ（Ｐ１ｂ）、アルファ－マンノシダーゼ（Ａｍｎ１）、アスパルチルプロテアーゼ、Ｇｅｌ１；ブラストミセス・デルマチチジス（Ｂｌａｓｔｏｍｙｃｅｓ　ｄｅｒｍａｔｉｔｉｄｉｓ）：ブラストミセス・デルマチチジス表面アドヘシンＷＩ－１；クリプトコッカス・ネオフォルマンス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｎｅｏｆｏｒｍａｎｓ）：クリプトコッカス・ネオフォルマンスＧＸＭ及びそのペプチドミモトープ及びマンノプロテイン、クリプトスポリジウム属（Ｃｒｙｐｔｏｓｐｏｒｉｄｉｕｍ）の表面タンパク質ｇｐ１５及びｇｐ４０、Ｃｐ２３抗原、ｐ２３；Ｃ．アルビカンス（ａｌｂｉｃａｎｓ）、Ｃ．グラブラタ（ｇｌａｂｒａｔａ）、Ｃ．パラプシローシス（ｐａｒａｐｓｉｌｏｓｉｓ）、Ｃ．デュブリニエンシス（ｄｕｂｌｉｎｉｅｎｓｉｓ）、Ｃ．クルセイ（ｋｒｕｓｅｉ）などを含むカンジダ属の種；アスペルギルス属（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）の種：アスペルギルス属Ａｓｐ　ｆ　１６、Ａｓｐ　ｆ　２、Ｄｅｒ　ｐ　１及びＦｅｌ　ｄ　１、ロドレット（ｒｏｄｌｅｔ）Ａ、ＰＥＰ２、アスペルギルス属ＨＳＰ９０、９０ｋＤａカタラーゼを含む。

【０２５３】

ｄ．原生動物又は寄生生物病原体

一部の実施形態では、抗原性又は免疫原性タンパク質断片又はエピトープは、病原性原生動物に由来する。例示的原虫又は原生動物抗原として、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、プラスモディウムアピカル膜抗原１（ＡＭＡ１）、２５ｋＤａの有性段階タンパク質（Ｐｆｓ２５）、赤血球膜タンパク質１（ＰｆＥＭＰ１）スポロゾイト周囲タンパク質（ＣＳＰ）、メロゾイト表面タンパク質－１（ＭＳＰ１）；リーシュマニア属（Ｌｅｉｓｈｍａｎｉａ）の種：リーシュマニア属システインプロテイナーゼＩＩＩ型（ＣＰＣ）トリパノソーマ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍｅ）の種（アフリカのもの及びアメリカのもの）：梅毒トレポネーマ外膜リポタンパク質、トリパノソーマベーター－チュブリン（ＳＴＩＢ　８０６）、微小管結合タンパク質（ＭＡＰ　ｐ１５）、システインプロテアーゼ（ＣＰ）クリプトスポリジウム属；イソスポーラ属（ｉｓｏｓｐｏｒａ）の種；ネグレリア・フォーレリ（Ｎａｅｇｌｅｒｉａ　ｆｏｗｌｅｒｉ）；アカントアメーバ属（Ａｃａｎｔｈａｍｏｅｂａ）の種；バラムチア・マンドリルリス（Ｂａｌａｍｕｔｈｉａ　ｍａｎｄｒｉｌｌａｒｉｓ）；トキソプラズマ・ゴンディ（Ｔｏｘｏｐｌａｓｍａ　ｇｏｎｄｉｉ）又はニューモシスチス・カリニ（Ｐｎｅｕｍｏｃｙｓｔｉｓ　ｃａｒｉｎｉｉ）：ニューモシスチス・カリニ腫瘍表面糖タンパク質（ＭＳＧ）、ｐ５５抗原；バベシア属（Ｂａｂｅｓｉａ）住血吸虫症：マンソン住血吸虫症Ｓｍ１４、２１．７及びＳｍＦｉｍ抗原、テグメントタンパク質Ｓｍ２９、２６ｋＤａＧＳＴ、日本住血吸虫（Ｓｃｈｉｓｔｏｓｏｍａ　ｊａｐｏｎｉｃｕｍ）、ＳｊＣＴＰＩ、ＳｊＣ２３、Ｓｊ２２．７又はＳｊＧＳＴ－３２トキソプラズマ症：ゴンディ（ｇｏｎｄｉｉ）表面抗原１（ＴｇＳＡＧ１）、プロテアーゼ阻害剤－１（ＴｇＰＩ－１）、表面結合タンパク質ＭＩＣ２、ＭＩＣ３、ＲＯＰ２、ＧＲＡ１－ＧＲＡ７が挙げられる。

【０２５４】

２．腫瘍抗原

腫瘍抗原は、細胞表面分子を含み得る。既知構造の、既知又は記載された機能を有する腫瘍抗原として、以下の細胞表面受容体：ＨＥＲ１（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｕ４８７２２）、ＨＥＲ２（Ｙｏｓｈｉｎｏら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１５２：２３９３頁（１９９４）；）；ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｘ０３３６３及びＭ１７７３０）、ＨＥＲ３（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｕ２９３３９及びＭ３４３０９）、ＨＥＲ４（Ｐｌｏｗｍａｎら、Ｎａｔｕｒｅ、３６６：４７３（１９９３）；ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｌ０７８６８及びＴ６４１０５）、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｕ４８７２２及びＫＯ３１９３）、血管内皮細胞増殖因子（ＧｅｎＢａｎｋ番号Ｍ３２９７７）、血管内皮細胞増殖因子受容体（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＡＦ０２２３７５、１６８０１４３、Ｕ４８８０１及びＸ６２５６８）、インスリン様成長因子－Ｉ（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｘ００１７３、Ｘ５６７７４、Ｘ５６７７３、Ｘ０６０４３、欧州特許第ＧＢ２２４１７０３号明細書）、インスリン様成長因子－ＩＩ（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｘ０３５６２、Ｘ００９１０、Ｍ１７８６３及びＭ１７８６２）、トランスフェリン受容体（Ｔｒｏｗｂｒｉｄｇｅ　ａｎｄ　Ｏｍａｒｙ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．ＵＳＡ、７８：３０３９頁（１９８１）；ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｘ０１０６０及びＭ１１５０７）、エストロゲン受容体（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｍ３８６５１、Ｘ０３６３５、Ｘ９９１０１、Ｕ４７６７８及びＭ１２６７４）、プロゲステロン受容体（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｘ５１７３０、Ｘ６９０６８及びＭ１５７１６）、卵胞刺激ホルモン受容体（ＦＳＨ－Ｒ）（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｚ３４２６０及びＭ６５０８５）、レチノイン酸受容体（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｌ１２０６０、Ｍ６０９０９、Ｘ７７６６４、Ｘ５７２８０、Ｘ０７２８２及びＸ０６５３８）、ＭＵＣ－１（Ｂａｒｎｅｓら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８６：７１５９頁（１９８９）；ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｍ６５１３２及びＭ６４９２８）ＮＹ－ＥＳＯ－１（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＡＪ００３１４９及びＵ８７４５９）、ＮＡ　１７－Ａ（ＰＣＴ公開第９６／４００３９号）、Ｍｅｌａｎ－Ａ／ＭＡＲＴ－１（Ｋａｗａｋａｍｉら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９１：３５１５頁（１９９４）；ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｕ０６６５４及びＵ０６４５２）、チロシナーゼ（Ｔｏｐａｌｉａｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９１

：９４６１頁（１９９４）；ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｍ２６７２９；Ｗｅｂｅｒら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ、１０２：１２５８頁（１９９８））、Ｇｐ－１００（Ｋａｗａｋａｍｉら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９１：３５１５頁（１９９４）；ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｓ７３００３、Ａｄｅｍａら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２６９：２０１２６頁（１９９４））、ＭＡＧＥ（ｖａｎ ｄｅｎ Ｂｒｕｇｇｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２５４：１６４３頁（１９９１））；ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｕ９３１６３、ＡＦ０６４５８９、Ｕ６６０８３、Ｄ３２０７７、Ｄ３２０７６、Ｄ３２０７５、Ｕ１０６９４、Ｕ１０６９３、Ｕ１０６９１、Ｕ１０６９０、Ｕ１０６８９、Ｕ１０６８８、Ｕ１０６８７、Ｕ１０６８６、Ｕ１０６８５、Ｌ１８８７７、Ｕ１０３４０、Ｕ１０３３９、Ｌ１８９２０、Ｕ０３７３５及びＭ７７４８１）、ＢＡＧＥ（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｕ１９１８０；米国特許第５，６８３，８８６号明細書及び同５，５７１，７１１号明細書）、ＧＡＧＥ（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＡＦ０５５４７５、ＡＦ０５５４７４、ＡＦ０５５４７３、Ｕ１９１４７、Ｕ１９１４６、Ｕ１９１４５、Ｕ１９１４４、Ｕ１９１４３及びＵ１９１４２）、特に、ＳＳＸ２遺伝子（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｘ８６１７５、Ｕ９０８４２、Ｕ９０８４１及びＸ８６１７４）によってコードされるＨＯＭ－ＭＥＬ－４０抗原を含む受容体のＣＴＡクラスのいずれか、がん胎児性抗原（ＣＥＡ、Ｇｏｌｄ ａｎｄ Ｆｒｅｅｄｍａｎ、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．、１２１：４３９頁（１９８５））；ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｍ５９７１０、Ｍ５９２５５及びＭ２９５４０）並びにＰｙＬＴ（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｊ０２２８９及びＪ０２０３８）；ｐ９７（メラノトランスフェリン）（Ｂｒｏｗｎら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１２７：５３９～４６頁（１９８１））が挙げられる。

【０２５５】

追加の腫瘍関連抗原として、前立腺表面抗原（ＰＳＡ）（米国特許第６，６７７，１５７号明細書；同６，６７３，５４５号明細書）；β－ヒト絨毛性腺刺激ホルモンβ－ＨＣＧ）（ＭｃＭａｎｕｓら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．、３６：３４７６～８１頁（１９７６）；Ｙｏｓｈｉｍｕｒａら、Ｃａｎｃｅｒ、７３：２７４５～５２頁（１９９４）；Ｙａｍａｇｕｃｈｉら、Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ、６０：３８２～８４頁（１９８９）：Ａｌｆｔｈａｎら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．、５２：４６２８～３３頁（１９９２））；グリコシルトランスフェラーゼβ－１，４－Ｎ－アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ（ＧａｌＮＡｃ）（Ｈｏｏｎら、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ、４３：８５７～６２頁（１９８９）；Ａｎｄｏら、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ、４０：１２～１７頁（１９８７）；Ｔｓｕｃｈｉｄａら、Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ、７８：４５～５４頁（１９８７）；Ｔｓｕｃｈｉｄａら、Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ、７８：５５～６０頁（１９８７））；ＮＵＣ１８（Ｌｅｈｍａｎｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８６：９８９１～９５頁（１９８９）；Ｌｅｈｍａｎｎら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．、４７：８４１～４５頁（１９８７））；黒色腫抗原ｇｐ７５（Ｖｉｊａｙａｓａｒｄａｈｉら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．、１７１：１３７５～８０頁（１９９０）；ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｘ５１４５５）；ヒトサイトケラチン８；高分子量黒色腫抗原（Ｎａｔａｌｉら、Ｃａｎｃｅｒ、５９：５５～６３頁（１９８７）；ケラチン１９（Ｄａｔｔａら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．、１２：４７５～８２頁（１９９４））が挙げられる。

【０２５６】

３．ポリヌクレオチドのトランスフェクションのための組成物

ポリカチオンポリマーの遺伝子送達能は、ポリマー分子量、疎水性及び電荷密度を含む複数の因子によるということが発見された。多数の合成ポリカチオン材料が、非ウイルス性遺伝子送達のベクターとして試験されたが、その低い効率又は高い毒性のためにほとんどすべてが有効ではない。これまでに記載されたほとんどのポリカチオンベクターは、高い電荷密度を示し、これが有効なＤＮＡ凝縮の主要な必要条件と考えられてきた。結果として、それらは、インビトロで高効率で遺伝子を送達できるが、過剰の電荷密度と関連する毒性のためにインビボ適用については制限される。

【０２５７】

高分子量ポリマー、特に、ラクトンのジアルキルジエステル及びアミノジオールとのポリマー及び酵素によって触媒される共重合を使用してそれを作製する方法が開示される。これらのポリ（アミン－コ－エステル）ポリマーは、低い電荷密度を有する。さらに、その疎水性は、特定の環サイズを有するラクトンコモノマーを選択すること及びポリマー中のラクトン含量を調整することによって変えられる。ラクトン－ジエステル－アミノジオールポリマーの高分子量及び疎水性の増大は、低電荷密度を補い、最小の毒性しか伴わない効率的な遺伝子送達を提供する。

【０２５８】

好ましい実施形態では、ポリマーは、毒性が低減された効率的な遺伝子送達を示す。ポリマーは、著しくより効率的な市販の非ウイルス性ベクターであり得る。例えば、ポリマーは、ルシフェラーゼ発現アッセイに基づいて、市販の非ウイルス性ベクター、例えば、ＰＥＩ及びＬＩＰＯＦＥＣＴアミン（登録商標）２０００よりも１００倍より効率的である場合があり、最大０．５ｍｇ／ｍｌの用量の毒性で、これらの市販の非ウイルス性ベクターと比較して最小の毒性しか示さない。好ましくは、ポリマーは、核酸のインビトロ及びインビボ両方のトランスフェクションに適した濃度で非毒性である。例えば、一部の実施形態では、ポリマーは、細胞トランスフェクションの他のアプローチと比較して、少ない非特異的細胞死しか引き起こさない。

【０２５９】

以下により詳細に記載されるように、一部の実施形態では、ポリマーは、２０％　ＰＤＬを含有するω－ペンタデカラクトン－ジエチルセバケート－Ｎ－メチルジエタノールアミンポリマーである（ターポリマーＩＩＩ－２０％　ＰＤとも呼ばれる）。

【０２６０】

４．粒子のコーティング剤

ポリマーを使用するポリヌクレオチド送達の効率は、粒子表面上の正電荷によって影響を受け得る。例えば、＋８．９ｍＶの粒子のゼータ電位は、循環の間に血液中の負電荷を有する血漿タンパク質を誘引し、結合でき、細網内皮系（ＲＥＳ）による迅速なクリアランスにつながる。効率はまた、ナノ粒子の不安定性によって影響を受ける場合がある。例えば、以下の実施例において論じられるように、１０％の血清を含有するＮａＡｃ緩衝溶液中でインキュベートされた粒子は、１５分以内にサイズがほぼ２倍になり、７５分後に１０倍を超えて増大した。このサイズの増大の結果として、拡大された粒子は肝臓における取り込みにより循環から除去される可能性がある。したがって、一部の実施形態では、粒子は、ポリヌクレオチド送達効率を改善するために処置又はコーティングされる。一部の実施形態では、コーティングは、対照と比較して、粒子の細胞特異的標的化を改善する、安定性を改善する（すなわち、インビボで粒子のサイズを安定化する）、インビボで（すなわち、全身循環における）粒子の半減期を増大する、又はそれらの組合せ。一部の実施形態では、対照は、コーティングのない粒子である。

【０２６１】

腫瘍細胞を標的化するための例示的粒子コーティングとして、ポリＥ－ｍＲＧＤがある。本明細書で使用される場合、ポリＥ－ｍＲＧＤとは、３つのセグメント：生理学的ｐＨで負電荷を有し、したがって、粒子の正電荷を有する表面と静電結合可能であるポリグルタミン酸（ポリＥ）ストレッチを含む第１のセグメント；中性リンカーとして働く、中性ポリグリシンストレッチを含む第２のセグメント；並びにＲＧＤのα$_v$β$_3$及びα$_v$β$_5$との相互作用を介して腫瘍内皮に結合するＲＧＤ配列を含む第３のセグメントを含有する合成ペプチドを指す。

【０２６２】

以下により詳細に論じられるように、実施例において使用されるポリＥ－ｍＲＧＤは、ＩＩＩ－２０％　ＰＤＬ／ｐＬｕｃＤＮＡ粒子の表面電荷を反転させた。ポリＥ－ｍＲＧＤが５：１のペプチド／ＤＮＡ重量比率で添加される場合には、粒子のゼータ電位は、＋８．９ｍＶから－５．８ｍＶに変化した。ペプチドコーティングされた粒子は、１０％血清を含有するＮａＡｃ緩衝液中でのインキュベーションの際に安定であり、凝集に対して

耐性であり、これは、改変された粒子がインビボで循環の間のＲＥＳによるクリアランスを回避できることを示す。

【０２６３】

一実施形態では、ポリＥ－ｍＲＧＤは、配列ＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥＧＧＧＧＧＧＲＧＤＫ（配列番号１）又はＲＧＤＫＧＧＧＧＧＧ　ＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥ（配列番号２）又は配列番号１又は２に対して８５％、９０％、９５％又は９５％より高い配列同一性を有するそれらのバリアントを含む。

【０２６４】

インビボでそのサイズを維持する電荷中性又は負電荷を有する粒子を調製するために使用され得る別の例示的コーティングは、Ｈａｒｒｉｓら、Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ、３１：９９８～１００６頁（２０１０））に記載されており、非特異的全身投与のための、アミノ酸配列ＧＧＧＧＧＧＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥ（配列番号３、ポリＥ）、又は脾臓、脊椎、胸骨及び大腿骨への標的化を増大するポリカチオン配列を含有するアミノ酸配列ＧｄＰｄＬＧｄＶｄＲＧ－ＧＧＧＧＧＧ－ＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥ－ＣＯＮＨ２（配列番号４、ポリＥ－ｃａｔ）を挙げることができる。一部の実施形態では、コーティングに使用されるポリペプチドは、バリアント配列番号３又は４であり、配列番号３又は４に対して８５％、９０％、９５％又は９５％より高い配列同一性を有する。

【０２６５】

インビトロ研究は、免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）及び補体タンパク質Ｃ３のナノ粒子への吸着が、クップファー細胞によるその取り込みを増大し、血清中でのインキュベーションが、肝臓灌流後のインビボ肝臓取り込みを増大することを示した（Ｎａｇａｙａｍａら、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｐｈａｒｍ．、３４２：２１５～２１（２００７））。報告書はまた、ガラクトースが、アシアロ糖タンパク質受容体を介して肝細胞にポリマー遺伝子送達粒子を案内するために使用され得ることを示す（Ｚｈａｎｇら、Ｊ．Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ　Ｒｅｌｅａｓｅ、１０２：７４９～６３頁（２００５））。

【０２６６】

５．表面電荷を変更するための組成物

粒子のポリヌクレオチド送達効率は、粒子を生理学的ｐＨで負電荷を有する物質でコーティングすることによって改善され得る。好ましくは、負電荷を有する物質は、粒子の正電荷を有する表面に静電結合可能である。負電荷を有する物質は、粒子の電荷を中和できる又は粒子の電荷を反転できる。したがって、一部の実施形態では、負電荷を有する物質は、粒子に正味の負電荷を付与する。

【０２６７】

一部の実施形態では、負電荷を有する物質は、負電荷を有するポリペプチドである。例えば、ポリペプチドは、ポリペプチドの全体的な電荷が中性ｐＨで負であるように、アスパラギン酸、グルタミン酸又は組合せを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０個又は２０個より多いアスパラギン酸残基を含むポリアスパラギン酸ポリペプチドである。一部の実施形態では、ポリペプチドは、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０個又は２０個より多いグルタミン酸残基を含むポリグルタミン酸ポリペプチドである。他の負電荷を有する分子として、小分子（すなわち、１５００、１００、７５０又は５００ダルトン未満のＭＷ）、例えば、ヒアルロン酸が挙げられる。

【０２６８】

粒子の表面上の負電荷を増大することによって、より多く正電荷を有する粒子が、循環の間に血液中の負電荷を有する血漿タンパク質を誘引し、結合し、細網内皮系（ＲＥＳ）による迅速なクリアランスにつながる上記の負の相互作用を低減又は防止することができる。一部の実施形態では、粒子のゼータ電位は、約－１５ｍＶ～約１０ｍＶ、好ましくは、約－１５ｍＶ～約８ｍＶ、より好ましくは、約－１０ｍＶ～約８ｍＶ、より好ましくは、約－８ｍＶ～約８ｍＶである。ゼータ電位は、粒子が安定であり（すなわち、凝集しな

いなど）、血流から容易に除去されないという条件で、上記の範囲よりも負又は正であり得る。ゼータ電位は、表面電荷を変える１つ以上の部分で粒子表面をコーティングする又は官能化することによって操作され得る。あるいは、モノマー自体が官能化され得、及び／又はポリマー中に追加のモノマーが導入され、それによって表面電荷が変わる場合がある。

【０２６９】

６．標的化部分

一部の実施形態では、粒子は、細胞種又は細胞状態特異的標的化ドメイン又は標的化シグナルを含む。粒子に連結されていてもよく、粒子に連結されていなくてもよい部分の例として、例えば、特異的細胞への分子の送達を提供する標的化部分が挙げられる。標的化シグナル又は配列は、宿主、組織、臓器、細胞、オルガネラ、非核オルガネラ又は細胞コンパートメントに特異的であり得る。例えば、組成物を肝臓又は肝臓細胞に標的化するために、本明細書において組成物は、ガラクトシル終結高分子で改変され得る。改変された組成物は、肝細胞に、担体ガラクトース残基の、これらの細胞でのみ多量に、高親和性で存在するアシアロ糖タンパク質受容体との相互作用後に選択的に侵入する。さらに、本明細書における組成物は、他の特定の細胞内領域、コンパートメント又は細胞種に標的化され得る。

【０２７０】

一実施形態では、標的化シグナルは、例えば、ベクターの細胞中への浸透を可能にするためにベクター及び細胞膜を互いに十分に近接させるように、標的細胞の表面に位置するそのリガンド又は受容体に結合する。追加の実施形態は、ポリヌクレオチドを特定の組織又は細胞種に特異的に送達することを対象とし、ポリヌクレオチドは、ポリペプチドをコードし、異なるポリヌクレオチドの発現に干渉できる。細胞に送達されるポリヌクレオチドは、細胞の機能を増強できる又はそれに寄与できるポリペプチドをコードできる。

【０２７１】

標的化部分は、抗体又はその抗原結合性断片、抗体ドメイン、抗原、Ｔ細胞受容体、細胞表面受容体、細胞表面接着分子、主要組織適合性遺伝子座タンパク質、ウイルスエンベロープタンパク質及び定義される細胞に特異的に結合するファージディスプレイによって選択されるペプチドであり得る。

【０２７２】

当業者ならば、記載された粒子の指向性は、単に標的化シグナルを変更することによって変化され得ると理解する。哺乳動物生物中の組織中のほぼどの細胞種も、いくつかの特有の細胞表面受容体又は抗原を有することは、当技術分野で公知である。したがって、細胞表面受容体又は抗原のほぼどのようなリガンドも、標的化シグナルとして組み込むことが可能である。例えば、ペプチジルホルモンは、このようなホルモンの受容体を有する細胞への標的送達の標的化部分として使用され得る。ケモカイン及びサイトカインも、その標的細胞への複合体の標的送達の標的化シグナルとして同様に使用され得る。ある特定の細胞又は細胞状態において優先的に発現される遺伝子を同定するためのさまざまな技術が開発されており、当業者は、このような技術を使用して、目的の標的組織で優先的に又は特有に発現される標的化シグナルを同定できる。

【０２７３】

７．粒子のサイズ

小さい粒子サイズを維持することによって、肝臓によるクリアランスが制限され、粒子の標的細胞へのトランスフェクション能力が維持されるので、凝集に対する耐性は重要であり得る。したがって、好ましい実施形態では、粒子は、凝集に対して耐性である。好ましくは、コーティングあり又はなしの粒子は、半径が約１ｎｍ～１０００ｎｍの間、より好ましくは、半径が約１ｎｍ～約５００ｎｍの間、最も好ましくは、半径が約１５ｎｍ～約２５０ｎｍの間である。例えば、一部の実施形態では、ポリヌクレオチドが負荷されたコーティングされた粒子は、半径が約１５０ｎｍ～２７５ｎｍの間である。

【０２７４】

粒子のサイズを調整するために、ポリマー重量に対するポリヌクレオチド重量の比率（ポリヌクレオチド：ポリマー）、粒子コーティングの含量及び量又はそれらの組合せが使用され得る。

【０２７５】

例えば、以下の実施例は、一部の実施形態では、２５：１のポリマー対ＤＮＡ比率を用いた場合の粒子のトランスフェクション効率は、５０：１、１００：１、１５０：１及び２００：１のポリマー：ＤＮＡ比率を用いた場合の粒子のトランスフェクション効率よりも低いことを示す。特定の製剤のための最も好ましいポリマー：ポリヌクレオチド比率は、当技術分野で公知である方法、例えば、以下の実施例に記載されるものを使用して経験的に決定され得る。一般に、ポリマー：ポリヌクレオチドの重量：重量比率は、好ましくは、約１０：１よりも大きい、より好ましくは、約５０：１よりも大きい、最も好ましくは、約１００：１よりも大きい。ポリマー：ポリヌクレオチドの重量：重量比率は、好ましくは、約１０：１～５００：１の間、より好ましくは、約２５：１～２５０：１の間、最も好ましくは、約５０：１～１５０：１の間である。一部の実施形態では、ポリマー：ポリヌクレオチドの重量比率は、約１００：１である。好ましくは、粒子の形状は、球状である。

【０２７６】

実施例はまた、一部の実施形態では、コーティング剤分子対ポリヌクレオチド分子の比率（コーティング剤：ポリヌクレオチド）別の粒子のトランスフェクション効率を示す。比率は、重量別に表される。特定の製剤の最も好ましいコーティング剤：ポリヌクレオチド比率は、当技術分野で公知である方法、例えば、以下の実施例に記載されるものを使用して経験的に決定され得る。一般に、コーティング剤：ポリヌクレオチドの比率は、０より大きい、好ましくは、約５０：１より低い、より好ましくは、約２５：１より低い、最も好ましくは、約１０：１より低い。比率コーティング剤：ポリヌクレオチドは、好ましくは、約１：１～１０：１の間、より好ましくは、約２．５：１～７．５：１の間である。一部の実施形態では、コーティング剤：ポリヌクレオチドの比率は、約５：１である。１０：１、５：１及び２．５：１のコーティング剤：ポリヌクレオチドの比率はまた、本明細書においてそれぞれ、１０ｘ、５ｘ及び２．５ｘと呼ばれる。好ましくは、粒子の形状は、球状である。

【０２７７】

８．ＰＥＧブロッキング含有ポリマー

ポリマーは、薬物送達のために、例えば、制御放出方法で望ましい期間にわたって１つ以上の治療薬、予防薬及び／又は診断薬を放出できる、粒子、例えば、微粒子又はナノ粒子又はミセルの形成において使用され得る。

【０２７８】

ｐＨ応答性ミセルナノキャリアは、両親媒性ブロックコポリマーの自己組織化を介して形成されることが多く、中程度のｐＨに応答可能である親水性（例えば、ＰＥＧ）外側シェル及び疎水性内側コアを含む。通常、中程度のｐＨを中性又はわずかに塩基性から軽度に酸性に変更する際、ミセルコアは、加速された分解を受け、水に完全に可溶性になる又は水性媒体中で相当に膨潤する。結果として、生理学的ｐＨで遅い薬物放出速度を有する薬物が封入されたミセルは、酸性ｐＨによって薬物分子を迅速に負荷軽減するようにされ得る。これまでの報告書におけるミセルコアを構成するポリマーセグメントとして、ポリ（オルトエステル）、ポリ（β－アミノエステル）、ポリ（Ｌ－ヒスチジン）などが挙げられる。これまでのミセル系のほとんどの場合の主要な不利点は、コポリマーを調製するために必要な複数のステップ並びにポリマー分子量を制御すること及びコポリマー合成の際にポリマー組成を調整することの困難性である。

【０２７９】

コポリマーは、ｐＨの関数として放出の速度の変動を示した。ＰＥＧ２Ｋ－ＰＰＭＳコポリマー試料（ＰＥＧ２Ｋ－ＰＰＭＳ－１１％ＰＤＬ、ＰＥＧ２Ｋ－ＰＰＭＳ－３０％ＰＤＬ及びＰＥＧ２Ｋ－ＰＰＭＳ－５１％ＰＤＬ）のＤＴＸが封入されたミセルのインビト

口薬物放出挙動が、７．４の生理学的ｐＨ及び５．０の酸性ｐＨの両方でＰＢＳ溶液中で研究された。全般的に、すべてのミセル試料からのＤＴＸ放出は、二相性放出速度論をたどり、顕著なｐＨ依存を示した。ＤＴＸが負荷されたＰＥＧ２Ｋ－ＰＰＭＳコポリマーミセルは、２５～４５％の薬物を最初の１２時間の間に迅速に放出し、続いて、その後の１３２時間の間に追加の２５～４０％の薬物をより段階的に放出する。薬物放出速度に対する中程度のｐＨの影響は相当なものである。例えば、インキュベーション期間（１４４時間）の最後に、ＰＥＧ２Ｋ－ＰＰＭＳ－１１％ＰＤＬ、ＰＥＧ２Ｋ－ＰＰＭＳ－３０％ＰＤＬ及びＰＥＧ２Ｋ－ＰＰＭＳ－５１％ＰＤＬコポリマーのミセルから放出された蓄積されたＤＴＸの値は、７．４の生理学的ｐＨでそれぞれ６６％、６０％及び５５％であり、それらが、５．０の酸性ｐＨでは８５％、８１％及び７５％相当に増大する。観察されたｐＨによって引き起こされるＰＥＧ２Ｋ－ＰＰＭＳコポリマーミセルからのＤＴＸ放出の加速は、中程度のｐＨの７．４から５．０への変更が、ミセルＰＰＭＳコアのプロトン化及びサイズの増大によるミセルの著しい膨潤を引き起こすという初期の観察結果と一致する。このｐＨによって引き起こされるミセルサイズの拡大は、ミセルコアから水性媒体への封入されたＤＴＸの拡散及び放出を確実に促進する。所与のｐＨでは、ＤＴＸ放出速度は、ミセルコアにおける薬物とＰＰＭＳマトリックス間の相互作用によっておそらくは制御される。ＰＤＬリッチＰＥＧ２Ｋ－ＰＰＭＳコポリマーは、そのミセル内部コアにおいて強い疎水性ドメインを形成して、疎水性ＤＴＸ分子をより良好に捕捉し保持すると予測されるので、このようなコポリマーミセルからの薬物放出は、より緩やかで持続されるはずである。この仮説は、７．４及び５．０の両ｐＨで、ＰＥＧ２Ｋ－ＰＰＭＳコポリマーミセルからのＤＴＸ放出速度が、コポリマーのＰＰＭＳ鎖セグメント中のＰＤＬ含量が増大するにつれて低下するということを示す実験結果によって支持される。

【０２８０】

腫瘍細胞によるミセルの取り込みの際、ミセル粒子は、５．５～６．０の範囲のｐＨでエンドソームにおける捕捉に、４．５～５．０の範囲のｐＨでリソソームにおける捕捉を受けるということが知られている。上記の結果が明確に示すように、これらの酸性環境は、ＰＥＧ２Ｋ－ＰＰＭＳコポリマーミセルからの迅速なＤＴＸ放出を必然的に引き起こし、したがって、薬物が負荷されたミセルの細胞傷害性を増強する。コポリマー中のアミノ基は、プロトンスポンジとして作用して、エンドソーム回避を促進する。したがって、ＰＥＧ２Ｋ－ＰＰＭＳコポリマーミセルによって示されるｐＨ応答特性は、高度に望ましいものであり、これによって、抗がん薬の送達のための優れた担体となる。

【０２８１】

ＩＩＩ．製剤

製剤は、安全で有効であり、望ましくない生物学的副作用又は不要の相互作用を引き起こすことなく個体に投与され得る材料から構成される薬学的に許容される「担体」を使用して調製される。「担体」は、有効成分（単数又は複数）以外の医薬製剤中に存在するすべての構成成分である。

【０２８２】

好ましくは、抗原をコードする核酸の形態である抗原の投与のために使用され得る２つの一般的なクラスの製剤がある。好ましい実施形態では、核酸はｍＲＮＡである。２つの一般的なクラスの製剤は、（１）ＰＡＣＥで形成されたポリマー性ナノ粒子及び（２）脂質ベースの粒子、脂質エマルジョン及びリポソームである。

【０２８３】

ｍＲＮＡ送達のために、脂質、脂質様材料、ポリマー及びタンパク質誘導体を含むさまざまな材料が開発されている。好ましい脂質として、ジステロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ｐｈｓｐｈａｔｉｄｙｌｃｈｏｌｉｎｅ）、ホスファチジルセリン、コレステロール及びポリエチレングリコール（ＰＥＧ）－脂質が挙げられる。他の材料として、スクアレン、Ｓｐａｎ　８５、ＤＯＴＡＰ、ポリソルベート８０、トリオレート及び他の界面活性剤が挙げられる。

【０２８４】

これらには、リポソーム、リポソーム様ナノ粒子、固体脂質ナノ粒子、ナノ構造脂質担体、吸収脂質－ポリマーハイブリッドナノ粒子、封入脂質－ポリマーハイブリッドナノ粒子、カチオンナノエマルジョン、エキソソーム、天然リポタンパク質及び合成リポタンパク質が含まれる。異なる脂質が、核酸の送達のための種々の脂質ベースの製剤を製作するためによく使用されてきた。伝統的なリポソーム、リポプレックス、カチオン性ナノエマルジョン（ＣＮＥ）及びナノ構造脂質担体（ＮＬＣ）が、核酸の送達システムとして開発された。

【０２８５】

リポソームは、選択された薬物が封入され得る水性コアを取り囲む単層又は多層リン脂質二層を含む球状小胞である。それらは、極性頭部（親水性の）基及び非極性尾部（疎水性）基を有する材料から調製される。これらの基の間の相互作用が、小胞の形成を誘導する。Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃｓ １３、２０６（２０２１ ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．３３９０／ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃｓ１３０２０２０６。

【０２８６】

特に、脂質ナノ粒子は、小分子、ｓｉＲＮＡ薬及びｍＲＮＡの送達のために徹底的に研究され、成功裏に臨床に入った。とりわけ、２種の承認されたコロナウイルス疾患２０１９（ＣＯＶＩＤ－１９）ワクチン、ｍＲＮＡ－１２７３及びＢＮＴ１６２ｂは、抗原ｍＲＮＡを送達するために脂質ナノ粒子を使用する。ウイルス感染症、がん及び遺伝病の防止及び処置のために、多数の他の脂質ナノ粒子－ｍＲＮＡ製剤が開発されており、臨床評価下にある。ｍＲＮＡ送達のための適した脂質ナノ粒子が知られている。例えば、Ｈｏｕら Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｓｓ Ｍａｔｅｒｉａｌｓ ６，１０７８～１０９４頁（２０２１）を参照されたい。ｍＲＮＡの脂質担体の概説はまた、Ｚｈａｎｇら Ａｃｔａ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａ Ｓｉｎｉｃａ Ｂ ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０１６／ｊ．ａｐｓｂ．２０２２．１１．０２６に見出され得る。Ｂｏｌｈａｓｓａｎｉ，Ａ．Ａ．Ｌｉｐｉｄ－Ｂａｓｅｄ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ ｉｎ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ｏｆ Ｇｅｎｅｔｉｃ ａｎｄ Ｓｕｂｕｎｉｔ Ｖａｃｃｉｎｅｓ．Ｍｏｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ （２０２２）．ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１００７／ｓ１２０３３－０２２－００６２４－８も参照されたい。

【０２８７】

ＬＮＰのより進行した送達システムは、伝統的な脂質ベースの製剤と比較して核酸を送達するのにより有効である。これらの進行したＬＮＰは、水性コアを取り囲む脂質二重層を示さない場合がある。代わりに、それらは、非水性コアの内側に薬物分子を封入するミセル様構造を示す場合がある。さらに、ＬＮＰは、その核酸内容物との静電複合体形成を示さない。

【０２８８】

ＧｅｒｈａｒｄｔらＭｏｌ．Ｔｈｅｒ．Ｍｅｔｈｏｄ Ｃｌｉｎ．Ｄｅｖ．２５、２０５頁（２０２２）には、ｍＲＮＡワクチンの送達のための耐熱性のナノ構造脂質担体が記載されている。これらは１５０ｎｍ未満の直径を有する。

【０２８９】

固体脂質ナノ粒子（ＳＬＮ）は、負電荷を有するＤＮＡを結合するのに適した固体脂質コア及びカチオン性脂質表面から構成された粒状担体システムである。ＳＬＮ送達システムは、ＤＮＡに結合してＳＬＮ／ＤＮＡ複合体（「リポプレックス」と呼ばれる）をもたらすように使用される場合があり、これは有望なワクチンとして使用され得る。Ｆｒａｎｃｉｓら（２０２２）．Ｄｅｓｉｇｎ ａｎｄ Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｓｏｌｉｄ Ｌｉｐｉｄ Ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅ （ＳＬＮ）－Ｍｅｄｉａｔｅｄ ＤＮＡ Ｖａｃｃｉｎｅ．Ｉｎ：Ｔｈｏｍａｓ，Ｓ．（編）Ｖａｃｃｉｎｅ Ｄｅｓｉｇｎ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、第２４１２巻．Ｈｕｍａｎａ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、ＮＹ．ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１００７／９７８－１－０７１６－１８９２－９＿１８。Ａｌｄｏｓａｒｉら Ｌｉｐｉｄ Ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ａｓ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ ｆｏｒ ＲＮＡ－Ｂａｓｅｄ Ｖａｃｃｉｎ

ｅｓ．Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃｓ ２０２１， １３， ２０６．ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．３３９０／ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃｓ１３０２０２０も参照されたい。

【０２９０】

ＩＶ．ポリマー性ナノ粒子を調製する方法

Ａ．粒子を作製する方法

粒子は、当技術分野で公知のさまざまな技術を使用して調製され得る。使用される技術は、ナノ粒子を形成するために使用されるポリマー、得られる粒子の所望のサイズ範囲及び封入される材料の適合性を含むさまざまな因子に応じて変わり得る。

【０２９１】

ナノ粒子を調製するために使用され得る当技術分野で公知の方法として、それだけには限らないが、高分子電解質縮合（Ｓｕｋら、Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ、２７、５１４３～５１５０頁（２００６）を参照されたい）、シングル及びダブルエマルジョン、ナノ粒子成形及び静電自己組織化（例えば、ポリエチレンイミン－ＤＮＡ又はリポソーム）が挙げられる。好ましい方法にはまた、微少流体方法（例えば、Ｌｉｕら、Ｎａｎｏ Ｍｉｃｒｏ Ｓｍａｌｌ Ｒｅｖｉｅｗ（２０１９）；Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．２０１８、９０、３、１４３４～１４４３頁（２０１７）；Ｌｉｍら、“Ｕｌｔｒａ－Ｈｉｇｈ Ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ｗｉｔｈ Ｈｏｍｏｇｅｎｅｏｕｓ Ｓｉｚｅ Ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ Ｕｓｉｎｇ ａ Ｃｏａｘｉａｌ Ｔｕｒｂｕｌｅｎｔ Ｊｅｔ Ｍｉｘｅｒ”ＡＣＳ Ｎａｎｏ ２０１４、８、６、６０５６～６０６５頁（２０１４）を参照されたい）が含まれる。これらはまた、ＰＡＣＥナノ粒子のためにも働く。

【０２９２】

一実施形態では、通常、有機溶媒中のポリマーの溶液を、目的のポリヌクレオチドと組み合わせることによって、負荷された粒子が調製される。ポリマー溶液は、溶媒中にポリマーを溶解又は懸濁することによって調製される。溶媒は、封入される核酸に悪影響を及ぼす（例えば、不安定化する、又は分解する）ことがないように選択されなくてはならない。適した溶媒として、それだけには限らないが、ＤＭＳＯ及び塩化メチレンが挙げられる。溶媒中のポリマーの濃度は、必要に応じて変えられる。一部の実施形態では、濃度は、例えば、２５ｍｇ／ｍｌである。ポリマー溶液はまた、緩衝液、例えば、酢酸ナトリウム緩衝液で希釈され得る。

【０２９３】

次いで、ポリマー溶液は、封入される物質、例えば、ポリヌクレオチドと混合される。物質は、溶媒中に溶解されて、溶液を形成することができ、その後、それをポリマー溶液と組み合わせる。一部の実施形態では、物質は、生理学的緩衝液に溶解され、その後、ポリマー溶液と組み合わされる。ポリマー溶液体積対物質溶液体積の比率は、１：１であり得る。ポリマー及び物質の組合せは、通常、数分間インキュベートされて、粒子を形成し、その後、この溶液をその所望の目的、例えば、トランスフェクションのために使用する。例えば、ポリマー／ポリヌクレオチド溶液は、２分、５分、１０分又は１０分以上インキュベートされる場合があり、その後、この溶液をトランスフェクションのために使用する。インキュベーションは、室温であり得る。

【０２９４】

一部の実施形態では、粒子はまた、使用前にコーティング剤を含有する溶液とともにインキュベートされる。粒子溶液は、コーティング剤とともに２分、５分、１０分又は１０分以上インキュベートされる場合があり、その後、この粒子をトランスフェクションのために使用する。インキュベーションは、室温であり得る。

【０２９５】

一部の実施形態では、薬剤がポリヌクレオチドである場合には、ポリヌクレオチドは、まずポリカチオンと複合体形成され、その後ポリマーと混合される。複合体形成は、ポリヌクレオチド及びポリカチオンを適切なモル比で混合することによって達成され得る。ポ

リアミンがポリカチオン種として使用される場合には、ポリアミン窒素対ポリヌクレオチドリン酸のモル比（Ｎ／Ｐ比率）を決定することが有用である。好ましい実施形態では、およそ１：１～１：２５の間、好ましくは、約８：１～１５：１の間のＮ／Ｐ比率で阻害性ＲＮＡ及びポリアミンが一緒に混合されて、複合体を形成する。特定のモル比を達成するために必要なポリアミン溶液の体積は、以下の式：

【０２９６】

【数１】

$$V_{NH2} = \frac{C_{inhRNA,final} \times M_{w,inhRNA} / C_{inhRNA,final} \times M_{w,P} \times \Phi_{N:P} \times \Phi V_{final}}{C_{NH2} / M_{w,NH2}}$$

［式中、$M_{w,inhRNA}$＝阻害性ＲＮＡの分子量、$M_{w,P}$＝阻害性ＲＮＡのリン酸基の分子量、$\Phi_{N:P}$＝Ｎ：Ｐ比率（ポリアミン由来の窒素対阻害性ＲＮＡ由来のリン酸の比率のモル比）、C_{NH2}、ｓｔｏｃｋ＝ポリアミンストック溶液の濃度及び$M_{w,NH2}$＝ポリアミンの窒素あたりの分子量］

に従って決定され得る。ポリヌクレオチドをポリカチオンと混合して、ポリヌクレオチドを凝縮する方法は、当技術分野で公知である。例えば、米国特許出願公開第２０１１／０００８４５１号明細書を参照されたい。

【０２９７】

「ポリカチオン」という用語は、選択されたｐＨ、好ましくは、生理学的ｐＨで正電荷、好ましくは、少なくとも２の正電荷を有する化合物を指す。ポリカチオン部分は、選択されたｐＨ値で約２～約１５の間の正電荷、好ましくは、約２～約１２の間の正電荷、より好ましくは、約２～約８の間の正電荷を有する。多数のポリカチオンが当技術分野で公知である。ポリカチオンの適した成分として、塩基性アミノ酸及びその誘導体、例えば、アルギニン、アスパラギン、グルタミン、リジン及びヒスチジン；カチオン性デンドリマー及びアミノ多糖が挙げられる。適したポリカチオンは、構造が直鎖状テトラリジンなどの直鎖状、分岐状又はデンドリマー状であり得る。

【０２９８】

例示的ポリカチオンとして、それだけには限らないが、アクリルアミド及び２－アクリルアミド－２－メチルプロパントリメチルアミンをベースとする合成ポリカチオン、ポリ（Ｎ－エチル－４－ビニルピリジン）又は類似の四級化ポリピリジン、ジエチルアミノエチルポリマー及びデキストランコンジュゲート、ポリミキシンＢスルフェート、リポポリアミン、ポリ（アリルアミン）例えば、強力なポリカチオンポリ（ジメチルジアリルアンモニウムクロリド）、ポリエチレンイミン、ポリブレン及びプロタミンなどのポリペプチド、ヒストンポリペプチド、ポリリジン、ポリアルギニン及びポリオルニチンが挙げられる。

【０２９９】

一部の実施形態では、ポリカチオンはポリアミンである。ポリアミンは、２つ以上の第一級アミン基を有する化合物である。適した天然に存在するポリアミンとして、それだけには限らないが、スペルミン、スペルミジン、カダベリン及びプトレシンが挙げられる。好ましい実施形態では、ポリアミンはスペルミジンである。

【０３００】

別の実施形態では、ポリカチオンは環状ポリアミンである。環状ポリアミンは、当技術分野で公知であり、例えば、米国特許第５，６９８，５４６号明細書、国際公開第１９９３／０１２０９６号及び国際公開第２００２／０１０１４２号に記載されている。例示的環状ポリアミンとして、それだけには限らないが、サイクレンが挙げられる。

【０３０１】

スペルミン及びスペルミジンは、Ｌ－オルニチンからＯＤＣ（オルニチンデカルボキシラーゼ）の作用によって生成されるプトレシン（１，４－ジアミノブタン）の誘導体である。Ｌ－オルニチンは、アルギナーゼによるＬ－アルギニン分解の生成物である。スペルミジンは、脱カルボキシル化Ｓ－アデノシルメチオニン（ｄｃＡｄｏＭｅｔ）３－アミノ

プロピルドナーを用いるプトレシン（１，４－ジアミノブタン）のモノアルキル化を触媒するスペルミジンシンターゼ（ＳｐｄＳ）によって生成されるトリアミン構造である。３－アミノプロピルドナーを用いるプトレシンの両アミノ基の正式なアルキル化によって、対称性テトラアミンスペルミンが生じる。スペルミンの生合成は、ｄｃＡｄｏＭｅｔの存在下でスペルミンシンターゼ（ＳｐｍＳ）の効果によってスペルミジンに進行する。３－アミノプロピルドナー（ｄｃＡｄｏＭｅｔ）は、メチオニンアデノシルトランスフェラーゼによるＬ－メチオニンの、続いてＡｄｏＭｅｔＤＣ（Ｓ－アデノシルメチオニンデカルボキシラーゼ）による脱炭酸の連続形質転換によってＳ－アデノシルメチオニンから導かれる。したがって、プトレシン、スペルミジン及びスペルミンは、アミノ酸Ｌ－アルギニン（Ｌ－オルニチン、プトレシン）及びＬ－メチオニン（ｄｃＡｄｏＭｅｔ、アミノプロピルドナー）に由来する代謝産物である。

【０３０２】

Ｖ．免疫応答を誘発するためとして／ワクチンとして使用する方法

抗原又は抗原をコードする核酸を含むＰＡＣＥ粒子は、病原体に対する粘膜免疫の増強を提供するために使用され得るということが確立された。抗原含有ＰＡＣＥ粒子は、「プライム及びＰＡＣＥ－スパイク」と呼ばれる、ウイルスによる感染に対する２ステップワクチン接種戦略において使用され得る。

【０３０３】

自然感染は、病原体遭遇部位でセンチネルとして働く組織常在粘膜適応免疫の発生を誘導し、１）感染細胞を迅速に死滅させて、感染した人物内での病原体の増幅及び伝播を防ぐことができるＣＤ８Ｔ細胞、２）粘膜に存在する分泌ＩｇＡと呼ばれる特異的粘膜抗体を産生して、病原体侵入及び感染を防ぐＢ細胞及び３）最適に機能するようにＣＤ８Ｔ細胞及びＢ細胞を補助できるＣＤ４Ｔ細胞を含む。筋肉内注射（ショット）として与えられる非経口ワクチン接種は、優れた全身免疫防御を提供するが、頑強な粘膜免疫は誘導しない。コグネイト抗原に対する粘膜曝露及び／又は炎症は、組織常在記憶Ｔ及びＢ細胞応答の発生にとって重要である。

【０３０４】

「粘膜免疫応答」又は「粘膜免疫」とは、同義的に使用され、体液性（すなわち、Ｂ細胞及び抗体）及び／又は細胞性（すなわち、Ｔ細胞）応答の誘導を意味する。最も好ましくは、この免疫応答は、哺乳動物宿主が免疫化された抗原に対して特異的である。適宜、体液性粘膜免疫応答が、宿主中への所望の抗原の導入に応じて粘膜洗浄液に存在する抗原特異的抗体を測定することによって評価され得る。１つの例示的実施形態では、粘膜免疫応答は、免疫化された対象の気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬ）において抗抗原抗体力価及びアイソタイププロファイルを測定することによって評価される。最も好ましくは、抗体応答は、主にＩｇＡ抗体から構成される。細胞性粘膜免疫応答は、粘膜領域（例えば、呼吸器又は消化管）から、又は粘膜領域（例えば、呼吸器領域又は消化器系領域）から流れるリンパ節から単離された組織内でＴ細胞応答を測定することによって評価され得る。方法は、呼吸器粘膜免疫応答に制限されない。一部の実施形態では、免疫応答は、哺乳動物、好ましくは、ヒトの種々の粘膜でのものである。

【０３０５】

対象の粘膜及び上皮組織において外因性抗原に対する頑強な粘膜免疫を誘導又は増強する方法が提供される。方法は、レシピエントにおいて組織常在Ｔ細胞及びＢ細胞の１つ以上の集団を効果的に生成する。好ましい実施形態では、方法は、粘膜組織で、ワクチン接種抗原（複数可）及び／又はワクチン接種抗原が供給される元の宿主に対して防御的な、$CD8^+$組織常在記憶（T_{RM}）細胞、$CD4^+$組織常在記憶（T_{RM}）細胞及び／又は記憶Ｂ細胞の集団を提供する。一実施形態では、方法は、肺及び／又は縦隔リンパ節においてワクチン接種抗原（複数可）に対する$CD69^+CD8^+$組織常在記憶（T_{RM}）細胞の集団を誘導する。一実施形態では、方法は、肺及び／又は縦隔リンパ節においてワクチン接種抗原（複数可）に対する$CD69^+CD103^+CD8^+$組織常在記憶（T_{RM}）細胞の集団を誘導する。さらなる実施形態では、方法は、流入領域リンパ節において、

ＣＸＣＲ５$^{+}$ＰＤ１$^{+}$濾胞性ヘルパーＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞（Ｔ$_{fh}$細胞）、ＧＬ７$^{+}$胚中心Ｂ細胞、ＣＤ１３８＋抗体分泌細胞（ＡＳＣ）及び抗原特異的Ｂ細胞の１つ以上の集団を誘導する。一部の実施形態では、方法は、ＢＡＬＦにおいて、及び／又は血清においてワクチン接種抗原（複数可）に対するＩｇＡ及び／又はＩｇＧ抗体の有効な増大を提供する。

【０３０６】

Ａ．プライミング及びブースティングの方法

一部の態様では、本発明は、それを必要とする対象においてウイルスによる感染を処置する、寛解させる、及び／又は防止する方法を対象とする。一部の態様では、本発明は、ウイルスによる感染に対して哺乳動物を免疫化する方法を対象とする。一部の実施形態では、ウイルスは、呼吸器感染を引き起こすものである。一部の実施形態では、ウイルスは、コロナウイルス、インフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス又はそれらの任意の組合せである。

【０３０７】

一部の実施形態では、既存の免疫は、本明細書において別の場所に記載されるものなどの「プライミング」ワクチン接種によって得られる。一部の実施形態では、既存の免疫は、コロナウイルスによる以前の感染によって得られる。

【０３０８】

一部の実施形態では、方法は、対象にコロナウイルスタンパク質を含む組成物を鼻腔内投与することを含む。一部の実施形態では、組成物は、本明細書において別の場所で記載される「スパイキング」ステップにおいて使用されるものと同一又は同様である。

【０３０９】

本明細書で記載される実施例（「本研究」）は、ウイルスによる感染に対する以下の２ステップワクチン接種戦略を実証した（限定されない例としてＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を使用して：（１）抗原を用いる、ＩＭプライム及びＩＮブースティング（本明細書において、「プライム及びスパイク」）；（２）抗原含有ＰＡＣＥ／抗原封入ＰＡＣＥを用いる、ＩＭプライム及びＩＮブースティング（本明細書において、プライム及びＰＡＣＥ－スパイク）；（３）抗原含有ＰＡＣＥ／抗原封入ＰＡＣＥを用いる、ＩＭプライム及びＩＭブースティング（本明細書において、プライム及びＩＭ　ＰＡＣＥ－スパイク（４）両方とも抗原含有ＰＡＣＥ／抗原封入ＰＡＣＥを用いる、ＩＮプライム及びＩＮブースティング（本明細書において、「ＩＮ　ＰＡＣＥ－プライム及びＩＮ　ＰＡＣＥ－スパイク」）。ＩＭプライムとは、本明細書で使用される場合、従来の非経口的に投与されたワクチン（例えば、ｍＲＮＡ－脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）ベースのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ワクチンの筋肉内投与）を指す。

【０３１０】

一部の実施形態では、方法は、ｉ）全身性又は粘膜投与経路を介してプライミング免疫原性組成物の有効量を投与するステップ並びにその後、ｉｉ）粘膜経路を介して対象にブースティング免疫原性組成物の有効量を投与するステップを含む。この方法は、抗原を選択的に発現するワクチンを使用する、対象の全身又は粘膜プライミングは、粘膜経路を介した同一抗原又はその断片を含有する組成物を用いたその後の免疫化又はブースティングの際に抗原特異的粘膜免疫の誘導を増大又は増強するという発見に基づいている。本研究は、対象（例えば、マウス）を、従来の非経口的に投与されたワクチン（例えば、ｍＲＮＡ－脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）ベースのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ワクチンの筋肉内投与）を用いて「プライミング」し、続いて、対象を、（ｉ）鼻腔内投与されたウイルスタンパク質（例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質の鼻腔内投与）又は（ｉｉ）鼻腔内投与された抗原含有ＰＡＣＥ粒子を用いて「スパイキング」することが、頑強な免疫応答をもたらしたことを実証した。「プライム及びスパイク」又は「プライム及びＰＡＣＥ－スパイク」戦略によって誘発された免疫応答は、従来の「プライム及びブースト」ワクチン接種戦略（ワクチンの２回以上の非経口投与）によって誘発されたものよりも頑強である。本研究はまた、抗原含有ＰＡＣＥ鼻腔内投与された抗原含有ＰＡＣＥ粒子を用いて対象（例えば、マウス）を「プライミング」及びスパイキングすることが、頑強な免疫応

答をもたらしたことを実証した。同様に、免疫能低下の状況内でＩＮ抗原又は抗原含有ＰＡＣＥ粒子又はＩＭ抗原含有ＰＡＣＥ粒子を用いて、対象をプライミングし、対象を「スパイキング」することは、致死的ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２曝露から保護する。

【０３１１】

本発明の方法は、宿主において任意の抗原に対する粘膜免疫を誘導又は増強するように、好ましくは、防御免疫を付与するように容易に適応させることができる。

【０３１２】

ｉ．プライム及びスパイク

一部の実施形態では、方法は、対象にウイルスに対するワクチン接種を非経口的に投与すること及び対象にウイルスタンパク質を鼻腔内に投与することを含む。一部の実施形態では、ウイルスタンパク質は、単離されたウイルスタンパク質を含む。一部の実施形態では、ウイルスタンパク質は、コロナウイルスの単離されたスパイクタンパク質を含む。

【０３１３】

一部の実施形態では、対象にウイルスタンパク質を鼻腔内に投与することは、コロナウイルスのスパイクタンパク質を投与することを含む。一部の実施形態では、スパイクタンパク質は、処置、防止及び／又は寛解されている、及び／又はそれに対してワクチン接種されている同一種類のコロナウイルスに由来する。一部の実施形態では、スパイクタンパク質は、コロナウイルスファミリーの間でスパイクタンパク質のアミノ酸配列、タンパク質構造及び／又はグリコシル化パターンの類似性のために、第１のコロナウイルスに由来するスパイクタンパク質によって誘発された免疫が、第２のコロナウイルスに対して有効であることが多いので、異なる種類のコロナウイルスに由来する。実際、本研究は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶスパイクタンパク質又はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のいずれかを用いて対象を「スパイキング」することによって、対象において汎サルベコウイルス免疫を生成できることを実証した。具体的には、本研究は、すでに「プライミングされた」対象を組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶスパイクタンパク質を用いて「スパイキング」することによって、対象において抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＩｇＡ及びＩｇＧの頑強な生成を誘発できることを実証する。同様に、すでに「プライミングされた」対象を組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質を用いて「スパイキング」することによって、同様に対象において抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ　ＩｇＡ及びＩｇＧの頑強な生成を誘発できる。一部の実施形態では、スパイクタンパク質は、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質（野生型又は遺伝子操作されたもの、例えば、安定性又は同一若しくは異なるコロナウイルスのスパイクに対する免疫原性を改善するように遺伝子操作されたもののいずれか）又はその断片である。一部の実施形態では、スパイクタンパク質は、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶスパイクタンパク質（野生型又は遺伝子操作されたもの、例えば、安定性又は同一若しくは異なるコロナウイルスのスパイクに対する免疫原性を改善するように遺伝子操作されたもののいずれか）又はその断片である。一部の実施形態では、ＳＡＲＳ－ＣｏＶスパイクタンパク質、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質又はその断片は、グリコシル化されている。一部の実施形態では、ＳＡＲＳ－ＣｏＶスパイクタンパク質、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質又はその断片は、対象を「スパイク」して、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ感染、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染、両方、又は他の種類のコロナウイルス感染に対する免疫をブーストするために使用される。

【０３１４】

一部の実施形態では、抗原性ウイルスタンパク質、例えば、スパイクタンパク質は、アジュバントを伴わずに鼻腔内に投与される。一部の実施形態では、抗原性ウイルスタンパク質、例えば、スパイクタンパク質は、１つ以上のアジュバントとともに鼻腔内に投与される。一部の実施形態では、抗原性ウイルスタンパク質、例えば、スパイクタンパク質は、鼻腔内投与に適した１つ以上の薬学的に許容される担体とともに投与される。

【０３１５】

ｉｉ．抗原含有プライム及びＰＡＣＥ－スパイク

一実施形態では、方法は、ｉ）筋肉内投与経路を介して１つ以上の抗原をコードするｍ

ＲＮＡを含むプライミング免疫原性組成物の有効量を投与するステップ、並びにその後ｉｉ）粘膜経路を介して対象に同一抗原をコードするｍＲＮＡを含むブースティング免疫原性組成物の有効量を投与して、組織常在免疫を確立するステップを含む。一実施形態では、方法は、（ｉ）筋肉内（ＩＭ）注射を介して脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）及び抗原をコードするポリヌクレオチドを含有するプライミング抗原の有効量を投与するステップ並びに（ｉｉ）その後、対象に、ポリ（アミン－コ－エステル）又はポリ（アミン－コ－アミド）、（ＰＡＣＥ）、ＰＡＣＥ－ＰＥＧブロックコポリマー及び／又はナノ粒子をより酸感受性にする追加のモノマーを含み得るＰＡＣＥポリマーブレンド及び同一抗原をコードするポリヌクレオチドを含有するブースティング組成物の有効量を鼻腔内（ＩＮ）又はＩＭ投与するステップを含む。別の実施形態では、方法は、ｉ）粘膜投与経路を介して１つ以上の抗原をコードするｍＲＮＡを含むプライミング免疫原性組成物の有効量を投与するステップ、並びにその後ｉｉ）粘膜経路を介して、対象に同一抗原をコードするｍＲＮＡを含むブースティング免疫原性組成物の有効量を投与して、組織常在免疫を確立するステップを含む。一実施形態では、方法は、プライミング抗原組成物の有効量を鼻腔内（ＩＮ）投与するステップ、及び（ｉｉ）その後、対象にブースティング抗原組成物の有効量を鼻腔内（ＩＮ）投与するステップを含む。好ましい実施形態では、プライミング免疫原性組成物及び／又はブースティング免疫原性組成物は、好ましくは、ナノ粒子中に封入された、ポリ（アミン－コ－エステル）又はポリ（アミン－コ－アミド）、（ＰＡＣＥ）、ＰＡＣＥ－ＰＥＧブロックコポリマー及び／又はナノ粒子をより酸感受性にする追加のモノマーを含み得るＰＡＣＥポリマーブレンド及び同一抗原をコードするポリヌクレオチドを含有する。

【０３１６】

一部の実施形態では、防御免疫を誘導する方法は、ｉ）全身性投与経路を介してプライミング免疫原性組成物の有効量を投与するステップ、及びその後ｉｉ）全身性又は粘膜経路を介して対象にブースティング免疫原性組成物の有効量を投与するステップを含む。一実施形態では、方法は、（ｉ）筋肉内（ＩＭ）注射を介して脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）及び抗原をコードするポリヌクレオチドを含有するプライミング抗原の有効量を投与するステップ、並びに（ｉｉ）その後、筋肉内（ＩＭ）注射を介して対象にポリ（アミン－コ－エステル）又はポリ（アミン－コ－アミド）、（ＰＡＣＥ）、ＰＡＣＥ－ＰＥＧブロックコポリマー及び／又はナノ粒子をより酸感受性にする追加のモノマーを含み得るＰＡＣＥポリマーブレンド、及び同一抗原をコードするポリヌクレオチドを含有するブースティング組成物の有効量を投与するステップを含む。方法は、１つ以上の呼吸器病原体に対する防御免疫の提供において有効である。

【０３１７】

さらなる実施形態では、防御免疫を誘導する方法は、ｉ）粘膜投与経路を介してプライミング免疫原性組成物の有効量を投与するステップ、及びその後ｉｉ）全身性経路を介して対象にブースティング免疫原性組成物の有効量を投与するステップを含む。好ましい実施形態では、プライミング免疫原性組成物及び／又はブースティング免疫原性組成物は、ポリ（アミン－コ－エステル）又はポリ（アミン－コ－アミド）、（ＰＡＣＥ）、ＰＡＣＥ－ＰＥＧブロックコポリマー及び／又はナノ粒子をより酸感受性にする追加のモノマーを含み得るＰＡＣＥポリマーブレンド、及び同一抗原をコードするポリヌクレオチドを含有する。

【０３１８】

好ましい実施形態では、粘膜表面に投与するための免疫原性組成物は、ｍＲＮＡの有効送達のためにポリ（アミン－コ－エステル）粒子を含む。粘膜免疫は、ポリ（アミン－コ－エステル）粒子を含まずに誘導されるものと比較して、例えば、粘膜部位での、特に、気道における１つ以上のワクチン接種抗原に対する、組織常在記憶Ｔ細胞、組織常在記憶Ｂ細胞及び粘膜ＩｇＡの数の点で増強される。

【０３１９】

粘膜経路を介して投与される場合のプライミング又はブースティング組成物は、選択さ

れた粘膜を介して投与される。好ましい粘膜投与経路は、鼻腔内経路である。送達は、エアロゾル、噴霧器によって、又は鼻腔中に液体を蓄積させることによって達成され得る。

【０３２０】

一部の実施形態では、プライミングは、粘膜経路を介した抗原に対する事前の曝露を含む。例えば、一部の実施形態では、対象は、対象の粘膜組織への抗原を含む免疫原性組成物の有効量の投与によって、抗原に事前に曝露されている対象である。例示的粘膜組織として、肺、鼻腔、口腔、消化器系、膣、及び直腸粘膜が挙げられる。

【０３２１】

一部の実施形態では、対象にコロナウイルスに対するワクチン接種を非経口的に投与することによって、対象において全身性Ｔ細胞、Ｂ細胞及び抗体応答が誘発される。

【０３２２】

一部の実施形態では、ウイルスタンパク質を対象に鼻腔内投与することによって、肺常在Ｔ及びＢ細胞が確立される。一部の実施形態では、対象に非経口的に投与するワクチン接種には、非経口投与に適している任意のコロナウイルスに対する任意のワクチンが含まれる。一部の実施形態では、対象に非経口的に投与するワクチン接種には、ｍＲＮＡ－脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）ベースのワクチン、ウイルスベクターワクチン（例えば、非複製性又は複製性ウイルスベクターワクチン）、不活化ウイルスワクチン、ウイルスサブユニット／ペプチドワクチン、ＤＮＡワクチン、ウイルス様粒子（ＶＬＰ）ワクチンなどが含まれる。

【０３２３】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスに対するｍＲＮＡ－ＬＮＰベースのワクチンの例として、Ｐｆｉｚｅｒ及びＢｉｏＮＴｅｃｈ製のＢＮＴ１６２ｂ１及びＢＮＴ１６２ｂ２（コミナティ／トジナメラン）及びＢＮＴ１６２ｂ２ｓ０１、Ｍｏｄｅｒｎａ製のｍＲＮＡ－１２７３（ＳＰＩＫＥＶＡＸ／エラソメラン（ｅｌａｓｏｍｅｒａｎ））及びｍＲＮＡ－１２７３．２１１及びｍＲＮＡ－１２７３．６１７．２、ＣｕｒｅＶａｃ製のＣＶｎＣｏＶ及びＣＶ２ＣｏＶ、Ａｒｃｔｕｒｕｓ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ Ｉｎｃ製のＡＲＣＴ－１５４、Ａｂｏｇｅｎ製のＡＲＣｏＶ、Ｔａｋｅｄａ製のＴＡＫ－９１９（モデルナ製剤）、Ｗａｌｖａｘ製のｍＲＮＡなどが挙げられる。

【０３２４】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスに対する非複製性ウイルスベクターワクチンの例として、Ｊａｎｓｓｅｎ（Ｊｏｈｎｓｏｎ ＆ Ｊｏｈｎｓｏｎ）製のＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ、Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ及びＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａによって開発されたＡＺＤ１２２２及びＡＺＤ２８１６、Ｇａｍ－ＣＯＶＩＤ－Ｖａｃ（Ｓｐｕｔｎｉｋ Ｖ）及びＧａｍａｌｅｙａ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｅｐｉｄｅｍｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ｉｎ Ｒｕｓｓｉａ製のＳｐｕｔｎｉｋ Ｌｉｇｈｔ、ＣａｎＳｉｎｏ Ｂｉｏｌｏｇｉｃｓによって開発されたＡＤ５－ｎＣＯＶ及びＡＤ５－ｎＣＯＶ－ＩＨ、Ｓｅｒｕｍ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ ＩｎｄｉａによるＣｏｖｉｓｈｉｅｌｄ（Ｏｘｆｏｒｄ／ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎ）、ＲｅｉＴｈｅｒａ製のＧＲＡｄ－ＣＯＶ２などが挙げられる。

【０３２５】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスに対する複製性ウイルスベクターワクチンの例として、Ｗａｎｔａｉ製のＤｅｌＮＳ１－２０１９－ｎＣｏＶ－ＲＢＤ－ＯＰＴ、Ｉｓｒａｅｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｆｏｒ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ製のＩＩＢＲ－１００（ＩＩＢＲ）などが挙げられる。

【０３２６】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスに対する不活化ウイルスワクチンの例として、Ｓｉｎｏｖａｃ Ｂｉｏｔｅｃｈ製のＣｏｒｏｎａＶａｃ、Ｓｉｎｏｐｈａｒｍ製のＢＢＩＢＰ－ＣｏｒＶ及びＷＩＢＰ－ＣｏｒＶ、Ｂｈａｒａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈ製のＣｏｖａｘｉｎ、Ｃｈｕｍａｋｏｖ Ｃｅｎｔｒｅ製のＫｏｖｉＶａｃ、Ｓｈｉｆａ Ｐｈａｒｍｅｄ Ｉｎｄｕｓｔｒｉａｌ Ｇｒｏｕｐ製のＣＯＶＩｒａｎ Ｂａｒｅｋａｔ、Ｖａｌｎｅｖａ

ＳＥ ａｎｄ Ｄｙｎａｖａｘ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ製のＶＬＡ２００１及びＶＬＡ２１０１、Ｈｅａｌｔｈ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｔｕｒｋｅｙ製のＥＲＵＣＯＶ－ＶＡＣ、Ｋａｚａｋｈｓｔａｎ ＲＩＢＳＰ製のＱａｚＶａｃ、Ｍｉｎｈａｉ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｃｏ製のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ワクチン（Ｖｅｒｏ Ｃｅｌｌｓ）、Ｏｒｇａｎｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ Ｄｅｆｅｎｓｉｖｅ Ｉｎｎｏｖａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ製のＦＡＫＨＲＡＶＡＣ（ＭＩＶＡＣ）、ＫＭ Ｂｉｏｌｏｇｉｃｓ Ｃｏ Ｌｔｄ製のＫＤ－４１４、Ｃｈｉｎｅｓｅ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ製のＩｎａｃｔｉｖａｔｅｄ（Ｖｅｒｏ Ｃｅｌｌｓ）などが挙げられる。

【０３２７】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスに対するウイルスサブユニット／ペプチドワクチンの例として、ＶＥＣＴＯＲ ｃｅｎｔｅｒ ｏｆ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ製のＥｐｉＶａｃＣｏｒｏｎａ、中国科学院のＡｎｈｕｉ Ｚｈｉｆｅｉ Ｌｏｎｇｃｏｍ ａｎｄ ｔｈｅ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ製のＺＦ２００１、Ｍｅｄｉｇｅｎ Ｖａｃｃｉｎｅ Ｂｉｏｌｏｇｉｃｓ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、Ｄｙｎａｖａｘ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ及びＵ．Ｓ．Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ製のＭＶＣ ＣＯＶＩＤ－１９ワクチン、Ｎｏｖａｖａｘ及びＣｏａｌｉｔｉｏｎ ｆｏｒ Ｅｐｉｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｐａｒｅｄｎｅｓｓ Ｉｎｎｏｖａｔｉｏｎｓ（ＣＥＰＩ）製のＮｏｖａｖａｘ ＣＯＶＩＤ－１９ワクチン（ＮＶＸ－ＣｏＶ２３７３）、Ｆｉｎｌａｙ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ製のＦＩＮＬＡＹ－ＦＲ－２、Ｓａｎｏｆｉ Ｐａｓｔｅｕｒ及びＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ製のＶＡＴ００００２及びＶＡＴ００００８、Ｉｃｏｓａｖａｘ製のＩＶＸ－４１１及びＩＶＸ－４２１、Ｗａｌｔｅｒ Ｒｅｅｄ Ａｒｍｙ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｒｅｓｅａｒｃｈ（ＷＲＡＩＲ）製のＳＰＦＮ＿１Ｂ－０６－ＰＬ、Ｃｌｏｖｅｒ Ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ製のＳＣＢ－２０１９（ＣｐＧ １０１８／Ａｌｕｍ）、Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｅ Ｌｉｍｉｔｅｄ製のＢＥＣＯＶ２Ａ／Ｃｏｒｂｅｖａｘ、Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ａｎｄ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（ＣＩＧＢ）製のＣＩＧＢ－６６、ＦＢＲＩ製のＥｐｉＶａｃＣｏｒｏｎａ及びＥｐｉＶａｃＣｏｒｏｎａ－Ｎ、Ｉｎｓｔｉｔｕｔｏ Ｆｉｎｌａｙ ｄｅ Ｖａｃｕｎａｓ Ｃｕｂａ製のＳｏｂｅｒａｎａ ０２及びＳｏｂｅｒａｎａ Ｐｌｕｓ、Ｒａｚｉ Ｖａｃｃｉｎｅ ａｎｄ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ製のＲａｚｉ Ｃｏｖ Ｐａｒｓ、Ｓｅｒｕｍ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｉｎｄｉａ製のＣＯＶＯＶＡＸ（Ｎｏｖａｖａｘ製剤）、Ｖａｘｉｎｅ／ＣｉｎｎａＧｅｎ Ｃｏ．製のＣＯＶＡＸ－１９、Ｎａｎｏｇｅｎ製のＮａｎｏｃｏｖａｘ、Ｌｉｖｚｏｎ Ｍａｂｐｈａｒｍ Ｉｎｃ製のＶ－０１、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｖａｃｃｉｎｅ ａｎｄ Ｓｅｒｕｍ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ製の組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ワクチン（ＣＨＯ Ｃｅｌｌ）、Ｊｉａｎｇｓｕ Ｒｅｃ－Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｃｏ Ｌｔｄ製のＲｅＣＯＶ、Ｓｈｉｏｎｏｇｉ製のＳ－２６８０１９、Ｓｉｎｏｃｅｌｌｔｅｃｈ製のＳＣＴＶ０１Ｃ、ＣＯＶＡＸＸ製のＵＢ－６１２、ＳＫ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ Ｃｏ Ｌｔｄ製のＧＢＰ５１０、Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ａｎｄ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（ＣＩＧＢ）製のＣＩＧＢ－６６、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｃｅｎｔｅｒ Ｇｒｏｎｉｎｇｅｎ製のＡＫＳ－４５２、Ｗｅｓｔ Ｃｈｉｎａ Ｈｏｓｐｉｔａｌ製の組換え（Ｓｆ９細胞）、Ｍｅｄｉｇｅｎ製のＭＶＣ－ＣＯＶ１９０１などが挙げられる。

【０３２８】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスに対するＤＮＡワクチンの例として、ＡｎＧｅｓ製のＡＧ０３０２－ＣＯＶＩＤ１９、Ｚｙｄｕｓ Ｃａｄｉｌａ製のＺｙＣｏＶ－Ｄ、Ｇｅｎｅｘｉｎｅ製のＧＸ－１９、Ｉｎｏｖｉｏ製のＩＮＯ－４８００などが挙げられる。

【０３２９】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスに対するウイルス様粒子（ＶＬＰ）ワクチンの例として、Ｙａｎｔａｉ Ｐａｔｒｏｎｕｓ Ｂｉｏｔｅｃｈ Ｃｏ Ｌｔｄ製のＬＹＢ００１、

Ｍｅｄｉｃａｇｏ製の植物ベースのＶＬＰなどが挙げられる。
【０３３０】
Ｂ．ワクチン接種される個体
処置を必要とする対象は、感染症を有している又は感染症を有するリスクにある対象である（例えば、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症又は原虫感染症を有している又はそれに罹患するリスクにある対象。方法は、１つ以上の呼吸器病原体、例えば、重症急性呼吸器症候群（ＳＡＲＳ）ウイルス及びインフルエンザウイルスに対する曝露のリスクにあるものに特に適している。方法は、組織常在記憶Ｔ及びＢ細胞を含む粘膜免疫を効果的に誘導する。一部の実施形態では、方法は、オルトミクソウイルス科（例えば、インフルエンザウイルスＡ及びＢ及びＣ）又はコロナウイルス科（例えば、コロナウイルス、例えば、重症急性呼吸器症候群（ＳＡＲＳ）ウイルス）に由来する１つ以上の抗原に対する防御的粘膜及び全身性免疫を提供する。
【０３３１】
感染を有する対象は、感染性微生物に曝露されている、その身体において急性又は慢性の検出可能なレベルの微生物を有する、又は感染性微生物の徴候及び症状を有する対象である。対象において感染を評価及び検出する方法は、当業者に公知である。感染症を有するリスクにある対象は、感染性微生物と接触すると予測され得る対象である。このような対象の例として、医療従事者又は感染症の罹患率が高い世界各地に旅行するものがある。したがって、一部の実施形態では、対象は、医療従事者であること、感染症の罹患率が高い世界各地に住んでいること若しくはそこに旅行していることを含む１つ以上のリスク因子を有する、又は罹患個体と密接な接触を有する、例えば、１人以上の罹患個体と同居している若しくはともに働いている個体である。一部の実施形態では、対象が感染を有する１つ以上の生理学的リスク因子を有するので、対象は感染症のリスクが上昇している。感染を有するリスク因子の例として、例えば、免疫抑制、易感染性、年齢、外傷、火傷（例えば、熱傷）、手術、異物、がん、新生児、特に、低体重で生まれた新生児が挙げられる。したがって、一部の実施形態では、対象は、免疫抑制、易感染性、高齢、外傷、火傷（例えば、熱傷）、手術、異物、がん、新生児及び低体重で生まれた新生児を含む１つ以上のリスク因子を有する個体である。
【０３３２】
感染症のリスクの程度は、対象が有するリスク因子の多さ及び重症度又は大きさに応じて変わる。リスク因子の存在及び重症度に基づいて対象において感染症のリスクを評価するためにリスクチャート及び予測アルゴリズムが利用可能である。対象において感染症のリスクを評価する他の方法は、当業者によって知られている。一部の実施形態では、感染症のリスクが上昇している対象は、見かけ上は健康な対象である場合がある。見かけ上は健康な対象は、疾患の徴候又は症状を有さない対象である。
【０３３３】
１．防止される疾患
方法は、感染性疾患に対する防御免疫を提供する。特に、方法は、１つ以上の呼吸器疾患に対する防御免疫を提供する。防御免疫が提供される疾患は、投与のための組成物内に提供される抗原によって決定される。
【０３３４】
好ましい実施形態では、方法は、重症急性呼吸器症候群（ＳＡＲＳ－Ｃｏｖ－２）の発症と関連するコロナウイルス又はインフルエンザウイルスによる感染症などの呼吸器ウイルス性疾患を含む感染症に対して対象にワクチン接種する。
【０３３５】
同一抗原性エピトープのうち１つ以上を共有する、又は対象において同一交差防御免疫監視分子によって認識され得る病原体の複数の病原性株がある場合には、方法は、対象への粒子組成物の単回投与後に対象において１つより多い病原体に対する防御免疫を提供できる。例えば、一部の実施形態では、方法に従う対象への単一抗原種の投与によって、対象において多様な病原体に対する、又は多様な病原体の株に対して防御免疫誘導又は刺激

できる。例示的な実施形態では、対象への単一のＳＡＲＳコロナウイルス抗原種の投与は、対象において多様なＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２コロナウイルスに対する防御免疫を誘導又は刺激する。別の実施形態では、対象への単一のインフルエンザウイルス抗原種の投与は、対象において多様なインフルエンザウイルスに対する防御免疫を誘導又は刺激する。

【０３３６】

ａ．呼吸器感染症

好ましい実施形態では、方法は、オルソミクソウイルス、パラミクソウイルス、コロナウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス及びヒトボカウイルスから選択される呼吸器系ウイルスによる感染を防ぐ。呼吸器感染症と関連する例示的ウイルスとして、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス及び呼吸器合胞体ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、重症急性呼吸器症候群（ＳＡＲＳ）コロナウイルス２、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、エプスタイン－バーウイルス（ＥＢＶ）及び水痘帯状疱疹ウイルス（ＶＺＶ）が挙げられる。

【０３３７】

ｉ．ＳＡＲＳ

一部の実施形態では、方法は、対象においてコロナウイルス感染症の１つ以上の症状を防ぐ。例えば、方法は、対象において重症後天性呼吸器症候群（ＳＡＲＳ）の１つ以上の症状又は生理学的マーカーを低減する又は防ぐ。一部の実施形態では、方法は、対象において原因となるウイルス性疾患ＣＯＶＩＤ－１９による感染を防ぐ。ＣＯＶＩＤ－１９の例示的症状として、咳、疲労、発熱、体の痛み、頭痛、咽頭痛、味覚及び／又は嗅覚の喪失又は変化、嘔吐、下痢、サイトカインストーム、皮膚の変化、眼の合併症、錯乱、慢性神経障害、胸痛及び息切れが挙げられる。したがって、一部の実施形態では、方法は、咳、疲労、発熱、体の痛み、頭痛、咽頭痛、味覚及び／又は嗅覚の喪失又は変化、嘔吐、下痢、サイトカインストーム、皮膚の変化、眼の合併症、錯乱、慢性神経障害、胸痛及び息切れのうち１つ以上を防ぐ又は低減する。

【０３３８】

したがって、一部の実施形態では、ウイルスは、コロナウイルスを含む。ある特定の実施形態では、コロナウイルスは、アルファコロナウイルス、ベータコロナウイルス、ガンマコロナウイルス及びデルタコロナウイルスのうち少なくとも１つを含む。

【０３３９】

ある特定の実施形態では、コロナウイルスは、アルファコロナウイルス、例えば、それだけには限らないが、アルファコロナウイルス１、ヒトコロナウイルス２２９Ｅ、ヒトコロナウイルスＮＬ６３、ユビナガコウモリ属（Ｍｉｎｉｏｐｔｅｒｕｓ）コウモリコロナウイルス１、ミニオプテルス属コウモリコロナウイルスＨＫＵ８、ブタ流行性下痢ウイルス、キクガシラコウモリ属（Ｒｈｉｎｏｌｏｐｈｕｓ）コウモリコロナウイルスＨＫＵ２及び／又はイエローハウスコウモリ属（Ｓｃｏｔｏｐｈｉｌｕｓ）コウモリコロナウイルス５１２である。ある特定の実施形態では、コロナウイルスは、ベータコロナウイルス、例えば、それだけには限らないが、ベータコロナウイルス１（ウシコロナウイルス、ヒトコロナウイルスＯＣ４３）、ハリネズミコロナウイルス１、ヒトコロナウイルスＨＫＵ１、中東呼吸器症候群関連コロナウイルス、マウスコロナウイルス、アブラコウモリ属（Ｐｉｐｉｓｔｒｅｌｌｕｓ）コウモリコロナウイルスＨＫＵ５、ルーセットオオコウモリ属（Ｒｏｕｓｅｔｔｕｓ）コウモリコロナウイルスＨＫＵ９、重症急性呼吸器症候群関連コロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）及び／又はタケコウモリ属（Ｔｙｌｏｎｙｃｔｅｒｉｓ）コウモリコロナウイルスＨＫＵ４である。ある特定の実施形態では、コロナウイルスは、重症急性呼吸器症候群関連コロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）である。ある特定の実施形態では、コロナウイルスは、重症急性呼吸器症候群関連コロナウイルス、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２である。ある特定の実施形態では、コロナウイルス（ｏｒｏｎａｖｉｒｕｓ）は、ガンマコロナウイルス、例えば、それだけには限らないが、鳥類コロナウイルス及び／又はシロイルカコロナウイルスＳＷ

１である。ある特定の実施形態では、コロナウイルスは、デルタコロナウイルス、例えば、それだけには限らないが、ヒヨドリコロナウイルスＨＫＵ１１及び／又はブタコロナウイルスＨＫＵ１５である。

【０３４０】

一部の実施形態では、コロナウイルスには、ヒトコロナウイルスＯＣ４３（ＨＣｏＶ－ＯＣ４３）、ヒトコロナウイルスＨＫＵ１（ＨＣｏＶ－ＨＫＵ１）、ヒトコロナウイルス２２９Ｅ（ＨＣｏＶ－２２９Ｅ）、ヒトコロナウイルスＮＬ６３（ＨＣｏＶ－ＮＬ６３）、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）、中東呼吸器症候群関連コロナウイルス（ＭＥＲＳ－ＣｏＶ）、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）又はヒト及び／又は他の哺乳動物対象に感染可能である任意の他のコロナウイルスが含まれる。

【０３４１】

ある特定の実施形態では、コロナウイルスには、ＭＥＲＳ－ＣｏＶ、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ及びＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のうち少なくとも１つが含まれる。

【０３４２】

ある特定の実施形態では、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２には、Ｂ．１．１．７（アルファ）、Ｂ．１．３５１（ベータ）、Ｐ．１（ガンマ）、Ｂ．１．６１７．２（デルタ）、Ｂ．１．４２９／Ｂ．１．４２７（イプシロン）、Ｂ．１．６１７．１（カッパ）、Ｂ．１．５２５（エータ）、Ｂ．１．５２６（イオタ）、Ｐ．３（シータ）、Ｐ．２（ゼータ）及びＢ．１．１．５２９（オミクロン）から選択される少なくとも１つのバリアントが含まれる。

【０３４３】

ある特定の実施形態では、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２には、Ａ．１～Ａ．６、Ｂ．３～Ｂ．７、Ｂ．９、Ｂ．１０、Ｂ．１３～Ｂ．１６、Ｂ．２、Ｂ．１系統、Ｐ．１、Ｐ．２、Ｐ．３及びＲ．１から選択される少なくとも１つのバリアントが含まれる。

【０３４４】

ある特定の実施形態では、Ｂ．１系統には、（それだけには限らないが、Ｂ．１、Ｂ．１．１、Ｂ．１．１．７、Ｅ４８４Ｋを有するＢ．１．１．７、Ｂ．１．２、Ｂ．１．５～Ｂ．１．７２、Ｂ．１．９、Ｂ．１．１３、Ｂ．１．２２、Ｂ．１．２６、Ｂ．１．３７、Ｂ．１．３－Ｂ．１．６６、Ｂ．１．１７７、Ｂ．１．２４３、Ｂ．１．３１３、Ｂ．１．３５１、Ｂ．１．４２７、Ｂ．１．４２９、Ｂ．１．５２５、Ｂ．１．５２６、Ｂ．１．５２６．１、Ｂ．１．５２６．２、Ｂ．１．６１７、Ｂ．１．６１７．１、Ｂ．１．６１７．２、Ｂ．１．６１７．３、Ｂ．１．６１９、Ｂ．１．６２０及びＢ．１．６２１を含むもののうち少なくとも１つが含まれる。

【０３４５】

ｉｉ．インフルエンザ

一部の実施形態では、方法は、対象においてインフルエンザウイルス感染症（インフルエンザ）の１つ以上の症状を防ぐ。例えば、方法は、対象においてインフルエンザの１つ以上の症状又は生理学的マーカーを防ぐ又は低減する。一部の実施形態では、方法は、１つ以上のインフルエンザウイルスによる感染を防ぐ、又はインフルエンザの１つ以上の症状を防ぐ若しくは低減する。インフルエンザの例示的症状として、咳、疲労、発熱、体の痛み、頭痛、咽頭痛、嘔吐、下痢、サイトカインストーム、皮膚の変化、胸痛及び息切れが挙げられる。したがって、一部の実施形態では、方法は、咳、疲労、発熱、体の痛み、頭痛、咽頭痛、胸痛及び息切れのうち１つ以上を防ぐ又は低減する。

【０３４６】

ｂ．他の疾患

一部の実施形態では、方法は、１つ以上の他の感染性疾患、例えば、ウイルス性疾患、例えば、ＨＩＶ／ＡＩＤＳ、ＡＩＤＳ関連症候群、水痘（Ｃｈｉｃｋｅｐｏｘ）（水痘（Ｖａｒｉｃｅｌｌａ））、感冒、サイトメガロウイルス感染、コロラドダニ熱、デング熱、エボラ出血熱、流行性耳下腺炎、インフルエンザ、手足口病、肝炎、単純ヘルペス、帯

状疱疹、ＨＰＶ、ラッサ熱、麻疹、マールブルグ出血熱、流行性単核球症、ムンプス、灰白髄炎、進行性多巣性白質脳症、狂犬病、風疹、天然痘（痘瘡）、ウイルス性脳炎、ウイルス性胃腸炎、ウイルス性髄膜炎、ウイルス性肺炎、ウエストナイル疾患又は黄熱病；又は細菌性疾患、例えば、炭疽病、細菌性髄膜炎、ブルセラ症、腺ペスト、カンピロバクター症、ネコ引っかき病、コレラ、ジフテリア、発疹チフス、淋病、ハンセン病、レジオネラ病、らい病、レプトスピラ症、リステリア症、ライム病、類鼻疽、ＭＲＳＡ感染症、ノカルジア症、百日咳、肺炎球菌肺炎、オウム病、Ｑ熱、ロッキー山紅斑熱又はＲＭＳＦ、サルモネラ症、猩紅熱、細菌性赤痢ｓａ、梅毒、テタヌス、トラコーマ、結核、野兎病、腸チフス熱、チフス、百日咳；寄生生物疾患、例えば、アフリカトリパノソーマ症、アメーバ症、回虫症、バベシア症、シャーガス病、肝吸虫症、クリプトスポリジウム症、嚢虫症、裂頭条虫症、メジナ虫症、エキノコックス症、腸蟯虫症、肝蛭症、肥大吸虫症、フィラリア症、自由生活性アメーバ感染症、ジアルジア症、顎口虫症、膜様条虫症、イソスポーラ症、カラアザール、リーシュマニア症、マラリア、横川吸虫症、ハエ幼虫症、オンコセルカ症、シラミ寄生症、蟯虫感染症、疥癬、住血吸虫症、条虫症、トキソカラ症、トキソプラズマ症、旋毛虫症、旋毛虫症、鞭虫症及びトリパノソーマ症に対して対象にワクチン接種する。

【０３４７】

Ｃ．投与経路

方法は、インビボで例えば、ポリヌクレオチドの形態の抗原を細胞に送達するために使用され得る。ポリマーは、ＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥ２０００、ＰＥＩ及びさらに他のＰＭＳＣを含む代替トランスフェクション試薬よりも、ポリヌクレオチドの全身性インビボトランスフェクションにとってより効率的であり、及び／又は毒性が低いということが発見された。したがって、一部の実施形態では、治療用ポリヌクレオチドを含む細胞特異的粒子は、疾患、例えば、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）及びがんを防ぐためにインビボで全身に投与される。

【０３４８】

組成物は、一般に、有効量で対象に投与される。本明細書で使用される場合、「有効量」という用語は、１つ以上の感染症又は疾患の症状を阻害する、又は防ぐのに、又はそうでなければ所望の薬理学的及び／又は生理学的効果を提供するのに十分な投与量を意味する。正確な投与量は、対象依存性変数（例えば、年齢、免疫系の健康など）、免疫が望まれる疾患及び影響される処置などのさまざまな因子に従って変わる。

【０３４９】

医薬組成物は、非経口（筋肉内、腹腔内、静脈内（ＩＶ）又は皮下注射）、経皮（受動的に、又はイオン導入法若しくはエレクトロポレーションを使用してのいずれか）又は経粘膜（鼻腔、膣、直腸又は舌下）投与経路による、又は生体内分解性挿入物を使用する投与のためのものである場合があり、各投与経路にとって適切な投与形で製剤化され得る。

【０３５０】

一部の実施形態では、組成物は、全身又は粘膜経路を介して、例えば、静脈内又は腹膜内投与によって、標的化細胞への組成物の送達に有効な量で投与される。

【０３５１】

ある特定の実施形態では、組成物は処置される部位に局所的に、例えば、注射によって直接的に投与される。一部の実施形態では、組成物は、１つ以上の腫瘍に注射されるか、そうでなければ直接的に投与される。通常、局所注射は、組成物の局在する濃度の増大を引き起こし、これは、全身投与によって達成され得るものよりも大きい。一部の実施形態では、組成物は、カテーテル又はシリンジを使用して適切な細胞に局所的に送達される。このような組成物を細胞に局所的に送達する他の手段として、注入ポンプ（例えば、Ａｌｚａ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ、Ｃａｌｉｆ．製の）を使用すること又は組成物をポリマー性留置剤中に組み込むこと（例えば、Ｐ．Ｊｏｈｎｓｏｎ ａｎｄ Ｊ．Ｇ．Ｌｌｏｙｄ－Ｊｏｎｅｓ編、Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｃｈｉｃｈｅｓｔｅｒ、Ｅｎｇｌａｎｄ： Ｅｌｌｉｓ Ｈｏｒｗｏｏｄ Ｌｔｄ．、

１９８７を参照されたい）が挙げられ、これは、留置剤の隣接領域への粒子の持続放出に影響を及ぼし得る。

【０３５２】

粒子は、直接的に、例えば、それを細胞と接触させることによって、又は間接的に、例えば、任意の生物学的プロセスの作用によって細胞に提供され得る。例えば、粒子は、生理学的に許容される担体又は媒体中で製剤化され、細胞の周囲の組織若しくは流体中に注射され得る。粒子は、単純拡散、エンドサイトーシスによって、又は任意の能動若しくは受動輸送機序によって細胞膜を超えることができる。

【０３５３】

鼻腔内ワクチンは、肺T_{RM}の頑強な集団を生成する。ワクチン送達様式は、T_{RM}の生成において重要な役割を果たす。ワクチン送達の異なる様式は、同様のレベルの全身性抗体及びT_{CM}を生成するが、大きく異なるレベルの粘膜抗体及びT_{RM}を生成する場合がある。T_{RM}の有無は、感染に対する耐性に反映され、防御免疫の代用物として、抗体力価及び／又は記憶Ｔ細胞存在量及び機能のために血液を簡単にサンプリングすることは、この目的には程遠く、判断を誤らせることさえあり得ることを明確に実証する。

【０３５４】

１．粘膜組織を介した投与

粒子は、抗原の送達において有用である。粒子は、鼻腔又は肺系への投与に特に適しており、又は粘膜表面（膣、直腸、頬側、舌下）に投与される。粒子は、乾燥粉末として、水性懸濁液（水、生理食塩水、緩衝生理食塩水などの中の）として、ヒドロゲル、オルガノゲル又はリポソーム中で、カプセル剤、除溶剤、トローチ剤又は他の標準医薬賦形剤中で投与され得る。

【０３５５】

適した組成物及び投与形として、例えば、錠剤、カプレット、丸薬、ゲルキャップ、トローチ、分散液、懸濁液、溶液、シロップ、顆粒、ビーズ、経皮パッチ、ゲル、粉末、ペレット、マグマ、薬用キャンディ、クリーム、ペースト、プラスター、ローション、ディスク、坐剤、鼻腔又は経口投与用の液体スプレー、又は吸入用のエアロゾル化製剤、膀胱内投与用の組成物及び製剤などが挙げられる。本明細書で有用であろう製剤及び組成物は、本明細書で記載される特定の製剤及び組成物に限定されないということは理解されなくてはならない。

【０３５６】

粒子によって送達される特定のポリヌクレオチドは、処置される状態又は疾患に応じて当業者によって選択され得る。ポリヌクレオチドは、例えば、目的の遺伝子若しくはｃＤＮＡ、ｍＲＮＡ、機能的核酸、例えば、阻害性ＲＮＡ、ｔＲＮＡ、ｒＲＮＡ又は目的の遺伝子若しくはｃＤＮＡ、機能的核酸、ｔＲＮＡ若しくはｒＲＮＡをコードする発現ベクターであり得る。一部の実施形態では、２つ以上のポリヌクレオチドが、組み合わせて投与される。

【０３５７】

Ｄ．投与／投薬

臨床設定では、本明細書で記載される組成物の送達システムは、各々当技術分野で精通されているいくつかの方法によって対象中に導入され得る。例えば、組成物の医薬製剤は、吸入によって、又は例えば、静脈内注射によって全身に投与され得る。

【０３５８】

投与のレジメンは、有効量を構成するものに影響を及ぼし得る。治療用製剤は、疾患又は状態に伴う症状の顕在化の前又は後のいずれかで対象に投与されてもよい。さらに、いくつかの分割投与量並びに時差投与量が、毎日又は連続して投与されてもよく、又は用量は継続的に注入されてもよく、又はボーラス注射であってもよい。さらに、治療用製剤の投与量は、治療又は予防状況の緊急事態によって示されるように、比例的に増大又は減少され得る。

【０３５９】

対象、好ましくは、哺乳動物、より好ましくは、ヒトへの本明細書の組成物の投与は、対象において疾患又は状態を処置するのに有効な投与量で、期間の間、公知の手順を使用して実施され得る。治療効果を達成するのに必要な組成物の有効量は、投与時間；投与の持続期間；組成物と組み合わせて使用される他の薬物、化合物又は材料；疾患又は障害の状態；処置されている対象の年齢、性別、体重、状態、全身の健康及び以前の病歴；並びに医学の技術分野で周知の同様の因子などの因子に従って変わり得る。投与計画は、最適な治療応答を提供するように調整され得る。例えば、いくつかの分割用量が、毎日投与されてもよく、又は用量が、治療状況の緊急事態によって示されるように比例的に低減されてもよい。当業者は、関連因子を研究し、過度の実験を行わずに組成物の有効量に関して決定できる。製剤は、従来の賦形剤、すなわち、経口、非経口、鼻腔、静脈内、皮下、経腸又は当技術分野で公知の任意の他の適した投与様式に適した薬学的に許容される有機又は無機担体物質との混合物で利用され得る。医薬品は、滅菌され、必要に応じて、助剤、例えば、滑沢剤、保存料、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧緩衝液に影響を及ぼす塩、着色物質、矯味及び／又は芳香物質などと混合され得る。それらはまた、望まれる場合には、他の活性薬剤、例えば、他の鎮痛剤と組み合わされてもよい。

【０３６０】

本明細書の抗原の治療上有効な量又は用量は、患者の年齢、性別及び体重、患者の現在の医学的状態及び処置されている患者において本明細書において考慮される疾患又は障害の進行に応じて変わる。当業者は、これらの及び他の因子に応じて適切な投与量を決定できる。

【０３６１】

本明細書の抗原の適した用量は、１日あたり約０．００１ｍｇ～約５，０００ｍｇ、例えば、約０．０１ｍｇ～約１，０００ｍｇ、例えば、１日あたり約１ｍｇ～約５００ｍｇ、例えば、約５ｍｇ～約２５０ｍｇの範囲であり得る。用量は、単回投与量で、又は複数回投与量、例えば、１日あたり１～４又はそれより多い回数で投与され得る。複数投与量が使用される場合には、各投与量の量は、同一又は異なる場合がある。例えば、１日あたり１ｍｇの用量は、用量の間に約１２時間間隔をあけて２つの０．５ｍｇの用量として投与され得る。

【０３６２】

１日あたりに投薬される化合物の量は、限定されない例において、毎日、隔日で、２日毎に、３日毎に、４日毎に、又は５日毎に投与され得るということは理解される。例えば、隔日投与を用いる場合には、１日あたり５ｍｇの用量が月曜日に開始され、第１のその後の１日あたり５ｍｇの用量が水曜日に投与され、第２のその後の１日あたり５ｍｇの用量が金曜日に投与される場合があるなど。

【０３６３】

本明細書の医薬製剤中の細胞の実際の投与量レベルは、対象にとって毒性ではなく、特定の対象、組成物及び投与様式について、所望の治療応答を達成するのに有効である組成物の量を得るように変えられてもよい。

【０３６４】

このような治療レジメンの毒性及び治療効力は、それだけには限らないが、ＬＤ５０（集団の５０％にとって致死性の用量）及びＥＤ５０（集団の５０％において治療上有効な用量）の決定を含む、細胞培養物又は実験動物において任意選択的に決定される。毒性及び治療効果の間の用量比は治療係数であり、これは、ＬＤ５０とＥＤ５０の間の比率として表される。細胞培養アッセイ及び動物研究から得られたデータは、ヒトにおいて使用するための投与量の範囲の処方において任意選択的に使用される。このような化合物の投与量は、好ましくは、ＥＤ５０を含み、最小毒性を有する循環濃度の範囲内にある。投与量は、使用される投与形及び利用される投与経路に応じてこの範囲内で任意選択的に変わる。

【０３６５】

Ｅ．対照

対象におけるワクチン接種抗原に対して特異的な粘膜免疫応答及び／又は持続性の、防御的粘膜免疫の誘導における、ミセル（ｍｉｃｅｌｌｕｌａｒ）粒子又は固体ポリマー性ナノ粒子の形態のポリ（アミン－コ－エステル）ポリマー内に結合又は封入されたポリヌクレオチドベースのワクチンの効果は、対照と比較され得る。一部の実施形態では、対照は、非粘膜経路を介してプライミング免疫原性組成物及び／若しくはブースティング免疫原性組成物を有するもの、又は筋肉内経路を介してプライミング及びブースティング両方を有していたものである。一部の実施形態では、対照は、ポリ（アミン－コ－エステル）ポリマーを使用せずにプライミング免疫原性組成物及び／若しくはブースティング免疫原性組成物を有していたものである。さらなる実施形態では、対照は、プライミング免疫原性組成物及びブースティング免疫原性組成物を有していたものであり、いずれもワクチン担体としてポリ（アミン－コ－エステル）ポリマーを使用しない。

【０３６６】

適した対照は、当技術分野で公知であり、例えば、未処置対象又はプラセボ処置された対象が含まれる。通常の対照は、組成物の投与の前及び後の対象の状態又は症状の比較である。状態又は症状は、生化学的、分子的、生理学的又は病理学的読み出しであり得る。例えば、特定の症状に対する組成物の効果、薬理学的又は生理学的指標が、未処置対象又は処置の前の対象の状態と比較され得る。一部の実施形態では、症状、薬理学的又は生理学的指標が、処置の前の対象において測定され、処置が開始された後、再度１回以上測定される。一部の実施形態では、対照は、処置される疾患若しくは状態を有さない１人以上の対象（例えば、健康な対象）における症状、薬理学的若しくは生理学的指標の測定に基づいて決定された参照レベル又は平均である。一部の実施形態では、処置の効果は、当技術分野で公知である従来の処置と比較される。

【０３６７】

ＶＩ．キット

それだけには限らないが、１つ以上の病原性抗原に対する防御免疫を含む粘膜免疫を誘導するのに必要な要素を供給するキット又はパックも開示される。キットは、対象の免疫系を「プライム」するために使用される第１の組成物及び対象を「スパイク」する第２の組成物を含む。

【０３６８】

したがって、一部の態様では、本発明は、ウイルスによる感染に対して対象において免疫応答を誘発する／対象にワクチン接種するためのキットを対象とする。一部の実施形態では、ウイルスは、呼吸器感染症を引き起こすものである。一部の実施形態では、ウイルスは、コロナウイルス、インフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス又はそれらの任意の組合せである。

【０３６９】

一部の実施形態では、ウイルス感染症は、本明細書において別の場所で記載されるものと同一又は同様である。

【０３７０】

したがって、一部の実施形態では、キットは、対象の免疫系をプライミングするための第１の組成物及び第１の組成物を用いるワクチン接種後に免疫化をブーストするための第２の組成物を含有する。

【０３７１】

一部の実施形態では、第１の組成物は、本明細書において別の場所に記載される「プライミング」ステップにおいて使用されるものと同一又は同様である。

【０３７２】

一部の実施形態では、第２の組成物は、本明細書において別の場所に記載される「スパイキング」ステップにおいて使用されるものと同一又は同様である。

【０３７３】

一実施形態によれば、ポリマー、任意選択的にコーティング、例えば、標的特異的コーティング及び抗原性ポリペプチド又は抗原をコードするポリヌクレオチドを含むキットが

提供され、抗原を標的細胞に送達するために使用され得る複合体を形成する。粒子は、コーティングとさらに混合されて、細胞種又は細胞状態特異的指向性を提供し得る。

【０３７４】

一実施形態では、キットは、第１の組成物として適した筋肉内又は皮内製剤中に外因性抗原をコードする１つ以上のメッセンジャーリボ核酸を含むプライミング免疫原性組成物を含み、キットは、第２の組成物として、好ましくは、ＰＡＣＥ粒子中に封入されたウイルス抗原又はウイルス抗原をコードするｍＲＮＡを含有する組成物を含み得る。キットは、鼻腔内製剤中に、同一外因性抗原をコードする１つ以上のメッセンジャーリボ核酸を封入しているポリ（アミン－コ－エステル）又はポリ（アミン－コ－アミド）から形成された粒子（例えば、微粒子及び／又はナノ粒子）を含む免疫原性組成物を含み、一部の実施形態では、第１の及び／又は第２の組成物であり得る。別の実施形態では、プライミングワクチン組成物及びブースティングワクチン組成物は、別個の容器中にパッケージングされる。

【０３７５】

キットの個々の構成成分は、さまざまな容器中、例えば、バイアル、チューブ、マイクロタイターウェルプレート、ボトルなどにパッケージングされ得る。他の試薬、例えば、陽性対照試料、陰性対照試料、緩衝液、細胞培養培地などは、別個の容器中に含まれ、キットとともに提供され得る。好ましくは、キットはまた、使用のための説明書を含む。

【０３７６】

当業者は、ただ日常的な実験を使用して、本明細書に記載される特定の手順、実施形態、特許請求の範囲及び実施例の多数の等価物を認識する又は確認できる。このような等価物は本発明の範囲内にあり、添付の特許請求の範囲によって対象とされると考えられた。例えば、それだけには限らないが、当技術分野で認識された代替物を用いる、ただ日常的な実験を使用する、反応時間、反応物のサイズ／体積及び実験試薬、例えば、溶媒、触媒、圧力、雰囲気条件、例えば、窒素雰囲気及び還元剤／酸化剤を含む反応条件の改変は、本出願の範囲内であるということは理解されなくてはならない。

【０３７７】

値及び範囲が本明細書で提供される限り、これらの値及び範囲によって包含されるすべての値及び範囲が、本発明の範囲内に包含されることを意味すると理解されるべきである。さらに、これらの範囲内に入るすべての値並びに値の範囲の上限又は下限もまた、本出願によって企図される。

【実施例】

【０３７８】

本明細書では、以下の実験例を参照することによってさらに詳細に説明する。これらの実施例は、単に例示目的で提供されるものであって、そのように指定されない限り、制限であると意図されない。したがって、本明細書は、決して以下の実施例に制限されると解釈されてはならず、むしろ、提供される教示の結果として明らかとなるありとあらゆる変法を包含すると解釈されるべきである。

【０３７９】

［実施例１］

材料及び方法

細胞及びウイルス

Ｉｓｒａｅｌｏｗら（Ｓｃｉ Ｉｍｍｕｎｏｌ ６、ｅａｂｌ４５０９ （２０２１））、Ｇａｒｔｌａｎら（Ｆｒｏｎｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ １３、８８２９７２ （２０２２））及びＳａｎｃｈｅｚら（Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ６、ｅａｂｉ８６３５ （２０２１））において報告されたように、アンジオテンシン変換酵素２（ＡＣＥ２）及びＴＭＰＲＳＳ２を過剰発現するＶｅｒｏ Ｅ６細胞［米国国立衛生研究所ワクチン研究センター（ＮＩＨ－ＶＲＣ）のＢ．Ｇｒａｈａｍの好意により提供された］を、１％のピルビン酸ナトリウム及び５％のウシ胎児血清（ＦＢＳ）を補給したダルベッコの改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）中、３７℃及び５％CO_2で培養した。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－

２分離株ｈＣＯＶ－１９／ＵＳＡＷＡ１／２０２０（ＮＲ－５２２８１）は、ＢＥＩ　Ｒｅｓｏｕｒｃｅｓから入手し、ＡＣＥ２及びＴＭＰＲＳＳ２を過剰発現するＶｅｒｏＥ６細胞において増幅させた。多重感染度０．０１で２～３日間細胞に感染させて、作業ストックを生成し、インキュベーション後、遠心分離（５分、５００ｇ）によって上清を清澄化し、０．４５ｍｍのフィルターを通して濾過し、－８０℃で保存した。ｈＡＣＥ２及びＴＭＰＲＳＳ２を過剰発現するＶｅｒｏ　Ｅ６細胞を使用し、標準プラークアッセイを用いてウイルス力価を測定した。

【０３８０】

動物

Ｂ６．Ｃｇ－Ｔｇ（Ｋ１８－ＡＣＥ２）２Ｐｒｌｍｎ／Ｊ（Ｋ１８－ｈＡＣＥ２）マウス（ストック番号０３４８６０）を、Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙから購入し、その後、イェール大学で飼育し、収容した。８～１２週齢の雌のマウスを、免疫化実験に使用した。雄のシリアンハムスター（株、ＨＳｄＨａｎ：ＡＵＲＡ；ストック番号０８９）をＥｎｖｉｇｏから購入し、１２週齢でワクチン接種を開始した。この研究において使用したすべての手順（例えば、性別適合及び齢適合）は、連邦政府のガイドライン及びイェール大学医学部動物飼育・使用委員会の機関方針に準拠していた。使用される実験動物の全体数を低減するために、また本発明者らの施設の動物使用方針と一致するように、対照データ点はいくつかの図の間で共有され、適用できる場合、図の凡例に記されている。動物実験の試料サイズは、目的の生物学的効果を評価する十分な統計的検出力を提供するように、同様の実験パラダイムを用い、当該技術分野のこれまでに公開された研究に基づいて経験的に決定した。統計的手法を使用して、試料サイズを事前に決定することはなかった。実験の開始時に、齢及び性別を適合させた動物を実験群に無作為に割り当てた。主観的測定は実施されなかったので、病理学的解析を除いて研究者は盲検化されなかった。

【０３８１】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染

マウスは、プロピレングリコールで希釈された３０％　ｖ／ｖのイソフルランを使用して麻酔した。ピペットを使用して、６×１０４プラーク形成単位（ＰＦＵ）のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を含有する５０ｍｌを鼻腔内に送達した。ハムスターは、プロピレングリコールで希釈された３０％　ｖ／ｖのイソフルランを使用して麻酔し、１００ｍｌ中の６×１０　ＰＦＵのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を鼻腔内に投与した。

【０３８２】

コミナティ（ＢＮＴ１６２ｂ２）ｍＲＮＡ－ＬＮＰからのｍＲＮＡ抽出

ワクチン製剤からＴＲＩｚｏｌ－クロロホルム分離法を用いて、これまでに記載されたように（４１）ｍＲＮＡを抽出した。手短には、ワクチンのアリコートをＴＲＩｚｏｌ　ＬＳ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に、１：６．６のワクチン対ＴＲＩｚｏｌ体積比で溶解した。１５分インキュベート（３７℃、振盪）した後、１ｍｌのＴＲＩｚｏｌあたり０．２ｍｌのクロロホルムを添加した。１分間、溶液を激しく振盪し、次いで、室温で３分間インキュベートした。溶液を１２，０００ｇで８分間、４℃で遠心分離した。単離されたｍＲＮＡを含有する水層を、Ｑｉａｇｅｎ（Ｇｅｒｍａｎｔｏｗｎ、ＭＤ、ＵＳＡ）から購入したＲＮｅａｓｙ　Ｍａｘｉキットを用い、製造業者のプロトコールに従ってさらに精製した。最終ステップで、３７℃に加温した酢酸ナトリウム緩衝液（２５ｍＭ、ｐＨ５．８）を用いてＲＮＡをカラムから溶出した。抽出されたＲＮＡを、２６０、２８０及び２３０ｎｍの吸光度でのＮａｎｏＤｒｏｐ測定を用いて濃度及び純度について解析し、純度はＡ２６０／Ａ２８０＞２及びＡ２６０／Ａ２３０＞２として評価される。アガロースゲル電気泳動を使用して、長さを決定し、ｍＲＮＡが無傷のままであることを確認した。１：１００のＳＹＢＲ　Ｓａｆｅ色素（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を含有する抽出されたｍＲＮＡを１％アガロースゲルにロードし、１：５０００　ＳＹＢＲ　Ｓａｆｅ色素を含有するｔｒｉｓ－酢酸－ＥＤＴＡ緩衝液を用いて７５Ｖで流した（図１４）。

【０３８３】
ＡＣＥポリプレックス製剤化及び特性決定
　これまでに記載されたようにＰＡＣＥポリマーを合成し、特性決定した。すべてのポリプレックスを、５０：１の重量比のポリマー対ｍＲＮＡで製剤化した。ＰＡＣＥポリマーを、ジメチルスルホキシドに１００ｍｇ／ｍｌで一晩溶解した（３７℃、振盪）。ポリプレックス製造前に、末端基改変及びポリエチレングリコールテールを含有するＰＡＣＥポリマーの溶液を混合することによって最適ＰＡＣＥポリマーブレンドを生成した。ｍＲＮＡ及びポリマーを、等体積の酢酸ナトリウム緩衝液（２５ｍＭ、ｐＨ５．８）に希釈した。ポリマー希釈物を次いで、１５秒間ボルテックス処理し、ｍＲＮＡ希釈物と混合し、さらに２５秒間ボルテックス処理した。ポリプレックスは、使用前に室温で１０分間インキュベートした。
【０３８４】
ワクチン接種
　コミナティワクチンの使用済みバイアルを、開封から２４時間以内にＹａｌｅ　Ｈｅａｌｔｈ薬局から獲得し、４℃で保存した。バイアルは、残存するワクチン（製造業者の使用説明書によって１００ｍｇ／ｍｌに希釈された）を含有しており、これを脊髄用シリンジで回収し、プールした。プールされた残存ワクチンをアリコートにし、－８０℃で保存した。マウスは、ケタミン（体重１キログラムあたり５０ｍｇ）及びキシラジン（体重１キログラムあたり５ｍｇ）の混合物を使用することによって麻酔し、腹膜内に注射した。ワクチンを滅菌リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で希釈し、示されたように１又は０．０５ｍｇの最終用量について１０又は２０ｍｌを３１Ｇシリンジを用いて左四頭筋中に注射した。同様に、ハムスターに、左四頭筋に３１Ｇシリンジによって２０ｍｌに希釈した０．５ｍｇを投与した。ＩＮワクチン接種のために、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２－安定化されたスパイク（ＡＣＲＯ　ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、ＳＰＮ－Ｃ５２Ｈ９）又はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイク（ＡＣＲＯ　ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、ＳＰＮ－Ｓ５２Ｈ６）を製造業者のプロトコールに従って滅菌エンドトキシン不含水で再構成し、次いで、滅菌ＰＢＳで希釈し、－８０℃で保存した。マウス又はハムスターをイソフランを使用することによって麻酔し、ＩＮ経路によって５０ｍｌ（示される場合には２５ｍｌ）中の１又は５ｍｇ（示されるように）を投与した。ＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥについては、溶液中の５０ｍｌのポリプレックスを示された用量で投与した。
【０３８５】
ウイルス力価解析
　ウイルス力価解析を、これまでに記載され、記載された改変を加え、本明細書に概説されるように実施した。マウスを、示された時点で１００％イソフランで安楽死させた。肺全体のおよそ半分（右葉）又は鼻腔の鼻甲介を、１ｍｌの、２％のＦＢＳ及び２％の抗生物質／抗真菌剤（Ｇｉｂｃｏ）を補給したＰＢＳを含有するビーズホモジナイザーチューブ中でホモジナイズし、－８０℃で保存した。鼻腔の鼻甲介及び肺ホモジネートから、遠心分離（１０分、３１００ｇ）によってデブリを清澄化した。毎日の口腔スワブ（Ｐｒｕｉｔａｎ　ＰｕｒＦｌｏｃｋ　Ｕｌｔｒａ　２５－３２０６－Ｕ）をハムスターで実施し、１ｍｌの、２％のＦＢＳ及び２％の抗生物質／抗真菌剤（Ｇｉｂｃｏ）を有するＤＭＥＭ中で保存し、ー８０℃で保存した。感染性ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２力価を決定するために、プラークアッセイを、ＡＣＥ２及びＴＭＰＲＳＳ２を過剰発現するＶｅｒｏ　Ｅ６細胞を使用することによって実施した。プラークを感染の４０～４２時間後にホルマリン固定によって分離し、続いて、プラーク可視化のためにクリスタルバイオレットを用いて染色し、水ですすいだ。
【０３８６】
ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２－特異的抗体測定
　酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）をこれまでに記載されたように（Ｉｓｒａｌｏｗら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．、２１７：ｅ２０２０１２４１（２０２０）、Ａｒｍａｔら、Ｎａｔ　Ｍｅｄ．、２６：１０３３～３６頁（２０２０））、記載された改変を加えて

、本明細書に概説されるように実施した。９６ウェルＭａｘｉＳｏｒｐ ｐｌａｔｅｓ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ ４４２４０４）を、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２Ｓ１タンパク質（ＡＣＲＯ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ Ｓ１Ｎ－Ｃ５２Ｈ３）又はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１ Ｓ１タンパク質（ＡＣＲＯ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ Ｓ１Ｎ－Ｓ５２Ｈ５）を用いてコーティングした。４℃で一晩インキュベートした後、プレートをブロッキング溶液（０．１％ Ｔｗｅｅｎ－２０及び５％粉乳を有するＰＢＳ）と交換し、室温で１～２時間インキュベートした。血清又はＢＡＬＦを希釈溶液（０．１％ Ｔｗｅｅｎ－２０及び２％粉乳を有するＰＢＳ）で希釈し、プレートに室温で２時間添加した。プレートを、自動プレートウォッシャー（サイクルあたり２５０ｍｌ）を使用することによってＰＢＳ－Ｔ（０．０５％ Ｔｗｅｅｎ－２０を有するＰＢＳ）で５回洗浄し、希釈溶液で希釈した、５０ｍｌの西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）抗マウスＩｇＧ（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ７０７６；１：３０００）、ＨＲＰ抗マウスＩｇＡ（Ｓｏｕｔｈ－ｅｒｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ １０４０－０５；１：１０００）、ＨＲＰ抗ハムスターＩｇＧ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ ６０６０－０５； １：１０００）又はウサギ抗ハムスターＩｇＡ ＨＲＰ（Ｂｒｏｏｋｗｏｏｄ Ｂｉｏ－ｍｅｄｉｃａｌ、ｓａｂ３００３ａ、１：２５０ １００ｍｇ／ｍｌ）を各ウェルに添加した。室温で１時間インキュベートした後（ハムスターＩｇＡについては４℃で一晩）、プレートを自動プレートウォッシャーを使用することによってＰＢＳ－Ｔで３回洗浄した。５０μｌのＴＭＢ基質試薬セット（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ ５５５２１４）をプレートに添加した。１５分の基質発色後に、反応を終結させるために別の５０ｍｌの２Ｎ硫酸を添加した。次いで、プレートを４５０及び５７０ｎｍの波長で記録し、相違をＡＵＣとして報告した。

【０３８７】

免疫組織化学及び病理学的解析

イェール病理組織サービス（Ｙａｌｅ Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ Ｔｉｓｓｕｅ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ）（ＹＰＴＳ）が肺組織の包理、切片作製並びにヘマトキシリン及びエオシン（Ｈ＆Ｅ）染色を実施した。肺の病理医が、盲検でスライドを再検討し、免疫細胞浸潤及び他の関連病理を同定した。１～４のマウス肺スコアは、以下のとおりに特徴付けられた：１、実質及び血管周囲の、軽度の斑状単核浸潤物、不定に反応性の肺細胞及び間質反応を伴う；２、実質及び血管周囲の、中程度の斑状単核浸潤物、不定に反応性の肺細胞及び間質反応を伴う；３、軽度の、単核細胞及び顆粒球及び好中球を含む高密度混合浸潤物；並びに４、中程度の、単核細胞及び顆粒球及び好中球を含む高密度混合浸潤物。０～４のハムスター肺スコアは、以下のとおりに特徴付けられた：０、正常；１、極めて限局的な傷害、炎症及び修復；２、多巣的修復；及び４、壊死を伴う多巣的修復。

【０３８８】

血管内標識、細胞単離及びフローサイトメトリー

循環免疫細胞を血管外免疫細胞と識別するために、マウスに３０％イソフランを用いて麻酔し、２ｍｇのＡＰＣ／Ｆｉｒｅ ７５０標識抗ＣＤ４５ Ａｂを静脈内に注射した。３分標識した後、マウスを安楽死させた。組織を回収し、これまでに記載されたように（３９）解析した。手短には、肺及び鼻腔の鼻甲介をハサミで切り刻み、ＲＰＭＩ中にコラゲナーゼＡ（Ｒｏｃｈｅ）及びＤＮアーゼＩ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を含有する消化カクテル中、３７℃で４５分間インキュベートし、７０ｍｍフィルターを通して分離した。気道常在免疫細胞を、ＢＡＬＦを４℃で６００ｇで５分間遠心分離することによって収集し、その後、細胞ペレットをフローサイトメトリーに使用し、上清を抗体解析に使用した。細胞を塩化アンモニウム－カリウム（ＡＣＫ）緩衝液で処置して、赤血球を溶解し、次いでＰＢＳで１回洗浄した。単細胞懸濁液を、Ｆｉｘａｂｌｅ Ａｑｕａ細胞生存力色素（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｌ３４９５７）及び抗マウスＣＤ１６／ＣＤ３２ ＦｃＢｌｏｃｋ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ ５５３１４１）とともに４℃で３０分間インキュベートした。細胞をＰＢＳで１回洗浄し、その後表面染色した。Ｔ細胞解析のために、細胞をまず、ＡＰＣ標識ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ Ｓ ６２－７６ ＭＨＣクラスＩＩ

四量体［Ｉ－Ａ（ｂ）］を用いて室温で６０分間染色した。細胞をＰＢＳで１回洗浄し、次いで、抗ＣＤ１０３、抗ＣＤ３、抗ＣＤ４４、抗ＣＤ６２Ｌ、抗ＣＤ８ａ、抗ＣＤ６９、抗ＣＤ１８３（ＣＸＣＲ３）、抗ＣＤ４及びＰＥ－ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ　５３９－５４６　ＭＨＣクラスＩ四量体［Ｈ－２Ｋ（ｂ）］を用いて４℃で３０分間染色した。Ｂ細胞解析のために、細胞を、抗ＧＬ７、抗ＩｇＭ、抗ＣＤ１３８、抗ＣＤ１９、抗ＩｇＡ、抗Ｂ２２０、ＰＥ－ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＲＢＤ四量体、抗ＣＤ３８、ＡＰＣ－ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＲＢＤ四量体及び抗ＩｇＤとともに４℃で３０分間染色した。細胞をＰＢＳで１回洗浄し、続いて、４℃で４５分間４％パラホルムアルデヒド固定した。フローサイトメトリーデータは、Ａｔ－ｔｕｎｅ　ＮｘＴフローサイトメーターで獲得し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェア（１０．５．３；Ｔｒｅｅ　Ｓｔａｒ）の使用によって解析した。図１５Ａ～１５Ｃでは、ゲーティング戦略が提供され、以下の表１に詳細な抗体情報が提供されている。

【０３８９】

【表１】

試薬	フルオロフォア	クローン#	カタログ#	ベンダー	最終濃度
					(μg/mL)
抗B220	PerCP/Cy5.5	RA3-6B2	103236	BioLegend	63.9
抗CD3	PerCP/Cy5.5	17A2	100218	BioLegend	56.1
抗CD3	BV605	17A2	100237	BioLegend	63.9
抗CD4	AF700	GK1.5	100430	BioLegend	159.7
抗CD4	APC/Cy7	GK1.5	100414	BioLegend	99.3
抗CD8a	PerCP/Cy5.5	53-6.7	100734	BioLegend	63.9
抗CD19	BV785	6D5	115543	BioLegend	5.8
抗CD38	PE/Cy7	90	102718	BioLegend	63.9
抗CD44	AF700	IM7	103026	BioLegend	159.7
抗CD44	BV711	IM7	103057	BioLegend	63.9
抗CD45.1	BV785	A20	110743	BioLegend	56.1
抗CD62L	FITC	MEL-14	104406	BioLegend	159.7
抗CD69	PE/Cy7	H1.2F3	104512	BioLegend	56.1
抗CD103	BV421	2E7	121422	BioLegend	56.1
抗CD138	BV711	281-2	142519	BioLegend	63.9
抗CXCR3	APC	CXCR3-173	126512	BioLegend	63.9
抗GL7	パシフィックブルー	GL7	144614	BioLegend	159.7
抗IgA	FITC	N/A	1040-02	Southern Biotech	319.4
抗IgD	AF700	11-26c.2a	405710	BioLegend	159.7
抗IgM	BV605	RMM-1	406513	BioLegend	63.9
抗IL-2	PE	JES6-5H4	503808	BioLegend	56.1
抗IL-4	AF488	11B11	504109	BioLegend	99.3
抗IL-17A	BV421	TC11-18H10.1	506926	BioLegend	56.1
抗TNF-α	PE/Cy7	MP6-XT22	506324	BioLegend	56.1
抗IFN-γ	BV711	XMG1.2	505836	BioLegend	56.1
SCV2スパイク S62-76MHC II 四量体	APC	N/A	N/A	NIH Tetramer Core	344.7
SCV2スパイク S539-546 MHC I 四量体	PE	N/A	N/A	NIH Tetramer Core	460.8
抗CD45	APC/Fire 750	30-F11	103154	BioLegend	2μg/マウス
抗CD45	BV605	30-F11	103140	BioLegend	2μg/マウス

表S1.本研究において使用されたフローサイトメトリー試薬の特異性、コンジュゲートされたフルオロフォア、クローン番号、カタログ番号、ベンダー、希釈及び最終濃度。

【０３９０】

肺常在スパイク特異的ＣＤ４Ｔ細胞の検出のための細胞内サイトカイン染色アッセイ

マウスあたり２ｍｇの用量で抗ＣＤ４５　Ａｂを使用することによって血管内標識し、肺を単離し、処理した後、パーコール勾配を使用することによって肺組織から単細胞をまず濃縮し、その後スパイクペプチド刺激した。手短には、総肺細胞を、１５ｍｌのコニカルチューブ中の５ｍｌの３０％パーコール溶液にまず再懸濁し、５ｍｌの７０％パーコール溶液を下に敷き、１０００ｇで室温で２０分間の遠心分離に付した。遠心分離後、３０と７０％パーコール溶液の間の相に位置するリンパ球を収集し、ＰＢＳで１回洗浄し、完全ＲＰＭＩに再懸濁した。９６ウェルＵ底プレートにおいて、各肺試料から濃縮された１

０６個のリンパ球を、１ｍｇ／ペプチド１ｍｌの最終作業濃度のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（ＪＰＴ　ＰＭ－ＷＣＰＶ－Ｓ－１）又はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（ＪＰＴ　ＰＭ－ＣＶＨＳＡ－Ｓ－１）からのスパイクペプチドメガプール、１Ｘタンパク質輸送阻害剤カクテル（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　００－４９８０－０３）及び１０６個のＣＤ４５．１＋マウスから新たに単離された脾細胞と一緒に添加し、２００ｍｌの最終体積のために完全ＲＰＭＩを用いた。ペプチド刺激を３７℃で８時間実施した。ペプチド刺激後、細胞をＦｃブロック（ＢｉｏＸＣｅｌｌ　ＢＥ０３０７）及びＡｑｕａ細胞生存力色素（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｌ３４９５７）とともに４℃で２０分間インキュベートした。細胞をＰＢＳで１回洗浄し、その後、抗ＣＤ３、抗ＣＤ４４、抗ＣＤ４及び抗ＣＤ４５．１を用いて表面染色した。ＰＢＳで洗浄した後、細胞を４％パラホルムアルデヒドを使用することによって４℃で４５分間固定した。次いで、細胞を洗浄し、１Ｘ透過処理緩衝液（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　００－８３３３－５６）を用いて室温で１０分間透過処理した。透過処理後、細胞を抗ＩＬ－４、抗ＩＬ－２、抗腫瘍壊死因子α（ＴＮＦ－α）、抗ＩＬ－１７Ａ及び抗インターフェロン－γ（ＩＦＮ－γ）を用いて染色した。細胞をＰＢＳで１回洗浄し、その後、Ａｔｔｕｎｅで獲得し、ＦｌｏｗＪｏの使用によって解析した。図１５Ａ～１５Ｃでは、ゲーティング戦略が提供され、表１に詳細な抗体情報が提供されている。

【０３９１】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＲＢＤ　Ｂ細胞四量体生成及び染色

組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクＲＢＤ　Ｈｉｓビオチンタンパク質、ＣＦ（Ｒ＆Ｄ　ＢＴ１０５００－０５０）を、４：１のモル比でストレプトアビジン－ＰＥ（Ｐｒｏｚｙｍｅ　ＰＪＲＳ２５）又はストレプトアビジン－ＡＰＣ（Ｐｒｏｚｙｍｅ　ＰＪ２７Ｓ）のいずれかとともに４℃で３０分間インキュベートした。次いで、混合物をＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ（５０ｋＤＡ　ＭＷＣＯ）スピンカラム中で精製し、濃縮し、滅菌冷ＰＢＳで１回洗浄した。濃度をＮａｎｏＤｒｏｐ　８０００分光光度計（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　ＮＤ－８０００－ＧＬ）でフルオロフォア特異的吸光度を使用することによって決定した。次いで、四量体をＰＢＳで１．０ｍＭに希釈し、４℃で保存した。２×１０^{7}個～５×１０^{7}個の細胞毎に、１ｍｌのストックの１．０ｍＭ四量体を染色のために使用した。

【０３９２】

偽ウイルス生成及び中和アッセイ

偽ウイルスを、これまでに記載されたように（Ｉｓｒａｅｌｏｗら、Ｉｍｍｕｎｏｌ．、６、ｅａｂｌ４５０９　（２０２１））生成した。スパイクをコードするプラスミドは、Ｖ．Ｍｕｎｓｔｅｒの好意により提供され、これまでに記載されている（４５）。偽ウイルス中和アッセイを実施するために、ｈＡＣＥ２及びＴＭＰＲＳＳ２を過剰発現するＶｅｒｏ　Ｅ６（図１）又はＨｕｈ７．５細胞（図５及び図９Ａ～Ｈ）を、感染の前日に白色９６ウェルプレートの各ウェルにプレーティングした（３×１０４）。感染の当日、血清及びＢＡＬＦを５６℃で３０分間熱不活化した。図１に示される血清を、１：５０の出発希釈で試験し、ＢＡＬＦ試料を１：４の出発希釈で試験し、両方とも８つの２倍段階希釈を有していた。図５及び図９Ａ～Ｈに示される血清は、１：４０の出発希釈で試験し、８つの３倍段階希釈を有していた。段階希釈を示された偽ウイルスと１：１混合し、３７℃及び５％ＣＯ２で１時間インキュベートした。次いで、増殖培地を細胞から吸引し、１００ｍｌの血清－ウイルス混合物と交換した。感染の２４時間後、感染－抗体混合物を回収し、プレートを－８０℃で急速凍結した。３０ｍｌの受動的溶解緩衝液（Ｐｒｏｍｅｇａ）を各ウェルに添加し、プレートを室温で１５分間インキュベートした。次いで、各ウェルに３０ｍｌのウミシイタケ（Ｒｅｎｉｌｌａ）－Ｇｌｏルシフェラーゼアッセイシステム基質（Ｐｒｏｍｅｇａ）、さらに１５分間室温でインキュベートした。発光をマイクロプレートリーダー（ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　ｉ３、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）で測定した。中央値阻害濃度を、Ｐｒｉｓｍ　９（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗｅｒｅ）非線形回帰を用いて算出した。

【０３９３】

配列アラインメント

アラインメントに使用されたコロナウイルススパイクタンパク質の以下のアミノ酸配列は、Ｕｎｉｐｒｏｔ／Ｇｅｎｅｂａｎｋ：Ｗｕｈａｎ（Ｐ０ＤＴＣ２）、Ｂ．１．１．７（ＱＷＥ８８９２０．１）、Ｂ．１．３５１（ＱＲＮ７８３４７．１）、Ｂ．１．６１７（ＱＵＤ５２７６４．１）、Ｂ．１．１．２８．１（ＱＲＸ３９４２５．１）、ＢＡ．１（ＵＦＯ６９２７９．１）、ＢＡ．２（ＵＦＯ６９２７９．１）、ＢＡ．２．１２．１（ＵＭＺ９２８９２．１）、ＢＡ．４（ＵＰＰ１４４０９．１）、ＢＡ．５（ＵＯＺ４５８０４．１）、Ｋｈｏｓｔａ（ＭＺ１９０１３７．１）、Ｋｈｏｓｔａ－２（ＭＺ１９０１３８．１）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ（ＡＹ２７８４８９．２）、ＷＩＶ１（ＫＦ３６７４５７）及びＢＡＮＡＬ２３６（ＭＺ９３７００３．１）から入手した。配列アラインメントは、ＪａｌＶｉｅｗ（ｖ２．１１．２．３）においてＭＡＦＦＴを用いて実施した。

【０３９４】

結果

アジュバント非添加ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを用いるＩＮブースティングは、粘膜体液性免疫を誘導する

呼吸器粘膜免疫の発生のためのＩＮアジュバント非添加サブユニットワクチンブースティングの可能性を評価するために、本発明者らは、ｍＲＮＡ－ＬＮＰの強い全身免疫原性を利用することとした。本発明者らはさらに、免疫原性を実質的に増強し、タンパク質安定性を増大するとわかっているＨｅｘａＰｒｏを使用することによる広範なＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク操作から恩恵を受けた（Ｈｓｉｅｈら Ｓｃｉｅｎｃｅ ３６９、１５０１～１５０５頁（２０２０））。

【０３９５】

Ｋ１８－ｈＡＣＥ２（マウス）に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰ（Ｐｆｉｚｅｒ／ＢｉｏＮＴｅｃｈ ＢＮＴ１６２ｂ２）を用いＩＭ注射（プライム）によって、続いて、１４日後に、１μｇの組換えアジュバント非添加スパイクタンパク質のＩＮ投与［プライム及びスパイク（Ｐ＆Ｓ）］を用いてワクチン接種した。２１日目又は２８日目にマウスを安楽死させ、粘膜体液性免疫について評価した（図１Ａ）。

【０３９６】

まず、抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクＩｇＧ及びＩｇＡは、鼻腔洗浄液（図１Ｂ及び１Ｃ）、気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬＦ）（図１Ｄ及び１Ｅ）及び血清（図１Ｆ及び１Ｇ）において評価した。Ｐ＆Ｓを投与されたマウスのみで、鼻腔洗浄液及びＢＡＬＦにおいて高レベルの抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ ＩｇＡ及びＩｇＧが生じた。ＩＭプライムも、ＩＮスパイクも単独では粘膜抗体が生じるには十分ではなかった。血清では、低レベルのＩｇＡ及びＩｇＧを誘導するにはプライム単独で十分であった。対照的に、Ｐ＆Ｓは、抗スパイクＩｇＡ及びＩｇＧ両方の著しい全身性のブースティングにつながった。抗体レベルのこれらの増大は、ＢＡＬＦ（図１Ｈ）及び血清（図１Ｉ）両方における中和力価の増大と相関した。したがって、単回用量のアジュバント非添加ＩＮスパイク単独は、免疫原性ではなく、アジュバント非添加スパイクによる強力な粘膜及び全身性抗体応答の誘導には、この場合にはｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いる事前の全身性プライミングが必要である。

【０３９７】

肺における組織常在記憶Ｂ細胞（B_{RM}）細胞は、インフルエンザモデルにおいて二次異種曝露の際の抗体分泌性形質細胞の迅速なリコール応答を補助し、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対する防御において重要な局所免疫エフェクターであり得る（２９）。肺組織内の循環免疫細胞を識別するための静脈内（ＩＶ）ＣＤ４５標識を、スパイクタンパク質の受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）に特異的なＢ細胞四量体と組み合わせて使用することで、データは、Ｐ＆Ｓが、肺組織内での抗原特異的Ｂ細胞（$IV^{-}CD45^{-}B220^{+}CD19^{+}$四量体$^{+}$）の増大につながったことを示した（図１Ｊ）。本研究はまた、肺内のスパイク特異的Ｂ細胞のより完全なセットに相当する可能性が高い、ポリクローナル組織応答を調べた。データは、ＩｇＡ又はＩｇＧを発現する肺組織におけるクラススイッチした抗体分泌性細胞（ＡＳＣ）（$IV^{-}CD45^{-}CD19^{+/-}CD138^{+}$）の増大（図１Ｋ

及び１Ｌ）並びにＩｇＡ又はＩｇＧを発現するクラススイッチしたＢ$_{RM}$細胞（ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$Ｂ２２０$^{+}$ＣＤ１９$^{+}$ＩｇＤ$^{-}$ＩｇＭ$^{-}$ＣＤ３８$^{+}$）の増大（図１Ｍ及び１Ｎ）を示した。したがって、Ｐ＆Ｓは、肺において局所Ｂ細胞応答を誘発する。

【０３９８】

プライム及びスパイクは、粘膜Ｔ細胞免疫を誘導する

Ｐ＆Ｓが呼吸器粘膜体液性記憶を誘導したことを考慮して、次の研究では肺記憶Ｔ細胞（Ｔ$_{RM}$細胞）の誘導を評価した。アジュバント不含サブユニットワクチンは伝統的に、抗原特異的Ｔ細胞応答の強力な誘導因子ではなかったが、仮説は、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライミングによって生じた免疫記憶が、サブユニット媒介性Ｔ細胞ブースティング応答を可能にするということであった。スパイク特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を同定するために、主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）クラスＩ四量体Ｓ５３９－５４６（ＶＮＦＮＦＮＧＬ（配列番号６））を使用した。肺組織（図２Ａ～２Ｃ）、ＢＡＬＦ（図２Ｄ～２Ｆ）及び鼻腔の鼻甲介（図２Ｇ～２Ｉ）内でＣＤ６９$^{+}$及びＣＤ１０３$^{+}$を含むＴ$_{RM}$細胞の標準的なマーカーを発現するＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の有意な誘導があった。さらに、抗原を経験したＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞（ＩＶ$^{-}$ＣＤ４５$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４$^{+}$）の有意な増大があり、その多くは、肺組織（図２Ｊ～２Ｌ）内で、及びＢＡＬＦ（図２Ｍ～２Ｏ）においてＣＤ６９$^{+}$及びＣＤ１０３$^{+}$の両方を発現した。したがって、Ｐ＆Ｓは肺柔組織及び気道ＣＤ８$^{+}$Ｔ$_{RM}$及びＣＤ４$^{+}$Ｔ$_{RM}$細胞の拡大増殖を媒介する。

【０３９９】

宿主遺伝子型、ブースティング間隔及びＩＮ体積は、Ｐ＆Ｓにほとんど影響を及ぼさない

マウス遺伝子型、ブースティング間隔又はブースティング体積が、Ｐ＆Ｓによって誘導される免疫に影響を及ぼしたか否かを評価するために、本発明者らは、Ｋ１８－ｈＡＣＥ２対Ｃ５７Ｂ６／Ｊ（Ｂ６Ｊ）マウス、２週間対４週間のブースティング間隔及び２５μｌ対５０μｌのＩＮ接種を含む変動する条件下で、Ｐ＆Ｓ後の粘膜ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞及び抗体応答を比較した（図７Ａ）。抗原特異的肺ＣＤ８$^{+}$Ｔ$_{RM}$細胞（図７、Ｂ～Ｄ）、ＢＡＬＦ　ＩｇＡ及びＩｇＧ（図７Ｅ及び７Ｆ）、血清ＩｇＡ及びＩｇＧ（図７Ｇ及び７Ｈ）並びに血清中和反応（図７Ｉ）は、すべての群の間で同様であり、プライム単独によって誘発された応答よりも有意に高かった。これらの結果は、複数の実験変数が免疫応答全体に影響を及ぼすことなく改変され得るので、Ｐ＆Ｓの頑健性を支持する。

【０４００】

遅延間隔Ｐ＆Ｓは、粘膜免疫を誘導する

追加の研究によって、増大した間隔でのブースティングが、Ｐ＆Ｓ応答に影響を及ぼすか否かを試験した。これを試験するために、マウスはＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰを受け、８４日後にＩＮスパイクでブーストされた。９１日目及び１４０日目での体液性及び細胞性粘膜免疫応答をサンプリングした（図８Ａ）。遅延Ｐ＆Ｓは、少なくとも５６日間ＣＤ８$^{+}$Ｔ$_{RM}$細胞を誘導するのに十分であった（図８Ｂ～Ｄ）。ポリクローナルＣＤ４$^{+}$Ｔ$_{RM}$細胞が、ブーストの７日後に誘導された。しかし、その数は、その数は、５６日目まで減少したようであった（図８Ｅ～Ｇ）。遅延Ｐ＆Ｓはまた、ブースト後５６日目にＢＡＬＦにおける粘膜ＩｇＡ及びＩｇＧ（図８Ｈ及びＩ）並びに血清ＩｇＡ及びＩｇＧ（図８Ｊ及びＫ）の増強をもたらした。したがって、プライミングの最大３ヶ月後でさえ、投与されたＰ＆Ｓは、永続的な粘膜体液性及び細胞性免疫応答を誘発する。

【０４０１】

ｍＲＮＡポリプレックスのＩＮ送達も、粘膜ブースティングを媒介する

ポリ（アミン－コ－エステル）（ＰＡＣＥ）は、インビボで核酸、例えば、ｍＲＮＡを封入し、指定された組織に送達するために開発された生分解性ターポリマーである（Ｇｕｎら、Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ、２７２：１２０７８０（２０２１））。最近の研究によって、気道に送達されたｍＲＮＡ－ＬＮＰはマウスにおいて用量依存的に致死性であることが示された（Ｎｄｅｕｐｅｎら、ｉＳｃｉｅｎｅ、２４：１０３４７９（２０２１））。対照的に、ＰＡＣＥ材料は、相対的に免疫学的にサイレントであるように開発され、気道など免疫病理に対してより感受性の位置への投与を可能にする。ＰＡＣＥをポリエチ

レングリコールを用いて化学的に改変することは、インビボ肺送達を著しく改善する。スパイクタンパク質をコードするｍＲＮＡを封入するＰＡＣＥの、ＩＮブースターとしての有用性を評価するために、ｍＲＮＡをＢＮＴ１６２ｂ２から抽出し、ＰＡＣＥ中に封入した。マウスをｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングし、ＰＡＣＥ中に封入されたＩＮスパイクｍＲＮＡ（ＰＡＣＥ－スパイク）を用いてブーストした。追加の対照群には、ＰＡＣＥ－スパイクのみ及びＩＭプライム＋抽出されたｍＲＮＡ（裸のｍＲＮＡ）を含めた（図９Ａ）。Ｐ＆Ｓを用いて見出したものと同様に、プライム及びＰＡＣＥ－スパイクは、抗原特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ$_{ＲＭ}$細胞（ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$）を誘導した（図９Ｂ～９Ｄ）。さらに、ＰＡＣＥ－スパイクでブーストされたマウスでは、高レベルのＢＡＬＦ　ＩｇＡが生じた。ＢＡＬＦ　ＩｇＧ及び血清ＩｇＡ及びＩｇＧのレベルは、ＩＭプライム単独と同様であった（図９Ｅ～９Ｈ）。ＩＭプライムと、続いてＩＮ裸のｍＲＮＡは、ＩＭプライム単独のものを上回る粘膜又は全身性免疫応答を誘導できず、これは、粘膜ブースティングにはＰＡＣＥによるｍＲＮＡ封入が必要であったということを示す。さらに、ＩＮＰＡＣＥ－スパイク単独の単回用量は、この用量で何らかの検出可能な粘膜又は全身性抗体応答を誘発するには不十分であった。

【０４０２】

ＩＮスパイク又はＩＮ　ＰＡＣＥ－スパイクは、致死的ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２曝露に対して防御する最適以下のプライムをブーストする

現在のワクチンは、防御的免疫の誘発で当初は極めて有効であったが、抗体レベルの低下及び免疫回避のために、当面の間、ブースターが必要になる。ブースティングレジメンへの最良のアプローチは、未解決の問題のままである。ＩＮ投与が代替防御的ブーストを提供するか否かを試験するために、本発明者らは、低用量（ＬＤ）０．０５ｍｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰワクチンを使用して、非防御免疫を模倣した。本発明者らは以前に、この用量は、全身性抗体応答を誘導するにもかかわらずＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２曝露から防御するには不十分であるということを示した（Ｉｓｒａｅｌｏｗら、Ｉｍｍｕｎｏｌ．、６、ｅａｂｌ４５０９（２０２１）。ＬＤ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内にプライミングし、ＩＮスパイクを用いてブーストしたマウスでは、ブーストの４２日後にＢＡＬＦにおいて抗原特異的肺ＣＤ８$^{+}$Ｔ$_{ＲＭ}$細胞並びにＩｇＡ及びＩｇＧが生じた（図１０Ａ～１０Ｈ）。したがって、低レベルの免疫記憶によって、アジュバント非添加ＩＮスパイクによる体液性及び細胞性応答の有効な粘膜ブースティングが可能となる。

【０４０３】

未処置、ＬＤプライムのみ、又はＬＤ　Ｐ＆ＳマウスにＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を曝露し、感染の２日後にウイルス負荷について評価し、感染の５日後に肺の病理について評価し、又は１４日間、体重減少及び死亡率についてモニタリングした（図３Ａ）。Ｐ＆Ｓを用いてワクチン接種したすべてのマウスが、体重減少又は死亡から完全に防御されたが、未処置も、ＬＤプライムのみも防御されなかった（図３Ｂ～３Ｄ）。この防御は、上気道（鼻腔の鼻甲介）及び下気道（肺）の両方においてウイルス負荷の低減を伴った（図３Ｅ及び３Ｆ）。さらに、Ｐ＆Ｓは、肺の病理からの有意な防御につながり、６匹のマウスのうち１匹のみでは感染の５日後に制限された単核浸潤物が生じた（図３Ｇ及び３Ｈ）。次いで、ＰＡＣＥ－スパイクＩＮブーストの防御的能力を評価するために、本発明者らは再度、マウスをＬＤ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いて筋肉内に免疫化し、それらをＰＡＣＥ－スパイクｍＲＮＡを用いて鼻腔内にブーストした。プライム及びＰＡＣＥ－スパイクは、罹病率及び死亡率からの有意な防御をもたらした（図３Ｉ～３Ｌ）。したがって、ＩＮアジュバント非添加スパイク又はＰＡＣＥ－スパイクのいずれかによるＩＮブースティングは、粘膜免疫を誘導し、致死的曝露及びＣＯＶＩＤ－１９様肺疾患に対する防御を提供するのに十分であるので、Ｐ＆Ｓ及びＰＡＣＥ－スパイクは両方とも、頑強な、多用途の、安全なワクチン戦略に相当する。

【０４０４】

Ｐ＆Ｓは、非経口ｍＲＮＡ－ＬＮＰと同様の頑強な全身性ブースター応答を達成する

ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰベースのブーストは、現在の標準である。したがって、本明細

書者らは、Ｐ＆Ｓワクチン接種した、及びＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブーストワクチン接種したマウスにおいて全身性及び粘膜免疫応答を比較した（図４Ａ）。Ｐ＆Ｓワクチン接種した動物のみで、ＣＤ６９＋及びＣＤ１０３$^{+}$を発現する肺ＩＶ$^{-}$ＣＤ４５$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞が生じた（図４Ｂ～４Ｄ）。スパイク６２－７６（Ｓ６２－７６）に対応するペプチド配列は、回復期Ｃ５７ＢＬ／６マウスにおけるＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞によって認識されるエピトープである。したがって、ＭＨＣクラスＩＩ四量体Ｓ６２－７６（ＶＴＷＦＨＡＩＨＶＳＧＴＮＧＴ（配列番号５））が開発され、これによってＰ＆Ｓ及び回復期マウスの両方において肺常在ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞が容易に同定された（図１１Ａ～Ｇ）。感染及びワクチン接種の両方とも同様にＩＶ$^{-}$ＣＤ４５$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ４$^{+}$ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{-}$$T_{RM}$細胞の増大につながった。Ｐ＆Ｓは、著しく高いレベルの肺常在抗原特異的ＣＤ４$^{+}$細胞を誘導し、これは感染によって誘導されるＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞（ＩＶ－ＣＤ４５$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ４$^{+}$）と表現型が類似している（図４Ｅ及び４Ｆ）。ＣＤ４$^{+}$$T_{RM}$細胞応答をさらに特徴付けるために、本発明者らは、ペプチド刺激アッセイを使用し、Ｐ＆Ｓはより多数の組織常在ＣＤ４$^{+}$Ｔヘルパー１型（ＴＨ１）及びＴＨ１７をもたらしたが、ＴＨ２ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞はもたらさなかった（図４Ｇ～４Ｋ）ことを見出した。Ｐ＆Ｓはまた、多機能性肺常在ＴＨ１細胞の誘導をもたらした（図１２Ｂ～１２Ｅ）。

【０４０５】

プライム－ブーストワクチン接種された動物ではなく、Ｐ＆Ｓワクチン接種された動物で、ＢＡＬＦ　ＩｇＡのレベルの増大が生じた（図４Ｌ）。未処置に対してプライム－ブーストにおいてＢＡＬＦ　ＩｇＧレベルが増大されたが、Ｐ＆Ｓでは、プライム－ブーストのものよりも有意に高いＢＡＬＦ　ＩｇＧが生じた（図４Ｍ）。プライム－ブーストワクチン接種された、及びＰ＆Ｓワクチン接種されたマウスにおける血清ＩｇＡ及びＩｇＧは、中和抗体レベル（図４Ｐ）のように、同様であった（図４Ｎ及び４Ｏ）。したがって、Ｐ＆Ｓは、同様の全身性結合及びヒトにおける防御の相関物である中和抗体レベルを誘導し、特有に、粘膜ＩｇＡ、ＩｇＧ、ＣＤ４$^{+}$$T_{RM}$細胞及びＣＤ８$^{+}$$T_{RM}$細胞を誘発する。とりわけ、Ｐ＆Ｓのみが、ＴＨ１及びＴＨ１７　ＣＤ４$^{+}$$T_{RM}$細胞を誘発し、ワクチン関連疾患増悪（ＶＡＥＤ）と関連している病原性ＴＨ２細胞応答を誘発しない（Ｇａｒｔｌａｎら、Ｆｒｏｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１３：８８２９７２（２０２２）。

【０４０６】

Ｐ＆Ｓ対ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブーストの防御的有効性を比較するために、マウスをＬＤ（０．０５μｇ）ｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いてプライミングし、ＬＤ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ（筋肉内に）又は１μｇのアジュバント非添加スパイクタンパク質のいずれかを用いてブーストした（鼻腔内に）。プライムの１１８日後マウスは曝露された。両ワクチン戦略とも、死亡からのほぼ同等の防御をもたらし、９匹のプライム－ブーストマウスのうち２匹及び９匹のＰ＆Ｓマウスのうち０匹が感染症に屈した（図４Ｑ及び４Ｒ）。９匹のｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブーストマウスのうち６匹がその出発体重の＞５％を失ったのに対して、９匹のマウスのうち１匹のみが、＞５％の初期体重を失ったことによって、Ｐ＆Ｓは有意に増強された無病生存期間をもたらした（図４Ｓ）。Ｐ＆Ｓはまた、鼻腔の鼻甲介ウイルス量の減少によって示される上気道防御の増強をもたらし、また統計的に有意ではないが、下気道ウイルス量を低減した（図４Ｔ及び４Ｕ）。

【０４０７】

Ｐ＆Ｓは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のハムスターモデルにおいて伝播を低減する

次いで、本発明者らは、シリアンハムスターを使用して、代替ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２モデルにおけるＰ＆Ｓの生存力及び伝播を低減するその能力の両方を評価した。ハムスターを、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト又はＰ＆Ｓのいずれかによってワクチン接種した（図５Ａ）。プライムの６７日後の血清ＩｇＡ及びＩｇＧレベルは、２つの群間で同等であった（図５Ｂ及び５Ｃ）。プライムの９３日後にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を用いてハムスターに注射し、未処置動物のものと比較した、最小体重減少及び低減した肺病理によって示されるように、両群は、疾患から同等に防御された（図５Ｄ及び５Ｅ）。Ｐ＆

Ｓワクチン接種された動物は、感染の４日後に開始して未処置対照と比較してより迅速にウイルス排出が消失し、感染の５日後までに感染性ウイルスについてすべての口腔スワブが陰性となった。逆に、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト動物は、感染後４又は５日で有意に低い力価を有さず、感染後６日までウイルスの排出を停止しなかった。曲線下面積（ＡＵＣ）で評価された累積ウイルス排出は、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト及びＰ＆Ｓワクチン接種動物の両方とも、未処置動物よりも有意に低い全体的なウイルス排出を有していたことを示した。Ｐ＆Ｓ　ＡＵＣはｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブーストよりも少ないが、結果は統計的に有意ではなかった。

【０４０８】

Ｐ＆Ｓは、感染後ウイルス排出を低減したが、ワクチン接種された動物への伝播を低減できたか否かという疑問は、まだ答えられなかった。したがって、ワクチン接種されたハムスターを、２４時間前に感染している未処置ドナーハムスターと共飼育した（図５Ｊ）。Ｐ＆Ｓワクチン接種された接触ハムスターは、未処置と比較して、曝露の２、４及び５日目で有意に低いウイルス力価を有していたが、ｍＲＮＡプライム－ブーストワクチン接種された動物は、曝露後の任意の単一時点で有意に低減されたウイルス排出を有していなかった（図５Ｌ～５Ｎ）。伝播の設定ではＰ＆Ｓ及びｍＲＮＡプライム－ブーストの両方とも、下気道の病理から同等に防御された（図５Ｋ及び示されていないデータ）。ピークウイルス量（感染後２日目での）及び累積ウイルス排出は、未処置及びｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブースト接触ハムスターと比較して、Ｐ＆Ｓワクチン動物において有意に低減された（図５Ｏ）。したがって、Ｐ＆Ｓは、ハムスターにおいて有効なワクチン戦略であると思われ、ウイルス伝播を低減する。

【０４０９】

異種スパイクは、交差反応性免疫を頑強に誘発する

相同アジュバント非添加サブユニットスパイクによって別個の解剖学的位置、この場合には、呼吸器粘膜にブーストすることによって、新規粘膜免疫記憶の形成が可能になり、全身性免疫を増強する。しかし、現在のオミクロン亜系統などのＶＯＣは、スパイクタンパク質配列の相当な変化を有し、既存の体液性免疫の回避につながっている。将来のバリアントがさらにより分岐する可能性は高く、これは、将来のバリアントを中和するには広範反応性免疫を誘発するブースティング戦略が必要となることを示唆する。

【０４１０】

Ｐ＆Ｓにおけるアジュバント非添加異種スパイク（スパイクＸ）タンパク質の能力を試験するために、Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスにＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ｍＲＮＡ－ＬＮＰを用いプライミングし、続いて、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを用いてＩＮブースティングし、これは、本発明者らはＰ＆Ｓｘと呼ぶ（図６Ａ）。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１は関連サルベコウイルスであり、そのスパイクタンパク質は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクと７６％の相同性しか共有しない。プライミングの４５日後に、ＩＶ$^{-}$ＣＤ４５$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８$^{+}$$T_{RM}$細胞の増大があった（図６Ｂ～６Ｄ）。ＭＨＣクラスＩ四量体配列は、サルベコウイルスファミリー内で高度に保存された（図１１Ａ）。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１及びＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ペプチドプールの両方を使用してペプチド刺激アッセイを実施して、抗原特異的肺ＣＤ４$^{+}$$T_{RM}$細胞の発生を評価した。データは、Ｐ＆Ｓｘが、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１－特異的及びより少ない程度でＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２－特異的抗原特異的ＴＨ１及びＴＨ１７　ＣＤ４$^{+}$$T_{RM}$細胞の発生をもたらし、ＴＨ２サイトカインインターロイキン－４（ＩＬ－４）を発現するＣＤ４$^{+}$$T_{RM}$を誘導しないことを示した（図６Ｅ～６Ｎ及び図１３Ａ～１３Ｈ）。また、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブーストと比較してＰ＆Ｓｘ ではＢＡＬＦ及び血清の両方において抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１　ＩｇＡ及びＩｇＧの増大があった（図６Ｏ～６Ｒ）。Ｐ＆Ｓｘマウスは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブーストを用いてワクチン接種されたマウスのものよりも、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１に対するより高い中和力価を対応して発生させた（図６Ｓ）。Ｐ＆Ｓｘは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブーストよりも高い抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＢＡＬＦ　ＩｇＡを誘導し、ＢＡＬＦにおいて同様のレベルの抗ＳＡ

ＲＳ－ＣｏＶ－２　ＩｇＧを誘導した（図６Ｔ及び６Ｕ）。血清ＩｇＧレベルの上昇と一致して、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブーストマウスは、Ｐ＆Ｓｘマウスのものよりも、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対するより高い血清中和力価を有していた（図６Ｖ～６Ｘ）。したがって、アジュバント非添加異種スパイクタンパク質を用いるＩＮブースティングは、相当に多様なサルベコウイルスに対する強力な粘膜細胞性及び体液性記憶を誘導できる。

【０４１１】

［実施例２］

組織常在免疫を確立するためのハイブリッド戦略としての全身性ｍＲＮＡプライムと、それに続く粘膜ｍＲＮＡブースト

コグネイト抗原及び／又は炎症に対する曝露のための粘膜曝露は、組織常在記憶Ｔ及びＢ細胞応答の発生の鍵である。非経口ｍＲＮＡワクチン接種は、自然感染によって誘発される組織常在Ｔ細胞免疫を確立することができないことが確立されている。したがって、全身性ｍＲＮＡプライムと、それに続く粘膜ｍＲＮＡブーストが、組織常在免疫を確立するためのハイブリッド戦略として提案された。

【０４１２】

方法及び材料

ポリ（アミン－コ－エステル）（ＰＡＣＥ）粒子を、これまでに記載されたように調製した。手短には、構成要素を長鎖「ＰＡＣＥ」分子に組み立てた。ＰＥＧをＰＡＣＥの１つのプールの一方の末端に付着させて、ＰＡＣＥ－ＰＥＧ分子を形成した。ポリペプチド抗原をコードする核酸を、種々の量のＰＡＣＥ及びＰＡＣＥ－ＰＥＧ分子と組み合わせてＰＡＣＥ粒子（ＰＡＣＥナノ粒子）を形成した。

【０４１３】

本明細書で使用されるＰＡＣＥは、末端基１４を有し、Ｍｗは、７．５＋／－０．５ｋＤａであり、２．２＋／－０．１のＰＤＩを有する。ＰＡＣＥ－ＰＥＧ　Ｍｗは、１４＋／－０．５ｋＤａであり、１２ｋＤａのＭｎであり、１．１＋／－０．１のＰＤＩを有する。ＰＥＧ部分は、５ｋＤａのＭｎを有し、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈから購入した。

【０４１４】

平均での得られたナノ粒子のサイズは、１～５０％のＰＰ含量について０．２＋／－０．０５のＰＤＩでインビボ用に作製される濃度で１６０＋／－２５ｎｍである。かなり低濃度で作製されたインビトロ実験用に作製された粒子は、より小さい平均粒子サイズを有する。

【０４１５】

調製は、１：５０比率のｍＲＮＡ対ポリマー、ｐＨ５．８の酢酸ナトリウム緩衝液を用いる通常の方法であった。

【０４１６】

ｍＲＮＡカーゴの肺への、ＰＥＧコンジュゲートＰＡＣＥによって媒介される送達及び発現は、それぞれ０％、０．２５％、１％、５％、１０％又は５０％のＰＡＣＥ－ＰＥＧを含有する対照及び試料の各々について実証された（図１６）。

【０４１７】

呼吸器系ウイルスに対する組織常在免疫を確立するために粘膜ブースト剤としてｍＲＮＡ－ＰＡＣＥを使用するための方法論を、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２抗原を使用して評価した。図１７に方法の概略フロー図が示されている。手短には、１マイクログラムＲＮＡの抗原（ｍＲＮＡ－脂質ナノ粒子）を、ブーストの１４日前に（－１４日目）Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスモデル中に筋肉内（ＩＭ）経路を介して注射した。ブーストステップ（１マイクログラムＲＮＡのｍＲＮＡ－ＰＡＣＥ粒子を筋肉内（ＩＭ）又は鼻腔内（ＩＮ）経路を介して注射すること）を、０日目に実施し、ＩＶ抗体標識をブーストの２週間後に実行し（１４日目）、続いて、肺、気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬＦ）及び血清を採取した。

【０４１８】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染に対して感受性のトランスジェニックマウス（Ｋ１８－ｈＡＣＥ２）に、筋肉内経路を介して１０μｌ中１μｇのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタン

パク質をコードするｍＲＮＡ－ＬＮＰを注射する（「プライミングする」）か、偽注射した。１４日後、マウスを、１μｇのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　スパイクタンパク質をコードするｍＲＮＡを含有するＰＡＣＥ－ＰＥＧ粒子を用い、鼻腔内投与を介して「ブースト」した。比較のために、他のプライミングされたマウスに、１μｇのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質をコードするｍＲＮＡを含有するＰＡＣＥ－ＰＥＧ粒子の筋肉内注射又は偽注射のいずれかを投与した。ブースティングの１４日後、マウスを安楽死させた。血管（ＩＶ$^{+}$）細胞を組織常在（ＩＶ$^{-}$）細胞と識別するために、安楽死の３分前にマウスにＣＤ４５標識抗体を静脈内注射した。

【０４１９】

肺を、コラゲナーゼＡ及びＤＮアーゼを補給したＲＰＭＩを用いて３７℃で４５分間消化し、その後、ホモジナイズして単細胞懸濁液にした。肺単細胞懸濁液を蛍光標識された抗体を用いて染色し、次いで、４％パラホルムアルデヒド中で固定し、その後、フローサイトメーターで獲得し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアを用いて解析した。血清及び気管支肺胞上皮洗浄液（ＢＡＬＦ）を回収し、示された希釈のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクＳ１ドメインに対する酵素結合免疫測定法（ＥＬＩＳＡ）を使用して解析した。ＥＬＩＳＡを実施するために、９６ウェルプレートを、１ｍｌあたり２マイクログラムのＰＢＳ中のＳ１タンパク質５０マイクロリットルを用い、４℃で一晩コーティングした。プレートを、２５０μｌのブロッキング溶液（０．１％　Ｔｗｅｅｎ　２０及び５％粉乳を有するＰＢＳ）とともに室温で１時間インキュベートした。血清を希釈溶液（０．１％　Ｔｗｅｅｎ　２０及び２％粉乳を有するＰＢＳ）で希釈し、希釈された血清１００μｌを室温で２時間添加した。プレートをＰＢＳ－Ｔ（０．１％　Ｔｗｅｅｎ　２０を有するＰＢＳ）で５回洗浄し、各ウェルに５０μｌの西洋ワサビペルオキシダーゼ抗マウスＩｇＧ又は抗マウスＩｇＡを添加した。室温で１時間インキュベートした後、プレートをＰＢＳ－Ｔで３回洗浄した。プレートを１００μｌのトリメチルボロン基質試薬セットを用いて発色させ、１５分後に２Ｎの硫酸を添加することによって反応を停止した。次いで、プレートを４５０及び５７０ｎｍの波長で読み取り、相違を報告した。

【０４２０】

結果

「プライム」ワクチン接種として使用される場合のｍＲＮＡ－脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）の筋肉内（ＩＭ）注射と、それに続く、プライミングの１４日後に「ブースト」ワクチン接種として使用されるｍＲＮＡ－ＰＡＣＥの鼻腔内（ＩＮ）投与によって、肺常在（ＩＶ$^{-}$）スパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞免疫が誘導されたが、循環（ＩＶ$^{+}$）ＣＤ８Ｔ細胞免疫には影響を及ぼさなかった。

【０４２１】

各試料（未処置；ＩＭ　ＬＮＰ；ＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＮ裸のｍＲＮＡ；ＩＮ　ＰＡＣＥ；ＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＭ　ＰＡＣＥ；及びＩＭ　ＬＮＰ＞ＩＮ　ＰＡＣＥスパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞）の絶対細胞数を示す結果が、それぞれ「ＩＶ$^{-}$」肺常在Ｔ細胞について図１８Ａ～１８Ｃに、ＩＶ$^{+}$循環Ｔ細胞について図１９Ａ～１９Ｃに示されている。

【０４２２】

さらに、細気管支洗浄液（ＢＡＬＦ）中の、及び血清中のＩｇＡを示す図２０Ａ～２０Ｄに実証されるように、「プライム」ワクチン接種として使用される場合のｍＲＮＡ－脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）の筋肉内（ＩＭ）注射と、それに続く、プライミングの１４日後に「ブースト」ワクチン接種として使用されるｍＲＮＡ－ＰＡＣＥの鼻腔内（ＩＮ）投与が、頑強な粘膜及び全身性抗原特異的ＩｇＡ及びＩｇＧを誘発したことが実証された。

【０４２３】

［実施例３］

ｍＲＮＡ－ＬＮＰ免疫低下の状況におけるＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライミングと、それに続くＩＭ又はＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティングは、致死的ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２曝露から防御する

鼻腔内ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２曝露に対する防御免疫を増大するためにｍＲＮＡ－ＰＡＣ

Ｅをブースティング剤として使用することの有効性を評価した。実験設定の概略フロー図は、図２１に示されている。手短には、０．０５マイクログラムＲＮＡの抗原（ｍＲＮＡ－脂質ナノ粒子）を、０日目にＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスモデル中に筋肉内（ＩＭ）経路を介して注射した。ブーストステップ（１０マイクログラムＲＮＡのｍＲＮＡ－ＰＡＣＥ粒子を筋肉内（ＩＭ）又は鼻腔内（ＩＮ）経路を介して注射すること）を１４日目に実施した。感染前出血を４９日目に実施した。５６日目にこれらのＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスに鼻腔内ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を用いて曝露させた。体重減少及び生存を、５６日目から７０日目までの感染後１４日間モニタリングした。

【０４２４】

「プライム」ワクチン接種として使用される場合のｍＲＮＡ－脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）の筋肉内（ＩＭ）注射と、それに続く、プライミングの１４日後に「ブースト」ワクチン接種として使用されるｍＲＮＡ－ＰＡＣＥの鼻腔内（ＩＮ）又はＩＭ投与は、鼻腔内ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２曝露後に大幅な体重減少を防ぎ、生存を有意に増大した（図２２Ａ～２２Ｃ）。

【０４２５】

［実施例４］

粘膜ワクチンプラットフォームとしてのＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥプライミングと、それに続く、ＩＮ　ｍＲＮＡ－ＰＡＣＥブースティング

「プライム」ワクチン接種として使用される場合のｍＲＮＡ－ＰＡＣＥの鼻腔内（ＩＮ）投与と、それに続く、プライミングの２８日後に「ブースト」ワクチン接種として使用されるｍＲＮＡ－ＰＡＣＥの鼻腔内（ＩＮ）投与は、組織常在（ＩＶ$^{-}$）スパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞免疫及び頑強な体液性免疫を誘導した。この実験設定の概略フロー図は、図２３に示されている。

【０４２６】

各試料（未処置；ＩＮ　ＰＡＣＥ＞ＩＮ　ＰＡＣＥスパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞）の絶対細胞数を示す結果が、それぞれ「ＩＶ$^{-}$」肺常在Ｔ細胞について図１０Ａ～１０Ｃに、「ＩＶ$^{-}$」縦隔リンパ節常在Ｔ細胞について図２４Ｄ～２４Ｆに示されている。

【０４２７】

さらに、「プライム」ワクチン接種として使用される場合のｍＲＮＡ－ＰＡＣＥの鼻腔内（ＩＮ）投与と、それに続く、プライミングの２８日後に「ブースト」ワクチン接種として使用されるｍＲＮＡ－ＰＡＣＥの鼻腔内（ＩＮ）投与が、流入領域リンパ節において頑強な体液性免疫応答を誘発したことが実証された。各試料（未処置；ＩＮ　ＰＡＣＥ＞ＩＮ　ＰＡＣＥスパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞）の絶対細胞数を示す結果が、ＣＸＣＲ５$^{+}$ＰＤ１$^{+}$Ｔ$_{FH}$細胞、ＧＬ７＋胚中心（ＧＣ）Ｂ細胞、ＣＤ１３８＋抗体分泌性細胞（ＡＳＣ）及び四量体＋Ｂ細胞について図２５Ａ～２５Ｄに示されている。

【０４２８】

頑強な粘膜及び全身性抗原特異的ＩｇＡ及びＩｇＧを示す結果が、図２６Ａ～２６Ｄに示されており、細気管支洗浄液（ＢＡＬＦ）及び血清中のＩｇＧ及びＩｇＡを示す。

【０４２９】

［実施例５］

単回用量の非経口ｍＲＮＡワクチン接種は、自然感染によって誘発される組織常在Ｔ細胞免疫を確立できない

Ｂ６．Ｃｇ－Ｔｇ（Ｋ１８－ＡＣＥ２）２Ｐｒｌｍｎ／Ｊ（Ｋ１８－ｈＡＣＥ２）マウスに、筋肉内注射を介して１μｇのＰｆｉｚｅｒ－ＢｉｏＮＴｅｃｈ　ｍＲＮＡワクチン接種を投与した（ワクチン）、又は５００　ＰＦＵ　ＷＡ１株ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を鼻腔内投与を介して感染させた（感染）。ワクチン接種又は感染の１４日後、循環を組織常在Ｔ細胞応答と識別するためにマウスに抗ＣＤ４５標識抗体を静脈内（ＩＶ）注射した。

【０４３０】

Ｐｆｉｚｅｒ－ＢｉｏＮＴｅｃｈ　ｍＲＮＡワクチンを用いるワクチン接種及びＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスによる感染は、循環中に同等レベルのウイルススパイク特異的Ｃ

Ｄ８＋Ｔ細胞をもたらした。しかし、ワクチン接種は、有意に低いレベルの、ウイルススパイクタンパク質に特異的な組織常在ＣＤ８＋Ｔ細胞を誘発した。同様の結果は、ＣＤ８＋記憶Ｔ細胞（ＣＤ６９＋ＣＤ１０３＋ＣＤ８＋）についても見られた（示されていないデータ）。

【０４３１】

「プライム及びスパイク」ワクチン接種は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対する組織常在免疫を誘導した

－１４日目に、Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウス（宿主細胞に侵入するための、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を含むいくつかのコロナウイルスのスパイクタンパク質によって認識される受容体であるヒトＡＣＥ２を発現するトランスジェニックマウス）に、１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２ワクチン（Ｐｆｉｚｅｒ－ＢｉｏＮＴｅｃｈによるコミナティワクチン）を筋肉内に投与した（「プライム」）。次いで１４日後、０日目にマウスに１μｇの三量体ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクタンパク質を鼻腔内に投与した（「スパイク」）。この実施例に使用されたスパイクタンパク質は、フューリン切断部位においてＣ末端Ｔ４フィブリチン（ｆｉｂｒｉｔｉｎ）三量体化モチーフ、６つのプロリン置換（Ｆ８１７Ｐ、Ａ８９２Ｐ、Ａ８９９Ｐ、Ａ９４２Ｐ、Ｋ９８６Ｐ、Ｖ９８７Ｐ）及びアラニン置換（Ｒ６８３Ａ及びＲ６８５Ａ）を追加してその融合前確認で安定化される（本明細書において以下、安定化されたスパイクタンパク質）。プライミングもスパイキングもされなかったＫ１８－ｈＡＣＥ２マウス（「未処置」）、プライム時点（－１４日目）で筋肉内ｍＲＮＡ－ＬＮＰワクチンでプライミングのみ行われたもの（「ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ」）、又はブースト時点（０日目）でスパイクタンパク質を用いる投与のみ行われたもの（「ＩＮスパイクタンパク質」）を対照として使用した。１４日目に、安楽死及び生体試料採取の３分前に、すべてのマウスにＡＰＣ／Ｆｉｒｅ　７５０　ＣＤ４５抗体（３０－Ｆ１１、ＡＢ＿２５７２１１６、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ　＃１０３１５４）を静脈内注射し、脈管構造中の免疫細胞のみ標識し、組織中の免疫細胞は標識しなかった。次いで、マウスを　　殺し、肺、気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬＦ）及び血清を採取した。

【０４３２】

「プライミング」及び「スパイキング」の両方を受けたマウスは、「プライミング」、「スパイキング」又は両方を欠くマウスと比較して、有意に多い数の血管外ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク特異的ＣＤ８Ｔ細胞（ＩＶ$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ８$^{+}$細胞）（示されていないデータ、図２Ａ、２Ｄ及び２Ｇも参照されたい）、血管外ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク特異的抗原を経験したＣＤ８Ｔ細胞（ＩＶ$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ８$^{+}$細胞）（図２７Ａ）、血管外ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク特異的組織常在記憶ＣＤ８Ｔ細胞（ＩＶ$^{-}$四量体$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ８$^{+}$細胞）（示されていないデータ、図２Ｃ、２Ｆ及び２Ｉも参照されたい）、活性化された血管外ＣＤ４Ｔ細胞（ＩＶ$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ４$^{+}$細胞）（示されていないデータ、図２Ｊ及び２Ｋも参照されたい）、活性化された抗原を経験した血管外ＣＤ４Ｔ細胞（ＩＶ$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ４$^{+}$細胞）（図２７Ｂ）、活性化された血管外ＣＤ４組織常在記憶Ｔ細胞（ＩＶ$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ６９$^{+}$ＣＤ１０３$^{+}$ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞）（示されていないデータ、図２Ｌ及び２Ｏも参照されたい）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　スパイクタンパク質の受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）に対して特異的である血管外Ｂ細胞（ＩＶ$^{-}$ＲＢＤ－特異的Ｂ細胞）（図２７Ｃ）、血管外抗体分泌性Ｂ細胞（ＩＶ$^{-}$抗体分泌性細胞）（図２７Ｄ）、血管外常在記憶Ｂ細胞（ＩＶ$^{-}$常在記憶Ｂ細胞）（図２７Ｅ）及び血管外胚中心様Ｂ細胞（（ＩＶ$^{-}$胚中心様Ｂ細胞）（図２７Ｆ）を有していた。

【０４３３】

図２８Ａ～２８Ｄを参照すると、「プライミング」及び「スパイキング」の両方を受けたマウスは、「プライミング」、「スパイキング」を欠くマウスと比較して、有意に高い濃度の、ＢＡＬＦ中の抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質Ｓ１ドメインＩｇＡ（図２８Ａ）、血清中の抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質Ｓ１ドメインＩｇＡ（図２８Ｂ）、ＢＡＬＦ中の抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質Ｓ１ドメインＩｇ

Ｇ（図２８Ｃ）及び血清中の抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質Ｓ１ドメインＩｇＧ（図２８Ｄ）を有していた。

【０４３４】

「プライミング」及び「スパイキング」の両方を受けたマウスは、「プライミング」、「スパイキング」を欠くマウスと比較して、有意に多い数の、鼻腔の鼻甲介中のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク特異的血管外ＣＤ８＋Ｔ細胞（図２Ｊ）及び鼻腔粘液中の（図２７Ｅ）、並びに有意に高い濃度の鼻腔粘液中のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク特異的ＩｇＡ（図２８Ｆ）及びＩｇＧ（図２８Ｇ）を有していた。

【０４３５】

「プライミング」及び「スパイキング」の両方を受けたマウスは、「プライミング」、「スパイキング」を欠くマウスと比較して、有意により明白な、脈管構造及び気道と関連するリンパ系凝集体形成を有していた。リンパ系凝集体での細胞増殖の程度は、「プライミング」及び「スパイキング」の両方を受けたマウスについてかなり高く、これは、これらのマウスにおけるより強い増殖性免疫応答を示す。Ｂ細胞、ＣＤ８Ｔ細胞及びＣＤ４Ｔ細胞はリンパ系凝集体で濃縮される（示されていないデータ）。

【０４３６】

「プライム及びスパイク」ワクチン接種は、従来の「プライム及びブースト」ワクチン接種よりも強い粘膜Ｔ細胞及び抗体応答を誘導した

Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスに、－１４日目にｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ワクチン（コミナティ）を筋肉内に投与した（「プライム」）。次いで、マウスに、１μｇの従来のｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ワクチンブースター（「ブースト」）（コミナティ）を筋肉内に投与し、又は０日目に１μｇのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２安定化スパイクタンパク質（「スパイク」）を鼻腔内投与した。７日目に、マウスを　　殺し、肺及びＢＡＬＦを採取した。

【０４３７】

図２９Ａ～２９Ｃを参照すると、「プライム及びスパイク」ワクチン接種を投与されたマウスは、従来の「プライム及びブースト」ワクチン接種を投与されたマウスと比較して、有意に多い数の、活性化された肺常在記憶ＣＤ８Ｔ細胞（ＩＶ$^{-}$ＣＤ４４$^{+}$四量体$^{+}$ＣＤ８$^{+}$$Ｔ_{ＲＭ}$（図２９Ａ）及び活性化された肺常在記憶ＣＤ４Ｔ細胞（図２９Ｂ）を有していた。「プライム及びスパイク」を投与されたマウスはまた、従来の「プライム及びブースト」ワクチン接種が投与されたマウスよりもかなり高い、ＢＡＬＦ中の抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質Ｓ１ドメインＩｇＡを有していた。

【０４３８】

「プライム及びスパイク」ワクチン接種は、長期の投与間間隔後の場合に、従来の「プライム及びブースト」ワクチン接種よりもより強い、より長い持続性の免疫を誘導する

Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスに、－８４日目にｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ワクチン（コミナティ）を筋肉内に投与した（「プライミングされた」）。０日目に、マウスに同一ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ワクチンを筋肉内に（「ブースティングされた」）又はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の組換え安定化スパイクタンパク質を鼻腔内に（「スパイクされた」）投与した。７日目又は５５日目にマウスを　　殺し、ＢＡＬＦ及び血清を採取した。

【０４３９】

図２９Ｄを参照すると、「プライム及びスパイクワクチン接種」戦略によって誘導された粘膜ＩｇＡ応答は、従来の「プライム及びブースト」ワクチン接種戦略よりもより強く、より長く持続性であった。

【０４４０】

「プライム及びスパイク」ワクチン接種は、従来の「プライム及びブースト」ワクチン接種と比較して、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染に対して優れた抗ウイルス防御を誘導した

Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスに、－１４日目に０．０５μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ワクチン（コミナティ）を筋肉内に投与した（「プライム」）。次いで、マウスに、０日目に１μｇの三量体ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２安定化されたスパイクタンパク

質を鼻腔内に（ＩＮ）投与した（「スパイク」）。「プライミング」及び「スパイキング」の両方を欠く（「未処置」）、「スパイキング」のみを欠く（「ＩＭプライム」）、「スパイキングされる」代わりに１μｇのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質を筋肉内に投与した（「ＩＭプライム＋ＩＭ　ＣｏＶ－２スパイク」）Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスを対照として使用した。すべてのマウスは、４２日目に生存ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスに曝露された。４２日目から５６日目までマウスの生存及び体重減少を記録した。４４日目に、肺ウイルス力価及び肺ウイルスＲＮＡ量も測定した。

【０４４１】

「プライミング」及び「スパイキング」の両方を受けたマウスは、体重減少に苦しんだ対照と比較して、ウイルスの致死性に対して十分に防御された（示されていないデータ）。

【０４４２】

図２９Ｅ～２９Ｇを参照すると、「プライミング」及び「スパイキング」の両方を受けたマウスは、対照と比較して、ウイルス力価（図２９Ｅ及び２９Ｇ）並びに肺におけるウイルスＲＮＡ量（図２９Ｅ）によって決定されるように、肺（下気道）及び鼻腔の鼻甲介（上気道）においてより少ない量のウイルスを有していた。

【０４４３】

関連するが異なる２種のウイルスに由来する抗原を使用する「プライミング」及び「スパイキング」はまた、両ウイルスに対して頑強な免疫を生成できる。

【０４４４】

マウスを、０日目に１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２ワクチン（コミナティ）を筋肉内に投与することによって「プライミング」した。１４日後に、マウスを１μｇの三量体ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（ＳＣＶ２）安定化されたスパイクタンパク質を筋肉内に（ＩＭ）「ブースティング」し若しくは同一物を鼻腔内に（ＩＮ）「スパイキング」した、１４日目に５μｇの三量体ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１（ＳＣＶ１）安定化されたスパイクタンパク質で「ブースティング」し若しくは同一物で「スパイキング」した、又は１μｇのｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンＩＭで「ブースティング」した。ブースティングの時点（１４日目）で、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンＩＭを用いて事前にプライミングされ（－５３日目）、ブースティングされた（－１６日目）Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスを、５μｇの三量体ＳＣＶ１安定化されたスパイクタンパク質ＩＮを用いて再度ブースティングした。

【０４４５】

プライミングもブースティングも受けていないＫ１８－ｈＡＣＥ２マウス（「未処置」）を対照として使用した。４５日目に、安楽死及び生体試料採取の３分前に、すべてのマウスにＡＰＣ／Ｆｉｒｅ　７５０　ＣＤ４５　Ａｂ（３０－Ｆ１１、ＡＢ＿２５７２１１６、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ　＃１０３１５４）を静脈内に注射し、脈管構造中の免疫細胞のみ標識し、組織中の免疫細胞は標識しなかった。次いで、マウスを　　殺し、肺、気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬＦ）及び血清を採取した。肺組織は、ＣＤ８Ｔ細胞応答の評価（図２９Ｈ）のために処理し、ＢＡＬＦ及び血清は、抗ＳＣＶ１及び抗ＳＣＶ２結合抗体（図３０Ａ～３０Ｄ及び３０ＥＡ～３０Ｈ）並びに中和抗体（図３０Ｉ）応答を評価するために使用した。

【０４４６】

図２９Ｈを参照すると、ＳＣＶ２又はＳＣＶ１スパイクタンパク質のいずれかを使用して、筋肉内に「プライミング」され、鼻腔内に「スパイキング」されたマウスでは、未処置マウス並びにＳＣＶ２スパイクタンパク質、ＳＣＶ１　スパイクタンパク質又はｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いて筋肉内に「プライミング」され、筋肉内に「ブースティング」されたマウスと比較して、有意に多い数の、ＳＣＶ１及びＳＣＶ２の間で共有される保存されたエピトープ（ＶＮＦＮＦＮＧＬ、（配列番号６）に対して特異的な組織常在記憶ＣＤ８＋Ｔ細胞が生じた。ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いて「プライミング」及び「ブースティング」され、さらにＳＣＶ１スパイクタンパク質を用いて

鼻腔内に「スパイキング」されたマウスでも、高レベルの、ＳＣＶ１及びＳＣＶ２の間で共有される保存されたエピトープ（ＶＮＦＮＦＮＧＬ、（配列番号６）に対して特異的な抗原特異的組織常在記憶ＣＤ８Ｔ＋細胞が生じた。

【０４４７】

図３０Ａ～３０Ｄを参照すると、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ（ＳＣＶ１）スパイクタンパク質を用いてＩＭ「プライミング」され、ＩＮ「スパイキング」されたマウスは、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ　ＳＣＶ１スパイクタンパク質若しくはＩＭ　ＳＣＶ２スパイクを用いてＩＭ「プライミング」され、後に「ブースティング」された、又はＳＣＶ２スパイクタンパク質でＩＮ「スパイキング」されたマウスと比較して、ＢＡＬＦ及び血清の両方において抗ＳＣＶ１　ＩｇＡ及びＩｇＧの有意に高い力価を有していた。ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いて筋肉内に「プライミング及びブースティングされ」、さらにＳＣＶ１スパイクタンパク質を用いて鼻腔内に「スパイキング」されたマウスは、ＩＭ「プライミング」され、ＩＮ　ＳＣＶ１「スパイキング」されたマウスと比較して、粘膜及び循環抗ＳＣＶ１　ＩｇＡ及びＩｇＧがさらに増大した。

【０４４８】

図３０Ｅ～３０Ｈを参照すると、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ（ＳＣＶ１）又はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（ＳＣＶ２）スパイクタンパク質を用いて筋肉内に「プライミング」され、鼻腔内に「スパイキング」されたマウスは、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ　ＳＣＶ１スパイク又はＩＭ　ＳＣＶ２スパイクを用いてＩＭ「プライミング」され、後に「ブースティング」されたマウスと比較して、ＢＡＬＦにおいて抗ＳＣＶ２　ＩｇＡの有意に高い力価を有していた。とりわけ、ＩＭ「プライミング」され、ＩＮ　ＳＣＶ２「スパイキング」されたマウスでは、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭ「プライミング」され、「ブースティング」されたマウスと比較して、同等のレベルのＢＡＬＦ抗ＳＣＶ２　ＩｇＧ、血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＡ及び血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＧが生じた。ＩＭ「プライミング」され、ＩＮ　ＳＣＶ１「スパイキング」されたマウスではまた、頑強なレベルのＢＡＬＦ抗ＳＣＶ２　ＩｇＧ、血清抗ＳＣＶ２　ＩｇＡ及び血清抗ＳＣＶ２ＩｇＧが生じた。抗ＳＣＶ１抗体応答と同様に、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭ「プライミング」され、「ブースティング」され、さらにＳＣＶ１スパイクタンパク質を用いてＩＮ「スパイキング」されたマウスでは、すべての他の群と比較して、最高レベルの粘膜及び循環抗ＳＣＶ２　ＩｇＡ及びＩｇＧが生じた。

【０４４９】

図３０Ｉを参照すると、ＩＮ　ＳＣＶ１又はＩＭ　ＳＣＶ１スパイクタンパク質を用いてＩＭ「プライミング」され、後に「スパイキング」されたマウスは、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２ワクチン、ＩＭ　ＳＣＶ２スパイクを用いてＩＭ「プライミング」され、後に「ブースティング」された、又はＩＮ　ＳＣＶ２スパイクタンパク質を用いて「スパイキング」されたマウスと比較して、有意に高い、水泡性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）－偽型ＳＣＶ１に対する血清中和力価（ＩＣ５０）を有していた。ＩＭ「プライミング」され、後にＩＮ　ＳＣＶ２スパイクを用いて「スパイキング」された、又はＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ　ＳＣＶ２　ワクチンを用いて「ブースティング」されたマウスは、ＩＭ　ＳＣＶ２スパイクタンパク質、ＩＭ　ＳＣＶ１スパイクタンパク質を用いてＩＭ「プライミング」され、後に「ブースティング」された、又はＩＮ　ＳＣＶ１スパイクタンパク質を用いて「スパイキング」されたマウスと比較して有意に高い、ＶＳＶ－偽型ＳＣＶ２に対する血清中和力価（ＩＣ５０）を有していた。結合抗体力価と一致して、ｍＲＮＡ－ＬＮＰＳＣＶ２ワクチンを用いてＩＭ「プライミング」され、「ブースティング」され、さらにＳＣＶ１スパイクを用いてＩＮ「プライミング」されたマウスでは、ＶＳＶ－偽型ＳＣＶ１及びＳＣＶ２両方に対して高い血清中和力価（ＩＣ５０）が生じた。

【０４５０】

考察

この研究では、代替ワクチン戦略（ｉ）プライム及びスパイク（Ｐ＆Ｓ）、（ｉｉ）プライム及びＰＡＣＥスパイク）、及び（ｉｉｉ）ＰＡＣＥプライム及びＰＡＣＥスパイク

の前臨床開発について説明する。

【０４５１】

Ｐ＆Ｓでは、ＩＮアジュバント非添加スパイクサブユニットタンパク質は、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ非経口免疫化（プライム）後に頑強な防御的粘膜免疫を誘発する。これらの増強された粘膜応答は、抗原特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ$_{RM}$、ＣＤ４$^{+}$Ｔ$_{RM}$及びＢ$_{RM}$細胞の拡大増殖並びにＩｇＡ及びＩｇＧの粘膜分泌を特徴とする。データは、ＩＮアジュバント非添加スパイクブースターは、一次免疫から数ヶ月で投与してもよいこと及びそれが、ＩＭ　ｍＲＮＡ－ＬＰＮブーストのものと同等の全身性中和抗体ブースター応答を提供することを示した。同様に、プライム及びＰＡＣＥ－スパイクは、抗原特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ$_{RM}$細胞及び粘膜ＩｇＡの増大を誘発する。両ブースティング法とも、致死性ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２曝露からの防御をもたらす。データはまた、Ｐ＆Ｓがワクチン接種の開始から１１８日目で防御的ワクチン有効性を有する永続的な応答につながることを示した。Ｐ＆Ｓ／ＰＡＣＥ－プライム及びＰＡＣＥ－スパイクは、ハムスターにおいて防御的であり、ウイルス伝播をｍＲＮＡ－ＬＮＰプライム－ブーストが行うよりも効果的に遮断する。多様なスパイク抗原を使用することによって、本研究は、Ｐ＆Ｓｘは、元の抗原標的であるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対する全身性及び粘膜中和抗体もブーストしながら、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１に対する粘膜免疫を生成できることを実証する。ワクチン接種の目的は、個体の罹病率及び死亡率を防ぐことであったが、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の進化によって、伝播も防ぐ迅速に配置可能な粘膜ワクチンの必要性が浮き彫りにされた。データは、Ｐ＆Ｓ、プライム及びＰＡＣＥ－スパイク、ＰＡＣＥ－プライム及びＰＡＣＥ－スパイクを、感染及び伝播の両方の低減において使用できることを実証する。現在のワクチンプラットフォームに改良を加え、粘膜免疫を提供することは、このパンデミックをコントロールするために不可欠であり、次にとっても重要であることは間違いない。

【０４５２】

Ｐ＆Ｓ、プライム及びＰＡＣＥ－スパイク、ＰＡＣＥ－プライム及びＰＡＣＥ－スパイクは、以前にワクチン接種された個体において新規ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＶＯＣに対するブースターとして、又は新興呼吸器病原体に対する新規一次免疫戦略として広く適用可能である。本研究は、ｍＲＮＡ－ＬＮＰプライミングを使用するワクチンレジメンを実証するが、このアプローチは、一次免疫レジメンに又は以前の感染の場合に当てはめることができる。さらに、本明細書で示されたデータは、Ｐ＆Ｓ／ＰＡＣＥ－スパイクは、既存の免疫を、それによって阻害されるのではなく利用すると思われるので、アジュバント非添加ＩＮブースティングは、複数回の以前の注射を受けている個体ではそれ以上ではないにせよ、同程度に有効であろうという結論を支持する。さらに、高度に安定化されたスパイクは、その免疫原性を増強すること及びこのワクチン接種戦略を他の病原体に適用するには、アジュバント非添加ブースティングを可能にするために突然変異の安定化を加える必要がある可能性があることが示された。

【０４５３】

本研究は、２つの異なる十分に検証された前臨床ワクチンモデルにおいて、アジュバント又は複製ウイルス又はベクターを使用することなくＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対する粘膜免疫を発生させる方法を特性決定する。

【０４５４】

多種多様なサルベコウイルスに対して広く中和する免疫を生成するワクチンが、新興ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアント及び潜在的なパンデミックＳＡＲＳ様コロナウイルスの両方と闘うための目的である。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクを異種ＩＮブーストとして使用して、Ｐ＆Ｓｘは、事前のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ｍＲＮＡ－ＬＮＰは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１中和抗体の発生を妨げず、むしろそれを可能にすることを実証する。Ｐ＆Ｓｘは、広く反応性の中和抗体及び粘膜免疫を同時に誘発する。

【０４５５】

本明細書で記載される方法及び組成物の改変及び変法は、以下の特許請求の範囲の範囲内であるものとする。本明細書で引用されたすべての参考文献は、参照により具体的に組

み込まれる。

【図面】

【図１Ａ】

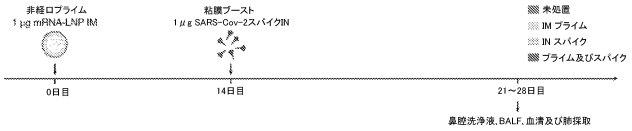


FIG. 1A

【図１Ｂ】

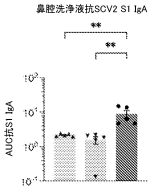


FIG. 1B

【図１Ｃ】

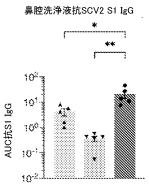


FIG. 1C

【図１Ｄ】

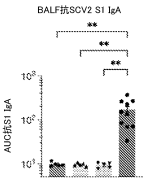


FIG. 1D

【図１Ｅ】

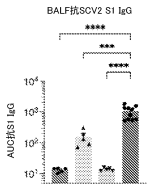


FIG. 1E

【図１Ｆ】

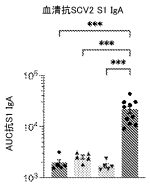


FIG. 1F

【図１Ｇ】

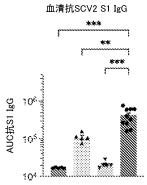


FIG. 1G

【図１Ｈ】

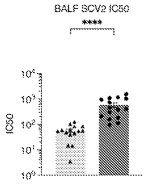


FIG. 1H

【図１Ｉ】

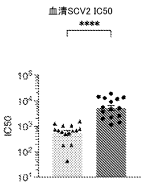


FIG. 1I

【図１Ｊ】

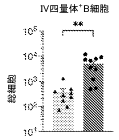


FIG. 1J

【図１Ｋ】

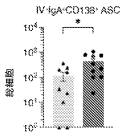


FIG. 1K

【図１Ｌ】

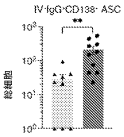


FIG. 1L

【図１Ｍ】

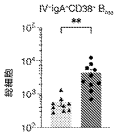


FIG. 1M

【図１Ｎ】

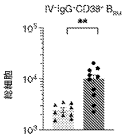


FIG. 1N

【図２Ａ】

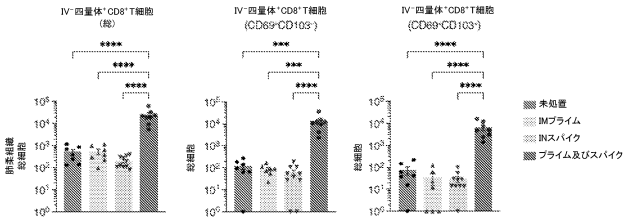


FIG. 2A FIG. 2B FIG. 2C

【図２Ｂ】

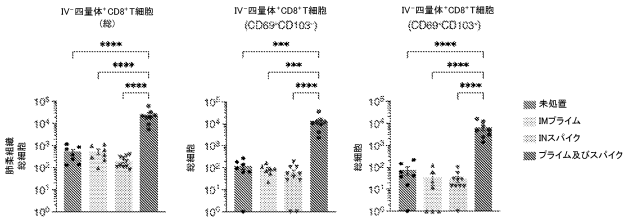


FIG. 2A FIG. 2B FIG. 2C

【図２Ｃ】

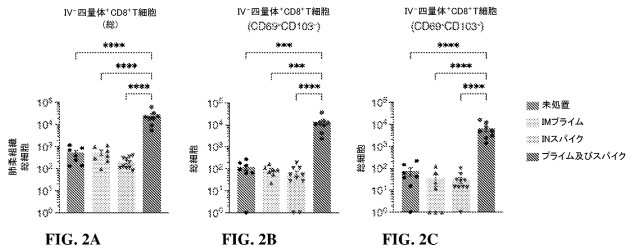


FIG. 2A FIG. 2B FIG. 2C

【図２Ｄ】

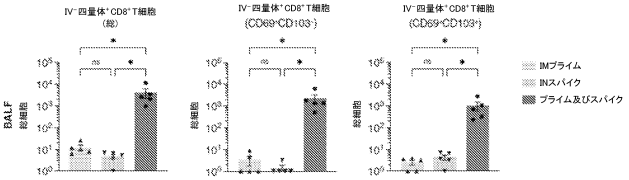


FIG. 2D FIG. 2E FIG. 2F

【図２Ｅ】

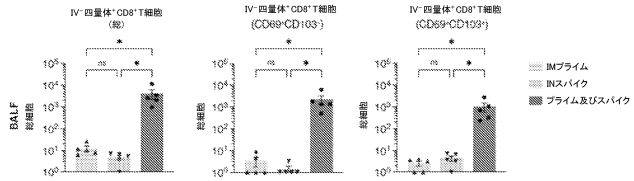


FIG. 2D FIG. 2E FIG. 2F

【図２Ｆ】

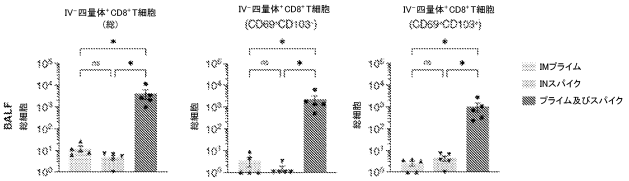


FIG. 2D FIG. 2E FIG. 2F

【図２Ｇ】

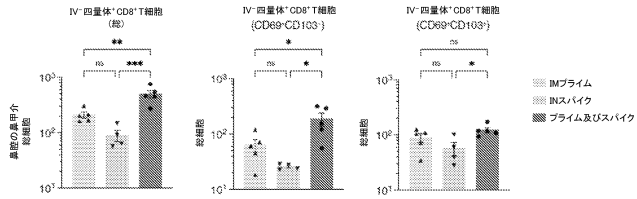


FIG. 2G FIG. 2H FIG. 2I

【図２Ｈ】

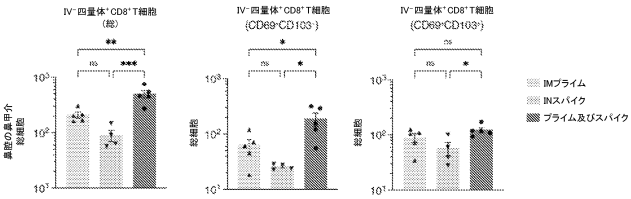


FIG. 2G FIG. 2H FIG. 2I

【図２Ｉ】

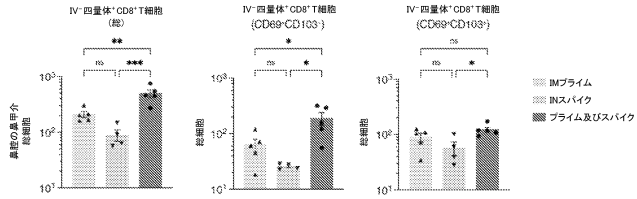


FIG. 2G FIG. 2H FIG. 2I

【図２Ｊ】

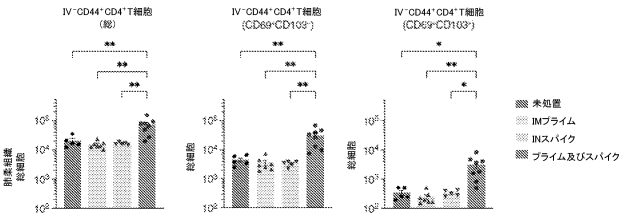


FIG. 2J FIG. 2K FIG. 2L

【図２Ｋ】

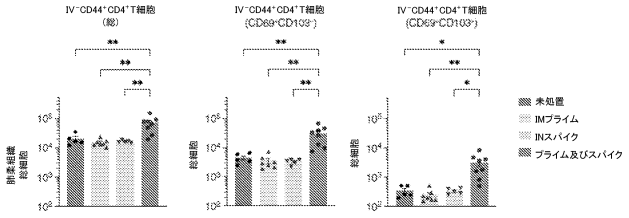


FIG. 2J FIG. 2K FIG. 2L

【図２Ｌ】

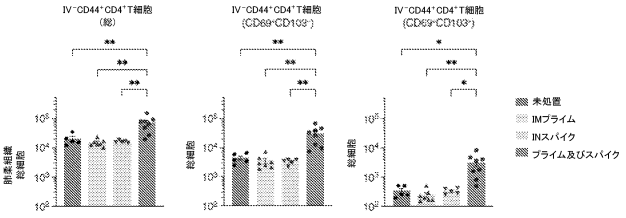


FIG. 2J FIG. 2K FIG. 2L

【図２Ｍ】

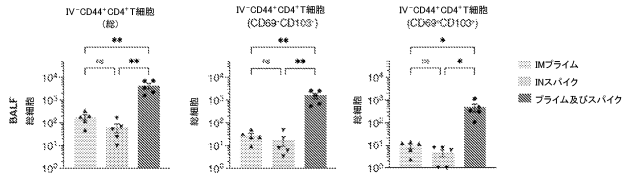


FIG. 2M FIG. 2N FIG. 2O

【図２Ｎ】

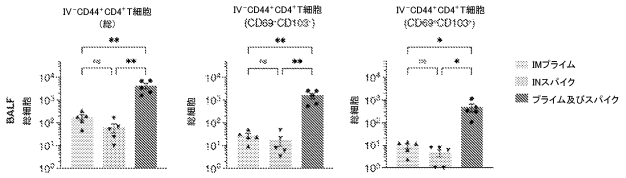


FIG. 2M FIG. 2N FIG. 2O

【図２Ｏ】

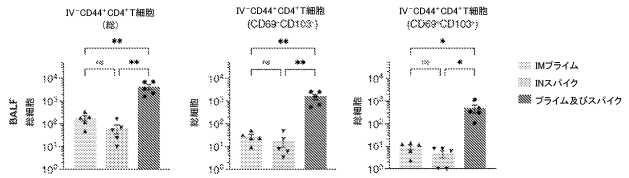


FIG. 2M FIG. 2N FIG. 2O

【図３Ａ】

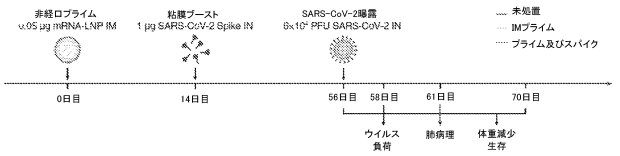


FIG. 3A

【図３Ｂ】

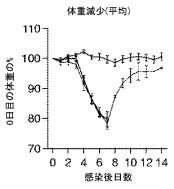


FIG. 3B

【図３Ｃ】

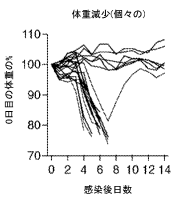


FIG. 3C

【図３Ｄ】

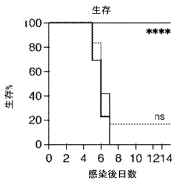


FIG. 3D

【図３Ｅ】

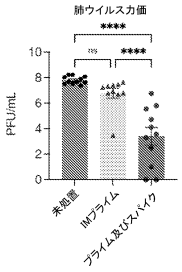


FIG. 3E

【図３Ｆ】

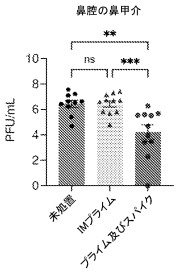


FIG. 3F

【図３Ｇ】

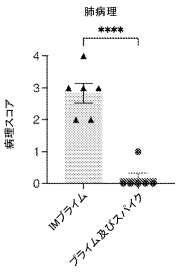


FIG. 3G

【図３Ｈ】

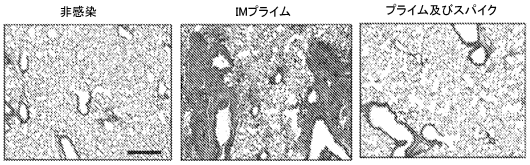


FIG. 3H

【図３Ｉ】

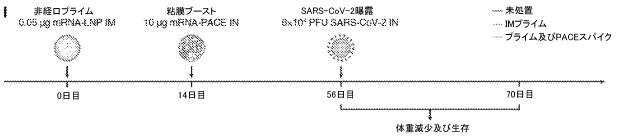


FIG. 3I

【図３Ｊ】

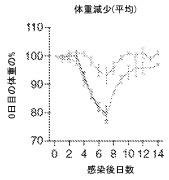


FIG. 3J

【図３Ｋ】

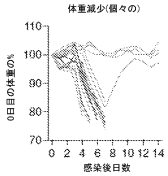


FIG. 3K

【図３Ｌ】

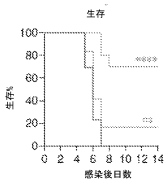


FIG. 3L

【図４Ａ】

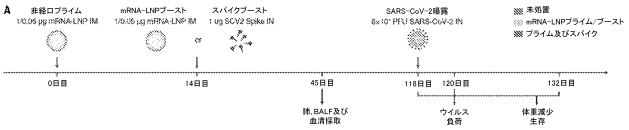


FIG. 4A

【図４Ｂ】

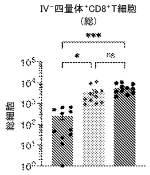


FIG. 4B

【図４Ｃ】

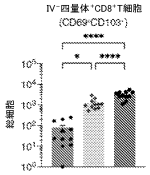


FIG. 4C

【図４Ｄ】

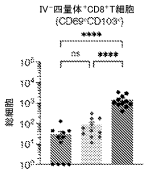


FIG. 4D

【図４Ｅ】

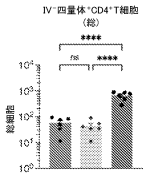


FIG. 4E

【図４Ｆ】

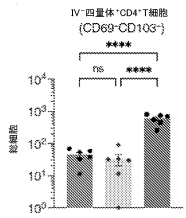


FIG. 4F

【図４Ｇ】

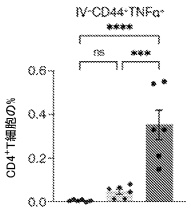


FIG. 4G

【図４Ｈ】

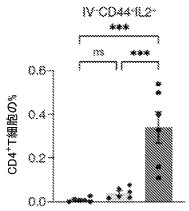


FIG. 4H

【図４Ｉ】

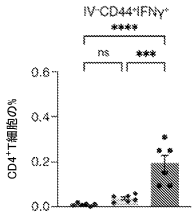


FIG. 4I

【図４Ｊ】

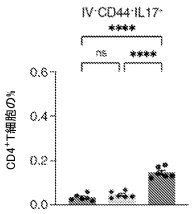


FIG. 4J

【図４Ｋ】

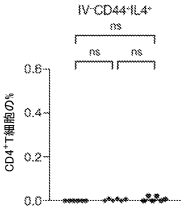


FIG. 4K

【図４Ｌ】

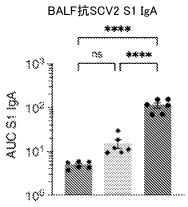


FIG. 4L

【図４Ｍ】

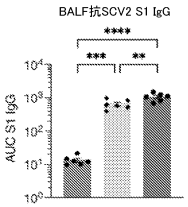


FIG. 4M

【図４Ｎ】

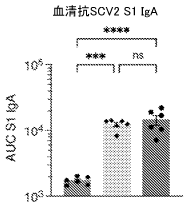


FIG. 4N

【図４Ｏ】

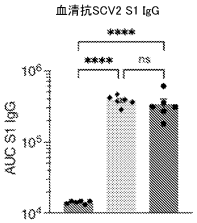


FIG. 4O

【図４Ｐ】

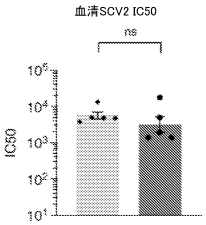


FIG. 4P

【図４Ｑ】

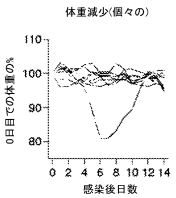


FIG. 4Q

【図４Ｒ】

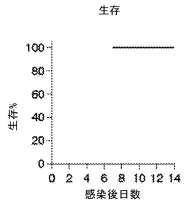


FIG. 4R

【図４Ｓ】

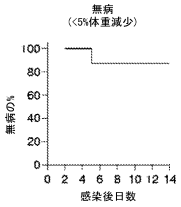


FIG. 4S

【図４Ｔ】

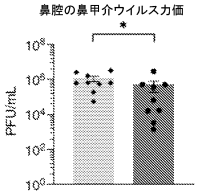


FIG. 4T

【図４Ｕ】

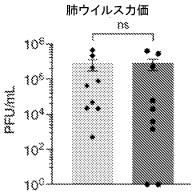


FIG. 4U

【図５Ａ】

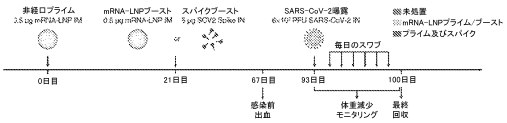


FIG. 5A

【図５Ｂ】

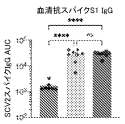


FIG. 5B

【図５Ｃ】

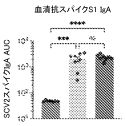


FIG. 5C

【図５Ｄ】

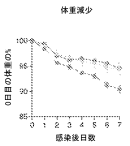


FIG. 5D

【図５Ｅ】

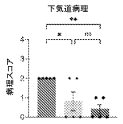


FIG. 5E

【図５Ｆ】

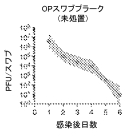


FIG. 5F

【図５Ｇ】

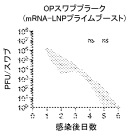


FIG. 5G

【図５Ｈ】

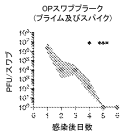


FIG. 5H

【図５Ｉ】

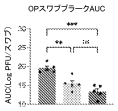


FIG. 5I

【図５Ｊ】

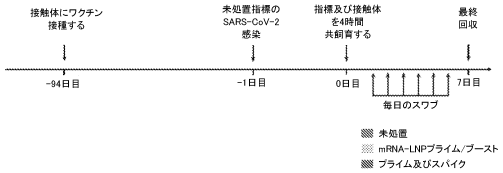


FIG. 5J

【図５Ｋ】

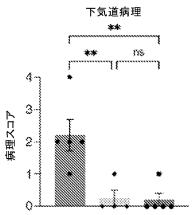


FIG. 5K

【図５Ｌ】

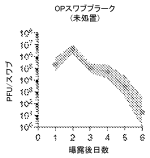


FIG. 5L

【図５Ｍ】

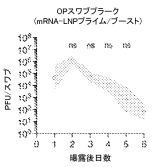


FIG. 5M

【図５Ｎ】

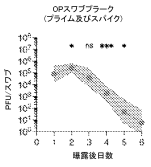


FIG. 5N

【図５Ｏ】

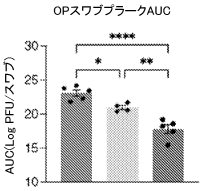


FIG. 5O

【図６Ａ】

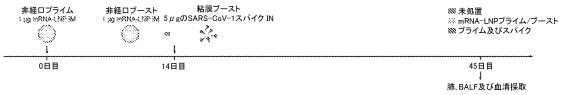


FIG. 6A

【図６Ｂ】

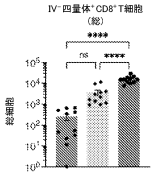


FIG. 6B

【図６Ｃ】

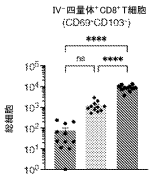


FIG. 6C

【図６Ｄ】

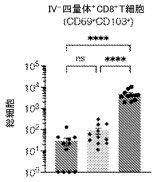


FIG. 6D

【図６Ｅ】

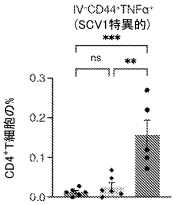


FIG. 6E

【図６Ｆ】

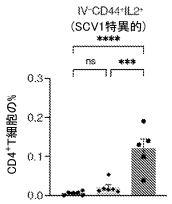


FIG. 6F

【図６Ｇ】

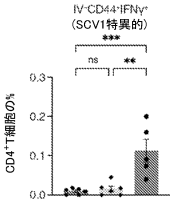


FIG. 6G

【図６Ｈ】

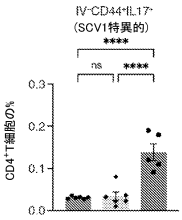


FIG. 6H

【図６Ｉ】

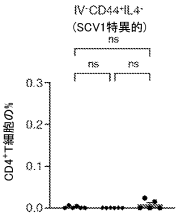


FIG. 6I

【図６Ｊ】

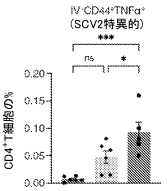


FIG. 6J

【図６Ｋ】

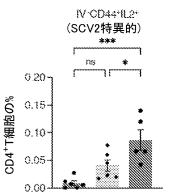


FIG. 6K

【図６Ｌ】

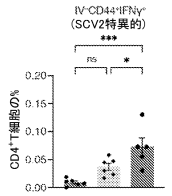


FIG. 6L

【図６Ｍ】

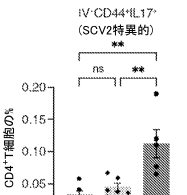


FIG. 6M

【図６Ｎ】

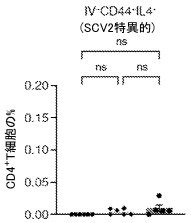


FIG. 6N

【図６Ｏ】

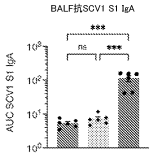


FIG. 6O

【図６Ｐ】

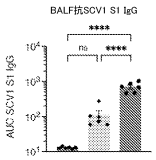


FIG. 6P

【図６Ｑ】

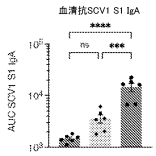


FIG. 6Q

【図６Ｒ】

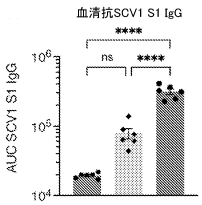


FIG. 6R

【図６Ｓ】

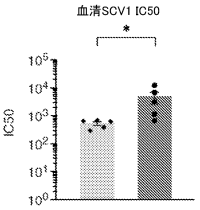


FIG. 6S

【図６Ｔ】

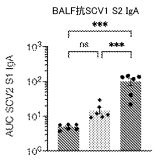


FIG. 6T

【図６Ｕ】

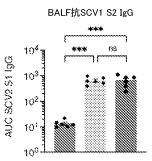


FIG. 6U

【図６Ｖ】

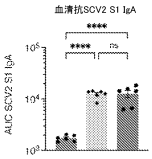


FIG. 6V

【図６Ｗ】

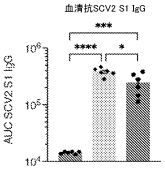


FIG. 6W

【図６Ｘ】

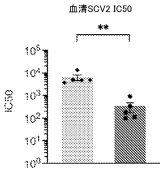


FIG. 6X

【図７Ａ】

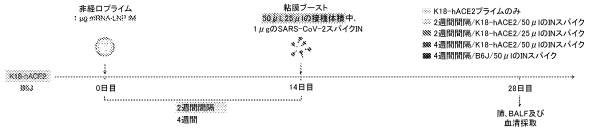


FIG. 7A

【図７Ｂ】

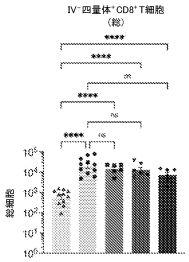


FIG. 7B

【図７Ｃ】

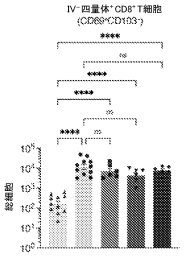


FIG. 7C

【図７Ｄ】

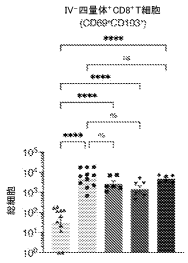


FIG. 7D

【図７Ｅ】

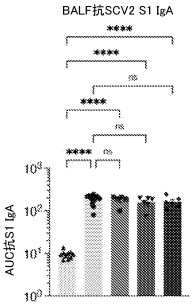


FIG. 7E

【図７Ｆ】

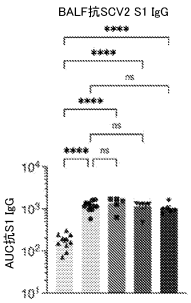


FIG. 7F

【図７Ｇ】

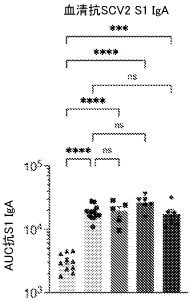


FIG. 7G

【図７Ｈ】

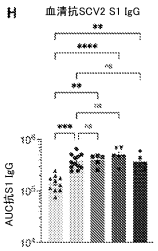


FIG. 7H

【図７Ｉ】

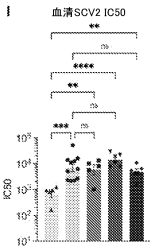


FIG. 7I

【図８Ａ】

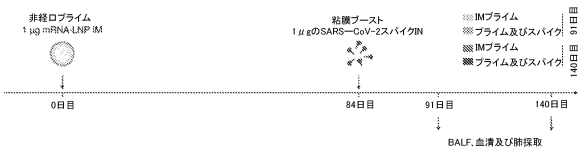


FIG. 8A

【図８Ｂ】

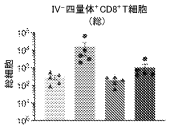


FIG. 8B

【図８Ｃ】

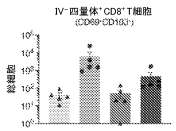


FIG. 8C

【図８Ｄ】

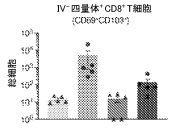


FIG. 8D

【図８Ｅ】

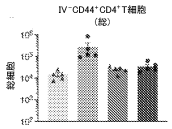


FIG. 8E

【図８Ｆ】

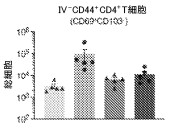


FIG. 8F

【図８Ｇ】

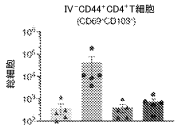


FIG. 8G

【図８Ｈ】

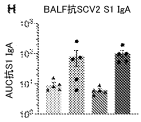


FIG. 8H

【図８Ｉ】

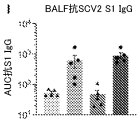


FIG. 8I

【図８Ｊ】

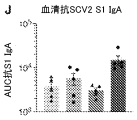


FIG. 8J

【図８Ｋ】

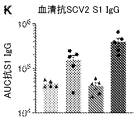


FIG. 8K

【図９Ａ】



FIG. 9A

【図９Ｂ】

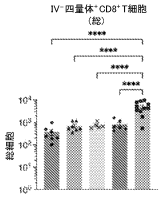


FIG. 9B

【図９Ｃ】

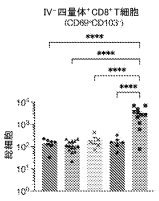


FIG. 9C

【図９Ｄ】

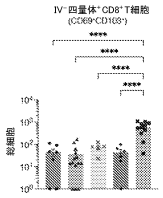


FIG. 9D

【図９Ｅ】

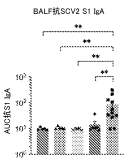


FIG. 9E

【図９Ｆ】

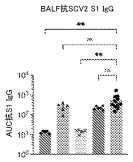


FIG. 9F

【図９Ｇ】

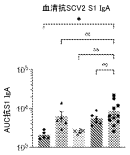
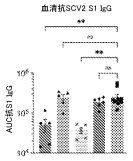


FIG. 9G

【図９Ｈ】



GIF 9H

【図１０Ａ】

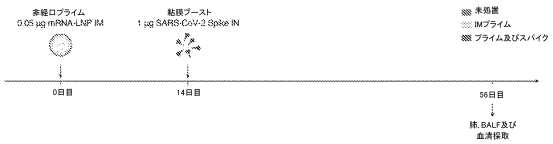


FIG. 10A

【図１０Ｂ】

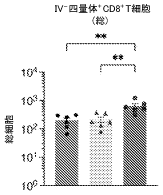


FIG. 10B

【図１０Ｃ】

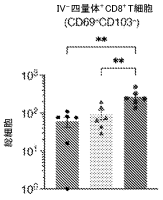


FIG. 10C

【図１０Ｄ】

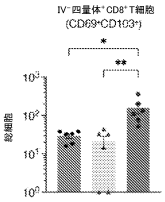


FIG. 10D

【図１０Ｅ】

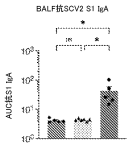


FIG. 10E

【図１０Ｆ】

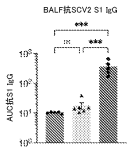


FIG. 10F

【図１０Ｇ】

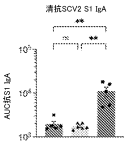


FIG. 10G

【図１０Ｈ】

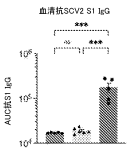


FIG. 10H

【図１１Ａ】

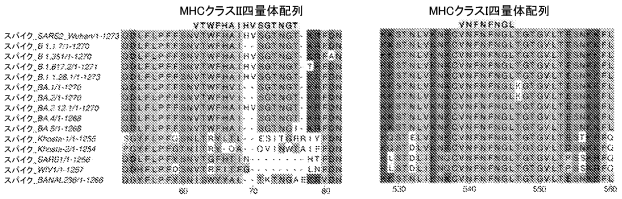
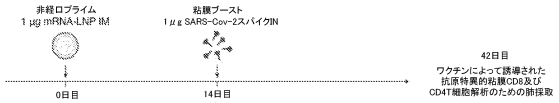


FIG. 11A

【図１１Ｂ】



FIGF. 11B

【図１１Ｃ】

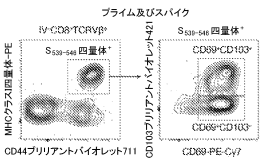


FIG. 11C

【図１１Ｄ】

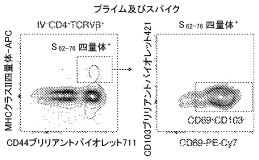


FIG. 11D

【図１１Ｅ】



FIG. 11E

【図１１Ｆ】

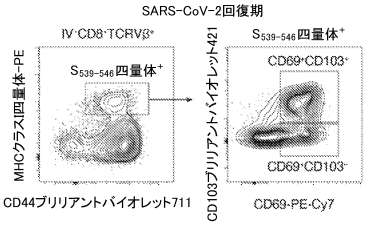


FIG. 11F

【図１１Ｇ】

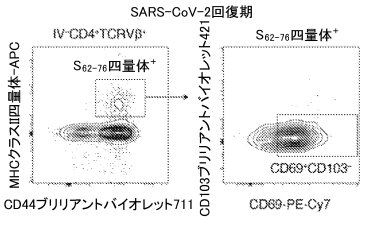


FIG. 11G

【図１２Ａ】

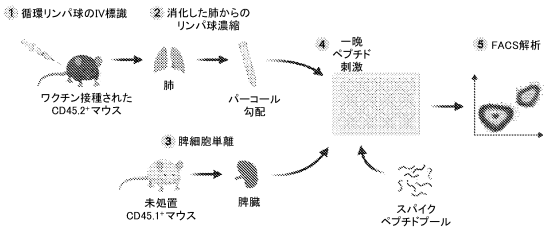


FIG. 12A

【図１２Ｂ】

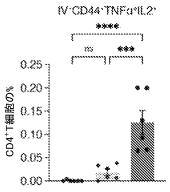


FIG. 12B

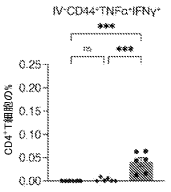


FIG. 12C

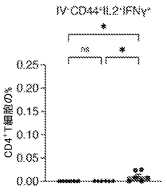


FIG. 12D

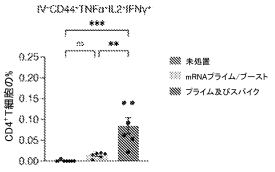


FIG. 12E

【図１２Ｃ】

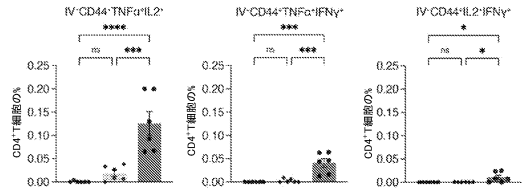


FIG. 12B FIG. 12C FIG. 12D

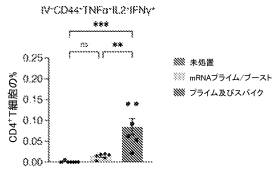


FIG. 12E

【図１２Ｄ】

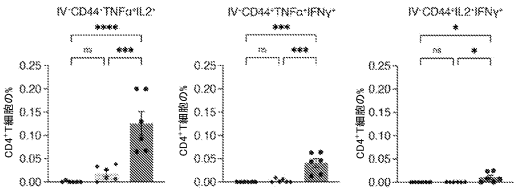


FIG. 12B FIG. 12C FIG. 12D

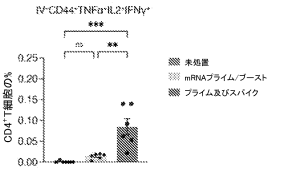


FIG. 12E

【図１２Ｅ】

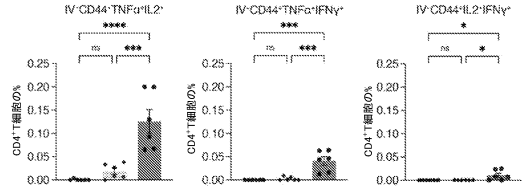


FIG. 12B FIG. 12C FIG. 12D

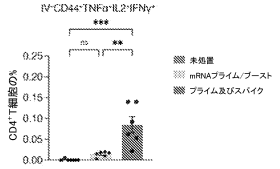


FIG. 12E

【図１３Ａ】

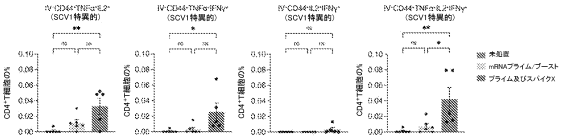


FIG. 13A FIG. 13B FIG. 13C FIG. 13D

【図１３Ｂ】

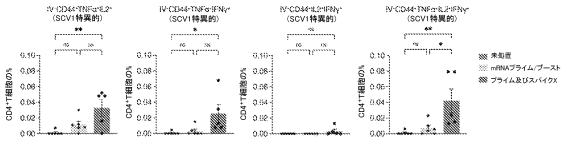


FIG. 13A FIG. 13B FIG. 13C FIG. 13D

【図１３Ｃ】

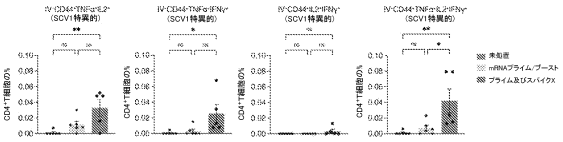


FIG. 13A FIG. 13B FIG. 13C FIG. 13D

【図１３Ｄ】

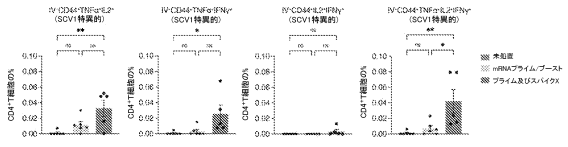


FIG. 13A FIG. 13B FIG. 13C FIG. 13D

【図１３Ｅ】

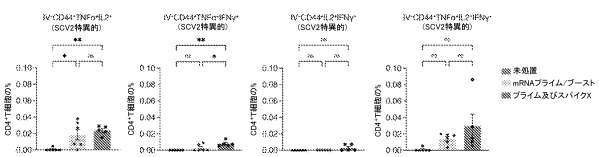


FIG. 13E FIG. 13F FIG. 13G FIG. 13H

【図１３Ｆ】

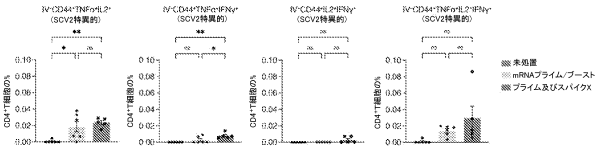


FIG. 13E FIG. 13F FIG. 13G FIG. 13H

【図１３Ｇ】

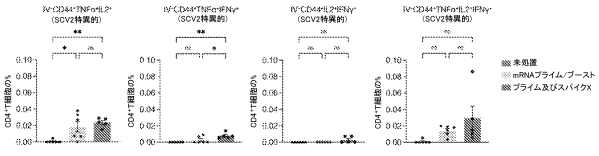


FIG. 13E FIG. 13F FIG. 13G FIG. 13H

【図１３Ｈ】

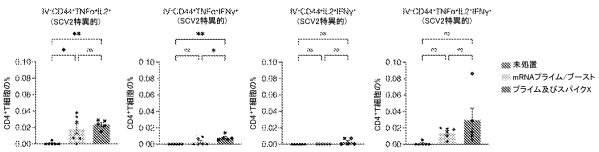


FIG. 13E FIG. 13F FIG. 13G FIG. 13H

【図１４】

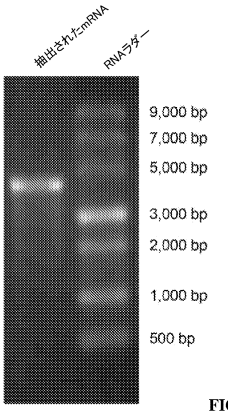


FIG. 14

【図１５Ａ】

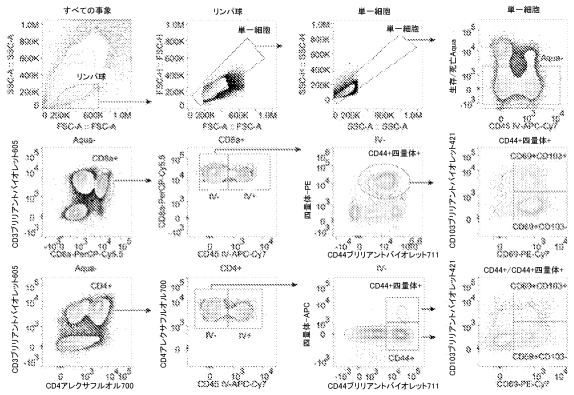


FIG. 15A

【図１５Ｂ】

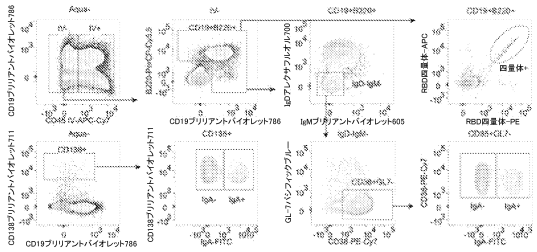


FIG. 15B

【図１５Ｃ】

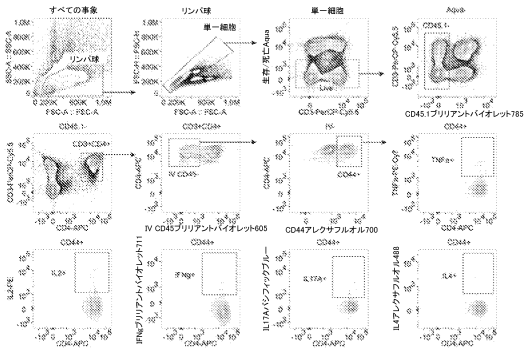


FIG. 15C

【図１６】

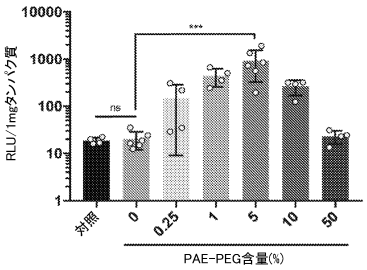


FIG. 16

【図１７】

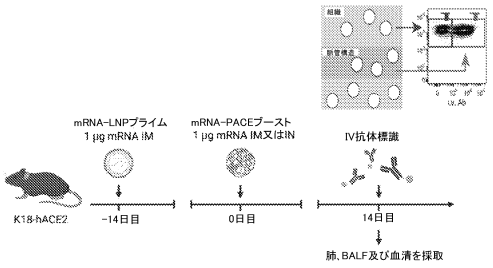


FIG. 17

【図１８Ａ】

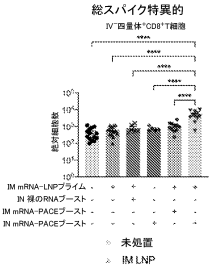


FIG. 18A

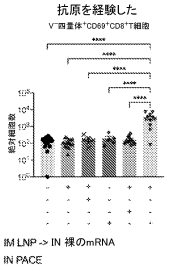


FIG. 18B

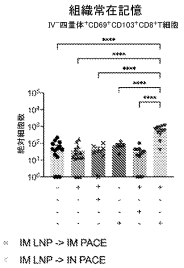


FIG. 18C

【図１８Ｂ】

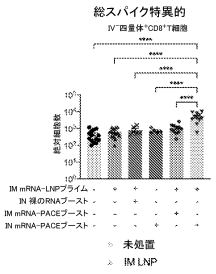


FIG. 18A

【図１８Ｂ】

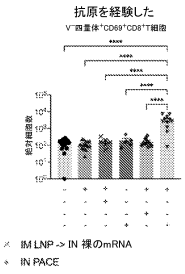


FIG. 18B

【図１８Ｃ】

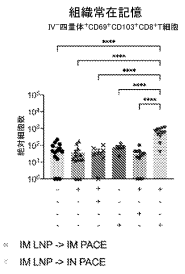


FIG. 18C

【図１８Ａ】

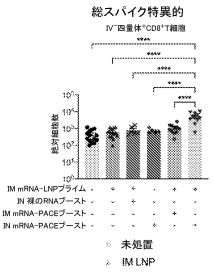


FIG. 18A

【図１８Ｂ】

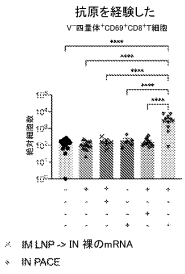


FIG. 18B

【図１８Ｃ】

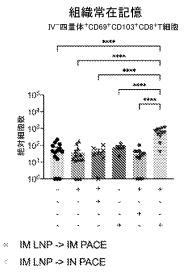


FIG. 18C

【図１９Ａ】

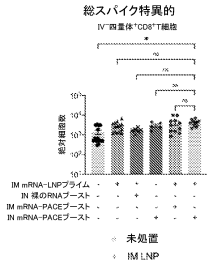


FIG. 19A

【図１９Ｂ】

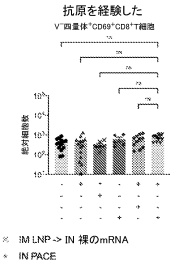


FIG. 19B

【図１９Ｃ】

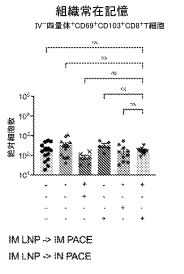


FIG. 19C

【図１９Ａ】

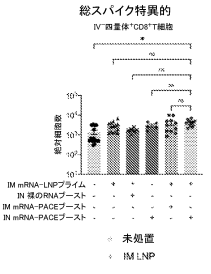


FIG. 19A

【図１９Ｂ】

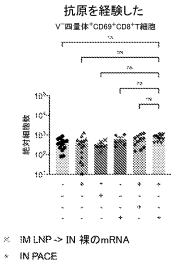


FIG. 19B

【図１９Ｃ】

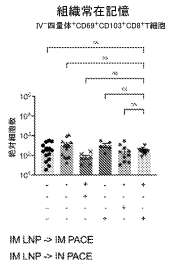


FIG. 19C

【図１９Ｃ】

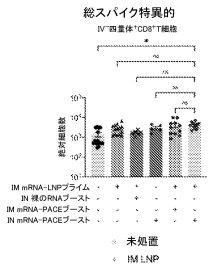


FIG. 19A

【図１９Ｂ】

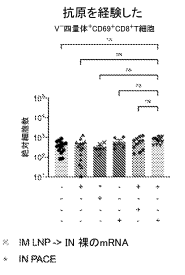


FIG. 19B

【図１９Ｃ】

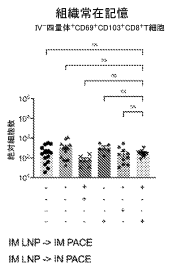


FIG. 19C

【図２０Ａ】

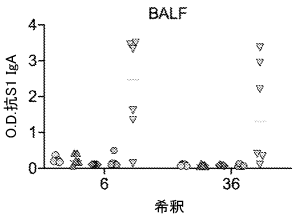


FIG. 20A

【図２０Ｂ】

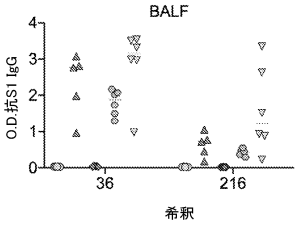


FIG. 20B

【図２０Ｃ】

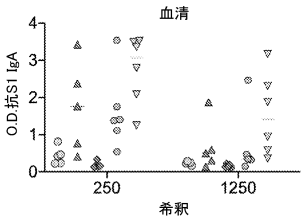


FIG. 20C

【図２０Ｄ】

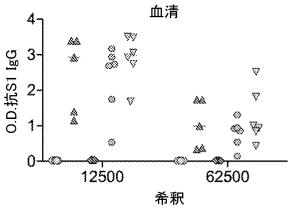


FIG. 20D

【図２１】

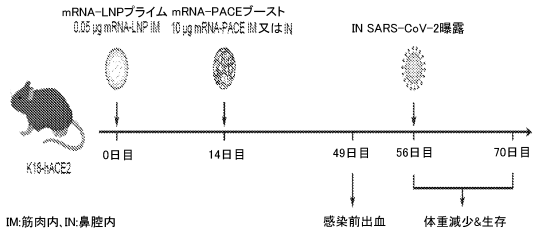


FIG. 21

【図２２Ａ】

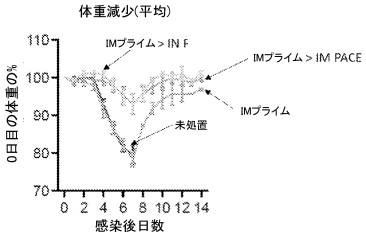


FIG. 22A

【図２２Ｂ】

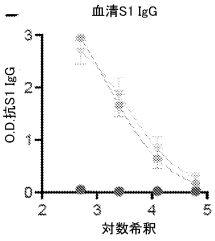


FIG. 22B

【図２２Ｃ】

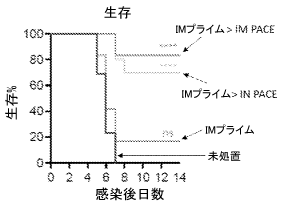


FIG. 22C

【図２３】

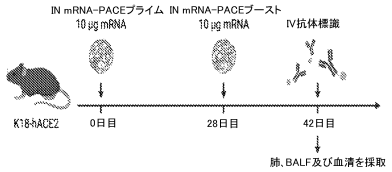


FIG. 23

【図２４Ａ】

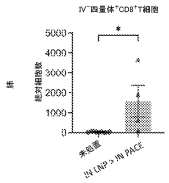


FIG. 24A

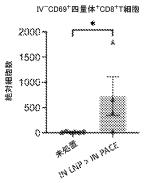


FIG. 24B

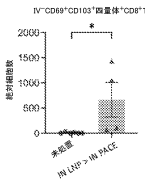


FIG. 24C

【図２４Ｂ】

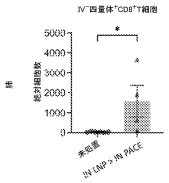


FIG. 24A

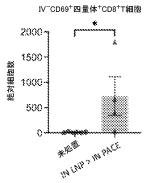


FIG. 24B

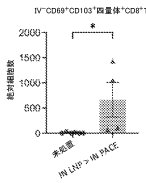


FIG. 24C

【図２４Ｃ】

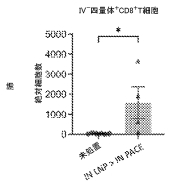


FIG. 24A

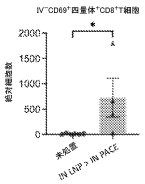


FIG. 24B

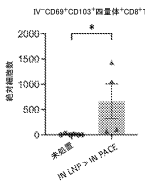


FIG. 24C

【図２４Ｄ】

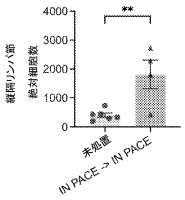


FIG. 24D

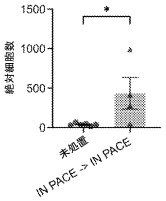


FIG. 24E

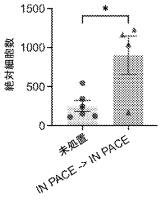


FIG. 24F

【図２４Ｅ】

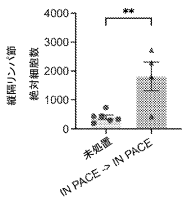


FIG. 24D

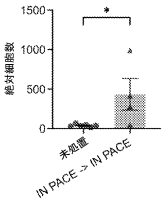


FIG. 24E

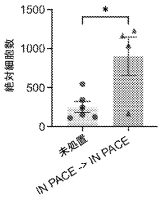


FIG. 24F

【図２４Ｆ】

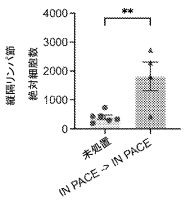


FIG. 24D

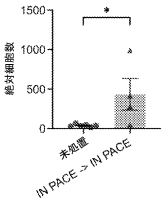


FIG. 24E

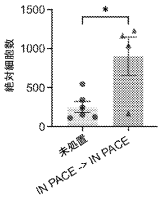


FIG. 24F

【図２５Ａ】

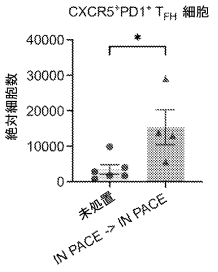


FIG. 25A

【図２５Ｂ】

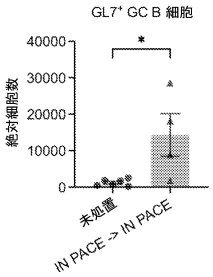


FIG. 25B

【図２５Ｃ】

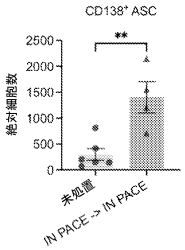


FIG. 25C

【図２５Ｄ】

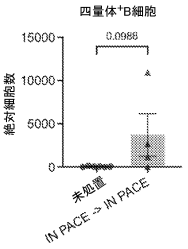


FIG. 25D

【図２６Ａ】

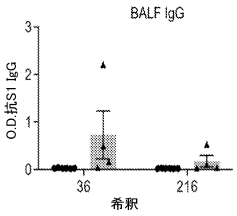


FIG. 26A

【図２６Ｂ】

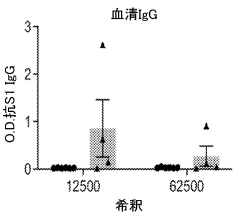


FIG. 26B

【図２６Ｃ】

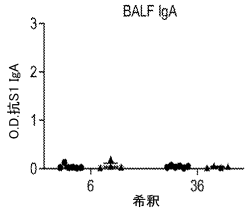


FIG. 26C

【図２６Ｄ】

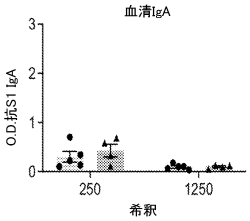


FIG. 26D

【図２７Ａ】

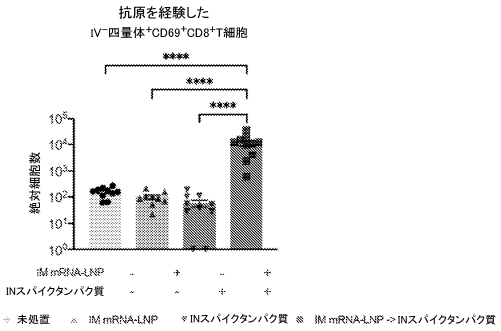


FIG. 27A

【図２７Ｂ】

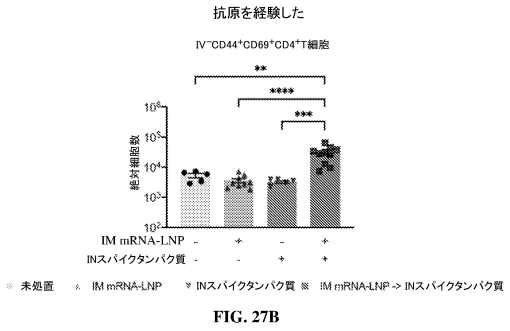


FIG. 27B

【図２７Ｃ】

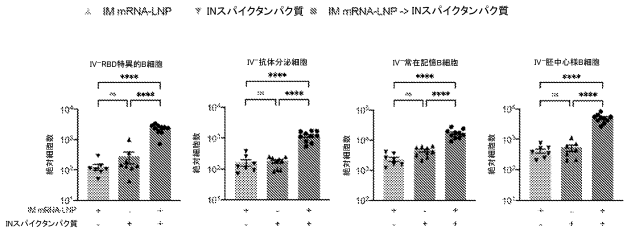


FIG. 27C FIG. 27D FIG. 27E FIG. 27F

【図２７Ｄ】

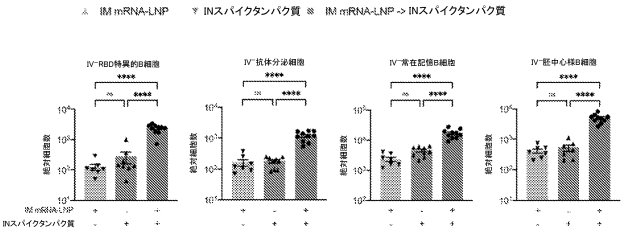


FIG. 27C FIG. 27D FIG. 27E FIG. 27F

【図２７Ｅ】

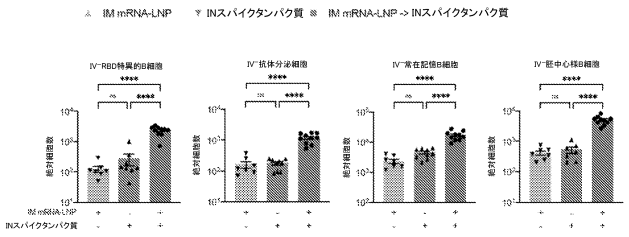


FIG. 27C FIG. 27D FIG. 27E FIG. 27F

【図２７Ｆ】

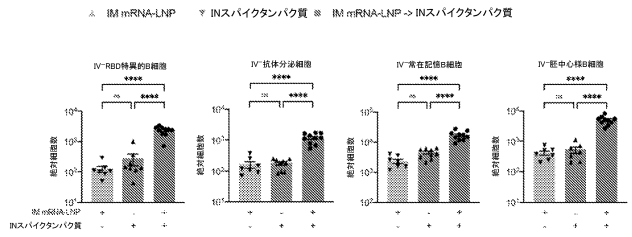


FIG. 27C FIG. 27D FIG. 27E FIG. 27F

【図２８Ａ】

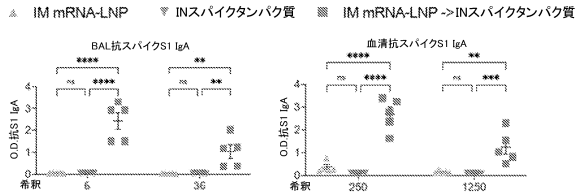


FIG. 28A FIG. 28B

【図２８Ｂ】

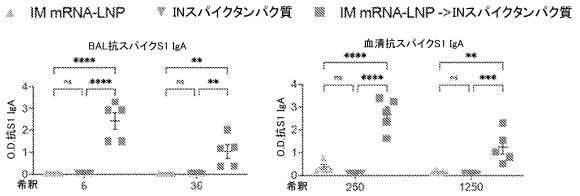


FIG. 28A FIG. 28B

【図２８Ｃ】

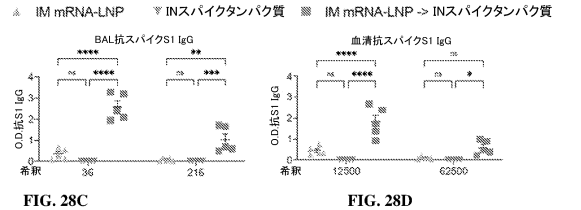


FIG. 28C FIG. 28D

【図２８Ｄ】

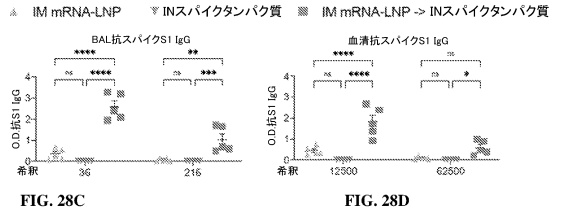


FIG. 28C FIG. 28D

【図２８Ｅ】

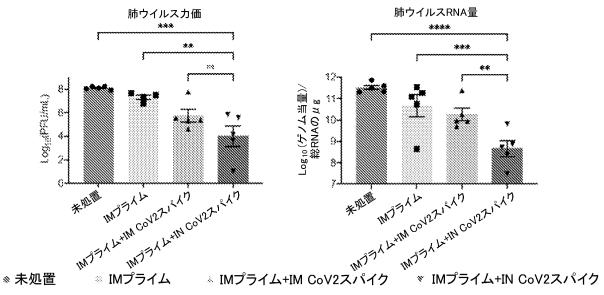


FIG. 28E FIG. 28F

【図２８Ｆ】

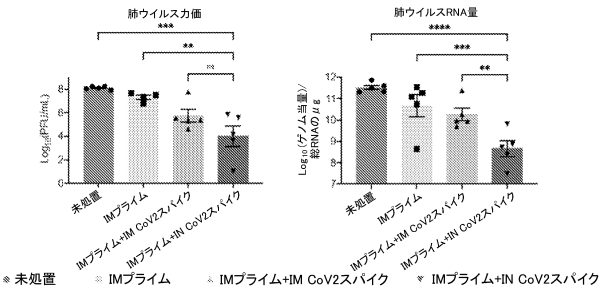


FIG. 28E FIG. 28F

【図２８Ｇ】

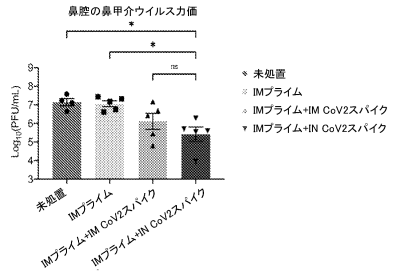


FIG. 28G

【図２９Ａ】

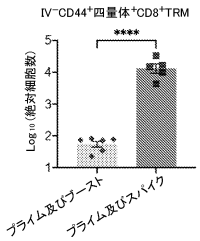


FIG. 29A

【図２９Ｂ】

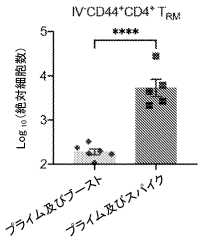


FIG. 29B

【図２９Ｃ】

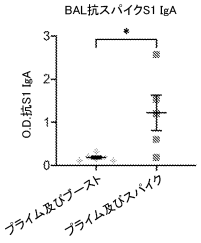


FIG. 29C

【図２９Ｄ】

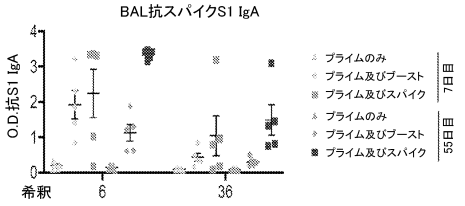


FIG. 29D

【図２９Ｅ】

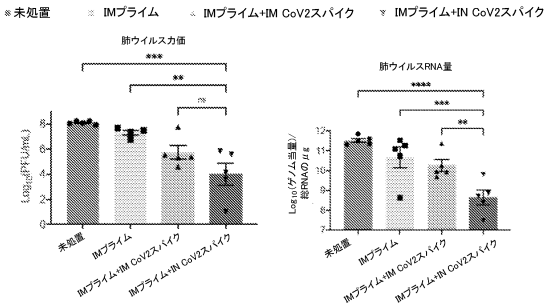


FIG. 29E

FIG. 29F

【図２９Ｆ】

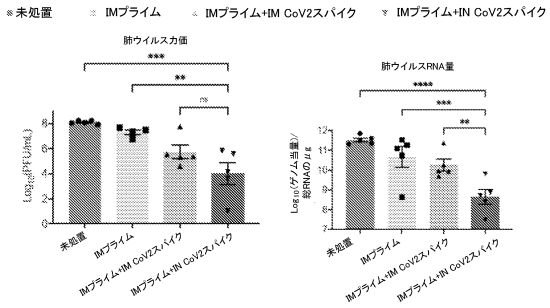


FIG. 29E　FIG. 29F

【図２９Ｇ】

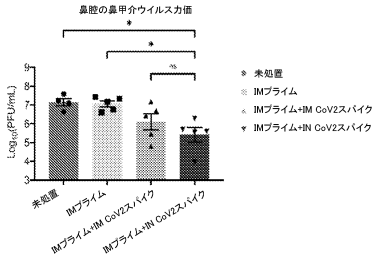


FIG. 29G

【図２９Ｈ】

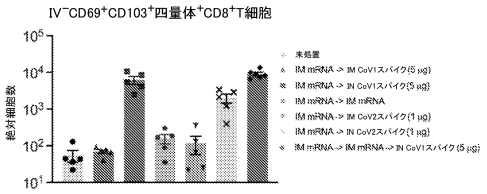


FIG. 29H

【図３０Ａ】

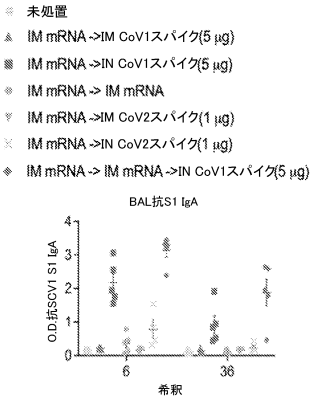


FIG. 30A

【図３０Ｂ】

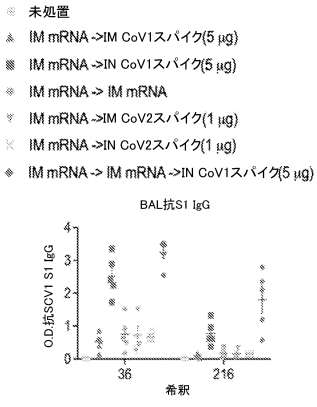


FIG. 30B

【図３０Ｃ】

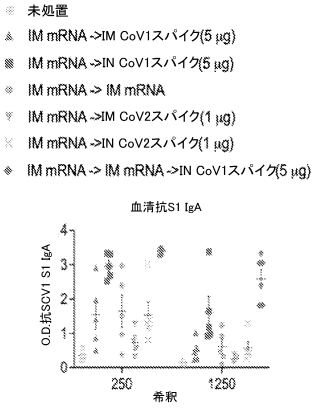


FIG. 30C

【図３０Ｄ】

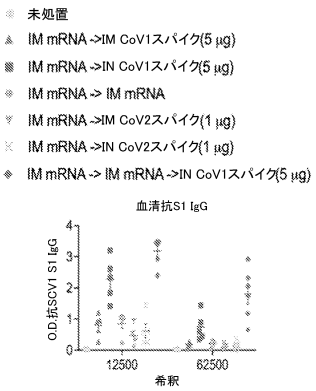


FIG. 30D

【図３０Ｅ】

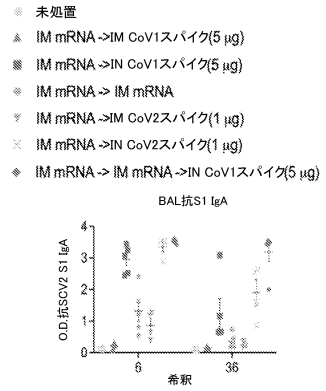


FIG. 30E

【図３０Ｆ】

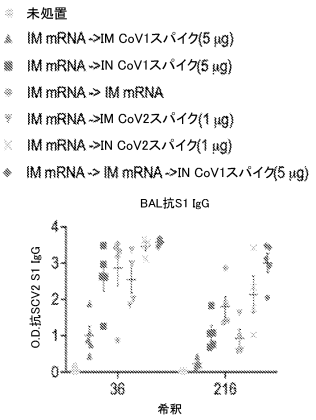


FIG. 30F

【図３０Ｇ】

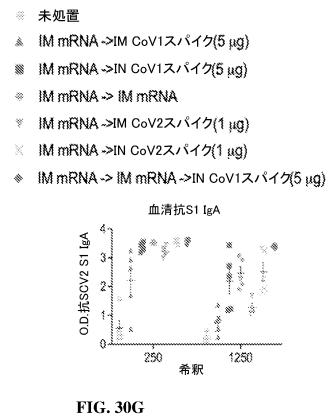


FIG. 30G

【図３０Ｈ】

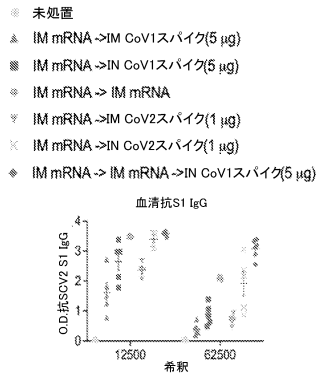


FIG. 30H

【図３０Ｉ】

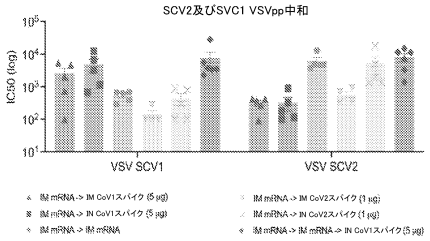


FIG. 30I

【配列表】

2025502630000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/081199

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K47/60 A61K47/69 A61P35/00 A61K39/12 A61P31/14
A61K39/39
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 C12N A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LAPUENTE DENNIS ET AL: "Protective mucosal immunity against SARS-CoV-2 after heterologous systemic prime-mucosal boost immunization", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 12, no. 1, 26 November 2021 (2021-11-26), XP93038253, DOI: 10.1038/s41467-021-27063-4 Retrieved from the Internet: URL:https://www.nature.com/articles/s41467-021-27063-4> figures; abstract ----- -/--	1-55, 78-92

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[x] 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
30 May 2023	07/06/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Saame, Tina

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/081199

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SUI YONGJUN ET AL: "Protection against SARS-CoV-2 infection by a mucosal vaccine in rhesus macaques", JCI INSIGHT, vol. 6, no. 210, 28 April 2021 (2021-04-28), XP93050277, ISSN: 2379-3708, DOI: 10.1172/jci figures; abstract	1-55, 78-92
X	GRUN MOLLY K. ET AL: "PEGylation of poly(amine-co-ester) polyplexes for tunable gene delivery", BIOMATERIALS, vol. 272, 1 May 2021 (2021-05-01), page 120780, XP093035344, AMSTERDAM, NL ISSN: 0142-9612, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2021.120780	78-92
Y	abstract	1-55
X	US 2017/360959 A1 (SALTZMAN W MARK [US] ET AL) 21 December 2017 (2017-12-21)	78-92
Y	paragraphs [0286], [0323]; claim 1	1-55
X	US 2016/251477 A1 (CUI JIAJIA [US] ET AL) 1 September 2016 (2016-09-01)	78-92
Y	paragraphs [0003], [0099], [0100], [0122], [0226]	1-55
X,P	WO 2021/257262 A1 (UNIV YALE [US]) 23 December 2021 (2021-12-23)	1-45, 78-92
Y,P	figure 12; example 7 claim 1	1-55
A	KAUFFMAN AMY C. ET AL: "Tunability of Biodegradable Poly(amine- co -ester) Polymers for Customized Nucleic Acid Delivery and Other Biomedical Applications", BIOMACROMOLECULES, vol. 19, no. 9, 15 August 2018 (2018-08-15), pages 3861-3873, XP055845595, US ISSN: 1525-7797, DOI: 10.1021/acs.biomac.8b00997 the whole document	1-55, 78-92

-/--

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/081199

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	Suberi Alexandra ET AL: "Inhalable polymer nanoparticles for versatile mRNA delivery and mucosal vaccination", bioRxiv, 23 March 2022 (2022-03-23), XP093050189, DOI: 10.1101/2022.03.22.485401 Retrieved from the Internet: URL:https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.03.22.485401v1.full.pdf [retrieved on 2023-05-26] the whole document -----	1-55, 78-92
A,P	NDEUPEN NDEUPEN SONIA SONIA ET AL: "The mRNA-LNP platform's lipid nanoparticle component used in preclinical vaccine studies is highly inflammatory", ISCIENCE, vol. 24, no. 12, 17 December 2021 (2021-12-17), pages 103479-103479, XP93050279, US ISSN: 2589-0042, DOI: 10.1016/j.isci.2021.103479 cited in the application the whole document -----	1-55, 78-92
E	WO 2023/012824 A1 (BHARAT BIOTECH INT LTD [IN]) 9 February 2023 (2023-02-09) claims -----	1-55, 78-92

2

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/081199

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

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

   a. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. [ ] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/081199

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 56-77, 93-109(completely); 1-55, 78-92(partially)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

International Application No. PCT/US2022/081199

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 56-77, 93-109(completely); 1-55, 78-92(partially)

The search is limited to claims 1-55 and 78-92 insofar as these claims relate to PACE carriers. The reasons for the limitation of the search are set out in the accompanying written opinion of the International Searching Authority (WOISA).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines C-IV, 7.2), should the problems which led to the Article 17(2) PCT declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/081199

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2017360959 A1	21-12-2017	NONE	
US 2016251477 A1	01-09-2016	NONE	
WO 2021257262 A1	23-12-2021	AU 2021293780 A1	02-02-2023
		BR 112022025855 A2	10-01-2023
		CA 3183351 A1	23-12-2021
		CN 116157444 A	23-05-2023
		EP 4168471 A1	26-04-2023
		KR 20230042018 A	27-03-2023
		WO 2021257262 A1	23-12-2021
WO 2023012824 A1	09-02-2023	NONE	

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

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
A61K	*39/155(2006.01)*	A61K	39/145	
A61K	*39/215(2006.01)*	A61K	39/155	
A61K	*39/235(2006.01)*	A61K	39/215	
A61K	*39/245(2006.01)*	A61K	39/235	
A61K	*39/25 (2006.01)*	A61K	39/245	
A61K	*39/12 (2006.01)*	A61K	39/25	
A61K	*39/23 (2006.01)*	A61K	39/12	
A61K	*47/34 (2017.01)*	A61K	39/23	
A61K	*47/46 (2006.01)*	A61K	47/34	
A61K	*9/127(2025.01)*	A61K	47/46	
A61K	*9/107(2006.01)*	A61K	9/127	
A61K	*9/51 (2006.01)*	A61K	9/107	
A61K	*9/12 (2006.01)*	A61K	9/51	
C12N	*15/50 (2006.01)*	A61K	9/12	
C12N	*15/45 (2006.01)*	C12N	15/50	
C12N	*15/44 (2006.01)*	C12N	15/45	
C12N	*15/34 (2006.01)*	C12N	15/44	
C12N	*15/38 (2006.01)*	C12N	15/34	
		C12N	15/38	

(32)優先日　令和3年12月21日(2021.12.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/301,942
(32)優先日　令和4年1月21日(2022.1.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/302,413
(32)優先日　令和4年1月24日(2022.1.24)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/418,744
(32)優先日　令和4年10月24日(2022.10.24)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＷＥＥＮ

リート・４３３、イェール・ベンチャーズ、イェール・ユニバーシティ気付
(72)発明者　ゴールドマン－イズラエロウ，ベンジャミン
アメリカ合衆国、コネチカット・０６５１１、ニュー・ヘブン、テンプル・ストリート・４３３、イェール・ベンチャーズ、イェール・ユニバーシティ気付
(72)発明者　サルツマン，ダブリュ・マーク

アメリカ合衆国、コネチカット・０６５１１、ニュー・ヘブン、テンプル・ストリート・４３３、イェール・ベンチャーズ、イェール・ユニバーシティ気付
(72)発明者　サベリ，アレグザンドラ
アメリカ合衆国、コネチカット・０６５１１、ニュー・ヘブン、テンプル・ストリート・４３３、イェール・ベンチャーズ、イェール・ユニバーシティ気付
(72)発明者　レスクク，メラニー
アメリカ合衆国、コネチカット・０６５１１、ニュー・ヘブン、テンプル・ストリート・４３３、イェール・ベンチャーズ、イェール・ユニバーシティ気付
(72)発明者　ピオットロースキー－ダスピット，アレグザンドラ
アメリカ合衆国、コネチカット・０６５１１、ニュー・ヘブン、テンプル・ストリート・４３３、イェール・ベンチャーズ、イェール・ユニバーシティ気付
(72)発明者　スー，ヒ・ウォン
アメリカ合衆国、コネチカット・０６５１１、ニュー・ヘブン、テンプル・ストリート・４３３、イェール・ベンチャーズ、イェール・ユニバーシティ気付

Ｆターム（参考）　4C076　AA17 AA19 AA24 AA65 AA95 BB15 BB16 BB21 BB22 BB25
BB27 BB29 BB30 CC06 CC07 CC35 EE17 EE23 EE48 EE57
4C084　AA13 MA02 MA05 MA13 MA38 MA56 MA57 MA59 MA60 MA66
NA05 NA13 NA14 ZB051 ZB091 ZB221 ZB331 ZC751
4C085　AA03 BA51 BA55 BA57 BA58 BA71 BA75 BA79 BA80 BA83
BB23 CC08 CC31 DD62 EE01 EE03 GG03 GG05 GG10