(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-512519
(P2023-512519A)
(43)公表日　令和5年3月27日(2023.3.27)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/50 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/50	ＺＮＡ	４Ｃ０８５
Ｃ１２Ｎ	*15/63 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ	４Ｃ０８７
Ｃ０７Ｋ	*14/165 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/165		４Ｈ０４５
Ｃ１２Ｎ	*15/861 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/861	Ｚ	
Ａ６１Ｋ	*39/215 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/215		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全338頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-546341(P2022-546341)
(86)(22)出願日　令和3年1月30日(2021.1.30)
(85)翻訳文提出日　令和4年9月27日(2022.9.27)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/015946
(87)国際公開番号　WO2021/155323
(87)国際公開日　令和3年8月5日(2021.8.5)
(31)優先権主張番号　62/705,308
(32)優先日　令和2年6月21日(2020.6.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/706,958
(32)優先日　令和2年9月21日(2020.9.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/706,937
最終頁に続く

(71)出願人　308042481
ベス イスラエル ディーコネス メディカル センター インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２２１５ ボストン ブルックリン アベニュー ３３０
(71)出願人　514010601
ヤンセン ファーマシューティカルズ，インコーポレーテッド
アメリカ合衆国 ニュー ジャージー州 ０８５６０，タイタスビル，トレントン－ハーバートン ロード １１２５
(74)代理人　100092783
弁理士　小林 浩
(74)代理人　100095360
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　コロナウイルス感染症を予防および処置するための組成物および方法－ＳＡＲＳ－ＣＯＶ－２ワクチン

(57)【要約】
本発明は、コロナウイルス（例えば、武漢コロナウイルス（２０１９－ｎＣｏＶ；ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２とも呼ばれる））タンパク質またはコロナウイルス（例えば、武漢コロナウイルス（２０１９－ｎＣｏＶ；ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２））タンパク質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およびワクチンならびにそれらの使用に関する。また、本発明は、免疫原性組成物またはワクチンを対象（例えば、ヒト）に投与することにより、コロナウイルス（例えば、武漢コロナウイルス（２０１９－ｎＣｏＶ；ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２））感染症を処置および／または予防する方法を提供する。また、本発明は、保護的な抗コロナウイルス（例えば、武漢コロナウイルス（２０１９－ｎＣｏＶ；ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２））抗体応答（例えば、抗コロナウイルス抗体応答、例えば、抗２０１９－ｎＣｏＶ抗体応答、例えば、抗スパイク抗体応答、例えば、抗スパイク中和抗体応答）を検出および／またはモニターする方法を提供する。本発明は、コロナウイルスＳタンパク質、特にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質をコードする単離された

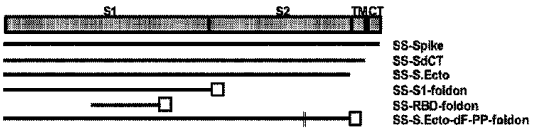


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号２９の完全長アミノ酸配列に対する以下の改変：
ａ．　アミノ酸９８６および９８７における、プロリンへの安定化突然変異；ならびに
ｂ．　フューリン切断部位（配列番号９０）に対する突然変異
を含む２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子。
【請求項２】
配列番号２１１のヌクレオチド配列を含む、請求項１に記載の単離された核酸分子。
【請求項３】
配列番号２０５のアミノ酸配列を含む２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項１または２に記載の単離された核酸分子。
【請求項４】
配列番号５１のアミノ酸配列と少なくとも８５％の配列同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、請求項１に記載の単離された核酸分子。
【請求項５】
配列番号５１のアミノ酸配列と少なくとも９９％の配列同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、請求項１または４に記載の単離された核酸分子。
【請求項６】
配列番号５６のアミノ酸配列と少なくとも８５％の配列同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、請求項１に記載の単離された核酸分子。
【請求項７】
配列番号１４３と少なくとも８５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列、またはその相補配列を含む、請求項４または５に記載の単離された核酸分子。
【請求項８】
配列番号１４８と少なくとも８５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列、またはその相補配列を含む、請求項６に記載の単離された核酸分子。
【請求項９】
配列番号２９の完全長アミノ酸配列に対する以下のさらなる改変：
ｃ．　シグナル配列の欠失
を含む２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質をコードする、請求項１～８のいずれか一項に記載の単離された核酸分子。
【請求項１０】
前記２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質をコードする核酸は、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、好ましくはＣＭＶ前初期プロモーターに作動可能に連結している、請求項１～９のいずれかに記載の単離された核酸分子。
【請求項１１】
前記２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質をコードする核酸は、少なくとも１つのテトラサイクリンオペレーター（ＴｅｔＯ）モチーフを含むサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーターに作動可能に連結している、請求項１～１０のいずれかに記載の単離された核酸分子。
【請求項１２】
前記少なくとも１つのＴｅｔＯモチーフを含むＣＭＶプロモーターは、配列番号２１９のヌクレオチド配列を含む、請求項１１に記載の単離された核酸分子。
【請求項１３】
配列番号２９の完全長アミノ酸配列に対する以下の改変：
ａ．　アミノ酸９８６および９８７における、プロリンへの安定化突然変異；ならびに
ｂ．　フューリン切断部位（配列番号９０）に対する突然変異
を含む、単離された２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質。
【請求項１４】

配列番号２０５のアミノ酸配列を含む、請求項１３に記載の単離された２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質。
【請求項１５】
配列番号５１のアミノ酸配列と少なくとも８５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１３に記載の単離された２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質。
【請求項１６】
配列番号５１のアミノ酸配列と少なくとも９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１３または１５に記載の単離された２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質。
【請求項１７】
配列番号５６のアミノ酸配列と少なくとも８５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１３に記載の単離された２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質。
【請求項１８】
配列番号２９の完全長アミノ酸配列に対する以下のさらなる改変：
ｃ．　シグナル配列の欠失
を含む、請求項１３に記載の単離された２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質。
【請求項１９】
請求項１～１２のいずれか一項に記載の核酸分子の１つまたは複数を含む、単離されたベクター。
【請求項２０】
複製欠損性である、請求項１９に記載のベクター。
【請求項２１】
血清型２６のアデノウイルスである、請求項１９または２０に記載のベクター。
【請求項２２】
請求項１～１２のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項１３～１８のいずれか一項に記載のタンパク質、または請求項１９～２１のいずれか一項に記載のベクターを含む組成物。
【請求項２３】
薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤をさらに含む、請求項２２に記載の組成物。
【請求項２４】
ワクチンとして使用するための、請求項２２または２３に記載の組成物。
【請求項２５】
１８歳以上の成人のコロナウイルス疾患－２０１９（ＣＯＶＩＤ－１９）を予防するための能動免疫化に使用するための、請求項２２～２４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２６】
１８歳以上の個体の、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）により引き起こされるコロナウイルス疾患２０１９（ＣＯＶＩＤ－１９）を予防するための能動免疫化の方法であって、請求項２２～２５のいずれか一項に記載の組成物を対象に投与するステップを含む方法。
【請求項２７】
請求項２２～２５のいずれか一項に記載の組成物を１用量レジメンで投与するステップを含む、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
請求項２２～２５のいずれか一項に記載の組成物を２用量レジメンで投与するステップを含み、前記用量は、約１、２、または３か月間隔で投与される、請求項２６に記載の方法。
【請求項２９】
前記組成物は、１用量当たり５×10^{10}ｖｐの用量で投与される、請求項２６～２８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３０】
１８歳以上の個体の、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）により引き起こされるコロナウイルス疾患２０１９（ＣＯＶＩＤ－１９）を予防するための免疫原性組成物を製造する方法であって、
（ａ）請求項１～１２のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項１３～１８のいずれか一項に記載のタンパク質、請求項１９～２１のいずれか一項に記載のベクター、請求項２２～２５のいずれか一項に記載の組成物の少なくとも１つを、薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤と混合して、前記免疫原性組成物を形成するステップ；および
（ｂ）前記免疫原性組成物を容器に入れるステップ
を含む方法。
【請求項３１】
（ａ）請求項１～１２のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項１３～１８のいずれか一項に記載のタンパク質、請求項１６～２１のいずれか一項に記載のベクター、請求項２２～２５のいずれか一項に記載の組成物の少なくとも１つを含む第１の容器；
（ｂ）その使用説明書；および必要に応じて
（ｃ）薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤を含む第２の容器
を含むキット。
【請求項３２】
１８歳以上の個体の、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）により引き起こされるコロナウイルス疾患２０１９（ＣＯＶＩＤ－１９）を予防するためのＣＯＶＩＤ－１９に対するワクチンを作製するための方法であって、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質またはその断片をコードする核酸を含む血清型２６の組換えヒトアデノウイルスを用意するステップ、宿主細胞の培養物中で前記組換えアデノウイルスを増殖させるステップ、前記組換えアデノウイルスを単離および精製するステップ、ならびに前記組換えアデノウイルスを薬学的に許容される組成物に製剤化するステップを含む方法。
【請求項３３】
ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質またはその断片をコードする核酸を含む血清型２６の組換えヒトアデノウイルスのゲノムを形成する単離された組換え核酸。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
緒言
本発明は、ウイルス学および医学の分野に関する。特に、本発明は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２により誘導される疾患を予防するためのワクチンに関する。
【０００２】
関連出願の相互参照
本出願は、２０２０年１月３１日に出願された米国特許仮出願第６２／９６９，００８号；２０２０年３月２５日に出願された米国特許仮出願第６２／９９４，６３０号；２０２０年４月２３日に出願された米国特許仮出願第６３／０１４，４６７号；２０２０年５月１５日に出願された米国特許仮出願第６３／０２５，７８２号；２０２０年６月１５日に出願された米国特許仮出願第６２／７０５，１８７号；２０２０年６月２１日に出願された米国特許仮出願第６２／７０５，３０８号；２０２０年６月２３日に出願された米国特許仮出願第６３／０４３，０９０号；２０２０年８月１２日に出願された米国特許仮出願第６２／７０６，３６６号；２０２０年８月１４日に出願された米国特許仮出願第６３／０６６，１４７号；２０２０年９月２日に出願された米国特許仮出願第６２／７０６，６７６号；２０２０年９月１８日に出願された米国特許仮出願第６２／７０６，９３７号；２０２０年９月２１日に出願された米国特許仮出願第６２／７０６，９５８号；２０２０年９月２８日に出願された米国特許仮出願第６３／１９８，０８９号；２０２０年１０月９日に出願された米国特許仮出願第６３／１９８，３０６号；２０２０年１１月１２日

に出願された米国特許仮出願第６３／１１２，９００号；２０２０年１１月２８日に出願されたカナダ特許出願第３，１０１，１３１号；２０２０年１２月４日に出願された米国特許仮出願第６３／１２１，４８２号；２０２１年１月５日に出願された米国特許仮出願第６３／１３３，９６９号；２０２１年１月８日に出願された米国特許仮出願第６３／１３５，１８２号；２０２１年１月２６日に出願された米国特許仮出願第６３／１４１，９１３号；２０２１年１月２８日に出願された米国特許仮出願第６３／１４２，９７７号の優先権を主張するものである。各開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０００３】

配列表

本出願は、ＡＳＣＩＩフォーマットで電子的に提出されており、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる配列表を含む。このＡＳＣＩＩコピーは、２０２１年１月２９日に作成され、ＣＲＵ６０４３ＷＯＰＣＴというファイル名でありで、サイズは１．３６ＭＢである。

【０００４】

連邦資金による研究に関する声明

本発明は、ＨＨＳにより授与された合意書ＨＨＳＯ１００２０１７０００１８Ｃに基づく連邦政府の支援によりなされた。連邦政府は、本発明に対してある特定の権利を有する。

【背景技術】

【０００５】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２は、２０１９年後半に中国武漢地域で初めて発見されたコロナウイルスである。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２は、いずれもコウモリが起源であるＭＥＲＳ－ＣｏＶおよびＳＡＲＳ－ＣｏＶと同様に、ベーターコロナウイルスである。現在、米国、中国、および他国の数人の患者から入手可能ないくつかの配列が存在し、このウイルスが動物病原体保有宿主からの単一の最近の出現である可能性が高いことを示唆している。このウイルスにより引き起こされるこの疾患の名称は、コロナウイルス疾患２０１９、略してＣＯＶＩＤ－１９である。ＣＯＶＩＤ－１９の症状は、確認されたＣＯＶＩＤ－１９症例では、軽症症状から重症疾病および死亡にまで及ぶ。

【０００６】

上記に示されているように、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２は、コウモリコロナウイルスと強い遺伝的類似性を有しており、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２はコウモリコロナウイルスを起源とする可能性が高いが、センザンコウなどの中間病原体保有宿主が関与していると考えられている。分類学的観点から、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２は、重症急性呼吸器症候群（ＳＡＲＳ）関連コロナウイルス種の株であると分類されている。

【０００７】

コロナウイルスは、エンベロープＲＮＡウイルスである。主要な表面タンパク質は、宿主細胞受容体との結合ならびにウイルスと宿主細胞膜との融合を媒介する大型三量体スパイク糖タンパク質（Ｓ）である。Ｓタンパク質は、それぞれ受容体結合および膜融合を担うＮ末端Ｓ１サブユニットおよびＣ末端Ｓ２サブユニットで構成されている。アルファコロナウイルス、ベータコロナウイルス、およびデルタコロナウイルスのＣｏＶ三量体Ｓ構造の最近のｃｒｙｏ－ＥＭ再構成は、Ｓ１サブユニットが、２つの異なるドメイン：Ｎ末端ドメイン（Ｓ１　ＮＴＤ）および受容体結合ドメイン（Ｓ１　ＲＢＤ）を含むことを明らかにした。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２は、そのＳ１　ＲＢＤを駆使して、ヒトアンジオテンシン変換酵素２（ＡＣＥ２）に結合する。

【０００８】

ＣＯＶＩＤ－１９パンデミックの急速な拡大により、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ワクチンの開発は、世界的な健康上の優先事項になっている。この新型ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスは、２０１９年後半にヒトで初めて観察されて以来、８００万人を超える人々が感染し、ＣＯＶＩＤ－１９の結果として数十万人が死亡している。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２および

より一般的にはコロナウイルスには効果的な処置がなく、満たされていない大きな医療ニーズに結び付いている。加えて、現在、コロナウイルス誘導性疾患（ＣＯＶＩＤ－１９）を予防するために利用可能なワクチンは存在しない。現在、疾病を予防するための最良の方法は、このウイルスへの曝露を回避することである。ＣＯＶＩＤ－１９などの新興感染性疾患は公衆衛生上の大きな脅威であるため、コロナウイルス誘導性呼吸器疾患を予防するために使用することができる新規ワクチンが緊急に必要とされている。

【０００９】

武漢コロナウイルス（２０１９－ｎＣｏＶ；ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２とも呼ばれる）は、中国における最近の未曾有の流行の原因とされるコロナウイルスである。２０１９－ｎＣｏＶは、呼吸器症状および発熱を引き起こし、死に至る場合があることが知られている。

【００１０】

世界保健機関は、２０２０年１月３０日に２０１９－ｎＣｏＶ大流行を国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態と宣言し、１６か国で１１，０００例を超える症例を確認した。安全で有効な２０１９－ｎＣｏＶワクチンの迅速な開発は世界的な健康上の優先事項であるが、２０１９－ｎＣｏＶの免疫学的特徴および免疫保護の機序については現在ほとんど知られていない。

【００１１】

したがって、２０１９－ｎＣｏＶ療法の分野には、満たされていないニーズが存在する。

【発明の概要】

【００１２】

本発明に結び付いた研究では、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対する保護免疫応答を誘導するための免疫原として有用であることが実証されたある特定の安定化ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２Ｓタンパク質が構築された。

【００１３】

本発明は、配列番号２９の完全長アミノ酸配列に対する以下の改変：

ａ．　アミノ酸９８６および９８７における、プロリンへの安定化突然変異；ならびに

ｂ．　フューリン切断部位（配列番号９０）に対する突然変異

を含む２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質（本明細書ではＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質とも呼ばれる）をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供する。

【００１４】

一部の実施形態では、こうした改変は、配列番号２９の配列に対してなされた唯一の改変である。他の実施形態では、単離された核酸分子は、配列番号２９の完全長アミノ酸配列に対する以下のさらなる改変：

ｃ．　シグナル配列の欠失

を含む２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質をコードする。

【００１５】

一部の実施形態では、２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質をコードする核酸は、サイトメガロウイルス（配列番号２１９）プロモーター、好ましくはＣＭＶ前初期プロモーターに作動可能に連結している。一部の実施形態では、２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質をコードする核酸は、少なくとも１つのテトラサイクリンオペレーター（ＴｅｔＯ）モチーフを含むサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーターに作動可能に連結している。特定の実施形態では、少なくとも１つのＴｅｔＯモチーフを含むＣＭＶプロモーターは、配列番号２１９のヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、ＣＭＶプロモーターは、配列番号２１９のヌクレオチド配列からなる。こうした核酸は、典型的には、ベクターの一部を形成する。

【００１６】

したがって、一態様では、本発明は、安定化コロナウイルスＳタンパク質、特にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質をコードする単離されたおよび／または組換え核酸であっ

て、配列番号２１１～２１８またはそれらの断片からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸に関する。

【００１７】

好ましい実施形態では、本発明は、安定化コロナウイルスＳタンパク質、特にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質をコードする単離されたおよび／または組換え核酸であって、配列番号２１１のヌクレオチドまたはその断片を含む核酸に関する。

【００１８】

本発明は、配列番号２９の完全長アミノ酸配列に対する以下の改変：

ａ．　アミノ酸９８６および９８７における、プロリンへの安定化突然変異；ならびに

ｂ．　フューリン切断部位（配列番号９０）に対する突然変異

を含む単離された２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質（本明細書ではＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質とも呼ばれる）を提供する。

【００１９】

一部の実施形態では、こうした改変は、配列番号２９の配列に対してなされた唯一の改変である。他の実施形態では、単離された２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質は、配列番号２９の完全長アミノ酸配列に対する以下のさらなる改変：

ｃ．　シグナル配列の欠失

を含む。

【００２０】

別の態様では、本発明は、配列番号２０５～２１０またはそれらの断片からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む単離されたおよび／または組換えコロナウイルスＳタンパク質、ならびにそのようなコロナウイルスＳタンパク質またはそれらの断片をコードする核酸に関する。

【００２１】

好ましい実施形態では、本発明は、配列番号２０５のアミノ酸配列またはその断片を含む単離されたおよび／または組換えコロナウイルスＳタンパク質、ならびにそのようなコロナウイルスＳタンパク質またはそれらの断片をコードする核酸に関する。

【００２２】

さらに別の態様では、本発明は、そのような核酸を含むベクターに関する。ある特定の実施形態では、ベクターは、血清型２６の組換えヒトアデノウイルスである。

【００２３】

別の態様では、本発明は、そのような核酸、タンパク質、および／またはベクターを含む組成物およびワクチンに関する。

【００２４】

別の態様では、本発明は、ＣＯＶＩＤ－１９に対して対象にワクチン接種するための方法であって、本発明によるワクチンまたは組成物を対象に投与するステップを含む方法に関する。

【００２５】

別の態様では、本発明は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質またはその断片をコードする核酸を含む血清型２６の組換えヒトアデノウイルスを含む単離された宿主細胞に関する。

【００２６】

別の態様では、本発明は、ＣＯＶＩＤ－１９に対するワクチンを作製するための方法であって、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質またはその断片をコードする核酸を含む血清型２６の組換えヒトアデノウイルスを用意するステップ、組換えアデノウイルスを宿主細胞の培養物中で増殖させるステップ、組換えアデノウイルスを単離および精製するステップ、ならびに組換えアデノウイルスを薬学的に許容される組成物に製剤化するステップを含む方法に関する。この態様の組換えヒトアデノウイルスは、本明細書に記載のアデノウイルスのいずれであってもよい。

【００２７】

別の態様では、本発明は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質またはその断片をコードする核酸を含む血清型２６の組換えヒトアデノウイルスのゲノムを形成する単離された組換え核酸に関する。また、アデノウイルスは、上記の実施形態に記載のアデノウイルスのいずれであってもよい。

【００２８】

また、本発明は、それを必要とする対象における分子的に確認された中等症～重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９の予防に使用するための組成物であって、予防は、本明細書に記載の本発明の組成物または免疫原性組成物を対象に投与することを含み、組成物は、１用量投与レジメン（つまり、単一容量）にて１用量当たり５×１０^{10}ｖｐの用量で投与される、組成物に関する。

【００２９】

本発明は、ＤＮＡまたはＲＮＡワクチン、抗体、および免疫原性組成物を生成するための最適化されたおよび／または天然に存在しないコロナウイルス（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ）核酸分子およびポリペプチド、ならびに対象（例えば、哺乳動物対象（例えば、ヒト））のコロナウイルス（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ）感染症を予防、低減、および／または処置する方法におけるそれらの使用を特徴とする。

【００３０】

本発明の一態様は、配列番号１～８４のいずれか１つのアミノ酸配列と、少なくとも８５％の配列同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を特徴とする。一部の実施形態では、ａ）ポリペプチドは、対象において免疫応答を誘発することが可能であるか、またはｂ）ポリペプチドは、配列番号１～８４のいずれか１つと、またはそのポリペプチド配列と、少なくとも８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％の配列同一性を有する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号５６のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号５１のアミノ酸配列を有する。

【００３１】

別の態様は、配列番号９３～１８１、１９０～１９５、および１９９～２０４のいずれか１つのすべてまたは部分と少なくとも８５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列またはその相補配列を含む単離された核酸分子を特徴とする。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号９３～１８１、１９０～１９５、および１９９～２０４のいずれか１つと、またはそのヌクレオチド配列と、少なくとも８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％の配列同一性を有する。一部の実施形態では、核酸分子またはその部分は、対象において免疫応答を誘発することが可能である。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号１９５のヌクレオチド配列を有する。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号１４３のヌクレオチド配列を有する。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号２０４のヌクレオチド配列を有する。一部の実施形態では、核酸分子は、配列番号２０４のヌクレオチド１９～３８３７のヌクレオチド配列を有する。

【００３２】

別の態様は、配列番号１～８４のいずれか１つのすべてまたは部分と、少なくとも８５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを特徴とする。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号１～８４のいずれか１つと、またはそのアミノ酸配列と、少なくとも８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％の配列同一性を有する。一部の実施形態では、ポリペプチドまたはその部分は、対象において免疫応答を誘発することが可能である。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号２８のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号５１のアミノ酸配列を有する。

【００３３】

別の態様は、上記の核酸分子の１つまたは複数を含む単離されたベクターを特徴とする。一部の実施形態では、ベクターは複製欠損性である（例えば、Ｅ１領域、Ｅ３領域、お

よび／またはＥ４領域を欠如する）。一部の実施形態では、ベクターは、哺乳動物ベクター、細菌ベクター、またはウイルスベクターである。一部の実施形態では、ベクターは発現ベクターである。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、パルボウイルス、コロナウイルス、マイナス鎖ＲＮＡウイルス、オルソミクソウイルス、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、プラス鎖ＲＮＡウイルス、ピコルナウイルス、アルファウイルス、二本鎖ＤＮＡウイルス、ヘルペスウイルス、エプスタイン－バーウイルス、サイトメガロウイルス、鶏痘、およびカナリア痘からなる群から選択されるウイルスである。一部の実施形態では、ベクターはアデノウイルスである。一部の実施形態では、アデノウイルスは、Ａｄ２、Ａｄ５、Ａｄ１１、Ａｄ１２、Ａｄ２４、Ａｄ２６、Ａｄ３４、Ａｄ３５、Ａｄ４０、Ａｄ４８、Ａｄ４９、Ａｄ５０、Ａｄ５２、Ａｄ５９、およびＰａｎ９からなる群から選択される。一部の実施形態では、Ａｄ５２はアカゲザルＡｄ５２であるか、またはＡｄ５９はアカゲザルＡｄ５９である。一部の実施形態では、アデノウイルスはＡｄ２６である。他の実施形態では、アデノウイルスは、配列番号２０４のヌクレオチド１９～３８３７または配列番号２０４のヌクレオチドのすべてを有する核酸分子を含むＡｄ２６ベクターである。別の実施形態では、アデノウイルスは、配列番号５１のポリペプチドと、少なくとも８５％またはそれよりも高い（例えば、９０％、９５％、９９％、または１００％）配列同一性を有するポリペプチドをコードする核酸分子を含むＡｄ２６ベクターである。

【００３４】

別の態様は、上述のポリペプチドのいずれかに特異的に結合する単離された抗体を特徴とする。一部の実施形態では、抗体は、哺乳動物を、核酸、ポリペプチド、またはベクターで免疫化することにより生成される。一部の実施形態では、哺乳動物は、ヒト、ウシ、ヤギ、マウス、またはウサギである。一部の実施形態では、抗体はヒト化されている。一部の実施形態では、抗体はＩｇＧである。一部の実施形態では、抗体は、ｂｉｓ－Ｆａｂ、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、ダイアボディ、線状抗体、またはｓｃＦＶである。

【００３５】

別の態様は、抗２０１９－武漢コロナウイルス（２０１９－ｎＣｏＶ）抗体を産生する方法であって、対象に、対象への投与後に中和抗２０１９－ｎＣｏＶ抗血清の産生を誘発するのに十分な量の核酸分子、ポリペプチド、および／またはベクターを投与するステップを含む方法を特徴とする。

【００３６】

別の態様は、上述の方法のいずれかにより産生される単離された抗２０１９－ｎＣｏＶ抗体を特徴とする。一部の実施形態では、抗体は、配列番号１～８４のいずれか１つ内にあるエピトープに結合する。

【００３７】

別の態様は、核酸分子、ポリペプチド、ベクター、または抗体を含む組成物を特徴とする。一部の実施形態では、組成物は、薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤をさらに含む。一部の実施形態では、組成物は、アジュバントまたは免疫刺激剤をさらに含む。

【００３８】

別の態様は、核酸分子、ポリペプチド、ベクター、または抗体を含む免疫原性組成物を特徴とする。一部の実施形態では、免疫原性組成物はワクチンである。一部の実施形態では、免疫原性組成物は、それを必要とする対象におけるコロナウイルス感染症（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ感染症）を処置するかまたはそのリスクを低減することが可能である。一部の実施形態では、免疫原性組成物は、対象への投与後に中和抗２０１９－ｎＣｏＶ抗血清の産生を誘発する。一部の実施形態では、対象は哺乳動物である。一部の実施形態では、哺乳動物はヒトである。一部の実施形態では、ヒトは基礎疾患を有する。一部の実施形態では、基礎疾患は、高血圧、糖尿病、または心血管疾患である。

【００３９】

別の態様は、コロナウイルス感染症に対する対象の感受性を特定、診断、および／または予測する方法であって、対象が、対象に由来する試料中に保護レベルの抗コロナウイルス抗体（抗スパイク抗体など）を有するか否かを決定するステップを含み、好ましくは、保護レベルは、（ｉ）偽ウイルス中和アッセイを使用して決定して少なくとも約７０の力価であるかもしくはそれを上回るレベル；（ｉｉ）生ウイルス中和アッセイを使用して決定して少なくとも約２５の力価であるかもしくはそれを上回るレベル；または（ｉｉｉ）偽ウイルス中和アッセイもしくは生ウイルス中和アッセイにより決定して、回復期ヒトのコホートにおける抗コロナウイルス抗体の中央値レベルの少なくとも８０％であるレベルである、方法を特徴とする。一部の実施形態では、抗コロナウイルス抗体の保護レベルは、重症疾患の発症を予防または低減するのに十分なレベルである。一部の実施形態では、本方法は、有効量の組成物または免疫原性組成物を、保護レベル未満の抗コロナウイルス抗体を有する対象に投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、本方法は、抗コロナウイルス抗体（例えば、抗スパイク抗体）のサブクラスおよび／またはエフェクター機能を特定するステップをさらに含む。一部の実施形態では、サブクラスは、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＦｃｇＲ２Ａである。一部の実施形態では、エフェクター機能は、抗体依存性好中球ファゴサイトーシス（ＡＤＮＰ）、抗体依存性補体沈着（ＡＤＣＤ）、抗体依存性単球細胞ファゴサイトーシス（ＡＤＣＰ）、または抗体依存性ＮＫ細胞活性化である。一部の実施形態では、試料は、対象に由来する体液であり、好ましくは、体液は血液である。一部の実施形態では、コロナウイルスは２０１９－ｎＣｏＶである。

【００４０】

別の態様は、それを必要とする対象におけるコロナウイルス感染症を処置するかまたはそのリスクを低減する方法であって、治療有効量の組成物または免疫原性組成物を対象に投与するステップを含む方法を特徴とする。一部の実施形態では、本方法は、対象の抗コロナウイルス抗体（例えば、抗スパイク抗体）レベルを測定するステップをさらに含む。一部の実施形態では、対象の抗コロナウイルス抗体レベルは、投与前および／または投与後に測定される。一部の実施形態では、対象の抗コロナウイルス抗体レベルは、投与後の約１、２、３、４、５、または６日間、１、２、３、４、５、６、または７週間、２、３、４、５、または６か月間、１、２、３、４、または５年間にわたって１回または複数回測定される。一部の実施形態では、対象の抗コロナウイルス抗体レベルは保護レベルを下回っており、本方法は、対象に、組成物もしくは免疫原性組成物を再投与するステップ、または異なる抗コロナウイルス組成物を投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、保護レベルは、コロナウイルス媒介性疾患の症状または継続期間を低減するのに十分なレベルである。一部の実施形態では、保護レベルは、重症疾患の発症を予防または低減するのに十分なレベルである（例えば、体重減少（対象の感染前初期体重と比べて少なくとも約５％の（例えば、少なくとも約７．５％、少なくとも約１０％、少なくとも約１２．５％、少なくとも約１５％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、またはそれよりも大きな）体重低減）、肺炎および／もしくは呼吸不全の発症、ならびに／または死亡リスクの増加により特徴付けることができる）。一部の実施形態では、保護レベルは、（ｉ）偽ウイルス中和アッセイを使用して決定して、少なくとも約７０の力価であるかもしくはそれを上回るレベル；（ｉｉ）生ウイルス中和アッセイを使用して決定して、少なくとも約２５の力価であるかもしくはそれを上回るレベル；または（ｉｉｉ）偽ウイルス中和アッセイもしくは生ウイルス中和アッセイにより決定して、回復期ヒトのコホートにおける抗コロナウイルス抗体の中央値レベルの少なくとも８０％であるレベルである。一部の実施形態では、コロナウイルスは２０１９－ｎＣｏＶである。一部の実施形態では、本方法は、対象に由来する試料中のコロナウイルス（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ）ウイルス量を測定するステップをさらに含む。一部の実施形態では、試料は、気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬ）または鼻スワブ（ＮＳ）である。一部の実施形態では、試料は、対象に由来する体液（例えば血液、例えば全血または血漿）である。一部の実施形態では、試料は、対象に由来する組織試料（例えば、気道組織試料）である。一部の実施形態では、ウイル

ス量は、検出可能な核酸（例えば、サブゲノムｍＲＮＡ）レベルまたは検出可能なタンパク質（例えば、ヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ））レベルである。一部の実施形態では、検出可能な核酸（例えば、サブゲノムｍＲＮＡ）は、ＲＮＡ－ｓｅｑ、ＲＴ－ｑＰＣＲ、ｑＰＣＲ、マルチプレックスｑＰＣＲもしくはＲＴ－ｑＰＣＲ、ＬＡＭＰ、マイクロアレイ分析、またはハイブリダイゼーション（例えば、ＩＳＨ（例えば、ＦＩＳＨ））により決定される。一部の実施形態では、検出可能なタンパク質（例えば、ヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ））は、イムノアッセイ（例えば、免疫組織化学（ＩＨＣ）アッセイまたはラテラルフローイムノアッセイ）により決定される。一部の実施形態では、検出可能なウイルス量は、対象が疾患（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ媒介性疾患、例えば、ＣＯＶＩＤ－１９、例えば、重症ＣＯＶＩＤ－１９疾患）に感受性であることを示す。一部の実施形態では、少なくとも約３．５　$\log_{10}$ ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬよりも大きなウイルス量、一部の実施形態では、ＢＡＬにおける３．８５　$\log_{10}$ ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬまたはＮＳにおける３．７８　$\log_{10}$ ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬよりも大きなウイルス量は、対象が疾患（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ媒介性疾患、例えば、ＣＯＶＩＤ－１９、例えば、重症ＣＯＶＩＤ－１９疾患）に感受性であることを示す。一部の実施形態では、ＢＡＬにおける３．８５　$\log_{10}$ ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬまたはＮＳにおける３．７８　$\log_{10}$ ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬよりも大きなウイルス量は、対象が重症ＣＯＶＩＤ－１９疾患に感受性であることを示す。一部の実施形態では、組織の約２．０　$\log_{10}$ ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬよりも大きなウイルス量は、対象が重症ＣＯＶＩＤ－１９疾患に感受性であることを示す。一部の実施形態では、肺組織における約８．０　$\log_{10}$ ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ、鼻孔組織における約７．０　$\log_{10}$ ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ、気管組織における約６．０　$\log_{10}$ ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ、心臓組織における約５．５　$\log_{10}$ ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ、またはＧＩ、脾臓、肝臓、腎臓、もしくは脳組織における約２．０　$\log_{10}$ ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇよりも大きなウイルス量は、対象が重症ＣＯＶＩＤ－１９疾患に感受性であることを示す。一部の実施形態では、ＩＳＨによる約３％ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ｖＲＮＡ染色よりも大きなウイルス量は、対象が疾患に感受性であることを示す。一部の実施形態では、ＩＳＨによる約５％ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ｖＲＮＡ染色よりも大きなウイルス量は、対象が重症ＣＯＶＩＤ－１９疾患に感受性であることを示す。一部の実施形態では、コロナウイルス（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ）ウイルス量は、感染後の約１、２、３、４、５、もしくは６日間、または１、２、３、４、５、６、もしくは７週間にわたって１回または複数回測定される。一部の実施形態では、疾患（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ媒介性疾患、例えば、ＣＯＶＩＤ－１９、例えば、重症ＣＯＶＩＤ－１９疾患）に感受性であると決定された対象に、本開示の組成物または免疫原性組成物が単独でまたは追加の治療剤と組み合わせて投与される。

【００４１】

別の態様は、２０１９－ｎＣｏＶに感染した対象のコロナウイルス媒介性活性（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ媒介性活性）を低減させるための方法であって、治療有効量の組成物または免疫原性組成物を対象に投与するステップを含む方法を特徴とする。一部の実施形態では、治療有効量は、ＥＬＩＳＡアッセイにより測定して、対象において２よりも大きなｌｏｇ血清抗スパイク抗体価を生み出すのに十分である。一部の実施形態では、治療有効量は、１５μｇ～３００μｇの組成物または免疫原性組成物である。一部の実施形態では、活性は、ウイルス力価、ウイルス拡散、感染、または細胞融合である。一部の実施形態では、ウイルス力価は、組成物または免疫原性組成物の投与後に減少する。一部の実施形態では、ウイルス力価は２５％またはそれよりも大きく減少する。一部の実施形態では、ウイルス力価は５０％またはそれよりも大きく減少する。一部の実施形態では、ウイルス力価は７５％またはそれよりも大きく減少する。一部の実施形態では、コロナウイルスは、投与後、検出不能である。一部の実施形態では、投与は、コロナウイルスに曝露される前に生じる。一部の実施形態では、投与は、コロナウイルスに曝露される少なくとも１時間前に生じる。一部の実施形態では、投与は、コロナウイルスに曝露される少なくと

も１週間、１か月、または１年前に生じる。一部の実施形態では、投与は、コロナウイルスに曝露された後に生じる。一部の実施形態では、投与は、コロナウイルスに曝露された少なくとも１５分後に生じる。一部の実施形態では、投与は、コロナウイルスに曝露された少なくとも１時間、１日、１週間後に生じる。一部の実施形態では、対象に、少なくとも１用量の核酸分子、ポリペプチド、ベクター、組成物、免疫原性組成物、および抗体が投与される。一部の実施形態では、対象に、少なくとも２用量が投与される。一部の実施形態では、核酸分子、ポリペプチド、ベクター、組成物、または免疫原性組成物は、プライム、ブースト、またはプライムブーストとして対象に投与される。一部の実施形態では、核酸分子、ポリペプチド、ベクター、組成物、免疫原性組成物、または抗体は、筋肉内に、静脈内に、皮内に、経皮的に、動脈内に、腹腔内に、病変内に、頭蓋内に、関節内に、前立腺内に、胸腔内に、気管内に、鼻腔内に、硝子体内に、膣内に、直腸内に、局部的に、腫瘍内に、腹腔に、皮下に、結膜下に、膀胱内に、粘膜に、心膜内に、臍内に、眼内に、経口的に、局部的に、局所的に、吸入により、注射により、注入により、持続注入により、標的細胞を直接浸す局所灌流により、カテーテルにより、洗浄により、経管栄養により、クリーム剤で、または脂質組成物で投与される。一部の実施形態では、核酸分子、ポリペプチド、ベクター、組成物、免疫原性組成物、または抗体は、筋肉内に投与される。一部の実施形態では、対象は哺乳動物である。一部の実施形態では、哺乳動物はヒトである。一部の実施形態では、ヒトは基礎疾患を有する。一部の実施形態では、基礎疾患は、高血圧、糖尿病、または心血管疾患である。一部の実施形態では、本方法は、対象の免疫応答を促進する。一部の実施形態では、免疫応答は体液性免疫応答である。一部の実施形態では、体液性免疫応答は、ＩｇＧ応答である。

【００４２】

別の態様は、それを必要とする対象における２０１９－ｎＣｏＶ感染症などのコロナウイルス感染症の処置またはそのリスクの低減に使用するための組成物であって、治療有効量の組成物または免疫原性組成物を含む組成物を特徴とする。

【００４３】

別の態様は、２０１９－ｎＣｏＶに感染した対象のコロナウイルス媒介性活性（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ媒介性活性）の低減に使用するための組成物であって、治療有効量の組成物または免疫原性組成物を含む組成物を特徴とする。

【００４４】

別の態様は、それを必要とする対象におけるコロナウイルス（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ）感染症の処置またはそのリスクの低減に使用するための免疫原性組成物を製造する方法であって、（ａ）核酸分子、ポリペプチド、ベクター、組成物、および抗体の少なくとも１つを、薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤と混合して、免疫原性組成物を形成するステップ；ならびに（ｂ）免疫原性組成物を容器に入れるステップを含む方法を特徴とする。

【００４５】

別の態様は、（ａ）核酸分子、ポリペプチド、ベクター、組成物、免疫原性組成物、および抗体の少なくとも１つを含む第１の容器；（ｂ）その使用説明書；ならびに必要に応じて（ｃ）薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤を含む第２の容器を含むキットを特徴とする。一部の実施形態では、第１の容器は、薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤をさらに含む。キットは、必要に応じて、アジュバントおよび／または免疫刺激剤を含む。

【００４６】

別の態様は、対象に由来する試料（例えば、血液試料）中の抗コロナウイルス抗体（抗スパイク抗体など）の存在を決定するための１つまたは複数の試薬、ならびにコロナウイルス感染症に対する対象の感受性を特定、診断、および／または予測するための使用説明書を含むキットを特徴とする。一部の実施形態では、キットは、抗コロナウイルス抗体のサブクラスおよび／またはエフェクター機能を特定するための試薬をさらに含む。一部の実施形態では、キットは、比較のための標準物質または試料をさらに含む。

【００４７】
添付の図面は、本発明の実施形態およびそのインプリメンテーションのさらなる理解を例示するために含まれる。前述の要約、加えて以下の発明の詳細な説明は、添付の図面と共に読めばよりよく理解されるであろう。本発明は、図面に示される正確な実施形態に限定されないことが理解されるものとする。
【００４８】
特許または出願ファイルは、カラーで作成された少なくとも１つの図面を含む。カラー図面を含むこの特許または公開特許公報のコピーは、要請と必要料金の支払いに応じて特許庁によって提供される。
【図面の簡単な説明】
【００４９】
【図１】スパイクタンパク質免疫原を示す線図である。２０１９－ｎＣｏＶスパイク（配列番号１）の注釈付きドメインは、Ｓ１（配列番号４）、Ｓ２（配列番号１のアミノ酸６６５～１１９１）、ＴＭ（配列番号８６）、およびＣＴ（配列番号８５）ドメインを含む。全長スパイク（配列番号１）、ＳｄＣＴ（配列番号２）、Ｓ．Ｅｃｔｏ（配列番号３）、Ｓ１－フォールドン（配列番号９）、ＲＢＤ－フォールドン（配列番号１０）、およびＳ．Ｅｃｔｏ－ＰＰ－フォールドン（配列番号２２）タンパク質免疫原が標識される。白色のボックスは、フォールドンドメインを示し、Ｓ．Ｅｃｔｏ－ＰＰ－フォールドンにおける二重の交差する線は、２つの安定化突然変異（配列番号１のアミノ酸Ｋ９６９およびＶ９７０に対応するプロリン置換）のおよその位置を示す。
【図２】ポリクローナル抗ＳＡＲＳ抗血清による組換え２０１９－ｎＣｏＶタンパク質の認識を示すウエスタンブロットである。ＳＳ－スパイク（レーン１）、ＳＳ－ＳｄＣＴ（レーン２）、ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ（レーン３）、およびＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン（レーン４）をコードするＤＮＡでトランスフェクトされた細胞からの細胞溶解産物（左のパネル）および上清（右のパネル）を、ポリクローナル抗ＳＡＲＳ抗血清を使用してプロービングした。各ブロットの左側の番号付けされた黒線は、ｋＤａでのおよその分子量を示し、各ブロットの上の数字は、レーン番号を示す。
【図３】２０１９－ｎＣｏＶがワクチン接種されたマウスで産生された抗体による全長スパイクの認識を示すグラフである。血清を、ＳＳ－スパイク（レーン１）、ＳＳ－ＳｄＣＴ（レーン２）、ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ（レーン３）、ＳＳ－Ｓ１－フォールドン（レーン４）、ＳＳ－ＲＢＤ－フォールドン（レーン５）、およびＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン（レーン６）をコードするＤＮＡでのワクチン接種から４週後のマウスから収集し、全長スパイク（配列番号１）を用いたＥＬＩＳＡで使用した。灰色のバーは、平均ＥＬＩＳＡ力価を表す。
【図４】２０１９－ｎＣｏＶがワクチン接種されたマウスで産生された抗体によるＳ．ｄＴＭ．ＰＰの認識を示すグラフである。血清を、ＳＳ－スパイク（レーン１）、ＳＳ－ＳｄＣＴ（レーン２）、ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ（レーン３）、ＳＳ－Ｓ１－フォールドン（レーン４）、ＳＳ－ＲＢＤ－フォールドン（レーン５）、およびＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン（レーン６）をコードするＤＮＡでのワクチン接種から４週後のマウスから収集し、全長エクトドメインＳ．Ｅｃｔｏ－ＰＰ（配列番号１９）を用いたＥＬＩＳＡで使用した。灰色のバーは、平均ＥＬＩＳＡ力価を表す。
【図５】２０１９－ｎＣｏＶがワクチン接種されたマウスで産生された抗体の活性の中和を示すグラフである。血清を、ＳＳ－スパイク（レーン１）、ＳＳ－ＳｄＣＴ（レーン２）、ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ（レーン３）、ＳＳ－Ｓ１－フォールドン（レーン４）、ＳＳ－ＲＢＤ－フォールドン（レーン５）、およびＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン（レーン６）をコードするＤＮＡでのワクチン接種から４週後のマウスから収集し、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける２０１９－ｎＣｏＶスパイク偽ウイルス中和アッセイで使用した。灰色のバーは、平均ＩＣ５０力価を表す。
【図６－１】ワクチン接種されたアカゲザルにおける体液性免疫応答を示すグラフである。体液性免疫応答を、（図６Ａ）結合抗体ＥＬＩＳＡ、（図６Ｂ）偽ウイルス中和アッセ

イ、および（図６Ｃ）生ウイルス中和アッセイによる免疫化の後に評価した。（図６Ｄ）ワクチン接種されたマカク（すべての動物およびＳＳ－スパイク／ＳＳ－ＳｄＣＴ群）、９匹の回復期マカクのコホート、および２０１９－ｎＣｏＶ感染から回復したボストンからの２７人の回復期ヒトのコホートにおける偽ウイルス中和力価の比較。（図６Ｅ）ＳおよびＲＢＤ特異的抗体依存性好中球ファゴサイトーシス（ＡＤＮＰ）、抗体依存性補体沈着（ＡＤＣＤ）、抗体依存性単球細胞ファゴサイトーシス（ＡＤＣＰ）、および抗体依存性ＮＫ細胞活性化（ＩＦＮ－γ分泌、ＣＤ１０７ａ脱顆粒、およびＭＩＰ－１β発現）が示される。レーダープロットは、ワクチン群にわたる抗体特徴の分布を示す。くさびの大きさと色の強度は、対応する群の特徴の中央値を示す（青色は抗体機能を描写し、赤色は抗体のアイソタイプ／サブクラス／ＦｃγＲ結合を描写する）。主成分分析（ＰＣＡ）プロットは、群にわたる多変量の抗体プロファイルを示す。各ドットは動物を表し、ドットの色は群を意味し、楕円は、多変量の正常分布を仮定した７０％の信頼水準としての群の分布を示す。赤色のバーは、中央値の応答を反映する。点線は、アッセイの検出限界を反映する。

【図６－２】図６－１と同じ。

【図６－３】図６－１と同じ。

【図６－４】図６－１と同じ。

【図６－５】図６－１と同じ。

【図６－６】図６－１と同じ。

【図６－７】図６－１と同じ。

【図６－８】図６－１と同じ。

【図７】ワクチン接種されたアカゲザルにおける細胞性免疫応答を示すグラフである。プールしたＳペプチドへの応答における（図７Ａ）ＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイおよび（図７Ｂ）多パラメーター細胞内サイトカイン染色アッセイによる免疫化の後に、細胞性免疫応答を評価した。赤色のバーは、平均応答を反映する。

【図８－１】２０１９－ｎＣｏＶで負荷されたアカゲザルにおけるウイルス量を示すグラフである。アカゲザルを、１．２×１０^{12}ＶＰ（１．１×１０^{4}ＰＦＵ）の２０１９－ｎＣｏＶで、鼻腔内および気管内経路によって負荷した。（図８Ａ）Log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬまたはコピー／スワブ（５０コピー／ｍＬが限界）を、負荷後の複数のタイムポイントで、シャム対照における気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬ）および鼻スワブ（ＮＳ）で評価した。ワクチン接種された動物における（図８Ｂ）ＢＡＬにおけるLog_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬおよび（図８Ｃ）ＮＳにおけるlog_{10}のｓｇｍＲＮＡコピー／スワブ。（図８Ｄ）負荷後のＢＡＬおよびＮＳにおけるピークウイルス量。赤色の線は、中央値のウイルス量を反映する。Ｐ値は、両側マン－ホイットニー検定を示す。

【図８－２】図８－１と同じ。

【図８－３】図８－１と同じ。

【図８－４】図８－１と同じ。

【図９－１】免疫と保護の相関を示すグラフである。負荷前のＢＡＬにおけるlogピークｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬ、または負荷後の鼻スワブにおけるlogピークｓｇｍＲＮＡコピー／スワブでの（図９Ａ）偽ウイルスＮＡｂ力価および（図９Ｂ）生ＮＡｂ力価の相関。赤色の線は、これらの変数間の最良適合関係を反映する。ＰおよびＲ値は、両側のスピアマンの順位相関検定を反映する。（図９Ｃ）ヒートマップ（上のパネル）は、抗体特徴間のスピアマンおよびピアソンの相関ならびにＢＡＬにおけるlogピークｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬ（＊ｑ＜０．０５、＊＊ｑ＜０．０１、＊＊＊ｑ＜０．００１、ｑ－値は多重検定のためのベンジャミニ－ホッホベルグの補正により得られた）を示す。棒グラフ（左下のパネル）は、部分最小二乗回帰（ＰＬＳＲ）およびランダムフォレスト（ＲＦ）回帰のための再帰的な特徴の消去によって定義される最も予測される組合せまたは個々の抗体特徴のピアソン相関の順位を示す。相関ヒートマップ（右下のパネル）は、すべての動物にわたる特徴間のペアワイズピアソン相関を表す。

【図９－２】図９－１と同じ。

【図９－３】図９－１と同じ。
【図９－４】図９－１と同じ。
【図１０】ワクチン接種されたマカクにおける偽ウイルスと生ウイルスＮＡｂアッセイの相関を示すグラフである。赤色の線は、これらの変数間の最良適合関係を反映する。ＰおよびＲ値は、両側のスピアマンの順位相関検定を反映する。
【図１１】ＢＡＬおよび鼻スワブにおけるシャム対照における２０１９－ｎＣｏＶ負荷後のウイルスＲＮＡを示すグラフである。赤色の線は、中央値のウイルス量を反映する。
【図１２】ＢＡＬにおけるワクチン接種された動物における２０１９－ｎＣｏＶ負荷後のウイルスＲＮＡを示すグラフである。赤色の線は、中央値のウイルス量を反映する。
【図１３】鼻スワブにおけるワクチン接種された動物における２０１９－ｎＣｏＶ負荷後のウイルスＲＮＡを示すグラフである。赤色の線は、中央値のウイルス量を反映する。
【図１４】ＢＡＬおよび鼻スワブにおけるワクチン接種された動物における２０１９－ｎＣｏＶ負荷後のピークウイルスＲＮＡを示すグラフである。赤色の線は、中央値のウイルス量を反映する。Ｐ値は、両側ウィルコクソン順位和検定を示す。
【図１５】負荷後のＢＡＬおよび鼻スワブにおけるｌｏｇ　ｓｇｍＲＮＡでの負荷前のｌｏｇ　ＥＬＩＳＡ力価の相関を示すグラフである。赤色の線は、これらの変数間の最良適合関係を反映する。ＰおよびＲ値は、両側のスピアマンの順位相関検定を反映する。
【図１６】負荷前のＢＡＬにおけるｌｏｇ　ｓｇｍＲＮＡでのｌｏｇ　ＥＬＩＳＰＯＴ応答と、負荷後の鼻スワブにおける応答の相関を示すグラフである。赤色の線は、これらの変数間の最良適合関係を反映する。ＰおよびＲ値は、両側のスピアマンの順位相関検定を反映する。
【図１７】負荷前のＢＡＬにおけるｌｏｇ　ｓｇｍＲＮＡでのｌｏｇ　ＣＤ４＋ＩＣＳ応答と、負荷後の鼻スワブにおける応答の相関を示すグラフである。赤色の線は、これらの変数間の最良適合関係を反映する。ＰおよびＲ値は、両側のスピアマンの順位相関検定を反映する。
【図１８】負荷前のＢＡＬにおけるｌｏｇ　ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬでのｌｏｇ　ＣＤ８＋ＩＣＳ応答と、負荷後の鼻スワブにおけるｌｏｇ　ｓｇｍＲＮＡコピー／スワブの相関を示すグラフである。赤色の線は、これらの変数間の最良適合関係を反映する。ＰおよびＲ値は、両側のスピアマンの順位相関検定を反映する。
【図１９】負荷後の既往のＥＬＩＳＡ応答を示すグラフである。負荷後の０日目および１４日目における応答が示される。赤色の線は、中央値の応答を反映する。
【図２０】負荷後の既往の偽ウイルスＮＡｂ応答を示すグラフである。負荷後の０日目および１４日目における応答が示される。赤色の線は、中央値の応答を反映する。
【図２１】負荷後の既往の生ウイルスＮＡｂ応答を示すグラフである。負荷後の０日目および１４日目における応答が示される。赤色の線は、中央値の応答を反映する。
【図２２】負荷後の既往のＥＬＩＳＰＯＴ応答を示すグラフである。負荷後の０日目および１４日目における応答が示される。赤色の線は、中央値の応答を反映する。
【図２３－１】２０１９－ｎＣｏＶで負荷されたアカゲザルにおけるウイルス量を示すグラフである。アカゲザルに、1.1×10^{6}ＰＦＵ（群１；Ｎ＝３）、1.1×10^{5}ＰＦＵ（群２；Ｎ＝３）、または1.1×10^{4}ＰＦＵ（群３；Ｎ＝３）の２０１９－ｎＣｏＶを鼻腔内および気管内経路によって接種した。（図２３Ａ）気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬ）において、負荷後の複数のタイムポイントで、Log_{10}ウイルスＲＮＡコピー／ｍＬ（５０コピー／ｍＬが限界）を評価した。（図２３Ｂ）鼻スワブ（ＮＳ）において、負荷後の複数のタイムポイントで、Log_{10}ウイルスＲＮＡコピー／スワブおよび（図２３Ｃ）log_{10}のｓｇｍＲＮＡコピー／スワブ（５０コピー／スワブが限界）を評価した。赤色の水平のバーは、中央値のウイルス量を反映する。
【図２３－２】図２３－１と同じ。
【図２３－３】図２３－１と同じ。
【図２４－１】２０１９－ｎＣｏＶで負荷されたアカゲザルにおける免疫応答を示すグラフである。負荷後、（図２４Ａ）結合抗体ＥＬＩＳＡ、（図２４Ｂ）偽ウイルス中和アッ

セイ、（図２４Ｃ）生ウイルス中和アッセイ、および（図２４Ｄ）３５日目における抗体サブクラスおよび受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）に対するエフェクター機能、可溶性スパイク（Ｓ）エクトドメイン、およびヌクレオカプシド（Ｎ）タンパク質を含むシステム血清学プロファイルによって体液性免疫応答を評価した。抗体依存性補体沈着（ＡＤＣＤ）、抗体依存性細胞ファゴサイトーシス（ＡＤＣＰ）、抗体依存性好中球ファゴサイトーシス（ＡＤＮＰ）、および抗体依存性ＮＫ細胞脱顆粒（ＮＫ　ＣＤ１０７ａ）およびサイトカイン分泌（ＮＫ　ＭＩＰ１β、ＮＫ　ＩＦＮγ）が示される。細胞性免疫応答はまた、プールしたＳペプチドへの応答における（図２４Ｅ）ＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイおよび（図２４Ｆ）多パラメーター細胞内サイトカイン染色アッセイによる負荷の後に評価した。赤色および水平のバーは、平均応答を反映する。

【図２４－２】図２４－１と同じ。

【図２４－３】図２４－１と同じ。

【図２４－４】図２４－１と同じ。

【図２４－５】図２４－１と同じ。

【図２４－６】図２４－１と同じ。

【図２５】２０１９－ｎＣｏＶが急性ウイルス性間質性肺炎を誘発させることを示す一連の顕微鏡写真である。（図２５Ａ～２５Ｆ）負荷後の２日の２０１９－ｎＣｏＶに感染したアカゲザルからの固定した肺組織のＨ＆Ｅ断片であり、（図２５Ａ）間質性浮腫および局部的な肺硬化、（図２５Ｂ）肺胞内浮腫および好中球の浸潤、（図２５Ｃ～２５Ｄ）細気管支上皮の痂皮形成および壊死、（図２５Ｅ）細気管支上皮の合胞体細胞形成、ならびに（図２５Ｆ）肺胞中隔内のヒアリン膜を示す。（図２５Ｇ～２５Ｈ）ＳＡＲＳヌクレオカプシドのＩＨＣであり、（図２５Ｇ）内腔内のウイルス合胞体細胞および（図２５Ｈ）ウイルス感染した肺胞内膜細胞を含む間質腔内のウイルス感染細胞を示す。（図２５Ｉ）ＲＮＡＳＣＯＰＥ（登録商標）インサイチュハイブリダイゼーションにより２０１９－ｎＣｏＶ　ＲＮＡを含有する複数の細胞を示す炎症性浸潤。（図２５Ｊ～２５Ｌ）気管支の気道上皮であり、（図２５Ｊ）粘膜下組織内の炎症および気管支の線毛円柱気道上皮への炎症細胞の遊出、（図２５Ｋ）２０１９－ｎＣｏＶ　ＲＮＡ、および（図２５Ｌ）ＳＡＲＳヌクレオカプシドを示す。スケールバー（図２５Ａ）＝２００ミクロン；（２５Ｃ、２５Ｉ、２５Ｋ～２５Ｌ）＝１００ミクロン；（図２５Ｇ）＝５０ミクロン；（図２５Ｂ、２５Ｄ～２５Ｆ、２５Ｊ）＝２０ミクロン、および（図２５Ｈ）＝１０ミクロン。Ｈ＆Ｅ＝ヘマトキシリンおよびエオシン；ＩＨＣ＝免疫組織化学；ＲＮＡｓｃｏｐｅ＝２０１９－ｎＣｏＶ　ＲＮＡ染色。

【図２６－１】アカゲザルにおいて２０１９－ｎＣｏＶが肺胞上皮細胞に感染することを示す一連の顕微鏡写真である。負荷後の２日の２０１９－ｎＣｏＶに感染したアカゲザルからの固定した肺組織のサイクリック免疫蛍光法（Ｃｙｃｌｉｃ　ｉｍｍｕｎｏｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ；ＣｙＣＩＦ）染色。（図２６Ａ）細胞核のＤＡＰＩ染色、核硬化の領域（矢印）、およびウイルス複製の病巣（ボックス）を含む肺のスライド画像の全体。（図２６Ｂ）差し込みボックスのより高い倍率の画像であり、（図２６Ｃ）ＳＡＲＳヌクレオカプシド陽性細胞（緑色）および細胞核のＤＡＰＩ（青色）を示す。（図２６Ｄ）（図２６Ｂおよび図２６Ｃ）に描写された対応する肺の領域からのＳＡＲＳヌクレオカプシドの明視野ＩＨＣ。（図２６Ｅ～２６Ｋ）ＣＤ２０６とのＳＡＲＳ－Ｎの共染色（図２６Ｅおよび図２６Ｋ）、汎サイトケラチン（ｐａｎ－ＣＫ）（図２６Ｇおよび図２６Ｈ）、ＣＤ６８（図２６Ｉ）、およびＩｂａ－１（図２６Ｊ）ウイルス感染した上皮細胞および感染した上皮細胞に近いマクロファージを示す。スケールバー（図２６Ｆ～２６Ｋ）＝５０ミクロン。

【図２６－２】図２６－１と同じ。

【図２７－１】アカゲザルにおける２０１９－ｎＣｏＶ再負荷後のウイルス量を示すグラフである。初感染後の３５日目に（図２３Ａ～２３Ｃおよび２４Ａ～２４Ｆを参照）、アカゲザルを、１．１×10^6ＰＦＵ（群１；Ｎ＝３）、１．１×10^5ＰＦＵ（群２；Ｎ＝３）、または１．１×10^4ＰＦＵ（群３；Ｎ＝３）での鼻腔内および気管内経路によ

って２０１９－ｎＣｏＶで再負荷した。再負荷実験において、３匹のナイーブ動物を陽性対照として組み入れた。（図２７Ａ）Log_{10}ウイルスＲＮＡコピー／ｍＬ（５０コピー／ｍＬが限界）を、再負荷後の複数のタイムポイントで、気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬ）において評価した。ナイーブ動物のうち１匹の洗浄液が採取できなかった。（図２７Ｂ）初回負荷および再負荷後のＢＡＬにおけるウイルスＲＮＡの比較。（図２７Ｃ）Log_{10}ウイルスＲＮＡコピー／ｍＬおよび（図２７Ｅ）log_{10}のｓｇｍＲＮＡコピー／スワブ（５０コピー／ｍＬが限界）を、再負荷後の複数のタイムポイントで、鼻スワブ（ＮＳ）において評価した。初回負荷および再負荷後のＮＳにおける（図２７Ｄ）ウイルスＲＮＡおよび（図２７Ｆ）ｓｇｍＲＮＡの比較。赤色の水平のバーは、中央値のウイルス量を反映する。Ｐ値は、両側マン－ホイットニー検定を反映する。

【図２７－２】図２７－１と同じ。

【図２７－３】図２７－１と同じ。

【図２７－４】図２７－１と同じ。

【図２７－５】図２７－１と同じ。

【図２７－６】図２７－１と同じ。

【図２８】アカゲザルにおける２０１９－ｎＣｏＶ再負荷後の既往の免疫応答を示す一連のグラフである。ウイルス特異的結合抗体ＥＬＩＳＡ、偽ウイルス中和アッセイ、生ウイルス中和アッセイ、およびＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイは、２０１９－ｎＣｏＶ再負荷の前および２０１９－ｎＣｏＶ再負荷の７日後に描写されたものである。赤色の線は、平均応答を反映する。Ｐ値は、両側マン－ホイットニー検定を反映する。

【図２９】２０１９－ｎＣｏＶで負荷されたアカゲザルにおける血漿ウイルス量を示す一連のグラフである。群１～３は図２３に記載される。Log_{10}ウイルスＲＮＡコピー／ｍＬ（５０コピー／ｍＬが限界）を、負荷後の複数のタイムポイントで、血漿において評価した。赤色の水平のバーは、中央値のウイルス量を反映する。

【図３０】２０１９－ｎＣｏＶで負荷されたアカゲザルの臨床スコアを示す一連のグラフである。群１～３は図２３に記載される。所見、呼吸困難、横臥、食欲、および応答性に基づく動物の半定量的な臨床スコア付け。負荷後の複数のタイムポイントにおける呼吸窮迫。赤色の水平のバーは、中央値の臨床スコアを反映する。

【図３１】２０１９－ｎＣｏＶで負荷されたアカゲザルにおける血液学を示すグラフである。好中球およびリンパ球数（Ｋ／μＬ）が示される。赤色の水平のバーは、中央値を反映する。

【図３２】２０１９－ｎＣｏＶで負荷されたアカゲザルにおける組織ウイルス量を示すグラフである。アカゲザルに２０１９－ｎＣｏＶを接種し、負荷後２日目（Ｎ＝２）および４日目（Ｎ＝２）に検死した。Log_{10}ウイルスＲＮＡコピー／ｇ組織（２００コピー／ｇが限界）を複数の組織で評価した。赤色の水平のバーは、中央値のウイルス量を反映する。

【図３３】２０１９－ｎＣｏＶ複製が、１型インターフェロン応答に関連する多形核および単核炎症性浸潤を誘発することを示す顕微鏡写真である。（図３３Ａおよび図３３Ｆ）２０１９－ｎＣｏＶ　ＲＮＡの検出、（図３３Ｂおよび図３３Ｇ）ミエロペルオキシダーゼ（ＭＰＯ）のＩＨＣ、（図３３Ｃおよび図３３Ｈ）ＣＤ４（茶色）およびマクロファージ（ＣＤ６８およびＣＤ１６３、赤色）の二重染色、（図３３Ｄおよび図３３Ｉ）ＣＤ８Ｔリンパ球、および（図３３Ｅおよび図３３Ｊ）ＭＸ１（１型インターフェロン応答遺伝子）であって、（図３３Ａ～３３Ｅ）負荷後の２日目における２０１９－ｎＣｏＶに感染したアカゲザルにおけるＭＸ１、および（図３３Ｆ～３３Ｇ）未感染のアカゲザルにおけるＭＸ１。スケールバー＝１００ミクロン。

【図３４】肺組織における炎症性浸潤の定量分析を示すグラフである。２０１９－ｎＣｏＶに感染したアカゲザル対未感染のアカゲザルにおける（図３４Ａ）肺胞の多形核（ＰＭＮ）細胞浸潤、および（図３４Ｂ）ＭＸ１染色の程度。Ｐ値は、両側マン－ホイットニー検定を反映する。

【図３５－１】２０１９－ｎＣｏＶ急性感染における肺硬化の領域内の炎症性浸潤を示す

顕微鏡写真である。（図３５Ａ）感染後２日の１つの肺断片であり、組織硬化を示した３つの関心領域（ＲＯＩ）（ＲＯＩ１～３）を含有する；スケールバー＝５ｍｍ。（図３５Ｂ）気管支関連リンパ組織（ＢＡＬＴ）および（図３５Ｃおよび図３５Ｄ）ＲＯＩ１内の細気管支上皮であって、（図３５Ｃ）細気管支内腔へのＣＤ３＋Ｔリンパ球の遊走、および（図３５Ｄ）多数のミエロペルオキシダーゼ（ＭＰＯ）を発現する好中球およびＣＤ１６＋マクロファージを含む細気管支周囲炎を伴う細気管支の壊死を示す；ＣＤ３（灰色）、ＣＤ２０（青色）、ＣＤ６８（黄色）、ＨＬＡＤＲ（青緑色）、ＭＰＯ（深紅色）、Ｅ－カドヘリン（緑色）；スケールバー＝１００μｍ。（図３５Ｅおよび図３５Ｆ）硬化した組織（ＤＮＡ、灰色）におけるＣＤ１６陽性率（赤色）であり、（図３５Ｆ、図３５Ｈ、および図３５Ｊ）ＲＯＩ３における高い２０１９－ｎＣｏＶ陽性率と比較して、（図３５Ｅ、図３５Ｇ、および図３５Ｉ）ＲＯＩ１では低い２０１９－ｎＣｏＶ陽性率である。（図３５Ｇ）ＲＯＩ１対（図３５Ｈ）ＲＯＩ３における、ＳＡＲＳ－Ｎ（緑色）およびｐａｎ－ＣＫ（上皮、赤色）染色。ＲＯＩ１（低いＳＡＲＳ　ＣｏＶ２陽性率）（図３５Ｉ）対ＲＯＩ３（高いＳＡＲＳ　ＣｏＶ２陽性率）（図３５Ｊ）におけるＣＤ３（灰色）、ＣＤ２０（赤色）、およびＣＤ６８（緑色）陽性率；スケールバー＝０．５ｍｍ。

【図３５－２】図３５－１と同じ。

【図３６】２０１９－ｎＣｏＶの初回負荷および再負荷後のＢＡＬおよび鼻スワブのプラークアッセイを示すグラフである。初回負荷または再負荷後の１～７日目からの、ＢＡＬの場合は１ｍｌ当たりの、または鼻スワブの場合はスワブ１つ当たりのピークプラーク形成単位（ＰＦＵ）が示される。赤色の水平のバーは、中央値のＰＦＵ力価を反映する。

【図３７】２０１９－ｎＣｏＶ再負荷されたアカゲザルの臨床スコアを示すグラフである。群１～３は図２３に記載される。所見、呼吸困難、横臥、食欲、および応答性に基づく動物の半定量的な臨床スコア付け。負荷後の複数のタイムポイントにおける呼吸窮迫。

【図３８－１】図３８Ａ：Ａｄ２６ベクターの構築を示す線図である。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質バリアントを発現する７つのＡｄ２６ベクターを産生した：（ｉ）全長Ｓを有するｔＰＡリーダー配列（ｔＰＡ．Ｓ（配列番号１、Ｎ末端に融合したｔＰＡリーダー配列を含む））、（ｉｉ）フューリン切断部位の突然変異および２つのプロリンを安定化する突然変異を有する全長Ｓを有するｔＰＡリーダー配列（ｔＰＡ．Ｓ．ＰＰ（配列番号２３、Ｎ末端に融合したｔＰＡリーダー配列を含む））、（ｉｉｉ）天然全長Ｓを有する野生型リーダー配列（Ｓ（配列番号２９））、（ｉｖ）細胞質内の尾部が欠失したＳを有する野生型リーダー配列（Ｓ．ｄＣＴ（ＳＳ－ＳｄＣＴ）（配列番号３０））、（ｖ）タンデムｔＰＡおよび全長Ｓを有する野生型リーダー配列（ｔＰＡ．ＷＴ．Ｓ（配列番号２９、Ｎ末端に融合したｔＰＡリーダー配列を含む））、（ｖｉ）フューリン切断部位の突然変異、プロリンを安定化する突然変異、およびフォールドン三量体化ドメインを有する、可溶性エクトドメインを反映する膜貫通領域および細胞質内の尾部が欠失したＳを有する野生型リーダー配列（Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰ（ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン）（配列番号５６））、および（ｖｉｉ）フューリン切断部位の突然変異およびプロリンを安定化する突然変異を有する、全長Ｓを有する野生型リーダー配列（Ｓ．ＰＰ（ＳＳ－スパイク－ｄＦ－ＰＰ）（配列番号５１））。赤色の三角は、ｔＰＡリーダー配列を描写し、黒色の三角は、野生型リーダー配列を描写し、赤色のＸは、フューリン切断部位突然変異を描写し、赤色の垂直線は、プロリン突然変異を描写し、白抜きの四角は、フォールドン三量体化ドメインを描写する。

【図３８－２】図３８Ｂ：ポリクローナル抗ＳＡＲＳ抗体によるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓバリアントの認識を示すウエスタンブロットである。抗ＳＡＲＳポリクローナル抗体を使用した、細胞溶解産物中のｔＰＡ．Ｓ（レーン１）、ｔＰＡ．Ｓ．ＰＰ（レーン２）、Ｓ（レーン３）、Ｓ．ｄＣＴ（ＳＳ－ＳｄＣＴ）（レーン４）、ｔＰＡ．ＷＴ．Ｓ（レーン５）、Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰ（ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン）（レーン６）、およびＳ．ＰＰ（ＳＳ－スパイク－ｄＦ－ＰＰ）（レーン７）をコードするＡｄ２６ベクターからの発現のウエスタンブロット分析。

【図３９－１】ワクチン接種されたアカゲザルにおける体液性免疫応答を示すグラフであ

る。体液性免疫応答を、０、２、および４週目に、（図３９Ａ）ＲＢＤ特異的結合抗体ＥＬＩＳＡ、（図３９Ｂ）偽ウイルス中和アッセイ、および（図３９Ｃ）生ウイルス中和アッセイによって評価した。赤色のバーは、中央値の応答を反映する。点線は、定量のアッセイ限界を反映する。（図３９Ｄ）４週目における、ＳおよびＲＢＤ特異的抗体依存性好中球ファゴサイトーシス（ＡＤＮＰ）、抗体依存性単球細胞ファゴサイトーシス（ＡＤＣＰ）、抗体依存性補体沈着（ＡＤＣＤ）、および抗体依存性ＮＫ細胞活性化（ＡＤＮＫＡ）は、レーダープロットとして示される。くさびの大きさと色の強度は、対応する群の特徴の中央値を示す（青色は抗体機能を描写し、赤色は抗体のアイソタイプ／サブクラス／ＦｃγＲ結合を描写する）。主成分分析（ＰＣＡ）プロットは、群にわたる多変量の抗体プロファイルを示す。各ドットは動物を表し、ドットの色は群を意味し、楕円は、多変量の正常分布を仮定した７０％の信頼水準としての群の分布を示す。

【図３９－２】図３９－１と同じ。

【図３９－３】図３９－１と同じ。

【図３９－４】図３９－１と同じ。

【図３９－５】図３９－１と同じ。

【図４０】ワクチン接種されたアカゲザルにおける細胞性免疫応答を示すグラフである。プールしたＳペプチドへの応答における（図４０Ａ）ＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイおよび（図４０Ｂ）ＩＦＮ－γ＋ＣＤ４＋およびＩＦＮ－γ＋ＣＤ８＋Ｔ細胞の細胞内サイトカイン染色アッセイによる免疫化後の４週目に、細胞性免疫応答を評価した。赤色のバーは、中央値の応答を反映する。点線は、定量のアッセイ限界を反映する。

【図４１－１】ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷後のアカゲザルにおけるウイルス量を示すグラフである。アカゲザルを、１．２×１０^{8}ＶＰ（１．１×１０^{4}ＰＦＵ）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２で、鼻腔内および気管内経路によって負荷した。（図４１Ａ～４１Ｂ）Log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬ（定量限界５０コピー／ｍＬ）を、負荷後のシャム対照およびワクチン接種された動物において、気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬ）で評価した。（図４１Ｃ～４１Ｄ）Log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／スワブ（定量限界５０コピー／スワブ）を、負荷後のシャム対照およびワクチン接種された動物において、鼻スワブ（ＮＳ）で評価した。Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰ（ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン）群中の１匹の動物は、負荷後に得たピークＢＡＬ試料を有していなかった。赤色の線は、中央値を反映する。

【図４１－２】図４１－１と同じ。

【図４１－３】図４１－１と同じ。

【図４２】ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷後のピークウイルス量の要約を示すグラフである。負荷後のＢＡＬおよびＮＳにおけるピークウイルス量。ピークウイルス量は、負荷後の１～４日目に可変的に発生した。赤色の線は、中央値のウイルス量を反映する。Ｐ値は、両側マン－ホイットニー検定を示す（＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．００１、＊＊＊Ｐ＜０．０００１）。

【図４３－１】抗体と保護の相関を示すグラフである。２週目および４週目における、負荷後のＢＡＬにおけるｌｏｇピークｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬとの、（図４３Ａ）結合のＥＬＩＳＡ力価、（図４３Ｂ）偽ウイルスＮＡｂ力価、および（図４３Ｃ）生ウイルスＮＡｂ力価の相関。赤色の線は、これらの変数間の最良の直線状の適合関係を反映する。ＰおよびＲ値は、両側のスピアマンの順位相関検定を反映する。（図４３Ｄ）ヒートマップは、完全に保護された（Ｎ＝１７）、および部分的に保護された、および保護されていない（Ｎ＝２２）動物間の特徴のｚスコアの平均における差を示す。２つの群を両側マン－ホイットニー検定によって比較した。星印は、ベンジャミニ－ホッホベルグ補正したｑ値を示す（＊ｑ＜０．０５）。ドットプロットは、ＮＡｂ力価、Ｓ特異的抗体依存性ＮＫ細胞活性化（ＡＤＮＫＡ）、および抗体依存性単球細胞ファゴサイトーシス（ＡＤＣＰ）を含む、完全に保護された動物と部分的に保護された動物とを最もよく識別した特徴における差を示す。Ｐ値は、両側マン－ホイットニー検定を示す。バープロットは、ロジスティック回帰モデルにおいて、ｘ軸上に示された特徴を使用して受信者操作特性曲線下の交差

検証された領域を示す。上の３つの１特徴および２特徴モデルが示される。エラーバーは、１０分割の交差確認の１００回繰り返しの平均および標準偏差を示す。
【図４３－２】図４３－１と同じ。
【図４３－３】図４３－１と同じ。
【図４３－４】図４３－１と同じ。
【図４３－５】図４３－１と同じ。
【図４４－１】ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷後の免疫応答を示すグラフである。（図４４Ａ）負荷前および負荷後の１４日目における偽ウイルスＮＡｂ力価、ならびに（図４４Ｂ）シャム対照およびＡｄ２６－Ｓ．ＰＰ（Ａｄ２６ＳＳ－スパイク－ｄＦ－ＰＰ）がワクチン接種された動物における、負荷後の１４日目における、プールしたスパイク（Ｓ１、Ｓ２）、ヌクレオカプシド（ＮＣＡＰ）、および非構造タンパク質（Ｎ６、Ｎ７ａ、Ｎ８）ペプチドへの応答における細胞内サイトカイン染色アッセイによるＩＦＮ－γ＋ＣＤ８＋およびＩＦＮ－γ＋ＣＤ４＋Ｔ細胞応答。赤色のバーは、中央値の応答を反映する。点線は、定量のアッセイ限界を反映する。
【図４４－２】図４４－１と同じ。
【図４５】ワクチン接種されたマカクにおける偽ウイルスＮＡｂ力価とＥＬＩＳＡまたは生ウイルスＮＡｂアッセイとの相関を示す一対のグラフである。赤色の線は、これらの変数間の最良の直線状の適合関係を反映する。ＰおよびＲ値は、両側のスピアマンの順位相関検定を反映する。
【図４６】ワクチン接種されたマカクならびに回復期マカクおよびヒトにおける偽ウイルスＮＡｂ力価の比較を示すグラフである。Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰ（Ａｄ２６ＳＳ－スパイク－ｄＦ－ＰＰ）がワクチン接種されたマカクにおける偽ウイルスＮＡｂの、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染から回復した回復期マカクおよび回復期ヒトのこれまでに報告されたコホートとの比較。
【図４７】ワクチン接種されたアカゲザルにおけるＢＡＬにおける体液性免疫応答を示す一対のグラフである。シャム対照およびＡｄ２６－Ｓ．ＰＰ（Ａｄ２６ＳＳ－スパイク－ｄＦ－ＰＰ）がワクチン接種された動物における、ＥＬＩＳＡによるＢＡＬにおける４週目のＳ特異的なＩｇＧおよびＩｇＡ。赤色のバーは、中央値の応答を反映する。点線は、定量のアッセイ限界を反映する。
【図４８－１】ワクチン接種されたアカゲザルにおける体液性免疫応答を示す一連のグラフである。ＳおよびＲＢＤ特異的抗体依存性好中球ファゴサイトーシス（ＡＤＮＰ）、抗体依存性単球細胞ファゴサイトーシス（ＡＤＣＰ）、抗体依存性補体沈着（ＡＤＣＤ）、および抗体依存性ＮＫ細胞活性化（ＡＤＮＫＡ）が示される。赤色のバーは、中央値の応答を反映する。
【図４８－２】図４８－１と同じ。
【図４８－３】図４８－１と同じ。
【図４８－４】図４８－１と同じ。
【図４９】ワクチン接種されたアカゲザルにおける細胞性免疫応答を示す一対のグラフである。Ａｄ２６－Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰ（Ａｄ２６ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン）およびＡｄ２６－Ｓ．ＰＰ（Ａｄ２６ＳＳ－スパイク－ｄＦ－ＰＰ）がワクチン接種された動物における、プールしたＳペプチドへの応答におけるＩＦＮ－γ＋、ＩＬ－２＋、ＩＬ－４＋、およびＩＬ－１０＋ＣＤ４＋Ｔ細胞の細胞内サイトカイン染色アッセイ。赤色のバーは、中央値の応答を反映する。点線は、定量のアッセイ限界を反映する。
【図５０】保護のＥＬＩＳＡ相関を示す一対のグラフである。２週目および４週目における結合ＥＬＩＳＡ力価の、負荷後のＮＳにおけるｌｏｇピークｓｇｍＲＮＡコピー／スワブとの相関。赤色の線は、これらの変数間の最良の直線状の適合関係を反映する。ＰおよびＲ値は、両側のスピアマンの順位相関検定を反映する。
【図５１】偽ウイルスＮＡｂと保護の相関を示す一対のグラフである。２週目および４週目における偽ウイルスＮＡｂ力価の、負荷後のＮＳにおけるｌｏｇピークｓｇｍＲＮＡコピー／スワブとの相関。赤色の線は、これらの変数間の最良の直線状の適合関係を反映す

る。ＰおよびＲ値は、両側のスピアマンの順位相関検定を反映する。
【図５２】生ウイルスＮＡｂと保護の相関を示す一対のグラフである。２週目および４週目における生ウイルスＮＡｂ力価の、負荷後のＮＳにおけるｌｏｇピークｓｇｍＲＮＡコピー／スワブとの相関。赤色の線は、これらの変数間の最良の直線状の適合関係を反映する。ＰおよびＲ値は、両側のスピアマンの順位相関検定を反映する。
【図５３－１】抗体と保護の相関を示す一連のグラフである。ドットプロットは、完全に保護された動物と、部分的に保護された動物との間の特徴における差を示す。Ｐ値は、両側マン－ホイットニー検定を示す。
【図５３－２】図５３－１と同じ。
【図５３－３】図５３－１と同じ。
【図５３－４】図５３－１と同じ。
【図５３－５】図５３－１と同じ。
【図５３－６】図５３－１と同じ。
【図５３－７】図５３－１と同じ。
【図５３－８】図５３－１と同じ。
【図５４】ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷後のＮＡｂ力価を示す一連のグラフである。ワクチン接種された動物における、負荷前の、および負荷後の１４日目における偽ウイルスＮＡｂ力価。赤色のバーは、中央値の応答を反映する。点線は、定量のアッセイ限界を反映する。
【図５５－１】ハムスターにおけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染後の臨床疾患を示すグラフである。シリアンゴールデンハムスター（１０～１２週齢；雄および雌；Ｎ＝２０）を、5×10^{4}ＴＣＩＤ$_{50}$（低用量；Ｎ＝４）または5×10^{5}ＴＣＩＤ$_{50}$（高用量；Ｎ＝１６）のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２で鼻腔内経路によって感染させた。（図５５Ａ）負荷後の中央値のパーセント重量変化。数値は、各タイムポイントにおける動物の数を反映する。高用量群において、４匹の動物を２日目に検死し、４匹の動物を４日目に検死し、４匹の動物は６日目に安楽死基準を満たし、２匹の動物は７日目に安楽死基準を満たした。（図５５Ｂ）個々の動物における負荷後のパーセント重量変化。中央値の体重の減少は赤色で描写される。星印は死亡率を示す。灰色の線は、２日目および４日目に計画的に検死された動物を示す。（図５５Ｃ）２日目および４日目における計画的な検死での、６～７日目に安楽死基準を満たした６匹の動物のうち２～５匹における、組織１グラム当たりの$\log_{10}$ＲＮＡコピー（定量限界１００コピー／ｇ）によって測定した場合の組織ウイルス量。６日目に、拡大増殖した組織は回収しなかった。
【図５５－２】図５５－１と同じ。
【図５６】ハムスターにおける高用量ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染の病理学的な特徴を示す一連のグラフである。（図５６Ａ）鼻甲介における壊死および炎症（矢印）、Ｈ＆Ｅ（２日目）。（図５６Ｂ）内腔における死細胞片および変性性好中球での細気管支上皮の壊死（矢印）および血管壁における炎症細胞の遊出（矢じり）、Ｈ＆Ｅ（２日目）。（図５６Ｃ）間質性肺炎、出血、および肺実質の硬化、Ｈ＆Ｅ（２日目）。（図５６Ｄ）鼻甲介上皮は、ＩＨＣによってＳＡＲＳ－ＣｏＶ－Ｎの強い陽性率を示す（２日目）。（図５６Ｅ）細気管支上皮および管腔の死細胞片は、ＩＨＣによってＳＡＲＳ－ＣｏＶ－Ｎの強い陽性率を示す（２日目）。（図５６Ｆ）肺細胞および肺胞中隔は、ＩＨＣによってＳＡＲＳ－ＣｏＶ－Ｎの多病巣性の強い陽性率を示す（２日目）。（図５６Ｇ）肺間質内（矢印、間質性肺炎）および細気管支上皮内（矢じり；２日目）のＲＮＡＳＣＯＰＥ（登録商標）によるびまん性ｖＲＮＡ染色。（図５６Ｈ）肺間質内（４日目）のＲＮＡＳＣＯＰＥ（登録商標）によるびまん性ｖＲＮＡ染色。（図５６Ｉ）肺間質内（７日目）のＩｂａ－１ＩＨＣ（マクロファージ）。（図５６Ｊ）肺間質内のＣＤ３＋Ｔリンパ球、ＣＤ３　ＩＨＣ（４日目）。（図５６Ｋ）間質性好中球の存在を示すＭＰＯ（好中球ミエロペルオキシダーゼ）ＩＨＣ（７日目）。（図５６Ｌ）インターフェロン誘導性遺伝子、ＭＸ１、ＩＨＣは、肺全体で強く広汎性の陽性率を示す（４日目）。Ｈ＆Ｅ、ヘマトキシリンおよびエオシン；ＩＨＣ、免疫組織化学；Ｉｂａ１、イオン化カルシウム結合アダプタータンパク

質１。代表的な断片が示される。スケールバー＝２０μｍ（図５６Ｂ、５６Ｄ）；５０μｍ（図５６Ａ、５６Ｅ、５６Ｆ）；１００μｍ（図５６Ｃ、５６Ｇ～５６Ｌ）。

【図５７－１】肺におけるウイルス複製および関連炎症の長期的な定量的画像分析を示す一連のグラフである。（図５７Ａ）ＲＮＡＳＣＯＰＥ（登録商標）ＩＳＨによるアンチセンスＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスＲＮＡ（ｖＲＮＡ）陽性のパーセント肺面積。（図５７Ｂ）ＩＨＣによるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－Ｎタンパク質（核または細胞質内）陽性の総細胞のパーセンテージ。（図５７Ｃ）ＩＨＣによる単位面積当たりのＩｂａ－１陽性細胞。（図５７Ｄ）単位面積当たりのＣＤ３陽性細胞。（図５７Ｅ）単位面積当たりのＭＰＯ陽性細胞。（図５７Ｆ）総肺面積の比率としてのＭＸ１陽性肺組織のパーセンテージ。ＩＳＨ、インサイチュハイブリダイゼーション；ＩＨＣ、免疫組織化学；ＳＡＲＳ－Ｎ、ＳＡＲＳ－ＣｏＶヌクレオカプシド；ＭＰＯ、ミエロペルオキシダーゼ；ＭＸ１、ミクソウイルスタンパク質１（１型インターフェロン誘導性遺伝子）。各ドットは、１匹の動物を表す。

【図５７－２】図５７－１と同じ。

【図５７－３】図５７－１と同じ。

【図５８】肺ウイルス動態およびＡＣＥ２受容体発現パターンを示す一連のグラフである。負荷後の２日目（Ｄ２）、４日目（Ｄ４）、７日目（Ｄ７）、および１４日目（Ｄ１４）における高用量ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２での負荷の前（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２陰性）またはその後に、ハムスターを検死した。肺組織の連続断片を、ｖＲＮＡアンチセンスＲＮＡＳＣＯＰＥ（登録商標）（図５８Ａ～５８Ｅ）、ｖＲＮＡセンスＲＮＡＳＣＯＰＥ（登録商標）（図５８Ｆ～５８Ｊ）、およびＡＣＥ２　ＩＨＣ（図５８Ｋ～５８Ｏ）のために染色した。アンチセンスＲＮＡＳＣＯＰＥ（登録商標）はセンスプローブを使用し、センスＲＮＡＳＣＯＰＥ（登録商標）はアンチセンスプローブを使用した。ＩＨＣ、免疫組織化学。代表的な断片が示される。スケールバー＝１００μｍ。

【図５９－１】肺外の病態を示す一連のグラフである。（図５９Ａ）負荷後の２日目における脳幹におけるアンチセンスＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスＲＮＡ（ｖＲＮＡ）。（図５９Ｂ）より高い倍率は、炎症および病態の非存在下でのニューロンにおける細胞質内ｖＲＮＡ染色を示す。（図５９Ｃ）負荷後の２日目における小腸絨毛の粘膜固有層におけるアンチセンスＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ｖＲＮＡ染色。（図５９Ｄ）より高い倍率は、炎症および組織の病態の非存在下での個々の単核細胞における細胞質内および核ｖＲＮＡ染色を示す。（図５９Ｅ）負荷後の４日目における、心筋内の、および心臓の心外膜表面に沿ったアンチセンスＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のｖＲＮＡ染色。（図５９Ｆ）より高い倍率は、限局性心筋炎と一致する炎症性単核細胞の浸潤の染色を示す。（図５９Ｇ）負荷後４日目（ｄ４）に内皮炎を示す肺血管。（図５９Ｈ）負荷後４日目における、内皮に接着した、および血管壁内の、ＩＨＣによるＣＤ３＋Ｔリンパ球染色を示す肺血管。（図５９Ｉ）４日目における、内皮に沿った、および血管周囲における、マクロファージのＩＨＣによるＩｂａ－１＋染色を示す肺血管。（図５９Ｊ）４日目におけるＩＨＣによるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－Ｎの最小の血管の染色を示す肺血管。（図５９Ｋ）（図５９Ｅ、５９Ｆ）からの心臓であり、４日目にＩＨＣにより細胞のＣＤ３＋Ｔリンパ球染色（図５９Ｌ）によって確認した場合の限局性リンパ球性心筋炎を示す。スケールバー＝５００μｍ（図５９Ａ、５９Ｃ、５９Ｅ）；１００μｍ（図５９Ｂ、５９Ｄ、５９Ｆ、５９Ｇ～５９Ｌ）。

【図５９－２】図５９－１と同じ。

【図６０】血液単核細胞および骨髄におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を示す一連のグラフである。（図６０Ａ～６０Ｃ）負荷後の２日目における肺血栓中の単核細胞内のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２アンチセンスｖＲＮＡ染色。（図６０Ｄ）負荷後の４日における鼻甲介からの骨髄であり、（図６０Ｆ）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－Ｎ　ＩＨＣの陽性染色を示す（図６０Ｅ）造血細胞（Ｈ＆Ｅ）を示す。ｖＲＮＡ、ウイルスＲＮＡ；Ｈ＆Ｅ、ヘマトキシリンおよびエオシン；ＩＨＣ、免疫組織化学。スケールバー＝５００μｍ（図６０Ａ）；２００μｍ（図６０Ｄ）；１００μｍ（図６０Ｂ、６０Ｃ、６０Ｅ、６０Ｆ）。

【図６１－１】ワクチン接種されたハムスターにおける体液性免疫応答を示すグラフであ

る。（図６１Ａ）どちらもフューリン切断部位の突然変異と２つのプロリンを安定化する突然変異を有する、（ｉ）フォールドン三量体化ドメインを有する可溶性エクトドメインを反映する膜貫通領域および細胞質内の尾部の欠失（Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰ）または（ｉｉ）全長Ｓ（Ｓ．ＰＰ）を有するＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク（Ｓ）免疫原。赤色のＸは、フューリン切断部位突然変異を描写し、赤色の垂直線は、プロリン突然変異を描写し、白抜きの四角は、フォールドン三量体化ドメインを描写する。Ｓ１およびＳ２は、Ｓタンパク質の第１および第２のドメインを表し、ＴＭは、膜貫通領域を描写し、ＣＴは、細胞質内ドメインを描写する。ハムスターに、10^{10}ｖｐまたは10^{9}ｖｐのＡｄ２６－Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰまたはＡｄ２６－Ｓ．ＰＰまたはシャム対照をワクチン接種した（Ｎ＝１０／群）。体液性免疫応答を、０、２、および４週目に、（図６１Ｂ）ＲＢＤ特異的結合抗体ＥＬＩＳＡおよび（図６１Ｃ）偽ウイルス中和アッセイによって評価した。赤色のバーは、中央値の応答を反映する。点線は、定量のアッセイ限界を反映する。（図６１Ｄ）４週目におけるＳおよびＲＢＤ特異的なＩｇＧサブクラス、ＦｃγＲ、およびＡＤＣＤ応答は、レーダープロットとして示される。くさびの大きさと色の強度は、対応する群の特徴の中央値を示す（抗体サブクラス、赤色；ＦｃγＲ結合、青色；ＡＤＣＤ、緑色）。（図６１Ｅ）ワクチン接種群にわたる多変量の抗体プロファイルを示す主成分分析（ＰＣＡ）プロット。各ドットは動物を表し、ドットの色は群を意味し、楕円は、多変量の正常分布を仮定した７０％の信頼水準としての群の分布を示す。（図６１Ｆ）ヒートマップは、ワクチン群Ｓ．ＰＰとＳ．ｄＴＭ．ＰＰとの間の特徴のｚスコアの平均における差を示す。２つの群を両側マン－ホイットニー検定によって比較した。星印は、ベンジャミニ－ホッホベルグ補正したｑ値を示す（＊ｑ＜０．０５、＊＊ｑ＜０．０１、＊＊＊ｑ＜０．００１）。

【図６１－２】図６１－１と同じ。

【図６１－３】図６１－１と同じ。

【図６１－４】図６１－１と同じ。

【図６１－５】図６１－１と同じ。

【図６２－１】抗体力価と生存曲線の相関を示すグラフである。（図６２Ａ）２週目および４週目における結合ＥＬＩＳＡ力価の相関および偽ウイルスＮＡｂ力価。赤色の線は、これらの変数間の最良の直線状の適合関係を反映する。ＰおよびＲ値は、両側のスピアマンの順位相関検定を反映する。（図６２Ｂ）ワクチン研究の生存曲線。Ｐ値は、両側フィッシャー正確確率検定を示す。Ｎは、各群における動物の数を意味する。（図６２Ｃ）５×10^{5}ＴＣＩＤ$_{50}$の負荷用量を受け、長期的に追跡したすべての動物を含む２つのハムスター研究の組み合わされた分析。Ｐ値は、両側フィッシャー正確確率検定を示す。Ｎは、各群における動物の数を意味する。

【図６２－２】図６２－１と同じ。

【図６３－１】高用量ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷後のハムスターにおける臨床疾患を示すグラフである。（図６３Ａ）負荷後の中央値のパーセント重量変化。（図６３Ｂ）個々の動物における負荷後のパーセント重量変化。中央値の体重の減少は赤色で描写される。星印は死亡率を示す。灰色の線は、４日目に計画的な検死を受けた動物を示す。（図６３Ｃ）４日目に検死した動物を除いた、組み合わされたＡｄ２６－Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰ（Ｎ＝１４）、Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰ（Ｎ＝１４）、およびシャム対照（Ｎ＝７）群における最大の体重の減少。Ｐ値は、両側マン－ホイットニー検定を示す。（図６３Ｄ）負荷後の４日目における、対照ハムスターと比較した、Ａｄ２６－Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰおよびＡｄ２６－Ｓ．ＰＰがワクチン接種されたハムスターからの組織断片におけるアンチセンスｖＲＮＡに関して陽性のパーセント肺面積の定量化。Ｐ値は、両側マン－ホイットニー検定を表す。

【図６３－２】図６３－１と同じ。

【図６３－３】図６３－１と同じ。

【図６４】抗体と臨床的保護の相関を示すグラフである。２週目および４週目における（図６４Ａ）結合ＥＬＩＳＡ力価および（図６４Ｂ）偽ウイルスＮＡｂ力価と、負荷後の体重の減少の最大パーセントとの相関。赤色の線は、これらの変数間の最良の直線状の適合

関係を反映する。ＰおよびＲ値は、両側のスピアマンの順位相関検定を反映する。
【図６５－１】４日目および１４日目における組織ウイルス量を示すグラフである。負荷後の（図６５Ａ）４日目（Ｎ＝６、各ワクチンにつき両方の用量群を反映する）および（図６５Ｂ）１４日目（Ｎ＝１４、各ワクチンにつき両方の用量群を反映する）における、組織１グラム当たりのlog_{10}サブゲノムＲＮＡコピー（定量限界１００コピー／ｇ）によって測定した場合の組織ウイルス量。赤色の線は、中央値を反映する。各ドットは、１匹の動物を表す。
【図６５－２】図６５－１と同じ。
【図６６－１】抗体と保護の相関を示すグラフである。２週目および４週目における（図６６Ａ、６６Ｃ）結合ＥＬＩＳＡ力価および（図６６Ｂ、６６Ｄ）偽ウイルスＮＡｂ力価と、４日目に検死した動物における、（図６６Ａ、６６Ｂ）肺および（図６６Ｃ、６６Ｄ）鼻甲介組織のlog_{10}のＲＮＡコピー／グラムとの相関。赤色の線は、これらの変数間の最良の直線状の適合関係を反映する。ＰおよびＲ値は、両側のスピアマンの順位相関検定を反映する。
【図６６－２】図６６－１と同じ。
【図６７－１】抗体と保護および既往の応答の相関を示すグラフである。（図６７Ａ）ヒートマップは、抗体特徴と、体重の減少（Ｎ＝３５）、肺ウイルス量（Ｎ＝１２）、および鼻甲介ウイルス量（Ｎ＝１２）との間のスピアマン順位相関を示す。ベンジャミニ－ホッホベルグ法を使用した多重検定補正の後に、有意な相関が星印によって示される（＊ｑ＜０．０５、＊＊ｑ＜０．０１、＊＊＊ｑ＜０．００１）。（図６７Ｂ）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷後の１４日目に生き残ったハムスターにおけるＥＬＩＳＡおよびＮＡｂ応答。
【図６７－２】図６７－１と同じ。
【図６８－１】Ａｄ２６ワクチン接種がＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の病態からの保護をもたらすことを示す一連のグラフである。（図６８Ａ～６８Ｅ、６８Ｋ～６８Ｎ）シャム対照および（図６８Ｆ～Ｊ、６８Ｏ～Ｒ）Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰがワクチン接種されたハムスターの組織病理Ｈ＆Ｅ評価は、シャム対照における、（図６８Ａ）重度の肺実質の硬化および炎症細胞の浸潤、（図６８Ｂ）細気管支上皮の融合細胞および壊死、（図６８Ｃ）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－Ｎ陽性（ＩＨＣ）細気管支上皮細胞、（図６８Ｄ）細気管支周囲のＣＤ３＋Ｔリンパ球浸潤、ならびに（図６８Ｅ）細気管支周囲のマクロファージ浸潤（Ｉｂａ－１；ＩＨＣ）、ならびに（図６８Ｆ～Ｊ）Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰがワクチン接種された動物において対応する病態が最小か存在しないことを示す。負荷後の４日目における、Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰがワクチン接種された動物における類似の領域と比較した（図６８Ｏ～６８Ｒ）、シャム対照における（図６８Ｋ）間質性ＣＤ３＋Ｔリンパ球（図６８Ｌ）、ＩＨＣによるＭＰＯ染色、およびＩＨＣによるＭＸ１染色（図６８Ｎ）におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２アンチセンスＲＮＡＳＣＯＰＥ（登録商標）ＩＳＨ。負荷後の４日における、対照ハムスターと比較した、Ａｄ２６－Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰおよびＡｄ２６－Ｓ．ＰＰがワクチン接種されたハムスターからの組織断片におけるアンチセンスｖＲＮＡに関して陽性のパーセント肺面積の定量化（図６８Ｓ）。代表的な断片が示される。Ｐ値は、両側マン－ホイットニー検定を表す。スケールバー＝２０μｍ（図６８Ｂ、６８Ｃ、６８Ｇ、６８Ｈ、６８Ｉ）；５０μｍ（図６８Ａ、６８Ｄ、６８Ｅ、６８Ｊ）；１００μｍ（図６８Ｆ、６８Ｋ～６８Ｒ）。
【図６８－２】図６８－１と同じ。
【図６９】ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ構築物のいくつかの設計の概略図（Ｓ１薄灰色、Ｓ２暗い灰色）を示す図である。下の設計では、野生型（ｗｔ）シグナルペプチドをｔＰＡシグナルペプチドに変更した。Ｓ１とＳ２との間の垂直線は、フューリン切断部位における突然変異を示す。点線は、９８６位および９８７位における二重のプロリン突然変異を示す。デルタＥＲＲＳは、小胞体保持シグナルを含有するＣ末端残基の欠失を示す。
【図７０】細胞ベースのＥＬＩＳＡを使用した発光強度に基づいた、いくつかの異なるＳバリアントでのトランスフェクション後の、細胞表面におけるいくつかのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１特異的抗体を用いたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓの発現の検出。データは、平均±Ｓ

ＥＭとして表される。
【図７１】フローサイトメトリーを使用した、いくつかの異なるＳバリアントでのトランスフェクション後の、細胞表面におけるいくつかのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１特異的抗体およびＨＩＶ　ｇｐ１２０における高マンノースパッチに対する特異的な抗体（２Ｇ１２）を用いたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓの発現の検出。データは、平均±ＳＥＭとして表される。
【図７２】ＥＬＩＳＡによる１９日目における血清ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク特異的抗体力価。ＵＬＯＱ、検出上限；ＬＬＯＤ、検出下限。統計的分析：ボンフェローニ多重比較補正を用いた一元配置ＡＮＯＶＡ；ｎ．ｓ．、有意ではない（ｐ＞０．０５）。
【図７３】タンパク質発現への異なるシグナルペプチドの作用。細胞ベースのＥＬＩＳＡを使用した発光強度に基づいた、細胞表面における、ＡＣＥ２－抗体構築物およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１特異的抗体（ＣＲ３０２２）を用いた異なるシグナルペプチドを有するＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ構築物の発現の検出。データは、平均±ＳＥＭとして表される。
【図７４】線形化した標的ベクターにＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２コード配列をクローニングすることを示す図である。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質の部分をコードする２つのＤＮＡ断片を、その標的ベクターに組み入れた。
【図７５】Ａｄ２６ベクターのＥ１領域へのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２配列をコードする発現カセットの導入を示す図である。
【図７６】ＥＬＩＳＡによって測定した場合のＳタンパク質結合抗体力価を示す図である。（図７６Ａ）２週目；（図７６Ｂ）４週目。中央値の応答／群は、水平線で示される。点線は、ＬＬＯＤを示す。Ａｄ２６ＮＣＯＶ０３０（Ａｄ２６ＣＯＶＳ１）、Ａｄ２６ＮＣＯＶ００６、およびＡｄ２６ＮＣＯＶ０２８にわたる用量間比較（データ示さず）を、多重比較のためのボンフェローニ補正を用いたＡＮＯＶＡからのｔ検定を用いて実行した。＊：ｐ＜０．０５。ＬＬＯＤ＝検出下限。
【図７７】Ｖｅｒｏ　Ｅ６細胞におけるウイルス単離株Ｌｅｉｄｅｎ１（Ｌ－００１）の細胞変性効果（ＣＰＥ）を決定するｗｔＶＮＡによって測定した場合の中和抗体力価を示す図である。（図７７Ａ）２週目；（図７７Ｂ）４週目。中央値の応答／群は、水平線で示される。点線は、ＬＬＯＤを示す。ＬＬＯＤまたはそれ未満で応答を有する動物は、白抜きの記号として示される。ｗｔＶＮＡ＝野生型ウイルス中和アッセイ。Ａｄ２６ＮＣＯＶ０３０（Ａｄ２６ＣＯＶＳ１）、Ａｄ２６ＮＣＯＶ００６、およびＡｄ２６ＮＣＯＶ０２８にわたる用量間比較（データ示さず）を、多重比較のためのボンフェローニ補正を用いたＴｏｂｉｔ　ＡＮＯＶＡのためのｚ検定を用いて実行した。＊＊：ｐ＜０．０１。
【図７８】マウスにおけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質特異的細胞応答を示す図である；ペプチドプール１および２での刺激からのＳＦＵの合計が示される。脾細胞によるＩＦＮ－γ産生を、ペプチド刺激の１８時間後にＥＬＩＳｐｏｔによって測定した。点線は、培地およびＤＭＳＯと共にインキュベートした、10^6個の刺激されていない脾細胞当たり２００ＩＦＮ－γ　ＳＦＵのＬＬＯＤを示す。ＬＬＯＤまたはそれ未満で応答を有する動物は、白抜きの記号として示される。
【図７９－１】細胞上清におけるサイトカイン濃度を、マルチプレックスＥＬＩＳＡベースの分析によって決定し、比率を計算したことを示す図である。（図７９Ａ）ＩＦＮγ／ＩＬ－４の比率；（図７９Ｂ）ＩＦＮγ／ＩＬ－５の比率；（図７９Ｃ）ＩＦＮγ／ＩＬ－１０の比率。中央値の比率／群は、水平線で示される。Ａｄ２６ＣＯＶＳ１（Ａｄ２６ＮＣＯＶ０３０）とアジュバント添加Ｓタンパク質との間の統計学的差異を、マン－ホイットニーＵ検定によって２倍のボンフェローニ補正を用いて計算した。＊＊＊：ｐ＜０．００１。
【図７９－２】図７９－１と同じ。
【図８０－１】Ｓタンパク質結合ＩｇＧ１およびＩｇＧ２ａ力価をＥＬＩＳＡによって測定したことを示す図である。（図８０Ａ）ＩｇＧ１；（図８０Ｂ）ＩｇＧ２ａ。中央値の応答／群は、水平線で示される。点線は、アッセイのＬＬＯＤおよびＵＬＯＤを示す。ＬＬＯＤまたはそれ未満で、またはＵＬＯＤまたはそれを超えて応答を有する動物は、白抜きの記号として示される。（図８０Ｃ）ＩｇＧ２ａ／ＩｇＧ１力価の比率を計算した。中

央値の応答／群は、水平線で示される。点線は、１のＩｇＧ２ａ／ＩｇＧ１の比率を示す。ＩｇＧ２ａ　ＥＬＩＳＡにおいてＬＬＯＤまたはそれ未満で応答を有する動物は、白抜きの記号として示される。Ａｄ２６ＣＯＶＳ１（Ａｄ２６ＮＣＯＶ０３０）とアジュバント添加Ｓタンパク質との統計的比較を、マン－ホイットニーＵ検定によって２倍のボンフェローニ補正を用いて分析した。＊＊：ｐ＜０．０１。

【図８０－２】図８０－１と同じ。

【図８１－１】（図８１Ａ）ＥＬＩＳＡによって測定した場合のＳタンパク質結合抗体力価を示す図である。（図８１Ｂ）Ｖｅｒｏ　Ｅ６細胞におけるウイルス単離株Ｌｅｉｄｅｎ１（Ｌ－００１）の細胞変性効果（ＣＰＥ）を決定するｗｔＶＮＡによって測定した場合の中和抗体力価。中央値の応答／群は、水平線で示される。下の点線は、ＥＬＩＳＡの場合の１．６９９ｌｏｇ$_{10}$およびｗｔＶＮＡの場合の５．７ｌｏｇ$_{10}$のＬＬＯＤを示す。ＬＬＯＤまたはそれ未満で応答を有する動物は、白抜きの記号として示される。用量間比較を、多重比較のためのボンフェローニの調整と共に、ＡＮＯＶＡ（ＥＬＩＳＡ）からのｔ検定、およびコクラン－マンテル－ヘンツェル検定（ｗｔＶＮＡ）を用いて実行した。

【図８１－２】図８１－１と同じ。

【図８２】ＥＬＩＳｐｏｔによってペプチド刺激の１８時間後に測定されたＰＢＭＣによるＩＦＮ－γ産生を示す図である。ペプチドプール１および２での刺激からのＳＦＵの合計が示される。点線は、培地およびＤＭＳＯと共にインキュベートされた刺激されていない細胞からのＳＦＵの９５位のパーセンタイルとして計算された１０^{6}個のＰＢＭＣ当たり４．５ＩＦＮ－γ　ＳＦＵのＬＯＢを示す。ＬＯＢまたはそれ未満で応答を有する動物は、白抜きの記号として示される。用量間比較を、多重比較のためのボンフェローニ補正を用いたＡＮＯＶＡからのｔ検定を用いて実行した。

【図８３】（図８３Ａ）ＥＬＩＳＡによって測定した場合のＳタンパク質結合抗体力価を示す図である。Ａｄ２６．空試料Ｎ＝１８。（図８３Ｂ）Ｖｅｒｏ　Ｅ６細胞におけるウイルス単離株Ｌｅｉｄｅｎ１（Ｌ－００１）の細胞変性効果（ＣＰＥ）を決定するｗｔＶＮＡによって測定した場合の中和抗体力価。Ａｄ２６．空群は、群７（Ｎ＝６）および群８（Ｎ＝６）からの２つのプールした血清群として示される。中央値の応答／群は、水平線で示される。点線は、ＬＬＯＤを示す。ＬＬＯＤまたはそれ未満で応答を有する動物は、白抜きの記号として示される。ＥＬＩＳＡデータ比較を、マン－ホイットニーＵ検定によって、Ａｄ２６ＣＯＶＳ１（Ａｄ２６ＮＣＯＶ０３０）とＡｄ２６．空との間で用量ごとに実行した。多重比較のための補正はなされなかった。＊＊＊：ｐ＜０．００１。

【図８４】プラークアッセイによって測定された複製能を有するウイルス（肺１グラム当たりのＴＣＩＤ$_{50}$）を示す図である。中央値のウイルス量／群は、水平線で示される。ＬＬＯＤまたはそれ未満で応答を有する動物は、白抜きの記号として示される。マン－ホイットニーＵ検定によって、Ａｄ２６．空群およびＡｄ２６ＣＯＶＳ１（Ａｄ２６ＮＣＯＶ０３０）およびＡｄ２６ＮＣＯＶ００６群の間で比較を実行した。多重比較のための補正はなされなかった。＊＊：ｐ＜０．０１。

【図８５】負荷に関する［Ｃ］０日目の負荷前とＣ４日目の負荷後４日に測定された体重を示す。体重における相対変化は、Ｃ０日目に対する体重％として表される。体重／群における中央値の変化は、水平線で示される。ＡＮＯＶＡからのｔ検定によって、Ａｄ２６．空群およびＡｄ２６ＣＯＶＳ１（Ａｄ２６ＮＣＯＶ０３０）およびＡｄ２６ＮＣＯＶ００６群の間で比較を実行した。多重比較のための補正はなされなかった。＊＊＊：ｐ＜０．００１；＊＊：ｐ＜０．０１；＊：ｐ＜０．０５。

【図８６－１】（図８６Ａ）ＥＬＩＳＡによって測定した場合のＳタンパク質結合抗体力価を示す図である。（図８６Ｂ）ｐｐＶＮＡによって測定した場合の中和抗体力価。（図８６Ｃ）Ｖｅｒｏ　Ｅ６細胞においてインキュベートされた、ルシフェラーゼおよびＧＦＰを発現するように設計されたシアトル・ワシントン単離株を使用してｗｔＶＮＡによって測定した場合の中和抗体力価。力価を、Ｎａｎｏ－Ｇｌｏルシフェラーゼアッセイシステムによって測定した。（図８６Ｄ）ＥＬＩＳｐｏｔによって測定した場合のＳＡＲＳ－

ＣｏＶ－２ペプチドで刺激されたＰＢＭＣのＩＦＮ－γ産生。ペプチドプール１および２での刺激からのＳＦＵの合計が示される。点線は、10^6個のＰＢＭＣ当たり５０ＩＦＮ－γ　ＳＦＵのＬＯＢを示す。ＬＯＢまたはそれ未満で応答を有する動物は、白抜きの記号として示される。中央値の応答／群は、水平線で示される。点線は、ＥＬＩＳＡについて２５、ｐｐＶＮＡについて２０、およびｗｔＶＮＡについて４のＬＬＯＤを示す。ＬＬＯＤまたはそれ未満で応答を有する動物は、白抜きの記号として示される。ｐｐＶＮＡ＝偽タイプ化ウイルス中和アッセイ；ＳＦＵ＝スポット形成単位；ｖｐ＝ウイルス粒子；ｗｔＶＮＡ＝野生型ウイルス中和アッセイ。

【図８６－２】図８６－１と同じ。

【図８７】抗ＳＡＲＳポリクローナル抗体を使用した細胞溶解産物におけるｔＰＡ．Ｓ（レーン１）、ｔＰＡ．Ｓ．ＰＰ（レーン２）、Ｓ（レーン３）、Ｓ．ｄＣＴ（レーン４）、ｔＰＡ．ＷＴ．Ｓ（レーン５）、Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰ（レーン６）、およびＳ．ＰＰ（レーン７）をコードするＡｄ２６ベクターからの発現のウエスタンブロット分析を示す図である。

【図８８－１】ワクチン接種されたアカゲザルにおける体液性免疫応答を示す図である。体液性免疫応答を、０、２、および４週目に、（図８８Ａ）ＲＢＤ特異的結合抗体ＥＬＩＳＡ、および（図８８Ｂ）偽ウイルス中和アッセイによって評価した。赤色の（実線）バーは、中央値の応答を反映する。

【図８８－２】図８８－１と同じ。

【図８８－３】図８８－１と同じ。

【図８９－１】ワクチン接種されたアカゲザルにおける細胞性免疫応答を示す図である。プールしたＳペプチドへの応答における（図８９Ａ）ＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイおよび（図８９Ｂ）ＩＦＮ－γ＋ＣＤ４＋およびＩＦＮ－γ＋ＣＤ８＋Ｔ細胞の細胞内サイトカイン染色アッセイによる免疫化後の４週目に、細胞性免疫応答を評価した。赤色の（実線）バーは、中央値の応答を反映する。

【図８９－２】図８９－１と同じ。

【図９０－１】ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷後のアカゲザルにおけるウイルス量を示す図である。アカゲザルを、1.2×10^8ＶＰ（1.1×10^4ＰＦＵ）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２で、鼻腔内および気管内経路によって負荷した。（図９０Ａ、図９０Ｂ）Log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍｌ（５０コピー／ｍｌが限界）を、負荷後のシャム対照およびワクチン接種された動物において、気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬ）で評価した。（図９０Ｃ、図９０Ｄ）Log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／スワブ（５０コピー／スワブが限界）を、負荷後のシャム対照およびワクチン接種された動物において、鼻スワブ（ＮＳ）で評価した。赤色の線は、中央値を反映する。

【図９０－２】図９０－１と同じ。

【図９０－３】図９０－１と同じ。

【図９１】ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷後のピークウイルス量の要約を示す図である。負荷後のＢＡＬおよびＮＳにおけるピークウイルス量。ピークウイルス量は、負荷後の１～４日目に可変的に発生した。赤色の線は、中央値のウイルス量を反映する。Ｐ値は、両側マン－ホイットニー検定を示す（＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．００１、＊＊＊Ｐ＜０．０００１）。

【図９２】ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷後の免疫応答を示す図である。負荷前および負荷後の１４日目における偽ウイルスＮＡｂ力価。赤色のバーは、中央値の応答を反映する。

【図９３】ワクチン接種されたマカクならびに回復期マカクおよびヒトにおける偽ウイルスＮＡｂ力価の比較を示す図である。Ａｄ２６．Ｓ．ＰＰがワクチン接種されたマカクにおける偽ウイルスＮＡｂの、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染から回復した回復期マカクおよび回復期ヒトのこれまでに報告されたコホートとの比較。

【図９４】ワクチン接種されたアカゲザルにおけるＢＡＬにおける体液性免疫応答を示す図である。シャム対照およびＡｄ２６．Ｓ．ＰＰがワクチン接種された動物における、ＥＬＩＳＡによるＢＡＬにおける４週目のＳ特異的なＩｇＧおよびＩｇＡ。赤色のバーは、

中央値の応答を反映する。
【図９５】ワクチン接種されたアカゲザルにおける細胞性免疫応答。Ａｄ２６．Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰおよびＡｄ２６．Ｓ．ＰＰがワクチン接種された動物における、プールしたＳペプチドへの応答におけるＩＦＮ－γ＋、ＩＬ－２＋、ＩＬ－４＋、およびＩＬ－１０＋ＣＤ４＋Ｔ細胞の細胞内サイトカイン染色アッセイ。赤色のバーは、中央値の応答を反映する。
【図９６－１】（図９６Ａ）負荷後の中央値のパーセント重量変化を示す図である。数値は、各タイムポイントにおける動物の数を反映する。高用量群において、４匹の動物を２日目に検死し、４匹の動物を４日目に検死し、４匹の動物は６日目に安楽死基準を満たし、２匹の動物は、７日目に安楽死基準を満たした。（図９６Ｂ）個々の動物における負荷後のパーセント重量変化。中央値の体重の減少は赤色で描写される。星印は死亡率を示す。灰色の線は、２日目および４日目に計画的に検死された動物を示す。（図９６Ｃ）２日目および４日目における計画的な検死における、ならびに６～７日目における安楽死基準を満たした６匹の動物のうち２～５匹における、組織１グラム当たりの$\log_{10}$のＲＮＡコピー（定量限界１００コピー／ｇ）によって測定した場合の組織ウイルス量。６日目に、拡大増殖した組織は回収しなかった。
【図９６－２】図９６－１と同じ。
【図９７】ハムスターにおける高用量ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染の病理学的な特徴を示す図である。（図９７Ａ）鼻甲介における壊死および炎症（矢印）、Ｈ＆Ｅ（２日目）。（図９７Ｂ）内腔における死細胞片および変性性好中球での細気管支上皮の壊死（矢印）および血管壁における炎症細胞の遊出（矢じり）、Ｈ＆Ｅ（２日目）。（図９７Ｃ）間質性肺炎、出血、および肺実質の硬化、Ｈ＆Ｅ（２日目）。（図９７Ｄ）鼻甲介上皮は、ＩＨＣによってＳＡＲＳ－ＣｏＶ－Ｎの強い陽性率を示す（２日目）。（図９７Ｅ）細気管支上皮および管腔の死細胞片は、ＩＨＣによってＳＡＲＳ－ＣｏＶ－Ｎの強い陽性率を示す（２日目）。（図９７Ｆ）肺細胞および肺胞中隔は、ＩＨＣによってＳＡＲＳ－ＣｏＶ－Ｎの多病巣性の強い陽性率を示す（２日目）。（図９７Ｇ）肺間質内（矢印、間質性肺炎）および細気管支上皮内（矢じり；２日目）のＲＮＡｓｃｏｐｅによるびまん性ｖＲＮＡ染色。（図９７Ｈ）肺間質内のＲＮＡｓｃｏｐｅによるびまん性ｖＲＮＡ染色（４日目）。（図９７Ｉ）肺間質内のＩｂａ－１　ＩＨＣ（マクロファージ）（７日目）。（図９７Ｊ）肺間質内のＣＤ３＋Ｔリンパ球、ＣＤ３　ＩＨＣ（４日目）。（図９７Ｋ）間質性好中球の存在を示すＭＰＯ（好中球ミエロペルオキシダーゼ）ＩＨＣ（７日目）。（図９７Ｌ）インターフェロン誘導性遺伝子、ＭＸ１、ＩＨＣは、肺全体で強く広汎性の陽性率を示す（４日目）。Ｈ＆Ｅ、ヘマトキシリンおよびエオシン；ＩＨＣ、免疫組織化学；Ｉｂａ１、イオン化カルシウム結合アダプタータンパク質１。代表的な断片が示される。実験は、類似の結果で少なくとも３回繰り返された。スケールバー＝２０μｍ（ｂ、ｄ）；５０μｍ（ａ、ｅ、ｆ）；１００μｍ（ｃ、ｇ～ｌ）。
【図９８－１】ワクチン接種されたハムスターにおける体液性免疫応答を示す図である。（図９８Ａ）どちらもフューリン切断部位の突然変異と２つのプロリンを安定化する突然変異を有する、（ｉ）フォールドン三量体化ドメインを有する可溶性エクトドメインを反映する膜貫通領域および細胞質内の尾部の欠失（Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰ）または（ｉｉ）全長Ｓ（Ｓ．ＰＰ）を有するＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク（Ｓ）免疫原。赤色のＸは、フューリン切断部位の突然変異を描写し、赤色の垂直線は、プロリン突然変異を描写し、白抜きの四角は、フォールドン三量体化ドメインを描写する。Ｓ１およびＳ２は、Ｓタンパク質の第１および第２のドメインを表し、ＴＭは、膜貫通領域を描写し、ＣＴは、細胞質内ドメインを描写する。ハムスターに、10^{10}ｖｐまたは10^{9}ｖｐのＡｄ２６－Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰまたはＡｄ２６－Ｓ．ＰＰまたはシャム対照をワクチン接種した（Ｎ＝１０／群）。体液性免疫応答を、０、２、および４週目に、（図９８Ｂ）ＲＢＤ特異的結合抗体ＥＬＩＳＡおよび（図９８Ｃ）偽ウイルス中和アッセイによって評価した。赤色のバーは、中央値の応答を反映する。点線は、定量のアッセイ限界を反映する。（図９８Ｄ）４週目におけるＳおよびＲＢＤ特異的ＩｇＧサブクラス、ＦｃγＲ、ならびにＡＤＣＤ応答は

、レーダープロットとして示される。くさびの大きさと色の強度は、対応する群の特徴の中央値を示す（抗体サブクラス、赤色；ＦｃγＲ結合、青色；ＡＤＣＤ、緑色）。（図９８Ｅ）ワクチン接種群にわたる多変量の抗体プロファイルを示す主成分分析（ＰＣＡ）プロット。各ドットは動物を表し、ドットの色は群を意味し、楕円は、多変量の正常分布を仮定した７０％の信頼水準としての群の分布を示す。（図９８Ｆ）ヒートマップは、ワクチン群Ｓ．ＰＰとＳ．ｄＴＭ．ＰＰとの間の特徴のｚスコアの平均における差を示す。２つの群を両側マン－ホイットニー検定によって比較した。星印は、ベンジャミニ－ホッホベルグ補正したｑ値を示す（＊ｑ＜０．０５、＊＊ｑ＜０．０１、＊＊＊ｑ＜０．００１）。

【図９８－２】図９８－１と同じ。

【図９８－３】図９８－１と同じ。

【図９８－４】図９８－１と同じ。

【図９８－５】図９８－１と同じ。

【図９９－１】高用量ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷後のハムスターにおける臨床疾患を示す図である。（図９９Ａ）負荷後の中央値のパーセント重量変化。（図９９Ｂ）個々の動物における負荷後のパーセント重量変化。中央値の体重の減少は赤色で描写される。星印は死亡率を示す。灰色の線は、４日目に計画的な検死を受けた動物を示す。（図９９Ｃ）４日目に検死した動物を除いた、組み合わされたＡｄ２６－Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰ（Ｎ＝１４）、Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰ（Ｎ＝１４）、およびシャム対照（Ｎ＝７）群における最大の体重の減少。Ｐ値は、両側マン－ホイットニー検定を示す。Ｎは、体重の減少について追跡され、４日目に検死されなかったすべての動物を反映する。

【図９９－２】図９９－１と同じ。

【図９９－３】図９９－１と同じ。

【図１００－１】肺におけるウイルス複製および関連炎症の長期的な定量的画像分析を示す図である。（図１００Ａ）ＲＮＡｓｃｏｐｅ　ＩＳＨによるアンチセンスＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスＲＮＡ（ｖＲＮＡ）の陽性のパーセント肺面積。（図１００Ｂ）ＩＨＣによるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－Ｎタンパク質（核または細胞質内）陽性の総細胞のパーセンテージ。（図１００Ｃ）ＩＨＣによる単位面積当たりのＩｂａ－１陽性細胞。（図１００Ｄ）単位面積当たりのＣＤ３陽性細胞。（図１００Ｅ）単位面積当たりのＭＰＯ陽性細胞。（図１００Ｆ）総肺面積の比率としてのＭＸ１陽性肺組織のパーセンテージ。ＩＳＨ、インサイチュハイブリダイゼーション；ＩＨＣ、免疫組織化学；ＳＡＲＳ－Ｎ、ＳＡＲＳ－ＣｏＶヌクレオカプシド；ＭＰＯ、ミエロペルオキシダーゼ；ＭＸ１、ミクソウイルスタンパク質１（１型インターフェロン誘導性遺伝子）。各ドットは、１匹の動物を表す。

【図１００－２】図１００－１と同じ。

【図１００－３】図１００－１と同じ。

【図１００－４】図１００－１と同じ。

【図１０１】ベルギーおよび米国の拠点に参加者を同時に登録したことを示す図である。参加者を、５つのワクチン接種群のうち１つに対して１：１：１：１：１の比率で平行してランダム化して、５×10^{10}ｖｐまたは１×10^{11}ｖｐのいずれかの２用量レベルでのＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓまたはプラセボの１または２回のＩＭ注射を与えた。各コホートにつき、１回目のワクチン接種が５人のセンチネル参加者（１用量レベルおよび１つのプラセボ当たり１人）に投与された２４時間後に臨床的に有意な発見がなかったとき、すべての群にわたり別の１０人の参加者にワクチン接種を行った。次いで、残りの参加者をランダム化する前に、２８日目までの安全性データを内部データ審査委員会によって再調査した。

【図１０２－１】コホート１ａ（図１０２Ａ）、コホート１ｂ（図１０２Ｂ）およびコホート３（図１０２Ｃ）のフローチャートを示す図である。

【図１０２－２】図１０２－１と同じ。

【図１０２－３】図１０２－１と同じ。

【図１０３－１】体液性および細胞性免疫応答を示す図である。（図１０３Ａ）コホート

１ａおよび３における、スケジュールに従った、すべての参加者間での、ベースライン時およびワクチン接種後２９日における、ＥＬＩＳＡによって測定された（ＥＬＩＳＡ単位／ｍＬ［ＥＵ／ｍＬ］）、血清ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２結合抗体のＬｏｇ相乗平均力価（ＧＭＴ、水平のバーと各タイムポイントの下の数字によって例示される通り）。点線は、アッセイの定量下限（ＬＬＯＱ）および定量上限（ＵＬＯＱ）を示し、エラーバーは、９５％信頼区間（ＣＩ）を示す。ＬＬＯＱ未満の値の場合、ＬＬＯＱ／２値をプロットした。（図１０３Ｂ）コホート１ａおよび３における、スケジュールに従った、参加者のサブセット間での、ベースライン時におよびワクチン接種後２９日における、５０％マイクロ中和アッセイ（ID_{50}Ｌｏｇ　ＧＭＴ、水平のバーおよび各タイムポイントの下の数字によって例示される通り）によって測定された、血清ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和抗体のＬｏｇ　ＧＭＴ。点線は、アッセイのＬＬＯＱおよびＵＬＯＱを示し、エラーバーは、９５％ＣＩを示す。ＬＬＯＱ未満の値の場合、ＬＬＯＱ／２値をプロットした。（図１０３Ｃ）ＣＤ４　Ｔ細胞によるＴｈ１（ＩＦＮγおよび／またはＩＬ－２であり、ＩＬ－４、ＩＬ－５およびＩＬ－１３ではない）、およびＴｈ２（ＩＬ－４および／またはＩＬ－５および／またはＩＬ－１３ならびにＣＤ４０Ｌ）サイトカインの発現を、細胞内サイトカイン染色（ＩＣＳ）によって測定した。スケジュールに従った、コホート１ａおよび３からの参加者のサブセット間での、ベースライン時およびワクチン接種後１５日における、末梢血単核細胞における、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質ペプチドプールへの中央値（水平のバーおよび各タイムポイントの下の数字によって例示される通り）および個々のＩＣＳ応答。パーセントは、Ｔｈ１またはＴｈ２サイトカインについて陽性のＴ細胞のパーセンテージを意味する。点線は、ＬＬＯＱを示す。（図１０３Ｄ）ＣＤ８　Ｔ細胞によるＩＦＮγおよび／またはＩＬ－２サイトカインの発現を、ＩＣＳによって測定した。スケジュールに従った、コホート１ａおよび３からの参加者のサブセット間での、ベースライン時およびワクチン接種後１５日における、末梢血単核細胞における、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質ペプチドプールへの中央値（水平のバーおよび各タイムポイントの下の数字によって例示される通り）および個々のＩＣＳ応答。パーセントは、ＩＦＮγおよび／またはＩＬ－２サイトカインについて陽性のＣＤ８　Ｔ細胞のパーセンテージを意味する。点線は、ＬＬＯＱを示す。

【図１０３－２】図１０３－１と同じ。

【図１０３－３】図１０３－１と同じ。

【図１０４】長期にわたるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対するＶＮＡ応答のグラフ表示（対応する９５％ＣＩを用いた相乗平均力価［ＧＭＴ］）を示す図である。

【図１０５－１】２９日目までの中和抗体応答への年齢の作用を描写する図である。

【図１０５－２】図１０５－１と同じ。

【図１０６】研究コホートにおける中和抗体応答および応答者率を描写する図である。

【図１０７】5×10^{10}ｖｐワクチン群および1×10^{11}ｖｐワクチン群の逆の累積度数分布曲線を描写する図である。

【図１０８】ＥＬＩＳＡによって測定した場合のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質結合抗体応答のグラフ表示である。

【図１０９－１】２９日目における結合抗体応答への年齢の作用を描写する図である。

【図１０９－２】図１０９－１と同じ。

【図１１０】ＥＬＩＳＡによって測定した場合のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質結合抗体応答のグラフ表示である。

【図１１１－１】5×10^{10}ｖｐワクチン群および1×10^{11}ｖｐワクチン群の逆の累積度数分布曲線を描写する図である。

【図１１１－２】図１１１－１と同じ。

【図１１２－１】ｗｔＶＮＡ力価が１５日目および２９日目の両方においてＥＬＩＳＡ力価と高度に相関していたことを示す図であり、スピアマン相関係数はそれぞれ０．７３４および０．７２であった。

【図１１２－２】図１１２－１と同じ。

【図１１３－１】ＩＦＮγおよび／またはＩＬ－２（Ｔｈ１）を発現し、Ｔｈ２サイトカインを発現しないＣＤ４＋Ｔ細胞、ならびにＩＬ－４および／またはＩＬ－５／ＩＬ－１３およびＣＤ４０Ｌ（Ｔｈ２）を発現するＣＤ４＋Ｔ細胞のパーセンテージを示す図である。
【図１１３－２】図１１３－１と同じ。
【図１１４－１】組み合わされたレジメンのプロファイルを示す図である。
【図１１４－２】図１１４－１と同じ。
【図１１５】ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓペプチド刺激に応答してＩＦＮγおよび／またはＩＬ－２を産生するＣＤ８＋Ｔ細胞の記述統計を示す図である。
【図１１６】組み合わされたレジメンのプロファイルを示す図である。
【図１１７－１】成体アカゲザルにおける１および２用量のＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチンレジメンに対するＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２特異的体液性免疫応答を示す図である。（図１１７Ａ）スパイク（Ｓ）タンパク質結合抗体のレベルを、コーティング抗原として哺乳動物細胞で産生された三量体の可溶性安定化Ｓタンパク質を使用して、ヒト試料のための適格なＥＬＩＳＡで長期にわたり測定した。個々の動物レベルは灰色のポイントで描写され、対になる測定は灰色の線で接続した。結合抗体応答の相乗平均力価（ＧＭＴ）／群は、赤色の線で示される。点線は、検出下限（ＬＬＯＤ）および定量下限（ＬＬＯＱ）を示す。（図１１７Ｂ）Ｓタンパク質中和抗体レベルを、改変された水疱性口内炎ウイルス（ＶＳＶΔＧ）主鎖から作製され、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のＳ糖タンパク質を有する偽タイプ化ウイルス粒子を使用して、ヒト試料のための適格なｐｓＶＮＡで長期にわたり測定した。中和抗体応答は、５０％中和が達成される試料の希釈率（IC_{50}）の逆数として測定される。個々の動物レベルは灰色のポイントで描写され、対になる測定は灰色の線で接続した。中和抗体応答のＧＭＴ／群は、赤色の線で示される。点線は、ＬＬＯＤおよびＬＬＯＱを示す。（図１１７Ｃ）シャム対照群および０週目（ベースライン）を除いた、すべての群およびタイムポイントごとの動物１匹当たりのＳ特異的結合抗体のレベルと中和抗体力価との相関。点線は、各アッセイにおけるＬＬＯＤを示す。
【図１１７－２】図１１７－１と同じ。
【図１１７－３】図１１７－１と同じ。
【図１１８－１】老化したアカゲザルのワクチン接種後のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２特異的体液性および細胞性免疫応答を示す図である。（図１１８Ａ）スパイク（Ｓ）タンパク質結合抗体のレベルを、コーティング抗原として哺乳動物細胞で産生された三量体の可溶性安定化Ｓタンパク質を使用して、ヒト試料のための適格なＥＬＩＳＡで長期にわたり測定した。個々の動物レベルは灰色のポイントで描写され、対になる測定は灰色の線で接続した。結合抗体応答の相乗平均力価（ＧＭＴ）／群は、赤色の線で示される。点線は、検出下限（ＬＬＯＤ）および定量下限（ＬＬＯＱ）を示す。（図１１８Ｂ）ｗｔＶＮＡによって測定した場合の長期にわたるＳＡＲＳ－Ｃｏｖ－２中和抗体力価。個々の動物レベルは灰色のポイントで描写され、対になる測定は灰色の線で接続した。ＧＭＴ／群は、赤色の線で示される。点線は、ＬＬＯＤを示す。（図１１８Ｃ）シャム対照群および０週目を除いた、すべての群およびタイムポイントにわたる動物１匹当たりのＳ特異的結合抗体のレベルと中和抗体力価との相関。点線は、各アッセイにおけるＬＬＯＤを示す。
【図１１８－２】図１１８－１と同じ。
【図１１９－１】老化したアカゲザルのワクチン接種後のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２特異的細胞性免疫応答を示す図である。（図１１９Ａ）示されたタイムポイントでＩＦＮ－γ／ＩＬ－４ダブルカラーＥＬＩＳｐｏｔを用いて測定した場合のスパイク（Ｓ）タンパク質特異的Ｔ細胞応答。相乗平均力価（ＧＭＴ）応答／群は、水平線で示される。バックグラウンドを差し引いた数が０未満または０に等しい試料を、可視化目的で１０に設定し、点線によって示した。（図１１９Ｂ）示されたタイムポイントで細胞内サイトカイン染色によって測定した場合のスパイク（Ｓ）タンパク質特異的Ｔ細胞応答。サイトカインを発現するＣＤ４＋ＣＤ６９＋Ｔ細胞の頻度。相乗平均力価（ＧＭＴ）応答／群は、水平線で示される。点線は、技術的な閾値を示す。白抜きの記号は、技術的な閾値における試料を意味

する。（図１１９Ｃ）Ｔｈ１（ＩＦＮ－γまたはＩＬ－２）またはＴｈ２（ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－１３）サイトカインを発現するＣＤ４＋ＣＤ６９＋Ｔ細胞の比率。相乗平均力価（ＧＭＴ）応答／群は、水平線で示される。白抜きの記号は、技術的な閾値におけるＴｈ１、Ｔｈ２またはいずれかのサイトカインを発現する細胞のいずれかの値を意味する。点線の水平線は、可視化目的で１の比率に設定される。

【図１１９－２】図１１９－１と同じ。

【図１１９－３】図１１９－１と同じ。

【図１１９－４】図１１９－１と同じ。

【図１１９－５】図１１９－１と同じ。

【図１１９－６】図１１９－１と同じ。

【図１１９－７】図１１９－１と同じ。

【図１２０－１】示されたタイムポイントで細胞内サイトカイン染色によって測定した場合のスパイク（Ｓ）タンパク質特異的Ｔ細胞応答を示す図である。サイトカインを発現するＣＤ８＋ＣＤ６９＋Ｔ細胞の頻度。相乗平均力価（ＧＭＴ）応答／群は、水平線で示される。点線は、技術的な閾値を示す。白抜きの記号は、技術的な閾値における試料を意味する。

【図１２０－２】図１２０－１と同じ。

【図１２０－３】図１２０－１と同じ。

【図１２０－４】図１２０－１と同じ。

【図１２０－５】図１２０－１と同じ。

【図１２１－１】コホート１ａ（１８～５５歳）（図１２１Ａ）およびコホート３（＞６５歳）（図１２１Ｂ）における、スケジュールに従った、すべての参加者の間でのベースライン時およびワクチン接種後２９日目における、およびコホート１ａに利用可能な参加者の５７日目および７１日目における、ＥＬＩＳＡによって測定した場合の（ＥＬＩＳＡ単位／ｍＬ［ＥＵ／ｍＬ］）、血清中のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質結合抗体のＬｏｇ相乗平均力価（ＧＭＴ、水平のバーおよび各タイムポイントの下の数字によって例示される通り）を示す図である。点線は、アッセイの定量下限（ＬＬＯＱ）および定量上限（ＵＬＯＱ）を示し、エラーバーは、９５％信頼区間（ＣＩ）を示す。ＬＬＯＱ未満の値の場合、ＬＬＯＱ／２値をプロットした。 コホート１ａ（１８～５５歳）（図１２１Ｃ）およびコホート３（＞６５歳）（図１２１Ｄ）における、スケジュールに従った、ベースライン時における、ならびにワクチン接種後２９日目、５７日目および７１日目における、参加者のサブセット間での、５０％中和アッセイ（ＩＣ５０ Ｌｏｇ ＧＭＴ－水平のバーおよび各タイムポイントの下の数字によって例示される通り）によって測定された、血清ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和抗体のＬｏｇ ＧＭＴ（ｗｔＶＮＡ）。点線は、ワクチン試料に使用される現行の事前希釈を用いて実行されたアッセイのＬＬＯＱおよびＵＬＯＱを示し、エラーバーは、９５％ＣＩを示す。ＬＬＯＱ未満の値の場合、ＬＬＯＱ／２値をプロットした。

【図１２１－２】図１２１－１と同じ。

【図１２１－３】図１２１－１と同じ。

【図１２１－４】図１２１－１と同じ。

【図１２２－１】コホート１ａ（１８～５５歳）の、スケジュールに従った、参加者のサブセット間での、ベースライン時における、ならびにワクチン接種後２９日目、５７日目および７１日目における、ならびにコホート３（＞６５歳）の、ワクチン接種後１日目、１５日目および２９日目における、８０％中和アッセイ（ＩＣ８０ Ｌｏｇ ＧＭＴ－黒色のドットおよび各タイムポイントの下の数字によって例示される通り）によって測定された血清ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和抗体のＬｏｇ ＧＭＴ（ｗｔＶＮＡ）を示す図である。

【図１２２－２】図１２２－１と同じ。

【図１２２－３】図１２２－１と同じ。

【図１２２－４】図１２２－１と同じ。

【図１２２－５】図１２２－１と同じ。

【図１２２－６】図１２２－１と同じ。
【図１２３】Ａｄ２６およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和抗体力価間の相関プロットを示す図である：ベースラインＡｄ２６　ＶＮＡベースライン対２９日目のｗｔＶＮＡ、および５７日目のＡｄ２６　ＶＮＡ対７１日目のｗｔＶＮＡ。
【図１２４－１】ＣＤ４＋Ｔ細胞による、Ｔｈ１（ＩＦＮ－γおよび／またはＩＬ－２を発現するが、ＩＬ－４、ＩＬ－５およびＩＬ－１３を発現しない）（図１２４Ａ）、およびＴｈ２（ＩＬ－４および／またはＩＬ－５および／またはＩＬ－１３ならびにＣＤ４０Ｌ）（図１２４Ｂ）サイトカインの発現を、細胞内サイトカイン染色（ＩＣＳ）によって測定したことを示す図である。スケジュールに従った、コホート１ａ（１８～５５歳）およびコホート３（＞６５歳）からの参加者のサブセット間での、ベースライン時およびワクチン接種後１５日における、末梢血単核細胞における、中央値（水平のバーおよび各タイムポイントの下の数字によって例示される通り）およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質ペプチドプールに対する個々のＩＣＳ応答が示される。Ｙ軸は、Ｔｈ１またはＴｈ２サイトカインについて陽性のＴ細胞のパーセンテージを意味する。点線は、ＬＬＯＱを示す。ＬＬＯＱ未満の値をＬＬＯＱ／２としてプロットした。　（図１２４Ｃ）ＣＤ８＋Ｔ細胞によるＩＦＮ－γおよび／またはＩＬ－２サイトカインの発現を、ＩＣＳによって測定した。スケジュールに従った、コホート１ａ（１８～５５歳）およびコホート３（＞６５歳）からの参加者のサブセット間での、ベースライン時およびワクチン接種後１５日における、末梢血単核細胞における、中央値（水平のバーおよび各タイムポイントの下の数字によって例示される通り）およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質ペプチドプールに対する個々のＩＣＳ応答が示される。Ｙ軸は、ＩＦＮ－γおよび／またはＩＬ－２サイトカインについて陽性のＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージを意味する。点線は、ＬＬＯＱを示す。ＬＬＯＱ未満の値をＬＬＯＱ／２としてプロットした。
【図１２４－２】図１２４－１と同じ。
【図１２４－３】図１２４－１と同じ。
【図１２５】ｓＰＥＲ．Ｃ６およびＰＥＲ．Ｃ６ＴｅｔＲ細胞におけるＡｄ２６ＮＣＯＶ０３０（ＪＮＪ７８４３６７３５）およびＡｄ２６ＮＣＯＶ０２８精製材料の相対的な生産性を示す図である。　Ａ）．ｓＰＥＲ．Ｃ６細胞Ｂ）ｓＰＥＲ．Ｃ６ＴｅｔＲ細胞。振盪フラスコ中で、細胞を、Ａｄ２６ベクターの精製材料（７０または３００ＶＰ／細胞）で形質導入した。感染後０、１、２、３、および４日に試料を採取し、ベクター粒子濃度をＶＰ－ｑＰＣＲによって測定した。標準対照（Ａｄ２６．ＺＥＢＯＶ）および低対照（２６ＺＩＫ００１）。ＶＰ、ウイルス粒子；ｑＰＣＲ、定量的ポリメラーゼ連鎖反応；ＴｅｔＲ、テトラサイクリンリプレッサー。
【図１２６－１】シリアンハムスターにおけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷用量の滴定および組織病理の特徴付けを示す図である。シリアンハムスター（Ｎ＝１２／群）に、10^{2}、$10^{3\cdot3}$、$10^{4\cdot6}$または$10^{5\cdot9}$ＴＣＩＤ$_{50}$のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ベータＣｏＶ／ミュンヘン／ＢａｖＰａｔ１／２０２０を鼻腔内に接種するか、またはＶｅｒｏ　Ｅ６細胞上清を擬似接種した。２、３、４、および７日ｐ．ｉ．に１日１回喉スワブを採取し、ハムスター３匹／群を　　殺し、分析および組織病理のために鼻および肺組織を収集した。（図１２６Ａ）肺組織、（図１２６Ｂ）鼻組織、および（図１２６Ｃ）喉スワブにおける複製能を有するウイルス量を、Ｖｅｒｏ　Ｅ６細胞でＴＣＩＤ$_{50}$アッセイによって決定した。ＬＬＯＤを、動物１匹当たり、組織１グラムまたはミリリットル当たりで計算した。ＬＬＯＤまたはそれ未満で応答を有する動物は、白抜きの記号として示される。（図１２６Ｄ）肺組織を、肺胞炎、肺胞のダメージ、肺胞浮腫、肺胞出血、ＩＩ型肺細胞過形成、気管支炎、細気管支炎、気管支周囲および血管周囲のカフィングの存在および重症度に関して分析およびスコア付けした。スコアの合計は、ＬＲＴ疾患パラメーターの合計として提示される（可能な範囲：０～２４）。（図１２６Ｅ）鼻組織を分析し、鼻炎の重症度に関して０から３のスケールでスコア付けした。点線は、組織病理学の最小および最大スコアを示す。中央値の応答／群は、水平線で示され、パネルｃにおけるエラーバーは、範囲を示す。ｐ．ｉ．＝接種後；ＬＬＯＤ＝検出下限；ＬＲＴ＝下気道；Ｎ＝動物の

数；ＴＣＩＤ５０／ｇ＝組織１グラム当たりの５０％組織培養感染量；ＴＣＩＤ５０／ｍｌ＝試料１ミリリットル当たりの５０％組織培養感染量；ｖｐ＝ウイルス粒子。
【図１２６－２】図１２６－１と同じ。
【図１２６－３】図１２６－１と同じ。
【図１２７－１】シリアンハムスターにおける１および２用量のＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチンレジメンによって惹起されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和抗体応答を示す図である。（図１２７Ａ）シリアンハムスターを、10^9または10^{10}ＶＰ（Ｎ＝１２／用量のレベル）のＡｄ２６ベースのワクチン候補、または対照として10^{10}ｖｐの遺伝子挿入がないＡｄ２６ベクター（Ａｄ２６．空、Ｎ＝６）のいずれかで免疫化した。免疫化の４週間後に１群当たり半分のハムスターが同じＡｄ２６ベースのワクチン候補での第２の免疫化を受けた（Ｎ＝６／群）。（図１２７Ｂ）用量１の４週間後にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和力価を測定し、（図１２７Ｃ）用量２の４週間後に、野生型ＶＮＡによって、Ｖｅｒｏ　Ｅ６細胞におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の細胞変性効果の阻害を決定した。Ａｄ２６．空で免疫化したシリアンハムスターからの血清を、ネガティブ対照試料のための２つの群にプールした。１群当たりの中央値の応答は、水平線で示される。点線は、ＬＬＯＤを示す。ＬＬＯＤまたはそれ未満で応答を有する動物は、ＬＬＯＤ上に白抜きの記号として表示される。ＣＰＥ＝細胞変性効果；ＬＬＯＤ＝検出下限；ｐ．ｉ．＝接種後；ＶＮＡ＝ウイルス中和アッセイ；ＶＰ＝ウイルス粒子。
【図１２７－２】図１２７－１と同じ。
【図１２８－１】シリアンハムスターにおける１および２用量のＡｄ２６ワクチンレジメンによって惹起された、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質結合抗体応答、および中和抗体応答との比率を示す図である。シリアンハムスターを、10^9または10^{10}ＶＰのＡｄ２６ベースのワクチン候補Ａｄ２６．Ｓ、Ａｄ２６．ｄＴＭ．ＰＰもしくはＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ、または対照として10^{10}ｖｐの遺伝子挿入がないＡｄ２６ベクター（Ａｄ２６．空）のいずれかで免疫化した。免疫化の４週間後に、１群当たり半分のハムスターが同じＡｄ２６ベースのワクチン候補での第２の免疫化を受けた（Ｎ＝６／群）。１回目の免疫化の２および４週間後、ならびに第２の免疫化の１、２および４週間後（それぞれ５、６および８週目）に、血液試料を収集し、血清学分析のために血清を単離した。（図１２８Ａ）２回の免疫化を受けたハムスター（Ｎ＝６／群）のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質特異的抗体結合力価をＥＬＩＳＡによって測定した。（図１２８Ｂ）用量１の４週間後（１回の免疫化を受けたハムスター、Ｎ＝６／群）および（図１２８Ｃ）用量２の４週間後（２回の免疫化を受けたハムスター、Ｎ＝６／群）に中和力価を測定した。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和抗体の結合抗体に対する比率を、ｗｔＶＮＡによって測定した場合の抗体力価を、ＥＬＩＳＡによって測定した場合の抗体力価で割ることによって計算した。ＬＬＯＤまたはそれ未満の中和力価を有する動物は、白抜きの記号として表示される。１群当たりの中央値の応答は、水平線で示される。ＬＬＯＤ＝検出下限；ＥＬＩＳＡ＝酵素結合免疫吸着検定法；ｗｔＶＮＡ＝野生型ウイルス中和アッセイ；ＶＰ＝ウイルス粒子。
【図１２８－２】図１２８－１と同じ。
【図１２９－１】ニュージーランドホワイトウサギにおける２用量のＡｄ２６ワクチンレジメンによって惹起されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質結合抗体応答および中和抗体応答を示す図である。ニュージーランドホワイトウサギを、筋肉内で、5×10^9ｖｐまたは5×10^{10}ｖｐのＡｄ２６．Ｓ、Ａｄ２６．ｄＴＭ．ＰＰ、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ、または生理食塩水の２用量レジメンで免疫化した（図１２９Ａ）。血清を、免疫化前（－３日目）、および１４日目、２１日目、３５日目、４２日目、５６日目、６３日目、７０日目、８４日目、および　　殺時に（９９～１０１日目、グラフ中で１００日目として描写される）にサンプリングした。（図１２９Ｂ）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質特異的抗体結合力価をＥＬＩＳＡによって測定した。（図１２９Ｃ）中和力価を、１４日目、３５日目、５６日目、７０日目および　　殺時に測定した。１群当たりの中央値の応答は、水平線で示され、垂直線は、群の範囲を意味する。ＥＬＩＳＡ＝酵素結

合免疫吸着検定法；ｗｔＶＮＡ＝野生型ウイルス中和アッセイ；ＬＬＯＱ＝定性下限；ＵＬＯＱ＝定性上限；ＬＬＯＤ＝検出下限；ＶＰ＝ウイルス粒子。

【図１２９－２】図１２９－１と同じ。

【図１３０－１】Ａｄ２６ベースのワクチン候補で免疫化されたシリアンハムスターにおけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルス複製からの保護を示す図である。シリアンハムスターを、筋肉内で、Ａｄ２６．Ｓ、Ａｄ２６．ｄＴＭ．ＰＰ、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ、またはＡｄ２６．空（いかなるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２抗原もコードしないＡｄ２６ベクター）の１用量レジメンおよび２用量レジメンで免疫化した。ハムスターは、10^2ＴＣＩＤ$_{50}$のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２株ベータＣｏＶ／ミュンヘン／ＢａｖＰａｔ１／２０２０での鼻腔内接種を用量１後４週間（４週目）または用量２後４週間（８週目）に受けた。（図１３０Ａ、１３０Ｂ）右の肺組織および（図１３０Ｃ、１３０Ｄ）右の鼻甲介を、ウイルス量分析のために４日の接種期間の最後に回収した。複製能を有するウイルスを、ＴＣＩＤ$_{50}$アッセイによって測定した。（図１３０Ｅ、１３０Ｆ）喉スワブ試料を接種後毎日採取し、４日の経過観察中のウイルス量濃度曲線下面積をＴＣＩＤ$_{50}$／ｍｌ×日として計算した。中央値のウイルス量／群は、水平線で示される。動物１匹当たりのＬＬＯＤを計算した。ＬＬＯＤまたはそれ未満で応答を有する動物は、ＬＬＯＤ上の白抜きの記号として示される。マン－ホイットニーＵ検定によって、Ａｄ２６．Ｓ、Ａｄ２６．ｄＴＭ．ＰＰおよびＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ群間で、用量レベルにわたるＡｄ２６．空群との比較を実行した。統計学的差異は星印によって示される：＊：ｐ＜０．０５；＊＊：ｐ＜０．０１。ＬＬＯＤ＝検出下限；ＴＣＩＤ$_{50}$／ｇ＝組織１グラム当たりの５０％組織培養感染量；ＴＣＩＤ５０／ｍｌ＝試料１ｍｌ当たりの５０％組織培養感染量；ＶＰ＝ウイルス粒子。

【図１３０－２】図１３０－１と同じ。

【図１３０－３】図１３０－１と同じ。

【図１３１－１】Ａｄ２６ベースのワクチン候補で免疫化したシリアンハムスターの肺組織におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ＩＨＣおよび組織病理に対する保護を示す図である。シリアンハムスターを、筋肉内で、Ａｄ２６．Ｓ、Ａｄ２６．ｄＴＭ．ＰＰ、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ、またはＡｄ２６．空（いかなるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２抗原もコードしないＡｄ２６ベクター）の１用量レジメンおよび２用量レジメンで免疫化した。ハムスターは、用量１後４週間（４週目）、または用量２後４週間（８週目）に、10^2ＴＣＩＤ$_{50}$のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２株ベータＣｏＶ／ミュンヘン／ＢａｖＰａｔ１／２０２０での鼻腔内接種を受けた。免疫組織化学的ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－ＮＰ染色および組織病理の分析のために、左の肺組織を接種後の４日に単離した。技術的な失敗のために、分析できたのは、１用量のＡｄ２６．空で免疫化された８匹のハムスターのうち２匹の組織のみであった。（図１３１Ａおよび１３１Ｂ）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ＮＰの存在を、免疫組織化学的染色によって決定した。（図１３１Ｃおよび１３１Ｄ）肺組織を、肺胞炎、肺胞のダメージ、肺胞浮腫、肺胞出血、ＩＩ型肺細胞過形成、気管支炎、細気管支炎、気管支周囲および血管周囲のカフィングの存在および重症度に関してスコア付けした。スコアの合計は、ＬＲＴ疾患パラメーターの合計として提示される。中央値スコア／群は、水平線で示される。点線は、ＬＬＯＤを示す。パネルｃを除き、マン－ホイットニーＵ検定によって、用量レベルにわたるワクチン群間でＡｄ２６．空群との比較を実行した。統計学的差異は星印によって示される：＊：ｐ＜０．０５；＊＊：ｐ＜０．０１。ＬＬＯＤ＝検出下限；ＶＰ＝ウイルス粒子；ＮＰ＝ヌクレオカプシドタンパク質；ＩＨＣ＝免疫組織化学；ＬＲＴ＝下気道。

【図１３１－２】図１３１－１と同じ。

【図１３２－１】Ａｄ２６ベースのワクチン候補で免疫化したシリアンハムスターの鼻組織におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ＩＨＣおよび組織病理に対する保護を示す図である。シリアンハムスターを、筋肉内で、Ａｄ２６．Ｓ、Ａｄ２６．ｄＴＭ．ＰＰ、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ、またはＡｄ２６．空（いかなるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２抗原もコードしないＡｄ２６ベクター）の１用量レジメンおよび２用量レジメンで免疫化した。ハムスターは、

用量１後４週間（４週目）、または用量２後４週間（８週目）に、10^2ＴＣＩＤ$_{50}$のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２株ベータＣｏＶ／ミュンヘン／ＢａｖＰａｔ１／２０２０で鼻腔内接種を受けた。免疫組織化学的ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－ＮＰ染色および組織病理の分析のために、左の鼻組織を接種後の４日に単離した。技術的な失敗のために、分析できたのは、１用量のＡｄ２６．空で免疫化された８匹のハムスターのうち５匹の組織のみであった。（図１３２Ａおよび１３２Ｂ）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－ＮＰの存在を、免疫組織化学的染色によって決定した。（図１３２Ｃおよび１３２Ｄ）鼻組織を、鼻炎の重症度に関してスコア付けした。中央値スコア／群は、水平線で示される。点線は、ＬＬＯＤを示す。マン－ホイットニーＵ検定によって、用量レベルにわたるワクチン群間のＡｄ２６．空群との比較を実行した。統計学的差異は星印によって示される：＊：ｐ＜０．０５；＊＊：ｐ＜０．０１。ＬＬＯＤ＝検出下限；ＶＰ＝ウイルス粒子；ＮＰ＝ヌクレオカプシドタンパク質；ＩＨＣ＝免疫組織化学。

【図１３２－２】図１３２－１と同じ。

【図１３３－１】ハムスターにおける免疫原性および肺ウイルス量へのＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの用量応答性を示す図である。シリアンハムスターを、筋肉内で、Ｎ＝８／群で、10^7、10^8、10^9または10^{10}ＶＰのＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓで、または10^{10}ＶＰのＡｄ２６．Ｉｒｒ（いかなるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２抗原もコードしないＡｄ２６ベクター、Ｎ＝８）で免疫化した。１回の免疫化の４週間後に、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質特異的抗体結合力価（図１３３Ａ）およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和抗体（図１３３Ｂ）を決定した。中央値の抗体応答／群は、水平線で示される。点線は、ＬＬＯＤを示す。ＬＬＯＤまたはそれ未満で応答を有する動物をＬＬＯＤ上に配置し、白抜きの記号として示される。ハムスターは、免疫化の４週間後（４週目）に、10^2ＴＣＩＤ$_{50}$のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２株ベータＣｏＶ／ミュンヘン／ＢａｖＰａｔ１／２０２０での鼻腔内接種を受けた。右の肺組織を、接種後の４日に、分析および免疫組織化学のために単離した。（図１３３Ｃ）肺ウイルス量を、Ｖｅｒｏ　Ｅ６細胞におけるＴＣＩＤ$_{50}$アッセイによって決定した。中央値のウイルス量／群は、水平線で示される。動物１匹当たりのＬＬＯＤを計算した。ＬＬＯＤまたはそれ未満で応答を有する動物は、白抜きの記号として示される。（図１３３Ｄ）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ＮＰの存在を、免疫組織化学的染色によって決定した。マン－ホイットニーＵ検定によって、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ用量レベル群間でＡｄ２６．Ｉｒｒ群との比較を実行した。統計学的差異は星印によって示される：＊：ｐ＜０．０５；＊＊：ｐ＜０．０１；＊＊＊：ｐ＜０．００１。Ａｄ２６．Ｉｒｒ＝いかなるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２抗原もコードしないＡｄ２６ベクター；ＬＬＯＤ＝検出下限；Ｎ＝動物の数；ＴＣＩＤ$_{50}$／ｇ＝組織１グラム当たりの５０％組織培養感染量；ＶＰ＝ウイルス粒子；ＮＰ＝ヌクレオカプシドタンパク質。

【図１３３－２】図１３３－１と同じ。

【図１３４】10^2ＴＣＩＤ$_{50}$のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（Ｎ＝８／群）でのＩＮ接種の後の４日にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を接種したＡｄ２６免疫化シリアンハムスターにおけるＶＡＥＲＤの兆候はないことを示す図であり、ａ）肺組織を単離し、肺胞炎、肺胞のダメージ、肺胞浮腫、肺胞出血、ＩＩ型肺細胞過形成、気管支炎、細気管支炎、気管支周囲および血管周囲のカフィングの存在および重症度に関してスコア付けした。スコアの合計は、ＬＲＴ疾患パラメーターの合計として提示される。ｂ）接種後の４日に、鼻組織を単離し、炎症（鼻炎）の重症度に関してスコア付けした。　水平線は、組織病理がないことを示す０の病理スコアを意味する。赤色の記号は、破過点となる肺ウイルス量（＞10_2ＴＣＩＤ$_{50}$／ｇ）を有するハムスターからの試料を意味する。マン－ホイットニーＵ検定によって、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ用量レベル群間でＡｄ２６．Ｉｒｒ群との比較を実行した。統計学的差異は星印によって示される：＊：ｐ＜０．０５；＊＊：ｐ＜０．０１；＊＊＊：ｐ＜０．００１。Ａｄ２６．Ｉｒｒ＝いかなるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２抗原もコードしないＡｄ２６ベクター；ＬＲＴ＝下気道；Ｎ＝動物の数；ＶＰ＝ウイルス粒子。

【図１３５－１】結合および中和抗体が保護と相関することを示す図である。ワクチン構築物による保護を、ワクチンのレジメンおよび用量レベルに関わりなく、肺組織における

１０^{2}ＴＣＩＤ$_{50}$／ｇ未満のウイルス量と定義した（図１２９ＡおよびＢ、ならびに図１３３Ｃを参照）。シリアンハムスターを、１０^{9}または１０^{10}ＶＰのＡｄ２６．Ｓもしくは Ａｄ２６．ｄＴＭ．ＰＰ（構築物１つ当たりＮ＝２４）、または１０^{7}、１０^{8}、１０^{9}、１０^{10}ＶＰのＡｄ２６．ＣｏＶ．Ｓ（Ｎ＝５６）で１回、または２回で免疫化した。ハムスターに１０^{2}ＴＣＩＤ$_{50}$のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を接種し、４日後に肺組織のウイルス学的な分析のために　殺した。ウイルス接種の前に、血清試料を、（図１３５Ａ）抗体結合力価および（図１３５Ｂ）ウイルス中和抗体に関して分析した。中央値の抗体応答／群は、水平線で示される。点線は、ＬＬＯＤを示す。（図１３５Ｃ）Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓのプールしたレジメンおよび用量レベルからの結合および中和抗体力価のファース（Ｆｉｒｔｈ）の補正を用いて、保護確率のロジスティック回帰モデルを構築した。点線は、９５％信頼区間を示す。ＬＬＯＤ＝検出下限；Ｎ＝動物の数；ＴＣＩＤ$_{50}$／ｇ＝組織１グラム当たりの５０％組織培養感染量；ＶＰ＝ウイルス粒子。

【図１３５－２】図１３５－１と同じ。

【図１３５－３】図１３５－１と同じ。

【図１３６】Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチン接種後の結合および中和抗体の迅速な誘導を示す図である。（図１３６Ａ）ＥＬＩＳＡによるＳ特異的結合抗体、（図１３６Ｂ）ＥＬＩＳＡによるＲＢＤ特異的結合抗体、および（図１３６Ｃ）高用量（ＨＤ）および低用量（ＬＤ）のＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓまたはプラセボ（ＰＬ）のレシピエントにおける、１日目および８日目における偽ウイルス中和抗体（ｐｓＶＮＡ）。赤色のバーは、相乗平均力価（ＧＭＴ）を反映する。Ｐ値は、両側マン－ホイットニー検定を反映する。

【図１３７－１】Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチン接種後の結合および中和抗体の速度論および規模を示す図である。（Ａ）ＥＬＩＳＡによるＳおよびＲＢＤ特異的結合抗体、ならびに（Ｂ）Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチン接種後の、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２偽ウイルス中和抗体（ｐｓＶＮＡ）およびＡｄ２６ウイルス中和抗体（Ａｄ２６　ＶＮＡ）応答。ＬＤ、低用量；ＨＤ、高用量；ＰＬ、プラセボ。赤色のバーは、相乗平均力価（ＧＭＴ）を反映する。点線は、定量の下限を反映する。

【図１３７－２】図１３７－１と同じ。

【図１３８】体液性免疫応答の相関を示す図である。２９日目における、ｌｏｇ$_{10}$のＳ特異的ＥＬＩＳＡ力価、ｌｏｇ$_{10}$のＲＢＤ特異的ＥＬＩＳＡ力価、およびｌｏｇ１０の中和抗体（ＮＡｂ）力価の相関。ＰおよびＲ値は、両側のスピアマンの順位相関検定を反映する。

【図１３９－１】Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチン接種後の抗体交差反応性を示す図である。Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチン接種後の、（図１３９Ａ）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１、加えて、（図１３９Ｂ）ＣｏＶ－２２９Ｅ、ＣｏＶ－ＨＫＵ１、ＣｏＶ－ＮＬ６３、およびＣｏＶ－ＯＣ４３からのＳタンパク質に対する結合抗体応答を評価するエレクトロケミルミネッセンスアッセイ（Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＩｇＧパネル２；Ｋ１５３６９Ｕ－２）。ＬＤ、低用量；ＨＤ、高用量；ＰＬ、プラセボ。赤色のバーは、相乗平均応答を反映する。点線は、定量の下限を反映する。

【図１３９－２】図１３９－１と同じ。

【図１３９－３】図１３９－１と同じ。

【図１４０】Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチン接種後の細胞性免疫応答の速度論および規模を示す図である。Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチン接種後の、ＩＣＳアッセイによる、（図１４０Ａ）ＩＦＮ－γおよびＩＬ－４ＥＬＩＳＰＯＴ応答、および（図１４０Ｂ）ＩＦＮ－γセントラルメモリーＣＤ２７＋ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞応答。７１／８５日目に、十分な末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を用いて、参加者のサブセットにＩＣＳアッセイを実行した。ＳＦＣ、スポット形成細胞；ＬＤ、低用量；ＨＤ、高用量；ＰＬ、プラセボ。赤色のバーは、相乗平均応答を反映する。点線は、定量の下限を反映する。

【図１４１】細胞および体液性免疫応答の相関を示す図である。２９日目における、ｌｏ

ｇ１０のＥＬＩＳＰＯＴ応答と、ｌｏｇ１０のＳ特異的ＥＬＩＳＡ力価、ｌｏｇ１０のＲＢＤ特異的ＥＬＩＳＡ力価、およびｌｏｇ１０の中和抗体（ＮＡｂ）力価との相関。ＰおよびＲ値は、両側のスピアマンの順位相関検定を反映する。
【図１４２】最大分析セットでの、ワクチン接種後の少なくとも１日に開始した分子的に確認された中度から重度／深刻なＣＯＶＩＤ－１９症例の累積発生率を示す図である。
【図１４３】最大分析セットでの、セロステータスによってワクチン接種後の少なくとも１日に開始して２９日目までの、分子的に確認された中度から重度／深刻なＣＯＶＩＤ－１９症例の累積発生率を示す図である。
【図１４４】最大分析セットでの、ワクチン接種後の少なくとも１日に開始した分子的に確認された重度／深刻なＣＯＶＩＤ－１９症例の累積発生率を示す図である。
【図１４５】感染力を示す図である。様々な国におけるプラセボＣＯＶＩＤ－１９発生率。
【発明を実施するための形態】
【００５０】
定義
本明細書で使用される場合、用語「約」は、記載された値の＋／－１０％を意味する。
【００５１】
用語「アデノウイルスベクター（adenovirus vector）」および「アデノウイルスベクター（adenoviral vector）」は、互換的に使用され、目的のポリヌクレオチド（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ免疫原をコードするポリヌクレオチド）を真核細胞に挿入して、その結果、ポリヌクレオチドがその後に発現されるように設計されている、遺伝子操作されたアデノウイルスを意味する。ウイルスベクターとして使用し得るアデノウイルスの例としては、血清型Ａｄ２、Ａｄ５、Ａｄ１１、Ａｄ１２、Ａｄ２４、Ａｄ２６、Ａｄ３４、Ａｄ３５、Ａｄ４０、Ａｄ４８、Ａｄ４９、Ａｄ５０、Ａｄ５２（例えば、ＲｈＡｄ５２）、Ａｄ５９（例えば、ＲｈＡｄ５９）、およびＰａｎ９（ＡｄＣ６８としても知られる）を有するか、またはそれらに由来するものが挙げられる。これらのベクターは、例えば、ヒト、チンパンジー、またはアカゲザルのアデノウイルスに由来し得る。一部の実施形態では、アデノウイルスはＡｄ２６である。
【００５２】
用語「アジュバント」は、他の薬剤（例えば、ワクチン）の効果を改変するが、一方、単独で投与された場合には直接的な効果はあるにしてもわずかしかない薬理学的または免疫学的薬剤を指す。これは、注射される異物を最小限に保ちながら、供給される抗原に対するレシピエントの免疫応答を増強するためにワクチンに含められることが多い。
【００５３】
本明細書で使用される場合、「投与すること」は、医薬組成物（例えば、免疫原性組成物（例えば、ワクチン（例えば、武漢コロナウイルス（２０１９－ｎＣｏＶ）ワクチン））の投薬量を対象に与える方法を意味する。本明細書に記載される方法に利用される組成物は、例えば、筋肉内に、静脈内に、皮内に、経皮的に、動脈内に、腹腔内に、病変内に、頭蓋内に、関節内に、前立腺内に、胸腔内に、気管内に、鼻腔内に、硝子体内に、膣内に、直腸内に、局部的に、腫瘍内に、腹腔に、皮下に、結膜下に、膀胱内に、粘膜に、心膜内に、臍帯内に、眼内に、経口的に、局部的に、局所的に、吸入により、注射により、注入により、持続注入により、標的細胞を直接浸す局所灌流により、カテーテルにより、洗浄により、経管栄養により、クリーム剤で、または脂質組成物で投与することができる。好ましい投与の方法は、様々な要因（例えば、投与される組成物の成分および治療される状態の重症度）に応じて異なり得る。
【００５４】
用語「抗体」および「免疫グロブリン（Ｉｇ）」は、最も広い意味で互換的に使用され、モノクローナル抗体（例えば、完全長またはインタクトのモノクローナル抗体）、ポリクローナル抗体、多価抗体、多特異性抗体（例えば、所望の生物活性を示す限りにおいての二特異性抗体）を含み、かつ、ある特定の抗体断片も含み得る。抗体は典型的には、「

軽鎖」および「重鎖」の両方を含む。任意の脊椎動物種由来の抗体（免疫グロブリン）の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（κ）およびラムダ（λ）と呼ばれる２つの明確に異なるタイプのうちの１つに割り当てることができる。重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは異なるクラスに割り当てることができる。免疫グロブリンには、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、ＩｇＭという５つの主要なクラスがあり、これらのいくつかはさらにサブクラス（アイソタイプ）、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、ＩｇＡ２に分けることができる。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれα、δ、ε、γ、およびμと呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造および三次元配置はよく知られている。

【００５５】

本明細書で使用される場合の用語「コドン」は、特定のアミノ酸または翻訳のための開始もしくは停止シグナルを指定する、所与のメッセンジャーＲＮＡ分子またはＤＮＡのコード鎖における３個の連続したヌクレオチド塩基の任意の群を指す。コドンという用語は、ＤＮＡ鎖における塩基トリプレットも指す。

【００５６】

本明細書および特許請求の範囲を通して、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」という単語、または「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」もしくは「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」などの変形物は、記載された整数または整数の群を含むことを意味するが、いかなる他の整数または整数の群を除外することも意味しないことが理解されるであろう。

【００５７】

本明細書で使用される場合の用語「回復期の」は、コロナウイルス感染症（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ）から回復したか、または回復中である対象を指す。「回復期のヒトのコホート」は、共通の特徴（例えば、性別、年齢、体重、病歴、人種、民族、または環境）を有し、コロナウイルス感染症（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ）から回復したか、または回復中であるヒトの一群を指す。好ましくは、回復期のヒトのコホートは、２０１９－ｎＣｏＶ感染症のリスクを有するか、またはコロナウイルス感染症に感受性である疑いのある対象と共通の特徴を有する。好ましくは、回復期のヒトからの試料は、文書記録による回復（例えば、鼻スワブで陰性と判定）の少なくとも７日後に得られる。

【００５８】

用語「外部ドメイン」および「細胞外ドメイン」は、膜貫通ドメインを越えて細胞外空間に伸びるコロナウイルススパイクポリペプチドの部分を指す。外部ドメインは、スパイクポリペプチドの１つまたは複数のコロナウイルス受容体（例、ＡＣＥ２）への結合を媒介する。例えば、外部ドメインは、スパイクポリペプチドのＳ１ドメイン（例えば、配列番号４）およびＲＢＤ（例えば、配列番号５）を含む。

【００５９】

「遺伝子送達ビヒクル」は、挿入されたポリヌクレオチドを宿主細胞内に運ぶことができる任意の分子と定義される。遺伝子送達ビヒクルの例には、リポソーム、天然ポリマーおよび合成ポリマーを含む生体適合性ポリマー、リポタンパク質、ポリペプチド、多糖類、リポ多糖類、人工ウイルスエンベロープ、金属粒子ならびに細菌、またはバキュロウイルス、アデノウイルスおよびレトロウイルスなどのウイルス、バクテリオファージ、コスミド、プラスミド、真菌ベクター、ならびに種々の真核生物および原核生物宿主における発現について記載されていて、単純なタンパク質発現のための他に遺伝子治療のためにも使用され得る、当技術分野で典型的に使用されている他の組換えビヒクルがある。

【００６０】

本明細書で使用される場合の「遺伝子送達」、「遺伝子移入」などは、導入に使用される方法に関係なく、宿主細胞への外因性ポリヌクレオチド（「導入遺伝子」と呼ばれることもある）の導入を指す用語である。そのような方法としては、例えば、ベクター媒介遺伝子移入（例えば、ウイルス感染／トランスフェクション、または様々な他のタンパク質ベースまたは脂質ベースの遺伝子送達複合体）などの種々の手法のほか、「裸の」ポリヌ

クレオチドの送達を容易にする手法（例えば、電気穿孔、「遺伝子銃」送達、およびポリヌクレオチドの導入のために使用される様々な他の手法）が挙げられる。

【００６１】

導入されたポリヌクレオチドは、宿主細胞内で安定にまたは一過性に維持され得る。安定な維持のためには、典型的には、導入されたポリヌクレオチドが、宿主細胞と適合する複製起点を含有するか、または宿主細胞のレプリコン、例えば、染色体外レプリコン（例えば、プラスミド）または核内染色体もしくはミトコンドリア染色体に組み込まれることを必要とする。いくつかのベクターは、哺乳動物細胞への遺伝子の移入を媒介することができる。

【００６２】

「遺伝子産物」は、遺伝子から転写されたｍＲＮＡまたは他の核酸（例えば、マイクロＲＮＡ）、ならびにそれらのｍＲＮＡから翻訳されたポリペプチドを含むことを意味する。一部の実施形態では、遺伝子産物は、ウイルス（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ）由来であり、例えば、本明細書に記載されるウイルスタンパク質、またはその断片のうちの任意の１つまたは複数を含み得る。

【００６３】

「異種核酸分子」は、ポリヌクレオチドまたはベクターに組み込まれ得る、ウイルスなどの病原性生物に由来するかまたはそれから得られるタンパク質をコードし得るヌクレオチド配列を意味する。異種核酸はまた、免疫を誘導するように構築された合成または人工タンパク質、例えば、免疫原性エピトープをコードしてもよい。異種核酸分子の一例は、コロナウイルス（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ）に由来する１つまたは複数の免疫原性ペプチドまたはポリペプチドをコードするものである。異種核酸分子は、異種核酸分子が組み入れられたポリヌクレオチドまたはベクターの中に見出される他の核酸分子には通常は付随しないものである。

【００６４】

用語「宿主細胞」は、外因性核酸が導入された細胞を意味し、そのような細胞の子孫を含む。宿主細胞は「形質転換体」および「形質転換細胞」を含み、一次形質転換細胞およびそれに由来する子孫を継代の数に関係なく含む。宿主細胞は、外因性核酸が導入された対象（例えば、哺乳動物対象（例えば、ヒト））の体内の細胞を含む。

【００６５】

「免疫原」は、投与に際して対象において免疫応答を誘導し得る任意のポリペプチドを意味する。一部の実施形態では、免疫原は、その後の免疫原の発現（例えば、目的の遺伝子産物、またはその断片（例えば、ポリペプチド））のために、例えば、ポリヌクレオチドまたはベクターに組み込まれ得る核酸分子によってコードされる。

【００６６】

本明細書で使用される場合の用語「免疫原性組成物」は、免疫応答を誘発させるために使用されて、対象への免疫原性組成物の投与後に免疫を付与し得る材料と定義される。

【００６７】

用語「免疫刺激剤」は、免疫系を、その構成要素のいずれかの活性化を誘導するかまたは活性を増加させることによって刺激する物質（例えば、薬物および栄養素）を指す。免疫刺激剤としては、サイトカイン（例えば、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子）およびインターフェロン（例えば、ＩＦＮ－αおよび／またはＩＦＮ－γ）が挙げられる。

【００６８】

「単離された」は、その天然環境の構成要素から分離、回収、または精製されていることを意味する。例えば、核酸分子またはポリペプチドは、その天然環境の構成要素から、１％（２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％）またはそれを上回って単離されていてもよい。

【００６９】

「医薬組成物」は、治療的または生物学的に活性な薬剤、例えば、免疫原性組成物また

はワクチン（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ核酸分子、ベクター、および／またはポリペプチド）を含有し、好ましくは、目的の抗原遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列またはその断片を含み、対象への投与に好適であって、かつ疾患（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ感染症）を治療もしくは予防する、または疾患の１つもしくは複数の症状（例えば、２０１９－ｎＣｏＶウイルス力価、ウイルス拡散、感染、および／または細胞融合）を軽減もしくは改善する、任意の組成物を意味する。本発明の目的では、医薬組成物にはワクチンが含まれ、治療的または生物学的に活性な薬剤を送達するために好適な医薬組成物には、例えば、錠剤、ゲルキャップ、カプセル、丸剤、散剤、顆粒剤、懸濁剤、乳剤、溶液、ゲル、ヒドロゲル、経口ゲル、ペースト、点眼剤、軟膏、クリーム、硬膏剤、水薬、送達デバイス、坐剤、浣腸剤、注射剤、留置剤、噴霧剤、またはエアロゾルが含まれ得る。これらの調合物のうちの任意のものを、当技術分野で周知であって認められている方法によって調製することができる。例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (21st ed.), ed. A.R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2005およびEncyclopedia of Pharmaceutical Technology, ed. J. Swarbrick, Informa Healthcare, 2006を参照のこと、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み込まれる。

【００７０】

本明細書で使用される場合の用語「連結された（連結した）」または「連結する（ｌｉｎｋｓ）」または「連結する（ｌｉｎｋ）」は、２つのアミノ酸配列または２つの核酸配列のそれぞれペプチド結合またはホスホジエステル結合を介した共有結合性接続を指すことを意味し、そのような接続は、接続される２つのアミノ酸配列または核酸配列の間に任意の数の追加のアミノ酸または核酸配列を含み得る。

【００７１】

本明細書で互換的に使用される「核酸分子」または「ポリヌクレオチド」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、ＤＮＡおよびＲＮＡを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチドもしくは塩基、および／またはそれらのアナログ、または、ＤＮＡもしくはＲＮＡポリメラーゼによって、または合成反応によってポリマーに組み入れることができる任意の基質であり得る。ポリヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド、例えば、メチル化ヌクレオチドおよびそのアナログを含み得る。ヌクレオチド構造に対する修飾は、存在する場合、ポリマーの集合体の前または後に付与され得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド性構成要素によって中断されてもよい。ポリヌクレオチドを合成後に、例えば、標識とのコンジュゲーションによってさらに修飾してもよい。

【００７２】

「核酸ワクチン」は、異種核酸分子を、対象における発現のためのプロモーターの制御下に含むワクチンを指す。異種核酸分子は、プラスミドなどの発現ベクターに組み入れることができる。「ＤＮＡワクチン」は、核酸がＤＮＡであるワクチンを指す。「ＲＮＡワクチン」は、核酸がＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）であるワクチンを指す。

【００７３】

核酸は、それが別の核酸配列と構造的または機能的な関係に置かれている場合、「作動可能に連結され」ている。例えば、ＤＮＡの１つのセグメントは、ＤＮＡの別のセグメントと、それらが同一の連続したＤＮＡ分子上で互いに対して配置され、構造的または機能的な関係を有する場合には、作動可能に連結されることができ、これは例えば、コード配列の転写を助長するようにコード配列に対して配置されているプロモーターもしくはエンハンサー；翻訳を助長するようにコード配列に対して配置されているリボソーム結合部位；またはプレタンパク質（例えば、コードされるポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質）の発現を助長するようにコード配列に対して配置されているプレ配列もしくは分泌リーダーなどである。他の例において、作動可能に連結された核酸配列は、連続してはいないが、核酸としてまたはそれらによって発現されるタンパク質として、それらが互いに機能的関係を有するように配置されている。例えば、エンハンサーは連続している必要

はない。連結は、便利な制限部位でのライゲーションによって、または合成オリゴヌクレオチドアダプターもしくはリンカーを使用することによって達成することができる。

【００７４】

「最適化された」は、天然に存在するペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質ではない免疫原性ポリペプチド、例えば、天然に存在しないウイルスポリペプチド（例えば、スパイクポリペプチド）を意味する。最適化されたウイルスポリペプチド配列は、まず、１つまたは複数の天然に存在するウイルス遺伝子産物（例えば、ペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質）のアミノ酸配列を改変して、対象（例えば、ヒト）の免疫化（例えば、組成物、例えば、ワクチンに組み入れられた場合）に際して生じる抗ウイルス免疫応答（例えば、細胞性または体液性免疫応答）の幅、強度、深さ、または寿命を増加させることによって作製される。したがって、最適化されたウイルスポリペプチドは、「親」ウイルス遺伝子配列に対応し得る；あるいは、最適化されたウイルスポリペプチドは、特定の「親」ウイルス遺伝子配列に対応していないが、ウイルスの様々な株または疑似種由来の類似配列に対応していてもよい。最適化されたウイルスポリペプチドに含めることができるウイルス遺伝子配列の改変には、アミノ酸の付加、置換、および欠失が含まれる。一実施形態では、最適化されたポリペプチドはスパイクポリペプチドであり、これは、最大のタンパク質発現のためのリーダー／シグナル配列（例えば、スパイクシグナル配列またはｔＰＡシグナル配列）、第Ｘａ因子部位、フォールドン三量体化ドメイン（例えば、配列番号８７を参照）、および／またはリンカーもしくはスペーサー（例えば、配列番号８８または８９）配列を含むようにさらに変更されている。最適化されたポリペプチドは、切断部位突然変異（例えば、フューリン切断部位突然変異（例えば、配列番号９１））も含んでもよいが、含む必要はない。最適化されたウイルスポリペプチドを作製する方法は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Fisher et al. "Polyvalent Vaccine for Optimal Coverage of Potential T-Cell Epitopes in Global HIV-1 Variants," Nat. Med. 13(1):100-106 (2007)および国際特許出願公開第２００７／０２４９４１号パンフレットに記載されている。最適化されたウイルスポリペプチド配列がひとたび作製されると、対応するポリペプチドを、標準的な手法（例えば、組み換えウイルスベクター、例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際特許出願公開２００６／０４０３３０号パンフレットおよび同２００７／１０４７９２号パンフレットに開示されているアデノウイルスベクター）によって生産すること、または投与することができ、任意選択で、安定化されたポリペプチド三量体を形成するように組み立てることもできる。

【００７５】

本明細書において使用される用語「最適化されたコドン」および「コドン最適化」は、標的（例えば、対象）または宿主生物におけるコドン頻度に一致するように改変されているが、翻訳される元のタンパク質のアミノ酸配列を変化させないコドン配列を指す。

【００７６】

「薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、担体、またはアジュバント」は、対象にとって生理的に許容され、その一方で、それと共に投与される医薬組成物の治療特性を保持する、希釈剤、賦形剤、担体、またはアジュバントを意味する。１つの例示的な薬学的に許容される担体は、生理食塩水である。他の生理的に許容される希釈剤、賦形剤、担体、またはアジュバントおよびそれらの製剤は、当業者に公知である（例えば、米国特許出願公開第２０１２／００７６８１２号明細書を参照）。

【００７７】

「部分」または「断片」は、全体の一部を意味する。一部分は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列領域の全長のうちの少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または９５％を含み得る。ポリヌクレオチドについては、例えば、一部分は、参照ポリヌクレオチド分子の少なくとも５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１１００、１２００、１３００、１４００、１５００、１６００、１７００、１８００またはそれを上回る連続

したヌクレオチドを含み得る。ポリペプチドについては、例えば、一部は、参照ポリペプチド分子の少なくとも５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、５０、７５、９０、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、５００、５２５、５５０、５７５、または６００またはそれを上回る連続したアミノ酸を含み得る。

【００７８】

ある場合には、核酸分子の断片は、ポリヌクレオチドＳＳ－スパイク（配列番号１２１）の少なくとも２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１１００、１２００、１３００、１４００、１５００、１６００、１７００またはそれを上回る連続したヌクレオチドを含み得る。ある場合には、核酸分子の断片は、ポリヌクレオチドＳＳ－スパイク－ｄＦ－ＰＰ（配列番号１４３および２０４）の少なくとも２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１１００、１２００、１３００、１４００、１５００、１６００、１７００またはそれを上回る連続したヌクレオチドを含み得る。ある場合には、核酸分子の断片は、ポリヌクレオチドＳＳ－ＳｄＣＴ（配列番号１２２）の少なくとも２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１１００、１２００、１３００、１４００、１５００、またはそれを上回る連続したヌクレオチドを含み得る。ある場合には、核酸分子の断片は、ポリヌクレオチドＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ（配列番号１２３）の少なくとも２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１１００、１２００、１３００、１４００、またはそれを上回る連続したヌクレオチドを含み得る。ある場合には、核酸分子の断片は、ポリヌクレオチドＳＳ－Ｓ１－フォールドン（配列番号１２９）の少なくとも２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１１００、１２００、１３００、１４００、１５００、またはそれを上回る連続したヌクレオチドを含み得る。ある場合には、核酸分子の断片は、ポリヌクレオチドのＳＳ－ＲＢＤ－フォールドン（配列番号１３０）の少なくとも２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１１００、１２００、１３００、またはそれを上回る連続したヌクレオチドを含み得る。ある場合には、核酸分子の断片は、ポリヌクレオチドＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－フォールドン（配列番号１３６または１９３）の少なくとも２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１１００、１２００、またはそれを上回る連続したヌクレオチドを含み得る。ある場合には、核酸分子の断片は、ポリヌクレオチドＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ＰＰ－フォールドン（配列番号１４２）の少なくとも５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１１００、１２００、１３００、１４００、１５００、１６００、１７００、１８００、１９００、２０００、またはそれを上回る連続したヌクレオチドを含み得る。ある場合には、核酸分子の断片は、ポリヌクレオチドＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン（配列番号１９５）の少なくとも５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１１００、１２００、１３００、１４００、１５００、１６００、１７００、１８００、１９００、２０００、またはそれを上回る連続したヌクレオチドを含み得る。

【００７９】

ある場合には、ポリペプチドの断片は、ポリペプチドＳＳ－スパイク（配列番号２９）の少なくとも２０、２５、５０、７５、９０、１００、１２５、１５０、１７５、２００

、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、５００、５２５、５５０、またはそれを上回る連続したアミノ酸を含み得る。ある場合には、ポリペプチドの断片は、ポリペプチドＳＳ－ＳｄＣＴ（配列番号３０）の少なくとも２０、２５、５０、７５、９０、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、５００、またはそれを上回る連続したアミノ酸を含み得る。ある場合には、ポリペプチドの断片は、ポリペプチドＳＳ－スパイク－ｄＦ－ＰＰ（配列番号５１）の少なくとも２０、２５、５０、７５、９０、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、５００、またはそれを上回る連続したアミノ酸を含み得る。ある場合には、ポリペプチドの断片は、ポリペプチドＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ（配列番号３１）の少なくとも２０、２５、５０、７５、９０、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、またはそれを上回る連続したアミノ酸を含み得る。ある場合には、ポリペプチドの断片は、ポリペプチドＳＳ－Ｓ１－フォールドン（配列番号３７）の少なくとも２０、２５、５０、７５、９０、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、またはそれを上回る連続したアミノ酸を含み得る。ある場合には、ポリペプチドの断片は、ポリペプチドＳＳ－ＲＢＤ－フォールドン（配列番号３８）の少なくとも２０、２５、５０、７５、９０、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、５００、またはそれを上回る連続したアミノ酸を含み得る。ある場合には、ポリペプチドの断片は、ポリペプチドＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－フォールドン（配列番号４４）の少なくとも２０、２５、５０、７５、９０、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、またはそれを上回る連続したアミノ酸を含み得る。ある場合には、ポリペプチドの断片は、ポリペプチドＳ．Ｅｃｔｏ－ＰＰ－フォールドン（配列番号５０）の少なくとも２０、２５、５０、７５、９０、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、またはそれを上回る連続したアミノ酸を含み得る。ある場合には、ポリペプチドの断片は、ポリペプチドＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン（配列番号５６）の少なくとも２０、２５、５０、７５、９０、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、５００、５２５、５５０、５７５、６００、６２５、６５０、６７５、またはそれを上回る連続したアミノ酸を含み得る。ある場合には、ポリペプチドの断片は、ＪＥＶステム／ＴＭを有するポリペプチドｐｒＭ－Ｅｎｖ（配列番号２７）の少なくとも２０、２５、５０、７５、９０、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、５００、５２５、５５０、５７５、６００、６２５、６５０、６７５、またはそれを上回る連続したアミノ酸を含み得る。

【００８０】

ある場合には、ポリヌクレオチド（例えば、配列番号９３～１８１、１９０～１９５、および１９９～２０４）および／またはポリペプチド（例えば、配列番号１～８４、例えば、配列番号５１）の断片の対象への投与は、対象における免疫応答を誘発し得る。

【００８１】

「プロモーター」は、メッセンジャーＲＮＡ中の遺伝子配列の転写の開始を可能にする核酸配列であり、そのような転写は、プロモーター上またはその近くへのＲＮＡポリメラーゼの結合によって開始される。

【００８２】

「免疫応答を促進する」は、医薬組成物（例えば、免疫原性組成物またはワクチン）が投与された対象において、例えば、１つまたは複数の感染体（例えば、ウイルス（例えば

、２０１９－ｎＣｏＶ））もしくはタンパク質標的に対して方向付けられた体液性応答（例えば、抗体の産生）または細胞性応答（例えば、Ｔ細胞、マクロファージ、好中球、および／またはナチュラルキラー細胞の活性化）を誘発することを意味する。

【００８３】

「２０１９－ｎＣｏＶ媒介性疾患」という用語は、本明細書において「コロナウイルス疾患２０１９（ＣＯＶＩＤ－１９）」、さらにはその文法的変形物と互換的に使用され、その疾患を有する対象における２０１９－ｎＣｏＶ（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）感染または曝露によって（単独でまたは他のメディエーターと関連して）引き起こされるか、増悪するか、またはそれに関連することが当技術分野で知られている任意の病態または続発症を指す。疾患は、急性（例えば、発熱）または慢性（例えば、慢性疲労）、軽症（例えば、、脱毛）または重症（例えば、臓器不全）、および早発性（例えば、感染２～１４日後）または遅発性（例えば、感染２週後）のいずれでもあり得る。重症疾患の例としては、肺炎、急性呼吸促迫症候群（ＡＲＤＳ）、急性呼吸不全、肺水腫、臓器不全、または死亡が挙げられるが、これらに限定されない。症状の例としては、体重減少、発熱、咳、呼吸困難、疲労、頭痛、味覚または嗅覚の喪失、脱毛、発疹、咽頭痛、悪心、および下痢が挙げられるが、これらに限定されない。症状は、軽度のことも重度（例えば、１週間以内に約５％を超える体重減少、および高熱）のこともあり、一時的なことも永続的なこともある。

【００８４】

「保護レベル」は、コロナウイルス感染または疾患からの部分的または完全な保護を示すマーカー（例えば、抗体、細胞（例えば、免疫細胞、例えば、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞、または好中球））の量またはレベルを指す。保護レベルを上回るマーカーの量またはレベルは、コロナウイルス感染（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ感染）または疾患（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ媒介性疾患、例えば、ＣＯＶＩＤ－１９、例えば、重症ＣＯＶＩＤ－１９疾患）からの保護を示す。防護レベルを下回るマーカーの量またはレベルは、コロナウイルス感染または疾患（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ媒介性疾患、例えば、ＣＯＶＩＤ－１９、例えば、重症臨床疾患）に対する感受性を示す。マーカーは単一の測定値（例えば、中和抗体レベル）であってもよく、またはマーカーは複数の測定値の組合せ（例えば、中和抗体レベルおよびＲＢＤ特異的ＩｇＧ２レベル）であってもよい。ある場合には、保護レベルは、本明細書に記載される偽ウイルス中和アッセイを用いて測定される抗コロナウイルス抗体価が少なくとも約７０である、本明細書に記載される生ウイルス中和アッセイを用いて測定される抗コロナウイルス抗体価が少なくとも約２５である、または本明細書に記載される抗コロナウイルス抗体価が偽ウイルス中和アッセイもしくは生ウイルス中和アッセイによって決定される回復期のヒトのコホートの中央値または平均レベルの少なくとも約８０％のレベルを上回ることである。ある場合には、保護レベルは、本明細書に記載される偽ウイルス中和アッセイを用いて測定される抗コロナウイルス抗体価が少なくとも約１００である。

【００８５】

本明細書で使用される場合、用語「試料」は、例えば、物理的、生化学的、化学的および／または生理学的な特徴に基づいて、特徴付けおよび／または特定しようとする細胞性および／または他の分子的実体を含有する対象から得られるか、またはそれに由来する組成物である。試料は、新鮮な、凍結された、および／もしくは保存された臓器、組織試料、生検試料、ならびに／または吸引物からの固形組織；血液または血漿などの血液成分；脳脊髄液、羊水、腹水、または間質液などの体液であってもよい。試料はまた、初代もしくは培養細胞または細胞系であってもよい。試料は、天然の組織と自然には混合しない化合物、例えば、保存剤、抗凝固剤、緩衝剤、固定剤、ワックス、栄養分、抗生物質などを含有してもよい。

【００８６】

「配列同一性」または「配列類似性」は、２つ以上のアミノ酸配列、または２つ以上のヌクレオチド配列の間のそれぞれ同一性または類似性が、配列間の同一性または類似性の

点からそれぞれ表されることを意味する。配列同一性は、「パーセンテージ（％）同一性」の点から測定することができ、パーセンテージが高いほど、配列間で共有される同一性が高いことを示す。配列類似性は、パーセンテージ類似性（これは保存的アミノ酸置換を考慮する）の点から測定することができ、パーセンテージが高いほど、配列間で共有される類似性が高くなる。核酸またはアミノ酸配列のホモログまたはオルソログは、標準的な方法を使用してアラインメントされた場合、比較的高度の配列同一性／類似性を有する。配列同一性は、配列解析ソフトウェア（例えば、Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ ｏｆ ｔｈｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｃｅｎｔｅｒ，１７１０ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ａｖｅｎｕｅ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ ５３７０５）をデフォルトの設定で使用して測定することができる。そのようなソフトウェアは、様々な置換、欠失、および他の修飾に対して相同性の程度を割り当てることにより、類似の配列のマッチングを行うことができる。配列同一性／類似性を、比較される２つ以上の配列の全体または規定の部分にわたって決定することができる。

【００８７】

「シグナルペプチド」は、ポリペプチドを分泌経路（例えば、細胞外空間）に向かわせる、ポリペプチドのＮ末端にある短いペプチド（例えば、長さが５～３０アミノ酸、例えば、長さが１７アミノ酸、例えば、配列番号９２）を意味する。シグナルペプチドは典型的には、ポリペプチドの分泌中に切断される。シグナル配列は、ポリペプチドを細胞内区画またはオルガネラ、例えば、ゴルジ装置に導くことができる。シグナル配列は、ポリペプチドを細胞の特定の領域に標的化する既知の機能を有するペプチドに対する相同性、または生物活性によって特定することができる。当業者は、容易に入手可能なソフトウェア（例えば、Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ ｏｆ ｔｈｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｃｅｎｔｅｒ，１７１０ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ａｖｅｎｕｅ，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓ．５３７０５，ＢＬＡＳＴ、またはＰＩＬＥＵＰ／ＰＲＥＴＴＹＢＯＸプログラム）を使用することによってシグナルペプチドを特定することができる。シグナルペプチドは、例えば、配列番号９２のアミノ酸配列と実質的に同一なものであり得る。

【００８８】

本明細書で使用される場合の語句「特異的に結合する」は、例えば、抗体またはその抗原結合性断片によって特定性を伴って認識される、タンパク質および他の生体分子の不均一な集団における抗原の存在を決定付ける結合反応を指す。抗原に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片は、１００ｎＭ未満のK_Dで抗原に結合する。例えば、抗原に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片は、最大１００ｎＭのK_D（例えば、１ｐＭ～１００ｎＭ）で抗原に結合する。特定の抗原またはそのエピトープへの特異的結合を示さない抗体またはその抗原結合性断片は、その特定の抗原またはそのエピトープに対して１００ｎＭを上回る（例えば、５００ｎＭ、１μＭ、１００μＭ、５００μＭ、または１ｍＭを上回る）K_Dを示すと考えられる。種々のイムノアッセイフォーマットを使用して、特定のタンパク質または糖質への特異的な免疫反応性のある抗体を選択することができる。例えば、固相ＥＬＩＳＡイムノアッセイは、タンパク質または糖質への特異的な免疫反応性のある抗体を選択するために慣行的に使用される。特異的な免疫反応性を決定するために使用することができるイムノアッセイのフォーマットおよび条件の説明については、Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York (1988)およびHarlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York (1999)を参照されたい。

【００８９】

本明細書で使用される場合、用語「安定化されたポリペプチド三量体」または「安定化された三量体」は、限定はされないが、（例えば、１つまたは複数のオリゴマー化ドメイ

ンの存在を介して）三量体構造の安定性を高める（例えば、三量体の単量体単位への解離を減少させる）タンパク質および／またはポリペプチド配列を含むオリゴマーを指す。安定化されたポリペプチド三量体は、例えば、ホモ三量体であってもよい。「オリゴマー化ドメイン」は、限定はされないが、オリゴマーエンベロープタンパク質の安定性を高めるために、例えば、スパイク三量体の安定性を高めるために、使用することができるポリペプチド配列を指す。オリゴマー化ドメインを使用して、ホモオリゴマーポリペプチド、さらにはヘテロオリゴマーポリペプチドの安定性を高めることができる。オリゴマー化ドメインは当技術分野で周知であり、これには「三量体化ドメイン」が挙げられる。三量体化ドメインは、三量体ポリペプチド（例えば、１つまたは複数のスパイクポリペプチドからなる三量体）を安定化するオリゴマー化ドメインを指す。三量体化ドメインの例としては、Ｔ４－フィブリチン「フォールドン」三量体化ドメイン；ＧＣＮ４に由来するコイルドコイル三量体化ドメイン（Yang et al. (2002) J. Virol. 76:4634）；および三量体タグとしての大腸菌（E. coli）アスパラギン酸トランスカルバモイラーゼの触媒サブユニット（Chen et al. (2004) J. Virol. 78:4508）が挙げられるが、これらに限定されない。

【００９０】

「対象」は、脊椎動物、例えば、哺乳動物（例えば、霊長類およびヒト、特に基礎的な健康上の異常（例えば、高血圧、糖尿病、または心血管疾患）を有するヒト）である。哺乳動物としては、家畜（雌ウシなど）、競技用動物（例えば、ウマ）、ペット（ネコおよびイヌなど）、マウス、ラット、コウモリ、ジャコウネコ、およびタヌキが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に記載される方法に従って治療されようとする対象（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ感染からの保護を必要とするか、または２０１９－ｎＣｏＶ感染を有する対象）は、そのような必要性または感染を有すると医師によって診断された者であり得る。診断は、任意の適切な手段によって行われ得る。感染症の発症が予防されている対象は、そのような診断を受けていることもあれば、受けていないこともある。当業者は、本発明に従って治療されようとする対象が、標準的な検査を受けていることもあれば、または診察を受けずに、１つもしくは複数の危険因子の存在（例えば、２０１９－ｎＣｏＶへの曝露、例えば、２０１９－ｎＣｏＶ感染症が流行している地域への旅行による）を理由として、感染が疑われるか、もしくは感染のリスクが高い者として特定されていてもよいことを理解するであろう。さらに、基礎的な健康上の異常（例えば、高血圧、糖尿病、または心血管疾患）を有するヒトは、コロナウイルス（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ）感染のリスクが高い対象として特定される。したがって、組成物を用いてヒト対象を治療する方法は、基礎的な健康上の異常を有するヒトにおける２０１９－ｎＣｏＶ感染症の治療、低減、および／または予防に特に有用である。

【００９１】

本明細書で使用される場合、用語「トランスフェクション」は、外因性核酸分子（例えば、発現ベクターなどのＤＮＡ）を原核生物または真核生物宿主細胞に導入するために一般的に使用される多岐にわたる手法のいずれか、例えば、電気穿孔、リポフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ＤＥＡＥ－デキストラントランスフェクションなどを指す。

【００９２】

本明細書で使用され、当技術分野でよく理解されているように、「治療」は、有益なまたは望ましい結果、例えば、臨床結果を得るためのアプローチである。有益なまたは望ましい結果としては、検出可能であるかまたは検出不可能であるかを問わず、１つまたは複数の症状（例えば、発熱、関節痛、発疹、結膜炎、筋肉痛、頭痛、後眼窩痛、浮腫、リンパ節腫脹、倦怠感、無力症、咽頭痛、咳、悪心、嘔吐、下痢、および血精液症）もしくは状態（Zammarchi et al., J. Clin. Virol. 63:32-5, 2015; Waddell et al., PLoS One 11(5): e0156376, 2016）の軽減または改善；疾患、障害または状態の程度の減少；疾患の様子、障害または状態の安定化（例えば、悪化していない）；疾患、障害または状態の拡大の予防；疾患、障害または状態の進行の遅延または緩徐化；疾患、障害または状態の改善または緩和；寛解（部分寛解または完全寛解のいずれか）を挙げるこ

とができるが、これらに限定されない。疾患、障害、または状態を「緩和すること」は、処置を行わない場合の程度または経時的推移と比較して、疾患、障害、もしくは状態の程度および／もしくは望ましくない臨床症状が減ること、ならびに／または進行の経時的推移が緩徐化されるかもしくは延長されることを意味する。処置は、１つまたは複数の治療剤、例えば、本明細書に記載される組成物の１つもしくは複数および／または１つもしくは複数の追加の治療剤を含むことができる。追加の治療剤は、免疫応答を刺激する（例えば、インターフェロン）かまたは阻害する（例えば、抗炎症薬、例えば、デキサメタゾンなどのコルチコステロイド）薬剤を含むことができる。処置は、１つまたは複数の治療介入、例えば、外科手術または腹臥位を含むことができる。

【００９３】

本明細書で使用される場合の用語「ワクチン」は、免疫応答を惹起するために使用されて、対象へのワクチンの投与後に一定期間にわたって免疫を付与する材料と定義される。

【００９４】

「ベクター」は、ウイルス種、例えば、２０１９－ｎＣｏＶ種などに由来する、１つまたは複数のポリヌクレオチドまたはその断片を含むＤＮＡ構築物を意味する。ベクターを使用して、対象の細胞に感染させることができ、その結果、ベクターのポリヌクレオチドのタンパク質産物への翻訳がもたらされる。ベクターの１つのタイプは、追加のＤＮＡセグメントをライゲートすることができる環状二本鎖ＤＮＡループを指す「プラスミド」である。ある特定のベクターは、それが導入された宿主細胞において自律的複製が可能である（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム性哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム性哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれることができ、それによって宿主ゲノムと共に複製される。さらに、ある特定のベクターは、それが作動可能に連結された遺伝子の発現を方向付けることができる。そのようなベクターは、本明細書では「組換え発現ベクター」（または簡潔に「組換えベクター」）と称される。一般に、組換えＤＮＡ手法において有用な発現ベクターは、しばしばプラスミドの形態にある。プラスミドはベクターの最も一般的に使用される形態であるので、本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は、時には互換的に使用されてもよい。他のベクターとしては、例えば、ウイルスベクター、例えば、アデノウイルスベクター（例えば、Ａｄ２６ベクター）、特に本明細書に記載されるものが挙げられる。

【００９５】

用語「ウイルス」は、本明細書で使用される場合、宿主細胞の外では増殖することも複製することもできず、かつ哺乳動物（例えば、ヒト）に感染する感染病原体と定義される。

【００９６】

「ウイルスベクター」は、宿主細胞に送達しようとするポリヌクレオチドを含む、組換えにより作製されるウイルスまたはウイルス粒子と定義される。ウイルスベクターの例としては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター（例えば、ＰＣＴ国際公開第２００６／００２２０３号パンフレットを参照）、アルファウイルスベクターなどが挙げられる。

【００９７】

遺伝子導入がＤＮＡウイルスベクター、例えば、アデノウイルス（Ａｄ（例えば、Ａｄ２６））またはアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）などによって媒介される態様では、ベクター構築物は、ウイルスゲノムまたはその一部と、導入遺伝子とを含むポリヌクレオチドを指す。Ａｄは、５０種類を上回る血清型（国際公開第９５／２７０７１号パンフレット）で構成される、比較的よく特徴付けられた同質のウイルス群である。Ａｄは増殖しやすく、宿主細胞ゲノム中への組込みの必要がない。組換えＡｄ由来ベクター、特に野生型ウイルスの組換えおよび生成の可能性を減少させるものも構築されている（国際公開第９５／００６５５号パンフレットおよび国際公開第９５／１１９８４号パンフレット）。ポリヌクレオチドが作動可能に連結され得るプロモーターおよびクローニング部位の両方を含む

ベクターは、当技術分野で公知である。そのようなベクターは、ｉｎ ｖｉｔｒｏまたはｉｎ ｖｉｖｏでＲＮＡを転写することができる。発現および／またはｉｎ ｖｉｔｒｏ転写を最適化するためには、クローンの５’および／または３’非翻訳部分を除去するか、付加するか、または変更して、転写または翻訳のいずれかのレベルで発現を妨害するかまたは減少させる可能性のある、余分で、不適切な可能性のある代替的な翻訳開始コドンまたは他の配列を削除することが必要である。

【００９８】

他の特徴および利点は、以下の詳細な説明、図面、および特許請求の範囲から明らかであろう。

【００９９】

発明の詳細な説明

本発明は、配列番号２９の完全長アミノ酸配列に対する以下の改変：

ａ． アミノ酸９８６および９８７における、プロリンへの安定化突然変異；ならびに

ｂ． フューリン切断部位（配列番号９０）に対する突然変異

を含む２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質（本明細書ではＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２Ｓタンパク質と称する）をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供する。

【０１００】

配列番号２９は、完全長２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質のアミノ酸配列を提供する；ＮＣＢＩ参照配列：ＹＰ＿００９７２４３９０．１も参照されたい。安定化突然変異は、この配列における元のアミノ酸からプロリンへのものである。配列番号２９に示すように、９８６位の元のアミノ酸はリジン（ｌｙｓ、Ｋ）であり、９８７位の元のアミノ酸はバリン（ｖａｌ、Ｖ）である。

【０１０１】

２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質の内部のフューリン切断部位は、アミノ酸配列ＲＡＲＲ（配列番号９０）を含むか、または有する。好適な突然変異としては、ＳＲＡＧ（配列番号２２５）またはＧＧＳＧ（配列番号９１）への突然変異が挙げられる。ＳＲＡＧ突然変異は、アミノ酸配列にＲ６８２ＳおよびＲ６８５Ｇ突然変異を導入することによって達成される。ＧＧＳＧ突然変異は、アミノ酸配列にＲ６８２Ｇ、Ｒ６８３Ｇ、Ａ６８４ＳおよびＲ６８５Ｇ突然変異を導入することによって達成される。

【０１０２】

一部の実施形態では、配列番号２９の配列に対して加えられるのはこれらの改変のみである。したがって、好ましい核酸分子は、安定化突然変異およびフューリン切断部位に対する突然変異のみを改変として有する完全長２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質をコードする。

【０１０３】

他の実施形態では、単離された核酸分子は、配列番号２９の完全長アミノ酸配列に対する以下のさらなる改変を含む、２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質をコードする：

ｃ． シグナル配列の欠失。

【０１０４】

一部の実施形態では、２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質をコードする核酸は、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、好ましくはＣＭＶ前初期プロモーターに作動可能に連結している。一部の実施形態では、２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質をコードする核酸は、少なくとも１つのテトラサイクリンオペレーター（ＴｅｔＯ）モチーフを含むサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーターに作動可能に連結している。特定の実施形態では、少なくとも１つのＴｅｔＯモチーフを含むＣＭＶプロモーターは、配列番号２１９のヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、ＣＭＶプロモーターは、配列番号２１９のヌクレオチド配列からなる。これらの核酸は、典型的には、ベクターの一部を形成する。ベクターについては、本明細書でさらに詳細に説明する。

【０１０５】
本発明はまた、配列番号２９の完全長アミノ酸配列に対する以下の改変：
ａ．　アミノ酸９８６および９８７における、プロリンへの安定化突然変異；ならびに
ｂ．　フューリン切断部位（配列番号９０）に対する突然変異
を含む、単離された２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質（本明細書ではＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２Ｓタンパク質とも称する）も提供する。
【０１０６】
一部の実施形態では、配列番号２９の配列に対して加えられるのはこれらの改変のみである。他の実施形態では、単離された２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質は、配列番号２９の完全長アミノ酸配列に対する以下のさらなる改変を含む：
ｃ．　シグナル配列の欠失。
【０１０７】
本明細書で使用される場合の核酸、タンパク質および／またはアデノウイルスについての「組換え型の」という用語は、それが人の手によって改変されていること、例えば、アデノベクターの場合には、それがその中に能動的にクローニングされた末端を有すること、および／またはそれが異種遺伝子を含むこと、すなわち、それは天然に存在する野生型アデノウイルスではないことを意味する。
【０１０８】
本明細書では、ヌクレオチド配列は、当技術分野での慣例として、５’から３’の向きで提示される。
【０１０９】
コロナウイルス（Coronavirus）科には、アルファコロナウイルス（Alphacoronavirus）属、ベータコロナウイルス（Betacoronavirus）属、ガンマコロナウイルス属（Gammacoronavirus）、およびデルタコロナウイルス（Deltacoronavirus）属が含まれる。これらのすべての属には、鳥類、ネコ、イヌ、ウシ、コウモリ、およびヒトを含む多岐にわたる動物に感染することができる病原性ウイルスが含まれる。これらのウイルスは、腸疾患および呼吸器疾患を含む広範囲の疾患を引き起こす。宿主範囲は主にウイルスのスパイクタンパク質（Ｓタンパク質）によって決定され、これはウイルスの宿主細胞への侵入を媒介する。ヒトに感染し得るコロナウイルスは、アルファコロナウイルス（Alphacoronavirus）属およびベータコロナウイルス（Betacoronavirus）属の両方にみられる。ヒトにおいて呼吸器疾患を引き起こす既知のコロナウイルスは、ベータコロナウイルス（Betacoronavirus）属のメンバーである。これらとしては、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２およびＭＥＲＳ、ＯＣ４３ならびにＨＫＵ１が挙げられる。
【０１１０】
上述のように、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２はヒトにおいて重症呼吸器疾患を引き起こす可能性がある。ＣＯＶＩＤ－１９のパンデミックを終わらせるには、安全でかつ効果的なＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のワクチンが必要な可能性がある。
【０１１１】
ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２ウイルススパイク（Ｓ）タンパク質は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２によって利用される侵入受容体であるアンジオテンシン変換酵素２（ＡＣＥ２）に結合する。ＡＣＥ２は、レニン・アンジオテンシン系（ＲＡＳ）の重要な要素であって高血圧処置の標的であることが長く知られている酵素であるＡＣＥとの相同性を有するＩ型膜貫通メタロカルボキシペプチダーゼである。これは特に、血管内皮細胞、尿細管上皮、および精巣のライディッヒ細胞で発現される。ＰＣＲ分析により、ＡＣＥ－２が、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を保有することが示された組織である、肺、腎臓および消化管でも発現されることが明らかになった。コロナウイルスのスパイク（Ｓ）タンパク質は主要な表面タンパク質であり、感染患者における中和抗体の標的であり（Lester et al., Access Microbiology 2019;1）、このため、ワクチン設計のための保護抗原となる可能性があると考えられている。本発明に至った研究において、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスのＳタンパク

質に基づいていくつかの抗原構築物が設計された。驚いたことに、本発明の核酸（すなわち、配列番号２１１）は発現された場合に免疫原性に優れること、およびこの核酸を含有するアデノベクターを高収率で製造し得ることが見出された。配列番号２０５のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２Ｓタンパク質をコードする核酸を含有するＡｄ２６ベクターは、強固な中和抗体応答を誘導し、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷後の気管支肺胞洗浄液において完全な保護を、または鼻腔スワブにおいてほぼ完全な保護をもたらした。加えて、実施例に示すように、これは非ヒト霊長類においてＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対する強固な一回接種ワクチン保護を示した。

【０１１２】

一態様では、本発明は、したがって、安定化されたコロナウイルスＳタンパク質、特にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２Ｓタンパク質をコードする単離されたおよび／または組換え核酸であって、配列番号２１１～２１８からなる群から選択されるヌクレオチド配列、またはその断片を含む前記核酸を提供する。

【０１１３】

好ましい一実施形態では、本発明は、安定化されたコロナウイルスＳタンパク質、特にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２Ｓタンパク質をコードする単離されたおよび／または組換え核酸であって、配列番号２１１のヌクレオチド配列、またはその断片を含むか、またはそれからなる前記核酸を提供する。

【０１１４】

本発明はまた、配列番号２０５～２１０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む単離されたおよび／もしくは組換えコロナウイルスＳタンパク質、またはその断片、ならびにそのようなコロナウイルスＳタンパク質、またはその断片をコードする核酸を提供する。

【０１１５】

好ましい一態様では、本発明は、配列番号２０５のアミノ酸配列を含む単離されたおよび／もしくは組換えコロナウイルスＳタンパク質、またはその断片、ならびにそのようなコロナウイルスＳタンパク質、またはその断片をコードする核酸を提供する。Ｓタンパク質は、シグナルペプチド（またはリーダー配列）を含んでもよく、または含まなくてもよい。シグナルペプチドは、配列番号２０５のアミノ酸１～１３を含んでもよい。ある特定の実施形態では、コロナウイルスＳタンパク質は、配列番号２０５のアミノ酸配列からなる。ある特定の実施形態では、コロナウイルスＳタンパク質は、シグナルペプチドを有しない配列番号２０５のアミノ酸配列からなる。

【０１１６】

数多くの異なる核酸が、遺伝暗号の縮重の結果として同じポリペプチドまたはタンパク質をコードし得ることは、当業者に理解されるであろう。また、当業者が慣行的な手法を使用して、ポリペプチドを発現させようとする任意の特定の宿主生物のコドン使用を反映するように、核酸分子がコードするアミノ酸配列に影響を及ぼさないヌクレオチド置換を行い得ることも理解される。したがって、特に指定しない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、相互の縮重バージョンであって同じアミノ酸配列をコードするすべてのヌクレオチド配列を含む。タンパク質およびＲＮＡをコードするヌクレオチド配列はイントロンを含んでもよい。

【０１１７】

本発明は、したがって、配列番号２０５のコロナウイルスＳタンパク質、特にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２Ｓタンパク質、またはその断片をコードする核酸も提供する。ある特定の実施形態では、核酸は、ヒト細胞における発現のために最適化されたコドンである。

【０１１８】

本明細書で使用される場合の用語「断片」は、アミノ末端および／またはカルボキシ末端および／または内部欠失を有するが、残りのアミノ酸配列がＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２Ｓタンパク質の配列、例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２Ｓタンパク質の完全長配列における対応する位置と同一であるタンパク質または（ポリ）ペプチドを指す。免疫応答を誘導するた

めに、および一般にワクチン接種の目的のために、タンパク質は完全長である必要はなく、そのすべての野生型機能を有する必要もなく、タンパク質の断片（すなわち、シグナルペプチドを有しない）も同様に有用であることが理解されるであろう。

【０１１９】

本発明による断片は、免疫学的活性断片であり、典型的には、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２Ｓタンパク質の少なくとも１５アミノ酸、または少なくとも３０アミノ酸を含む。ある特定の実施形態では、これはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２Ｓタンパク質の少なくとも５０、７５、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、または５５０アミノ酸を含む。

【０１２０】

当業者は、例えば、慣行的な分子生物学の手順を使用して、例えば、アミノ酸置換、欠失、付加などによってタンパク質に変化を加え得ることも理解するであろう。一般に、保存的アミノ酸置換は、ポリペプチドの機能および免疫原性の喪失を伴わずに適用することができる。これは、当業者に周知の慣行的な手順に従って容易に確かめることができる。

【０１２１】

本発明はさらに、本発明による核酸配列を含むベクターを提供する。

【０１２２】

本発明のある特定の実施形態では、ベクターは、アデノウイルスベクター、例えば、組換えヒトアデノウイルスベクターである。本発明のアデノウイルスはアデノウイルス（Ａdenoviridae）科に属し、好ましくはマストアデノウイルス（Mastadenovirus）属に属するものである。これはヒトアデノウイルスであり得るが、ウシアデノウイルス（例えば、ウシアデノウイルス３、ＢＡｄＶ３）、イヌアデノウイルス（例：ＣＡｄＶ２）、ブタアデノウイルス（例：ＰＡｄＶ３または５）、またはシミアンアデノウイルス（これにはサルのアデノウイルスおよび類人猿アデノウイルス、例えば、チンパンジーアデノウイルスもしくはゴリラアデノウイルスが含まれる）が挙げられるが、これらに限定されない、他の種に感染するアデノウイルスでもあり得る。好ましくは、アデノウイルスは、ヒトアデノウイルス（ＨＡｄＶ、もしくはＡｄＨｕ）、またはシミアンアデノウイルス、例えば、チンパンジーもしくはゴリラアデノウイルス（ＣｈＡｄ、ＡｄＣｈ、もしくはＳＡｄＶ）、またはアカゲザルアデノウイルス（ＲｈＡｄ）である。本発明において、種の表示を伴わずにＡｄと称する場合にはヒトアデノウイルスを意味し、例えば、短い表記「Ａｄ２６」は、ヒトアデノウイルス血清型２６であるＨＡｄＶ２６と同じものを意味する。また、本明細書で使用される場合、表記「ｒＡｄ」は組換えアデノウイルスを意味し、例えば、「ｒＡｄ２６」は組換えヒトアデノウイルス２６を指す。

【０１２３】

ヒトアデノウイルスを使用して最先端の研究が行われており、本発明のある特定の態様によればヒトアデノウイルスが好ましい。ある特定の好ましい実施形態では、本発明による組換えアデノウイルスは、ヒトアデノウイルスをベースにしている。好ましい実施形態では、組換えアデノウイルスは、ヒトアデノウイルス血清型５、１１、２６、３４、３５、４８、４９、５０、５２などをベースにしている。本発明の特に好ましい一実施形態では、アデノウイルスは、血清型２６のヒトアデノウイルスである。これらの血清型の利点としては、ヒト集団における低い血清有病率および／または低い既存中和抗体価、ならびに臨床試験におけるヒト対象での使用経験が挙げられる。

【０１２４】

シミアンアデノウイルスも一般に、ヒト集団において低い血清有病率および／または低い既存中和抗体価を有し、チンパンジーアデノウイルスベクターを使用したかなりの量の研究が報告されている（例えば、米国特許６０８３７１６号明細書；国際公開第２００５／０７１０９３号パンフレット；国際公開第２０１０／０８６１８９号パンフレット；国際公開第２０１０／０８５９８４号パンフレット；Farina et al, 2001, J Virol 75: 11603-13; Cohen et al, 2002, J Gen Virol 83: 151-55; Kobinger et al, 2006, Virology 346: 394-401; Tatsis et al., 2007, Molecular Therapy 15:

608-17；また、Bangari and Mittal, 2006, Vaccine 24: 849-62による概説；およびLasaro and Ertl, 2009, Mol Ther 17: 1333-39による概説も参照されたい）。したがって、他の実施形態では、本発明による組換えアデノウイルスは、シミアンアデノウイルス、例えば、チンパンジーアデノウイルスをベースにしている。ある特定の実施形態では、組換えアデノウイルスは、シミアンアデノウイルス１型、７型、８型、２１型、２２型、２３型、２４型、２５型、２６型、２７．１型、２８．１型、２９型、３０型、３１．１型、３２型、３３型、３４型、３５．１型、３６型、３７．２型、３９型、４０．１型、４１．１型、４２．１型、４３型、４４型、４５型、４６型、４８型、４９型、５０型、またはＳＡ７Ｐをベースにしている。ある特定の実施形態では、組換えアデノウイルスは、チンパンジーアデノウイルス、例えば、ＣｈＡｄＯｘ１（国際公開第２０１２／１７２２７７号パンフレットを参照）またはＣｈＡｄＯｘ２（国際公開第２０１８／２１５７６６号パンフレット参照）をベースにしている。ある特定の実施形態では、組換えアデノウイルスは、チンパンジーアデノウイルス、例えば、ＢＺ２８（国際公開第２０１９／０８６４６６号パンフレットを参照）をベースにしている。ある特定の実施形態では、組換えアデノウイルスは、ゴリラアデノウイルス、例えば、ＢＬＹ６（国際公開第２０１９／０８６４５６パンフレットを参照）またはＢＺ１（国際公開第２０１９／０８６４６６号パンフレットを参照）をベースにしている。

【０１２５】

本発明の好ましい一実施形態では、アデノウイルスベクターは、例えば、Ａｄ２６を含む、稀な血清型由来のカプシドタンパク質を含む。典型的な実施形態では、ベクターは、ｒＡｄ２６ウイルスである。「アデノウイルスカプシドタンパク質」は、特定のアデノウイルスの血清型および／または指向性の決定に関与するアデノウイルス（例えば、Ａｄ２６、Ａｄ３５、ｒＡｄ４８、ｒＡｄ５ＨＶＲ４８ベクター）のカプシド上のタンパク質を指す。アデノウイルスのカプシドタンパク質としては典型的には、ファイバー、ペントンおよび／またはヘキソンタンパク質が挙げられる。本明細書で使用される場合、特定のアデノウイルスについての「カプシドタンパク質」、例えば、「Ａｄ２６カプシドタンパク質」は、例えば、Ａｄ２６カプシドタンパク質の少なくとも一部を含むキメラカプシドタンパク質であり得る。ある特定の実施形態では、カプシドタンパク質は、Ａｄ２６のカプシドタンパク質全体である。ある特定の実施形態では、ヘキソン、ペントンおよびファイバーはＡｄ２６のものである。当業者には、複数の血清型に由来するエレメントを合わせて単一の組換えアデノウイルスベクターにしてもよいことが認識されるであろう。したがって、異なる血清型の望ましい特性を兼ね備えるキメラアデノウイルスを作製することができる。したがって、一部の実施形態では、本発明のキメラアデノウイルスは、第１の血清型の既存の免疫の非存在と、諸特性、例えば、温度安定性、組立て、係留、生産収率、再方向付けまたは改善された感染、標的細胞におけるＤＮＡの安全性などを兼ね備えるものであり得る。例えば、Ａｄ４８由来の部分的カプシドを有するＡｄ５骨格を含むキメラアデノウイルスＡｄ５ＨＶＲ４８については、国際公開第２００６／０４０３３０号パンフレットを、また、それぞれＰｔｒ１、Ｐｔｒ１２、およびＰｔｒ１３の部分的カプシドタンパク質を有するＡｄ２６ウイルス骨格を含むキメラアデノウイルスＡｄ２６ＨＶＲＰｔｒ１、Ａｄ２６ＨＶＲＰｔｒ１２、およびＡｄ２６ＨＶＲＰｔｒ１３については、国際公開第２０１９／０８６４６１を参照されたい。ある特定の好ましい実施形態では、本発明において有用な組換えアデノウイルスベクターは、主として、または完全にＡｄ２６に由来する（すなわち、ベクターはｒＡｄ２６である）。一部の実施形態では、アデノウイルスは、例えば、それがゲノムのＥ１領域内に欠失を含有するため、複製欠損性である。非グループＣアデノウイルス、例えば、Ａｄ２６またはＡｄ３５に由来するアデノウイルスでは、アデノウイルスのＥ４－ｏｒｆ６コード配列を、Ａｄ５などのヒトサブグループＣのアデノウイルスのＥ４－ｏｒｆ６に交換することが典型的である。これにより、そのようなアデノウイルスの増殖が、Ａｄ５のＥ１遺伝子を発現する周知の相補性細胞系、例えば、２９３細胞、ＰＥＲ．Ｃ６細胞などにおいて可能になる（例えば、Havenga, et al., 2006, J Gen Virol 87: 2135-43；国際公開第０３／１０４４６７号パンフレ

ットを参照されたい）。しかし、そのようなアデノウイルスは、Ａｄ５のＥ１遺伝子を発現しない非相補性細胞では複製することができないと考えられる。

【０１２６】

組換えアデノウイルスベクターの調製は、当技術分野で公知である。ｒＡｄ２６ベクターの調製は、例えば、国際公開第２００７／１０４７９２号パンフレットおよびAbbink et al., (2007) Virol 81(9): 4654-63に記載されている。Ａｄ２６の例示的なゲノム配列は、ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ ＥＦ １５３４７４および国際公開第２００７／１０４７９２号パンフレットの配列番号１に見出される。本発明に有用なベクターの例としては、例えば、国際公開第２０１２／０８２９１８号パンフレットに記載されたものが挙げられ、その開示内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０１２７】

典型的には、本発明において有用なベクターは、組換えアデノウイルスゲノム全体を含む核酸（例えば、プラスミド、コスミド、またはバキュロウイルスベクター）を使用して作製される。したがって、本発明はまた、本発明のアデノウイルスベクターをコードする単離された核酸分子も提供する。本発明の核酸分子は、ＲＮＡの形態、またはクローニングによって得られるか、もしくは合成により生成されるＤＮＡの形態であり得る。ＤＮＡは二本鎖であっても一本鎖であってもよい。

【０１２８】

本発明において有用なアデノウイルスベクターは、典型的には複製欠損性である。これらの実施形態では、ウイルスは、ウイルスの複製に極めて重要な領域、例えば、Ｅ１領域の欠失または不活性化によって複製欠損性となる。これらの領域は、例えば、目的の遺伝子、例えば、合成ＳＡＲＳ ＣｏＶ２Ｓタンパク質をコードする遺伝子（通常、プロモーターに連結されている）、またはＳＡＲＳ ＣｏＶ２Ｓ抗原ポリペプチドをコードする遺伝子（通常、プロモーターに連結されている）を領域内に挿入することによって、実質的に欠失または不活性化され得る。一部の実施形態では、本発明のベクターは、他の領域、例えば、Ｅ２、Ｅ３もしくはＥ４領域における欠失、またはこれらの領域のうちの１つもしくは複数の内部へのプロモーターに連結された異種遺伝子の挿入を含み得る。Ｅ２－および／またはＥ４－突然変異型アデノウイルスについては、一般に、Ｅ２－および／またはＥ４－相補性細胞系が組換えアデノウイルスを作製するために使用される。アデノウイルスのＥ３領域内の突然変異は、Ｅ３が複製に必要とされないため、細胞系によって補完される必要はない。

【０１２９】

ある特定の実施形態では、組換えヒトアデノウイルスは、アデノウイルスゲノムのＥ１領域における欠失、Ｅ３領域における欠失、またはＥ１およびＥ３領域の両方における欠失を有する。したがって、ある特定の実施形態では、本発明によるアデノウイルスベクターは、ウイルス複製のために必要なアデノウイルスゲノムのＥ１領域、例えば、Ｅ１ａ領域および／またはＥ１ｂ領域の少なくとも１つの必須遺伝子機能を欠損している。ある特定の実施形態では、本発明によるアデノウイルスベクターは、非必須Ｅ３領域の少なくとも一部を欠損している。ある特定の実施形態では、ベクターは、Ｅ１領域の少なくとも１つの必須遺伝子機能および非必須Ｅ３領域の少なくとも一部を欠損している。アデノウイルスベクターは、「多欠損性」であってもよく、これはアデノウイルスゲノムの２つ以上の領域の各々において、アデノウイルスベクターが１つまたは複数の必須遺伝子機能を欠損していることを意味する。例えば、上述のＥ１欠損性またはＥ１、Ｅ３欠損性アデノウイルスベクターは、Ｅ４領域の少なくとも１つの必須遺伝子および／またはＥ２領域の少なくとも１つの必須遺伝子（例えば、Ｅ２Ａ領域および／またはＥ２Ｂ領域）をさらに欠損していることができる。

【０１３０】

ある特定の実施形態では、ベクターは血清型２６の組換えヒトアデノウイルス（ｒＡｄ２６ベクター）である。この血清型は一般に、ヒト集団において低い血清有病率および／または低い既存中和抗体価を有する。ｒＡｄ２６ベクターの調製は、例えば、国際公開第

２００７／１０４７９２号パンフレットおよびAbbink et al., (2007) Virol 81(9): 4654-63に記載されている。Ａｄ２６の例示的なゲノム配列は、ＧｅｎＢａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　ＥＦ１５３４７４および国際公開第２００７／１０４７９２号パンフレットの配列番号１に見出される。

【０１３１】

好ましい実施形態では、アデノウイルスは、例えば、それがゲノムのＥ１領域内に欠失を含有するため、複製欠損性である。当業者に公知であるように、アデノウイルスゲノムからの必須領域の欠失の場合、これらの領域によってコードされる機能は、好ましくはプロデューサー細胞によってトランス性に提供されなければならず、すなわち、Ｅ１、Ｅ２および／またはＥ４領域の一部または全体がアデノウイルスから欠失している場合、これらは、例えば、そのゲノム中に組み込まれて、またはいわゆるヘルパーアデノウイルスもしくはヘルパープラスミドの形態で、プロデューサー細胞内に存在しなければならない。アデノウイルスはＥ３領域に欠失を有してもよく、これは複製に必須ではなく、それ故にそのような欠失は相補される必要はない。

【０１３２】

好ましい一実施形態では、組換え型の複製不全ヒトアデノウイルス２６型（Ａｄ２６）ベクターは、その融合前のコンフォメーションで安定化されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク（Ｓ）タンパク質をコードするように構築される。好ましくは、アデノウイルスは、配列番号２０５の核酸を含む。

【０１３３】

本発明に使用するためのアデノウイルスベクターを十分な量で作製するために、典型的にはパッケージング細胞系が使用される。パッケージング細胞は、欠失したかまたは不活性化されているこれらの遺伝子を複製欠損性ベクター内に含む細胞であり、したがって、細胞内でウイルスが複製することが可能である。Ｅ１領域に欠失を有するアデノウイルスのための好適なパッケージング細胞系としては、例えば、ＰＥＲ．Ｃ６、９１１、２９３およびＥ１　Ａ５４９が挙げられる。

【０１３４】

本発明の好ましい一実施形態では、ベクターはアデノウイルスベクターであり、より好ましくはｒＡｄ２６ベクター、最も好ましくはアデノウイルスゲノムのＥ１領域に少なくとも１つの欠失を有するｒＡｄ２６ベクター、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Abbink, J Virol, 2007. 81(9): p. 4654-63に記載されているものである。典型的には、合成ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２Ｓ抗原をコードする核酸配列を、アデノウイルスゲノムのＥ１および／またはＥ３領域にクローニングする。

【０１３５】

ある特定の実施形態では、コロナウイルスＳタンパク質をコードする核酸は、少なくとも１つのテトラサイクリンオペレーター（ＴｅｔＯ）モチーフを含むサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーターに作動可能に連結している。これにより、ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２Ｓタンパク質インサートを含むアデノウイルス粒子の費用対効果の高い大規模製造が可能になる。理論に制約されるつもりはないが、ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２Ｓタンパク質はアデノウイルス粒子産生のレベルの低下を招くと考えられている。ＣＭＶプロモーターへのＴｅｔＯモチーフの付加は、より高レベルでのアデノウイルス粒子産生を可能にする。

【０１３６】

本明細書で使用される場合、「プロモーター」は、メッセンジャーＲＮＡ中の遺伝子配列の転写の開始を可能にする核酸配列であり、そのような転写は、プロモーター上またはその近くへのＲＮＡポリメラーゼの結合によって開始される。

【０１３７】

上記に定義した通り、ある特定の実施形態では、プロモーターは、少なくとも１つのテトラサイクリンオペレーター（ＴｅｔＯ）モチーフを含むサイトメガロウイルスプロモーターである。ＴｅｔＯモチーフは、「調節配列」または「調節エレメント」と称することができるが、これは、本明細書で使用される場合、それが作動可能に連結された核酸配列

の転写をモジュレートし、それ故に転写調節物質として作用する、典型的にはＤＮＡであるがそれには限定されない核酸のセグメントを指す。調節配列はしばしば、転写タンパク質および／または転写因子、エンハンサー、またはリプレッサーなどの核酸結合ドメインによって認識される転写結合ドメインである核酸配列を含む。例えば、リプレッサー配列をプロモーターに作動可能に共役させることが可能であり、このリプレッサー配列は、リプレッサータンパク質を発現する生産細胞系において導入遺伝子の発現を減少させるかまたは防止することができるリプレッサータンパク質による結合を受けることができる。これは、継代時および／またはこれが生産細胞系において大量に産生される場合に、核酸分子の遺伝的安定性および／または発現レベルを改善することができる。そのようなシステムは当技術分野で記載されている。調節配列は、テトラサイクリンリプレッサータンパク質（ＴｅｔＲ）の存在下で発現が阻害されるように、１つまたは複数のテトラサイクリンオペレーター（ＴｅｔＯ）モチーフ／配列を含むことができる。テトラサイクリンの非存在下では、ＴｅｔＲタンパク質はＴｅｔＯ部位に結合することができ、ＴｅｔＯモチーフ／配列に作動可能に連結された導入遺伝子（例えば、ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２Ｓ抗原）の転写を抑制することができる。ある特定の実施形態では、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２Ｓタンパク質をコードする核酸は、アデノウイルスベクター中に存在する場合、少なくとも１つのテトラサイクリンオペレーター（ＴｅｔＯ）モチーフを含むサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーターに作動可能に連結されており、その結果、ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２Ｓタンパク質の発現は、ＴｅｔＲタンパク質が発現されるプロデューサー細胞系において産生される組換えアデノウイルスにおいて阻害される。組換えアデノウイルスベクターが、ＴｅｔＲタンパク質を発現しない対象または細胞に導入される場合には、発現は阻害されないと考えられる。しかし、本発明は、少なくとも１つのテトラサイクリンオペレーター（ＴｅｔＯ）モチーフを含むサイトメガロウイルスプロモーターの使用には限定されない。

【０１３８】

本明細書で使用される場合、用語「リプレッサー」は、組換え発現ベクター（例えば、アデノウイルスベクター）の異種性タンパク質産物の産生を阻害する、それに干渉する、遅延させる、および／または抑制する能力を有する分子（例えば、タンパク質）を指す。リプレッサーは、発現カセットなどにおいて発現ベクターに沿った適切な位置で結合部位に干渉することによって発現を阻害することができる（例えば、ＴｅｔＲはＣＭＶプロモーター中のＴｅｔＯモチーフに結合することができる）。ベクター増殖中のベクター導入遺伝子発現の抑制は、導入遺伝子の不安定性を防ぐことができ、産生中の導入遺伝子を有するベクターの収率を高めることができる。

【０１３９】

核酸は、それが別の核酸配列と構造的または機能的な関係に置かれている場合、「作動可能に連結され」ている。例えば、ＤＮＡの１つのセグメントは、ＤＮＡの別のセグメントと、それらが同一の連続したＤＮＡ分子上で互いに対して配置され、構造的または機能的な関係を有する場合には、作動可能に連結されることができ、これは例えば、コード配列の転写を助長するようにコード配列に対して配置されているプロモーターもしくはエンハンサー；翻訳を助長するようにコード配列に対して配置されているリボソーム結合部位；またはプレタンパク質（例えば、コードされるポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質）の発現を助長するようにコード配列に対して配置されているプレ配列もしくは分泌リーダーなどである。他の例において、作動可能に連結された核酸配列は、連続してはいないが、核酸としてまたはそれらによって発現されるタンパク質として、それらが互いに機能的関係を有するように配置されている。例えば、エンハンサーは連続している必要はない。連結は、便利な制限部位でのライゲーションによって、または合成オリゴヌクレオチドアダプターもしくはリンカーを使用することによって達成することができる。

【０１４０】

ある特定の実施形態では、少なくとも１つのＴｅｔＯモチーフを含むＣＭＶプロモーターは、配列番号２１９のヌクレオチド配列を含み、好ましくは、ＣＭＶプロモーターは配列番号２１９からなる。

【０１４１】
好ましい一実施形態では、アデノウイルスベクターは、ＰＥＲ．Ｃ６－テトラサイクリンリプレッサー（ＴｅｔＲ）細胞内で産生される。
【０１４２】
本発明はさらに、本発明による核酸、タンパク質、および／またはベクターを含む組成物を提供する。ヒトへの投与のために、本発明は、核酸、タンパク質、および／またはベクター、ならびに薬学的に許容される担体または賦形剤を含む薬学組成物を使用することができる。これに関連して、用語「薬学的に許容される」は、担体または賦形剤が、使用される用量および濃度で、それらが投与される対象においていかなる望ましくない影響も有害な影響も引き起こさないことを意味する。そのような薬学的に許容される担体および賦形剤は、当技術分野で周知である（Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer and L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000];およびHandbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]を参照）。精製された核酸、タンパク質、および／またはベクターは、好ましくは製剤化され、無菌溶液として投与されるが、凍結乾燥調製物を利用することも可能である。滅菌溶液は、滅菌濾過または当技術分野で公知の他の方法によって調製される。溶液は、その後に凍結乾燥されるか、または医薬投与容器に充填される。溶液のｐＨは一般に、ｐＨ　３．０から９．５の範囲、好ましくはｐＨ　５．０から７．５の範囲である。核酸、タンパク質、および／またはベクターは、典型的には、薬学的に許容される好適な緩衝剤を有する溶液中にあり、溶液はまた塩を含有してもよい。任意選択で、アルブミンなどの安定剤が存在してもよい。ある特定の実施形態では、界面活性剤が添加される。ある特定の実施形態では、核酸、タンパク質、および／またはベクターは、注射用調製物として製剤化することができる。これらの製剤は、核酸、タンパク質、および／またはベクターの有効量を含有し、無菌の液体溶液、液体懸濁液または凍結乾燥されたもののいずれかであり、任意選択で安定剤または賦形剤を含有する。
【０１４３】
例えば、アデノウイルスを、Ａｄｅｎｏｖｉｒｕｓ　Ｗｏｒｌｄ　Ｓｔａｎｄａｒｄ（Hoganson et al., Development of a stable adenoviral vector formulation, Bioprocessing March 2002, p. 43-48）にも使用されている緩衝液：２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ８、２５ｍＭ　ＮａＣｌ、２．５％グリセロール中に保存してもよい。ヒトへの投与に好適である別の有用な製剤用緩衝液は、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、２ｍＭ　ＭｇＣｌ２、２５ｍＭ　ＮａＣｌ、スクロース１０％ｗ／ｖ、ポリソルベート－８０　０．０２％ｗ／ｖである。明らかに、多くの他の緩衝液を使用することができ、精製された（アデノ）ウイルス調製物の保存および医薬投与のための好適な製剤のいくつかの例は、例えば、欧州特許第０８５３６６０号明細書、米国特許第６，２２５，２８９号明細書、および国際特許出願第９９／４１４１６号パンフレット、国際特許出願第９９／１２５６８号パンフレット、国際特許出願第００／２９０２４号パンフレット、国際特許出願第０１／６６１３７号パンフレット、国際特許出願第０３／０４９７６３号パンフレット、国際特許出願第０３／０７８５９２号パンフレット、国際特許出願第０３／０６１７０８号パンフレットに見出すことができる。
【０１４４】
ある特定の実施形態では、アデノウイルス組成物は、以下の不活性成分：
・　クエン酸一水和物
・　クエン酸三ナトリウム二水和物
・　エタノール
・　２－ヒドロキシプロピル－β－シクロデキストリン（ＨＢＣＤ）
・　ポリソルベート８０
・　塩化ナトリウム

・　水酸化ナトリウム
・　注射用水
および任意選択で塩酸
を含有する筋肉内注射用の無菌懸濁液であり、この製品は保存剤を含有しない。
【０１４５】
好ましい一実施形態では、アデノウイルスベクターワクチンの初期の有効貯蔵期間は、推奨される貯蔵条件である－２５℃～－１５℃（－１３°Ｆ～５°Ｆ）で凍結保存した場合には２４か月であり、これらの２４か月以内に２℃～８℃（３６°Ｆ～４６°Ｆ）で保存した場合には３か月である。ある特定の実施形態では、本発明による組成物は、さらなる活性成分と組み合わせた本発明による（アデノ）ベクターを含む。そのようなさらなる活性成分は、１つまたは複数のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質抗原、例えば、本発明によるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質、または任意の他のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質抗原、または類似のもしくは代替的なＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２抗原をコードする核酸を含むさらなるベクターを含み得る。そのようなベクターはやはり、非アデノウイルス性であってもよいし、またはアデノウイルスであってもよく、このうちの後者は任意の血清型のものであり得る。
【０１４６】
ある特定の実施形態では、アデノウイルスを含む組成物は、１つまたは複数のアジュバントをさらに含む。アジュバントは、適用される抗原決定基に対する免疫応答をさらに高めることが当技術分野で公知であり、アデノウイルスおよび好適なアジュバントを含む医薬組成物は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第２００７／１１０４０９号パンフレットに開示されている。用語「アジュバント」および「免疫刺激剤」は互換的に使用され、免疫系の刺激を引き起こす１つまたは複数の物質と定義される。これに関連して、アジュバントは、本発明のアデノウイルスベクターに対する免疫応答を増強するために使用される。好適なアジュバントの例としては、水酸化アルミニウムおよび／またはリン酸アルミニウムなどのアルミニウム塩；ＭＦ５９（例えば、国際公開第９０／１４８３７号パンフレットを参照）などのスクアレン－水エマルジョンを含む油－エマルジョン組成物（または水中油型組成物）；サポニン製剤、例えばＱＳ２１および免疫刺激複合体（ＩＳＣＯＭＳ）など（例えば、米国特許第５，０５７，５４０号明細書；国際公開第９０／０３１８４号パンフレット、国際公開第９６／１１７１１号パンフレット、国際公開第２００４／００４７６２号パンフレット、国際公開第２００５／００２６２０号パンフレットを参照）；その例に、モノホスホリルリピドＡ（ＭＰＬ）、３－Ｏ－脱アシル化ＭＰＬ（３ｄＭＰＬ）、ＣｐＧ－モチーフ含有オリゴヌクレオチド、ＡＤＰ－リボシル化細菌毒素またはその突然変異体、例えば、大腸菌（E. coli）易熱性エンテロトキシンＬＴ、コレラ毒素ＣＴなどがある、細菌または微生物の派生物が挙げられる。また、例えば、Ｃ４結合タンパク質（Ｃ４ｂｐ）のオリゴマー化ドメインと目的の抗原との融合物をコードする異種核酸を使用することによって、ベクターにコード化されたアジュバントを使用することも可能である（例えば、Solabomi et al, 2008, Infect Immun 76: 3817-23）。ある特定の実施形態では、本発明の組成物は、例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、リン酸カリウムアルミニウム、またはそれらの組合せの形態にあるアルミニウムを、１用量当たり０．０５～５ｍｇ、例えば、０．０７５～１．０ｍｇのアルミニウム含有量の濃度で、アジュバントとして含む。
【０１４７】
他の実施形態では、組成物はアジュバントを含まない。
【０１４８】
本発明はさらに、本発明による核酸、タンパク質、および／またはベクターを含む、ＣＯＶＩＤ－１９に対するワクチンを提供する。用語「ワクチン」は、ある特定の病原体または疾患に対して対象において治療的な程度の免疫を誘導するのに有効な活性成分を含有する薬剤または組成物を意味する。本発明によれば、ワクチンは、ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２のＳタンパク質に対する免疫応答、好ましくは保護免疫応答をもたらす、ＳＡＲＳ　Ｃｏ

Ｖ－２Ｓタンパク質、特に配列番号１のアミノ酸配列を含むＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２タンパク質、またはその抗原断片をコードする、血清型２６の組換えアデノウイルスの有効量を含むことができる。本発明のワクチンは、対象において入院に至る重篤な下気道疾患を予防し、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染および複製による肺炎および細気管支炎などの合併症の頻度を減少させる方法に使用され得る。ワクチンはまた、いわゆる曝露後予防（ＰＥＰ）、すなわち、コロナウイルスへの潜在的なもしくは記録された曝露後の疾病を予防するため、および／または感染の二次伝播のリスクを低減するためにも使用され得る。本発明による「ワクチン」は、典型的には、薬学的に許容される希釈剤、担体または賦形剤を含む。それはさらなる活性成分を含んでもよいし、または含まなくともよい。

【０１４９】

ある特定の実施形態では、それは、例えば、ＳＡＲＳ．ＣｏＶ２の他のタンパク質および／または他の感染病原体に対する免疫応答を誘導する他の成分をさらに含む、組合せワクチンであってもよい。

【０１５０】

ある特定の実施形態では、ワクチンは、本発明によるベクター、ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２Ｓタンパク質、および任意選択的にアジュバントを含む組合せワクチンであり、ベクターおよびＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２タンパク質は同時投与用である。ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２タンパク質は、本明細書に記載されるタンパク質、または当技術分野で公知の任意の他の好適なＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２Ｓタンパク質であってもよい。

【０１５１】

本発明によれば、ベクターおよびタンパク質は好ましくは同時投与用である（すなわち、同時に投与される）。対象へのベクターおよびタンパク質の投与の文脈において、「同時投与または共投与」は、ベクターおよびタンパク質を組み合わせて使用することを指し、ここで前記ベクターおよびタンパク質は２４時間以内に対象に投与される。

【０１５２】

ある特定の実施形態では、ベクターおよびタンパク質は、例えば、薬学的に許容される緩衝液、担体、賦形剤および／またはアジュバントと、例えば混合されて、投与用の単一の組成物として共製剤化され、対象に共に同時に投与される。他の実施形態では、ベクターおよびタンパク質は、例えば、薬学的に許容される緩衝液、担体、賦形剤および／またはアジュバントと、別々の組成物として製剤化され、２４時間以内に、例えば、１２時間以内、１０時間以内、８時間以内、６時間以内、４時間以内、２時間以内、または１時間以内に、例えば、対象の同じ腕または２本の異なる腕に、ほぼ同時に別々の組成物として対象に投与される。

【０１５３】

本発明は、１８歳以上の個体の、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）により引き起こされるコロナウイルス疾患２０１９（ＣＯＶＩＤ－１９）を予防するための能動免疫化の方法を提供する。

【０１５４】

本発明は、１６歳以上の個体の、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）により引き起こされるコロナウイルス疾患２０１９（ＣＯＶＩＤ－１９）を予防するための能動免疫化の方法を提供する。

【０１５５】

本発明は、１２歳以上の個体の、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）により引き起こされるコロナウイルス疾患２０１９（ＣＯＶＩＤ－１９）を予防するための能動免疫化の方法を提供する。

【０１５６】

本発明は、２か月齢以上の個体の、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）により引き起こされるコロナウイルス疾患２０１９（ＣＯＶＩＤ－１９）を予防するための能動免疫化の方法を提供する。

【０１５７】

本発明はまた、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）バリアントにより引き起こされるコロナウイルス疾患２０１９（ＣＯＶＩＤ－１９）を予防するための能動免疫化の方法も提供する。

【０１５８】

ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２バリアントは、好ましくは、英国バリアント（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ｌｉｎ．　Ｂ．１．１．７）、南アフリカバリアント（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　５０１Ｙ．Ｖ２）およびデンマークバリアント（クラスター５）からなる群から選択される。

【０１５９】

ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２バリアントは、ｄｅｌ６９－７０、ｄｅｌ１４５、Ａ５７０Ｄ、Ｄ６１４Ｇ、Ｐ６８１Ｈ、Ｔ７１６Ｉ、Ｓ９８２Ａ、Ｄ１１１８Ｈ、Ｄ８０Ａ、Ｄ２１５Ｇ、Ｌ２４２Ｈ、Ｒ２４６Ｉ、Ｋ４１７Ｎ、Ｅ４８４Ｋ、Ｎ５０１Ｙ、Ｙ４３５Ｆ、Ｉ１６９２Ｖ、Ｍ１２２９ＩおよびＡ７０１Ｖからなる群から選択される１つまたは複数の突然変異を含み得る。

【０１６０】

ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２バリアントは、Ｅ４８４Ｋ突然変異と、ｄｅｌ６９－７０、ｄｅｌ１４５、Ａ５７０Ｄ、Ｄ６１４Ｇ、Ｐ６８１Ｈ、Ｔ７１６Ｉ、Ｓ９８２Ａ、Ｄ１１１８Ｈ、Ｄ８０Ａ、Ｄ２１５Ｇ、Ｌ２４２Ｈ、Ｒ２４６Ｉ、Ｋ４１７Ｎ、Ｅ４８４Ｋ、Ｎ５０１Ｙ、Ｙ４３５Ｆ、Ｉ１６９２Ｖ、Ｍ１２２９ＩおよびＡ７０１Ｖからなる群から選択される１つまたは複数の突然変異とを有し得る。そのようなＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２バリアントの例は、Ｂ．１．３５１、Ｂ．１．１．７、Ｐ．１およびＣＡＬ２０Ｃである。

【０１６１】

本発明はまた、例えば、ＥＬＩＳＡによって測定される、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２結合抗体を、それを必要とする対象において誘導するための方法であって、本明細書に記載される組成物またはワクチンを対象に投与するステップを含む、方法も提供する。

【０１６２】

本発明はまた、例えば、ＶＮＡによって測定される、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和抗体を、それを必要とする対象において誘導するための方法であって、本明細書に記載される組成物またはワクチンを対象に投与するステップを含む、方法も提供する。

【０１６３】

本発明はまた、例えば、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２Ｓタンパク質ペプチド刺激後のフローサイトメトリーおよび細胞内染色によって評価される、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２特異的Ｔ細胞応答を、それを必要とする対象において誘導するための方法であって、本明細書に記載される組成物またはワクチンを対象に投与するステップを含む、方法も提供する。

【０１６４】

本発明はまた、対象の例えば、鼻腔および肺におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２またはそのバリアントの感染および／または複製を減少させる方法であって、本明細書に記載される組成物またはワクチンを対象に投与するステップを含む、方法も提供する。これは対象におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染に起因する有害効果を減少させ、それ故にそのような有害効果に対する対象の保護に寄与すると考えられる。ある特定の実施形態では、ＳＡＲＳ－ＣＯＶ－２感染の有害効果を本質的に予防することができ、すなわち、それが臨床的に問題とならないような低いレベルに減少させることができる。組換えアデノウイルスは、上述の実施形態を含む、本発明によるワクチンの形態であり得る。さらなる活性成分の投与は、例えば、別々の投与によって、または本発明のワクチンの組合せ製品を投与することによって行うことができる。

【０１６５】

本発明はまた、分子的に確認された中等症ないし重症／重篤なＣＯＶＩＤ－１９の予防のための方法であって、１用量または２用量ワクチンとして投与される場合に、本明細書に記載される組成物またはワクチンを対象に投与するステップを含む、方法も提供する。

ある特定の実施形態では、本発明は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２血清陰性の成人において、分子的に確認された中等症ないし重症／重篤なＣＯＶＩＤ－１９の、プラセボと比較した予防のための方法であって、１用量または２用量ワクチンとして投与される場合に、本明細書に記載される組成物またはワクチンを対象に投与するステップを含む、方法も提供する。

【０１６６】

本発明はまた、分子的に確認された重症／重篤なＣＯＶＩＤ－１９の予防のための方法であって、１用量または２用量ワクチンとして投与される場合に、本明細書に記載される組成物またはワクチンを対象に投与するステップを含む、方法も提供する。ある特定の実施形態では、本発明は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２血清陰性の成人において、分子的に確認された重症／重篤なＣＯＶＩＤ－１９の、プラセボと比較した予防のための方法であって、１用量または２用量ワクチンとして投与される場合に、本明細書に記載される組成物またはワクチンを対象に投与するステップを含む、方法も提供する。

【０１６７】

本発明によれば、中等症ＣＯＶＩＤ－１９は、以下のように定義される：入手可能ないずれかの気道試料または他の試料によるＲＴ－ＰＣＲまたは分子検査でＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２陽性の結果であり、中央検査室で分子的に確認され、かつ

徴候および症状が消失するまでの観察期間中のいずれかの時点で：

以下のうちのいずれか１つの徴候または症状の新規発生または悪化：

呼吸数≧２０回／分；

酸素飽和度（ＳｐＯ２）が異常であるが、海抜０ｍの室内空気で依然として９３％を超える；

肺炎の臨床的または放射線学的所見；

ＤＶＴの放射線学的所見；

息切れまたは呼吸困難；

または

以下のうちのいずれか２つの徴候または症状の新規発生または悪化：

発熱（３８．０℃以上または１００．４°Ｆ以上）；

心拍数≧９０回／分；

悪寒または振戦；

嗅覚障害または味覚障害の新規発生または変化；

咽頭痛；

倦怠感；

頭痛；

咳；

筋肉痛（筋痛）；

胃腸症状；

足または足指の発赤または青あざのような所見。

【０１６８】

本発明によれば、重症／重篤なＣＯＶＩＤ－１９は、以下のように定義される：入手可能ないずれかの気道試料または他の試料によるＲＴ－ＰＣＲまたは分子検査でＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２陽性の結果であり、中央検査室で分子的に確認され；かつ

重症の全身性疾患を示す安静時の臨床徴候（呼吸数≧３０回／分、心拍数≧１２５回／分、海抜０ｍでの室内空気でＳｐＯ２≦９３％、またはＰａＯ２／ＦｉＯ２＜３００　ｍｍＨｇ）；

呼吸不全（高流量酸素、非侵襲的換気、機械的換気、またはＥＣＭＯ（体外式膜型人工肺）を必要とすると定義される）

ショックの所見（収縮期血圧＜９０ｍｍＨｇ、拡張期血圧＜６０ｍｍＨｇ、または昇圧薬を必要とする状態と定義される）；

重大な急性の腎機能障害、肝機能障害、または神経機能障害；

ＩＣＵへの入室；
死亡。
【０１６９】
ある特定の実施形態では、重症ＣＯＶＩＤ－１９は、ＦＤＡガイダンスにより定義される通りである。
【０１７０】
本発明によれば、軽症ＣＯＶＩＤ－１９は以下のように定義される：入手可能ないずれかの気道試料または他の試料によるＲＴ－ＰＣＲまたは分子検査でＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２陽性の結果であり、中央検査室で分子的に確認され、かつ
以下の症状のうちの１つ：
発熱（３８．０℃以上または１００．４°Ｆ以上）
喉の痛み、
頭痛、
筋肉痛（筋痛）、
胃腸症状、
咳、
胸部うっ血、
鼻水、
喘鳴、
皮疹
目の刺激または眼脂、
悪寒、
嗅覚障害または味覚障害の新規発生または変化、
足または足指の発赤または青あざのような所見、
悪寒戦慄または振戦、
倦怠感（食欲不振、全般に体調不良、疲労、身体的衰弱）。
【０１７１】
症例は、上記の症例定義を満たすものの中等症ないし重度／重篤の定義を満たさない場合には軽症とみなされる。
【０１７２】
無症候性または未検出のＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２感染は、以下のように定義される：
参加者が徴候および症状に基づいてＣＯＶＩＤ－１９が疑われる基準を満たしていない；かつ
入手可能ないずれかの気道試料（例えば、鼻スワブ試料、喀痰試料、咽頭スワブ試料、唾液試料）または他の試料によるＲＴ－ＰＣＲまたは分子検査でＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２陽性の結果である；または
血清学的（非Ｓタンパク質）検査で陽性（血清学的転換）に発色する。
【０１７３】
本発明はまた、分子的に確認された中等症ないし重症／重篤なＣＯＶＩＤ－１９を有する参加者において、定量的逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）によって評価されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルス量を減少させるための方法も提供する。
【０１７４】
本発明はまた、分子的に確認された任意のＣＯＶＩＤ－１９に関連する肺炎の発生をプラセボと比較して予防するかまたは減少させるための方法も提供する。
【０１７５】
本発明はまた、ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２感染により引き起こされる症状を減少させるための方法も提供する。
【０１７６】
本発明はまた、分子的に確認された任意のＣＯＶＩＤ－１９に関連する入院の発生をプラセボと比較して予防するかまたは減少させるための方法も提供する。

【０１７７】
本発明はまた、分子的に確認された任意のＣＯＶＩＤ－１９に関連する急性呼吸促迫症候群の発生をプラセボと比較して予防するかまたは減少させるための方法も提供する。
【０１７８】
本発明はまた、プラセボと比較した場合の、分子的に確認された任意のＣＯＶＩＤ－１９に関連する敗血症の発生を予防するかまたは減少させるための方法も提供する。
【０１７９】
本発明はまた、分子的に確認された任意のＣＯＶＩＤ－１９に関連する敗血症性ショックの発生をプラセボと比較して予防するかまたは減少させるための方法も提供する。
【０１８０】
本発明はまた、分子的に確認された任意のＣＯＶＩＤ－１９に関連する死亡を予防するかまたは減少させる方法も提供する。
【０１８１】
好ましい一実施形態では、本方法は、本発明によるワクチンの5×10^{10}ｖｐを含む０．５ｍＬの単回投与としての組成物またはワクチンの投与を含む。
【０１８２】
ある特定の実施形態では、ワクチンの効果（すなわち、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２結合および／もしくは中和抗体の誘導ならびに／またはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２特異的Ｔ細胞応答の誘導）は、ワクチンの投与から８日後に既に生じる。
【０１８３】
ある特定の実施形態では、ワクチンの効果は、レジメンに応じて、試験ワクチンの初回投与から少なくとも１４日後に生じる。ある特定の実施形態では、ワクチンの効果は、レジメンに応じて、試験ワクチンの初回投与から少なくとも２８日後に生じる。
【０１８４】
好ましい実施形態では、本発明は、分子的に確認された中等症ないし重症のＣＯＶＩＤ－１９を予防するための方法を提供する。
【０１８５】
本発明による組成物またはワクチンは、分子的に確認された中等症ないし重症のＣＯＶＩＤ－１９に対して少なくとも５０、５５、６０、６５または７０％のワクチン有効性を有することが好ましい。好ましくは、本発明による組成物またはワクチンは、ワクチン接種から少なくとも１４日後にワクチン有効性を生じ、分子的に確認された中等症ないし重症のＣＯＶＩＤ－１９に対して少なくとも６０％、好ましくは少なくとも６５％のワクチン有効性を有する。
【０１８６】
本発明によれば、組成物またはワクチンは、ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２により引き起こされるＣＯＶＩＤ－１９のほかに、英国（Ｂ１．１．７／５０１Ｙ．Ｖ１）、南アフリカ２１２（５０１Ｙ．Ｖ２）およびブラジル（Ｂ１．１．２８／５０１．Ｖ３）における急速な症例数の増加と関連していて特定の有病率を有する循環するＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントの少なくともいくつかに対しても有効である。
【０１８７】
本発明によれば、ワクチンの単回投与は、中等症ないし重症／重篤なＣＯＶＩＤ－１９の予防に有効であり、ワクチン接種から１４日後および２８日後の両方でワクチン有効性（ＶＥ）が６６％であることが示された。
【０１８８】
投与２８日後の中等症／重症疾患に対するワクチン有効性は、米国で７１％、ブラジルで６６％、南アフリカで５７％であり、株のほとんど（９０％）がバリアント５０１Ｙ．Ｖ２（南アフリカバリアント）であった。重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９に対する高いワクチン有効性（全体で８５％）が認められ、１８～５９歳では９０％を上回る有効性であった。この所見は、ほぼすべての症例がＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の新バリアントに感染された南アフリカを含め、国および地域（南北アメリカ、南アフリカ）を越えて一貫してみられ

た。

【０１８９】

有効性の発生は１４日目と推定され、有効性は５６日目まで増加し、特に重症疾患に対してはそうであり、これは１４日目以降に検出され、５６日目まで増加し続けて８５日目まで漸減の徴候がみられなかった中和抗体価の所見と一致していた。

【０１９０】

本発明による組成物またはワクチンは、対象、例えば、ヒト対象に投与することができる。１回の投与で対象に提供されるアデノウイルスの総用量は、一般に、1×10^{7}ウイルス粒子（ｖｐ）と1×10^{12}ｖｐとの間、好ましくは1×10^{8}ｖｐと1×10^{11}ｖｐとの間、例えば、3×10^{8}と5×10^{10}ｖｐとの間、例えば、10^{9}と3×10^{10}ｖｐとの間である。

【０１９１】

好ましい一実施形態では、本発明のワクチンは、１用量レジメン、または用量が約１、２、もしくは３か月間隔で投与される２用量レジメンにおいて、１用量当たり1.25×10^{10}、2.5×10^{10}、5×10^{10}または1×10^{11}ｖｐの用量でヒト対象に投与される。

【０１９２】

ある特定の実施形態では、本発明のワクチンは、１用量レジメンにおいて１用量当たり1×10^{11}ｖｐの用量でヒト対象に投与され、続いて６、１２、または２４か月の時点で同じ用量で２回目のワクチン接種が行われる。

【０１９３】

好ましい一実施形態では、本発明のワクチンは、１用量レジメンにおいて１用量当たり5×10^{10}ｖｐの用量でヒト対象に投与される。

【０１９４】

別の好ましい実施形態では、本発明のワクチンは、１用量レジメンにおいて１用量当たり1×10^{11}ｖｐの用量でヒト対象に投与される。

【０１９５】

別の好ましい実施形態では、ワクチンは、１用量当たり5×10^{10}ｖｐの用量での第１の投与、および約２か月（８週間または５６日間）の間隔をおいて投与される１用量当たり5×10^{10}ｖｐの第２の投与を含む２用量レジメンでヒト対象に投与される。

【０１９６】

ある特定の実施形態では、ワクチンは、約２か月（８週間）の間隔をおいて投与される２用量レジメンにおいて１用量当たり5×10^{10}ｖｐの用量でヒト対象に投与され、続いて８か月、１４か月、および２６か月（すなわち、２用量レジメンの完了から６か月、１２か月または２４か月後）の時点で同じ用量でさらなるワクチン接種が行われる。

【０１９７】

好ましい一実施形態では、組成物は、１用量レジメンにおいて１用量当たり5×10^{10}ｖｐの用量で投与される。

【０１９８】

アデノウイルス組成物の投与は、標準的な投与経路を使用して行うことができる。限定されない実施形態としては、注射、例えば、筋肉内、皮内などによる非経口投与、または皮下、経皮、もしくは粘膜投与、例えば、鼻腔内、経口などによる投与が挙げられる。しかし、本発明によれば、ワクチンを筋肉内投与することが特に好ましい。筋肉内投与の利点は、それが簡単で、十分に確立されており、６か月未満の乳児の鼻腔内投与に対する安全性の懸念がないことである。一実施形態では、組成物は、筋肉内注射によって、例えば、腕の三角筋または大腿の外側広筋に投与される。

【０１９９】

本明細書で使用される場合、対象は、好ましくは、哺乳動物、例えば、齧歯類、例えば、マウス、コットンラット、または非ヒト霊長類、またはヒトである。好ましくは、対象はヒト対象である。対象は、任意の年齢、例えば、約１か月から１００歳、例えば、約２

か月から約８０歳、約６か月から約３歳、約３歳から約１８歳、約１２歳から約１８歳、約１８歳から約５５歳、約５０歳から約７５歳などであり得る。ある特定の好ましい実施形態では、対象は２歳以上のヒトである。他の好ましい実施形態では、ヒト対象は１８歳以上のヒト、好ましくは６０歳以上のヒト、または６５歳以上のヒトである。

【０２００】

ある特定の実施形態では、組成物またはワクチンは、対象に複数回、例えば、１年に１回投与される。ある特定の実施形態では、ワクチン接種の方法は、対象への組成物またはワクチンの単回投与からなる。また、本発明のワクチンの１回またはそれ以上の２回目（またはブースター）投与を提供することも可能である。第２のワクチン接種が行われる場合、典型的には、そのような第２のワクチン接種は、組成物を初めて対象に投与した後（そのような場合、「プライミングワクチン接種」と呼ばれることがある）、１週間から１年の間、好ましくは２週間から４か月の間の時点に同じ対象に投与される。

【０２０１】

本発明はさらに、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２Ｓタンパク質またはその断片をコードする核酸を含む血清型２６の組換えヒトアデノウイルスを含む単離された宿主細胞を提供する。

【０２０２】

使用し得る宿主細胞（本明細書では「パッケージング細胞」または「相補性細胞」または「プロデューサー細胞」とも称されることがある）は、所望のアデノウイルスを増殖させることができる任意の宿主細胞であり得る。宿主細胞系は、典型的には、本発明の十分な量のアデノウイルスベクターを産生するために使用される。宿主細胞は、複製欠損性ベクター中で欠失しているかまたは不活性化されている遺伝子を含む細胞であり、それによってウイルスが細胞内で複製することを可能にする。好適な細胞系としては、例えば、ＰＥＲ．Ｃ６、９１１、２９３、およびＥ１Ａ５４９が挙げられる。

【０２０３】

ある特定の実施形態では、宿主細胞は、テトラサイクリン抑制因子（ＴｅｔＲ）タンパク質をコードするヌクレオチド配列をさらに含む。ＴｅｔＲタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、例えば、宿主細胞のゲノムに組み込むことができる。一例として、ＴｅｔＲタンパク質をコードするヌクレオチド配列を染色体１に組み込むことができる。宿主細胞系は、例えば、ＰＥＲ．Ｃ６細胞であり得る。

【０２０４】

好ましい一実施形態では、宿主細胞は、テトラサイクリン抑制因子（ＴｅｔＲ）タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むＰＥＲ．Ｃ６細胞である。そのような「ＰＥＲ．Ｃ６　ＴｅｔＲ」細胞は、ＰＣＴ／ＥＰ２０１８／０５３２０１号明細書（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、ＴｅｔＲをコードするヌクレオチドが導入されたＰＥＲ．Ｃ６細胞（Ｅ１によって不死化されたヒト網膜細胞）である。そのような実施形態では、好ましくは、アデノウイルスは、１つまたは複数のＴｅｔオペレーター（ＴｅｔＯ）モチーフを含むプロモーターに作動可能に連結されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２Ｓタンパク質またはその断片をコードする核酸を含む。好ましい実施形態では、プロモーターは、１つまたは複数のＴｅｔＯモチーフを含むＣＭＶプロモーターである。好ましくは、プロモーターは、２つのＴｅｔＯモチーフを含むＣＭＶプロモーターである。好ましくは、プロモーターはＣＭＶプロモーターであり、配列番号２１９のヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、プロモーターは、配列番号２１９のヌクレオチド配列からなる。

【０２０５】

本発明はさらに、ＳＡＲＳコロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣＯＶ－２）に対するワクチンを作製するための方法であって、本明細書に記載されるＳＡＲＳ－ＣＯＶ－２Ｓタンパク質またはその断片をコードする核酸を含む血清型２６の組換えヒトアデノウイルスを用意するステップ、宿主細胞の培養物中で前記組換えアデノウイルスを増殖させるステップ、組換えアデノウイルスを単離および精製するステップ、ならびに組換えアデノウイルスを薬学的に許容される組成物に製剤化するステップを含む方法を提供する。ある特定の実施

形態では、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２抗原を含むアデノウイルス粒子を産生させる方法が本明細書において提供される。本方法は、（ａ）本発明の宿主細胞を本発明のアデノウイルスベクターと接触させるステップ、および（ｂ）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２抗原を含むアデノウイルス粒子が産生される条件下で宿主細胞を増殖させるステップを含む。組換えアデノウイルスは、アデノウイルスに感染された宿主細胞の細胞培養を必要とする周知の方法に従って、宿主細胞内で調製し、増殖させることができる。細胞培養物は、付着性細胞培養物、例えば、培養容器の表面またはマイクロキャリアに付着した細胞、ならびに懸濁培養物を含む、任意の種類の細胞培養物であり得る。

【０２０６】

ほとんどの大規模懸濁培養は、操作およびスケールアップが最も簡単であるため、バッチ法または流加法として操作される。最近では、灌流原理に基づく連続法がより一般的になりつつあり、また好適でもある（例えば、大量の組換えアデノウイルスを入手および精製するための好適な方法を記載している、国際公開第２０１０／０６０７１９号パンフレットおよび国際公開第２０１１／０９８５９２号パンフレットを参照されたい）。本発明はさらに、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２Ｓタンパク質またはその断片をコードする核酸を含む血清型２６の組換えヒトアデノウイルスのゲノムを形成する単離された組換え核酸を提供する。

【０２０７】

武漢コロナウイルス（２０１９－ｎＣｏＶ）ポリペプチドは、コロナウイルス（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ）に感染または曝露された対象（例えば、ヒト対象）に投与された場合に、コロナウイルス感染（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ感染）に対する保護的および治療的免疫応答（例えば、体液性反応や細胞性反応）を誘発させるために使用することができる。対象への投与のために調製し得る組成物は、２０１９－ｎＣｏＶタンパク質（例えば、スパイク（Ｓ）タンパク質またはその一部（例えば、配列番号１～８４のいずれか１つの配列、例えば、配列番号５１の配列を有するポリペプチド、または配列番号１～８４のいずれか１つの配列を有するポリペプチドに対して少なくとも８５％（例えば、少なくとも９０％、９５％、９９％もしくはそれ以上）の配列同一性を有するポリペプチド））、または２０１９－ｎＣｏＶタンパク質をコードする核酸配列（例えば、配列番号９３～１８１、１９０～１９５、および１９９～２０４のうちのいずれか１つの配列を有する核酸分子；または配列番号９３～１８１、１９０～１９５、および１９９～２０４のうちのいずれか１つの配列を有する核酸分子と少なくとも８５％（例えば、少なくとも９０％、９５％、９９％もしくはそれ以上）の配列同一性を有する核酸分子）を含むベクター（例えば、発現ベクター、例えば、プラスミド、またはウイルスベクター、例えば、アデノウイルス（例えば、Ａｄ２６）、ポックスウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、または他のウイルスベクター、または裸のもしくはカプセル化されたＤＮＡ）を含む。

【０２０８】

２０１９－ｎＣｏＶ　スパイク（Ｓ）タンパク質を発現するＤＮＡワクチンの作製について記載した。２０１９－ｎＣｏＶ　ＤＮＡワクチンは、Ｓまたはその一部分（例えば、配列番号１～８４、例えば、配列番号５１、またはそれに対して最大で８５％もしくはそれを上回る配列同一性を有するそのバリアント）をコードするポリヌクレオチド（例えば、配列番号９３～１８１、１９０～１９５、および１９９～２０４、またはそれに対して最大で８５％もしくはそれを上回る配列同一性を有するそのバリアント）を、哺乳動物発現ベクター（例えば、ｐｃＤＮＡ３．１＋；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，　ＣＡ，　ＵＳＡ）に組み入れてワクチンを作製することによって作製することができる。

【０２０９】

２０１９－ｎＣｏＶスパイク（Ｓ）タンパク質を発現する組換えウイルスベクター（例えば、Ａｄ２６ウイルスベクター）の作製についても記載した。２０１９－ｎＣｏＶウイルスベクターは、Ｓまたはその一部分（例えば、配列番号１～８４、またはそれに対して最大で８５％もしくはそれを上回る配列同一性を有するそのバリアント、例えば、配列番

号５１）をコードするポリヌクレオチド（例えば、配列番号９３～１８１、１９０～１９５、および１９９～２０４、またはそれに対して最大で８５％もしくはそれを上回る配列同一性を有するそのバリアント）を、ウイルスベクター（例えば、Ａｄ２６ウイルスベクター）に組み入れることによって作製することができる。

【０２１０】

対象（例えば、ヒト対象）由来の試料中に存在する抗コロナウイルス抗体（例えば、抗２０１９－ｎＣｏＶ抗体、例えば、抗スパイク抗体、例えば、抗スパイク中和抗体）を使用して、保護抗体応答を検出および／またはモニターすることができる。抗コロナウイルス抗体（例えば、抗スパイク抗体、例えば、抗スパイク中和抗体）は、治療用組成物（例えば、本明細書に記載される組成物または免疫原性組成物のいずれか）の投与後に、短い時間枠（例えば、投与１日後から投与８週間後まで）またはより長い時間枠（例えば、投与２か月後から投与１５年後までの間）で測定することができる。

【０２１１】

２０１９－ｎＣｏＶ感染症を治療および予防する核酸分子、ポリペプチド、ベクター、ワクチン、組成物、抗体、および方法について本明細書に記載する。

【０２１２】

Ｉ．　組成物および方法

核酸分子

核酸分子（例えば、配列番号９３～１８１、１９０～１９５、および１９９～２０４、またはそれらと最大で８５％またはそれよりも高い配列同一性を有するそれらのバリアント）を、武漢コロナウイルス（２０１９－ｎＣｏＶ）に基づいて設計した。核酸分子は、２０１９－ｎＣｏＶスパイク（Ｓ）タンパク質の領域、例えば、完全長（配列番号１２１）、細胞質領域が欠失されたスパイク（配列番号９４）、細胞外ドメイン（配列番号９５）、Ｓ１（配列番号９６）、および受容体結合ドメイン（配列番号９７）をコードする。また、本発明は、シグナル配列（例えば、配列番号１８９）の欠失または包含、安定化突然変異（例えば、配列番号１のアミノ酸Ｋ９６９およびＶ９７０に対応するプロリン置換）、フューリン切断部位（例えば、配列番号１８８）に対する突然変異、三量体化ドメイン（例えば、フォールドン三量体化ドメイン、例えば、配列番号１８４）の導入、リンカーまたはスペーサー配列（例えば、配列番号１８５および１８６）の導入、およびそれらの組合せを含む、上述のＳの領域に対する追加の改変を特徴とする。核酸分子は、野生型２０１９－ｎＣｏＶスパイクヌクレオチド配列と比べて、宿主細胞（例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）宿主細胞）での発現を向上させるために最適化されている。最適化は、リーダー配列、制限部位、および／またはコザック配列の付加を含む。

【０２１３】

核酸分子は、配列番号９３～１８１、１９０～１９５、および１９９～２０４のいずれか１つのすべてまたは部分と、少なくとも８５％（例えば、少なくとも８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％）配列同一性を有するヌクレオチド配列、またはその相補配列を有する。例えば、核酸分子は、配列番号１９５のヌクレオチド配列を有してもよい。あるいは、単離された核酸分子は、配列番号１～８４のいずれか１つのアミノ酸配列と、少なくとも８５％（例えば、少なくとも８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％）配列同一性を有する２０１９－ｎＣｏＶポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を有する。例えば、単離された核酸分子は、配列番号５６のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を有してもよい。

【０２１４】

核酸分子は、コドン最適化などにより、標的哺乳動物対象（例えば、ヒトまたはワクチン生産のための非ヒト動物）での発現のためにさらに最適化されていてもよい。

【０２１５】

また、核酸分子は、プラスミドなどの発現ベクター、またはアデノウイルス、ポックス

ウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、もしくは他のウイルスベクターなどのウイルスベクターに挿入されていてもよく、あるいはネイキッドＤＮＡまたは被包ＤＮＡとして調製され、組成物に組み込まれていてもよい。

【０２１６】

ポリペプチド

ポリペプチドは、例えば、２０１９－ｎＣｏＶスパイク（Ｓ）タンパク質の領域（配列番号１～８４）、例えば、完全長（配列番号２９）、細胞質領域が欠失されたスパイク（配列番号２）、細胞外ドメイン（配列番号３）、Ｓ１（配列番号４）、受容体結合ドメイン（配列番号５）、および配列番号１～８４のいずれか１つのすべてまたは部分と、少なくとも８５％（例えば、少なくとも８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％）配列同一性を有するバリアントに対応するコロナウイルスポリペプチド（例えば、２０１９－ｎＣｏＶポリペプチド）である。ポリペプチドは、配列番号１～８４のいずれか１つの、少なくとも５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１１００、１２００、１３００、１４００、１５００、１６００、１７００、または１８００個、またはそれよりも多くの連続または非連続アミノ酸を含んでいてもよい。また、ポリペプチドは、シグナル配列（例えば、配列番号９２）の欠失または包含、安定化突然変異（例えば、配列番号１のアミノ酸Ｋ９６９およびＶ９７０に対応するプロリン置換）、フューリン切断部位（例えば、配列番号９１）に対する突然変異、三量体化ドメイン（例えば、フォールドン三量体化ドメイン、例えば、配列番号８７）の導入、リンカーまたはスペーサー配列（例えば、配列番号８８および８９）の導入、およびそれらの組合せを含んでいてもよい。例えば、ポリペプチドは、配列番号２８のアミノ酸配列を有してもよい。また、ポリペプチドは、他の成分（例えば、ポリペプチドが天然で関連している成分）から単離され、組成物に組み込まれていてもよい。

【０２１７】

ベクター

また、本発明は、上記に記載のポリヌクレオチドのいずれか１つまたは複数を含む組換えベクター（例えば、Ａｄ２６ウイルスベクター）を特徴とする。ベクターは、免疫原（例えば、配列番号１～８４、またはそれらと少なくとも８５～９９％の配列同一性、例えばそれらと少なくとも９０％よりも高い配列同一性を有するそれらのバリアントの１つまたは複数）を発現する核酸を送達するために使用することができ、哺乳動物発現ベクター、ウイルス発現ベクター、および細菌発現ベクターが挙げられる。例えば、ベクターを使用して、配列番号５１のアミノ酸配列を有する免疫原を発現する核酸（例えば、配列番号１０４または２０４のヌクレオチド配列を含む核酸）を送達することができる。例えば、ベクターを使用して、配列番号５６のアミノ酸配列を有する免疫原を発現する核酸（例えば、配列番号１９５のヌクレオチド配列を含む核酸）を送達することができる。哺乳動物ベクター、ウイルスベクター、および細菌ベクターは、配列番号９３～１８１、１９０～１９５、および１９９～２０４に示されている１つまたは複数の核酸配列、またはそれらと少なくとも８５～９９％の配列同一性、例えば、それらと少なくとも９０％よりも高い配列同一性を有するそれらのバリアント、およびそれらの相補体を含むように遺伝子改変されていてもよい。

【０２１８】

ベクターは、例えば、プラスミド、人工染色体（例えば、ＢＡＧ、ＰＡＣ、ＹＡＣ）、およびウイルスベクターまたはファージベクターであってもよく、必要に応じて、ポリヌクレオチド発現のためのプロモーター、エンハンサー、または調節因子を含んでいてもよい。また、ベクターは、１つまたは複数の選択可能なマーカー遺伝子、例えば、細菌プラスミドの場合はアンピシリン、ネオマイシン、および／もしくはカナマイシン耐性遺伝子、または真菌ベクターの場合は耐性遺伝子を含んでいてもよい。ベクターは、例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡをｉｎ　ｖｉｔｒｏで産生するために、または例えば、ベクターにより

コードされているタンパク質を産生させるために、宿主細胞、例えば哺乳動物宿主細胞にトランスフェクトまたは形質転換するために使用することができる。また、ベクターは、例えば、ＤＮＡワクチン接種、ＲＮＡワクチン接種、または遺伝子療法のための方法においてｉｎ　ｖｉｖｏで使用するように構成することができる。

【０２１９】

プロモーターおよび他の発現調節シグナルは、そこでの発現のために設計されている宿主細胞と適合するように選択することができる。例えば、哺乳動物プロモーターとしては、カドミウムなどの重金属に応答して誘導することができるメタロチオネインプロモーター、およびβ－アクチンプロモーターが挙げられる。例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（Ａ）、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、レトロウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス、およびサルウイルス４０（ＳＶ４０）、およびヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）などのウイルスのゲノムから得ることができるウイルスプロモーターも使用することができる。こうしたプロモーターは周知であり、当技術分野で容易に入手可能である。

【０２２０】

好ましいプロモーターエレメントは、ＣＭＶ前初期プロモーターである。一部の実施形態では、発現プラスミドは、ｐｃＤＮＡ３．１＋（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カリフォルニア州、米国）である。一部の実施形態では、発現ベクターは、アデノウイルスまたはポックスウイルスに由来するベクターなどのウイルスベクターである。

【０２２１】

ウイルスゲノムは、外因性遺伝子を細胞（真核細胞または原核細胞など）のゲノムへと効率的に送達するために使用することができるベクターの豊富な供給源を提供する。ウイルスゲノムは、そのようなゲノム内に含まれているポリヌクレオチドが、典型的には、一般化または特殊形質導入により標的細胞のゲノムへと組み込まれるため、遺伝子送達に特に有用なベクターである。こうしたプロセスは、天然ウイルス複製サイクルの一部として生じ、遺伝子組込みを誘導するためにタンパク質も試薬も添加する必要がない。免疫原（例えば、配列番号１～８４、またはそれらと少なくとも８５～９９％の配列同一性、例えばそれらと少なくとも９０％よりも高い配列同一性を有するそれらのバリアントの１つもしくは複数）を発現する核酸を送達するために使用することができるウイルスベクターの例としては、レトロウイルス、アデノウイルス（例えば、Ａｄ２、Ａｄ５、Ａｄ１１、Ａｄ１２、Ａｄ２４、Ａｄ２６、Ａｄ３４、Ａｄ３５、Ａｄ４０、Ａｄ４８、Ａｄ４９、Ａｄ５０、Ａｄ５２（例えば、ＲｈＡｄ５２）、Ａｄ５９（例えば、ＲｈＡｄ５９）、およびＰａｎ９（ＡｄＣ６８としても知られている））、パルボウイルス（例えば、アデノ随伴ウイルス）、コロナウイルス、オルソミクソウイルス（例えば、インフルエンザウイルス）、ラブドウイルス（例えば、狂犬病ウイルスおよび水疱性口内炎ウイルス）、パラミクソウイルス（麻疹およびセンダイなど）などのマイナス鎖ＲＮＡウイルス、ピコルナウイルスおよびアルファウイルスなどのプラス鎖ＲＮＡウイルス、ならびにアデノウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、単純ヘルペスウイルス１型および２型、エプスタインバーウイルス、サイトメガロウイルス）、およびポックスウイルス（例えば、ワクシニア、改変ワクシニアアンカラ（ＭＶＡ）、鶏痘、およびカナリア痘）などの二本鎖ＤＮＡウイルスが挙げられる。免疫原（例えば、ポリペプチド）をコードするポリヌクレオチドを送達するために有用な他のウイルスとしては、例えば、ノーウォークウイルス、トガウイルス、コロナウイルス、レオウイルス、パポバウイルス、ヘパドナウイルス、および肝炎ウイルスが挙げられる。レトロウイルスの例としては、トリ白血病肉腫、哺乳動物Ｃ型、Ｂ型ウイルス、Ｄ型ウイルス、ＨＴＬＶ－ＢＬＶ群、レンチウイルス、スプーマウイルスが挙げられる（Coffin, J. M., Retroviridae: The viruses and their replication, In Fundamental Virology, Third Edition, B. N. Fields, et al. , Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996）。例えば、ベクターはＡｄ２６であってもよい。こうしたアデノウイルスベクターは、例えば、ヒトアデノウイルス、チンパンジーアデノウイルス、またはアカゲザルアデノウイルスに由来してもよい。他の例と

しては、マウス白血病ウイルス、マウス肉腫ウイルス、マウス乳腺腫瘍ウイルス、ウシ白血病ウイルス、ネコ白血病ウイルス、ネコ肉腫ウイルス、トリ白血病ウイルス、ヒトＴ細胞白血病ウイルス、ヒヒ内因性ウイルス、テナガザル白血病ウイルス、マソンファイザーサルウイルス、サル免疫不全ウイルス、サル肉腫ウイルス、ラウス肉腫ウイルス、およびレンチウイルスが挙げられる。ベクターの他の例は、例えば、ＭｃＶｅｙら（米国特許第５，８０１，０３０号明細書）に記載されている。この文献はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。ウイルスベクターの核酸物質（例えば、核酸分子を含む）は、例えば、脂質膜内に、または１つもしくは複数のウイルスポリペプチド（例えば、糖タンパク質）を含んでいてもよい構造タンパク質（例えば、カプシドタンパク質）により被包されていてもよい。ウイルスベクターは、対象の細胞に感染させ、それによりひいては、ウイルスベクターの異種性遺伝子の免疫原への翻訳を促進するために使用することができる。例えば、ウイルスベクターは、配列番号９３～１８１、１９０～１９５、および１９９～２０４に示されている１つもしくは複数の核酸配列、またはそれらと少なくとも８５～９９％の配列同一性、例えば、それらと少なくとも９０％よりも高い配列同一性を有するそれらのバリアント、およびそれらの相補体を含むように遺伝子改変されていてもよい。

【０２２２】

国際公開第２００６／０４０３３０号パンフレットおよび国際公開第２００７／１０４７９２号パンフレットに開示のアデノウイルスベクターは、ベクターとして特に有用である。これら文献の各々は参照により本明細書に組み込まれる。こうしたアデノウイルスベクターは、免疫原（例えば、２０１９－ｎＣｏＶポリペプチド）の１つまたは複数をコードおよび／または送達して、ウイルス感染症（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ感染症）に関連付けられる病態を有する対象を処置することができる。一部の実施形態では、１つまたは複数の組換えアデノウイルスベクターを対象に投与して、１つよりも多くのタイプの免疫原（例えば、２０１９－ｎＣｏＶポリペプチド）を発現させることができる。一部の実施形態では、組換えアデノウイルスベクターを改変して、ヘキソンＨＶＲドメインを変更する（例えば、１つまたは複数のＨＶＲを異なる血清型のものと置き換える）ことができる。アデノウイルスベクターの他に、対象（例えば、ヒト）への免疫原の１つまたは複数の送達および／または対象での発現を促進するために使用することができる他のウイルスベクターおよび技法が当技術分野で公知である。こうしたウイルスとしては、ポックスウイルス（例えば、ワクシニアウイルスおよび改変ワクシニアウイルスアンカラ（ＭＶＡ）；例えば、米国特許第４，６０３，１１２号明細書および第５，７６２，９３８号明細書を参照。これら文献は各々が参照により本明細書に組み込まれる）、ヘルペスウイルス、トガウイルス（例えば、ベネズエラウマ脳炎ウイルス；例えば、米国特許第５，６４３，５７６号明細書を参照。この文献は参照により本明細書に組み込まれる）、ピコルナウイルス（例えば、ポリオウイルス；例えば、米国特許第５，６３９，６４９号明細書を参照。この文献は参照により本明細書に組み込まれる）、バキュロウイルス、およびＷａｔｔａｎａｐｉｔａｙａｋｕｌおよびＢａｕｅｒ（Biomed. Pharmacother. 54:487 (2000)。この文献は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているものが挙げられる。

【０２２３】

こうしたウイルスを用いた遺伝子移入技法は当業者に公知である。例えば、レトロウイルスベクターを使用して、ポリヌクレオチドを宿主ゲノムに安定的に組み込むことができるが、そのような組換えは好ましくない。対照的に、複製欠損性アデノウイルスベクターはエピソーム性のままであるため、一過性発現が可能である。

【０２２４】

昆虫細胞（例えば、バキュロウイルスベクター）、ヒト細胞、酵母、または細菌において発現を駆動させることが可能なベクターを使用して、例えば、サブユニットワクチンとしてまたはイムノアッセイで使用するために、本発明のポリヌクレオチドによりコードされている２０１９－ｎＣｏＶタンパク質を大量に産生させることができる。

【０２２５】

抗体

抗２０１９－ｎＣｏＶ抗体は、２０１９－ｎＣｏＶポリペプチドに特異的に結合することが可能であり、対象（例えば、ヒト）の２０１９－ｎＣｏＶ媒介性活性（例えば、ウイルス拡散、感染、または細胞融合）を阻害することが可能である。そのような結合の結果は、例えば、２０１９－ｎＣｏＶに感染した対象に抗体を投与した後、ウイルス力価（例えば、ウイルス量）が、約１％（例えば、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％）またはそれよりも大きく低減されることであってもよい。抗２０１９－ｎＣｏＶ抗体は、２０１９－ｎＣｏＶポリタンパク質のＥｎｖ領域のすべてまたは部分を含むエピトープに選択的に結合することができる。特に、抗２０１９－ｎＣｏＶ抗体は、配列番号１～８４のいずれか１つのすべてまたは部分を含むエピトープに選択的に結合することができる。例えば、抗体は、配列番号２８のすべてまたは部分を含むエピトープに結合することができる。したがって、抗体は、２０１９－ｎＣｏＶ感染症を予防または処置するために使用することができる。

【０２２６】

２０１９－ｎＣｏＶポリタンパク質に対する抗体または抗体断片の特異的結合は、様々な確立されている方法のいずれかにより決定することができる。親和性は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでのウイルス拡散（ウイルス力価など）の最大半量阻害を達成するのに必要な抗体の濃度（IC_{50}）および抗体－２０１９－ｎＣｏＶポリタンパク質複合体解離の平衡定数（K_D）を含む、種々の測定値により定量的に表すことができる。２０１９－ｎＣｏＶポリタンパク質と抗体との相互作用を記述する平衡定数K_Dは、２０１９－ｎＣｏＶポリタンパク質－抗体複合体が、互いに相互作用しない、溶媒により分離された２０１９－ｎＣｏＶポリタンパク質および抗体分子へと解離する反応の化学平衡定数である。

【０２２７】

抗体は、１μＭ未満のK_D値（例えば、９００ｎＭ、８００ｎＭ、７００ｎＭ、６００ｎＭ、５００ｎＭ、４００ｎＭ、３００ｎＭ、２００ｎＭ、１００ｎＭ、９５ｎＭ、９０ｎＭ、８５ｎＭ、８０ｎＭ、７５ｎＭ、７０ｎＭ、６５ｎＭ、６０ｎＭ、５５ｎＭ、５０ｎＭ、４５ｎＭ、４０ｎＭ、３５ｎＭ、３０ｎＭ、２５ｎＭ、２０ｎＭ、１５ｎＭ、１０ｎＭ、５ｎＭ、４ｎＭ、３ｎＭ、２ｎＭ、または１ｎＭ）で、２０１９－ｎＣｏＶポリタンパク質（例えば、２０１９－ｎＣｏＶのＥｎｖ領域）に特異的に結合するものである。ある特定の場合では、抗体は、１ｎＭ未満のK_D値（例えば、９９０ｐＭ、９８０ｐＭ、９７０ｐＭ、９６０ｐＭ、９５０ｐＭ、９４０ｐＭ、９３０ｐＭ、９２０ｐＭ、９１０ｐＭ、９００ｐＭ、８９０ｐＭ、８８０ｐＭ、８７０ｐＭ、８６０ｐＭ、８５０ｐＭ、８４０ｐＭ、８３０ｐＭ、８２０ｐＭ、８１０ｐＭ、８００ｐＭ、７９０ｐＭ、７８０ｐＭ、７７０ｐＭ、７６０ｐＭ、７５０ｐＭ、７４０ｐＭ、７３０ｐＭ、７２０ｐＭ、７１０ｐＭ、７００ｐＭ、６９０ｐＭ、６８０ｐＭ、６７０ｐＭ、６６０ｐＭ、６５０ｐＭ、６４０ｐＭ、６３０ｐＭ、６２０ｐＭ、６１０ｐＭ、６００ｐＭ、５９０ｐＭ、５８０ｐＭ、５７０ｐＭ、５６０ｐＭ、５５０ｐＭ、５４０ｐＭ、５３０ｐＭ、５２０ｐＭ、５１０ｐＭ、５００ｐＭ、４９０ｐＭ、４８０ｐＭ、４７０ｐＭ、４６０ｐＭ、４５０ｐＭ、４４０ｐＭ、４３０ｐＭ、４２０ｐＭ、４１０ｐＭ、４００ｐＭ、３９０ｐＭ、３８０ｐＭ、３７０ｐＭ、３６０ｐＭ、３５０ｐＭ、３４０ｐＭ、３３０ｐＭ、３２０ｐＭ、３１０ｐＭ、３００ｐＭ、２９０ｐＭ、２８０ｐＭ、２７０ｐＭ、２６０ｐＭ、２５０ｐＭ、２４０ｐＭ、２３０ｐＭ、２２０ｐＭ、２１０ｐＭ、２００ｐＭ、１９０ｐＭ、１８０ｐＭ、１７０ｐＭ、１６０ｐＭ、１５０ｐＭ、１４０ｐＭ、１３０ｐＭ、１２０ｐＭ、１１０ｐＭ、１００ｐＭ、９０ｐＭ、８０ｐＭ、７０ｐＭ、６０ｐＭ、５０ｐＭ、４０ｐＭ、３０ｐＭ、２０ｐＭ、１０ｐＭ、５ｐＭ、または１ｐＭ）で、２０１９－ｎＣｏＶポリタンパク質に特異的に結合するものである。

【０２２８】

また、抗体は、様々なｉｎ　ｖｉｔｒｏ結合アッセイにより特徴付けることができる。２０１９－ｎＣｏＶ抗体のK_DまたはIC_{50}を決定するために使用することができる実

験の例としては、例えば、なかでも、表面プラズモン共鳴法、等温滴定熱量測定法、蛍光偏光測定法、およびＥＬＩＳＡベースアッセイが挙げられる。ＥＬＩＳＡは、そのようなアッセイが典型的には最小限の濃度の抗体しか必要としないため、抗体活性を分析するための特に有用な方法である。典型的なＥＬＩＳＡアッセイで分析される一般的なシグナルは発光であり、発光は、典型的には一次抗体（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ抗体）に特異的に結合する二次抗体にコンジュゲートされたペルオキシダーゼの活性の結果である。抗体は、２０１９－ｎＣｏＶ、および配列番号１～８４のいずれか１つの残基の１つまたは複数を含むエピトープなどの、それらに由来するエピトープ、ならびに２０１９－ｎＣｏＶに由来する単離されたペプチドであって、天然タンパク質におけるこうしたアミノ酸のコンフォメーションを模倣することができるように種々の残基が構造的に事前組織化されているペプチドに結合することが可能である。例えば、抗体は、配列番号１～８４のいずれか１つのアミノ酸配列を含むペプチド、または配列番号１～８４のいずれか１つの約１０～約３０個の連続または不連続アミノ酸を含むペプチドに結合することができる。直接ＥＬＩＳＡ実験では、この結合は、例えば、ＨＲＰ基質（例えば、２，２’－アジノ－ジ－３－エチルベンズチアゾリンスルホネート）を、ＨＲＰコンジュゲート二次抗体に結合した抗原－抗体複合体と共にインキュベーションした際に生じる発光を分析することにより定量化することができる。

【０２２９】

抗体としては、宿主（例えば、ヒトなどの哺乳動物宿主）を配列番号１～８４のポリペプチドで免疫化することにより生成されるものが挙げられる。抗体は、組換え的に調製し、抗２０１９－ｎＣｏＶ抗体が生成された宿主がヒトでない場合は、ヒトレシピエントへのその後の投与のために、必要に応じてヒト化することができる。

【０２３０】

組成物

組成物は、２０１９－ｎＣｏＶに由来する抗原または治療用遺伝子産物またはそれらの断片（例えば、配列番号９３～１８１、１９０～１９５、および１９９～２０４のいずれか１つの核酸分子、または配列番号９３～１８１、１９０～１９５、および１９９～２０４のいずれか１つと少なくとも８５％（例えば、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％）配列同一性を有するそのバリアント、およびそれらの相補体のすべてまたは部分）をコードする異種性核酸分子を含むＤＮＡベクターまたはＲＮＡベクターを含む。例えば、組成物は、配列番号１４３または配列番号２０４の核酸分子を含むＤＮＡベクターを含んでいてもよい。例えば、組成物は、配列番号１９５の核酸分子を含むＤＮＡベクターを含んでいてもよい。追加の組成物として、２０１９－ｎＣｏＶポリタンパク質に由来する免疫原性ポリペプチドまたはその断片（例えば、配列番号１～８４のポリペプチドまたは配列番号１～８４のポリペプチドと少なくとも８５％（例えば、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％）配列同一性を有するそのバリアントのすべてまたは部分）が挙げられる。例えば、組成物は、配列番号５１のアミノ酸配列を有する免疫原性ポリペプチドを含んでいてもよい。例えば、組成物は、配列番号２８のアミノ酸配列を有する免疫原性ポリペプチドを含んでいてもよい。また、組成物は、２０１９－ｎＣｏＶに結合することが可能な２０１９－ｎＣｏＶ抗体（例えば、抗スパイク抗体）、および配列番号１～８４のいずれか１つの残基の１つまたは複数を含むエピトープなどのそれに由来するエピトープを含んでもよい。例えば、組成物は、配列番号２８の残基の１つまたは複数を含むエピトープに結合することが可能な抗体を含んでいてもよい。抗体は、配列番号１～８４のいずれか１つのポリペプチドで宿主を免疫化することにより生成することができる。例えば、抗体は、配列番号２８のアミノ酸配列を有するポリペプチドで宿主を免疫化することにより生成することができる。

【０２３１】

必要に応じて、組成物は、例えば、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルスベクタ

ーまたはポックスウイルスベクター）による投与のために製剤化することができる。組換えアデノウイルスは、例えば、免疫原（例えば、２０１９－ｎＣｏＶポリペプチド）の１つまたは複数を発現させるためのベクターとして使用するためのいくつかの重要な利点を提供する。ウイルスは、高力価に調製することができ、非複製細胞に感染することができ、標的細胞集団との接触後にｅｘ　ｖｉｖｏで標的細胞の高効率形質導入をもたらすことができる。さらに、アデノウイルスは、自身のＤＮＡを宿主ゲノムへと組み込まない。したがって、発現ベクターとしてのそれらの使用は、自発的増殖性疾患を誘導するリスクを低減させる。動物モデルでは、アデノウイルスベクターは、一般に、およそ１週間にわたって高レベル発現を媒介することが見出されている。導入遺伝子発現（核酸分子の発現）の継続期間は、細胞特異的または組織特異的プロモーターを使用することにより延長することができる。アデノウイルスベクター自体の他の分子工学的向上により、導入遺伝子のより持続的な発現および炎症の減少がもたらされている。これは、追加の初期アデノウイルス遺伝子に特定の突然変異を有するいわゆる「第二世代」ベクター、および実質的にすべてのウイルス遺伝子がＣｒｅ－Ｌｏｘ戦略を使用して欠失されている「ガットレス」ベクターに見られる（Engelhardt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:6196 (1994)およびKochanek et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5731 (1996)。これらの文献は各々が参照により本明細書に組み込まれる）。

【０２３２】

組成物の治療用製剤は、所望の純度を有する活性成分を必要に応じて生理学的に許容される担体、賦形剤、または安定剤と混合することによる当技術分野で公知の標準的な方法を使用して、対象（例えば、ヒト）投与用に調製される（Remington’s Pharmaceutical Sciences (20thedition), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA）。組成物の治療用製剤は、所望の純度を有する活性成分を必要に応じて生理学的に許容される担体、賦形剤、または安定剤と混合することによる当技術分野で公知の標準的な方法を使用して調製される（Remington’s Pharmaceutical Sciences (20thedition), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA）。許容される担体としては、生理食塩水、またはリン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量（約１０残基未満の）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、もしくはリシンなどのアミノ酸；単糖類、二糖類、およびグルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む他の炭水化物；ＥＤＴＡなどのキレート剤；マンニトールもしくはソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの塩形成対イオン；ならびに／またはＴＷＥＥＮ（商標）、ＰＬＵＲＯＮＩＣＳ（商標）、もしくはＰＥＧなどの非イオン性界面活性剤が挙げられる。

【０２３３】

必要に応じて、しかし好ましくは、製剤は、薬学的に許容される塩、好ましくは塩化ナトリウムを、好ましくはほぼ生理学的濃度で含む。必要に応じて、製剤は、薬学的に許容される保存剤を含んでいてもよい。保存剤の濃度は、典型的には、体積／体積で約０．１～約２．０％の範囲であってもよい。好適な保存剤としては、ベンジルアルコール、フェノール、ｍ－クレゾール、メチルパラベン、およびプロピルパラベンなど、医薬品分野で公知のものが挙げられる。必要に応じて、製剤は、薬学的に許容される界面活性剤を約０．００５～約０．０２％の濃度で含んでいてもよい。

【０２３４】

必要に応じて、組成物は、同時投与または順次投与のための、受容体分子、核酸、免疫原性タンパク質、医薬品、化学療法剤、およびアクセサリーサイトカインなどのアジュバントならびに／または免疫刺激剤（例えば、タンパク質）を含むように製剤化してもよい。例えば、インターロイキン－３（ＩＬ－３）、インターロイキン－４（ＩＬ－４）、インターロイキン－５（ＩＬ－５）、インターロイキン－７（ＩＬ－７）、インターロイキン－８（ＩＬ－８）、インターロイキン－１０（ＩＬ－１０）、インターロイキン－１１

（ＩＬ－１１）、インターロイキン－１２（ＩＬ－１２）、インターロイキン－１３（ＩＬ－１３）、リピドＡ、ホスホリパーゼＡ２、エンドトキシン、ブドウ球菌エンテロトキシンＢ、Ｉ型インターフェロン、ＩＩ型インターフェロン、トランスフォーミング増殖因子－β（ＴＧＦ－β）、リンホトキシン遊走阻害因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＣＳＦ）、単球マクロファージＣＳＦ、顆粒球ＣＳＦ、血管上皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、アンギオゲニン、トランスフォーミング増殖因子（ＴＧＦ－α）、熱ショックタンパク質（ＨＳＰ）、血液型Ｒｈ因子の炭水化物部分（carbohydrate moieties of blood groups, Rh factors）、線維芽細胞増殖因子、ヌクレオチド、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ＭＡＲＴ、ＭＡＧＥ、ＢＡＧＥ、突然変異体ｐ５３、チロシナーゼ、ＡＺＴ、アンギオスタチン、エンドスタチン、またはそれらの組合せが、組成物の製剤に含まれてもよく、または組成物と同時投与されてもよい。

【０２３５】

医薬組成物は、感染病原体（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ）に対する免疫原性および／または保護効果を提供する治療有効量で投与することができる。一部の実施形態では、核酸分子、ポリペプチド、ベクター、および／または抗体を含む組成物は、少なくとも１～１，０００μｇ（例えば、少なくとも１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、または３００μｇ、またはそれよりも多く）の用量で投与するために製剤化されていてもよい。用量は、０．２ｍＬ～１．０ｍＬまたは最大１Ｌ（例えば、点滴剤として調製する場合）の体積であってもよい。一部の実施形態では、核酸分子、ベクター、および／またはワクチンを含む組成物は、５０μｇの用量で投与される。

【０２３６】

本明細書に記載の方法で使用される組成物は、例えば、筋肉内に、静脈内に、皮内に、経皮的に、動脈内に、腹腔内に、病変内に、頭蓋内に、関節内に、前立腺内に、胸腔内に、気管内に、鼻腔内に、硝子体内に、膣内に、直腸内に、局部的に、腫瘍内に、腹腔に、皮下に、結膜下に、膀胱内に、粘膜に、心膜内に、臍内に、眼内に、経口的に、局部的に、局所的に、吸入により、注射により、注入により、持続注入により、標的細胞を直接浸す局所灌流により、カテーテルにより、洗浄により、経管栄養により、クリーム剤で、または脂質組成物で投与するために製剤化することができる。

【０２３７】

本明細書に記載の本発明による医薬組成物は、投与後直ちに（例えば、標的送達）、または放出制御製剤もしくは持続放出製剤を使用して投与後の任意の所定期間に組成物を放出するように製剤化することができる。放出制御製剤または持続放出製剤での医薬組成物の投与は、組成物が、単独または組合せのいずれかで、（ｉ）治療指数が狭いか（例えば、有害副作用または毒性反応に結び付く血漿濃度と治療効果に結び付く血漿濃度との差が小さい。一般に、治療指数ＴＩは、致死量中央値（LD_{50}）と有効用量中央値（ED_{50}）の比として規定される）；（ｉｉ）放出部位（例えば、胃腸管）での吸収窓が狭いか；または（ｉｉｉ）生物学的半減期が短く、治療レベルを維持するために１日に頻繁な投与が必要とされる場合に、有用である。

【０２３８】

多数の戦略を追求して、放出速度が医薬組成物の代謝速度を上回る放出制御または持続放出を得ることができる。例えば、放出制御は、例えば、適切な放出制御組成物およびコーティングを含む、製剤化パラメーターおよび成分を適切に選択することにより得ることができる。好適な製剤は当業者に公知である。例としては、単一または複数単位の錠剤またはカプセル剤組成物、油剤、懸濁剤、エマルジョン、マイクロカプセル、ミクロスフェア、ナノ粒子、パッチ、およびリポソームが挙げられる。

【０２３９】

組成物は、従来の滅菌技法により滅菌することができるか、または滅菌濾過することができる。得られた水溶液は、使用のためにそのまま包装してもよくまたは凍結乾燥してもよく、凍結乾燥調製物は、粉末形態で投与してもよく、または投与前に滅菌水性担体と組

み合わせてもよい。調製物のｐＨは、典型的には３～１１、より好ましくは５～９または６～８、最も好ましくは７～７．５など７～８であろう。得られた固体形態の組成物は、各々が一定量の免疫原性組成物（例えば、ワクチンまたは抗２０１９－ｎＣｏＶ抗体）、および所望の場合は１つまたは複数の免疫調節剤を含む、錠剤もしくはカプセルの密閉包装、または１つもしくは複数の用量を投与することが可能な好適な乾燥粉末吸入器（ＤＰＩ）などの複数の単一用量単位に包装することができる。

【０２４０】

組成物を使用した処置方法

医薬組成物（例えば、免疫原性組成物および抗２０１９－ｎＣｏＶ抗体）は、コロナウイルス（２０１９－ｎＣｏＶ）に曝露されるリスクのある（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ感染症が蔓延している地域への旅行により）対象（例えば、ヒト）、コロナウイルス（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ）感染症に感受性の対象を処置するために、コロナウイルス（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ）感染症を有する対象を処置するために使用することができる。特に、組成物は、２０１９－ｎＣｏＶによる感染症（曝露前または曝露後）を処置するために使用することができる。一部の実施形態では、処置は、保護レベルの抗コロナウイルス抗体（例えば、抗２０１９－ｎＣｏＶ抗体、例えば、抗スパイク抗体、例えば、抗スパイク中和抗体）を誘導することができる。一部の実施形態では、保護レベルは、本明細書に記載の偽ウイルス中和アッセイを使用して測定して少なくとも約７０の力価であるか、本明細書に記載の生ウイルス中和アッセイを使用して測定して少なくとも約２５の力価であるか、または本明細書に記載の偽ウイルス中和アッセイもしくは生ウイルス中和アッセイにより決定して、回復期ヒトのコホートの中央値もしくは平均値レベルの少なくとも約８０％のレベルを上回る。一部の実施形態では、組成物による処置は、ウイルス力価、ウイルス拡散、感染、および／または細胞融合など、対象の２０１９－ｎＣｏＶ媒介性活性を低減させることができる。一部の実施形態では、２０１９－ｎＣｏＶ媒介性活性は、気道（例えば、上気道および／または下気道）におけるウイルス量である。一部の実施形態では、２０１９－ｎＣｏＶ媒介性活性は、肺、鼻孔、および／または気管におけるウイルス量である。一部の実施形態では、２０１９－ｎＣｏＶウイルス量は、約１％またはそれよりも大きく（例えば、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、９９．９％、９９．９９％、またはそれよりも大きく）減少する。一部の実施形態では、２０１９－ｎＣｏＶに感染した処置対象の２０１９－ｎＣｏＶ力価は、対象への組成物（例えば、ワクチン）投与後に、少なくとも約１％またはそれよりも大きく（例えば、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％、９５％、９９％、９９．９％、９９．９９％、またはそれよりも大きく）減少する。

【０２４１】

組成物（例えば、本明細書に記載の組成物のいずれか）を使用して、対象（例えば、ヒト対象）において免疫応答（例えば、体液性および／または細胞性免疫応答）を誘導することができる。誘導される免疫応答は、投与される組成物または組成物の組合せに応じて異なる（例えば、特異性、ロバストさ、または耐久性が異なる）可能性がある。例えば、組成物は、異なる抗体タイプ（例えば、異なる割合のＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＦｃｇＲ２Ａ．１）または異なる機能的特徴（例えば、抗体依存性好中球ファゴサイトーシス（ＡＤＮＰ）、抗体依存性補体沈着（ＡＤＣＤ）、抗体依存性単球細胞ファゴサイトーシス（ＡＤＣＰ）、または抗体依存性ＮＫ細胞活性化（ＩＦＮ－γ分泌、ＣＤ１０７ａ脱顆粒、およびＭＩＰ－１β発現）を誘導する能力）の抗体応答を誘導することができる。本明細書に記載の組成物（例えば、ＳＳ－スパイクおよびＳＳ－ＳｄＣＴ）は、モニターすることができる（例えば、治療有効性を評価するために）ＡＤＣＤ応答を誘発することができる。本明細書に記載の組成物（例えば、ＳＳ－ＲＢＤ－フォールドンおよびＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン）は、モニターすることができる（例えば、治療有効性を評価するために）抗体依存性ＮＫ細胞活性化応答を誘

導することができる。また、組成物は、異なる特徴を有する細胞応答（例えば、Ｔｈ１、Ｔｈ２、またはＴｈ１７応答）を誘導することができる。本明細書に記載の組成物（例えば、ＳＳ－スパイク、ＳＳ－ＳｄＣＴ、およびＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン）は、モニターすることができる（例えば、治療有効性を評価するために）Ｓ特異的ＣＤ４$^{+}$またはＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞応答を誘導することができる。

【０２４２】

２０１９－ｎＣｏＶ感染症を予防および／または処置する方法では、ベクター（例えば、哺乳動物由来、細菌由来、またはウイルス（例えば、Ａｄ２６）由来の発現ベクター）を使用して、免疫原（例えば、配列番号１～８４、またはそれらと少なくとも８５～９９％の配列同一性、例えばそれらと少なくとも９０％よりも高い配列同一性を有するそれらのバリアントの１つまたは複数）を発現する核酸を対象に送達することができる。例えば、ベクターを使用して、配列番号５１のアミノ酸配列を有する免疫原を発現する核酸（例えば、配列番号１０４または２０４のヌクレオチド配列を含む核酸）を送達することができる。例えば、ベクターを使用して、配列番号５６のアミノ酸配列を有する免疫原を発現する核酸（例えば、配列番号１９５のヌクレオチド配列を含む核酸）を送達することができる。ベクター（例えば、哺乳動物由来、細菌由来、またはウイルス由来の発現ベクター）は、配列番号９３～１８１、１９０～１９５、および１９９～２０４に示されている１つまたは複数の核酸配列、またはそれらと少なくとも８５～９９％の配列同一性、例えば、それらと少なくとも９０％よりも高い配列同一性を有するそれらのバリアント、およびそれらの相補体を含むように遺伝子改変されていてもよい。特に、国際公開第２００６／０４０３３０号パンフレットおよび国際公開第２００７／１０４７９２号パンフレットに開示されているアデノウイルスベクター（例えば、Ａｄ２、Ａｄ５、Ａｄ１１、Ａｄ１２、Ａｄ２４、Ａｄ２６、Ａｄ３４、Ａｄ３５、Ａｄ４０、Ａｄ４８、Ａｄ４９、Ａｄ５０、Ａｄ５２（ＲｈＡｄ５２）、Ａｄ５９（ＲｈＡｄ５９）、およびＰａｎ９（ＡｄＣ６８としても知られている）に由来するベクター）は、免疫原を対象に送達する方法におけるベクターとして特に有用である。これら文献は各々が参照により本明細書に組み込まれる。例えば、ベクターはＡｄ２６であってもよい。ベクターの他の例は、例えば、ＭｃＶｅｙら（米国特許第５，８０１，０３０号明細書）に記載されている。この文献はその全体が参照により組み込まれる。

【０２４３】

それを必要とする対象に免疫原を送達するための有用な遺伝子療法としては、国際公開第２００６／０６０６４１号パンフレット、米国特許第７，１７９，９０３号明細書、および国際公開第２００１／０３６６２０号パンフレットに記載のものが挙げられ、こうした文献には、治療用タンパク質送達のための、例えば、アデノウイルスベクター（例えば、Ａｄ２、Ａｄ５、Ａｄ１１、Ａｄ１２、Ａｄ２４、Ａｄ２６、Ａｄ３４、Ａｄ３５、Ａｄ４０、Ａｄ４８、Ａｄ４９、Ａｄ５０、Ａｄ５２（ＲｈＡｄ５２）、Ａｄ５９（ＲｈＡｄ５９）、およびＰａｎ９（ＡｄＣ６８としても知られている）に由来するベクター）の使用が記載されている。

【０２４４】

本明細書に記載の組成物（例えば、医薬組成物（例えば、免疫原性組成物および抗２０１９－ｎＣｏＶ抗体））のいずれかの１つまたは複数を、処置に使用することができる。処置としては、１つまたは複数の追加の治療剤（例えば、炎症促進性（例えば、インターフェロン）または抗炎症剤（例えば、コルチコステロイド、例えば、デキサメタゾン））および／または１つまたは複数の治療介入（例えば、手術および腹臥位）を挙げることができる。治療剤および／または治療介入は、順次投与（例えば、本明細書に記載の組成物のいずれかの１つまたは複数を疾患前または疾患の初期段階（例えば、症状発症から１週間以内）に投与し、次いで追加の治療剤（例えば、抗炎症剤（例えば、コルチコステロイド、例えば、デキサメタゾン））を疾患の後期段階（例えば、症状発症の１週間後）に投与）してもよく、または同時投与（例えば、本明細書に記載の組成物のいずれかの１つもしくは複数および／または１つもしくは複数の追加の治療剤を投与）してもよい。追加の

治療剤としては、コルチコステロイド（例えば、グルココルチコイド（例えば、デキサメタゾン、プレドニゾン、およびヒドロコルチゾン））、インターフェロン（例えば、インターフェロンベータ）、デオキシコール酸、コロニー刺激因子（例えば、Ｇ－ＣＳＦおよびＧＭ－ＣＳＦ）、および非ステロイド系抗炎症薬（例えば、アスピリン、イブプロフェン、フェノプロフェン、ケトプロフェン、フルルビプロフェン、オキサプロジン、およびナプロキセンなどのプロピオン酸誘導体、スリンダク、インドメタシン、エトドラク、ジクロフェナクなどの酢酸誘導体、ピロキシカム、メロキシカム、テノキシカム、ドロキシカム、ロルノキシカム、およびイソキシカムなどのエノール酸誘導体、メフェナム酸、メクロフェナム酸、フルフェナム酸、トルフェナム酸などのフェナム酸誘導体、およびセレコキシブ、エトリコキシブ、ルミラコキシブ、パレコキシブ、ロフェコキシブ、ロフェコキシブ、およびバルデコキシブなどのＣＯＸ－２阻害剤）を挙げることができる。本明細書に記載の組成物と組み合わせて投与することができる他の作用剤としては、レムデシビル、クロロキン、ヒドロキシクロロキン、バリシチニブ、ロピナビル／リトナビル、ウミフェノビル、ファビピラビル、トシリズマブ、およびリバビリンが挙げられる。

【０２４５】

投与

医薬組成物は、感染病原体（例えば、２０１９－ｎＣｏＶなどのコロナウイルス）への曝露前または曝露後に対象（例えば、ヒト）に投与して、感染症（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ感染症などのコロナウイルス感染症）の１つまたは複数の症状を処置、予防、軽減、その進行を阻害、またはその重症度を低減することができる。例えば、組成物は、２０１９－ｎＣｏＶ感染症を有する対象に投与することができる。組成物を使用して処置することができる、２０１９－ｎＣｏＶなどのウイルス感染症により引き起こされる疾患の症状の例としては、例えば、発熱、肺炎、呼吸不全、体重減少、関節痛、発疹、結膜炎、筋肉痛、頭痛、眼窩後痛、浮腫、リンパ節腫脹、倦怠感、無力症、咽頭炎、咳、悪心、嘔吐、下痢、血精液症が挙げられる。こうした症状および処置中のそれらの解消は、例えば、身体診断中に医師により、または当技術分野で公知の他の検査および方法により測定することができる。本明細書に記載の医薬組成物は、感染病原体（例えば、２０１９－ｎＣｏＶなどのコロナウイルス）への曝露前または曝露後に対象（例えば、ヒト）に投与して、病原体により引き起こされる死亡リスクを低減または予防することができる。

【０２４６】

好ましい投与方法は、種々の要因（例えば、投与される組成物の成分、および処置される状態の重症度）に応じて様々であり得る。経口または経鼻投与に好適な製剤としては、各々が所定量のキメラＡｄ５ベクター組成物を含む、希釈剤（例えば、水、生理食塩水、またはＰＥＧ－４００）に溶解された有効量の組成物などの液剤、カプセル剤、サシェ剤、錠剤、またはゲル剤を挙げることができる。また、医薬組成物は、例えば、気管支路への吸入用エアロゾル製剤であってもよい。エアロゾル製剤は、加圧された薬学的に許容される噴射剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、または窒素）と混合することができる。特に、吸入による投与は、例えば、トリオレイン酸ソルビタンまたはオレイン酸を、例えば、トリクロロフルオロメタン、ジクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、または任意の他の生物学的に適合する噴射剤ガスと一緒に含むエアロゾルを使用することにより達成することができる。

【０２４７】

組成物の免疫原性は、免疫刺激剤および／またはアジュバントと同時投与すると、著しく向上する場合がある。当業者に周知の好適なアジュバントとしては、例えば、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、ＱＳ２１、ＱｕｉｌＡ（およびその誘導体および成分）、リン酸カルシウム、水酸化カルシウム、水酸化亜鉛、糖脂質アナログ、アミノ酸のオクトデシルエステル、ムラミルジペプチド、ポリホスファゼン、リポタンパク質、ＩＳＣＯＭマトリックス、ＤＣ－Ｃｈｏｌ、ＤＤＡ、サイトカイン、および他のアジュバント、およびそれらの誘導体が挙げられる。

【０２４８】

組成物は、曝露前予防を提供するために、または対象がウイルス感染症（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ感染症）を有すると診断された後に、または対象がウイルス（例えば、２０１９－ｎＣｏＶなどのコロナウイルス感染症）などの感染病原体に曝露された後に、投与することができる。組成物は、例えば、２０１９－ｎＣｏＶに曝露される１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、３０、３５、４０、４５、５０、５５、もしくは６０分前、２、４、６、１０、１５、もしくは２４時間前、２、３、５、もしくは７日前、２、４、６、もしくは８週間前、または３、４、または６か月前でさえ投与してもよく、あるいはコロナウイルス（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ）に曝露された１５～３０分後、または１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、２０、２４、４８、もしくは７２時間後、２、３、５、もしくは７日後、２、４、６、もしくは８週間後、３、４、６、もしくは９か月後、または１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、もしくは２０年後に対象に投与してもよい。

【０２４９】

ウイルス感染症（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ感染症）を処置する場合、組成物は、症状発生前もしくは確定診断前または診断後もしくは症状が明らかになった後のいずれで対象に投与してもよい。例えば、組成物は、例えば、診断もしくは症状の臨床的認識の直後に、または診断もしくは症状検出の２、４、６、１０、１５、もしくは２４時間後、２、３、５、もしくは７日後に投与してもよい。

【０２５０】

免疫原性組成物または抗２０１９－ｎＣｏＶ抗体含有組成物の１つまたは複数の用量（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０用量）を、それを必要とする対象に投与してもよい。一部の実施形態では、少なくとも１用量が対象に投与される。一部の実施形態では、少なくとも２用量が対象に投与される。一部の実施形態では、用量は同じ日に投与される。一部の実施形態では、用量は異なる日に投与される。一部の実施形態では、免疫原性組成物は、それを必要とする対象にプライム、ブースト、プライム－ブーストとして投与される。一部の実施形態では、ブーストは、プライム－ブーストレジメンのプライムの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、または２８日後、５、６、７、８、９、１０、１１、または１２週間後、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、または２３か月後、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、または２０年後に投与される。他の実施形態では、複数のブースト用量が投与され、各ブースト用量は、少なくとも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、または２８日間、５、６、７、８、９、１０、１１、または１２週間、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、または２３か月間、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、または２０年間の間隔をおいて投与される。

【０２５１】

本明細書に記載の組成物のいずれか（例えば、本明細書に記載の免疫原性組成物のいずれか）の１つまたは複数の用量は、１つまたは複数の追加の治療剤と共に、順次または同時のいずれかで投与することができる。

【０２５２】

投薬量

組成物の用量または組成物を使用した処置の回数は、対象の疾患の重症度、発生、または進行に基づき（例えば、ウイルス感染症などの１つまたは複数の症状の重症度に基づき）増加または減少させることができる。

【０２５３】

医薬組成物は、感染病原体（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ）に対する免疫原性効果および／または保護効果を提供する治療有効量で投与することができる。一部の実施形態では

、核酸分子、ポリペプチド、ベクター、および／または抗体を含む組成物は、少なくとも１μｇ～１００ｍｇ（例えば、少なくとも１０μｇ、２０μｇ、３０μｇ、４０μｇ、５０μｇ、６０μｇ、７０μｇ、８０μｇ、９０μｇ、１００μｇ、１２５μｇ、１５０μｇ、１７５μｇ、２００μｇ、２２５μｇ、２５０μｇ、２７５μｇ、３００μｇ、３２５μｇ、３５０μｇ、３７５μｇ、４００μｇ、４２５μｇ、４５０μｇ、４７５μｇ、５００μｇ、５２５μｇ、５５０μｇ、５７５μｇ、６００μｇ、６２５μｇ、６５０μｇ、６７５μｇ、７００μｇ、７２５μｇ、７５０μｇ、７７５μｇ、８００μｇ、８２５μｇ、８５０μｇ、８７５μｇ、９００μｇ、９２５μｇ、９５０μｇ、９７５μｇ、１ｍｇ、２ｍｇ、３ｍｇ、４ｍｇ、５ｍｇ、６ｍｇ、７ｍｇ、８ｍｇ、９ｍｇ、１０ｍｇ、１１ｍｇ、１２ｍｇ、１３ｍｇ、１４ｍｇ、１５ｍｇ、１６ｍｇ、１７ｍｇ、１８ｍｇ、１９ｍｇ、２０ｍｇ、２５ｍｇ、３０ｍｇ、４０ｍｇ、５０ｍｇ、６０ｍｇ、７０ｍｇ、８０ｍｇ、９０ｍｇ、またはそれよりも多く）の用量で投与することができる。一部の実施形態では、核酸分子、ベクター、および／または抗体を含む組成物は、約５０μｇの用量（例えば、約２５μｇ～約７５μｇの用量）で投与される。一部の実施形態では、核酸分子、ベクター、および／または抗体を含む組成物は、約５ｍｇの用量（例えば、約１ｍｇ～約１０ｍｇの用量）で投与される。

【０２５４】

一部の場合では、有効量の組成物の（例えば、配列番号１～８４などの免疫原）の投与は、保護レベルの（例えば、本明細書に記載の偽ウイルス中和アッセイを使用して測定して少なくとも約７０の力価を上回るか、本明細書に記載の生ウイルス中和アッセイを用いて測定して少なくとも約２５の力価を上回るか、または本明細書に記載の偽ウイルス中和アッセイもしくは生ウイルス中和アッセイを使用して決定した、回復期ヒトのコホートの中央値もしくは平均値レベルの少なくとも約８０％のレベルを上回る）抗コロナウイルス抗体（例えば、抗２０１９－ｎＣｏＶ抗体、例えば、抗スパイク抗体、例えば抗スパイク中和抗体）を誘導する。一部の場合では、保護レベルは、本明細書に記載の偽ウイルス中和アッセイを使用して測定して、少なくとも約７０（例えば、少なくとも約８０、少なくとも約１００、または少なくとも約１２０）の力価である。一部の場合では、保護レベルは、本明細書に記載の偽ウイルス中和アッセイを使用して測定して、少なくとも約１００の力価である。一部の場合では、有効量の組成物の投与は、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、もしくは１２か月間、または１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５年間、もしくはそれよりも長期間維持される保護レベルの抗コロナウイルス抗体（例えば、抗２０１９－ｎＣｏＶ抗体、例えば抗スパイク抗体、例えば抗スパイク中和抗体）をもたらす。

【０２５５】

一部の場合では、有効量の組成物（例えば、配列番号１～８４などの免疫原）の投与は、２０１９－ｎＣｏＶ感染症を有する対象から決定される２０１９－ｎＣｏＶ血清ウイルス量を、有効量の組成物の投与前の患者から決定されるウイルス量と比較して、少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、またはそれよりも大きく低減させる。一部の場合では、有効量の組成物の投与は、血清ウイルス量を、有効量の組成物の投与前の患者から決定されるウイルス量と比較して、検出不可能なレベルに低減させる。一部の場合では、有効量の組成物の投与は、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７日間；１、２、３、４週間；１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、もしくは１２か月；または１年間もしくはそれよりも長期間維持することができる、低減されたおよび／または検出不能な血清ウイルス量をもたらす。

【０２５６】

投与される投薬量は、処置しようとする対象（例えば、処置される対象の年齢、体重、免疫系の能力、および全体的健康状態）、投与形態（例えば、固体または液体として）、投与様式（例えば、注射、吸入、または乾燥粉末噴射による）、および標的とする細胞（例えば、血管上皮細胞、鼻上皮細胞、または肺上皮細胞などの上皮細胞）に依存する。組成物は、好ましくは、十分なレベルの抗原性もしくは治療用遺伝子産物またはそれらの断

片を提供する量で投与される（例えば、宿主において抗原性遺伝子産物により引き起こされる過度の有害な生理学的効果を示さずに免疫応答を誘発する抗原性遺伝子産物のレベル）。

【０２５７】

例えば、ＤＮＡワクチンまたはＲＮＡワクチンを送達する方法により、用量の量が決定される場合がある。一部の場合では、静脈内（ｉｖ）または筋肉内（ｉｍ）経路による注射により投与される投薬量は、種々の量の、例えば１０μｇ～１ｍｇのＤＮＡワクチンまたはＲＮＡワクチンを必要とする可能性がある。しかしながら、遺伝子銃を使用した投与は、０．２μｇ～２０μｇ（例えば、０．２、０．１、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０μｇ）のＤＮＡワクチンまたはＲＮＡワクチンの用量を必要とする可能性がある。一部の場合では、ＤＮＡワクチンまたはＲＮＡワクチンの用量を送達するための遺伝子銃の使用は、わずかｎｇ量の、例えば１０ｎｇ～２００ｎｇ（例えば、１０、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０．３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２５、１５０、１７５、または２００ｎｇ）のＤＮＡまたはＲＮＡしか必要としない可能性がある。

【０２５８】

送達ベクターがウイルス（例えば、Ａｄ２６ウイルス）である他の実施形態では、少なくとも約1×10^{3}ウイルス粒子（ＶＰ）／用量、または1×10^{1}～1×10^{20}ＶＰ／用量（例えば、1×10^{1}、1×10^{2}、1×10^{3}、1×10^{4}、1×10^{5}、1×10^{6}、1×10^{7}、1×10^{8}、1×10^{9}、1×10^{10}、1×10^{11}、1×10^{12}、1×10^{13}、1×10^{14}、1×10^{15}、1×10^{16}、1×10^{17}、1×10^{18}、1×10^{19}、1×10^{19}、または1×10^{20}ＶＰ／用量）を対象に投与してもよい。例えば、約1×10^{6}～約1×10^{14}ＶＰ／用量（例えば、約1×10^{7}、約1×10^{8}、約1×10^{9}、約1×10^{10}、約1×10^{11}、約1×10^{12}、約1×10^{13}、約1×10^{14}、または約1×10^{15}ＶＰ／用量）を対象に投与してもよい。例えば、約1×10^{11}、約1×10^{12}、約1×10^{13}、または約1×10^{14}ＶＰ／用量を対象に投与してもよい。

【０２５９】

加えて、本発明の組成物の単回または複数回投与を（曝露前もしくは曝露後および／または診断前もしくは診断後に）対象に施してもよい（例えば、１回の投与または２回もしくはそれよりも多くの投与）。例えばウイルス感染症（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ感染症）に特に感受性である対象は、例えば、ウイルスに対抗する保護を確立および／または維持するために複数の処置を必要とする可能性がある。本明細書に記載の医薬組成物により提供される誘導免疫のレベルは、例えば、中和分泌および血清抗体の量を測定することによりモニターすることができる。次いで、所望レベルの免疫応答を誘発するために必要に応じて投薬量を調整または繰り返すことができる。例えば、組成物の単回投与（プライム）により誘発される免疫応答は、有効な保護を提供するのに十分な効力および／または持続性を示さない可能性がある。したがって、一部の実施形態では、プライムブーストレジメンが確立されるような反復投与（ブースト）により、組成物の抗原に対する体液性および細胞性応答を著しく増強することができる。

【０２６０】

あるいは、処置の有効性は、組成物の投与後に対象（例えば、ヒト）において発現される抗原性もしくは治療用遺伝子産物またはその断片のレベルをモニターすることにより決定することができる。例えば、対象の血液またはリンパ液を、例えば当技術分野で公知の標準的アッセイを使用して、抗原性もしくは治療用遺伝子産物またはその断片について試験することができる。

【０２６１】

一部の場合では、処置の有効性は、有効量の組成物（例えば、配列番号１～８４のいずれか１つなどの免疫原）を投与する前および投与した後に得られる対象に由来する試料の

血清ウイルス量の変化をモニターすることにより決定することができる。有効量の組成物を投与する前の対象から決定されたウイルス量と比較して、少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、またはそれよりも大きな、血清ウイルス量の低減は、対象が処置から利益を受けていることを示すことができる。組成物の投与後に、ウイルス量が少なくとも約１０％、２０％、３０％、またはそれよりも大きく減少しない場合、投与する組成物の投薬量を、例えば、対象に投与されるＤＮＡワクチン（例えば、配列番号９３～１８１、１９０～１９５、および１９９～２０４の１つまたは複数を含むＤＮＡワクチン）のμｇ量またはｍｇ量を増加させることにより、またはアデノウイルスベクターベースワクチン（例えば、配列番号９３～１８１、１９０～１９５、および１９９～２０４の１つまたは複数を含むアデノウイルスベクターベースワクチン）のウイルス粒子（ＶＰ）の数を増加させることにより、増加させることができる。

【０２６２】

組成物の単一用量は、曝露前または診断前に、保護を達成することができる。加えて、曝露後または診断後に投与される単一用量は、本発明による処置として機能することができる。

【０２６３】

組成物の単一用量は、感染症（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ感染症などのコロナウイルス感染症）の処置を受けている対象の療法を達成するためにも使用することができる。また、必要な場合、複数用量（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、またはそれよりも多くの用量）をこうした対象に投与することができる。

【０２６４】

コロナウイルス感染症に対する感受性を診断および予測する方法

診断方法

本明細書では、コロナウイルス感染症に対する対象の感受性を特定、診断、および／または予測するための方法が提供される。本方法は、対象に由来する試料（例えば、全血試料、例えば、血清試料または血漿試料）中の抗コロナウイルス抗体（例えば、抗スパイク抗体）のレベルまたは量を測定するステップを含む。一部の実施形態では、コロナウイルスは２０１９－ｎＣｏＶである。一部の実施形態では、抗コロナウイルス抗体（例えば、抗スパイク抗体）は中和抗体である。一部の実施形態では、対象は、抗コロナウイルス抗体（例えば、抗スパイク抗体）の量またはレベルが保護レベルを下回る（例えば、本明細書に記載の偽ウイルス中和アッセイを使用して測定して少なくとも約７０の力価を下回るか、本明細書に記載の生ウイルス中和アッセイを使用して測定して少なくとも約２５の力価を下回るか、または偽ウイルス中和アッセイもしくは生ウイルス中和アッセイにより決定して、回復期ヒトのコホート（例えば、コロナウイルス感染症（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ）から回復したかまたは回復中であるヒトの群）の中央値レベルの８０％を下回る）場合、コロナウイルス感染症に感受性であると決定され、抗コロナウイルス抗体（例えば、抗スパイク抗体）レベルが保護レベルを上回る場合、コロナウイルス感染症に感受性でないと決定される。一部の実施形態では、保護レベルは、偽ウイルス中和アッセイで決定して、少なくとも約７０の（例えば、約７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１４０、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、またはそれよりも高い）抗コロナウイルス抗体価（例えば、抗スパイク中和抗体価）である。一部の実施形態では、保護レベルは、偽ウイルス中和アッセイで決定して、少なくとも約８３の抗コロナウイルス抗体価（例えば、抗スパイク中和抗体価）である。一部の実施形態では、保護レベルは、生ウイルス中和アッセイで決定して、少なくとも約２５の（例えば、約２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５

６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１４０、１５０、１７５、２００、またはそれよりも高い）抗コロナウイルス抗体価（例えば、抗スパイク中和抗体価）である。一部の実施形態では、保護レベルは、生ウイルス中和アッセイで決定して少なくとも約３５の抗コロナウイルス抗体価（例えば、抗スパイク中和抗体価）である。一部の実施形態では、保護レベルは、本明細書に記載の偽ウイルス中和アッセイまたは生ウイルス中和アッセイにより決定して、回復期ヒトのコホートの中央値または平均値レベルの少なくとも約６０％（例えば、約６１％、約６２％、約６３％、約６４％、約６５％、約６６％、約６７％、約６８％、約６９％、約７０％、約７１％、約７２％、約７３％、約７４％、約７５％、約７６％、約７７％、約７８％、約７９％、約８１％、約８２％、約８３％、約８４％、約８５％、約８６％、約８７％、約８８％、約８９％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、約１００％、約１１０％、約１２０％）の抗コロナウイルス抗体価（例えば、抗スパイク中和抗体価）である。一部の実施形態では、保護レベルは、本明細書に記載の偽ウイルス中和アッセイまたは生ウイルス中和アッセイにより決定して、回復期ヒトのコホートの中央値または平均値レベルの少なくとも約８０％である抗コロナウイルス抗体価（例えば、抗スパイク中和抗体価）である。コロナウイルス感染症に感受性であると決定された対象（抗コロナウイルス抗体（例えば、抗スパイク抗体）の量またはレベルが保護レベルを下回る（例えば、本明細書に記載の偽ウイルス中和アッセイを使用して測定して少なくとも約７０の力価を下回るか、本明細書に記載の生ウイルス中和アッセイを使用して測定して少なくとも約２５の力価を下回るか、または偽ウイルス中和アッセイもしくは生ウイルス中和アッセイにより決定して、回復期ヒトのコホート（例えば、コロナウイルス感染症（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ）から回復したかまたは回復中であるヒトの群）の中央値レベルの８０％を下回る対象）に、本明細書に記載の有効量の医薬組成物（例えば、免疫原性組成物および抗２０１９－ｎＣｏＶ抗体）の１つまたは複数などの療法剤を投与することができる（例えば、本明細書に記載の組成物のいずれかを投与することができる）。対象がコロナウイルス感染症に感受性でないと決定されるまで（例えば、対象が、保護レベルを上回るレベル（本明細書に記載の偽ウイルス中和アッセイを使用して測定して少なくとも約７０の力価を上回るレベル、本明細書に記載の生ウイルス中和アッセイを使用して測定して少なくとも約２５の力価を上回るレベル、または偽ウイルス中和アッセイもしくは生ウイルス中和アッセイにより決定して、回復期ヒトのコホート（例えば、コロナウイルス感染症（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ）から回復したかまたは回復中のヒトの群）の抗コロナウイルス抗体の中央値レベルの少なくとも８０％（および好ましくは中央値レベルであるかまたはそれを上回るレベル）の抗コロナウイルス抗体（例えば、抗スパイク抗体）レベルを有するまで）、対象に療法剤を再投与してもよい。また、本方法は、抗スパイク抗体がＲＢＤ特異的抗体であるか否かを決定するステップを含んでいてもよい。また、本方法は、抗スパイク抗体がＳ１特異的抗体であるか否かを決定するステップを含んでいてもよい。また、本方法は、抗スパイク抗体がＳ２特異的抗体であるか否かを決定するステップを含んでいてもよい。また、本方法は、抗コロナウイルス抗体のサブクラス（例えば、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＦｃｇＲ２Ａ．１）および／またはエフェクター機能（例えば、抗体依存性好中球ファゴサイトーシス（ＡＤＮＰ）、抗体依存性補体沈着（ＡＤＣＤ）、抗体依存性単球細胞ファゴサイトーシス（ＡＤＣＰ）、または抗体依存性ＮＫ細胞活性化（ＩＦＮ－γ分泌、ＣＤ１０７ａ脱顆粒、およびＭＩＰ－１β発現））を特定するステップを含んでいてもよい。本方法は、本明細書に記載の医薬組成物（例えば、免疫原性組成物および抗２０１９－ｎＣｏＶ抗体）の１つまたは複数を、さらなる療法が必要であると決定された対象に投与するステップをさらに含んでいてもよい。

【０２６５】

本方法は、対象に由来する試料中のコロナウイルス（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ）ウイルス量を測定するステップを含んでいてもよい。一部の実施形態では、試料は、気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬ）または鼻スワブ（ＮＳ）である。一部の実施形態では、試料は、対象に由来する体液（例えば血液、例えば全血または血漿）である。一部の実施形態では、試料は、対象に由来する組織試料（例えば、気道組織試料）である。一部の実施形態では、ウイルス量は、検出可能な核酸（例えば、サブゲノムｍＲＮＡ）レベルまたは検出可能なタンパク質（例えば、ヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ））レベルである。一部の実施形態では、検出可能な核酸（例えば、サブゲノムｍＲＮＡ）は、ＲＮＡ－ｓｅｑ、ＲＴ－ｑＰＣＲ、ｑＰＣＲ、マルチプレックスｑＰＣＲもしくはＲＴ－ｑＰＣＲ、ＬＡＭＰ、マイクロアレイ分析、またはハイブリダイゼーション（例えば、ＩＳＨ（例えば、ＦＩＳＨ））により決定される。一部の実施形態では、検出可能なタンパク質（例えば、ヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ））は、イムノアッセイ（例えば、免疫組織化学（ＩＨＣ）アッセイまたはラテラルフローイムノアッセイ）により決定される。一部の実施形態では、検出可能なウイルス量は、対象が疾患（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ媒介性疾患、例えば、ＣＯＶＩＤ－１９、例えば、重症ＣＯＶＩＤ－１９疾患）に感受性であることを示す。一部の実施形態では、少なくとも約３．５ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬよりも大きい（例えば、約３．７５ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬ、約３．８ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬ、約３．９ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬ、約４．０ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬ、約４．２５ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬ、約４．５ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬ、約４．７５ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬ、約５．０ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬ、約５．５ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬ、約６．０ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬ、約６．５ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬ、約７．０ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬ、約７．５ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬ、約８．０ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬ、約８．５ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬ、約９ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬ、約１０ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬ、約１１ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬ、約１２ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬ、約１３ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬ、またはそれよりも大きな）ウイルス量、一部の実施形態では、ＢＡＬにおける３．８５ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬまたはＮＳにおける３．７８ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬよりも大きなウイルス量は、対象が疾患（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ媒介性疾患、例えば、ＣＯＶＩＤ－１９、例えば、重症ＣＯＶＩＤ－１９疾患）に感受性であることを示す。一部の実施形態では、ＢＡＬにおける３．８５ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬまたはＮＳにおける３．７８ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬよりも大きなウイルス量は、対象が重症ＣＯＶＩＤ－１９疾患に感受性であることを示す。一部の実施形態では、組織の約２．０ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇよりも大きな（例えば、約２．０ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ、約２．５ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ、約３．０ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ、約３．５ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ、約４．０ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ、約４．２５ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ、約４．５ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ、約４．７５ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ、約５．０ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ、約５．５ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ、約６．０ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ、約６．５ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ、約７．０ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ、約７．５ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ、約８．０ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ、約８．５ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ、約９ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ、約１０ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ、約１１ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ、約１２ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ、約１３ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ、またはそれよりも大きな）ウイルス量は、対象が重症ＣＯＶＩＤ－１９疾患に感受性であることを示す。一部の実施形態では、肺組織における約８．０ log_{10} ｓｇ

ｍＲＮＡコピー／ｇ、鼻孔組織における約７．０　ｌｏｇ$_{10}$　ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ、気管組織における約６．０　ｌｏｇ$_{10}$　ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ、心臓組織における約５．５　ｌｏｇ$_{10}$　ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ、またはＧＩ、脾臓、肝臓、腎臓、もしくは脳組織における約２．０　ｌｏｇ$_{10}$　ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇよりも大きなウイルス量は、対象が重症ＣＯＶＩＤ－１９疾患に感受性であることを示す。一部の実施形態では、ＩＳＨによる約３％（例えば、約４％、約５％、約６％、約７％、約８％、約９％、約１０％）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ｖＲＮＡ染色よりも大きなウイルス量は、対象が疾患（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ媒介性疾患、例えば、ＣＯＶＩＤ－１９、例えば、重症ＣＯＶＩＤ－１９疾患）に感受性であることを示す。一部の実施形態では、ＩＳＨによる約５％（例えば、約５％、約６％、約７％、約８％、約９％、約１０％）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ｖＲＮＡ染色よりも大きなウイルス量は、対象が重症ＣＯＶＩＤ－１９疾患に感受性であることを示す。一部の実施形態では、ＩＳＨによる約５％（例えば、約５％、約６％、約７％、約８％、約９％、約１０％）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ｖＲＮＡ染色よりも大きなウイルス量は、対象が重症ＣＯＶＩＤ－１９疾患に感受性であることを示す。一部の実施形態では、コロナウイルス（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ）ウイルス量は、感染後の約１、２、３、４、５、もしくは６日間、または１、２、３、４、５、６、もしくは７週間にわたって１回または複数回測定される。

【０２６６】

応答性のモニタリング

本明細書では、コロナウイルス感染症を処置するかまたはそのリスクを低減するための治療用組成物（例えば、本明細書に記載のまたは当技術分野で公知の組成物または免疫原性組成物のいずれか）に対する対象の抗コロナウイルス免疫応答をモニターするための方法が提供される。本方法は、対象の抗コロナウイルス抗体（例えば、抗スパイク抗体）のレベルまたは量を測定するステップを含む。一部の実施形態では、コロナウイルスは２０１９－ｎＣｏＶである。一部の実施形態では、抗コロナウイルス抗体（例えば、抗スパイク抗体）は中和抗体である。抗コロナウイルス抗体（例えば、抗スパイク抗体、例えば、抗スパイク中和抗体）を、治療用組成物（例えば、本明細書に記載の組成物または免疫原性組成物のいずれか）の投与後に短い時間枠で（例えば、抗体応答のロバストさを測定するため）またはより長い時間枠で（例えば、抗体応答の耐久性を測定するために）測定してもよい。一部の実施形態では、抗コロナウイルス抗体（例えば、抗スパイク抗体）は、対象に治療用組成物（例えば、本明細書に記載の組成物または免疫原性組成物のいずれか）を投与した、約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、もしくは２８日後、約５、６、７、８、９、１０、１１、もしくは１２週間後、約４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、もしくは２３か月後、または約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、または２０年後に測定される。

【０２６７】

対象は、対象にて（例えば、対象の血液中で）検出される抗コロナウイルス抗体（例えば、抗スパイク抗体）が保護レベルを上回る（例えば、本明細書に記載の偽ウイルス中和アッセイを使用して測定して少なくとも約７０の力価を上回るか、本明細書に記載の生ウイルス中和アッセイを使用して測定して少なくとも約２５の力価を上回るか、または偽ウイルス中和アッセイもしくは生ウイルス中和アッセイにより決定して、回復期ヒトのコホート（例えば、コロナウイルス感染症（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ）から回復したかまたは回復中であるヒトの群）の抗コロナウイルス抗体の中央値レベルの少なくとも８０％のレベルである（好ましくは、中央値レベルであるかまたはそれを上回るレベルである））場合、治療用組成物に応答性であると決定される。あるいは、対象は、対象にて検出される抗コロナウイルス抗体（例えば、抗スパイク抗体）が保護レベルを下回る（例えば、本明細書に記載の偽ウイルス中和アッセイを使用して測定して少なくとも約７０の力価を下回るか、本明細書に記載の生ウイルス中和アッセイを使用して測定して少なくとも約２

５の力価を下回るか、または偽ウイルス中和アッセイもしくは生ウイルス中和アッセイにより決定して、回復期ヒトのコホートの中央値レベルの８０％を下回るレベルである）場合、治療用組成物に非応答性であると決定される。抗コロナウイルス抗体（例えば、抗スパイク中和抗体）の保護レベルは、偽ウイルス中和アッセイ（例えば、本明細書に記載の偽ウイルス中和アッセイ）で決定して、少なくとも約７０の（例えば、約７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１４０、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、またはそれよりも高い）力価に対応する。一部の実施形態では、保護レベルは、生ウイルス中和アッセイ（例えば、本明細書に記載の偽ウイルス中和アッセイ）で決定して、少なくとも約２５の（例えば、約２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１４０、１５０、１７５、２００、またはそれよりも高い）抗コロナウイルス抗体価（例えば、抗スパイク中和抗体価）である。一部の実施形態では、保護レベルは、本明細書に記載の偽ウイルス中和アッセイまたは生ウイルス中和アッセイにより決定して、回復期ヒトのコホートの中央値または平均値レベルの少なくとも約６０％（例えば、約６１％、約６２％、約６３％、約６４％、約６５％、約６６％、約６７％、約６８％、約６９％、約７０％、約７１％、約７２％、約７３％、約７４％、約７５％、約７６％、約７７％、約７８％、約７９％、約８１％、約８２％、約８３％、約８４％、約８５％、約８６％、約８７％、約８８％、約８９％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、約１００％、約１１０％、約１２０％）の抗コロナウイルス抗体価（例えば、抗スパイク中和抗体価）である。

【０２６８】

対象における（例えば、対象の血液中の）抗コロナウイルス抗体（例えば、抗スパイク抗体）価が、時間の経過と共に、保護レベルを下回るかまたは保護レベルに到達することができない（例えば、本明細書に記載の偽ウイルス中和アッセイを使用して測定して少なくとも約７０の力価を下回るか、本明細書に記載の生ウイルス中和アッセイを使用して測定して少なくとも約２５の力価を下回るか、または本明細書に記載の偽ウイルス中和アッセイもしくは生ウイルス中和アッセイにより決定して、回復期ヒトのコホートの中央値レベルの８０％を下回る）場合、対象に、コロナウイルスワクチン組成物（例えば、本明細書に記載の治療用組成物または免疫原組成物の１つまたは複数）を、単独でまたは本明細書に記載の追加の治療剤の１つまたは複数などの追加の治療剤と組み合わせて投与してもよく、または再投与してもよい。それを必要とする対象への本開示の組成物の投与を、対象における抗コロナウイルス抗体の保護レベルを維持するための必要性に応じて、１日もしくはそれより多くの日数（例えば、１、２、３、４、５、６、または７日間）、１週もしくはそれより多くの週数（例えば、１、２、３、４、５、６、７、または８週間）、１か月もしくはそれより多くの月数（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、または１２か月間）、または１年もしくはそれより多くの年数（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０年、またはそれよりも多くの年数）にわたって、あるいは対象の生涯にわたって、１回または複数回（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５回、またはそれよりも多くの回数）実施し、それにより対象をコロナウイルス感染症（例えば、２０１９－ｎＣｏＶによる感染症）に対して保護することができる。

【０２６９】

本方法は、対象に由来する試料中のコロナウイルス（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ）ウイルス量を測定するステップをさらに含んでいてもよい。一部の実施形態では、コロナウイルスは２０１９－ｎＣｏＶである。一部の実施形態では、ウイルス量は、感染の約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、３０、３６、４２、もしくは４８時間後、または約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、もしくは２８日後に測定される。一部の実施形態では、試料は、気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬ）または鼻スワブ（ＮＳ）である。一部の実施形態では、試料は、対象に由来する体液（例えば血液、例えば全血または血漿）である。一部の実施形態では、試料は、対象に由来する組織試料（例えば、気道組織試料）である。一部の実施形態では、ウイルス量は、検出可能な核酸（例えば、サブゲノムｍＲＮＡ）レベルまたは検出可能なタンパク質（例えば、ヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ））レベルである。一部の実施形態では、検出可能な核酸（例えば、サブゲノムｍＲＮＡ）は、ＲＮＡ－ｓｅｑ、ＲＴ－ｑＰＣＲ、ｑＰＣＲ、マルチプレックスｑＰＣＲもしくはＲＴ－ｑＰＣＲ、ＬＡＭＰ、マイクロアレイ分析、またはハイブリダイゼーション（例えば、ＩＳＨ（例えば、ＦＩＳＨ））により決定される。一部の実施形態では、検出可能なタンパク質（例えば、ヌクレオカプシドタンパク質（Ｎ））は、イムノアッセイ（例えば、免疫組織化学（ＩＨＣ）アッセイまたはラテラルフローイムノアッセイ）により決定される。ウイルス量が事前に割り当てられたレベルを下回る場合、対象は治療用組成物に応答性であると決定される。一部の実施形態では、事前に割り当てられたレベルは、約３．５　$\log_{10}$ ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬ　ＢＡＬまたはＮＳ未満、または約５．０　$\log_{10}$ ｓｇｍＲＮＡコピー／ｇ組織（例えば、肺、鼻孔、気管、心臓、ＧＩ、脾臓、肝臓、腎臓、または脳組織）未満である。一部の実施形態では、対象は、対象のウイルス量が減少した場合、治療用組成物に応答性であると決定される。

【０２７０】

ウイルス量により決定して対象が応答性であると決定されない場合、対象に、コロナウイルスワクチン組成物（例えば、本明細書に記載の治療用または免疫原性組成物の１つまたは複数）を、単独でまたは本明細書に記載の追加の治療剤の１つまたは複数などの追加の治療剤と組み合わせて投与してもよくまたは再投与してもよい

【０２７１】

それを必要とする対象への本開示の組成物の投与は、ウイルス量を低減させるための必要性に応じて、１日またはそれよりも多くの日数（例えば、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、または２８日間）にわたって、１回または複数回（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４，１５回、またはそれよりも多くの回数）実施してもよい。

【０２７２】

他の実施形態

本明細書で言及されている刊行物、特許、および特許出願はすべて、各々独立した刊行物または特許出願が具体的におよび個々に参照により組み込まれることが示されている場合と同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【０２７３】

本発明は、その特定の実施形態に関連して説明されているが、さらなる改変が可能であり、本出願は、概して本原理に従い、本発明が関する技術分野の公知または慣例的実施の範囲内にあり、示されている前述の本質的な特徴に適用することができ、特許請求の範囲に従う、本発明からのそのような逸脱を含む、あらゆる変化形態、使用、または適応を包含することが意図されていることが理解されるであろう。

【０２７４】

本発明は以下のものをさらに提供する。

実施形態１は、配列番号２９の完全長アミノ酸配列に対する以下の改変：
ａ．　アミノ酸９８６および９８７おける、プロリンへの安定化突然変異；ならびに
ｂ．　フューリン切断部位（配列番号９０）に対する突然変異
を含む２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子である。

【０２７５】

実施形態２は、配列番号２１１のヌクレオチド配列を含む、実施形態１に記載の単離された核酸分子である。

【０２７６】

実施形態３は、配列番号２０５のアミノ酸配列を含む２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、実施形態１または２に記載の単離された核酸分子である。

【０２７７】

実施形態４は、配列番号５１のアミノ酸配列と少なくとも８５％の配列同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、実施形態１に記載の単離された核酸分子である。

【０２７８】

実施形態５は、配列番号５１のアミノ酸配列と少なくとも９９％の配列同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、実施形態１または４に記載の単離された核酸分子である。

【０２７９】

実施形態６は、配列番号５４のアミノ酸配列と少なくとも８５％の配列同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、実施形態１に記載の単離された核酸分子である。

【０２８０】

実施形態７は、配列番号５６のアミノ酸配列と少なくとも８５％の配列同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、実施形態１に記載の単離された核酸分子である。

【０２８１】

実施形態８は、配列番号１２１と少なくとも８５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列、またはその相補配列を含む、実施形態１に記載の単離された核酸分子である。

【０２８２】

実施形態９は、配列番号１４３と少なくとも８５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列、またはその相補配列を含む、実施形態４または５に記載の単離された核酸分子である。

【０２８３】

実施形態１０は、配列番号１４６と少なくとも８５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列、またはその相補配列を含む、実施形態６または７に記載の単離された核酸分子である。

【０２８４】

実施形態１１は、配列番号１４８と少なくとも８５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列、またはその相補配列を含む、実施形態６または７に記載の単離された核酸分子である。

【０２８５】

実施形態１２は、配列番号２９の完全長アミノ酸配列に対する以下のさらなる改変：
ｃ．　シグナル配列の欠失
を含む２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質をコードする、実施形態１に記載の単離された核酸分子である。

【０２８６】

実施形態１３は、配列番号２３のアミノ酸配列と少なくとも８５％の配列同一性を有す

るポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、実施形態１または１２に記載の単離された核酸分子である。

【０２８７】

実施形態１４は、配列番号２３のアミノ酸配列と少なくとも９９％の配列同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、実施形態１、１２、または１３に記載の単離された核酸分子である。

【０２８８】

実施形態１５は、配列番号２６のアミノ酸配列と少なくとも８５％の配列同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、実施形態１または１２に記載の単離された核酸分子である。

【０２８９】

実施形態１６は、配列番号１１５と少なくとも８５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列、またはその相補配列を含む、実施形態１、１２、または１３に記載の単離された核酸分子である。

【０２９０】

実施形態１７は、配列番号１１８と少なくとも８５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列、またはその相補配列を含む、実施形態１５に記載の単離された核酸分子である。

【０２９１】

実施形態１８は、２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質をコードする核酸が、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、好ましくはＣＭＶ前初期プロモーターに作動可能に連結している、実施形態１～１７のいずれかに記載の単離された核酸分子である。

【０２９２】

実施形態１９は、２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質をコードする核酸が、少なくとも１つのテトラサイクリンオペレーター（ＴｅｔＯ）モチーフを含むサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーターに作動可能に連結している、実施形態１～１８のいずれかに記載の単離された核酸分子である。

【０２９３】

実施形態２０は、少なくとも１つのＴｅｔＯモチーフを含むＣＭＶプロモーターが、配列番号２１９のヌクレオチド配列を含む、実施形態１９に記載の単離された核酸分子である。

【０２９４】

実施形態２１は、ＣＭＶプロモーターが、配列番号２１９のヌクレオチド配列からなる、実施形態１９または２０に記載の単離された核酸分子である。

【０２９５】

実施形態２２は、配列番号２９の完全長アミノ酸配列に対する以下の改変：

ａ．　アミノ酸９８６および９８７おける、プロリンへの安定化突然変異；ならびに

ｂ．　フューリン切断部位（配列番号９０）に対する突然変異

を含む単離された２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質である。

【０２９６】

実施形態２３は、配列番号２０５のアミノ酸配列を含む、実施形態２２に記載の単離された２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質である。

【０２９７】

実施形態２４は、配列番号５１のアミノ酸配列と少なくとも８５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態２２に記載の単離された２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質である。

【０２９８】

実施形態２５は、配列番号５１のアミノ酸配列と少なくとも９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態２２または２３に記載の単離された２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質である。

【０２９９】
実施形態２６は、配列番号５４のアミノ酸配列と少なくとも８５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態２２に記載の単離された２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質である。
【０３００】
実施形態２７は、配列番号５６のアミノ酸配列と少なくとも８５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態２２に記載の単離された２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質である。
【０３０１】
実施形態２８は、配列番号２９の完全長アミノ酸配列に対する以下のさらなる改変：
ｃ．　シグナル配列の欠失
を含む、実施形態２２に記載の単離された２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質である。
【０３０２】
実施形態２９は、配列番号２３のアミノ酸配列と少なくとも８５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態２２または２８に記載の単離された２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質である。
【０３０３】
実施形態３０は、配列番号２３のアミノ酸配列と少なくとも９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態２２、２８、または２９に記載の単離された２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質である。
【０３０４】
実施形態３１は、配列番号２６のアミノ酸配列と少なくとも８５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態２２または２８に記載の単離された２０１９－ＮＣＯＶスパイク（Ｓ）タンパク質である。
【０３０５】
実施形態３２は、実施形態１～２１のいずれか１つに記載の核酸分子の１つまたは複数を含む、単離されたベクターである。
【０３０６】
実施形態３３は、複製欠損性である、実施形態３２に記載のベクターである。
【０３０７】
実施形態３４は、哺乳動物ベクター、細菌ベクター、またはウイルスベクターである、実施形態３２に記載のベクターである。
【０３０８】
実施形態３５は、発現ベクターである、実施形態３２に記載のベクターである。
【０３０９】
実施形態３６は、ウイルスベクターが、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、パルボウイルス、コロナウイルス、マイナス鎖ＲＮＡウイルス、オルソミクソウイルス、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、プラス鎖ＲＮＡウイルス、ピコルナウイルス、アルファウイルス、二本鎖ＤＮＡウイルス、ヘルペスウイルス、エプスタイン－バーウイルス、サイトメガロウイルス、鶏痘、およびカナリア痘からなる群から選択されるウイルスである、実施形態３２に記載のベクターである。
【０３１０】
実施形態３７は、アデノウイルスである、実施形態３６に記載のベクターである。
【０３１１】
実施形態３８は、アデノウイルスが、Ａｄ２６、Ａｄ５２、Ａｄ５９、Ａｄ２、Ａｄ５、Ａｄ１１、Ａｄ１２、Ａｄ２４、Ａｄ３４、Ａｄ３５、Ａｄ４０、Ａｄ４８、Ａｄ４９、Ａｄ５０、およびＰａｎ９からなる群から選択され、特にＡｄ２６である、実施形態３７に記載のベクターである。
【０３１２】

実施形態３９は、実施形態１～２１のいずれか１つに記載の核酸分子、実施形態２２～３１のいずれか１つに記載のポリペプチド、または実施形態３２～３８のいずれか１つに記載のベクターを含む組成物である。

【０３１３】

実施形態４０は、薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤をさらに含む、実施形態３９に記載の組成物。

【０３１４】

実施形態４１は、アジュバントまたは免疫刺激剤をさらに含む、実施形態３９または４０に記載の組成物。

【０３１５】

実施形態４２は、実施形態１～２１のいずれか１つに記載の核酸分子、実施形態２２～３１のいずれか１つに記載のポリペプチド、または実施形態３２～３８のいずれか１つに記載のベクターを含む免疫原性組成物である。

【０３１６】

実施形態４３は、ワクチンである、実施形態４２に記載の免疫原性組成物である。

【０３１７】

実施形態４４は、それを必要とする対象における２０１９－ｎＣｏＶ感染症などのコロナウイルス感染症の処置またはそのリスクの低減に使用するための組成物であって、治療有効量の実施形態３９～４１のいずれか１つに記載の組成物または実施形態４２もしくは４３に記載の免疫原性組成物を含む組成物である。

【０３１８】

実施形態４５は、２０１９－ｎＣｏＶに感染した対象のコロナウイルス媒介性活性（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ媒介性活性）の低減に使用するための組成物であって、治療有効量の実施形態３９～４１のいずれか１つに記載の組成物または実施形態４２もしくは４３に記載の免疫原性組成物を含む組成物である。

【０３１９】

実施形態４６は、それを必要とする対象における分子的に確認された中等症～重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９の予防に使用するための組成物であって、予防は、実施形態３９～４１のいずれか１つに記載の組成物または実施形態４２もしくは４３に記載の免疫原性組成物を対象に投与することを含み、組成物は、１用量投与レジメンにて１用量当たり５×10^{10}ｖｐの用量で投与するためのものである組成物である。

【０３２０】

実施形態４７は、それを必要とする対象におけるコロナウイルス（例えば、２０１９－ＮＣＯＶ）感染症を処置するかまたはそのリスクを低減するための免疫原性組成物を製造する方法であって、

（ａ）実施形態１～２１のいずれか１つに記載の核酸分子、実施形態２２～３１のいずれか１つに記載のポリペプチド、実施形態３２～３８のいずれか１つに記載のベクター、実施形態３９～４１のいずれか１つに記載の組成物の少なくとも１つを、薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤と混合して、免疫原性組成物を形成するステップ；および

（ｂ）免疫原性組成物を容器に入れるステップ

を含む方法である。

【０３２１】

実施形態４８は、

（ａ）実施形態１～２１のいずれか１つに記載の核酸分子、実施形態２２～３１のいずれか１つに記載のポリペプチド、実施形態３２～３８のいずれか１つに記載のベクター、実施形態３９～４１のいずれか１つに記載の組成物、および実施形態４２または４３に記載の免疫原性組成物の少なくとも１つを含む第１の容器；

（ｂ）その使用説明書；ならびに必要に応じて

（ｃ）薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤を含む第２の容器

を含むキットである。
【０３２２】
実施形態４９は、第１の容器が、薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤をさらに含む、実施形態４８に記載のキット。
【０３２３】
実施形態５０は、必要に応じてアジュバントおよび／または免疫刺激剤を含む、実施形態４８または４９に記載のキットである。
【０３２４】
実施形態５１は、配列番号２１１のヌクレオチド配列を含むコロナウイルスＳタンパク質またはその断片をコードする単離されたおよび／または組換え核酸である。
【０３２５】
実施形態５２は、配列番号２０５のアミノ酸配列またはその断片を含む単離されたおよび／または組換えコロナウイルスＳタンパク質である。
【０３２６】
実施形態５３は、実施形態５２に記載のコロナウイルスＳタンパク質をコードする核酸である。
【０３２７】
実施形態５４は、ヒト細胞での発現のために最適化されたコドンである、実施形態５１または５３に記載の核酸である。
【０３２８】
実施形態５５は、実施形態５１、５３、または５４に記載の核酸を含むベクターである。
【０３２９】
実施形態５６は、実施形態５２に記載のタンパク質をコードする核酸を含むベクターである。
【０３３０】
実施形態５７は、組換えヒトアデノウイルスベクターである、実施形態５５または５６に記載のベクターである。
【０３３１】
実施形態５８は、コロナウイルスＳタンパク質をコードする核酸が、少なくとも１つのテトラサイクリンオペレーター（ＴｅｔＯ）モチーフを含むサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーターに作動可能に連結している、実施形態５７に記載のベクターである。
【０３３２】
実施形態５９は、少なくとも１つのＴｅｔＯモチーフを含むＣＭＶプロモーターが、配列番号２１９のヌクレオチド配列を含む、実施形態５８に記載のベクターである。
【０３３３】
実施形態６０は、組換えヒトアデノウイルスが、アデノウイルスゲノムのＥ１領域に欠失を有するか、Ｅ３領域に欠失を有するか、またはＥ１およびＥ３領域の両方に欠失を有する、実施形態５７、５８、または５９に記載のベクターである。
【０３３４】
実施形態６１は、血清型２６の組換えヒトアデノウイルスである、実施形態５８～６０のいずれか１つに記載のベクターである。
【０３３５】
実施形態６２は、実施形態５１、５３、もしくは５４に記載の核酸、実施形態５２に記載のタンパク質、および／または実施形態５５～６１のいずれか１つに記載のベクターを含む組成物である。
【０３３６】
実施形態６３は、実施形態５１、５３、もしくは５４のいずれか１つに記載の核酸、実施形態５２に記載のタンパク質、および／または実施形態５５～６１のいずれか１つに記載のベクターを含む、ＣＯＶＩＤ－１９に対するワクチンである。

【０３３７】
実施形態６４は、配列番号２０５のアミノ酸配列を含むＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質またはその断片をコードする核酸を含む、血清型２６の組換えヒトアデノウイルスを含む、実施形態６３に記載のワクチンである。
【０３３８】
実施形態６５は、ＣＯＶＩＤ－１９に対して対象にワクチン接種するための方法であって、実施形態６３または６４に記載のワクチンを対象に投与するステップを含む方法である。
【０３３９】
実施形態６６は、対象のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の感染および／または複製を低減するための方法であって、実施形態５９に記載の組成物または実施形態６３もしくは６４に記載のワクチンを対象に投与するステップを含む方法である。
【０３４０】
実施形態６７は、対象における分子的に確認された中等症～重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９を予防するための方法であって、実施形態６０または６１に記載のワクチンを１用量または２用量ワクチンレジメンで対象に投与するステップを含む方法である。
【０３４１】
実施形態６８は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２血清陰性の成体対象における分子的に確認された中等症～重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９をプラセボと比較して予防するための方法であって、１用量または２用量ワクチンレジメンで投与される実施形態６３または６４に記載のワクチンを対象に投与するステップを含む方法である。
【０３４２】
実施形態６９は、定量的逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）により評価して、対象において分子的に確認された中等症～重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９を有する参加者のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルス量を低減するための方法であって、１用量または２用量ワクチンレジメンで投与される実施形態６３または６４に記載のワクチンを対象に投与するステップを含む方法である。
【０３４３】
実施形態７０は、対象が、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２による感染症に罹患している疑いがあるかまたはそれを有すると診断されている、実施形態６５～６９のいずれか１つに記載の方法である。
【０３４４】
実施形態７１は、ワクチンが筋肉内投与される、実施形態６５～７０のいずれか１つに記載の方法である。
【０３４５】
実施形態７２は、ワクチンが、約８週間の間隔をあけて投与される１用量当たり５×１０^{10}ｖｐまたは１×１０^{11}ｖｐの用量を含む２用量ワクチンレジメンで投与される、実施形態６５～７１のいずれか１つに記載の方法である。
【０３４６】
実施形態７３は、１用量当たり５×１０^{10}ｖｐまたは１×１０^{11}ｖｐの用量のワクチンを対象に単回投与するステップを含む、実施形態６５～７２のいずれか１つに記載の方法である。
【０３４７】
実施形態７４は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質またはその断片をコードする核酸を含む血清型２６の組換えヒトアデノウイルスを含む単離された宿主細胞である。
【０３４８】
実施形態７５は、ＣＯＶＩＤ－１９に対するワクチンを作製するための方法であって、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質またはその断片をコードする核酸を含む血清型２６の組換えヒトアデノウイルスを用意するステップ、組換えアデノウイルスを宿主細胞の培養物中で増殖させるステップ、組換えアデノウイルスを単離および精製するステップ、な

らびに組換えアデノウイルスを薬学的に許容される組成物に製剤化するステップを含む方法である。

【０３４９】

実施形態７６は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質またはその断片をコードする核酸を含む血清型２６の組換えヒトアデノウイルスのゲノムを形成する単離された組換え核酸である。

【０３５０】

実施形態７７は、配列番号１～８４のいずれか１つのアミノ酸配列と少なくとも８５％の配列同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子である。

【０３５１】

実施形態７８は、

ａ）ポリペプチドが、対象において免疫応答を誘発することが可能であるか；または

ｂ）ポリペプチドが、配列番号１～８４のいずれか１つと、またはそのポリペプチド配列と、少なくとも８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％の配列同一性を有する、

実施形態７７に記載の核酸分子である。

【０３５２】

実施形態７９は、ポリペプチドが、配列番号５６のアミノ酸配列を有する、実施形態７７または７８に記載の核酸分子である。

【０３５３】

実施形態８０は、配列番号９３～１８１、１９０～１９５、および１９９～２０４のいずれか１つまたはその相補配列のすべてまたは部分と、少なくとも８５％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子である。

【０３５４】

実施形態８１は、核酸分子が、配列番号９３～１８１、１９０～１９５、および１９９～２０４のいずれか１つと、またはそのヌクレオチド配列と、少なくとも８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％の配列同一性を有する、実施形態８０に記載の単離された核酸分子である。

【０３５５】

実施形態８２は、核酸分子またはその部分が、対象において免疫応答を誘発することが可能である、実施形態８０または８１に記載の単離された核酸分子である。

【０３５６】

実施形態８３は、核酸分子が、配列番号１９５のヌクレオチド配列を有する、実施形態８０～８２のいずれか１つに記載の単離された核酸分子である。

【０３５７】

実施形態８４は、配列番号１～８４のいずれか１つのすべてまたは部分と、少なくとも８５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドである。

【０３５８】

実施形態８５は、ポリペプチドが、配列番号１～８４のいずれか１つと、またはそのアミノ酸配列と、少なくとも８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％の配列同一性を有する、実施形態８４に記載の単離されたポリペプチドである。

【０３５９】

実施形態８６は、ポリペプチドまたはその部分が、対象において免疫応答を誘発することが可能である、実施形態８４または８５に記載の単離されたポリペプチドである。

【０３６０】

実施形態８７は、ポリペプチドが、配列番号２８のアミノ酸配列を有する、実施形態８４～８６のいずれか１つに記載の単離されたポリペプチドである。

【０３６１】

実施形態８８は、実施形態７７～８３のいずれか１つに記載の核酸分子の１つまたは複数を含む単離されたベクターである。

【０３６２】

実施形態８９は、複製欠損性である、実施形態８８に記載のベクターである。

【０３６３】

実施形態９０は、哺乳動物ベクター、細菌ベクター、またはウイルスベクターである、実施形態８８または８９に記載のベクターである。

【０３６４】

実施形態９１は、発現ベクターである、実施形態９０に記載のベクターである。

【０３６５】

実施形態９２は、ウイルスベクターが、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、パルボウイルス、コロナウイルス、マイナス鎖ＲＮＡウイルス、オルソミクソウイルス、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、プラス鎖ＲＮＡウイルス、ピコルナウイルス、アルファウイルス、二本鎖ＤＮＡウイルス、ヘルペスウイルス、エプスタイン－バーウイルス、サイトメガロウイルス、鶏痘、およびカナリア痘からなる群から選択されるウイルスである、実施形態９０に記載のベクターである。

【０３６６】

実施形態９３は、アデノウイルスである、実施形態９２に記載のベクターである。

【０３６７】

実施形態９４は、アデノウイルスが、Ａｄ２６、Ａｄ５２、Ａｄ５９、Ａｄ２、Ａｄ５、Ａｄ１１、Ａｄ１２、Ａｄ２４、Ａｄ３４、Ａｄ３５、Ａｄ４０、Ａｄ４８、Ａｄ４９、Ａｄ５０、およびＰａｎ９からなる群から選択される、実施形態９３に記載のベクターである。

【０３６８】

実施形態９５は、Ａｄ５２がアカゲザルＡｄ５２であるか、またはＡｄ２６がアカゲザルＡｄ２６である、実施形態９４に記載のベクターである。

【０３６９】

実施形態９６は、実施形態８４～８７のいずれか１つに記載のポリペプチドに特異的に結合する単離された抗体である。

【０３７０】

実施形態９７は、実施形態７７～８２のいずれか１つに記載の核酸、実施形態８４～８７のいずれか１つに記載のポリペプチド、または実施形態８８～９５のいずれか１つに記載のベクターで哺乳動物を免疫化することにより生成される、実施形態９６に記載の抗体である。

【０３７１】

実施形態９８は、哺乳動物が、ヒト、ウシ、ヤギ、マウス、またはウサギである、実施形態９７に記載の抗体である。

【０３７２】

実施形態９９は、ヒト化されている、実施形態９６または９７に記載の抗体である。

【０３７３】

実施形態１００は、ＩｇＧである、実施形態９６～９９のいずれか１つに記載の抗体である。

【０３７４】

実施形態１０１は、ｂｉｓ－Ｆａｂ、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆ（ａｂ’）２、ダイアボディ、線状抗体、またはｓｃＦＶである、実施形態９６～１００のいずれか１つに記載の抗体である。

【０３７５】

実施形態１０２は、抗２０１９－武漢コロナウイルス（２０１９－ｎＣｏＶ）抗体を産生する方法であって、実施形態７７～８３のいずれか１つに記載の核酸分子、実施形態８４～８７のいずれか１つに記載のポリペプチド、および／または実施形態８８～９５のい

ずれか１つに記載のベクターを、対象への投与後に中和抗２０１９－ｎＣｏＶ抗血清の産生を誘発するのに十分な量で対象に投与するステップを含む方法である。

【０３７６】

実施形態１０３は、実施形態１０２に記載の方法により産生される単離された抗２０１９－ｎＣｏＶ抗体である。

【０３７７】

実施形態１０４は、配列番号１～８４のいずれか１つ内にあるエピトープに結合する、実施形態１０３に記載の抗体である。

【０３７８】

実施形態１０５は、実施形態７７～８３のいずれか１つに記載の核酸分子、実施形態８４～８７のいずれか１つに記載のポリペプチド、実施形態８８～９５のいずれか１つに記載のベクター、または実施形態９６～１０１もしくは１０３～１０４のいずれか１つに記載の抗体を含む組成物である。

【０３７９】

実施形態１０６は、薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤をさらに含む、実施形態１０５に記載の組成物である。

【０３８０】

実施形態１０７は、アジュバントまたは免疫刺激剤をさらに含む、実施形態１０５または１０６に記載の組成物である。

【０３８１】

実施形態１０８は、実施形態７７～８２のいずれか１つに記載の核酸分子、実施形態８４～８７のいずれか１つに記載のポリペプチド、実施形態８８～９５のいずれか１つに記載のベクター、または実施形態９６～１０１もしくは１０３～１０４のいずれか１つに記載の抗体を含む免疫原性組成物である。

【０３８２】

実施形態１０９は、ワクチンである、実施形態１０８に記載の免疫原性組成物である。

【０３８３】

実施形態１１０は、それを必要とする対象のコロナウイルス感染症（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ感染症）を処置するかまたはそのリスクを低減することが可能である、実施形態１０８に記載の免疫原性組成物である。

【０３８４】

実施形態１１１は、対象への投与後に中和抗２０１９－ｎＣｏＶ抗血清の産生を誘発する、実施形態１０８～１１０のいずれか１つに記載の免疫原性組成物である。

【０３８５】

実施形態１１２は、対象が哺乳動物である、実施形態１０８～１１１のいずれか１つに記載の免疫原性組成物である。

【０３８６】

実施形態１１３は、哺乳動物がヒトである、実施形態１１２に記載の免疫原性組成物である。

【０３８７】

実施形態１１４は、ヒトが基礎疾患を有する、実施形態１１３に記載の免疫原性組成物である。

【０３８８】

実施形態１１５は、基礎疾患が、高血圧症、糖尿病、または心血管疾患である、実施形態１１４に記載の免疫原性組成物である。

【０３８９】

実施形態１１６は、コロナウイルス感染症に対する対象の感受性を特定、診断、および／または予測する方法であって、対象は、対象に由来する試料中に保護レベルの抗コロナウイルス抗体（抗スパイク抗体など）を有するか否かを決定するステップを含み、好ましくは、保護レベルは、

（ｉ）偽ウイルス中和アッセイを使用して決定して少なくとも約７０の力価であるかもしくはそれを上回るレベル；または
（ｉｉ）生ウイルス中和アッセイを使用して決定して少なくとも約２５の力価であるかもしくはそれを上回るレベル；または
（ｉｉｉ）偽ウイルス中和アッセイもしくは生ウイルス中和アッセイにより決定して、回復期ヒトのコホートにおける抗コロナウイルス抗体の中央値レベルの少なくとも８０％であるレベルである、
方法である。

【０３９０】

実施形態１１７は、有効量の実施形態１０５～１０７のいずれか１つに記載の組成物または実施形態１０８～１１５のいずれか１つに記載の免疫原性組成物を、保護レベル未満の抗コロナウイルス抗体を有する対象に投与するステップをさらに含む、実施形態１１６に記載の方法である。

【０３９１】

実施形態１１８は、抗コロナウイルス抗体（例えば、抗スパイク抗体）のクラスを特定するステップをさらに含む、実施形態１１６または１１７に記載の方法である。

【０３９２】

実施形態１１９は、クラスがＩｇＧである、実施形態１１８に記載の方法である。

【０３９３】

実施形態１２０は、試料が、対象に由来する体液であり、好ましくは、体液は血液である、実施形態１１６～１１９のいずれか１つに記載の方法である。

【０３９４】

実施形態１２１は、コロナウイルスが２０１９－ｎＣｏＶである、実施形態１１６～１２０のいずれか１つに記載の方法である。

【０３９５】

実施形態１２２は、それを必要とする対象におけるコロナウイルス感染症を処置するかまたはそのリスクを低減する方法であって、治療有効量の実施形態１０５～１０７のいずれか１つに記載の組成物または実施形態１０８～１１５のいずれか１つに記載の免疫原性組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

【０３９６】

実施形態１２３は、対象の抗コロナウイルス抗体（例えば、抗スパイク抗体）レベルを測定するステップをさらに含む、実施形態１２２に記載の方法である。

【０３９７】

実施形態１２４は、対象の抗コロナウイルス抗体レベルが、投与前および／または投与後に測定される、実施形態１２３に記載の方法。

【０３９８】

実施形態１２５は、対象の抗コロナウイルス抗体レベルが、投与後の約１、２、３、４、５、または６日間、１、２、３、４、５、６、または７週間、２、３、４、５、または６か月間、１、２、３、４、または５年間にわたって、１回または複数回測定される、実施形態１２４に記載の方法。

【０３９９】

実施形態１２６は、対象の抗コロナウイルス抗体レベルが保護レベルを下回っており、方法は、実施形態１０５～１０７のいずれか１つに記載の組成物もしくは実施形態１０８～１１５のいずれか１つに記載の免疫原性組成物を対象に再投与するステップ、または異なる抗コロナウイルス組成物を対象に投与するステップをさらに含む、実施形態１２２～１２５のいずれか１つに記載の方法である。

【０４００】

実施形態１２７は、保護レベルが、コロナウイルス媒介性疾患の症状または継続期間を低減するのに十分なレベルである、実施形態１２６に記載の方法。

【０４０１】

実施形態１２８は、保護レベルが、
（ｉ）偽ウイルス中和アッセイを使用して決定して少なくとも約７０の力価であるかもしくはそれを上回るレベル；または
（ｉｉ）生ウイルス中和アッセイを使用して決定して少なくとも約２５の力価であるかもしくはそれを上回るレベル；または
（ｉｉｉ）偽ウイルス中和アッセイもしくは生ウイルス中和アッセイにより決定して、回復期ヒトのコホートにおける抗コロナウイルス抗体の中央値レベルの少なくとも８０％であるレベルである、
実施形態１２６または１２７に記載の方法。

【０４０２】

実施形態１２９は、コロナウイルスが、２０１９－ｎＣｏＶである、実施形態１２２～１２８のいずれか１つに記載の方法である。

【０４０３】

実施形態１３０は、２０１９－ｎＣｏＶに感染した対象のコロナウイルス媒介性活性（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ媒介性活性）を低減する方法であって、治療有効量の実施形態１０５～１０７のいずれか１つに記載の組成物または実施形態１０８～１１５のいずれか１つに記載の免疫原性組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

【０４０４】

実施形態１３１は、治療有効量が、ＥＬＩＳＡアッセイにより測定して、対象において２よりも大きなｌｏｇ血清抗スパイク抗体価を生み出すのに十分である、実施形態１３０に記載の方法である。

【０４０５】

実施形態１３２は、治療有効量が、１５μｇ～３００μｇの実施形態１０５～１０７のいずれか１つに記載の組成物または実施形態１０８～１１５のいずれか１つに記載の免疫原性組成物である、実施形態１３１の方法である。

【０４０６】

実施形態１３３は、活性が、ウイルス力価、ウイルス拡散、感染、または細胞融合である、実施形態１３０～１３２のいずれか１つに記載の方法である。

【０４０７】

実施形態１３４は、ウイルス力価が、実施形態１０５～１０７のいずれか１つに記載の組成物または実施形態１０８～１１５のいずれか１つに記載の免疫原性組成物の投与後に減少する、実施形態１３３に記載の方法である。

【０４０８】

実施形態１３５は、ウイルス力価が２５％またはそれよりも大きく減少する、実施形態１３４に記載の方法である。

【０４０９】

実施形態１３６は、ウイルス力価が５０％またはそれよりも大きく減少する、実施形態１３５に記載の方法である。

【０４１０】

実施形態１３７は、ウイルス力価が７５％またはそれよりも大きく減少する、実施形態１３６に記載の方法である。

【０４１１】

実施形態１３８は、コロナウイルスが、投与後に検出不能である、実施形態１３７に記載の方法である。

【０４１２】

実施形態１３９は、投与が、コロナウイルスに曝露される前に生じる、実施形態１３０～１３８のいずれか１つに記載の方法である。

【０４１３】

実施形態１４０は、投与が、コロナウイルスに曝露される少なくとも１時間前に生じる、実施形態１３９に記載の方法である。

【０４１４】
実施形態１４１は、投与が、コロナウイルスに曝露される少なくとも１週間、１か月、または１年前に生じる、実施形態１４０に記載の方法である。
【０４１５】
実施形態１４２は、投与が、コロナウイルスに曝露された後に生じる、実施形態１３０～１３８のいずれか１つに記載の方法である。
【０４１６】
実施形態１４３は、投与が、コロナウイルスに曝露された少なくとも１５分後に生じる、実施形態１４２に記載の方法である。
【０４１７】
実施形態１４４は、投与が、コロナウイルスに曝露された少なくとも１時間後、１日後、１週間後に生じる、実施形態１４３に記載の方法である。
【０４１８】
実施形態１４５は、対象に、少なくとも１用量の核酸分子、ポリペプチド、ベクター、組成物、免疫原性組成物、および抗体が投与される、実施形態１３０～１４４のいずれか１つに記載の方法である。
【０４１９】
実施形態１４６は、対象に、少なくとも２用量が投与される、実施形態１４５に記載の方法である。
【０４２０】
実施形態１４７は、核酸分子、ポリペプチド、ベクター、組成物、または免疫原性組成物が、プライム、ブースト、またはプライム－ブーストとして対象に投与される、実施形態１４６に記載の方法である。
【０４２１】
実施形態１４８は、核酸分子、ポリペプチド、ベクター、組成物、免疫原性組成物、または抗体が、筋肉内に、静脈内に、皮内に、経皮的に、動脈内に、腹腔内に、病変内に、頭蓋内に、関節内に、前立腺内に、胸腔内に、気管内に、鼻腔内に、硝子体内に、膣内に、直腸内に、局部的に、腫瘍内に、腹腔に、皮下に、結膜下に、膀胱内に、粘膜に、心膜内に、臍内に、眼内に、経口的に、局部的に、局所的に、吸入により、注射により、注入により、持続注入により、標的細胞を直接浸す局所灌流により、カテーテルにより、洗浄により、経管栄養により、クリーム剤で、または脂質組成物で投与される、実施形態１３０～１４７のいずれか１つに記載の方法である。
【０４２２】
実施形態１４９は、対象が哺乳動物である、実施形態１３０～１４８のいずれか１つに記載の方法である。
【０４２３】
実施形態１５０は、哺乳動物がヒトである、実施形態１４９に記載の方法である。
【０４２４】
実施形態１５１は、ヒトが基礎疾患を有する、実施形態１５０に記載の方法である。
【０４２５】
実施形態１５２は、基礎疾患が、高血圧症、糖尿病、または心血管疾患である、実施形態１５１に記載の方法である。
【０４２６】
実施形態１５３は、対象における免疫応答を促進する、実施形態１３０～１５２のいずれか１つに記載の方法である。
【０４２７】
実施形態１５４は、免疫応答が体液性免疫応答である、実施形態１５３に記載の方法である。
【０４２８】
実施形態１５５は、体液性免疫応答が、ＩｇＧ応答である、実施形態１５４に記載の方

法である。
【０４２９】
実施形態１５６は、それを必要とする対象における２０１９－ｎＣｏＶ感染症などのコロナウイルス感染症の処置またはそのリスクの低減に使用するための組成物であって、治療有効量の実施形態１０５～１０７に記載のいずれか１つに記載の組成物または実施形態１０８～１１５のいずれか１つに記載の免疫原性組成物を含む組成物である。
【０４３０】
実施形態１５７は、２０１９－ｎＣｏＶに感染した対象のコロナウイルス媒介性活性（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ媒介性活性）の低減に使用するための組成物であって、治療有効量の実施形態１０５～１０７に記載のいずれか１つに記載の組成物または実施形態１０８～１１５のいずれか１つに記載の免疫原性組成物を含む組成物である。
【０４３１】
実施形態１５８は、それを必要とする対象におけるコロナウイルス（例えば、２０１９－ｎＣＯＶ）感染症を処置するかまたはそのリスクを低減するための免疫原性組成物を製造する方法であって、
（ａ）実施形態７７～８３のいずれか１つに記載の核酸分子、実施形態８４～８７のいずれか１つに記載のポリペプチド、実施形態８８～９５のいずれか１つに記載のベクター、実施形態１０５～１０７のいずれか１つに記載の組成物、および実施形態９６～１０１または１０２～１０４のいずれか１つに記載の抗体の少なくとも１つを、薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤と混合して、免疫原性組成物を形成するステップ；ならびに
（ｂ）免疫原性組成物を容器に入れるステップ
を含む方法である。
【０４３２】
実施形態１５９は、
（ａ）実施形態７７～８３のいずれか１つに記載の核酸分子、実施形態８４～８７のいずれか１つに記載のポリペプチド、実施形態８８～９５のいずれか１つに記載のベクター、実施形態１０５～１０７のいずれか１つに記載の組成物、実施形態１０８～１１５のいずれか１つに記載の免疫原性組成物、および実施形態９６～１０１または１０３～１０４のいずれか１つに記載の抗体の少なくとも１つを含む第１の容器；
（ｂ）その使用説明書；ならびに必要に応じて
（ｃ）薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤を含む第２の容器
を含むキットである。
【０４３３】
実施形態１６０は、第１の容器が、薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤をさらに含む、実施形態１５９に記載のキットである。
【０４３４】
実施形態１６１は、必要に応じて、アジュバントおよび／または免疫刺激剤を含む、実施形態１５９または１６０に記載のキットである。
【０４３５】
実施形態１６２は、核酸分子が、配列番号１４３のヌクレオチド配列を有する、実施形態８０～８２のいずれか１つに記載の単離された核酸分子である。
【０４３６】
実施形態１６３は、核酸分子が、配列番号２０４のヌクレオチド配列を有する、実施形態８０～８２のいずれか１つに記載の単離された核酸分子である。
【０４３７】
実施形態１６４は、核酸分子が、配列番号２０４のヌクレオチド１９～３８３７のヌクレオチド配列を有する、実施形態８０～８２のいずれか１つに記載の単離された核酸分子である。
【０４３８】

実施形態１６５は、ポリペプチドが、配列番号５１のアミノ酸配列を有する、実施形態８４～８６のいずれか１つに記載の単離されたポリペプチドである。

【０４３９】

実施形態１６６は、Ａｄ２６である、実施形態８８に記載のベクターである。

【０４４０】

実施形態１６７は、配列番号１４３、配列番号２０４のヌクレオチド１９～３８３７、もしくは配列番号２０４を含む核酸、配列番号５１のアミノ酸配列を含むポリペプチド、または配列番号１４３、配列番号２０４のヌクレオチド１９～３８３７、もしくは配列番号２０４を含む核酸を含むＡｄ２６ベクターで哺乳動物を免疫化することにより生成される、実施形態９３に記載の抗体である。

【０４４１】

実施形態１６８は、配列番号１４３、配列番号２０４のヌクレオチド１９～３８３７、もしくは配列番号２０４を含む核酸分子、配列番号５１のアミノ酸配列を含むポリペプチド、または配列番号１４３、配列番号２０４のヌクレオチド１９～３８３７、もしくは配列番号２０４を含む核酸を含むＡｄ２６ベクターを、対象に投与した後で中和抗２０１９－ｎＣｏＶ抗血清の産生を誘発するのに十分な量で対象に投与するステップを含む、実施形態１０２に記載の方法である。

【０４４２】

実施形態１６９は、実施形態１６２～１６４のいずれか１つに記載の核酸分子、実施形態１６５に記載のポリペプチド、実施形態１６６に記載のベクター、または実施形態１６７または１６８に記載の抗体を含む組成物である。

【０４４３】

実施形態１７０は、実施形態１６２～１６４のいずれか１つに記載の核酸分子、実施形態１６５に記載のポリペプチド、実施形態１６６に記載のベクター、または実施形態１６７もしくは１６８に記載の抗体を含む免疫原性組成物である。

【０４４４】

実施形態１７１は、それを必要とする対象におけるコロナウイルス感染症を処置するかまたはそのリスクを低減する方法であって、治療有効量の実施形態１６９に記載の組成物または実施形態１７０に記載の免疫原性組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

【０４４５】

実施形態１７２は、２０１９－ｎＣｏＶに感染した対象のコロナウイルス媒介性活性（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ媒介性活性）を低減する方法であって、治療有効量の実施形態１６９に記載の組成物または実施形態１７０に記載の免疫原性組成物を対象に投与するステップを含む方法である。

【０４４６】

実施形態１７３は、それを必要とする対象における２０１９－ｎＣｏＶ感染症などのコロナウイルス感染症の処置またはそのリスクの低減に使用するための組成物であって、治療有効量の実施形態１６９に記載の組成物または実施形態１７０に記載の免疫原性組成物を含む組成物である。

【０４４７】

実施形態１７４は、２０１９－ｎＣｏＶに感染した対象のコロナウイルス媒介性活性（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ媒介性活性）の低減に使用するための組成物であって、治療有効量の実施形態１６９に記載の組成物または実施形態１７０に記載の免疫原性組成物を含む組成物である。

【０４４８】

実施形態１７５は、それを必要とする対象における２０１９－ｎＣｏＶ感染症などのコロナウイルス感染症の処置またはそのリスクの低減のための医薬の調製における、実施形態１～２１のいずれか１つに記載の核酸分子、実施形態２２～３１のいずれか１つに記載のポリペプチド、実施形態３２～３８のいずれか１つに記載のベクター、実施形態３９～

４１のいずれか１つに記載の組成物、および実施形態４２または４３に記載の免疫原性組成物の少なくとも１つの使用である。

【０４４９】

実施形態１７６は、２０１９－ｎＣｏＶに感染した対象のコロナウイルス媒介性活性（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ媒介性活性）を低減するための医薬の調製における、実施形態１～２１のいずれか１つに記載の核酸分子、実施形態２２～３１のいずれか１つに記載のポリペプチド、実施形態３２～３８のいずれか１つに記載のベクター、実施形態３９～４１のいずれか１つに記載の組成物、および実施形態４２または４３に記載の免疫原性組成物の少なくとも１つの使用である。

【０４５０】

実施形態１７７は、それを必要とする対象における分子的に確認された中等症～重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９を予防するための医薬の調製における、実施形態１～２１のいずれか１つに記載の核酸分子、実施形態２２～３１のいずれか１つに記載のポリペプチド、実施形態３２～３８のいずれか１つに記載のベクター、実施形態３９～４１のいずれか１つに記載の組成物、および実施形態４２または４３に記載の免疫原性組成物の少なくとも１つの使用であって、組成物は、１用量レジメンにて１用量当たり５×１０^{10}ｖｐの用量で投与するためのものである、使用である。

【０４５１】

実施形態１７８は、ＣＯＶＩＤ－１９に対する対象のワクチン接種に使用するための、実施形態６３または６４に記載のワクチンである。

【０４５２】

実施形態１７９は、対象におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の感染および／または複製の低減に使用するための、実施形態６３もしくは６４に記載のワクチンまたは実施形態６２に記載の組成物である。

【０４５３】

実施形態１８０は、１用量または２用量ワクチンレジメンで、対象における分子的に確認された中等症～重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９を予防するために使用するための、実施形態６３または６４に記載のワクチンである。

【０４５４】

実施形態１８１は、１用量または２用量ワクチンレジメンで、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２血清陰性の成体対象における分子的に確認された中等症～重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９をプラセボと比較して予防するために使用するための、実施形態６３または６４に記載のワクチンである。

【０４５５】

実施形態１８２は、定量的逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）により評価して、対象において分子的に確認された中等症～重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９を有する参加者のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルス量を１用量または２用量ワクチンレジメンで低減するために使用するための、実施形態６３または６４に記載のワクチンである。

【０４５６】

実施形態１８３は、対象が、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２による感染症に罹患している疑いがあるかまたはそれを有すると診断されている、実施形態１７８～１８２のいずれか１つに記載の使用のためのワクチンである。

【０４５７】

実施形態１８４は、ワクチンが筋肉内投与用に製剤化されている、実施形態１７８～１８３のいずれか１つに記載の使用のためのワクチンである。

【０４５８】

実施形態１８５は、ワクチンが、約８週間の間隔をあけて投与される１用量当たり５×１０^{10}ｖｐまたは１×１０^{11}ｖｐの用量を含む２用量ワクチンレジメンで投与するためのものである、実施形態１８１～１８４のいずれか１つに記載の使用のためのワクチンである。

【０４５９】
実施形態１８６は、１用量当たり５×１０^{10}ｖｐまたは１×１０^{11}ｖｐの用量のワクチンを対象に単回投与することを含む、実施形態１７８～１８５のいずれか１つに記載の使用のためのワクチンである。
【０４６０】
実施形態１８７は、ＣＯＶＩＤ－１９に対する対象へのワクチン接種のための医薬の調製における、実施形態５１、５３、もしくは５４のいずれか１つに記載の核酸、実施形態５２に記載のタンパク質、および／または実施形態５５～６１のいずれか１つに記載のベクターの使用である。
【０４６１】
実施形態１８８は、対象におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の感染および／または複製を低減するための医薬の調製における、実施形態５１、５３、もしくは５４のいずれか１つに記載の核酸、実施形態５２に記載のタンパク質、および／または実施形態５５～６１のいずれか１つに記載のベクターの使用である。
【０４６２】
実施形態１８９は、対象における分子的に確認された中等症～重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９を１用量または２用量ワクチンレジメンで予防するための医薬の調製における、実施形態５１、５３、もしくは５４のいずれか１つに記載の核酸、実施形態５２に記載のタンパク質、および／または実施形態５５～６１のいずれか１つに記載のベクターの使用である。
【０４６３】
実施形態１９０は、１用量または２用量ワクチンレジメンで、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２血清陰性の成体対象における分子的に確認された中等症～重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９をプラセボと比較して予防するための医薬の調製における、実施形態５１、５３、もしくは５４のいずれか１つに記載の核酸、実施形態５２に記載のタンパク質、および／または実施形態５５～６１のいずれか１つに記載のベクターの使用である。
【０４６４】
実施形態１９１は、定量的逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）により評価して、対象において分子的に確認された中等症～重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９を有する参加者のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルス量を１用量または２用量ワクチンレジメンで低減するための医薬の調製における、実施形態５１、５３、もしくは５４のいずれか１つに記載の核酸、実施形態５２に記載のタンパク質、および／または実施形態５５～６１のいずれか１つに記載のベクターの使用である。
【０４６５】
実施形態１９２は、対象が、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２による感染症に罹患している疑いがあるかまたはそれを有すると診断されている、実施形態１８７～１９１のいずれか１つに記載の使用である。
【０４６６】
実施形態１９３は、ワクチンが筋肉内投与用に製剤化されている、実施形態１８７～１９２のいずれか１つに記載の使用である。
【０４６７】
実施形態１９４は、ワクチンが、約８週間の間隔をあけて投与される１用量当たり５×１０^{10}ｖｐまたは１×１０^{11}ｖｐの用量を含む２用量ワクチンレジメンで投与するためのものである、実施形態１８７～１９３のいずれか１つに記載の使用である。
【０４６８】
実施形態１９５は、１用量当たり５×１０^{10}ｖｐまたは１×１０^{11}ｖｐの用量のワクチンを対象に単回投与するための、実施形態１８７～１９４のいずれか１つに記載の使用である。
【０４６９】
実施形態１９６は、それを必要とする対象における２０１９－ｎＣｏＶ感染症などのコ

ロナウイルス感染症を処置するかまたはそのリスクを低減するための医薬の調製における、実施形態７７～８３のいずれか１つに記載の核酸分子、実施形態８４～８７のいずれか１つに記載のポリペプチド、実施形態８８～９５のいずれか１つに記載のベクター、または実施形態９６～１０１もしくは１０３～１０４のいずれか１つに記載の抗体の使用である。

【０４７０】

実施形態１９７は、２０１９－ｎＣｏＶに感染した対象のコロナウイルス媒介性活性（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ媒介性活性）を低減するための医薬の調製における、実施形態７７～８３のいずれか１つに記載の核酸分子、実施形態８４～８７のいずれか１つに記載のポリペプチド、実施形態８８～９５のいずれか１つに記載のベクター、または実施形態９９～１０１もしくは１０３～１０４のいずれか１つに記載の抗体の使用である。

【０４７１】

実施形態１９８は、それを必要とする対象における２０１９－ｎＣｏＶ感染症などのコロナウイルス感染症を処置するかまたはそのリスクを低減するための医薬の調製における、実施形態１６２～１６４のいずれか１つに記載の核酸分子、実施形態１６５に記載のポリペプチド、実施形態１６６に記載のベクター、または実施形態１６７もしくは１６８に記載の抗体の使用である。

【０４７２】

実施形態１９９は、２０１９－ｎＣｏＶに感染した対象のコロナウイルス媒介性活性（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ媒介性活性）を低減するための医薬の調製における、実施形態１６２～１６４のいずれか１つに記載の核酸分子、実施形態１６５に記載のポリペプチド、実施形態１６６に記載のベクター、または実施形態１６７もしくは１６８に記載の抗体の使用である。特定の実施形態は、実施形態内にある。

【０４７３】

本発明は、以下の実施例でさらに説明される。実施例は、いかなる点でも本発明を限定しない。実施例は本発明を明確にする役目を果たすに過ぎない。

【実施例】

【０４７４】

以下の実施例は、本発明を例示するためのものである。これらは、本発明を限定することを決して意味しない。

【０４７５】

［実施例１］

２０１９－ｎＣｏＶ　ＤＮＡワクチンの開発

２０１９－ｎＣｏＶ免疫原および２０１９－ｎＣｏＶ　ＤＮＡワクチンの設計

武漢コロナウイルス（２０１９－ｎＣｏＶ）スパイクタンパク質（配列番号２９）を使用して、合成的生産のために核酸分子（配列番号９３～１８１、１９０～１９５、および１９９～２０４）を設計した。核酸分子の一部の最適化は、導入遺伝子発現の強化のために実行された。ＤＮＡワクチンは、配列番号９３～１８１、１９０～１９５、および１９９～２０４の核酸分子を哺乳動物発現ベクターに組み込むことによって生成することができる（例えば、ｐｃＤＮＡ３．１＋；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、ＣＡ、ＵＳＡ）。欠失突然変異体は、シグナル配列、細胞質内領域、膜貫通領域、Ｓ２、またはそれらの組合せを欠如したものであり得る。

【０４７６】

［実施例２］

ヒト対象への核酸ワクチンの投与

組成物は、本方法に従って、２０１９－ｎＣｏＶへの曝露前または後にヒト対象に投与することができる。ヒト対象は、２０１９－ｎＣｏＶ感染が流行している地域（例えば、湖北省）に旅行したかもしくは旅行する予定であるか、または２０１９－ｎＣｏＶ感染と一致する症状を呈すると特定された個体などの、感染の高いリスクにあると特定されたヒト対象であってよい。

【０４７７】
例えば、２０１９－ｎＣｏＶ感染のリスクがあると特定された基礎疾患（例えば、高血圧、糖尿病、または心臓血管疾患）を有するヒトに、２０１９－ｎＣｏＶ核酸（例えば、配列番号９３～１８１、１９０～１９５、および１９９～２０４のいずれか１つ）をコードする核酸分子を含有する核酸ワクチン（例えば、ＤＮＡワクチンまたはＲＮＡワクチン）を、例えばアデノウイルスベクター中で、１０μｇから１０ｍｇの間の用量で投与することができる。好ましくは、核酸ワクチン（例えば、ＤＮＡワクチンまたはＲＮＡワクチン）は、配列番号１３６、１９３、１４２、１４８、１９５、１２１、１２２、１２３、１２９、および／または１３０を含有していてもよい。次いで患者は、２０１９－ｎＣｏＶ感染の症状の呈示、症状の消散、および／または２０１９－ｎＣｏＶ抗体の産生に関してモニターしてもよい。必要に応じて、核酸ワクチンの第２の用量または追加の用量を投与してもよい。

【０４７８】
［実施例３］
免疫原性２０１９－ｎＣｏＶポリペプチドのヒト対象への投与
組成物は、本方法に従って、２０１９－ｎＣｏＶへの曝露前または後にヒト対象に投与することができる。ヒト対象は、２０１９－ｎＣｏＶ感染が流行している地域（例えば、湖北省）に旅行したかもしくは旅行する予定であるか、または２０１９－ｎＣｏＶ感染と一致する症状を呈すると特定された個体などの、感染の高いリスクにあると特定されたヒト対象であってよい。

【０４７９】
例えば、２０１９－ｎＣｏＶ感染のリスクがあると特定された基礎疾患（例えば、高血圧、糖尿病、または心臓血管疾患）を有するヒトに、２０１９－ｎＣｏＶ免疫原（例えば、配列番号１～８４のいずれか１つ）を、例えば、アデノウイルスベクター中で、１０μｇから１０ｍｇの間の用量で投与することができる。好ましくは、免疫原は、配列番号４４、５０、５６、２９、３０、３１、３７、または３８によってコードされた１つまたは複数のポリペプチドである。次いで患者は、２０１９－ｎＣｏＶ感染の症状の呈示、症状の消散、および／または２０１９－ｎＣｏＶ抗体の産生に関してモニターしてもよい。必要に応じて、免疫原の第２の用量または追加の用量を投与してもよい。

【０４８０】
［実施例４］
２０１９－ｎＣｏＶ感染のリスクがあるヒト対象への抗２０１９－ｎＣｏＶ抗体の投与
２０１９－ｎＣｏＶ感染のリスクがあると特定されたヒト対象（例えば、２０１９－ｎＣｏＶ感染が流行している地域（例えば、湖北省）への旅行のために、または対象が基礎疾患（例えば、高血圧、糖尿病、または心臓血管疾患）を有するヒトであるために）に、予防的療法として、スパイク（配列番号２９）ポリペプチド内のエピトープに結合する抗２０１９－ｎＣｏＶ抗体（例えば、抗体は、配列番号１～８４のいずれか１つのポリペプチドに対して生成されたものでもよい）を１～１，０００ｍｇの間の用量で投与することができる。予防的療法として、対象に、２０１９－ｎＣｏＶへの曝露前または後に抗２０１９－ｎＣｏＶ抗体を投与することができる。次いで患者は、２０１９－ｎＣｏＶ感染の症状の呈示または症状の消散に関してモニターしてもよい。必要に応じて、抗２０１９－ｎＣｏＶ抗体の第２の用量または追加の用量を投与してもよい。

【０４８１】
［実施例５］
２０１９－ｎＣｏＶ感染の症状を呈するヒト対象への抗２０１９－ｎＣｏＶ抗体の投与
２０１９－ｎＣｏＶの症状を呈すると特定されたヒト対象に、スパイク（配列番号２９）ポリペプチド内のエピトープに結合する抗２０１９－ｎＣｏＶ抗体（例えば、抗体は、配列番号１～８４のいずれか１つのポリペプチドに対して生成されたものでもよい）を１～１，０００ｍｇの間の用量で投与することができる。対象（例えば、ヒト、特に基礎疾患（例えば、高血圧、糖尿病、または心臓血管疾患）を有するヒト）は、最近、２０１９

－ｎＣｏＶ感染が流行している地域（例えば、湖北省）に旅行したものであってもよい。医療従事者による２０１９－ｎＣｏＶ感染の診断の後、所定用量の抗２０１９－ｎＣｏＶ抗体を対象に投与してもよい。次いで患者は、症状の消散に関してモニターしてもよい。必要に応じて、抗２０１９－ｎＣｏＶ抗体の第２の用量または追加の用量を投与してもよい。

【０４８２】

［実施例６］

２０１９－ｎＣｏＶ　ＤＮＡワクチンによってコードされた免疫原の、ポリクローナル抗ＳＡＲＳ抗血清との反応性

２０１９－ｎＣｏＶ　ＤＮＡワクチンによってコードされた免疫原の抗ＳＡＲＳ抗体との反応性を評価するために、細胞を、２０１９－ｎＣｏＶ免疫原をコードするＳＳ－スパイク（配列番号１２１）、ＳＳ－ＳｄＣＴ（配列番号１２２）、ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ（配列番号１２３）、およびＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン（配列番号１９５）を含有するプラスミド（それぞれ配列番号２９、３０、３１、および５６）でトランスフェクトした。細胞溶解産物および上清をトランスフェクトされた細胞から収集し、還元および変性条件下でゲルに泳動した。その後、試料を、モルモットから単離したポリクローナル抗ＳＡＲＳ抗血清（ＢＥＩ　Ｒｅｓｏｕｒｃｅｓ、ＮＩＡＩＤ、ＮＩＨ；カタログ番号：ＮＲ－１０３６１）を使用したウエスタンブロットによって分析した。試験したすべてのＤＮＡワクチンは、抗血清中に存在する抗ＳＡＲＳ抗体と交差反応するタンパク質を産生することが可能であった（図２）。スパイクタンパク質は、およそ２００ｋＤａのサイズを有するバンドとして出現する。

【０４８３】

［実施例７］

２０１９－ｎＣｏＶ　ＤＮＡワクチンは抗スパイク抗体応答の中和を惹起できる

２０１９－ｎＣｏＶ免疫原をコードするＳＳ－スパイク（配列番号１２１）、ＳＳ－ＳｄＣＴ（配列番号１２２）、ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ（配列番号１２３）、ＳＳ－Ｓ１－フォールドン（配列番号１２９）、ＳＳ－ＲＢＤ－フォールドン（配列番号１３０）、およびＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン（配列番号１９５）を含有するＤＮＡワクチン（それぞれ配列番号２９、３０、３１、３７、３８、および５６）を、中和抗体応答を生じるそれらの能力に関して試験した。雌Ｂａｌｂ／ｃマウス（８～１２週齢）に、５０μｇのＤＮＡワクチンの１つを筋肉内（ＩＭ）注射し、４週間後に第２の用量をＩＭ注射した。ワクチン接種から４週後、処置したマウスからの血清試料を収集し、ＥＬＩＳＡによって全長スパイク（配列番号１）（図３）およびＳ．Ｅｃｔｏ－ＰＰ（配列番号１９）（図４）への結合に関して分析した。試験したＤＮＡワクチンのすべてが、処置したマウスにおいて全長スパイク（配列番号１）およびＳ．Ｅｃｔｏ－ＰＰ（配列番号１９）を認識する抗体応答を惹起することが可能であった。ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドンをコードするＤＮＡワクチンは、試験した他のＤＮＡワクチンと比較して、優れた抗体応答を生じた。

【０４８４】

ワクチン接種後４週間のマウスからの血清を、中和活性に関してさらに分析した。ｉｎｖｉｔｒｏにおけるルシフェラーゼベースの偽ウイルス中和アッセイを使用して中和活性を評価した。中和アッセイは、２０１９－ｎＣｏＶスパイクタンパク質（配列番号１）で偽タイプ化したレトロウイルスコアを使用した。偽ウイルス侵入を維持するために、２０１９－ｎＣｏＶの受容体であるヒトアンジオテンシン変換酵素２（ＡＣＥ２）で形質導入した２９３細胞における感染力を試験した。ＤＮＡワクチンＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ、ＳＳ－ＲＢＤ－フォールドン、およびＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドンで処置したマウスにおいて、実質的な中和能力が観察された。ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドンＤＮＡワクチンで処置したマウスは、最もロバストな中和能力を示した（図５）。

【０４８５】

［実施例８］
２０１９－ｎＣｏＶ　ＤＮＡワクチンはコロナウイルス感染に対する保護免疫応答を惹起できる
　急速に拡大するＣＯＶＩＤ－１９パンデミックは、安全で有効かつ展開可能なワクチンの開発を深刻な国際的優先事項とした（１～８）。しかしながら、現在のところ２０１９－ｎＣｏＶに対する免疫と保護の相関の理解は、極めて限定的である。このような知見は、２０１９－ｎＣｏＶワクチンに加えて他の免疫治療的介入の開発のために必須である。この研究において、２０１９－ｎＣｏＶスパイク（Ｓ）タンパク質の様々な形態を発現する一連のプロトタイプＤＮＡワクチンを構築し、アカゲザルにおいて、２０１９－ｎＣｏＶ負荷に対するそれらの免疫原性および保護的有効性を評価した。
【０４８６】
方法
動物および研究の設計。
　３５匹の異系交配されたインド起源の成体雄および雌アカゲザル（Ｍａｃａｃａ　ｍｕｌａｔｔａ）、６～１２歳を群に無作為に割り当てた。すべての動物をＢｉｏｑｕａｌ，Ｉｎｃ．（Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、ＭＤ）に収容した。動物は、ＳＳ－スパイク（Ｎ＝４）、ＳＳ－ＳｄＣＴ（Ｎ＝４）、ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ（Ｎ＝４）、Ｓ１（Ｎ＝４）、ＳＳ－ＲＢＤ－フォールドン（Ｎ＝４）、ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン（Ｎ＝５）、およびシャム対照（Ｎ＝１０）を発現するＤＮＡワクチンを受けた。動物は、０週目および３週目に５ｍｇのＤＮＡワクチンを受けた。６週目に、すべての動物を、１．２×１０^{8}ＶＰ（１．１×１０^{4}）ＰＦＵの２０１９－ｎＣｏＶで負荷した。ウイルスを、鼻腔内（ＩＮ）経路によって１ｍｌ（各鼻孔に０．５ｍｌ）および気管内（ＩＴ）経路によって１ｍｌとして投与した。すべての免疫学的およびウイルス学的アッセイを盲検で実行した。すべての動物実験を、すべての関連する地域、州、および連邦の規制に従って実行し、Ｂｉｏｑｕａｌの施設内動物管理使用委員会（ＩＡＣＵＣ）によって承認した。
【０４８７】
　ヒト試料。マサチューセッツ州ボストンからの２０１９－ｎＣｏＶ回復期個体からの２７人の非特定化されたヒト血清試料を、陰性の鼻スワブで回復が記述された後の少なくとも７日に個体から得た。すべてのヒト研究を、すべての関連する地域、州、および連邦の規制に従って実行し、Ｐａｒｔｎｅｒｓの施設内倫理審査委員会（ＩＲＢ）によって承認された。
【０４８８】
　ＤＮＡワクチン。２０１９－ｎＣｏＶスパイク（Ｓ）タンパク質配列（Ｗｕｈａｎ／ＷＩＶ０４／２０１９）に基づいてＤＮＡワクチンを設計した。配列のコドンを最適化し、商業的に合成した（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、ＮＪ、ＵＳＡ）。スパイクの６つのバージョン（全長ＳＳ－スパイク；細胞質内ドメインが欠失したＳＳ－ＳｄＣＴ；可溶性エクトドメインを有するＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ；フォールドン三量体化タグを有するＳ１ドメインを有するＳＳ－Ｓ１－フォールドン；フォールドン三量体化タグを有する受容体結合ドメインを有するＳＳ－ＲＢＤ－フォールドン；フューリン切断部位の欠失、ＰＰ安定化突然変異、およびフォールドン三量体化タグを有する可溶性エクトドメインを有するＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン）を産生した。合成遺伝子を哺乳動物発現プラスミドｐｃＤＮＡ３．１＋（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、ＣＡ、ＵＳＡ）にクローニングし、内毒素非含有のｇｉｇａｐｒｅｐキット（Ｍａｃｈｅｒｙ－Ｎａｇｅｌ、Ｄｕｒｅｎ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を用いて拡大増殖した。すべてのＤＮＡワクチン配列をサンガーＤＮＡ配列決定によって確認した。
【０４８９】
　ウエスタンブロット。７０～８０％のコンフルエンシーで２９３Ｔ細胞を播種したＴ－２５フラスコを、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して２０１９－ｎＣｏＶ　ＤＮＡ発現プラスミド（１０μｇのＤＮＡ／構築物）で一時的にトランスフェクトし、上清および細胞溶解産物をトランスフェクション後の４８時間

に回収し、還元試料緩衝液（Ｐｉｅｒｃｅ）と別々に混合し、９５℃で５分間加熱し、プレキャストした４～１５％ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）に泳動した。タンパク質を、ｉＢｌｏｔドライブロッティングシステム（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用してポリビニリデンジフルオリド（ＰＶＤＦ）膜に移し、膜のブロッキングを、０．２％Ｔｗｅｅｎ２０（Ｓｉｇｍａ）（Ｖ／Ｖ）および５％（Ｗ／Ｖ）無脂肪乳粉末を含有するダルベッコリン酸緩衝生理食塩水Ｔ（Ｄ－ＰＢＳＴ）中で４℃で一晩実行した。一晩ブロッキングした後、ＰＶＤＦ膜を、１時間、（交差反応性）ポリクローナルモルモット抗ＳＡＲＳコロナウイルス抗血清（ＢＥＩ　Ｒｅｓｏｕｒｃｅｓ）の１：１０，０００希釈物を含有する３％乳汁ＤＰＢＳ－Ｔ中で１時間インキュベートした。このインキュベーションの後、ＰＶＤＦ膜を５％乳汁ＤＰＢＳ－Ｔで５回洗浄し、その後、３％乳汁ＤＰＢＳ－Ｔ中の１：３０，０００抗モルモットホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）コンジュゲート二次抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈ）と共にインキュベートした。最後に、ＰＶＤＦ膜を、５％乳汁ＤＰＢＳ－Ｔで再び５回洗浄し、Ａｍｅｒｓｈａｍ　ＥＣＬ　Ｐｌｕｓウエスタンブロッティング検出システム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して発色させた。

【０４９０】

ウイルスＲＮＡアッセイ。本質的にこれまでに記載されたようにして（１６）、ＲＴ－ＰＣＲアッセイを利用して、ウイルス量をモニターした。簡単に言えば、ＱＩＡｃｕｂｅＨＴ（Ｑｉａｇｅｎ、Ｇｅｒｍａｎｙ）およびＣａｄｏｒ病原体ＨＴキットを使用して、気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬ）上清および鼻スワブからＲＮＡを抽出した。ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ　ＶＩＬＯ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用してＲＮＡを逆転写し、ＱｕａｎｔＳｔｕｄｉｏ６および７ＦｌｅｘリアルタイムＰＣＲシステム（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を製造元の仕様書に従って使用して２連で泳動した。ウイルス量を、１ｍＬ当たりまたはスワブ１つ当たりのウイルスＲＮＡコピーとして計算し、アッセイ感度は５０コピーであった。増幅のための標的は、２０１９－ｎＣｏＶ　Ｎ（ヌクレオカプシド）遺伝子であった。標的のためにプライマーおよびプローブは以下の通りである：

２０１９－ｎＣｏＶ＿Ｎ１－Ｆ：５’－ＧＡＣＣＣＣＡＡＡＡＴＣＡＧＣＧＡＡＡＴ－３’（配列番号１９６）

２０１９－ｎＣｏＶ＿Ｎ１－Ｒ：５’－ＴＣＴＧＧＴＴＡＣＴＧＣＣＡＧＴＴＧＡＡＴＣＴＧ－３’（配列番号１９７）

２０１９－ｎＣｏＶ＿Ｎ１－Ｐ：５’－ＦＡＭ－ＡＣＣＣＣＧＣＡＴＴＡＣＧＴＴＴＧＧＴＧＧＡＣＣ－ＢＨＱ１～３’（配列番号１９８）。

【０４９１】

サブゲノムｍＲＮＡアッセイ。２０１９－ｎＣｏＶ　Ｅ遺伝子のサブゲノムｍＲＮＡ（ｓｇｍＲＮＡ）を、これまでに記載されたものと類似したアプローチ（１７）を使用して、ＲＴ－ＰＣＲによって評価した。標準曲線を作成するために、２０１９－ｎＣｏＶ　Ｅ遺伝子のｓｇｍＲＮＡを、ｐｃＤＮＡ３．１発現プラスミドにクローニングした；このインサートを、ＡｍｐｌｉＣａｐ－Ｍａｘ　Ｔ７高収量メッセージメーカーキット（Ｃｅｌｌｓｃｒｉｐｔ）を使用して転写して、標準のためのＲＮＡを得た。ＲＴ－ＰＣＲの前に、負荷された動物または標準から収集した試料を、ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ　ＩＩＩ　ＶＩＬＯ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を製造元の使用説明書に従って使用して逆転写した。Ｔａｑｍａｎカスタム遺伝子発現アッセイ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を、Ｅ遺伝子のｓｇｍＲＮＡを標的化する配列（１７）を使用して設計した。反応を、ＱｕａｎｔＳｔｕｄｉｏ６および７ＦｌｅｘリアルタイムＰＣＲシステム（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）で製造元の仕様書に従って行った。標準曲線を使用して、ｓｇｍＲＮＡを、１ｍｌ当たりまたはスワブ１つ当たりのコピーで計算した；定量的なアッセイ感度は、１ｍｌ当たりまたはスワブ１つ当たり５０コピーであった。

【０４９２】

ＰＦＵアッセイ。プラークアッセイのために、Ｖｅｒｏ　Ｅ６細胞のコンフルエントな単分子層を、６－ウェルプレート中で調製した。負荷された動物から収集した示された試

料を連続的に希釈し、ウェルに添加し、３７℃で１時間インキュベートした。インキュベーションの後、１．５ｍＬの０．５％メチルセルロース培地を各ウェルに添加し、プレートを、３７℃で、５％ＣＯ２と共に２日間インキュベートした。プレートを、ウェル当たり４００μＬの氷冷メタノールを添加し、－２０℃で３０分間インキュベートすることすることによって固定した。固定の後、メタノールを捨て、細胞単層を６００μＬ／ウェルの０．２３％クリスタルバイオレットで３０分間染色した。染色の後、クリスタルバイオレットを捨て、プレートを６００μＬの水で１回洗浄してプラークを可視化し計数した。

【０４９３】

ＥＬＩＳＡ。簡単に言えば、９６－ウェルプレートを、１×ＤＰＢＳ中の１μｇ／ｍＬの２０１９－ｎＣｏＶスパイク（Ｓ）タンパク質（Ｓｉｎｏ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ）でコーティングし、４℃で一晩インキュベートした。インキュベーションの後、プレートを洗浄緩衝液（１×ＤＰＢＳ中の０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０）で１回洗浄し、３５０μＬ／ウェルのカゼインブロックで室温で２～３時間ブロッキングした。インキュベーションの後、ブロック溶液を捨て、プレートをドライブロットした。カゼインブロックで希釈した熱不活性化血清の連続希釈物をウェルに添加し、プレートを室温で１時間インキュベートし、その後、さらに3回洗浄し、続いて、暗所で、室温で、１：１０００希釈した抗マカクＩｇＧ ＨＲＰ（ＮＩＨ ＮＨＰ Ｒｅａｇｅｎｔ Ｐｒｏｇｒａｍ）と共に1時間インキュベートした。次いでプレートを洗浄緩衝液で3回洗浄し、１００μＬのＳＥＲＡＣＡＲＥ（登録商標）ＫＰＬ ＴＭＢ ＳｕｒｅＢｌｕｅ Ｓｔａｒｔ溶液を各ウェルに添加した；ウェル当たり１００μＬのＳＥＲＡＣＡＲＥ（登録商標）ＫＰＬ ＴＭＢ Ｓｔｏｐ溶液の添加によって、プレートの発色を中断した。４５０ｎｍでの吸光度を、ＶＥＲＳＡＭＡＸ（商標）またはオメガ（登録商標）マイクロプレートリーダーを使用して記録した。ＥＬＩＳＡのエンドポイントの力価を、吸光度＞０．２をもたらす最大の相互の血清希釈率と定義した。Ｌｏｇ１０のエンドポイントの力価が報告される。

【０４９４】

偽ウイルス中和アッセイ。ルシフェラーゼレポーター遺伝子を発現する２０１９－ｎＣｏＶ偽ウイルスを、上述したのと類似したアプローチで生成した（９）。簡単に言えば、パッケージング構築物ｐｓＰＡＸ２（ＡＩＤＳ Ｒｅｓｏｕｒｃｅ ａｎｄ Ｒｅａｇｅｎｔ Ｐｒｏｇｒａｍ）、ルシフェラーゼレポータープラスミドｐＬｅｎｔｉ－ＣＭＶ Ｐｕｒｏ－Ｌｕｃ（Ａｄｄｇｅｎｅ）、およびｐｃＤＮＡ３．１－ＳＡＲＳ ＣｏＶ－２ ＳΔＣＴを発現するスパイクタンパク質を、リン酸カルシウムを用いてＨＥＫ２９３Ｔ細胞に一緒にトランスフェクトした。トランスフェクション後の４８時間に、偽タイプウイルスを含有する上清を収集した；偽タイプウイルスを、０．４５μｍフィルターを用いた濾過によって精製した。ワクチン接種された動物からの抗血清の中和活性を決定するために、ＨＥＫ２９３Ｔ－ｈＡＣＥ２細胞を、９６ウェルの組織培養プレートに、細胞1.75×10^{4}個／ウェルの密度で一晩播種した。熱不活性化血清試料の２倍連続希釈物を調製し、５０μＬの偽ウイルスと混合した。混合物を３７℃で１時間インキュベートし、その後、ＨＥＫ２９３Ｔ－ｈＡＣＥ２細胞に添加した。感染後の４８時間に、ＳＴＥＡＤＹ－ＧＬＯ（登録商標）ルシフェラーゼアッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ）で製造元の使用説明書に従って細胞を溶解させた。２０１９－ｎＣｏＶ中和力価を、ウイルス対照ウェルの平均と比べてＲＬＵの５０％の低減が観察された試料希釈率と定義した。

【０４９５】

生ウイルス中和アッセイ。シアトル・ワシントン単離株に基づく全長２０１９－ｎＣｏＶウイルスを、ルシフェラーゼおよびＧＦＰを発現するように設計し、逆遺伝学によって、これまでに記載されたようにして回収した（１３、１４）。ウイルスをＶｅｒｏ Ｅ６ＵＳＡＭＲＩＤ細胞で力価測定して、細胞のみの対照バックグラウンドの少なくとも１０倍の相対発光量（ＲＬＵ）シグナルを得た。Ｖｅｒｏ Ｅ６ＵＳＡＭＲＩＤ細胞を、前の日に、透明な底と黒色の壁を有する９６ウェルプレートで、ウェル当たり細胞２０，０００個で平板培養した。中和抗体血清試料を、１：４０の開始時の希釈率で試験し、８つの希釈スポットまで連続的に４倍希釈した。抗体－ウイルス複合体を、３７℃で、５％ＣＯ

２と共に１時間インキュベートした。インキュベーションの後、成長培地を除去し、ウイルス－抗体希釈複合体を２連で細胞に添加した。各中和アッセイプレートには、ウイルスのみ対照および細胞のみの対照が含まれていた。感染の後、プレートを、３７℃で、５％ＣＯ２と共に４８時間インキュベートした。４８時間のインキュベーションの後、細胞を溶解させ、ルシフェラーゼ活性を、Ｎａｎｏ－Ｇｌｏルシフェラーゼアッセイシステムによって製造元の仕様書に従って測定した（Ｐｒｏｍｅｇａ）。２０１９－ｎＣｏＶ中和力価を、ウイルス対照ウェルの平均と比べてＲＬＵの５０％の低減が観察された試料希釈率と定義した。

【０４９６】

システム血清学。血清試料の機能的な分析のために、ビーズベースのアッセイを使用して、抗体依存性細胞ファゴサイトーシス（ＡＤＣＰ）、抗体依存性好中球ファゴサイトーシス（ＡＤＮＰ）および抗体依存性補体沈着（ＡＤＣＤ）をこれまでに記載されたようにして定量化した（１５）。タンパク質抗原は、受容体結合ドメイン（ＲＢＤ；Ａａｒｏｎ Ｓｃｈｍｉｄｔ、Ｒａｇｏｎ ＩｎｓｔｉｔｕｔｅおよびＭａｓｓＣＰＲより無償提供）、融合前安定化スパイクエクトドメイン（Ｓ；Ｂｉｎｇ Ｃｈｅｎ，Ｃｈｉｌｄｒｅｎ’ｓ ＨｏｓｐｉｔａｌおよびＭａｓｓＣＰＲより無償提供）、およびヌクレオカプシド（Ｎ；Ｓｉｎｏ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ）を含んでいた。蛍光性ストレプトアビジンビーズ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）をビオチン化したＲＢＤ、ＮおよびＳにカップリングし、希釈した血清（ＡＤＣＰおよびＡＤＮＰ １：１００、ＡＤＣＤ １：１０）と共にインキュベートした。ＡＤＣＰの場合、ＴＨＰを免疫複合体に添加し、３７℃で１６時間インキュベートした。ＡＤＮＰの場合、アンモニウム－塩化カリウム（ＡＣＫ）溶解緩衝液を使用して全血から一次好中球を単離した。３７℃で１時間のインキュベーションの後、好中球を抗ＣＤ６６ｂ ＰａｃＢｌｕｅ検出抗体（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）で染色した。ＡＤＣＤアッセイのために、凍結乾燥したモルモット補体（Ｃｅｄａｒｌａｎｅ）を製造元の使用説明書に従って再懸濁し、カルシウムおよびマグネシウム（Ｂｏｓｔｏｎ ＢｉｏＰｒｏｄｕｃｔｓ）を含むゼラチンベロナール緩衝液で希釈した。インキュベーション後、モルモット補体Ｃ３に対するフルオレセインコンジュゲートヤギＩｇＧ画分（Ｍｐｂｉｏ）でＣ３を検出した。抗体依存性ＮＫ細胞活性の検出のために、ＥＬＩＳＡベースのアプローチを使用した。簡単に言えば、プレートを３ｕｇ／ｍＬの抗原（上述した通り）でコーティングし、１：５０希釈で試料を添加し、３７℃で２時間インキュベートした。前の日にＲｏｓｅｔｔｅＳｅｐ（Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）により健康な軟膜からＮＫ細胞を単離し、１ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ）中で一晩静置した。ＮＫ細胞を、ＣＤ１０７ａ ＰＥ－Ｃｙ５（ＢＤ）、ゴルジストップ（ＢＤ）およびブレフェルジンＡ（ＢＦＡ、Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ）を含有する染色カクテルと共に、免疫複合体と３７℃で５時間インキュベートした。ＮＫ細胞のインキュベーション後、細胞を固定し（Ｐｅｒｍ Ａ、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈ）、表面マーカーに関して、固定しながら抗ＣＤ１６ＡＰＣ－Ｃｙ７（ＢＤ）、抗ＣＤ５６ＰＥ－Ｃｙ７（ＢＤ）および抗ＣＤ３ＰａｃＢｌｕｅ（ＢＤ）で染色した。Ｐｅｒｍ Ｂ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈ）で透過化した後、細胞内染色のために抗ＩＦＮ－ガンマＦＩＴＣ（ＢＤ）および抗ＭＩＰ－１βＰＥ（ＢＤ）抗体を使用した。すべてのアッセイを、ｉＱｕｅ（Ｉｎｔｅｌｌｉｃｙｔ）およびＳ－Ｌａｂロボット（ＰＡＡ）を用いるフローサイトメトリーを介して獲得した。ＡＤＣＰのために、事象をビーズ陽性細胞においてゲーティングし、一方で好中球をＣＤ６６ｂ陽性と定義し、続いてビーズ陽性好中球でゲーティングした。ＡＤＣＰおよびＡＤＮＰのファゴサイトーシススコアを、（ビーズ陽性細胞のパーセンテージ）×（ビーズ陽性細胞のＭＦＩ）を１００００で割った値として計算した。ＡＤＣＤを、Ｃ３沈着のＭＦＩとして報告した。ＮＫ細胞を、ＣＤ３－、ＣＤ１６＋およびＣＤ５６＋と定義した。データを、ＣＤ１０７ａ、ＭＩＰ－１－アルファまたはＩＦＮ－ガンマについて陽性の細胞のパーセンテージとして報告した。

【０４９７】

ピアソンおよびスピアマン相関の両方を使用して、抗体特徴とＢＡＬにおけるｌｏｇ１

$_0$ピーク　ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬとの間の線形および非線形関係をそれぞれ調査した。ベンジャミニ－ホッホベルグの補正を使用して、多重比較のために補正した。加えて、ピアソン相関を使用して、すべての抗体特徴のペアワイズ相関を試験した。保護と相関する最適な特徴を定義するために、部分最小二乗回帰（ＰＬＳＲ）およびランダムフォレスト回帰（ＲＦＲ）を、再帰的な特徴の消去を使用して実行した。まずすべてのアイソタイプ／サブクラスおよびＦｃ－受容体結合データを$\log_{10}$変換した。Ｒパッケージ「ｒｏｐｌｓ」を使用してＰＣＡを構築して、多変量プロファイルを比較した。Ｒパッケージ「ｒｏｐｌｓ」を使用してＰＬＳＲを実行し、Ｒパッケージ「ｒａｎｄｏｍＦｏｒｅｓｔ」を使用してランダムフォレストを実行した。各モデル（すなわち特徴の各セット）を、５分割の交差確認の１０回繰り返しでフィッティングした。特徴消去の各ステップにおいて、ＰＬＳＲの場合、最も低い平均（倍数にわたり）の射影の変数重要度（ｖａｒｉａｂｌｅ　ｉｍｐｏｒｔａｎｃｅ　ｏｆ　ｐｒｏｊｅｃｔｉｏｎ；ＶＩＰ）スコアを有する特徴、およびＲＦＲの場合、ノード不純物として測定された最も低い平均（倍数にわたり）重要度を有する特徴を除去した。２つの特徴のあらゆる可能な組合せを試験した。

【０４９８】

ＥＬＩＳＰＯＴアッセイ。ＥＬＩＳＰＯＴプレートを、ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎからのマウス抗ヒトＩＦＮ－γモノクローナル抗体で、５μｇ／ウェルの濃度で４℃で一晩コーティングした。プレートを０．２５％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＤＰＢＳで洗浄し、Ｒ１０培地（１１％ＦＢＳおよび１．１％ペニシリン－ストレプトマイシンを含むＲＰＭＩ）で３７℃で１時間ブロッキングした。スパイク１およびスパイク２ペプチドプールを２μｇ／ウェルの濃度で調製し、２００，０００細胞個／ウェルを添加した。ペプチドおよび細胞を３７℃で１８～２４時間インキュベートした。このインキュベーション後のすべての工程を室温で実行した。プレートをコールター緩衝液で洗浄し、Ｕ－Ｃｙｔｅｃｈからのウサギポリクローナル抗ヒトＩＦＮ－γビオチン（１μｇ／ｍＬ）と共に２時間インキュベートした。プレートを２回洗浄し、Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙからのストレプトアビジン－アルカリホスファターゼ抗体（１μｇ／ｍＬ）と共に２時間インキュベートする。最後の洗浄の後、ニトロブルーテトラゾリウムクロリド／５－ブロモ－４－クロロ３－インドリルリン酸ｐ－トルイジン（ｔｏｌｕｄｉｎｅ）塩（ＮＢＴ／ＢＣＩＰ色素原）基質溶液を７分にわたり添加した。色素原を捨て、プレートを水で洗浄し、暗い場所で２４時間乾燥させた。プレートをスキャンし、Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｌｉｍｉｔｅｄのイムノスポットアナライザーで計数した。

【０４９９】

細胞内サイトカイン染色アッセイ。10^6個のＰＢＭＣ／ウェルを、ＣＤ４９ｄモノクローナル抗体（１μｇ／ｍＬ）が補充された１００μＬのＲ１０培地に再懸濁した。各試料を、ｍｏｃｋ（１００μＬのＲ１０、加えて、０．５％ＤＭＳＯ；バックグラウンド対照）、スパイク１およびスパイク２ペプチドプール（２μｇ／ｍＬ）、または１０ｐｇ／ｍＬのホルボールミリステートアセテート（ＰＭＡ）および１μｇ／ｍＬのイオノマイシン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）（１００μＬ；陽性対照）を用いて評価し、３７℃で１時間インキュベートした。インキュベーションの後、５０μＬのＲ１０中の０．２５μＬのＧｏｌｇｉＳｔｏｐおよび０．２５μＬのＧｏｌｇｉＰｌｕｇを各ウェルに添加し、３７℃で８時間インキュベートし、次いで４℃で一晩保持した。次の日、細胞をＤＰＢＳで２回洗浄し、近赤外ライブ／デッド色素（Ｎｅａｒ　ＩＲ　ｌｉｖｅ／ｄｅａｄ　ｄｙｅ）で１０分間染色し、次いで、ＣＤ２７９（クローンＥＨ１２．１、ＢＢ７００）、ＣＤ３８（クローンＯＫＴ１０、ＰＥ）、ＣＤ２８（クローン２８．２、ＰＥ　ＣＹ５）、ＣＤ４（クローンＬ２００、ＢＶ５１０）、ＣＤ４５（クローンＤ０５８～１２８３、ＢＵＶ６１５）、ＣＤ９５（クローンＤＸ２、ＢＵＶ７３７）、ＣＤ８（クローンＳＫ１、ＢＵＶ８０５）に対する予め決定された力価のｍＡｂで３０分間染色した。次いで細胞を２％ＦＢＳ／ＤＰＢＳ緩衝液で２回洗浄し、２００μＬのＢＤ　ＣｙｔｏＦｉｘ／ＣｙｔｏＰｅｒｍ固定／透過化溶液と共に１５分間インキュベートした。細胞を１×Ｐｅｒｍ洗浄緩衝液（ＭｉｌｌｉＱ水で希釈し、０．２２μｍフィルターを通過させた、ＣｙｔｏＦ

ｉｘ／ＣｙｔｏＰｅｒｍ固定／透過化キットにおけるＢＤ　Ｐｅｒｍ／Ｗａｓｈ（商標）緩衝液１０×）で２回洗浄し、Ｋｉ６７（クローンＢ５６、ＦＩＴＣ）、ＣＤ６９（クローンＴＰ１．５５．３、ＥＣＤ）、ＩＬ１０（クローンＪＥＳ３～９Ｄ７、ＰＥ　ＣＹ７）、ＩＬ１３（クローンＪＥＳ１０－５Ａ２、ＢＶ４２１）、ＴＮＦ－α（クローンＭａｂ１１、ＢＶ６５０）、ＩＬ４（クローンＭＰ４－２５Ｄ２、ＢＶ７１１）、ＩＦＮ－γ（クローンＢ２７；ＢＵＶ３９５）、ＩＬ２（クローンＭＱ１－１７Ｈ１２、ＡＰＣ）、ＣＤ３（クローンＳＰ３４．２、Ａｌｅｘａ　７００）に対するｍＡｂで、細胞内で３０分間染色した。細胞を１×Ｐｅｒｍ洗浄緩衝液で２回洗浄し、２５０μＬの新たに調製された１．５％ホルムアルデヒドで固定した。固定した細胞を９６ウェルの丸底プレートに移し、ＢＤ　ＦＡＣＳｙｍｐｈｏｎｙ（商標）システムによって分析した。

【０５００】

統計分析。ウイルス学的および免疫学的なデータの分析を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　８．４．２（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ）を使用して実行した。群間のデータの比較を、両側マン－ホイットニー検定を使用して実行した。相関を、両側のスピアマンの順位相関検定によって評価した。０．０５未満のＰ値を有意とみなした。

【０５０１】

結果

ＤＮＡワクチンの構築および免疫原性

２０１９－ｎＣｏＶ　Ｓタンパク質の６つのバリアントを発現するＤＮＡワクチンを生産した：全長（ＳＳ－スパイク）、細胞質内の尾部の欠失（ＳＳ－ＳｄＣＴ）（９）、膜貫通ドメインおよび可溶性エクトドメインを反映する細胞質内の尾部の欠失（ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ）（９）、フォールドン三量体化タグを有するＳ１ドメイン（ＳＳ－Ｓ１－フォールドン）、フォールドン三量体化タグを有する受容体結合ドメイン（ＳＳ－ＲＢＤ－フォールドン）、およびフューリン切断部位の欠失、２つのプロリン突然変異、およびフォールドン三量体化タグを有する融合前安定化可溶性エクトドメイン（ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン）（１０～１２）（図１）。ウエスタンブロット分析により、Ｓ、ＳＳ－ＳｄＣＴ、ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ、およびＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン構築物のために細胞溶解産物における、ならびに可溶性ＳＳ－Ｓ．ＥｃｔｏおよびＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン構築物のために培養上清における発現を確認した（図６）。分泌されたタンパク質のタンパク質分解による切断が、ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏで記録されたが、恐らくＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドンにおけるフューリン切断部位の突然変異に起因してＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドンでは記録されなかった。

【０５０２】

６～１２歳の３５匹の成体アカゲザルを、以下の群：ＳＳ－スパイク（Ｎ＝４）、ＳＳ－ＳｄＣＴ（Ｎ＝４）、ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ（Ｎ＝４）、Ｓ１（Ｎ＝４）、ＳＳ－ＲＢＤ－フォールドン（Ｎ＝４）、ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン（Ｎ＝５）、およびシャム対照（Ｎ＝１０）において、ＤＮＡワクチンで免疫化した。動物は、０週目および３週目に５ｍｇのＤＮＡワクチンを受けた。５週目におけるブースト免疫化の後、Ｓ特異的結合抗体を、ＥＬＩＳＡ（図６Ａ）および偽ウイルス中和アッセイ（９）（図６Ｂ）と生ウイルス中和アッセイ（１３、１４）（図６Ｃ）の両方を使用した中和抗体（ＮＡｂ）によって観察した。２匹の動物は、ＥＬＩＳＡによりベースライン時に結合抗体を有しており、これは、他の天然霊長類コロナウイルスの交差反応性を反映している可能性があった。偽ウイルス中和アッセイによって測定されたＮＡｂ力価は、生ウイルス中和アッセイによって測定されたＮＡｂ力価と相関していた（Ｐ＜０．０００１、Ｒ＝０．８０５２、両側のスピアマンの順位相関検定；図１０）。さらに、ワクチン接種されたマカクにおけるＮＡｂ力価（中央値力価７４；ＳおよびＳＳ－ＳｄＣＴ群における中央値力価１７０）は、９匹の回復期マカクのコホートにおけるＮＡｂ力価（中央値力価１０６）および２０１９－ｎＣｏＶ感染から回復した２７人の回復期ヒトのコホートにおけるＮＡｂ力価（中央値力価９３）と同等であった（図６Ｄ）。

【０５０３】
ワクチン接種されたマカクにおけるＳ特異的およびＲＢＤ特異的抗体は、抗体依存性好中球ファゴサイトーシス（ＡＤＮＰ）、抗体依存性補体沈着（ＡＤＣＤ）、抗体依存性単球細胞ファゴサイトーシス（ＡＤＣＰ）、および抗体依存性ＮＫ細胞活性化（ＩＦＮ－γ分泌、ＣＤ１０７ａ脱顆粒、およびＭＩＰ－１β発現）を含む多様なサブクラスおよびエフェクター機能を含んでいた（１５）（図６Ｅ）。より高いＡＤＣＤ応答への傾向はＳおよびＳＳ－ＳｄＣＴ群で観察されたが、それに対してより高いＮＫ細胞活性化はＳＳ－ＲＢＤ－フォールドンおよびＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン群で観察された。機能的および生物物理学的な抗体特徴の主成分分析によれば、異なるワクチン群のオーバーラップが示され、ＳおよびＲＢＤ群においてより明確なプロファイルが示された（図６Ｅ）。

【０５０４】
プールしたＳペプチドに対する細胞性免疫応答が、５週目におけるＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイによってワクチン接種された動物の大半でも観察された（図７Ａ）。細胞内サイトカイン染色アッセイは、Ｓ特異的なＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞応答の誘導を実証し、ＳＳ－Ｓ１－フォールドンおよびＳＳ－ＲＢＤ－フォールドン免疫原が短いほど、より低い応答を誘導した（図７Ｂ）。

【０５０５】
２０１９－ｎＣｏＶ負荷に対する保護有効性
ブースト免疫化の３週間後である６週目に、すべての動物を、鼻腔内（ＩＮ）経路により１ｍｌおよび気管内（ＩＴ）経路により１ｍｌとして投与された１．２×１０^{8}ＶＰ（１．１×１０^{4}ＰＦＵ）の２０１９－ｎＣｏＶで負荷した。負荷の後、気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬ）および鼻スワブ（ＮＳ）におけるウイルスＲＮＡレベルを、ＲＴ－ＰＣＲ（１６）によって評価した。血漿においてウイルスＲＮＡは陰性であり、動物は軽度の臨床症状のみを示した。高いレベルのウイルスＲＮＡがシャム対照で観察され、ＢＡＬにおいて６．４６（４．８１～７．９９の範囲）$\log_{10}$ ＲＮＡコピー／ｍＬの中央値ピークであり、ＮＳにおいて６．８２（５．９６～７．９６の範囲）$\log_{10}$ ＲＮＡコピー／スワブの中央値ピークであった（図１１）。より低いレベルのウイルスＲＮＡがワクチン群で観察され（図１２、図１３）、例えば、シャム対照と比較した、ＳＳ－スパイクがワクチン接種された動物における、それぞれＢＡＬおよびＮＳにおける中央値ピークのウイルスＲＮＡの１．９２および２．１６$\log_{10}$低減などであった（Ｐ＝０．０２およびＰ＝０．０４、両側マン－ホイットニー検定）（図１４）。ウイルスＲＮＡアッセイをＰＦＵアッセイによって確認した。

【０５０６】
負荷後のＢＡＬおよびＮＳにおけるウイルスＲＮＡの実質的な画分はインプットされる負荷ウイルスを表すと考えられることから、したがって、ビリオンにパッケージ化されないウイルス複製細胞中間体を反映すると考えられ、したがって細胞中でウイルスを複製すると推定されるサブゲノムｍＲＮＡ（ｓｇｍＲＮＡ）のレベルも評価した（１７）。高いレベルのｓｇｍＲＮＡがシャム対照で観察され、ＢＡＬにおいて５．３５（３．９７～６．９５の範囲）$\log_{10}$ ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬの中央値ピークであり、ＮＳにおいて６．４０（４．９１～７．０１の範囲）$\log_{10}$ ｓｇｍＲＮＡコピー／スワブの中央値ピークであった（図８Ａ）。著しくより低いレベルのｓｇｍＲＮＡがワクチン群で観察され（図８Ｂ、８Ｃ）、例えば、シャム対照と比較した、ＳＳ－スパイクがワクチン接種された動物における、それぞれＢＡＬおよびＮＳにおける中央値ピークｓｇｍＲＮＡの＞３．１および＞３．７$\log_{10}$の減少などであった（Ｐ＝０．０３およびＰ＝０．０１、両側マン－ホイットニー検定）（図８Ｄ）。低下したレベルのｓｇｍＲＮＡが、ＳＳ－ＳｄＣＴ、ＳＳ－Ｓ１－フォールドン、ＳＳ－ＲＢＤ－フォールドン、およびＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドンを含む他のワクチン群でも観察されたが、ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ群でより低い保護が見られたことから、これまでに報告されているような融合前エクトドメイン安定化の重要性が確認された（１２）。２５匹のワクチン接種され

た動物のうち合計８匹が、負荷後のいずれのタイムポイントにおいてもＢＡＬおよびＮＳにおいて検出可能なｓｇｍＲＮＡを示さなかった。

【０５０７】

免疫と保護の相関

この研究における保護有効性における変動が、免疫と保護の相関の分析を助長した。５週目におけるlog_{10}偽ウイルスＮＡｂ力価は、ＢＡＬ（Ｐ＜０．０００１、Ｒ＝－０．６８７７、両側のスピアマンの順位相関検定）とＮＳ（Ｐ＝０．０１９９、Ｒ＝－０．４１６２）の両方におけるピークlog_{10} ｓｇｍＲＮＡと逆に相関していた（図９Ａ）。同様に、５週目におけるlog_{10}生ウイルスＮＡｂ力価は、ＢＡＬ（Ｐ＜０．０００１、Ｒ＝－０．７７０２）とＮＳ（Ｐ＝０．１００６、Ｒ＝－０．３３６０）の両方においてピークlog_{10} ｓｇｍＲＮＡレベルと逆に相関していた（図９Ｂ）。これらのデータは、ワクチンによって惹起された血清ＮＡｂ力価が、２０１９－ｎＣｏＶ負荷に対するロバストな免疫と保護の相関であり得ることを示唆する。スワブ収集に固有の変動のために、ＮＳにおけるウイルス量と比較して、ＢＡＬにおけるウイルス量との相関がよりロバストであると推測された。５週目におけるlog_{10} ＥＬＩＳＡ力価はまた、ＢＡＬにおけるピークlog_{10} ｓｇｍＲＮＡレベルとも逆に相関していた（Ｐ＝０．００４１、Ｒ＝－０．４７３３）（図１５）。ワクチンによって惹起されたＥＬＩＳＰＯＴ応答（図１６）、ＣＤ４＋ＩＣＳ応答（図１７）、およびＣＤ８＋ＩＣＳ応答（図１８）は保護と相関していなかった。

【０５０８】

次に免疫と保護の相関への他の抗体エフェクター機能の考えられる寄与を調査した。ＮＡｂ力価に加えて、ＳおよびＲＢＤ特異的なＡＤＣＤ応答は、ＢＡＬにおけるピークlog_{10} ｓｇｍＲＮＡレベルと逆に相関していた（図９Ｃ、上のパネル）。次いで、最小の組み合わされた保護の相関を定義するために、２つの直交性の偏りのない機械学習アプローチを利用した。非線形ランダムフォレスト分析および線形部分最小二乗回帰分析は、ＲＢＤ特異的ＦｃγＲ２ａ－１結合とＡＤＣＤ応答、またはＮＡｂ力価とＲＢＤ特異的ＩｇＧ２応答などの２つの特徴を利用することが保護との相関を改善したことを示した（図９Ｃ、左下のパネル）。さらに、ＮＡｂ力価は、抗体媒介性ＮＫ細胞活性化を除いてほとんどの抗体エフェクター機能と相関していた（図９Ｃ、右下のパネル）。総合すると、これらのデータは、２０１９－ｎＣｏＶから保護することにおけるＮＡｂの主要な役割が、ＡＤＣＤなどの自然免疫エフェクター機能によって支持されていることを示唆する。

【０５０９】

負荷後の既往の免疫応答

すべての動物が、負荷の後、負荷後の１４日目に、増加したＥＬＩＳＡ力価（図１９）、偽ウイルスＮＡｂ力価（図２０）、生ウイルスＮＡｂ力価（図２１）、およびＩＦＮ－γ ＥＬＩＳＰＯＴ応答（図２２）を含む既往の体液性および細胞性免疫応答を示した。これらのデータは、２５匹の動物のうち８匹において、負荷後のいずれのタイムポイントにおいてもＢＡＬおよびＮＳにおいて検出可能なｓｇｍＲＮＡを有しておらず、むしろ負荷後に迅速なウイルス学的な制御が媒介している可能性があったことを含み、ワクチン保護が無効にならないことを示唆する。

【０５１０】

考察

世界的なＣＯＶＩＤ－１９パンデミックを終わらせるために、安全かつ有効な２０１９－ｎＣｏＶワクチンが必要な場合がある。いくつかのワクチン候補は臨床試験を始めているが、他の多くのものは臨床試験前の開発段階である。しかしながら、動物モデルにおける候補２０１９－ｎＣｏＶワクチンの免疫と保護の相関および保護有効性について現在わかっているものは極めてわずかである。この研究において、様々なＳ免疫原を発現する一連のプロトタイプＤＮＡワクチンを作成し、アカゲザルにおける鼻腔内および気管内の２０１９－ｎＣｏＶ負荷に対する保護有効性を評価した。本発明者らは、Ｓ免疫動物において、シャム対照と比較してそれぞれＢＡＬおよびＮＳにおいて中央値のウイルス量におけ

る実質的な＞３．１および＞３．７ｌｏｇ１０の低減を示すロバストなワクチン保護を実証する。保護は無効にならなかったが、その代わりに負荷後の迅速な免疫学的な制御が媒介する可能性があった。

【０５１１】

本発明者らのデータは、マウス、フェレット、およびマカクにおけるＳＡＲＳおよびＭＥＲＳワクチン保護に対する以前の研究（９、１８～２１）を拡張するものである。ＳＡＲＳおよびＭＥＲＳワクチン候補のためのフェーズ１臨床研究も実行されたが（２２）、これらのワクチンは、ヒトにおける有効性に関して試験されていなかった。本発明者らのデータは、マカクにおける２０１９－ｎＣｏＶからの保護が実現可能であることを示唆する。ウイルス複製の劇的な低減が、上および下気道で観察された。全長Ｓ免疫原を用いて最適な保護が達成され、可溶性構築物とより小さい断片を用いて低減された保護が観察された。しかしながら、より小さい免疫原は、特定の設定（例えば、異なる患者集団）で有用な可能性がある。

【０５１２】

ヒトのための２０１９－ｎＣｏＶワクチンの保護免疫の耐久性および最適なワクチンプラットフォームの重要な問題に取り組むために、さらなる調査をする必要があると予想される。データはＤＮＡワクチンに限定されているが、発見は、ＲＮＡワクチンおよび組換えベクターベースのワクチンなどの他の遺伝子ベースのワクチンにも同様に適用することができる。抗体依存性の増進に起因する可能性がある呼吸器疾患の増進の問題に取り組むためにさらなる研究も必要であると予想される（２３、２４）。臨床疾患の増進は、保護が不可能であった最適下限のワクチン構築物では観察されなかった。

【０５１３】

２つの独立したアッセイ（偽ウイルス中和および生ウイルス中和）によって測定した場合の血清ＮＡｂ力価を、この研究における保護のロバストな相関として特定した。この相関が、ＮＨＰとヒトの両方における複数のワクチン研究にわたり適用できることを立証するのであれば、これは、２０１９－ｎＣｏＶワクチンの臨床開発のための有用な基準になるであろう。ＡＤＣＤなどの自然免疫エフェクター機能も保護有効性に寄与する可能性がある。

【０５１４】

まとめると、このモデルにおいて、アカゲザルにおける２０１９－ｎＣｏＶ負荷からのワクチン保護は、一連のプロトタイプＤＮＡワクチンで実証され、血清ＮＡｂ力価は、保護と相関することが特定された。この相関は、複数の設定でさらに調べるべきであるが、確認された場合、ヒトにおいて２０１９－ｎＣｏＶワクチンを試験するための基準として有用であることの立証となる可能性がある。

【０５１５】

参考文献

【０５１６】

【表１－１】

1. F. Wu *et al.*, A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 579, 265-269 (2020).
2. P. Zhou *et al.*, A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270-273 (2020).
3. M. L. Holshue *et al.*, First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States. *N Engl J Med* 382, 929-936 (2020).
4. Q. Li *et al.*, Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *N Engl J Med*, (2020).
5. N. Zhu *et al.*, A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 382, 727-733 (2020).
6. N. Chen *et al.*, Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* 395, 507-513 (2020).
7. C. Huang *et al.*, Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 395, 497-506 (2020).
8. J. F. Chan *et al.*, A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet* 395, 514-523 (2020).
9. Z. Y. Yang *et al.*, A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice. *Nature* 428, 561-564 (2004).
10. R. N. Kirchdoerfer *et al.*, Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein. *Nature* 531, 118-121 (2016).
11. J. Pallesen *et al.*, Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E7348-E7357 (2017).
12. D. Wrapp *et al.*, Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 367, 1260-1263 (2020).
13. T. Scobey *et al.*, Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 16157-16162 (2013).
14. B. Yount *et al.*, Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12995-13000 (2003).
15. A. W. Chung *et al.*, Dissecting Polyclonal Vaccine-Induced Humoral Immunity against HIV Using Systems Serology. *Cell* 163, 988-998 (2015).
16. P. Abbink *et al.*, Lack of therapeutic efficacy of an antibody to alpha4beta7 in SIVmac251-infected rhesus macaques. *Science* 365, 1029-1033 (2019).

【０５１７】

【表１－２】

17. R. Wolfel *et al.*, Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*, (2020).

18. R. Liu *et al.*, A recombinant VSV-vectored MERS-CoV vaccine induces neutralizing antibody and T cell responses in rhesus monkeys after single dose immunization. *Antiviral research* 150, 30-38 (2018).

19. K. Muthumani *et al.*, A synthetic consensus anti-spike protein DNA vaccine induces protective immunity against Middle East respiratory syndrome coronavirus in nonhuman primates. *Sci Transl Med* 7, 301ra132 (2015).

20. G. P. Kobinger *et al.*, Adenovirus-based vaccine prevents pneumonia in ferrets challenged with the SARS coronavirus and stimulates robust immune responses in macaques. *Vaccine* 25, 5220-5231 (2007).

21. J. Zhou *et al.*, Immunogenicity, safety, and protective efficacy of an inactivated SARS-associated coronavirus vaccine in rhesus monkeys. *Vaccine* 23, 3202-3209 (2005).

22. J. E. Martin *et al.*, A SARS DNA vaccine induces neutralizing antibody and cellular immune responses in healthy adults in a Phase I clinical trial. *Vaccine* 26, 6338-6343 (2008).

23. C. T. Tseng *et al.*, Immunization with SARS coronavirus vaccines leads to pulmonary immunopathology on challenge with the SARS virus. *PLoS ONE* 7, e35421 (2012).

24. L. Liu *et al.*, Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute SARS-CoV infection. *JCI insight* 4, (2019).

【０５１８】

［実施例９］

コロナウイルス感染に対する２０１９－ｎＣｏＶ天然免疫応答

ＣＯＶＩＤ－１９パンデミックの爆発的な広がりは、対抗手段の開発を緊急的な国際的優先事項とした（１～８）。しかしながら、２０１９－ｎＣｏＶの免疫病原性の理解は現在、極めて限定的である。具体的に言えば、現在、２０１９－ｎＣｏＶ感染が、ヒトにおいて再曝露から保護する天然の免疫性を誘導するかどうかはわかっていない。このような情報は、ワクチン戦略、疫学的なモデリング、および公衆衛生アプローチにとって重要である。この問題を調査するために、２０１９－ｎＣｏＶ感染のアカゲザルモデルを開発し、感染のウイルス学的、免疫学的、および病理学的な特徴、加えて再負荷に対する保護免疫を評価した。

【０５１９】

方法

動物および研究の設計。

６～１２歳の１３匹の異系交配されたインド起源の成体雄および雌アカゲザル（Ｍａｃａｃａ　ｍｕｌａｔｔａ）を群に無作為に割り当てた。すべての動物をＢｉｏｑｕａｌ，Ｉｎｃ．（Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、ＭＤ）に収容した。第１の研究において、９匹の動物に、２０１９－ｎＣｏＶを、１．１×１０^{6}プラーク形成単位（ＰＦＵ）（群１；Ｎ＝３）、１．１×１０^{5}ＰＦＵ（群２；Ｎ＝３）、または１．１×１０^{4}ＰＦＵ（群３；Ｎ＝３）の総用量で接種した。これらの用量を、鼻腔内（ＩＮ）経路によって１ｍｌ（各鼻孔に０．５ｍｌ）および気管内（ＩＴ）経路によって１ｍｌとして投与した。負荷後の３５日目に、動物を、最初の負荷で利用した用量に一致させた用量で、２０１９－ｎＣｏＶで再負荷した。半定量的な臨床スコア付けは、臨床的所見、呼吸困難、横臥、および応答性に

対する獣医スタッフによる盲検評価を含んでいた（０～４０の範囲にわたり１カテゴリーにつき１０ポイント；軽度の疾患＜１２；中程度の疾患１３～２０；重度疾患＞２０）。第２の研究において、４匹のアカゲザルに、再びＩＮおよびＩＴ経路により投与することによって、１．１×10^5ＰＦＵの総用量の２０１９－ｎＣｏＶを接種した。負荷後２日目（Ｎ＝２）または４日目（Ｎ＝２）のいずれかにマカクを検死した。すべての免疫学的およびウイルス学的アッセイを盲検で実行した。すべての動物実験を、すべての関連する地域、州、および連邦の規制に従って実行し、Ｂｉｏｑｕａｌの施設内動物管理使用委員会（ＩＡＣＵＣ）によって承認した。

【０５２０】

２０１９－ｎＣｏＶストック。２０１９－ｎＣｏＶ ＵＳＡ－ＷＡ１／２０２０ストックを、Ｖｅｒｏ Ｅ６細胞において、ＢＥＩ Ｒｅｓｏｕｒｃｅｓ（ＮＲ－５２２８１；ロット番号７００３３１７５；Ｎａｔａｌｉｅ Ｔｈｏｒｎｂｕｒｇ、Ｃｅｎｔｅｒｓ ｆｏｒ Ｄｉｓｅａｓｅ Ｃｏｎｔｒｏｌ ａｎｄ Ｐｒｅｖｅｎｔｉｏｎより無償提供）から拡大増殖させ、感染の後５日目に９０％の細胞変性効果（ＣＰＥ）でウイルス負荷ストックを回収した。完全ゲノム配列決定から、親ウイルス配列（ＧｅｎＢａｎｋ ＭＮ９８５３２５．１；Ｄａｖｉｄ Ｏ’Ｃｏｎｎｏｒ、Ｓｈｅｌｂｙ Ｏ’Ｃｏｎｎｏｒ、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎより無償提供）と１００％の同一性が解明された。

【０５２１】

ウイルスＲＮＡアッセイ。ウイルスＲＮＡを、２０１９－ｎＣｏＶヌクレオカプシドを標的化するＲＴ－ＰＣＲアッセイを使用して定量化した。簡単に言えば、ＲＮＡを、負荷前または示されたタイムポイントでの負荷後のいずれかで、Ｑｉａｇｅｎ ＭｉｎＥｌｕｔｅウイルススピンキットまたはＲＮＡ－ＳＴＡＴ６０（Ｔｅｌ－試験Ｂ）を使用して、マカクから収集した試料（例えば、気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬ）上清）から単離し、ＲＮアーゼ非含有水に再懸濁した。単離したＲＮＡを２連で平板培養し、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ ７５００シーケンスディテクターで、以下のプログラムを使用して増幅した：ｉ）４８℃で３０分間、ｉｉ）９５℃で１０分間、およびｉｉｉ）９５℃で１５秒および５５℃で１分間を４０サイクル。アッセイは、流体の場合は１ｍｌ当たり、または組織の場合は１グラム当たりの、実用的な範囲の５×10^1～５×10^8のＲＮＡコピーを示した。フォワード（Ｆ）およびリバース（Ｒ）プライマー配列およびプローブ配列（Ｐ）は以下の通りであった：

２０１９－ｎＣｏＶ＿Ｎ１－Ｆ：５’－ＧＡＣＣＣＣＡＡＡＡＴＣＡＧＣＧＡＡＡＴ－３’（配列番号１９６）

２０１９－ｎＣｏＶ＿Ｎ１－Ｒ：５’－ＴＣＴＧＧＴＴＡＣＴＧＣＣＡＧＴＴＧＡＡＴＣＴＧ－３’（配列番号１９７）

２０１９－ｎＣｏＶ＿Ｎ１－Ｐ：５’－ＦＡＭ－ＡＣＣＣＣＧＣＡＴＴＡＣＧＴＴＴＧＧＴＧＧＡＣＣ－ＢＨＱ１～３’（配列番号１９８）。

【０５２２】

サブゲノムｍＲＮＡアッセイ。２０１９－ｎＣｏＶ Ｅ遺伝子のサブゲノムｍＲＮＡ（ｓｇｍＲＮＡ）を、これまでに記載されたものと類似したアプローチ（９）を使用して、ＲＴ－ＰＣＲによって評価した。標準曲線を作成するために、２０１９－ｎＣｏＶ Ｅ遺伝子のｓｇｍＲＮＡを、ｐｃＤＮＡ３．１発現プラスミドにクローニングした；このインサートを、ＡｍｐｌｉＣａｐ－Ｍａｘ Ｔ７高収量メッセージメーカーキット（Ｃｅｌｌｓｃｒｉｐｔ）を使用して転写して、標準のためのＲＮＡを得た。ＲＴ－ＰＣＲの前に、負荷された動物または標準から収集した試料を、ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ ＩＩＩ ＶＩＬＯ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を製造元の使用説明書に従って使用して逆転写した。Ｔａｑｍａｎカスタム遺伝子発現アッセイ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を、Ｅ遺伝子のｓｇｍＲＮＡを標的化する配列（９）を使用して設計した。反応を、ＱｕａｎｔＳｔｕｄｉｏ６および７ＦｌｅｘリアルタイムＰＣＲシステム（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）で製造元の仕様書に従って行った。標準曲線を使用して、ｓ

ｇｍＲＮＡを、１ｍｌ当たりまたはスワブ１つ当たりのコピーで計算した；定量的なアッセイ感度は、１ｍｌ当たりまたはスワブ１つ当たり５０コピーであった。

【０５２３】

ＰＦＵアッセイ。プラークアッセイのために、Ｖｅｒｏ　Ｅ６細胞のコンフルエントな単分子層を、６－ウェルプレート中で調製した。負荷された動物から収集した示された試料を連続的に希釈し、ウェルに添加し、３７℃で１時間インキュベートした。インキュベーションの後、１．５ｍＬの０．５％メチルセルロース培地を各ウェルに添加し、プレートを、３７℃で、５％CO_2と共に２日間インキュベートした。プレートを、ウェル当たり４００μＬの氷冷メタノールを添加し、－２０℃で３０分間インキュベートすることすることによって固定した。固定の後、メタノールを捨て、細胞単層を６００μＬ／ウェルの０．２３％クリスタルバイオレットで３０分間染色した。染色の後、クリスタルバイオレットを捨て、プレートを６００μＬの水で１回洗浄してプラークを可視化し計数した。

【０５２４】

ＥＬＩＳＡ。簡単に言えば、９６－ウェルプレートを、１×ＤＰＢＳ中の１μｇ／ｍＬの２０１９－ｎＣｏＶスパイク（Ｓ）タンパク質（Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ）でコーティングし、４℃で一晩インキュベートした。インキュベーションの後、プレートを洗浄緩衝液（１×ＤＰＢＳ中の０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０）で１回洗浄し、３５０μＬ／ウェルのカゼインブロックで室温で２～３時間ブロッキングした。インキュベーションの後、ブロック溶液を捨て、プレートをドライブロットした。カゼインブロックで希釈した熱不活性化血清の連続希釈物をウェルに添加し、プレートを室温で１時間インキュベートし、その後、さらに３回洗浄し、続いて、暗所で、室温で、１：１０００希釈した抗マカクＩｇＧ　ＨＲＰ（ＮＩＨ　ＮＨＰ　Ｒｅａｇｅｎｔ　Ｐｒｏｇｒａｍ）と共に１時間インキュベートした。次いでプレートを洗浄緩衝液で３回洗浄し、１００μＬのＳＥＲＡＣＡＲＥ（登録商標）ＫＰＬ　ＴＭＢ　ＳｕｒｅＢｌｕｅ　Ｓｔａｒｔ溶液を各ウェルに添加した；ウェル当たり１００μＬのＳＥＲＡＣＡＲＥ（登録商標）ＫＰＬ　ＴＭＢ　Ｓｔｏｐ溶液の添加によって、プレートの発色を中断した。４５０ｎｍでの吸光度を、ＶＥＲＳＡＭＡＸ（商標）またはオメガ（登録商標）マイクロプレートリーダーを使用して記録した。ＥＬＩＳＡのエンドポイントの力価を、吸光度＞０．２をもたらす最大の相互の血清希釈率と定義した。Ｌｏｇ１０のエンドポイントの力価が報告される。

【０５２５】

偽ウイルス中和アッセイ。ルシフェラーゼレポーター遺伝子を発現する２０１９－ｎＣｏＶ偽ウイルスを、上述したのと類似したアプローチで生成した（１０）。簡単に言えば、パッケージング構築物ｐｓＰＡＸ２（ＡＩＤＳ　Ｒｅｓｏｕｒｃｅ　ａｎｄ　Ｒｅａｇｅｎｔ　Ｐｒｏｇｒａｍ）、ルシフェラーゼレポータープラスミドｐＬｅｎｔｉ－ＣＭＶ　Ｐｕｒｏ－Ｌｕｃ（Ａｄｄｇｅｎｅ）、およびｐｃＤＮＡ３．１－ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２　ＳΔＣＴを発現するスパイクタンパク質を、リン酸カルシウムを用いてＨＥＫ２９３Ｔ細胞に一緒にトランスフェクトした。トランスフェクション後の４８時間に、偽タイプウイルスを含有する上清を収集した；偽タイプウイルスを、０．４５μｍフィルターを用いた濾過によって精製した。ワクチン接種された動物からの抗血清の中和活性を決定するために、ＨＥＫ２９３Ｔ－ｈＡＣＥ２細胞を、９６ウェルの組織培養プレートに、細胞１．７５×10^4個／ウェルの密度で一晩播種した。熱不活性化血清試料の２倍連続希釈物を調製し、５０μＬの偽ウイルスと混合した。混合物を３７℃で１時間インキュベートし、その後、ＨＥＫ２９３Ｔ－ｈＡＣＥ２細胞に添加した。感染後の４８時間に、ＳＴＥＡＤＹ－ＧＬＯ（登録商標）ルシフェラーゼアッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ）で製造元の使用説明書に従って細胞を溶解させた。２０１９－ｎＣｏＶ中和力価を、ウイルス対照ウェルの平均と比べてＲＬＵの５０％の低減が観察された試料希釈率と定義した。

【０５２６】

生ウイルス中和アッセイ。シアトル・ワシントン単離株に基づく全長２０１９－ｎＣｏＶウイルスを、ルシフェラーゼおよびＧＦＰを発現するように設計し、逆遺伝学によって、これまでに記載されたようにして回収した（１１、１２）。ウイルスをＶｅｒｏ　Ｅ６

ＵＳＡＭＲＩＤ細胞で力価測定して、細胞のみの対照バックグラウンドの少なくとも１０倍の相対発光量（ＲＬＵ）シグナルを得た。Ｖｅｒｏ　Ｅ６ＵＳＡＭＲＩＤ細胞を、前の日に、透明な底と黒色の壁を有する９６ウェルプレートで、ウェル当たり細胞２０，０００個で平板培養した。中和抗体血清試料を、１：４０の開始時の希釈率で試験し、８つの希釈スポットまで連続的に４倍希釈した。抗体－ウイルス複合体を、３７℃で、５％CO_2と共に１時間インキュベートした。インキュベーションの後、成長培地を除去し、ウイルス－抗体希釈複合体を２連で細胞に添加した。各中和アッセイプレートには、ウイルスのみ対照および細胞のみの対照が含まれていた。感染の後、プレートを、３７℃で、５％CO_2と共に４８時間インキュベートした。４８時間のインキュベーションの後、細胞を溶解させ、ルシフェラーゼ活性を、Ｎａｎｏ－Ｇｌｏルシフェラーゼアッセイシステムによって製造元の仕様書に従って測定した（Ｐｒｏｍｅｇａ）。２０１９－ｎＣｏＶ中和力価を、ウイルス対照ウェルの平均と比べてＲＬＵの５０％の低減が観察された試料希釈率と定義した。

【０５２７】

システム血清学。血漿試料の機能的な分析のために、ビーズベースのアッセイを使用して、抗体依存性細胞ファゴサイトーシス（ＡＤＣＰ）、抗体依存性好中球ファゴサイトーシス（ＡＤＮＰ）および抗体依存性補体沈着（ＡＤＣＤ）をこれまでに記載されたようにして定量化した（１３）。タンパク質抗原は、受容体結合ドメイン（ＲＢＤ；Ａａｒｏｎ Ｓｃｈｍｉｄｔ、Ｒａｇｏｎ　ＩｎｓｔｉｔｕｔｅおよびＭａｓｓＣＰＲより無償提供）、融合前安定化スパイクエクトドメイン（Ｓ；Ｂｉｎｇ　Ｃｈｅｎ，Ｃｈｉｌｄｒｅｎ’ｓ　ＨｏｓｐｉｔａｌおよびＭａｓｓＣＰＲより無償提供）、およびヌクレオカプシド（Ｎ；Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ）を含んでいた。蛍光性ストレプトアビジンビーズ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）をビオチン化したＲＢＤ、ＮおよびＳにカップリングし、希釈した血漿（ＡＤＣＰおよびＡＤＮＰ　１：１００、ＡＤＣＤ　１：１０）と共にインキュベートした。ＡＤＣＰの場合、ＴＨＰを免疫複合体に添加し、３７℃で１６時間インキュベートした。ＡＤＮＰの場合、アンモニウム－塩化カリウム（ＡＣＫ）溶解緩衝液を使用して全血から一次好中球を単離した。３７℃で１時間のインキュベーションの後、好中球を抗ＣＤ６６ｂ　ＰａｃＢｌｕｅ検出抗体（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）で染色した。ＡＤＣＤアッセイのために、凍結乾燥したモルモット補体（Ｃｅｄａｒｌａｎｅ）を製造元の使用説明書に従って再懸濁し、カルシウムおよびマグネシウム（Ｂｏｓｔｏｎ　Ｂｉｏ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ）を含むゼラチンベロナール緩衝液で希釈した。インキュベーション後、モルモット補体Ｃ３に対するフルオレセインコンジュゲートヤギＩｇＧ画分（Ｍｐｂｉｏ）でＣ３を検出した。抗体依存性ＮＫ細胞活性の検出のために、ＥＬＩＳＡベースのアプローチを使用した。簡単に言えば、プレートを３ｕｇ／ｍＬの抗原（上述した通り）でコーティングし、１：５０希釈で試料を添加し、３７℃で２時間インキュベートした。前の日にＲｏｓｅｔｔｅＳｅｐ（Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）により健康な軟膜からＮＫ細胞を単離し、１ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ）中で一晩静置した。ＮＫ細胞を、ＣＤ１０７ａ　ＰＥ－Ｃｙ５（ＢＤ）、ゴルジストップ（ＢＤ）およびブレフェルジンＡ（ＢＦＡ、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）を含有する染色カクテルと共に、免疫複合体と３７℃で５時間インキュベートした。ＮＫ細胞のインキュベーション後、細胞を固定し（Ｐｅｒｍ　Ａ、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈ）、表面マーカーに関して、固定しながら抗ＣＤ１６ＡＰＣ－Ｃｙ７（ＢＤ）、抗ＣＤ５６ＰＥ－Ｃｙ７（ＢＤ）および抗ＣＤ３ＰａｃＢｌｕｅ（ＢＤ）で染色した。Ｐｅｒｍ　Ｂ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈ）で透過化した後、細胞内染色のために抗ＩＦＮ－ガンマＦＩＴＣ（ＢＤ）および抗ＭＩＰ－１βＰＥ（ＢＤ）抗体を使用した。すべてのアッセイを、ｉＱｕｅ（Ｉｎｔｅｌｌｉｃｙｔ）およびＳ－Ｌａｂロボット（ＰＡＡ）を用いるフローサイトメトリーを介して獲得した。ＡＤＣＰのために、事象をビーズ陽性細胞においてゲーティングし、一方で好中球をＣＤ６６ｂ陽性と定義し、続いてビーズ陽性好中球でゲーティングした。ＡＤＣＰおよびＡＤＮＰのファゴサイトーシススコアを、（ビーズ陽性細胞のパーセンテージ）×（ビーズ陽性細胞のＭＦＩ）を１００００で割った値として計算した。ＡＤＣＤを、Ｃ３沈

着のＭＦＩとして報告した。ＮＫ細胞を、ＣＤ３－、ＣＤ１６＋およびＣＤ５６＋と定義した。データを、ＣＤ１０７ａ、ＭＩＰ－１－アルファまたはＩＦＮ－ガンマについて陽性の細胞のパーセンテージとして報告した。

【０５２８】

ＥＬＩＳＰＯＴアッセイ。ＥＬＩＳＰＯＴプレートを、ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎからのマウス抗ヒトＩＦＮ－γモノクローナル抗体で、５μｇ／ウェルの濃度で４℃で一晩コーティングした。プレートを０．２５％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＤＰＢＳで洗浄し、Ｒ１０培地（１１％ＦＢＳおよび１．１％ペニシリン－ストレプトマイシンを含むＲＰＭＩ）で３７℃で１時間ブロッキングした。スパイク１およびスパイク２ペプチドプールを２μｇ／ウェルの濃度で調製し、２００，０００細胞個／ウェルを添加した。ペプチドおよび細胞を３７℃で１８～２４時間インキュベートした。このインキュベーション後のすべての工程を室温で実行した。プレートをコールター緩衝液で洗浄し、Ｕ－Ｃｙｔｅｃｈからのウサギポリクローナル抗ヒトＩＦＮ－γビオチン（１μｇ／ｍＬ）と共に２時間インキュベートした。プレートを２回洗浄し、Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙからのストレプトアビジン－アルカリホスファターゼ抗体（１μｇ／ｍＬ）と共に２時間インキュベートする。最後の洗浄の後、ニトロブルーテトラゾリウムクロリド／５－ブロモ－４－クロロ３‘インドリルリン酸ｐ－トルイジン塩（ＮＢＴ／ＢＣＩＰ色素原）基質溶液を７分にわたり添加した。色素原を捨て、プレートを水で洗浄し、暗い場所で２４時間乾燥させた。プレートをスキャンし、Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｌｉｍｉｔｅｄのイムノスポットアナライザーで計数した。

【０５２９】

細胞内サイトカイン染色アッセイ。10^6個のＰＢＭＣ／ウェルを、ＣＤ４９ｄモノクローナル抗体（１μｇ／ｍＬ）が補充された１００μＬのＲ１０培地に再懸濁した。各試料を、ｍｏｃｋ（１００μＬのＲ１０、加えて、０．５％ＤＭＳＯ；バックグラウンド対照）、スパイク１およびスパイク２ペプチドプール（２μｇ／ｍＬ）、または１０ｐｇ／ｍＬのホルボールミリステートアセテート（ＰＭＡ）および１μｇ／ｍＬのイオノマイシン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）（１００μＬ；陽性対照）を用いて評価し、３７℃で１時間インキュベートした。インキュベーションの後、５０μＬのＲ１０中の０．２５μＬのＧｏｌｇｉＳｔｏｐおよび０．２５μＬのＧｏｌｇｉＰｌｕｇを各ウェルに添加し、３７℃で８時間インキュベートし、次いで４℃で一晩保持した。次の日、細胞をＤＰＢＳで２回洗浄し、近赤外ライブ／デッド色素で１０分間染色し、次いで、ＣＤ２７９（クローンＥＨ１２．１、ＢＢ７００）、ＣＤ３８（クローンＯＫＴ１０、ＰＥ）、ＣＤ２８（クローン２８．２、ＰＥ　ＣＹ５）、ＣＤ４（クローンＬ２００、ＢＶ５１０）、ＣＤ４５（クローンＤ０５８～１２８３、ＢＵＶ６１５）、ＣＤ９５（クローンＤＸ２、ＢＵＶ７３７）、ＣＤ８（クローンＳＫ１、ＢＵＶ８０５）に対する予め決定された力価のｍＡｂで３０分間染色した。次いで細胞を２％ＦＢＳ／ＤＰＢＳ緩衝液で２回洗浄し、２００μＬのＢＤ　ＣｙｔｏＦｉｘ／ＣｙｔｏＰｅｒｍ固定／透過化溶液と共に１５分間インキュベートした。細胞を１×Ｐｅｒｍ洗浄緩衝液（ＭｉｌｌｉＱ水で希釈し、０．２２μｍフィルターを通過させた、ＣｙｔｏＦｉｘ／ＣｙｔｏＰｅｒｍ固定／透過化キットにおけるＢＤ　Ｐｅｒｍ／Ｗａｓｈ（商標）緩衝液１０×）で２回洗浄し、Ｋｉ６７（クローンＢ５６、ＦＩＴＣ）、ＣＤ６９（クローンＴＰ１．５５．３、ＥＣＤ）、ＩＬ１０（クローンＪＥＳ３～９Ｄ７、ＰＥ　ＣＹ７）、ＩＬ１３（クローンＪＥＳ１０－５Ａ２、ＢＶ４２１）、ＴＮＦ－α（クローンＭａｂ１１、ＢＶ６５０）、ＩＬ４（クローンＭＰ４－２５Ｄ２、ＢＶ７１１）、ＩＦＮ－γ（クローンＢ２７；ＢＵＶ３９５）、ＩＬ２（クローンＭＱ１－１７Ｈ１２、ＡＰＣ）、ＣＤ３（クローンＳＰ３４．２、Ａｌｅｘａ　７００）に対するｍＡｂで、細胞内で３０分間染色した。細胞を１×Ｐｅｒｍ洗浄緩衝液で２回洗浄し、２５０μＬの新たに調製された１．５％ホルムアルデヒドで固定した。固定した細胞を９６ウェルの丸底プレートに移し、ＢＤ　ＦＡＣＳｙｍｐｈｏｎｙ（商標）システムによって分析した。

【０５３０】

組織病理学および免疫組織化学。組織を、新たに調製された４％パラホルムアルデヒド中で２４時間固定し、７０％エタノールに移し、７日以内にパラフィンに包埋し、ブロックを５μｍで断片化した。スライドを６５度で３０～６０分間ベークし、次いでキシレン中で脱パラフィンし、一連の段階的なエタノールから蒸留水にわたり再水和した。ＳＡＲＳ－ＮおよびＩｂａ－１のＩＨＣのために、熱誘導エピトープ賦活化（ＨＩＥＲ）を、クエン酸緩衝液（Ｔｈｅｒｍｏ；ＡＰ－９００３－５００）中で２５分間の水蒸気設定で圧力鍋を使用し、それに続き３％過酸化水素での処置によって実行した。次いでスライドを蒸留水中で濯ぎ、タンパク質を１５分間ブロッキングし（ＢｉｏＣａｒｅ、ＢＥ９６５Ｈ）、続いて１×リン酸緩衝生理食塩水中で濯いだ。一次ウサギ抗ＳＡＲＳ－核タンパク質抗体（Ｎｏｖｕｓ；ＮＢ１００－５６５７６）およびウサギ抗Ｉｂａ－１抗体（和光；０１９－１９７４１）を１：２５０で適用し、続いてウサギＭａｃｈ－２ＨＲＰ－ポリマー（ＢｉｏＣａｒｅ；ＲＨＲＰ５２０Ｌ）を３０分間適用し、次いでヘマトキシリンで対比染色し、続いて０．２５％アンモニア水を使用して青色にした。Ｂｉｏｇｅｎｅｘ　ｉ６０００オートステイナー（ｖ３．０２）でＳＡＲＳ－ＮおよびＩｂａ－１の標識付けを実行した。ＣＤ４＋Ｔ細胞、マクロファージ（ＣＤ６８／ＣＤ１６３）、好中球（ＭＰＯ）、および１型ＩＦＮ応答（Ｍｘ１）ＩＨＣを、これまでに記載されたようにして、Ｂｉｏｃａｒｅ　ｉｎｔｅｌｌｉＰＡＴＨオートステイナーを使用して、すべての抗体を室温で１時間インキュベートして、実行した（１４）。ＣＤ４（ａｂｃａｍカタログ番号ａｂ１３３６１６；クローンＥＰＲ６８５５）を、ウサギＰｏｌｉｎｋ－１ＨＲＰ（ＧＢＩ　Ｌａｂｓカタログ番号Ｄ１３～１１０）を使用した１：２００の検出で使用し、ＣＤ６８（Ｂｉｏｃａｒｅカタログ番号ＣＭ０３３Ｃ；クローンＫＰ１）を、マウスＰｏｌｉｎｋ－２ＡＰ（ＧＢＩ　Ｌａｂｓカタログ番号Ｄ６９～１１０）を使用した１：４００の検出で使用し、ＣＤ１６３（Ｔｈｅｒｍｏカタログ番号ＭＡ５～１１４５８；クローン１０Ｄ６）を、マウスＰｏｌｉｎｋ－２ＡＰ（ＧＢＩ　Ｌａｂｓカタログ番号Ｄ６９～１１０）を使用した１：４００の検出で使用し、ＭＰＯ（Ｄａｋｏカタログ番号Ａ０３９８；ポリクローナル）を、ウサギＰｏｌｉｎｋ－１ＨＲＰ（ＧＢＩ　Ｌａｂｓカタログ番号Ｄ１３～１１０）を使用した１：１０００の検出で使用し、Ｍｘ１（ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅカタログ番号ＭＡＢＦ９３８；クローンＭ１４３／ＣＬ１４３）を、マウスＰｏｌｉｎｋ－２ＨＲＰ（ＧＢＩ　Ｌａｂｓカタログ番号Ｄ３７～１１０）を使用した１：１０００の検出で使用した。組織病理を、２人の有資格の獣医学病理医（ＡＪＭおよびＡＤＭ）によって独立して評価した。定量的な画像分析を、ＨＡＬＯソフトウェア（ｖ２．３．２０８９．２７；Ｉｎｄｉｃａ　Ｌａｂｓ）を使用して実行した。ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２感染動物（ｎ＝４）のために、左および右の肺のそれぞれの４つの面積を分析し、未感染の対照（ｎ＝４）のために、１つの面積を分析した。Ｍｘ１定量化のために、Ａｒｅａ　Ｑｕａｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｖ２モジュールを使用して、ＭＸ１タンパク質のパーセンテージを総組織面積の比率として決定した。ＭＰＯ（好中球）定量化のために、まずＨＡＬＯＡＩソフトウェアをトレーニングして、血管（＞５ｍｍ^2）、気管支、細気管支、軟骨、および結合組織を排除することによって肺の肺胞部分を検出した；その後、ＣｙｔｏＮｕｃｌｅａｒ　ｖ１．６モジュールを使用して、ＭＰＯ＋細胞を検出した。これは、総肺胞組織の比率（ＰＭＮ／ｍｍ^2）として提示される。すべての例において、手作業でのキュレーションを各試料に対し実行して、アノテーションが正確であることを確認し、偽陽性／偽陰性を補正した。

【０５３１】

ＲＮＡＳＣＯＰＥ（登録商標）インサイチュハイブリダイゼーション。ＲＮＡＳＣＯＰＥ（登録商標）インサイチュハイブリダイゼーションを、これまでに記載されたようにして（１５）、プラスセンスウイルスＲＮＡを標的化する２０１９－ｎＣｏＶアンチセンス特異的プローブｖ－ｎＣｏＶ２０１９－Ｓ（ＡＣＤカタログ番号８４８５６１）、マイナスセンスゲノムウイルスＲＮＡを標的化する２０１９－ｎＣｏＶセンス特異的プローブｖ－ｎＣｏＶ２０１９－ｏｒｆ１ａｂ－センス（ＡＣＤカタログ番号８５９１５１）、および陰性対照としてＺＩＫＡプローブＶ－ＺＩＫＶｓｐｈ２０１５（ＡＣＤカタログ番号４

６７８７１）を使用して実行した。簡単に言えば、スライドをキシレン中で脱パラフィンし、一連の段階的なエタノールから蒸留水にわたり再水和した後、賦活化を、９５～９８℃で、ＡＣＤ　Ｐ２賦活化緩衝液（ＡＣＤカタログ番号３２２０００）中で３０分間実行し、続いてＰＢＳで１：１０希釈したプロテアーゼＩＩＩ（ＡＣＤカタログ番号３２２３３７）で、４０℃で２０分間処置した。次いでスライドを、ＰＢＳ中の３％Ｈ２Ｏ２と共に、室温で１０分間インキュベートした。ハイブリダイゼーションの前に、プローブストックを、マイクロ遠心分離機を使用して、１３，０００ｒｐｍで１０分間遠心分離し、次いでプローブ希釈剤（ＡＣＤカタログ番号３０００４１）で１：２に希釈して、プローブ凝集組織産物を低減させた。スライドを、ＲＮＡＳＣＯＰＥ（登録商標）２．５ＨＤ検出試薬－ＲＥＤ（ＡＣＤカタログ番号３２２３６０）を使用して発色させた。

【０５３２】

サイクリック免疫蛍光法。サイクリック免疫蛍光法（ＣｙＣＩＦ）をこれまでに記載されたようにして実行した（１６）。簡単に言えば、スライドガラス上のパラホルムアルデヒドで固定した検体のワックスを除去し、Ｌｅｉｃａ　Ｂｏｎｄ　ＲＸで抗原賦活化を実行した。次いでスライドを、以下の抗体（表１）を使用してＣｙＣＩＦに供した。２０×、０．８ＮＡ対物を備えたＲＡＲＥＣＹＴＥ（登録商標）ＣＹＴＥＦＩＮＤＥＲ（登録商標）スキャナーでスライドをスキャンし、次いでＢａＳｉＣツールを使用して一様でない照度に関して画像を補正した。フラットフィールド補正した画像を、ＡＳＨＬＡＲソフトウェアを使用して加工して、画像とチャネルをすべてのサイクルにわたり互いにアライメントした。

【０５３３】

【表２】

表 1: 組織サイクリック免疫蛍光法のための抗体

標的	蛍光色素	種	クローン	製造元	カタログ番号	希釈率	[Ab] (μg/mL)
CD16	ALEXA FLUOR® 647	マウス	DJ130c	Santa Cruz Biotechnologies	sc-20052 AF647	150	1.3
CD20	eFluor 660	マウス	L26	Thermo Fisher	50-0202-80	1000	0.2
CD206	ALEXA FLUOR®488	マウス	D-1	Santa Cruz Biotechnologies	sc-376108 AF488	150	1.3
CD31	ALEXA FLUOR®647	ウサギ	EPR3094	Abcam	ab218582	300	n.d.
CD3E	n/a	ラット	CD3-12	Abcam	ab11089	100	2
CD68	フィコエリトリン	ウサギ	D4B9C	CST	79594S	200	n.d.
ECAD	ALEXA FLUOR®488	ウサギ	クローン 24E10	CST	3199S	300	n.d.
HLADR	ALEXA FLUOR®555	ウサギ	EPR3692	Abcam	ab215312	500	n.d.
IBA1	ALEXA FLUOR®488	ウサギ	EPR6136(2)	Abcam	ab195031	200	n.d.
MPO	ALEXA FLUOR®488	ウサギ	EPR20257	Abcam	ab225474	400	n.d.
pan-CK	eFluor 570	マウス	AE1/AE3	Thermo Fisher	41-9003-82	1000	0.2
ウサギ IgG	ALEXA FLUOR®488	ヤギ	ポリクローナル	Thermo Fisher	A11070	2000	1
ラット IgG	ALEXA FLUOR®555	ヤギ	ポリクローナル	Thermo Fisher	A21245	2000	1
SARS-N	n/a	ウサギ	ポリクローナル	Novus	NB100-56576	200	2.5

【０５３４】

統計分析。ウイルス学的および免疫学的なデータの分析を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　８．４．２（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ）を使用して実行した。群間のデータの比較を、両側マン－ホイットニー検定を使用して実行した。０．０５未満のＰ値を有意とみなした。

【０５３５】

結果

アカゲザルにおける２０１９－ｎＣｏＶ感染のウイルス学および免疫学

９匹の成体アカゲザル（６～１２歳）に、鼻腔内（ＩＮ）経路により１ｍｌおよび気管内（ＩＴ）経路によって１ｍｌとして投与された合計１．１×１０^{6}ＰＦＵ（群１；Ｎ＝３）、１．１×１０^{5}ＰＦＵ（群２；Ｎ＝３）、または１．１×１０^{4}ＰＦＵ（群３；Ｎ＝３）の２０１９－ｎＣｏＶを接種した。ウイルス負荷の後、ウイルスＲＮＡレベルを、複数の解剖学的区画においてＲＴ－ＰＣＲによって評価した。高いレベルのウイルスＲＮＡが気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬ）（図２３Ａ）および鼻スワブ（ＮＳ）（図２３Ｂ）で観察され、ＢＡＬにおいて６．５６（５．３２～８．９７の範囲）log_{10} ＲＮＡコピー／ｍＬの中央値ピークであり、ＮＳにおいて７．００（５．０６～８．５５の範囲）log_{10} ＲＮＡコピー／スワブの中央値ピークであった。１日目から２日目に、すべての動物においてＮＳにおけるウイルスＲＮＡが増加したことから、ウイルス複製が示唆される。ウイルスＲＮＡは２日目にピークであり、典型的にはＢＡＬにおいて１０～１４日

目に回復し、ＮＳにおいて２１～２８日目に回復した。翌２日目、ＢＡＬおよびＮＳにおけるウイルス量は、用量に関係なく、すべての群において同等のようであった。ウイルスＲＮＡは、血漿中で検出不能であった（図２９）。動物は、軽度の臨床疾患を示唆する多少減少した食欲および応答性を示し（図３０）、加えて高用量群において軽度の一時的な好中球減少症およびリンパ球減少症を示したが（図３１）、発熱、体重の減少、呼吸窮迫、および死亡率は観察されなかった。

【０５３６】

新たに複製されるウイルスからのインプットされる負荷ウイルスの分化を助けるために、ＲＴ－ＰＣＲアッセイを開発して、Ｅ遺伝子のサブゲノムｍＲＮＡ（ｓｇｍＲＮＡ）を評価した。Ｅ遺伝子のｓｇｍＲＮＡは、ビリオンにパッケージ化されないウイルス複製細胞中間体を反映し、したがって、推定の細胞中でのウイルス複製を表す（９）。総ウイルスＲＮＡと比較して（図２３Ｂ）、ｓｇｍＲＮＡレベルは、１日目においてＮＳでより低く、中央値は５．１１（＜１．７０～５．９４の範囲）log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／スワブであったが、次いで２日目に６．５０（４．１６～７．８１の範囲）log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／スワブの中央値に増加した（図２３Ｃ）。

【０５３７】

次にこれらの動物における２０１９－ｎＣｏＶ特異的体液性および細胞性免疫応答を評価した。すべての９匹のマカクが、ＥＬＩＳＡにより、２０１９－ｎＣｏＶスパイク（Ｓ）タンパク質に対する結合抗体応答を発生させ（図２４Ａ）、偽ウイルス中和アッセイ（１０）（図２４Ｂ）と生ウイルス中和アッセイ（１１、１２）（図２４Ｃ）の両方を使用して中和抗体（ＮＡｂ）応答を発生させた。およそ１００のＮＡｂ力価が、用量群に関係なく、３５日目にすべての動物で観察された（偽ウイルス中和アッセイにより、８３～１９７の範囲、および生ウイルス中和アッセイにより、３５～３２６）。受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）、融合前Ｓエクトドメイン（Ｓ）、およびヌクレオカプシド（Ｎ）に対する複数のサブクラスの抗体応答が観察され、抗体は、抗体依存性補体沈着（ＡＤＣＤ）、抗体依存性細胞ファゴサイトーシス（ＡＤＣＰ）、抗体依存性好中球ファゴサイトーシス（ＡＤＮＰ）、および抗体依存性ＮＫ細胞脱顆粒（ＮＫ　ＣＤ１０７ａ）およびサイトカイン分泌（ＮＫ　ＭＩＰ１β、ＮＫ　ＩＦＮ－γ）（１３）を含む多様なエフェクター機能を示した（図２４Ｄ）。プールしたＳペプチドに対する細胞性免疫応答が、３５日目に、ＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイによって動物の大半で観察され、より低用量群でより低い応答への傾向を示した（図２４Ｅ）。細胞内サイトカイン染色アッセイは、Ｓ特異的ＣＤ８＋およびＣＤ４＋Ｔ細胞応答の両方の誘導を実証した（図２４Ｆ）。

【０５３８】

ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２感染はアカゲザルにおいて急性ウイルス性間質性肺炎を誘導する

現在入手可能な２０１９－ｎＣｏＶに感染したヒトからの病理データは、極めて限定的である。アカゲザルにおける２０１９－ｎＣｏＶ感染の病理学的な特徴を評価するために、４匹の動物に、上述した通りＩＮおよびＩＴ経路によって１．１×10^5ＰＦＵのウイルスを接種し、負荷後の２日目（Ｎ＝２）および４日目（Ｎ＝２）にそれらを検死した。ウイルス学的および病理学的な分析のために、上気道、下気道、消化管、リンパ節、および他の臓器の複数の領域を回収した。高いレベルのウイルスＲＮＡが、すべての鼻粘膜、咽頭、気管、および肺組織で観察され、より低いレベルのウイルスが、消化管、肝臓、および腎臓で見出された（図３２）。ウイルスＲＮＡは気管傍リンパ節で容易に検出されたが、遠位のリンパ節および脾臓では散発的にしか見出されなかった（図３２）。

【０５３９】

上気道の粘膜、気管、および肺をパラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋し、組織病理学によって評価した。負荷後の２日目に、両方の検死した動物は、炎症の多病巣性領域、ならびに単核細胞浸潤、硬化、および浮腫を伴う肺胞中隔の拡張などのウイルス性肺炎の証拠を実証した（図２５Ａ、２５Ｂ）。浮腫を有する領域はまた、多数の多形核細胞、優勢には好中球も含有していた。末端の細気管支上皮は壊死して脱落し、上皮細胞の凝集塊が気道内と肺胞腔内の遠位で検出され（図２５Ｃ、２５Ｄ）場合により細気管支

上皮の合胞体細胞の形成がみられた（図２５Ｅ）。肺胞中隔内にヒアリン膜が場合により観察され、これは、Ｉ型およびＩＩ型肺細胞へのダメージと一致していた（図２５Ｆ）。散在性の反応性を有する肺胞マクロファージが肺胞を満たし、一部は多核化し、免疫組織化学によってヌクレオカプシドに対して陽性に標識した（図２５Ｇ）。肺胞内膜細胞（肺細胞）はまたヌクレオカプシドに対しても顕著に陽性に標識した（図２５Ｈ）。

【０５４０】

肺実質にわたりウイルス感染細胞の多病巣性クラスターが存在し、これは免疫組織化学およびインサイチュＲＮＡハイブリダイゼーション（ＲＮＡＳＣＯＰＥ（登録商標））によって検出された通りである（１４、１５）（図２５Ｉ）。ＲＮＡＳＣＯＰＥ（登録商標）によってプラスセンスおよびマイナスセンスウイルスＲＮＡの両方が観察されたことから、肺組織におけるウイルス複製が示唆される。高密度の炎症性浸潤は、内因性ミエロペルオキシダーゼ染色（ＭＰＯ）によって検出された多形核細胞、ＣＤ６８およびＣＤ１６３陽性マクロファージ、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔリンパ球、ならびに１型インターフェロン遺伝子ＭＸ１の広汎的な上方調節を含んでいた（図３３）。２０１９－ｎＣｏＶ感染は、未感染の動物と比較して、肺の肺胞の多形核細胞浸潤の有意な増加をもたらし（Ｐ＝０．０２８６）、加えて総肺組織のおよそ３０％における大規模なＭＸ１染色をもたらした（Ｐ＝０．０２８６）（図３４）。炎症性浸潤はまた、より大きい気道の呼吸器の上皮粘膜下組織でも細気管支内腔への炎症細胞の遊出と共に検出された（図２５Ｊ）。また線毛上皮細胞もＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２のＲＮＡ（図２５Ｋ）とＳＡＲＳヌクレオカプシド（図２５Ｌ）の両方に対して陽性染色した。感染後の４日目に、炎症およびウイルス性肺炎の程度は減少したが、それでもなおウイルスは肺実質で検出され、好中球浸潤および１型インターフェロン応答も持続した（図３４）。

【０５４１】

感染した組織をさらに特徴付けるために、サイクリック免疫蛍光法（ＣｙＣＩＦ）イメージング、パラホルムアルデヒドで固定した組織検体のマルチプレックスイムノフェノタイピングのための方法（１６）を実行した。他の免疫細胞および解剖学的な構造を特定するためのマーカーのパネル、ならびにすべての核を標識するためのＤＮＡの対比染色に加えて、ヌクレオカプシド（ＳＡＲＳ－Ｎ）、汎サイトケラチン（上皮細胞を特定するため）、Ｉｂａ－１（汎マクロファージマーカーとしての、イオン化カルシウム結合アダプター）、ＣＤ６８（単球／マクロファージマーカー）、およびＣＤ２０６（マクロファージマーカー）に対して組織を染色した。ウイルス感染細胞の病巣は、肺にわたってランダムに分散され、炎症性浸潤と可変的に関連していた（図２６Ａ～Ｄ）。実質性の硬化および炎症の一部の領域は、ウイルスをほとんど含有していなかった（図２６Ａ、矢印；図３５）。ウイルス感染細胞は高頻度で汎サイトケラチン（図２６Ｅ～Ｈ）で共染色されたことから、それらが肺胞上皮細胞（肺細胞）であったことが示唆される。未感染のＩｂａ－１＋ＣＤ６８＋ＣＤ２０６＋活性化マクロファージもまた、高頻度で、ウイルス感染した上皮細胞に隣接して検出された（図２６Ｅ、Ｉ～Ｋ）。これらのデータは、２０１９－ｎＣｏＶが、感染した肺細胞、線毛気管支上皮細胞、および恐らく他の細胞型を含む急性炎症およびウイルス性肺炎の多病巣性領域を誘導したことを実証する。

【０５４２】

アカゲザルにおける２０１９－ｎＣｏＶでの再負荷に対する保護有効性

最初のウイルス感染後から３５日目に（図２３～２４）、９匹すべてのアカゲザルを、初回感染のために利用された同じ用量の、すなわち１．１×10^6ＰＦＵ（群１；Ｎ＝３）、１．１×10^5ＰＦＵ（群２；Ｎ＝３）、または１．１×10^4ＰＦＵ（群３；Ｎ＝３）の２０１９－ｎＣｏＶで再負荷した。再負荷実験において、３匹のナイーブ動物を陽性対照として組み入れた。２つの群１の動物および１つの群２の動物において、再負荷後の１日目に、ＢＡＬで極めて限定的なウイルスＲＮＡしか観察されず、それに続くタイムポイントでウイルスＲＮＡは検出されなかった（図２７Ａ）。対照的に、高いレベルのウイルスＲＮＡが、予想通りに、同時に負荷されたナイーブ動物で観察された（図２７Ａ）。ＢＡＬにおける中央値のピークウイルス量は、再負荷後、初回負荷後と比較して＞５．

１ｌｏｇ$_{10}$低かった（Ｐ＜０．０００１、両側マン－ホイットニー検定；図２７Ｂ）。再負荷後のウイルスＲＮＡは、ＢＡＬと比較してＮＳにおいてより高かったが、用量依存性および迅速な衰退を示し（図２７Ｃ）、ＮＳにおける中央値ピークウイルス量はそれでもなお、再負荷後、初回負荷後と比較して＞１．７ｌｏｇ$_{10}$低かった（Ｐ＝０．００１１、両側マン－ホイットニー検定；図２７Ｄ）。

【０５４３】

再負荷後にＮＳにおいて検出されたウイルスの大半は、インプットされる負荷ウイルスであると推測され、それゆえにｓｇｍＲＮＡレベルを、再負荷後のＮＳにおいて評価した。低いが検出可能なレベルのｓｇｍＲＮＡがそれでもなお、９匹の動物のうち４匹で、再負荷後の１日目におけるＮＳにおいて観察されたが、ｓｇｍＲＮＡレベルは急速に低下し（図２７Ｅ）、ＮＳにおける中央値ピークｓｇｍＲＮＡレベルは、初回負荷と比較して、再負荷後、＞４．８ｌｏｇ$_{10}$低かった（Ｐ＝０．０００３、両側マン－ホイットニー検定；図２７Ｆ）。これらのデータと一致して、再負荷後のＢＡＬおよびＮＳ試料におけるプラークアッセイは、回収可能なウイルスを示さず、初回感染後より低かった（それぞれＰ＝０．００９および０．００２、両側マン－ホイットニー検定；図３６）。さらに、再負荷後の動物においてほとんど臨床疾患が観察されなかった（図３７）。

【０５４４】

２０１９－ｎＣｏＶ再負荷の後、動物は、再負荷後の７日目までに、増加したウイルス特異的ＥＬＩＳＡ力価（Ｐ＝０．００３４、両側マン－ホイットニー検定）、偽ウイルスＮＡｂ力価（Ｐ＝０．０００３）、および生ウイルスＮＡｂ力価（Ｐ＝０．０００３）、加えて、ＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴ応答増加への傾向（Ｐ＝０．１８３７）を含む迅速な既往の免疫応答を示した（図２８）。すべての動物が、ＢＡＬまたはＮＳにおける残留したウイルスＲＮＡまたはｓｇｍＲＮＡの存在または非存在に関係なく再負荷後に既往の抗体応答を発生させたことから、再負荷に対する保護有効性は、迅速な免疫学的制御によって媒介されることが推測された。

【０５４５】

考察

特定のウイルス感染から回復する個体は、典型的に、再曝露に対するロバストな保護免疫を提供するウイルス特異的抗体応答を発生させるが、ＨＩＶ－１などの一部のウイルスは、保護的な天然免疫性を生じない（１７）。一般的な風邪のコロナウイルス２２９Ｅに関するヒト負荷研究は、部分的な天然免疫性が存在し得ることを示唆した（１８）。しかしながら、２０１９－ｎＣｏＶ感染から回復したヒトが再曝露から保護されるかどうかのデータは現在ない（世界保健機関（Ｗｏｒｌｄ　Ｈｅａｌｔｈ　Ｏｒｇａｎｉｚａｔｉｏｎ）、Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｂｒｉｅｆ、２０２０年４月２４日）。これは、ワクチン開発、公衆衛生戦略、抗体ベースの治療剤、および集団免疫の疫学的なモデリングに対して深い意味合いがある深刻な問題である。この研究において、アカゲザルにおける２０１９－ｎＣｏＶ感染は、２０１９－ｎＣｏＶ再負荷に対する実質的な保護有効性を提供することが実証された。

【０５４６】

上および下気道における高いレベルのウイルス複製（図２３）およびウイルス性肺炎の明確な病理学的証拠を含む、ヒト２０１９－ｎＣｏＶ感染の多くの態様を再現する２０１９－ｎＣｏＶ感染のアカゲザルモデルが開発された（図２５、２６）。組織病理学、免疫組織化学、ＲＮＡＳＣＯＰＥ（登録商標）、およびＣｙＣＩＦイメージングから、肺胞の肺細胞および線毛気管支上皮細胞のウイルス感染の証拠と共に急性炎症の領域におけるウイルス感染細胞の多病巣性クラスターが実証された。これらのデータは、ワクチンおよび治療剤を試験するための、ならびに免疫病原性を研究するのための２０１９－ｎＣｏＶ感染のためのモデルとしてのアカゲザルの有用性を示唆し、この発見は、カニクイザルで近年公開されたデータを補完し、拡張する（１９）。しかしながら、いずれの非ヒト霊長類モデルも呼吸不全または死亡に至らなかったことから、重度のＣＯＶＩＤ－１９疾患の非ヒト霊長類モデルを開発するためにさらなる調査が必要であろう。

【０５４７】
アカゲザルにおける２０１９－ｎＣｏＶ感染は、ロバストな体液性および細胞性免疫応答を引き起こし（図２）、再負荷からのロバストな保護を提供した（図２７）。２０１９－ｎＣｏＶ再負荷後の、動物のサブセットにおける鼻スワブに残留した低いレベルのサブゲノムｍＲＮＡ（図２７）およびすべての動物における既往の免疫応答（図２８）は、迅速な免疫学的制御によって保護が媒介されたこと、および恐らく無効にならなかったことを示唆する。
【０５４８】
アカゲザルにおける２０１９－ｎＣｏＶ感染は、偽ウイルス中和アッセイと生ウイルス中和アッセイの両方によって、およそ１００の中和抗体力価の誘導を引き起こしたが、２０１９－ｎＣｏＶに対する保護有効性に対する、中和抗体、他の機能的な抗体、細胞性免疫、および自然免疫の相対的な重要度は決定されないままである。さらに、天然免疫性の耐久性を定義するために追加の調査が必要であろう。
【０５４９】
まとめると、アカゲザルにおける２０１９－ｎＣｏＶ感染は、体液性および細胞性免疫応答を誘導し、２０１９－ｎＣｏＶ再負荷に対するロバストな保護有効性を提供した。これらのデータは、２０１９－ｎＣｏＶ感染の防止および処置に対する免疫学的なアプローチが、実際に可能であり得るという可能性を高める。
【０５５０】
参考文献
【０５５１】

【表３－１】

1. F. Wu *et al.*, A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 579, 265-269 (2020).
2. P. Zhou *et al.*, A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270-273 (2020).
3. M. L. Holshue *et al.*, First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States. *N Engl J Med* 382, 929-936 (2020).
4. Q. Li *et al.*, Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *N Engl J Med*, (2020).
5. N. Zhu *et al.*, A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 382, 727-733 (2020).
6. N. Chen *et al.*, Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* 395, 507-513 (2020).
7. C. Huang *et al.*, Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 395, 497-506 (2020).
8. J. F. Chan *et al.*, A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet* 395, 514-523 (2020).
9. R. Wolfel *et al.*, Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*, (2020).
10. Z. Y. Yang *et al.*, A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice. *Nature* 428, 561-564 (2004).
11. T. Scobey *et al.*, Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 16157-16162 (2013).
12. B. Yount *et al.*, Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12995-13000 (2003).
13. A. W. Chung *et al.*, Dissecting Polyclonal Vaccine-Induced Humoral Immunity against HIV Using Systems Serology. *Cell* 163, 988-998 (2015).
14. C. Deleage *et al.*, Impact of early cART in the gut during acute HIV infection. *JCI insight* 1, (2016).
15. C. Deleage *et al.*, Defining HIV and SIV Reservoirs in Lymphoid Tissues. *Pathog Immun* 1, 68-106 (2016).
16. J. R. Lin *et al.*, Highly multiplexed immunofluorescence imaging of human tissues and tumors using t-CyCIF and conventional optical microscopes. *eLife* 7, (2018).

【０５５２】

【表３－２】

17. M. Altfeld *et al.*, HIV-1 superinfection despite broad CD8+ T-cell responses containing replication of the primary virus. *Nature* 420, 434-439 (2002).

18. K. A. Callow, H. F. Parry, M. Sergeant, D. A. Tyrrell, The time course of the immune response to experimental coronavirus infection of man. *Epidemiol Infect* 105, 435-446 (1990).

19. B. Rockx *et al.*, Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. *Science*, (2020).

【０５５３】

［実施例１０］

ヒト対象への抗コロナウイルス組成物の投与または再投与

ヒト対象は、本明細書において定義されるように、抗コロナウイルス抗体レベルの非存在（例えば、対象の血液における）または保護レベル未満の抗コロナウイルス抗体レベルに基づいてコロナウイルス感染に感受性であると特定することができる。対象は、本明細書に記載される方法に従って、抗コロナウイルス組成物（例えば、本明細書に記載される組成物または免疫原性組成物のいずれか）を初回投与（プライム）または再投与（ブースト）のいずれかとして投与することができる。処置の後、ヒト対象は、ヒト対象における（例えば、対象の血液における）抗コロナウイルス抗体レベルを測定することによって、処置の有効性に関して試験することができる。本明細書において定義されるように、レベルが保護レベル未満である場合、ヒト対象は、抗コロナウイルス組成物の後続のブーストが与えられてもよいし、またはこれまでに投与されたものとは異なる抗コロナウイルス組成物で処置されていてもよい。

【０５５４】

抗コロナウイルス抗体レベルは、抗コロナウイルス抗体の保護レベルを達成するのに追加の用量（例えば、ブースト）が必要かどうかを決定するために、処置の直後に（例えば、投与後１日から投与後８週間の間に）測定してもよい。対象における抗コロナウイルス抗体レベルはまた、より長い時間枠にわたり（例えば、投与後２ヶ月から投与後１５年の間）モニターしてもよく、本明細書において定義されるように抗コロナウイルス抗体レベルが保護レベル未満に落ちた場合に、抗コロナウイルス組成物を再投与してもよい。

【０５５５】

［実施例１１］

アカゲザルにおいて単回用量ワクチンが２０１９－ｎＣｏＶからの保護をもたらす

ＣＯＶＩＤ－１９パンデミックを終わらせるために、安全かつ有効な２０１９－ｎＣｏＶ ワクチンが必要な場合がある[1～8]。国際的な展開およびパンデミックの制御のために、単回の免疫化のみを必要とするワクチンが最適であると予想される。非ヒト霊長類において２０１９－ｎＣｏＶスパイク（Ｓ）タンパク質を発現するアデノウイルス血清型２６（Ａｄ２６）ベクターベースのワクチンの単回用量の免疫原性および保護有効性が、本明細書において示される。５２匹のアカゲザルを、Ｓバリアントまたはシャム対照のパネルの１つを発現するＡｄ２６ベクターで免疫化し、鼻腔内および気管内経路によって２０１９－ｎＣｏＶで負荷した[9、10]。最適なＡｄ２６ワクチンは、ロバストな中和抗体応答を誘導し、２０１９－ｎＣｏＶ負荷後の気管支肺胞洗浄液および鼻スワブにおける完全な、またはほぼ完全な保護を提供した。ワクチンによって惹起された中和抗体力価は、保護有効性と相関していたことから、保護の免疫的な相関が示唆される。これらのデータは、ヒトにおける当分野で容認された疾患処置の動物モデルである非ヒト霊長類における２０１９－ｎＣｏＶからのロバストな単回のショットのワクチン保護を実証する。Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓと呼ばれる２０１９－ｎＣｏＶのための最適なＡｄ２６ベクターベースのワクチンは、差し迫った臨床試験のために計画される。

【０５５６】

ＣＯＶＩＤ－１９パンデミックの急速な拡大は、２０１９－ｎＣｏＶ ワクチンの開発を国際的な健康上の優先事項とした。アデノウイルス血清型２６（Ａｄ２６）ベクター[11]は、非ヒト霊長類とヒトの両方において複数の病原体に対するロバストな体液性および細胞性免疫応答を誘導することが示されている。２０１９－ｎＣｏＶスパイク（Ｓ）タンパク質の異なるバリアントを発現する一連のＡｄ２６ベクターを開発し、アカゲザルにおけるそれらの免疫原性および２０１９－ｎＣｏＶ負荷に対する保護有効性を評価した。

【０５５７】

材料および方法

動物および研究の設計。

６～１２歳の５２匹の異系交配されたインド起源の成体雄および雌アカゲザル（Ｍａｃａ ｍｕｌａｔｔａ）を群にランダムに割り当てた。すべての動物をＢｉｏｑｕａｌ，Ｉｎｃ．（Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、ＭＤ）に収容した。動物は、ｔＰＡ．Ｓ（Ｎ＝４）、ｔＰＡ．Ｓ．ＰＰ（Ｎ＝４）、Ｓ（Ｎ＝４）、Ｓ．ｄＣＴ（ＳＳ－ＳｄＣＴ）（Ｎ＝４）、ｔＰＡ．ＷＴ．Ｓ（Ｎ＝４）、Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰ（ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン）（Ｎ＝６）、Ｓ．ＰＰ（ＳＳ－スパイク－ｄＦ－ＰＰ）（Ｎ＝６）、およびシャム対照（Ｎ＝２０）を発現するＡｄ２６ベクターを受けた。動物は、10^{11}個のウイルス粒子（ｖｐ）Ａｄ２６ベクターの単回の免疫化を、０週目に、筋肉内経路によって、アジュバントなしで受けた。６週目に、すべての動物を、ＵＳＡ－ＷＡ１／２０２０（ＮＲ－５２２８１；ＢＥＩ Ｒｅｓｏｕｒｃｅｓ）から得た1.2×10^{8}ＶＰ（1.1×10^{4}ＰＦＵ）の２０１９－ｎＣｏＶで負荷した[9]。ウイルスを、鼻腔内（ＩＮ）経路によって１ｍｌ（各鼻孔に０．５ｍｌ）および気管内（ＩＴ）経路によって１ｍｌとして投与した。すべての免疫学的およびウイルス学的アッセイを盲検で実行した。すべての動物実験を、すべての関連する地域、州、および連邦の規制に従って実行し、Ｂｉｏｑｕａｌの施設内動物管理使用委員会（ＩＡＣＵＣ）によって承認した。

【０５５８】

Ａｄ２６ベクター。Ａｄ２６ベクターを、２０１９－ｎＣｏＶスパイク（Ｓ）タンパク質配列（Ｗｕｈａｎ／ＷＩＶ０４／２０１９；Ｇｅｎｂａｎｋ ＭＮ９９６５２８．１）の７つのバリアントを用いて構築した。配列のコドンを最適化し、合成した。複製能がないＥ１／Ｅ３欠失Ａｄ２６－ベクター[11]を、完全Ａｄ２６ベクターゲノムおよび導入遺伝子発現カセットを含有するプラスミドを使用して、ＰＥＲ．Ｃ６．ＴｅｔＲ細胞で産生した。ベクターを配列決定し、使用前に発現に関して試験した。

【０５５９】

ウエスタンブロット。７０～８０％のコンフルエンシーで２９３Ｔ細胞を播種したＴ－２５フラスコを、２０１９－ｎＣｏＶ Ａｄ２６ベクターで一時的にトランスフェクトし、細胞溶解産物をトランスフェクション後の４８時間に回収し、還元試料緩衝液（Ｐｉｅｒｃｅ）と別々に混合し、９５℃で５分間加熱し、プレキャストした４～１５％ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）に泳動した。タンパク質を、ｉＢｌｏｔドライブロッティングシステム（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用してポリビニリデンジフルオリド（ＰＶＤＦ）膜に移し、膜のブロッキングを、０．２％Ｔｗｅｅｎ２０（Ｓｉｇｍａ）（Ｖ／Ｖ）および５％（Ｗ／Ｖ）無脂肪乳粉末を含有するダルベッコリン酸緩衝生理食塩水Ｔ（Ｄ－ＰＢＳＴ）中で４℃で一晩実行した。一晩ブロッキングした後、ＰＶＤＦ膜を、１時間、ポリクローナルモルモット抗ＳＡＲＳ抗体（ＢＥＩ Ｒｅｓｏｕｒｃｅｓ）の１：１０，０００希釈物を含有する３％乳汁ＤＰＢＳ－Ｔ中で１時間インキュベートした。このインキュベーションの後、ＰＶＤＦ膜を５％乳汁ＤＰＢＳ－Ｔで５回洗浄し、その後、３％乳汁ＤＰＢＳ－Ｔ中の１：３０，０００の抗モルモットまたは抗ウサギホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）コンジュゲート二次抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈ）と共にインキュベートした。最後に、ＰＶＤＦ膜を、５％乳汁ＤＰＢＳ－Ｔで再び５回洗浄し、Ａｍｅｒｓｈａｍ ＥＣＬ Ｐｌｕｓウエスタンブロッティング検出システム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して発色させた。

【０５６０】

サブゲノムｍＲＮＡアッセイ。２０１９－ｎＣｏＶ　Ｅ遺伝子のサブゲノムｍＲＮＡ（ｓｇｍＲＮＡ）を、これまでに記載されたものと類似したアプローチを使用したＲＴ－ＰＣＲによって評価した[9、10、20]。簡単に言えば、標準曲線を作成するために、２０１９－ｎＣｏＶ　Ｅ遺伝子のｓｇｍＲＮＡを、ｐｃＤＮＡ３．１発現プラスミドにクローニングした；このインサートを、ＡｍｐｌｉＣａｐ－Ｍａｘ　Ｔ７高収量メッセージメーカーキット（Ｃｅｌｌｓｃｒｉｐｔ）を使用して転写して、標準のためのＲＮＡを得た。ＲＴ－ＰＣＲの前に、負荷された動物または標準から収集した試料を、ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ　ＩＩＩ　ＶＩＬＯ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を製造元の使用説明書に従って使用して逆転写した。Ｔａｑｍａｎカスタム遺伝子発現アッセイ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を、Ｅ遺伝子のｓｇｍＲＮＡを標的化する配列[20]を使用して設計した。反応を、ＱｕａｎｔＳｔｕｄｉｏ６および７ＦｌｅｘリアルタイムＰＣＲシステム（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）で製造元の仕様書に従って行った。標準曲線を使用して、ｓｇｍＲＮＡを、１ｍｌ当たりまたはスワブ１つ当たりのコピーで計算した；定量的なアッセイ感度は、１ｍｌ当たりまたはスワブ１つ当たり５０コピーであった。

【０５６１】

ＰＦＵアッセイ。プラークアッセイのために、Ｖｅｒｏ　Ｅ６細胞のコンフルエントな単分子層を、６－ウェルプレート中で調製した。負荷された動物から収集した示された試料を連続的に希釈し、ウェルに添加し、３７℃で１時間インキュベートした。インキュベーションの後、１．５ｍＬの０．５％メチルセルロース培地を各ウェルに添加し、プレートを、３７℃で、５％CO_2と共に２日間インキュベートした。プレートを、ウェル当たり４００μＬの氷冷メタノールを添加し、－２０℃で３０分間インキュベートすることによって固定した。固定の後、メタノールを捨て、細胞単層を６００μＬ／ウェルの０．２３％クリスタルバイオレットで３０分間染色した。染色の後、クリスタルバイオレットを捨て、プレートを６００μＬの水で１回洗浄してプラークを可視化し計数した。

【０５６２】

ＥＬＩＳＡ。ＲＢＤ特異的結合抗体を、実質的に記載された通りにＥＬＩＳＡによって評価した[9、10]。簡単に言えば、９６－ウェルプレートを、１×ＤＰＢＳ中の１μｇ／ｍＬの２０１９－ｎＣｏＶ　ＲＢＤタンパク質（Ａａｒｏｎ　Ｓｃｈｍｉｄｔ、ＭａｓｓＣＰＲ）でコーティングし、４℃で一晩インキュベートした。インキュベーションの後、プレートを洗浄緩衝液（１×ＤＰＢＳ中の０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０）で１回洗浄し、３５０μＬ／ウェルのカゼインブロックで室温で２～３時間ブロッキングした。インキュベーションの後、ブロック溶液を捨て、プレートをドライブロットした。カゼインブロックで希釈した熱不活性化血清の連続希釈物をウェルに添加し、プレートを室温で１時間インキュベートし、その後、さらに３回洗浄し、抗マカクＩｇＧ　ＨＲＰ（ＮＩＨ　ＮＨＰ　Ｒｅａｇｅｎｔ　Ｐｒｏｇｒａｍ）の１：１０００の希釈物と、暗所で、室温で１時間インキュベートした。次いでプレートを３回洗浄し、１００μＬのＳＥＲＡＣＡＲＥ（登録商標）ＫＰＬ　ＴＭＢ　ＳｕｒｅＢｌｕｅ　Ｓｔａｒｔ溶液を各ウェルに添加した；ウェル当たり１００μＬのＳＥＲＡＣＡＲＥ（登録商標）ＫＰＬ　ＴＭＢ　Ｓｔｏｐ溶液の添加によって、プレートの発色を中断した。４５０ｎｍでの吸光度を、ＶＥＲＳＡＭＡＸ（商標）またはオメガ（登録商標）マイクロプレートリーダーを使用して記録した。ＥＬＩＳＡのエンドポイントの力価を、吸光度＞０．２をもたらす最大の相互の血清希釈率と定義した。Ｌｏｇ１０のエンドポイントの力価が報告される。

【０５６３】

偽ウイルス中和アッセイ。ルシフェラーゼレポーター遺伝子を発現する２０１９－ｎＣｏＶ偽ウイルスを、上述したのと類似したアプローチで生成した[9、10、16]。簡単に言えば、パッケージング構築物ｐｓＰＡＸ２（ＡＩＤＳ　Ｒｅｓｏｕｒｃｅ　ａｎｄ　Ｒｅａｇｅｎｔ　Ｐｒｏｇｒａｍ）、ルシフェラーゼレポータープラスミドｐＬｅｎｔｉ－ＣＭＶ　Ｐｕｒｏ－Ｌｕｃ（Ａｄｄｇｅｎｅ）、およびｐｃＤＮＡ３．１－ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２　ＳΔＣＴを発現するスパイクタンパク質を、リン酸カルシウムを用いてＨＥＫ

２９３Ｔ細胞に一緒にトランスフェクトした。トランスフェクション後の４８時間に、偽タイプウイルスを含有する上清を収集した；偽タイプウイルスを、０．４５μｍフィルターを用いた濾過によって精製した。ワクチン接種された動物からの抗血清の中和活性を決定するために、ＨＥＫ２９３Ｔ－ｈＡＣＥ２細胞を、９６ウェルの組織培養プレートに、細胞１．７５×10^4個／ウェルの密度で一晩播種した。熱不活性化血清試料の２倍連続希釈物を調製し、５０μＬの偽ウイルスと混合した。混合物を３７℃で１時間インキュベートし、その後、ＨＥＫ２９３Ｔ－ｈＡＣＥ２細胞に添加した。感染後の４８時間に、ＳＴＥＡＤＹ－ＧＬＯ（登録商標）ルシフェラーゼアッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ）で製造元の使用説明書に従って細胞を溶解させた。２０１９－ｎＣｏＶ　中和力価を、ウイルス対照ウェルの平均と比べてＲＬＵの５０％の低減が観察された試料希釈率と定義した。

【０５６４】

生ウイルス中和アッセイ。シアトル・ワシントン単離株に基づく全長２０１９－ｎＣｏＶ　ウイルスを、ルシフェラーゼおよびＧＦＰを発現するように設計し、これまでに記載されたように逆遺伝学によって回収した[17、18]。ウイルスをＶｅｒｏ　Ｅ６ＵＳＡＭＲＩＤ細胞で力価測定して、細胞のみの対照バックグラウンドの少なくとも１０倍の相対発光量（ＲＬＵ）シグナルを得た。Ｖｅｒｏ　Ｅ６ＵＳＡＭＲＩＩＤ細胞を、前の日に、透明な底と黒色の壁を有する９６ウェルプレートで、ウェル当たり細胞２０，０００個で平板培養した。中和抗体血清試料を、１：４の開始時の希釈率で試験し、８つの希釈スポットまで連続的に４倍希釈した。抗体－ウイルス複合体を、３７℃で、５％CO_2と共に１時間インキュベートした。インキュベーションの後、成長培地を除去し、ウイルス－抗体希釈複合体を２連で細胞に添加した。各中和アッセイプレートには、ウイルスのみ対照および細胞のみの対照が含まれていた。感染の後、プレートを、３７℃で、５％CO_2と共に４８時間インキュベートした。次いで細胞を溶解させ、ルシフェラーゼ活性を、Ｎａｎｏ－Ｇｌｏルシフェラーゼアッセイシステムによって製造元の仕様書に従って測定した（Ｐｒｏｍｅｇａ）。２０１９－ｎＣｏＶ　中和力価を、ウイルス対照ウェルの平均と比べてＲＬＵの５０％の低減が観察された試料希釈率と定義した。

【０５６５】

システム血清学。

Ｌｕｍｉｎｅｘ

相対的な抗原特異的抗体力価を定量化するためのカスタムした多重アプローチを、これまでに記載されたようにして使用した[29]。それゆえに、固有な蛍光を有するマイクロスフェア（Ｌｕｍｉｎｅｘ）を、ＥＤＣ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）およびＳｕｌｆｏ－ＮＨＳ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を介した共有結合によるＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）－エステル結合によって、スパイクタンパク質（Ｓ）および受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）を含む２０１９－ｎＣｏＶ抗原とカップリングした。３８４－ウェルプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ）におけるウェル当たり、領域／抗原１つ当たり１．２×10^3個のビーズを添加し、希釈した血清試料（ＩｇＧ１を除くすべてのアイソタイプ／サブクラス、加えてＦｃ－受容体結合は、１：１００で希釈し、ＩｇＧ１は、１：２５０で希釈した）と共に、４℃で１６時間、９００ｒｍｐで振盪しながらインキュベートした。免疫複合体の形成後、自動プレートウォッシャー（Ｔｅｃａｎ）を用いて、０．１％ＢＳＡおよび０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０（Ｌｕｍｉｎｅｘアッセイ緩衝液）中でマイクロスフェアを３回洗浄した。抗アカゲザルＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＡ（ＮＩＨ　ＮＨＰ　Ｒｅａｇｅｎｔ　Ｐｒｏｇｒａｍ）およびＩｇＭ（Ｌｉｆｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ）検出抗体をＬｕｍｉｎｅｘアッセイ緩衝液で０．６５ｕｇ／ｍＬに希釈し、ビーズと共に、９００ｒｐｍで振盪しながら室温で１時間インキュベートした。染色した免疫複合体の洗浄の後、三次ヤギ抗マウスＩｇＧ－ＰＥ抗体（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）を各ウェルに０．５ｕｇ／ｍＬで添加し、振盪機で室温で１時間インキュベートした。同様に、Ｆｃ－受容体結合プロファイルのために、組換えアカゲザルＦｃγＲ２Ａ－１、ＦｃγＲ２Ａ－２、ＦｃγＲ２Ａ－３、ＦｃγＲ２Ａ－４、ＦｃγＲ３ＡおよびヒトＦｃγＲ２Ｂ（Ｄｕｋｅのタンパク質生産施設）をビオチン化し（Ｔｈｅ

ｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、ストレプトアビジン－ＰＥに１０分間コンジュゲートした（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）。次いでコーティングされたビーズを洗浄し、フローサイトメーターであるロボットアームが取り付けられた（ＰＡＡ）ｉＱｕｅ（Ｉｎｔｅｌｌｉｃｙｔ）で読んだ。各ビーズ領域上で事象をゲーティングし、ビーズ陽性事象ごとのＰＥの中央値の蛍光を報告した。試料を、各二次検出剤ごとに２連で泳動した。

【０５６６】

ビーズベースのＡＤＮＰ、ＡＤＣＰ、ＡＤＣＤ

抗体依存性好中球ファゴサイトーシス（ＡＤＮＰ）、抗体依存性細胞ファゴサイトーシス（ＡＤＣＰ）、および抗体依存性補体沈着（ＡＤＣＤ）を、これまでに記載されたようにして実行した[30～32]。簡単に言えば、２０１９－ｎＣｏＶ　ＳおよびＲＢＤをビオチン化し（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）、１μｍの黄色（ＡＤＣＰ、ＡＤＮＰ）および赤色（ＡＤＣＤ）の蛍光ビーズに、３７℃で２時間カップリングした。ＰＢＳ中の０．１％ＢＳＡで２回洗浄することによって過量の抗原を除去した。続いて、１．８２×10^8個の抗原でコーティングされたビーズを９６－ウェルプレートの各ウェルに添加し、希釈した試料（ＡＤＣＰおよびＡＤＮＰ　１：１００、ＡＤＣＤ　１：１０）と共に３７℃で２時間インキュベートして、免疫複合体形成を容易にした。インキュベーションの後、複合体化したビーズを洗浄し、ＡＤＣＰの場合、ウェル当たり２．５×10^4個のＴＨＰ－１細胞（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）を添加し、３７℃で１６時間インキュベートした。ＡＤＮＰの場合、アンモニウム－クロリド－カリウム（ＡＣＫ）溶解物（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）の添加によって赤血球を溶解させることによって、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を健康な血液ドナーから単離し、ウェル当たり５×10^4個の細胞を添加し、３７℃で１時間インキュベートした。

【０５６７】

その後、一次血液細胞を抗Ｃｄ６６ｂ　Ｐａｃ　ｂｌｕｅ検出抗体（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）で染色した。ＡＤＣＤの場合、凍結乾燥したモルモット補体を、製造元の使用説明書（Ｃｅｄａｒｌａｎｅ）に従って、水で再構成し、ウェル当たり４μｌを、Mg^{2+}およびCa^{2+}を含有するゼラチンベロナール緩衝液（ＧＶＢ$^{++}$、Ｂｏｓｔｏｎ　ＢｉｏＰｒｏｄｕｃｔｓ）中で、免疫複合体に３７℃で２０分間にわたり添加した。ＰＢＳ中の１５ｍＭのＥＤＴＡで２回洗浄した後、免疫複合体を、モルモット補体Ｃ３（ＭｐＢｉｏ）に対するフルオレセインコンジュゲートヤギＩｇＧ画分で染色した。ＡＤＮＰおよびＡＤＣＤの場合のＴＨＰ－ｓとのインキュベーションおよび細胞の染色後、細胞試料を４％パラホルムアルデヒド（ＰＦＡ）で固定し、ロボットアーム（ＰＡＡ）を利用するフローサイトメトリー（Ｉｎｔｅｌｌｉｃｙｔ、ｉＱｕｅ　Ｓｃｒｅｅｎｅｒ　ｐｌｕｓ）を介して試料獲得を実行した。すべての事象を、単一の細胞およびビーズの陽性事象でゲーティングし、ＡＤＣＰおよびＡＤＮＰに関して、ファゴサイトーシススコアを、ビーズ陽性細胞のパーセント×ＧＭＦＩ／１，０００として計算した。ＡＤＣＤに関して、Ｃ３陽性事象の中央値が報告される。すべての試料を２連で別の日に泳動した。

【０５６８】

ＡＤＮＫＡ

ＮＫ細胞関連の応答の分析のために、ＥＬＩＳＡベースのアッセイを使用した。それゆえに、９６－ウェルのＥＬＩＳＡプレート（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を、２０１９－ｎＣｏＶ　Ｓで３７℃で２時間にわたりコーティングした。次いでプレートを洗浄し、ＰＢＳ中の５％ＢＳＡで４℃で一晩ブロッキングした。ＮＫ細胞を、健康なドナー（ＭＧＨ血液ドナーセンター）からの軟膜からＲｏｓｅｔｔｅＳｅｐ単離キット（Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して単離し、ＩＬ－１５（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ）を補充したＮＫ細胞を一晩休ませた。血清試料を１：５０で希釈し、ＥＬＩＳＡプレート上で３７℃で２時間インキュベートした。抗ＣＤ１０７ａ－ＰＥ－Ｃｙ５染色（ＢＤ）、ブレフェルジンＡ（Ｓｉｇｍａ）、およびＧｏｌｇｉＳｔｏｐ（ＢＤ）の染色カクテルをＮＫ細胞に添加し、ウェル当たり５×10^4個のＮＫ細胞を添加し、３７℃で５時間インキュベートした。ＮＫ細胞を固定し、Ｐｅｒｍ　ＡおよびＢ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈ

ｅｒ）を使用して透過化し、表面マーカーを、抗ＣＤ１６ＡＰＣ－Ｃｙ７（ＢＤ）、抗ＣＤ５６ＰＥ－Ｃｙ７（ＢＤ）および抗ＣＤ３　ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ７００抗体（ＢＤ）で染色した。細胞内染色は、抗ＩＦＮγＡＰＣ（ＢＤ）および抗ＭＩＰ－１βＰＥ（ＢＤ）を含んでいた。獲得は、ロボットアーム（ＰＡＡ）を備えたフローサイトメトリーｉＱｕｅ（Ｉｎｔｅｌｌｉｃｙｔ）によって行われた。ＮＫ細胞を、ＣＤ３－、ＣＤ１６＋およびＣＤ５６＋と定義した。ＡＤＮＫＡアッセイを２つの血液ドナーにわたり２連で実行した。

【０５６９】

分析

すべてのアイソタイプ／サブクラス、Ｆｃ－受容体結合およびＡＤＣＤのデータをｌｏｇ１０変換した。レーダープロットのために、各抗体特徴を、群内の中央値を使用する前に、群にわたりその最小値が０であり、最大値が１であるように正規化した。主成分分析（ＰＣＡ）をＲパッケージ「ｒｏｐｌｓ」を使用して構築して、多変量プロファイルを比較した。完全に保護された動物を、ＢＡＬおよびＮＳにおいて検出可能なｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬを有さないと定義した。完全に保護された動物と、それに対して部分的に保護された、および保護されていない動物を、両側マン－ホイットニー検定を使用して比較した。ヒートマップにおける可視化のために、特徴のｚスコアの完全および部分的に保護された群の平均における差を示した。ヒートマップにおける有意性を示すために、ベンジャミニ－ホッホベルグの補正を使用して、多重比較のために補正した。特徴およびそれらの組合せの保護を予測する能力を評価するために、ロジスティック回帰モデルを、１０分割の交差確認フレームワークにおいて１００回繰り返してトレーニングし、受信者操作特性（ＡＵＲＯＣ）曲線下の面積を計算した。２つの特徴のすべての可能な組合せを試験した。このために、Ｒパッケージ「ｇｌｍ」および「ｐＲＯＣ」を使用した。

【０５７０】

ＥＬＩＳＰＯＴアッセイ。ＥＬＩＳＰＯＴプレートを、ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎからのマウス抗ヒトＩＦＮ－γモノクローナル抗体で、５μｇ／ウェルの濃度で４℃で一晩コーティングした。プレートを０．２５％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＤＰＢＳで洗浄し、Ｒ１０培地（１１％ＦＢＳおよび１．１％ペニシリン－ストレプトマイシンを含むＲＰＭＩ）で３７℃で１時間ブロッキングした。スパイク１およびスパイク２ペプチドプールは、タンパク質配列にわたり、それぞれタンパク質のＮ末端およびＣ末端の半分を反映する１１アミノ酸がオーバーラップする１５アミノ酸のペプチドを含有する。スパイク１およびスパイク２ペプチドプールを２μｇ／ウェルの濃度で調製し、２００，０００細胞個／ウェルを添加した。ペプチドおよび細胞を３７℃で１８～２４時間インキュベートした。このインキュベーション後のすべての工程を室温で実行した。プレートをコールター緩衝液で洗浄し、Ｕ－Ｃｙｔｅｃｈからのウサギポリクローナル抗ヒトＩＦＮ－γビオチン（１μｇ／ｍＬ）と共に２時間インキュベートした。プレートを２回洗浄し、Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙからのストレプトアビジン－アルカリホスファターゼ抗体（１μｇ／ｍＬ）と共に２時間インキュベートする。最後の洗浄の後、ニトロブルーテトラゾリウムクロリド／５－ブロモ－４－クロロ３‘インドリルリン酸ｐ－トルイジン塩（ＮＢＴ／ＢＣＩＰ色素原）基質溶液を７分にわたり添加した。色素原を捨て、プレートを水で洗浄し、暗い場所で２４時間乾燥させた。プレートをスキャンし、Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｌｉｍｉｔｅｄのイムノスポットアナライザーで計数した。

【０５７１】

細胞内サイトカイン染色アッセイ。10^6個のＰＢＭＣ／ウェルを、ＣＤ４９ｄモノクローナル抗体（１μｇ／ｍＬ）が補充された１００μＬのＲ１０培地に再懸濁した。各試料を、ｍｏｃｋ（１００μＬのＲ１０、加えて、０．５％ＤＭＳＯ；バックグラウンド対照）、ペプチドプール（２μｇ／ｍＬ）、または１０ｐｇ／ｍＬのホルボールミリステートアセテート（ＰＭＡ）および１μｇ／ｍＬのイオノマイシン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）（１００μＬ；陽性対照）を用いて評価し、３７℃で１時間インキュベートした。

インキュベーションの後、５０μＬのＲ１０中の０．２５μＬのＧｏｌｇｉＳｔｏｐおよび０．２５μＬのＧｏｌｇｉＰｌｕｇを各ウェルに添加し、３７℃で８時間インキュベートし、次いで４℃で一晩保持した。次の日、細胞をＤＰＢＳで２回洗浄し、近赤外ライブ／デッド色素で１０分間染色し、次いで、ＣＤ２７９（クローンＥＨ１２．１、ＢＢ７００）、ＣＤ３８（クローンＯＫＴ１０、ＰＥ）、ＣＤ２８（クローン２８．２、ＰＥ　ＣＹ５）、ＣＤ４（クローンＬ２００、ＢＶ５１０）、ＣＤ４５（クローンＤ０５８～１２８３、ＢＵＶ６１５）、ＣＤ９５（クローンＤＸ２、ＢＵＶ７３７）、ＣＤ８（クローンＳＫ１、ＢＵＶ８０５）に対する予め決定された力価のｍＡｂで３０分間染色した。次いで細胞を２％ＦＢＳ／ＤＰＢＳ緩衝液で２回洗浄し、２００μＬのＢＤ　ＣｙｔｏＦｉｘ／ＣｙｔｏＰｅｒｍ固定／透過化溶液と共に１５分間インキュベートした。細胞を１×Ｐｅｒｍ洗浄緩衝液（ＭｉｌｌｉＱ水で希釈し、０．２２μｍフィルターを通過させた、ＣｙｔｏＦｉｘ／ＣｙｔｏＰｅｒｍ固定／透過化キットにおけるＢＤ　Ｐｅｒｍ／Ｗａｓｈ（商標）緩衝液１０×）で２回洗浄し、Ｋｉ６７（クローンＢ５６、ＦＩＴＣ）、ＣＤ６９（クローンＴＰ１．５５．３、ＥＣＤ）、ＩＬ１０（クローンＪＥＳ３～９Ｄ７、ＰＥＣＹ７）、ＩＬ１３（クローンＪＥＳ１０－５Ａ２、ＢＶ４２１）、ＴＮＦ－α（クローンＭａｂ１１、ＢＶ６５０）、ＩＬ４（クローンＭＰ４－２５Ｄ２、ＢＶ７１１）、ＩＦＮ－γ（クローンＢ２７；ＢＵＶ３９５）、ＩＬ２（クローンＭＱ１－１７Ｈ１２、ＡＰＣ）、ＣＤ３（クローンＳＰ３４．２、Ａｌｅｘａ　７００）に対するｍＡｂで、細胞内で３０分間染色した。細胞を１×Ｐｅｒｍ洗浄緩衝液で２回洗浄し、２５０μＬの新たに調製された１．５％ホルムアルデヒドで固定した。固定した細胞を９６ウェルの丸底プレートに移し、ＢＤ　ＦＡＣＳｙｍｐｈｏｎｙ（商標）システムによって分析した。

【０５７２】

統計分析。ウイルス学的および免疫学的なデータの分析を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ８．４．２（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ）を使用して実行した。群間のデータの比較を、両側マン－ホイットニー検定を使用して実行した。相関を、両側のスピアマンの順位相関検定によって評価した。０．０５未満のＰ値を有意とみなした。

【０５７３】

結果

Ａｄ２６ワクチン候補の生成および免疫原性

異なるプロモーター、抗原形態、および安定化突然変異を反映した２０１９－ｎＣｏＶＳバリアントを発現する７つのＡｄ２６ベクターを産生した：（ｉ）全長Ｓを有する組織プラスミノゲン活性化因子（ｔＰＡ）リーダー配列（ｔＰＡ．Ｓ（配列番号１、Ｎ末端に融合したｔＰＡリーダー配列を含む））[12]、（ｉｉ）フューリン切断部位の突然変異および２つのプロリンを安定化する突然変異を有する全長Ｓを有するｔＰＡリーダー配列（ｔＰＡ．Ｓ．ＰＰ（配列番号２３、Ｎ末端に融合したｔＰＡリーダー配列を含む））[13～15]、（ｉｉｉ）天然全長Ｓを有する野生型リーダー配列（Ｓ（配列番号２９））、（ｉｖ）細胞質内の尾部が欠失したＳを有する野生型リーダー配列（Ｓ．ｄＣＴ（ＳＳ－ＳｄＣＴ）（配列番号３０））[16]、（ｖ）タンデムｔＰＡおよび全長Ｓを有する野生型リーダー配列（ｔＰＡ．ＷＴ．Ｓ（配列番号２９、Ｎ末端に融合したｔＰＡリーダー配列を含む））[12]、（ｖｉ）フューリン切断部位の突然変異、プロリンを安定化する突然変異、およびフォールドン三量体化ドメインを有する、可溶性エクトドメインを反映する、膜貫通領域および細胞質内の尾部が欠失したＳを有する野生型リーダー配列（Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰ（ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン）（配列番号５６））[15]、および（ｖｉｉ）フューリン切断部位の突然変異およびプロリンを安定化する突然変異を有する全長Ｓを有する野生型リーダー配列（Ｓ．ＰＰ（ＳＳ－スパイク－ｄＦ－ＰＰ）（配列番号５１））（図３８ａ）。ウエスタンブロット分析は、すべてのベクターからの細胞溶解産物におけるＳ発現を確認した（図３８ｂ）。

【０５７４】

６～１２歳の５２匹の成体アカゲザルを、ｔＰＡ．Ｓ（Ｎ＝４）、ｔＰＡ．Ｓ．ＰＰ（Ｎ＝４）、Ｓ（Ｎ＝４）、Ｓ．ｄＣＴ（ＳＳ－ＳｄＣＴ）（Ｎ＝４）、ｔＰＡ．ＷＴ．Ｓ

（Ｎ＝４）、Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰ（ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン）（Ｎ＝６）、Ｓ．ＰＰ（ＳＳ－スパイク－ｄＦ－ＰＰ）（Ｎ＝６）、およびシャム対照（Ｎ＝２０）を発現するＡｄ２６ベクターで免疫化した。動物は、10^{11}個のウイルス粒子（ｖｐ）Ａｄ２６ベクターの単回の免疫化を、０週目に、筋肉内経路によって、アジュバントなしで受けた。ＲＢＤ特異的結合抗体を、３２匹のワクチン接種された動物のうち３１匹において２週目までに、すべてのワクチン接種された動物において４週目までにＥＬＩＳＡによって観察した（図３９ａ）。中和抗体（ＮＡｂ）応答を、偽ウイルス中和アッセイ[9、10、16]（図３９ｂ）および生ウイルス中和アッセイ[9、10、17、18]（図３９ｃ）の両方を使用して評価した。２週目に、両方のアッセイによって測定した場合のＮＡｂ力価が、ワクチン接種された動物の大半で観察され、４週目に全般的に増加した。Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰ（Ａｄ２６ＳＳ－スパイク－ｄＦ－ＰＰ）ワクチンは、４週目に最大の偽ウイルスＮＡｂ力価（中央値４０８；２０８～６４３の範囲）および生ウイルスＮＡｂ力価（中央値１１３；５３～２３３の範囲）を惹起した。偽ウイルスＮＡｂ力価は、ＥＬＩＳＡ力価と生ウイルスＮＡｂ力価の両方と相関していた（それぞれ、Ｐ＜０．０００１、Ｒ＝０．８３１４およびＰ＜０．０００１、Ｒ＝０．８４２７、両側のスピアマンの順位相関検定；図４５）。Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰがワクチン接種されたマカクにおける中央値のＮＡｂ力価は、２０１９－ｎＣｏＶ感染から回復した後の９匹の回復期マカク[9]および２７人の回復期ヒト[10]のこれまでに報告されたコホートにおける中央値のＮＡｂ力価より４倍高かった（図４６）。Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰワクチンはまた、気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬ）において、低いが検出可能なＳ特異的ＩｇＧおよびＩｇＡ応答も誘導した（図４７）。

【０５７５】

ワクチン接種された動物におけるＳ特異的およびＲＢＤ特異的抗体応答をさらに、システム血清学によって特徴付けた[19]。抗体依存性好中球ファゴサイトーシス（ＡＤＮＰ）、抗体依存性単球細胞ファゴサイトーシス（ＡＤＣＰ）、抗体依存性補体沈着（ＡＤＣＤ）、および抗体依存性ＮＫ細胞活性化（ＡＤＮＫＡ）、加えて、複数のＩｇサブクラスおよびＦｃＲ結合を含む様々なＦｃエフェクター機能を観察した（図３９ｄ、図４８）。Ａｄ２６－ｔＰＡ．Ｓ．ＰＰおよびＡｄ２６－Ｓ．ＰＰワクチンで、最大の結合抗体応答を観察し、Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰワクチンで、最大のエフェクター機能応答が見られた。主成分分析は、ワクチン群の実質的なオーバーラップを示したが、Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰが最も異なる群であった（図３９ｄ）。

【０５７６】

３２匹のワクチン接種された動物のうち３０匹において、４週目に、プールしたＳペプチドを使用したＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイによって細胞性免疫応答を誘導した（図４０ａ）。多パラメーター細胞内サイトカイン染色アッセイを利用して、ＩＦＮ－γ＋ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞応答を評価した（図４０ｂ）。応答は、ほとんどのワクチン群において同等であったが、Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰワクチンとの細胞性免疫応答がより低い傾向があった。ＩＦＮ－γ＋およびＩＬ－２＋ＣＤ４＋Ｔ細胞応答は、Ａｄ２６－Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰ（Ａｄ２６ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン）およびＡｄ２６－Ｓ．ＰＰワクチンに関して、ＩＬ－４＋およびＩＬ－１０＋ＣＤ４＋Ｔ細胞応答より高かったことから（図４９）Ｔｈ１バイアス応答の誘導が示唆される。

【０５７７】

Ａｄ２６ワクチン候補の保護有効性

６週目に、すべての動物を、1.2×10^{8}ＶＰ（1.1×10^{4}ＰＦＵ）の２０１９－ｎＣｏＶで、鼻腔内（ＩＮ）および気管内（ＩＴ）経路によって負荷した[9、10]。気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬ）および鼻スワブ（ＮＳ）におけるウイルス量を、ウイルス複製を測定すると考えられるサブゲノムｍＲＮＡ（ｓｇｍＲＮＡ）のＲＴ－ＰＣＲによって評価した[9、20]。すべての２０匹のシャム対照を感染させたところ、ＢＡＬにおける４．８９（３．８５～６．５１の範囲）$\log_{10}$ ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬの中央値ピークを示した（図４１ａ）。対照的に、Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰ（Ａｄ２６ＳＳ－スパイク－ｄ

Ｆ－ＰＰ）を受けた動物は、ＢＡＬにおいて検出可能なウイルスを実証しなかった（１．６９ｌｏｇ$_{10}$ ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍＬの定量限界）。他のワクチンでも実質的な保護が観察されたが、偶発的な動物がＢＡＬにおいて低いレベルのｓｇｍＲＮＡを示した（図４１ｂ）。同様に、シャム対照は、ＮＳにおける５．５９（３．７８～８．０１の範囲）ｌｏｇ$_{10}$ ｓｇｍＲＮＡの中央値ピークを示した（図４１ｃ）。Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰワクチンを受けた動物のうち１匹のみが、ＮＳにおいて低い量のウイルスを示した。他のワクチンを受けた動物は、一般的に、対照と比較して、ＮＳにおいて低減されたウイルス量を実証したが、保護はＡｄ２６－Ｓ．ＰＰで最適であった（図４１ｄ）。

【０５７８】

ワクチン接種された動物におけるピークウイルス量の比較は、ＢＡＬにおける保護が一般的にＮＳにおける保護よりロバストであったことを示唆した（図４２）。Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰワクチンは、ＮＳにおいて低い量のウイルスを示した１匹の動物を除いて、下気道と上気道の両方において完全な保護を提供し、それぞれシャム対照と比較して、ＢＡＬおよびＮＳにおいて、中央値ピークｓｇｍＲＮＡの＞３．２および＞３．９ｌｏｇ$_{10}$の低減をもたらした（それぞれＰ＜０．０００１およびＰ＜０．０００１、両側マン－ホイットニー検定）（図４２）。３２匹のワクチン接種されたマカクの間で、１７匹の動物が完全に保護され、負荷の後、ＢＡＬまたはＮＳにおける検出可能なｓｇｍＲＮＡを有しておらず、５匹の追加の動物は、ＢＡＬにおいてｓｇｍＲＮＡを有していなかったが、ＮＳにおいて多少のウイルスを示した。

【０５７９】

免疫と保護の相関

異なるワクチン構築物を用いたこの研究のサイズおよび結果の変動が、免疫相関分析を促進した。２週目および４週目におけるｌｏｇ$_{10}$ＥＬＩＳＡ力価、偽ウイルスＮＡｂ力価、および生ウイルスＮＡｂ力価は、ＢＡＬ（図４３）とＮＳ（図５０～５２）の両方においてピークｌｏｇ$_{10}$ ｓｇｍＲＮＡと逆に相関していた。一般的に、４週目の力価は、２週目の力価とよりよく相関し、ＮＡｂ力価は、ＥＬＩＳＡ力価とよりよく相関していた。４週目におけるｌｏｇ$_{10}$偽ウイルスＮＡｂ力価および生ウイルスＮＡｂ力価は、ＢＡＬにおけるピークｌｏｇ$_{10}$ ｓｇｍＲＮＡ（それぞれＰ＜０．０００１、Ｒ＝－０．６８８０およびＰ＜０．０００１、Ｒ＝－０．６５６２、両側のスピアマンの順位相関検定）（図４３ｂ～ｃ）およびＮＳにおけるピークｌｏｇ$_{10}$ ｓｇｍＲＮＡ（それぞれＰ＜０．０００１、Ｒ＝－０．５８３９、およびＰ＜０．０００１、Ｒ＝－０．５７１４、両側のスピアマンの順位相関検定）（図５１および５２）と逆相関していた。これまでに公開されたデータと総合すると[10]、これらの発見は、血清抗体力価が、２０１９－ｎＣｏＶワクチンのための保護の有用な免疫相関を証明できることを示唆する。それに対して、ワクチンによって惹起されたＥＬＩＳＰＯＴ応答、ＣＤ４＋ＩＣＳ応答、およびＣＤ８＋ＩＣＳ応答は保護と相関していなかった。

【０５８０】

抗体と保護の相関へのさらなる洞察を獲得するために、完全に保護された動物（負荷後のＢＡＬにおける検出可能なｓｇｍＲＮＡまたはＮＳを有さない動物と定義された）と、部分的に保護された、または保護されていない動物とを区別する抗体パラメーターを定義した。ＮＡｂ力価は、部分的に保護された、または保護されていない動物と比較して完全に保護された動物で最も濃縮されるパラメーターであり（Ｐ＝０．０００９、両側マン－ホイットニー検定）、それにＡＤＮＫＡ（Ｐ＝０．００４４）およびＡＤＣＰ（Ｐ＝０．００９２）応答（図４３ｄ、図５３）が続く。さらに、ロジスティック回帰分析は、ＮＡｂ力価およびＦｃγＲ２Ａ－３、ＩｇＭ、またはＡＤＣＤ応答などの２つの特徴を利用することが、保護との相関を改善したことを示した（図４３ｄ）。これらのデータは、ＮＡｂが主として２０１９－ｎＣｏＶからの保護に関与するが、他の結合および機能的抗体も役割を果たす可能性があることを示唆する。

【０５８１】

負荷後のワクチン接種された動物における免疫応答

シャム対照およびワクチン接種された動物のほとんどが、２０１９－ｎＣｏＶ負荷後の１４日目に、より実質的に高い偽ウイルスＮＡｂ応答（図４４ａ、図５４）、加えてＣＤ８＋およびＣＤ４＋Ｔ細胞応答（図４４ｂ）を発生させた。これらの動物において、ＣＤ８＋およびＣＤ４＋Ｔ細胞応答を、スパイク（Ｓ１、Ｓ２）、ヌクレオカプシド（ＮＣＡＰ）、および非構造タンパク質（ＮＳ６、ＮＳ７ａ、ＮＳ８）を含む複数の２０１９－ｎＣｏＶタンパク質に対して方向付けた（図４４ｂ）。対照的に、Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰ（Ａｄ２６ＳＳ－スパイク－ｄＦ－ＰＰ）ワクチンを受けた動物は既往のＮＡｂ応答を実証せず（図４４ａ）、負荷後のワクチン抗原であるスパイク（Ｓ１、Ｓ２）に対する低いＴ細胞応答のみを示した（図４４ｂ）。これらの発見は、Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰがワクチン接種された動物において主として検出不能なウイルス量と一致することから（図４１および４２）、負荷後のこれらの動物におけるウイルス複製のレベルは極めて低く、あったとしてもわずかであることを示唆する。

【０５８２】

考察

安全かつ有効な２０１９－ｎＣｏＶワクチンの開発は、深刻な国際的優先事項である。これらのデータは、融合前安定化Ｓ免疫原を発現するＡｄ２６ベクターでの単回の免疫化が、ロバストなＮＡｂ応答を誘導し、アカゲザルにおける完全な、またはほぼ完全な２０１９－ｎＣｏＶ負荷からの保護を提供したことを実証する。この研究において評価した最適なワクチンは、野生型リーダー配列、全長膜結合Ｓ、フューリン切断部位の突然変異、および２つのプロリンを安定化する突然変異を含有するＡｄ２６－Ｓ．ＰＰ（Ａｄ２６ＳＳ－スパイク－ｄＦ－ＰＰ）であった[15]。

【０５８３】

これらのデータは、非ヒト霊長類における２０１９－ｎＣｏＶのための不活性化ウイルスワクチンおよびＤＮＡワクチンの近年の前臨床研究を拡張するものである[10、21]。不活性化ウイルスワクチン、核酸ワクチン、およびタンパク質サブユニットワクチンは、典型的には２回またはそれより多くの免疫化を必要とするが、それに対してアデノウイルスベクターは、単回の免疫化の後にロバストで長持ちするＮＡｂ応答を誘導することができる[22～24]。単回のショットの２０１９－ｎＣｏＶワクチンは、集団ワクチン接種キャンペーンやパンデミックの制御のために、２用量のワクチンと比較して、重要な論理的および実用的な利点を有すると予想される。しかしながら、Ａｄ２６－ＨＩＶベクターでの同種のブーストは、非ヒト霊長類およびヒトの両方において１０倍より高く抗体力価を増大させる可能性があることから[25～27]、Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰワクチンの単回用量および２用量レジメンはどちらも有効なアプローチであり得ることが示唆される。

【０５８４】

Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰは、単回の免疫化の後にロバストなＮＡｂ応答を誘導し、ＮＳにおいて低いレベルのウイルスを有していた１匹の動物を除いて、完全な２０１９－ｎＣｏＶ負荷からの保護を提供した。さらに、Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰがワクチン接種された動物におけるＮＡｂ力価およびＴ細胞応答は、負荷の後に拡大せず、Ｔ細胞応答もまた、ヌクレオカプシドや非構造タンパク質などの非ワクチン抗原に拡がらなかった。対照的に、シャム対照および他のワクチンは、負荷の後、複数の２０１９－ｎＣｏＶタンパク質に対してより高いＮＡｂ力価およびＴ細胞応答を生じ、ＤＮＡワクチンを用いた以前の観察と一致した[10]。これらのデータは、２０１９－ｎＣｏＶ負荷後のＡｄ２６－Ｓ．ＰＰがワクチン接種された動物において、ウイルス複製が最小かないことを示唆し、これは、これらの動物におけるより高いＮＡｂ応答に関連する可能性がある。

【０５８５】

負荷前のワクチンによって惹起されたＮＡｂ力価は、負荷の後、ＢＡＬおよびＮＳの両方において保護と相関しており、これは、以前の発見と一致した[10]。これらのデータは、血清ＮＡｂ力価が、ワクチン保護のための見込みがあるバイオマーカーであり得ることを示唆するが、これは、非ヒト霊長類およびヒトの両方において追加の２０１９－ｎＣｏＶワクチン有効性研究で確認する必要があるであろう。さらに、ＡＤＮＫＡ、ＡＤＣＰ、

およびＡＤＣＤ応答などの追加の機能的な抗体応答も保護に寄与する可能性がある。ワクチン保護におけるＴ細胞応答の役割はまだ決定されておらず、Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰにおける他のベクターと比較して低い細胞性免疫応答への傾向は、さらなる調査を必要とするであろう。

【０５８６】

Ａｄ２６－Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰ（Ａｄ２６　ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン）およびＡｄ２６－Ｓ．ＰＰワクチンは、Ｔｈ２バイアスではなくＴｈ１バイアスＣＤ４＋Ｔ細胞応答を惹起し、保護水準未満のＮＡｂ力価を有していた動物は、増進されたウイルス複製または臨床疾患を実証しなかった。これは、感染の抗体依存性強化の可能性に対する証拠である[２８]。

【０５８７】

まとめると、これらのデータは、２０１９－ｎＣｏＶによって惹起されたロバストなＮＡｂ力価のためのＡｄ２６ベクターベースのワクチンの単回の免疫化を実証し、アカゲザルにおいて完全な、またはほぼ完全な２０１９－ｎＣｏＶ負荷からの保護を提供した。保護のＮＡｂ相関の特定は、臨床用途のためのこれらの２０１９－ｎＣｏＶワクチンの有効性を確認する。この研究からの最適なＡｄ２６－Ｓ．ＰＰワクチンは、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓと呼ばれ、これは、ヒトにおいて有効である可能性が高い。

【０５８８】

参考文献

【０５８９】

【表４－１】

1 Wu, F. et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. Nature 579, 265-269, doi:10.1038/s41586-020-2008-3 (2020).

2 Zhou, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature 579, 270-273, doi:10.1038/s41586-020-2012-7 (2020).

3 Holshue, M. L. et al. First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States. N Engl J Med 382, 929-936, doi:10.1056/NEJMoa2001191 (2020).

4 Li, Q. et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. N Engl J Med, doi:10.1056/NEJMoa2001316 (2020).

5 Zhu, N. et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. N Engl J Med 382, 727-733, doi:10.1056/NEJMoa2001017 (2020).

6 Chen, N. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. Lancet 395, 507-513, doi:10.1016/S0140-6736(20)30211-7 (2020).

7 Huang, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet 395, 497-506, doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5 (2020).

8 Chan, J. F. et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. Lancet 395, 514-523, doi:10.1016/S0140-6736(20)30154-9 (2020).

9 Chandrashekar, A. et al. SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques. Science, doi:10.1126/science.abc4776 (2020).

10 Yu, J. et al. DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. Science, doi:10.1126/science.abc6284 (2020).

11 Abbink, P. et al. Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. J Virol 81, 4654-4663, doi:JVI.02696-06 [pii] 10.1128/JVI.02696-06 (2007).

12 Alharbi, N. K. et al. ChAdOx1 and MVA based vaccine candidates against MERS-CoV elicit neutralising antibodies and cellular immune responses in mice. Vaccine 35, 3780-3788, doi:10.1016/j.vaccine.2017.05.032 (2017).

13 Kirchdoerfer, R. N. et al. Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein. Nature 531, 118-121, doi:10.1038/nature17200 (2016).

14 Pallesen, J. et al. Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. Proc Natl Acad Sci U S A 114, E7348-E7357, doi:10.1073/pnas.1707304114 (2017).

【０５９０】

【表４－２】

15 Wrapp, D. et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. Science 367, 1260-1263, doi:10.1126/science.abb2507 (2020).
16 Yang, Z. Y. et al. A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice. Nature 428, 561-564, doi:10.1038/nature02463 (2004).
17 Scobey, T. et al. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. Proc Natl Acad Sci U S A 110, 16157-16162, doi:10.1073/pnas.1311542110 (2013).
18 Yount, B. et al. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 12995-13000, doi:10.1073/pnas.1735582100 (2003).
19 Chung, A. W. et al. Dissecting Polyclonal Vaccine-Induced Humoral Immunity against HIV Using Systems Serology. Cell 163, 988-998, doi:10.1016/j.cell.2015.10.027 (2015).
20 Wolfel, R. et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. Nature, doi:10.1038/s41586-020-2196-x (2020).
21 Gao, Q. et al. Rapid development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. Science, doi:10.1126/science.abc1932 (2020).
22 Abbink, P. et al. Durability and correlates of vaccine protection against Zika virus in rhesus monkeys. Sci Transl Med 9, doi:10.1126/scitranslmed.aao4163 (2017).
23 Abbink, P. et al. Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. Science 353, 1129-1132, doi:10.1126/science.aah6157 (2016).
24 Cox, F. et al. Adenoviral vector type 26 encoding Zika virus (ZIKV) M-Env antigen induces humoral and cellular immune responses and protects mice and nonhuman primates against ZIKV challenge. PLoS ONE 13, e0202820, doi:10.1371/journal.pone.0202820 (2018).
25 Barouch, D. H. et al. Evaluation of a mosaic HIV-1 vaccine in a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2a clinical trial (APPROACH) and in rhesus monkeys (NHP 13-19). Lancet 392, 232-243, doi:10.1016/S0140-6736(18)31364-3 (2018).
26 Barouch, D. H. et al. Protective efficacy of adenovirus/protein vaccines against SIV challenges in rhesus monkeys. Science 349, 320-324, doi:10.1126/science.aab3886 (2015).
27 Baden, L. R. et al. First-in-human evaluation of the safety and immunogenicity of a recombinant adenovirus serotype 26 HIV-1 Env vaccine (IPCAVD 001). J Infect Dis 207, 240-247, doi:10.1093/infdis/jis670 (2013).

【０５９１】

【表４－３】

28 Graham, B. S. Rapid COVID-19 vaccine development. Science, doi:10.1126/science.abb8923 (2020).

29 Brown, E. P. et al. Multiplexed Fc array for evaluation of antigen-specific antibody effector profiles. J Immunol Methods 443, 33-44, doi:10.1016/j.jim.2017.01.010 (2017).

30 Ackerman, M. E. et al. A robust, high-throughput assay to determine the phagocytic activity of clinical antibody samples. J Immunol Methods 366, 8-19, doi:10.1016/j.jim.2010.12.016 (2011).

31 Lu, L. L. et al. A Functional Role for Antibodies in Tuberculosis. Cell 167, 433-443 e414, doi:10.1016/j.cell.2016.08.072 (2016).

32 Fischinger, S. et al. A high-throughput, bead-based, antigen-specific assay to assess the ability of antibodies to induce complement activation. J Immunol Methods 473, 112630, doi:10.1016/j.jim.2019.07.002 (2019).

【０５９２】

[実施例１２]

単一用量ワクチンは、ハムスターを２０１９－ｎＣｏＶ重症臨床疾患に対して保護する

ヒトのＣＯＶＩＤ－１９疾患は、臨床的に軽症疾病であることが多いが、一部の個体は重症肺炎、呼吸不全、および死亡を発生させる[1～4]。ハムスター[5～7]および非ヒト霊長類[8～10]におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（２０１９－ｎＣｏＶ）感染症の研究では、一般に軽症臨床疾患が報告されており、前臨床ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ワクチン研究では、非ヒト霊長類の上気道および下気道でのウイルス複製の低減が実証されている[11～13]。

【０５９３】

下記に記載の通り、ハムスターでの高用量鼻腔内ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染は、動物のサブセットにおいて、組織での高レベルウイルス複製、広範な肺炎、体重減少、および死亡を含む、重症臨床疾患をもたらす。安定化ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク（Ｓ）タンパク質（ＳＳ－スパイク－ｄＦ－ＰＰ、配列番号５１）をコードするヌクレオチド（ＳＳ－スパイク－ｄＦ－ＰＰ、配列番号２０４）を発現するアデノウイルス血清型２６（Ａｄ２６）ベクターベースワクチンによる単回免疫化は、結合性および中和抗体応答を誘発し、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２誘導性の体重減少、肺炎、および死亡に対する保護を示した。こうしたデータは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２臨床疾患に対するワクチン保護を実証していている。このモデルは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ワクチン、療法、および病態形成の前臨床研究に有用であることが証明されるはずである。

【０５９４】

材料および方法

動物および研究設計。１０～１２週齢の雄および雌シリアンゴールデンハムスター（Ｅｎｖｉｇｏ）７０匹を無作為に群に割り振った。動物はすべて、Ｂｉｏｑｕａｌ，Ｉｎｃ．（ロックビル、メリーランド州）にて飼育された。動物は、Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰ（ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン、配列番号５６）をコードするヌクレオチド（ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン、配列番号１９５）またはＳ．ＰＰ（ＳＳ－スパイク－ｄＦ－ＰＰ、配列番号５１）をコードするヌクレオチド（ＳＳ－スパイク－ｄＦ－ＰＰ、配列番号２０４）またはシャム対照を発現するＡｄ２６ベクターを受け取った（Ｎ＝１０／群）。動物は、０週目にアジュバントなしで筋肉内経路により10^{10}または10^{9}ウイルス粒子（ｖｐ）のＡｄ２６ベクターの単回免疫化を受けた。４週目に、すべての動物に、5.0×10^{5} ＴＣＩＤ$_{50}$（6×10^{8}ＶＰ、5.5×10^{4}ＰＦＵ）または5.0×10^{4}ＴＣＩＤ$_{50}$（6×10^{7}ＶＰ、5.5×10^{3}ＰＦＵ）の

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を負荷した、このＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２は、ＵＳＡ－ＷＡ１／２０２０（ＮＲ－５２２８１；ＢＥＩ　Ｒｅｓｏｕｒｃｅｓ）[10]を１継代したものに由来した。ウイルスを、鼻腔内（ＩＮ）経路により１００μＬ（各鼻孔に５０μＬ）で投与した。体重を毎日評価した。免疫学的およびウイルス学的アッセイはすべて盲検で実施した。４日目に、動物のサブセットを、組織ウイルス量および病理のために安楽死させた。動物研究はすべて、すべての関連する地方、州、および連邦規制に準拠して実施し、Ｂｉｏｑｕａｌの施設内動物管理使用委員会（ＩＡＣＵＣ）の承認を受けた。

【０５９５】

Ａｄ２６ベクター。Ａｄ２６ベクターを、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク（Ｓ）タンパク質配列（Ｗｕｈａｎ／ＷＩＶ０４／２０１９；Ｇｅｎｂａｎｋ　ＭＮ９９６５２８．１）の２つのバリアントを用いて構築した。配列をコドン最適化し合成した。複製不全Ｅ１／Ｅ３欠失Ａｄ２６ベクター[19]を、全長Ａｄ２６ベクターゲノムおよび導入遺伝子発現カセットを含むプラスミドを使用してＰＥＲ．Ｃ６．ＴｅｔＲ細胞で産生した。シャム対照は、Ａｄ２６－空ベクターを含んでいた。ベクターを配列決定し、使用前に発現を試験した。

【０５９６】

組織病理学および免疫組織化学。組織を、新たに調製した４％パラホルムアルデヒドで２４時間固定し、７０％エタノールに移し、７～１０日以内にパラフィン包埋し、ブロックを５μｍに切片化した。スライドを６５℃で３０～６０分間焼成し、次いでキシレンで脱パラフィンし、エタノールから蒸留水へと段階的に再水和した。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－Ｎ、Ｉｂａ－１、およびＣＤ３　ＩＨＣの場合、クエン酸塩緩衝液（Ｔｈｅｒｍｏ；ＡＰ－９００３－５００）中で２５分間、蒸気設定の圧力鍋を使用して熱誘導エピトープ賦活化（ＨＩＥＲ）を実施し、続いて３％過酸化水素で処理した。次いで、スライドを蒸留水ですすぎ、タンパク質を１５分間ブロッキングし（ＢｉｏＣａｒｅ、ＢＥ９６５Ｈ）、続いて１×リン酸緩衝食塩水ですすいだ。一次ウサギ抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ核タンパク質抗体（Ｎｏｖｕｓ；ＮＢ１００－５６５７６、１：５００または１：１０００）、ウサギ抗Ｉｂａ－１抗体（Ｗａｋｏ；０１９－１９７４１、１：５００）、またはウサギ抗ＣＤ３（Ｄａｋｏ；Ａ０４５２、１：３００）を３０分間アプライし、続いてウサギＭａｃｈ－２ＨＲＰ－ポリマー（ＢｉｏＣａｒｅ；ＲＨＲＰ５２０Ｌ）を３０分間アプライし、次いでヘマトキシリンで対比染色し、続いて０．２５％アンモニア水を使用してブルーイングした。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－Ｎ、Ｉｂａ－１、およびＣＤ３の標識は、Ｂｉｏｇｅｎｅｘ　ｉ６０００自動染色装置（ｖ３．０２）で実施した。一部の場合では、ＣＤ３、Ｉｂａ－１、およびＡＣＥ－２染色は、１：４００のＣＤ３（Ｔｈｅｒｍｏ　カタログ番号ＲＭ－９１０７－Ｓ；クローンＳＰ７）、１：５００のＩｂａ－１（ＢｉｏＣａｒｅ　カタログ番号ＣＰ２９０Ａ；ポリクローナル）、またはＡＣＥ－２（Ａｂｃａｍ；ａｂ１０８２５２）で実施した。これらはすべて、ウサギＰｏｌｉｎｋ－１　ＨＲＰ（ＧＢＩ　Ｌａｂｓ　カタログ番号Ｄ１３－１１０）を使用して検出した。好中球（ＭＰＯ）および１型ＩＦＮ応答（Ｍｘ１）は、ウサギＰｏｌｉｎｋ－１　ＨＲＰを使用して１：１０００のＭＰＯ検出（Ｄａｋｏ　カタログ番号Ａ０３９８；ポリクローナル）で、およびマウスＰｏｌｉｎｋ－２　ＨＲＰ（ＧＢＩ　Ｌａｂｓ　カタログ番号Ｄ３７－１１０）を使用して１：１０００のＭｘ１検出（ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　カタログ番号ＭＡＢＦ９３８；クローンＭ１４３／ＣＬ１４３）で実施した。ＣＤ３、Ｉｂａ－１、ＭＰＯ、およびＭｘ１　ＩＨＣの染色は、以前に記載の通り、Ｂｉｏｃａｒｅ　ｉｎｔｅｌｌｉＰＡＴＨ自動染色装置を使用し、すべての抗体を室温で１時間インキュベートして実施した。組織病理は、２人の獣医病理学者が独立して評価した。

【０５９７】

ＲＮＡＳＣＯＰＥ（登録商標）ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション。ＲＮＡＳＣＯＰＥ（登録商標）ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーションを、以前に記載の通り[10]、プラス鎖ウイルスＲＮＡを標的とするＳＡＲＳ－ＣｏＶ２アンチセンス特異的プローブｖ－ｎＣｏＶ２０１９－Ｓ（ＡＣＤ　カタログ番号８４８５６１）およびマイナス鎖ゲノムウ

イルスＲＮＡを標的とするＳＡＲＳ－ＣｏＶ２センス特異的プローブｖ－ｎＣｏＶ２０１９－ｏｒｆ１ａｂ－ｓｅｎｓｅ（ＡＣＤ　カタログ番号８５９１５１）を使用して実施した。手短に言えば、スライドをキシレンで脱パラフィンし、エタノールから蒸留水へと段階的に再水和した後、ＡＣＤ　Ｐ２賦活化緩衝液（ＡＣＤ　カタログ番号３２２０００）中にて３０分間９５～９８℃で賦活化を実施し、続いてＰＢＳで１：１０に希釈したプロテアーゼＩＩＩ（ＡＣＤ　カタログ番号３２２３３７）を用いて２０分間４０℃で処理した。次いで、スライドを、ＰＢＳ中３％のH_2O_2と共に室温で１０分間インキュベートした。ハイブリダイゼーションの前に、微量遠心分離機を使用してプローブストックを１３，０００ｒｐｍで１０分間遠心分離し、次いでプローブ希釈液（ＡＣＤ　カタログ番号３００００４１）で１：２に希釈して、プローブ凝集組織アーチファクトを低減させた。ＲＮＡＳＣＯＰＥ（登録商標）２．５ＨＤ検出試薬－ＲＥＤ（ＡＣＤ　カタログ番号　３２２３６０）を使用してスライドを発色させた。

【０５９８】

定量的画像分析。各動物の少なくとも１つの肺葉断面に対して、ＨＡＬＯソフトウェア（ｖ２．３．２０８９．２７またはｖ３．０．３１１．４０５；Ｉｎｄｉｃａ　Ｌａｂｓ）を使用して定量的画像分析を実施した。＞１の断面が利用可能な場合、各肺葉を個々のデータポイントとして定量化した。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－Ｎについては、マルチプレックスＩＨＣ　ｖ２．３．４アルゴリズムを、酸性ヘマチンの除外スクリーニングと共に使用して、ＳＡＲ－Ｎタンパク質陽性細胞のパーセンテージを細胞総数の割合として決定した。Ｉｂａ－１については、マルチプレックスＩＨＣ　ｖ２．３．４アルゴリズムを定量化に使用した。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＲＮＡＳＣＯＰＥ（登録商標）ＩＳＨおよびＭｘ１の定量化では、Ａｒｅａ　Ｑｕａｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｖ２．１．３モジュールを使用して、総ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２アンチセンスもしくはセンスプローブまたはＭｘ１タンパク質のパーセンテージを総組織面積の割合として決定した。ＭＰＯ（好中球）およびＣＤ３＋細胞の定量化の場合、血管（＞５mm^2）、気管支、細気管支、軟骨、および結合組織を除外するようにスライドを注釈付けし、その後、Ｃｙｔｏｎｕｃｌｅａｒ　ｖ１．６モジュールを使用して、ＭＰＯ＋またはＣＤ３＋細胞を検出し、総肺胞組織（ＰＭＮ／mm^2）の割合として算出した。これは、Ａｒｅａ　Ｑｕａｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｖ２．１．３モジュールを実行することにより決定した。すべての場合において、注釈が正確であることを確認するため、各試料に対してすべての画像の手動検査を実施した。

【０５９９】

サブゲノムｍＲＮＡアッセイ。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｅ遺伝子サブゲノムｍＲＮＡ（ｓｇｍＲＮＡ）を、以前に記載の通り、プライマーおよびプローブを使用したＲＴ－ＰＣＲにより評価した[10、11、23]。手短に言えば、ＱＩＡｃｕｂｅ　ＨＴ（Ｑｉａｇｅｎ）およびＲＮｅａｓｙ　９６　ＱＩＡｃｕｂｅ　ＨＴキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して、いくつかの解剖学的部位に由来する組織ホモジネートから全ＲＮＡを抽出した。ｐｃＤＮＡ３．１発現プラスミドにクローニングされたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｅ遺伝子ｓｇｍＲＮＡを使用して標準曲線を作成した。このインサートを、ＡｍｐｌｉＣａｐ－ＭａｘＴ７　Ｈｉｇｈ　Ｙｉｅｌｄ　Ｍｅｓｓａｇｅ　Ｍａｋｅｒキット（Ｃｅｌｌｓｃｒｉｐｔ）を使用して転写した。ＲＴ－ＰＣＲ前に、製造元の使用説明書に従ってＳｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ　ＩＩＩ　ＶＩＬＯ　（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して、負荷した動物から収集した試料または標準物質を逆転写した。Ｅ遺伝子ｓｇｍＲＮＡを標的とする配列を使用して、Ｔａｑｍａｎカスタム遺伝子発現アッセイ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を設計した。反応を、製造元の仕様に従ってＱｕａｎｔＳｔｕｄｉｏ６および７ＦｌｅｘリアルタイムＰＣＲシステム（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）で実施した。標準曲線を使用して、組織１グラム当たりのｓｇｍＲＮＡコピー数を算出した。定量アッセイの感度は１００コピーであった。

【０６００】

ＥＬＩＳＡ。ＲＢＤ特異的結合性抗体を、本質的に記載の通りにＥＬＩＳＡにより評価した[10、11]。手短に言えば、９６ウェルプレートを、１×ＤＰＢＳ中１μｇ／ｍＬの

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＲＢＤタンパク質（Ａａｒｏｎ　Ｓｃｈｍｉｄｔ、ＭａｓｓＣＰＲ）または１μｇ／ｍＬのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク（Ｓ）タンパク質（Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ）でコーティングし、４℃で一晩インキュベートした。インキュベーション後、プレートを洗浄緩衝液（１×ＤＰＢＳ中０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０）で１回洗浄し、３５０μＬカゼインブロッキング液／ウェルで２～３時間室温にてブロッキングした。インキュベーション後、ブロッキング溶液を廃棄し、プレートをブロット乾燥した。カゼインブロッキング液による熱不活化血清の３倍系列希釈物をウェルに添加し、プレートを室温で１時間インキュベートし、プレートを３回洗浄し、次いでその後、カゼインブロッキング液中０．１μｇ／ｍＬの抗ハムスターＩｇＧ　ＨＲＰ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）と共に暗所にて室温で１時間インキュベートした。プレートを３回洗浄し、次いで１００μＬのＳＥＲＡＣＡＲＥ（登録商標）ＫＰＬ　ＴＭＢ　ＳＵＲＥＢＬＵＥ（登録商標）開始溶液を各ウェルに添加した。１ウェル当たり１００μＬのＳＥＲＡＣＡＲＥ（登録商標）ＫＰＬ　ＴＭＢ停止溶液を添加することにより、プレート発色を停止させた。ＶＥＲＳＡＭＡＸ（登録商標）またはＯＭＥＧＡ（登録商標）マイクロプレートリーダーを使用して、４５０ｎｍの吸光度を記録した。ＥＬＩＳＡエンドポイント力価は、バックグラウンドの２倍を上回る吸光度がもたらされた最も高い血清希釈の逆数と規定した。

【０６０１】

偽ウイルス中和アッセイ。ルシフェラーゼレポーター遺伝子を発現するＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２偽ウイルスを、以前の記載と同様の手法で生成した[10、11、21]。手短に言えば、パッケージング構築物ｐｓＰＡＸ２（ＡＩＤＳ　Ｒｅｓｏｕｒｃｅ　ａｎｄ　Ｒｅａｇｅｎｔ　Ｐｒｏｇｒａｍ）、ルシフェラーゼレポータープラスミドｐＬｅｎｔｉ－ＣＭＶ　Ｐｕｒｏ－Ｌｕｃ（Ａｄｄｇｅｎｅ）、およびスパイクタンパク質発現ｐｃＤＮＡ３．１－ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２　ＳΔＣＴを、リポフェクタミン２０００（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）によりＨＥＫ２９３Ｔ細胞に共トランスフェクトした。トランスフェクションの４８時間後に、偽型ウイルスを含む上清を収集した。偽型ウイルスを、０．４５μｍフィルターで濾過することにより精製した。ワクチン接種動物に由来する抗血清の中和活性を決定するために、ＨＥＫ２９３Ｔ－ｈＡＣＥ２細胞を、９６ウェル組織培養プレートに１．７５×10^4細胞／ウェルの密度で一晩播種した。熱不活化血清試料の３倍系列希釈物を調製し、５０μＬの偽ウイルスと混合した。混合物を３７℃で１時間インキュベートしてから、ＨＥＫ２９３Ｔ－ｈＡＣＥ２細胞に添加した。感染の４８時間後、細胞を、ＳＴＥＡＤＹ－ＧＬＯ（登録商標）ルシフェラーゼアッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ）で製造元の使用説明書に従って溶解した。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和力価を、ウイルス対照ウェルの平均と比べてＲＬＵの５０％低減が観察された試料希釈として規定した。

【０６０２】

ルミネックス。抗原特異的抗体価の相対量を検出するために、カスタマイズされたルミネックスアッセイを以前に記載の通り実施した[25]。これにより、蛍光標識ミクロスフェア（Ｌｕｍｉｎｅｘ）を、スパイクタンパク質（Ｓ）（Ｅｒｉｃ　Ｆｉｓｃｈｅｒ、Ｄａｎａ　Ｆａｒｂｅｒ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）、Ｓ１、およびＳ２（Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ）、ならびに受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）（Ａａｒｏｎ　Ｓｃｈｍｉｄｔ、Ｒａｇｏｎ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）を含むＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２抗原と、ＥＤＣ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）およびスルホ－ＮＨＳ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）による共有結合Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）－エステル連結を介してカップリングした。１領域当たり１．２×10^3個ビーズおよび抗原を３８４ウェルプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ）に添加し、希釈した血清（ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ３、ＩｇＭの場合は１：９０、全ＩｇＧおよびＦｃ受容体結合アッセイの場合は１：５００）と共に９００ｒｐｍで振盪しながら４℃で１６時間インキュベートした。免疫複合体の形成後、自動プレート洗浄機（Ｔｅｃａｎ）を使用して、ミクロスフェアを０．１％ＢＳＡおよび０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０（ルミネックスアッセイ緩衝液）で３回洗浄した。ＰＥ標識ヤギ抗マウスＩｇＧ、ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ３、およびＩｇＭ検出抗体（ｓｏｕ

ｔｈｅｒｎ　ｂｉｏｔｅｃｈ）をルミネックスアッセイ緩衝液で０．６５ｕｇ／ｍＬに希釈し、ビーズと共に９００ｒｐｍで振盪しながら室温で１時間インキュベートした。同様に、Ｆｃ受容体結合プロファイルについては、組換えマウスＦｃγＲ２、ＦｃγＲ３、およびＦｃγＲ４（Ｄｕｋｅ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　ｆａｃｉｌｉｔｙ）を、試料に添加する前に、ビオチン化し（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、１０分間ストレプトアビジン－ＰＥにコンジュゲートした（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）。こうしたマウス抗体およびタンパク質は、ハムスターに対して交差反応性である。次いで、コーティングしたビーズを洗浄し、ロボットアーム（ＰＡＡ）が取り付けられたフローサイトメーターｉＱｕｅ（Ｉｎｔｅｌｌｉｃｙｔ）で読み取った。各ビーズ領域のイベントをゲーティングし、ビーズ陽性イベントのＰＥの蛍光中央値を報告した。試料は、各二次検出試薬１つ当たり２連で実験した。

【０６０３】

抗体依存性補体沈着（ＡＤＣＤ）。ＡＤＣＤアッセイを、以前に記載の通りに実施した[26]。手短に言えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＳおよびＲＢＤをビオチン化し（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）、１μｍ赤色蛍光ニュートラアビジンビーズ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）に３７℃で２時間カップリングし、その後過剰な抗原を洗い流した。免疫複合体の形成については、１．８２×10^8個の抗原コーティングビーズを、９６ウェル丸底プレートの各ウェルに添加し、１：１０希釈試料と共に３７℃で２時間インキュベートした。凍結乾燥モルモット補体を、製造元（Ｃｅｄａｒｌａｎｅ）の使用説明書に従って水で再構成し、１ウェル当たり４μＬを、Ｍｇ２＋およびＣａ２＋を含むゼラチンベロナール緩衝液（ＧＶＢ＋＋、Ｂｏｓｔｏｎ　ＢｉｏＰｒｏｄｕｃｔｓ）中の免疫複合体に３７℃で２０分間添加した。免疫複合体を、ＰＢＳ中１５ｍＭのＥＤＴＡで洗浄し、モルモット補体Ｃ３に対するフルオレセインコンジュゲートヤギＩｇＧ画分（ＭｐＢｉｏ）を添加した。染色後、試料を、４％パラホルムアルデヒド（ＰＦＡ）で固定し、ロボットアーム（ＰＡＡ）を使用したフローサイトメトリー（Ｉｎｔｅｌｌｉｃｙｔ、ｉＱｕｅ　Ｓｃｒｅｅｎｅｒ　ｐｌｕｓ）により試料取得を実施した。イベントはすべて、単一細胞およびビーズ陽性イベントでゲーティングした。Ｃ３陽性イベントの中央値が報告されている。試料すべては、別々の日に２連で実験した。

【０６０４】

統計分析。免疫学的データ、ウイルス学的データ、および体重データの分析は、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ８．４．２（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ）を使用して実施した。群間のデータの比較は、両側マン－ホイットニー検定を使用して実施した。死亡率は、両側フィッシャー直接検定により評価した。相関性は、両側スピアマン順位相関検定により評価した。０．０５未満のＰ値を有意とみなした。システム血清学データはすべて、log_{10}に変換した。レーダープロットでは、群内の中央値を使用する前に、群全体で最小値が０、最大値が１になるように各抗体特徴を正規化した。多変量プロファイルを比較するために、Ｒパッケージの「ｒｏｐｌｓ」を使用して主成分分析（ＰＣＡ）を構築した。ヒートマップでの視覚化では、Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰ群およびＳ．ＰＰ群のｚスコア化特徴の平均値の違いを示した。ヒートマップにおいて有意性を示すために、Ｂｅｎｊａｍｉｎｉ－Ｈｏｃｈｂｅｒｇ補正を使用して、行内の多重比較を補正した。

【０６０５】

結果および考察

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２は、非ヒト霊長類[8～10]、ハムスター[5～7]、フェレット[14～16]、ｈＡＣＥ２トランスジェニックマウス[17、18]、および他の種[16]に感染することができるが、こうしたモデルにおける臨床疾患は一般に軽症である。重症肺炎モデルは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ワクチンおよび他の対策の前臨床評価に有用であると考えられる。なぜならば、ヒトにおけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染症は、重症臨床疾患、呼吸不全、および死亡に結び付く可能性があるからである[1～4]。ハムスターにおける高用量ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染の臨床的およびウイルス学的特徴を評価し、安定化ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク（Ｓ）をコードするＡｄ２６ベクターベースワクチン[19]の保護有効性を、こ

のストリンジェントモデルで評価した。

【０６０６】

２０匹のシリアンゴールデンハムスター（１０～１２週齢）に、5×10^{4}ＴＣＩＤ$_{50}$（Ｎ＝４；低用量）または5×10^{5}ＴＣＩＤ$_{50}$（Ｎ＝１６；高用量）のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を鼻腔内経路で接種した。高用量群では、組織ウイルス量および組織病理のために、４匹の動物を２日目に剖検し、４匹の動物を４日目に剖検し、残りの８匹の動物を縦断的に追跡した。１４日目に残りの動物をすべて剖検した。低用量群では、ハムスターは、６日目までに中央値で体重の１４．７％を失ったが、１４日目までには完全に回復した（図５５Ａ～５５Ｂ）。これは以前の研究と一致する[5～7]。高用量群では、ハムスターは６日目までに中央値で体重の１９．９％を失った。縦断的に追跡したこの群の８匹の動物のうち４匹は、６日目に＞２０％体重減少および呼吸促迫というＩＡＣＵＣ人道的安楽死基準を満たし、追加の２匹は７日目にこうした基準を満たした。残りの２匹の動物は１４日目までに回復した。こうしたデータは、ハムスターにおける高用量ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染が重症体重減少および部分的死亡に結び付いたことを示している。

【０６０７】

高用量ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を受け取り、２日目に剖検された４匹動物、および４日目に剖検された４匹の動物、および６～７日目に安楽死基準を満たした６匹中５匹の動物の組織ウイルス量を評価した（図５５Ｃ）。２日目に、肺組織では10^{12}ＲＮＡコピー／ｇ、鼻孔および気管では10^{8}～10^{9}ＲＮＡコピー／ｇという高い組織ウイルス量中央値が観察され、心臓、胃腸管、脳、脾臓、肝臓、および腎臓では、中央値は10^{5}～10^{8}ＲＮＡコピー／ｇであった。これは播種性感染症であることを示している。体重減少が続いていたにもかかわらず、組織ウイルス量は、６～７日目までに約２ｌｏｇ低下した。

【０６０８】

高用量ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に感染したハムスターを、２日目（Ｎ＝４）、４日目（Ｎ＝４）、６～７日目（Ｎ＝６）、および１４日目（Ｎ＝２）に組織病理により評価した。感染は、鼻甲介および細気管支上皮の顕著な炎症性浸潤および多巣性上皮壊死を伴い（図５６Ａ）、内腔に変性好中球および細胞残渣をもたらした（図５６Ｂ）。近隣血管の内皮は、単核細胞が内皮に付着し、血管壁内で遊走することに反応し、内皮炎を示した（図５６Ｂ）。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染後早くも２日目に肺実質の３０～６０％に影響を及ぼす肺硬化により特徴付けられる中等症～重症多巣性間質性肺炎が存在していた（図５６Ｃ）。炎症性浸潤物は、大量のマクロファージおよび好中球で構成され、リンパ球は少なかった。鼻甲介上皮（図５６Ｄ）および細気管支上皮細胞（図５６Ｅ）は、炎症および壊死の領域において、免疫組織化学（ＩＨＣ）的に、ＳＡＲＳヌクレオカプシドタンパク質（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－Ｎ）に対して強力に陽性であった。また、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－Ｎ ＩＨＣでは、マクロファージと形態学的に一致する、肺胞中隔および間質性単核細胞の局所的に著しい染色が示された（図５６Ｆ）。同様に、かなりのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスＲＮＡ（ｖＲＮＡ）が、炎症領域の細気管支上皮および肺間質で観察された（図５６Ｇ～５６Ｈ）。

【０６０９】

肺におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ ｖＲＮＡおよびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－Ｎタンパク質の発現レベルは両方とも、２日目に最も高く、４日目までに減少し、７日目までには最小限のｖＲＮＡおよびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－Ｎタンパク質しか検出されなかった（図５７Ａ～５７Ｂ）。肺炎は、肺間質ならびにＣＤ３＋Ｔリンパ球におけるＩｂａ－１＋マクロファージの大きな炎症性浸潤により特徴付けられた（図５６Ｉ～５６Ｊ）。数多くの生存および変性好中球が、肺全体に、特に壊死領域で検出され、肺全体で好中球ミエロペルオキシダーゼ（ＭＰＯ）が高度に発現された（図５６Ｋ）。また、インターフェロン誘導性遺伝子産物であるＭＸ１のびらん性発現が肺で検出された（図５６Ｌ）。２日目にピークに達したＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ ｖＲＮＡおよびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－Ｎ検出の動力学とは対照的に、こうした炎症マーカーは７日目にピークに達し（図５７Ｃ～５７Ｆ）、それと一致して体重減少および死亡率も最も高かった（図５５Ａ～５５Ｂ）。ＲＮＡＳＣＯＰＥ（登録

商標）によりｖＲＮＡが肺において検出されたことは、単にウイルス接種を反映したものではない。なぜならば、マイナス鎖ｖＲＮＡ（５８Ａ～５８Ｅ）だけでなく、プラス鎖ｖＲＮＡも検出され（図５８Ｆ～５８Ｊ）、検出は、負荷後２日目から７日目まで場所もパターンも重複していたからである。肺には、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ｖＲＮＡ発現（アンチセンス鎖およびセンス鎖の両方）が存在し、ＡＣＥ２受容体発現はロバストであった（図５８Ｋ～５８Ｏ）。

【０６１０】

全身性ｖＲＮＡは、脳幹、胃腸管、および心筋を含む遠位組織でも検出された（図５９Ａ～５９Ｆ）。こうした組織では、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－Ｎ染色は最小限であったにも関わらず、マクロファージおよびリンパ球による顕著な内皮炎および血管周囲炎が観察された（図５９Ｇ～５９Ｊ）。限局性リンパ球性心筋炎が１匹の動物で認められ、ｖＲＮＡの存在に対応していた（図５９Ｋ～５９Ｌ）。ウイルスが検出された他の部位としては、肺の血栓中の末梢血単核細胞（図６０Ａ～６０Ｃ）および鼻甲介の骨髄（図６０Ｄ～６０Ｆ）が挙げられる。

【０６１１】

（ｉ）フォールドン三量化ドメインを有する可溶性エクトドメインを反映する膜貫通領域および細胞質尾部が欠失されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク（Ｓ）（Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰ（ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン）または（ｉｉ）完全長Ｓ（Ｓ．ＰＰ（Ａｄ２６　ＳＳ－スパイク－ｄＦ－ＰＰ））をコードする組換え複製不全Ａｄ２６ベクターを産生させた。これらは両方ともフューリン切断部位の突然変異および２つのプロリン安定化突然変異を有していた[20]（図６１Ａ）。最近、アカゲザルにおけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷に対するこうしたワクチンの免疫原性および保護有効性が報告された[13]。

【０６１２】

５０匹のシリアンゴールデンハムスターを、Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰまたはＳ．ＰＰ（Ｎ＝１０／群）またはシャム対照（Ｎ＝１０）をコードする10^{10}または10^{9}ウイルス粒子（ｖｐ）のＡｄ２６ベクターで免疫化した。動物は、０週目に筋肉内経路による単回ワクチン接種を受けた。２週目および４週目の動物において、受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）特異的結合性抗体がＥＬＩＳＡにより観察され[10、11]（図６１Ｂ）、中和抗体（ＮＡｂ）が偽ウイルス中和アッセイにより観察された[10、11、21]（図６１Ｃ）。４週目に、Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰは、Ａｄ２６－Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰ（Ａｄ２６　ＳＳ－Ｓ．Ｅｃｔｏ－ｄＦ－ＰＰ－フォールドン）（１０１４、１１８５）と比較して４．０～４．７倍高いＥＬＩＳＡ力価中央値（４４７０、４７５７）を誘発した（図６１Ｂ；Ｐ＜０．０００１、両側マン－ホイットニー検定）。同様に、Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰは、Ａｄ２６－Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰ（１３９、２１１）と比較して、１．８～２．６倍高いＮＡｂ　ＩＣ５０力価中央値（３５９、３７５）を誘発した（Ｐ＜０．０５、両側マン－ホイットニー検定）。各ベクターについて、試験した２つの用量は同等であると考えられた。第２週および第４週の両方においてＥＬＩＳＡおよびＮＡｂデータは相関していた（それぞれ、Ｒ＝０．７０７４、Ｐ＜０．０００１、およびＲ＝０．７８４９、Ｐ＜０．０００１、両側スピアマン順位相関検定；図６２Ａ）。

【０６１３】

Ｓ特異的およびＲＢＤ特異的抗体応答を、システム血清学により４週目のワクチン接種動物で特徴付けた[22]。ＩｇＧ、ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ３、ＩｇＭ、Ｆｃ受容体ＦｃＲγ２、ＦｃＲγ３、およびＦｃＲγ４、ならびに抗体依存性補体沈着（ＡＤＣＤ）応答を評価した（図６１Ｄ～６１Ｆ）。Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰでは、Ａｄ２６．Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰと比較してより高くより一貫した応答が観察され（図６１Ｄ、６１Ｆ）、こうした抗体特徴の主成分分析により、こうした２つのワクチンが異なるプロファイルを有していたことが確認された（図６１Ｅ）。

【０６１４】

４週目に、すべての動物に、5×10^{5}ＴＣＩＤ$_{50}$のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を鼻腔内

経路で負荷した。４日目に、各群３匹の動物を組織ウイルス量および組織病理のために剖検し、各群の残り７匹の動物を１４日目まで追跡した。シャム対照では、ハムスターは、７日目までに中央値で１９．６％の体重を失い、縦断的に追跡した動物の４３％（７匹中３匹）が６～７日目に安楽死基準を満たした（図６３Ａ～６３Ｂ）。Ａｄ２６－Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰワクチン接種動物は、中央値で８．７％の体重を失い、Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰワクチン接種動物は中央値で４．０％の体重を失った（図６３Ａ～６３Ｂ）。最大体重減少パーセントは、シャム対照と比較して、両ワクチン接種群において顕著により低く（Ｐ＜０．０００１、両側マン－ホイットニー検定；図６３Ｃ）、Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰを受け取った動物は、Ａｄ２６．Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰを受け取った動物よりも少ない体重減少を示した（Ｐ＜０．０００１、両側マン－ホイットニー検定；図６３Ｃ）。両ワクチンは、シャム対照と比較して、人道的安楽死基準を満たすことであると規定される死亡に対する保護を示した（Ｐ＝０．０２、両側フィッシャー直接検定；図６２Ｂ）。２つのハムスター実験を複合的に分析すると、両ワクチンが死亡に対する効果的な保護を示すことが確認された（Ｐ＝０．００７、両側フィッシャー直接検定；図６２Ｃ）。２週目（Ｒ＝－０．８９９２、Ｐ＜０．０００１）および４週目（Ｒ＝－０．９３４４、Ｐ＜０．０００１）のＥＬＩＳＡ応答は、最大体重減少パーセントと逆相関した（図６４Ａ）。２週目（Ｒ＝－０．７３８０、Ｐ＜０．０００１）および４週目（Ｒ＝－０．８０７５、Ｐ＜０．０００１）のＮＡｂ応答も、最大体重減少パーセントと逆相関した（図６４Ｂ）。

【０６１５】

組織ウイルス量を、４日目に剖検した動物のサブセットおよび１４日目の残りの生存動物で評価した。高用量ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷後の４日目には、すべての動物の組織で、サブゲノムＲＮＡ　ＲＴ－ＰＣＲによりウイルスが検出された。サブゲノムＲＮＡ　ＲＴ－ＰＣＲは、ウイルス複製を測定すると考えられている[10、23]（図６５Ａ）。肺組織のウイルス量中央値は、Ａｄ２６－Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰワクチン接種動物での10^8ＲＮＡコピー／ｇ、Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰワクチン接種動物での10^6ＲＮＡコピー／ｇと比較して、シャム対照では、およそ10^{12}ＲＮＡコピー／ｇであった。１４日目まで、生存シャム対照の肺および鼻孔ではウイルスが依然として検出されたが、Ａｄ２６－Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰワクチン接種動物の少数にのみウイルスが観察され、Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰワクチン接種動物ではウイルスは観察されなかった（図６５Ｂ）。

【０６１６】

２週目（Ｒ＝－０．８１３３、Ｐ＝０．０００４）および４週目（Ｒ＝－０．９２８８、Ｐ＜０．０００１）のＥＬＩＳＡ応答は、４日目の肺ウイルス量（図６６Ａ）と、ならびに２週目（Ｒ＝－０．７４６９、Ｐ＝０．００２０）および４週目（Ｒ＝－０．６００４、Ｐ＝０．０１９９）のＮＡｂ応答は、４日目の肺ウイルス量と逆相関した（図６６Ｂ）。ＥＬＩＳＡおよびＮＡｂ応答は、鼻甲介のウイルス量とも逆相関した（図６６ｃ、６６ｄ）。免疫相関性のより深い分析により、複数の抗体特徴が、体重減少および組織ウイルス量と逆相関したことが明らかになった（図６７Ａ）。

【０６１７】

ワクチン接種動物は、負荷後４日目にシャム対照と比較して病理の減少も示した（図６８）。Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰワクチン接種動物は、ウイルス性間質性肺炎、細気管支上皮の破壊、またはＣＤ３＋Ｔリンパ球およびマクロファージの細気管支周囲凝集体の証拠を最小限しかまたはまったく示さなかった。組織球および好中球炎症性浸潤は、すべての肺葉で顕著に低減され、Ａｄ２６－Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰおよびＡｄ２６－Ｓ．ＰＰワクチン接種ハムスターでは、シャム対照と比較して、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ｖＲＮＡが有意に低減された（それぞれ、Ｐ＝０．００４およびＰ＝０．００４、両側マン－ホイットニー検定；図６３Ｄ）。

【０６１８】

生存シャム対照は、負荷後１４日目までに強力な結合性および中和抗体応答を発生させた（図６７Ｂ）。また、ワクチン接種動物は、負荷後に、より高いＥＬＩＳＡおよびＮＡｂ応答を示し（図６７Ｂ）、組織ウイルス量が、高用量ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷後のこ

うした動物において低く一過性レベルのウイルス複製を示したことと一致した。

【０６１９】

この研究では、完全長融合前安定化Ｓ免疫原（Ｓ．ＰＰ）をコードするＡｄ２６ベクターの単回免疫化が、ハムスターにおける高用量ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷後の重症臨床疾患に対する保護を示すことが実証された。シャム対照は、顕著な体重減少、重症肺炎、および部分的死亡を示した。対照的に、ワクチン接種動物は、最小限の体重減少および肺炎を示し、死亡はなかった。ワクチン誘発性結合性および中和抗体応答は、臨床疾患に対する保護、ならびに上気道および下気道におけるウイルス複製の低減と相関していた。

【０６２０】

このモデルにおける臨床疾患のこの重症度は、ハムスター[5～7]および他の種[8～10、14～18]におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染に関する以前の研究とは対照的である。ハムスターは、ヒトＡＣＥ２受容体と相同性である結果としてＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の許容モデルであり[5]、ハムスター間の伝染が報告されている[6]。動物年齢、動物起源、および負荷ストックなどの、臨床疾患の程度に影響を及ぼす可能性のある生物学的要因は、厳密にはまだ研究されていないが、高負荷用量は、本研究において広範な臨床疾患をもたらした。

【０６２１】

非ヒト霊長類でのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ワクチン研究では、現在までに、感染に対する保護または上気道および下気道でのウイルス複製の低減が実証されている[11、12]。最近、Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰの単回免疫化は、アカゲザルにおいてＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷に対する完全なまたはほぼ完全な保護を提供することが報告された[13]。しかしながら、非ヒト霊長類におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染は、重症臨床疾患または死亡をもたらさない[8～10]。ウイルス複製に対する保護は、必ずしも重症疾患に対する保護を意味するわけではないため、重症疾患モデルは、現行の非ヒト霊長類負荷モデルを補完するために有用であるだろう。実際、本研究におけるハムスターの組織病理学的分析では、肺のウイルス量は、２日目から７日目まで減少したが、炎症マーカーは、この期間中増加し続け、継続的な体重減少と相関していた。こうしたデータは、ハムスターにおける進行性臨床疾患は、主に、感染により引き起こされるが、ウイルス複製が減少した場合でも増加し続ける炎症プロセスであることを示唆する。

【０６２２】

ヒトのＣＯＶＩＤ－１９は重症臨床疾患に進行する可能性があるため、劇症肺炎および死亡を含む重症臨床疾患を再現する前臨床モデルにおいてＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ワクチン候補を試験することが重要である。本明細書に記載の高用量ハムスターモデルは、こうした基準の多くを達成しているため、特に重症疾患の病態形成に関してヒト疾患および処置に有用なモデルである。このモデルにおける臨床疾患の主な所見は、ある特定のｈＡＣＥ２トランスジェニックマウスモデルで報告されている脳炎ではなく、重症肺炎であった[2～4]。さらに、結合性および中和抗体応答は保護と相関していた。

【０６２３】

まとめると、こうしたデータは、Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰの単回免疫化が、ヒトにおける疾患の発症および進行を緊密に近似する動物モデルにおいて、高用量ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染後の重症臨床疾患に対してロバストな保護を提供することを示している。重症ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２肺炎および死亡に対するそのようなワクチン保護は、これまで報告されていない。Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓとも称されるＡｄ２６－Ｓ．ＰＰは、現在、臨床試験で評価中である。このハムスター重症疾患モデルは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ワクチン、療法、および他の対策の試験にも使用することができる。

【０６２４】

参考文献

【０６２５】

【表５－１】

1 Li, Q. *et al.* Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *N Engl J Med*, doi:10.1056/NEJMoa2001316 (2020).

2 Zhu, N. *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 382, 727-733, doi:10.1056/NEJMoa2001017 (2020).

3 Chen, N. *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* 395, 507-513, doi:10.1016/S0140-6736(20)30211-7 (2020).

4 Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 395, 497-506, doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5 (2020).

5 Chan, J. F. *et al.* Simulation of the clinical and pathological manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. *Clin Infect Dis*, doi:10.1093/cid/ciaa325 (2020).

6 Sia, S. F. *et al.* Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature*, doi:10.1038/s41586-020-2342-5 (2020).

7 Imai, M. *et al.* Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 16587-16595, doi:10.1073/pnas.2009799117 (2020).

8 Munster, V. J. *et al.* Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2. *Nature*, doi:10.1038/s41586-020-2324-7 (2020).

9 Rockx, B. *et al.* Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. *Science*, doi:10.1126/science.abb7314 (2020).

10 Chandrashekar, A. *et al.* SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques. *Science*, doi:10.1126/science.abc4776 (2020).

11 Yu, J. *et al.* DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Science*, doi:10.1126/science.abc6284 (2020).

12 Gao, Q. *et al.* Rapid development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science*, doi:10.1126/science.abc1932 (2020).

13 Mercado, N. B. *et al.* Single-shot Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature*, doi:10.1038/s41586-020-2607-z (2020).

14 Blanco-Melo, D. *et al.* Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell* 181, 1036-1045 e1039, doi:10.1016/j.cell.2020.04.026 (2020).

15 Kim, Y. I. *et al.* Infection and Rapid Transmission of SARS-CoV-2 in Ferrets. *Cell Host Microbe* 27, 704-709 e702, doi:10.1016/j.chom.2020.03.023 (2020).

【０６２６】

【表５－２】

16 Shi, J. *et al.* Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science* 368, 1016-1020, doi:10.1126/science.abb7015 (2020).

17 Bao, L. *et al.* The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature*, doi:10.1038/s41586-020-2312-y (2020).

18 Sun, S. H. *et al.* A Mouse Model of SARS-CoV-2 Infection and Pathogenesis. *Cell Host Microbe* 28, 124-133 e124, doi:10.1016/j.chom.2020.05.020 (2020).

19 Abbink, P. *et al.* Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. *J Virol* 81, 4654-4663, doi:JVI.02696-06 [pii] 10.1128/JVI.02696-06 (2007).

20 Wrapp, D. *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 367, 1260-1263, doi:10.1126/science.abb2507 (2020).

21 Yang, Z. Y. *et al.* A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice. *Nature* 428, 561-564, doi:10.1038/nature02463 (2004).

22 Chung, A. W. *et al.* Dissecting Polyclonal Vaccine-Induced Humoral Immunity against HIV Using Systems Serology. *Cell* 163, 988-998, doi:10.1016/j.cell.2015.10.027 (2015).

23 Wolfel, R. *et al.* Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*, doi:10.1038/s41586-020-2196-x (2020).

24 Netland, J., Meyerholz, D. K., Moore, S., Cassell, M. & Perlman, S. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection causes neuronal death in the absence of encephalitis in mice transgenic for human ACE2. *J Virol* 82, 7264-7275, doi:10.1128/JVI.00737-08 (2008).

25 Brown, E. P. *et al.* High-throughput, multiplexed IgG subclassing of antigen-specific antibodies from clinical samples. *J Immunol Methods* 386, 117-123, doi:10.1016/j.jim.2012.09.007 (2012).

26 Fischinger, S. *et al.* A high-throughput, bead-based, antigen-specific assay to assess the ability of antibodies to induce complement activation. *J Immunol Methods* 473, 112630, doi:10.1016/j.jim.2019.07.002 (2019).

【０６２７】

[実施例１３]

抗原設計

完全長の武漢－ＣｏＶ　Ｓタンパク質の配列に基づくいくつかの抗原を設計した。そのうちの少数が図６９に概略的に示されている。すべての配列は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク完全長タンパク質（ＹＰ＿００９７２４３９０．１　－　配列番号２９）に基づいていた。

【０６２８】

異なる抗原には、ＣＯＲ２００００６、２００００７、および２００００８の天然野生型シグナルペプチド、ｔＰＡシグナルペプチド（ＣＯＲ２００００９、２０００１０、および２０００１１）、またはキメラリーダー配列（ＣＯＲ２０００１８）など、異なるシグナルペプチド／リーダー配列を使用した。

【０６２９】
加えて、構築物の一部は、野生型フューリン切断部位（ｗｔ）（つまり、２００００６、２００００９、および２０００１８）を含み、一部の構築物（つまり、２００００７、２００００８、２０００１０、および２０００１１）では、安定性および発現を最適化するために、フューリン部位アミノ酸配列ＲＲＡＲ（ｗｔ）（配列番号９０および２２４）をＳＲＡＧ（ｄＦｕｒ）（配列番号２２５）に変更することにより、つまり、Ｒ６８２ＳおよびＲ６８５Ｇ突然変異（アミノ酸位置の付番は、アミノ酸配列ＹＰ＿００９７２４３９０　－　配列番号２９の付番による）を導入することにより、フューリン切断部位を除去した。

【０６３０】
構築物の一部では、ヒンジループの９８６位および９８７位に安定化（プロリン）突然変異を導入して、安定性および発現を最適化した。特に、ＣＯＲ２０００７、２０００８、２０００１０、および２０００１１は、Ｋ９８６ＰおよびＶ９８７Ｐ突然変異（アミノ酸位置の付番は、アミノ酸配列ＹＰ＿００９７２４３９０　－　配列番号２９の付番による）を含む。

【０６３１】
最後に、構築物２０００００８および２０００１１では、ＥＲ保持シグナルを欠失させて、つまり、最後の５個のアミノ酸ＫＬＨＹＴ（配列番号２２６）を除去することにより、輸送および発現を最適化した。

【０６３２】
ＣＯＲ２０００１０、２０００１１、および２０００１８を含む、いくつかのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２免疫原設計の発現および抗原性を、細胞ベースＥｌｉｓａ（ＣＢＥ）実験および蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）実験で試験した。

【０６３３】
ＣＢＥでは、１日目に、黒色壁ポリ－Ｄ－リシンコーティングマイクロプレートにＨＥＫ２９３細胞を１００％コンフルエントになるまで播種した。２日目に、リポフェクタミンを使用して細胞にプラスミドをトランスフェクトし、４日目に、細胞ベースＥＬＩＳＡを４℃で実施した。固定ステップは使用しなかった。ＢＭ化学発光ＥＬＩＳＡ基質（Ｒｏｃｈｅ）を使用して、二次抗体を検出した。Ｅｎｓｉｇｈｔ機器を使用して、細胞コンフルエンスおよび発光強度を測定した。

【０６３４】
ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質と交差反応するいくつかのＳＡＲＳ－ＣｏＶ抗体を使用した。抗体ＣＲ３０２２（国際公開第０６／０５１０９１号パンフレットに開示されている）は、低効力でＳＡＲＳ－ＣｏＶを中和することが知られている（Ter Meulen et al. (2006), PLOS Medicine）。抗体ＣＲ３０２２は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を中和しない。抗体ＣＲ３０２２は、少なくとも２つの受容体結合領域（ＲＢＤ）が上向き位置にある場合にのみ結合する（Yuan et al., Science. 2020 Apr 3. pii: eabb7269. doi: 10.1126/science.abb7269. [Epub ahead of print]; Joyce et al. doi: https://doi.org/10.1101/2020.03.15.992883）。ＣＲ３０１５（国際公開第２００５／０１２３６０号パンフレットに開示されている）は、非中和ＳＡＲＳ－ＣｏＶであることが知られている。ＣＲ３０２３、ＣＲ３０４６、ＣＲ３０５０、ＣＲ３０５４、およびＣＲ３０５５も非中和抗体であるとみなされる。結果を図７０に示す。

【０６３５】
図示されている通り、ＣＯＲ２０００１０は、最も高い中和：非中和Ａｂ結合比を示した。このことは、Ｓタンパク質の好ましい抗原性および正しい天然フォールディングを反映しており、したがって、このタンパク質は大部分が融合前様状態にあることを示している可能性がある。こうしたデータおよびＦＡＣＳデータ（図７１を参照）に基づき、ＣＯＲ２０００１１を選択解除し、さらなる試験はしなかった。加えて、ＣＯＲ２０００００８を選択解除した（データ非表示）。

【０６３６】

加えて、６～８週齢のＢａｌｂ／Ｃマウスを、１００ｍｃｇの対応するＤＮＡ構築物または対照としてのリン酸緩衝食塩水で筋肉内免疫化した。免疫後１９日目に、血清ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク特異的抗体価を、組換え可溶性安定化スパイク標的抗原を使用してＥＬＩＳＡにより決定した。フューリン部位ノックアウト（ＫＯ）およびプロリン突然変異（ＰＰ）は、免疫原性を増加させた（フューリンＫＯ＋ＰＰ－Ｓタンパク質に対するＥＬＩＳＡ、図７２を参照）。

【０６３７】

さらに、ＥＲ保持シグナル（ｄＥＲＲＳ）を除去すると、ＣＢＥでのＣＲ３０２２結合が減少し、免疫原性が低減した。

【０６３８】

ＣＢＥにおけるＣＲ３０２２：ＣＲ３０１５結合比（ＦＡＣＳでのＣＯＲ２０００１１データと合わせて）、ＷＢでの発現レベル（データ非表示）、マウスＤＮＡ免疫化後のＥＬＩＳＡ力価（ＣＯＲ２０００００９、ＣＯＲ２０００１０、およびＣＯＲ２０００１１との比較）（データ非表示）、およびＣＯＲ２０００１０ＤＮＡで見られた中和に基づき、ＣＯＲ２０００００１０が、最良の抗原構築物であると考えられ、アデノベクター構築用の抗原として選択した。

【０６３９】

膜結合Ｓタンパク質の場合、ｔＰＡシグナルペプチド（ＳＴ）は、非安定化型のｗｔＳＰと比較して有益な効果を示さないと考えられたため（ＣＲ３０２２結合に基づき）、ＣＯＲ２０００００７もアデノベクター構築のために選択した。

【０６４０】

図７３は、ＣＯＲ２０００００７が、ＣＯＲ２０００１０よりも良好にＡＣＥ２に結合することを示す。

【０６４１】

[実施例１４]

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ベクターのＡｄ２６へのクローニング

実施例１３に記載の通り、いくつかの異なるインサートを、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２配列（全ゲノム配列ＮＣ＿０４５５１２）のＳタンパク質に基づき、Ａｄ２６用に設計した。インサートは、膜係留型ＣＯＲ２０００７、ＣＯＲ２０００８、ＣＯＲ２０００９、ＣＯＲ２０００１０、ＣＯＲ２０００１１、およびＣＯＲ２０００１８であった。

【０６４２】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクタンパク質のクローニングは、２つの異なるステップで構成される。

１：ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクタンパク質の設計およびシャトル発現ベクターへのクローニング

このベクターは、ｈＣＭＶプロモーター内に２つのテトラサイクリンオペレーター（ｔｅｔＯ）配列およびＳＶ４０ポリアデニル化シグナルを有するヒトサイトメガロウイルス（ｈＣＭＶ）プロモーターを含む。この発現ベクターを、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏ実験のために、およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクタンパク質を有するＡｄ２６ウイルスの生成に使用する。

２：発現ベクターのＡｄ２６ウイルスへのクローニング

【０６４３】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクタンパク質デザインの設計およびシャトル発現ベクターへのクローニング

実施例１３に記載の通り、ｗｔＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクタンパク質（ＹＰ＿００９７２４３９０　－　配列番号２９を参照）に基づき、異なるシグナルペプチド、フューリン切断部位除去、安定化突然変異、および膜貫通領域における変異が導入された（表を参照）、完全長ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－スパイクタンパク質に基づくいくつかの構築物を設計した（ＣＯＲ２０００７、ＣＯＲ２０００８、ＣＯＲ２０００９、ＣＯＲ２０００１０、ＣＯＲ２０００１１、およびＣＯＲ２０００１８と名付けた）。

【０６４４】
【表６】

プラスミド名称	説明/改変					配列番号	
	インサート名称	シグナルペプチド	フューリン切断	安定化	膜貫通	タンパク質	DNA*
pUC_CMVdel134TO_COR20007	COR20007	wt	dFur	PP	Wt	205	211
pUC_CMVdel134TO_COR20008	COR20008	wt	dFur	PP	dERRS	206	212
pUC_CMVdel134TO_COR20009	COR20009	tPA	wt	wt	Wt	207	213
pUC_CMVdel134TO_COR200010	COR200010	tPA	dFur	PP	Wt	208	214
pUC_CMVdel134TO_COR200011	COR200011	tPA	dFur	PP	dERRS	209	215
pUC_CMVdel134TO_COR200018	COR200018	tPA+wt	wt	wt	Wt	210	216

*注: nt 配列はコード配列のみをコードする; つまり、下記で説明されている追加的に付加された5'および 3'配列を含まない。

【０６４５】
こうしたタンパク質配列を、オープンソースのバイオインフォマティクスツール（ＧｅｎｅＯｐｔｉｍｉｚｅｒ；ＧｅｎｅＡｒｔ、スプライス部位およびプロモーター予測；ｆｒｕｉｔｆｌｙ．ｏｒｇ）を使用し、ＧＣ含有量が補正された最も頻繁が高いヒトコドン使用頻度（ＣＬＣ－ｍａｉｎ　ｗｏｒｋｂｅｎｃｈ；　Ｑｉａｇｅｎ）、隠れたスプライス部位（cryptic splice site）、ＳＤ配列、ＴＡＴＡボックス、および終結シグナルを使用して逆翻訳した。次に、異なる設計間でコドン使用頻度を調和させ、５’末端には、シャトルベクターとの重複、ＨｉｎｄＩＩＩ制限部位、およびコザック配列（ＣＧＧＣＣＧＧＧＡＡＣＧＧＴＧＣＡＴＴＧＧＡＡＧＣＴＴＧＣＣＡＣＣ（配列番号２２０））を含むヌクレオチドを、３’末端には、二重停止コドン、ＸｂａＩ制限部位、およびシャトル発現ベクターとの重複配列（ＴＧＡＴＡＡＴＣＴＡＧＡＣＧＡＧＡＴＣＣＧＡＡＣＴＴＧＴＴＴＡＴＴＧ（配列番号２２１））を含むヌクレオチドを付加した。次いで、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２スパイクタンパク質配列の一部をコードする２つのＤＮＡ断片（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、ＩＤＴにより提供されたｇＢｌｏｃｋ）を、図７４に概略的に図示されている通り、Ｇｉｂｓｏｎアセンブリ（ＮＥＢｕｉｌｄｅｒ（登録商標）ＨｉＦｉ　ＤＮＡ　Ａｓｓｅｍｂｌｙ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ、ＮＥＢ、カタログ番号Ｅ２６２１）により、ＨｉｎｄＩＩＩ＋ＸｂａＩ線状化標的ベクター（ＩＤ７３４６＿ｐＵＣ＿Ｅ１－ＣＭＶｄｅｌ１３４ＴＯ－スタッファー、配列番号１３）へとアセンブルした。これにより、抗原構築物ＣＯＲ２０００９、ＣＯＲ２０００１０、ＣＯＲ２０００１１、およびＣＯＲ２０００１８をコードする発現ベクターがもたらされた。

【０６４６】
図７４は、機能的発現ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のクローニングの概略図を示す。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質をコードするおよそ２ｋｂの２つのＤＮＡ断片（ｇＢｌｏｃｋ；ＩＤＴ）は互いに重複しており、５’末端および３’末端の両方が重複しており、それにより、両ＤＮＡ断片の線状ベクターへのｉｎ　ｖｉｔｒｏアセンブリ（ＩＶＡ）が可能になる（Gibson et al; (2009) Nat Methods 6(5):345-345による説明の通り）。

【０６４７】
ＣＯＲ２０００７およびＣＯＲ２０００８発現ベクターの構築のため、それぞれ、ベクターｐＵＣ－ＣＭＶｄｅｌ１３４ＴＯ＿ＣＯＲ２０００１０、ＣＭＶｄｅｌ１３４＿ＣＯＲ２０００１１を部位特異的突然変異誘発手法の鋳型として使用して、ｔＰＡリーダーをｗｔスパイクリーダーに置き換えた。ここで、製造元のプロトコールに従って、Ｑ５－ｓｔｅ定方向突然変異誘発キット（ＮＥＢ；Ｅ０５５４Ｓ）を使用して、部位特異的ＰＣＲを実施した。プライマー７＿ｆｗ（ｇｃｔｃｃｃｃｃｔｃｇｔｃｔｃｃａｇｔＣＡＡＴＧＣＧＴＧＡＡＣＣＴＧＡＣＣ（配列番号２２２））および８＿Ｒｖ（ａｇｔａｃｃａｇａ

ａａｃａｃｇａａｃａｔＧＧＴＧＧＣＡＡＧＣＴＴＣＣＡＡＴＧ（配列番号２２３））を用い、ＰＣＲプログラムは、９８℃で３０秒間の変性、続いて９８℃で２０秒間の変性、６４℃で２０秒間の融解、および７２℃で２分間の伸長の２５サイクルである。得られたアンプリコンをゲルから単離し、製造元のプロトコールに従ってＫＬＤ混合物で処理して、ＣＯＲ２０００７およびＣＯＲ２０００８発現ベクターを得た。

【０６４８】

シャトル発現構築物を、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏアッセイのために（例えば、実施例１３に記載のとおり）、および下記に記載の通り、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク配列を有するＡｄ２６ベクターゲノムプラスミドを生成するために使用した。

【０６４９】

Ａｄ２６ベクターゲノムプラスミドｐＡｄ２６．ｄＥ１．ｄＥ３．５ｏｒｆ６の生成

ｐＡｄ２６．ｄＥ１．ｄＥ３．５ｏｒｆ６は、以前に生成されたＡｄ２６ベースベクターについて記載されている通り（Abbink et al., (2007); J Virol, 81(9),4654-4663）、Ｅ１欠失、Ｅ３欠失、およびＡｄ５のものによるＡｄ２６　Ｅ４　ｏｒｆ６の置換を有する完全長Ａｄ２６ベクターゲノムを含むプラスミドである。ｐＡｄ２６．ｄＥ１．ｄＥ３．５ｏｒｆ６のプラスミド骨格は、ｐＭＢ１複製起点およびアンピシリン耐性遺伝子を含み、ｐＢＲ３２２（ＧｅｎＢａｎｋ受入番号Ｊ０１７４９．１）に由来する。ｐＡｄ２６．ｄＥ１．ｄＥ３．５ｏｒｆ６は、ベクターゲノムのＥ１欠失の代わりに、固有のＡｓｉＳＩ制限部位をさらに含む。こうした部位は、シャトルベクター（ｐＳｈｕｔｔｌｅ＿Ｅ１．ＣＭＶｄｅｌ１３４ＴＯ；配列番号２１７）に由来する導入遺伝子カセットを対応する位置に挿入するために使用することができる。最後に、ｐＡｄ２６．ｄＥ１．ｄＥ３．５ｏｒｆ６内のアデノウイルスベクターゲノムは、ＳｗａＩ制限部位によりその末端の各々にフランキングされており、ＳｗａＩ消化によるプラスミド骨格からのその放出が可能である。

【０６５０】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク配列を有するＡｄ２６ベクターゲノムプラスミドの生成

プラスミドｐＳｈｕｔｔｌｅ＿Ｅ１．ＣＭＶｄｅｌ１３４ＴＯ発現ベクターは、ｈＣＭＶプロモーター内に２つのテトラサイクリンオペレーター（ｔｅｔＯ）配列およびＳＶ４０ポリアデニル化シグナルを有するヒトサイトメガロウイルス（ｈＣＭＶ）プロモーターを有する。さらに、このベクターは、導入遺伝子カセットの上流および下流の両方に、受入側Ａｄ２６ベクター（ＩＤ６５９８＿ｐＡｄ２６．ｄＥ１．ｄＥ３．５ｏｒｆ６；配列番号２１８）と相同性である２０ｎｔによりフランキングされているＳａｐＩ制限部位を含み、これにより、Ａｄ２６　ベクターへの導入遺伝子カセットのＩｎ　Ｖｉｔｒｏアセンブリが可能になる（Gibson; 2009, supra）。

【０６５１】

図７５は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質を発現するシャトルベクターの、Ａｄ２６ベクターのＥ１領域へのクローニングの概略図を示す。Ａｄ２６ベクターを、制限酵素ＡｓｉＳＩで線状化する。シャトルベクターをＳａｐＩで消化して、発現カセットをその骨格から分離する。発現カセットは、両ＤＮＡ断片のｉｎ　ｖｉｔｒｏアセンブリ（ＩＶＡ）を可能にする（Gibson et al; 2009に記載の通りに）、Ａｄ２６骨格のＡｓｉＳＩ部位にフランキングされている配列と相同性である配列を含む。

【０６５２】

そのために、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク配列を有するｐＳｈｕｔｔｌｅ＿Ｅ１．ＣＭＶｄｅｌ１３４ＴＯ発現ベクターをＳａｐＩで消化し、発現カセットをゲルから単離し、ＡｓｉＳＩ線状化Ａｄ２６ベクター（ＩＤ６５９８＿ｐＡｄ２６．ｄＥ１．ｄＥ３．５ｏｒｆ６；配列番号２１８）へとｉｎ　ｖｉｔｒｏアセンブルした（ＮＥＢｕｉｌｄｅｒ（登録商標）ＨｉＦｉ　ＤＮＡ　Ａｓｓｅｍｂｌｙ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ、ＮＥＢ、カタログ番号Ｅ２６２１）。これにより、ＳＡＲＳ－Ｃｏｖ－２スパイクバリアントを有するＡｄ２６ベクター；ｐＡｄ２６．Ｅ１．ＣＭＶｄｅｌ１３４－ＴＯ．ＣＯＲ２０００７、ｐＡｄ２６．Ｅ１．ＣＭＶｄｅｌ１３４－ＴＯ．ＣＯＲ２０００８、ｐＡｄ２６．Ｅ１

．ＣＭＶｄｅｌ１３４－ＴＯ．ＣＯＲ２０００９、ｐＡｄ２６．Ｅ１．ＣＭＶｄｅｌ１３４－ＴＯ．ＣＯＲ２０００１０、ｐＡｄ２６．Ｅ１．ＣＭＶｄｅｌ１３４－ＴＯ．ＣＯＲ２０００１１、およびｐＡｄ２６．Ｅ１．ＣＭＶｄｅｌ１３４－ＴＯ．ＣＯＲ２０００１８がもたらされた。

【０６５３】

組換えＡｄ２６ベクター生成

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２インサートを含むＡｄ２６ベクターを、標準的な操作手順を使用して、全ゲノムプラスミドをＥ１相補性懸濁ＰＥＲ．Ｃ６　ＴｅｔＲ（ｓＰＥＲ．Ｃ６　ＴｅｔＲ）細胞にトランスフェクトすることにより生成した。ＰＬＬコーティングプレートの１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）および１０ｍＭ　$MgCl_2$を補充したダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）で増殖させたｓＰＥＲ．Ｃ６　ＴｅｔＲへのトランスフェクション前に、ＡｄベクタープラスミドをＳｗａＩで消化して、アデノウイルスベクターゲノムをプラスミドから放出させた。リポフェクタミントランスフェクション試薬（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ：カールズバッド、カリフォルニア州）を使用し標準手順に従って、トランスフェクションを実施した。ウイルスレスキュートランスフェクションの回収後、ｓＰＥＲ．Ｃ６　Ｔｅｔでの数回の連続感染ラウンドによりウイルスをさらに増幅した。ｓＰＥＲ．Ｃ６　ＴｅｔＲ細胞を、Ｐｅｒｍｅｘｃｉｓ培地で培養した。ウイルスを、以前に記載の通り（Havenga et al. , “Novel replication-incompetent adenoviral B-group vectors: high vector stability and yield in PER.C6 cells,” J.Gen.Virol. 87(8):2135-43 (2006)）、２段階塩化セシウム（ＣｓＣｌ）密度勾配超遠心分離手順を使用して、粗ウイルス回収物から精製した。ウイルス粒子（ＶＰ）力価を、以前に記載の分光光度計ベース手順により測定した（Maizel et al., "The polypeptides of adenovirus: I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12," Virology, 36(1):115-25 (1968)）。

【０６５４】

[実施例１５]

マウスにおける体液性免疫原性

ＢＡＬＢ／ｃマウスを、10^8、10^9、または10^{10}ｖｐのＡｄ２６ＣＯＶＳ１の単一用量で筋肉内（ＩＭ）免疫化した（１用量レベル当たりＮ＝１０）。Ａｄ２６ＮＣＯＶ０３０およびＡｄ２６ＣＯＶＳ１という呼称は、同じ構築物に対して使用され、同義的に使用されていることに留意されたい。陰性対照群は、導入遺伝子を有していない10^{10}ｖｐのＡｄ２６ベクターを受け取った（Ａｄ２６．空、Ｎ＝５）。安定化突然変異を有していない天然完全長Ｓタンパク質をコードするＡｄ２６ＮＣＯＶ００６ベクターは、Ａｄ２６ＣＯＶＳ１と比較した安定化突然変異の利益の評価を可能にした。１群（群１、Ｎ＝５）は、血清生成の目的で10^7ｖｐのＡｄ２６ＮＣＯＶ００６を受け取った。この群の結果は示されていない。免疫化後の２週目および４週目に血清を採取して、Ｓタンパク質結合性抗体応答およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和抗体応答を測定した。Ｓタンパク質結合性抗体価をＥＬＩＳＡにより測定した。

【０６５５】

Ｓタンパク質結合性抗体応答

Ａｄ２６ＣＯＶＳ１による単回免疫化は、Ｓタンパク質結合性抗体の用量レベル依存的誘導に結び付き、免疫化後２週間で既に高い抗体価を示した（図７６Ａ）。安定化突然変異を有していないＳタンパク質をコードするＡｄ２６ＮＣＯＶ００６ベクターと比較して、Ａｄ２６ＣＯＶＳ１は、２週目および４週目の時点で有意により高い結合性抗体価を誘導した。１群当たりの応答中央値は、横線で示されている。点線は、ＬＬＯＤを示す。

【０６５６】

中和抗体応答

10^{10}ｖｐのＡｄ２６ＣＯＶＳ１を受け取ったマウスに由来する血清試料を使用して、中和抗体の存在を決定した。ベロＥ６細胞に対するウイルス単離株Ｌｅｉｄｅｎ１（Ｌ－００１）の細胞変性効果（ＣＰＥ）が決定されるｗｔＶＮＡにより、中和抗体価を測定

した。１群当たりの応答中央値は、横線で示されている。点線は、ＬＬＯＤを示す。ＬＬＯＤであるかまたはそれを下回る応答を有する動物は、白抜き記号として示されている。Ａｄ２６ＣＯＶＳ１による単回免疫化は、免疫化後２週間という早い時期にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和抗体の誘導に結び付いた（図７７）。Ａｄ２６ＣＯＶＳ１により誘導されたｗｔＶＮＡ中和抗体価中央値は、２週目から４週目まで４～６４倍増加した（力価範囲：２２．６～９０．５）。Ａｄ２６ＣＯＶＳ１は、４週目に、Ａｄ２６ＮＣＯＶ００６と比較して有意により高い中和抗体価を誘導した。

【０６５７】

[実施例１６]

マウスにおける免疫応答の極性化

この実験は、Ａｄ２６ＣＯＶＳ１を含む２つのＡｄ２６ベースＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ベクターにより誘導されるＴｈ１／Ｔｈ２バランスを決定するために実施した。これは、ワクチン関連疾患増強の理論的リスクの間接的尺度である。ＢＡＬＢ／ｃマウス（Ｔｈ２型応答を生成する傾向がある）を、10^{10}ｖｐのＡｄ２６ＣＯＶＳ１の単一用量でＩＭ免疫化した（Ｎ＝６）。対照群は、一般にＴｈ２バイアス免疫応答を誘導することが知られているリン酸アルミニウム（ＡｌＰＯ$_4$；Ａｄｊｕ－Ｐｈｏｓ（登録商標））１００μｇをアジュバント添加した組換え安定化Ｓタンパク質５０μｇを受け取った（Ｎ＝６）。陰性対照群は、ＡｌＰＯ$_4$アジュバント１００μｇのみを受け取った（Ｎ＝３）。免疫化後２週目に脾臓および血清を採取して、細胞性および体液性免疫応答を測定した。

【０６５８】

Ｓタンパク質特異的細胞性サイトカイン応答

サイトカイン産生を測定するために、脾細胞を野生型Ｓタンパク質ペプチドプールでｅｘ　ｖｉｖｏ刺激した。免疫化後１３日目に、マウスを　　殺し、脾臓を処理して単細胞懸濁液にし、脾細胞を、完全な野生型ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質配列をカバーする１１個アミノ酸が重複する１５量体ペプチドの２つのペプチドプールでｅｘ　ｖｉｖｏ刺激した。ペプチドプール１および２による刺激のＳＦＵの合計が示されている。脾細胞によるＩＦＮ－γ産生を、ペプチド刺激の１８時間後にＥＬＩＳｐｏｔにより測定した。細胞性免疫応答を、ＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳｐｏｔ、ＩＣＳ、およびマルチプレックスＥＬＩＳＡにより（１０プレックスメソスケール検出［ＭＳＤ］炎症促進性パネル［マウス］キットを使用して）決定した。

【０６５９】

Ａｄ２６ＣＯＶＳ１の単一投与は、ＥＬＩＳｐｏｔにより測定されるＩＦＮ－γの実質的な分泌に結び付いたが、ＡｌＰＯ４をアジュバント添加した組換えＳタンパク質は、検出不能なまたは低い細胞性免疫応答を誘導した（図７８）。こうした結果は、ＣＤ８＋Ｔ細胞を用いたＩＣＳにより確認した（データ非表示）。

【０６６０】

免疫化後１３日目に、マウスを　　殺し、脾臓を処理して単細胞懸濁液にした。脾細胞を、完全な野生型ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質配列をカバーする１１個アミノ酸が重複する１５量体ペプチドの２つのペプチドプールで４８時間ｅｘ　ｖｉｖｏ刺激した。示されている結果は、プール１刺激およびプール２刺激の合計の比である。細胞培養上清中のサイトカイン濃度を、マルチプレックスＥＬＩＳＡにより測定した。Ａｄ２６ＣＯＶＳ１による免疫化後、Ｔｈ１極性化の特徴であるＩＦＮ－γの実質的な分泌が観察されたが、Ｔｈ２型免疫応答に関連付けられる典型的なサイトカインであるＩＬ－４、ＩＬ－５、およびＩＬ－１０の分泌は低かった（データ非表示）。ＩＬ－４、ＩＬ－５、またはＩＬ－１０のいずれかに対するＩＦＮ－γのサイトカイン濃度の比は、免疫応答のＴｈ１極性化を示すものであるとみなされており、図７９に示されている。Ａｄ２６ＣＯＶＳ１による免疫化は、脾臓細胞応答をＩＦＮ－γ分泌へと偏向させた。対照的に、ＡｌＰＯ$_4$をアジュバント添加したＳタンパク質による免疫化では、ＩＦＮ－γ分泌に対する偏向を示さず、この群では全体的サイトカイン分泌は低かった。

【０６６１】

Ｓタンパク質特異的ＩｇＧサブタイプ応答

マウスでは、ＩｇＧ１は、あらゆるタイプの免疫応答中に生成されるが、ＩｇＧ２ａは、主にＴｈ１極性免疫応答中に生成される。したがって、ＩｇＧ２ａ／ＩｇＧ１比の増加は、免疫応答のＴｈ１偏向を示すものである。免疫化後のＩｇＧ１力価およびＩｇＧ２ａ力価およびＩｇＧ２ａ／ＩｇＧ１比は図８０に示されている。免疫化１３日後に血清を試料採取した。Ｓタンパク質結合性ＩｇＧ１力価およびＩｇＧ２ａ力価をＥＬＩＳＡにより測定した。Ａｄ２６ＣＯＶＳ１は、すべての動物においてＳタンパク質結合性ＩｇＧ１およびＩｇＧ２ａ抗体を誘導した。対照的に、ＡｌＰＯ４をアジュバント添加したＳタンパク質は、すべての動物においてＩｇＧ１を誘導したが、ＩｇＧ２ａ力価は検出下限に近いかまたは検出下限であった。これにより、Ａｄ２６ＣＯＶＳ１免疫化後に、ＡｌＰＯ４をアジュバント添加したＳタンパク質による免疫化後に観察された、Ｔｈ２バイアス応答に関連付けられる比とは統計的に異なる、主にＴｈ１バイアスであったＩｇＧ２ａ／ＩｇＧ１比がもたらされた。

【０６６２】

[実施例１７]

ニュージーランドホワイトウサギにおける免疫原性

ニュージーランドホワイトウサギを、５×１０^{9}ｖｐの単一用量または５×１０^{10}ｖｐのＡｄ２６ＣＯＶＳ１の臨床用量レベルでＩＭ免疫化した（１用量レベル当たりＮ＝５）。陰性対照群は生理食塩水を受け取った（Ｎ＝５）。安定化突然変異を有していない天然完全長Ｓタンパク質をコードするＡｄ２６ＮＣＯＶ００６ベクターは、Ａｄ２６ＣＯＶＳ１と比較した安定化突然変異の利益の評価を可能にした。Ｓタンパク質結合性抗体応答およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和抗体応答を、用量１後の２週目に採取した血清で測定した。Ｓタンパク質特異的細胞性応答を、用量１後の３週目に採取した末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）で測定した。

【０６６３】

Ｓタンパク質結合性抗体応答

Ａｄ２６ＣＯＶＳ１による単回免疫化は、Ｓタンパク質結合性抗体の用量レベル依存的誘導に結び付いた（図８１Ａ）。Ａｄ２６ＣＯＶＳ１は、安定化突然変異を有していないＳタンパク質をコードするＡｄ２６ＮＣＯＶ００６ベクターと比較して、有意により高い結合性抗体価を誘導した。

【０６６４】

中和抗体応答

Ａｄ２６ＣＯＶＳ１による単回免疫化は、用量レベル依存的ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和抗体誘導に結び付き、より高い用量レベルの５×１０^{10}ｖｐを受け取ったすべての動物において応答があった（図８１Ｂ）。中和力価は低く、ばらつきあった。これは、アッセイ時点が早かったためである可能性がある（２週目）。Ａｄ２６ＣＯＶＳ１は、安定化突然変異を有していないＳタンパク質をコードするＡｄ２６ＮＣＯＶ００６ベクターと比較して、有意により高い中和抗体価を誘導した。

【０６６５】

Ｓタンパク質特異的細胞性サイトカイン応答

細胞性免疫原性を測定するため、ＰＢＭＣを、野生型Ｓタンパク質ペプチドプールでｅｘ　ｖｉｖｏ刺激し、細胞性免疫応答をＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳｐｏｔにより決定した。免疫化後の２１日目に、ＰＢＭＣを単離し、完全な野生型ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質配列をカバーする１１個アミノ酸が重複する１５量体ペプチドの２つのペプチドプールでｅｘ　ｖｉｖｏ刺激した。ＰＢＭＣによるＩＦＮ－γ産生を、ＥＬＩＳｐｏｔによるペプチド刺激の１８時間後に測定した。用量１の３週間後に測定したところ、Ａｄ２６ＣＯＶＳ１は、すべての動物において用量レベル非依存的細胞性応答を誘導したが、応答は、天然Ｓタンパク質をコードする、つまり安定化突然変異を有していないＡｄ２６ＮＣＯＶ００６ベクターによる免疫化後よりも低かった（図８２）。これにより、Ａｄ２６ＣＯＶＳ１を用いたマウス研究で既に観察されているＴｈ１関連サイトカインＩＦＮ－γの誘

導が確認された。

【０６６６】

[実施例１８]

シリアンハムスターにおける免疫原性および有効性

シリアンハムスターを、１用量レジメン（群５および６）または４週間間隔の２用量与レジメン（群１３および１４）にて10^9または10^{10}ｖｐのＡｄ２６ＣＯＶＳ１（１群当たりＮ＝６）でＩＭ免疫化した。安定化突然変異を有していない天然完全長Ｓタンパク質をコードするＡｄ２６ＮＣＯＶ００６を、Ａｄ２６ＣＯＶＳ１と同じ用量レベルおよびレジメンで投与し（１群当たりＮ＝６、１用量群１および２、２用量群９および１０）、これにより、Ａｄ２６ＣＯＶＳ１安定化突然変異の利益を評価するための比較が可能であった。陰性対照群は、１用量および２用量レジメンでＡｄ２６．空を受け取った（１群当たりＮ＝６）（それぞれ、群７および８、ならびに群１５）。Ｓタンパク質結合性抗体応答およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和抗体応答を、用量１後の４週目に採取した血清で測定した。４週目に、１用量レジメンを受けた動物にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を負荷し、４日間の経過観察期間を設けた。

【０６６７】

Ｓタンパク質結合性抗体応答および中和抗体応答

免疫化後２８日目に血清を試料採取した。Ｓタンパク質結合性抗体価をＥＬＩＳＡにより測定した。Ａｄ２６．空試料Ｎ＝１８（図８３Ａ）。ベロＥ６細胞に対するウイルス単離株Ｌｅｉｄｅｎ１（Ｌ－００１）の細胞変性効果（ＣＰＥ）を決定するｗｔＶＮＡにより、中和抗体価を測定した（図８３Ｂ）。Ａｄ２６ＣＯＶＳ１による単回免疫化は、用量１後の４週目、つまり１用量レジメンを受けた動物を負荷した時点で測定して、Ｓタンパク質結合性抗体およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和抗体の誘導に結び付いた（図８３Ａおよび８３Ｂ）。

【０６６８】

ウイルス量

シリアンハムスターを、1×10^9または1×10^{10}ｖｐのＡｄ２６ＣＯＶＳ１（Ａｄ２６ＮＣＯＶ０３０）またはＡｄ２６ＮＣＶＯ００６（天然Ｓタンパク質をコードするＡｄ２６ベクター）（１用量レベル当たりＮ＝６）またはＡｄ２６．空（ＣＯＶＩＤ－１９抗原を一切コードしていないＡｄ２６ベクター、Ｎ＝６）で筋肉内免疫化した。ハムスターは、免疫化の４週間後（２８日目）に10^2ＴＣＩＤ５０のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２株ＢｅｔａＣｏＶ／Ｍｕｎｉｃｈ／ＢａｖＰａｔ１／２０２０による鼻腔内負荷を受けた。肺組織を、負荷段階の終了時（Ｃ４日目）にウイルス量分析のために単離した。複製可能なウイルス（肺１グラム当たりの$TCID_{50}$）を、プラークアッセイにより測定した。肺組織における複製可能なウイルスを、負荷の４日後にプラークアッセイにより決定した。

【０６６９】

Ａｄ２６．空を受け取ったモック免疫対照群は、負荷の４日後、高い肺ウイルス量を有していた。Ａｄ２６ＣＯＶＳ１の単一用量は、Ａｄ２６．空モック免疫動物と比較してウイルス量の有意な低減をもたらした。Ａｄ２６ＣＯＶＳ１による免疫化は、安定化突然変異を有していないＳタンパク質をコードするＡｄ２６ＮＣＯＶ００６ベクターと比較して有意により低いウイルス量をもたらした（図８４）。ウイルス量は、Ａｄ２６ＣＯＶＳ１で免疫化した大多数の動物で検出限界を下回った。

【０６７０】

負荷後の体重減少

体重減少を、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２による負荷後の疾患重症度の尺度として決定した。Ａｄ２６ＣＯＶＳ１の単一用量は、負荷４日後に測定して、Ａｄ２６．空対照免疫動物と比較して体重減少の有意な低減をもたらした（図８５）。Ａｄ２６ＣＯＶＳ１免疫群とＡｄ２６ＮＣＯＶ００６免疫群との間には、用量レベルにわたって体重減少に有意差はなかった（３倍ボンフェローニ補正による分散分析［ＡＮＯＶＡ］のｔ検定では、ｐ＝０．０

９１）。
【０６７１】
[実施例１９]
非ヒト霊長類（ＮＨＰ）における免疫原性
ＮＨＰを、臨床使用が意図されている高ワクチン用量に対応する10^{11}ｖｐのＡｄ２６ＣＯＶＳ１（Ｎ＝６）の単一用量で筋肉内免疫化した。陰性対照群は生理食塩水のみを受け取った（Ｎ＝４）。体液性免疫原性を評価するための血清を、免疫化前（０週、ベースライン）ならびに免疫化後２週目および４週目に採取した。細胞に基づくアッセイのために、ＰＢＭＣを０週目および４週目に単離した。
【０６７２】
Ｓタンパク質結合性抗体応答および中和抗体応答
ＮＨＰでは、Ａｄ２６ＣＯＶＳ１による単回免疫化は、ｐｐＶＮＡ（図８６Ｂ）およびｗｔＶＮＡ（図８６Ｃ）により測定されるＳタンパク質結合性抗体（図８６Ａ）および中和抗体を、免疫後２週目という早期に誘導した。アッセイはすべて、Chandrashekar et al. Science. 2020; eabc4776. doi: 10.1126/science.abc4776に記載されている。
【０６７３】
２週目と比較して、４週目の結合性抗体価中央値は、３．３倍増加して１６，４９７になった（力価範囲：４，４５０～５７，７９０）。ｐｐＶＮＡ中和抗体価中央値は、２週目から４週目まで５．８倍増加して４０８になった（力価範囲：２０８～６４３）。野生型ＶＮＡ中和抗体価は、全般的により低かったが、時間の経過と共に同等の増加を示し、４週目の中和抗体価中央値は６．２倍増加して１１３になった（力価範囲５３～２３４）。
【０６７４】
Ｓタンパク質特異的細胞性サイトカイン応答
細胞性免疫原性を測定するため、ＰＢＭＣを、野生型Ｓタンパク質ペプチドプールでｅｘ ｖｉｖｏ刺激し、細胞性免疫応答をＩＦＮ－γ ＥＬＩＳｐｏｔにより測定した。免疫化の４週間後に測定すると、Ａｄ２６ＣＯＶＳ１は、６匹中５匹の動物で細胞性応答を誘導した（図８６Ｄ）。これにより、Ａｄ２６ＣＯＶＳ１によりマウスおよびウサギで既に観察されているＴｈ１関連サイトカインＩＦＮ－γの誘導が確認された。
【０６７５】
[実施例２０]
シングルショットＡｄ２６ワクチンは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷に対してアカゲザルを保護する
Ａｄ２６ワクチン候補の生成および免疫原性
上記に記載の通り、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ Ｓタンパク質バリアントを発現するいくつかのＡｄ２６ベクターを、（ｉ）野生型（ｗｔ）ＬＳの代わりに、組織プラスミノーゲン活性化因子（ｔＰＡ）リーダー配列（ＬＳ）（ｔＰＡ．Ｓ；ＣＯＲ２０００００９：配列番号２０７）を用いて、（ｉｉ）ｗｔＬＳの代わりに、フューリン切断部位の突然変異および２つのプロリン安定化突然変異を有する完全長Ｓを有するｔＰＡリーダーＬＳ（ｔＰＡ．Ｓ．ＰＰ；ＣＯＲ２０００１０：配列番号２０８）を用いて、（ｉｉｉ）天然完全長Ｓ（Ｓ；Ｗｕｈａｎ／ＷＩＶ０４／２０１９）を用いて、（ｉｖ）ｔＰＡおよび完全長Ｓを有する野生型リーダー配列（ｔＰＡ．ＷＴ．Ｓ；ＣＯＲ２０００１８：配列番号２１０））を用いて、ならびに（ｖ）フューリン切断部位の突然変異およびプロリン安定化突然変異を有する完全長Ｓ（Ｓ．ＰＰ；ＣＯＲ２０００００７：配列番号２０５）を用いて産生した。ウエスタンブロット分析により、すべてのベクターの各々を接種した細胞の細胞溶解物におけるスパイクタンパク質発現、および突然変異フューリン切断部位を有するスパイクバリアントを有する細胞溶解物におけるフューリン切断生成物の非存在が確認された（図８７）。
【０６７６】

６～１２歳の雄雌混合成体アカゲザル５２頭を、ｔＰＡ．Ｓ（Ｎ＝４）、ｔＰＡ．Ｓ．ＰＰ（Ｎ＝４）、Ｓ（Ｎ＝４）、ｔＰＡ．ＷＴ．Ｓ（Ｎ＝４）、Ｓ．ＰＰ（Ｎ＝６）を発現するＡｄ２６ベクターおよびシャム対照（Ｎ＝２０）で免疫化した。動物は、０週目にアジュバントなしで10^{11}ウイルス粒子（ｖｐ）Ａｄ２６ベクターの筋肉内単回免疫化を受けた。ＲＢＤ特異的結合性抗体は、２週目までにほとんどすべてのワクチン接種動物において、および４週目までにすべてのワクチン接種動物において、ＥＬＩＳＡにより観察された（図８８Ａ）。中和抗体（ＮＡｂ）応答を、偽ウイルス中和アッセイ（Chandrashekar, A. et al. Science, doi:10.1126/science.abc4776 (2020); Yu, J. et al. Science, doi:10.1126/science.abc6284 (2020); Yang, Z. Y. et al. Nature 428, 561-564, doi:10.1038/nature02463 (2004)）（図８８Ｂ）および生ウイルス中和アッセイの両方を使用して評価した（データ非表示）。両中和アッセイにより測定したＮＡｂ力価は、２週目にはワクチン接種動物の大部分で観察され、４週目では増加した。Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰ（Ａｄ２６ＣＯＶＳ１）ワクチンは、４週目に最も高い偽ウイルスＮＡｂ力価（中央値４０８；範囲２０８～６４３）および生ウイルスＮＡｂ力価（中央値１１３；範囲５３～２３３）を誘発した。Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰワクチン接種マカクのＮＡｂ力価中央値は、以前に報告された９匹の回復期のマカクおよび２７人の回復期ヒトのコホートにおける、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染からの回復後のＮＡｂ力価の中央値よりも４倍高かった[10]（図９３）。Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰワクチンは、気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬ）において、低いが検出可能なＳ特異的ＩｇＧおよびＩｇＡ応答も誘導した（図９４）。

【０６７７】

細胞性免疫応答は、プールしたＳペプチドを使用したＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイによると、４週目にワクチン接種動物の大部分において誘導された（図８９Ａ）。マルチパラメーター細胞内サイトカイン染色アッセイを使用して、ＩＦＮ－γ＋ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞応答を評価した（図８９Ｂ）。応答は、種々のワクチン群で同等であったが、Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰワクチンでは応答がより低い傾向があった。ＩＦＮ－γ＋およびＩＬ－２＋ＣＤ４＋Ｔ細胞応答は、ＩＬ－４＋およびＩＬ－１０＋ＣＤ４＋Ｔ細胞応答よりも高く（図９５）、Ｔｈ１バイアス細胞性免疫応答の誘導が示唆された。

【０６７８】

Ａｄ２６ワクチン候補の保護有効性

６週目に、すべての動物に、1.2×10^{8}ＶＰ（1.1×10^{4}ＰＦＵ）のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を鼻腔内（ＩＮ）および気管内（ＩＴ）経路で負荷した（Chandrashekar, A. et al. Science, doi:10.1126/science.abc4776 (2020); Yu, J. et al. Science, doi:10.1126/science.abc6284 (2020)）。気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬ）および鼻スワブ（ＮＳ）中のウイルス量を、ウイルス複製を表すと考えられている、サブゲノムｍＲＮＡ（ｓｇｍＲＮＡ）のＲＴ－ＰＣＲにより評価した（Chandrashekar, A. et al. supra; Wolfel, R. et al. Nature, doi:10.1038/s41586-020-2196-x (2020)）。

【０６７９】

２０匹のシャム対照すべてが感染し、ＢＡＬでは、４．８９（範囲３．８５～６．５１）log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍｌのピーク中央値を示した（図９０Ａ）。対照的に、Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰを受け取った動物は、ＢＡＬではウイルス検出を示さなかった（検出限界１．６９ log_{10} ｓｇｍＲＮＡコピー／ｍｌ）。他のワクチンでも実質的な保護が観察され、動物は、ＢＡＬにおいて低レベルのｓｇｍＲＮＡを示すことがあった（図９０Ｂ）。同様に、シャム対照は、ＮＳにおいて５．５９（範囲３．７８～８．０１）log_{10} ｓｇｍＲＮＡのピーク中央値を示した（図９０Ｃ）。Ａｄ２６．Ｓ．ＰＰを受け取った１匹の動物は、ＮＳに少量のウイルスを有していた。他のワクチンは、一般に、対照と比較してＮＳにおけるウイルス量の低減を示したが、Ａｄ２６．Ｓ．ＰＰで最も良好な保護が見られた（図９０Ｄ）。

【０６８０】

ワクチン接種動物におけるピークウイルス量の比較は、一般に、ＢＡＬにおける保護のほうがＮＳにおける保護よりもロバストであることを示唆した（図９１）。Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰワクチンは、下気道では完全な保護を提供し、上気道では５／６匹の動物に保護を提供し、ＢＡＬおよびＮＳにおけるピークｓｇｍＲＮＡ中央値は、シャム対照と比較して、それぞれ＞３．２および＞３．９　log_{10}低減を示した（それぞれＰ＜０．０００１およびＰ＜０．０００１、両側マン－ホイットニー検定）（図９１）。こうしたデータは、Ｓ免疫原の融合前安定化の関連性を裏付ける。３２匹のワクチン接種個体のうち、１７匹の動物は完全に保護され、負荷後のＢＡＬまたはＮＳに検出可能なｓｇｍＲＮＡを有していなかった。５匹の追加の動物は、ＢＡＬにはｓｇｍＲＮＡを有していなかったが、ＮＳではウイルスをある程度示した。

【０６８１】

負荷後のＡｄ２６．Ｓ．ＰＰワクチン接種動物における免疫応答

シャム対照は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷後１４日目までに、ロバストな偽ウイルスＮＡｂ応答（図９２）ならびにＣＤ８＋およびＣＤ４＋Ｔ細胞応答（データ非表示）を発生させた。こうした動物におけるＣＤ８＋およびＣＤ４＋Ｔ細胞応答は、スパイク（Ｓ１、Ｓ２）、ヌクレオカプシド（ＮＣＡＰ）、および非構造タンパク質（ＮＳ６、ＮＳ７１、ＮＳ８）を含む、複数のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質に対して向けられていた。対照的に、Ａｄ２６．Ｓ．ＰＰワクチンを受けた動物は既往性ＮＡｂ応答を示さず（図９２）、負荷後にスパイク（Ｓ１、Ｓ２）に対する低いＴ細胞応答を示したに過ぎなかった。こうした知見は、ウイルス量がほとんど存在しないというこうした動物のデータと一致しており（図９０～９１）、こうした動物では負荷後にウイルス複製があったとしても非常に低いレベルであったことを示唆している。

【０６８２】

安全で効果的なＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ワクチンの開発は、重要な世界的優先事項である。本発明は、遺伝子操作されたＳ免疫原を発現するＡｄ２６ベクターによる単回免疫化が、アカゲザルにおいて、ロバストなＮＡｂ応答を誘導し、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷に対する保護を示したことを実証している。この研究で最も良好なワクチンは、野生型リーダー配列、完全長の膜結合型Ｓ、フューリン部位突然変異、および２つのプロリン安定化突然変異を含むＡｄ２６－Ｓ．ＰＰ（Ａｄ２６ＣＯＶＳ１またはＡｄ２６ＮＣＯＶ０３０）であった。

【０６８３】

こうしたデータは、非ヒト霊長類におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対する不活化ウイルスおよびＤＮＡワクチンに関する最近の前臨床研究を拡張する（Yu, J. et al. Science, doi:10.1126/science.abc6284 (2020); Gao, Q. et al. Science, doi:10.1126/science.abc1932 (2020)）。不活化ウイルスワクチンおよび核酸ワクチンは、典型的には、少なくとも２回の免疫化を必要とするが、アデノウイルスベクターベースワクチンは、単回免疫化後にロバストで耐久性の抗体応答を誘導することができる。シングルショットＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ワクチンは、大規模ワクチン接種キャンペーンおよびパンデミック制御の場合、２用量ワクチンと比較して、重要な物流的および実用的な利点を有するだろう。しかしながら、Ａｄ２６－ＨＩＶベクターによる同種ブーストは、非ヒト霊長類およびヒトの両方において抗体価を１０倍よりも大きく増強することができることも以前に示されており、単一用量レジメンおよび２用量レジメンの両方のＡｄ２６－Ｓ．ＰＰワクチンを、臨床試験で評価するべきであることが示唆される。本研究では、Ａｄ２６．Ｓ．ＰＰは単回免疫化後にＮＡｂ応答を誘導し、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷に対して完全またはほぼ完全な保護を提供した。さらに、こうした動物におけるＮＡｂ力価およびＴ細胞応答は、負荷後に実質的に拡張せず、Ｔ細胞応答は、ヌクレオカプシドおよび非構造タンパク質などの非ワクチン抗原に拡大しなかったが、シャム対照は、負荷後に複数のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質に対してロバストなＮＡｂ力価およびＴ細胞応答を生み出した。こうしたデータは、負荷後のＡｄ２６ＣＯＶＳ１ワクチン接種動物では、ウイルス複製が最小限であるかまたはまったくないことを示唆している。

【０６８４】
加えて、Ａｄ２６ワクチンは、Ｔｈ２バイアスではなくＴｈ１バイアスのＣＤ４＋Ｔ細胞応答を誘発し、保護未満のＮＡｂ力価を有していた動物はウイルス複製の増強を示さなかったことに留意されたい。
【０６８５】
材料および方法
動物および研究設計。６～１２歳の非近交系インド起源成体雄および雌アカゲザル（Ｍａｃａｃａ ｍｕｌａｔｔａ）５２匹を、無作為に群に割り振った。動物はすべて、Ｂｉｏｑｕａｌ，Ｉｎｃ．（ロックビル、メリーランド州）にて飼育された。動物は、ｔＰＡ．Ｓ（Ｎ＝４）、ｔＰＡ．Ｓ．ＰＰ（Ｎ＝４）、Ｓ（Ｎ＝４）、ｔＰＡ．ＷＴ．Ｓ（Ｎ＝４）、Ｓ．ＰＰ（Ｎ＝６）、およびシャム対照（Ｎ＝２０）を発現するＡｄ２６ベクターを受け取った。動物は、０週目に、アジュバントなしで筋肉内経路により10^{11}ウイルス粒子（ｖｐ）Ａｄ２６ベクターの単回免疫化を受けた。６週目に、すべての動物を、1.2×10^{8}ＶＰ（1.1×10^{4}ＰＦＵ）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（ＵＳＡ－ＷＡ１／２０２０；ＮＲ－５２２８１ストック；ＢＥＩ　Ｒｅｓｏｕｒｃｅｓ）で負荷した。ウイルスは、鼻腔内（ＩＮ）経路で１ｍｌ（各鼻孔に０．５ｍｌ）および気管内（ＩＴ）経路で１ｍｌを投与した。免疫学的およびウイルス学的アッセイはすべて盲検で実施した。動物研究はすべて、すべての関連する地方、州、および連邦規制に準拠して実施し、Ｂｉｏｑｕａｌの施設内動物管理使用委員会（ＩＡＣＵＣ）の承認を受けた。
【０６８６】
Ａｄ２６ベクターを、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク（Ｓ）タンパク質配列（Ｗｕｈａｎ／ＷＩＶ０４／２０１９）のいくつかの型を用いて構築した。配列をコドン最適化し合成した。複製不全Ｅ１／Ｅ３欠失Ａｄ２６ベクター（Abbink, P. et al. J Virol 81, 4654-4663, doi:JVI.02696-06 [pii]10.1128/JVI.02696-06 (2007)）を、全長Ａｄ２６ベクターゲノムおよび導入遺伝子発現カセットを含むプラスミドを使用してＰＥＲ．Ｃ６．ＴｅｔＲ細胞で産生した。ベクターを配列決定し、使用前に発現を試験した。
【０６８７】
ウエスタンブロット。２９３Ｔ細胞を７０～８０％コンフルエントで播種したＴ－２５フラスコに、ＳＡＲＳ－Ｃｏｖ－２　Ａｄ２６ベクターを一過性にトランスフェクトし、トランスフェクションの４８時間後に細胞溶解物を回収し、別々に還元試料緩衝液（Ｐｉｅｒｃｅ）と混合し、９５℃で５分間加熱し、プレキャスト４～１５％ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）に流した。ｉＢｌｏｔドライブロッティングシステム（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用してタンパク質をポリビニリデンジフルオリド（ＰＶＤＦ）膜に転写し、０．２％Ｔｗｅｅｎ２０（Ｓｉｇｍａ）（体積／体積）および５％（重量／体積）脱脂粉乳を含むダルベッコのリン酸緩衝食塩水Ｔ（Ｄ－ＰＢＳＴ）中で、膜ブロッキングを一晩４℃にて実施した。一晩ブロッキングした後、ＰＶＤＦ膜を、１：１０，０００希釈のポリクローナルモルモット抗ＳＡＲＳ抗体（ＢＥＩ　ｒｅｓｏｕｒｃｅ）を含む３％ミルクＤＰＢＳ－Ｔ中で１時間インキュベートした。このインキュベーション後、ＰＶＤＦ膜を５％ミルクＤＰＢＳ－Ｔで５回洗浄し、その後３％ミルクＤＰＢＳ－Ｔ中の１：３０，０００抗モルモットまたは抗ウサギ西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）コンジュゲート二次抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈ）と共にインキュベートした。最後に、ＰＶＤＦ膜を５％ミルクＤＰＢＳ－Ｔで５回再度洗浄し、Ａｍｅｒｓｈａｍ　ＥＣＬ　Ｐｌｕｓウエスタンブロッティング検出システム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して発色させた。
【０６８８】
サブゲノムｍＲＮＡアッセイ。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｅ遺伝子サブゲノムｍＲＮＡ（ｓｇｍＲＮＡ）を、以前の記載と同様の手法を使用してＲＴ－ＰＣＲにより評価した[9、10、20]。標準曲線を作成するために、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｅ遺伝子ｓｇｍＲＮＡを、ｐｃＤＮＡ３．１発現プラスミドにクローニングした。このインサートを、Ａｍｐｌ

ｉＣａｐ－Ｍａｘ Ｔ７ Ｈｉｇｈ Ｙｉｅｌｄ Ｍｅｓｓａｇｅ Ｍａｋｅｒキット（Ｃｅｌｌｓｃｒｉｐｔ）を使用して転写して、標準物質用のＲＮＡを得た。ＲＴ－ＰＣＲの前に、製造元の使用説明書に従ってＳｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ ＩＩＩ ＶＩＬＯ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して、負荷動物から収集した試料また標準物質を逆転写した。Ｅ遺伝子ｓｇｍＲＮＡを標的とする配列を使用して、Ｔａｑｍａｎカスタム遺伝子発現アッセイ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を設計した２０。反応は、ＱｕａｎｔＳｔｕｄｉｏ６および７ＦｌｅｘリアルタイムＰＣＲシステム（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）で製造元の仕様に従って実施した。標準曲線を使用して、１ｍｌ当たりまたは１スワブ当たりのｓｇｍＲＮＡコピー数を算出した。定量アッセイの感度は、１ｍｌ当たりまたは１スワブ当たり５０コピーであった。

【０６８９】

ＰＦＵアッセイ。プラークアッセイのために、コンフルエント単層のベロＥ６細胞を６ウェルプレートで調製した。負荷動物から収集した指定の試料を系列希釈し、ウェルに添加し、３７℃で１時間インキュベートした。インキュベーション後、１．５ｍＬの０．５％メチルセルロース培地を各ウェルに添加し、プレートを５％CO_2で２日間３７℃にてインキュベートした。１ウェル当たり４００μＬの氷冷メタノールを添加することによりプレートを固定し、－２０℃で３０分間インキュベートした。固定した後、メタノールを廃棄し、細胞単層を、１ウェル当たり６００μＬの０．２３％クリスタルバイオレットで３０分間染色した。染色した後、クリスタルバイオレットを廃棄し、プレートを６００μＬの水で１回洗浄して、プラークを可視化および計数した。

【０６９０】

ＥＬＩＳＡ。手短に言えば、９６ウェルプレートを、１×ＤＰＢＳ中１μｇ／ｍｌのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ ＲＢＤタンパク質（Ａａｒｏｎ Ｓｃｈｍｉｄｔ、ＭａｓｓＣＰＲ）でコーティングし、４℃で一晩インキュベートした。インキュベーション後、プレートを洗浄緩衝液（１×ＤＰＢＳ中０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０）で１回洗浄し、３５０μＬカゼインブロッキング液／ウェルで２～３時間室温にてブロッキングした。インキュベーション後、ブロッキング溶液を廃棄し、プレートをブロット乾燥した。カゼインブロッキング液で希釈した熱不活化血清の系列希釈物をウェルに添加し、プレートを室温で１時間インキュベートしてから、プレートをさらに3回洗浄し、その後、１：１０００希釈の抗マカクＩｇＧ ＨＲＰ（ＮＩＨ ＮＨＰ Ｒｅａｇｅｎｔ Ｐｒｏｇｒａｍ）と共に室温で暗所にて１時間インキュベートした。次いで、プレートを洗浄緩衝液で３回洗浄し、１００μＬのＳｅｒａＣａｒｅ ＫＰＬ ＴＭＢ ＳｕｒｅＢｌｕｅ開始溶液を各ウェルに添加した。１ウェル当たり１００μＬのＳｅｒａＣａｒｅ ＫＰＬ ＴＭＢ停止溶液を添加することにより、プレート発色を停止させた。ＶｅｒｓａＭａｘまたはＯｍｅｇａマイクロプレートリーダーを使用して、４５０ｎｍの吸光度を記録した。ＥＬＩＳＡエンドポイント力価は、報告された＞０．２．Log_{10}エンドポイント力価の吸光度をもたらした最も高い血清希釈の逆数と規定した。

【０６９１】

偽ウイルス中和アッセイ。ルシフェラーゼレポーター遺伝子を発現するＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２偽ウイルスを、以前の記載と同様の手法で生成した９、１０、１６。手短に言えば、パッケージング構築物ｐｓＰＡＸ２（ＡＩＤＳ Ｒｅｓｏｕｒｃｅ ａｎｄ Ｒｅａｇｅｎｔ Ｐｒｏｇｒａｍ）、ルシフェラーゼレポータープラスミドｐＬｅｎｔｉ－ＣＭＶ Ｐｕｒｏ－Ｌｕｃ（Ａｄｄｇｅｎｅ）、およびスパイクタンパク質発現ｐｃＤＮＡ３．１－ＳＡＲＳ ＣｏＶ－２ ＳΔＣＴを、リン酸カルシウムでＨＥＫ２９３Ｔ細胞に共トランスフェクトした。トランスフェクションの４８時間後に、偽型ウイルスを含む上清を収集した。偽型ウイルスを、０．４５μｍフィルターで濾過することにより精製した。ワクチン接種動物に由来する抗血清の中和活性を決定するために、ＨＥＫ２９３Ｔ－ｈＡＣＥ２細胞を、９６ウェル組織培養プレートに1.75×10^4細胞／ウェルの密度で一晩播種した。熱不活化血清試料の２倍系列希釈物を調製し、５０μＬの偽ウイルスと混合した。混合物を３７℃で１時間インキュベートしてから、ＨＥＫ２９３Ｔ－ｈＡＣＥ２細胞に

添加した。感染の４８時間後、細胞を、Ｓｔｅａｄｙ－Ｇｌｏルシフェラーゼアッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ）で製造元の使用説明書に従って溶解した。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和力価を、ウイルス対照ウェルの平均と比べてＲＬＵの５０％低減が観察された試料希釈として規定した。

【０６９２】

ＥＬＩＳＰＯＴアッセイ。ＥＬＩＳＰＯＴプレートを、ＢＤ Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎの５μｇ／ウェル濃度のマウス抗ヒトＩＦＮ－γモノクローナル抗体で一晩４℃でコーティングした。プレートを、０．２５％Ｔｗｅｅｎ２０を含むＤＰＢＳで洗浄し、Ｒ１０培地（１１％ＦＢＳおよび１．１％ペニシリン－ストレプトマイシンを有するＲＰＭＩ）で１時間３７℃でブロッキングした。スパイク１およびスパイク２ペプチドプールは、タンパク質配列全体にわたる１１個アミノ酸が重複する１５個のアミノ酸ペプチドを含み、それぞれ、タンパク質のＮ末端半分およびＣ末端半分を反映する。スパイク１およびスパイク２ペプチドプールを２μｇ／ウェルの濃度に調製し、２００，０００細胞／ウェルを添加した。ペプチドおよび細胞を３７℃で１８～２４時間インキュベートした。このインキュベーション後のステップはすべて室温で実施した。プレートをコールター緩衝液で洗浄し、Ｕ－Ｃｙｔｅｃｈのウサギポリクローナル抗ヒトＩＦＮ－γビオチン（１μｇ／ｍＬ）と共に２時間インキュベートした。プレートを２回洗浄し、Ｓｏｕｔｈｅｒｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙのストレプトアビジン－アルカリホスファターゼ抗体（１μｇ／ｍＬ）と共に２時間インキュベートする。最終洗浄に続いて、ニトロ（Nitor）－ブルーテトラゾリウムクロリド／５－ブロモ－４－クロロ３’インドリルホスフェートｐ－トルイジン（toludine）塩（ＮＢＴ／ＢＣＩＰ色素原（chromagen））基質溶液を７分間添加した。色素原を破棄し、プレートを水で洗浄し、暗所で２４時間乾燥させた。プレートを走査し、Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｌｉｍｉｔｅｄ Ｉｍｍｕｎｏｓｐｏｔ分析機で計数した。

【０６９３】

細胞内サイトカイン染色アッセイ。10^6ＰＢＭＣ／ウェルを、ＣＤ４９ｄモノクローナル抗体（１μｇ／ｍＬ）を補充した１００μＬのＲ１０培地に再懸濁した。各試料を、モック（１００μＬのＲ１０＋０．５％ＤＭＳＯ、バックグラウンド対照）、ペプチドプール（２μｇ／ｍＬ）、または１０ｐｇ／ｍＬホルボールミリステートアセテート（ＰＭＡ）、および１μｇ／ｍＬイオノマイシン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）（１００μＬ；陽性対照）で評価し、３７℃で１時間インキュベートした。インキュベーション後、５０μＬのＲ１０中０．２５μＬのＧｏｌｇｉＳｔｏｐおよび０．２５μＬのＧｏｌｇｉＰｌｕｇを各ウェルに添加し、３７℃で８時間インキュベートし、次いで４℃で一晩保持した。翌日、細胞をＤＰＢＳで２回洗浄し、近ＩＲ生／死色素で１０分間染色し、次いでＣＤ２７９（クローンＥＨ１２．１、ＢＢ７００）、ＣＤ３８（クローンＯＫＴ１０、ＰＥ）、ＣＤ２８（クローン２８．２、ＰＥ ＣＹ５）、ＣＤ４（クローンＬ２００、ＢＶ５１０）、ＣＤ４５（クローンＤ０５８－１２８３、ＢＵＶ６１５）、ＣＤ９５（クローンＤＸ２、ＢＵＶ７３７）、ＣＤ８（クローンＳＫ１、ＢＵＶ８０５）に対する所定の力価のｍＡｂで３０分間染色した。次いで、細胞を２％ＦＢＳ／ＤＰＢＳ緩衝液で２回洗浄し、２００μＬのＢＤ ＣｙｔｏＦｉｘ／ＣｙｔｏＰｅｒｍ固定／透過処理溶液と共に１５分間インキュベートした。細胞を、１×Ｐｅｒｍ Ｗａｓｈ緩衝液（ＣｙｔｏＦｉｘ／ＣｙｔｏＰｅｒｍ固定／透過処理キット中のＢＤ Ｐｅｒｍ／Ｗａｓｈ（商標）緩衝液１０×をＭｉｌｌｉＱ水で希釈し、０．２２μｍフィルターに通した）で２回洗浄し、Ｋｉ６７（クローンＢ５６、ＦＩＴＣ）、ＣＤ６９（クローンＴＰ１．５５．３、ＥＣＤ）、ＩＬ１０（クローンＪＥＳ３－９Ｄ７、ＰＥ ＣＹ７）、ＩＬ１３（クローン ＪＥＳ１０－５Ａ２、ＢＶ４２１）、ＴＮＦ－α（クローンＭａｂ１１、ＢＶ６５０）、ＩＬ４（クローンＭＰ４－２５Ｄ２、ＢＶ７１１）、ＩＦＮ－γ（クローンＢ２７；ＢＵＶ３９５）、ＩＬ２（クローンＭＱ１－１７Ｈ１２、ＡＰＣ）、ＣＤ３（クローンＳＰ３４．２、Ａｌｅｘａ７００）に対するｍＡｂで３０分間細胞内染色した。細胞を、１×Ｐｅｒｍ Ｗａｓｈ緩衝液で２回洗浄し、２５０μＬの新たに調製した１．５％ホルムアルデヒドで固

定した。固定した細胞を、９６ウェル丸底プレートに移し、ＢＤ　ＦＡＣＳｙｍｐｈｏｎｙ（商標）システムで分析した。

【０６９４】

統計分析。ウイルス学的および免疫学的データの分析は、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　８．４．２（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ）を使用して実施した。群間のデータの比較は、両側マン－ホイットニー検定を使用して実施した。相関性は、両側スピアマン順位相関検定により評価した。０．０５未満のＰ値を有意とみなした。

【０６９５】

[実施例２１]

ＡＤ２６ワクチンはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２重症臨床疾患に対してハムスターを保護する

ハムスターにおける高用量ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染の臨床的およびウイルス学的特徴を評価し、安定化ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク（Ｓ）をコードする本発明によるＡｄ２６ベクターベースワクチンの保護有効性をストリンジェンドなモデルで評価した。

【０６９６】

２０匹のシリアンゴールデンハムスター（１０～１２週齢）に、5×10^{4}ＴＣＩＤ$_{50}$（Ｎ＝４；低用量）または5×10^{5}ＴＣＩＤ$_{50}$（Ｎ＝１６；高用量）のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を鼻腔内経路で接種した。高用量群では、組織ウイルス量および組織病理のために、４匹の動物を２日目に剖検し、４匹の動物を４日目に剖検し、残りの８匹の動物を縦断的に追跡した。

【０６９７】

残りの動物はすべて１４日目に剖検した。低用量群では、ハムスターは、６日目までに中央値で体重の１４．７％を失ったが、１４日目までに完全に回復した（図９６Ａ、９６Ｂ）、これは以前の研究と一致した（Chan et al., Clin Infect Dis, doi:10.1093/cid/ciaa325, (2020); Sia et al., Nature, doi:10.1038/s41586-020-2342-5 (2020); Imai et al., Procc Natl Acad Sci U S A 117, 16587-16595, (2020)）。高用量群では、ハムスターは、６日目までに中央値で体重の１９．９％を失った。縦断的に追跡したこの群の８匹の動物のうち、４匹は、６日目に、＞２０％の体重減少および呼吸促迫というＩＡＣＵＣ人道的安楽死基準を満たし、追加の２匹の動物は、７日目にこうした基準を満たした。残り２匹の動物は１４日目までに回復した。

【０６９８】

こうしたデータは、ハムスターにおける高用量のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染が、重症体重減少および部分的死亡に結び付いたことを示している。

【０６９９】

高用量ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を受け取り、２日目に剖検した４匹の動物、４日目に剖検した４匹の動物、および６～７日目に安楽死基準を満たした６匹中５匹の動物の組織ウイルス量を評価した（図９６Ｃ）。２日目に肺組織で10^{12}ＲＮＡコピー／ｇ、鼻孔および気管で10^{8}～10^{9}　６０　ＲＮＡコピー／ｇという高い組織ウイルス量中央値が観察され、心臓、胃腸管、脳、脾臓、肝臓、および腎臓では中央値は10^{5}～10^{8}ＲＮＡコピー／ｇであった。これは播種性感染症であることを示す。組織ウイルス量は、体重減少が続いていたにも関わらず、６～７日目までにおよそ２ｌｏｇ低下した。

【０７００】

高用量ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に感染したハムスターの組織病理を、２日目（Ｎ＝４）、４日目（Ｎ＝４）、６～７日目（Ｎ＝６）、および１４日目（Ｎ＝２）に評価した。感染は、鼻甲介（図９７ａ）および細気管支上皮の顕著な炎症性浸潤および多巣性上皮壊死を伴い、内腔に変性好中球および細胞残渣をもたらした（図９７ｂ）。近隣血管の内皮は、単核細胞が内皮に付着し、血管壁内で遊走することに反応し、内皮炎を示した（図９７ｂ）。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染後早くも２日目に肺実質の３０～６０％に影響を及ぼす肺硬化により特徴付けられる中等症～重症多病巣性間質性肺炎があった（図９７ｃ）。炎症性浸潤物は、大量のマクロファージおよび好中球で構成され、リンパ球は少なかった。鼻甲介上皮（図９７ｄ）および細気管支上皮細胞（図９７ｅ）は、炎症および壊死の領域に

おいて、免疫組織化学（ＩＨＣ）的に、ＳＡＲＳヌクレオカプシドタンパク質（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－Ｎ）に対して強力に陽性であった。また、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－Ｎ　ＩＨＣでは、マクロファージと形態学的に一致する、肺胞中隔および間質性単核細胞の局所的に著しい染色が示された（図９７ｆ）。同様に、かなりのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスＲＮＡ（ｖＲＮＡ）が、炎症領域の細気管支上皮および肺間質で観察された（図９７ｇ、９７ｈ）。

【０７０１】

肺におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ｖＲＮＡおよびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－Ｎタンパク質の発現レベルは両方とも、２日目に最も高く、４日目までに減少し、７日目までには最小限のｖＲＮＡおよびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－Ｎタンパク質しか検出されなかった（図１００）。肺炎は、肺間質ならびにＣＤ３＋Ｔリンパ球におけるＩｂａ－１＋マクロファージの大きな炎症性浸潤により特徴付けられた（図９７ｉ、９７ｊ）。数多くの生存および変性好中球が、肺全体に、特に壊死領域で検出され、肺全体で好中球ミエロペルオキシダーゼ（ＭＰＯ）が高度に発現された（図９７ｋ）。また、インターフェロン誘導性遺伝子産物であるＭＸ１のびらん性発現が肺で検出された（図９７ｌ）。２日目にピークに達したＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ｖＲＮＡおよびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－Ｎ検出の動力学とは対照的に、こうした炎症マーカーは７日目にピークに達し（図１００）、それと一致して体重減少および死亡率も最も高かった（図９６Ａ、９６Ｂ）。ＲＮＡｓｃｏｐｅによりｖＲＮＡが肺において検出されたことは、単にウイルス接種を反映したものではない。なぜならば、本発明者らは、マイナス鎖ｖＲＮＡだけでなく、プラス鎖ｖＲＮＡも検出し、検出は、負荷後２日目から７日目まで場所もパターンも重複していたためである。肺には、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ｖＲＮＡ発現（アンチセンス鎖およびセンス鎖の両方）が存在し、ＡＣＥ２受容体発現はロバストであった（データ非表示）。

【０７０２】

本発明者らは、（ｉ）フォールドン三量体化ドメインを有する可溶性細胞外ドメインを反映する、膜貫通領域および細胞質尾部が欠失されたＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２スパイク（Ｓ）（Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰ）または（ｉｉ）完全長Ｓ（Ｓ．ＰＰ）をコードし、両方ともフューリン切断部位の突然変異および２つのプロリン安定化突然変異を有する組換え複製不全Ａｄ２６ベクターを産生させた（図９８Ａ）。

【０７０３】

実施例２０には、アカゲザルにおけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷に対するＳ．ＰＰワクチンの免疫原性および保護有効性を記載した。

【０７０４】

この例では、５０匹のシリアンゴールデンハムスターを、Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰまたはＳ．ＰＰ（Ｎ＝１０／群）またはシャム対照（Ｎ＝１０）をコードする10^{10}または10^{9}ウイルス粒子（ｖｐ）のＡｄ２６ベクターで免疫化した。動物は、０週目に筋肉内経路による単回ワクチン接種を受けた。本発明者らは、２週目および４週目にすべての動物において、ＥＬＩＳＡによる受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）特異的結合性抗体（図９８Ｂ）および偽ウイルス中和アッセイによる中和抗体（ＮＡｂ）（図９８Ｃ）を観察した。４週目に、Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰは、Ａｄ２６－Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰ（１０１４、１１８５）と比較して、４．０～４．７倍より高いＥＬＩＳＡ力価中央値（４４７０、４７５７）を誘発した（図９８Ｂ、Ｐ＜０．０００１、両側マン－ホイットニー検定）。同様に、Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰは、Ａｄ２６－Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰ（１３９、２１１）と比較して、１．８～２．６倍より高いＮＡｂ　ＩＣ５０力価中央値（３５９、３７５）を誘発した（Ｐ＜０．０５、両側マン－ホイットニー検定）。各ベクターについて、試験した２つの用量は同等であると考えられた。第２週および第４週の両方においてＥＬＩＳＡデータおよびＮＡｂデータは相関していた（それぞれ、Ｒ＝０．７０７４、Ｐ＜０．０００１、およびＲ＝０．７８４９、Ｐ＜０．０００１、両側スピアマン順位相関検定）。

【０７０５】

本発明者らは、４週目のワクチン接種動物におけるＳ特異的およびＲＢＤ特異的抗体応

答を、システム血清学によりさらに特徴付けた（Chung, et al., Cell 163, 988-998, doi:10.1016/j.cell.2015.10.027 (2015)）。ＩｇＧ、ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ３、ＩｇＭ、Ｆｃ受容体ＦｃＲγ２、ＦｃＲγ３、およびＦｃＲγ４、ならびに抗体依存性補体沈着（ＡＤＣＤ）応答を評価した（図９８Ｄ～９８Ｆ）。Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰでは、Ａｄ２６．Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰと比較してより高くより一貫した応答が観察され（図９８Ｄ、９８Ｆ）、こうした抗体特徴の主成分分析により、こうした２つのワクチンが異なるプロファイルを有していたことが確認された（図９８Ｅ）。

【０７０６】

４週目に、すべての動物に、５×１０^{5}ＴＣＩＤ$_{50}$のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を鼻腔内経路で負荷した。４日目に、各群３匹の動物を組織ウイルス量および組織病理のために剖検し、各群の残り７匹の動物を１４日目まで追跡した。シャム対照では、ハムスターは、７日目までに中央値で１９．６％の体重を失い、縦断的に追跡した動物の４３％（７匹中３匹）が６～７日目に安楽死基準を満たした（図９９Ａ、９９Ｂ）。Ａｄ２６－Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰワクチン接種動物は、中央値で８．７％の体重を失い、Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰワクチン接種動物は中央値で４．０％の体重を失った（図９９Ａ、９９Ｂ）。最大体重減少パーセントは、シャム対照と比較して、両ワクチン接種群において顕著により低く（Ｐ＜０．０００１、両側マン－ホイットニー検定；図９９Ｃ）、Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰを受け取った動物は、Ａｄ２６．Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰを受け取った動物よりも少ない体重減少を示した（Ｐ＜０．０００１、両側マン－ホイットニー検定；図９９Ｃ）。両ワクチンは、シャム対照と比較して、人道的安楽死基準を満たすことであると規定される死亡に対する保護を示した（Ｐ＝０．０２、両側フィッシャー直接検定）。２つのハムスター実験を複合的に分析すると、両ワクチンが効果的に死亡に対する保護を示すことが確認された（Ｐ＝０．００７、両側フィッシャー直接検定）。２週目（Ｒ＝－０．８９９２、Ｐ＜０．０００１）および４週目（Ｒ＝－０．９３４４、Ｐ＜０．０００１）のＥＬＩＳＡ応答は、最大体重減少パーセントと逆相関した。２週目（Ｒ＝－０．７３８０、Ｐ＜０．０００１）および４週目（Ｒ＝－０．８０７５、Ｐ＜０．０００１）のＮＡｂ応答も、最大体重減少パーセントと逆相関した。

【０７０７】

組織球および好中球炎症性浸潤は、すべての肺葉で顕著に低減され、Ａｄ２６－Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰおよびＡｄ２６－Ｓ．ＰＰワクチン接種ハムスターでは、シャム対照と比較して、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ｖＲＮＡが有意に低減されたことが観察された（それぞれ、Ｐ＝０．００４およびＰ＝０．００４、両側マン－ホイットニー検定）。

【０７０８】

この実施例では、完全長融合前安定化Ｓ免疫原（Ｓ．ＰＰ）をコードするＡｄ２６ベクターの単回免疫化が、ハムスターにおける高用量ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷後の重症臨床疾患に対する保護を示すことが実証された。シャム対照は、顕著な体重減少、重症肺炎、および部分的死亡を示した。対照的に、ワクチン接種動物は、最小限の体重減少および肺炎を示し、死亡はなかった。ワクチン誘発性の結合性および中和抗体応答は、臨床疾患に対する保護、ならびに上気道および下気道におけるウイルス複製の低減と相関していた。

【０７０９】

このモデルにおける臨床疾患のこの重症度は、ハムスターおよび他の種におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染に関する以前の研究とは対照的である。ハムスターは、ヒトＡＣＥ２受容体と相同性である結果として、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の許容モデルであり、ハムスター間の伝染が報告されている（Sia, et al., Nature, doi:10.1038/s41586-020-2342-5 (2020)）。動物年齢、動物起源、およびウイルス負荷ストックなど、まだ完全には規定されていない生物学的要因も臨床疾患に影響を及ぼす可能性があるが、高負荷用量は、本研究では広範な臨床疾患をもたらした。

【０７１０】

非ヒト霊長類におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ワクチン研究では、現在までに、感染に対する保護または上気道および下気道でのウイルス複製の低減が実証されている。実施例２

０では、Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰの単回免疫化は、アカゲザルにおいてＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷からの完全なまたはほぼ完全な保護を提供したことが報告された。しかしながら、非ヒト霊長類におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染は、重症臨床疾患または死亡をもたらさない。ウイルス複製に対する保護は、必ずしも重症疾患に対する保護を意味するわけではないため、重症疾患モデルは、現行の非ヒト霊長類負荷モデルを補完するために有用であるだろう。実際、本研究におけるハムスターの組織病理学的分析では、肺のウイルス量は、２日目から７日目まで減少したが、炎症マーカーは、この期間中増加し続け、継続的な体重減少と相関していた。こうしたデータは、ハムスターにおける進行性臨床疾患は、主に、感染により引き起こされるが、ウイルス複製が減少した場合でも増加し続ける炎症プロセスであることを示唆する。

【０７１１】

ヒトのＣＯＶＩＤ－１９は重症臨床疾患に進行する可能性があるため、劇症肺炎および死亡を含む重症臨床疾患を再現する前臨床モデルにおいてＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ワクチン候補を試験することが重要である。この実施例に記載の高用量ハムスターモデルは、こうした基準の多くを達成しているため、重症疾患の病態形成を研究し、対策を試験するために有用であり得る。このモデルにおける臨床疾患の主な所見は、ある特定のｈＡＣＥ２トランスジェニックマウスモデルで報告されている脳炎ではなく、重症肺炎であった。さらに、結合性および中和抗体応答は保護と相関していた。

【０７１２】

まとめると、こうしたデータは、Ａｄ２６－Ｓ．ＰＰの単回免疫化が、ハムスターにおいて高用量ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染後の重症臨床疾患に対してロバストな保護を提供することを実証している。本発明者らが知る限り、重症ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２肺炎および死亡に対するワクチン保護は、これまで報告されていない。Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓとも呼ばれるＡｄ２６－Ｓ．ＰＰは、現在、臨床試験で評価中である。このハムスター重症疾患モデルは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ワクチン、療法、および他の対策の試験に有用であることが証明されるはずである。

【０７１３】

方法

動物および研究設計。１０～１２週齢の雄および雌シリアンゴールデンハムスター（Ｅｎｖｉｇｏ）７０匹を無作為に群に割り振った。動物はすべて、Ｂｉｏｑｕａｌ，Ｉｎｃ．（ロックビル、メリーランド州）にて飼育された。動物は、Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰもしくはＳ．ＰＰを発現するＡｄ２６ベクターまたはシャム対照（Ｎ＝１０／群）を受け取った。動物は、０週目にアジュバントなしで筋肉内経路により10^{10}または10^{9}ウイルス粒子（ｖｐ）のＡｄ２６ベクターの単回免疫化を受けた。４週目に、すべての動物に、５．０×$10^{5}$$TCID_{50}$（６×$10^{8}$ＶＰ、５．５×$10^{4}$ＰＦＵ）または５．０×$10^{4}$$TCID_{50}$（６×$10^{7}$ＶＰ、５．５×$10^{3}$ＰＦＵ）のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を負荷した、このＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２は、ＵＳＡ－ＷＡ１／２０２０（ＮＲ－５２２８１；ＢＥＩ　Ｒｅｓｏｕｒｃｅｓ）を１継代したものに由来した。ウイルスを、鼻腔内（ＩＮ）経路により１００μＬ（各鼻孔に５０μＬ）で投与した。体重を毎日評価した。免疫学的およびウイルス学的アッセイはすべて盲検で実施した。４日目に、動物のサブセットを、組織ウイルス量および病理のために安楽死させた。動物研究はすべて、すべての関連する地方、州、および連邦規制に準拠して実施し、Ｂｉｏｑｕａｌの施設内動物管理使用委員会（ＩＡＣＵＣ）の承認を受けた。

【０７１４】

Ａｄ２６ベクター。Ａｄ２６ベクターを、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク（Ｓ）タンパク質配列（Ｗｕｈａｎ／ＷＩＶ０４／２０１９；Ｇｅｎｂａｎｋ　ＭＮ９９６５２８．１）の２つのバリアントを用いて構築した。配列をコドン最適化し合成した。複製不全Ｅ１／Ｅ３欠失Ａｄ２６ベクターを、全長Ａｄ２６ベクターゲノムおよび導入遺伝子発現カセットを含むプラスミドを使用してＰＥＲ．Ｃ６．ＴｅｔＲ細胞で産生した。シャム対照は、Ａｄ２６－空ベクターを含んでいた。ベクターを配列決定し、使用前に発現を試験した

。

【０７１５】

組織病理学および免疫組織化学。組織を、新たに調製した４％パラホルムアルデヒドで２４時間固定し、７０％エタノールに移し、７～１０日以内にパラフィン包埋し、ブロックを５μｍに切片化した。スライドを６５℃で３０～６０分間焼成し、次いでキシレンで脱パラフィンし、エタノールから蒸留水へと段階的に再水和した。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－Ｎ、Ｉｂａ－１、およびＣＤ３　ＩＨＣの場合、クエン酸塩緩衝液（Ｔｈｅｒｍｏ；ＡＰ－９００３－５００）中で２５分間、蒸気設定の圧力鍋を使用して熱誘導エピトープ賦活化（ＨＩＥＲ）を実施し、続いて３％過酸化水素で処理した。次いで、スライドを蒸留水ですすぎ、タンパク質を１５分間ブロッキングし（ＢｉｏＣａｒｅ、ＢＥ９６５Ｈ）、続いて１×リン酸緩衝食塩水ですすいだ。

【０７１６】

一次ウサギ抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ核タンパク質抗体（Ｎｏｖｕｓ；ＮＢ１００－５６５７６、１：５００または１：１０００）、ウサギ抗Ｉｂａ－１抗体（Ｗａｋｏ；０１９－１９７４１、１：５００）、またはウサギ抗ＣＤ３（Ｄａｋｏ；Ａ０４５２、１：３００）を３０分間アプライし、続いてウサギＭａｃｈ－２ＨＲＰ－ポリマー（ＢｉｏＣａｒｅ；ＲＨＲＰ５２０Ｌ）を３０分間アプライし、次いでヘマトキシリンで対比染色し、続いて０．２５％アンモニア水を使用してブルーイングした。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－Ｎ、Ｉｂａ－１、およびＣＤ３の標識は、Ｂｉｏｇｅｎｅｘ　ｉ６０００自動染色装置（ｖ３．０２）で実施した。一部の場合では、ＣＤ３、Ｉｂａ－１、およびＡＣＥ－２染色は、１：４００のＣＤ３（Ｔｈｅｒｍｏ　カタログ番号ＲＭ－９１０７－Ｓ；クローンＳＰ７）、１：５００のＩｂａ－１（ＢｉｏＣａｒｅ　カタログ番号ＣＰ２９０Ａ；ポリクローナル）、またはＡＣＥ－２（Ａｂｃａｍ；ａｂ１０８２５２）で実施した。これらはすべて、ウサギＰｏｌｉｎｋ－１　ＨＲＰ（ＧＢＩ　Ｌａｂｓ　カタログ番号Ｄ１３－１１０）を使用して検出した。好中球（ＭＰＯ）および１型ＩＦＮ応答（Ｍｘ１）は、ウサギＰｏｌｉｎｋ－１　ＨＲＰを使用して１：１０００のＭＰＯ検出（Ｄａｋｏ　カタログ番号Ａ０３９８；ポリクローナル）で、およびマウスＰｏｌｉｎｋ－２　ＨＲＰ（ＧＢＩ　Ｌａｂｓ　カタログ番号Ｄ３７－１１０）を使用して１：１０００のＭｘ１検出（ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ カタログ番号ＭＡＢＦ９３８；クローンＭ１４３／ＣＬ１４３）で実施した。ＣＤ３、Ｉｂａ－１、ＭＰＯ、およびＭｘ１　ＩＨＣの染色は、以前に記載の通り、Ｂｉｏｃａｒｅ　ｉｎｔｅｌｌｉＰＡＴＨ自動染色装置を使用し、すべての抗体を室温で１時間インキュベートして実施した。組織病理は、２人の獣医病理学者が独立して評価した。

【０７１７】

ＲＮＡｓｃｏｐｅ　ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション。ＲＮＡｓｃｏｐｅ　ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーションを、以前に記載の通り（Chandrashekar, A. et al., Science, doi:10.1126/science.abc4776 (2020)）、プラス鎖ウイルスＲＮＡを標的とするＳＡＲＳ－ＣｏＶ２アンチセンス特異的プローブｖ－ｎＣｏＶ２０１９－Ｓ（ＡＣＤ　カタログ番号８４８５６１）およびマイナス鎖ゲノムウイルスＲＮＡを標的とするＳＡＲＳ－ＣｏＶ２センス特異的プローブｖｎＣｏＶ２０１９－ｏｒｆ１ａｂ－ｓｅｎｓｅ（ＡＣＤ　カタログ番号８５９１５１）を使用して実施した。手短に言えば、スライドをキシレンで脱パラフィンし、エタノールから蒸留水へと段階的に再水和した後、ＡＣＤ　Ｐ２賦活化緩衝液（ＡＣＤ　カタログ番号３２２０００）中にて３０分間９５～９８℃で賦活化を実施し、続いてＰＢＳで１：１０に希釈したプロテアーゼＩＩＩ（ＡＣＤ　カタログ番号３２２３３７）を用いて２０分間４０℃で処理した。次いで、スライドを、ＰＢＳ中３％Ｈ２Ｏ２と共に室温で１０分間インキュベートした。ハイブリダイゼーションの前に、微量遠心分離機を使用してプローブストックを１３，０００ｒｐｍで１０分間遠心分離し、次いでプローブ希釈液（ＡＣＤ　カタログ番号３００４１）で１：２に希釈して、プローブ凝集組織アーチファクトを低減させた。ＲＮＡｓｃｏｐｅ（登録商標）２．５ＨＤ検出試薬－ＲＥＤ（ＡＣＤ　カタログ番号　３２２３６０）を使用してスライドを発色させた。

【０７１８】
定量的画像分析。各動物の少なくとも１つの肺葉断面に対して、ＨＡＬＯソフトウェア（ｖ２．３．２０８９．２７またはｖ３．０．３１１．４０５；Ｉｎｄｉｃａ Ｌａｂｓ）を使用して定量的画像分析を実施した。＞１の断面が利用可能な場合、各肺葉を個々のデータポイントとして定量化した。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－Ｎについては、マルチプレックスＩＨＣ ｖ２．３．４アルゴリズムを、酸性ヘマチンの除外スクリーニングと共に使用して、ＳＡＲ－Ｎタンパク質陽性細胞のパーセンテージを細胞総数の割合として決定した。Ｉｂａ－１には、マルチプレックスＩＨＣ ｖ２．３．４アルゴリズムを定量化に使用した。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ ＲＮＡｓｃｏｐｅ ＩＳＨおよびＭｘ１定量化では、Ａｒｅａ Ｑｕａｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｖ２．１．３モジュールを使用して、総ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２アンチセンスもしくはセンスプローブまたはＭｘ１タンパク質のパーセンテージを総組織面積の割合として決定した。ＭＰＯ（好中球）およびＣＤ３＋細胞の定量化の場合、血管（＞５ｍｍ^2）、気管支、細気管支、軟骨、および結合組織を除外するようにスライドを注釈付けし、その後、Ｃｙｔｏｎｕｃｌｅａｒ ｖ１．６モジュールを使用して、ＭＰＯ＋またはＣＤ３＋細胞を検出し、総肺胞組織（ＰＭＮ／ｍｍ^2）の割合として算出した。これは、Ａｒｅａ Ｑｕａｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｖ２．１．３ ２１モジュールを実行することにより決定した。すべての場合において、注釈が正確であることを確認するため、すべての画像の手動検査を各試料に対して実施した。

【０７１９】
サブゲノムｍＲＮＡアッセイ。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ Ｅ遺伝子サブゲノムｍＲＮＡ（ｓｇｍＲＮＡ）を、以前に記載の通り、プライマーおよびプローブを使用したＲＴ－ＰＣＲにより評価した[10、11、23]。手短に言えば、ＱＩＡｃｕｂｅ ＨＴ（Ｑｉａｇｅｎ）およびＲＮｅａｓｙ ９６ ＱＩＡｃｕｂｅ ＨＴキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して、いくつかの解剖学的部位に由来する組織ホモジネートから全ＲＮＡを抽出した。ｐｃＤＮＡ３．１発現プラスミドにクローニングされたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ Ｅ遺伝子ｓｇｍＲＮＡを使用して標準曲線を作成した。このインサートを、ＡｍｐｌｉＣａｐ－ＭａｘＴ７ Ｈｉｇｈ Ｙｉｅｌｄ Ｍｅｓｓａｇｅ Ｍａｋｅｒキット（Ｃｅｌｌｓｃｒｉｐｔ）を使用して転写した。ＲＴ－ＰＣＲの前に、製造元の使用説明書に従ってＳｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ ＩＩＩ ＶＩＬＯ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して、負荷動物から収集した試料また標準物質を逆転写した。Ｔａｑｍａｎカスタム遺伝子発現アッセイ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を、Ｅ遺伝子ｓｇｍＲＮＡを標的とする配列を使用して設計した。ＱｕａｎｔＳｔｕｄｉｏ６および７ＦｌｅｘリアルタイムＰＣＲシステム（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）で製造元の仕様に従って反応を実施した。標準曲線を使用して、組織１グラム当たりのｓｇｍＲＮＡコピー数を算出した。定量アッセイの感度は１００コピーであった。

【０７２０】
ＥＬＩＳＡ。ＲＢＤ特異的結合抗体を、本質的に記載の通りにＥＬＩＳＡにより評価した（Chandrashekar, et al., Science, doi:10.1126/science.abc4776 (2020); Yu, et al., Science, doi:10.1126/science.abc6284 (2020)）[10、11]。手短に言えば、９６ウェルプレートを、１×ＤＰＢＳ中１μｇ／ｍＬのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ ＲＢＤタンパク質（Ａａｒｏｎ Ｓｃｈｍｉｄｔ、ＭａｓｓＣＰＲ）または１μｇ／ｍＬのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク（Ｓ）タンパク質（Ｓｉｎｏ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ）でコーティングし、４℃で一晩インキュベートした。インキュベーション後、プレートを洗浄緩衝液（１×ＤＰＢＳ中０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０）で１回洗浄し、３５０μＬのカゼインブロッキング液／ウェルで２～３時間室温にてブロッキングした。インキュベーション後、ブロッキング溶液を廃棄し、プレートをブロット乾燥した。

【０７２１】
カゼインブロッキング液での熱不活化血清の３倍系列希釈物をウェルに添加し、プレートを室温で１時間インキュベートし、プレートを３回洗浄し、次いでその後、カゼインブロッキング液中０．１μｇ／ｍＬの抗ハムスターＩｇＧ ＨＲＰ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ Ｂ

ｉｏｔｅｃｈ）と共に室温で暗所にて1時間インキュベートした。プレートを３回洗浄し、次いで、１００μＬのＳｅｒａＣａｒｅ　ＫＰＬ　ＴＭＢ　ＳｕｒｅＢｌｕｅ開始溶液を各ウェルに添加した。１ウェル当たり１００μＬのＳｅｒａＣａｒｅ　ＫＰＬ　ＴＭＢ停止溶液を添加することにより、プレート発色を停止させた。ＶｅｒｓａＭａｘまたはＯｍｅｇａマイクロプレートリーダーを使用して、４５０ｎｍの吸光度を記録した。ＥＬＩＳＡエンドポイント力価は、バックグラウンドの２倍を上回る吸光度がもたらされた最も高い血清希釈の逆数であると規定した。

【０７２２】

偽ウイルス中和アッセイ。ルシフェラーゼレポーター遺伝子を発現するＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２偽ウイルスを、以前の記載と同様の手法で生成した[10、11、21]。

【０７２３】

手短に言えば、パッケージング構築物ｐｓＰＡＸ２（ＡＩＤＳ　Ｒｅｓｏｕｒｃｅ　ａｎｄ　Ｒｅａｇｅｎｔ　Ｐｒｏｇｒａｍ）、ルシフェラーゼレポータープラスミドｐＬｅｎｔｉ－ＣＭＶ　Ｐｕｒｏ－Ｌｕｃ（Ａｄｄｇｅｎｅ）、およびスパイクタンパク質発現ｐｃＤＮＡ３．１－ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２　ＳΔＣＴを、リポフェクタミン２０００（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）によりＨＥＫ２９３Ｔ細胞に共トランスフェクトした。トランスフェクションの４８時間後に、偽型ウイルスを含む上清を収集した。偽型ウイルスを、０．４５μｍフィルターで濾過することにより精製した。ワクチン接種動物に由来する抗血清の中和活性を決定するために、ＨＥＫ２９３Ｔ－ｈＡＣＥ２細胞を、９６ウェル組織培養プレートに１．７５×10^4個の２９３細胞／ウェルの密度で一晩播種した。熱不活化血清試料の３倍系列希釈物を調製し、５０μＬの偽ウイルスと混合した。混合物を３７℃で１時間インキュベートしてから、ＨＥＫ２９３Ｔ－ＡＣＥ２細胞に添加した。感染の４８時間後、細胞を、製造元の使用説明書に従ってＳｔｅａｄｙ－Ｇｌｏルシフェラーゼアッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ）で溶解した。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和力価を、ウイルス対照ウェルの平均と比べてＲＬＵの５０％低減が観察された試料希釈として規定した。

【０７２４】

ルミネックス。抗原特異的抗体価の相対量を検出するために、カスタマイズされたルミネックスアッセイを以前に記載の通り実施した２５。これにより、蛍光標識ミクロスフェア（Ｌｕｍｉｎｅｘ）を、スパイクタンパク質（Ｓ）（Ｅｒｉｃ　Ｆｉｓｃｈｅｒ、Ｄａｎａ　Ｆａｒｂｅｒ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）、Ｓ１、およびＳ２（Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ）、ならびに受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）（Ａａｒｏｎ　Ｓｃｈｍｉｄｔ、Ｒａｇｏｎ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）を含むＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２抗原と、ＥＤＣ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）およびスルホ－ＮＨＳ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）による共有結合　Ｎ５０５　ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）－エステル連結を介してカップリングした。１領域当たり１．２×10^3　５０６　個のビーズおよび抗原を３８４ウェルプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ）に添加し、希釈した血清（ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ３、ＩｇＭの場合は１：９０、全ＩｇＧおよびＦｃ受容体結合アッセイの場合は１：５００）と共に９００ｒｐｍで振盪しながら４℃で１６時間インキュベートした。免疫複合体の形成後、自動プレート洗浄機（Ｔｅｃａｎ）を使用して、ミクロスフェアを０．１％ＢＳＡおよび０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０（ルミネックスアッセイ緩衝液）で３回洗浄した。ＰＥ標識ヤギ抗マウスＩｇＧ、ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ３、およびＩｇＭ検出抗体（ｓｏｕｔｈｅｒｎ　ｂｉｏｔｅｃｈ）をルミネックスアッセイ緩衝液で０．６５ｕｇ／ｍＬに希釈し、ビーズと共に９００ｒｐｍで振盪しながら室温で１時間インキュベートした。同様に、Ｆｃ受容体結合プロファイルについては、組換えマウスＦｃγＲ２、ＦｃγＲ３、およびＦｃγＲ４（Ｄｕｋｅ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　ｆａｃｉｌｉｔｙ）を、試料に添加する前に、ビオチン化し（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、１０分間ストレプトアビジン－ＰＥにコンジュゲートした（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）。こうしたマウス抗体およびタンパク質は、ハムスターに対して交差反応性である。次いで、コーティングされたビーズを洗浄し、ロボットアーム（ＰＡＡ）が取り付けられたフローサイトメーターｉＱｕｅ（Ｉｎｔｅｌｌｉｃｙｔ）で読

み取った。各ビーズ領域のイベントをゲーティングし、ビーズ陽性イベントのＰＥの蛍光中央値を報告した。試料は、各二次検出試薬１つ当たり２連で実験した。

【０７２５】

抗体依存性補体沈着（ＡＤＣＤ）。ＡＤＣＤアッセイを、以前に記載の通りに実施した[26]。手短に言えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＳおよびＲＢＤをビオチン化し（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）、１μｍ赤色蛍光ニュートラアビジンビーズ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）に３７℃で２時間カップリングし、その後過剰な抗原を洗い流した。免疫複合体を形成するために、１．８２×10^8個の抗原コーティングビーズを、９６ウェル丸底プレートの各ウェルに添加し、１：１０希釈試料と共に３７℃で２時間インキュベートした。凍結乾燥モルモット補体を、製造元（Ｃｅｄａｒｌａｎｅ）の使用説明書に従って水で再構成し、１ウェル当たり４μＬを、Ｍｇ２＋およびＣａ２＋を含むゼラチンベロナール緩衝液（ＧＶＢ＋＋、Ｂｏｓｔｏｎ　ＢｉｏＰｒｏｄｕｃｔｓ）中の免疫複合体に３７℃で２０分間添加した。免疫複合体を、ＰＢＳ中１５ｍＭのＥＤＴＡで洗浄し、モルモット補体Ｃ３に対するフルオレセインコンジュゲートヤギＩｇＧ画分（ＭｐＢｉｏ）を添加した。

【０７２６】

染色後、試料を、４％パラホルムアルデヒド（ＰＦＡ）で固定し、ロボットアーム（ＰＡＡ）を使用したフローサイトメトリー（Ｉｎｔｅｌｌｉｃｙｔ、ｉＱｕｅ　Ｓｃｒｅｅｎｅｒ　ｐｌｕｓ）により試料取得を実施した。イベントはすべて、単一細胞およびビーズ陽性イベントでゲーティングした。Ｃ３陽性イベントの中央値が報告されている。試料はすべて、別々の日に２連で実験した。

【０７２７】

統計分析。免疫学的データ、ウイルス学的データ、および体重データの分析は、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ８．４．２（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ）を使用して実施した。群間のデータの比較は、両側マン－ホイットニー検定を使用して実施した。死亡率は、両側フィッシャー直接検定により評価した。相関性は、両側スピアマン順位相関検定により評価した。０．０５未満のＰ値を有意とみなした。システム血清学データはすべて、ｌｏｇ１０に変換した。レーダープロットでは、群内の中央値を使用する前に、群全体で最小値が０、最大値が１になるように各抗体特徴を正規化した。多変量プロファイルを比較するために、Ｒバージョン３．６．１パッケージの「ｒｏｐｌｓ」を使用して主成分分析（ＰＣＡ）を構築した。ヒートマップでの視覚化では、Ｓ．ｄＴＭ．ＰＰ群およびＳ．ＰＰ群のｚスコア化特徴の平均値の違いを示した。ヒートマップにおいて有意性を示すために、Ｂｅｎｊａｍｉｎｉ－Ｈｏｃｈｂｅｒｇ補正を使用して、行内の多重比較を補正した。

【０７２８】

[実施例２２]

１８歳以上の成人における、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２媒介性ＣＯＶＩＤ－１９を予防するためのＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの有効性および安全性を評価するための無作為化二重盲検プラセボ対照第３相研究

１８歳以上の成人における、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２媒介性ＣＯＶＩＤ－１９を予防するためのＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの有効性および安全性を評価するための無作為化二重盲検プラセボ対照第３相研究を実施する。

【０７２９】

Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓは、本明細書に記載の通り、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス－２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）スパイク（Ｓ）タンパク質をコードするように構築された組換え複製不全アデノウイルス２６型（Ａｄ２６）ベクターで構成される一価ワクチンである。

【０７３０】

これは、≧１８歳成人における多施設無作為化二重盲検プラセボ対照第３相ピボタル有効性および安全性研究である。Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの有効性、安全性、および免疫原

性を、ＣＯＶＩＤ－１９のリスクがより高く（年齢、性別、人種／民族、職業、併存疾患に基づき）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２活動が高い地域に居住しているかまたは居住する予定である、２用量の治験ワクチンを投与した後の参加者において評価することになる。

【０７３１】

参加者を、並行して１：１比で無作為化して、下記の表に示されているように、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓまたはプラセボの筋肉内（ＩＭ）注射を受けることになる。Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓを、１×１０^{11}ウイルス粒子（ｖｐ）の用量レベルにてまたは１×１０^{10}の用量レベルにて１用量または２用量スケジュールで投与することになる。

【０７３２】

募集した参加者の最低でもおよそ２５％が≧６０歳であり、募集した参加者の最大でおよそ２５％が≧１８～＜４０歳であることが意図されている。

【０７３３】

時差登録戦略を使用することになる。

・　ステージ１：最初に、重症ＣＯＶＩＤ－１９に進行するリスクの増加に関連付けられる併存疾患を有していない１，０００人の参加者（５００人のＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓレシピエントおよび５００人のプラセボレシピエントを含む；年齢群間で均等に分散）が、ファーストインヒューマン（ＦＩＨ）研究ＶＡＣ３１５１８ＣＯＶ１００１の対応する年齢群からの、許容される２９日目安全性およびＴ－ヘルパー１／Ｔ－ヘルパー２（Ｔｈ１／Ｔｈ２）を含む適切な免疫原性データに基づき２つの年齢依存性亜群（ステージ１ａでは≧１８～＜６０歳およびステージ１ｂでは≧６０歳）に登録されることになる（詳細については、この文書の本文を参照されたい）。

・　ステージ２：ステージ１でのワクチン接種をいったん休止して、独立データ監視委員会（ＩＤＭＣ、データ安全性監視委員会［ＤＳＭＢ］としても知られている）が、３日間安全性データ（すべての４等級ＡＥおよびすべてのＳＡＥで構成される）を検討することを可能にした後、安全上の懸念が特定されない場合は、登録を続行し、２つの年齢依存性亜群（ステージ２ａでは≧１８歳～＜６０歳およびステージ２ｂでは≧６０歳）が、重症ＣＯＶＩＤ－１９に進行するリスクの増加に関連付けられる併存疾患を有する参加者を含むように登録を拡大させることになる。

【０７３４】

重症ＣＯＶＩＤ－１９に進行するリスクの増加に関連付けられるかまたは関連付けられる可能性のある併存疾患（または危険因子）としては、中等症～重症喘息；慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）（肺気腫および慢性気管支炎を含む）、特発性肺線維症、および嚢胞性線維症などの慢性肺疾患；糖尿病（１型、２型、または妊娠性を含む）；心不全、冠動脈疾患、先天性心疾患、心筋症、および（肺）高血圧症または高血圧症を含む重症心臓病；肥満（体格指数［ＢＭＩ］≧３０ｋｇ／ｍ２）；肝硬変を含む慢性肝疾患；鎌状赤血球症；サラセミア；脳血管疾患；神経学的状態（認知症）；末期腎臓疾患；臓器移植；がん；ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）感染症および他の免疫不全Ｂ型肝炎感染症；睡眠時無呼吸；パーキンソン病；発作；虚血性脳卒中；頭蓋内出血；ギランバレー症候群；脳症；髄膜脳炎；ならびに老人ホームまたは長期介護施設に居住している参加者が挙げられる。詳細および例外については、この文書の除外基準を参照されたい。

【０７３５】

個々の参加期間は、スクリーニングを含めて最長で２年３か月間になるだろう。参加者が研究を完了することができないが、同意を撤回しない場合、早期終了来院が行われることになる。研究の終了は、研究の最後の参加者の最終来院の完了時であるとみなされる。

【０７３６】

重要な有効性評価としては、ＣＯＶＩＤ－１９様徴候および症状の監視、ＣＯＶＩＤ－１９関連入院および合併症の記録、ならびに分子アッセイ（ＲＴ－ＰＣＲに基づく）および抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２血清学によるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染の検査による確認が挙げられる。免疫原性評価、ならびに特に中和抗体および結合性抗体に重点を置いた体液性免疫応答の評価も実施されることになる。重要な安全性評価としては、ソリサイティドお

よびアンソリサイティドＡＥのモニタリング（安全性サブセットにおいてのみ）、ならびにすべての参加者におけるＳＡＥおよびＭＡＡＥの収集が挙げられるだろう。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のウイルス量は、確認されたＣＯＶＩＤ－１９症例で評価されることになる。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染およびＣＯＶＩＤ－１９重症度と相関するバイオマーカーも研究されることになる。ワクチン接種後の医療資源利用（ＭＲＵ）が、分子的に確認された症候性ＣＯＶＩＤ－１９を有するすべての参加者について記録されることになる。選択された施設では、地域の規制で許可されている場合、共変量分析のために、現在の職業状況、生活状況、および地域社会交流に関連する追加のベースライン特徴を収集してもよい。

【０７３７】

２回目のワクチン接種の１年後まで、各参加者は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の感染に関連する可能性の任意の新しい症状または健康上の懸念を経験したか否かについて、電子臨床転帰評価（ｅＣＯＡ）により少なくとも週２回質問を受けることになる。２回目のワクチン接種の１年後から２年間の追跡調査期間が終了するまで、ｅＣＯＡによるこの調査質問の頻度は２週間に１回へと減少することになる。すべての参加者は、最終研究来院まで、疾患増強についてモニターされ続ける。ｅＣＯＡによる追跡調査ができず、入院が記録されていないすべての参加者に関しては、彼らの状態を文書化するためにあらゆる努力が払われることになる。

【０７３８】

ＣＯＶＩＤ－１９の１～２日目および３～５日目にＣＯＶＩＤ－１９が疑われる事前指定基準を満たすＣＯＶＩＤ－１９様徴候または症状を有するすべての参加者は、ＣＯＶＩＤ－１９　１～２日目および３～５日目に収集された鼻スワブが両方ともＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２陰性であることが確認されない限り、症状発症１４日後まで（ＣＯＶＩＤ－１９　１５日目）またはＣＯＶＩＤ－１９エピソードの解消までのいずれか遅い方まで、ＣＯＶＩＤ－１９手順（このプロトコールの本文に記載されている通り）を受けなければならない。ＣＯＶＩＤ－１９エピソードの解消は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２鼻スワブが２回連続で陰性であり、ＣＯＶＩＤ－１９関連徴候または症状が２日連続でないことであると規定される。ＣＯＶＩＤ－１９エピソードの解消時に、収集した情報を臨床症例定義に対して当てはめることになる。

【０７３９】

分子的技法により陰性であることが証明されるまでＣＯＶＩＤ－１９を有する疑いのある参加者、またはＣＯＶＩＤ－１９の１～２日目および３～５日目に陽性であり、かつＣＯＶＩＤ－１９が疑われる事前指定基準を満たす参加者の医療スタッフおよび他の接触者を保護するために、参加者がもはや陽性でなくなるまで、必要なすべての予防措置（地域の規制に従って）を講じなければならない。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染が確認された場合、参加者および参加者の医療提供者および／または地域保健当局（必要な場合）に通知されることになり、参加者は、地域の規制に定められている適切な措置および制限を遵守することが求められることになる。

【０７４０】

中等症～重症ＣＯＶＩＤ－１９の症例定義

主要エンドポイントについて、すべての中等症および重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９症例が考慮されることになる。

中等症ＣＯＶＩＤ－１９の症例定義

任意の入手可能な気道試料（例えば、鼻スワブ試料、喀痰試料、喉スワブ試料、唾液試料）または他の試料のＲＴ－ＰＣＲまたは分子検査の結果がＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２陽性であること

かつ、観察経過中の任意の時点で、

息切れ（呼吸困難）

または

以下の新しい徴候もしくは悪化する徴候のいずれか１つおよび以下の新しい症状もしくは悪化する症状のいずれか１つ：

【０７４１】
【表７】

徴候	症状
呼吸数≧20 回/分	発熱(≧38.0℃または≧100.4ºF)
異常な酸素飽和度(SpO_2)であるが、海抜レベルの室内空気で依然として>93%である*	咳
心拍数≧90 拍/分	咽頭炎
肺炎の臨床的または放射線学的証拠	以下の１つまたは複数により証明される倦怠感: -食欲不振 -全般的な体調不良 -疲労 -身体虚弱
深部静脈血栓症(DVT)の放射線学的証拠	頭痛 筋肉痛(筋痛) 胃腸症状(下痢、嘔吐、悪心、腹痛)

*SpO_2基準は、高度に応じて調整される。

または
以下の新しい症状もしくは悪化する症状のいずれか２つ：
【０７４２】
【表８】

発熱(≧38.0℃または≧100.4ºF)
悪寒戦慄または悪寒
咳
咽頭炎
以下の要素の１つまたは複数により証明される倦怠感*:
-食欲不振
-全般的な体調不良
-疲労
-身体虚弱
頭痛
筋肉痛(筋痛)
以下の要素の１つまたは複数により証明される胃腸症状*:
-下痢
-嘔吐
-悪心
-腹痛
足またはつま先の赤みまたは痣外観
嗅覚または味覚障害の発症または変化

*症状(嘔吐および下痢または疲労および食欲不振など)の２つ以上の要素を有する場合、症例定義では１つの症状として計数される。症例定義を満たすには、参加者は少なくとも２つの異なる症状を有する必要がある。

が観察されることである。
【０７４３】
重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９の症例定義
任意の入手可能な気道試料（例えば、鼻スワブ試料、喀痰試料、喉スワブ試料、唾液試

料）または他の試料のＲＴ－ＰＣＲまたは分子検査の結果がＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２陽性であること
　かつ、観察経過中の任意の時点で、以下のいずれか１つ
　重症全身性疾病を示す安静時の臨床的徴候（呼吸数≧３０呼吸／分、心拍数≧１２５拍動／分、海面レベルの室内空気での酸素飽和度（SpO_2）≦９３％＊、または酸素分圧／吸気酸素分圧）（PaO_2/FiO_2）＜３００ｍｍＨｇ）
＊SpO_2基準は、高度に応じて調整されることになる。
　呼吸不全（高流量酸素、非侵襲的人工呼吸、機械的人工呼吸、または体外式膜型人工肺［ＥＣＭＯ］が必要であると規定する）
　ショックの証拠（収縮期血圧＜９０ｍｍＨｇ、拡張期血圧＜６０ｍｍＨｇ、または昇圧剤が必要であることと規定する）
　重大な急性腎障害、肝障害、または神経機能障害
　ＩＣＵへの搬入
　死亡
が観察されることである。
【０７４４】
　軽症ＣＯＶＩＤ－１９の症例定義
　任意の入手可能な気道試料（例えば、鼻スワブ試料、喀痰試料、喉スワブ試料、唾液試料）または他の試料のＲＴ－ＰＣＲまたは分子検査の結果がＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２陽性であること
　かつ、観察経過中の任意の時点で、
　以下の症状の１つ：発熱（≧３８．０℃または≧１００．４°Ｆ）、咽頭炎、倦怠感（食欲不振、全般的な体調不良、疲労、身体虚弱）、頭痛、筋肉痛（筋痛）、胃腸症状、咳、胸部うっ血、鼻水、喘鳴、皮膚発疹、眼刺激もしくは眼脂、悪寒、または味覚もしくは嗅覚の新たな喪失が観察されることである。
　上記の症例定義を満たしているが、中等症～重症／重篤定義を満たしていない場合、その症例は臨床的に軽症であるとみなされる。
【０７４５】
[実施例２３]
　Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの安全性、反応原性、および免疫原性を評価するための、≧１８歳～≦５５歳のおよび≧６５歳の成人における無作為化二重盲検プラセボ対照ファーストインヒューマン（ＦＩＨ）第１／２ａ相多施設研究
　単一用量または５６日間隔てた２用量スケジュールのいずれかで、１ワクチン接種当たり5×10^{10}または1×10^{11}ウイルス粒子（ｖｐ）の用量レベルにて、健常成人（１８～５５歳；コホート１ａ；ｎ＝３７７）および健常高齢者（＞６５歳；コホート３；ｎ＝３９４）に投与した、本発明によるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の安定化融合前スパイク（Ｓ）タンパク質を発現する非複製性アデノウイルス２６ベースベクターであるＡｄ２６．ＣＯＶ－２．Ｓの安全性、反応原性、および免疫原性を評価する第１／２ａ相無作為化二重盲検プラセボ対照臨床研究を設計した。ワクチン誘発性Ｓ特異的抗体レベルをＥＬＩＳＡにより測定し、中和力価を、野生型ウイルス中和アッセイ（ｗｔＶＮＡ）で測定した。Ｔｈ１およびＴｈ２を、細胞内サイトカイン染色（ＩＣＳ）により評価した。
【０７４６】
　方法
　研究設計および参加者
　この研究は、１８～５５歳および＞６５歳の健常成人に、単一用量または８週間の間隔をおいた２用量スケジュールで5×10^{10}ｖｐまたは1×10^{11}ｖｐを筋肉内（ＩＭ）投与したＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの安全性、反応原性、および免疫原性を評価するための多施設無作為化二重盲検プラセボ対照治験である。臨床試験の概要は図１０１に示されている。
【０７４７】

Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓは、本明細書に記載の通り、武漢株の最初の臨床単離株（Ｗｕｈａｎ、２０１９、全ゲノム配列ＮＣ＿４５５１２）に由来するＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２Ｓタンパク質の遺伝子操作型をコードする組換え複製不全Ａｄ２６ベクターである。この研究は、ベルギーおよび米国の複数臨床施設で実施した。ＰＣＲのために鼻試料を収集することによりすべての対象をＣＯＶＩＤ－１９についてスクリーニングし、陽性の場合は対象を除外し、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２による以前の感染を検出するための施設で利用可能な血清学的アッセイにより、コホート１ａとコホート３との間で最大２５人の血清陽性の参加者が許容された。この研究は、施設内審査委員会により審査および承認された。すべての参加者は、登録前に書面によるインフォームドコンセントを提供した。

【０７４８】

無作為化および盲検化

１８～５５歳の適格参加者４０２人および＞６５歳の参加者４０５人を、５×１０^{10}ｖｐ用量もしくは１×１０^{11}ｖｐ用量のワクチンまたはプラセボ（ＰＬ）のいずれかによる１回または２回のワクチン接種（１：１：１：１：１年齢群当たり）：５×１０^{10}ｖｐ／５×１０^{10}ｖｐ；５×１０^{10}ｖｐ／ＰＬ；１×１０^{11}ｖｐ／１×１０^{11}ｖｐ；１×１０^{11}ｖｐ／ＰＬ；またはＰＬ／ＰＬを受け取るように無作為に割り振った（図１０１）。無作為化は、Ｉｎｔｅｒａｃｔｉｖｅ Ｗｅｂ Ｒｅｓｐｏｎｓｅ Ｓｙｓｔｅｍ（ＩＷＲＳ）により行われ、無作為に並べ替えられたブロックを使用して施設毎に階層化された。参加者および治験責任医師は、研究全体を通して盲検が維持されることになる。ワクチンおよびプラセボは、中身が隠された同一の注射器で提供された。スポンサーおよび統計学者は、すべての参加者が２９日目来院を完了したかまたはそれ以前の中止の時点で、中間解析のために群の盲検化を解除した。

【０７４９】

エンドポイント

各スケジュールの安全性および反応原性という主要目的を裏付けるエンドポイントは、各ワクチン接種後２８日間の有害事象（ＡＥ）、各ワクチン接種後７日間の局所的および全身性反応原性、ならびに研究全体にわたる重症有害事象（ＳＡＥ）であった。有害事象は、ＦＤＡ指針文書「Toxicity Grading Scale for Healthy Adult and Adolescent Volunteers Enrolled in Preventive Vaccine Clinical Trials」に従って等級付けした。副次的エンドポイントは、Ｓ特異的ＥＬＩＳＡにより示されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のＳタンパク質に対する体液性免疫応答、およびｗｔＶＮＡにおける野生型ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対する中和力価、およびＩＣＳにより測定される細胞性免疫応答であった。

【０７５０】

手順

参加者は、１日目に１ｍＬ体積の５×１０^{10}ｖｐまたは１×１０^{11}ｖｐのＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓまたはプラセボ（０．９％生理食塩水）の筋肉内（ＩＭ）注射を三角筋に受けた。ソリサイティドＡＥ（Solicited AE）をワクチン接種後７日間にわたって、アンソリサイティドＡＥ（unsolicited AE）を、ワクチン接種後２８日間にわたって、およびＳＡＥを研究の経過全体にわたって日記カード（Diary card）で収集した。血清化学のための、血液学のための、および免疫読み取り値を決定するための血液試料を、研究全体にわたっていくつかの時点で収集した／収集することになる。妊娠検査用の尿試料をワクチン接種前に収集した。

【０７５１】

ベースライン時および２９日目に、スパイク（Ｓ）特異的結合性抗体をＥＬＩＳＡにより測定した。血清陽性は、＞５０．３ＥＵ／ｍＬの力価であると規定した。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２血清中和抗体価は、イングランド公衆衛生局（ＰＨＥ）のＶｉｃｔｏｒｉａ／１／２０２０ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２株を使用してｗｔＶＮＡで測定した。ｗｔＶＮＡでの血清陽性は、ＩＣ５０力価が＞５８であると規定した。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ特異的Ｔ細胞応答を、ベースライン時および１５日目に、１１個が重複する１５量体のＳペプチド

プールの２つのプールを使用して細胞内サイトカイン染色（ＩＣＳ）により測定した。Ｔｈ１応答は、ＩＦＮｇおよび／またはＩＬ－２を発現するが、ＩＬ－４、ＩＬ－５、および／またはＩＬ１３を発現しないＣＤ４＋Ｔ細胞により特徴付けられ、Ｔｈ２応答は、ＣＤ４＋Ｔ細胞によるＩＬ－４、ＩＬ－５、および／またはＩＬ－１３、ならびにＣＤ４０Ｌの発現により特徴付けた。すべてアッセイは盲検法で実施した。すべてのアッセイは下記に記載の通りである。

【０７５２】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２野生型ウイルス中和アッセイ：

野生型ウイルス感染を阻害することが可能な中和抗体を、イングランド公衆衛生局（ＰＨＥ）により開発および認定された野生型ウイルスマイクロ中和アッセイ（ＭＮＡ）を使用して定量化した。使用したウイルスストックは、Ｖｉｃｔｏｒｉａ／１／２０２０株に由来する。

【０７５３】

手短に言えば、熱不活化ヒト血清試料の６つの２倍系列希釈物を、９６ウェルトランスファープレートで調製した。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２野生型ウイルスを、目標作業濃度（およそ１００プラーク形成単位［ＰＦＵ］／ウェル）で血清希釈物に順次添加し、５％CO_2補給下で６０～９０分間３７℃にてインキュベートした。次いで、血清－ウイルス混合物を、ベロＥ６アフリカミドリザル腎臓細胞を事前に一晩播種したアッセイプレートに移し、３７℃および５％CO_2で６０～９０分間インキュベートしてから、カルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）オーバーレイ培地を添加し、さらに２４時間インキュベートした。このインキュベーション後、細胞を固定し、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＲＢＤ　Ｓタンパク質に特異的な抗体対を使用して染色し、ＴｒｕｅＢｌｕｅ（商標）基質を使用して免疫プラークを可視化した。ＣＴＬのＩｍｍｕｎｏｓｐｏｔ分析機を使用して免疫プラークを計数した。免疫プラーク計数を、ＳｏｆｔＭａｘｐｒｏにエクスポートした。血清試料の中和力価は、その試料の５０％中和抗体価（ＩＤ５０）に対応する血清希釈の逆数として算出される。

【０７５４】

スパイク酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２プレスパイク特異的結合性抗体濃度を、抗体／抗原相互作用に基づく間接ＥＬＩＳＡであるヒトＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２プレスパイクＩｇＧ　ＥＬＩＳＡを使用して決定した。使用したＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２抗原は、ＥＳ－２９３細胞で産生された安定化融合前スパイクタンパク質（（２Ｐ）、Δフューリン、Ｔ４フォールドン、Ｈｉｓ－Ｔａｇ）である。このＥＬＩＳＡは、ヒト血清用にＮｅｘｅｌｉｓ、ラバル、カナダで開発および認定された。

【０７５５】

手短に言えば、精製ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２プレスパイク抗原をマイクロプレートのウェルに吸着させ、希釈した血清試料（試験試料、標準物、および品質管理用物質）を添加した。非結合試料を洗い流し、酵素コンジュゲート抗ヒトＩｇＧを添加した。過剰なコンジュゲートを洗い流した後、３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）比色基質を添加した。設定した時間が経過した後、反応を停止させた。各試験プレートの参照標準物を使用して、標準物により割り当てられた単位に従って、試料中のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２プレスパイクに対する抗体の量を定量化した（１ミリリットル当たりのＥＬＩＳＡ検査単位：ＥＬＵ／ｍＬ）。

【０７５６】

細胞内サイトカイン染色（ＩＣＳ）

ＳＡＲＳＣｏＶ２のＳタンパク質に対するＴ細胞応答を、ＨＩＶワクチン試験ネットワーク研究所（HIV Vaccine Trials Network Laboratories）、フレッドハッチンソンがん研究センター（Fred Hutchinson Cancer Research Center）（ＨＶＴＮ、ＦＨＣＲＣ）、シアトル、ワシントン州、米国で認定された２７色ＩＣＳにより特徴付けた。

【０７５７】
凍結保存された末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を解凍し、一晩休ませた後、ＳＡＲＳＣｏＶ２　Ｓタンパク質の長さ全体を網羅する２つのコンセンサスペプチドプール、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）（陰性対照）、またはブドウ球菌エンテロトキシンＢ（ＳＥＢ）（陽性対照）で、６時間３７℃にて刺激した。刺激中にブレフェルジンＡを含めて、サイトカイン放出を防止した。細胞を、まず生存色素で染色し、次に細胞外抗体カクテルで染色し、次いで固定および透過処理し、Ｔｈ１およびＴｈ２サイトカインを含む細胞内マーカーに対する抗体カクテルで染色した。細胞蛍光を、５レーザー３０パラメーターＢｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　ＦＡＣＳｙｍｐｈｏｎｙサイトメーターで取得し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアを使用して分析した。

【０７５８】
統計方法
この研究は、安全性および免疫原性を評価するために設計した。安全性データを完全な分析セットで記述的に分析し、免疫原性データをパープロトコール免疫原性集団で分析した。１ミリリットル当たりのＥＬＩＳＡ単位（ＥＵ／ｍＬ）およびｗｔＶＮＡでの中和抗体価として表されており、試験ウイルス用量の５０％を中和する血清希釈の逆数（５０％阻害濃度）［ＩＣ５０］）として表されているＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク（Ｓ）結合性抗体価は、ｌｏｇ１０スケールで表示されており、ＧＭＴおよび９５％信頼区間（ＣＩ）を使用して記載されている。両アッセイとも、血清転換は、ベースライン力価がＬＬＯＱを下回っていた場合は、ワクチン接種後に定量化下限（ＬＬＯＱ）を上回る抗体力価を有すること、またはベースライン力価がＬＬＯＱを上回っていた場合は、ワクチン接種後にベースラインから４倍増加することであると規定した。ＩＣＳ応答は、親集団の％として記載した。試料陽性は、未刺激ウェルとＳペプチド刺激ウェルとを比較する片側フィッシャー直接検定で決定した。ＬＬＯＱは０．２２％であり、定量化不能値はＬＬＯＱ／２に帰属させた。Ｔｈ１応答および／またはＴｈ２応答が陽性であり、２×ＬＬＯＱを上回っていた場合は、Ｔｈ１／Ｔｈ２比を算出した。参加者のＴｈ１応答またはＴｈ２応答がこうした基準を満たしていなかった場合、Ｔｈ１／Ｔｈ２比は、Ｔｈ２応答がない場合は１を上回り、Ｔｈ１応答がない場合は１を下回るとみなした。

【０７５９】
結果
研究参加者
参加者を２０２０年７月１３日にスクリーニングし、コホート１ａおよび１ｂ参加者（１８～５５歳）のワクチン接種を、２０２０年７月２２日（コホート１ａ）に、２０２０年７月２２日（コホート１ｂ）に開始し、最初のワクチン接種は、コホート１ａでは２０２０年８月４日に、コホート１ｂでは２０２０年８月７日に完了した。５７５人の志願者をスクリーニングし、そのうち３８０人をコホート１ａに登録し（３７７人にワクチン接種）、２８人をスクリーニングし、２５人をコホート１ｂに登録した（２５人にワクチン接種）（それぞれ図１０２Ａおよび１０２Ｂ）。７人（１．７％）の参加者が、スクリーニング時にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対して血清陽性であった。Ａｄ２６に対する血清陽性率は後に報告されることになる。コホート３参加者（＞６５歳）のワクチン接種を、２０２０年８月３日に開始し、最初のワクチン接種は２０２０年８月２４日に完了した。６６０人の志願者をスクリーニングし、そのうち４０５人を登録した（３９４人にワクチン接種）（図１０２Ｃ）。免疫原性結果はコホート３の最初の１５人の参加者についてのみが利用可能であった。ベースライン特徴は、群間でほぼ同等であった。

【０７６０】
ワクチン安全性および反応原性
ソリサイティドＡＥをワクチン接種後７日間にわたって、アンソリサイティドＡＥをワクチン接種後２８日間にわたって、ＳＡＥを研究の過程全体にわたって日記カードで収集した。こうした２つの研究における参加者および参加者を評価する治験責任医師の盲検を維持するために、安全性データは、この中間報告では群の盲検化を解除せずに提示されて

いる。

【０７６１】

コホート１ａおよび１ｂ（１８歳～≦５５歳）では、４０２人の参加者について治験責任医師による反応原性の評価が利用可能であり、そのうち２８８人（７２％）の参加者がソリサイティドＡＥを報告した。２３５人（５８％）の参加者でソリサイティド局所ＡＥが報告された。ほとんどが等級１／等級２であった。３人の参加者が等級３の疼痛／圧痛を報告した。最も高頻度のＡＥは、注射部位疼痛であった。２５８人（６４％）の参加者でソリサイティド全身性ＡＥが報告され、ほとんどが等級１／等級２であった。４６人（１１％）の参加者で等級３の全身性ＡＥが報告された。最も高頻度のＡＥは、疲労、頭痛、および筋痛であった。７６人（１９％）の参加者で発熱が報告され、２２人（５％）の参加者で等級３の発熱が報告された。全体として、９８人の参加者が１７８件のアンソリサイティドＡＥを報告し、１２人が等級３のＡＥを報告した。

【０７６２】

コホート３（≧６５歳）では、全体として、３９４人の参加者について治験責任医師による反応原性の評価が利用可能であり、そのうち１８３人（４６％）の参加者がソリサイティドＡＥを報告した。１０８人（２７％）の参加者でソリサイティド局所ＡＥが報告され、そのほとんどが等級１／等級２であった。１人の参加者が等級３の腫脹および紅斑を報告した。最も高頻度のＡＥは、注射部位疼痛であった。１４０人（３６％）の参加者でソリサイティド全身性ＡＥが報告され、そのほとんどが等級１／等級２であった。３人の参加者が等級３のＡＥを報告した。最も高頻度のＡＥは、頭痛、疲労、および筋痛であった。１４人（４％）の参加者で等級１または２の軽度または中等度の発熱が報告され、そのうち１人のみが等級２であった。コホート３では、日常生活活動が制限される高熱などの発熱の報告（等級３）はなかった。全体として、４６人の参加者が、７７件のアンソリサイティドＡＥを報告した。４人の参加者がアンソリサイティド等級３のＡＥを報告した。どのコホートでも、等級４のＡＥは、ソリサイティドのものもアンソリサイティドのものも報告されなかった。

【０７６３】

ＡＥのために試験を中止した参加者はいなかった。２件のＳＡＥがあった。１件は低血圧症であり、これは、再発性低血圧症の既往歴があったためワクチンとは無関係であると治験責任医師が判断した。発熱した１人の参加者は、ＣＯＶＩＤ－１９の疑いのため一晩入院し、１２時間以内に回復した。

【０７６４】

Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの免疫原性

安定化ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２完全長スパイクタンパク質に対する抗体を、ＥＬＩＳＡにより測定した。コホート１ａでは、５×１０^{10}ｖｐ用量群および１×１０^{11}ｖｐ用量群のベースライン時の参加者のそれぞれ９４％および９８％が、ワクチン接種後の２９日目にはＬＬＯＱを下回るＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質に対する幾何平均力価（ＧＭＴ）を示し、それぞれ５２８（９５％ＣＩ：４４２；６３０）および６９５（９５％ＣＩ：５９６；８１０）に増加し、各用量群は９９％が血清転換を示した（図１０３Ａ）。５×１０^{10}ｖｐ用量群および１×１０^{11}ｖｐ用量群では、ベースラインで血清陽性であったコホート１ａ参加者のそれぞれ８８％（７／８人）および６７％（２／３人）が、ワクチン応答者であるとみなされる結合性抗体価の４倍増加という事前設定基準を示した。コホート３の最初に登録された１５人の参加者全員がベースライン時に血清陰性であり、ワクチン接種２９日後までに血清転換を示し、ＧＭＴは、５×１０^{10}ｖｐ用量および１×１０^{11}ｖｐ用量でそれぞれ５０７（９５％ＣＩ：１８１；１４１８）および２４８（９５％ＣＩ：１２２；５０６）であった。この研究で使用したヒト回復期血清（ＨＣＳ）パネルでは、８９９のＧＭＴが観察され、各コホートにおいて両用量でＧＭＴの９５％ＣＩが重複しており、ワクチン誘発力価に大きな差異がないことが示された。

【０７６５】

参加者のサブセットにて（５×１０^{10}ｖｐ用量群および１×１０^{11}ｖｐ用量群の各

々でｎ＝５０）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和抗体レベルをｗｔＶＮＡにより測定した。コホート１ａでは、両投与群ともベースライン時のＧＭＴが＜ＬＬＯＱであったが、２９日目には、５×１０^{10}ｖｐ群および１×１０^{11}ｖｐ群で、それぞれ２１４（９５％ＣＩ：１７７；２５９）および２４３（９５％ＣＩ：２００；２９５）のＩＣ５０　ＧＭＴに増加した。同様の結果がコホート３のセンチネル群でも観察され、ベースライン時にはＧＭＴ＜ＬＬＯＱであったが、２９日目には５×１０^{10}ｖｐ群および１×１０^{11}ｖｐ群ではそれぞれ１９６（９５％ＣＩ：６９；５６０）および１２７（９５％ＣＩ：＜ＬＬＯＱ；３２７）のＧＭＴに増加した（図１０３Ｂ）．比較のために、この分析で使用したＨＣＳパネルで測定されたＧＭＴは５２２であり、ＨＣＳパネルと両用量群およびコホートとの間でＧＭＴの９５％ＣＩが重複していた。いくつかのワクチン研究試料は、ワクチン試料分析実験の定量化上限（ＵＬＯＱ＝６４０）に達したため、再分析中である。より高希釈度の試料を試験すると、より高いＵＬＯＱでより高い力価の決定が可能になるだろう。ＨＣＳ試料は、ワクチン研究試料よりも高い希釈度で試験したため、こうした試料の一部は、ここに示されているＵＬＯＱを上回る力価を有する。ワクチン接種後２９日目では、コホート１ａの参加者の９８％が、投与されたワクチン用量に関わりなく、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対する中和抗体に対して陽性であった。２９日目の血清転換率は、コホート１ａでは５×１０^{10}ｖｐ群および１×１０^{11}ｖｐ群の両方で９２％であり、コホート３では５×１０^{10}ｖｐ群および１×１０^{11}ｖｐ群で１００％（６／６人）および８３％（５／６人）であった。コホート１ａでは、５×１０^{10}ｖｐ群および１×１０^{11}ｖｐ群の参加者のそれぞれ合計で８２％および９４％が、１００よりも大きな力価に達した。これは、Ａｄ２６．ＣＯＶ２による単回ワクチン接種後に参加者の大多数においてロバストな応答が誘導されたことを示している。ｗｔＶＮＡおよびＳ－ＥＬＩＳＡコホート１ａ力価は高度に相関しており、スピアマン相関性は０．８６であった。偽ウイルス発現ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質中和アッセイのデータは保留中であり、本発明者らの用量１後の中間解析の完全な報告書に含まれることになる。

【０７６６】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ特異的ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞応答を、ベースライン時およびワクチン接種１５日後に研究参加者のサブセットで特徴付けた。Ｓタンパク質全体を網羅するペプチドで刺激した後、ＣＤ４＋Ｔｈ１応答は、コホート１ａの参加者の場合、ベースライン時に検出不能であったものが、ワクチン接種１５日後には５×１０^{10}ｖｐ群および１×１０^{11}ｖｐ群でそれぞれ０．０８％（９５％ＣＩ：０．０５；０．１６）および０．１１（９５％ＣＩ：０．０７；０．１６）に増加し、コホート３のセンチネル群の場合、ベースライン時に検出不能であったものが、５×１０^{10}ｖｐ群および１×１０^{11}ｖｐ群でそれぞれ０．３６％（９５％ＣＩ：０．１５；０．８９）および０．１３（９５％ＣＩ：０．０４；０．５０）に増加した（図１０３Ｃ）。コホート１ａでは、５×１０^{10}ｖｐ用量および１×１０^{11}ｖｐ用量のレシピエントでそれぞれ７６％（９５％ＣＩ：６５；８６）および８３％（９５％ＣＩ：７３；９１）のＴｈ１陽性反応が、観察された。コホート３の最初の１５人の参加者では、５×１０^{10}ｖｐ用量および１×１０^{11}ｖｐ用量のレシピエントでそれぞれ１００％（９５％ＣＩ：５４；１００）および６７％（９５％ＣＩ：２２；９６）のＴｈ１陽性反応が観察された。コホート１ａの５×１０^{10}ｖｐ群の１人の参加者を除いて、いずれのコホートでも定量化可能なＴｈ２応答はなかった（値はＬＬＯＱ／２に帰属させた）（図１０３Ｃ）。しかしながら、この参加者のＴｈ１／Ｔｈ２比は２８．９であり、Ｔｈ１偏向表現型を示していた。測定可能なＴｈ１および／またはＴｈ２応答を示したすべての他の参加者では、Ｔｈ１／Ｔｈ２比は１．０～６８．５の範囲であった。全体として、こうしたデータは、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓが両年齢群でＴｈ１偏向応答を誘発したことを示している。

【０７６７】

Ｓ特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞応答を、Ｓペプチド刺激によるＩＦＮｇおよび／またはＩＬ－２サイトカインの発現により特定した（図１０３Ｄ）。ワクチン接種の１５日後、Ｓ特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞応答の規模は、コホート１ａでは５×１０^{10}ｖｐ群および１×１０^{1}

10^{10}ｖｐ群でそれぞれ０．０７％（９５％ＣＩ：０．０３；０．１９）および０．０９％（９５％ＣＩ：０．０５；０．１９）であった。コホート３では、５×10^{10}ｖｐ群および１×10^{11}ｖｐ群でそれぞれ０．０５％（０．０２；０．２４）および０．０７％（０．０２；０．１４）であった。コホート１ａでは、５×10^{10}ｖｐ群および１×10^{11}ｖｐ群の参加者のそれぞれ５１％（９５％ＣＩ：３９；６３）および６４％（９５％ＣＩ：５２；７５）が、Ｓペプチド刺激に対して陽性ＣＤ８＋Ｔ細胞応答を示し、コホート３では、両用量群の参加者の３３％（９５％ＣＩ：４％；７８％）が、ロバストなワクチン誘導性ＣＤ８＋Ｔ細胞応答を示した。

【０７６８】

考察

本発明者らの第１／２ａ相試験の中間解析は、ワクチン候補Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓが許容される安全性および反応原性プロファイルを有し、５×10^{10}ｖｐ用量または１×10^{11}ｖｐ用量の両方で免疫原性であることを示している。

【０７６９】

Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの単一用量は、大多数のワクチンレシピエントに強力な体液性応答を誘発した。ＥＬＩＳＡにより測定されたＳ結合性抗体レベルは、投与されたワクチン用量レベルに関わりなく、コホート１ａの参加者の９９％およびコホート３の最初の参加者の１００％で、ベースライン時からワクチン接種後２９日目まで増加した。同様に、ｗｔＶＮＡで高い応答率が観察された。ワクチン接種の２９日後、参加者の９８％が検出可能な中和抗体を有していた。コホート１ａ参加者の９２％およびコホート３の５×10^{10}ｖｐ用量および１×10^{11}ｖｐ用量のそれぞれ６人中６人および６人中５人のレシピエントが、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和抗体に対して血清転換された。コホート１ａでは、参加者の８４％～９２％が、１００を上回る中和抗体価を有していた。ここで報告されているほぼすべての参加者の中和抗体応答は、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの単一用量後に得られた。

【０７７０】

こうした臨床データは、両用量レベルのＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓが、安定した健康状態にある健康な若年およびより高齢の参加者の大多数で強力な中和抗体応答を誘導することを示している。これまでのところ、コホート３の限られた人数の参加者のみが分析に含まれていたが、ここで観察された１８～５５歳の成人および＞６５歳の成人におけるＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの免疫原性が同様であることは、重症ＣＯＶＩＤ－１９を発症するリスクが非常により高い高齢者の保護に有望であり、特にこのパンデミック中の医療システムへの圧力の低減を達成するために非常に重要である。Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓにより誘導された結合性および中和抗体のレベルは、ＣＯＶＩＤ－１９ヒト回復期血清と比較して、ほとんどの参加者で同じ範囲ではあるものの、より低いように思われた。しかしながら、この比較の重要性は、ヒト血清パネルの組成にばらつきがあるため、ならびに回復期血清抗体アッセイは標準化されていないため、まだ確立されていない。別のＨＣＳパネルを使用すると、ワクチン試料力価との比較（比率）は異なるものになるだろう。年齢などの人口統計、疾患重症度、および疾患発症からの時間、ならびにパネルの試料数は、測定される抗体レベルに影響を及ぼし、任意のワクチン試料との比較を適切なものにすることができる。

【０７７１】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶおよびＭＥＲＳ－ＣｏＶワクチンの動物モデルによる以前の経験から、ワクチン関連増強呼吸器疾患（ＶＡＥＲＤ）に関する懸念が生じている。この安全上の懸念があることおよび体液性免疫の中和効力が不良であることとＴｈ２偏向との関連性が示唆されている。ここでは、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ誘発性Ｔ細胞応答が、圧倒的にＴｈ１偏向性であり、Ｔｈ２応答はないかまたは非常に低かったことが示されている。実際、すべての応答者で、Ｔｈ１／Ｔｈ２比は１を上回っていた。これは、Ａｄ２６ベースのワクチンプラットフォームに関する以前の経験と一致している。このロバストなＴｈ１応答は、ワクチン接種後の強力なＣＤ８＋Ｔ細胞応答を伴っていた。Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ

により誘発される強力な体液性応答に加えて、ＣＤ４＋Ｔｈ１およびＣＤ８＋Ｔ細胞応答の全体的にロバストな誘導により、ＶＡＥＲＤの理論上のリスクが最小限に抑えられる。

【０７７２】

明らかに、有効な単一用量ＣＯＶＩＤ－１９ワクチンは、現在のパンデミックで使用するための２用量ワクチンスケジュールに対して大きな利点を有し、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のパンデミックを制御することができる時間枠に直ちに影響を及ぼす確立が大幅に増加するだろう。単一用量のＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓにより誘発される免疫応答がＳＡＲＳ．ＣｏＶ．２感染またはＣＯＶＩＤ－１９に対する保護を示すことができるとしても、重要なこの免疫応答の耐久性は未知数である。Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの単一用量により誘発される免疫応答の耐久性に関するデータ、ならびに２回目の用量のＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ後の免疫応答に関するデータは、この進行中の第１／２ａ相試験で利用可能になる予定である。

【０７７３】

結論として、単回ワクチン接種後の安全性プロファイルおよび免疫原性は、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓを、ＣＯＶＩＤ－１９に対して潜在的に保護的なワクチンとしてさらに臨床開発するための裏付けとなるものである。この中間解析は、５×１０^{10}ｖｐまたは１×１０^{11}ｖｐのいずれかの用量のＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの単一用量が、安全であり、耐容性が良好であり、高度に免疫原性であることを示している。両用量レベルの免疫原性が同様であることに基づき、さらなる評価のために５×１０^{10}ｖｐ用量を選択した。第１の第３相試験では、５×１０^{10}ｖｐのＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチン候補の単一用量の有効性を評価することになる。５×１０^{10}ｖｐのＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチンによる２用量スケジュールの有効性および免疫の耐久性を評価するための追加の第３相試験が準備中である。

【０７７４】

[実施例２４]

Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの安全性、反応原性、および免疫原性を評価するための、≧１８歳～≦５５歳の成人および≧６５歳の成人における無作為化二重盲検プラセボ対照ファーストインヒューマン（ＦＩＨ）第１／２ａ相多施設研究　－　コホート３中間解析免疫原性報告

【０７７５】

このコホート３中間解析には、初回用量来院の２８日後（２９日目）までに（２９日目を含む）収集された野生型ウイルス中和アッセイ（ｗｔＶＮＡ）および酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）の群間非盲検体液性免疫原性データが含まれている。加えて、参加者のサブセットについて初回用量来院の１４日後（１５日目）までに（１５日目を含む）収集された細胞内サイトカイン染色（ＩＣＳ）の細胞性免疫原性データが記載されている。

【０７７６】

目的およびエンドポイント

コホート３の中間解析に適用可能な、この研究の目的／エンドポイントは下記に示されている。

【０７７７】

【表９】

目的	エンドポイント
副次的	
Ad26.COV2.S に対する体液性および細胞性免疫応答を評価する。	体液性免疫応答 コホート 3 の全参加者: • psVNA[a] または wtVNA により測定される血清中の SARS-CoV-2 中和力価。 • ELISA により測定される SARS-CoV-2 結合性抗体。 細胞性免疫応答 コホート 3 の参加者のサブセット: • 末梢血単核細胞(PBMC)および $CD4^+$/$CD8^+$、インターフェロンガンマ(IFNγ)、インターロイキン(IL)-2、腫瘍壊死因子アルファ(TNF-α)[b]、IL-4、IL-5、IL-13、および/または他の Th1/Th2 マーカーを含む ICS の SARS-CoV-2 S タンパク質ペプチド刺激後のフローサイトメトリーにより評価される T ヘルパー(Th)1 および Th2 免疫応答。
[b]TNF-α は、コホート 3 中間免疫原性分析には含まれていない	

【０７７８】
方法
研究設計の概要
研究設計は実施例２３に記載した。
【０７７９】
免疫原性
体液性免疫原性（ｗｔＶＮＡおよびＥＬＩＳＡ）の場合、値が厳密にＬＬＯＱよりも大きい（＞ＬＬＯＱ）場合、試料は陽性であるとみなされることになる。体液性免疫原性の応答者定義は、以下の通りに定義される。
－　ベースライン試料値が、ＬＬＯＱ以下であり（≦ＬＬＯＱ）、ベースライン後の試料値が、厳密にＬＬＯＱよりも大きい（＞ＬＬＯＱ）こと。
－　ベースライン試料値が、厳密にＬＬＯＱよりも大きく（＞ＬＬＯＱ）、ベースライン後の試料値が、ベースライン試料値から少なくとも４倍（≧４倍）増加すること。
【０７８０】
細胞性免疫原性（ＩＣＳ）の場合、試料の陽性は、モック条件および刺激条件を比較するフィッシャー直接検定により規定される。
【０７８１】
Ｔｈ１／Ｔｈ２応答比の評価
一緒にしたＳＡＲＳ－Ｃｏｖ２－Ｓペプチドプールに基づき、ベースライン後の時点のみを使用して、以下の２つの条件の少なくとも１つを満たす試料のＴｈ１／Ｔｈ２応答比を算出することになる。
－　Ｔｈ１応答（「ＩＦＮ－ｇまたはＩＬ２、非ＴＨ２性」）が陽性であり、かつ≧２×ＬＬＯＱであること、

または
－　Ｔｈ２応答（「ＩＬ４もしくはＩＬ５もしくはＩＬ１３およびＣＤ４０Ｌ」）が陽性であり、かつ≧２×ＬＬＯＱであること。
【０７８２】
Ｔｈ１／Ｔｈ２比分析の目的では、ＬＬＯＱは、両細胞集団（Ｔｈ１およびＴｈ２）で０．０２２％である。
【０７８３】
両細胞集団（Ｔｈ１およびＴｈ２）が陽性であり、かつ≧２×ＬＬＯＱである場合、Ｔｈ１／Ｔｈ２比が数値結果として算出されることになる。
【０７８４】
一方の細胞集団（Ｔｈ１またはＴｈ２のいずれか）のみが陽性であり、かつ≧２×ＬＬＯＱである場合、以下の規則を使用して、Ｔｈ１／Ｔｈ２比の定性的評価を決定することになる。
－　一方の細胞集団が陽性であり、他方が陰性である場合、陽性細胞集団は陰性細胞集団よりも大きい。Ｔｈ１反応が陽性であり、Ｔｈ２反応が陰性である場合、Ｔｈ１／Ｔｈ２比は「＞１」に設定されることになる。Ｔｈ１応答が陰性であり、Ｔｈ２応答が陽性である場合、Ｔｈ１／Ｔｈ２比は、「＜１」に設定されることになる。
－　細胞集団が両方とも陽性である場合、≧２×ＬＬＯＱである細胞集団は、＜２×ＬＬＯＱである細胞集団よりも大きい。Ｔｈ１応答が≧２×ＬＬＯＱであり、Ｔｈ２応答が＜２×ＬＬＯＱである場合、Ｔｈ１／Ｔｈ２比は、「＞１」に設定されることになる。Ｔｈ１応答が＜２×ＬＬＯＱであり、Ｔｈ２応答が≧２×ＬＬＯＱである場合、Ｔｈ１／Ｔｈ２比は、「＜１」に設定されることになる。
【０７８５】
結果
この実施例には、コホート３において用量１来院の２８日後（２９日目）までに（２９日目を含む）収集された体液性免疫応答データ（ｗｔＶＮＡおよびＥＬＩＳＡ）の分析が記載されている。加えて、この実施例には、コホート３において、用量１来院の１４日後（１５日目）までに（１５日目を含む）収集された、参加者のサブセットの細胞性免疫応答データ（ＩＣＳ）が記載されている。免疫原性データの概要は下記に提供されている。
【０７８６】
人口統計学的特徴およびベースライン特徴
参加者の人口統計学的特徴およびベースライン特徴は、表２にまとめられている。ほとんどの参加者は白人（９８．５％）であった。全体として、参加者の５０．１％が女性であり、４９．９％が男性であった。年齢中央値は６９．００歳（範囲：６５．０～８８．０歳）であり、体型指数（ＢＭＩ）中央値は２５．７００ｋｇ／ｍ^2（範囲：１６．６０～２９．９０ｋｇ／ｍ^2）であった。人口統計学的特徴およびベースライン特徴は、概してワクチン接種群間で良好なバランスが取れていた。
【０７８７】

【表１０－１】

表 2: 人口統計およびベースライン特徴の要約;コホート 3;完全分析セット(研究 VAC31518COV1001)

	Ad26 5e10	Ad26 1e11	プラセボ	全対象
分析セット:完全	161	161	81	403
年齢(歳)				
N	161	161	81	403
平均(SD)	69.63 (3.990)	69.99 (4.249)	69.89 (3.732)	69.83 (4.040)
中央値	69.00	69.00	69.00	69.00
範囲	(65.0; 83.0)	(65.0; 88.0)	(65.0; 79.0)	(65.0; 88.0)
65～75 歳	148 (91.9%)	148 (91.9%)	74 (91.4%)	370 (91.8%)
>75 歳	13 (8.1%)	13 (8.1%)	7 (8.6%)	33 (8.2%)
性別				
N	161	161	81	403
女性	77 (47.8%)	82 (50.9%)	43 (53.1%)	202 (50.1%)
男性	84 (52.2%)	79 (49.1%)	38 (46.9%)	201 (49.9%)
未分類	0	0	0	0
人種				
N	161	161	81	403
白人	158 (98.1%)	158 (98.1%)	81 (100.0%)	397 (98.5%)
黒人またはアフリカ系アメリカ人	1 (0.6%)	2 (1.2%)	0	3 (0.7%)
アジア人	0	0	0	0
先住ハワイ人または他の太平洋島民	0	0	0	0
アメリカインディアンまたはアラスカ先住民	1 (0.6%)	0	0	1 (0.2%)
混血	0	0	0	0
不明	1 (0.6%)	0	0	1 (0.2%)
未報告	0	1 (0.6%)	0	1 (0.2%)
民族				
N	161	161	81	403
ラテンアメリカ系またはラテン系	1 (0.6%)	2 (1.2%)	3 (3.7%)	6 (1.5%)
非ラテンアメリカ系またはラテン系	160 (99.4%)	159 (98.8%)	78 (96.3%)	397 (98.5%)
不明	0	0	0	0
未報告	0	0	0	0
体重(kg)				
N	161	161	81	403
平均(SD)	73.917 (11.8631)	73.584 (12.8941)	71.806 (13.5441)	73.360 (12.6223)
中央値	72.900	73.900	69.900	72.900
範囲	(46.00; 109.10)	(46.30; 108.90)	(45.10; 98.90)	(45.10; 109.10)

【０７８８】

【表１０－２】

表 2: 人口統計およびベースライン特徴の要約;コホート 3;完全分析セット(研究 VAC31518COV1001)

	Ad26 5e10	Ad26 1e11	プラセボ	全対象
身長(cm)				
N	161	161	81	403
平均(SD)	170.719 (8.8360)	169.288 (9.8092)	168.275 (10.5211)	169.656 (9.6068)
中央値	169.200	168.500	170.000	169.000
範囲	(146.70; 193.00)	(151.10; 193.00)	(147.50; 193.20)	(146.70; 193.20)
BMI (kg/m^2)				
N	161	161	81	403
平均(SD)	25.272 (2.8286)	25.515 (2.6968)	25.205 (3.1319)	25.356 (2.8370)
中央値	25.700	25.700	25.600	25.700
範囲	(16.60; 29.90)	(17.90; 29.90)	(17.20; 29.80)	(16.60; 29.90)
研究施設				
N	161	161	81	403
BE10001	21 (13.0%)	21 (13.0%)	10 (12.3%)	52 (12.9%)
BE10002	12 (7.5%)	10 (6.2%)	5 (6.2%)	27 (6.7%)
BE10003	14 (8.7%)	14 (8.7%)	7 (8.6%)	35 (8.7%)
BE10004	28 (17.4%)	27 (16.8%)	14 (17.3%)	69 (17.1%)
US10001	23 (14.3%)	25 (15.5%)	12 (14.8%)	60 (14.9%)
US10003	21 (13.0%)	21 (13.0%)	11 (13.6%)	53 (13.2%)
US10004	13 (8.1%)	14 (8.7%)	8 (9.9%)	35 (8.7%)
US10006	15 (9.3%)	14 (8.7%)	7 (8.6%)	36 (8.9%)
US10008	14 (8.7%)	15 (9.3%)	7 (8.6%)	36 (8.9%)
ベースラインでの SARS-CoV-2 血清陽性状態				
N	161	161	81	403
陽性	1 (0.6%)	2 (1.2%)	1 (1.2%)	4 (1.0%)
陰性	160 (99.4%)	159 (98.8%)	80 (98.8%)	399 (99.0%)

注:各パラメーターの N は、非欠測値を反映する。
SD:標準偏差、範囲:最小値～最大値
注:Ad26 5e10:Ad26.COV2.S $5x10^{10}$ vp; Ad26 1e11: Ad26.COV2.S $1x10^{11}$ vp。
2020 年 9 月 21 日までの全対象データが含まれている。

【０７８９】

免疫原性結果

分析したデータセット

免疫原性結果の分析は、免疫原性データが入手可能であったすべての無作為化ワクチン接種参加者で構成されていたパープロトコール免疫原性集団に基づいていた。群１および群２（５×１０^{10}ｖｐ）ならびに群３および群４（１×１０^{11}ｖｐ）のワクチン接種１後の免疫原性結果をプールした。

【０７９０】

完全な分析セットでは、５×１０^{10}ｖｐワクチン群の１人の参加者、１×１０^{11}ｖｐワクチン群の２人の参加者、およびプラセボ群の１人の参加者が、ベースライン時にＳＡＲＳ－ＣＯＶ－２に対して血清陽性であった（表２）。

【０７９１】
体液性免疫応答
コホート３　ＣＯＶ１００１参加者の中和抗体を、野生型ウイルス中和アッセイで測定した。事前規定のサブセット選択戦略（ワクチン割り当てにより層別化された前向き無作為試料採取）に従って１２５人の研究参加者（１群当たり２５人）の無作為サブセットが、非盲検独立外部統計学者により選択された。
【０７９２】
ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対する中和抗体応答
野生型ウイルス中和アッセイ
このアッセイでは、事前規定のサブセット選択戦略（ワクチン割り当てにより層別化された前向き無作為試料採取）に従って１２５人の研究参加者（１群当たり２５人）の無作為サブセットが、非盲検独立外部統計学者により選択された。
【０７９３】
ｗｔＶＮＡにより測定したＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対する中和抗体価は、５０％阻害濃度（ＩＣ５０）単位として表されている。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対する経時的なＶＮＡ応答のグラフ表示（幾何平均力価［ＧＭＴ］および対応する９５％ＣＩ）が、図１０６に示されている。
【０７９４】
ベースラインでは、５×１０^{10}ｖｐワクチン群の４７人の参加者、１×１０^{11}ｖｐワクチン群の４５人の参加者、およびプラセボ群の２４人の参加者は、検出可能なＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＩＣ５０力価を示さなかった（アッセイの定量化下限［ＬＬＯＱ］は５８のＩＣ５０であった）。以前のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２曝露を示す可能性がある、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＩＣ５０力価の検出可能なベースラインレベルが、５×１０^{10}ｖｐワクチン群の２人の参加者、１×１０^{11}ｖｐワクチン群の５人の参加者で観察されたが、プラセボ群の参加者では観察されなかった（図１０６）。
【０７９５】
１５日目には、両活性ワクチン群の参加者の７５％が、１００よりも大きなＩＣ５０力価に達し、参加者の大半が迅速でロバストな応答に誘発されていたことが示された。１５日目の応答者率は、５×１０^{10}ｖｐワクチン群では８７％であり、１×１０^{11}ｖｐワクチン群では８３％であった。１５日目では、ＧＭＴは、５×１０^{10}ｖｐワクチン群および１×１０^{11}ｖｐワクチン群でそれぞれ１９７（９５％ＣＩ：１３７；２８４）および１８０（９５％ＣＩ：１１７；２７６）であった。１５日目の標準偏差（ＳＤ）は、２つのワクチン群で同様であった。
【０７９６】
２９日目の中和抗体応答は、１５日目の応答と同等であった。２９日目には、５×１０^{10}ｖｐワクチン群の合計で８１％の参加者および１×１０^{11}ｖｐワクチン群の参加者の合計で８８％が、１００よりも大きなＩＣ５０力価に達した。２９日目の応答者率は、５×１０^{10}ｖｐワクチン群で９０％であり、１×１０^{11}ｖｐワクチン群で９１％であった。２９日目では、ＧＭＴは、５×１０^{10}ｖｐワクチン群および１×１０^{11}ｖｐワクチン群でそれぞれ２２１（９５％ＣＩ：１６０；３０７）および２１０（９５％ＣＩ：１５５；２８５）であった。標準偏差（ＳＤ）は、２つのワクチン群で同様であった。
【０７９７】
一部の参加者のワクチン接種後力価が、アッセイの定量化上限（ＵＬＯＱ）に達したため、中和抗体応答の規模および応答者率は、本分析では過小評価されている可能性がある。こうした試料は、個々の力価の決定を可能にするために、後の段階にてより高い希釈度で再分析されることになる。プラセボ群では、１５日目または２９日目にｗｔＶＮＡ力価の増加は観察されなかった。
【０７９８】
ベースライン時に検出可能なレベルのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和抗体を示した参加者のうち３人では、応答者状態が欠落していた。活性ワクチンレジメンの残りの４人の参加者

はすべて、１５日目および２９日目にＧＭＴの増加を示した。しかしながら、こうした参加者は全員が、事前規定の応答者基準を満たしたわけではない。

【０７９９】

加齢に伴う中和抗体応答の低下傾向は観察されなかった。コホート３およびコホート１ａの中和抗体データを２９日目の両ワクチン群について比較すると、コホート３の抗体応答の規模（ＧＭＴ、5×10^{10}ｖｐワクチン群ではコホート３対コホート１ａ：２２１対２１４、および1×10^{11}ｖｐワクチン群では２１０対２４３）および応答者率は、コホート１ａと同じ範囲内である。

【０８００】

ワクチン接種後に解熱剤／鎮痛剤を使用した5×10^{10}ｖｐ群の参加者（１８５ＧＭＴ、７８％応答者）および使用しなかった参加者（２３８ＧＭＴ、９５％応答者）の２９日目における抗体レベルは同様であった。２９日目では、ワクチン接種後に解熱剤／鎮痛剤を使用した1×10^{11}ｖｐ群の参加者（２２９ＧＭＴ、９０％応答者）および使用しなかった参加者（２０２ＧＭＴ、９１％応答者）の抗体レベルも同様であった。これは、こうした薬剤の使用は、ｗｔＶＮＡにより測定される中和抗体反応に影響を及ぼさないと考えられること示す。

【０８０１】

5×10^{10}ｖｐワクチン群および1×10^{11}ｖｐワクチン群の逆累積分布曲線は、１５日目および２９日目の両方で類似していた（図１０７）。

【０８０２】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質に対する結合性抗体応答（ＥＬＩＳＡ）

ＥＬＩＳＡにより測定した、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓにより誘導されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質結合性抗体応答の実際の値およびベースラインからの増加倍数（対応する９５％ＣＩと共に）の記述統計は、図１０８にグラフで示されている。

【０８０３】

以前のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２曝露を示す可能性があるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ　ＥＬＩＳＡ力価の検出可能なベースラインレベルが、5×10^{10}ｖｐワクチン群の２人の参加者、1×10^{11}ｖｐワクチン群の３人の参加者、およびプラセボ群の３人の参加者で観察された。1×10^{11}ｖｐワクチン群に属するこうした参加者のうちの１人は、スクリーニング時にＳＡＲＳ－ＣＯＶ－２血清陽性状態を示した。

【０８０４】

１５日目の応答者率は、5×10^{10}ｖｐワクチン群および1×10^{11}ｖｐワクチン群でそれぞれ７５％および７７％であった。対応するＧＭＴは、5×10^{10}ｖｐ群および1×10^{11}ｖｐ群でそれぞれ１２２（９５％ＣＩ：９７；１５２）および１４１（９５％ＣＩ：１１４；１７５）であった（図１０８）。プラセボ群では、タンパク質結合性抗体の増加は観察されなかった。

【０８０５】

２９日目の結合性抗体応答は、１５日目に見られたものよりも高かった。２９日目の応答者率は、両活性ワクチン群で９６％であった。２９日目のＧＭＴは、5×10^{10}ｖｐ群および1×10^{11}ｖｐ群でそれぞれ３１２（９５％ＣＩ：２４６；３９６）および３５０（９５％ＣＩ：２８４；４３１）であった。ＳＤは、２つのワクチン群で同様であった。プラセボ群では、ワクチン接種後のタンパク質結合性抗体の増加は、両時点においてＧＭＴでも応答者率でも観察されなかった。

【０８０６】

コホート３内では、加齢に伴う結合性抗体応答の低下傾向は観察されなかった。コホート３およびコホート１ａの結合性抗体データを２９日目の両ワクチン群について比較すると、コホート３の抗体応答の規模（ＧＭＴ、コホート３対コホート１ａ：5×10^{10}ｖｐワクチン群では３１２対５２８および1×10^{11}ｖｐワクチン群では３５０対６９５）はより低いが、コホート１ａと同じ範囲内である（図１１０）。コホート１ａおよびコホート３の結合性抗体応答者率は、それぞれ９９％および９６％であり、同等であった（

図１０８および図１１０）。
【０８０７】
ワクチン接種後に解熱剤／鎮痛剤を使用した参加者の１５日目および２９日目の結合性抗体レベルは、使用しなかった参加者と同様であった。解熱剤／鎮痛剤を使用した２９日目の５×１０^{10}ｖｐ群のＧＭＴおよび応答者率は、それぞれ３５７および９４％であった。解熱剤／鎮痛剤を使用しなかった２９日目の５×１０^{10}ｖｐ群のＧＭＴおよび応答者率は、それぞれ３０２および９７％であった。
【０８０８】
解熱剤／鎮痛剤を使用した２９日目の１×１０^{11}ｖｐ群のＧＭＴおよび応答者率は、それぞれ３５７および９４％であった。解熱剤／鎮痛剤を使用しなかった２９日目の５×１０^{10}ｖｐ群のＧＭＴおよび応答者率は、それぞれ３０２および９７％であった。
【０８０９】
５×１０^{10}ｖｐワクチン群および１×１０^{11}ｖｐワクチン群の逆累積分布曲線は類似していた（図１１１）。
【０８１０】
ｗｔＶＮＡ対ＥＬＩＳＡ
体液性アッセイ相関性をさらに調べると、ｗｔＶＮＡ力価は、１５日目および２９日目の両方においてＥＬＩＳＡ力価と高度に相関し、スピアマン相関係数はそれぞれ０．７３４および０．７２であったことが示された（図１１２）。相関性は、両アッセイの低範囲内および高範囲内でロバストであり、将来の分析ではｗｔＶＮＡの代理手法としてＥＬＩＳＡを使用することができることを示している。
【０８１１】
ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓペプチドに対する細胞性免疫応答
Ｔｈ１応答およびＴｈ２応答を、１日目（ワクチン接種前）および用量１後１５日目にＩＣＳにより評価した。参加者のサブセットでＰＢＭＣを収集した。
【０８１２】
ＣＤ４＋／ＣＤ８＋Ｔ細胞応答（ＩＣＳ）
ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞応答の誘導を、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓペプチド（ペプチドプールＳ１およびＳ２）でＰＢＭＣを刺激した後でＩＣＳにより決定した。ヘルパーＴ（Ｔｈ）１応答の測定は、ＩＦＮγおよび／またはＩＬ－２を産生するが、ＩＬ－４、ＩＬ－５、および／またはＩＬ－１３を産生しないＣＤ４＋Ｔ細胞のパーセンテージにより特徴付けた。Ｔｈ２応答は、ＩＬ－４および／またはＩＬ－５／ＩＬ－１３ならびにＣＤ４０Ｌを発現するＣＤ４＋Ｔ細胞のパーセンテージとして決定した。このデータを使用して、Ｔｈ１／Ｔｈ２比を決定した。ＣＤ８＋Ｔ細胞応答の検出は、ＩＦＮγおよび／またはＩＬ－２を産生するＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージにより特徴付けた。下記のＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞応答の要約では、Ｓ１およびＳ２ペプチドプールを一緒にした場合の値が提示および考察されている。
【０８１３】
ＣＤ４＋Ｔ細胞応答
ＩＦＮγおよび／またはＩＬ－２（Ｔｈ１）を発現するがＴｈ２サイトカインを発現しないＣＤ４＋Ｔ細胞ならびにＩＬ－４および／またはＩＬ－５／ＩＬ－１３ならびにＣＤ４０Ｌ（Ｔｈ２）を発現するＣＤ４＋Ｔ細胞のパーセンテージは図１１３に提示されている。一緒にしたレジメンプロファイルは図１１４に提供されている。
【０８１４】
Ｔｈ１応答
ベースラインＴｈ１応答は、１日目では、活性ワクチン群およびプラセボの両方でＬＬＯＱを下回っていた（＜０．０２２％）。Ｔｈ１応答中央値は、ワクチン接種の１４日後に、５×１０^{10}ｖｐワクチン接種群の参加者では０．０９％（Ｑ１；Ｑ３：０．０４；０．１７）に、１×１０^{11}ｖｐ用量群の参加者では０．１１％（Ｑ１；Ｑ３：０．０４；０．１５）に増加した（図４５）。最初のワクチン接種の１４日後のプラセボ群ではＴ

ｈ１応答の増加はなかった。こうした応答は、１５日目に、５×１０^{10}ｖｐワクチン接種群では０．０８％（Ｑ１；Ｑ３：０．０５；０．１６）および１×１０^{11}ｖｐ用量群では０．１１％（Ｑ１；Ｑ３：０．０７；０．１６）のＴｈ１応答中央値を示したコホート１ａの若年成人と同等である。

【０８１５】

５×１０^{10}ｖｐワクチン群および１×１０^{11}ｖｐワクチン群のＳＤは、それぞれ０．４１および０．３６であった。

【０８１６】

５×１０^{10}ｖｐワクチン群の参加者の合計６０％（９５％ＣＩ：４６％；７４％）および１×１０^{11}ｖｐワクチン群の参加者の合計６７％（９５％ＣＩ：５３％；７９％）が、ワクチン接種１４日後にＣＤ４＋Ｔ細胞応答を示した。これは、５×１０^{10}ｖｐワクチン群の参加者の７６％（９５％ＣＩ：６５％；８６％）および１×１０^{11}ｖｐワクチン群の参加者の８３％（９５％ＣＩ：７３％；９１％）が検出可能なＣＤ４＋Ｔ細胞応答を示したコホート１ａで見られたものよりもわずかに低い。

【０８１７】

Ｔｈ２応答

Ｔｈ２応答は、活性ワクチン群およびプラセボの両方においてベースライン時および１５日目では検出不能であった（図１１３）。こうした結果は、コホート１ａの若年成人と同等である。１人の参加者のみがＴｈ２応答を示した。また、１×１０^{11}ｖｐワクチン群に含まれていたこの参加者は、Ｔｈ２応答よりも高く、Ｔｈ１／Ｔｈ２比が２０．１２のＴｈ１応答を示した。これはＴｈ１偏向表現型であることを示している。

【０８１８】

Ｔｈ１／Ｔｈ２比の算出

Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓによるワクチン接種後、Ｔｈ１／Ｔｈ２比を算出して、Ｔ細胞応答が陽性である参加者のＴ細胞表現型偏向を評価した。Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチン接種群のすべての参加者のＴｈ１／Ｔｈ２比は１を上回っていた。これは、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓが全体的にＴｈ１偏向応答を誘導することを示す。これは、参加者の１００％が、同じくＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓによるワクチン接種で１を上回るＴｈ１／Ｔｈ２比を示したコホート１ａの結果と同等である。

【０８１９】

ＣＤ８＋Ｔ細胞応答

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓペプチド刺激に応答してＩＦＮγおよび／またはＩＬ－２を産生するＣＤ８＋Ｔ細胞の記述統計は、図１１５に示されている。一緒にしたレジメンプロファイルは図１１６に提供されている。

【０８２０】

ワクチン接種前のベースラインＣＤ８＋Ｔ細胞応答は、ワクチン群およびプラセボ群の両方でＬＬＯＱを下回っていた（＜０．０２２％）。ワクチン接種の１４日後、ＣＤ８＋Ｔ細胞応答の中央値レベルは、５×１０^{10}ｖｐ群では０．０６％（Ｑ１；Ｑ３：０．０２；０．１２）に、１×１０^{11}ｖｐ群では０．０２％（Ｑ１；Ｑ３：０．０１；０．０８）に増加した。ＣＤ８＋Ｔ細胞応答は、ワクチン接種後のプラセボ群では増加しなかった。５×１０^{10}ｖｐ群におけるこうしたＣＤ８＋Ｔ細胞応答は、コホート１ａの若年成人で見られたものと同等である（０．７％、Ｑ１；Ｑ３：０．０２；０．１２）。１×１０^{11}ｖｐ群におけるＣＤ８＋Ｔ細胞応答は、若年成人で見られたものよりも低い傾向がある（０．０９％、Ｑ１；Ｑ３：０．０５；０．１９）。

【０８２１】

２つのワクチン群のＳＤは、５×１０^{10}ｖｐ群では０．４０であり、１×１０^{11}ｖｐ群では０．４１であった。

５×１０^{10}ｖｐ群の参加者の合計で３６％（９５％ＣＩ：２３％；５１％）および１×１０^{11}ｖｐ群の参加者の合計で２４％（９５％ＣＩ：１３％；３７％）が、ワクチン接種１４日後にＣＤ８＋Ｔ細胞応答を示した。これは、１５日目にＣＤ８＋応答を示すコ

ホート１ａの若年成人のパーセンテージよりも低い（５×１０^{10}ｖｐ群＝５１％および１×１０^{11}ｖｐ群＝６４％）。

【０８２２】

結論および考察

コホート３の１５人のセンチネル参加者の免疫学的分析を以前に報告した。完全なコホート３中間解析は、センチネル報告と一致しており、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓは、５×１０^{10}ｖｐまたは１×１０^{11}ｖｐの用量レベルの単回ワクチン接種後、６５歳以上の参加者で高度に免疫原性であることを示している。

【０８２３】

両Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチン群で、ワクチン接種の１４日後および２８日後にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和抗体応答およびＳ結合性抗体応答がベースラインから増加したことが観察された。５×１０^{10}ｖｐワクチン群の応答者率は、ｗｔＶＮＡおよびＥＬＩＳＡでそれぞれ９０％および９６％であった。１×１０^{11}ｖｐワクチン群の応答者率は、ｗｔＶＮＡおよびＥＬＩＳＡでそれぞれ９１％および９６％であった。

【０８２４】

Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓは、ＩＣＳにより評価して細胞性免疫応答も誘導した。５×１０^{10}ｖｐまたは１×１０^{11}ｖｐでの単回ワクチン接種の１４日後、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞応答の増加が見られた。ワクチン接種後、ＣＤ４＋Ｔ細胞は、Ｔｈ１偏向表現型を示し、Ｔｈ２応答は観察されなかったかまたは非常に限定的であった。Ｔ細胞応答を有するすべての参加者で、Ｔｈ１／Ｔｈ２比は＞１であった。

【０８２５】

コホート３における体液性応答の全体的な規模および応答者率は、以前に報告したコホート１ａで観察された応答と同等である。細胞性ＣＤ４＋Ｔ細胞応答は、コホート１ａの若年成人と同様であり、ＣＤ８＋Ｔ細胞応答は、コホート１ａの若年成人で見られたものよりも概して低かった。

【０８２６】

６５歳の参加者では全体的に、５×１０^{10}ｖｐまたは１×１０^{11}ｖｐのＡｄ２６．ＣｏＶ．２の単回ワクチン接種は、ロバストな中和および結合性抗体応答、Ｔｈ１偏向表現型、ならびにＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞応答の上昇を誘導する。

【０８２７】

[実施例２５]

１８歳以上の成人におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２媒介性ＣＯＶＩＤ－１９を予防するためのＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの有効性および安全性を評価するための無作為化二重盲検プラセボ対照第３相研究

この研究では、分子的に確認された中等症～重症／重篤コロナウイルス疾患－２０１９（ＣＯＶＩＤ－１９）の予防におけるＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの有効性を成人参加者においてプラセボと比較して評価するために、最大で３０，０００人の参加者が登録されることになる。

【０８２８】

詳細な説明　ＣＯＶＩＤ－１９ワクチンの臨床開発プログラムの目的は、ＣＯＶＩＤ－１９を予防するための安全で効果的なワクチンを開発することである。現在、ＣＯＶＩＤ－１９の予防に利用可能なワクチンは存在しない。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質をコードするヒト複製不全Ａｄ２６ベクターに基づくＣＯＶＩＤ－１９ワクチンであるＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓが開発中であり、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス－２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）ウイルススパイク（Ｓ）タンパク質をコードするように構築されている。この研究は、スクリーニング期（最大２８日間）、二重盲検研究期間（６０週間）、および長期追跡調査期間（さらに１年間）で構成されることになる。参加者の合計研究期間は、最長で２年３か月になるだろう。有効性（ＣＯＶＩＤ－１９様徴候および症状など）、免疫原性（体液性免疫応答など）、および安全性（ＡＥモニタリングなど）のような評価は、研究全体を通して実施されることになる。

【０８２９】
参加者は、１日目および５７日目にＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチンまたはプラセボの筋肉内（ＩＭ）注射を受けることになる。
【０８３０】
[実施例２６]
成体および高齢アカゲザルにおけるＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ　ＣＯＶＩＤ－１９ワクチン候補の１用量および２用量レジメンの免疫原性
上記の実施例２０および２１に示されているように、非臨床有効性試験において、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの単一用量は、アカゲザルの上気道および下気道の両方においてＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷に対するロバストな保護を提供し、シリアンゴールデンハムスターを重症臨床疾患から保護した。保護有効性は、ＮＨＰの血清中のウイルス中和活性の存在と強く相関した。こうしたデータは、細胞侵入のためにＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２と同じ細胞受容体に結合する、ＳＡＲＳ－ＣｏＶスパイク（Ｓ）タンパク質に対する中和抗体応答が、非臨床モデルにおけるＳＡＲＳ－ＣｏＶに対する保護と関連付けられたことを示した、ＳＡＲＳ－ＣｏＶに関する以前に報告された知見を補強するものである。
【０８３１】
本発明によるＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチン候補は、第１／２ａ相試験における免疫化後２９日目まで測定した中間解析において、許容される安全性および反応原性プロファイルを有し、成体および高齢個体の両方で単一用量後に迅速で強力な免疫応答を誘発したことが示されている。免疫応答は、第３相試験においてＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの試験を進めるための事前指定の最低基準を満たしていた。
【０８３２】
この実施例では、最初のワクチン接種後最長で１４週間の追跡観察期間中の成体および高齢ＮＨＰの両方におけるＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの１用量および２用量レジメン後の免疫原性データが報告されている。
【０８３３】
方法
動物
成体ＮＨＰ　－　成体動物を含むＮＨＰ研究は、Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（ＣＲＬ）Ｍｏｎｔｒｅａｌ　ＵＬＣ、Ｌａｖａｌ　Ｓｉｔｅ（カナダ）で実施された。動物は、中国のＫｕｎｍｉｎｇｓ　Ｂｉｏｍｅｄ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｌｔｄから入手した。試験施設群体から移動させる前に、すべての動物は健康評価を受け、ツベルクリンの皮内注射により結核を少なくとも１回検査した。皮下注射により各動物に駆虫処置を施した。評価は、技術スタッフによる標準的操作手順に従って実施した。動物実験承認は、ＣＲＬ　Ｍｏｎｔｒｅａｌ　ＵＬＣ、Ｌａｖａｌ　Ｓｉｔｅ（カナダ）の施設内動物管理使用委員会（ＩＡＣＵＣ）により提供された。動物実験は、カナダ動物管理協議会（Canadian Council on Animal Care）により刊行された指針およびカナダ国立研究評議会（National Research Council Canada）により刊行された実験動物の管理および使用に関する指針（the Guide for Care and Use of Laboratory Animals）に準拠して実施した。試験施設は、カナダ動物管理評議会（ＣＡＣ）および米国実験動物管理認定協会（ＡＡＡＬＡＣ）の認定を受けている。加えて、この研究は、ＥＭＡ指針、ＩＣＨ　Ｍ３（Ｒ２）：Guidance on Non-Clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals and FDA guideline, Redbook 2000: General Guidelines for Designing and Conducting Toxicity Studiesに従って実施した。
【０８３４】
高齢ＮＨＰ　－　高齢ＮＨＰを使用した研究を、生物医学霊長類研究センター（Biomedical Primate Research Center）、ライスワイク、オランダ（ＡＡＡＬＡＣ認定機関）で実施した。動物を、研究目的で飼育繁殖させ、社会的に収容した。動物収容は、非

ヒト霊長類管理および使用に関する国際指針（欧州理事会指令８６／６０９／ＥＥＣ、および改訂版付録Ａを含むＥＴＳ　１２３協定、ならびにアメリカ合衆国保健社会福祉省の国立衛生研究所（ＮＩＨ）により提供された、識別番号Ａ５５３９－０１の「外国施設による実験動物の人道的管理および使用に関する基準（Standard for humane care and use of Laboratory Animals by Foreign institutions）」）に従っていた。すべての動物の取扱いは、オランダ法に従って動物科学部門（ＡＳＤ）内で実施した。専任の獣医師および病理医など、経験豊富なスタッフが多数在籍している。ＡＳＤは、担当当局（Ｖｏｅｄｓｅｌ　ｅｎ　Ｗａｒｅｎ　Ａｕｔｏｒｉｔｅｉｔ、ＶＷＡ）および独立動物福祉担当官により定期的に査察を受けている。一部の動物は、サルヘルペスＢウイルスに対する抗体に対して血清陽性であり、モック免疫対照群の一部の動物は、サルＴ細胞白血病ウイルスおよびサルレトロウイルスに対する抗体に対して陽性であった。動物はすべて、身体検査、全血球数の評価、および血清化学により健康であると分類された。生物医学霊長類研究センター（ｄｉｅｒｅｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔｅｎｃｏｍｍｉｓｓｉｅ、ＤＥＣ－ＢＰＲＣ）の組織内動物管理使用委員会は、厳格で国際的な倫理的および科学的基準および指針に準拠して開発された研究プロトコールを承認した。この委員会のメンバーには、研究機関から独立していることを含む適格性が、動物実験に関するオランダ法で要求されている。

【０８３５】

ワクチン

Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチンを、本明細書に記載の通りに生成した。Ａｄ２６ベクターの製造は、相補性細胞系ＰＥＲ．Ｃ６　ＴｅｔＲで実施した（Wunderlich et al., 2018）（Zahn et al., 2012）。陰性対照ベクターＡｄ２６．ＲＳＶ．ｇＬｕｃは、ガウシアホタルルシフェラーゼに融合されたＲＳＶ　Ｆタンパク質を、２Ａペプチド配列で隔てられた単一導入遺伝子としてコードし、個々のタンパク質の両方の発現がもたらされる。ベクターの製造は、ＰＥＲ．Ｃ６で実施した。

【０８３６】

研究設計動物実験

成体ＮＨＰ　－　６０匹（雌５７匹および雄３匹。雄３匹を、試験群３、４、および５に各群雄１匹で割り当てた）の３．３～５．０歳の中国原産アカゲザル（Macaca Mulatta）を、体重に基づく無作為層化方式により５群に割り振った。１４匹の動物が各ワクチン群に含まれ、４匹の動物がシャム対照群に含まれていた。群１（ｎ＝４）はシャム対照群であり、０週目および８週目に生理食塩水注射を受け、群２および３（各群ｎ＝１４）は、０週目に1×10^{11}ウイルス粒子（ｖｐ）および5×10^{10}ｖｐのＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓによるそれぞれ１回の免疫化を受け、群４および５（各群ｎ＝１４）は、それぞれ４週間（０週目および４週目）および８週間（０週目および８週目）の間隔をおいた、5×10^{10}ｖｐのＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓによる２回の免疫化を受けた。免疫化はすべて、左後肢の大腿四頭筋の筋肉内経路で実施した。初回ワクチン用量の前におよびその後は研究の１４週目まで２週間毎に血清のための血液を得た。

【０８３７】

高齢ＮＨＰ　－　１３．７５～２１．９歳の雌アカゲザル（Macaca Mulatta）２０匹を、４つの実験処置群に分け、ＡＢＳＬ－ＩＩＩ施設に収容し、社会的に適合する動物と対にして飼育した。群１（ｎ＝６）は、０週目に1×10^{11}ウイルス粒子（ｖｐ）のＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓを受け取った。群２（ｎ＝６）は、０週目および８週目に5×10^{10}ｖｐのＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓを受け取った。群３（ｎ＝４）は、０週目および８週目に、５００μｇの水酸化アルミニウム（Ａｌ（ＯＨ）３；２％アルハイドロゲル、ＩｎｖｉｖｏＧｅｎ）をアジュバント添加した１００μｇのＳタンパク質を受け取った。シャム対照群（群４、ｎ＝４）を、無関連抗原を発現するＡｄ２６ベクターである、1×10^{11}ｖｐのＡｄ２６．ＲＳＶ．ｇＬｕｃで免疫化した。免疫化はすべて、左後肢の大腿四頭筋の筋肉内経路で実施した。本文に示されているように、血清および末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）単離のための血液を得た。

【０８３８】
酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）
ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質に対するＩｇＧ結合を、Ｗｕｈａｎ－Ｈｕ－１ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２株（ＭＮ９０８９４７）に基づく組換えＳタンパク質抗原を使用してＥＬＩＳＡにより測定した。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質抗原を、４℃で最低でも１６時間、９６ウェルマイクロプレートに吸着させた。インキュベーション後、プレートをＰＢＳ／０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０で洗浄し、ＰＢＳ／０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０中５％スキムミルクで１時間室温にてブロッキングした。血清標準物、対照、およびＮＨＰ血清試料を希釈し、プレートにて１時間室温でインキュベートした。プレートを洗浄し、次いでペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗ヒトＩｇＧと共に室温で１時間インキュベートし、洗浄し、テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）基質で３０分間室温にて発色させ、光から保護し、次いでＨ２ＳＯ４で停止させた。４５０／６２０ｎｍの光学濃度を読み取った。抗体濃度を、標準物に対して逆算した。報告可能な値は、すべての希釈物に基づいて生成し、ＥＬＩＳＡ単位［ＥＵ］／ｍＬで表した。検出下限（ＬＬＯＤ）は、標準物最低内挿範囲濃度に希釈係数を乗じた値に基づき３．４ＥＵ／ｍＬであり、それを情報価値のあるＬＬＯＤとして使用する。定量化下限（ＬＬＯＱ）は、ヒト試料に対して実施された確認試験に基づき、予め５０．３ＥＵ／ｍＬに設定した。
【０８３９】
偽ウイルス中和アッセイ（ｐｓＶＮＡ）
ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ中和抗体価を、偽ウイルス中和アッセイにより測定した。偽型ウイルス粒子は、改変型水疱性口内炎ウイルス（ＶＳＶΔＧ）骨格から作製したものであり、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のＳ糖タンパク質を保持していた。偽粒子は、検出に使用されるルシフェラーゼレポーターを含む。熱不活化ＮＨＰ血清試料の系列希釈物を９６ウェルトランスファープレートで調製した。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２偽ウイルスを血清希釈物に順次添加し、５％ＣＯ２を補給して３７℃で６０±５分間インキュベートした。次いで、血清ウイルス複合体を、ベロＥ６細胞を前もって一晩播種しておいたプレートに移し、３７℃および５％ＣＯ２で２０±２時間インキュベートした。このインキュベーション後、ルシフェラーゼ基質を細胞に添加して、１ウェル当たりの発光レベルを評価した。次いで、発光プレートリーダーでプレートを読み取った。発光強度を、相対発光単位（ＲＬＵ）で定量化した。血清試料の中和力価を、その試料の５０％中和抗体価（ＩＤ５０）に対応する血清希釈の逆数として算出した。ＬＬＯＤは１０であり、これは情報価値のあるＬＬＯＤとして使用される最初の試料希釈（１：１０）である。ＬＬＯＱは、ＩＣ５０を３３に設定してヒト試料に対して実施された確認試験に基づく。
【０８４０】
野生型中和アッセイ（ｗｔＶＮＡ）
生ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対する中和アッセイを、以前に記載の（Ｂｏｓ ｅｔ ａｌ., ２０２０）マイクロ中和アッセイを使用し、使用する株を異なるものに変更して実施した。臨床単離株ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２／ｈｕｍａｎ／ＮＬＤ／Ｌｅｉｄｅｎ－０００８／２０２０（Ｌｅｉｄｅｎ－０００８）を喉スワブから単離し、ベロＥ６細胞で２回継代した。このウイルス単離株のＮＧＳ由来完全ゲノムは、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＭＴ７０５２０６．１で入手可能である。単離株Ｌｅｉｄｅｎ－０００８をベロＥ６細胞で増殖および滴定した。
【０８４１】
ＥＬＩＳｐｏｔ
ＩＦＮ－γ／ＩＬ－４ダブルカラー分析を新たに単離したＰＢＭＣに対して実施した。ＰＢＭＣを、フィコール勾配遠心分離（１：４　ＤＰＢＳ希釈血液中９２％の１０ｍｌ　Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）Ｐｌｕｓ）を使用してエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）全血から単離した。ＩｍｍｕｎｏＳｐｏｔ　Ｈｕｍａｎ　ＩＦＮ－γ／ＩＬ－４　Ｄｏｕｂｌｅ－Ｃｏｌｏｒ　Ｅｎｚｙｍａｔｉｃ　ＥＬＩＳｐｏｔアッセイキットを製造元のプロトコール（Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ

Ｌｉｍｉｔｅｄ）に従って使用してＥＬＩＳｐｏｔを実施した。エタノール活性化９６ウェルＥＬＩＳｐｏｔプレートを、抗ヒトＩＦＮ－γおよびＩＬ－４捕捉抗体で一晩コーティングした。細胞を１ウェル当たり２５０，０００細胞の濃度でプレーティングし、ＤＭＳＯの存在下の細胞培養培地、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質の長さ全体にわたる１１個アミノ酸重複（ＪＰＴ）を有する連続１５量体ペプチドの２μｇ／ｍＬのペプチド濃度の２つのプール、または陽性対照としての１μｇ／ｍＬ　ＰＨＡのいずれかにより２２時間刺激した。ＣＴＬ　ＩｍｍｕｎｏＳｐｏｔ分析機およびＩｍｍｕｎｏＳｐｏｔソフトウェア（Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）を使用して分析を実施した。１．０×１０^{6}ＰＢＭＣ当たりのスポット形成単位を、１動物当たりの個々のペプチドプールから培地刺激計数を減算し、２つのペプチドプールにわたって合計することにより算出した。

【０８４２】

細胞内サイトカイン染色（ＩＣＳ）

細胞内サイトカイン産生の分析には、１×１０^{6}個の新たに単離したＰＢＭＣを、細胞培養培地、２μｇ／ｍＬ　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質ペプチドプール（ＥＬＩＳｐｏｔに記載の通り）、ＧｏｌｇｉＳｔｏｐ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）の存在下の培地または１μｇ／ｍＬ　ＰＨＡのいずれかにより、３７℃で一晩（およそ１５時間）刺激した。刺激した細胞を、まずＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ　Ａｑｕａ生存色素（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）と共にインキュベートし、続いて抗ヒトモノクローナル抗体ＣＤ３－ＰｅｒＣＰ－Ｃｙ５．５、ＣＤ４－ＡＰＣ　Ｈ７、ＣＤ８－ＢＶ６５０、ＣＤ１４－ＢＶ６０５、ＣＤ６９－ＢＶ７８６（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）、およびＣＤ２０－ＢＶ６０５（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）で表面染色した。その後、細胞をＣｙｔｏｆｉｘ／Ｃｙｔｏｐｅｒｍ緩衝液（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）で固定し、抗ヒトＩＬ－２－ＰＥ、ＩＦＮ－ｇ－ＡＰＣ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）、ＩＬ－５－Ｖｉｏ５１５（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）、ＩＬ－４－ＰＥ　Ｄａｚｚｌｅ５９４、およびＩＬ－１３－ＢＶ４２１（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）で細胞内染色した。試料取得は、ＬＳＲ　Ｆｏｒｔｅｓｓａ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）で実施し、データは、ＦｌｏｗＪｏ　Ｖ１０（ＴｒｅｅＳｔａｒ）で分析した。抗原特異的Ｔ細胞を、単一細胞（ＦＳＣ－Ｈ対ＦＳＣ－Ａ）、生細胞、サイズ（リンパ球）（ＦＳＣ－Ａ対ＳＳＣ－Ａ）、ＣＤ３＋、ＣＤ４＋、またはＣＤ８＋細胞、ならびにＣＤ６９＋およびサイトカイン陽性での連続ゲーティングにより特定した（ゲーティング戦略は付録図２に示されている）。サイトカイン陽性応答は、各々個々の動物の対応する培地刺激試料で検出されたバックグラウンド応答を減算した後のものが提示されている。応答者は、サイトカインゲートにて少なくとも１つの事象を検出する理論的能力である技術的閾値（Ｂｏｗｙｅｒ ｅｔ ａｌ., ２０１８）により規定され、ここでは各アッセイ実行の培地刺激試料およびペプチドプール刺激試料のＣＤ４またはＣＤ８Ｔ細胞の平均個数の逆数として規定される。Ｔｈ１サイトカイン対Ｔｈ２サイトカインの比を、Ｔｈ１（ＩＦＮ－γまたはＩＬ－２を発現するＣＤ４＋ＣＤ６９＋Ｔ細胞）およびＴｈ２（ＩＬ－４またはＩＬ－５またはＩＬ－１３を発現するＣＤ４＋ＣＤ６９＋Ｔ細胞）サブセットのブールゲーティングにより算出した。ＩＬ－４またはＩＬ－５またはＩＬ－１３を発現するＴ細胞）サブセット。

【０８４３】

統計分析

ＥＬＩＳＡおよびｐｓＶＮＡ

結合性抗体およびｐｓＶＮＡ中和抗体データについての特定のワクチン群間の比較は、分散分析（ＡＮＯＶＡ）での２試料ｔ検定で行った。連続する時点を、ワクチン群毎に対応のあるｔ検定で比較した。ｐ値は、ｌｏｇ１０変換値の平均に対して算出した。

【０８４４】

ｗｔＶＮＡ、ＥＬＩＳｐｏｔ、およびＩＣＳ

ワクチン群を、マン－ホイットニーＵ検定で陰性対照群と比較した。力価の５０％未満がＬＬＯＤである場合、ワクチン群間の対比較は、ワクチンを因子としたＴｏｂｉｔ　Ａ

ＮＯＶＡを使用して実施した。ワクチン間の対比較は、ｚ検定を用いて行った。アッセイにて、いずれかのワクチン群を５０％以上で打ち切った場合、対比較は、マン－ホイットニーＵ検定で行った。

【０８４５】

連続時点間の力価の差を、各アッセイの動物毎に算出した。

【０８４６】

打ち切り測定値の数に応じて、Ｔｏｂｉｔ　ＡＮＯＶＡ、続いて事後的ｚ検定または符号検定で差を比較した。

【０８４７】

すべての統計検定で、有意レベルは５％であった。多重比較調整は適用しなかった。すべての統計計算はＳＡＳ９．４．（ＳＡＳ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　Ｉｎｃ．、カリー、ノースカロライナ州、米国）で行われる。

【０８４８】

相関分析

結合性抗体濃度と測定された中和抗体価との間の相関分析を、両側スピアマン順位相関検定により算出した。

【０８４９】

結果

成体アカゲザルにおける１用量および２用量Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチンレジメンの免疫原性

成体アカゲザル６０匹のコホート（３．３～５．０歳、雌５７匹および雄３匹）を、０週目での１×１０^{11}ｖｐもしくは５×１０^{10}ｖｐのＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの単一用量（１群当たりｎ＝１４）または４週間もしくは８週間間隔での５×１０^{10}ｖｐのＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの２用量（１群当たりｎ＝１４）のいずれかで免役した。シャム対照群（ｎ＝４）は、０週目および８週目に生理食塩水注射を受けた。Ｓ特異的抗体応答を、酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）および偽ウイルス中和アッセイ（ｐｓＶＮＡ）により、最初の免疫化の１４週間後まで２週間毎に追跡観察したところ、Ｓ特異的抗体応答は、免疫化２週間後という早い時期にすべてのワクチン接種動物で検出され、免疫化後４週目までに有意に増加した（ｐ≦０．０３０、ＡＮＯＶＡｔ検定）（図１Ａおよび１Ｂ）。１×１０^{11}ｖｐのＡｄ２６．ＣｏＶ２．Ｓを受け取った動物（群２）は、５×１０^{10}ｖｐのＡｄ２６．ＣｏＶ２．Ｓで免疫化した動物と比べて（群３、４、および５を併せて）、１．６倍より高い結合性抗体および２倍より高い中和抗体を有していた（それぞれ、ｐ＝０．００８およびｐ＝０．００４、ＡＮＯＶＡｔ検定）。応答レベルの同様の差異は、観察期間全体にわたって維持された。Ｓ結合性抗体レベルは、動物が受けたワクチン用量に関わりなく、中和抗体レベルよりも急速に低下した。

【０８５０】

初回ワクチン用量の４週間または８週間後に投与された２回目のワクチン用量は、用量２前の時点と比べて、Ｓ特異的抗体応答の有意な増加を誘発した（ｐ≦０．００１、ＡＮＯＶＡｔ検定）（図１１７Ａおよび１１７Ｂ）。５×１０^{10}ｖｐのＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓによる単回免疫化と比較して、初回用量の４週間および８週間後になされた２回目の免疫化は、用量２の２週間後に測定して、それぞれ、結合性抗体濃度の５．７倍および１１．８倍増加（ｐ＜０．００１、ＡＮＯＶＡ　ｔ検定）および中和抗体価の７．６倍および１５．２倍の増加（ｐ＜０．００１、ＡＮＯＶＡ　ｔ検定）を誘発させた。２用量ワクチンレジメンにより誘発された抗体応答を、単一１×１０^{11}ｖｐワクチン用量により誘発された抗体応答と比較すると、同様の差異が観察された。

【０８５１】

４週間および８週間間隔の２用量ワクチンレジメンは、２回目の免疫化の２週間後に、同等のＳ特異的結合性抗体濃度を誘発させたが、中和抗体価の幾何平均は、４週間レジメンと比較して８週間レジメンの方が２．２倍より高かった（ｐ＝０．００５、ＡＮＯＶＡｔ検定）。２回目の免疫化後の４週目および６週目に、結合性および中和抗体レベルは、

両２用量群とも同様の動力学で低下し、中和抗体規模の相対的な差異は維持された（８週間レジメンでは、４週目および６週目でそれぞれ２．１倍および２．４倍より高かった。それぞれｐ＝０．０２１およびｐ＝０．００１、ＡＮＯＶＡ　ｔ検定）。

【０８５２】

１用量レジメンを受けた動物では、中和抗体価と比べて結合性抗体価の方がより急速に低下したにも関わらず、本発明者らは、試験したすべてのレジメンの時点にわたって、結合性抗体レベルと中和抗体レベルとの間に良好な全体的相関性を観察した（Ｒ＝０．７８７５、ｐ＜０．００１、スピアマン順位相関検定）（図１１７Ｃ）。

【０８５３】

高齢アカゲザルにおける１用量および２用量Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチンレジメンの免疫原性

高齢個体ではＣＯＶＩＤ－１９重症度および死亡率が増加するため、本発明者らは、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの免疫原性を、高齢アカゲザル（雌２０匹、１３．７５～２１．９歳）でも分析した。融合前のコンフォメーションで安定化された、水酸化アルミニウム（Ａｌ（ＯＨ）３）アジュバント添加可溶性三量体スパイクタンパク質が、ヘルパーＴ２（Ｔｈ２）偏向対照ワクチンとして含まれていた。群を、０週目に投与した１×１０^{11}ｖｐのＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの１用量レジメン（ｎ＝６）、８週間の間隔をあけた、５×１０^{10}ｖｐのＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの２用量レジメン（ｎ＝６）、またはＴｈ２型応答を促進するためのＡｌ（ＯＨ）３アジュバント添加Ｓタンパク質１００μｇによる２用量レジメン（ｎ＝４）で免役した。シャム対照群は、無関連抗原をコードするＡｄ２６ベクター（Ａｄ２６．ＲＳＶ．ｇＬｕｃ；シャム対照；ｎ＝４）を０週目および８週目に受け取った。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質特異的結合性および中和抗体レベルを、最初の免疫化の１０週間後まで隔週で測定した。Ｓタンパク質特異的細胞性応答を４週目および１０週目に測定した。

【０８５４】

Ｓタンパク質特異的結合性抗体濃度は、２週目以降、各ワクチン接種レジメンで有意に増加した（ｐ≦０．０３４、０週目と２週目とを比較した事後の対応のあるｔ検定によるＡＮＯＶＡ）。６週目および８週目では、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ誘導性抗体濃度は、Ａｌ（ＯＨ）３アジュバント添加Ｓタンパク質誘導性濃度と比較して有意に増加した（ｐ≦０．０３６、事後ｔ検定によるＡＮＯＶＡ）。２つのＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ用量レベルにより誘発された抗体応答に統計的有意差は、８週目まで検出することができなかった。２回目の用量の２週間後である１０週目には、５×１０^{10}ｖｐのＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの２回目の用量を受け取った群は、単一用量１×１０^{11}ｖｐ　Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓのレシピエントと比較して有意により高い抗体濃度を有していたが（５×１０^{10}ｖｐ　Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ群では４．４倍、ｐ＝０．００２）、Ｓ抗体濃度は、Ａｌ（ＯＨ）３アジュバント添加Ｓタンパク質のレシピエントと同様であった（ｐ＝０．４８２）（図１１８Ａ）。

【０８５５】

中和抗体価の動力学を、野生型ウイルス中和アッセイにより決定した。１×１０^{11}ｖｐのＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの単一用量は、２週目に中和抗体価を誘導し、４週目にはすべての動物で以前の時点と比較して有意に増加し（ｐ＝０．０３１、符号検定）、その後１０週目まで安定したままであった。同様に、２用量５×１０^{10}ｖｐ　Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓレジメンは、４週目（ｐ＝０．０３１、符号検定）および６週目（ｐ＝０．００８、事後ｚ検定によるｔｏ　ｂｉｔ　ＡＮＯＶＡ）に以前の時点と比較して有意に増加した中和抗体価をすべての動物で誘導した。２回目の用量の２週間後である１０週目には、抗体価は８週目と比較して３倍増加した（ｐ＜０．００１、事後ｚ検定によるｔｏ　ｂｉｔ　ＡＮＯＶＡ）。Ａｌ（ＯＨ）３アジュバント添加Ｓタンパク質は、初回用量後、４匹中２匹の動物でのみ、低レベルで一過性レベルの中和抗体しか誘導しなかった。しかしながら、２回目の用量の２週間後である１０週目には、４匹の動物すべてが、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ群と同じ範囲の中和抗体を有していた（アジュバント添加タンパク質群の群サ

イズが小さいため、統計分析は不可能である）。１０週目のワクチン群の対比較は、２用量５×１０^{10}ｖｐ　Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓレジメンが、単一用量１×１０^{11}ｖｐ　Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ群と比較して、有意により高い中和抗体価を誘導したが（１０倍、ｐ＜０．００、ｔｏ　ｂｉｔ　ＡＮＯＶＡおよび事後ｚ検定）、Ｓタンパク質を受け取ったＮＨＰ群における力価は類似していた（ｐ＝０．３０３）ことを示した（図１１８Ｂ）。ＥＬＩＳＡで測定したＳ特異的結合性ＩｇＧレベルは、野生型中和抗体価と高度に相関し（Ｒ＝０．９２、ｐ＝＜０．００１、スピアマン順位相関）、ＥＬＩＳＡの感度がより高いことが示された（図１１８Ｃ）。

【０８５６】

Ｓタンパク質特異的Ｔ細胞応答を、完全Ｓタンパク質にわたって１１個が重複した１５量体ペプチドを使用してＥＬＩＳｐｏｔおよび細胞内サイトカイン染色（ＩＣＳ）で測定した。Ａｄ２６．ＣＯＶ２．ＳレジメンならびにＡｌ（ＯＨ）３アジュバント添加スパイクタンパク質は両方とも、最初の免疫化の４週間後にＩＦＮ－γ応答を誘導した（図１１９Ａおよび１１９Ｂ）。５×１０^{10}ｖｐ　Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ群およびアジュバント添加スパイクタンパク質群の２回目の用量の２週間後（１０週目）、ＩＦＮ－γ応答は、５×１０^{10}ｖｐ　Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ群では４週目の時点と同等であったが、１×１０^{11}ｖｐ　Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ群およびアジュバント添加Ｓタンパク質群ではより低かった。これは、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの２回目の用量が、Ｔ細胞応答のより良好な耐久性をもたらすことを示唆した。実質的なＩＬ－４応答は、Ａｌ（ＯＨ）３アジュバント添加スパイクタンパク質群でのみ、４週目および１０週目の両方においてＥＬＩＳｐｏｔにより観察された（図１１９Ａ）。ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞サイトカイン応答もＩＣＳにより分析した。Ｓタンパク質特異的ＣＤ４＋Ｔ細胞ＩＦＮ－γおよびＩＬ－４発現パターンにより、ＥＬＩＳｐｏｔ応答が確認され、すべてのワクチン群が４週目にシャム対照群と比較して有意により高いレベルのＩＦＮ－γを誘導した（ｐ≦０．０２９、マン－ホイットニーＵ検定）。これは、シャム対照群と比較して有意により高いままであった（ｐ＝０．０１０）２用量５×１０^{10}ｖｐ　Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ群を除いて、１０週目には減少した。ＩＬ－４発現は、両時点においてシャム対照群と比較して、Ａｌ（ＯＨ）３アジュバント添加スパイクタンパク質群でのみ有意により高かった（ｐ＝０．０２９）（図１１９Ｂ）。追加のサイトカインＩＬ－２またはＩＬ－５およびＩＬ－１３を測定した。それらは、それぞれＩＦＮ－γまたはＩＬ－４で見られるパターンを反映しており、２回目の用量を受け取った群の応答は最小限であったかまたはブーストがなく、Ａｌ（ＯＨ）３－アジュバント添加スパイクタンパク質のみが、ロバストなレベルのＴｈ２サイトカインＩＬ－４、ＩＬ－５、およびＩＬ－１３を誘導した（図１１９Ｃ）。これは、Ｔｈ１対Ｔｈ２比を算出することにより確認され、明確なＴｈ１偏向が、レジメンとは関わりなく、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ免疫化後に観察された（図１１９Ｃ）。Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓにより誘導されたスパイクタンパク質特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞は、主にＩＦＮ－γおよびＩＬ－２を産生したが、Ａｌ（ＯＨ）３アジュバント添加スパイクタンパク質は、ＩＬ－２のみを産生した。免疫化レジメンはいずれも、著しい量のＩＬ－４、ＩＬ－５、およびＩＬ－１３を産生するＣＤ８＋Ｔ細胞を誘導しなかった（図１２０）。

【０８５７】

この実施例では、候補ワクチンの単一用量後の免疫の耐久性およびＳタンパク質特異的免疫応答の規模に対する２回目の用量の影響の両方に関する洞察を得るために、初回用量の１４週間後までの成体および高齢アカゲザルにおける１用量および２用量Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓレジメンの免疫原性を評価した。

【０８５８】

成体マカクおよび高齢マカクの両方で、Ｓ結合性抗体応答およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和抗体応答は、最初の免疫化の早くも２週間後に検出され、４週目までに有意に増加した。成体アカゲザルおよび高齢アカゲザルの抗体応答の動力学および規模は、試験したすべてのＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチンレジメンで同様であると考えられた。こうした観察は、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓによる単回免疫化後の４週目に成人ヒトおよび高齢ヒトで

の観察と一致している。

【０８５９】

Ａｌ（ＯＨ）３アジュバント添加Ｓタンパク質は、有意なレベルの中和抗体を誘発するには２用量が必要であった。これは、ＮＨＰおよびヒトにおいて単回投薬後では十分に免疫原性でなかった第３相臨床試験のタンパク質またはｍＲＮＡプラットフォームに基づく他のＣＯＶＩＤ－１９ワクチンでも観察されている（Corbett et al., The New England Journal of Medicine, 383(16), 1544-1555, 2020）（Guebre-Xabier et al., BioRxiv, 1-16, 2020）。成体ＮＨＰおよび高齢ＮＨＰの両研究では、この２つの研究には異なる中和アッセイが使用されたものの、結合性抗体応答と中和抗体応答との間に高度な相関性が見出された。これは、Ｓタンパク質結合性抗体ＥＬＩＳＡが、中和抗体応答の代理読み取りとして使用することができることを示唆しており、これも本発明者らの以前の観察により裏付けられる（Mercado et al., Nature. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2607, 2020）。

【０８６０】

成体マカクでは、単一用量Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ誘発性体液性免疫応答は、免疫化後少なくとも１４週目まで維持された。結合性抗体応答は、時間の経過と共にある程度の低下を示したが、中和抗体応答はより安定的に維持され、本発明者らのワクチン候補により誘発された免疫の耐久性の初期兆候を提供した。体液性免疫応答は、５×１０^{10}ｖｐワクチン用量のレシピエントと比較して、１×１０^{11}ｖｐ用量を受け取ったＮＨＰの方がわずかにより高かったが、差は小さ過ぎて、さらなる臨床開発におけるより高い用量の使用を正当化することはできなかった。

【０８６１】

最初の免疫化の８週間後に投与したＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの２回目の用量は、成体ＮＨＰおよび高齢ＮＨＰの両方において１用量レジメンと比較して、スパイクタンパク質特異的結合性抗体の有意な増加ならびにより重要なことには中和抗体応答の有意な増加をもたらした。これは、２回目の用量は、動物モデルおよびヒトの両方においてより高くより耐久性の免疫応答を常に誘発したという他のＡｄ２６ベースワクチンでの観察と一致している。ＮＨＰにおける２用量Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓレジメンの知見は、２用量Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチンレジメンが、ヒトでも本発明者らの１用量レジメンと比較してより高くより耐久性の免疫応答をもたらす可能性があることを示唆している。

【０８６２】

成体ＮＨＰにおける２ワクチン用量間の間隔の長さの潜在的影響の評価は、誘発された結合性抗体濃度のレベルは、４週間間隔または８週間間隔のいずれかによる２用量後で類似していたが、中和抗体応答は、８週間間隔で２用量を受け取った動物の方がより高かったことを示した。したがって、２用量間で８週間の間隔をあけたワクチンレジメンは、４週間の間隔をあけたレジメンよりも好ましい。

【０８６３】

ＣＯＶＩＤ－１９ワクチンを開発する際に評価すべき重要な側面は、ワクチン関連増強呼吸器疾患（ＶＡＥＲＤ）の潜在的および理論的なリスクであり、これは一般に非中和抗体応答およびＴｈ２偏向細胞性免疫応答に関連付けられるとみなされている。この研究では、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓが、成体ＮＨＰならびに成人ヒトおよび高齢ヒトの両方で以前に示されているように、Ｔｈ１偏向性であった高齢ＮＨＰにおいてＣＤ４＋Ｔ細胞応答を誘発し、Ｓタンパク質抗原を使用したＮＨＰおよびヒトにおける他の遺伝子ワクチンプラットフォームで見出されているものと同様であったことが示されている（van Doremalen et al. , Nature, May. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2608-y, 2020）（Yu et al., Science (New York, N.Y.), 369(6505), 806-811. https://doi.org/10.1126/science.abc6284, 2020）（Vogel et al., BioRxiv, 2020.09.08.280818. https://doi.org/10.1101/2020.09.08.280818, 2020）（Corbett et al., supra, 2020）。対照的に、Ａｌ（ＯＨ）３アジュバント添加Ｓタンパク質は、このアジュバントで予想されるように、よりＴｈ２偏向性の免疫応答を誘導し

、Ｔｈ２偏向応答をこのＮＨＰ動物モデルで誘発することができることが確認された。Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓによるロバストで耐久性の中和抗体応答の誘導と共に、ＮＨＰにおけるＴｈ１偏向応答は、このワクチンのＶＡＥＲＤの可能性を低減させる。

【０８６４】

要約すると、こうしたデータは、１用量および２用量Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチンレジメンが、成体ＮＨＰおよび高齢ＮＨＰにおいて同様の抗体応答を誘発することを示している。重要なことには、最初の免疫化の８週間後に投与された２回目のワクチン用量は、単一ワクチン用量と比較して、成体動物および高齢動物の両方において（中和）抗体応答の有意な増加を誘発した。加えて、成体マカクにおける免疫原性の追跡観察は、最初の免疫化の１４週間後まで抗体応答が維持されることを示しており、単一用量Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓにより誘発される耐久性免疫応答の初期兆候を提供する。

【０８６５】

[実施例２７]

Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ Ｃｏｖｉｄ－１９ワクチンによる第１／２ａ相治験の中間結果

上記に記載の通り、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓを５×１０^{10}または１×１０^{11}ウイルス粒子の用量で単一用量または２用量スケジュール（５６日間隔）で受け取る健常成人（１８～５５歳；コホート１、ｎ＝４０５または＞６５歳；コホート３；ｎ＝４０５）での多施設第１／２ａ相無作為化二重盲検プラセボ対照治験を設計した。

【０８６６】

この実施例では、初回（コホート１および３）および２回目（コホート１）ワクチン接種後の結果が報告される。

【０８６７】

方法

研究設計および参加者

この研究は、１８～５５歳の健常成人（コホート１ａ：目標ｎ＝３７５；コホート１ｂ（詳細な免疫原性のための探索的コホート）：目標ｎ＝２５；および＞６５歳（コホート３：目標ｎ＝３７５）に単一用量または５６日の間隔をあけて２用量として筋肉内（ＩＭ、三角筋）投与した１ｍｌ体積の５×１０^{10}（低用量、ＬＤ）または１×１０^{11}（高用量、ＨＤ）ウイルス粒子（ｖｐ）のＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの安全性、反応原性、および免疫原性を評価するための多施設無作為化二重盲検プラセボ対照第１／２ａ相治験である。

【０８６８】

Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓは、本特許出願に記載の通り、武漢株の最初の臨床単離株（Ｗｕｈａｎ、２０１９、全ゲノム配列ＮＣ＿４５５１２）に由来する完全長安定化ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ Ｓタンパク質をコードする組換え複製不全Ａｄ２６ベクターである。この研究は、ベルギーおよび米国で実施され、現地の倫理委員会および組織内審査委員会（ＩＲＢ）により審査および承認された。すべての参加者は、登録前に書面によるインフォームドコンセントを提供した。

【０８６９】

手順

コホート１および３の両方の４０５人の適格参加者を、初回および２回目の用量のために、以下の処置群：ＬＤ／ＬＤ；ＬＤ／プラセボ；ＨＤ／ＨＤ；ＨＤ／プラセボ、プラセボ／プラセボの１つに無作為に割り振った（１：１：１：１：１）。無作為化は、Ｉｎｔｅｒａｃｔｉｖｅ Ｗｅｂ Ｒｅｓｐｏｎｓｅ Ｓｙｓｔｅｍ（ＩＷＲＳ）により行われ、無作為に並べ替えられたブロックを使用して施設毎に階層化した。参加者および治験責任医師は、研究全体を通して個々の参加者レベルで盲検のままである。研究盲検化の基準を満たすために、スポンサーおよび統計学者は、すべての参加者が用量２後の８日目に達した場合にのみ、コホート１および３の一次分析のために群の盲検化を解除した。

【０８７０】

主要エンドポイントは、各用量スケジュールの安全性および反応原性であった。ソリサ

イティド有害事象（ＡＥ）をワクチン接種後７日間にわたって、アンソリサイティドＡＥをワクチン接種後２８日間にわたって、ＳＡＥを研究の過程全体にわたって日記カードで収集した。有害事象は、ＦＤＡ指針文書「Toxicity Grading Scale for Healthy Adult and Adolescent Volunteers Enrolled in Preventive Vaccine Clinical Trials」に従って等級付けした。コホート１および３の２０２０年１０月３０日の打切日までの安全性データが含まれている。

【０８７１】

副次的エンドポイントは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質に対する体液性および細胞性免疫であった。ベースライン時ならびに１５、２９、５７、および７１日目に、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ特異的結合性抗体をＥＬＩＳＡにより測定した。血清陽性は、アッセイの定量化下限を上回る力価と規定した（定量化下限［ＬＬＯＱ］＝５０．３ＥＵ／ｍＬ）。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２血清中和抗体価を、イングランド公衆衛生局のＶｉｃｔｏｒｉａ／１／２０２０ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２株を使用してマイクロ中和ｗｔＶＮＡの試料の無作為サブセットで測定し、血清陽性はＩＣ５０力価＞５８（ＬＬＯＱ）と規定した。ＩＣ８０ｗｔＶＮＡ力価もこうした時点で評価した。Ｓ特異的Ｔ細胞応答を、ベースライン時および１５日目に、１１個アミノ酸が重複する１５量体のＳペプチドプールの２つのプールを使用してＩＣＳにより測定した。Ｔｈ１応答は、ＩＦＮ－γおよび／またはＩＬ－２を発現するがＩＬ－４、ＩＬ－５、および／またはＩＬ１３を発現しないＣＤ４＋Ｔ細胞により特徴付け、Ｔｈ２応答は、ＩＬ－４、ＩＬ－５、および／またはＩＬ－１３ならびにＣＤ４０Ｌの発現により特徴付けた。アッセイはすべて盲検法で実施し、詳細は付録資料に記載されている。

【０８７２】

統計方法

安全性データを完全な分析セットで記述的に分析し、免疫原性データをパープロトコール免疫原性集団で分析した。詳細については、付録資料および統計分析計画を参照されたい。

【０８７３】

結果

研究参加者

コホート１参加者（１８歳～５５歳）の最初のワクチン接種を、２０２０年７月２２日に開始した。２０２０年８月７日までに５９３人をスクリーニングし、４０５人を登録し、４０２人を初回用量で免疫化し、２０２０年１１月７日までにコホート１（１ａと１ｂを合わせて）を２回目の用量で免役した。コホート３参加者（＞６５歳）の免疫化を２０２０年８月３日に開始し、２０２０年８月２４日までに６６０人をスクリーニングし、４０５人を登録し、４０３人を初回用量で免疫化した。コホート１ａおよびコホート３におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２Ｓ特異的抗体のベースライン血清陽性率は、それぞれ１．９％および１．０％であった。ベースライン特徴は、群全体にわたってほぼ同様であった。

【０８７４】

Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓのワクチンの安全性および反応原性

両コホートの群レベル非盲検安全性データを収集し、分析した。ソリサイティドＡＥは、ワクチン接種後７日間にわたって、アンソリサイティドＡＥは、ワクチン接種後２８日間にわたって、ＳＡＥは、研究の過程全体にわたって日記カードで収集した。

【０８７５】

用量１後の反応原性に関する治験責任医師の評価は、コホート１では４０２人、コホート３では４０３人について利用可能である。両コホートとも、ソリサイティド局所ＡＥはほとんどが等級１または２であり、最も高頻度であったのは注射部位疼痛であった。コホート１では、ＬＤレシピエント１０３人（６４％）、ＨＤレシピエント１２３人（７８％）、およびプラセボ投与の７人（９％）でソリサイティド局所ＡＥがみられた。コホート３では、ＬＤレシピエント６６人（４１％）、ＨＤレシピエント６８人（４２％）、およびプラセボを投与したプラセボレシピエント１１人（１４％）でソリサイティド局所ＡＥ

が報告された。

【０８７６】

両コホートで、最も多かったソリサイティド全身性ＡＥは等級１または２であり、最も高頻度であったのは疲労、頭痛、および筋痛であった。コホート１では、ＬＤレシピエント１０５人（６５％）、ＨＤレシピエント１３３人（８４％）、およびプラセボレシピエント２１人（２６％）でソリサイティド全身性ＡＥが報告された。コホート３では、ＬＤレシピエント７４人（４６％）、ＨＤレシピエント８８人（５５％）、およびプラセボレシピエント１９人（２３％）でソリサイティド全身性ＡＥが報告された。コホート１では、ＬＤレシピエント１５人（９％）およびＨＤレシピエント３２人（２０％）で等級３の全身性ＡＥが報告され、プラセボ群では報告されなかった。コホート１ａにおいて１つまたは複数のソリサイティド等級３のＡＥを有する参加者を比較すると、１８～３０歳群のＬＤ群、ＨＤ群、プラセボ群ではそれぞれ２４％、２６％、および０％、３１～４５歳群のこうした群では３％、１４％、および０％、４６～５５歳群のこうした群では３％、１１％、および０％であることが明らかになった。コホート３では、ＬＤを投与したレシピエント１人（０．６％）、ＨＤを投与したレシピエント４人（２．５％）で等級３の全身性ＡＥが報告され、プラセボを投与したものでは報告されなかった。コホート１では、ＬＤレシピエント２５人（１５％）およびＨＤレシピエント６２人（３９％）で発熱が報告され、プラセボ群では報告されず、ＬＤレシピエント８人（５％）およびＨＤレシピエント１５人（９％）で等級３の発熱が報告された。コホート３では、ＬＤレシピエント７人（４％）およびＨＤレシピエント１４人（９％）で発熱が報告され、等級３の発熱は、ＬＤまたはプラセボを投与した参加者では報告されず、ＨＤレシピエント２人（１％）で報告された。すべての発熱は免疫化の２日以内に生じ、症状の発症時に解熱剤を使用して８０％よりも多くが１～２日以内に解消した。

【０８７７】

コホート１では、ＬＤ群、ＨＤ群、およびプラセボ群でそれぞれ３４例（２１％）、５６例（３５％）、および１４例（１７％）でアンソリサイティドＡＥが報告された。コホー３では、ＬＤ群、ＨＤ群、およびプラセボ群でそれぞれ２７例（１７％）、３８例（２４％）、および１３例（１６％）でアンソリサイティドＡＥが報告された。等級４のＡＥは、ソリサイティド、アンソリサイティドを問わず、いずれのコホートでも報告されなかった。

【０８７８】

コホート１ａでは、用量後の２つの安全性データが、３６３人の参加者で利用可能である。ＬＤ群およびＨＤ群ではそれぞれ７７．０％および７９．７％の参加者に１つまたは複数のソリサイティドＡＥがあった。それと比較して、ワクチンの初回用量後の２回目の用量としてプラセボを受け取った参加者の３３．８％および３１．３％に、プラセボのみを受け取ったプラセボ参加者の２１．６％に１つまたは複数のソリサイティドＡＥがあった。用量１後とは対照的に、ＬＤ群およびＨＤ群の参加者のそれぞれ１．４％および６．８％に、ワクチンの初回用量を以前に受け取った対照群では１．４％および１．５％に、ワクチンをまったく受けたことがない対照の０％に、最も不良な等級３またはそれより高い等級のソリサイティドＡＥがあった。２回目のワクチン用量後は、どの群にも等級３の発熱はなかった。

【０８７９】

ＡＥのために研究を中止した参加者はいなかった。５つのＳＡＥがあった：治験責任医師が、再発性低血圧症の既往歴のためでありワクチンとは無関連であると判断した低血圧１件、腎臓結石の過去の病歴を有する参加者の両側性腎結石症１件（関連性なし）、関連性のない１件のレジオネラ肺炎、ＭＲＩ所見に基づきおよそ８～１０年間存在していた多発性硬化症の悪化例１件、これは研究に組み入れた後に診断されものに過ぎなかった（関連性なし）、および発熱した参加者が１人、この参加者はＣｏｖｉｄ－１９の疑いのため一晩入院したが１２時間以内に回復し、その後、発熱はワクチン関連であることが治験責任医師により判定された。詳細については、付録資料を参照されたい。

【０８８０】
Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの免疫原性
この中間解析の免疫原性データは、用量レベルによる盲検化が解除されていた。コホート１ａの５群すべてで、安定化ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２完全長スパイクタンパク質に対する結合性抗体濃度（ＥＵ／ｍＬ　ＧＭＣ）を測定した。ベースライン時のＧＭＣは＜ＬＬＯＱであったが、ワクチン接種後２９日目までには、ＬＤ／プラセボ群、ＬＤ／ＬＤ群、ＨＤ／プラセボ群、およびＨＤ／ＨＤ群で、それぞれ４７８人（９５％信頼区間：３７９；６０３）、５８６人（４４５；７７１）、６２５人（５０５；７７３）、および７８８人（６２８；９８８）に増加し、すべての群で＞９９％が血清転換していた（図１２１Ａ）。ＧＭＣは、５７日目までにそれぞれ６６０（５１３；８４９）、７５４（５９２；９６１）、８７３（７０１；１０８７）、および１１００（９０８；１３３２）にさらに増加した。用量１後の血清転換率は、ＨＤ／プラセボ群（９７％）を除き、すべてにおいて１００％であった。２回目の用量の１４日後、ＬＤ／ＬＤ群およびＨＤ／ＨＤ群は、それぞれ１，６７７（１，３３４；２，１０９）および２，２９２（１，８４６；２，８４５）のＧＭＣに達し、各群で血清転換は１００％であった。ＬＤ／プラセボ群およびＨＤ／プラセボ群では、７１日目のＧＭＣ（それぞれ６００（４４３；８１４）および９５１（６９６；１，３００））は５７日目と同様でした。コホート３では、ベースライン時のＧＭＴは、＜ＬＬＯＱであった。ＬＤまたはＨＤのいずれかによるワクチン接種後１５日目までに、ＧＭＴは、それぞれ１２２（９７；１５２）および１４１（１１４；１７５）に増加し、両用量群で血清転換率は７７％であった（図１２１Ｂ）。２９日目までに、ＧＭＴは、３１２（２４６；３９６）および３５０（２８１；４２９）であり、血清転換率は９６％および９６％であった。

【０８８１】
ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和抗体価（ＩＣ５０）を、コホート１ａおよび３の参加者の無作為サブセットにおいてｗｔＶＮＡにより測定した。ベースライン時の幾何平均力価（ＧＭＴ）は＜ＬＬＯＱであったが、ワクチン接種後２９日目までに、コホート１ａのＬＤ／プラセボ群、ＬＤ／ＬＤ群、ＨＤ／プラセボ群、およびＨＤ／ＨＤ群ではそれぞれ２２４（１５８；３１８）、２２４（１６８；２９８）、２１５（１６；２７３）、および３５４（２２０；５７１）に増加し、血清転換率は９６％、８８％、９６％、および９２％であった（図１２１Ｃ）。ＧＭＴは、５７日目までに、ＬＤ／プラセボ群、ＬＤ／ＬＤ群、ＨＤ／プラセボ群、およびＨＤ／ＨＤ群ではそれぞれ３１０（２２８；４２２）、２８８（２２１；３７６）、３７０（２６８；５１１）、および４８８（３３４；７１４）にさらに増加し、血清転換率は、ＬＤ／プラセボ群で１００％であり、他の群では９６％であった。コホート１ａでは２回目の用量の１４日後に、ＬＤ／ＬＤ群およびＨＤ／ＨＤ群でそれぞれ７７５（５０８；１１８３）および１２７２（７４６；２１６９）のＧＭＴに達し、血清転換率は両用量群で１００％であった（図１２１Ｂ、左パネル）。ＬＤ／プラセボ群およびＨＤ／プラセボ群では、７１日目のＧＭＴは、それぞれ３１５（２２７；４３８）および３８８（２９０；５０９）であり、５７日目のＧＭＴと同様であった。両群は１００％応答者であった。コホート３では、ベースライン時のＧＭＴは＜ＬＬＯＱであったが、ＬＤ群およびＨＤ群では、１５日目には２１２（１３７；２８４）および１７１（１１９；２６９）に、２９日目には２７７（１９３；３０７）および２１２（１６３；２６６）に増加した（図１２１Ｄ）。血清転換率は、各用量レベル群では１５日目で９２％、コホート３のＬＤ群およびＨＤ群では２９日目で９８％（８３；９９）および９４％（７６；９９）であった。こうしたデータは、ＩＣ８０　ｗｔＶＮＡにより確認された（図１２２）。ｗｔＶＮＡ抗体レベルおよびＥＬＩＳＡ抗体レベルは、両コホートで強く相関していたが（図１２２Ａ）、コホート３では相関性がより幅広い曖昧な形状をしており、高齢成人における中和抗体価と結合性抗体価との関係性がより変動性であることが示唆している。

【０８８２】
異なる研究所で実行された体液性免疫評価のアッセイに含まれていた異なるヒト回復期

血清（ＨＣＳ）パネルの抗体レベルおよびワクチンレシピエントに由来する血清の抗体レベルは同じ範囲であった。

【０８８３】

ベースライン時のまたは用量１後のＡｄ２６中和抗体は、初回および２回目の免疫化がそれぞれ２９日目および７１日目（用量２後）にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和抗体を誘導する能力に対していかなる影響も及ぼさなかった（図１２３）。

【０８８４】

Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ誘発性Ｓ特異的ＣＤ４＋Ｔｈ１およびＴｈ２応答ならびにＣＤ８＋Ｔ細胞応答を、ベースライン時におよび用量１の１５日後に参加者のサブセットで特徴付けた。コホート１ａでは、ＬＤレシピエントおよびＨＤレシピエントのそれぞれ７６％（９５％ＣＩ：６５；８６）および８３％（７３；９１）、ならびにコホート３では、それぞれ６０％（４６；７４）および６７％（５３；７９）が、Ｓペプチドに対する検出可能なＴｈ１応答を示した。ＬＤレシピエントおよびＨＤレシピエントのＳペプチドに対するＣＤ４＋Ｔｈ１応答中央値は、コホート１ａでは、ベースライン時の検出不能から、ワクチン接種１５日後の０．０８％（Ｑ１；Ｑ３：０．０５；０．１６）および０．１１％（Ｑ１；Ｑ３：０．０７；０．１６）の中央値へとそれぞれ増加し、コホート３では、ベースライン時の検出不能から、０．０９％（Ｑ１；Ｑ３：０．０４；０．１７）および０．１１％（Ｑ１；Ｑ３：０．０４；０．１５）の中央値へとそれぞれ増加した（図１２４Ａ）。コホート１ａ（ＬＤレシピエント）の１人の参加者とコホート３（ＨＤレシピエント）の１人の参加者は、測定可能なＴｈ２応答を示したが（図１２４Ｂ）、測定可能なＴｈ１および／またはＴｈ２応答を示した参加者は全員、１を大きく上回るＴｈ１／Ｔｈ２比を示した。

【０８８５】

Ｓペプチド刺激によるＩＦＮ－γおよび／またはＩＬ－２サイトカインの発現により特定されるＳ特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞応答（図１２４Ｃ）は、両コホートともベースライン時には存在しなかった。ワクチン接種後１５日目に、コホート１ａ参加者の５１％（９５％ＣＩ：３９；６３）および６４％（９５％ＣＩ：５２；７５）がＣＤ８＋Ｔ細胞応答を示し、Ｓ特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞応答の規模の中央値は、ＬＤ群およびＨＤ群でそれぞれ０．０７％（Ｑ１；Ｑ３：０．０３；０．１９）および０．０９％（Ｑ１；Ｑ３：０．０５；０．１９）であった。コホート３では、ＣＤ８＋Ｔ細胞応答はより低く、ＬＤ群およびＨＤ群では、応答者はそれぞれ３６％（９５％ＣＩ：２３；５１）および２４％（９５％ＣＩ：１３；３７）であり、規模の中央値はそれぞれ０．０６％（Ｑ１；Ｑ３：０．０２；０．１２）および０．０２％（Ｑ１；Ｑ３：０．０１；０．０８）であった。ＣＤ４＋Ｔｈ１細胞応答とＣＤ８＋Ｔ細胞応答との相関性は、両コホートとも乏しかった（図１２２Ｂ）。

【０８８６】

結論

この第１／２ａ相試験の中間解析は、ワクチン候補Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓが、許容される安全性および反応原性プロファイルを示し、５×１０^{10}ｖｐ用量または１×１０^{11}ｖｐ用量のいずれかでの単回ワクチン接種後に免疫原性であることを示している。用量１後、Ｃｏｖｉｄ－１９ワクチンの有効性が期待される標的集団では、ワクチン用量レベルが高くなると共に、ソリサイティド全身性ＡＥの発生率が高くなる傾向があり、年齢が上がると共に等級３のＡＥが減少する明らかな傾向があった。免疫化当日または翌日に局所反応および全身反応が生じ、概して２４時間以内に解消された。全身反応は解熱剤に非常に応答性であり、予防的使用の必要はなかった。１８～５５歳での２回目の用量後、等級３のソリサイティド全身性ＡＥの発症率は、低ワクチン用量および高ワクチン用量の両方とも最初の免疫化後よりも非常に低く、２回目の用量が反応原性の増加に関連付けられると考えられるというｍＲＮＡベースワクチンでの観察とは対照的である。

【０８８７】

現在開発中のすべての他のＣｏｖｉｄ－１９ワクチンは２用量を必要とするが、単一用

量のＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓは、年齢群およびワクチン用量に関わりなく、ワクチンレシピエントの大多数で強力な体液性応答を誘発し、９０％よりも多くの参加者がＳ結合性抗体および中和抗体を有していた。加えて、現在利用可能な用量１後７１日間の追跡観察期間にわたって、抗体価はさらに増加し、安定していた。これは、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ誘発性免疫応答が耐久性であることを示唆している。

【０８８８】

有効な単一用量Ｃｏｖｉｄ－１９ワクチンは、特にパンデミック状況で使用する場合、２用量ワクチンよりも物流面で明らかな利点を有する。ここでは、１８～５５歳成人に２回目のワクチン用量を５７日目に投与すると、抗体価がさらに増加することが観察された。この場合もＮＨＰにおける最近の観察と一致する。初回ワクチン接種により誘発されたＡｄ２６ベクターに対する中和抗体価は、用量２後の応答の規模と相関しなかった。ヒトにおいて有効性および／または耐久性のいずれかを向上させるために２回目の用量が必要とされることになるか否かは、現在、第３相臨床試験で研究中である。

【０８８９】

基準が欠如しており、異なるアッセイが使用されているため、開発中の様々なＣｏｖｉｄ－１９ワクチンの性能を比較することは困難である。加えて、ＨＣＳパネルとの比較は、パネルが異なるＧＭＴを有し、それはパネルの構成（つまり、ドナーのＣｏｖｉｄ－１９重症度、疾患発症してからの試料採取するまでの時間など）に関連している可能性が高いため、かなり恣意的である。

【０８９０】

ワクチン関連増強呼吸器疾患（ＶＡＥＲＤ）の理論的リスクは、不良な中和体液性免疫およびＴｈ２偏向細胞性免疫応答に関連付けられている。ここでは、すべてのＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ誘発性ＣＤ４＋Ｔ細胞応答は、Ｔｈ１偏向性であり、Ａｄ２６ベースワクチンプラットフォームでの以前の経験と一致していた。高齢成人ではより低いものの付随する一貫したＣＤ８＋Ｔ細胞応答、および強力な体液性応答により、ＶＡＥＲＤの理論的リスクがさらに最小限に抑えられる。

【０８９１】

結論として、本発明者らの中間解析は、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓが安全であり、耐容性が良好で有り、免疫原性があることを示している。２つの進行中の第３相試験では、５×10^{10}ｖｐ　Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの単一用量または２用量レジメンのいずれかの有効性が評価中である。

【０８９２】

[実施例２８]

Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの生産性

Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ（Ａｄ２６ＮＣＯＶ０３０、Ａｄ２６ＣＯＶＳ１とも呼ばれる）の生産性は、１ｍＬ当たりのウイルス粒子の力価（ＶＰ／ｍＬ）で規定され、様々な下流プロセスステップに十分な材料を提供するためのバイオリアクターでのベクター生産の大規模化にとって重要である。したがって、ワクチン候補ベクターを、１０Ｌプロセス強化（ＰＩＮ）バイオリアクタープロセスでの性能が既知である対応するベンチマーク対照と比較することにより、生産性を小規模実験で評価した。

【０８９３】

Ａｄ２６ＮＣＯＶ０３０ワクチン候補の生産性を、Ａｄ２６ＮＣＯＶ０２８と共に１つの実験で試験した。その理由は、こうした２つの構築物は両方とも、初期には、リード候補を選択するために考慮されていたためである。手短に言えば、ｓＰＥＲ．Ｃ６およびｓＰＥＲ．Ｃ６　ＴｅｔＲ細胞に、７０および３００ＶＰ／細胞の精製Ａｄ２６ＮＣＯＶ０３０材料およびＡｄ２６ＮＣＯＶ０２８材料、ならびに２つのＡｄ２６ベンチマーク対照であるＡｄ２６．ＺＥＢＯＶベクターおよび２６ＺＩＫ００１ベクター（それぞれ標準対照および低対照）を形質導入した。

【０８９４】

感染後０、１、２、３、および４日目に試料を採取し、ウイルス粒子－定量的ポリメラ

ーゼ連鎖反応（ＶＰ－ｑＰＣＲ）によりＡｄ２６ベクター力価を決定した。図１２５Ａに示されているように、ｓＰＥＲ．Ｃ６細胞におけるＡｄ２６ＮＣＯＶ０３０の生産性は、低対照および標準対照との間であり、低対照と同様であったＡｄ２６ＮＣＯＶ０２８よりも高かった。ｓＰＥＲ．Ｃ６　ＴｅｔＲ細胞における生産性（図１２５Ｂ）は、Ａｄ２６ＮＣＯＶ０３０およびＡｄ２６ＮＣＯＶ０２８の両方で最大であった（両方とも標準対照と同様であった）。小規模生産性評価の結果は、ＰＥＲ．Ｃ６およびｓＰＥＲ．Ｃ６　ＴｅｔＲ細胞を使用した２Ｌバイオリアクター運転により強化された（下記の表）。こうしたデータは、Ａｄ２６ＮＣＯＶ０２８およびＡｄ２６ＮＣＯＶ０３０は両方とも、２ＬＰＩＮプラットフォームにおけるＰＥＲ．Ｃ６　ＴｅｔＲ細胞では生産性が高いこと、およびＰＥＲ．Ｃ６細胞でのＡｄ２６ＮＣＯＶ０２８およびＡｄ２６ＮＣＯＶ０３０の生産性は、それぞれ平均よりも低くおよび平均的であることを示した。

【０８９５】

【表１１】

表(Ad26NCOV030)およびAd26NCOV028 2Lバイオリアクターラン。

ベクター	細胞系	VP力価 (VP/mL, VP-qPCR)	
		2日目pi	3日目pi
Ad26NCOV028	PER.C6 TetR	1.78E12	5.70E12
JNJ-78436735	PER.C6 TetR	3.10E12	6.14E12
Ad26NCOV028	PER.C6	1.14E11	5.57E10
JNJ-78436735	PER.C6	6.24E11	1.15E12

VP、ウイルス粒子; qPCR、定量的ポリメラーゼ連鎖反応; TetR、テトラサイクリンリプレッサー;

【０８９６】

[実施例２９]

Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ誘発性免疫は、６１４ＧスパイクバリアントＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染に対してシリアンハムスターを保護し、最適未満のワクチン投薬後にブレークスルー感染を起こした負荷動物の呼吸器疾患を増強させない。

この実施例には、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの免疫原性を確認し、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の６１４ＧスパイクバリアントＢｅｔａＣｏＶ／Ｍｕｎｉｃｈ／ＢａｖＰａｔ１／２０２０）による鼻腔内感染に対する保護有効性を確立するために使用した代替ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ハムスター感染モデルが記載されている。ワクチン未接種動物では、このウイルスによる感染は、上気道および下気道の感染をもたらし、組織病理学的所見に基づき軽症～中等症疾患に結び付いた。Ａｄ２６．ＣＯＶＳ．２は、単一用量後に結合性および中和抗体を誘発し、誘発は、４週間の間隔をおいてワクチンの２回目の用量を行うとさらに増加させることができた。Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓは、評価した２つの他のＡｄ２６ベースＣＯＶＩＤ－１９プロトタイプワクチンと比較して、最も高いレベルの抗体および保護を誘発した。最適未満の用量のＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓは、体液性応答を誘発し、この体液性応答は、呼吸器ウイルス複製のモニタリングおよび詳細な病理組織学的分析により評価して、負荷後の肺をウイルス複製に対して保護しなかったが、ＶＡＥＲＤの証拠は明らかでなかった。

【０８９７】

材料および方法

ワクチン

Ａｄ２６ベースワクチンを、本明細書に記載の通りに生成した。手短に言えば、Ａｄ２６ベースワクチンは、融合前安定化ＳＡＲＳ－ＣＯＶ－２スパイクタンパク質配列（Ｗｕ

ｈａｎ　Ｈｕ１；　ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＭＮ９０８９４７）をコードする複製不全アデノウイルス血清型２６（Ａｄ２６）ベクターに基づいている。複製不全Ｅ１／Ｅ３欠失型Ａｄ２６－ベクターを、ＡｄＶａｃ系（Abbink et al., J. Virol. 81, 4654-4663 (2007)）を使用し、導入遺伝子発現カセットを含むＡｄ２６ベクターゲノムを含む単一プラスミド技術を使用して遺伝子操作した。コドン最適化融合前安定化ＳＡＲＳ－ＣＯＶ－２スパイクタンパク質コード遺伝子を、Ａｄ２６ベクターゲノムのＥ１位置に挿入した。Ａｄ２６ベクターの製造は、相補性細胞系ＰＥＲ．Ｃ６　ＴｅｔＲで実施した（Wunderlich et al., Potent and short promoter for expression of heterologous genes. (2018)）（Zahn et al., PLoS One 7, 1-13 (2012)）。陰性対照ベクターＡｄ２６．Ｉｒｒ（ＲＳＶ－ＦＡ２－２Ａ－ＧＬｕｃ）は、ガウシアホタルルシフェラーゼに融合されたＲＳＶ　Ｆタンパク質を、２Ａペプチド配列で隔てられた単一導入遺伝子としてコードし、それにより個々のタンパク質が両方とも発現される。ベクターの製造は、ＰＥＲ．Ｃ６で実施した。使用前に、アデノウイルスベクターのバイオバーデンおよびエンドトキシンレベルを試験した。

【０８９８】

研究設計動物実験

ハムスター研究

動物実験は、Ｃｅｎｔｒａｌ　Ａｕｔｈｏｒｉｔｙ　ｆｏｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｐｒｏｃｅｄｕｒｅｓ　ｏｎ　Ａｎｉｍａｌｓ（Ｃｅｎｔｒａｌｅ　Ｃｏｍｍｉｓｓｉｅ　Ｄｉｅｒｐｒｏｅｖｅｎ）による承認を受け、欧州指針（動物試験に関するＥＵ指令８６／６０９／ＥＥＣ）および動物実験に関するオランダ法に準拠して実施した。生存中の段階は、Ｖｉｒｏｃｌｉｎｉｃｓ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　ＢＶで行われた。データ解釈が必要であった臨床観察および検査室分析の実施に関与するすべてのウイルス臨床職員は、研究の完了前のいかなる時点でも処置割り当てキーを認識しておらず、収集された各試料および分析に固有の試料番号を割り当てることによって盲検化されていた。

【０８９９】

研究開始時に９～１１週齢であった雄シリアン（ゴールデン）ハムスター（Ｍｅｓｏｃｒｉｃｅｔｕｓ　ａｕｒａｔｕｓ）系統ＨｓｄＨａｎ：ＡＵＲＡを、Ｅｎｖｉｇｏ＋＋＋から購入した。ハムスターを、イソフルラン麻酔下で筋肉内経路により１００μｌのワクチン（１後肢当たり５０μｌ）で免疫化した。ハムスターに、10^2ＴＣＩＤ$_{50}$のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（Ｓ１断片にＤ６１４Ｇ置換を含むＢｅｔａＣｏＶ／Ｍｕｎｉｃｈ／ＢａｖＰａｔ１／２０２０）を含む１００μｌを鼻腔内接種した。負荷株の配列は特徴付けられており、親株と一致していることが示されている。感染当日、接種前、および感染４日後まで毎日、イソフルラン麻酔下で喉スワブを収集した。喉スワブをウイルス輸送培地に収集し、アリコートし、分析時まで保管した。中間血液試料を、イソフルラン麻酔下で後眼窩出血経路から収集した。血清単離のために血液を処理した。実験の終了時に、動物を麻酔下で頸椎脱臼により　殺し、剖検を実施した。剖検後に収集した呼吸器組織を、ウイルス量および組織病理学的変化について分析した。

【０９００】

ウサギ研究

ウサギの実験は、地域動物福祉団体による承認を受け、欧州指針（科学目的で使用される動物の保護に関するＥＵ指令２０１０／６３／ＥＵ）および動物実験に関するベルギー法に準拠して実施した。生存中の段階は、ＡＡＡＬＡＣの承認を受けた研究所であるＪａｎｓｓｅｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　ａｎｄ　Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔのｎｏｎ－ｃｌｉｎｉｃａｌ　ｓａｆｅｔｙ　Ｂｅｅｒｓｅ施設で行われた。研究開始時におよそ４か月齢であった雌ニュージーランドホワイトウサギを、フランスのＣｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓから購入した。ウサギを、０．５ｍＬの体積の5×10^9ｖｐまたは5×10^{10}ｖｐのＡｄ２６．Ｓ、Ａｄ２６．ｄＴＭ．ＰＰ、またはＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓで、研究の０週目および８週目に筋肉内経路により免疫化した。対照群として、５匹のウサギを生理食塩水で免疫化した。血清処理のための中間血液試料を、側耳から収

集した。実験の終了時に、ペントバルビタールナトリウムを静脈内注射し、続いて大腿動脈から放血することにより動物を　　殺した。

【０９０１】

病理組織学的特徴

組織病理学的特徴は、Ｖｉｒｏｃｌｉｎｉｃｓ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　ＢＶの病理学者およびＪａｎｓｓｅｎ　Ｎｏｎ－Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｓａｆｅｔｙ（ベーアセ、ベルギー）の病理学者により評価された。

【０９０２】

感染４日目後に、胸腔および腹腔を開腔し、すべての主要臓器を調べることにより、すべての動物を剖検した。肺硬化の程度を、罹患肺組織のパーセンテージの視覚的推定に基づいて評価した。左鼻甲介、気管、および左肺を、組織病理学的検査およびＩＨＣによる分析のために収集した。組織はすべて、１０％中性緩衝ホルマリンを穏やかに注入および／または浸漬して固定した。組織病理学的評価のために、肺および気管を規定通りに処理し、パラフィンワックスに包埋し、ガラススライド上で３μｍに薄切片化し、ヘマトキシリンおよびエオシン（Ｈ＆Ｅ）で染色した。試料採取し固定した鼻甲介を脱灰後に処理し、パラフィンブロックに包埋し、同様に切断および染色した。Ｈ＆Ｅ染色した組織切片を、Ｚｅｉｓｓ　ＡｘｉｏｐｌａｎまたはＬｅｉｃａ　ＤＭ２５００光学顕微鏡を使用して光学顕微鏡法により、２５倍、１００倍、２００倍、および４００倍の倍率ステップで、組織病理学的をスコア化し、ならびに任意の他の病変の存在について検査した。鼻甲介および気管における炎症細胞浸潤の重症度を、鼻炎および気管炎についてスコア化した：０＝炎症細胞無し、１＝少数の炎症細胞、２＝中程度数の炎症細胞、３＝多数の炎症細胞。

【０９０３】

肺組織については、各スライドの全体を検査し、肺胞浮腫、肺胞出血、およびＩＩ型肺細胞過形成の存在または非存在をスコア化した（０＝無し、１＝有り）。肺胞、気管支／細気管支における炎症細胞浸潤および損傷の重症度を、肺胞炎および気管支炎／細気管支炎についてスコア化した：０＝炎症細胞なし、１＝少数の炎症細胞、２＝中程度数の炎症細胞、３＝多数の炎症細胞。気管支周囲／血管周囲細胞浸潤の程度：０＝無し、１＝厚さが１～２個細胞、２＝厚さが３～１０個細胞、３＝厚さが１０個よりも多くの細胞。加えて、肺胞炎／肺胞損傷の程度を、スライド毎にスコア化した：０＝０％、１＝＜２５％、２＝２５～５０％、３＝＞５０％。

【０９０４】

肺組織の炎症の程度および重症度の累積スコア（合計）は、考え得る最大のスコアが２４である合計下気道（ＬＲＴ）スコアを提供した。下気道疾患パラメーターの合計には、以下の組織病理学的パラメーターが含まれていた：肺胞炎、肺胞損傷、肺胞浮腫、肺胞出血、ＩＩ型肺細胞過形成、気管支炎、細気管支炎、気管支周囲および血管周囲細胞浸潤。

【０９０５】

免疫組織化学

肺、鼻、および気管の組織試料は、Ｖｉｒｏｃｌｉｎｉｃｓ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｂ．Ｖ．により試料採取され、１０％ホルマリン（肺注入）で１４日間固定され、パラフィン包埋された。Ｊａｎｓｓｅｎ　Ｎｏｎ－ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｓａｆｅｔｙ（ベーアセ、ベルギー）の病理学者が組織ブロックが準備および評価された。

【０９０６】

すべての動物の肺切片、気管切片、および鼻切片のパラフィン切片を、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＮＰに対して交差反応性を有するウサギポリクローナル抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶヌクレオカプシドタンパク質抗体（ＮＰ、Ｎｏｖｕｓ　ＮＢ１００－５６５７６、１／３００）を使用して自動染色した（Ｖｅｎｔａｎａ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｕｌｔｒａ、Ｒｏｃｈｅ、フランス）。こうした切片を、免疫反応性細胞の数について半定量的にスコア化し、０：陽性免疫反応性細胞無し、１：最小（少数／単巣）数の陽性細胞、２：中程度（単巣／多巣）数の陽性細胞、および３：多／高（広範囲の単巣／多巣）数の免疫反応性細胞と等級付けした。

【０９０７】
ウイルス中和アッセイ
生ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対する中和アッセイは、ＡｌｇａｉｓｓｉおよびＨａｓｈｅｍ（Algaissi & Hashem, Evaluation of MERS-CoV Neutralizing Antibodies in Sera Using Live Virus Microneutralization Assay in 107-116 (2020). doi:10.1007/978-1-0716-0211-9_9）により以前に記載されているマイクロ中和アッセイを使用して実施した。ベロＥ６細胞［ＣＲＬ－１５８０、アメリカ培養細胞系統保存機関（ＡＴＣＣ）］を、８％ウシ胎児血清（ＦＣＳ；Ｂｏｄｉｎｃｏ　ＢＶ）、１％ペニシリン－ストレプトマイシン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｐ４４５８）、および２ｍＭ　Ｌ－グルタミン（ＰＡＡ）を補充したイーグル最小必須培地（ＥＭＥＭ；Ｌｏｎｚａ）で増殖させた。細胞を、５％ＣＯ２を含む加湿雰囲気にて３７℃に維持した。臨床単離株ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２／ｈｕｍａｎ／ＮＬＤ／Ｌｅｉｄｅｎ－０００８／２０２０（Ｌｅｉｄｅｎ　Ｌ－０００８）を鼻咽頭試料から単離した。その特徴付けは他所に記載されることになる（原稿準備中）。このウイルス単離株の次世代配列決定に由来する配列は、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＭＴ７０５２０６で入手可能であり、Ｌｅｉｄｅｎ－０００８ウイルスには武漢配列と比較して１つの突然変異があることが示されており、スパイクタンパク質の６１４位にＡｓｐ＞Ｇｌｙ（Ｄ６１４Ｇ）がもたらされている。ＴＣＩＤ５０エンドポイント希釈法を使用して、単離株Ｌｅｉｄｅｎ－０００８をベロＥ６細胞で増殖および滴定した。ＴＣＩＤ$_{50}$を、記載の通りに（Hierholzer & Killington, Virology Methods Manual - Virus isolation and quantitation (1996).doi:10.1016/B978-0-12-465330-6.X5000-3）Ｓｐｅａｒｍａｎ－Ｋａｒｂｅｒアルゴリズムで算出した。生ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２による研究はすべて、ライデン大学医療センターのバイオセーフティレベル３の施設で実施した。

【０９０８】
ベロＥ６細胞を、感染１日前に９６ウェル組織培養プレートに１２，０００細胞／ウェルで播種した。熱不活化（５６℃で３０分）血清試料を２連で分析した。血清のパネルを、ペニシリン、ストレプトマイシン、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン、および２％ＦＣＳを補充した６０μＬ　ＥＭＥＭ培地にて２連で１：１０の初期希釈および１：１２８０の最終希釈に２倍系列希釈した。希釈した血清を等体積の１２０ＴＣＩＤ$_{50}$／６０μＬ　Ｌｅｉｄｅｎ－０００１ウイルスと混合し、３７℃で１時間インキュベートした。次いで、ウイルス－血清混合物を、ベロＥ６細胞単層に添加し、５％ＣＯ２の加湿雰囲気にて３７℃でインキュベートした。ウイルス未曝露であるかまたは１２０ＴＣＩＤ$_{50}$／６０μＬのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２と混合したかのいずれかの細胞を、それぞれ陰性（未感染）対照および陽性（感染）対照として使用した。感染３日後に、細胞を固定し、４０μＬの３７％ホルムアルデヒド／ＰＢＳ溶液／ウェルで一晩４℃にて不活化した。固定液を細胞から除去し、クラスターを、５０μＬ／ウェルのクリスタルバイオレット溶液で染色し、１０分間インキュベートし、水ですいだ。乾燥したプレートを、ウイルス細胞変性効果について評価した。ウイルス誘導性細胞変性効果が完全に阻害された陽性ウェルの個数を複製の個数で除算し、算出された比率を安定させるために２．５を加えることにより中和力価を算出した。中和抗体価を、この値のｌｏｇ２逆数として規定した。使用した接種材料の用量が３０～３００ＴＣＩＤ$_{50}$の許容範囲内であることを確認するために、各アッセイ実行にはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２逆滴定が含まれていた。

【０９０９】
ＥＬＩＳＡ
ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク抗原に対するＩｇＧ結合を、完全長組織内産生スパイクタンパク質ＣＯＲ２００９９（ハムスター研究）またはＣＯＲ２００１５３（ウサギ研究）を用いたＥＬＩＳＡにより測定した。ＣＯＲ２００９９は、組織内産生ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質であり、フューリン切断部位をノックアウトするＳ１／Ｓ２接合部の２つの点突然変異により、およびＳ２のヒンジ領域に新たに導入された２つのプロリンにより安定化されている。加えて、膜貫通領域および細胞質領域は、三量体化突

然変異のためにフォールドンドメインに置き換えられており、タンパク質が可溶性タンパク質として産生されることが可能にされている。ＣＯＲ２００１５３は、Ｗｕｈａｎ－Ｈｕ－１　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２株（ＭＮ９０８９４７）に基づく組織内産生ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質であり、フューリン切断部位をノックアウトするＳ１／Ｓ２接合部の２つの点突然変異（Ｒ６８２Ａ、Ｒ６８５Ｇ）により、ならびにＳ２のヒンジ領域の２つの連続したプロリン（Ｋ９８６Ｐ、Ｖ９８７Ｐ）およびＡ９４２Ｐにより安定化されている。加えて、膜貫通領域および細胞質領域は、三量体化のためにフィブリチンフォールドンドメインに置き換えられている。タンパク質は、ソルターゼＡ反応によりＣ末端がビオチン化されている。

【０９１０】

ハムスターの場合、９６ウェルＰｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ白色１／２面積プレート（1/2 area plate）をタンパク質で一晩コーティングした。ウサギの場合、コーティングのためにプレートを３７℃で２時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを洗浄し、１時間ブロッキングし、その後ブロッキング緩衝液で３倍系列希釈した２連の血清試料と共に１時間インキュベートした。洗浄後、プレートを、ブロッキング緩衝液中で、ウサギ抗ハムスターＩｇＧ　ＨＲＰ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号Ａ１８８９５）または抗ウサギＩｇＧ－ＨＲＰ（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）と共に１時間インキュベートし、再度洗浄し、ＥＣＬ基質を使用して発色した。発光読み取りは、ＢｉｏＴｅｋ　Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｎｅｏ装置（ハムスター試料）またはＥｎｖｉｓｉｏｎ　Ｍｕｌｔｉｍｏｄｅプレートリーダー（ウサギ試料）を使用して実施した。ハムスター抗体価は、Ｌｏｇ１０エンドポイントとして報告されており、ウサギ力価は、参照標準物と比較したＬｏｇ１０相対効力として報告されている。

【０９１１】

統計分析

ＥＬＩＳＡで測定したＳ特異的結合性抗体、ウイルス中和アッセイ（ＶＮＡ）で測定した中和力価、ＴＣＩＤ$_{50}$により測定したウイルス量、病理組織学およびＩＨＣスコアの、免疫化レジメン間の用量レベルの統計的差異を両側で評価した。Ａｄ２６．Ｓ群、Ａｄ２６．ｄＴＭ．ＰＰ群、およびＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ群間の用量レベル間比較は、ワクチンおよび用量をＬＬＯＤもしくはＬＬＯＱで打ち切りしない測定の因子としたＡＮＯＶＡのｔ検定、最大５０％で打ち切りしたＴｏｂｉｔ　ＡＮＯＶＡのｚ検定、または少なくとも５０％で打ち切りしたＣｏｃｈｒａｎ－Ｍａｎｔｅｌ－Ｈａｅｎｓｚｅｌ検定を使用して行った。多重比較のために結果を３倍ボンフェローニ補正で補正した。無関連抗原、Ａｄ２６．空、およびＡｄ２６．Ｉｒｒで免疫化したＡｄ２６．Ｓ群、Ａｄ２６．ｄＴＭ．ＰＰ群、およびＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ群の用量レベル毎および用量レベル間の探索的比較は、上記の方法またはマン－ホイットニーＵ検定を使用して行った。こうした分析は性質が探索的であるため、多重比較のために結果を補正しなかった。

【０９１２】

統計分析は、ＳＡＳバージョン９．４（ＳＡＳ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　Ｉｎｃ．カリー、ノースカロライナ州、米国）およびＲバージョン３．６．１（２０１９－０７－０５）を使用して実施した。統計検定は、α＝０．０５の全体有意レベルにて両側で実施した。

【０９１３】

相関分析

ハムスターを、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に感染したかまたは保護されたかのいずれかに分類し、感染および保護は、それぞれ１０２ＴＣＩＤ$_{50}$／ｇを上回るかまたは下回る肺ウイルス量と規定した。異なるレジメンおよび用量レベルのＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓからプールした結合性および中和抗体のデータから、保護結果を従属変数とし、接種前のｗｔＶＮＡおよびＬｏｇ１０変換ＥＬＩＳＡデータを独立変数とした、Ｆｉｒｔｈ補正付のロジスティック回帰モデルを構築した。

【０９１４】

結果

代替ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シリアンハムスター負荷モデルの確立。

ハムスターにおけるワクチン免疫原性、有効性、およびＶＡＥＲＤを評価するために、本発明者らは、主にスパイクタンパク質にＤ６１４Ｇ置換を有するＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２株に基づく代替シリアンハムスター負荷モデルを確立した。雄動物（１接種用量レベル当たりｎ＝１２）に、用量レベル10^{2}、$10^{3\cdot3}$、$10^{4\cdot6}$、および$10^{5\cdot9}$の５０％組織培養感染用量（$TCID_{50}$）のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＢｅｔａＣｏＶ／Ｍｕｎｉｃｈ／ＢａｖＰａｔ１／２０２０（Ｓ１断片にＤ６１４Ｇ置換を含む）を鼻腔内経路による投与で接種した。喉スワブを１日１回採取し、接種の２、３、４、および７日後（ｄｐｉ）に剖検を実施し（各時点でｎ＝３）、喉スワブ、肺および鼻組織のウイルス量をモニターして、気道病理を研究した。図１２６Ａおよび１２６Ｂに示されているように、肺および鼻組織ウイルス量評価は、接種材料のサイズに関わりなく、２ｄｐｉに、接種したすべての動物で$TCID_{50}$により測定して、複製可能なウイルスの力価が高いことを明らかにした。２ｄｐｉ後に観察された肺および鼻ウイルス量動力学は、試験したすべての接種量で同等であった。$10^{3\cdot3}$、$10^{4\cdot6}$、および$10^{5\cdot9}$$TCID_{50}$を接種したハムスターは、１ｄｐｉに喉スワブで最も高いウイルス量を示し（図１２６Ｃ）、その後ウイルス量は、接種の最大で５日後（ｄｐｉ）までに検出限界未満に減少した。対照的に、最も低いＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２用量である$10^{2}$$TCID_{50}$を接種すると、１ｄｐｉから２ｄｐｉにかけて感染性ウイルス量の増加がもたらされ、これは肺複製を示唆し、その後ウイルス量は、接種の４日後までに検出限界未満に減少した。

【０９１５】

$10^{2}$$TCID_{50}$を負荷した後の組織学的分析は、免疫組織化学により重症炎症領域にＳＡＲＳヌクレオカプシドタンパク質抗原（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＮＰ）が豊富に存在することを示し、これは、上気道上皮細胞および下気道上皮細胞の多巣性の中等症～重症変性および壊死により特徴付けられる（データ非表示）。より高い負荷用量と比較して、$10^{2}$$TCID_{50}$は、盲検半定量スコア化により決定したところ、気道全体に同等の範囲および重症度の炎症および損傷を誘導し（図１２６Ｄおよび１２６Ｅ）、より低い用量レベルでは肺組織病理学スコアはわずかにより低かった。まとめると、こうした結果は、低用量負荷接種材料が、より高いウイルス用量負荷と比較して、同等のウイルス量および疾患病理を誘導したことを示している。その後の実験には、本発明者らは、組織病理学的所見に基づき軽症～中等症疾患に関連付けられる$10^{2}$$TCID_{50}$負荷用量を選択したため、より重症疾患の発生をこのモデルにおいて検出し、ＶＡＥＲＤの理論的リスクに対処することができた。肺組織ウイルス量および組織病理学特徴を同時に評価するための最も最適な時点として、負荷後４日間の追跡観察期間を選択した。

【０９１６】

シリアンハムスターにおけるＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ａの免疫原性。

本発明者らのＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチン候補の免疫原性および保護有効性を、上記に記載の新たに確立された負荷モデルで評価した。比較のために、膜結合完全長野生型スパイクタンパク質（Ａｄ２６．Ｓ）または膜貫通ドメインがＣ末端フォールドンに置き換えられた可溶性融合前安定化スパイクタンパク質（Ａｄ２６．ｄＴＭ．ＰＰ）を発現する２つのプロトタイプＡｄ２６ベースワクチンを使用した。ハムスターを、10^{9}または10^{10}ウイルス粒子（ＶＰ）のＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓおよび２つのプロトタイプワクチンで免疫化した。各用量レベル毎に、免疫原性を、単一用量後および４週目に投与した２回目の同種用量後の種々の時点で評価した。最後のワクチン用量の４週間後に動物に負荷した（図１２７Ａ）。４週目に、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓは、Ａｄ２６．Ｓ（力価中央値10^{9}ＶＰ　８．５、10^{10}ＶＰ　９．７；８／１２匹応答動物、ｐ＜０．００１）およびＡｄ２６．ｄＴＭ．ＰＰ（力価中央値10^{9}ＶＰ　８．５、10^{10}ＶＰ　１６．０；８／１２匹応答動物、ｐ＜０．００１）と比較して、用量レベル全体にわたって最も高い中和抗体価および応答動物頻度を誘発した（力価中央値10^{9}ＶＰ　２２．６、10^{10}ＶＰ　３８．６、１２／１２匹応答動物）（図１２７Ｂ）。使用したワクチンに関わりなく、２回目の用量は、中和力価を増加させた（８週目；図１２７Ｃ）。Ａｄ２６．Ｃ

ＯＶ２．Ｓワクチンは、２用量後も免疫原性が最も高く、中和力価中央値は、10^9ＶＰの２用量後で１２８、10^{10}ＶＰの２用量後で２１９であり、それと比較してＡｄ２６．Ｓではそれぞれ３２および５５（ｐ＝０．００３）であり、Ａ２６．ｄＴＭ．ＰＰでは１６および６１（ｐ＝０．００２）であった。

【０９１７】

ＥＬＩＳＡにより測定した結合性抗体は、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓと２つのプロトタイプワクチンとの間で同じ差異を示した（図１２８Ａ）。これは、結合性抗体に対する中和抗体力価比が同等であることを反映するものである（図１２８Ｂおよび１２８Ｃ）。しかしながら、４週目の２回目の用量は、５週目の結合性抗体価中央値を一過性に増加させたに過ぎなかった（図１２８Ａ）。その後抗体価は減少し、８週目には、４週目の用量２の前に観察されたレベルと同等であったか、またはそれよりも低かった。

【０９１８】

本発明者らは、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓおよび２つのプロトタイプワクチンの免疫原性、ならびに臨床研究でも評価されている間隔である８週間間隔を使用した２用量レジメンでのウサギにおける２回目の用量の利点を確認した。５×10^9ＶＰおよび５×10^{10}ＶＰの用量レベルでワクチンを試験し、後者は、第３相臨床試験で使用したヒト用量である。試験したすべてのワクチンは、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの１回目の用量の２週間後という早期に結合性および中和抗体価を誘発し、この場合も、Ａｄ２６．ＳおよびＡｄ２６．ｄＴＭ．ＰＰの両方と比較してより高い抗体価を誘導した（付録の図１２９Ａおよび１２９Ｂ）。８週目の２回目の同種用量は、結合性および中和抗体価を、１０週目（２回目の用量の２週間後）に、２回目の用量前のレベルと用量にわたって比較して有意にブーストした（ｐ＜０．００１）。

【０９１９】

シリアンハムスターにおけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷に対するＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの保護有効性。

次に、本発明者らは、１用量または２用量レジメンとして投与し、続いて、１用量レジメンでは４週目であり２用量レジメンでは８週目である最終用量の４週間後に10^2ＴＣＩＤ$_{50}$のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｄ６１４Ｇウイルスを鼻腔内接種した場合のＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓおよび２つのプロトタイプワクチンの保護有効性をシリアンハムスターにおいて研究した。４ｄｐｉに動物を　　殺し、肺、鼻甲介、および喉スワブをウイルス量および病理学的変化について分析した。統計分析の能力を増加させるため、および本発明者らは、ウイルス学的読取り値に対して顕著な用量応答性を観察しなかったため、Ａｄ２６．空対照群と比較するためにウイルス量読取り値をプールした。３つの異なるワクチン（Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ、Ａｄ２６．Ｓ、Ａｄ２６．ｄＴＭ．ＰＰ）間の比較を、用量レベルにわたって実施した。

【０９２０】

単回ワクチン接種およびその後の負荷後、すべてのワクチン群における肺ウイルス量中央値は、Ａｄ２６．空対照群と比較して有意により低かった（ウイルス量中央値$10^{7.3}$ＴＣＩＤ$_{50}$／ｇ）（図１３０Ａ）。単一用量のＡｄ２６．Ｓで免疫化した１２匹の動物中１１匹の肺で（ウイルス量中央値10^9ＶＰ　$10^{5.6}$ＴＣＩＤ$_{50}$／ｇ、10^{10}ＶＰ　10^5ＴＣＩＤ$_{50}$／ｇ）および単一用量のＡ２６．ｄＴＭ．ＰＰで免疫化した１２匹の動物中１０匹の肺で（ウイルス量中央値10^9ＶＰ　$10^{5.3}$ＴＣＩＤ$_{50}$／ｇ、10^{10}ＶＰ　$10^{5.7}$ＴＣＩＤ$_{50}$／ｇ）ウイルスが検出されたが、ワクチン用量による明確な効果は観察されなかった。対照的に、単一用量のＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓで免疫化した１２匹の動物中３匹のみが、検出可能なウイルスを肺に有していた（プールした用量レベルの力価中央値$10^{1.2}$ＴＣＩＤ$_{50}$／ｇ）。２回目の用量のＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓをワクチン接種したハムスターのうち、１２匹の動物中９匹が、両ワクチン用量レベルでは検出可能なウイルス量を有しておらず、２回目の用量の付加価値はないことが示唆された。また、ブレークスルー感染を起こした動物のウイルス量は、１回のワクチン接種後にブレークスルー感染を起こした動物のウイルス量と同様であった。また、10^9

ＶＰのＡｄ２６．ＳまたはＡｄ２６．ｄＴＭ．ＰＰの２回目の用量は、８週目の負荷後の肺感染率にほとんど影響を及ぼさなかったが（６匹の動物中５匹が、ワクチン毎に検出可能なウイルス量を示した）、こうしたプロトタイプワクチンの10^{10}ＶＰの２回目の用量は、１用量レジメンと比較して肺ウイルス量中央値がより低いことと関連付けられ（力価中央値はそれぞれ10^{2}ＴＣＩＤ$_{50}$／ｇおよび10^{4}ＴＣＩＤ$_{50}$／ｇ）、２用量レジメンの利益が示唆された（図１３０Ｂ）。

【０９２１】

上気道のウイルス量に対するワクチンの影響を決定するため、鼻甲介ウイルス量を、４ｄｐｉにて　殺した後で測定し、喉スワブウイルス量を感染後１日１回測定し、感染後４日目まで１動物当たりの曲線下面積（ＡＵＣ）として分析した。単一ワクチン用量を受け取った動物では、対照群と比較して、Ａｄ２６．ｄＴＭ．ＰＰでは負荷後の鼻甲介ウイルス量の限定的だが統計的に有意な低減が観察されたが、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．ＳおよびＡｄ２６．Ｓでは観察されなかった。２ワクチン用量後では、３つのワクチンすべてが、Ａｄ２６．空群と比較して、負荷後の鼻甲介ウイルス量の有意な低減を誘導した。対照的に、喉スワブウイルス量データは、いずれのワクチンも、単回免疫化およびその後のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２接種後に咽頭におけるウイルス負荷を低減させず（図１３０Ｃおよび１３０Ｅ）、２用量のＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓで免疫化した動物のみが、対照と比較して咽頭ウイルス量を有意に低減させたことを示した（図１３０Ｅおよび１３０Ｆ）。

【０９２２】

観察された保護有効性結果は、肺組織および鼻組織におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＮＰの免疫組織化学的（ＩＨＣ）染色、および病理組織学によりさらに裏付けられている（図１３１および１３２）。肺および鼻のＩＨＣおよび病理組織学スコアは、全体的にウイルス量データと一致し、Ａｄ２６．空群と比較して免疫化群の肺ではスコア中央値がより低く（図１３１）、ワクチンレジメンに関わらず、Ａｄ２６．空対照群と比較して、ワクチン接種動物の鼻組織におけるウイルス感染の量およびその後の病理に低減はみられなかった（図１３２）。

【０９２３】

最適未満の用量レベルのＡ２６．ＣＯＶ２．Ｓで免疫化したシリアンハムスターは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２接種後のＶＡＥＲＤの兆候およびブレークスルー感染を示さない。

観察された免疫原性および有効性に基づき、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷後にブレークスルー感染を許す最適未満の免疫応答の条件下におけるＶＡＥＲＤの理論的リスクに対処するための用量滴定研究でさらに評価するためにＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓを選択した。ハムスターの群を、10^{7}、10^{8}、10^{9}、または10^{10}ＶＰのＡｄ２６．ＣＯＶ．Ｓの単一用量で免疫化した（４群；ｎ＝８／群）。対照群は、無関連抗原をコードする10^{10}ＶＰの対照ワクチン（Ａｄ２６．Ｉｒｒ）を受け取った。免疫化４週間後に、応答動物の数および抗体価の両方において、結合性および中和抗体の明確な用量応答が観察され、最も低い10^{7}ＶＰの用量レベルでは８匹の動物のうち３匹で中和抗体価は検出されなかった（図１３３および１３３Ｂ）。10^{9}ＶＰ用量および10^{10}ＶＰ用量では、結合性抗体レベルの中央値（エンドポイント力価中央値はそれぞれ$10^{3.7}$および$10^{3.9}$）および中和抗体応答の中央値（中和力価中央値はそれぞれ４５および９１）は、以前の研究の観察と一致していた。１０２ＴＣＩＤ$_{50}$のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２で負荷した後、10^{9}ＶＰおよび10^{10}ＶＰのＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓを投薬したハムスターは、以前の研究における同等の群と同様の頻度でブレークスルー肺感染を示し（図１３０Ａ）、用量滴定研究ではそれぞれ８匹の動物中３匹および８匹の動物中２匹で肺ウイルス量が検出可能であった。より低いＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ用量レベルでブレークスルー感染を起こした動物の数が増加したにも関わらず（10^{8}ＶＰを受け取った動物は８匹中６匹、10^{7}ＶＰを受け取った動物は８匹中８匹）、肺ウイルス量力価中央値（10^{8}ＶＰで中央値$10^{4.8}$ＴＣＩＤ５０／ｇ、10^{7}ＶＰで中央値10^{5}ＴＣＩＤ$_{50}$／ｇ）およびこうした群におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ＮＰのＩＨＣ染色（スコア中央値１）は、対照群よりも低かった（肺ウイルス量中央値$10^{6.8}$ＴＣＩＤ$_{50}$／ｇおよびＩＨＣ中央値スコ

ア２）（図１３３Ｃおよび１３３Ｄ）。肺ウイルス量およびＩＨＣ染色の結果と一致して、10^8ＶＰ、10^9ＶＰ、および10^{10}ＶＰでの免疫化は、モック免疫ハムスターと比較して、下気道における組織病理学的特徴を有意に低減させた（図１３４Ａ）。10^9ＶＰおよび10^{10}ＶＰでの免疫化は、それぞれハムスター８匹中４匹およびハムスター８匹中３匹において下気道組織病理学的特徴のあらゆる徴候の非存在をもたらした。特に、10^7ＶＰで投薬したすべてのハムスターにおいて、および10^8ＶＰで免疫化したほとんどのハムスターにおいて、検出可能なブレークスルー肺感染があったものの、下気道組織病理学スコアの中央値は、モック免疫群と比較してより低かった。鼻組織の炎症スコア（鼻炎）は、ワクチン接種群と対照群とで有意差を示さなかった（図１３４Ｂ）。まとめると、こうしたデータは、最適未満のＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチンにより誘発された低レベルの中和抗体の存在が、モックワクチンと比較して、負荷シリアンハムスターの肺疾患を悪化させないことを示している。

【０９２４】

結合性および中和抗体は保護と相関する。

保護の推定相関性を決定するため、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ（Ｎ＝５６）の異なるレジメンおよび用量レベルに由来する結合性および中和抗体価をプールし、保護動物と非保護動物との間で比較した（図１３５）。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染からの保護は、検出可能なウイルス量を有する動物はほんの少数がこの範囲を下回るという観察に基づき、10^2ＴＣＩＤ／ｇを下回る肺ウイルス量であることと規定し、この範囲は、１動物当たりの利用可能な試料量の変動性に関連する可能性が高かった（図１２９Ａおよび１２９Ｂならびに図１３３Ｃ）。Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓを投薬した保護動物は、非保護動物よりも有意に（２．３倍）高い結合性抗体価中央値を有していた（ｐ＜０．００１、２標本ｔ検定）（図１３５Ａ）。中和抗体価中央値の類似分析でも同様の結果が観察された。中和抗体価中央値は、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓで免疫化され、肺ウイルス量が検出不能であった動物でも、非保護動物と比較して有意に（４倍）増加した（ｐ＜０．００１、２標本ｔ検定）（図１３５Ｂ）。

【０９２５】

免疫応答レベルと保護結果との関係性のより定量的な理解を得るために、本発明者らは、Ｆｉｒｔｈ補正付ロジスティック回帰モデルを構築した（図１３５Ｃ）。ハムスターを、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に感染したかまたは保護されたかのいずれかに分類し、感染または保護は、肺ウイルス量がそれぞれ10^2ＴＣＩＤ$_{50}$／ｇを上回るかまたは下回るかのいずれかと規定した。結合性および中和抗体は両方とも、保護確率とロバストな相関性を示した。結合性抗体価は、保護確率と有意に相関し（ｐ＝０．０００４）、$10^{3.6}$を上回るエンドポイント力価は、肺感染からの保護と関連していると考えられた。同等の有意な傾き（ｐ＝０．０００２）が中和抗体価で観察され、３２を上回る力価は、保護結果と関連していると考えられた。

【０９２６】

結論

プロトタイプ初期ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２単離株を使用した以前の研究（実施例２１）では、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの単一用量により誘発された免疫応答が、ウイルス量を低減させ、ハムスターを重症臨床疾患から保護することできることが実証された。しかしながら、進行中のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２パンデミック中に、スパイクタンパク質にＤ６１４Ｇ置換を有するウイルスバリアントが出現した。この突然変異は、ウイルス適応度の増加、感染力の増強に関連付けられており、今や世界の大部分で優勢なバリアントになっているが、時間の経過と共に、絶えず出現する新しいバリアントに置き換えられる可能性がある。シリアンハムスターでは、Ｄ６１４Ｇバリアントは、上気道ではより高い感染性ウイルス力価と関連付けられたが、肺ではそうでないことが確認された。ここでは、本発明者らは、蔓延しているＤ６１４Ｇ置換を含むＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２株を使用して、軽症～中等症疾患の追加のハムスター負荷モデルの確立について記載する。本発明者らは、このモデルを使用して、ＣＯＶＩＤ－１９ワクチン候補Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓおよび異なるＳＡ

ＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクバリアントをコードする２つのＡｄ２６ベースプロトタイプワクチンにより誘発される免疫応答の保護有効性を試験した。本発明者らの研究は、このハムスター負荷モデルにおける疾患進行が、明らかな組織病理学的肺疾患を有するヒトにおける中等症疾患経過の特徴を示し、それは、より高いウイルス用量を接種することによりわずかに悪化したに過ぎなかったことを実証している。肺ウイルス量のピークは、鼻腔内接種用量レベルの影響を受けず、主な易感染性肺細胞の大半が感染し、それにより接種後２日目にピークに達したウイルス血症に結び付いたことが示唆される。ＮＨＰおよびハムスターでの本発明者らの以前の研究と一致して、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチン接種は、ウイルス複製を対照動物で観察されたレベルよりも６ｌｏｇ$_{10}$低減させ、より高いワクチン用量を受け取った多数の動物は検出不能なウイルス複製を示した。Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓは、免疫原性および保護有効性の両方について、２つのプロトタイプワクチンの性能を有意に上回った。より初期のデータは、本研究と組み合わせると、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ誘発性免疫応答が、Ｄ６１４ＧスパイクＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントに対して適切な保護を付与することを示している。

【０９２７】

本発明者らは、結合性抗体レベルをわずかに向上させたに過ぎないが、中和抗体価を実質的にブーストしたＡｄ２６．ＣＯＶ２．ＳおよびプロトタイプワクチンのＳ２回目の同種用量を評価することにより、以前の研究を拡張した。これは、２回目のワクチン用量が中和抗体レベルおよび結合性抗体レベルを両方とも有意にブーストしたというＮＨＰでの観察とは対照的である。考え得る説明としては、ハムスターとＮＨＰとでは用量レベルの翻訳可能性が限定されるため、初回用量により誘発された抗Ａｄ２６ベクター応答が２回目の同種用量の免疫原性に及ぼす効果が種間で異なるためであること、および免疫化の間隔をより短くすると、以前にＮＨＰで観察されたように２回目の用量の影響が低減される可能性があるためであることが挙げられる。加えて、ハムスターにおいて単回免疫化により誘導される高結合性抗体レベルは、飽和レベルである可能性があるが、中和抗体は、２回目の用量後も依然として増加することができ、これは親和性成熟の延長を反映するものであると思われる。体液性ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ特異的免疫応答のための２回目の同種ワクチン用量の利点は、同じＡｄ２６ベースワクチンで免疫化したウサギでも観察され、本発明者らの臨床データが確認された（Sadoff, le Gars, NEJM、近刊）。２用量レジメンがワクチン有効性向上のためにも好ましいか否かはまだ分かっていない。

【０９２８】

興味深いことに、Ａｄ２６．ＳまたはＡｄ２６．ｄＴＭ．ＰＰの２回目の用量は、こうしたプロトタイプワクチンをハムスターに単回ワクチン接種することにより達成される低い保護と比較して、負荷後の肺ウイルス量に対する保護を増加させた。対照的に、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの２回目の用量は、単一用量で確立されたすでに高いレベルの有効性をさらに増加させなかった。これは、抗体価が高いほど保護の確率が増加し、ある特定の抗体価に達すると、保護確率がわずかしか増加しないという本発明者らの相関分析により裏付けられる。抗体と肺保護とのこの逆相関性は、本発明者らのＮＨＰにおける以前の研究を、このＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２－Ｄ６１４ＧシリアンハムスターモデルにおいてＳ確認するものであり、ワクチン、用量レベル、またはレジメンに関わるものではなかった。ヒトにおけるＳ特異的体液性免疫と保護との相関性は、有効性データが利用可能になり次第さらに調査する必要があり、次世代ＣＯＶＩＤ－１９ワクチン設計および開発中の他のワクチンに役立つ可能性がある。

【０９２９】

ＣＯＶＩＤ－１９からの保護に加えて、ワクチン誘発性免疫は、上気道のウイルス量を低減することにより、理想的には無症候性感染に対する保護ならびにウイルス伝染に対する保護も示す。他のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２動物モデルおよび他の呼吸器ウイルス感染で観察されているように、上気道は、親免疫によるウイルス感染および排菌からの保護がより困難であると考えられる。

【０９３０】

このハムスター負荷モデルでは、本発明者らは、使用したウイルス接種用量が低いにも関わらず、鼻甲介にて高い複製可能ウイルスレベルを観察した。これは、スパイクＤ６１４Ｇ置換が、負荷したハムスターの上気道におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染性を増加させるという観察と一致する。負荷接種用量が低いため、４日後に検出された鼻甲介のウイルス量が元の接種に由来するものである可能性は低い。鼻組織のウイルス量低減には、使用したワクチンに関わりなく、２ワクチン用量が必要であった。２用量のＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓは、喉スワブのウイルス力価も減少させた唯一のレジメンであった。上気道におけるウイルス血症の低減は下気道と比較して限定的であった。これは、本発明者らが鼻ウイルス量のほとんど完全な低減を観察した本発明者らのＮＨＰ研究とは対照的である。これは、ウイルス複製に対する鼻上皮の感受性が異なること、またはハムスターと霊長類との間で気道に存在する免疫細胞の組成が異なる可能性があること、およびＡｄ２６による局所上気道免疫の誘導が異なることにより説明することができる。Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ誘発性免疫が、無症候性感染およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２伝染に対して保護することができるか否かは、今後の動物実験およびヒトデータから決定する必要がある。

【０９３１】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶおよびＭＥＲＳに対するコロナウイルスワクチン候補に関する以前の研究では、ある特定のワクチン誘発性免疫応答により疾患が悪化する可能性があることが示された。しかしながら、前臨床動物モデル、またはｍＲＮＡベースおよび他のアデノウイルスベクターベースのワクチンもしくは不活化完全ワクチンの第３相試験の有効性報告を含む進行中の臨床研究では、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ワクチン候補によるワクチン接種後にＶＡＥＲＤも抗体媒介性疾患増強も報告されていない。それにもかかわらず、これまでの臨床研究におけるワクチン有効性は高く、ＶＡＥＲＤの理論的可能性については、特に最適未満の免疫が誘導された設定でさらに調査する必要がある。したがって、本発明者らは、動物が低Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ用量しか受け取っていなかったためワクチン誘発性抗体のレベルが肺でのウイルス複製を防止するのに十分ではなかった設定で、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．ＳがＶＡＥＲＤの素因となる可能性を評価した。重要なことには、免疫が不十分で肺ウイルス複製を防止しないという設定でさえ、免疫動物の下気道組織病理学スコアは、対照群と比較してＶＡＥＲＤの徴候を示さなかった。逆に、ブレークスルー感染を起こしたほとんどのワクチン接種動物は、対照動物と比較して組織病理学的特徴の低減を依然として示した。こうした結果は、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．ＳがＶＡＥＲＤの素因となる理論的リスクは最小限であることを示唆している。

【０９３２】

本発明者らの研究により、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチン候補は、高度に免疫原性であり、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルス６１４Ｇバリアントによる負荷に対してハムスターを保護することができることが確認される。Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの効力が優れていることおよびＶＡＥＲＤの素因となることを示すデータがないことは、単一用量および２用量レジメンでの進行中の第３相臨床試験における継続的な評価を裏付けている。

【０９３３】

[実施例３０]

ヒトにおけるＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ　ＣＯＶＩＤ－１９ワクチンの免疫原性

Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの無作為化二重盲検プラセボ対照第１相臨床試験（実施例２３、２４、および２７も参照）の一部として、２５人の参加者を単一臨床施設に登録し、このワクチンの免疫原性を詳細に評価した。この実施例では、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓのシングルショットおよびツーショットレジメンにより誘発された体液性および細胞性免疫応答の動力学および規模が報告されている。

【０９３４】

材料および方法

研究設計

この研究は、シングルショットまたは５６日の間隔をあけたツーショットワクチンスケジュールとして健常成人に筋肉内投与（ＩＭ）接種した５×１０^{10}ｖｐまたは１×１０

10^{11}ｖｐのＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの安全性、反応原性、および免疫原性を評価するための多施設無作為化二重盲検プラセボ対照第１／２ａ相治験の一部（コホート１ｂ）として実施された。コホート１ａでは、１８～５５歳成人（ｎ＝３７５）が登録され、主要安全性および免疫原性エンドポイントの収集に重点が置かれていた。コホート１ｂ（ここで報告されている）にも、１８～５５歳成人（ｎ＝２５）が登録されたが、探索的エンドポイントの調査を可能にするために、２回の追加来院が含まれ、血清、血漿、および末梢血単核細胞の試料採取を増加させた。コホート３（ｎ＝３７５）には、＞６５歳の参加者が登録され、コホート１で評価したものと同じレジメンを試験した。コホート１ｂの参加者は、マサチューセッツ州ボストンのベスイスラエルディーコネス医療センターの単一施設に登録された。プロトコールは、ＢＩＤＭＣ組織内審査委員会による承認を受け、ＣｌｉｎｉｃａｌＴｒｉａｌｓ．ｇｏｖ（ＮＣＴ０４４３６２７６）に登録した。

【０９３５】

研究参加者。

適格参加者は、１８歳～５５歳（両端値を含む）であり、鼻咽頭ＰＣＲおよび血清免疫グロブリン検査のスクリーニングにより、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染に陰性であった。また、適格参加者は、体格指数（ＢＭＩ）≦３０．０ｋｇ／m^2を有し、病歴、身体検査、臨床検査評価、およびスクリーニングで実施されたバイタルサインにより確認され、治験責任医師の臨床的判断において健康であり、重症ＣＯＶＩＤ－１９のリスク増加に関連する併存疾患を有していなかった。妊娠の可能性があった参加者は、非常に効果的な避妊法を使用する必要があり、妊娠中または授乳中であってはならなかった。参加者は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２曝露のリスクが高い職業に現在従事している場合、または治験責任医師の裁量で任意の他の理由によりＣＯＶＩＤ－１９に感染するリスクが高いとみなされた場合、除外された。参加者は全員、書面によるインフォームドコンセントを提出し、研究手順の開始前に理解度評価を正常に完了した。完全な適格性基準は、研究プロトコールに記載されている。

【０９３６】

無作為化および遮蔽化

無作為化は、無作為に並べ替えられたブロックを使用して、Ｉｎｔｅｒａｃｔｉｖｅ Ｗｅｂ Ｒｅｓｐｏｎｓｅ Ｓｙｓｔｅｍ（ＩＷＲＳ）により行われた。スポンサー、臨床スタッフ、治験責任医師、参加者、および検査室職員は、割り当てについて盲検化されていた。スポンサーおよび統計学者は、すべての参加者が２９日目来院を完了したかまたはそれ以前の中止の時点で、中間解析のために群を非盲検化した。研究製品の調製および調剤を主に担当する薬剤師には、群割り当てが盲検化されていなかった。盲検化を維持するために、薬剤師はシリンジに覆いをかぶせた。

【０９３７】

治験製品

Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓは、本明細書に記載の通り、武漢株の最初の臨床単離株（Ｗｕｈａｎ、２０１９、全ゲノム配列ＮＣ＿０４５５１２）に由来する完全長安定化ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ Ｓタンパク質をコードする組換え複製不全Ａｄ２６ベクターである。Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓは、1×10^{11}ｖｐ／ｍＬの濃度で単回使用バイアルに懸濁物として供給され、吸引可能な体積は０．５ｍＬであった。製剤緩衝液は、１５ｍＭクエン酸塩、５％（重量／重量）ヒドロキシプロピル－β－シクロデキストリン、０．４％（重量／重量）エタノール、０．０３％（重量／重量）ポリソルベート８０、７５ｍＭ ＮａＣｌ、ｐＨ６．２として供給された。プラセボは０．９％ＮａＣｌである。盲検化のため、すべての参加者に同じ体積（１ｍＬ）を投与した。治験ワクチンを、好ましくは、非利き腕の三角筋へのＩＭ注射により投与した。プラセボは、１ｍＬの０．９％ＮａＣｌ溶液で構成されていた。

【０９３８】

安全性評価。

ワクチン接種時からワクチン接種７日後まで各ワクチン接種毎に日記を通じて収集した

ソリサイティドＡＥを記録した。ワクチン接種時からワクチン接種２８日後まで各ワクチン接種毎にすべての他のアンソリサイティドＡＥおよび特別な報告状況が、深刻であるか否かに関わらず報告された（２回目のワクチン接種後のデータはここでは報告されていない）。発症日が上記で規定された時間枠外（その前の研究ワクチン接種の＞２８日後）であり、その後のワクチン接種日に進行中であるアンソリサイティドＡＥもそのように記録されることになる。研究／ワクチン接種の中止に結び付くすべてのＳＡＥおよびＡＥ（因果関係を問わない）は、初回ワクチン接種の瞬間から参加者の最後の研究関連手順の完了時まで、すべての参加者について報告される。参加者の最後の研究関連手順は、安全性追跡観察のための接触を含んでいてもよい。すべてのＡＥは、解消するまでまたは臨床的に安定するまで追跡されることになる。研究実施、データ管理、または統計分析に直接関与しないメンバーで構成される内部データ審査委員会（ＤＲＣ）を設立し、データをモニターして、この研究に登録された参加者の継続的な安全を確保することになる。

【０９３９】

試料サイズおよび統計分析。

正式な統計的仮説は安全性に関しても免疫原性に関しても試験しなかった。予備的な安全性および免疫原性評価を提供するために、この研究の参加者数を選択した。プラセボレシピエントは、盲検化および安全性のために含まれ、免疫原性アッセイのための追加の対照検体を提供した。完全な分析セット（ＦＡＳ）には、少なくとも１回のワクチン投与が記録されているすべての参加者が含まれている。パープロトコール免疫原性（ＰＰＩ）集団には、免疫原性結果に影響を及ぼすと予想される大きなプロトコール逸脱を有する参加者を除いて、免疫原性データが利用可能なすべての無作為化ワクチン接種参加者が含まれている。加えて、ワクチン接種を逸機した後に得られた試料、またはスクリーニング後に自然感染した参加者（該当する場合）は、分析セットから除外した。安全性データの正式な統計検定は予定されていない。安全性データは、ワクチン群別に記述的に分析した。免疫原性に関する正式な統計的仮説は試験しなかった。記述統計は、すべての利用可能な時点における連続した免疫学的パラメーターについて算出した。ＰＰＩ集団に対して免疫原性分析を実施した。免疫学的データの分析は、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　８．４．２（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ）を使用して実施した。群間のデータ比較は、両側マン－ホイットニー検定を使用して実施した。相関性は、両側スピアマン順位相関検定により評価した。０．０５未満のＰ値を有意とみなした。

【０９４０】

酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）

Ｓ特異的およびＲＢＤ特異的結合性抗体を、本質的に記載の通りにＥＬＩＳＡにより評価した（Chandrashekar et al., Science 369, 812-817 (2020)；Yu et al., Science 369, 806-811 (2020)）。手短に言えば、９６ウェルプレートを、１×ＤＰＢＳ中１μｇ／ｍｌのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質または２μｇ／ｍｌのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＲＢＤタンパク質でコーティングし、４℃で一晩インキュベートした。インキュベーション後、プレートを洗浄緩衝液（１×ＤＰＢＳ中０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０）で１回洗浄し、３５０μＬのカゼインブロッキング液／ウェルで２～３時間室温にてブロッキングした。インキュベーション後、ブロッキング溶液を廃棄し、プレートをブロット乾燥した。カゼインブロッキング液で希釈した熱不活化血清の系列希釈物をウェルに添加し、プレートを室温で１時間インキュベートしてから、さらに３回洗浄し、１：４０００希釈の抗ヒトＩｇＧ　ＨＲＰ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）と共に室温で暗所にて１時間インキュベーションした。次いで、プレートを３回洗浄し、１００μＬのＳｅｒａＣａｒｅ　ＫＰＬ　ＴＭＢ　ＳｕｒｅＢｌｕｅ開始溶液を各ウェルに添加した。１ウェル当たり１００μＬのＳｅｒａＣａｒｅ　ＫＰＬ　ＴＭＢ停止溶液を添加することにより、プレート発色を停止させた。ＶｅｒｓａＭａｘマイクロプレートリーダーを使用して、６５０ｎｍを基準として４５０ｎｍの吸光度を記録した。各試料について、Ｇｒａｐｈｐａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウェアで４パラメーターロジスティックカーブフィッティングを使用してＥＬＩＳＡエンドポイント力価を算出し、０．２の補正吸光度値（４５０ｎｍ－６５０ｎ

ｍ）をもたらす血清希釈の逆数を算出した。Ｌｏｇ１０エンドポイント力価が報告されている。ＥＬＩＳＡアッセイは、ベスイスラエルディーコネス医療センターのウイルス学およびワクチン研究センター（Center for Virology and Vaccine Research）においてヒト血清について開発および認定された。

【０９４１】

偽ウイルス中和アッセイ（ｐｓＶＮＡ）。

ルシフェラーゼレポーター遺伝子を発現するＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２偽ウイルスを、以前の記載と同様の手法で生成した（Chandrashekar et al., Science 369, 812-817 (2020)；Yu et al., Science 369, 806-811 (2020)）。手短に言えば、パッケージング構築物ｐｓＰＡＸ２（ＡＩＤＳ Ｒｅｓｏｕｒｃｅ ａｎｄ Ｒｅａｇｅｎｔ Ｐｒｏｇｒａｍ）、ルシフェラーゼレポータープラスミドｐＬｅｎｔｉ－ＣＭＶ Ｐｕｒｏ－Ｌｕｃ（Ａｄｄｇｅｎｅ）、およびスパイクタンパク質発現ｐｃＤＮＡ３．１－ＳＡＲＳ ＣｏＶ－２ ＳΔＣＴを、リポフェクタミン２，０００（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）によりＨＥＫ２９３Ｔ細胞に共トランスフェクトした。トランスフェクションの４８時間後に、偽型ウイルスを含む上清を収集した。偽型ウイルスを、０．４５μｍフィルターで濾過することにより精製した。ワクチン接種動物に由来する抗血清の中和活性を決定するために、ＨＥＫ２９３Ｔ－ｈＡＣＥ２細胞を、９６ウェル組織培養プレートに１．７５×10^4細胞／ウェルの密度で一晩播種した。熱不活化血清試料の３倍系列希釈物を調製し、５０μＬの偽ウイルスと混合した。混合物を３７℃で１時間インキュベートしてから、ＨＥＫ２９３Ｔ－ＡＣＥ２細胞に添加した。４８時間後、細胞を、製造元の使用説明書に従ってＳｔｅａｄｙ－Ｇｌｏルシフェラーゼアッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ）で溶解した。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和力価を、ウイルス対照ウェルの平均と比べてＲＬＵの５０％低減が観察された試料希釈として規定した。ｐｓＶＮＡアッセイは、ベスイスラエルディーコネス医療センターのウイルス学およびワクチン研究センターにおいてヒト血清について開発および認定された。

【０９４２】

Ａｄ２６中和アッセイ

Ａ５４９ヒト肺癌細胞を、感染の１日前に１ウェル当たり１×10^4細胞の密度で９６ウェルプレートに播種した。Ｅ１／Ｅ３欠失複製不全ｒＡｄ２６．Ｌｕｃレポーターウイルスを、熱不活化ヒト血清の３倍系列希釈物と混合し、次いで５００の感染多重度（ＭＯＩ）でＡ５４９細胞にアプライした。感染２４時間後、細胞内のルシフェラーゼ活性を、Ｓｔｅａｄｙ－Ｇｌｏルシフェラーゼ試薬系（Ｐｒｏｍｅｇａ、マディソン、ウィスコンシン州）を使用して測定した。中和力価は、ルシフェラーゼ活性の９０％を中和する最大血清希釈と規定した。Ａｄ２６中和アッセイは、ベスイスラエルディーコネス医療センターのウイルス学およびワクチン研究センターにおいてヒト血清について開発された。

【０９４３】

電気化学発光アッセイ（ＥＣＬＡ）。

ＥＣＬＡプレート（ＭｅｓｏＳｃａｌｅ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ ＩｇＧパネル２；Ｋ１５３６９Ｕ－２）を設計し、各ウェルに９つの抗原スポットを作製した。含まれていた抗原は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ Ｓ、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１ Ｓ、ｈＣｏＶ－２２９Ｅ Ｓ、ｈＣｏＶ－ＮＬ６３ Ｓ、ｈＣｏＶ－ＯＣ４３ Ｓ、およびｈＣｏＶ－ＨＫＵ１ Ｓであった。プレートを、７００ｒｐｍのデジタルマイクロプレート振盪器で少なくとも３０分間室温にて振盪しながら、５０ｕＬのＢｌｏｃｋｅｒ Ａ溶液でブロッキングした。ブロッキング中、血清をＤｉｌｕｅｎｔ１００で１：５，０００に希釈した。次いで、プレートを１５０μＬのＭＳＤキット洗浄緩衝液で３回洗浄し、ブロット乾燥し、５０μＬの希釈試料を２連でプレートに添加し、７００ｒｐｍの振盪器にセットして少なくとも２時間室温で振盪した。プレートを再度３回洗浄し、Ｄｉｌｕｅｎｔ１００で１×に希釈した５０μＬのＳＵＬＦＯタグ付き抗ヒトＩｇＧ検出抗体を各ウェルに添加し、７００ｒｐｍで少なくとも１時間室温にて振盪しながらインキュベートした。次いで、プレートを３回洗浄し、１５０μＬのＭＳＤ ＧＯＬＤ Ｒｅａｄ緩衝液Ｂを各ウ

ェルに添加し、その直後にプレートを、ＭＥＳＯ　ＱｕｉｃｋＰｌｅｘ　ＳＱ　１２０装置で読み取った。各試料のＭＳＤ力価を、各試料の各スポットの試料ＲＬＵからブランクＲＬＵを除算した値として算出された相対光単位（ＲＬＵ）として報告した。１０００ＲＬＵを各アッセイの検出限界として規定した。

【０９４４】

ＩＦＮ－γ酵素結合免疫スポット（ＥＬＩＳＰＯＴ）アッセイ。

ＥＬＩＳＰＯＴプレートを、ＭａｂＴｅｃｈの１μｇ／ウェル濃度のマウス抗ヒトＩＦＮ－γモノクローナル抗体で一晩４℃にてコーティングした。プレートをＤＰＢＳで洗浄し、Ｒ１０培地（１０％熱不活化ＦＢＳを有し、１％１００×ペニシリン－ストレプトマイシン、１Ｍ　ＨＥＰＥＳ、１００ｍＭピルビン酸ナトリウム、２００ｍＭ　Ｌ－グルタミン、および０．１％の５５ｍＭ　２－メルカプトエタノールを有するＲＰＭＩ）で２～４時間３７℃にてブロッキングした。スパイク１ペプチドプールおよびスパイク２ペプチドプールは、タンパク質配列全体にわたる１１個アミノ酸が重複する１５個のアミノ酸のペプチドを含み、それぞれタンパク質のＮ末端半分およびＣ末端半分を反映している。スパイク１ペプチドプールおよびスパイク２ペプチドプールを２μｇ／ウェルの濃度に調製し、２００，０００細胞／ウェルをプレートに添加した。ペプチドおよび細胞を３７℃で１５～２０時間インキュベートした。このインキュベーション後のステップはすべて室温で実施した。プレートをＥＬＩＳＰＯＴ洗浄緩衝液で洗浄し、ＭａｂＴｅｃｈからのビオチン化マウス抗ヒトＩＦＮ－γモノクローナル抗体（１μｇ／ｍＬ）と共に２～４時間インキュベートした。プレートを２回洗浄し、Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓのアルカリホスファターゼコンジュゲート抗ビオチンモノクローナル抗体（１．３３μｇ／ｍＬ）と共に２～３時間インキュベートする。最終洗浄に続いて、ニトロ－ブルーテトラゾリウムクロリド／５－ブロモ－４－クロロ３’インドリルホスフェートｐ－トルジン塩（ＮＢＴ／ＢＣＩＰ色素原）基質溶液を７分間添加した。色素原を破棄し、プレートを水で洗浄し、薄暗い場所で２４時間乾燥させた。プレートを、Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｌｉｍｉｔｅｄ　Ｉｍｍｕｎｏｓｐｏｔ分析機でスキャンおよび計数した。ＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイは、ベスイスラエルディーコネス医療センターのウイルス学およびワクチン研究センターにおいてヒト血清について開発および認定された。

【０９４５】

ＩＬ－４　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイ。

ＥＬＩＳＰＯＴプレートを、ＭａｂＴｅｃｈの１．５μｇ／ウェルのＩＬ４－Ｉモノクローナル抗体で一晩４℃にてコーティングした。プレートを１×ＰＢＳで洗浄し、Ｒ１０培地（１０％熱不活化ＦＢＳを有し、１％１００×ペニシリン－ストレプトマイシン、１Ｍ　ＨＥＰＥＳ、１００ｍＭピルビン酸ナトリウム、２００ｍＭ　Ｌ－グルタミン、および０．１％の５５ｍＭ　２－メルカプトエタノールを有するＲＰＭＩ）で３０分～４時間ブロッキングした。スパイク１ペプチドプールおよびスパイク２ペプチドプールを２μｇ／ウェルの濃度に調製し、２００，０００細胞／ウェルを添加した。ペプチドおよび細胞を３７℃で１８～４８時間インキュベートした。このインキュベーション後のステップはすべて室温で実施した。プレートを１×ＰＢＳで洗浄し、ＭａｂＴｅｃｈのビオチン化モノクローナル抗体ＩＬ４－ＩＩ（１μｇ／ウェル）と共に２時間インキュベートした。プレートを２回洗浄し、ＭａｂＴｅｃｈのストレプトアビジン－アルカリホスファターゼ（１：１０００）と共に１時間インキュベートする。最終洗浄に続いて、ニトロ－ブルーテトラゾリウムクロリド／５－ブロモ－４－クロロ３’インドリルホスフェートｐ－トルジン塩（ＮＢＴ／ＢＣＩＰ色素原）基質溶液を１２～１５分間添加した。色素原を破棄し、プレートを水で洗浄し、薄暗い場所で２４時間乾燥させた。プレートを、Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｌｉｍｉｔｅｄ　Ｉｍｍｕｎｏｓｐｏｔ分析機でスキャンおよび計数した。ＩＬ－４　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイは、ベスイスラエルディーコネス医療センターのウイルス学およびワクチン研究センターにおいてヒト血清について開発および認定された。

【０９４６】
細胞内サイトカイン染色（ＩＣＳ）アッセイ
１０^{6}ＰＢＭＣ／ウェルを、抗ＣＤ２８　ＣＤ４９ｄモノクローナル抗体（１μｇ／ｍＬ）を補充した１００μＬのＲ１０培地に再懸濁した。各試料を、モック（１００μＬのＲ１０＋０．５％ＤＭＳＯ；バックグラウンド対照）、ペプチドプール（２μｇ／ｍＬ）、または１０ｐｇ／ｍＬホルボールミリステートアセテート（ＰＭＡ）、および１μｇ／ｍＬイオノマイシン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）（１００μＬ；陽性対照）で評価し、３７℃で１時間インキュベートした。インキュベーション後、５０μＬのＲ１０中０．２５μＬのＧｏｌｇｉＳｔｏｐおよび０．２５μＬのＧｏｌｇｉＰｌｕｇを各ウェルに添加し、３７℃で８時間インキュベートし、次いで４℃で一晩保持した。翌日、細胞をＤＰＢＳで２回洗浄し、Ａｑｕａ　ｌｉｖｅ／ｄｅａｄ色素（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で１０分間染色し、次いで、ＣＤ２７９（クローンＥＨ１２．１、ＢＢ７００、ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）、ＣＤ４（クローンＬ２００、ＢＶ７１１、ＢＤ）、ＣＤ２７（クローンＭ－Ｔ２７１、ＢＵＶ５６３、ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）、ＣＤ８（クローンＳＫ１、ＢＵＶ８０５、ＢＤ）、ＣＤ４５ＲＡ（クローン５Ｈ９、ＡＰＣＨ７、ＢＤ）に対する所定の力価のｍＡｂで３０分間染色した。次いで、細胞を２％ＦＢＳ／ＤＰＢＳ緩衝液で２回洗浄し、２００μＬのＢＤ　ＣｙｔｏＦｉｘ／ＣｙｔｏＰｅｒｍ固定／透過処理溶液と共に１５分間インキュベートした。細胞を１×Ｐｅｒｍ　Ｗａｓｈ緩衝液（ＭｉｌｌｉＱ水で希釈し、０．２２μｍフィルターを通した、ＣｙｔｏＦｉｘ／ＣｙｔｏＰｅｒｍ固定／透過処理キットのＢＤ　Ｐｅｒｍ／Ｗａｓｈ（商標）緩衝液１０×）で２回洗浄し、Ｋｉ６７（クローンＢ５６、Ａｌｅｘａ４８８、ＢＤ）、ＩＬ２１（クローン３Ａ３－Ｎ２．１、ＰＥ、ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）、ＣＤ６９（クローンＴＰ１．５５．３、ＥＣＤ、Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）、ＩＬ１０（クローンＪＥＳ３－９Ｄ７、ＰＥ　ＣＹ７、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）、ＩＬ１３（クローンＪＥＳ１０－５Ａ２、ＢＶ４２１、ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）、ＩＬ４（クローンＭＰ４－２５Ｄ２、ＢＶ６０５、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）、ＴＮＦ－α（クローンＭａｂ１１、ＢＶ６５０、ＢＤ）、ＩＬ１７（クローンＮ４９－６５３、ＢＶ７５０、ＢＤ）、ＩＦＮ－γ（クローンＢ２７；ＢＵＶ３９５、ＢＤ）、ＩＬ２（クローンＭＱ１－１７Ｈ１２、ＢＵＶ７３７、ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）、ＩＬ６（クローンＭＱ２－１３Ａ５、ＡＰＣ、ＢＤ）、ＣＤ３（クローンＳＰ３４．２、Ａｌｅｘａ７００、ＢＤ）に対するｍＡｂで３０分間細胞内染色した。細胞を、１×Ｐｅｒｍ　Ｗａｓｈ緩衝液で２回洗浄し、２５０μＬの新たに調製した１．５％ホルムアルデヒドで固定した。固定した細胞を、９６ウェル丸底プレートに移し、ＢＤ　ＦＡＣＳｙｍｐｈｏｎｙ（商標）システムで分析した。ＩＣＳアッセイは、ベスイスラエルディーコネス医療センターのウイルス学およびワクチン研究センターにおいてヒト血清について開発された。
【０９４７】
結果
研究設計
２０２０年７月２７日～２０２０年８月７日に、マサチューセッツ州ボストンのベスイスラエルディーコネス医療センターで２８人の参加者をスクリーニングした。２人の参加者は、スクリーニング時のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２診断検査が陽性であったため不適格であり、１人は体格指数が＞３０ｋｇ／ｍ^{2}であったため不適格であった。２５人の参加者を無作為に割り振り、少なくとも１用量のワクチンまたはプラセボを受けた。参加者を５群の実験群（Ｎ＝５／群）の１つに無作為に割り振った：（ｉ）５×１０^{10}ｖｐ　Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ（低用量；ＬＤ）を１日目および５７日目に接種（ＬＤ／ＬＤ）；（ｉｉ）シングルショットワクチンとして１日目にＬＤおよび５７日目にプラセボを接種（ＬＤ／ＰＬ）；（ｉｉｉ）１×１０^{11}ｖｐ　Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ（高用量；ＨＤ）を１日目および５７日目に接種（ＨＤ／ＨＤ）；（ｉｖ）シングルショットワクチンとして１日目にＨＤおよび５７日目にプラセボを接種（ＨＤ／ＰＬ）；または（ｖ）プラセボを１日目および５７日目に接種（ＰＬ／ＰＬ）。こうした２５人の安全性データは別途報告

されている（Sadoff et al., New Engl. J. Med.、近刊）。

【０９４８】

結合性抗体応答および中和抗体応答の動力学および規模

免疫化後８日目までに、ＥＬＩＳＡによると、完全長スパイク（Ｓ）に対する結合性抗体は、ワクチンレシピエントの６５％で（２０人中１３人）（図１３６Ａ；Ｐ＝０．０１９４、両側マン－ホイットニー検定）、受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）に対する結合性抗体は、ワクチンレシピエントの９０％（２０人中１８人）で（図１３６Ｂ；Ｐ＝０．００３３、両側マン－ホイットニー検定）観察された。また、傾向として、ルシフェラーゼベース偽ウイルス中和抗体（ｐｓＶＮＡ）アッセイ（５～７）により、ワクチンレシピエントの２５％（２０人中５人）でウイルス中和抗体が８日目に観察された（図１３６Ｃ）。こうしたデータは、ヒトにおいてＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチン接種後に結合性抗体応答および中和抗体応答が迅速に誘導されたことを示している。

【０９４９】

１５日目までに、Ｓ特異的およびＲＢＤ特異的結合抗体は、ワクチンレシピエントの１００％（２０人中２０人）で観察され（図１３７Ａ）、中和抗体は、ワクチンレシピエントの８５％（２０人中１７人）で観察された（図１３７Ｂ）。結合性および中和抗体は、２９、５７、および７１日目に継続して増加した。５７日目および７１日目までに、ワクチンレシピエントの１００％（２０人中２０人）が中和抗体ならびにＳ特異的およびＲＢＤ特異的結合抗体を示した。７１日目には、Ｓ特異的結合性抗体の幾何平均力価（ＧＭＴ）は、ＬＤ／ＬＤ群、ＬＤ／ＰＬ群、ＨＤ／ＨＤ群、ＨＤ／ＰＬ群、およびＰＬ／ＰＬ群でそれぞれ２４３２、３２４９、５７２９、２８５２、および２０であり、ＲＢＤ特異的結合抗体のＧＭＴは、それぞれ１０１８、２０２３、３６６６、２３７２、および２１であり、中和抗体のＧＭＴは、それぞれ２４２、３７５、４４９、３８７、および１３であった（図１３７Ａ、１３７Ｂ）。まとめると、こうしたデータは、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓのシングルショットレジメン後およびツーショットレジメン後の両方で、結合性抗体応答および中和抗体応答の動力学が迅速であり、規模がロバストであったことを示している。シングルショット群では、７１日目までの抗体応答の持続性および増加は、こうした応答が耐久性であることを示唆している。

【０９５０】

５７日目の２回目の免疫化は、７１日目には、ＬＤ／ＬＤ群およびＨＤ／ＨＤ群において、結合性抗体価を平均で２．５６倍（範囲１．５８～３．０４）増加させ、中和抗体価を平均で４．６２倍（範囲３．５６～５．６８）増加させた。これは、以前の結果と同様であった（実施例２７を参照）。しかしながら、７１日目のツーショットワクチン群の全体的なＧＭＴは、シングルショットワクチン群のＧＭＴと同等であった。これは、各群の参加者が少人数であったこと、およびブースト前のＬＤ／ＬＤ群およびＨＤ／ＨＤ群に２人の低応答者がいたという事実を反映している可能性がある。ＬＤ／ＬＤ群と比較して、ＨＤ／ＨＤ群ではより高い結合性抗体応答および中和抗体応答に対する傾向が観察された。ブーストに対する免疫学的応答は、７１日目のＬＤ／ＬＤ群およびＨＤ／ＨＤ群におけるＡｄ２６ベクター特異的中和抗体の増加によっても明らかにされた（図１２７Ｂ）。

【０９５１】

２９日目のＳ特異的およびＲＢＤ特異的結合性抗体価は互いに強く相関し（Ｐ＜０．０００１、Ｒ＝０．９８３８、両側スピアマン順位相関検定；図１３８）、両方とも２９日目の中和抗体価と相関した（それぞれＰ＜０．０００１、Ｒ＝０．８８０９およびＰ＜０．０００１、Ｒ＝０．８６０４、両側スピアマン順位相関検定；図１３８）。こうしたデータは、ワクチン誘発性抗体が、概してＳおよびＲＢＤの両方に結合し、ロバストなウイルス中和能力を呈したことを示唆している。

【０９５２】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対する抗体応答の特異性を評価するために、本発明者らは、電気化学発光アッセイ（ＥＣＬＡ；Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＩｇＧパネル２；Ｋ１５３６９Ｕ－２）を使用した。本発明者らは、ＳＡ

ＲＳ－ＣｏＶ－２、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１、ＣｏＶ－２２９Ｅ、ＣｏＶ－ＨＫＵ１、ＣｏＶ－ＮＬ６３、およびＣｏＶ－ＯＣ４３に由来する完全長Ｓタンパク質に対する反応性を評価した。Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチン接種は、ＥＣＬＡによると、ＥＬＩＳＡ（図１３７Ａ）と同等のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２Ｓ特異的抗体を誘導した（図１３９Ａ）。また、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１に由来するＳタンパク質に対する交差反応性応答は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２よりもおよそ１０分の１の規模で観察された（図１３９Ａ）。風邪コロナウイルスＣｏＶ－２２９Ｅ、ＣｏＶ－ＨＫＵ１、ＣｏＶ－ＮＬ６３、およびＣｏＶ－ＯＣ４３に由来するＳタンパク質に対する高いバックグラウンドレベルの抗体がベースライン時に観察されたが、ワクチン接種後、こうした応答には明確な増加はなかった（図１３９Ｂ）。こうしたデータは、Ａｄ２６．ＣｏＶ．Ｓが、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１に対する低レベルの交差反応性抗体を誘発したが、より関連性が低い風邪ＣｏＶに対する抗体は最小限であったかまたはまったく誘発しなかったことを示唆する。

【０９５３】

細胞性免疫応答

本発明者らは、全参加者の末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）のＩＦＮ－γおよびＩＬ－４ＥＬＩＳＰＯＴアッセイにより、ならびに十分なＰＢＭＣが存在していた参加者のサブセットにおけるマルチパラメーター細胞内サイトカイン染色（ＩＣＳ）アッセイにより、Ｓ特異的細胞免疫応答を評価した。ＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴ応答は、１５日目までにワクチンレシピエントの６５％（２０人中１３人）で、７１日目までにワクチンレシピエントの８４％（１９人中１６人）で観察され、群間の細胞性免疫応答に明確な差はなかった（図１４０Ａ）。ＩＬ－４応答は観察されず、強くＴＨ１に偏向した細胞性免疫応答であることを示していた。マルチパラメーターＩＣＳアッセイにより、研究した１人のワクチンレシピエントを除く全員に、セントラルメモリーＣＤ２７＋ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞応答の誘導が確認された（図１４０Ｂ）。ＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴ応答は、２９日目には、Ｓ特異的結合性抗体価、ＲＢＤ特異的結合性抗体価、および中和抗体価と相関していた（それぞれ、Ｐ＝０．００４５、Ｒ＝０．５４９２；Ｐ＝０．００５６、Ｒ＝０．５３７８；およびＰ＝０．００３１、Ｒ＝０．５６７６、両側スピアマン順位相関検定；図１４１）。

【０９５４】

考察および結論

ここでは、本発明者らは、第１相臨床試験でＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓまたはプラセボの種々のレジメンを受けた２５人の詳細な免疫学的分析を報告する。全体として、免疫原性は、親研究の８１０人と同等であった（実施例２７およびSadoff et al., New Engl. J. Med.、近刊）。本発明者らは、ワクチン接種１週間後までに抗体が急速に誘導され、８日目までにワクチンレシピエントの９０％でＲＢＤ特異的結合性抗体が検出されたことを示すことにより、こうした以前の結果を拡張した。こうしたデータは、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓが、単回免疫化後に、同様の耐久性を有する迅速で複雑な抗体応答ならびに細胞性免疫応答を誘導することを示している。

【０９５５】

最も最近のＣＯＶＩＤ－１９ワクチンプログラムの中心的仮説は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２Ｓタンパク質に対する抗体が保護的であるということである。したがって、ほとんどのプログラムは、ウイルス特異的中和抗体を誘導する戦略に焦点を当てているが、他の抗体機能も保護に寄与する可能性がある。結合性抗体、中和抗体、および機能的非中和抗体はすべて、アカゲザルにおけるＤＮＡおよびＡｄ２６ワクチン接種後の保護有効性と相関していた（Mercado et al., Nature 586, 583-588 (2020): Yu et al., Science 369, 806-811 (2020)）。本発明者らは、最近、回復期のマカクに由来する精製ＩｇＧの養子移入が、ナイーブマカクをＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷から用量依存的に保護したことを示した（Chandrashekar et al., Science 369, 812-817 (2020)；McMahan et al., Correlates of protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. Nature (2020)）。この前臨床モデルにおける保護の閾値は、Ｓ特異的結合抗体価

が４００であり、ＲＢＤ特異的結合性抗体価が１００であり、中和抗体価が５０であったが、ヒトにおけるＣＯＶＩＤ－１９感染または疾患に対する保護についての保護の相関性はまだ決定されていない。それにもかかわらず、ヒトにおいてＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓにより誘導された抗体価（図１３７）は、本質的に同じアッセイを使用して以前に規定されたこうした閾値よりも実質的に大きかったことは注目に値する。また、Ｔ細胞応答は、特に抗体応答が漸減している設定または境界線上にある設定では、保護に寄与する可能性がある。

【０９５６】

ＣＯＶＩＤ－１９ワクチンの場合、多様な機能的抗体応答の迅速で強力な耐久性のある誘導が重要である可能性がある。Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓは、シングルショット免疫化後で高度に免疫原性であり、氷点下の冷凍コールドチェーンを必要としないため、大規模ワクチン接種キャンペーンでは物流上のおよび実用上の大きな利点を提供することができる。

【０９５７】

初期免疫化後の８日目までに、ワクチンレシピエントの大半で結合性抗体が急速に出現し、個人のサブセットで中和抗体が観察された。結合性および中和抗体が、単回免疫化後５７日目までにワクチンレシピエントの１００％で検出された。こうしたデータは、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓが、急速な動力学を示す抗体応答ならびに細胞性免疫応答を誘導したことを示している。ヒトにおけるＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチンの有効性を決定するために、２つの第３相臨床試験が現在進行中である。

【０９５８】

[実施例３１]

１８歳以上の成人におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２媒介性ＣＯＶＩＤ－１９を予防するためのＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの有効性および安全性を評価するための無作為化二重盲検プラセボ対照第３相研究（ＥＮＳＥＭＢＬＥ）

この試験は、重症ＣＯＶＩＤ－１９への進行リスクの増加に関連付けられる併存疾患の有無に関わらず、≧１８歳～＜６０歳成人（ステージ１）および≧６０歳成人（ステージ２）における、北米、中米、南米、および南アフリカで進行中の無作為化二重盲検プラセボ対照第３相ピボタル有効性、安全性、および免疫原性研究である。Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの単一用量の有効性、安全性、および免疫原性が、ＳＡＲＳ　ＣｏＶ　２感染の獲得リスクが高い場所に居住しているかまたは行く予定のある参加者で評価されている。無作為化時に層別化することにより、研究集団における年齢および併存疾患の存在／非存在の良好な再現が達成された。人種、民族、および性別に関しても、良好な再現を確保するための努力がなされた。共主要目的は、ワクチン接種の少なくとも１４日後および少なくとも２８日後に発症した分子的に確認された中等症～重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９の予防における単一用量のＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ　5×10^{10}ｖｐのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２血清陰性の成人における有効性を、プラセボと比較して実証することである。他の重要なエンドポイントには、重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９（死亡および医療介入を含む）の予防における有効性、すべての症候性ＣＯＶＩＤ－１９（重症度調整荷重ＢＯＤ分析により測定される、軽症、中等症、および重症／重篤疾患を含む）の予防における有効性、および≧６０歳成人における有効性が含まれる。

【０９５９】

この実施例には、この第３相試験で評価されたＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの有効性が記載されている。この大規模複数国ピボタル有効性試験では、このワクチンは、民族的および地理的に多様であった成人集団において中等症～重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９の予防に有効であることが示された。

【０９６０】

初期に計画された試料サイズである参加者６０，０００人は、推定６０％ＶＥのワクチン研究の８か月以内にタイムトゥーシグナル（time to signal）に到達する高い確率（および９０％）を提供する能力と組み合わせた疫学的状況の不確実性に基づき、研究開始

前の運用上の締め切り日に算出された。ＣＯＶＩＤ－１９の発症率が研究開始時の初期想定よりも大幅に高いことが明らかになったため、試料サイズをおよそ４０，０００人参加者に低減させた。

【０９６１】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染および症候性ＣＯＶＩＤ－１９の識別および分子的確認は、研究全体を通して臨床試験プロトコールに記載の通り実施した。中央検査室（ワシントン大学［ＵＷウイルス学研究所］）によるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染の分子的確認（ＡｂｂｏｔｔリアルタイムＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＲＴ－ＰＣＲアッセイ［Ａｂｂｏｔｔ　２０２０］を使用）を、症例定義の分析に使用した。

【０９６２】

重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９症例という用語は、臨床重症度判定委員会により臨床的に評価され、重症／重篤と判定された症例を指す。重症度の分類は、観察期間中の最も高い程度の重症度に基づいていた。重症／重篤症例を含むすべての分析は、別様の記載がない限り判定に基づいている。

【０９６３】

ＣＯＶＩＤ－１９関連入院およびＣＯＶＩＤ－１９関連合併症（これらに限定されないが、過炎症症候群（hyperinflammatory syndrome）、肺炎、神経系または血管系合併症、重症肺炎、重症神経系または血管系事象、急性呼吸窮迫症候群、腎合併症、敗血症、敗血症性ショック、死亡［ＷＨＯ２０２０ｄ］など）を、研究全体を通してモニターした。

【０９６４】

ＣＯＶ３００１研究の主要目的は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２血清陰性の成人の、分子的に確認された（ＰＣＲベース検査または他の分子診断検査を使用した中央検査室による陽性ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスＲＮＡ結果と規定される）中等症～重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９予防におけるＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの有効性を、プラセボと比較して実証することであった。

【０９６５】

完全分析セット（ＦＡＳ）は、少なくとも１回のワクチン投与を受けたすべての無作為化参加者を含む。

【０９６６】

パープロトコール（ＰＰ）セットは、（ｉ）有効性に影響を及ぼす大きなプロトコール逸脱を有する対象；（ｉｉ）ベースライン時（１日目）に血清陽性である対象；（ｉｉｉ）利用可能であれば＊、ベースライン時（１日目）にＰＣＲ＋である対象（＊すべての症例を１日目のＰＣＲで分析した）を除く、ＦＡＳのサブセットを含む。

【０９６７】

別様に記載がない限り、すべての有効性分析は、ＰＰ（パープロトコール）セットで実施した。ＰＰセットには、治験ワクチンを受け、ワクチン接種時に血清陰性であり、ワクチンの有効性に影響を及ぼす可能性があると判断される他の大きなプロトコール逸脱がなかった参加者が含まれている。

【０９６８】

同じ方法を使用して各部分集団のＶＥを記述するための（未調整）９５％ＣＩを含む記述的要約を使用した、年齢群（１８歳～＜６０歳、≧６０歳）および併存疾患の存在（有り／無し）毎の部分群分析で一次分析を補完した。

【０９６９】

一次分析の時点で、以下の副次的エンドポイントを試験した。

・　疾病負担（ＢＯＤ）エンドポイントにより評価した、ワクチン接種の少なくとも２８日後および少なくとも１４日後に発症したすべての症候性ＣＯＶＩＤ－１９に対するＶＥ。ＢＯＤにより、症候性ＣＯＶＩＤ－１９の予防に対する重症度調整済みＶＥが評価される。重症感染症にはより大きな重みが割り当てられ（重症症例にはスコア２、非重症症例には１が与えられる）、したがって、ＢＯＤエンドポイントは、重症感染症に対する保

護の増加を示すプラセボワクチンと区別するためのより高い統計的検出能力を提供することが目的である。

・　ワクチン接種の少なくとも２８日後および／または少なくとも１４日後に発症した重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９に対するＶＥ。

【０９７０】

また、以下のエンドポイントを記述的に分析した（９５％ＣＩを含む）。

・　ワクチン接種の少なくとも２８日後および少なくとも１４日後に発症した医療介入を必要とするＣＯＶＩＤ－１９に対するＶＥ（それぞれ２９日目および１５日目以降に発症した２３症例が利用可能である必要があった）。医療介入（酸素供給の減少、Ｘ線またはＣＴ所見などの客観的測定に関連する入院、ＩＣＵ入室、人工呼吸器、およびＥＣＭＯの複合エンドポイントなど）を必要とするＣＯＶＩＤ－１９は、医学的介助ＣＯＶＩＤ－１９用紙を介して収集された医療資源利用データに基づいて決定した。

・　２９日目から発症したすべてのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染に対するＶＥ（＞１５，０００人の参加者で、７１日目の試料が利用可能である必要があった）。

・　２９日目から発症した無症候性／または未検出症例に対するＶＥ（参加者は全員、少なくとも6か月間の追跡観察を受ける必要があった）。

【０９７１】

記述的に記載されている他の副次的エンドポイントには、分子的に確認された軽症ＣＯＶＩＤ－１９に対するＶＥ、および米国ＦＤＡ統一ＣＯＶＩＤ－１９症例定義によるＣＯＶＩＤ－１９に対するＶＥ、年齢、併存疾患の存在／非存在、性別、地域、国、人種、民族、およびＨＩＶ状態による部分群分析、ならびに感染後のウイルス量が含まれている。ＶＥの潜在的な時間効果を評価するために、カプラン－マイヤー法を使用した経時的な累積発生率プロットを使用した。

【０９７２】

研究実施中のＣＯＶＩＤ－１９発症率が高かったため、すべての症例が一次分析の時点で中央検査室（ＵｏＷ）により確認されたわけではなかった。ＣＯＶＩＤ－１９症例定義を満たす症状を有し、別の供給源（施設または中央）からの少なくとも１つの陽性ＰＣＲ結果を有する多数の症例があった。したがって、一次分析は、その検査の供給源に関わりなく、少なくとも１つのＰＣＲ陽性結果を有する症例を含む感度分析で補完されている。分析は非推計的であるが、対応する推計分析と同じαレベルを使用した。

【０９７３】

参加者情報：

合計で４３，７８３人の参加者（Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ　５×１０^{10}群で２１，８９５人およびプラセボ群で２１，８８８人）を無作為化し、その全員が治験ワクチン接種を受け、３９，３２１人（Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ　５×１０^{10}群で１９，６３０人およびプラセボ群で１９，６９１人）がＰＰセットに含まれていた。このセクションに示されているデータは、ＰＰセットのものである。

【０９７４】

ＰＰセットの参加者のうち、参加者の全員が研究を完了したわけではなく、１３０人（０．３％；（Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ　５×１０^{10}群で参加者４１人［０．２％］、プラセボ群で参加者８９人［０．５％］）が、主に同意撤回により早期に研究を中止した（それぞれ参加者３０人［０．２％］および参加者６２人［０．３％］）。一次分析の時点で、ワクチン接種後の追跡観察期間の中央値は５８日であり、ＰＰセットの参加者２１，４９１人は、追跡観察期間が少なくとも2か月間であった。

【０９７５】

認可／実施許諾ＣＯＶＩＤ－１９ワクチンを受ける資格を得た研究参加者は、パープロトコール盲検化の解除を要求することができた。２０２１年1月２２日の締め切り日までに、参加者２，２５７人（５．２％）が、この研究の過程中に認可／実施許諾ＣＯＶＩＤ－１９ワクチンを受けるための盲検化が解除された。

【０９７６】

Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ群とプラセボ群との間で、人口統計特徴およびベースライン特徴の関連差異は観察されなかった。無作為化を、施設、年齢、および併存疾患の存在／非存在で層別化し、人種、民族、および性別に関して良好な再現性を確保するための努力がなされた。

【０９７７】

研究集団の人口統計に関する主な調査結果：

年齢分布　＞＝６０（３３．５％）、＞＝６５（１９．６％）、＞＝７５（３．５％）、＞＝８０（１％）

性別：女性４５％、男性５５％

地域：米国４４％、中南米４１％、および南アフリカ１５％

人種：黒人またはアフリカ系アメリカ人１９．５％（米国では１３％）

併存疾患　全体４１％、肥満（２８．５％）、２型糖尿病（７．３％）、高血圧（１０．３％）、ＨＩＶ（２．８％）。他の免疫不全参加者も研究に参加していた。

【０９７８】

ＰＰセットでは、参加者の大半が、北米（４６．７％）および中南米（４０．６％）からであった。他の参加者は南アフリカからであった（１２．７％）。全体として、参加者の６２．１％が白人であり、１７．２％が黒人またはアフリカ系アメリカ人であり、８．３％がアメリカ先住民／アラスカ先住民であり、３．５％がアジア人であり、参加者の４５．１％がラテンアメリカ系またはラテン系であった。

【０９７９】

ＰＰセットでは、参加者の４４．５％が女性であり、５５．５％が男性であった。年齢中央値は５３．０歳（範囲：１８～１００歳）であった。最低でも、およそ３０％の参加者が≧６０歳であり、およそ２０％の参加者が≧１８歳～＜４０歳であるという意図されている登録目標が達成され、３４．６％の参加者が≧６０歳であり、２２．２％の参加者が≧１８歳～＜４０歳であった。合計で、参加者の２０．４％および３．７％がそれぞれ≧６５歳および≧７５歳であった。体格指数（ＢＭＩ）の中央値は、２６．９０ｋｇ／ｍ２（範囲：２．３；８２．６ｋｇ／ｍ^2）であった。

【０９８０】

完全な分析セット（ＦＡＳ、つまり、プロトコール逸脱の発生および登録時の血清状態を問わず、治験ワクチン投与が文書化されている無作為化参加者全員）では、参加者の９．６％がベースライン時にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２血清陽性であった。こうした参加者を、ＰＰセットから除外した。

【０９８１】

ＰＰセット全体では、参加者の３９．９％が、ベースライン時に重症ＣＯＶＩＤ－１９に進行するリスク増加に関連付けられる１つまたは複数の併存疾患を有していた。最も一般的な併存疾患は、肥満（２７．５％）、高血圧（１０．３％）、２型糖尿病（７．２％）、重症心臓状態（２．４％）、および喘息（１．３％）であった。参加者の＜１％に、他の併存疾患が存在してした。参加者の２．５％に、ＨＩＶ感染がベースライン時に報告された。

【０９８２】

有効性分析

ワクチン接種の少なくとも１４日後および少なくとも２８日後に生じたＣＯＶＩＤ－１９症例の数に基づく有効性分析の要約は、それぞれ表１および表２に提示されている。

【０９８３】

下記のセクションでは、別様に明記されていない限り、血清陰性参加者における確認されたＣＯＶＩＤ－１９症例に対するワクチン有効性が記載されている。エンドポイントが観察された症例が＜６例である場合、ＶＥは表示されない。

【０９８４】

本文、表、および図は、統計的仮説を評価した際に（主要エンドポイント、すべての症候性感染症［ＢＯＤ］エンドポイントに対するＶＥ、および重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９

に対するＶＥ、および医療介入を必要とするＣＯＶＩＤ－１９に対するＶＥ）、偽陽性抑制９５％信頼区間（ＣＩ）（「調整済みＣＩ」とも呼ばれる）を示し、それ以外の場合は、データは９５％ＣＩを使用して記述的に要約されている。

【０９８５】

分子的に確認されたＣＯＶＩＤ－１９を有する参加者の場合、追跡観察時間は、ワクチン接種から症例発症までの時間と規定される。確認されていないＣＯＶＩＤ－１９を有するすべての対象では、追跡観察時間は、ワクチン接種から最後の利用可能な測定（本研究で進行中の対象の場合）または研究中止／完了までの時間と規定される。確認されていない症例は、確認された症例および確認されていない症例を含む感度分析を除いて、すべての分析の追跡観察の算出では「非症例」して計数されていることに留意されたい。こうした分析では、確認されていない症例の追跡観察は、ワクチン接種と、任意の供給源からの陽性ＰＣＲ検査の時点との間の時間と規定される。

【０９８６】

この治験は、ＣＯＶＩＤ－１９パンデミックの最盛期に８か国および３地域で実施された。その間、疾患蔓延が世界中で加速し、人々がウイルスに曝露される機会の増加がもたらされ、感染性がより高い株を含む新型コロナウイルス株が出現していた（図１４５を参照）。

【０９８７】

【表１２】

表1:

TEFSUM01_A:ワクチン接種の少なくとも14日後に発症したCOVID-19に対するワクチン有効性の概要。パープロトコールセット(研究VAC31518COV3001)

	Ad26.5e10 vp		プラセボ				
	症例数	(N)人年	症例数	(N)人年	VE	95% CI	調整済み95% CI
分析セット:パープロトコールセット		(19630)		(19691)			
リスクセット[a]		(19514)		(19544)			
主要エンドポイント							
中等症および重症/重篤COVID-19	116	3116.57	348	3096.12	66.9%		(59.03; 73.40)
年齢18～59歳	95	2106.82	260	2094.97	63.7%	(53.87; 71.58)	
年齢≧60歳	21	1009.75	88	1001.15	76.3%	(61.58; 86.04)	
副次的エンドポイント							
任意の症候性COVID-19							
重症度	117	3116.46	351	3095.92	66.9%	(59.07; 73.37)	
軽症	1	3116.46	3	3095.92			
中等症	102	3116.57	288	3096.12	64.8%	(55.75; 72.21)	
重症/重篤	14	3125.05	60	3122.03	76.7%		(54.56; 89.09)
すべての症候性COVID (BOD)[b]	117	3116.46	351	3095.92	68.1%		(60.26; 74.32)
年齢18～59歳	95	2106.82	260	2094.97	65.8%	(56.22; 73.10)	
年齢≧60歳	22	1009.64	91	1000.95	74.5%	(57.91; 84.33)	
要医療介入	2	3125.92	8	3126.10	75.0%	(-25.28; 97.41)	
補完的エンドポイント							
未確認症例を含む主要エンドポイント	173	3113.88	509	3089.06	66.3%		(59.86; 71.79)
米国FDA統一COVID-19症例	114	3116.60	345	3096.30	67.2%	(59.32; 73.67)	

調整済みCIには、多重検定の1型エラー制御が実装されており、再検討した検定条件を満たした場合に提示される。
エンドポイントで観察された症例が6例未満の場合、VEは表示されることはない。
リスクセットは、1日目～14日目のPCR検査が陽性だった対象を除く、パープロトコールセットの全対象である。
BOD:疾病負担は、加重型の軽症、中等症、および重症/重篤ワクチン有効性である。
NE:評価不能

【０９８８】

【表１３】

表2:

TEFSUM01_C:ワクチン接種の少なくとも28日後に発症したCOVID-19に対するワクチン有効性の概要。パープロトコールセット(研究VAC31518COV3001)

	Ad26.5e10 vp		プラセボ			
	症例数	(N)人年	症例数	(N)人年	VE	95% CI	調整済み95% CI
分析セット:パープロトコールセット		(19630)		(19691)			
リスクセット[a]		(19306)		(19178)			
主要エンドポイント							
中等症および重症/重篤COVID-19	66	3102.00	193	3070.65	66.1%		(55.01; 74.80)
年齢18～59歳	52	2097.60	152	2077.01	66.1%	(53.30; 75.77)	
年齢≧60歳	14	1004.39	41	993.64	66.2%	(36.74; 82.99)	
副次的エンドポイント							
すべてのSARS-2感染症	71	3101.59	214	3069.58	67.2%	(56.86; 75.26)	
任意の症候性COVID-19重症度	66	3102.00	195	3070.53	66.5%	(55.50; 75.05)	
軽症	0	3102.00	2	3070.53			
中等症	61	3102.00	159	3070.65	62.0%	(48.68; 72.21)	
重症/重篤	5	3106.15	34	3082.58	85.4%		(54.15; 96.90)
無症候性SARS-2感染症	5	3101.59	19	3069.58	74.0%	(27.89; 92.40)	
すべての症候性COVID-(BOD)[b]	66	3102.00	195	3070.53	69.0%		(56.68; 77.64)
年齢18～59歳	52	2097.60	152	2077.01	69.3%	(57.42; 77.68)	
年齢≧60歳	14	1004.39	43	993.52	67.9%	(38.17; 82.77)	
要医療介入	0	3106.43	5	3084.42			
補完的エンドポイント							
未確認症例を含む主要エンドポイント	113	3100.26	324	3065.86	65.5%		(57.15; 72.41)
米国FDA統一COVID-19症例	65	3102.02	193	3070.58	66.7%	(55.63; 75.23)	

調整済みCIには、多重検定の型エラー制御が実装されており、再検討した検定条件を満たした場合に提示される。
エンドポイントで観察された症例が6例未満の場合、VEは表示されることはない。
[a]リスクセットは、1日目～28日目のPCR検査が陽性だった対象を除く、パープロトコールセットの全対象である。
[b]BOD:疾病負担は、加重型の軽症、中等症、および重症/重篤ワクチン有効性である。
NE:評価不能

【０９８９】

結果

この研究は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の発生率が非常に高く、新しい系統のウイルスが出現していた時期に、複数の地域（北米、南米、およびアフリカ）で高品質データをもたらした。

【０９９０】

この研究は、その共主要目的を達成した。

Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチンの単一用量は、中等症～重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９の予防に有効であり、ワクチン接種後１４日目および２８日目ではＶＥが６７％および６

６％であった。
【０９９１】
米国では、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチンの単一用量は、中等症～重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９の予防に有効であり、ワクチン接種後１４日目および２８日目ではＶＥが７７％および７２％であった。
【０９９２】
有効性の作用発現は、１４日目には明らかであり、特に重症疾患に対しては有効性が５６日目まで増加した。この知見は、利用可能な免疫原性結果と一致しており、１４日目以降には中和および結合性抗体価が検出され、これは５６日目まで増加し続け、８４日目まで漸減の兆候はなかった。
【０９９３】
ワクチン群の中等症ＣＯＶＩＤ－１９症例は、プラセボ群の中等症ＣＯＶＩＤ－１９症例よりも症状が少数であったことが報告された。
【０９９４】
こうした結果は、中央検査室で確認されたＰＣＲ＋症例のみを使用した場合でも、中央検査室による確認か否かに関わらずすべてのＰＣＲ＋症例を使用した場合でも、一貫していた。
【０９９５】
ワクチンの有効性は重症度と共に増加した。
重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９に対して高いワクチン有効性（２８日目以降、全体で８５％）が認められ、有効性は７日目という早い時期に観察された（１４日目時点では７７％）。
【０９９６】
この高いワクチン有効性は、ほとんどすべての症例がＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の新型バリアント（Ｂ．１．３５１）によるものであった（部分的に利用可能な配列データに基づく：４５／４８例がＢ．１．３５１に起因）南アフリカを含む国および地域にわたって一貫していた。
【０９９７】
入院、ＩＣＵ、ＥＣＭＯ、または人工呼吸器と規定される医療介入を必要とするＣＯＶＩＤ－１９エピソードを有する参加者の場合、１４日目以降にワクチン接種群では２例が報告されたのに対してプラセボ群では８例が報告され、２８日以降では症例が報告されなかったのに対して５例が報告された。過少報告の可能性についての調査が進行中である。
【０９９８】
ＣＯＶＩＤ－１９死亡確認（５人）はすべて、プラセボ群で生じた。
【０９９９】
共主要エンドポイントは、プラセボと比較して、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓによるワクチン接種の少なくとも２８日後および少なくとも１４日後に発症した、血清陰性参加者における確認された中等症～重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９症例の発生であった。主要エンドポイント結論の成功には、ＶＥが＞３０％であり、点推定値が≧５０％であり、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ群とプラセボ群との分割が好ましく、プラセボ群には少なくとも５症の重症症例があることが必要であった。一次分析の時点では、ＰＰセットには、ワクチン接種の少なくとも２８日後に生じた２５９例の中等症～重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９症例および少なくとも１４日後に生じた４６４例があった。一次分析成功のための事前指定の基準（上記を参照）が、共主要エンドポイントの両方に関して満たされていたため、ワクチン接種の１４日後以降、中等症および重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９に対するＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの有効性が確立された。
【１０００】
ワクチン接種の少なくとも２８日後に生じた中等症～重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９に対するＶＥ（調整済み９５％ＣＩ）は６６．１％（５５．０１；７４．８０）であり、ワクチン接種の少なくとも１４日後に評価した場合は６６．９％（５９．０３；７３．４０）

であった。ワクチン接種の少なくとも２８日後に生じた症例の症例分割は、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ群対プラセボ群でそれぞれ６６対１９３であった。ワクチン接種の少なくとも１４日後に生じた症例では、それぞれ１１６例および３４８例であった。ワクチン接種の少なくとも２８日後および少なくとも１４日後に生じた重症／重篤症例の症例分割は、それぞれ５対３４および１４対６０であった。

【１００１】

補完的分析では、中等症～重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９に対するＶＥを、年齢区分（≧１８～＜６０歳、≧６０歳）毎に評価した。≧６０歳の参加者のＶＥ（ＣＩ）は、＜６０歳の成人参加者と比較して、少なくとも等しく高かった：≧６０歳の参加者ではそれぞれ６６．２％（３６．７４；８２．９９）および７６．３％（６１．５８；８６．０４）が、＜６０歳の参加者ではそれぞれ６６．１％（５３．３０；７５．７７）および６３．７％（５３．８７；７１．５８）が、ワクチン接種の少なくとも２８日後および少なくとも１４日後に発症した。ベースラインＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２血清状態ならびに人口統計学的およびベースライン特徴による追加の部分群分析については、下記で考察されている。

【１００２】

確認された中等症～重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９に対する保護の早期作用発現は、図１４２および図１４３で明らかであり、図には、ワクチン接種の少なくとも１日後に発症した、初発の確認された中等症～重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９の累積発生率が示されている。累積分布曲線は、ワクチン接種の約１４日後にＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ群とプラセボ群との間で分離し始め、ＶＥは５６日目まで増加し続け、８５日目まで漸減する兆候はない。これは、１５日目以降に中和抗体反応が観察され、５７日目までＧＭＴおよび応答者のパーセンテージが増加したという第１相治験における知見と一致する。

【１００３】

重症疾患に対する有効性は時間の経過と共に増加し、４９日目以降にはワクチン接種参加者での症例は報告されなかった。

【１００４】

ワクチン接種の少なくとも２８日後および少なくとも１４日後に生じたそれぞれ２５９例および４６４例の中等症～重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９症例のうち、３９例および７４例は重症／重篤であり、２２０例および３９０例は中等症であった。加えて、分析の締め切り日までに、ワクチン接種の少なくとも２８日後および１４日後に発症したそれぞれ２例および４例の軽症ＣＯＶＩＤ－１９症例が報告された。

【１００５】

重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９に対するワクチンの有効性

重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９に対するワクチン有効性を、ＶＥ＜０％の帰無仮説に対して統計的に試験した。ワクチン接種の少なくとも２８日後に発症した症例ならびに少なくとも１４日後に発症した症例に基づき、事前指定の成功基準が満たされたため（調整済み９５％ＣＩは＞０）、重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９に対する有効性は、ワクチン接種の１４日後から確立されていた。ワクチン接種の少なくとも２８日後および１４日後に生じた重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９に対するＶＥ（ＣＩ）は、それぞれ８５．４％（５４．１５；９６．９０）および７６．７％（５４．５６；８９．０９）であった。

【１００６】

ワクチン接種の少なくとも１日後に発症した初発の重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９の累積発生率は、図１４４に示されており、重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９に対する保護の早期作用発現を示している。累積分布曲線は、ワクチン接種の約７日後にＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ群とプラセボ群との間で分離し始め、ＶＥは５６日目まで増加する。

【１００７】

ワクチン接種の少なくとも２８日後に医療介入（入院、ＩＣＵ入室、人工呼吸器、ＥＣＭＯ）を必要としたかまたは一次死亡をもたらした、ＥＮＳＥＭＢＬＥにおける確認されたＣＯＶＩＤ－１９症例はすべてが、プラセボを受けた参加者で生じた。

【１００８】

中等症および軽症ＣＯＶＩＤ－１９に対するワクチン有効性

ワクチン接種の少なくとも２８日後および少なくとも１４日後に生じた中等症ＣＯＶＩＤ１９に対するＶＥ（ＣＩ）は、それぞれ６２．０％（４８．６８；７２．２１）および６４．８％（５５．７５；７２．２１）であった。軽症ＣＯＶＩＤ－１９症例（＜６症例）の場合、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓとプラセボ群との間の分割は好ましく、ワクチン接種の少なくとも２８日後にはそれぞれ０および２症例が生じ、ワクチン接種の少なくとも１４日後にはそれぞれ１および３症例が生じた。

【１００９】

【表１４】

表3: ワクチン接種の少なくとも14日後に発症した中等症COVID-19に対するワクチン有効性の概要;中等症症状数によるパープロトコールセット

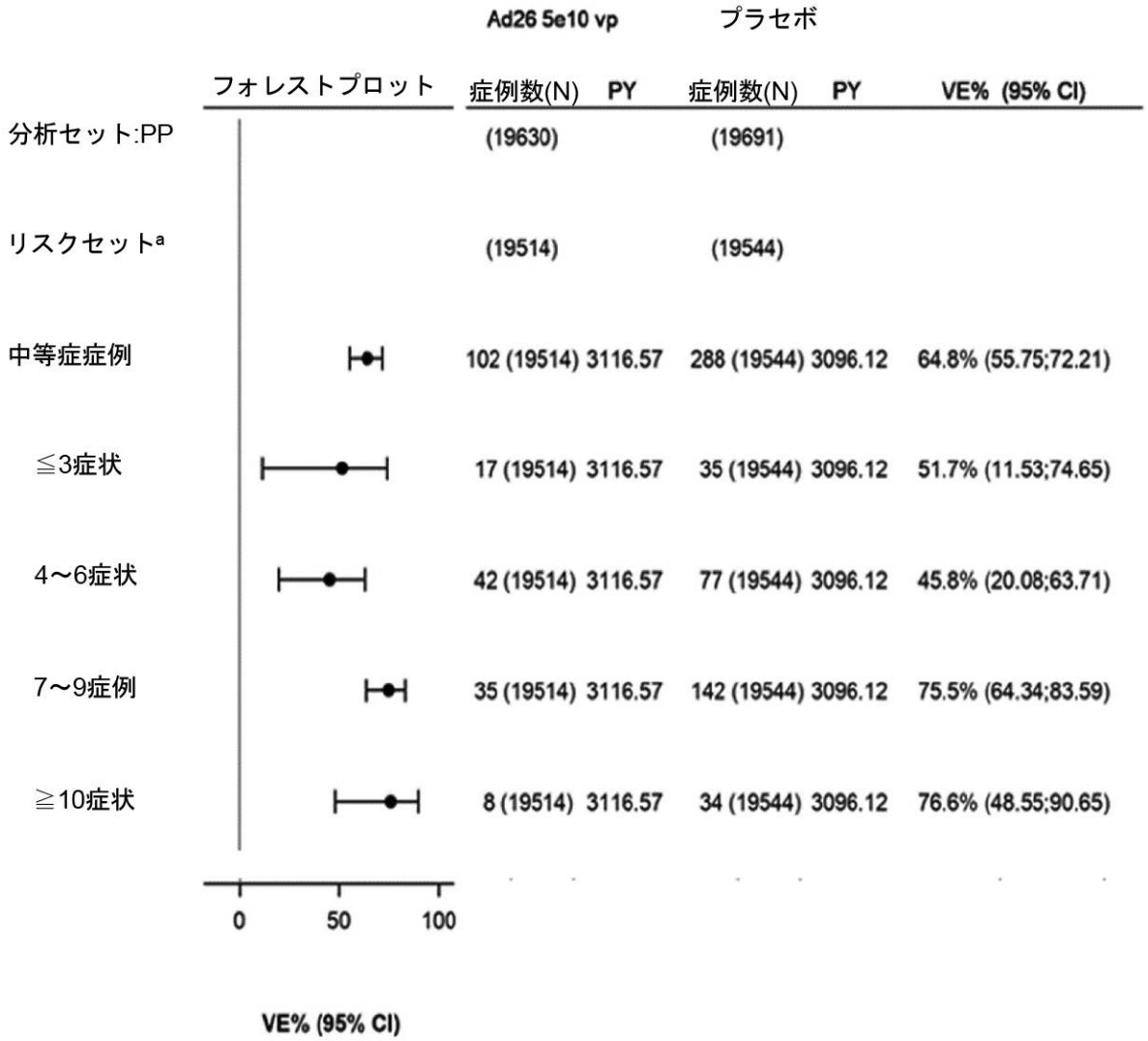


表3: ワクチン接種の少なくとも14日後に発症した中等症COVID-19に対するワクチン有効性の概要; 中等症症状数によるパープロトコールセット

【１０１０】

【表１５】

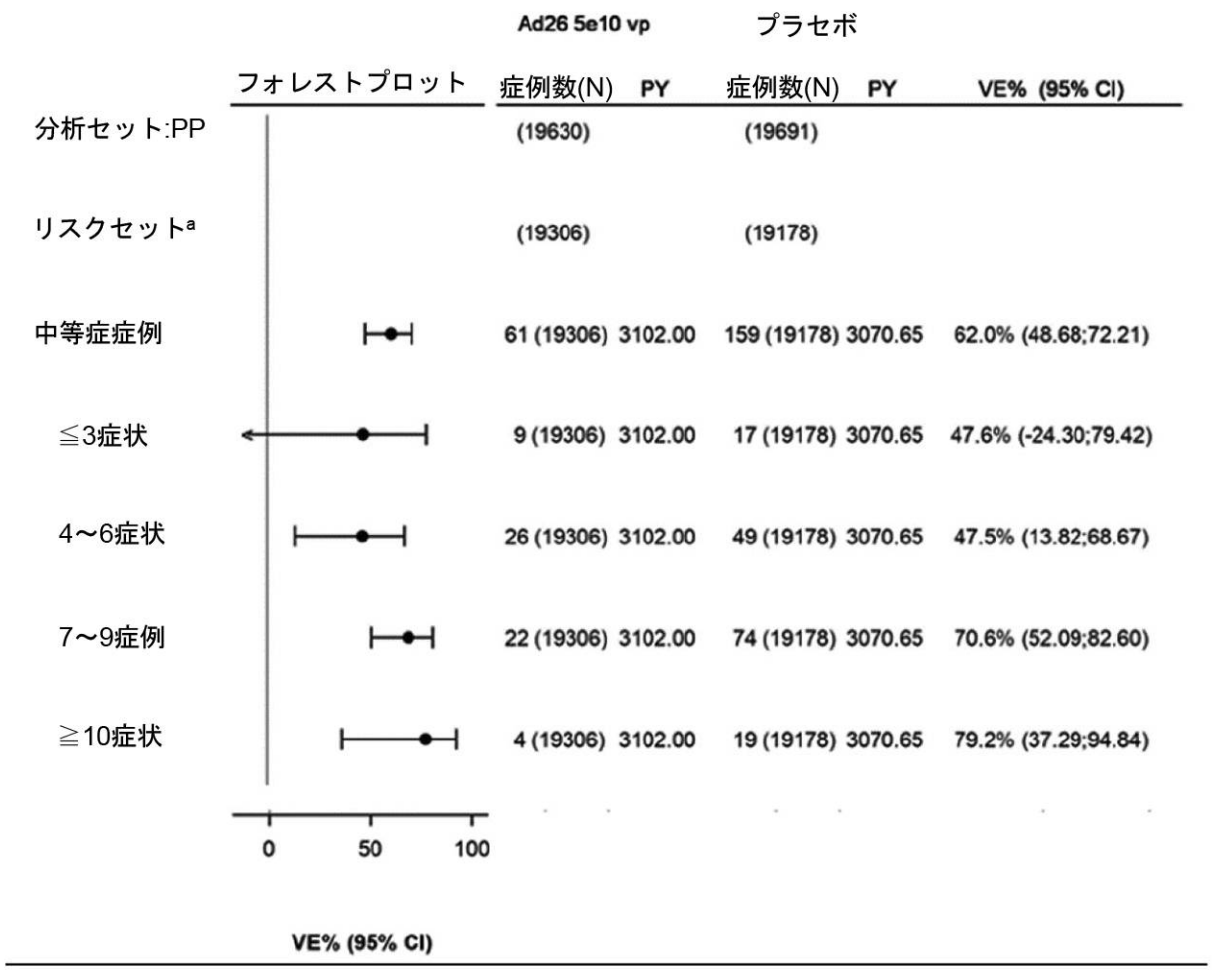


表4: ワクチン接種の少なくとも28日後に発症した中等症COVID-19に対するワクチン有効性の概要; 中等症症状数によるパープロトコールセット(研究VAC31518COV3001)

【１０１１】

ワクチン群の中等症ＣＯＶＩＤ－１９症例は、プラセボ群の中等症ＣＯＶＩＤ－１９症例よりも症状が少数であると報告され、ブレークスルー感染（区分は「中等症疾病」）の場合、ワクチン接種を受けた人はプラセボを受けた人よりも症状が有意に少なかったことが示された。

【１０１２】

症候性ＣＯＶＩＤ－１９に対するワクチン有効性

すべての症候性ＣＯＶＩＤ－１９症例を考慮すると、重症度に関わりなく、ワクチン接種の少なくとも２８日後およびワクチン接種の少なくとも１４日後に発症した合計で２８５例および４６８例の症候性ＣＯＶＩＤ－１９症例が報告された。すべての症候性ＣＯＶＩＤ－１９に対するＶＥを、症候性ＣＯＶＩＤ－１９の予防に対する重症度調整済みＶＥが評価されるＢＯＤエンドポイントにより評価した。重症感染症にはより大きな重みが割り当てられており（重症症例にはスコア２、非重症症例には１が与えられる）、したがって、ＢＯＤエンドポイントは、重症感染症に対する保護の増加を示すプラセボワクチンと区別するためにより高い統計的検出能力を提供することが目的である。ワクチン接種の少なくとも２８日後および少なくとも１４日後に生じたすべての症候性ＣＯＶＩＤ－１９に対するＶＥを、ＢＯＤエンドポイントにより測定したところ、それぞれ６９．０％（５６．６８、７７．６４）および６８．１％（６０．２６、７４．３２）であった。調整済み９５％ＣＩの下限は、両エンドポイントで＞０であるため、事前指定の成功基準が満たされており、したがって、すべての症候性ＣＯＶＩＤ－１９に対するＡｄ２６．ＣＯＶ２．

Ｓの有効性は、ワクチン接種の１４日後からそれ以降確立されていた。
【１０１３】
重症疾患に対するＶＥは、中等症および軽症疾患に対するＶＥと比較してより高かったため、すべての重症度を等しく重み付けした、すべての症候性ＣＯＶＩＤ－１９に対するＶＥは、重症度調整済みＶＥと比較してわずかにより低かった：ワクチン接種の少なくとも２８日後および少なくとも１４日後に生じた症例に基づき、それぞれ６６．５％（５５．５０；７５．０５）および６６．９％（５９．０７；７３．３７）。
【１０１４】
米国ＦＤＡ統一定義によるＣＯＶＩＤ－１９に対するＶＥは、すべての症候性ＣＯＶＩＤ－１９に対して観察されたＶＥと一致していた：ワクチン接種の少なくとも２８日後および少なくとも１４日後でそれぞれ６６．７％（５５．６３；７５．２３）および６７．２％（５９．３２；７３．６７）。
【１０１５】
無症候性または未検出症例を含むすべてのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染症
確認された無症候性または未検出ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染症の発生に対するＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの効果を、ＥＬＩＳＡおよび／またはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｎタンパク質に依存するＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２免疫グロブリンアッセイを使用して評価した。血清学的転換を、１日目（ワクチン接種前）と、ワクチン接種の７１日目、６か月後、および１年後との間で評価中である。加えて、１日目（ワクチン接種前）とワクチン接種後２９日目との間の血清学的転換を評価する。中間解析の時点では、７１日目および２９日目の限定的なデータしか利用可能でなかった。ワクチン接種の少なくとも２８日後に生じた無症候性ＣＯＶＩＤ－１９感染症に対するワクチン有効性（ＣＩ）は、７４．０％（２７．８９；９２．４０）であった（表５を参照）。
【１０１６】

【表１６】

表5:

TEFSUM02C: 29日目の無症候性/未検出SARS-CoV-2感染症に対するワクチン有効性の概要(研究VAC31518COV3001)

	Ad26.5e10.vp		プラセボ			
	症例数	(N)/人-年	症例数	(N)/人-年	VE	95% CI
分析セット:パープロトコールセット		(19630)		(19691)		
リスクセット		(19306)		(19178)		
無症候性SARS-CoV-2感染症(>29日目)[b]						
	5	3101.59	19	3069.58	74.0%	(27.89; 92.40)
以前の症状がない無症候性SARS-CoV-2感染症(>29日目)[b,d]	0	3100.95	12	3068.54	100.0%	(64.39; 100.00)
血清学リスクセット[a]		(486)		(479)		
血清変換COVID-(>29日目)[c]	2	132.46	16	128.88	87.8%	(48.27; 98.64)
以前の症状がない血清変換COVID-(>29日目)[c,d]	0	132.08	12	128.22	100.0%	(65.06; 100.00)

血清学セット: 71日目に利用可能な非Sタンパク質結果を有する患者。
SAPに記載のアルゴリズムにより検出される兆候および症状に基づき、患者がCOVID-19の疑いに関する基準を満たさず、RT-PCRまたは分子検査がSARS-CoV-2陽性であるかまたは血清学(非Sタンパク質)検査の陽性を生じさせる場合、患者は、無症候性または未検出COVID-19を経験したとみなされる。
患者が、以前の症状が生じたか否かに関わりなく、血清学(非Sタンパク質)検査陽性を生じさせ、血清学検査の陽性前にRT-PCRがSARS-CoV-2陽性でない場合、患者は、血清学的に変換されたとみなされる。
患者は、研究中の任意の時点でPCRまたは血清学検査が陽性になる前にCOVID-19の症状が生じなかった場合、以前の症状を有しないとみなされる。

[TEFSUM02C.RTF] [VAC31518VAC31518COV3001DBR_IA_PRIMARY\RE_IA_PRIMARY\PREPROD\TEFSUM02C.SAS] 27JAN2021, 09:02

【１０１７】

ワクチン接種の少なくとも２８日後に発症するすべてのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染症（血清学的におよび／または分子的に確認された症候性感染と無症候性感染との組合せ）の予防におけるＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓのワクチン有効性（ＣＩ）は、６７．２％（５６．８６；７５．２６）であった（上記の表２を参照）。

【１０１８】

部分群分析

年齢（１８～５９歳および≧６０歳）、併存疾患の存在／非存在（喘息、がん、脳血管疾患、嚢胞性線維症、慢性腎臓疾患、ＣＯＰＤ、重症心臓状態、高血圧、肝臓疾患、神経

学的状態、肥満、肺線維症、鎌状赤血球貧血、１型もしくは２型糖尿病、またはサラセミアを含む）、年齢および併存疾患、性別（男性／女性）、国（アルゼンチン、ブラジル、チリ、コロンビア、メキシコ、ペルー、米国、または南アフリカ）、人種（アメリカ先住民／アラスカ先住民、アジア人、黒人またはアフリカ系アメリカ人、ハワイ先住民／他、白人、混血）、民族（ラテンアメリカ系／ラテン系、非ラテンアメリカ系／ラテン系）、地域（ラテンアメリカ、北アメリカ、および南アフリカ）、およびＨＩＶ状態を含む、人口統計学的特徴およびベースライン特徴による、ワクチン接種の少なくとも２８日後および少なくとも１４日後に発症した、分子的に確認された中等症～重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９に対する有効性分析が進行中である。暫定結果を以下に示す。

【１０１９】

部分群の中等症／重症疾患および重症疾患に対するワクチン有効性（ＶＥ）：

ワクチンは、年齢群全体にわたって有効であり、中等症／重症疾患に対する推定ワクチン有効性は、１４日目後で少なくとも６４％、２８日目後で少なくとも６６％である。

【１０２０】

ワクチンは、併存疾患の有無に関わらず参加者全体で有効であり、中等症／重症疾患に対する推定ワクチン有効性は、併存疾患を有する群では、１４日目後で少なくとも６３％であり、２８日目後で少なくとも４９％である。中央検査室による確認か否かを問わずすべてのＰＣＲ＋を含む補完分析では、１４日目後で少なくとも６４％および２８日目後で少なくとも５９％であることが示されている。併存疾患を有する部分群と有しない部分群との間で観察される可能性のある差異を理解するには、より多くの追跡観察データが必要である。

【１０２１】

ワクチン有効性は、黒人／アフリカ系アメリカ人対白人、およびラテンアメリカ系対非ラテンアメリカ系で一貫していた。

【１０２２】

重症疾患に対するワクチン有効性は、十分なデータが利用可能な国（南アフリカ、コロンビア）では、１４日目の時点で明らかであり、２８日目にはおよそ８５％またはそれよりも高かった。

【１０２３】

中等症および重症ＣＯＶＩＤ－１９感染症に対する保護のレベルは、ワクチン接種の２８日後で、米国では７２％、ラテンアメリカでは６６％、および南アフリカでは５７％であった。

【１０２４】

異なるウイルス株に対するワクチン有効性

研究期間中、研究に含まれていた国で様々な突然変異バリアントが識別された。例えば、南アフリカでは、ＣＯＶＩＤ－１９感染症の原因株の大多数がバリアント５０１Ｙ．Ｖ２（ＲＳＡバリアント）であり、特にそうした株のうち９４％（配列決定された４５／４８株）が、Ｂ．１．３５１（５０１Ｙ．Ｖ２）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２系列のものであった。

【１０２５】

ワクチン接種の少なくとも２８日後に発症した初発の分子的に確認された中等症～重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９に対するワクチン有効性は、バリアントＢ１．３５１（５０１Ｙ突然変異を有する）およびＥ４８４Ｋ突然変異を有するバリアントに対して６７．０（－８．８７－９２．２４）であった。

【１０２６】

単一Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ　５×１０^{10}ｖｐ用量後２９日目までの体液性免疫原性

ウイルスＳタンパク質の、中和抗体の既知標的である領域に突然変異を有するＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスバリアントの台頭に鑑み、ワクチンインサートに対するＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの免疫原性を、感染率の高い２つの無作為選択されたブラジルの施設、ならびに他の無作為のブラジル、南アフリカ、および米国の施設からの試料を使用して、ワク

チン接種後の１日目および２９日目にＳ－ＥＬＩＳＡにより評価した。
【１０２７】
全体として、ブラジル、南アフリカ、および米国の参加者の間で、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓにより誘導される結合性抗体レベルに差異は観察されなかった。ブラジルの参加者の結合性抗体濃度（２９日目のＧＭＣ）は、ブラジル施設ＢＲ１０００３では３１７（９５％ＣＩ　２２７；４４４）～ブラジル施設ＢＲ１０００４での４７３（９５％ＣＩ　２６８；８３６）の範囲であった。南アフリカおよび米国の参加者の結合性抗体濃度は、それぞれ３８８（９５％ＣＩ　２９７；５０６）および４１２（９５％ＣＩ　３０６；５５４）の２９日目のＧＭＣと同様であった。
【１０２８】
応答者率は、３か国すべての施設で類似しており、活性ワクチン群では＞９３％であった。これはベースラインの６倍～９．３倍の幾何平均の増加を表している。
【１０２９】
ＧＭＲ（米国の参加者との比較）は、ブラジルの施設では０．７７（９５％ＣＩ　０．４９；１．２０）～１．１５（９５％ＣＩ　０．６４；２．０７）であり、南アフリカの施設では０．９４（９５％ＣＩ　０．６３；１．４２）であった。
【１０３０】
ＣＯＶ１００１データと比較すると、すべての国で同様のＧＭＣが観察された。
【１０３１】
要約すると、この暫定分析では、以下のことが示された。
Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの単一用量は、≧６０歳成人を含む≧１８歳成人をＣＯＶＩＤ１９に対して保護する。Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓを受けた参加者１９，６３０人およびプラセボを受けた参加者１９，６９１人を含むこのピボタル研究の一次有効性分析に基づくと、ワクチン接種時に血清陰性であった参加者における、分子的に確認された中等症～重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９に対する共主要エンドポイントのワクチン有効性（調整済み９５％ＣＩ）は、ワクチン接種の少なくとも１４日後からの症例を考慮すると６６．９％（５９．０３；７３．４０）であり、ワクチン接種の少なくとも２８日後からの症例を考慮すると６６．１％（５５．０１；７４．８０）であった。
【１０３２】
単一Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ用量の少なくとも２８日後および１４日後に生じた重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９に対するＶＥは、それぞれ８５．４％（５４．１５；９６．９０）および７６．７％（５４．５６；８９．０９）であり、２８日目後の１８～５９歳では９０％を超える有効性であった。この知見は、ほとんどすべての症例がＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（５０１Ｙ．Ｖ２）の新しいバリアントによる感染であった南アフリカを含む国および地域（北アメリカ、南アメリカ、南アフリカ）にわたって一貫していた。
【１０３３】
１４日目には有効性の作用発現が推定され、有効性は、特に重症疾患に対して５６日目まで増加した。この知見は、１４日目以降に検出された中和および結合性抗体価が５６日目まで増加し続け、８５日目まで漸減の兆候がなかったという免疫学的知見と一致している。
【１０３４】
すべての症候性疾患に対するワクチン有効性は、主要エンドポイントと一致していた。単一Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ用量の少なくとも２８日後および少なくとも１４日後に生じた、軽症、中等症、および重症／重篤ＶＥを含む重症度調整済み加重分析（ＢＯＤ）により測定した、すべての症候性ＣＯＶＩＤ－１９に対するワクチン有効性は、それぞれ６９．０％および６８．１％であった。それぞれワクチン接種の少なくとも２８日後および少なくとも１４日後に生じた重症／重篤ＣＯＶＩＤ－１９に対する有効性（８５．４％および７６．７％）は、中等症ＣＯＶＩＤ－１９に対する有効性（６２．０％および６４．８％）よりも高かった。非加重分析は、こうした結果と一致していた。
【１０３５】

ＣＯＶＩＤ－１９ワクチン接種の主な標的集団、例えば、高齢成人および併存疾患を有する（高齢）成人におけるワクチン有効性は、集団全体で観察された有効性と一致している。概して、記述的部分群分析は、ワクチン接種時の年齢群、性別、人種／民族、地理、併存疾患、併存疾患と組み合わせた年齢にわたってＡｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓワクチン有効性に差異がないことを明らかにしている。

【１０３６】

暫定データは、無症候性ＰＣＲ＋結果および血清学的転換により評価した、無症候性感染症に対するワクチン効果を示唆する。ワクチン接種の少なくとも２８日後に生じた無症候性ＣＯＶＩＤ－１９感染症に対するワクチン有効性（ＣＩ）は、７４．０％（２７．８９；９２．４０）であった。

【１０３７】

加えて、Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓの安全性および反応原性プロファイルは、他のＡｄ２６ベースワクチンと一致する。第１相および第２相Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ治験における発熱の頻度は、特に若年成人で、以前に観察されたものよりも高かったが、この知見は大規模第３相Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ治験では再現されなかった。Ａｄ２６．ＣＯＶ２．Ｓ反応原性は、明らかに一過性であり、１～２日以内に解消される。ワクチン接種後、必要に応じて症状の緩和のために解熱剤を使用することができる。

【１０３８】

配列

＞ＣＯＲ２０００００７＿配列番号２０５

【１０３９】

【化１】

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHV
SGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPF
LGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPI
NLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYN
ENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASV
YAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIAD
YNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYF
PLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFL
PFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLT
PTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPSRAGSVASQSIIAYTMSLG
AENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGI
AVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDC
LGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIG
VTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDI
LSRLDPPEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLM
SFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNT
FVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVA
KNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDD
SEPVLKGVKLHYT

＞ＣＯＲ２０００００８＿配列番号２０６

【１０４０】

【化２】

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHV
SGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPF
LGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPI
NLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYN
ENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASV
YAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIAD
YNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYF
PLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFL
PFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLT
PTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPSRAGSVASQSIIAYTMSLG
AENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGI
AVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDC
LGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIG
VTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDI
LSRLDPPEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLM
SFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNT
FVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVA
KNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDD
SEPVLKGV

＞ＣＯＲ２０００９＿配列番号２０７

【１０４１】

【化３】

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSAQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSN
VTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVC
EFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYF
KIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQ
PRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEV
FNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIA
PGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCN
GVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGV
LTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVP
VAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQS
IIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCT
QLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADA
GFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQ
MAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFG
AISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVD
FCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYE
PQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQK
EIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCG
SCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT

＞ＣＯＲ２０００１０＿配列番号２０８

【１０４２】

【化４】

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSAQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSN
VTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVC
EFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYF
KIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQ
PRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEV
FNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIA
PGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCN
GVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGV
LTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVP
VAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPSRAGSVASQS
IIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCT
QLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADA
GFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQ
MAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFG
AISSVLNDILSRLDPPEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVD
FCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYE
PQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQK
EIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCG
SCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT

＞ＣＯＲ２０００１１＿配列番号２０９

【１０４３】

【化５】

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSAQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSN
VTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVC
EFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYF
KIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQ
PRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEV
FNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIA
PGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCN
GVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGV
LTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVP
VAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPSRAGSVASQS
IIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCT
QLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADA
GFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQ
MAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFG
AISSVLNDILSRLDPPEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVD
FCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYE
PQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQK
EIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCG
SCCKFDEDDSEPVLKGV

＞ＣＯＲ２０００１８＿配列番号２１０

【１０４４】

【化６】

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSASQEIHARFRRFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYP
DKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTT
LDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDL
EGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYL
TPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFR
VQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLND
LCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKS
NLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKK
STNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVIT
PGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAG
ICASYQTQTNSPRRARSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCT
MYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDP
SKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLA
GTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQ
DVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIR
ASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHF
PREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNH
TSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVM
VTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT

＊太字下線部：理論上のシグナルペプチド配列
＞ＣＯＲ２０００７＿配列番号２１１
【１０４５】

【化７】

ATGTTCGTGTTTCTGGTACTGCTCCCCCTCGTCTCCAGTCAATGCGTGAACCTGACCACAAGAACCCAGC
TGCCTCCAGCCTACACCAACAGCTTTACCAGAGGCGTGTACTACCCCGACAAGGTGTTCAGATCCAGCGT
GCTGCACTCTACCCAGGACCTGTTCCTGCCTTTCTTCAGCAACGTGACCTGGTTCCACGCCATCCACGTG
TCCGGCACCAATGGCACCAAGAGATTCGACAACCCCGTGCTGCCCTTCAACGACGGGGTGTACTTTGCCA
GCACCGAGAAGTCCAACATCATCAGAGGCTGGATCTTCGGCACCACACTGGACAGCAAGACCCAGAGCCT
GCTGATCGTGAACAACGCCACCAACGTGGTCATCAAAGTGTGCGAGTTCCAGTTCTGCAACGACCCCTTC
CTGGGCGTCTACTATCACAAGAACAACAAGAGCTGGATGGAAAGCGAGTTCCGGGTGTACAGCAGCGCCA
ACAACTGCACCTTTGAATACGTGTCCCAGCCTTTCCTGATGGACCTGGAAGGCAAGCAGGGCAACTTCAA
GAACCTGCGCGAGTTCGTGTTCAAGAACATCGACGGCTACTTCAAGATCTACAGCAAGCACACCCCTATC
AACCTCGTGCGGGATCTGCCTCAGGGCTTCTCTGCTCTGGAACCCCTGGTGGATCTGCCCATCGGCATCA
ACATCACCCGGTTTCAGACACTGCTGGCCCTGCACAGAAGCTACCTGACACCTGGCGATAGCAGCAGCGG
ATGGACAGCTGGTGCCGCCGCTTACTATGTGGGCTACCTGCAGCCTAGAACCTTTCTGCTGAAGTACAAC
GAGAACGGCACCATCACCGACGCCGTGGATTGTGCTCTGGATCCTCTGAGCGAGACAAAGTGCACCCTGA
AGTCCTTCACCGTGGAAAAGGGCATCTACCAGACCAGCAACTTCCGGGTGCAGCCCACCGAATCCATCGT
GCGGTTCCCCAATATCACCAATCTGTGCCCCTTCGGCGAGGTGTTCAATGCCACCAGATTCGCCTCTGTG
TACGCCTGGAACCGGAAGCGGATCAGCAATTGCGTGGCCGACTACTCCGTGCTGTACAACTCCGCCAGCT
TCAGCACCTTCAAGTGCTACGGCGTGTCCCCTACCAAGCTGAACGACCTGTGCTTCACAAACGTGTACGC
CGACAGCTTCGTGATCCGGGGAGATGAAGTGCGGCAGATTGCCCCTGGACAGACTGGCAAGATCGCCGAC
TACAACTACAAGCTGCCCGACGACTTCACCGGCTGTGTGATTGCCTGGAACAGCAACAACCTGGACTCCA
AAGTCGGCGGCAACTACAATTACCTGTACCGGCTGTTCCGGAAGTCCAATCTGAAGCCCTTCGAGCGGGA
CATCTCCACCGAGATCTATCAGGCCGGCAGCACCCCTTGTAACGGCGTGGAAGGCTTCAACTGCTACTTC
CCACTGCAGTCCTACGGCTTTCAGCCCACAAATGGCGTGGGCTATCAGCCCTACAGAGTGGTGGTGCTGA
GCTTCGAACTGCTGCATGCCCCTGCCACAGTGTGCGGCCCTAAGAAAAGCACCAATCTCGTGAAGAACAA
ATGCGTGAACTTCAACTTCAACGGCCTGACCGGCACCGGCGTGCTGACAGAGAGCAACAAGAAGTTCCTG
CCATTCCAGCAGTTTGGCCGGGATATCGCCGATACCACAGACGCCGTTAGAGATCCCCAGACACTGGAAA
TCCTGGACATCACCCCTTGCAGCTTCGGCGGAGTGTCTGTGATCACCCCTGGCACCAACACCAGCAATCA
GGTGGCAGTGCTGTACCAGGACGTGAACTGTACCGAAGTGCCCGTGGCCATTCACGCCGATCAGCTGACA
CCTACATGGCGGGTGTACTCCACCGGCAGCAATGTGTTTCAGACCAGAGCCGGCTGTCTGATCGGAGCCG
AGCACGTGAACAATAGCTACGAGTGCGACATCCCCATCGGCGCTGGCATCTGTGCCAGCTACCAGACACA
GACAAACAGCCCCAGCAGAGCCGGATCTGTGGCCAGCCAGAGCATCATTGCCTACACAATGTCTCTGGGC
GCCGAGAACAGCGTGGCCTACTCCAACAACTCTATCGCTATCCCCACCAACTTCACCATCAGCGTGACCA
CAGAGATCCTGCCTGTGTCCATGACCAAGACCAGCGTGGACTGCACCATGTACATCTGCGGCGATTCCAC
CGAGTGCTCCAACCTGCTGCTGCAGTACGGCAGCTTCTGCACCCAGCTGAATAGAGCCCTGACAGGGATC
GCCGTGGAACAGGACAAGAACACCCAAGAGGTGTTCGCCCAAGTGAAGCAGATCTACAAGACCCCTCCTA
TCAAGGACTTCGGCGGCTTCAATTTCAGCCAGATTCTGCCCGATCCTAGCAAGCCCAGCAAGCGGAGCTT
CATCGAGGACCTGCTGTTCAACAAAGTGACACTGGCCGACGCCGGCTTCATCAAGCAGTATGGCGATTGT
CTGGGCGACATTGCCGCCAGGGATCTGATTTGCGCCCAGAAGTTTAACGGACTGACAGTGCTGCCTCCTC
TGCTGACCGATGAGATGATCGCCCAGTACACATCTGCCCTGCTGGCCGGCACAATCACAAGCGGCTGGAC
ATTTGGAGCTGGCGCCGCTCTGCAGATCCCCTTTGCTATGCAGATGGCCTACCGGTTCAACGGCATCGGA
GTGACCCAGAATGTGCTGTACGAGAACCAGAAGCTGATCGCCAACCAGTTCAACAGCGCCATCGGCAAGA
TCCAGGACAGCCTGAGCAGCACAGCAAGCGCCCTGGGAAAGCTGCAGGACGTGGTCAACCAGAATGCCCA
GGCACTGAACACCCTGGTCAAGCAGCTGTCCTCCAACTTCGGCGCCATCAGCTCTGTGCTGAACGATATC
CTGAGCAGACTGGACCCTCCTGAGGCCGAGGTGCAGATCGACAGACTGATCACCGGAAGGCTGCAGTCCC
TGCAGACCTACGTTACCCAGCAGCTGATCAGAGCCGCCGAGATTAGAGCCTCTGCCAATCTGGCCGCCAC
CAAGATGTCTGAGTGTGTGCTGGGCCAGAGCAAGAGAGTGGACTTTTGCGGCAAGGGCTACCACCTGATG
AGCTTCCCTCAGTCTGCCCCTCACGGCGTGGTGTTTCTGCACGTGACATATGTGCCCGCTCAAGAGAAGA
ATTTCACCACCGCTCCAGCCATCTGCCACGACGGCAAAGCCCACTTTCCTAGAGAAGGCGTGTTCGTGTC
CAACGGCACCCATTGGTTCGTGACACAGCGGAACTTCTACGAGCCCCAGATCATCACCACCGACAACACC
TTCGTGTCTGGCAACTGCGACGTCGTGATCGGCATTGTGAACAATACCGTGTACGACCCTCTGCAGCCCG
AGCTGGACAGCTTCAAAGAGGAACTGGACAAGTACTTTAAGAACCACACAAGCCCCGACGTGGACCTGGG
CGATATCAGCGGAATCAATGCCAGCGTCGTGAACATCCAGAAAGAGATCGACCGGCTGAACGAGGTGGCC
AAGAATCTGAACGAGAGCCTGATCGACCTGCAAGAACTGGGAAAATACGAGCAGTACATCAAGTGGCCTT
GGTACATCTGGCTGGGCTTTATCGCCGGACTGATTGCCATCGTGATGGTCACAATCATGCTGTGTTGCAT
GACCAGCTGCTGTAGCTGCCTGAAGGGCTGTTGTAGCTGTGGCAGCTGCTGCAAGTTCGACGAGGACGAT
TCTGAGCCCGTGCTGAAGGGCGTGAAACTGCACTACACA

＞ＣＯＲ２０００００８＿配列番号２１２

【１０４６】

【化８】

ATGTTCGTGTTTCTGGTACTGCTCCCCCTCGTCTCCAGTCAATGCGTGAACCTGACCACAAGAACCCAGC
TGCCTCCAGCCTACACCAACAGCTTTACCAGAGGCGTGTACTACCCCGACAAGGTGTTCAGATCCAGCGT
GCTGCACTCTACCCAGGACCTGTTCCTGCCTTTCTTCAGCAACGTGACCTGGTTCCACGCCATCCACGTG
TCCGGCACCAATGGCACCAAGAGATTCGACAACCCCGTGCTGCCCTTCAACGACGGGGTGTACTTTGCCA
GCACCGAGAAGTCCAACATCATCAGAGGCTGGATCTTCGGCACCACACTGGACAGCAAGACCCAGAGCCT
GCTGATCGTGAACAACGCCACCAACGTGGTCATCAAAGTGTGCGAGTTCCAGTTCTGCAACGACCCCTTC
CTGGGCGTCTACTATCACAAGAACAACAAGAGCTGGATGGAAAGCGAGTTCCGGGTGTACAGCAGCGCCA
ACAACTGCACCTTTGAATACGTGTCCCAGCCTTTCCTGATGGACCTGGAAGGCAAGCAGGGCAACTTCAA
GAACCTGCGCGAGTTCGTGTTCAAGAACATCGACGGCTACTTCAAGATCTACAGCAAGCACACCCCTATC
AACCTCGTGCGGGATCTGCCTCAGGGCTTCTCTGCTCTGGAACCCCTGGTGGATCTGCCCATCGGCATCA
ACATCACCCGGTTTCAGACACTGCTGGCCCTGCACAGAAGCTACCTGACACCTGGCGATAGCAGCAGCGG
ATGGACAGCTGGTGCCGCCGCTTACTATGTGGGCTACCTGCAGCCTAGAACCTTTCTGCTGAAGTACAAC
GAGAACGGCACCATCACCGACGCCGTGGATTGTGCTCTGGATCCTCTGAGCGAGACAAAGTGCACCCTGA
AGTCCTTCACCGTGGAAAAGGGCATCTACCAGACCAGCAACTTCCGGGTGCAGCCCACCGAATCCATCGT
GCGGTTCCCCAATATCACCAATCTGTGCCCCTTCGGCGAGGTGTTCAATGCCACCAGATTCGCCTCTGTG
TACGCCTGGAACCGGAAGCGGATCAGCAATTGCGTGGCCGACTACTCCGTGCTGTACAACTCCGCCAGCT
TCAGCACCTTCAAGTGCTACGGCGTGTCCCCTACCAAGCTGAACGACCTGTGCTTCACAAACGTGTACGC
CGACAGCTTCGTGATCCGGGGAGATGAAGTGCGGCAGATTGCCCCTGGACAGACTGGCAAGATCGCCGAC
TACAACTACAAGCTGCCCGACGACTTCACCGGCTGTGTGATTGCCTGGAACAGCAACAACCTGGACTCCA
AAGTCGGCGGCAACTACAATTACCTGTACCGGCTGTTCCGGAAGTCCAATCTGAAGCCCTTCGAGCGGGA
CATCTCCACCGAGATCTATCAGGCCGGCAGCACCCCTTGTAACGGCGTGGAAGGCTTCAACTGCTACTTC
CCACTGCAGTCCTACGGCTTTCAGCCCACAAATGGCGTGGGCTATCAGCCCTACAGAGTGGTGGTGCTGA
GCTTCGAACTGCTGCATGCCCCTGCCACAGTGTGCGGCCCTAAGAAAAGCACCAATCTCGTGAAGAACAA
ATGCGTGAACTTCAACTTCAACGGCCTGACCGGCACCGGCGTGCTGACAGAGAGCAACAAGAAGTTCCTG
CCATTCCAGCAGTTTGGCCGGGATATCGCCGATACCACAGACGCCGTTAGAGATCCCCAGACACTGGAAA
TCCTGGACATCACCCCTTGCAGCTTCGGCGGAGTGTCTGTGATCACCCCTGGCACCAACACCAGCAATCA
GGTGGCAGTGCTGTACCAGGACGTGAACTGTACCGAAGTGCCCGTGGCCATTCACGCCGATCAGCTGACA
CCTACATGGCGGGTGTACTCCACCGGCAGCAATGTGTTTCAGACCAGAGCCGGCTGTCTGATCGGAGCCG
AGCACGTGAACAATAGCTACGAGTGCGACATCCCCATCGGCGCTGGCATCTGTGCCAGCTACCAGACACA
GACAAACAGCCCCAGCAGAGCCGGATCTGTGGCCAGCCAGAGCATCATTGCCTACACAATGTCTCTGGGC
GCCGAGAACAGCGTGGCCTACTCCAACAACTCTATCGCTATCCCCACCAACTTCACCATCAGCGTGACCA
CAGAGATCCTGCCTGTGTCCATGACCAAGACCAGCGTGGACTGCACCATGTACATCTGCGGCGATTCCAC
CGAGTGCTCCAACCTGCTGCTGCAGTACGGCAGCTTCTGCACCCAGCTGAATAGAGCCCTGACAGGGATC
GCCGTGGAACAGGACAAGAACACCCAAGAGGTGTTCGCCCAAGTGAAGCAGATCTACAAGACCCCTCCTA
TCAAGGACTTCGGCGGCTTCAATTTCAGCCAGATTCTGCCCGATCCTAGCAAGCCCAGCAAGCGGAGCTT
CATCGAGGACCTGCTGTTCAACAAAGTGACACTGGCCGACGCCGGCTTCATCAAGCAGTATGGCGATTGT
CTGGGCGACATTGCCGCCAGGGATCTGATTTGCGCCCAGAAGTTTAACGGACTGACAGTGCTGCCTCCTC
TGCTGACCGATGAGATGATCGCCCAGTACACATCTGCCCTGCTGGCCGGCACAATCACAAGCGGCTGGAC
ATTTGGAGCTGGCGCCGCTCTGCAGATCCCCTTTGCTATGCAGATGGCCTACCGGTTCAACGGCATCGGA
GTGACCCAGAATGTGCTGTACGAGAACCAGAAGCTGATCGCCAACCAGTTCAACAGCGCCATCGGCAAGA
TCCAGGACAGCCTGAGCAGCACAGCAAGCGCCCTGGGAAAGCTGCAGGACGTGGTCAACCAGAATGCCCA
GGCACTGAACACCCTGGTCAAGCAGCTGTCCTCCAACTTCGGCGCCATCAGCTCTGTGCTGAACGATATC
CTGAGCAGACTGGACCCTCCTGAGGCCGAGGTGCAGATCGACAGACTGATCACCGGAAGGCTGCAGTCCC
TGCAGACCTACGTTACCCAGCAGCTGATCAGAGCCGCCGAGATTAGAGCCTCTGCCAATCTGGCCGCCAC
CAAGATGTCTGAGTGTGTGCTGGGCCAGAGCAAGAGAGTGGACTTTTGCGGCAAGGGCTACCACCTGATG
AGCTTCCCTCAGTCTGCCCCTCACGGCGTGGTGTTTCTGCACGTGACATATGTGCCCGCTCAAGAGAAGA
ATTTCACCACCGCTCCAGCCATCTGCCACGACGGCAAAGCCCACTTTCCTAGAGAAGGCGTGTTCGTGTC
CAACGGCACCCATTGGTTCGTGACACAGCGGAACTTCTACGAGCCCCAGATCATCACCACCGACAACACC
TTCGTGTCTGGCAACTGCGACGTCGTGATCGGCATTGTGAACAATACCGTGTACGACCCTCTGCAGCCCG
AGCTGGACAGCTTCAAAGAGGAACTGGACAAGTACTTTAAGAACCACACAAGCCCCGACGTGGACCTGGG
CGATATCAGCGGAATCAATGCCAGCGTCGTGAACATCCAGAAAGAGATCGACCGGCTGAACGAGGTGGCC
AAGAATCTGAACGAGAGCCTGATCGACCTGCAAGAACTGGGAAAATACGAGCAGTACATCAAGTGGCCTT
GGTACATCTGGCTGGGCTTTATCGCCGGACTGATTGCCATCGTGATGGTCACAATCATGCTGTGTTGCAT
GACCAGCTGCTGTAGCTGCCTGAAGGGCTGTTGTAGCTGTGGCAGCTGCTGCAAGTTCGACGAGGACGAT
TCTGAGCCCGTGCTGAAGGGCGTG

＞ＣＯＲ２０００９＿配列番号２１３

【１０４７】

【化９】

ATGGACGCTATGAAGAGGGGCCTGTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGCGGAGCTGTGTTTGTGTCTGCTCAAT
GCGTGAACCTGACCACAAGAACCCAGCTGCCTCCAGCCTACACCAACAGCTTTACCAGAGGCGTGTACTA
CCCCGACAAGGTGTTCAGATCCAGCGTGCTGCACTCTACCCAGGACCTGTTCCTGCCTTTCTTCAGCAAC
GTGACCTGGTTCCACGCCATCCACGTGTCCGGCACCAATGGCACCAAGAGATTCGACAACCCCGTGCTGC
CCTTCAACGACGGGGTGTACTTTGCCAGCACCGAGAAGTCCAACATCATCAGAGGCTGGATCTTCGGCAC
CACACTGGACAGCAAGACCCAGAGCCTGCTGATCGTGAACAACGCCACCAACGTGGTCATCAAAGTGTGC
GAGTTCCAGTTCTGCAACGACCCCTTCCTGGGCGTCTACTATCACAAGAACAACAAGAGCTGGATGGAAA
GCGAGTTCCGGGTGTACAGCAGCGCCAACAACTGCACCTTTGAATACGTGTCCCAGCCTTTCCTGATGGA
CCTGGAAGGCAAGCAGGGCAACTTCAAGAACCTGCGCGAGTTCGTGTTCAAGAACATCGACGGCTACTTC
AAGATCTACAGCAAGCACACCCCTATCAACCTCGTGCGGGATCTGCCTCAGGGCTTCTCTGCTCTGGAAC
CCCTGGTGGATCTGCCCATCGGCATCAACATCACCCGGTTTCAGACACTGCTGGCCCTGCACAGAAGCTA
CCTGACACCTGGCGATAGCAGCAGCGGATGGACAGCTGGTGCCGCCGCTTACTATGTGGGCTACCTGCAG
CCTAGAACCTTTCTGCTGAAGTACAACGAGAACGGCACCATCACCGACGCCGTGGATTGTGCTCTGGATC
CTCTGAGCGAGACAAAGTGCACCCTGAAGTCCTTCACCGTGGAAAAGGGCATCTACCAGACCAGCAACTT
CCGGGTGCAGCCCACCGAATCCATCGTGCGGTTCCCCAATATCACCAATCTGTGCCCCTTCGGCGAGGTG
TTCAATGCCACCAGATTCGCCTCTGTGTACGCCTGGAACCGGAAGCGGATCAGCAATTGCGTGGCCGACT
ACTCCGTGCTGTACAACTCCGCCAGCTTCAGCACCTTCAAGTGCTACGGCGTGTCCCCTACCAAGCTGAA
CGACCTGTGCTTCACAAACGTGTACGCCGACAGCTTCGTGATCCGGGGAGATGAAGTGCGGCAGATTGCC
CCTGGACAGACTGGCAAGATCGCCGACTACAACTACAAGCTGCCCGACGACTTCACCGGCTGTGTGATTG
CCTGGAACAGCAACAACCTGGACTCCAAAGTCGGCGGCAACTACAATTACCTGTACCGGCTGTTCCGGAA
GTCCAATCTGAAGCCCTTCGAGCGGGACATCTCCACCGAGATCTATCAGGCCGGCAGCACCCCTTGTAAC
GGCGTGGAAGGCTTCAACTGCTACTTCCCACTGCAGTCCTACGGCTTTCAGCCCACAAATGGCGTGGGCT
ATCAGCCCTACAGAGTGGTGGTGCTGAGCTTCGAACTGCTGCATGCCCCTGCCACAGTGTGCGGCCCTAA
GAAAAGCACCAATCTCGTGAAGAACAAATGCGTGAACTTCAACTTCAACGGCCTGACCGGCACCGGCGTG
CTGACAGAGAGCAACAAGAAGTTCCTGCCATTCCAGCAGTTTGGCCGGGATATCGCCGATACCACAGACG
CCGTTAGAGATCCCCAGACACTGGAAATCCTGGACATCACCCCTTGCAGCTTCGGCGGAGTGTCTGTGAT
CACCCCTGGCACCAACACCAGCAATCAGGTGGCAGTGCTGTACCAGGACGTGAACTGTACCGAAGTGCCC
GTGGCCATTCACGCCGATCAGCTGACACCTACATGGCGGGTGTACTCCACCGGCAGCAATGTGTTTCAGA
CCAGAGCCGGCTGTCTGATCGGAGCCGAGCACGTGAACAATAGCTACGAGTGCGACATCCCCATCGGCGC
TGGCATCTGTGCCAGCTACCAGACACAGACAAACAGCCCCAGACGGGCCAGATCTGTGGCCAGCCAGAGC
ATCATTGCCTACACAATGTCTCTGGGCGCCGAGAACAGCGTGGCCTACTCCAACAACTCTATCGCTATCC
CCACCAACTTCACCATCAGCGTGACCACAGAGATCCTGCCTGTGTCCATGACCAAGACCAGCGTGGACTG
CACCATGTACATCTGCGGCGATTCCACCGAGTGCTCCAACCTGCTGCTGCAGTACGGCAGCTTCTGCACC
CAGCTGAATAGAGCCCTGACAGGGATCGCCGTGGAACAGGACAAGAACACCCAAGAGGTGTTCGCCCAAG
TGAAGCAGATCTACAAGACCCCTCCTATCAAGGACTTCGGCGGCTTCAATTTCAGCCAGATTCTGCCCGA
TCCTAGCAAGCCCAGCAAGCGGAGCTTCATCGAGGACCTGCTGTTCAACAAAGTGACACTGGCCGACGCC
GGCTTCATCAAGCAGTATGGCGATTGTCTGGGCGACATTGCCGCCAGGGATCTGATTTGCGCCCAGAAGT
TTAACGGACTGACAGTGCTGCCTCCTCTGCTGACCGATGAGATGATCGCCCAGTACACATCTGCCCTGCT
GGCCGGCACAATCACAAGCGGCTGGACATTTGGAGCTGGCGCCGCTCTGCAGATCCCCTTTGCTATGCAG
ATGGCCTACCGGTTCAACGGCATCGGAGTGACCCAGAATGTGCTGTACGAGAACCAGAAGCTGATCGCCA
ACCAGTTCAACAGCGCCATCGGCAAGATCCAGGACAGCCTGAGCAGCACAGCAAGCGCCCTGGGAAAGCT
GCAGGACGTGGTCAACCAGAATGCCCAGGCACTGAACACCCTGGTCAAGCAGCTGTCCTCCAACTTCGGC
GCCATCAGCTCTGTGCTGAACGATATCCTGAGCAGACTGGACAAGGTGGAAGCCGAGGTGCAGATCGACA
GACTGATCACCGGAAGGCTGCAGTCCCTGCAGACCTACGTTACCCAGCAGCTGATCAGAGCCGCCGAGAT
TAGAGCCTCTGCCAATCTGGCCGCCACCAAGATGTCTGAGTGTGTGCTGGGCCAGAGCAAGAGAGTGGAC
TTTTGCGGCAAGGGCTACCACCTGATGAGCTTCCCTCAGTCTGCCCCTCACGGCGTGGTGTTTCTGCACG
TGACATATGTGCCCGCTCAAGAGAAGAATTTCACCACCGCTCCAGCCATCTGCCACGACGGCAAAGCCCA
CTTTCCTAGAGAAGGCGTGTTCGTGTCCAACGGCACCCATTGGTTCGTGACACAGCGGAACTTCTACGAG
CCCCAGATCATCACCACCGACAACACCTTCGTGTCTGGCAACTGCGACGTCGTGATCGGCATTGTGAACA
ATACCGTGTACGACCCTCTGCAGCCCGAGCTGGACAGCTTCAAAGAGGAACTGGACAAGTACTTTAAGAA
CCACACAAGCCCCGACGTGGACCTGGGCGATATCAGCGGAATCAATGCCAGCGTCGTGAACATCCAGAAA
GAGATCGACCGGCTGAACGAGGTGGCCAAGAATCTGAACGAGAGCCTGATCGACCTGCAAGAACTGGGAA
AATACGAGCAGTACATCAAGTGGCCTTGGTACATCTGGCTGGGCTTTATCGCCGGACTGATTGCCATCGT
GATGGTCACAATCATGCTGTGTTGCATGACCAGCTGCTGTAGCTGCCTGAAGGGCTGTTGTAGCTGTGGC
AGCTGCTGCAAGTTCGACGAGGACGATTCTGAGCCCGTGCTGAAGGGCGTGAAACTGCACTACACA

＞ＣＯＲ２０００１０＿配列番号２１４

【１０４８】

【化１０】

ATGGACGCTATGAAGAGGGGCCTGTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGCGGAGCTGTGTTTGTGTCTGCTCAAT
GCGTGAACCTGACCACAAGAACCCAGCTGCCTCCAGCCTACACCAACAGCTTTACCAGAGGCGTGTACTA
CCCCGACAAGGTGTTCAGATCCAGCGTGCTGCACTCTACCCAGGACCTGTTCCTGCCTTTCTTCAGCAAC
GTGACCTGGTTCCACGCCATCCACGTGTCCGGCACCAATGGCACCAAGAGATTCGACAACCCCGTGCTGC
CCTTCAACGACGGGGTGTACTTTGCCAGCACCGAGAAGTCCAACATCATCAGAGGCTGGATCTTCGGCAC
CACACTGGACAGCAAGACCCAGAGCCTGCTGATCGTGAACAACGCCACCAACGTGGTCATCAAAGTGTGC
GAGTTCCAGTTCTGCAACGACCCCTTCCTGGGCGTCTACTATCACAAGAACAACAAGAGCTGGATGGAAA
GCGAGTTCCGGGTGTACAGCAGCGCCAACAACTGCACCTTTGAATACGTGTCCCAGCCTTTCCTGATGGA
CCTGGAAGGCAAGCAGGGCAACTTCAAGAACCTGCGCGAGTTCGTGTTCAAGAACATCGACGGCTACTTC
AAGATCTACAGCAAGCACACCCCTATCAACCTCGTGCGGGATCTGCCTCAGGGCTTCTCTGCTCTGGAAC
CCCTGGTGGATCTGCCCATCGGCATCAACATCACCCGGTTTCAGACACTGCTGGCCCTGCACAGAAGCTA
CCTGACACCTGGCGATAGCAGCAGCGGATGGACAGCTGGTGCCGCCGCTTACTATGTGGGCTACCTGCAG
CCTAGAACCTTTCTGCTGAAGTACAACGAGAACGGCACCATCACCGACGCCGTGGATTGTGCTCTGGATC
CTCTGAGCGAGACAAAGTGCACCCTGAAGTCCTTCACCGTGGAAAAGGGCATCTACCAGACCAGCAACTT
CCGGGTGCAGCCCACCGAATCCATCGTGCGGTTCCCCAATATCACCAATCTGTGCCCCTTCGGCGAGGTG
TTCAATGCCACCAGATTCGCCTCTGTGTACGCCTGGAACCGGAAGCGGATCAGCAATTGCGTGGCCGACT
ACTCCGTGCTGTACAACTCCGCCAGCTTCAGCACCTTCAAGTGCTACGGCGTGTCCCCTACCAAGCTGAA
CGACCTGTGCTTCACAAACGTGTACGCCGACAGCTTCGTGATCCGGGGAGATGAAGTGCGGCAGATTGCC
CCTGGACAGACTGGCAAGATCGCCGACTACAACTACAAGCTGCCCGACGACTTCACCGGCTGTGTGATTG
CCTGGAACAGCAACAACCTGGACTCCAAAGTCGGCGGCAACTACAATTACCTGTACCGGCTGTTCCGGAA
GTCCAATCTGAAGCCCTTCGAGCGGGACATCTCCACCGAGATCTATCAGGCCGGCAGCACCCCTTGTAAC
GGCGTGGAAGGCTTCAACTGCTACTTCCCACTGCAGTCCTACGGCTTTCAGCCCACAAATGGCGTGGGCT
ATCAGCCCTACAGAGTGGTGGTGCTGAGCTTCGAACTGCTGCATGCCCCTGCCACAGTGTGCGGCCCTAA
GAAAAGCACCAATCTCGTGAAGAACAAATGCGTGAACTTCAACTTCAACGGCCTGACCGGCACCGGCGTG
CTGACAGAGAGCAACAAGAAGTTCCTGCCATTCCAGCAGTTTGGCCGGGATATCGCCGATACCACAGACG
CCGTTAGAGATCCCCAGACACTGGAAATCCTGGACATCACCCCTTGCAGCTTCGGCGGAGTGTCTGTGAT
CACCCCTGGCACCAACACCAGCAATCAGGTGGCAGTGCTGTACCAGGACGTGAACTGTACCGAAGTGCCC
GTGGCCATTCACGCCGATCAGCTGACACCTACATGGCGGGTGTACTCCACCGGCAGCAATGTGTTTCAGA
CCAGAGCCGGCTGTCTGATCGGAGCCGAGCACGTGAACAATAGCTACGAGTGCGACATCCCCATCGGCGC
TGGCATCTGTGCCAGCTACCAGACACAGACAAACAGCCCCAGCAGAGCCGGATCTGTGGCCAGCCAGAGC
ATCATTGCCTACACAATGTCTCTGGGCGCCGAGAACAGCGTGGCCTACTCCAACAACTCTATCGCTATCC
CCACCAACTTCACCATCAGCGTGACCACAGAGATCCTGCCTGTGTCCATGACCAAGACCAGCGTGGACTG
CACCATGTACATCTGCGGCGATTCCACCGAGTGCTCCAACCTGCTGCTGCAGTACGGCAGCTTCTGCACC
CAGCTGAATAGAGCCCTGACAGGGATCGCCGTGGAACAGGACAAGAACACCCAAGAGGTGTTCGCCCAAG
TGAAGCAGATCTACAAGACCCCTCCTATCAAGGACTTCGGCGGCTTCAATTTCAGCCAGATTCTGCCCGA
TCCTAGCAAGCCCAGCAAGCGGAGCTTCATCGAGGACCTGCTGTTCAACAAAGTGACACTGGCCGACGCC
GGCTTCATCAAGCAGTATGGCGATTGTCTGGGCGACATTGCCGCCAGGGATCTGATTTGCGCCCAGAAGT
TTAACGGACTGACAGTGCTGCCTCCTCTGCTGACCGATGAGATGATCGCCCAGTACACATCTGCCCTGCT
GGCCGGCACAATCACAAGCGGCTGGACATTTGGAGCTGGCGCCGCTCTGCAGATCCCCTTTGCTATGCAG
ATGGCCTACCGGTTCAACGGCATCGGAGTGACCCAGAATGTGCTGTACGAGAACCAGAAGCTGATCGCCA
ACCAGTTCAACAGCGCCATCGGCAAGATCCAGGACAGCCTGAGCAGCACAGCAAGCGCCCTGGGAAAGCT
GCAGGACGTGGTCAACCAGAATGCCCAGGCACTGAACACCCTGGTCAAGCAGCTGTCCTCCAACTTCGGC
GCCATCAGCTCTGTGCTGAACGATATCCTGAGCAGACTGGACCCTCCTGAGGCCGAGGTGCAGATCGACA
GACTGATCACCGGAAGGCTGCAGTCCCTGCAGACCTACGTTACCCAGCAGCTGATCAGAGCCGCCGAGAT
TAGAGCCTCTGCCAATCTGGCCGCCACCAAGATGTCTGAGTGTGTGCTGGGCCAGAGCAAGAGAGTGGAC
TTTTGCGGCAAGGGCTACCACCTGATGAGCTTCCCTCAGTCTGCCCCTCACGGCGTGGTGTTTCTGCACG
TGACATATGTGCCCGCTCAAGAGAAGAATTTCACCACCGCTCCAGCCATCTGCCACGACGGCAAAGCCCA
CTTTCCTAGAGAAGGCGTGTTCGTGTCCAACGGCACCCATTGGTTCGTGACACAGCGGAACTTCTACGAG
CCCCAGATCATCACCACCGACAACACCTTCGTGTCTGGCAACTGCGACGTCGTGATCGGCATTGTGAACA
ATACCGTGTACGACCCTCTGCAGCCCGAGCTGGACAGCTTCAAAGAGGAACTGGACAAGTACTTTAAGAA
CCACACAAGCCCCGACGTGGACCTGGGCGATATCAGCGGAATCAATGCCAGCGTCGTGAACATCCAGAAA
GAGATCGACCGGCTGAACGAGGTGGCCAAGAATCTGAACGAGAGCCTGATCGACCTGCAAGAACTGGGAA
AATACGAGCAGTACATCAAGTGGCCTTGGTACATCTGGCTGGGCTTTATCGCCGGACTGATTGCCATCGT
GATGGTCACAATCATGCTGTGTTGCATGACCAGCTGCTGTAGCTGCCTGAAGGGCTGTTGTAGCTGTGGC
AGCTGCTGCAAGTTCGACGAGGACGATTCTGAGCCCGTGCTGAAGGGCGTGAAACTGCACTACACA

＞ＣＯＲ２０００１１＿配列番号２１５

【１０４９】

【化１１】

ATGGACGCTATGAAGAGGGGCCTGTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGCGGAGCTGTGTTTGTGTCTGCTCAAT
GCGTGAACCTGACCACAAGAACCCAGCTGCCTCCAGCCTACACCAACAGCTTTACCAGAGGCGTGTACTA
CCCCGACAAGGTGTTCAGATCCAGCGTGCTGCACTCTACCCAGGACCTGTTCCTGCCTTTCTTCAGCAAC
GTGACCTGGTTCCACGCCATCCACGTGTCCGGCACCAATGGCACCAAGAGATTCGACAACCCCGTGCTGC
CCTTCAACGACGGGGTGTACTTTGCCAGCACCGAGAAGTCCAACATCATCAGAGGCTGGATCTTCGGCAC
CACACTGGACAGCAAGACCCAGAGCCTGCTGATCGTGAACAACGCCACCAACGTGGTCATCAAAGTGTGC
GAGTTCCAGTTCTGCAACGACCCCTTCCTGGGCGTCTACTATCACAAGAACAACAAGAGCTGGATGGAAA
GCGAGTTCCGGGTGTACAGCAGCGCCAACAACTGCACCTTTGAATACGTGTCCCAGCCTTTCCTGATGGA
CCTGGAAGGCAAGCAGGGCAACTTCAAGAACCTGCGCGAGTTCGTGTTCAAGAACATCGACGGCTACTTC
AAGATCTACAGCAAGCACACCCCTATCAACCTCGTGCGGGATCTGCCTCAGGGCTTCTCTGCTCTGGAAC
CCCTGGTGGATCTGCCCATCGGCATCAACATCACCCGGTTTCAGACACTGCTGGCCCTGCACAGAAGCTA
CCTGACACCTGGCGATAGCAGCAGCGGATGGACAGCTGGTGCCGCCGCTTACTATGTGGGCTACCTGCAG
CCTAGAACCTTTCTGCTGAAGTACAACGAGAACGGCACCATCACCGACGCCGTGGATTGTGCTCTGGATC
CTCTGAGCGAGACAAAGTGCACCCTGAAGTCCTTCACCGTGGAAAAGGGCATCTACCAGACCAGCAACTT
CCGGGTGCAGCCCACCGAATCCATCGTGCGGTTCCCCAATATCACCAATCTGTGCCCCTTCGGCGAGGTG
TTCAATGCCACCAGATTCGCCTCTGTGTACGCCTGGAACCGGAAGCGGATCAGCAATTGCGTGGCCGACT
ACTCCGTGCTGTACAACTCCGCCAGCTTCAGCACCTTCAAGTGCTACGGCGTGTCCCCTACCAAGCTGAA
CGACCTGTGCTTCACAAACGTGTACGCCGACAGCTTCGTGATCCGGGGAGATGAAGTGCGGCAGATTGCC
CCTGGACAGACTGGCAAGATCGCCGACTACAACTACAAGCTGCCCGACGACTTCACCGGCTGTGTGATTG
CCTGGAACAGCAACAACCTGGACTCCAAAGTCGGCGGCAACTACAATTACCTGTACCGGCTGTTCCGGAA
GTCCAATCTGAAGCCCTTCGAGCGGGACATCTCCACCGAGATCTATCAGGCCGGCAGCACCCCTTGTAAC
GGCGTGGAAGGCTTCAACTGCTACTTCCCACTGCAGTCCTACGGCTTTCAGCCCACAAATGGCGTGGGCT
ATCAGCCCTACAGAGTGGTGGTGCTGAGCTTCGAACTGCTGCATGCCCCTGCCACAGTGTGCGGCCCTAA
GAAAAGCACCAATCTCGTGAAGAACAAATGCGTGAACTTCAACTTCAACGGCCTGACCGGCACCGGCGTG
CTGACAGAGAGCAACAAGAAGTTCCTGCCATTCCAGCAGTTTGGCCGGGATATCGCCGATACCACAGACG
CCGTTAGAGATCCCCAGACACTGGAAATCCTGGACATCACCCCTTGCAGCTTCGGCGGAGTGTCTGTGAT
CACCCCTGGCACCAACACCAGCAATCAGGTGGCAGTGCTGTACCAGGACGTGAACTGTACCGAAGTGCCC
GTGGCCATTCACGCCGATCAGCTGACACCTACATGGCGGGTGTACTCCACCGGCAGCAATGTGTTTCAGA
CCAGAGCCGGCTGTCTGATCGGAGCCGAGCACGTGAACAATAGCTACGAGTGCGACATCCCCATCGGCGC
TGGCATCTGTGCCAGCTACCAGACACAGACAAACAGCCCCAGCAGAGCCGGATCTGTGGCCAGCCAGAGC
ATCATTGCCTACACAATGTCTCTGGGCGCCGAGAACAGCGTGGCCTACTCCAACAACTCTATCGCTATCC
CCACCAACTTCACCATCAGCGTGACCACAGAGATCCTGCCTGTGTCCATGACCAAGACCAGCGTGGACTG
CACCATGTACATCTGCGGCGATTCCACCGAGTGCTCCAACCTGCTGCTGCAGTACGGCAGCTTCTGCACC
CAGCTGAATAGAGCCCTGACAGGGATCGCCGTGGAACAGGACAAGAACACCCAAGAGGTGTTCGCCCAAG
TGAAGCAGATCTACAAGACCCCTCCTATCAAGGACTTCGGCGGCTTCAATTTCAGCCAGATTCTGCCCGA
TCCTAGCAAGCCCAGCAAGCGGAGCTTCATCGAGGACCTGCTGTTCAACAAAGTGACACTGGCCGACGCC
GGCTTCATCAAGCAGTATGGCGATTGTCTGGGCGACATTGCCGCCAGGGATCTGATTTGCGCCCAGAAGT
TTAACGGACTGACAGTGCTGCCTCCTCTGCTGACCGATGAGATGATCGCCCAGTACACATCTGCCCTGCT
GGCCGGCACAATCACAAGCGGCTGGACATTTGGAGCTGGCGCCGCTCTGCAGATCCCCTTTGCTATGCAG
ATGGCCTACCGGTTCAACGGCATCGGAGTGACCCAGAATGTGCTGTACGAGAACCAGAAGCTGATCGCCA
ACCAGTTCAACAGCGCCATCGGCAAGATCCAGGACAGCCTGAGCAGCACAGCAAGCGCCCTGGGAAAGCT
GCAGGACGTGGTCAACCAGAATGCCCAGGCACTGAACACCCTGGTCAAGCAGCTGTCCTCCAACTTCGGC
GCCATCAGCTCTGTGCTGAACGATATCCTGAGCAGACTGGACCCTCCTGAGGCCGAGGTGCAGATCGACA
GACTGATCACCGGAAGGCTGCAGTCCCTGCAGACCTACGTTACCCAGCAGCTGATCAGAGCCGCCGAGAT
TAGAGCCTCTGCCAATCTGGCCGCCACCAAGATGTCTGAGTGTGTGCTGGGCCAGAGCAAGAGAGTGGAC
TTTTGCGGCAAGGGCTACCACCTGATGAGCTTCCCTCAGTCTGCCCCTCACGGCGTGGTGTTTCTGCACG
TGACATATGTGCCCGCTCAAGAGAAGAATTTCACCACCGCTCCAGCCATCTGCCACGACGGCAAAGCCCA
CTTTCCTAGAGAAGGCGTGTTCGTGTCCAACGGCACCCATTGGTTCGTGACACAGCGGAACTTCTACGAG
CCCCAGATCATCACCACCGACAACACCTTCGTGTCTGGCAACTGCGACGTCGTGATCGGCATTGTGAACA
ATACCGTGTACGACCCTCTGCAGCCCGAGCTGGACAGCTTCAAAGAGGAACTGGACAAGTACTTTAAGAA
CCACACAAGCCCCGACGTGGACCTGGGCGATATCAGCGGAATCAATGCCAGCGTCGTGAACATCCAGAAA
GAGATCGACCGGCTGAACGAGGTGGCCAAGAATCTGAACGAGAGCCTGATCGACCTGCAAGAACTGGGAA
AATACGAGCAGTACATCAAGTGGCCTTGGTACATCTGGCTGGGCTTTATCGCCGGACTGATTGCCATCGT
GATGGTCACAATCATGCTGTGTTGCATGACCAGCTGCTGTAGCTGCCTGAAGGGCTGTTGTAGCTGTGGC
AGCTGCTGCAAGTTCGACGAGGACGATTCTGAGCCCGTGCTGAAGGGCGTG

＞ＣＯＲ２０００１８＿配列番号２１６

【１０５０】

【化１２】

ATGGACGCTATGAAGAGGGGCCTGTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGCGGAGCTGTGTTTGTGTCTGCTAGCC
AAGAGATCCACGCCAGATTTCGGAGATTCGTGTTTCTGGTGCTGCTGCCTCTGGTGTCCAGCCAATGCGT
GAACCTGACCACAAGAACCCAGCTGCCTCCAGCCTACACCAACAGCTTTACCAGAGGCGTGTACTACCCC
GACAAGGTGTTCAGATCCAGCGTGCTGCACTCTACCCAGGACCTGTTCCTGCCTTTCTTCAGCAACGTGA
CCTGGTTCCACGCCATCCACGTGTCCGGCACCAATGGCACCAAGAGATTCGACAACCCCGTGCTGCCCTT
CAACGACGGGGTGTACTTTGCCAGCACCGAGAAGTCCAACATCATCAGAGGCTGGATCTTCGGCACCACA
CTGGACAGCAAGACCCAGAGCCTGCTGATCGTGAACAACGCCACCAACGTGGTCATCAAAGTGTGCGAGT
TCCAGTTCTGCAACGACCCCTTCCTGGGCGTCTACTATCACAAGAACAACAAGAGCTGGATGGAAAGCGA
GTTCCGGGTGTACAGCAGCGCCAACAACTGCACCTTTGAATACGTGTCCCAGCCTTTCCTGATGGACCTG
GAAGGCAAGCAGGGCAACTTCAAGAACCTGCGCGAGTTCGTGTTCAAGAACATCGACGGCTACTTCAAGA
TCTACAGCAAGCACACCCCTATCAACCTCGTGCGGGATCTGCCTCAGGGCTTCTCTGCTCTGGAACCCCT
GGTGGATCTGCCCATCGGCATCAACATCACCCGGTTTCAGACACTGCTGGCCCTGCACAGAAGCTACCTG
ACACCTGGCGATAGCAGCAGCGGATGGACAGCTGGTGCCGCCGCTTACTATGTGGGCTACCTGCAGCCTA
GAACCTTTCTGCTGAAGTACAACGAGAACGGCACCATCACCGACGCCGTGGATTGTGCTCTGGATCCTCT
GAGCGAGACAAAGTGCACCCTGAAGTCCTTCACCGTGGAAAAGGGCATCTACCAGACCAGCAACTTCCGG
GTGCAGCCCACCGAATCCATCGTGCGGTTCCCCAATATCACCAATCTGTGCCCCTTCGGCGAGGTGTTCA
ATGCCACCAGATTCGCCTCTGTGTACGCCTGGAACCGGAAGCGGATCAGCAATTGCGTGGCCGACTACTC
CGTGCTGTACAACTCCGCCAGCTTCAGCACCTTCAAGTGCTACGGCGTGTCCCCTACCAAGCTGAACGAC
CTGTGCTTCACAAACGTGTACGCCGACAGCTTCGTGATCCGGGGAGATGAAGTGCGGCAGATTGCCCCTG
GACAGACTGGCAAGATCGCCGACTACAACTACAAGCTGCCCGACGACTTCACCGGCTGTGTGATTGCCTG
GAACAGCAACAACCTGGACTCCAAAGTCGGCGGCAACTACAATTACCTGTACCGGCTGTTCCGGAAGTCC
AATCTGAAGCCCTTCGAGCGGGACATCTCCACCGAGATCTATCAGGCCGGCAGCACCCCTTGTAACGGCG
TGGAAGGCTTCAACTGCTACTTCCCACTGCAGTCCTACGGCTTTCAGCCCACAAATGGCGTGGGCTATCA
GCCCTACAGAGTGGTGGTGCTGAGCTTCGAACTGCTGCATGCCCCTGCCACAGTGTGCGGCCCTAAGAAA
AGCACCAATCTCGTGAAGAACAAATGCGTGAACTTCAACTTCAACGGCCTGACCGGCACCGGCGTGCTGA
CAGAGAGCAACAAGAAGTTCCTGCCATTCCAGCAGTTTGGCCGGGATATCGCCGATACCACAGACGCCGT
TAGAGATCCCCAGACACTGGAAATCCTGGACATCACCCCTTGCAGCTTCGGCGGAGTGTCTGTGATCACC
CCTGGCACCAACACCAGCAATCAGGTGGCAGTGCTGTACCAGGACGTGAACTGTACCGAAGTGCCCGTGG
CCATTCACGCCGATCAGCTGACACCTACATGGCGGGTGTACTCCACCGGCAGCAATGTGTTTCAGACCAG
AGCCGGCTGTCTGATCGGAGCCGAGCACGTGAACAATAGCTACGAGTGCGACATCCCCATCGGCGCTGGC
ATCTGTGCCAGCTACCAGACACAGACAAACAGCCCCAGACGGGCCAGATCTGTGGCCAGCCAGAGCATCA
TTGCCTACACAATGTCTCTGGGCGCCGAGAACAGCGTGGCCTACTCCAACAACTCTATCGCTATCCCCAC
CAACTTCACCATCAGCGTGACCACAGAGATCCTGCCTGTGTCCATGACCAAGACCAGCGTGGACTGCACC
ATGTACATCTGCGGCGATTCCACCGAGTGCTCCAACCTGCTGCTGCAGTACGGCAGCTTCTGCACCCAGC
TGAATAGAGCCCTGACAGGGATCGCCGTGGAACAGGACAAGAACACCCAAGAGGTGTTCGCCCAAGTGAA
GCAGATCTACAAGACCCCTCCTATCAAGGACTTCGGCGGCTTCAATTTCAGCCAGATTCTGCCCGATCCT
AGCAAGCCCAGCAAGCGGAGCTTCATCGAGGACCTGCTGTTCAACAAAGTGACACTGGCCGACGCCGGCT
TCATCAAGCAGTATGGCGATTGTCTGGGCGACATTGCCGCCAGGGATCTGATTTGCGCCCAGAAGTTTAA
CGGACTGACAGTGCTGCCTCCTCTGCTGACCGATGAGATGATCGCCCAGTACACATCTGCCCTGCTGGCC
GGCACAATCACAAGCGGCTGGACATTTGGAGCTGGCGCCGCTCTGCAGATCCCCTTTGCTATGCAGATGG
CCTACCGGTTCAACGGCATCGGAGTGACCCAGAATGTGCTGTACGAGAACCAGAAGCTGATCGCCAACCA
GTTCAACAGCGCCATCGGCAAGATCCAGGACAGCCTGAGCAGCACAGCAAGCGCCCTGGGAAAGCTGCAG
GACGTGGTCAACCAGAATGCCCAGGCACTGAACACCCTGGTCAAGCAGCTGTCCTCCAACTTCGGCGCCA
TCAGCTCTGTGCTGAACGATATCCTGAGCAGACTGGACAAGGTGGAAGCCGAGGTGCAGATCGACAGACT
GATCACCGGAAGGCTGCAGTCCCTGCAGACCTACGTTACCCAGCAGCTGATCAGAGCCGCCGAGATTAGA
GCCTCTGCCAATCTGGCCGCCACCAAGATGTCTGAGTGTGTGCTGGGCCAGAGCAAGAGAGTGGACTTTT
GCGGCAAGGGCTACCACCTGATGAGCTTCCCTCAGTCTGCCCCTCACGGCGTGGTGTTTCTGCACGTGAC
ATATGTGCCCGCTCAAGAGAAGAATTTCACCACCGCTCCAGCCATCTGCCACGACGGCAAAGCCCACTTT
CCTAGAGAAGGCGTGTTCGTGTCCAACGGCACCCATTGGTTCGTGACACAGCGGAACTTCTACGAGCCCC
AGATCATCACCACCGACAACACCTTCGTGTCTGGCAACTGCGACGTCGTGATCGGCATTGTGAACAATAC
CGTGTACGACCCTCTGCAGCCCGAGCTGGACAGCTTCAAAGAGGAACTGGACAAGTACTTTAAGAACCAC
ACAAGCCCCGACGTGGACCTGGGCGATATCAGCGGAATCAATGCCAGCGTCGTGAACATCCAGAAAGAGA
TCGACCGGCTGAACGAGGTGGCCAAGAATCTGAACGAGAGCCTGATCGACCTGCAAGAACTGGGAAAATA
CGAGCAGTACATCAAGTGGCCTTGGTACATCTGGCTGGGCTTTATCGCCGGACTGATTGCCATCGTGATG
GTCACAATCATGCTGTGTTGCATGACCAGCTGCTGTAGCTGCCTGAAGGGCTGTTGTAGCTGTGGCAGCT
GCTGCAAGTTCGACGAGGACGATTCTGAGCCCGTGCTGAAGGGCGTGAAACTGCACTACACA

＞ ｐＳｈｕｔｔｌｅ＿Ｅ１．ＣＭＶｄｅｌ１３４ＴＯ；配列番号２１７

【１０５１】

【化１３】

TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGACGTCATTGTCGATGCTCT
TCAGTCCGGTGTTTATGTCACAGATCAGCTGAGCGATCGC**GTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAAT**
AGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAA
TGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
ACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTAC
ATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTA
TGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACC
ATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTC
TCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAA
CAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTC
CCTATCAGTGATAGAGATCTCCCTATCAGTGATAGAGATCGTCGACGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGA
TCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGG
CCGGGAACGGTGCATTGGAAGCTTGGTACCGGTGAATTCGCTAGCGTTAACGGATCCTCTAGACGAGATC
CGAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGC
ATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGCGATCGC
AGGTAGGTTTGAGTAGTGGGCGTGGCTAAGGAAGAGCATCATTGTCACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAA
AGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCA
CAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCT
GGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTT
CGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAA
GCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAG
TCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGT
ATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGG
TATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACC
ACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAG
ATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCAT
GAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAAGCCCAATC
TGAATAATGTTACAACCAATTAACCAATTCTGATTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAAT
TTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCAC
CGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACA
ACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCC
GGTGAGAATGGCAAAAGTTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCAT
CAAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATC
GCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACA
ATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTTCCGGGGATCGCAGTGGTGA
GTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCCGTCAGCCA
GTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACTCT
GGCGCATCGGGCTTCCCATACAAGCGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGCCCATT
TATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTCGACGTTTCCCGTTGAATATGGCT
CATAACACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTCATGATGATATATTTTTATCT
TGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACGGGCCAGAGCTGCA

注：太字：ＣＭＶｄｅｌ１３４プロモーター
＞ＩＤ＿６５９８＿　ｐＡｄ２６．ｄＥ１．ｄＥ３．５ｏｒｆ６；配列番号２１８
【１０５２】

【化１４－１】

CATCATCAATAATATACCCCACAAAGTAAACAAAAGTTAATATGCAAATGAGCTTTTGAATTTTAACGGT
TTTGGGGCGGAGCCAACGCTGATTGGACGAGAAACGGTGATGCAAATGACGTCACGACGCACGGCTAACG
GTCGCCGCGGAGGCGTGGCCTAGCCCGGAAGCAAGTCGCGGGGCTGATGACGTATAAAAAAGCGGACTTT
AGACCCGGAAACGGCCGATTTTCCCGCGGCCACGCCCGGATATGAGGTAATTCTGGGCGGATGCAAGTGA
AATTAGGTCATTTTGGCGCGAAAACTGAATGAGGAAGTGAAAAGCGAAAAATACCGGTCCCTCCCAGGGC
GGAATATTTACCGAGGGCCGAGAGACTTTGACCGATTACGTGGGGGTTTCGATTGCGGTGTTTTTTTCGC
GAATTTCCGCGTCCGTGTCAAAGTCCGGTGTTTATGTCACAGATCAGCTGAgcgatcgcAGGTAGGTTTG
AGTAGTGGGCGTGGCTAAGGTGACTATAAAGGCGGGTGTCTTACGAGGGTCTTTTTGCTTTTCTGCAGAC
ATCATGAACGGGACTGGCGGGGCCTTCGAAGGGGGGCTTTTTAGCCCTTATTTGACAACCCGCCTGCCGG
GATGGGCCGGAGTTCGTCAGAATGTGATGGGATCGACGGTGGATGGGCGCCCAGTGCTTCCAGCAAATTC
CTCGACCATGACCTACGCGACCGTGGGGAACTCGTCGCTCGACAGCACCGCCGCAGCCGCGGCAGCCGCA
GCCGCCATGACAGCGACGAGACTGGCCTCGAGCTACATGCCCAGCAGCGGTAGTAGCCCCTCTGTGCCCA
GTTCCATCATCGCCGAGGAGAAACTGCTGGCCCTGCTGGCCGAGCTGGAAGCCCTGAGCCGCCAGCTGGC
CGCCCTGACCCAGCAGGTGTCCGAGCTCCGCGAACAGCAGCAGCAGCAAAATAAATGATTCAATAAACAC
AGATTCTGATTCAAACAGCAAAGCATCTTTATTATTTATTTTTTCGCGCGCGGTAGGCCCTGGTCCACCT
CTCCCGATCATTGAGAGTGCGGTGGATTTTTTCCAGGACCCGGTAGAGGTGGGATTGGATGTTGAGGTAC
ATGGGCATGAGCCCGTCCCGTGGGTGGAGGTAGCACCACTGCATGGCCTCGTGCTCTGGGGTCGTGTTGT
AGATGATCCAGTCATAGCAGGGGCGCTGGGCGTGGTGCTGGATGATGTCCTTGAGGAGGAGACTGATGGC
CACGGGGAGCCCCTTGGTGTAGGTGTTGGCAAAACGGTTGAGCTGGGAGGGATGCATGCGGGGGGAGATG
ATGTGCAGTTTGGCCTGGATCTTGAGGTTGGCGATGTTGCCACCCAGATCCCGCCGGGGGTTCATGTTGT
GCAGGACCACCAGAACGGTGTAGCCCGTGCACTTGGGGAACTTGTCATGCAACTTGGAAGGGAATGCGTG
GAAGAATTTGGAGACGCCCTTGTGCCCGCCCAGGTTTTCCATGCACTCATCCATGATGATGGCAATGGGC
CCGTGGGCTGCGGCTTTGGCAAAGACGTTTCTGGGGTCAGAGACATCGTAATTATGCTCCTGGGTGAGAT
CATCATAAGACATTTTAATGAATTTGGGGCGGAGGGTGCCAGATTGGGGGACGATGGTTCCCTCGGGCCC
CGGGGCGAAGTTCCCCTCGCAGATCTGCATCTCCCAGGCTTTCATCTCGGAGGGGGGGATCATGTCCACC
TGCGGGGCGATGAAAAAAACGGTTTCCGGGGCGGGGGTGATGAGCTGCGAGGAGAGCAGGTTTCTCAACA
GCTGGGACTTGCCGCACCCGGTCGGGCCGTAGATGACCCCGATGACGGGTTGCAGGTGGTAGTTCAAGGA
CATGCAGCTGCCGTCGTCCCGGAGGAGGGGGGCCACCTCGTTGAGCTTGTCTCTGACTTGGAGGTTTTCC
CGGACGAGCTCGCCGAGGAGGCGGTCCCCGCCCAGCGAGAGAAGCTCTTGCAGGGAAGCAAAGTTTTTCA
GGGGCTTGAGCCCGTCGGCCATGGGCATCTTGGCGAGGGTCTGCGAGAGGAGCTCCAGGCGGTCCCAGAG
CTCGGTGACGTGCTCTACGGCATCTCGATCCAGCAGACTTCCTCGTTTCGGGGGTTGGGACGACTGCGAC
TGTAGGGCACGAGACGATGGGCGTCCAGCGCGGCCAGCGTCATGTCCTTCCAGGGTCTCAGGGTCCGCGT
GAGGGTGGTCTCCGTCACGGTGAAGGGGTGGGCCGCGGGCTGGGCGCTTGCAAGGGTGCGCTTGAGACTC
ATCCTGCTGGTGCTGAAACGGGCACGGTCTTCGCCCTGCGCGTCGGCGAGATAGCAGTTGACCATGAGCT
CGTAGTTGAGGGCCTCGGCGGCGTGGCCCTTGGCGCGGAGCTTGCCCTTGGAAGAGCGCCCGCAGGCGGG
ACAGAGGAGGGATTGCAGGGCGTAGAGCTTGGGCGCGAGAAAGACGGACTCGGGGGCGAAGGCGTCCGCT
CCGCAGTGGGCGCAGACGGTCTCGCACTCGACTAGCCAGGTGAGCTCGGGCTGCTCGGGGTCAAAAACCA
GTTTTCCCCCGTTCTTTTTGATGCGCTTCTTACCTCGCGTCTCCATGAGTCTGTGTCCGCGCTCGGTGAC
AAACAGGCTGTCTGTGTCCCCGTAGACGGACTTGATGGGCCTGTCCTGCAGGGGCGTCCCGCGGTCCTCC
TCGTAGAGAAACTCAGACCACTCTGAGACGAAGGCGCGCGTCCACGCCAAGACAAAGGAGGCCACGTGCG
AGGGGTAGCGGTCGTTGTCCACCAGGGGGTCCACCTTTTCCACGGTATGCAGGCACATGTCCCCCTCCTC
CGCATCCAAGAAGGTGATTGGCTTGTAGGTGTAGGCCACGTGACCTGGGGTTCCCGACGGGGGGGTATAA
AAGGGGGCGGGTCTGTGCTCGTCCTCACTCTCTTCCGCGTCGCTGTCCACGAGCGCCAGCTGTTGGGGTA
GGTATTCCCTCTCAAGAGCGGGCATGACCTCGGCACTCAGGTTGTCAGTTTCTAGAAACGAGGAGGATTT
GATGTGGGCCTGCCCTGCCGCGATGCTTTTTAGGAGACTTTCATCCATCTGGTCAGAAAAGACTATTTTT
TTATTGTCAAGCTTGGTGGCGAAGGAGCCATAGAGGGCGTTTGAGAGAAGCTTGGCGATGGATCTCATGG
TCTGATTTTTGTCACGGTCGGCGCGCTCCTTGGCCGCGATGTTGAGCTGGACATATTCGCGCGCGACACA
CTTCCATTCGGGGAAGACGGTGGTGCGCTCGTCGGGCACGATCCTGACGCGCCAGCCGCGGTTATGCAGG
GTGACCAGGTCCACGCTGGTGGCCACCTCGCCGCGCAGGGGCTCGTTGGTCCAGCAGAGTCTGCCGCCCT
TGCGCGAGCAGAACGGGGGCAGCACATCAAGCAGATGCTCGTCAGGGGGGTCCGCATCGATGGTGAAGAT
GCCCGGACAGAGTTCCTTGTCAAAATAATCGATTTTTGAGGATGCATCGTCCAAGGCCATCTGCCACTCG

【１０５３】

【化１４－２】

CGGGCGGCCAGCGCTCGCTCGTAGGGGTTGAGGGGCGGACCCCAAGGCATGGGATGCGTGAGGGCGGAGG
CGTACATGCCGCAGATGTCATAGACATAGATGGGCTCCGAGAGGATGCCGATGTAGGTGGGATAGCAGCG
CCCCCCGCGGATGCTTGCGCGCACGTAGTCATACAACTCGTGCGAGGGGGCCAAGAAGGCGGGGCCGAGA
TTGGTGCGCTGGGGCTGCTCGGCGCGGAAGACGATCTGGCGAAAGATGGCGTGCGAGTTGGAGGAGATGG
TGGGCCGTTGGAAGATGTTAAAGTGGGCGTGAGGCAGGCGGACCGAGTCGCGGATGAAGTGCGCGTAGGA
GTCTTGCAGCTTGGCGACGAGCTCGGCGGTGACGAGGACGTCCATGGCGCAGTAGTCCAGCGTTTCGCGG
ATGATGTCATAACTCGCCTCTCCTTTCTTCTCCCACAGCTCGCGGTTGAGGGCGTATTCCTCGTCATCCT
TCCAGTACTCCCGGAGCGGGAATCCTCGATCGTCCGCACGGTAAGAGCCCAGCATGTAGAAATGGTTCAC
GGCCTTGTAGGGACAGCAGCCCTTCTCCACGGGGAGGGCGTAAGCTTGAGCGGCCTTGCGGAGCGAGGTG
TGCGTCAGGGCAAAGGTGTCCCTGACCATGACTTTCAAGAACTGGTACTTGAAGTCCGAGTCGTCGCAGC
CGCCGTGCTCCCAGAGCTCGAAATCGGTGCGCTTCTTCGAGAGGGGGTTAGGCAGAGCGAAAGTGACGTC
ATTGAAGAGAATCTTGCCTGCCCGCGGCATGAAATTGCGGGTGATGCGGAAAGGGCCCGGGACGGAGGCT
CGGTTGTTGATGACCTGGGCGGCGAGGACGATCTCGTCAAAGCCGTTGATGTTGTGCCCGACGATGTAGA
GTTCCATGAATCGCGGGCGGCCTTTGATGTGCGGCAGCTTTTTGAGCTCCTCGTAGGTGAGGTCCTCGGG
GCATTGCAGGCCGTGCTGCTCGAGCGCCCACTCCTGGAGATGTGGGTTGGCTTGCATGAAGGAAGCCCAG
AGCTCGCGGGCCATGAGGGTCTGGAGCTCGTCGCGAAAGAGGCGGAACTGCTGGCCCACGGCCATCTTTT
CTGGGGTGACGCAGTAGAAGGTGAGGGGGTCCCGCTCCCAGCGATCCCAGCGTAAACGCACGGCGAGATC
GCGAGCGAGGGCGACCAGCTCTGGGTCCCCGGAGAATTTCATGACCAGCATGAAGGGGACGAGCTGCTTG
CCGAAGGACCCCATCCAGGTGTAGGTTTCTACATCGTAGGTGACAAAGAGCCGCTCCGTGCGAGGATGAG
AGCCGATTGGGAAGAACTGGATTTCCTGCCACCAGTTGGACGAGTGGCTGTTGATGTGATGAAAGTAGAA
ATCCCGCCGGCGAACCGAGCACTCGTGCTGATGCTTGTAAAAGCGTCCGCAGTACTCGCAGCGCTGCACG
GGCTGTACCTCATCCACGAGATACACAGCGCGTCCCTTGAGGAGGAACTTCAGGAGTGGCGGCCCTGGCT
GGTGGTTTTCATGTTCGCCTGCGTGGGACTCACCCTGGGGCTCCTCGAGGACGGAGAGGCTGACGAGCCC
GCGCGGGAGCCAGGTCCAGATCTCGGCGCGGCGGGGGCGGAGAGCGAAGACGAGGGCGCGCAGTTGGGAG
CTGTCCATGGTGTCGCGGAGATCCAGGTCCGGGGGCAGGGTTCTGAGGTTGACCTCGTAGAGGCGGGTGA
GGGCGTGCTTGAGATGCAGATGGTACTTGATTTCTACGGGTGAGTTGGTGGTCGTGTCCACGCATTGCAT
GAGCCCGTAGCTGCGCGGGGCCACGACCGTGCCGCGGTGCGCTTTTAGAAGCGGTGTCGCGGACGCGCTC
CCGGCGGCAGCGGCGGTTCCGGCCCCGCGGGCAGGGGCGGCAGAGGCACGTCGGCGTGGCGCTCGGGCAG
GTCCCGGTGCTGCGCCCTGAGAGCGCTGGCGTGCGCGACGACGCGGCGGTTGACATCCTGGATCTGCCGC
CTCTGCGTGAAGACCACGGGCCCCGTGACTTTGAACCTGAAAGACAGTTCAACAGAATCAATCTCTGCGT
CATTGACGGCGGCCTGACGCAGGATCTCTTGCACGTCGCCCGAGTTGTCCTGGTAGGCGATCTCGGACAT
GAACTGTTCGATCTCCTCCTCCTGGAGATCGCCGCGGCCCGCGCGCTCCACGGTGGCGGCGAGGTCATTG
GAGATGCGACCCATGAGCTGCGAGAAGGCGCCCAGGCCGCTCTCGTTCCAGACGCGGCTGTAGACCACGT
CCCCGTCGGCGTCGCGCGCGCGCATGACCACCTGCGCGAGGTTGAGCTCCACGTGCCGCGCAAAGACGGC
GTAGTTGCGCAGGCGCTGGAAGAGGTAGTTGAGGGTGGTGGCGATGTGCTCGGTGACGAAGAAGTACATG
ATCCAGCGGCGCAGGGGCATCTCGCTGATGTCGCCGATGGCTTCCAGCCTTTCCATGGCCTCGTAGAAGT
CCACGGCGAAGTTGAAAAACTGGGCGTTGCGGGCCGAGACCGTGAGCTCGTCTTCCAGGAGCCGGATGAG
TTCGGCGATGGTGGCGCGCACCTCGCGCTCGAAATCCCCGGGGGCCTCCTCCTCTTCCTCTTCTTCCATG
ACGACCTCTTCTTCTATTTCTTCCTCTGGGGGCGGTGGTGGTGGCGGGGGCCGACGACGACGGCGACGCA
CCGGGAGACGGTCGACGAAGCGCTCGATCATCTCCCCGCGGCGGCGACGCATGGTTTCGGTGACGGCGCG
ACCCCGTTCGCGAGGACGCAGCGTGAAGACGCCGCCGGTCATCTCCCGGTAATGGGGCGGGTCCCCATTG
GGCAGCGATAGGGCGCTGACGATGCATCTTATCAATTGCGGTGTAGGGGACGTGAGCGCGTCGAGATCGA
CCGGATCGGAGAATCTTTCGAGGAAAGCGTCTAGCCAATCGCAGTCGCAAGGTAAGCTCAAACACGTAGC
AGCCCTGCGGACGCTGTTAGAATTGCGGTTGCTGATGATGTAATTGAAGTAGGCGTTTTTGAGGCGGCGG
ATGGTGGCGAGGAGGACCAGGTCCTTGGGTCCAGCTTGCTGGATGCGGAGCCGCTCGGCCATGCCCCAGG
CCTGGCCCTGACACCGGCTCAGGTTCTTGTAGTAGTCATGCATGAGCCTCTCAATGTCATCACTGGCTGA
GGCGGAGTCTTCCATGCGGGTGACCCCGACGCCCCTGAGCGGCTGCACGAGCGCCAGGTCGGCGACGACG
CGCTCGGCGAGGATGGCCTGTTGCACGCGGGTGAGGGTGTCCTGGAAGTCGTCCATGTCGACGAAGCGGT
GATAGGCCCCGGTGTTGATGGTGTAGGTGCAGTTGGCCATGAGCGACCAGTTGACGGTCTGCAGGCCTGG
CTGCACGACCTCGGAGTACCTGAGCCGCGAGAAGGCGCGCGAGTCGAAGACGTAGTCGTTGCAGGTGCGC
ACGAGGTACTGGTATCCGACTAGGAAGTGCGGCGGCGGCTGGCGGTAGAGCGGCCAGCGCTGGGTGGCCG
GCGCGCCCGGGGCCAGGTCCTCGAGCATGAGGCGGTGGTAGCCGTAGAGGTAGCGGGACATCCAGGTGAT

【１０５４】

【化１４－３】

GCCGGCGGCGGTGGTGGAGGCGCGCGGGAACTCGCGGACGCGGTTCCAGATGTTGCGCAGCGGCAGGAAA
TAGTCCATGGTCGGCACGGTCTGGCCGGTGAGACGCGCGCAGTCATTGACGCTCTAGAGGCAAAAACGAA
AGCGGTTGAGCGGGCTCTTCCTCCGTAGCCTGGCGGAACGCAAACGGGTTAGGCCGCGTGTGTACCCCGG
TTCGAGTCCCCTCGAATCAGGCTGGAGCCGCGACTAACGTGGTATTGGCACTCCCGTCTCGACCCGAGCC
CGATAGCCGCCAGGATACGGCGGAGAGCCCTTTTTGCCGGCCGAGTGGGGTCGCTAGACTTGAAAGCGAC
CGAAAACCCtGCCGGGTAGTGGCTCGCGCCCGTAGTCTGGAGAAGCATCGCCAGGGTTGAGTCGCGGCAG
AACCCGGTTCGAGGACGGCCGCGGCGAGCGGGACTTGGTCACCCCGCCGATATAAAGACCCACAGCCAGC
CGACTTCTCCAGTTACGGGAGCGAGCCCCCTTTTTTCTTTTTGCCAGATGCATCCCGTCCTGCGCCAAAT
GCGTCCCACCCCCCCGGCGACCACCGCGACCGCGGCCGTAGCAGGCGCCGGCGCTAGCCAGCCACCACAG
ACAGAGATGGACTTGGAAGAGGGCGAAGGGCTGGCAAGACTGGGGGCGCCGTCCCCGGAGCGACATCCCC
GCGTGCAGCTGCAGAAGGACGTGCGCCCGGCGTACGTGCCTACGCAGAACCTGTTCAGGGACCGCAGCGG
GGAGGAGCCCGAGGAGATGCGCGACTGCCGGTTTCGGGCGGGCAGGGAGCTGCGCGAGGGCCTGGACCGC
CAGCGCGTGCTGCGCGACGAGGATTTCGAGCCGAACGAGCAGACGGGGATCAGCCCCGCACGCGCGCACG
TGGCGGCAGCCAACCTGGTGACGGCCTACGAGCAGACGGTGAAGCAGGAGCGCAACTTCCAAAAGAGTTT
CAACAACCACGTGCGCACCCTGATCGCGCGCGAGGAGGTGGCCCTGGGCCTGATGCACCTGTGGGACCTG
GCGGAGGCCATCGTGCAGAACCCGGACAGCAAGCCTCTGACGGCGCAGCTGTTCCTGGTGGTGCAGCACA
GCAGGGACAACGAGGCGTTCAGGGAGGCGCTGCTGAACATCGCCGAGCCCGAGGGTCGCTGGCTGCTGGA
GCTGATTAACATCTTGCAGAGCATCGTAGTGCAGGAGCGCAGCCTGAGCCTGGCCGAGAAGGTGGCGGCG
ATCAACTACTCGGTGCTGAGCCTGGGCAAGTTTTACGCGCGCAAGATTTACAAGACGCCGTACGTGCCCA
TAGACAAGGAGGTGAAGATAGACAGCTTTTACATGCGCATGGCGCTCAAGGTGCTGACGCTGAGCGACGA
CCTgGGCGTGTACCGCAACGACCGCATCCACAAGGCCGTGAGCACGAGCCGGCGGCGCGAGCTGAGCGAC
CGCGAGCTGATGCTGAGTCTGCGCCGGGCGCTGGTAGGGGGCGCCGCCGGCGGCGAGGAGTCCTACTTCG
ACATGGGTGCGGACCTGCATTGGCAGCCGAGCCGGCGCGCCTTGGAGGCCGCCTACGGTTCAGAGGACTT
GGATGAGGAAGAGGAAGAGGAGGAGGATGCACCCGCTGCGGGGTACTGACGCCTCCGTGATGTGTTTTTA
GATGTCCCAGCAAGCCCCGGACCCCGCCATAAGGGCGGCGCTGCAAAGCCAGCCGTCCGGTCTAGCATCG
GACGACTGGGAGGCCGCGATGCAACGCATCATGGCCCTGACGACCCGCAACCCCGAGTCCTTTAGACAAC
AGCCGCAGGCCAACAGACTCTCGGCCATTCTGGAGGCGGTGGTCCCCTCTCGGACCAACCCCACGCACGA
GAAGGTGCTGGCGATCGTGAACGCGCTGGCGGAGAACAAGGCCATCCGTCCCGACGAGGCCGGGCTGGTG
TACAACGCCCTGCTGGAGCGCGTGGGCCGCTACAACAGCACGAACGTGCAGTCCAACCTGGATCGGCTGG
TGACGGACGTGCGCGAGGCCGTGGCGCAGCGCGAGCGGTTCAAGAACGAGGGCCTGGGCTCGCTGGTGGC
GCTGAACGCCTTCCTGGCgACGCAGCCGGCGAACGTGCCGCGCGGGCAGGACGATTACACCAACTTTATC
AGCGCGCTGCGGCTGATGGTGACCGAGGTGCCCCAGAGCGAGGTGTACCAGTCTGGCCCGGACTACTTTT
TCCAGACGAGCCGGCAGGGCTTGCAGACGGTGAACCTGAGCCAGGCTTTCAAGAATCTGCGCGGGCTGTG
GGGCGTGCAGGCGCCCGTGGGCGACCGGTCAACGGTGAGCAGCTTGCTGACGCCCAACTCGCGGCTGCTG
CTGCTGCTGATCGCGCCCTTCACCGACAGCGGCAGCGTGAACCGCAACTCGTACCTGGGCCATCTGCTGA
CGCTGTACCGCGAGGCCATAGGCCAGGCGCAGGTGGACGAGCAGACCTTCCAGGAGATCACTAGCGTGAG
CCGCGCGCTGGGGCAGAACGACACCGACAGTCTGAGGGCCACCCTGAACTTTTTGCTGACCAATAGACAG
CAGAAGATCCCGGCGCAGTACGCACTGTCGGCCGAGGAGGAAAGGATTCTGAGATATGTGCAGCAGAGCG
TAGGGCTGTTCCTGATGCAGGAGGGTGCCACCCCCAGCGCCGCGCTGGACATGACCGCGCGCAACATGGA
ACCTAGCATGTACGCCGCCAACCGGCCGTTCATCAATAAGCTGATGGACTACTTGCACCGCGCGGCGGCC
ATGAACACGGACTACTTTACCAACGCCATCCTGAACCCGCACTGGCTCCCGCCGCCGGGGTTCTACACGG
GCGAGTACGACATGCCCGACCCCAACGACGGGTTCCTGTGGGACGACGTGGACAGCGCGGTGTTCTCGCC
GACCTTTCAAAAGCGCCAGGAGGCGCCGCCGAGCGAGGGCGCGGTGGGGAGGAGCCCCTTTCCTAGCTTA
GGGAGTTTGCATAGCTTGCCGGGCTCGGTGAACAGCGGCAGGGTGAGCCGGCCGCGCTTGCTGGGCGAGG
ACGAGTACCTGAACGACTCGCTGCTGCAGCCGCCGCGGGCCAAGAACGCCATGGCCAATAACGGGATAGA
GAGTCTGGTGGACAAACTGAACCGCTGGAAGACCTACGCTCAGGACCATAGGGACGCGCCCGCGCCGCGG
CGACAGCGCCACGACCGGCAGCGGGGCCTGGTGTGGGACGACGAGGACTCGGCCGACGATAGCAGCGTGT
TGGACTTGGGCGGGAGCGGTGGGGTCAACCCGTTCGCGCATCTGCAGCCCAAACTGGGGCGACGGATGTT
TTGAATGAAATAAAACTCACCAAGGCCATAGCGTGCGTTCTCTTCCTTGTTAGAGATGAGGCGCGCGGTG
GTGTCTTCCTCTCCTCCTCCCTCGTACGAGAGCGTGATGGCGCAGGCGACCCTGGAGGTTCCGTTTGTGC
CTCCGCGGTATATGGCTCCTACGGAGGGCAGAAACAGCATTCGTTACTCGGAGCTGGCTCCGCAGTACGA
CACCACTCGCGTGTACTTGGTGGACAACAAGTCGGCGGACATCGCTTCCCTGAACTACCAAAACGACCAC

【１０５５】

【化１４－４】

AGCAACTTCCTGACCACGGTGGTGCAGAACAACGATTTCACCCCCGCCGAGGCCAGCACGCAGACGATAA
ATTTTGACGAGCGGTCGCGGTGGGGCGGTGATCTGAAGACCATTCTGCACACTAACATGCCCAATGTGAA
CGAGTACATGTTCACCAGCAAGTTTAAGGCGCGGGTGATGGTGTCTAGGAAGCATCCAGAGGGGGTAGTT
GAAACAGATTTGAGTCAGGATAAGCTTGAATATGAGTGGTTTGAGTTTACCCTGCCCGAGGGAAACTTTT
CCGAGACCATGACCATAGACCTGATGAACAACGCCATCTTGGAAAACTACTTGCAAGTGGGGCGGCAGAA
TGGCGTGCTGGAGAGCGATATCGGAGTCAAGTTTGACAGCAGAAATTTCAAGCTGGGCTGGGACCCGGTG
ACCAAGCTGGTGATGCCAGGGGTCTACACCTACGAGGCCTTCCACCCGGACGTGGTGCTGCTGCCGGGCT
GCGGGGTGGACTTCACCGAGAGCCGCCTGAGCAACCTCCTGGGCATTCGCAAGAAGCAACCTTTCCAAGA
GGGCTTCAGAATCATGTATGAGGATCTAGAAGGTGGCAACATCCCCGCCCTCCTTGATGTGCCCAAGTAC
TTGGAAAGCAAGAAGAAAGTTGAAGACGAAACTAAAAATGCAGCTGCGGCCACAGCCGATACAACCACTA
GGGGTGATACATTTGCAACTCCAGCGCAAGAGACAGCAGCTGATAAGAAGGTAGAAGTCTTGCCCATTGA
AAAGGATGAGAGTGGTAGAAGTTACAACCTGATCCAGGGGACCCACGACACGCTGTACCGCAGTTGGTAC
CTGTCCTATACCTACGGGGACCCCGAGAAGGGGGTGCAGTCGTGGACGCTGCTCACCACCCCGGACGTTA
CCTGCGGCGCGGAGCAAGTCTACTGGTCACTGCCGGACCTCATGCAAGACCCCGTCACCTTCCGCTCCAC
CCAGCAAGTCAGCAACTACCCCGTGGTCGGCGCCGAGCTCATGCCCTTCCGCGCCAAGAGCTTTTACAAC
GACCTCGCCGTCTACTCCCAGCTCATCCGCAGCTACACCTCCCTCACCCACGTCTTCAACCGCTTCCCCG
ACAACCAGATCCTCTGCCGCCCGCCCGCGCCCACCATCACCACCGTCAGTGAAAACGTGCCTGCTCTCAC
AGATCACGGGACGCTACCGCTGCGCAGCAGTATCCGCGGAGTCCAGCGAGTGACCGTCACTGACGCCCGT
CGCCGCACCTGTCCCTACGTCTACAAGGCCCTGGGCATAGTCGCGCCGCGCGTGCTTTCCAGTCGCACCT
TCTAAAAAAATGTCTATTCTCATCTCGCCCAGCAATAACACCGGCTGGGGTCTTACTAGACCCAGCACCA
TGTACGGAGGAGCCAAGAAGCGCTCCCAGCAGCACCCCGTCCGCGTCCGCGGCCACTTCCGCGCTCCCTG
GGGCGCaTACAAGCGCGGGCGGACTTCCACCGCCGCCGTGCGCACCACCGTCGACGACGTCATCGACTCG
GTGGTCGCCGACGCGCGCAACTAtACcCCCGCCCCCTCCACCGTGGACGCGGTCATCGACAGCGTGGTGG
CCGACGCGCGCGACTATGCCAGACGCAAGAGCCGGCGGCGACGGATCGCCAGGCGCCACCGGAGCACGCC
CGCCATGCGCGCCGCCCGGGCTCTGCTGCGCCGCGCCAGACGCACGGGCCGCCGGGCCATGATGCGAGCC
GCGCGCCGCGCTGCCACTGCACCCACCCCCGCAGGCAGGACTCGCAGACGAGCGGCCGCCGCCGCCGCTG
CGGCCATCTCTAGCATGACCAGACCCAGGCGCGGAAACGTGTACTGGGTGCGCGACTCCGTCACGGGCGT
GCGCGTGCCCGTGCGCACCCGTCCTCCTCGTCCCTGATCTAATGCTTGTGTCCTCCCCCGCAAGCGACGA
TGTCAAAGCGCAAAATCAAGGAGGAGATGCTCCAGGTCGTCGCCCCGGAGATTTACGGACCACCCCAGGC
GGACCAGAAACCCCGCAAAATCAAGCGGGTTAAAAAAAAGGATGAGGTGGACGAGGGGGCAGTAGAGTTT
GTGCGCGAGTTCGCTCCGCGGCGGCGCGTAAATTGGAAGGGGCGCAGGGTGCAGCGCGTGTTGCGGCCCG
GCACGGCGGTGGTGTTCACGCCCGGCGAGCGGTCCTCGGTCAGGAGCAAGCGTAGCTATGACGAGGTGTA
CGGCGACGACGACATCCTGGACCAGGCGGCGGAGCGGGCGGGCGAGTTCGCCTACGGGAAGCGGTCGCGC
GAAGAGGAGCTGATCTCGCTGCCGCTGGACGAAAGCAACCCCACGCCGAGCCTGAAGCCCGTGACCCTGC
AGCAGGTGCTGCCCCAGGCGGTGCTGCTGCCGAGCCGCGGGGTCAAGCGCGAGGGCGAGAGCATGTACCC
GACCATGCAGATCATGGTGCCCAAGCGCCGGCGCGTGGAGGACGTGCTGGACACCGTGAAAATGGATGTG
GAGCCCGAGGTCAAGGTGCGCCCCATCAAGCAGGTGGCGCCGGGCCTGGGCGTGCAAACCGTGGACATTC
AGATCCCCACCGACATGGATGTCGACAAAAAACCCTCGACCAGCATCGAGGTGCAAACCGACCCCTGGCT
CCCAGCCTCCACCGCTACCGTCTCCACTTCTACCGCCGCCACGGCTACCGAGCCTCCCAGGAGGCGAAGA
TGGGGCGCCGCCAGCCGGCTGATGCCCAACTACGTGTTGCATCCTTCCATCATCCCGACGCCGGGCTACC
GCGGCACCCGGTACTACGCCAGCCGCCGGCGCCCAGCCAGCAAACGCCGCCGCCGCACCGCCACCCGCCG
CCGTCTGGCCCCCGCCCGCGTGCGCCGCGTGACCACGCGCCGGGGCCGCTCGCTCGTTCTGCCCACCGTG
CGCTACCACCCCAGCATCCTTTAATcCGTGTGCTGTGATACTGTTGCAGAGAGATGGCTCTCACTTGCCG
CCTGCGCATCCCCGTCCCGAATTACCGAGGAAGATCCCGCCGCAGGAGAGGCATGGCAGGCAGCGGCCTG
AACCGCCGCCGGCGGCGGGCCATGCGCAGGCGCCTGAGTGGCGGCTTTCTGCCCGCGCTCATCCCCATAA
TCGCCGCGGCCATtGGCACGATCCCGGGCATAGCTTCCGTTGCGCTGCAGGCGTCGCAGCGCCGTTGATG
TGCGAATAAAGCCTCTTTAGACTCTGACACACCTGGTCCTGTATATTTTTAGAATGGAAGACATCAATTT
TGCGTCCCTGGCTCCGCGGCACGGCACGCGGCCGTTCATGGGCACCTGGAACGAGATCGGCACCAGCCAG
CTGAACGGGGGCGCCTTCAATTGGAGCAGTGTCTGGAGCGGGCTTAAAAATTTCGGCTCGACGCTCCGGA
CCTATGGGAACAAGGCCTGGAATAGTAGCACGGGGCAGTTGTTGAGGGAAAAGCTCAAAGACCAgAACTT
CCAGCAGAAGGTGGTGGACGGGCTGGCCTCGGGCATTAACGGGGTGGTGGACATCGCGAACCAGGCCGTG
CAGCGCGAGATAAACAGCCGCCTGGACCCGCGACCGCCCACGGTGGTGGAGATGGAAGATGCAACTCTTC

【１０５６】

【化１４－５】

CGCCGCCCAAgGGCGAgAAGCGGCCGCGGCCCGACGCGGAGGAGACGATCCTGCAGGTGGACGAGCCGCC
CTCGTACGAGGAGGCCGTCAAGGCCGGCATGCCCACCACGCGCATCATCGCGCCGCTGGCCACGGGTGTA
ATGAAACCCGCCACCCTTGACCTGCCTCCACCACCCGCGCCCGCTCCACCGAAGGCAACTCCGGTTGTGC
AGGCCCCCCCGGTGGCGACCGCCGTGCGCCGCGTCCCCGCCCGCCGCCAGGCCCAGAACTGGCAGAGCAC
GCTGCACAGTATCGTGGGCCTGGGAGTGAAAAGTCTGAAGCGCCGCCGATGCTATTGAGAGAGAGGAAAG
AGGACACTAAAGGGAGAGCTTAACTTGTATGTGCCTTACCGCCAGAGAACGCGCGAAGATGGCCACCCCC
TCGATGATGCCGCAGTGGGCGTACATGCACATCGCCGGGCAGGACGCCTCGGAGTACCTGAGCCCGGGTC
TGGTGCAGTTTGCCCGCGCCACCGACACGTACTTCAGCCTGGGCAACAAGTTTAGGAACCCCACGGTGGC
CCCGACCCACGATGTGACCACGGACCGGTCCCAGCGTCTGACGCTGCGCTTCGTGCCCGTGGATCGCGAG
GACACCACGTACTCGTACAAGGCGCGCTTCACTCTGGCCGTGGGCGACAACCGGGTGCTAGACATGGCCA
GCACTTACTTTGACATCCGCGGCGTCCTGGACCGCGGTCCCAGCTTCAAACCCTACTCGGGCACGGCCTA
CAACAGCCTGGCTCCCAAGGGTGCCCCCAATCCCAGTCAGTGGGAAACAAAAGAAAAGCAAGGAACTACT
GGAGGAGTGCAGCAAGAAAAAGATGTCACAAAAACATTTGGTGTGGCTGCCACCGGCGGAATTAATATAA
CAAACCAGGGTCTGTTACTAGGAACTGACGAAACCGCTGAGAATGGCAAAAAAGACATTTATGCAGACAA
GACTTTCCAGCCAGAACCTCAAGTTGGAGAAGAAAACTGGCAGGAAAATGAAGCCTTCTATGGAGGAAGG
GCTCTTAAAAAGGACACTAAAATGAAACCATGCTATGGATCTTTTGCTAGACCTACTAATGAGAAAGGAG
GTCAGGCAAAGTTCAAACCAGTTAATGAAGGAGAACAACCTAAAGATCTGGATATAGATTTTGCTTACTT
TGACGTCCCTGGCGGAAGTCCTCCAGCAGGTGGTAGTGGGGAAGAATACAAAGCAGATATAATTTTGTAC
ACTGAAAATGTTAATCTTGAAACACCAGACACTCATGTGGTTTACAAGCCAGGAACTTCAGATAACAGTT
CAGAAATCAATCTGGTTCAGCAGTCCATGCCAAACAGACCCAACTACATTGGCTTTAGGGACAACTTTGT
AGGTCTCATGTATTACAACAGCACCGGAAATATGGGTGTGCTGGCTGGTCAGGCTTCTCAGTTGAACGCT
GTGGTCGACTTGCAAGACAGAAACACCGAGTTATCTTACCAGCTATTGCTAGATTCTCTGGGTGACAGAA
CCAGATACTTTAGCATGTGGAACTCTGCGGTGGACAGTTACGATCCAGATGTCAGGATCATTGAAAATCA
CGGTGTGGAAGATGAACTTCCAAACTATTGCTTCCCATTGAATGGCACTGGAACCAATTCCACTTATCAA
GGTGTAAAGATTACAAATGGTAATGATGGTGCTGAAGAAAGTGAGTGGGAGAAAGACGATGCAATTTCTA
GACAAAACCAAATCTGCAAGGGCAATGTCTACGCCATGGAGATCAACCTGCAGGCCAACCTGTGGAAGAG
TTTTCTGTACTCGAACGTGGCCCTGTACCTGCCCGACTCCTACAAGTACACGCCGGCCAACGTCAAGCTG
CCCGCCAACACCAACACCTACGAGTACATGAACGGCCGCGTGGTAGCCCCcTCgCTGGTGGACGCCTACA
TCAACATCGGCGCCCGCTGGTCGTTGGACCCCATGGACAACGTCAACCCCTTCAACCACCACCGCAATGC
GGGCCTGCGCTACCGCTCCATGCTGCTGGGCAACGGCCGCTACGTGCCCTTCCACATCCAAGTGCCCCAA
AAGTTCTTTGCCATCAAGAACCTGCTCCTGCTCCCGGGCTCCTACACCTACGAGTGGAACTTCCGCAAGG
ACGTCAACATGATCCTGCAGAGTTCCCTCGGCAACGACCTGCGCGTCGACGGCGCCTCCGTCCGCTTCGA
CAGCGTCAACCTATACGCCACTTTCTTCCCCATGGCGCACAACACCGCTTCAACCTTGGAAGCCATGCTG
CGCAACGACACCAACGACCAGTCCTTCAACGACTACCTCTCGGCCGCCAACATGCTCTACCCCATCCCGG
CCAAGGCCACCAACGTGCCCATCTCCATCCCATCGCGCAACTGGGCCGCCTTCCGCGGCTGGAGTTTCAC
CCGGCTCAAGACCAAGGAAACTCCTTCCCTCGGCTCGGGTTTCGACCCCTACTTTGTCTACTCGGGCTCC
ATCCCCTACCTCGACGGGACCTTCTACCTCAACCACACCTTCAAGAAGGTCTCCATCATGTTCGACTCCT
CGGTCAGCTGGCCCGGCAACGACCGGCTGCTCACGCCGAACGAGTTCGAGATCAAGCGCAGCGTCGACGG
GGAGGGCTACAACGTGGCCCAATGCAACATGACCAAGGACTGGTTCCTCGTCCAGATGCTCTCCCACTAC
AACATCGGCTACCAGGGCTTCCACGTGCCCCGAGGGCTACAAGGACCGCATGTACTCCTTCTTCCGCAACT
TCCAGCCCATGAGCAGGCAGGTGGTCGATGAGATCAACTACAAGGACTACAAGGCCGTCACCCTGCCCTT
CCAGCACAATAACTCGGGCTTCACCGGCTACCTCGCACCCACCATGCGCCAGGGGCAGCCCTACCCCGCC
AACTTCCCCTACCCGCTCATCGGTCAGACAGCCGTGCCCTCCGTCACCCAGAAAAAGTTCCTCTGCGACA
GGGTCATGTGGCGCATCCCcTTCTCCAGCAACTTCATGTCCATGGGCGCCCTCACCGACCTGGGTCAGAA
CATGCTCTACGCCAACTCGGCCCACGCGCTCGACATGACCTTCGAGGTGGACCCCATGGATGAGCCCACC
CTCCTCTATCTTCTCTTCGAAGTTTTCGACGTGGTCAGAGTACACCAGCCGCACCGCGGCGTCATCGAGG
CCGTCTACCTGCGCACGCCCTTCTCCGCCGGCAACGCCACCACCTAAGCATGAGCGGCTCCAGCGAACGA
GAGCTCGCGGCCATCGTGCGCGACCTGGGCTGCGGGCCCTACTTTTTGGGCACCCACGACAAGCGCTTCC
CGGGCTTTCTCGCCGGCGACAAGCTGGCCTGCGCCATCGTCAACACGGCCGGCCGCGAGACCGGAGGCGT
GCACTGGCTCGCCTTCGGCTGGAACCCGCGCTCGCGCACCTGCTACATGTTCGACCCCTTTGGGTTCTCG
GACCGCCGGCTCAAGCAGATTTACAGCTTCGAGTACGAGGCCATGCTGCGCCGCAGCGCCCTGGCCTCCT
CGCCCGACCGCTGTCTCAGCCTCGAGCAGTCCACTCAGACCGTGCAGGGGCCCGACTCCGCCGCCTGCGG

【１０５７】

【化１４－６】

ACTCTTCTGTTGCATGTTCTTGCATGCCTTCGTGCACTGGCCCGACCGACCCATGGACGGAAACCCCACC
ATGAACTTGCTGACGGGGGTGCCCAACGGCATGCTACAATCGCCACAGGTGCTGCCCACCCTCAGGCGCA
ACCAGGAGGAACTCTACCGCTTCCTCGCGCGCCACTCCCCTTACTTTCGCTCCCACCGCGCCGCCATCGA
ACACGCCACCGCTTTTGACAAAATGAAACAACTGCGTGTATCTCAATAAACAGCACTTTTATTTTACATG
CACTGGAGTATATGCAAGTTATTTAAAAGTCGAAGGGGTTCTCGCGCTCGTCGTTGTGCGCCGCGCTGGG
GAGGGCCACGTTGCGGTACTGGTACTTGGGCTGCCACTTGAACTCGGGGATCACCAGTTTGGGCACTGGG
GTCTCGGGGAAGGTCTCGCTCCACATGCGCCGGCTCATCTGCAGGGCGCCCAGCATGTCCGGGGCGGAGA
TCTTGAAATCGCAGTTGGGGCCGGTGCTCTGCGCGCGCGAGTTGCGGTACACGGGGTTGCAGCACTGGAA
CACCATCAGACTGGGGTACTTCACACTAGCCAGCACGCTCTTGTCGCTGATCTGATCCTTGTCCAGATCC
TCGGCGTTGCTCAGGCCGAACGGGGTCATCTTGCACAGCTGGCGTCCCAGGAAGGGCACGCTCTGAGGCT
TGTGGTTACACTCGCAGTGCACGGGCATCAGCATCATCCCCGCGCCGCGCTGCATATTCGGGTAGAGGGC
CTTGACAAAGGCCGCGATCTGCTTGAAAGCTTGCTGGGCCTTGGCCCCCTCGCTGAAAAACAGGCCGCAG
CTCTTCCCGCTGAACTGGTTATTCCCACACCCGGCATCCTGCACGCAGCAGCGCGCGTCATGGCTGGTCA
GTTGCACCACGCTCCGTCCCCAGCGGTTCTGGGTCACCTTAGCCTTGCTGGGCTGCTCCTTCAACGCGCG
CTGCCCGTTCTCGCTGGTCACATCCATCTCCACCACGTGGTCCTTGTGGATCATCATCGTCCCGTGCAGA
CACTTGAGCTGGCCTTCCACCTCGGTGCAGCCGTGATCCCACAGGGCGCAACCGGTGCACTCCCAGTTCT
TGTGCGCAATCCCGCTGTGGCTGAAGATGTAACCTTGCAACATGCGGCCCATGATGGTGCTAAATGCTTT
CTGGGTGGTGAAGGTCAGTTGCATCCCGCGGGCCTCCTCGTTCATCCAGGTCTGGCACATCTTCTGGAAG
ATCTCGGTCTGCTCGGGCATGAGCTTGTAAGCATCGCGCAGGCCGCTGTCGACGCGGTAGCGTTCCATCA
GCACGTTCATGGTATCCATGCCCTTCTCCCAGGACGAGACCAGAGGCAGACTCAGAGGGTTGCGTACGTT
CAGGACACCGGGGGTCGCGGGCTCGACGATGCGTTTTCCGTCCTTGCCTTCCTTCAATAGAACCGGCGGC
TGGCTGAATCCCACTCCCACGATCACGGCATCTTCCTGGGGCATCTCTTCGTCGGGGTCTACCTTGGTCA
CATGCTTGGTCTTTCTGGCTTGCTTCTTTTTTGGAGGGCTGTCCACGGGGAGCACGTCCTCCTCGGAAGA
CCCGGAGCCCACCCGCTGATACTTTCGGCGCTTGGTGGGCAGAGGAGGTGGCGGCGAGGGGCTCCTCTCC
TGCTCCGGCGGATAGCGCGCCGACCCGTGGCCCCGGGGCGGAGTGGCCTCTCGGCCCATGAACCGGCGCA
CGTCCTGACTGCCGCCGGCCATTGTTTCCTAGGGGAAGATGGAGGAGCAGCCGCGTAAGCAGGAGCAGGA
GGAGGACTTAACCACCCACGAGCAACCCAAAATCGAGCAGGACCTGGGCTTCGAAGAGCCGGCTCGTCTA
GAACCCCCACAGGATGAACAGGAGCACGAGCAAGACGCAGGCCAGGAGGAGACCGACGCTGGGCTCGAGC
ATGGCTACCTGGGAGGAGAGGAGGATGTGCTGCTGAAACACCTGCAGCGCCAGTCCCTCATCCTCCGGGA
CGCCCTGGCCGACCGGAGCGAAACCCCCCTCAGCGTCGAGGAGCTGTGTCGGGCCTACGAGCTCAACCTC
TTCTCGCCGCGCGTACCCCCCAAACGCCAGCCCAACGGCACCTGCGAGCCCAACCCGCGTCTCAACTTCT
ATCCCGTCTTTGCGGTCCCCGAAGCCCTCGCCACCTATCACATCTTTTTCAAGAACCAAAAGATCCCCGT
CTCCTGCCGCGCCAACCGCACCAGCGCCGACGCGCTCCTCGCTtTGGGGCCCGGCGCGCGCATACCTGAT
ATCGCTTCCCTGGAAGAGGTGCCCAAGATCTTCGAAGGGCTCGGTCGGGACGAGACGCGCGCGGCGAACG
CTCTGAAAGAAACAGCAGAGGAAGAGGGTCACACTAGCGCCCTGGTAGAGTTGGAAGGCGACAACGCCAG
GCTGGCCGTGCTCAAGCGCAGCGTCGAGCTtACCCACTTCGCCTACCCCGCCGTCAACCTCCCGCCCAAG
GTCATGCGTCGCATCATGGATCAGCTCATCATGCCCCACATCGAGGCCCTCGATGAAAGTCAGGAGCAGC
GCCCCGAGGACGCCCGGCCCGTGGTCAGCGACGAGATGCTCGCGCGCTGGCTCGGGACCCgCGACCCCCA
GGCTTTGGAACAGCGGCGCAAaCTCATGCTGGCCGTGGTCCTGGTcACCCTtGAGCTcGAATGCATGCGC
CGCTTtTTCAGCGACCCCGAGACCCTGCGCAAGGTCGAGGAGACCCTGCACTACACTTTCAGgCACGGTT
TCGTCAGGCAGGCCTGCAAGATCTCCAACGTGGAGCTGACCAACCTGGTCTCCTGCCTGGGGATCCTGCA
CGAGAACCGCCTGGGcCAGACCGTGCTCCACTCTACCCTGAAGGGCGAGGCGCGGCGGGACTATGTCCGC
GACTGCGTCTTTCTcTTTCTcTGCCACACATGGCAAGCgGCCATGGGCGTGTGGCAgCAGTGTCTCGAGG
ACGAgAACCTaAAGGAGCTGGACAAGCTTCTTGCTAGAAAcCTTAAAAAGCTGTGGACGGGCTTCGACGA
GCGCACCGTCGCCTCGGACCTGGCCGAGATCGTcTTCCCCGAGCGCCTGAGaCAGACGCTGAAAGGCGGG
CTGCCCGACTTCATGAGCCAGAGCATGTTGCAAAACTACCGCACTTTCATTCTtGAGCGATCaGGcATcC
TGCCCGCCACCTGCAACGCcTTCCCCTCCGACTTTGTaCCGCTGAGCTACCGCGAGTGTCCCCCGCCGCT
GTGGAGCCACTGCTACCTCTTGCAGCTGGCCAACTACATCGCCTACCACTCGGACGTGATCGAGGACGTG
AGCGGCGAGGGGCTGCTCGAGTGCCACTGtCGCTGCAACCTGTGCTCCCCGCAtCGCTCCCTGGTCTGCA
ACCCCCAGCTcCTgAGCGAGACCCAGGTCATCGGTACCTTcGAGCTGCAAGGTCCGCAGGAGTCCACCGC
TCCGCTGAAACTCACGCCGGGGTTGTGGACTTCCGCGTACCTGCGCAAATTTGTACCCGAaGACTACCAC
GCCCAtGAGATAAAGTTCTTTtGAGGACCAATCGCGTCCGCAGCACGCGGATCTCACGGCCTGCGTCATCA

【１０５８】

【化１４－７】

CCCAGGGCGCgATCCTCGCCCAATTGCACGCCATCCAAAAATCCCGCCAAGAGTTTCTTCTGAAAAAGGG
TAGAGGGGTCTACCTGGACCCCCAGACGGGCGAgGTGCTCAACCCGGGTCTCCCCCAGCATGCCGAGGAA
GAAGCAGGAGCCGCTAGTGGAGGAGATGGAAGAAGAATGGGACAGCCAGGCAGAGGAGGACGAATGGGAG
GAGGAGACAGAGGAGGAAGAATTGGAAGAGGTGGAAGAGGAGCAGGCAACAGAGCAGCCCGTCGCCGCAC
CATCCGCGCCGGCAGCCCCGCCGGTCACGGATACAACCTCCGCTCCGGtCAAGCCTCCTCGTAGATGGGA
TCaAGTGAAGGGTGACGGTAAGCACGAGCGGCAGGGCTACCGATCATGGAGGGCCCACAAAGCCGCGATC
ATCGCCTGCTTGCAAGACTGCGGGGGGAACATCGCTTTCGCCCGCCGCTACCTGCTCTTCCACCGCGGGG
TgAACATCCCCCGCAACGTGTTGCATTACTACCGTCACCTTCACAGCTAAGAAAAAGCAAGTcAAAGGAG
TCGCCGGAGGAGGAGgagGaggCCTGAGGATCGCGGCGAACGAGCCCTTGACCACCAGGGAGCTGAGGAA
CCGGATCTTCCCCACTCTTTATGCCATTTTTCAGCAGAGTCGAGGTCAGCAGCAAGAGCTCAAAGTAAAA
AACCGGTCTCTGCGCTCGCTCACCCGCAGTTGCTTGTACCACAAAAACGAAGATCAGCTGCAGCGCACTC
TCGAAGACGCCGAGGCTCTGTTCCACAAGTACTGCGCGCTCACTCTTAAAGACTAAGGCGCGCCCACCCG
GAAAAAAGGCGGGAATTACCTCATCGCCACCATGAGCAAGGAGATTCCCACCCCTTACATGTGGAGCTAT
CAGCCCCAAATGGGCCTGGCCGCGGGCGCCTCCCAGGACTACTCCACCCGCATGAACTGGCTCAGTGCCG
GCCCCTCGATGATCTCACGGGTCAACGGGGTCCGCAGTCATCGAAACCAGATATTGTTGGAGCAGGCGGC
GGTCACCTCCACGCCCAGGGCAAAGCTCAACCCGCGTAATTGGCCCTCCACCCTGGTGTATCAGGAAATC
CCCGGGCCGACTACCGTACTACTTCCGCGTGACGCACTGGCCGAAGTCCGCATGACTAACTCAGGTGTCC
AGCTGGCCGGCGGCGCTTCCCGGTGCCCGCTCCGCCCACAATCGGGTATAAAAACCCTGGTGATCCGAGG
CAGAGGCACACAGCTCAACGACGAGTTGGTGAGCTCTTCGATCGGTCTGCGACCGGACGGAGTGTTCCAA
CTAGCCGGAGCCGGGAGATCCTCCTTCACTCCCAACCAGGCCTACCTGACCTTGCAGAGCAGCTCTTCGG
AGCCTCGCTCCGGAGGCATCGGAACCCTCCAGTTTGTGGAGGAGTTTGTGCCCTCGGTCTACTTCAACCC
CTTCTCGGGATCGCCAGGCCTCTACCCGGACGAGTTCATACCGAACTTCGACGCAGTGAGAGAAGCGGTG
GACGGCTACGACTGAATGTCCCATGGTGACTCGGCTGAGCTCGCTCGGTTGAGGCATCTGGACCACTGCC
GCCGCCTGCGCTGCTTCGCCCGGGAGAGCTGCGGACTCATCTACTTTGAGTTTCCCGAGGAGCACCCCAA
CGGCCCTGCACACGGAGTGCGGATCACCGTAGAGGGCACCACCGAGTCTCACCTGGTCAGGTTCTTCACC
CAGCAACCCTTCCTGGTCGAGCGGGACCGGGGCGCCACCACCTACACCGTCTACTGCATCTGTCCAACCC
CGAAGTTGCATGAGAATTTTTGTTGTACTCTTTGTGGTGAGTTTAATAAAAGCTAAACTCTTGCAATACT
CTGGACCTTGTCGTCGTCAACTCAACGAGACCGTCTACCTCACCAACCAGACTGAGGTAAAACTCACCTG
CAGACCACACAAGACCTATATCATCTGGTTCTTCGAGAACACCTCATTTGCAGTCTCCAACACTCACTGC
ActagtCCATGAACTGATGTTGATTAAAAGCCCAAAAACCAATCAGCCCCTTCCCCCATTTCCCCATCCC
CCAATTACTCATAAAAAATAAATCATTGGAATTAATCATTCAATAAAGATCACTTACTTGAAATCTGAAA
GTATGTCTCTGGTGTAGTTGTTCAGCAGCACCTCGGTACCCTCCTCCCAGCTCTGGTACTCCAGTCCCCG
GCGGGCGGCGAACTTCCTCCACACCTTGAAAGGGATGTCAAATTCCTGGTCCACAATTTTCATTGTCTTC
CCTCTCAGATGGCAAAGAGGCTCCGGGTGGAAGATGACTTCAACCCCGTCTACCCCTATGGCTACGCGCG
GAATCAGAATATCCCCTTCCTCACTCCCCCCTTTGTCTCCTCCGATGGATTCAAAAACTTCCCCCCTGGG
GTCCTGTCACTTAAACTGGCTGATCCAATCACCATCAACAATGGGGATGTCTCACTTAAGGTGGGAGGGG
GACTTGCTGTAGAGCAACAGACTGGTAACCTAAGCGTAAACCCTGATGCACCCTTGCAAGTTGCAAGTGA
TAAGCTACAGCTTGCTCTGGCTCCTCCATTCGAGGTCAGAGATGGAAAGCTTGCTTTAAAGGCAGGTAAT
GGATTAAAAGTACTAGATAATTCCATTACTGGATTGACTGGATTATTGAATACACTTGTGGTATTAACTG
GAAGGGGAATAGGAACGGAGGAATTAAAAAATGACGATGGTGTAACAAACAAAGGAGTCGGCTTGCGTGT
AAGACTTGGAGATGACGGCGGGCTGACATTTGATAAAAAGGGTGATTTAGTAGCCTGGAATAAAAAAGAT
GACAGGCGCACCCTGTGGACAACCCCTGACACATCTCCAAATTGCAAAATGAGTACAGAAAAGGATTCTA
AACTTACGTTGACACTTACAAAGTGTGGAAGTCAGGTTCTGGGAAATGTATCTTTACTTGCAGTTACAGG
TGAATATCATCAAATGACTGCTACTACAAAGAAGGATGTAAAAATATCTTTACTATTTGATGAGAATGGA
ATTCTATTACCATCTTCGTCCCTTAGCAAAGATTATTGGAATTACAGAAGTGATGATTCTATTGTATCTC
AAAAATATAATAATGCAGTTCCATTCATGCCAAACCTGACAGCTTATCCAAAACCAAGCGCTCAAAATGC
AAAAAACTATTCAAGAACTAAAATCATAAGTAATGTCTACTTAGGTGCTCTTACCTACCAACCTGTAATT
ATCACTATTGCATTTAATCAGGAAACTGAAAATGGATGTGCTTATTCTATAACATTTACCTTCACTTGGC
AAAAAGACTATTCTGCCCAACAGTTTGATGTTACATCTTTTACCTTCTCATATCTTACCCAAGAGAACAA
AGACAAAGACTAATAAAATGTTTTGAACTGAATTTATGAATCTTTATTTATTTTTACACCAGCACGGGTA
GTCAGTTTCCCACCACCAGCCCATTTcacagtgtaaacAGTCCTTTCTCCCCGGCTGGCCTTAAAAAGCA
TCATATCATGGGTAACAGACATATTCTTAGGTGTTATATTCCACACGGTTTCCTGTCGAGCCAAACGCTC

【１０５９】

【化１４－８】

ATCAGTGATATTAATAAACTCCCCGGGCAGCTCACTTAAGTTCATGTCGCTGTCCAGCTGCTGAGCCACA
GGCTGCTGTCCAACTTGCGGTTGCTTAACGGGCGGCGAAGGAGAAGTCCACGCCTACATGGGGGTAGAGT
CATAATCGTGCATCAGGATAGGGCGGTGGTGCTGCAGCAGCGCGCGAATAAACTGCTGCCGCCGCCGCTC
CGTCCTGCAGGAATACAACATGGCAGTGGTCTCCTCAGCGATGATTCGCACCGCCCGCAGCATAAGGCGC
CTTGTCCTCCGGGCACAGCAGCGCACCCTGATCTCACTTAAATCAGCACAGTAACTGCAGCACAGCACCA
CAATATTGTTCAAAATCCCACAGTGCAAGGCGCTGTATCCAAAGCTCATGGCGGGGACCACAGAACCCAC
GTGGCCATCATACCACAAGCGCAGGTAGATTAAGTGGCGACCCCTCATAAACACGCTGGACATAAACATT
ACCTCTTTTGGCATGTTGTAATTCACCACCTCCCGGTACCATATAAACCTCTGATTAAACATGGCGCCAT
CCACCACCATCCTAAACCAGCTGGCCAAAACCTGCCCGCCGGCTATACACTGCAGGGAACCGGGACTGGA
ACAATGACAGTGGAGAGCCCAGGACTCGTAACCATGGATCATCATGCTCGTCATGATATCAATGTTGGCA
CAACACAGGCACACGTGCATACACTTCCTCAGGATTACAAGCTCCTCCCGCGTTAGAACCATATCCCAGG
GAACAACCCATTCCTGAATCAGCGTAAATCCCACACTGCAGGGAAGACCTCGCACGTAACTCACGTTGTG
CATTGTCAAAGTGTTACATTCGGGCAGCAGCGGATGATCCTCCAGTATGGTAGCGCGGGTTTCTGTCTCA
AAAGGAGGTAGACGATCCCTACTGTACGGAGTGCGCCGAGACAACCGAGATCGTGTTGGTCGTAGTGTCA
TGCCAAATGGAACGCCGGACGTAGTCATTGAAATGGATTCTCTTGCGTACCTTGTCGTACTTCTGCCAGC
AGAAAGTGGCTCGGGAACAGCAGATACCTTTCCTCCTGCTGTCCTTCCGCTGCTGACGCTCAGTCATCCA
ACTGAAGTACAGCCATTCCCGCAGGTTCTCCAGCAGCTCCTGTGCATCTGATGAAACAAAAGTCCCGTCG
ATGCGGATTCCCCTTAAAACATCAGCCAGGACATTGTAGGCCATCCCAATCCAGTTAATGCATCCTGATC
TATCATGAAGAGGAGGTGGGGGAAGAACTGGAAGAACCATTTTTATTCCAAGCGGTCTCGAAGGACGATA
AAGTGCAAGTCACGCAGGTGACAGCGTTCCCCGCCGCTGTGCTGGTGGAAACAGACAGCCAGGTCAAAAC
CCACTCTATTTTCAAGGTGCTCGACTGTGGCTTCGAGCAGTGGCTCTACGCGTACATCCAGCATAAGAAT
CACATTAAAGGCTGGACCTCCATCGATTTCATCAATCATCAGGTTACACTCATTCACCATCCCCAGGTAA
TTCTCATTTTTCCAGCCTTGGATTATTTCTACAAATTGTTGGTGTAAGTCCACTCCGCACATGTGGAAAA
GTTCCCACAGCGCCCCCTCCACTTTCATAATCAGGCAGACCTTCATATTAGAAACAGATCCTGCTGCTCC
ACCACCTGCAGCGTGTTCAAAACAACAAGATTCAATGAGGTTCTGCCCTCTGCCCTCAGCTCACGTCTCA
GCGTCAGCTGCAAAAAGTCACTCAAGTCCTCAGCCACTACAGCTGACAATTCAGAGCCAGGGCTAAGCGT
GGGACTGGCAAGCGTGAGTGAGTACTTTAATGCTCCAAAGCTAGCACCCAAAAACTGCATGCTGGAATAA
GCTCTCTTTGTGTCACCGGTGATGCCTTCCAATAGGTGAGTGATAAAGCGAGGTAGTTTTTCTTTAATCA
TTTGAGTAATAGAAAAGTCCTCTAAATAAGTCACTAGGACCCCAGGAACCACAATGTGGTAGCTGACAGC
GTGTCGCTCAAGCATGGTTAGTAGAGATGAGAGTCTGAAAAACAGAAAGCATGCACTAAACCAGAGTTGC
CAGTCTCACTGAAGGAAAAATCACTCTCTCCAGCAGCAAAGTGCCCACTGGGTGGCCCTCTCGGACATAC
AAAAATCGATCCGTGTGGTTAAAGAGCAGCACAGTTAGCTCCTGTCTTCTCCCAGCAAAGATCACATCGG
ACTGGGTTAGTATGCCCCTGGAATGGTAGTCATTCAAGGCCATAAATCTGCCTTGGTAGCCATTAGGAAT
CAGCACGCTCACTCTCAAGTGAACCAAAACCACCCCATGCGGAGGAATGTGGAAAGATTCTGGGCAAAAA
AAGGTATATCTATTGCTAGTCCCTTCCTGGACGGGAGCAATCCCTCCAGGGCTATCTATGAAAGCATACA
GAGATTCAGCCATAGCTCAGCCCGCTTACCAGTAGACAGAGAGCACAGCAGTACAAGCGCCAACAGCAGC
GACTGACTACCCACTGACCCAGCTCCCTATTTAAAGGCACCTTACACTGACGTAATGACCAAAGGTCTAA
AAACCCCGCCAAAAAAACACACACGCCCTGGGTGTTTTTCGCGAAAACACTTCCGCGTTCTCACTTCCTC
GTATCGATTTCGTGACTCAACTTCCGGGTTCCCACGTTACGTCACTTCTGCCCTTACATGTAACTCAGCC
GTAGGGCGCCATCTTGCCCACGTCCAAAATGGCTTCCATGTCCGGCCACGCCTCCGCGGCGACCGTTAGC
CGTGCGTCGTGACGTCATTTGCATCACCGTTTCTCGTCCAATCAGCGTTGGCTCCGCCCCAAAACCGTTA
AAATTCAAAAGCTCATTTGCATATTAACTTTTGTTTACTTTGTGGGGTATATTATTGATGATGatttaaa
tatTATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCC
TCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAA
TACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAG
GAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAAT
CGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCT
CCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAG
CGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGC
TGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACC
CGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGG
CGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGC

【１０６０】

【化１４－９】

GCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTG
GTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTT
GATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTA
TCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATG
AGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCG
TTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCC
AGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCG
GAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGA
AGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTG
TCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCC
CCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGT
GTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCT
GTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGG
CGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTC
GGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAAC
TGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAA
AAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCAT
TTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTT
CCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATA
AAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTgatttaaat

＞２×ＴＯを含むＣＭＶｄｅｌ１３４；配列番号２１９

【１０６１】

【化１５】

GTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT
GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTG
ACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGT
ATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGT
CAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAG
TACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGAT
AGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCA
AAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTA
CGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCCCTATCAGTGATAGAGATCTCCCTATCAGTGATAGAGATC
GTCGACGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAG
AAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTGCATTGGAA

【図面】

【図１】

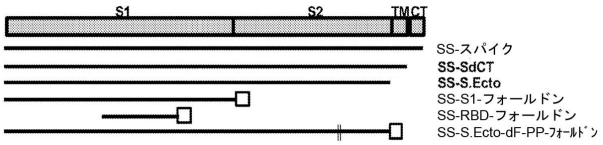


図１

【図２】

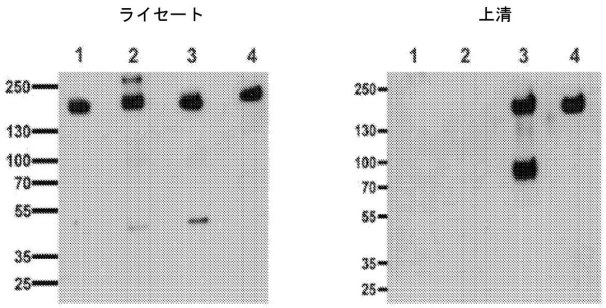


図２

【図３】

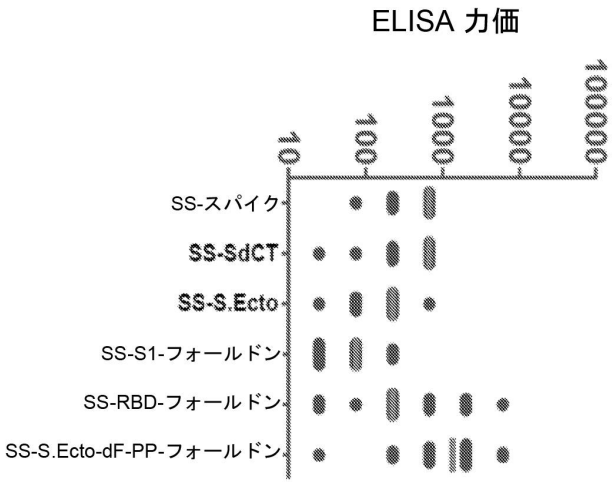


図３

【図４】

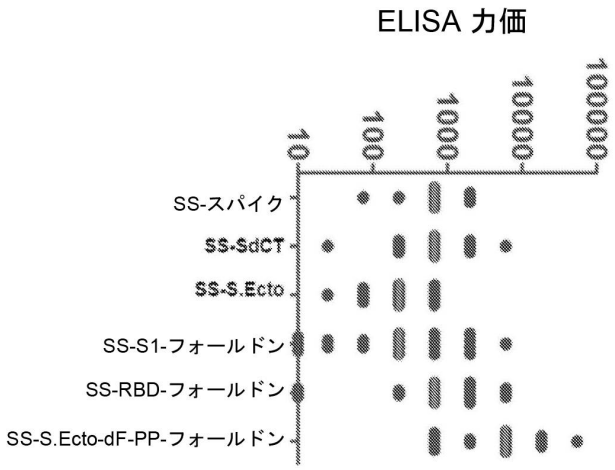


図４

【図５】

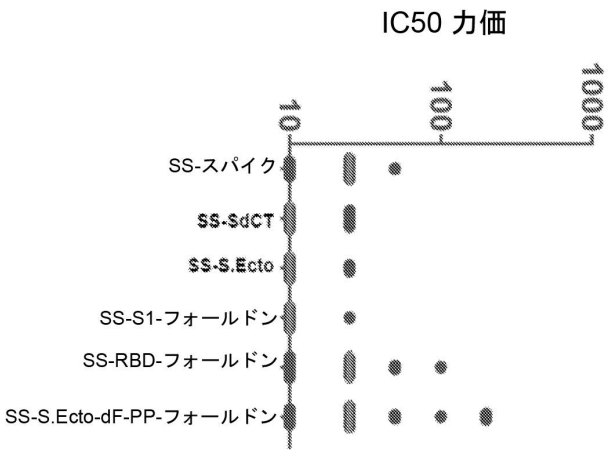


図 5

【図６－１】

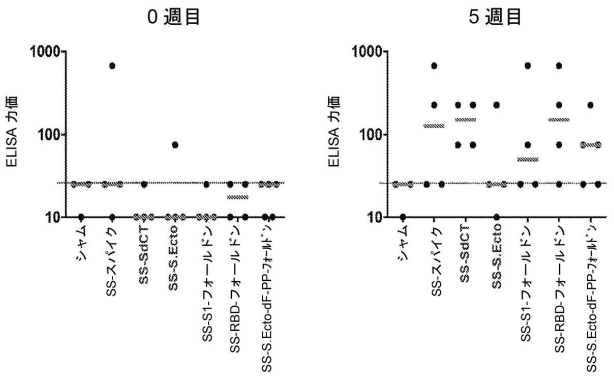


図 6A

【図６－２】

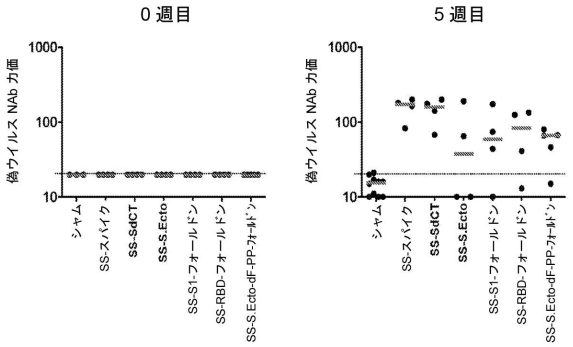


図 6B

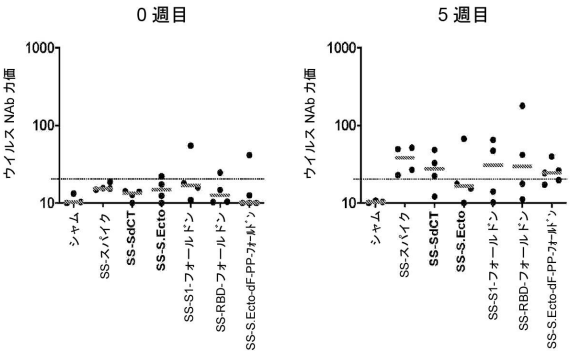


図 6C

【図６－３】

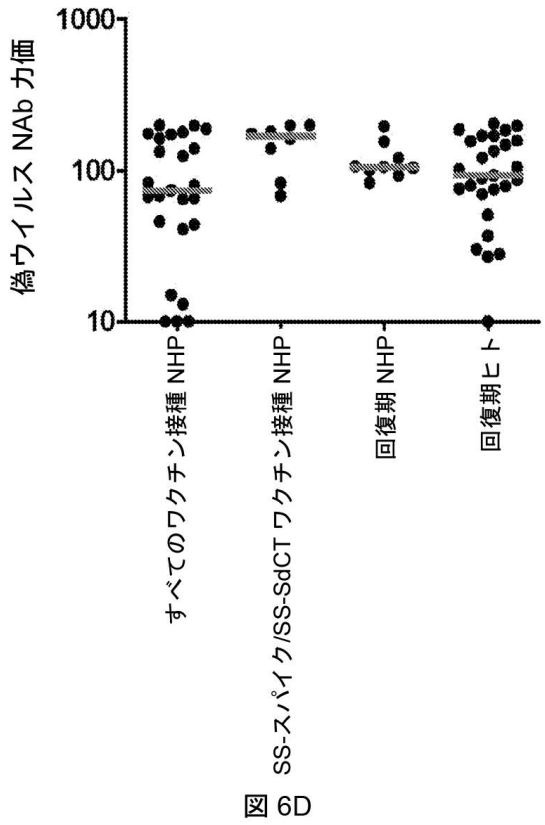


図 6D

【図６－４】

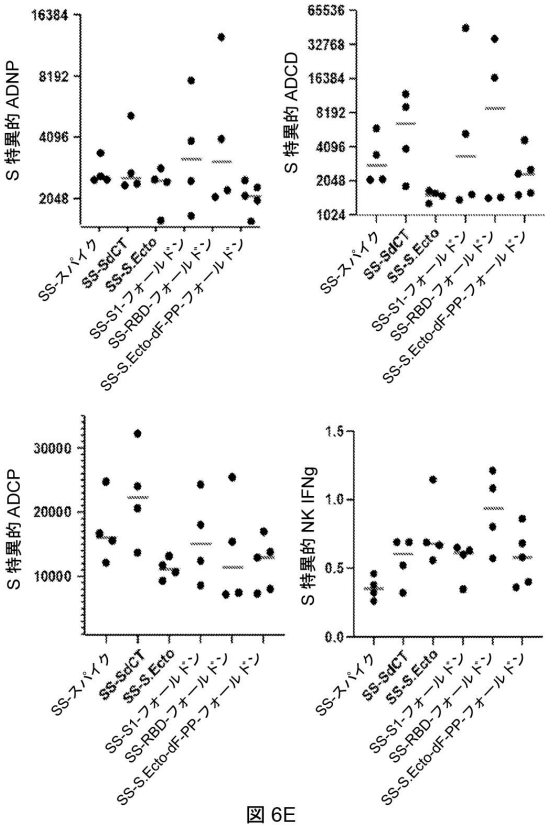


図 6E

【図６－５】

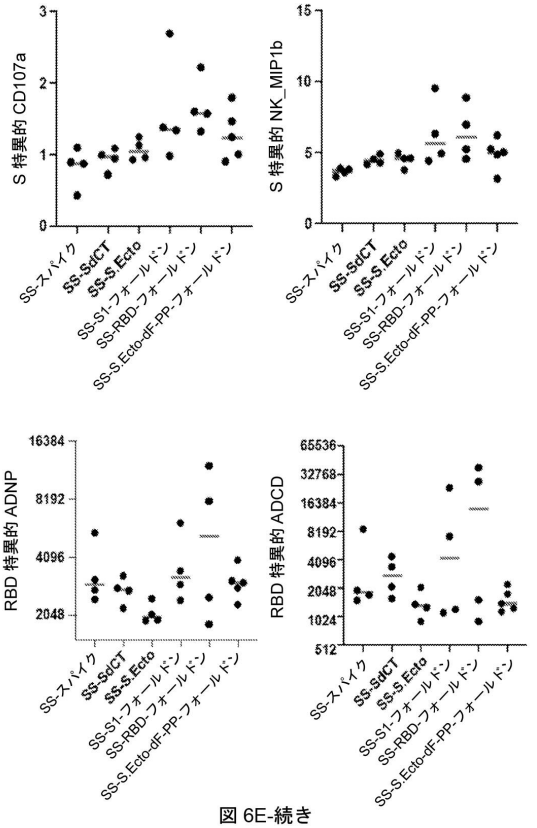


図 6E-続き

【図６－６】

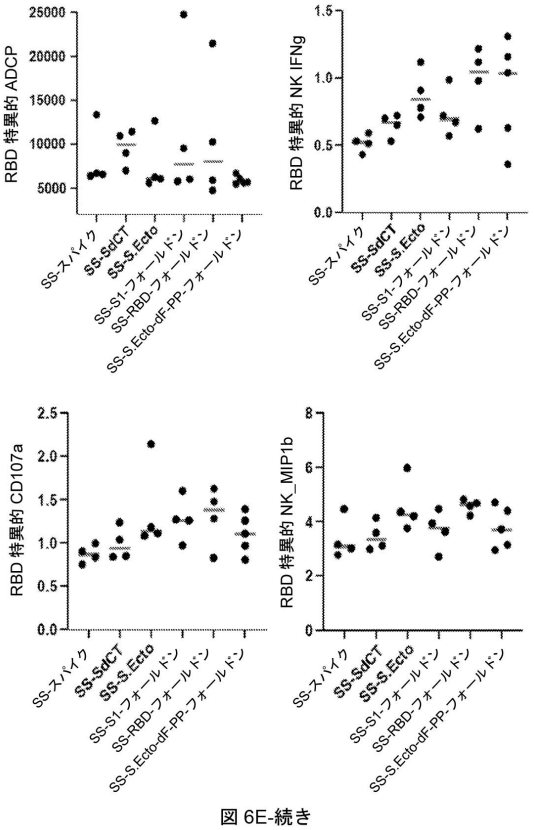


図 6E-続き

【図６－７】

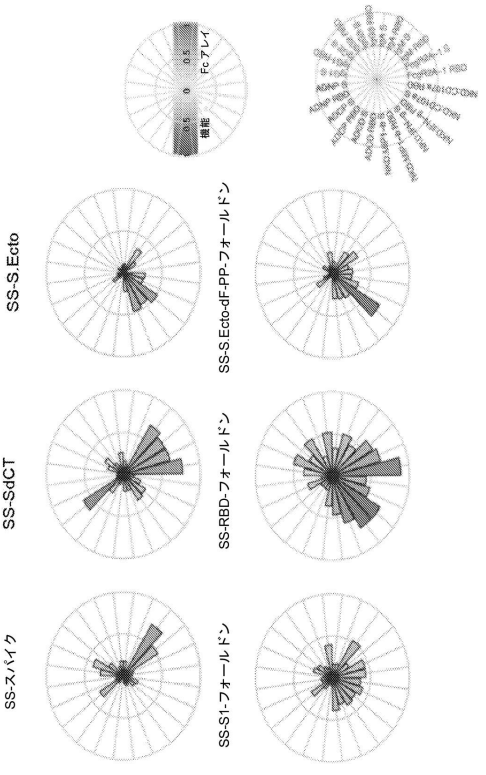


図 6E-続き

【図６－８】

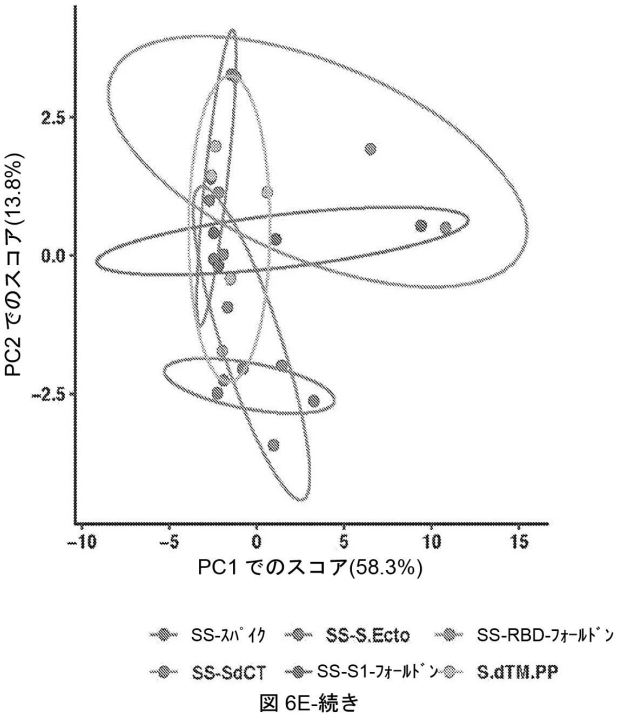


図 6E-続き

【図７】

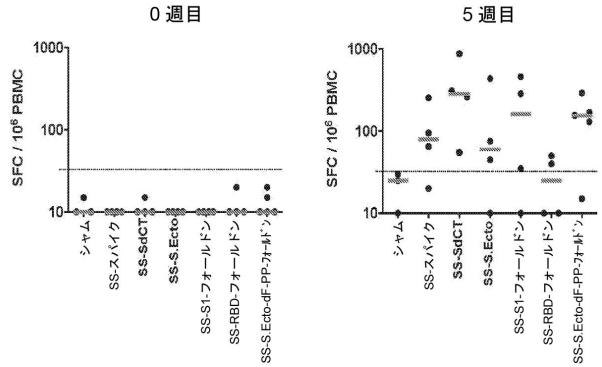


図 7A

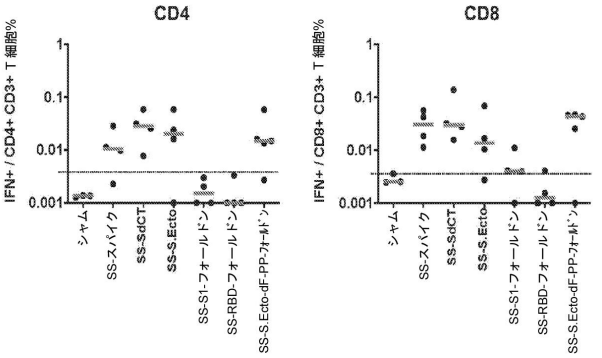


図 7B

【図８－１】

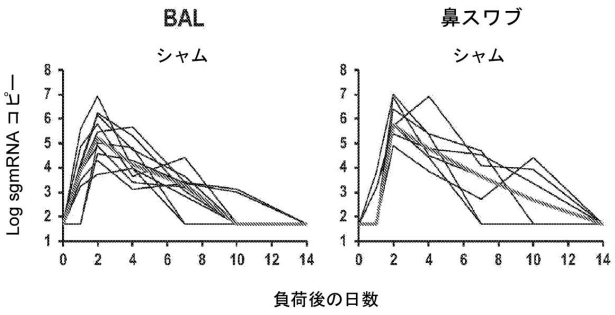


図 8A

【図８－２】

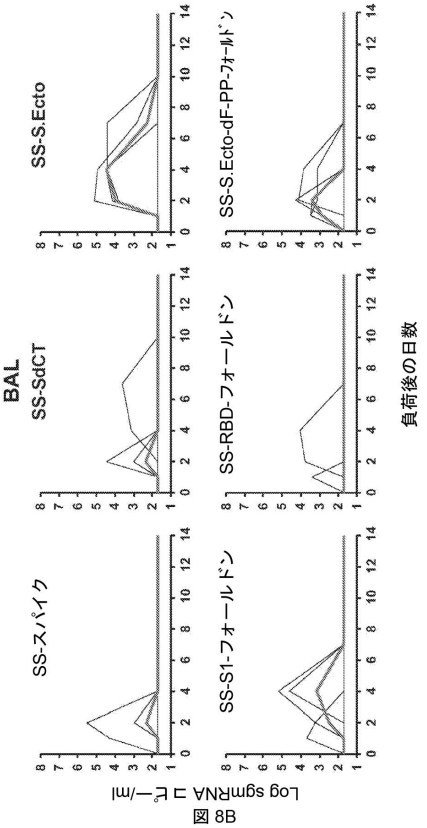


図 8B

【図８－３】

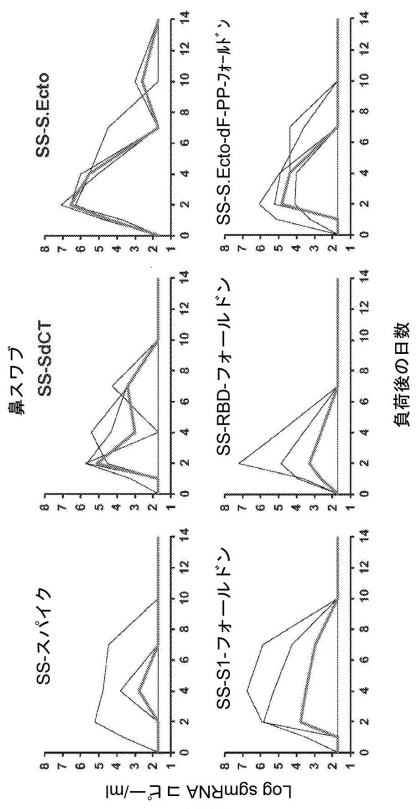


図 8C

【図８－４】

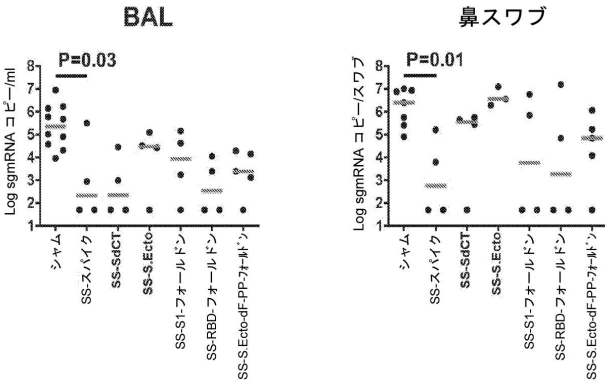


図 8D

【図９－１】

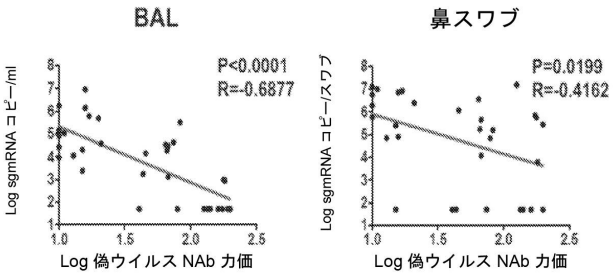


図 9A

【図９－２】

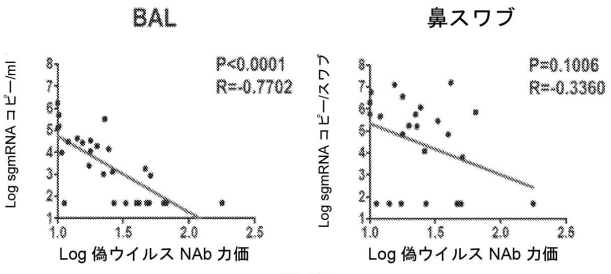


図 9B

【図９－３】

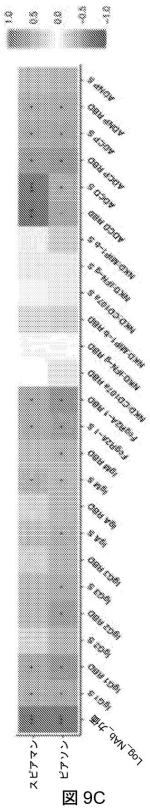


図 9C

【図９－４】

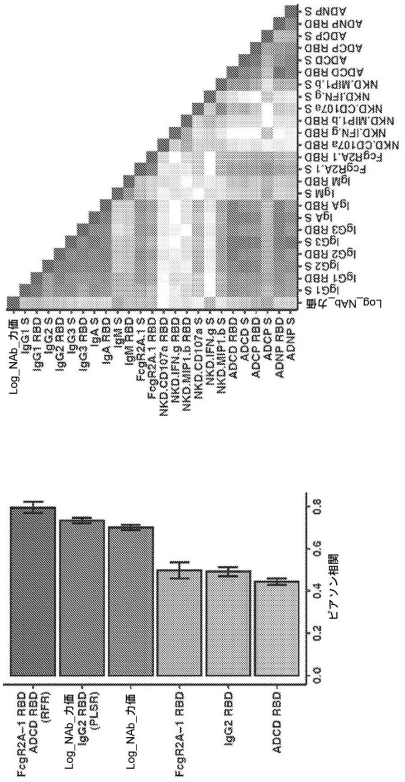


図 9C-続き

【図１０】

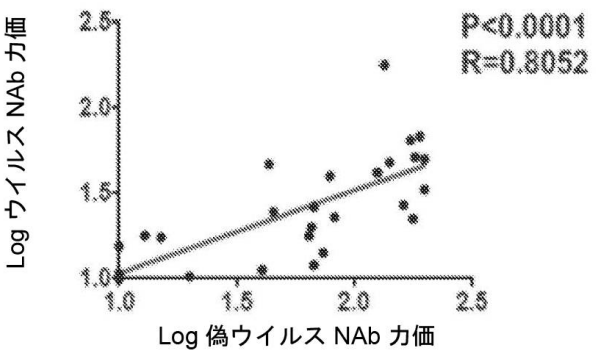


図 10

【図１１】

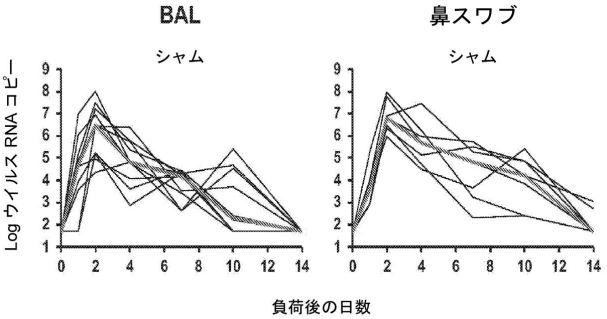


図 11

【図１２】

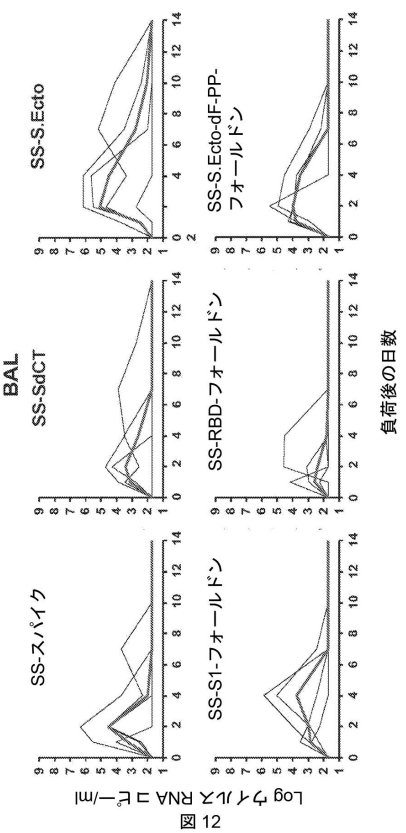


図 12

【図１３】

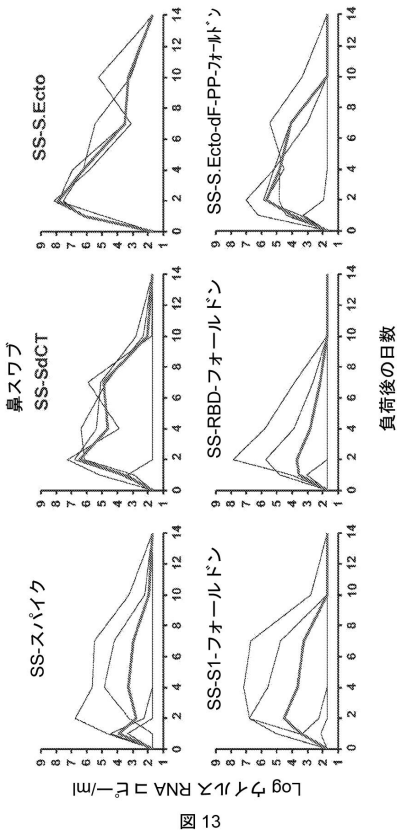


図 13

【図１４】

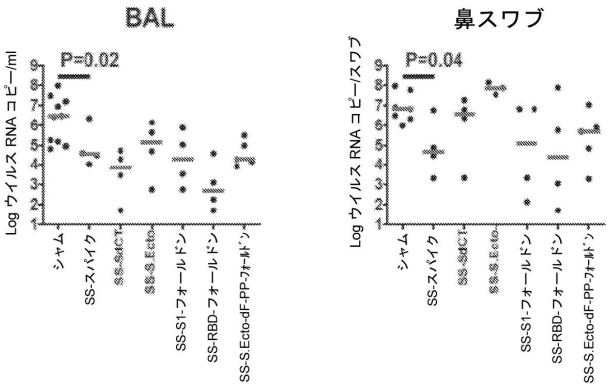


図 14

【図１５】

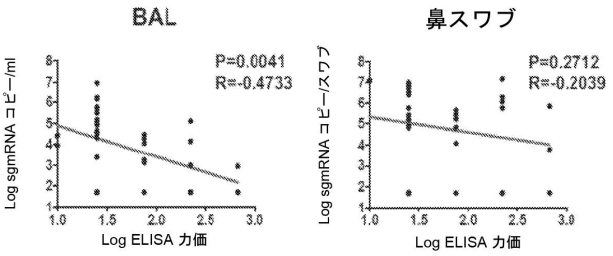


図 15

【図１６】

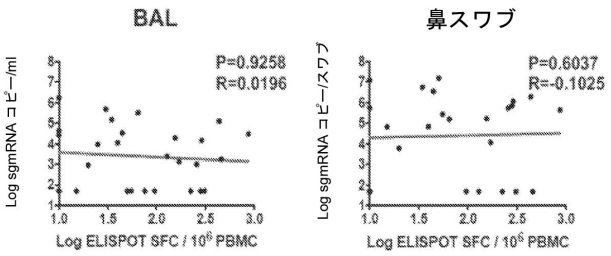


図 16

【図１７】

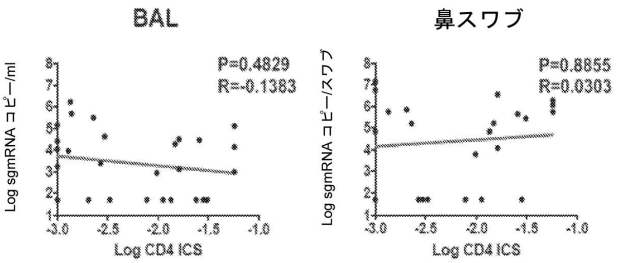


図 17

【図１８】

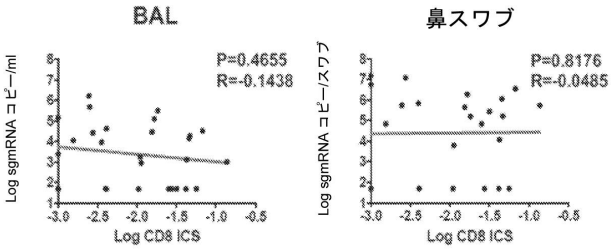


図 18

【図１９】

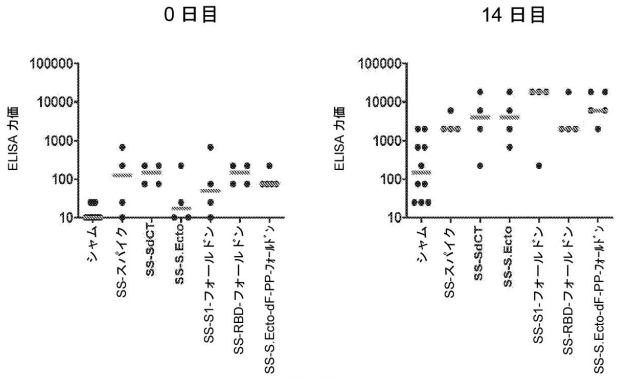


図 19

【図２０】

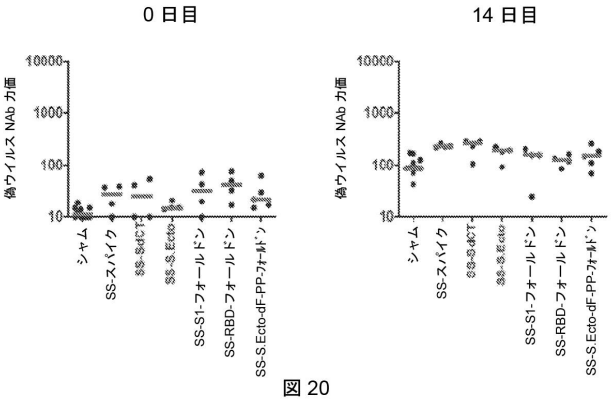


図 20

【図２１】

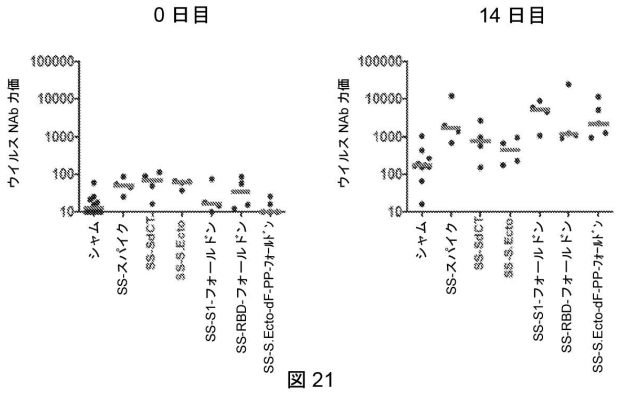


図 21

【図２２】

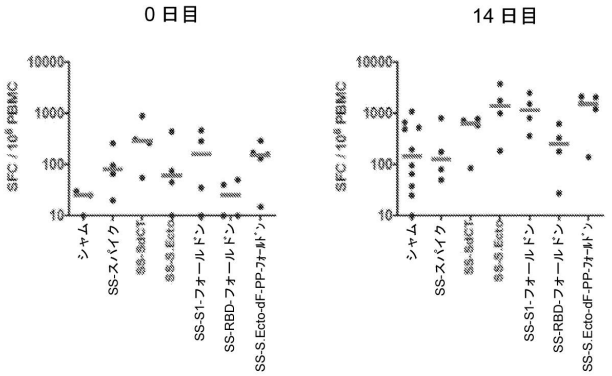


図 22

【図２３－１】

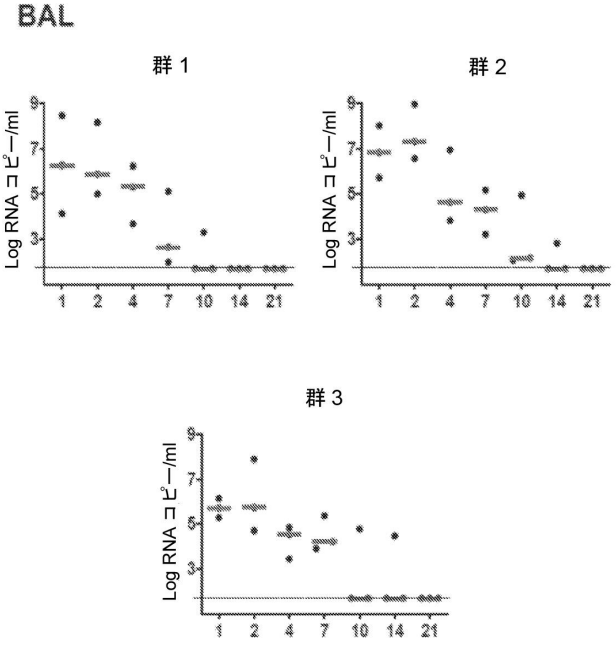


図 23A

【図２３－２】

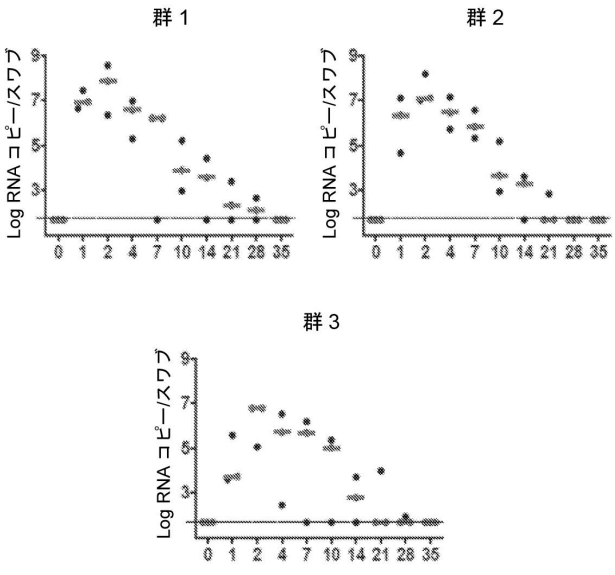


図 23B

【図２３－３】

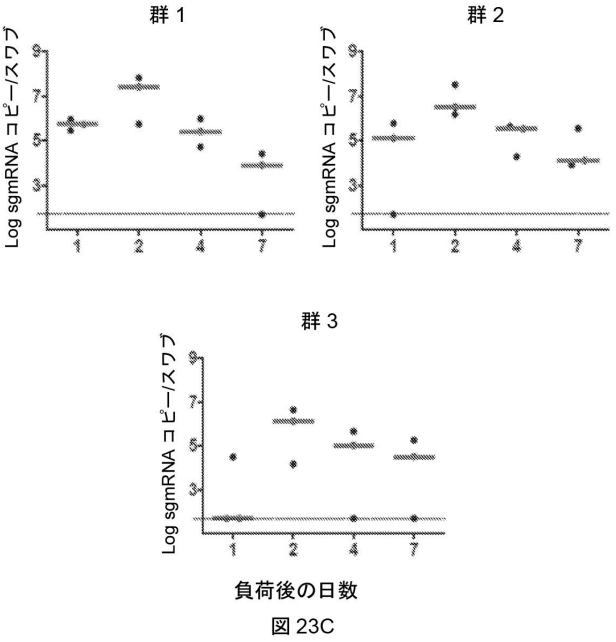


図 23C

【図２４－１】

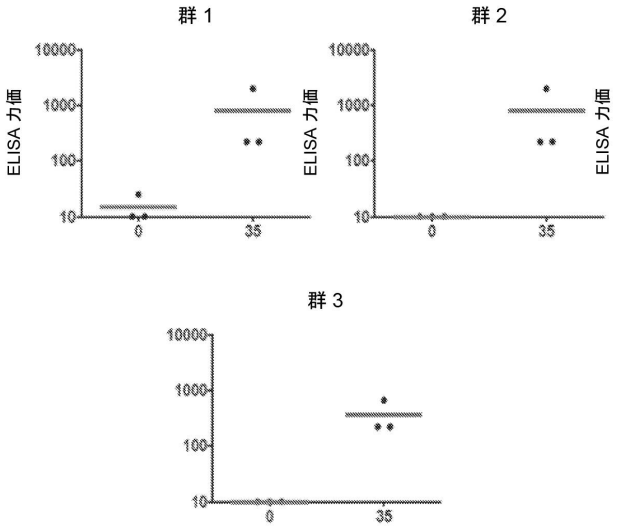


図 24A

【図２４－２】

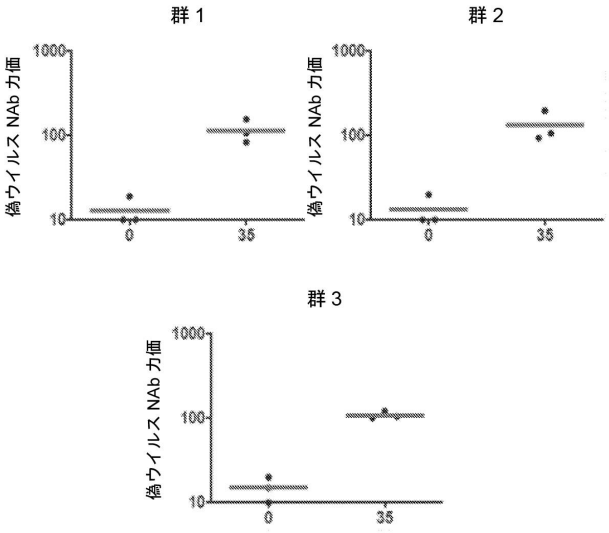


図 24B

【図２４－３】

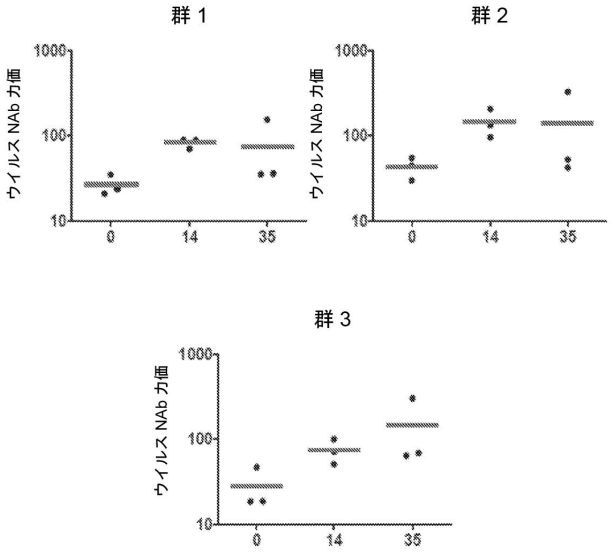


図 24C

【図２４－４】

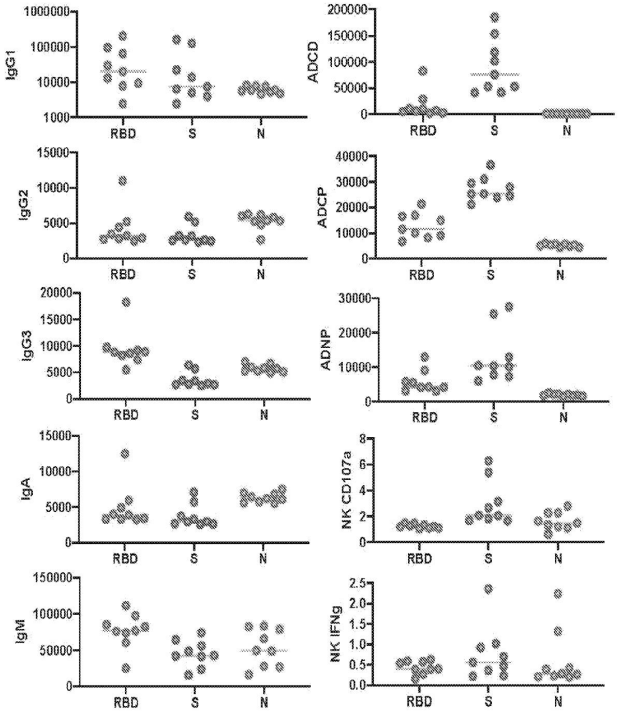


図 24D

【図２４－５】

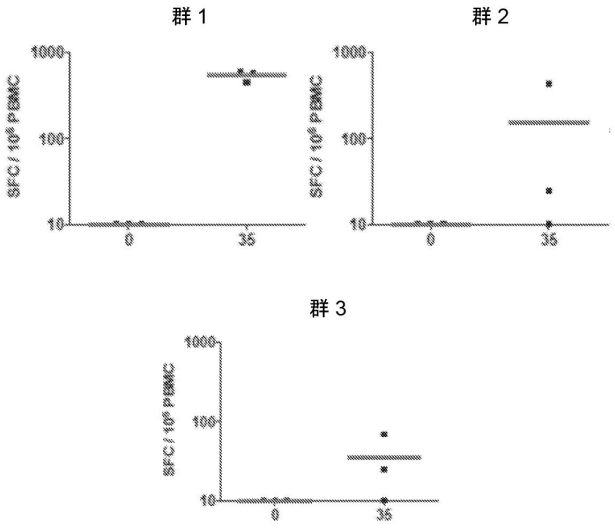


図 24E

【図２４－６】

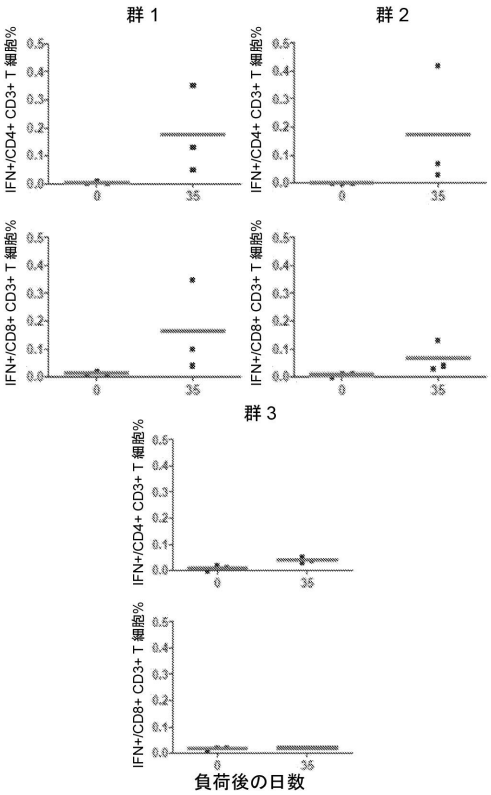


図 24F

【図２５】

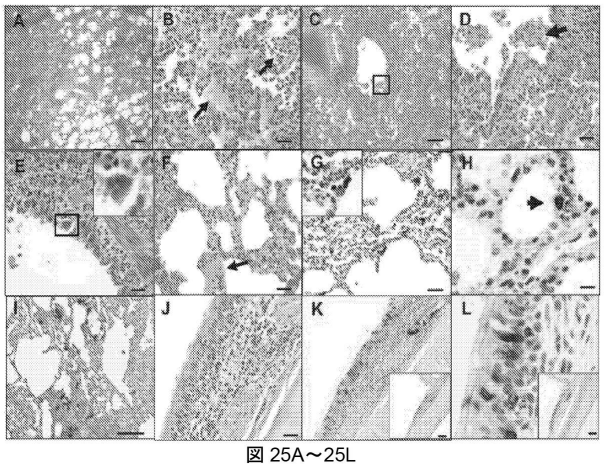


図 25A～25L

【図２６－１】

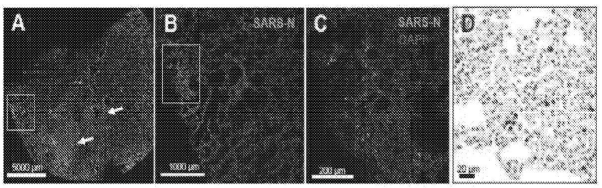


図 26A～26D

【図２６－２】

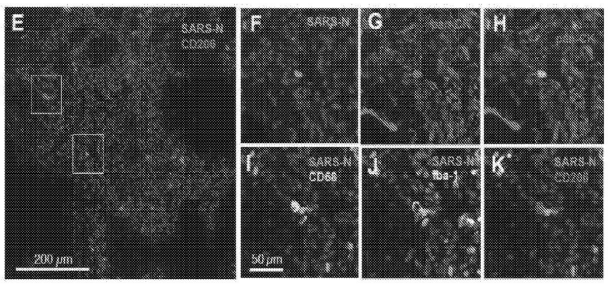


図 26E～26K

【図２７－１】

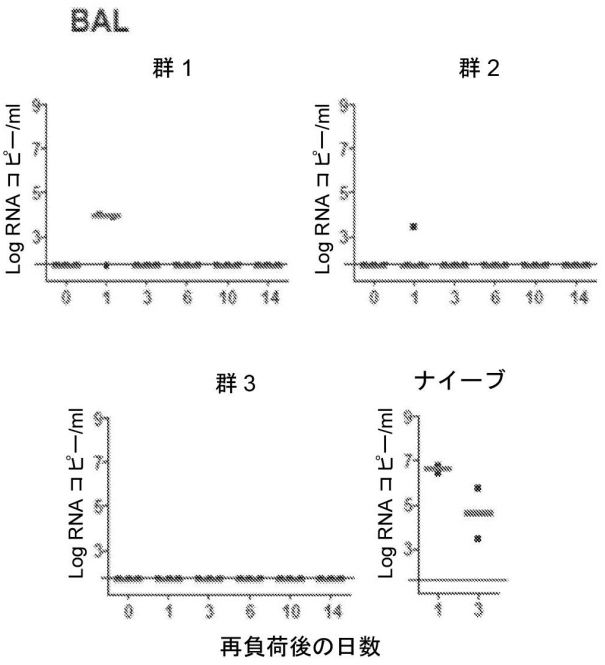


図 27A

【図２７－２】

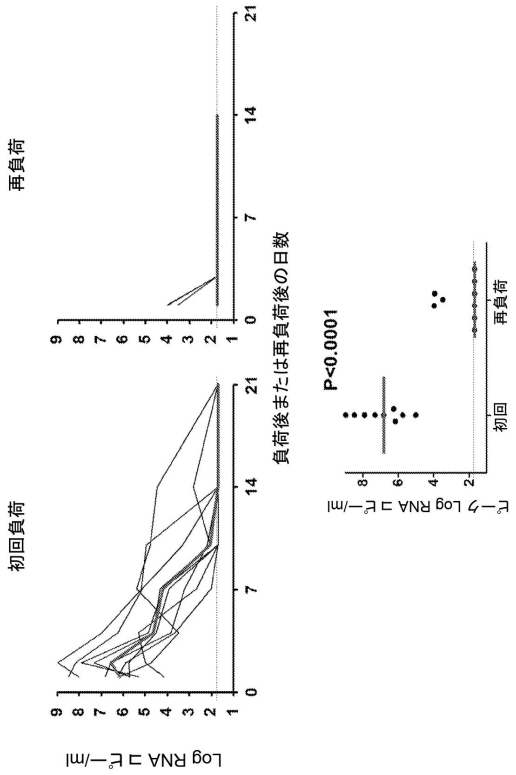


図 27B

【図２７－３】

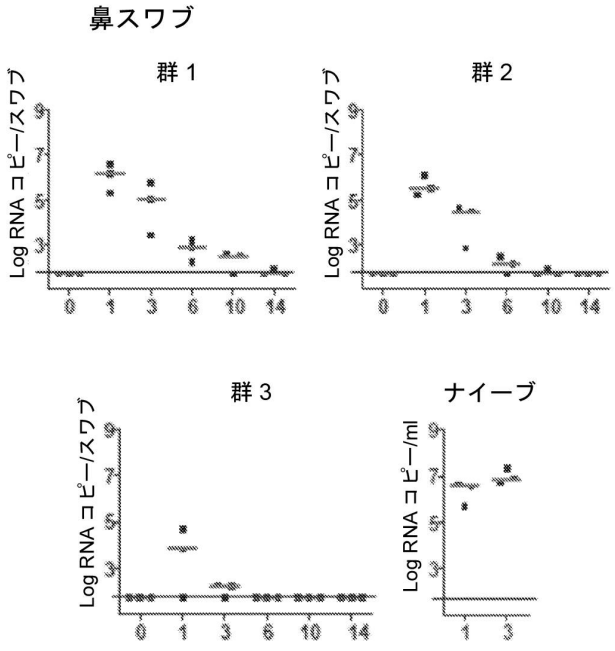


図 27C

【図２７－４】

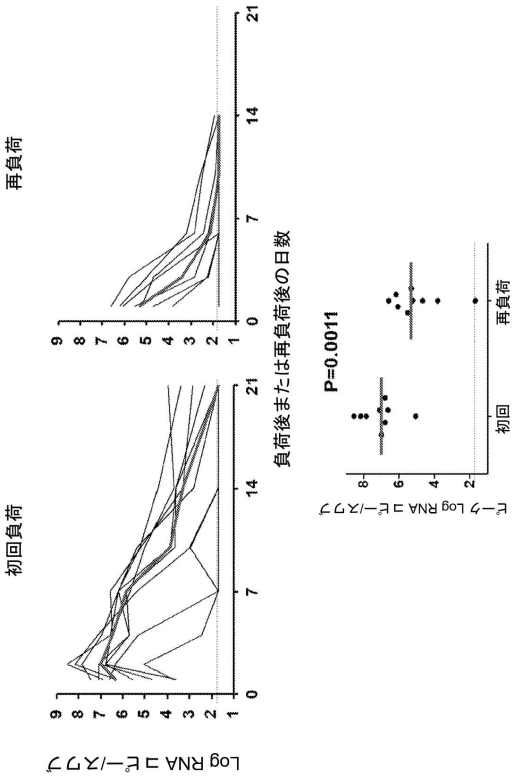


図 27D

【図２７－５】

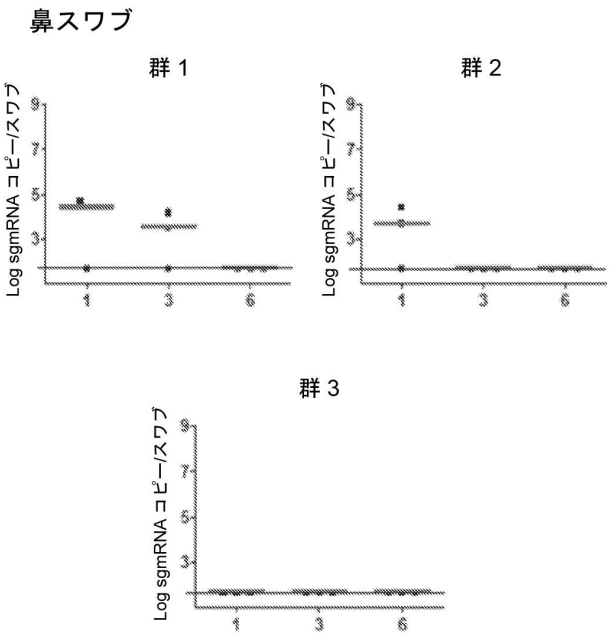


図 27E

【図２７－６】

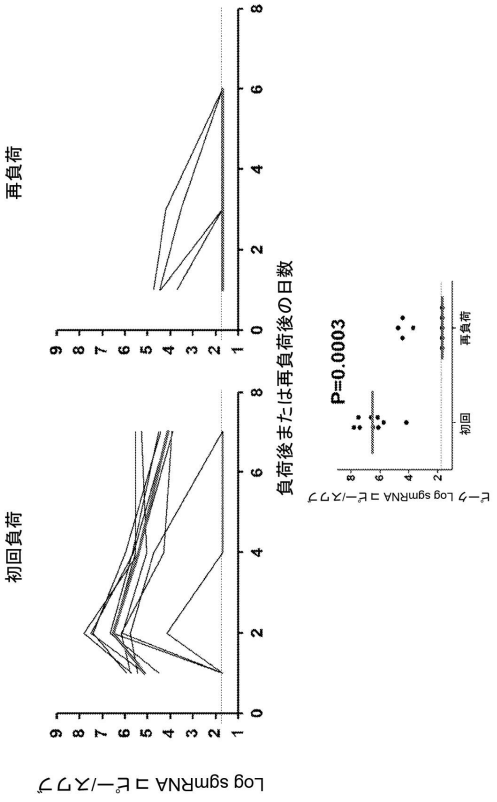


図 27F

【図２８】

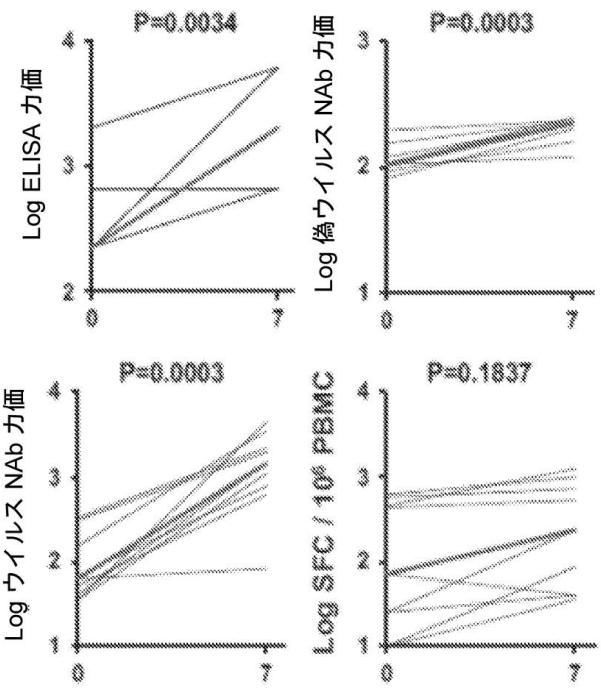


図 28

【図２９】

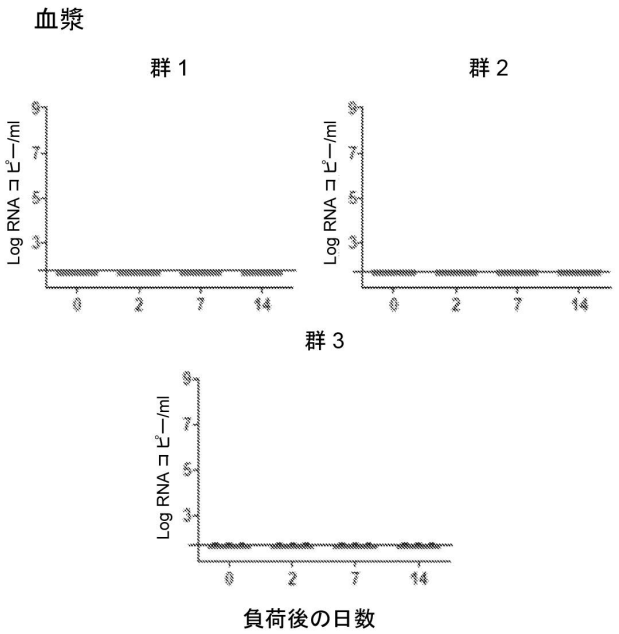


図 29

【図３０】

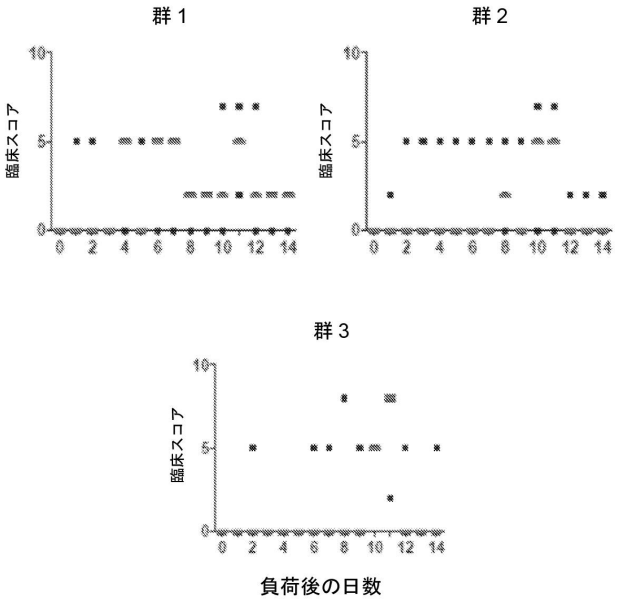


図 30

【図３１】

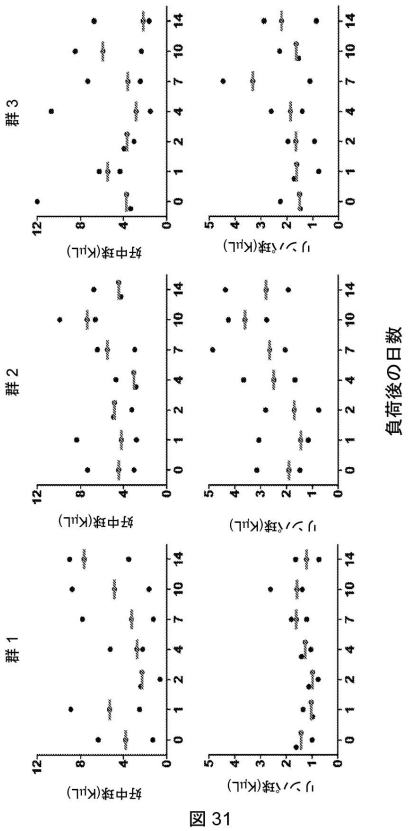


図 31

【図３２】

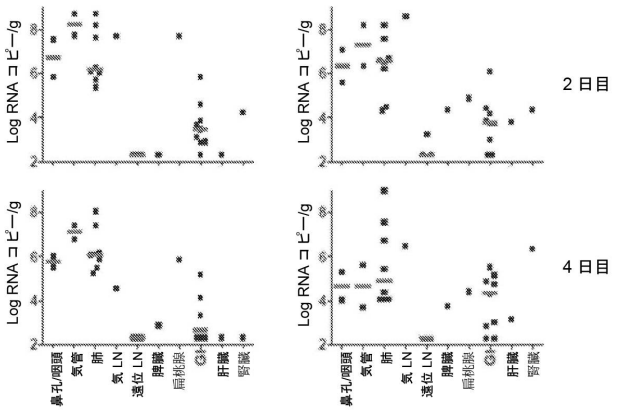


図 32

【図３３】

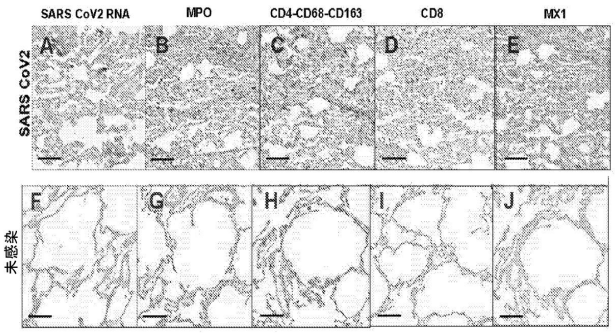
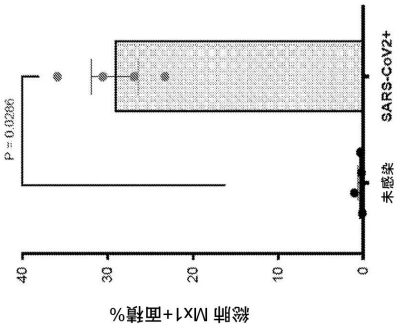


図 33A～33J

【図３４】



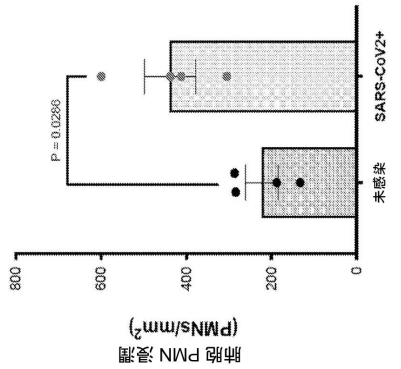


図 34A～34B

【図３５－１】

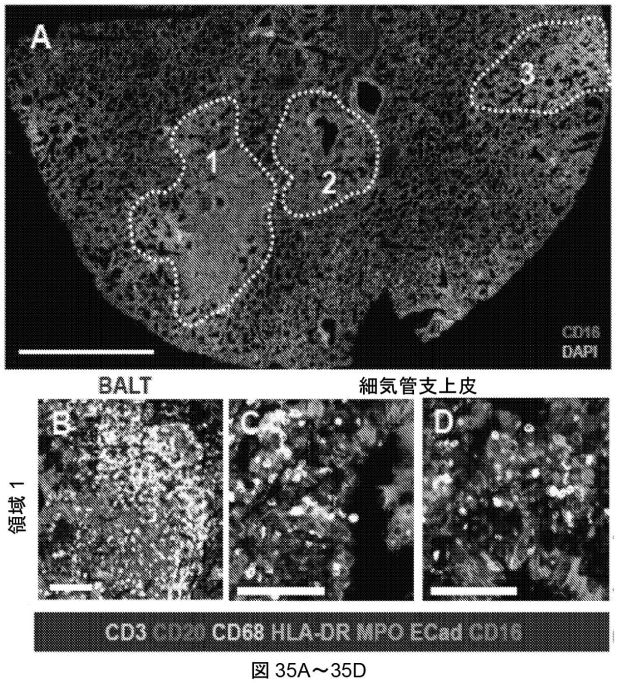


図 35A～35D

【図３５－２】

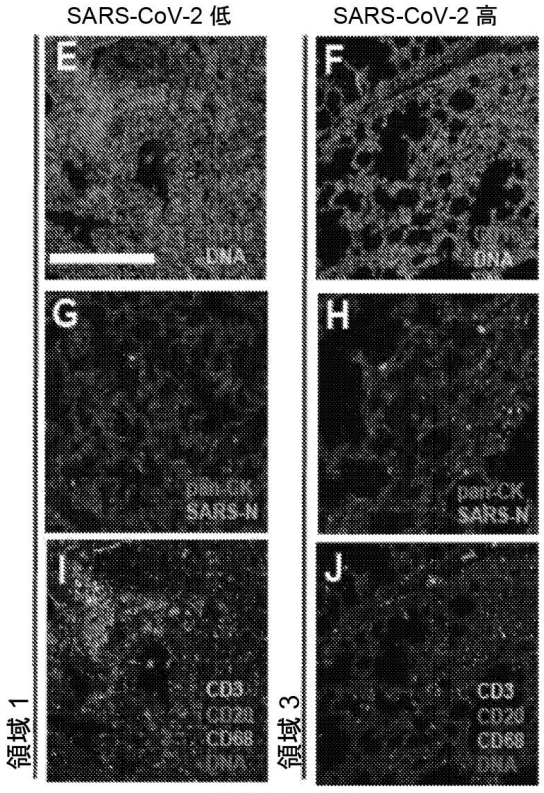


図 35E～35J

【図３６】

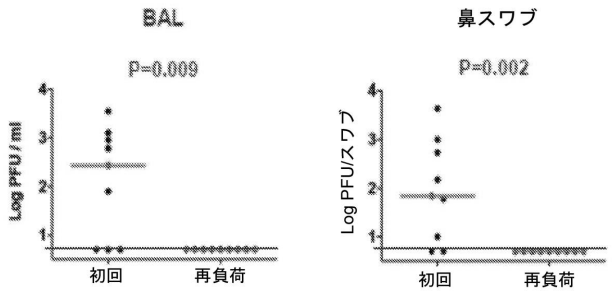


図 36

【図３７】

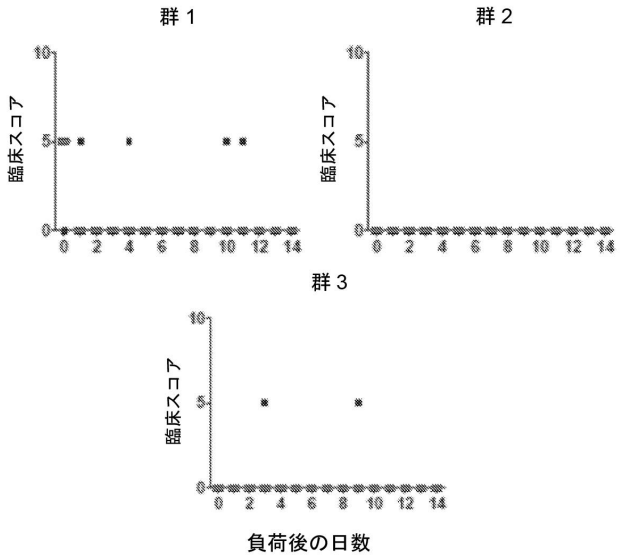


図 37

【図３８－１】

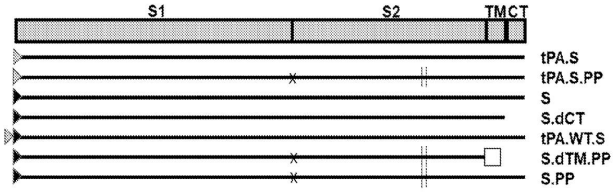


図 38A

【図３８－２】

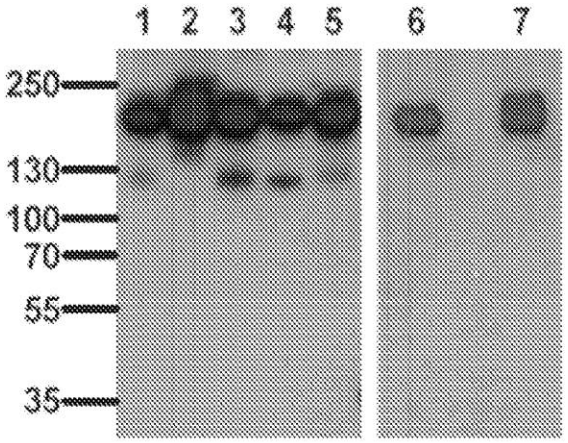


図 38B

【図３９－１】

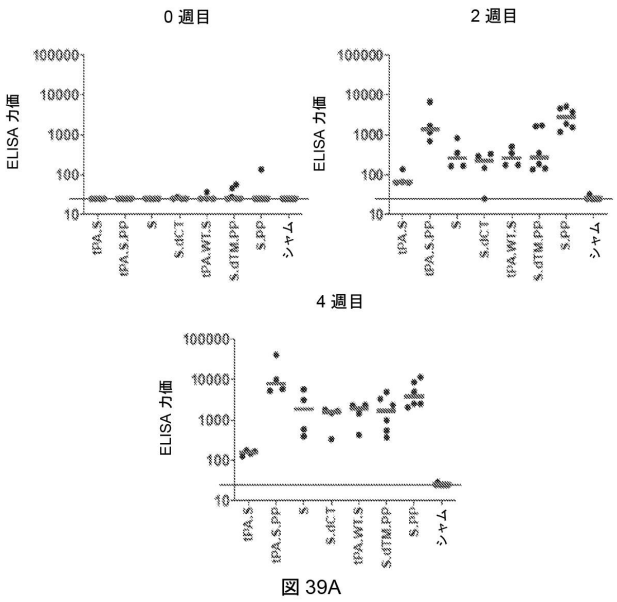


図 39A

【図３９－２】

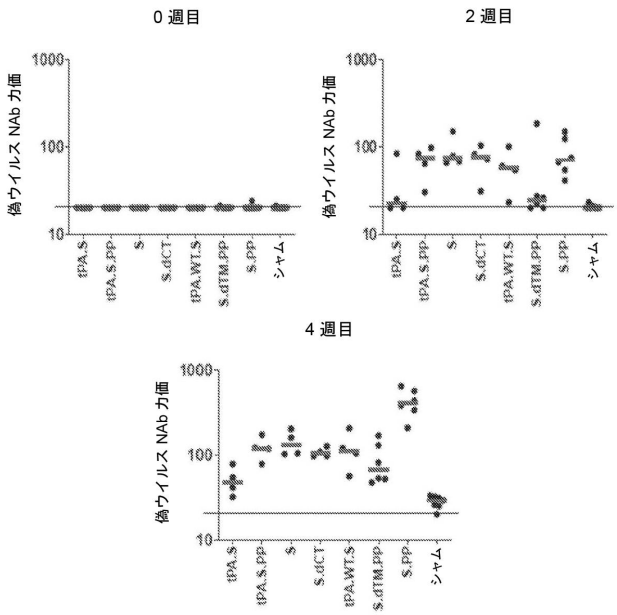


図 39B

【図３９－３】

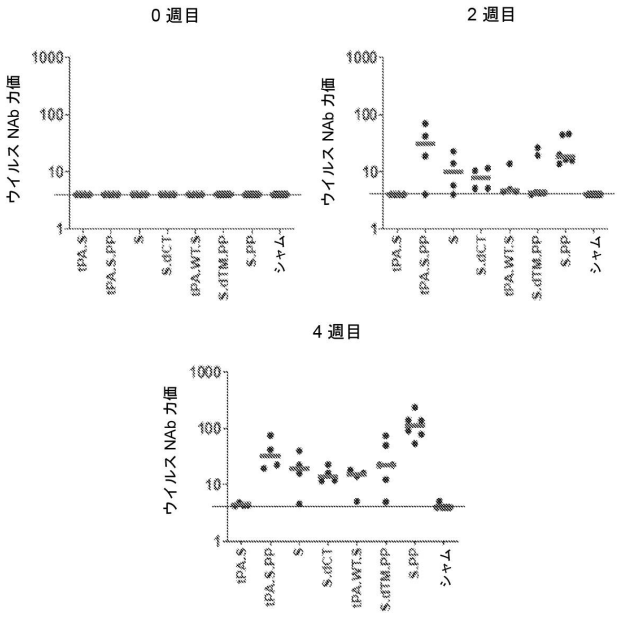


図 39C

【図３９－４】

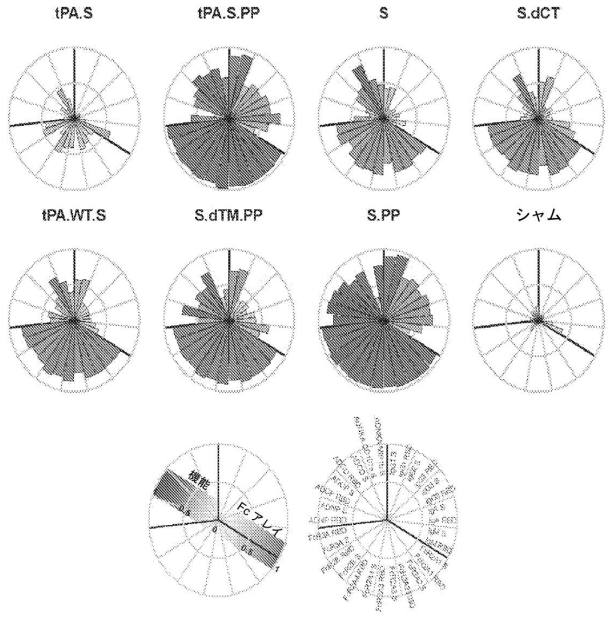


図 39D

【図３９－５】

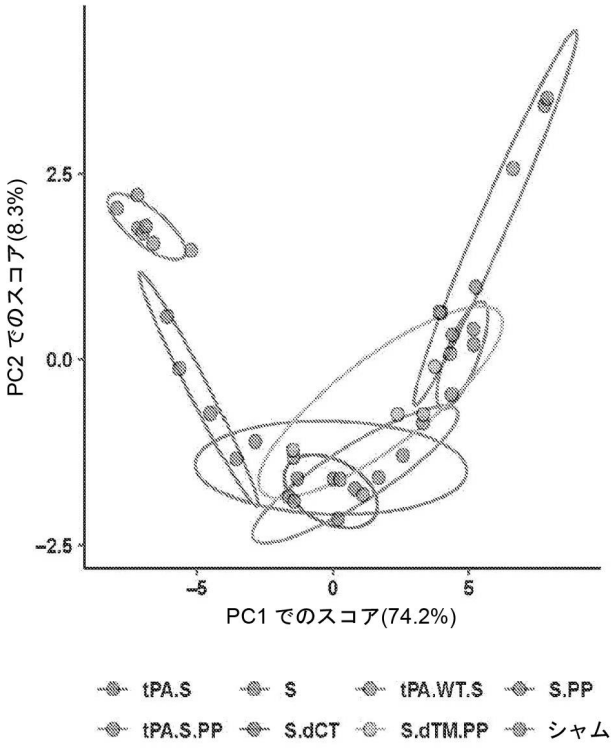


図 39D-続き

【図４０】

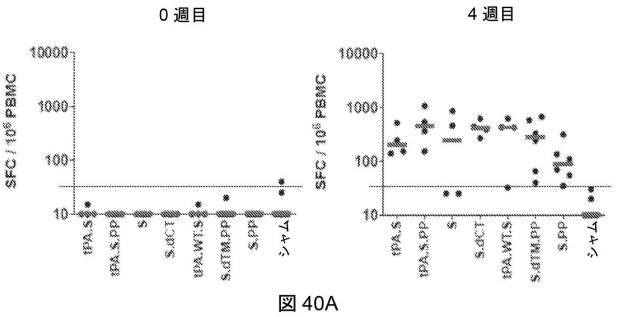


図 40A

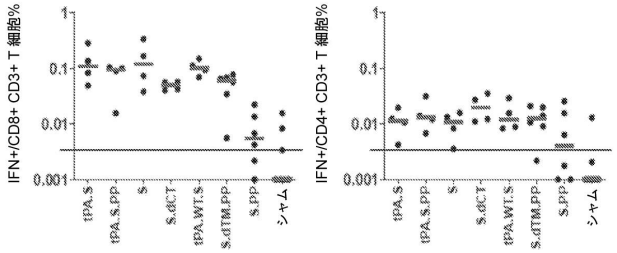


図 40B

【図４１－１】

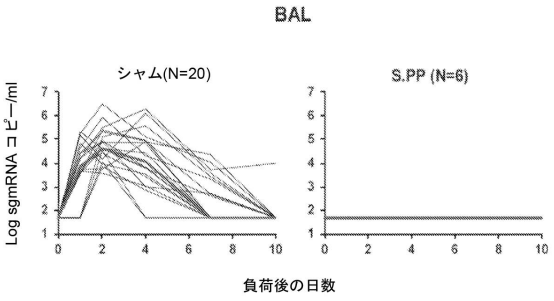


図 41A

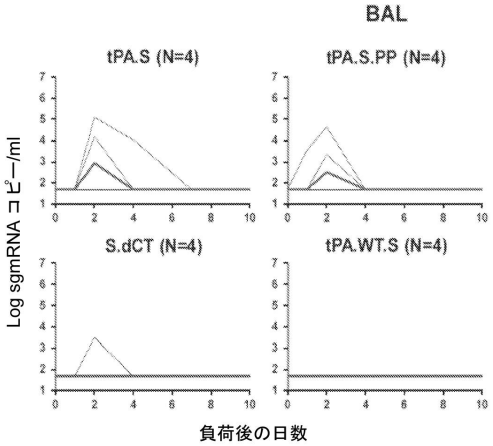


図 41B

【図４１－２】

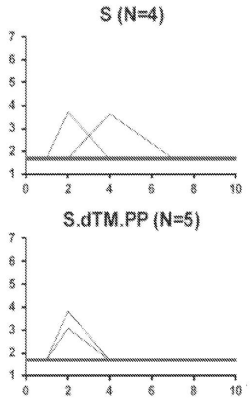


図 41B-続き

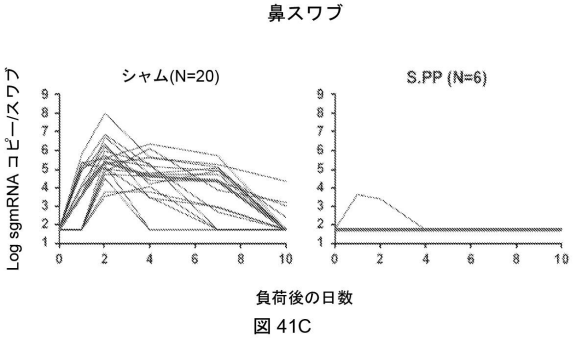


図 41C

【図４１－３】

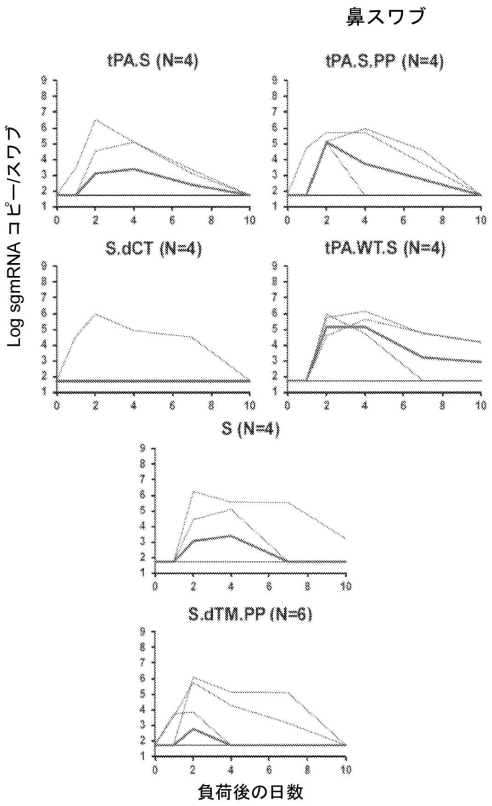


図 41D

【図４２】

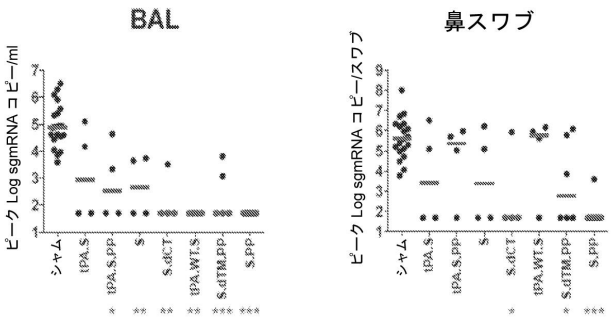


図 42

【図４３－１】

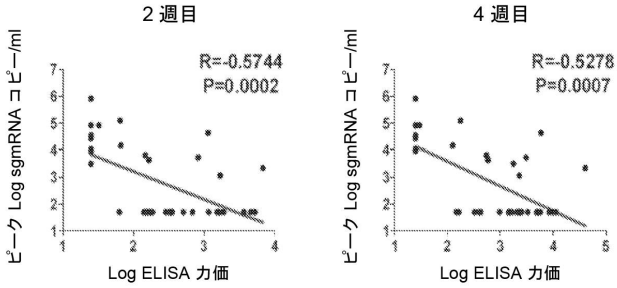


図 43A

【図４３－２】

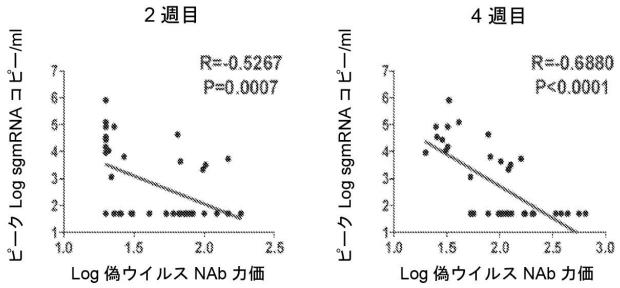


図 43B

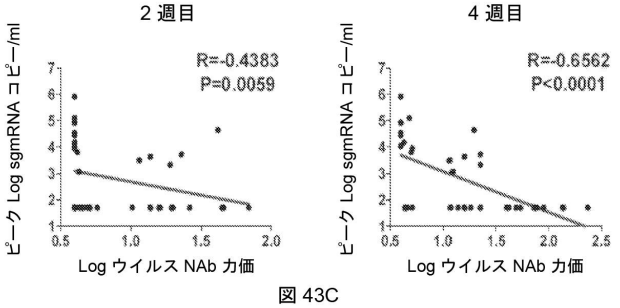


図 43C

【図４３－３】

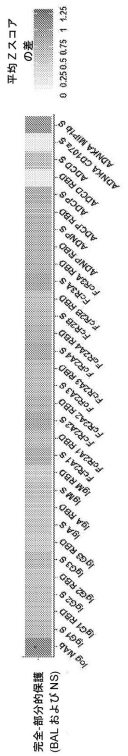


図 43D

【図４３－４】

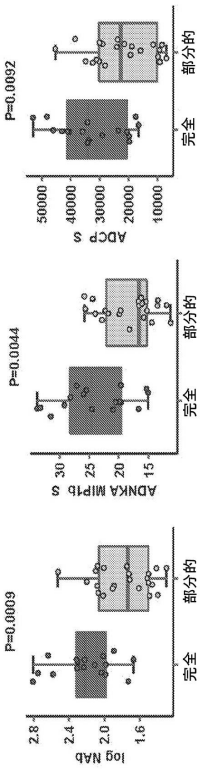


図 43D-続き

【図４３－５】

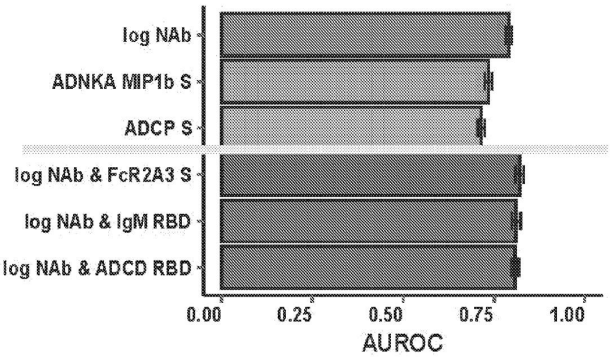


図 43D-続き

【図４４－１】

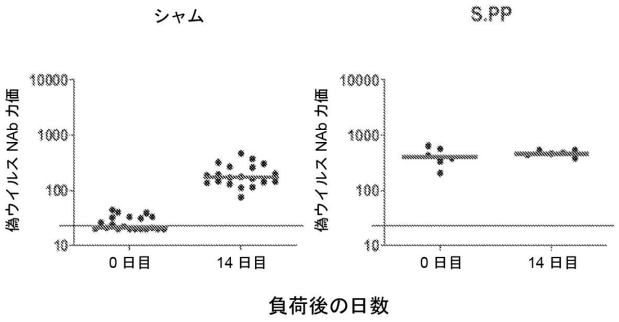


図 44A

【図４４－２】

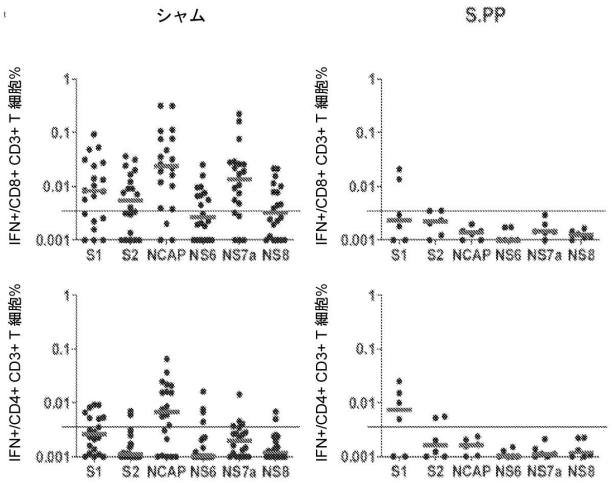


図 44B

【図４５】

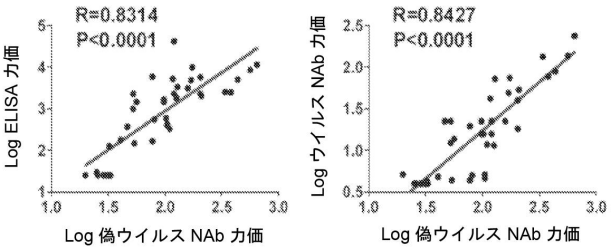


図 45

【図４６】

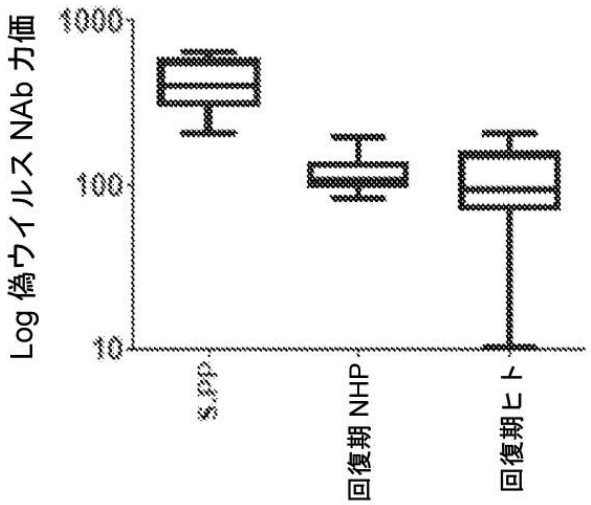


図 46

【図４７】

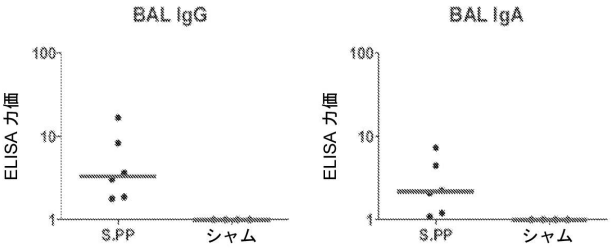


図 47

【図４８－１】

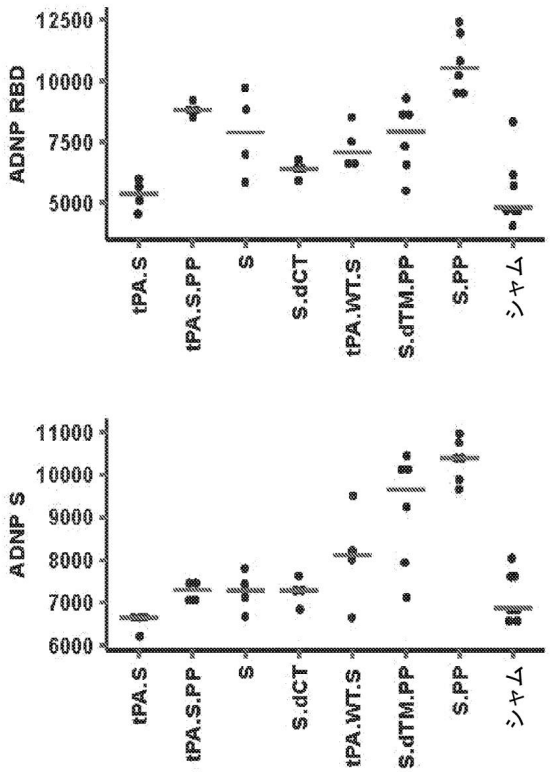


図 48

【図４８－２】

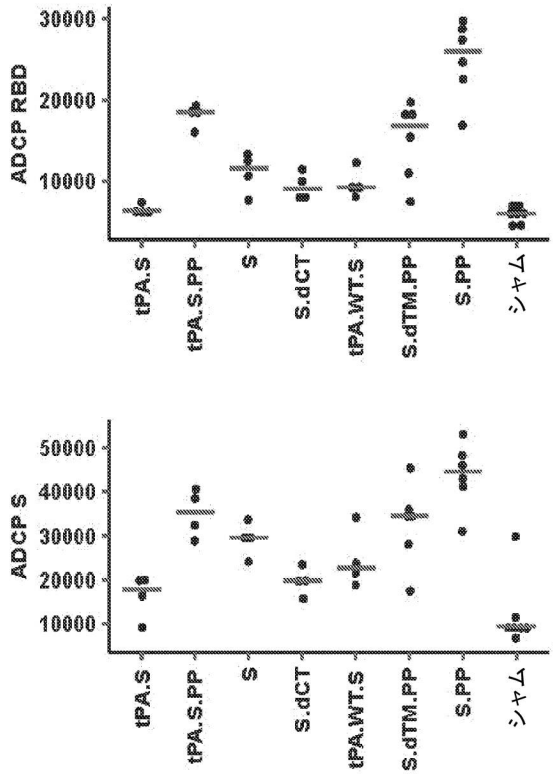


図 48-続き

【図４８－３】

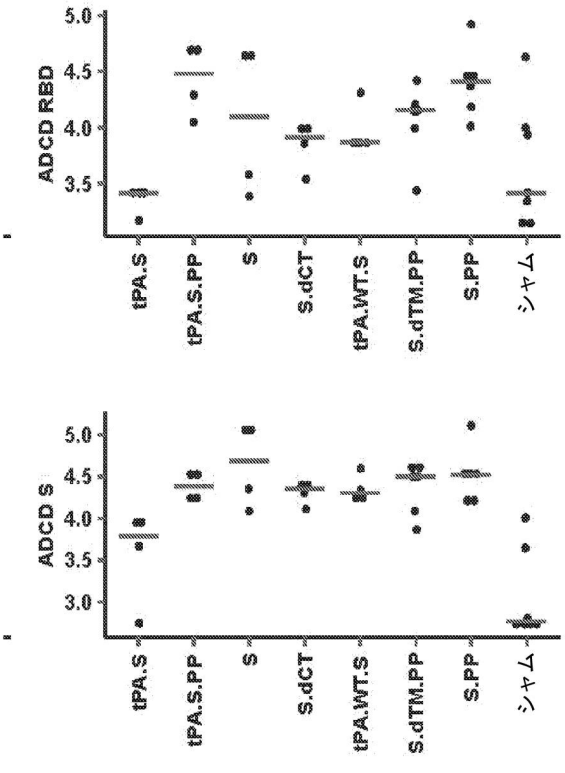


図 48-続き

【図４８－４】

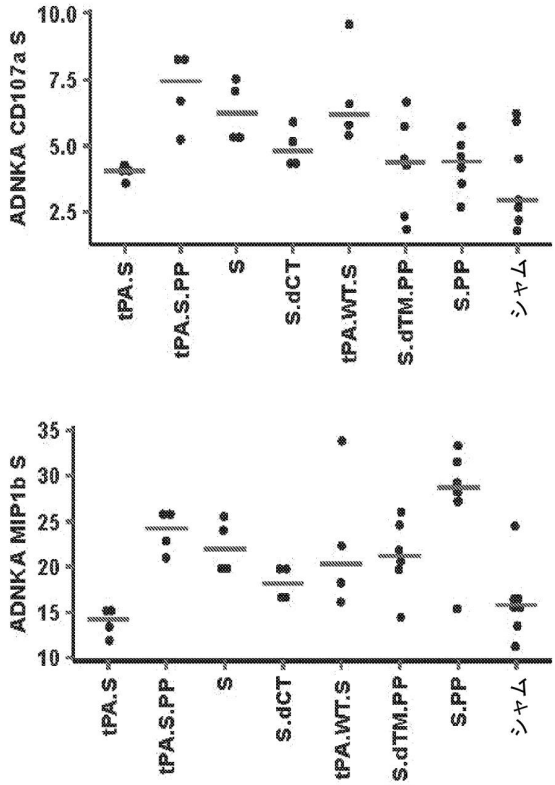


図 48-続き

【図４９】

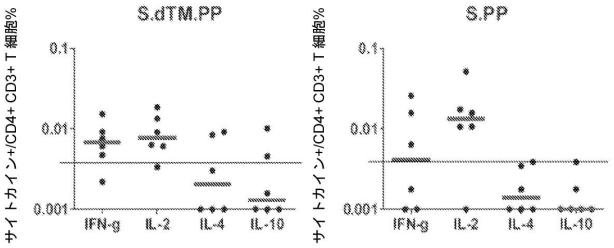


図 49

【図５０】

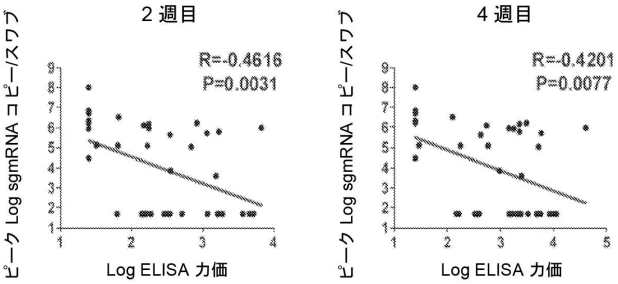


図 50

【図５１】

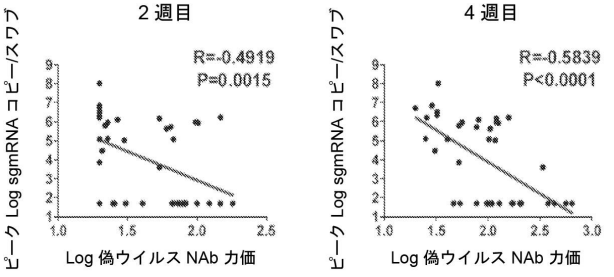


図 51

【図５２】

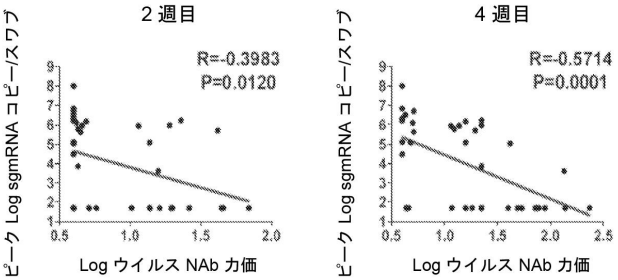


図 52

【図５３－１】

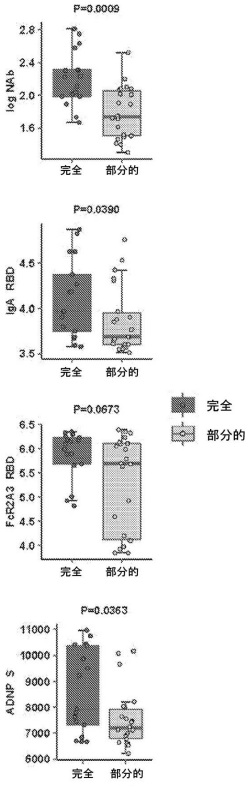


図 53

【図５３－２】

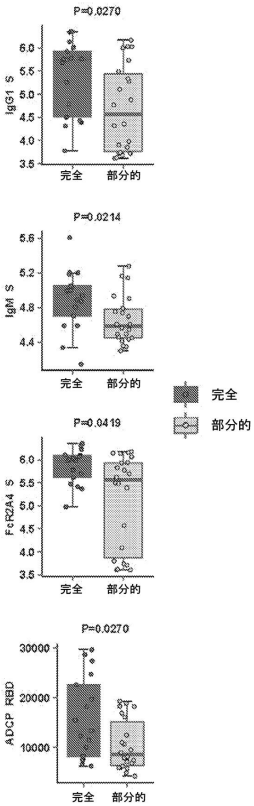


図 53-続き

【図５３－３】

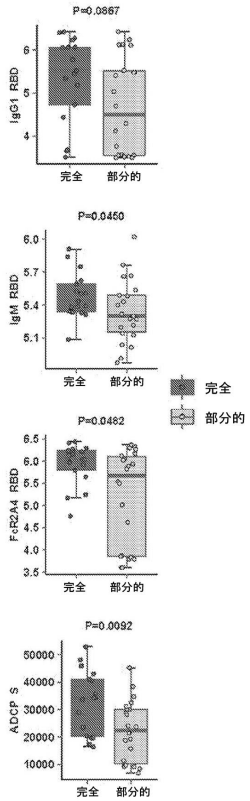


図 53-続き

【図５３－４】

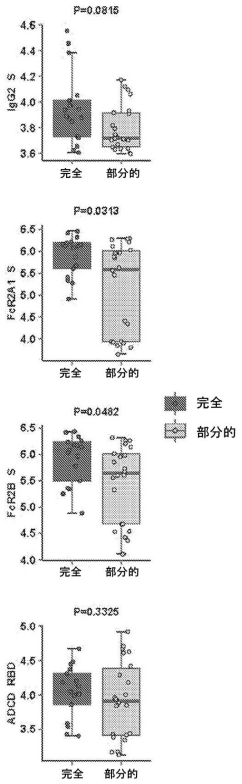


図 53-続き

【図５３－５】

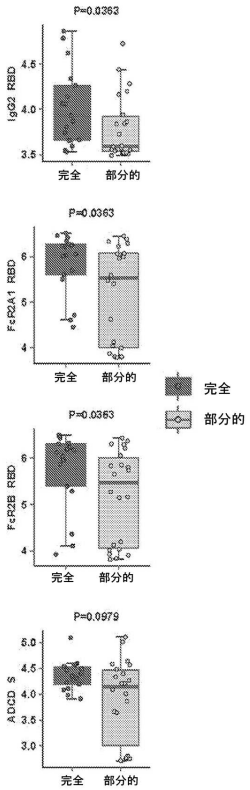


図 53-続き

【図５３－６】

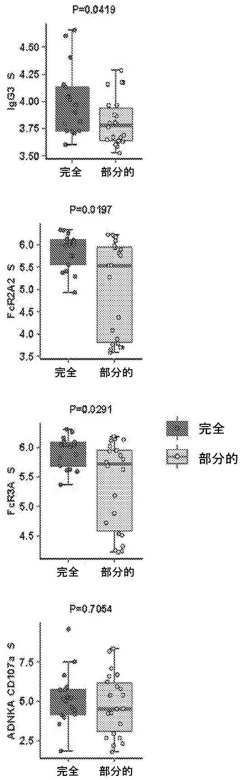


図 53-続き

【図５３－７】

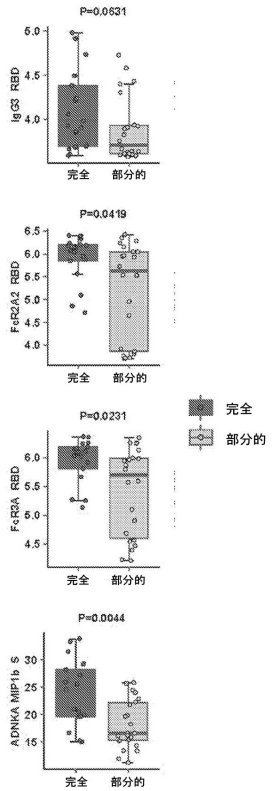


図 53-続き

【図５３－８】

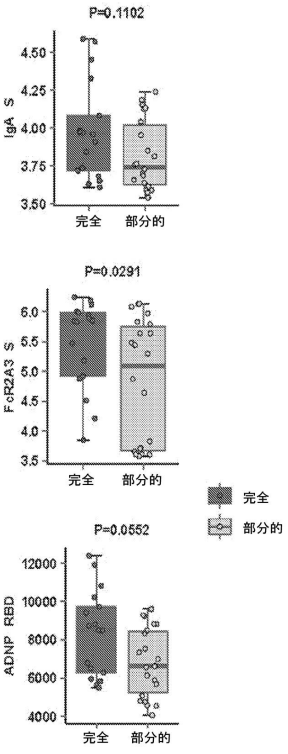


図 53-続き

【図５４】

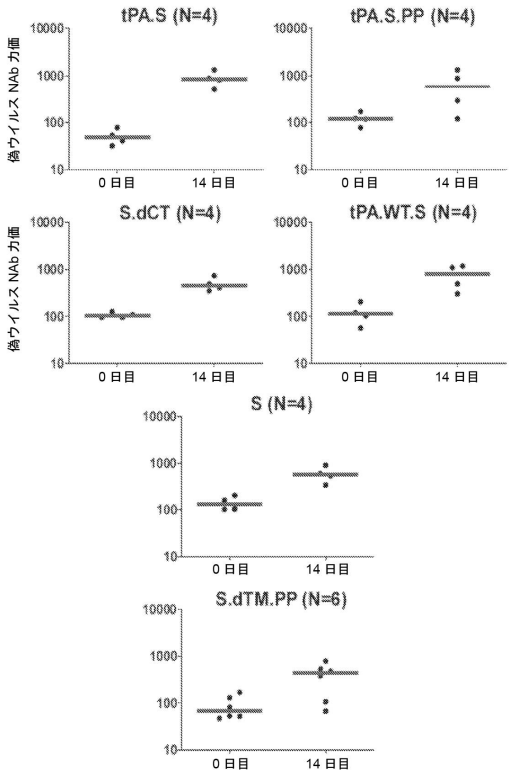


図 54

【図５５－１】

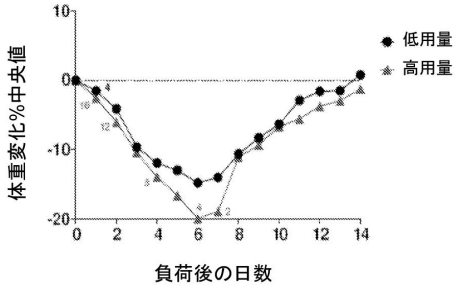


図 55A

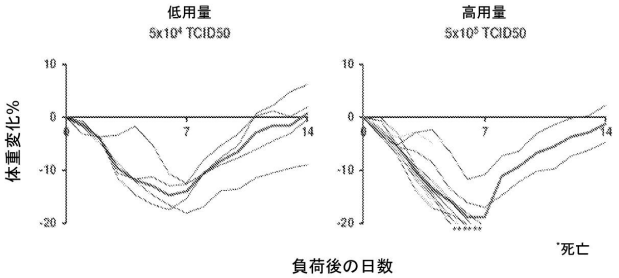


図 55B

【図５５－２】

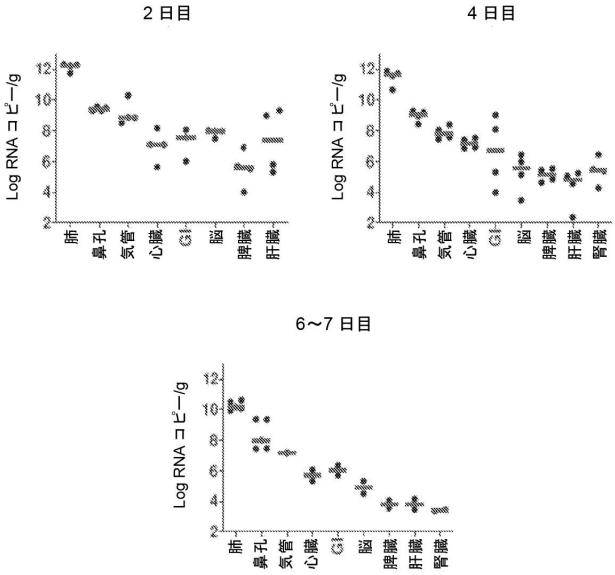


図 55C

【図５６】

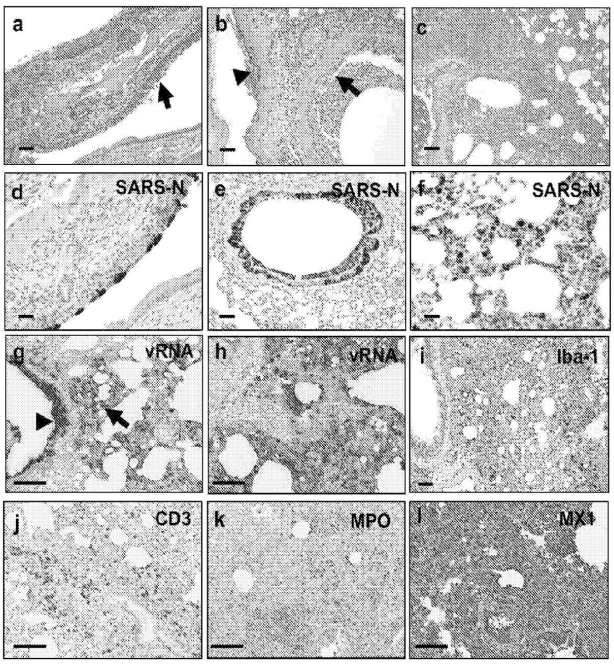


図 56A～56L

【図５７－１】

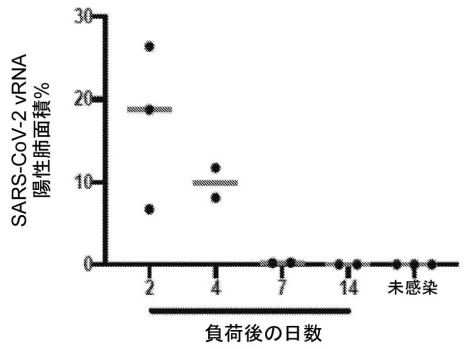


図 57A

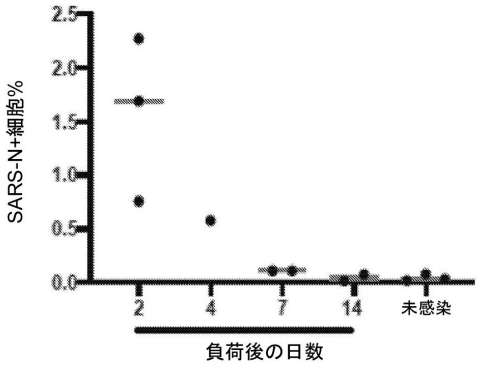


図 57B

【図５７－２】

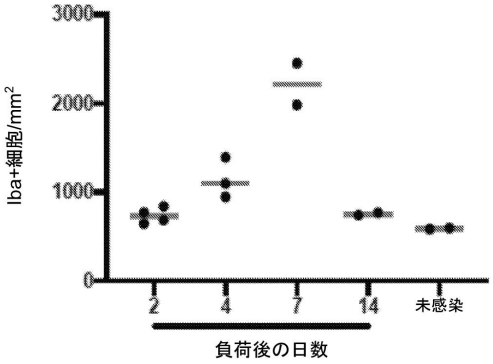


図 57C

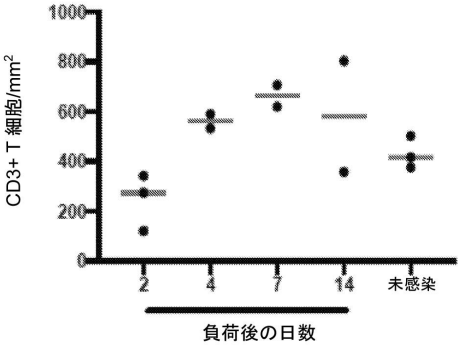


図 57D

【図５７－３】

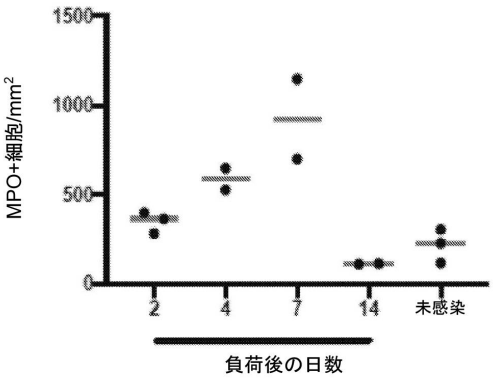


図 57E

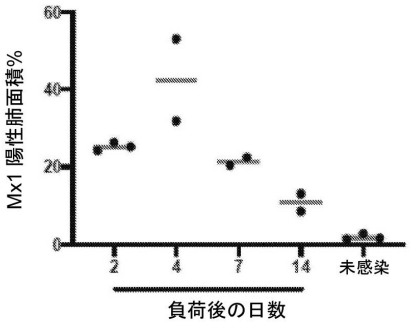


図 57F

【図５８】

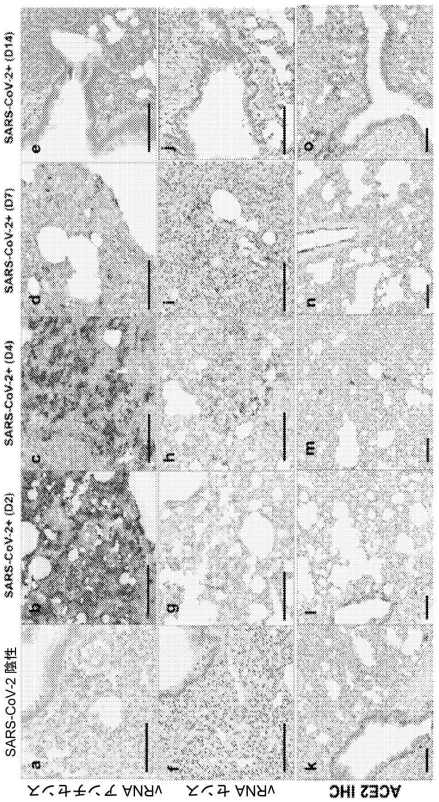


図 58A～58O

【図５９－１】

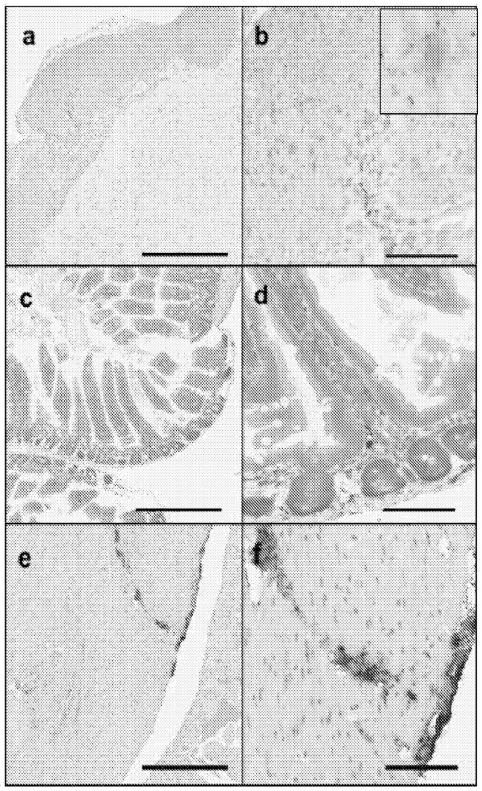


図 59A～59F

【図５９－２】

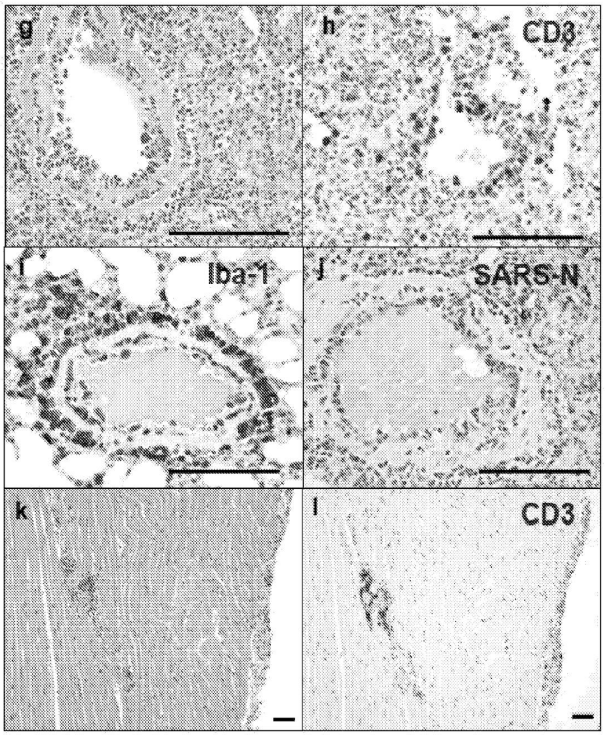


図 59G～59L

【図６０】

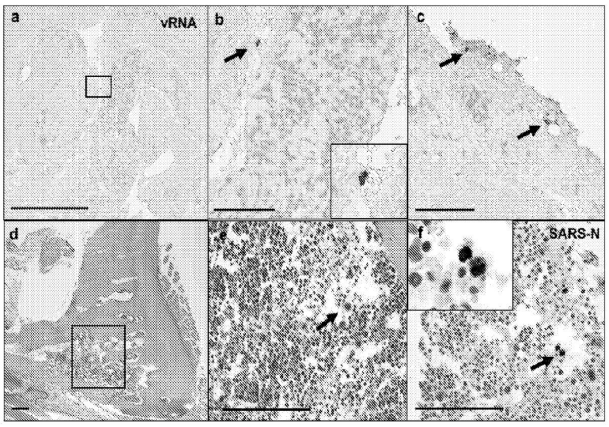


図 60A～60F

【図６１－１】

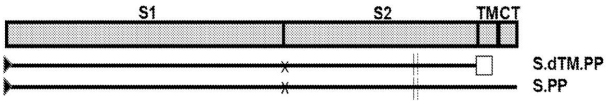


図 61A

【図６１－２】

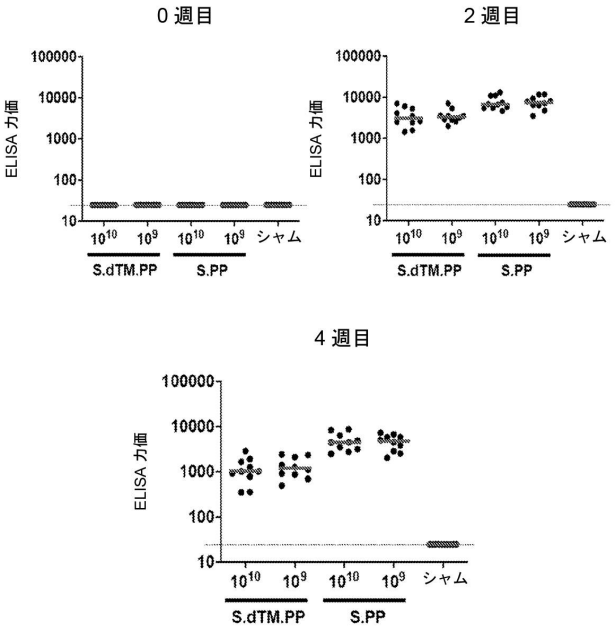


図 61B

【図６１－３】

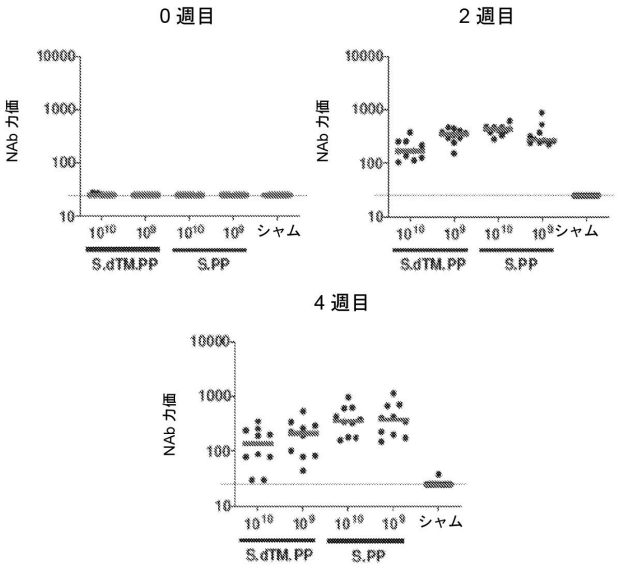


図 61C

【図６１－４】

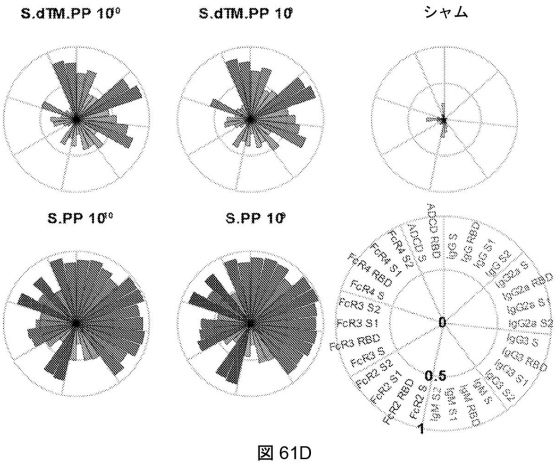


図 61D

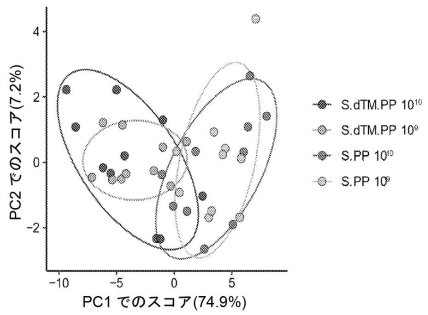


図 61E

【図６１－５】

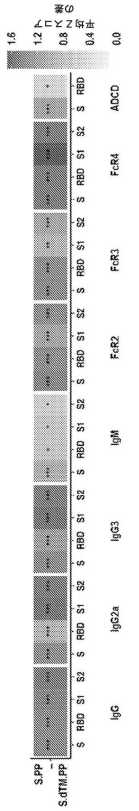


図 61F

【図６２－１】

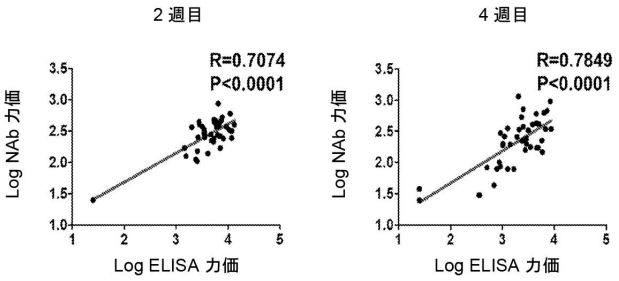


図 62A

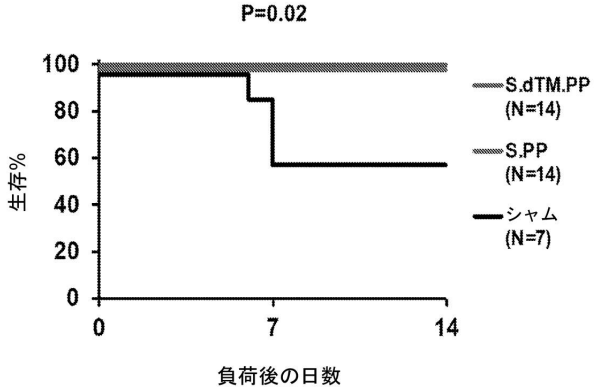


図 62B

【図６２－２】

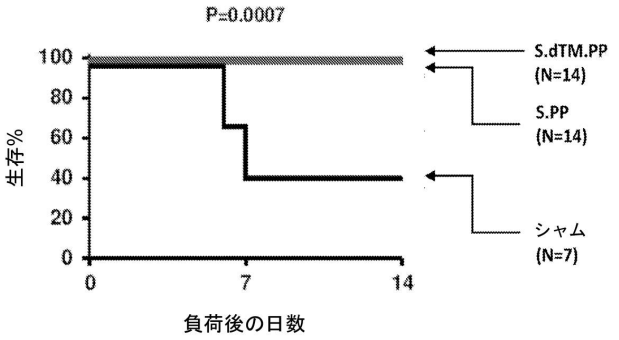


図 62C

【図６３－１】

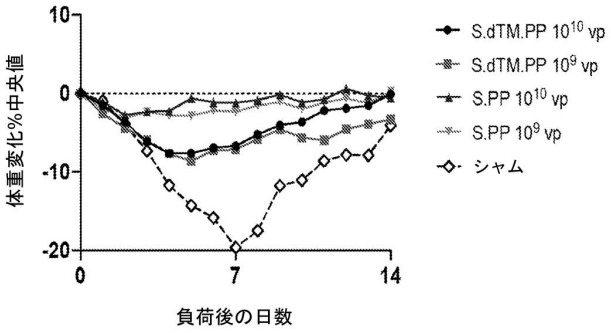


図 63A

【図６３－２】

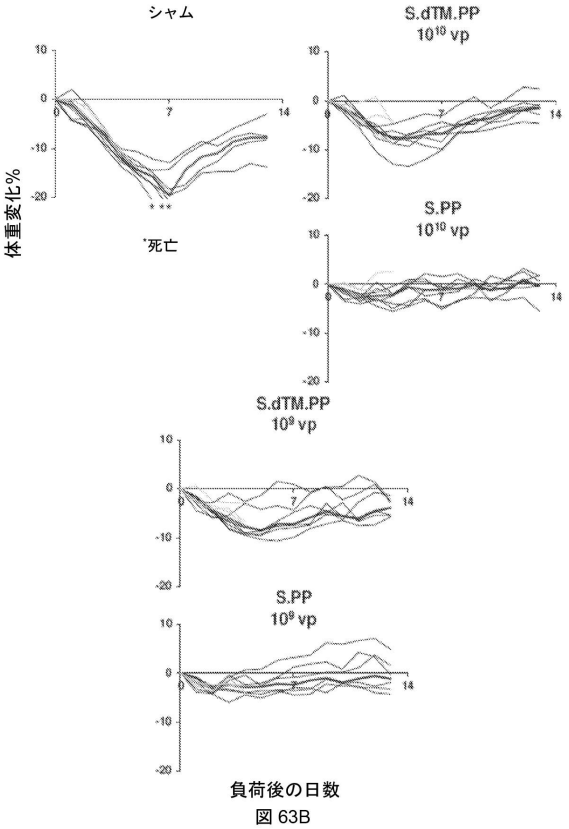


図 63B

【図６３－３】

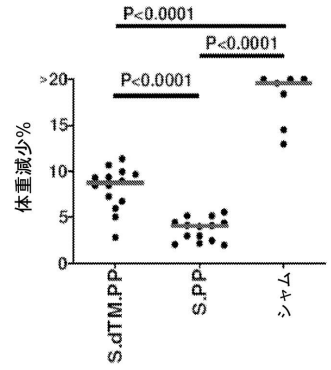


図 63C

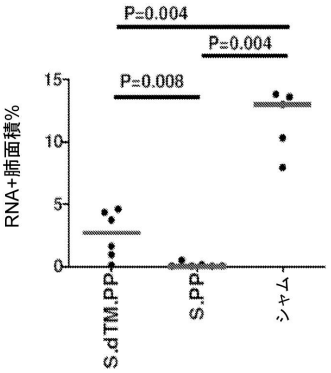


図 63D

【図６４】

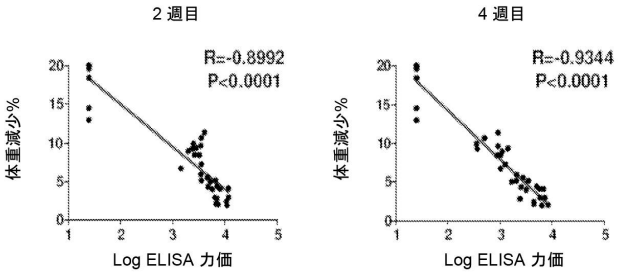


図 64A

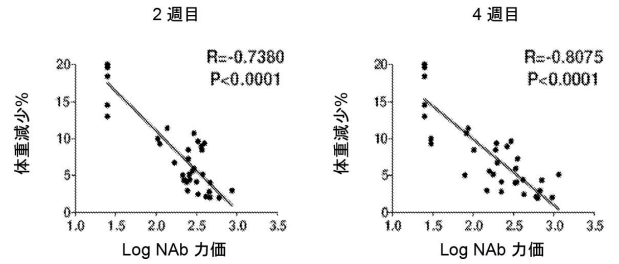


図 64B

【図６５－１】

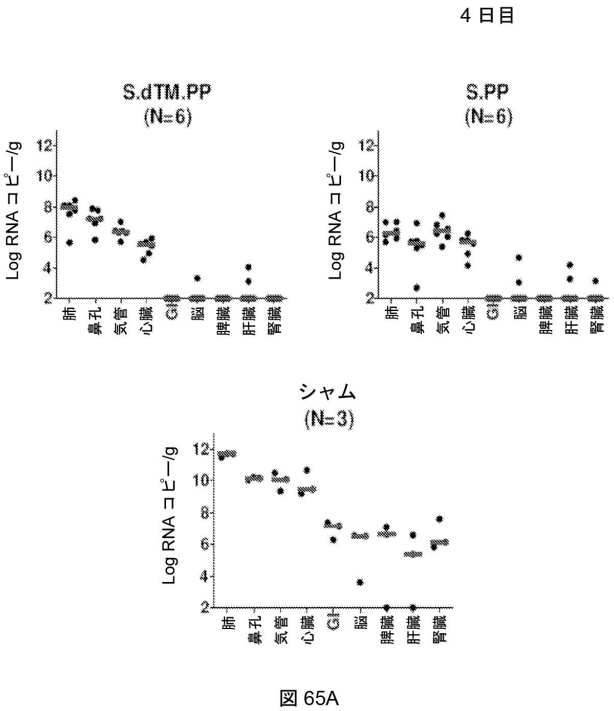


図 65A

【図６５－２】

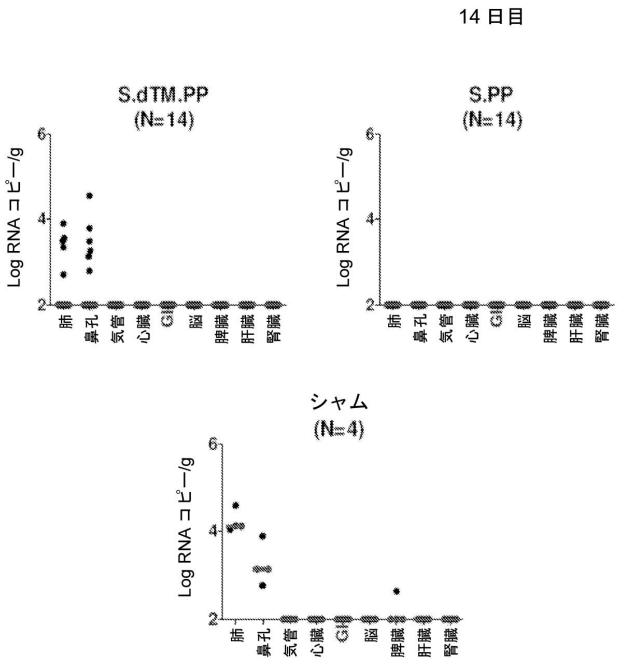


図 65B

【図６６－１】

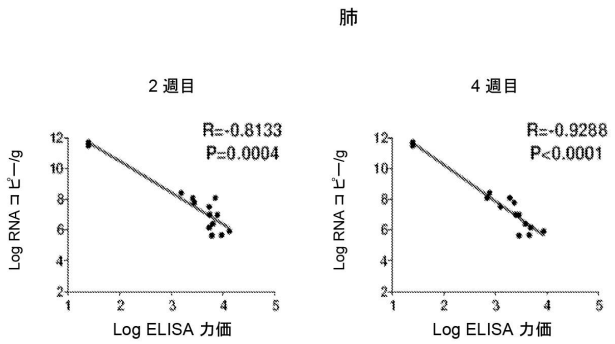


図 66A

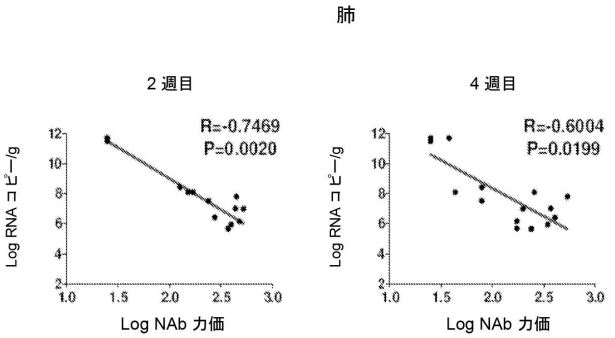


図 66B

【図６６－２】

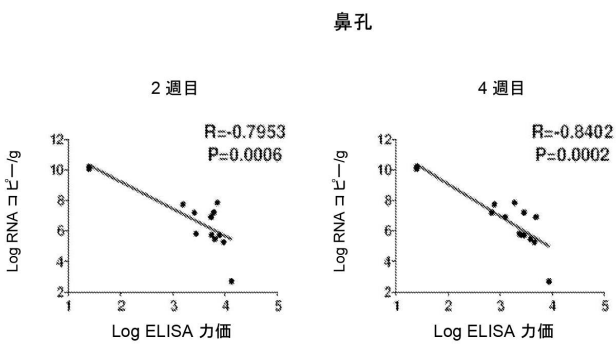


図 66C

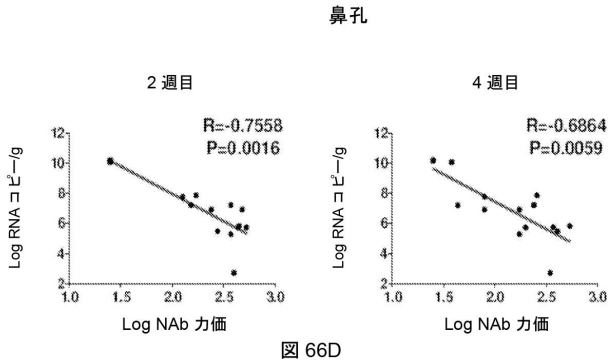


図 66D

【図６７－１】

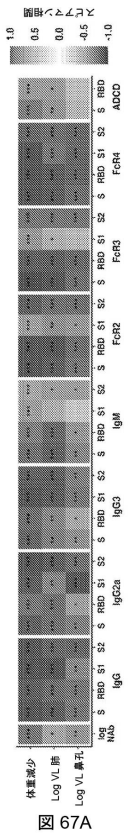


図 67A

【図６７－２】

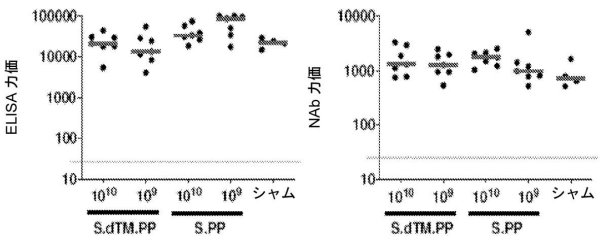


図 67B

【図６８－１】

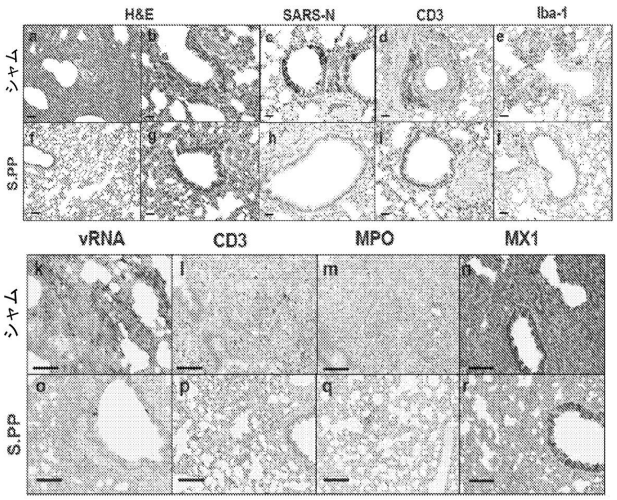


図 68A～68R

【図６８－２】

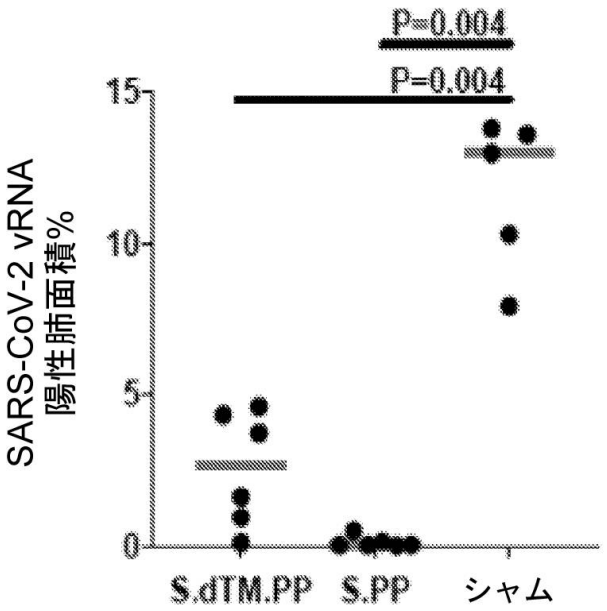


図 68S

【図６９】

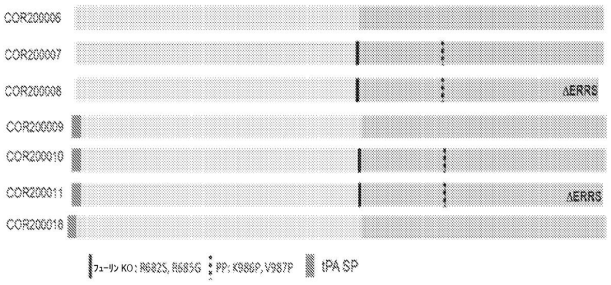


図 69

【図７０】

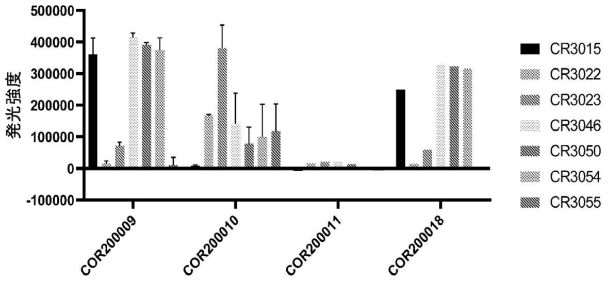


図 70

【図７１】

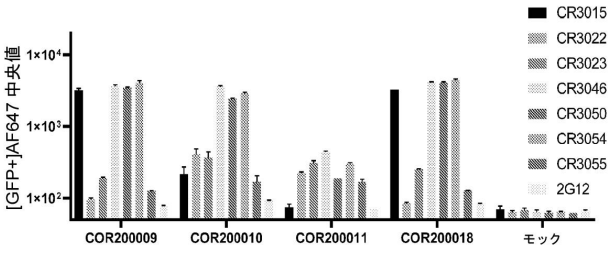


図 71

【図７２】

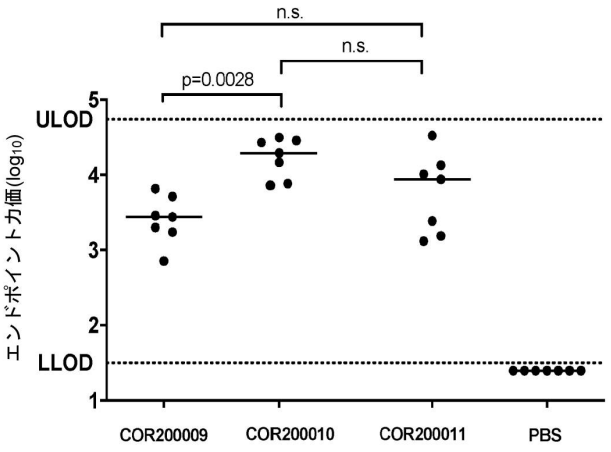


図 72

【図７３】

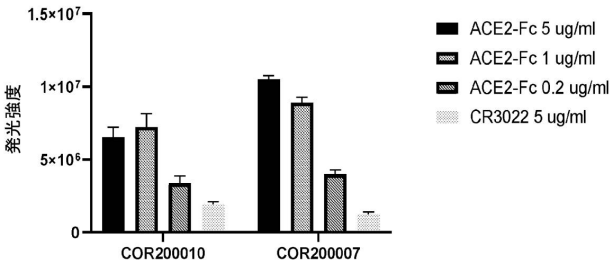


図 73

【図７４】

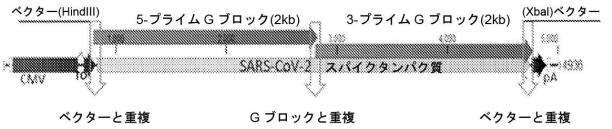


図 74

【図７５】

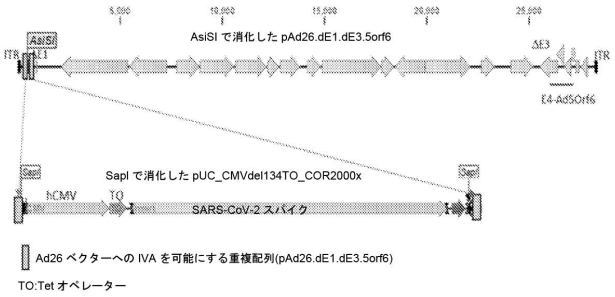


図 75

【図７６】

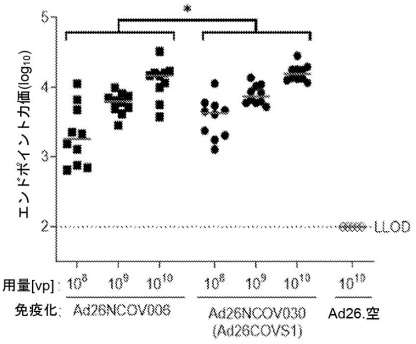


図 76A

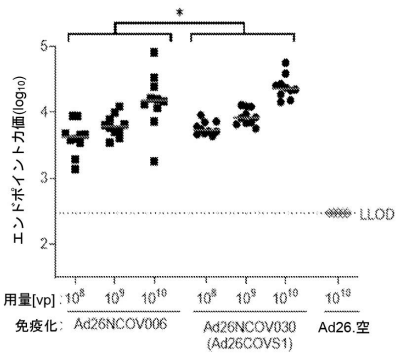


図 76B

【図７７】

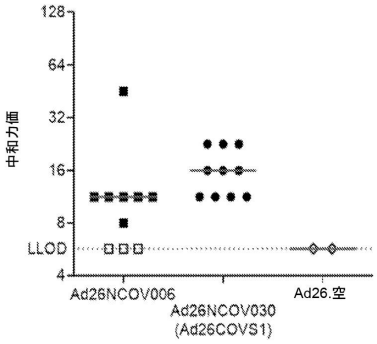


図 77A

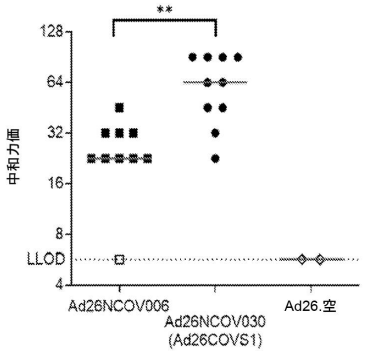


図 77B

【図７８】

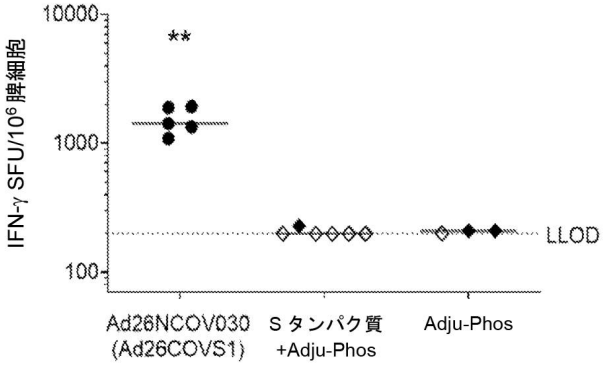


図 78

【図７９－１】

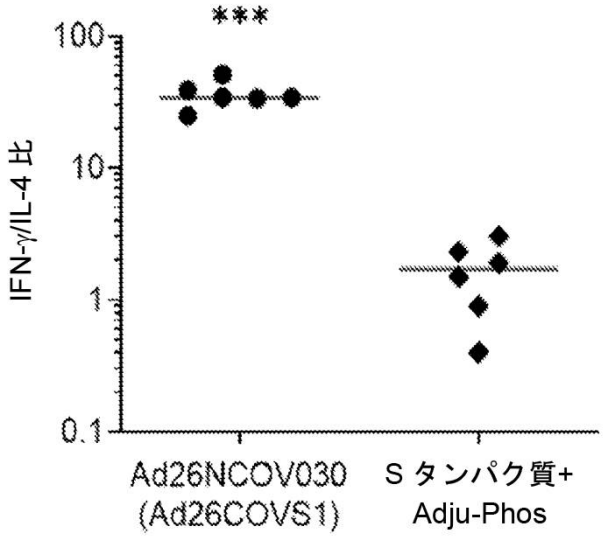


図 79A

【図７９－２】

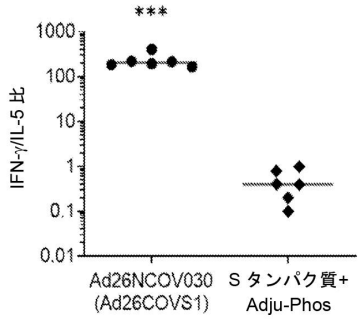


図 79B

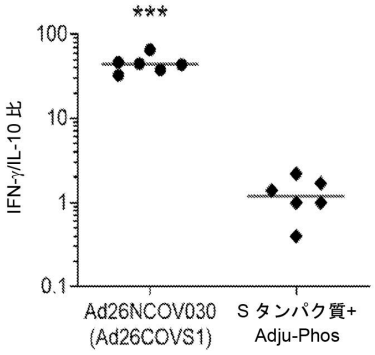


図 79C

【図８０－１】

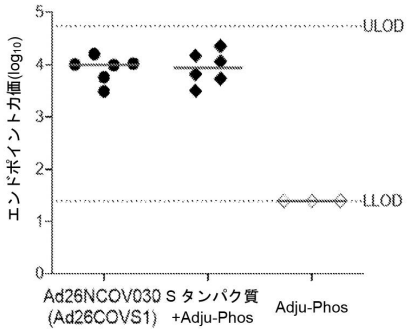


図 80A

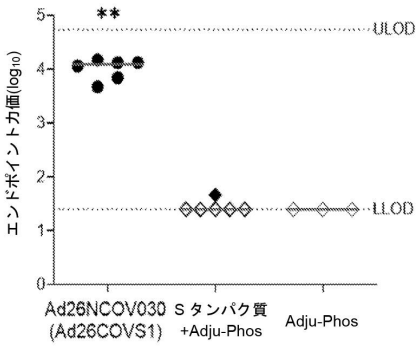


図 80B

【図８０－２】

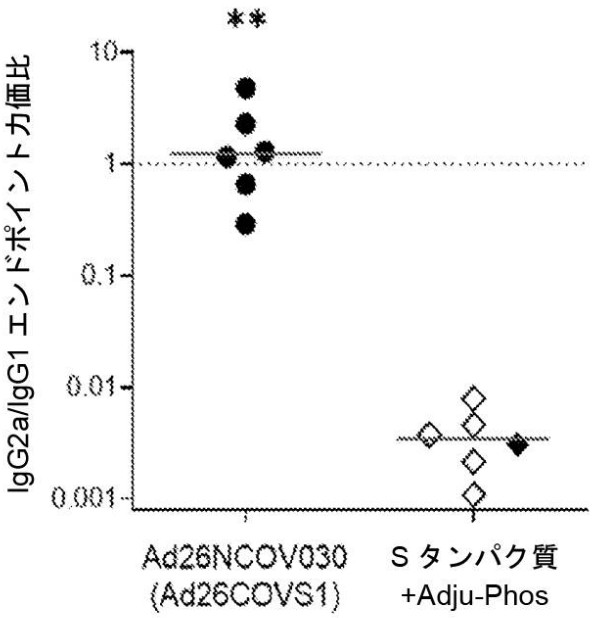


図 80C

【図８１－１】

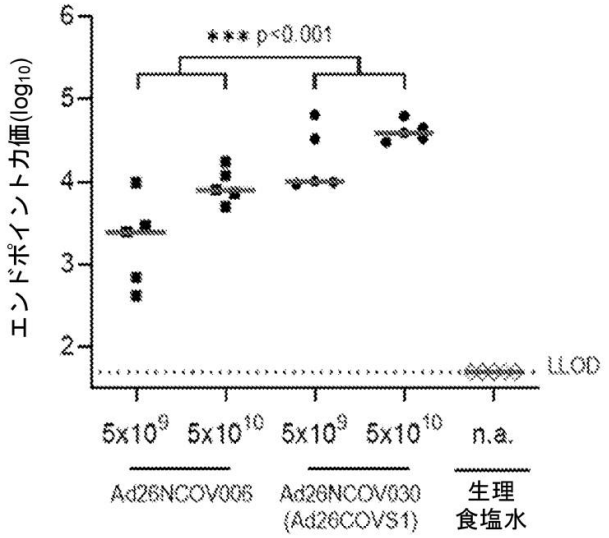


図 81A

【図８１－２】

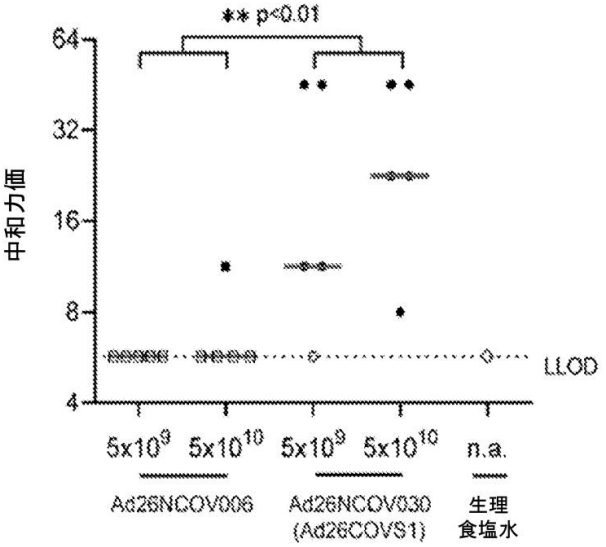


図 81B

【図８２】

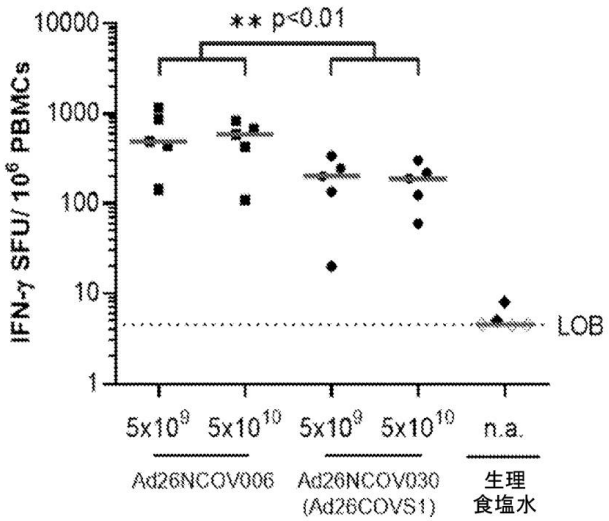


図 82

【図８３】

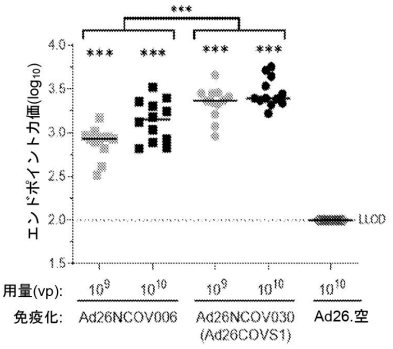


図 83A

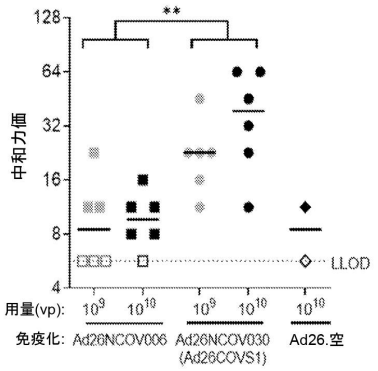


図 83B

【図８４】

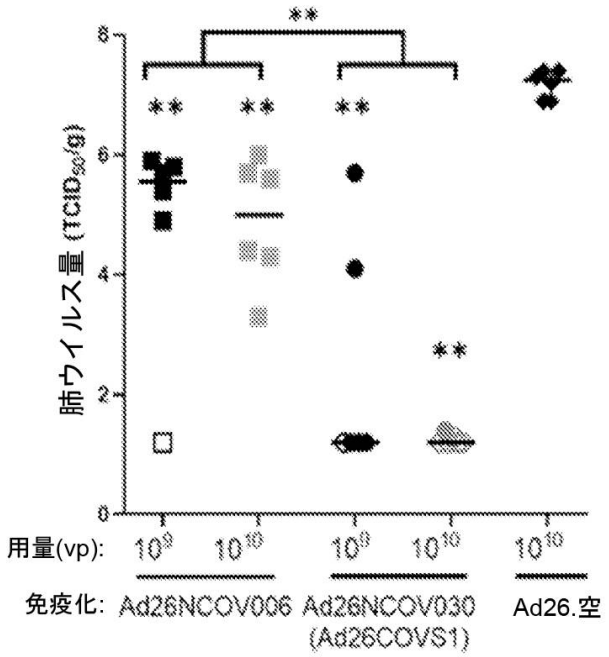


図 84

【図８５】

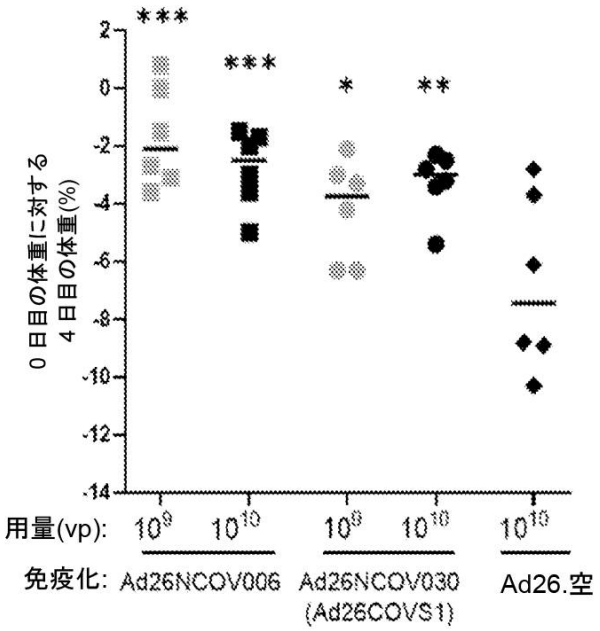


図 85

【図８６－１】

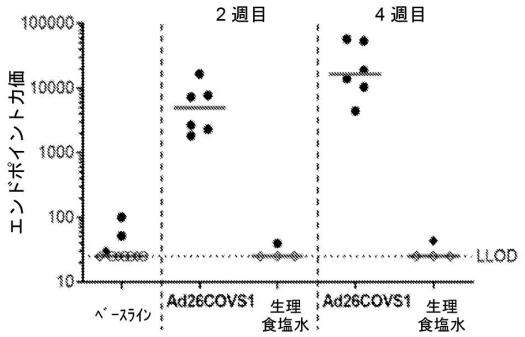


図 86A

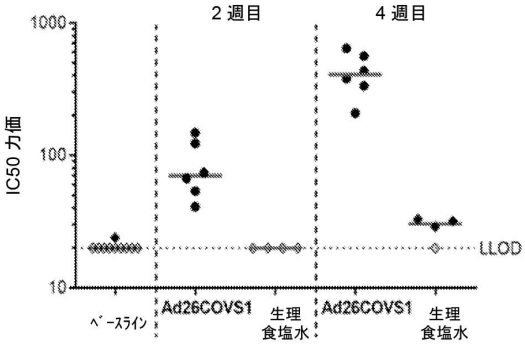


図 86B

【図８６－２】

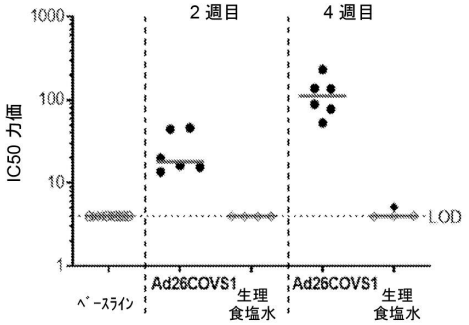


図 86C

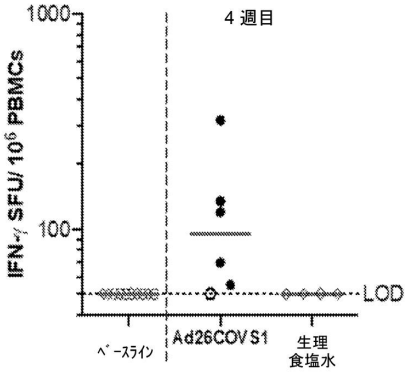


図 86D

【図８７】

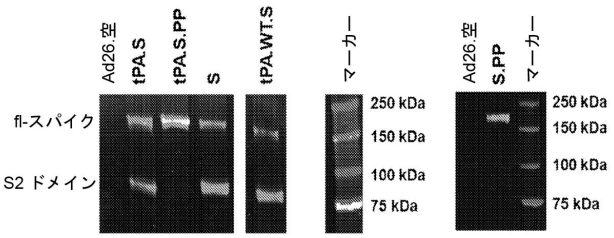


図 87

【図８８－１】

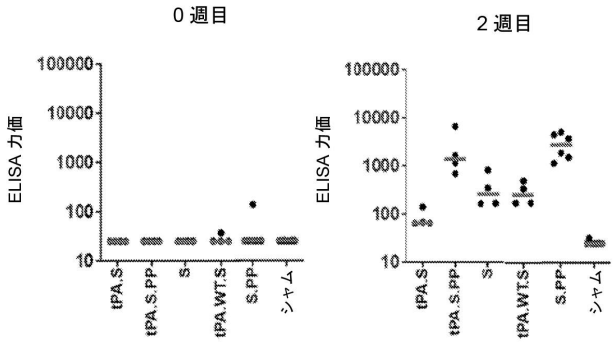


図 88A

【図８８－２】

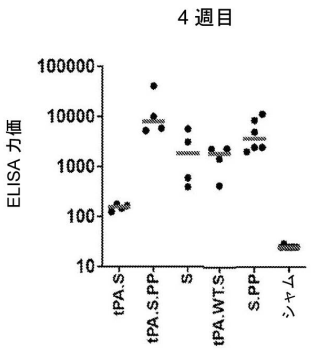


図 88A-続き

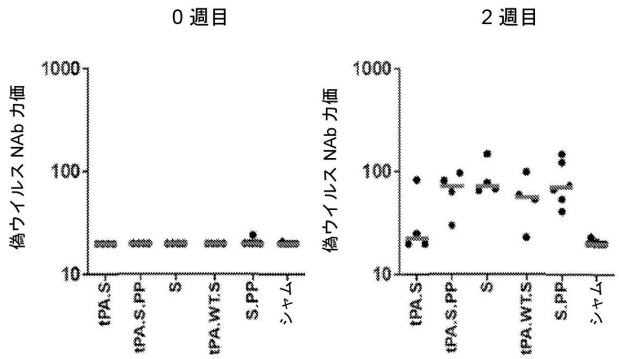


図 88B

【図８８－３】

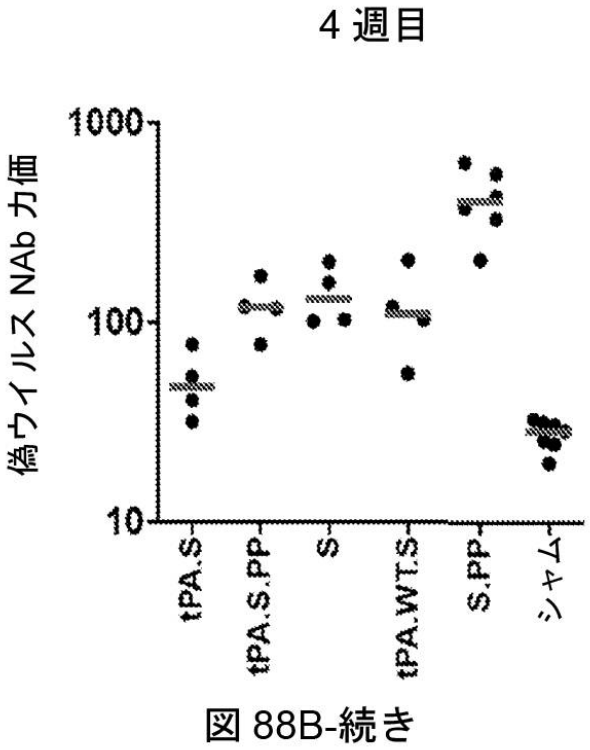


図 88B-続き

【図８９－１】

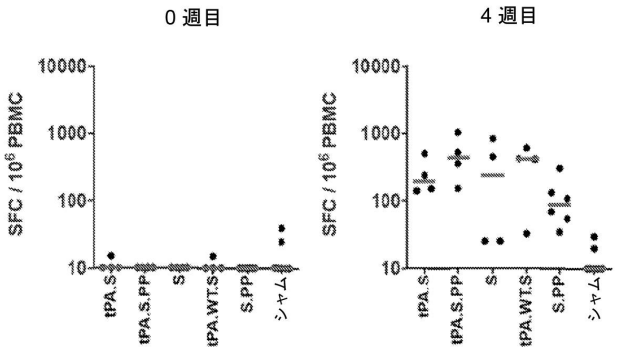


図 89A

【図８９－２】

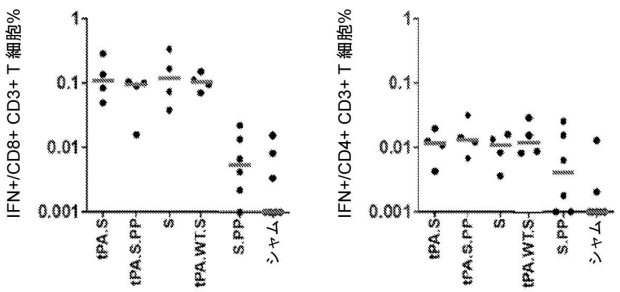


図 89B

【図９０－１】

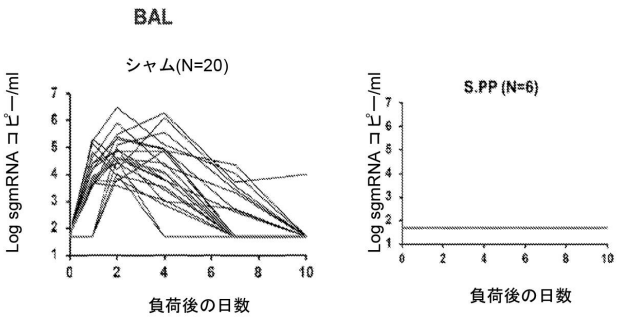


図 90A

【図９０－２】

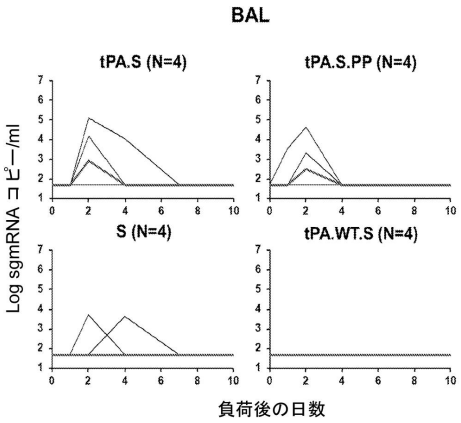


図 90B

鼻スワブ

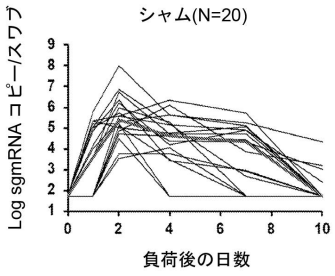


図 90C

【図９０－３】

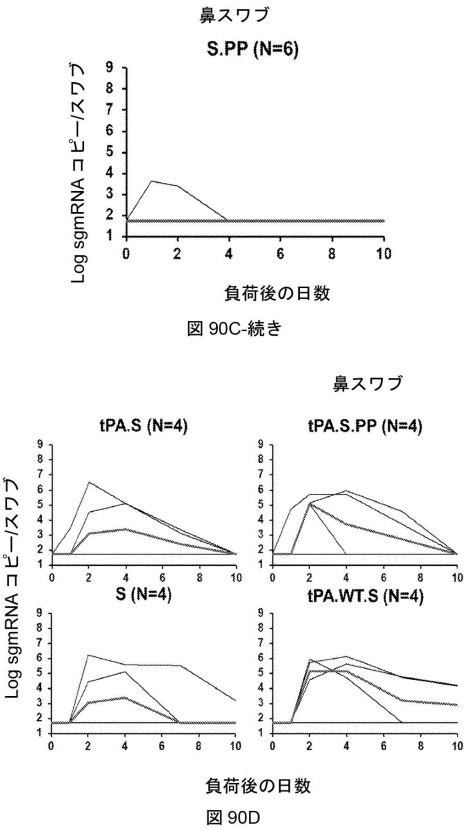


図 90C-続き

図 90D

【図９１】

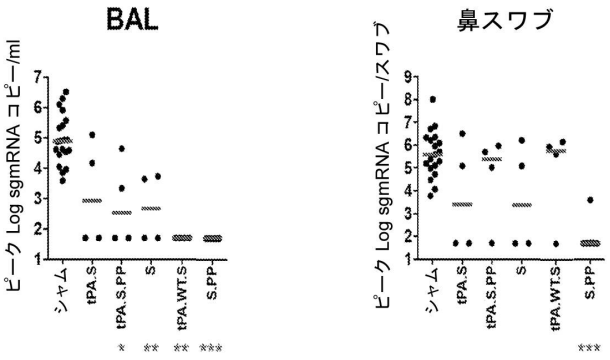


図 91

【図９２】

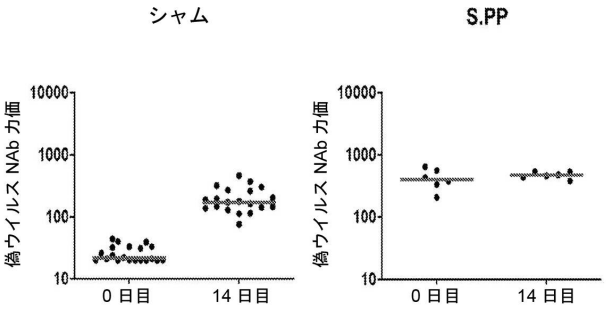


図 92

【図９３】

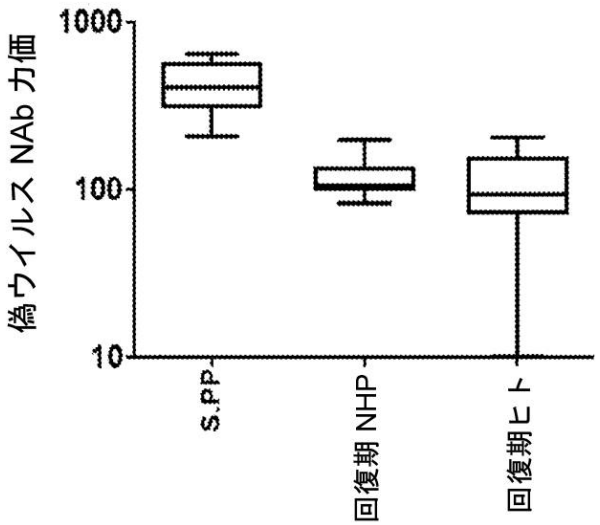


図 93

【図９４】

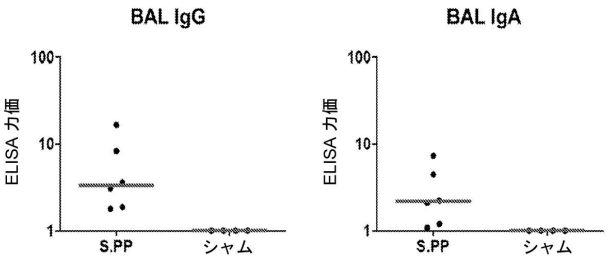


図 94

【図９５】

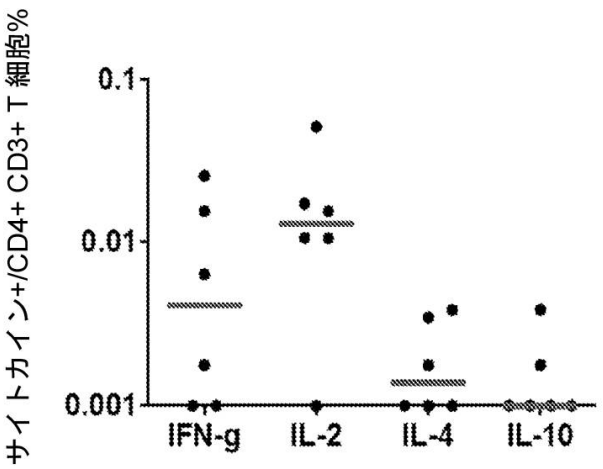


図 95

【図９６－１】

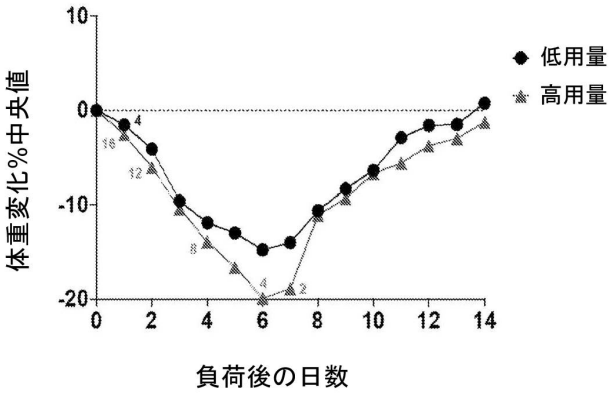


図 96A

【図９６－２】

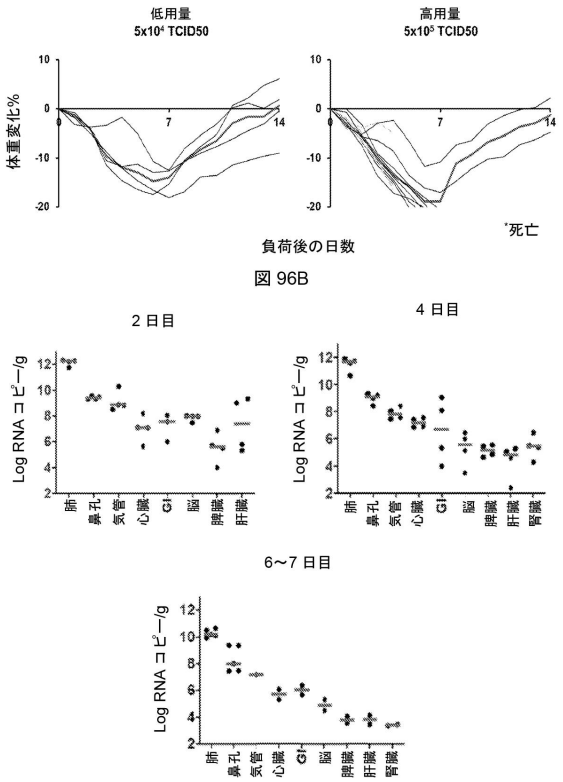


図 96B

図 96C

【図９７】

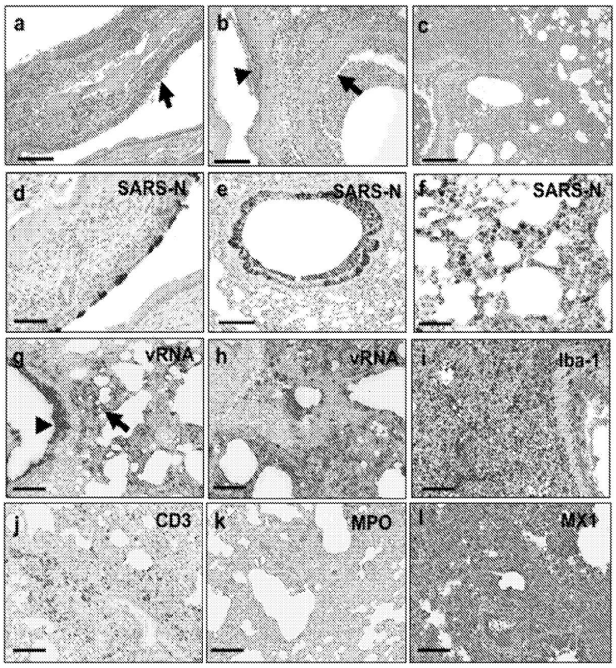


図 97A～97L

【図９８－１】

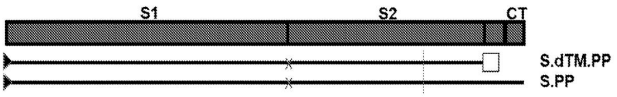


図 98A

【図９８－２】

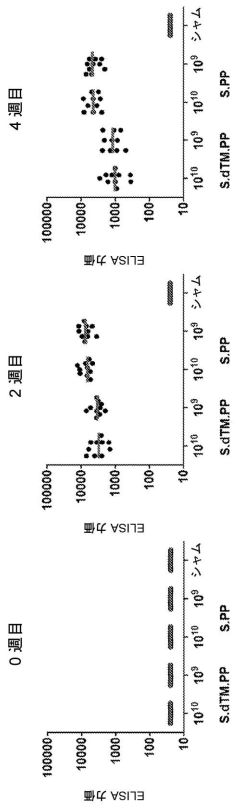


図 98B

【図９８－３】

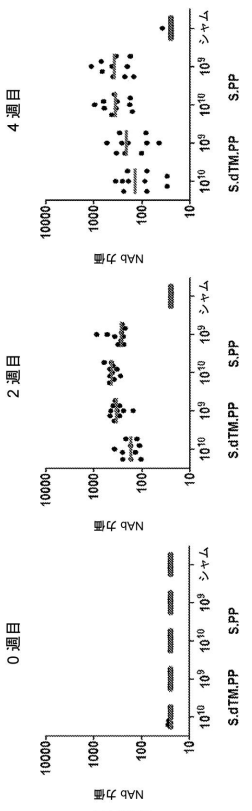


図 98C

【図９８－４】

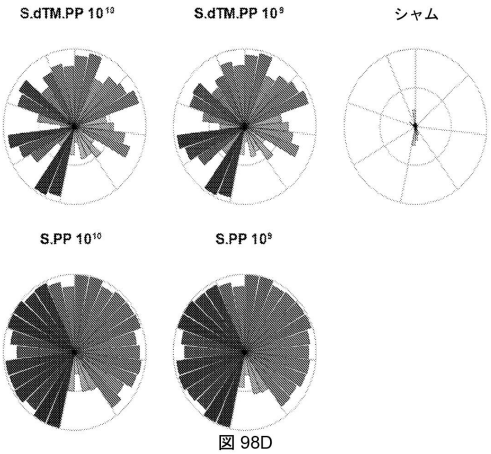


図 98D

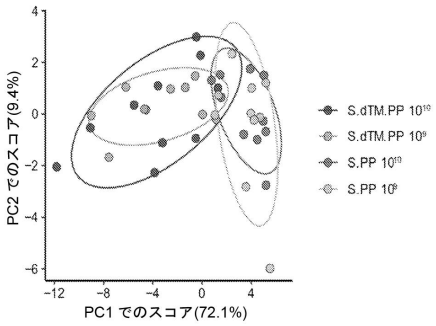


図 98E

【図９８－５】

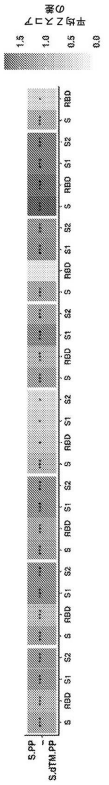


図 98F

【図９９－１】

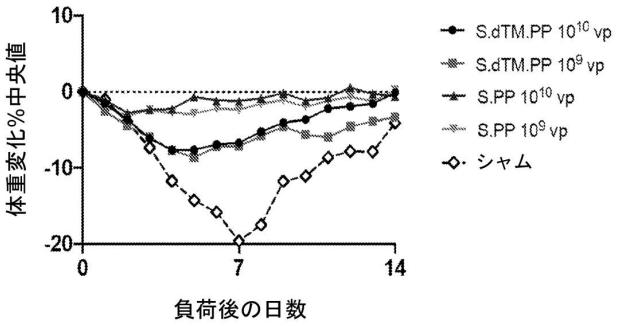


図 99A

【図９９－２】

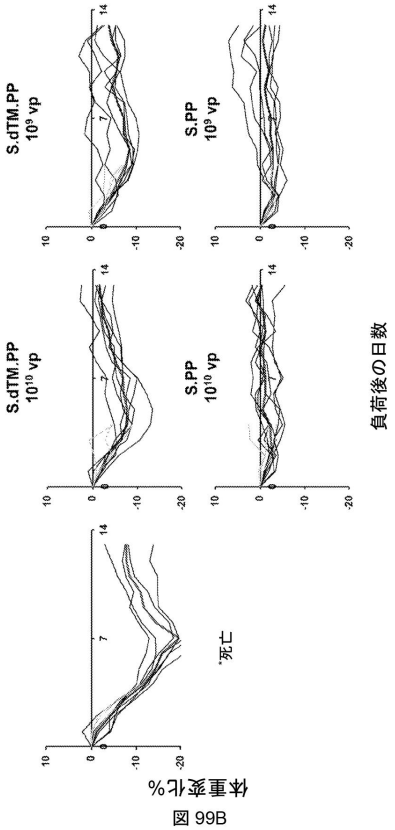


図 99B

【図９９－３】

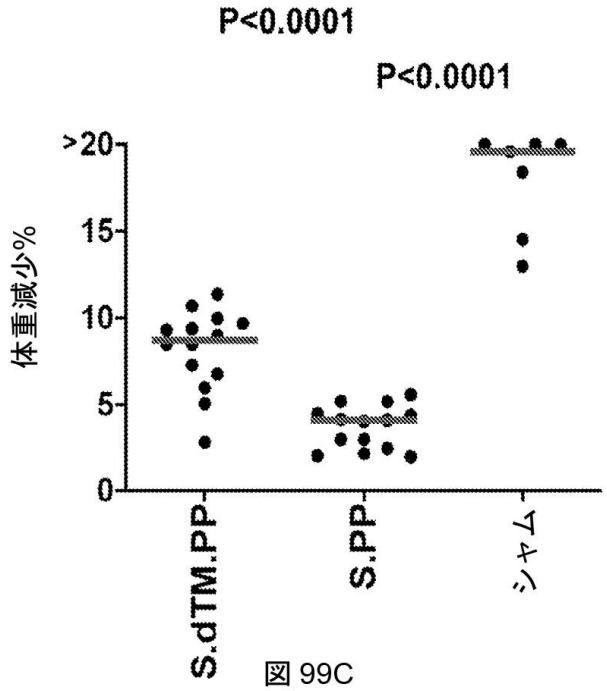


図 99C

【図１００－１】

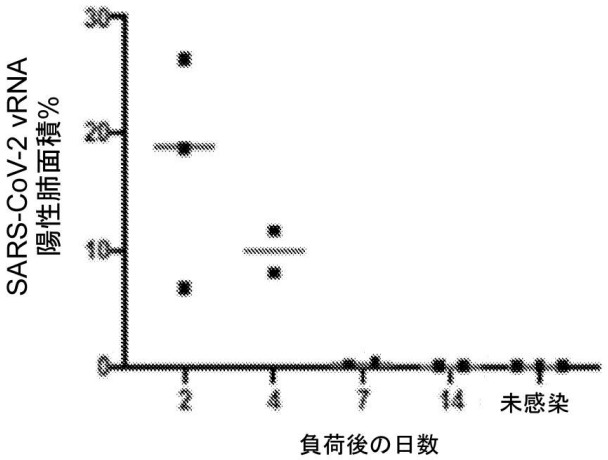


図 100A

【図１００－２】

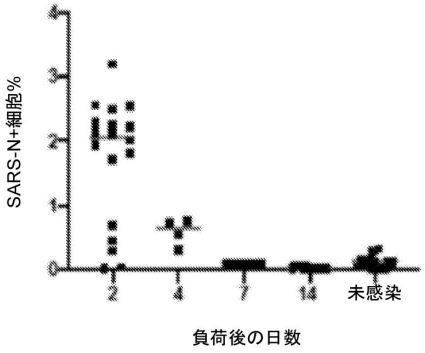


図 100B

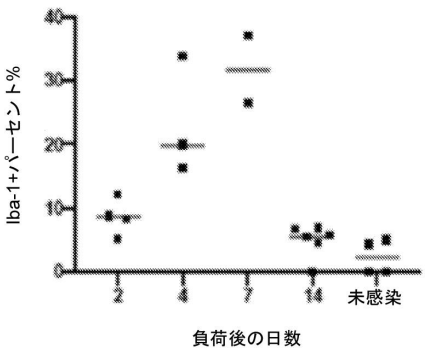


図 100C

【図１００－３】

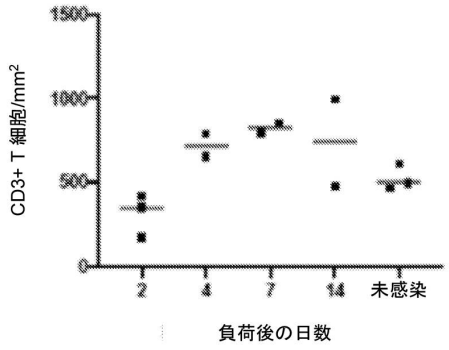


図 100D

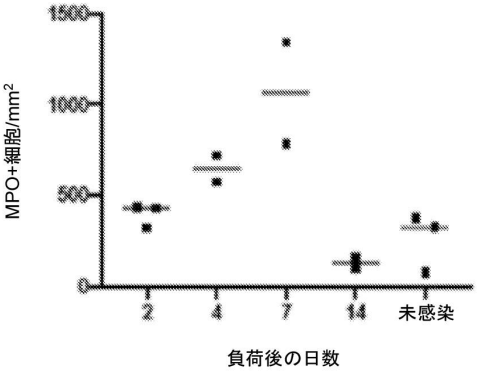


図 100E

【図１００－４】

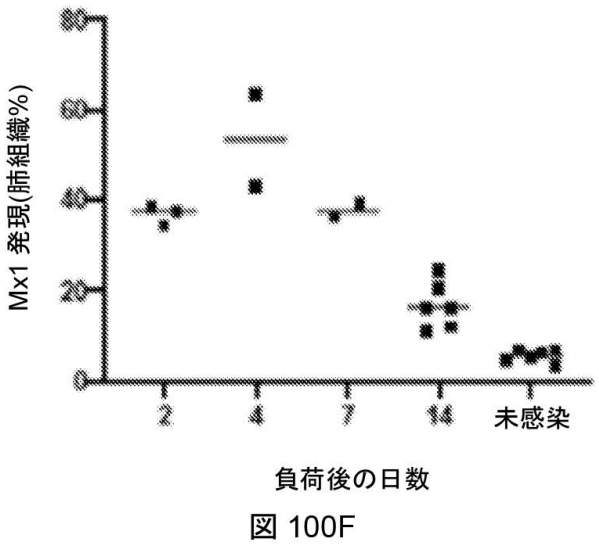


図 100F

【図１０１】

コホート 1a(成人≧18≦55 歳)

群	N	1 日目(ワクチン接種 1)	57 日目(ワクチン接種 2)
1	75	Ad26COVS1 5×10^{10} vp	Ad26COVS1 5×10^{10} vp
2	75	Ad26COVS1 5×10^{10} vp	プラセボ
3	75	Ad26COVS1 1×10^{11} vp	Ad26COVS1 1×10^{11} vp
4	75	Ad26COVS1 1×10^{11} vp	プラセボ
5	75	プラセボ	プラセボ

コホート 1b(成人≧18≦55 歳)

群	N	1 日目(ワクチン接種 1)	57 日目(ワクチン接種 2)
1	5	Ad26COVS1 5×10^{10} vp	Ad26COVS1 5×10^{10} vp
2	5	Ad26COVS1 5×10^{10} vp	プラセボ
3	5	Ad26COVS1 1×10^{11} vp	Ad26COVS1 1×10^{11} vp
4	5	Ad26COVS1 1×10^{11} vp	プラセボ
5	5	プラセボ	プラセボ

コホート 2a(成人≧18≦55 歳)

群	N	1 日目(ワクチン接種 1)	57 日目
1-4	120	Ad26COVS1 1×10^{11} vp	接種なし
5	15	プラセボ	接種なし

コホート 2b(成人≧18≦55 歳)

群	N	1 日目(ワクチン接種 1)	57 日目(ワクチン接種 2)
1-4	120	Ad26COVS1 5×10^{10} vp	Ad26COVS1 5×10^{10} vp
5	15	プラセボ	プラセボ

コホート 3(成人≧65 歳)

群	N	1 日目(ワクチン接種 1)	57 日目(ワクチン接種 2)
1	75	Ad26COVS1 5×10^{10} vp	Ad26COVS1 5×10^{10} vp
2	75	Ad26COVS1 5×10^{10} vp	プラセボ
3	75	Ad26COVS1 1×10^{11} vp	Ad26COVS1 1×10^{11} vp
4	75	Ad26COVS1 1×10^{11} vp	プラセボ
5	75	プラセボ	プラセボ
合計	1,045		

図 101

【図１０２－１】

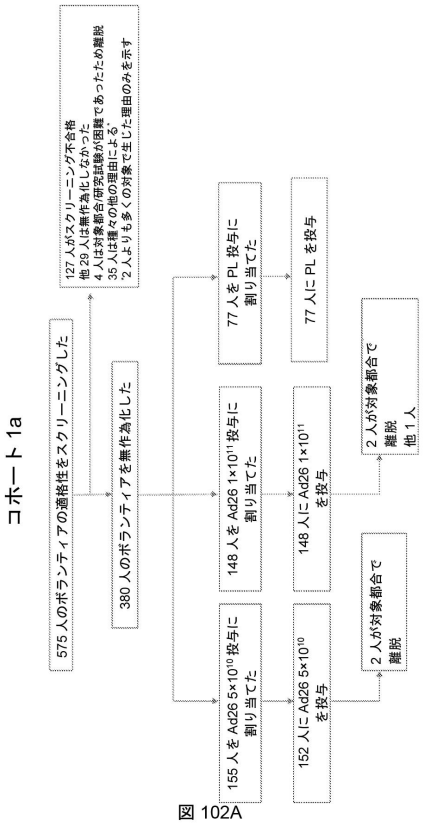


図 102A

【図１０２－２】

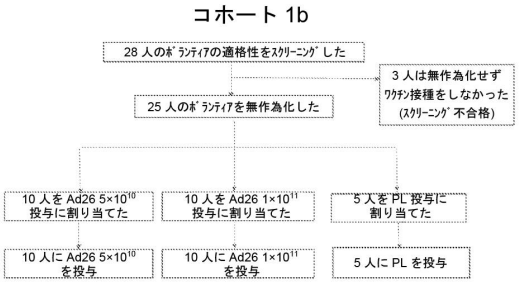


図 102B

【図１０２－３】

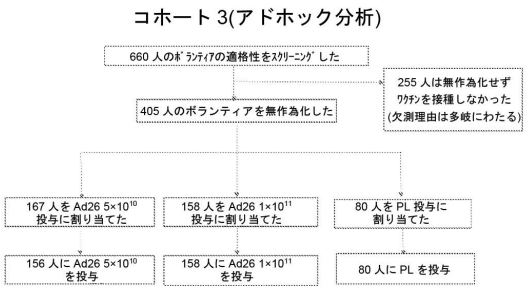


図 102C

【図１０３－１】

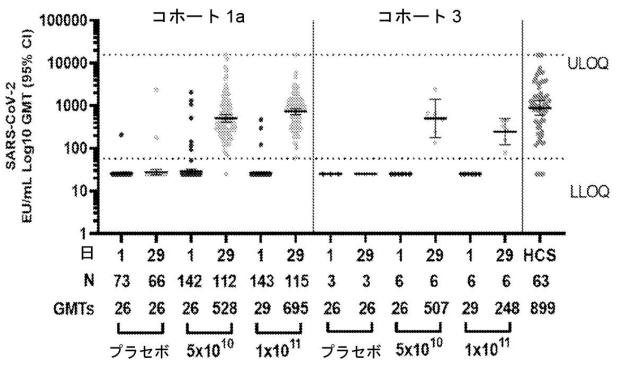


図 103A

【図１０３－２】

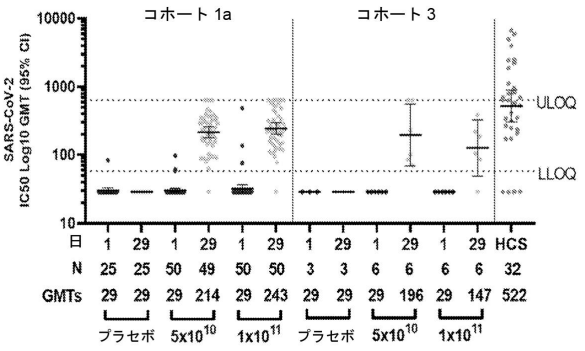


図 103B

【図１０３－３】

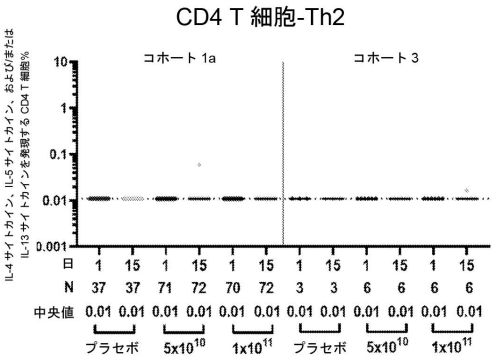


図 103C-続き

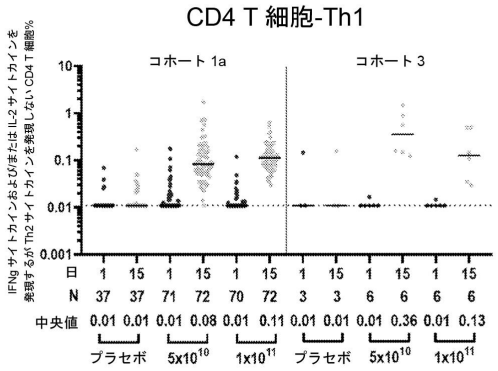


図 103C

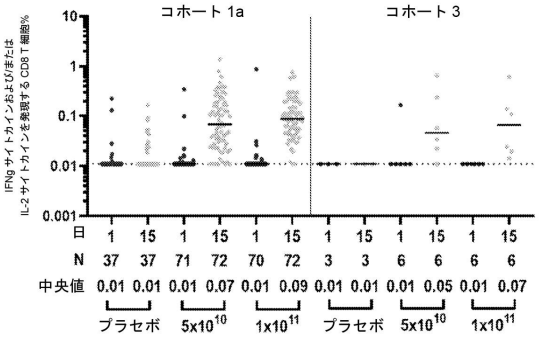


図 103D

【図１０４】

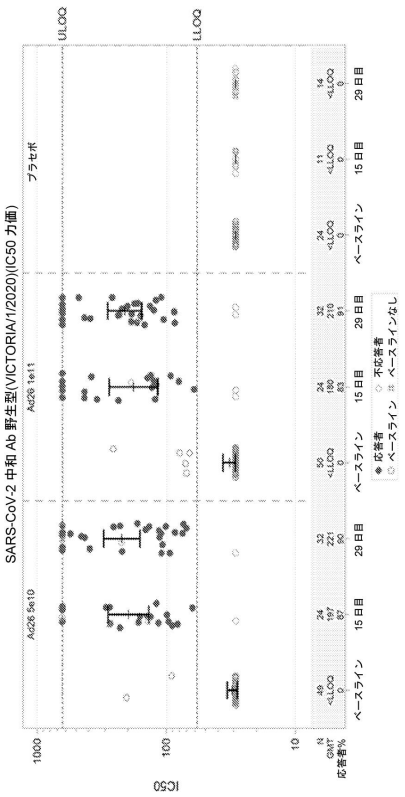


図 104

【図１０５－１】

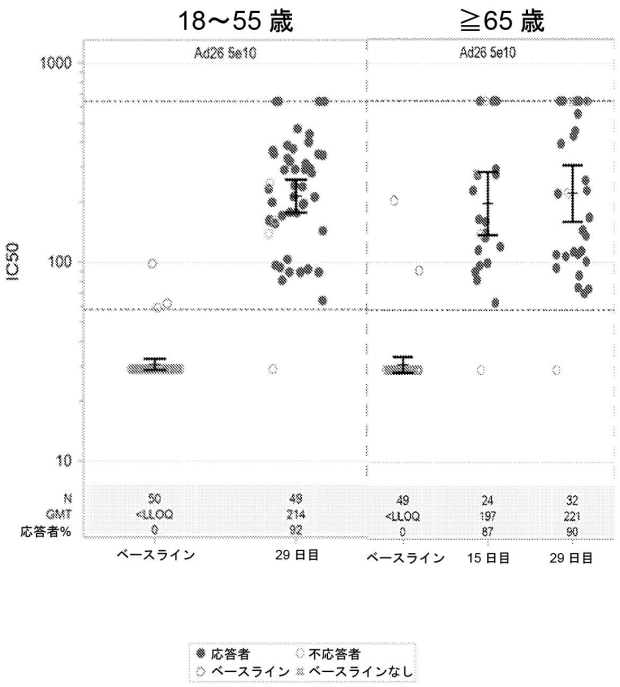


図 105

【図１０５－２】

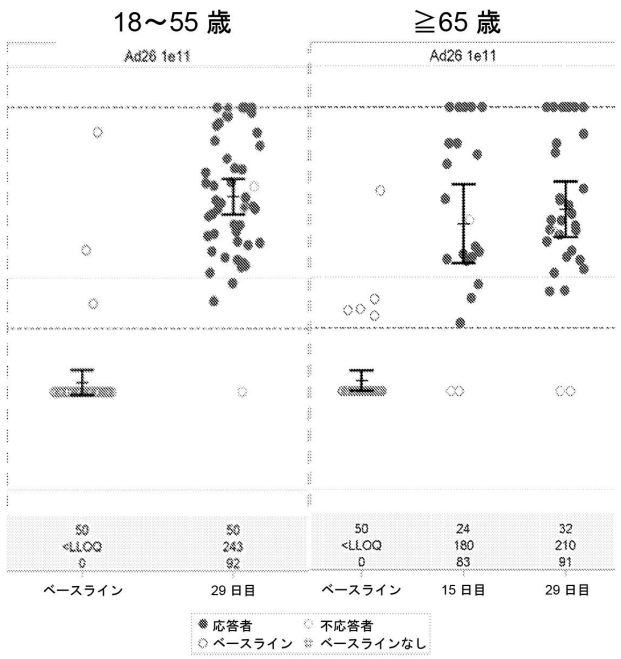


図 105-続き

【図１０６】

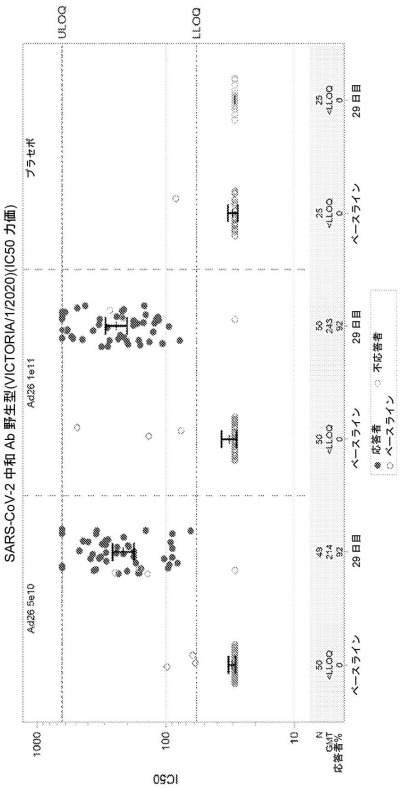


図 106

【図１０７】

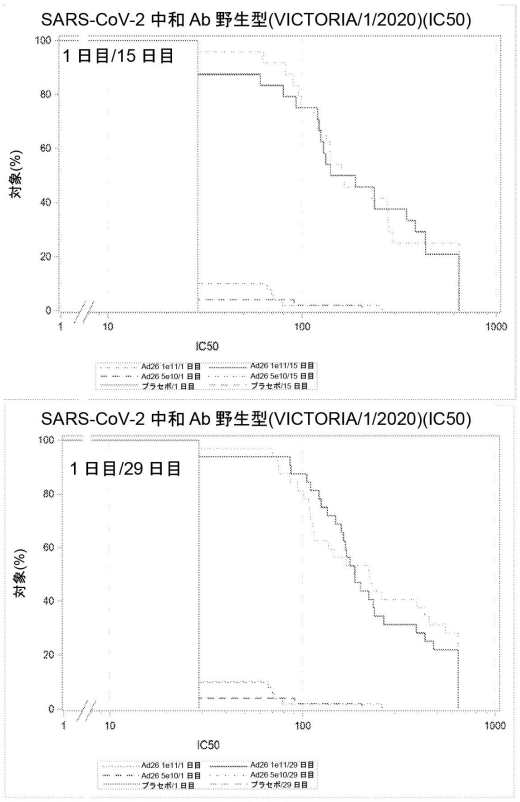


図 107

【図１０８】

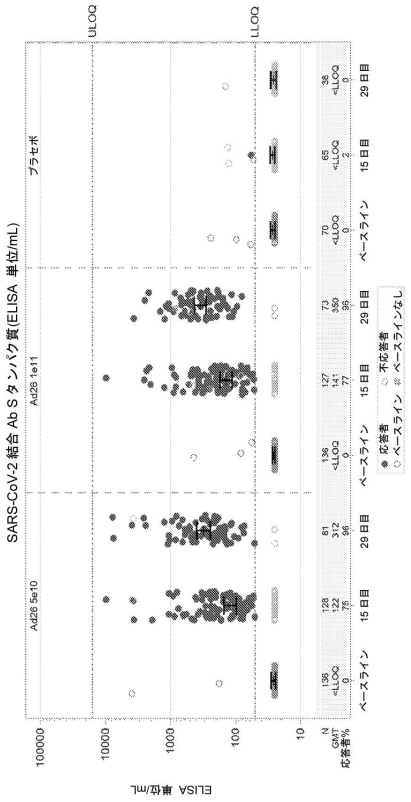


図 108

【図１０９－１】

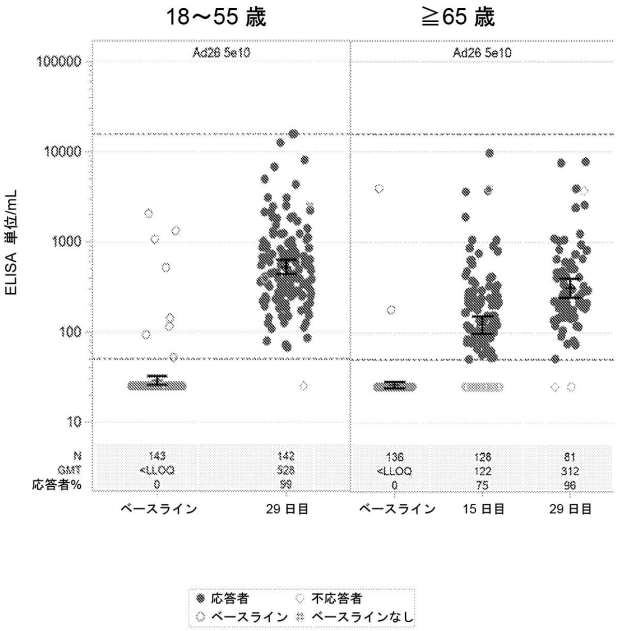


図 109

【図１０９－２】

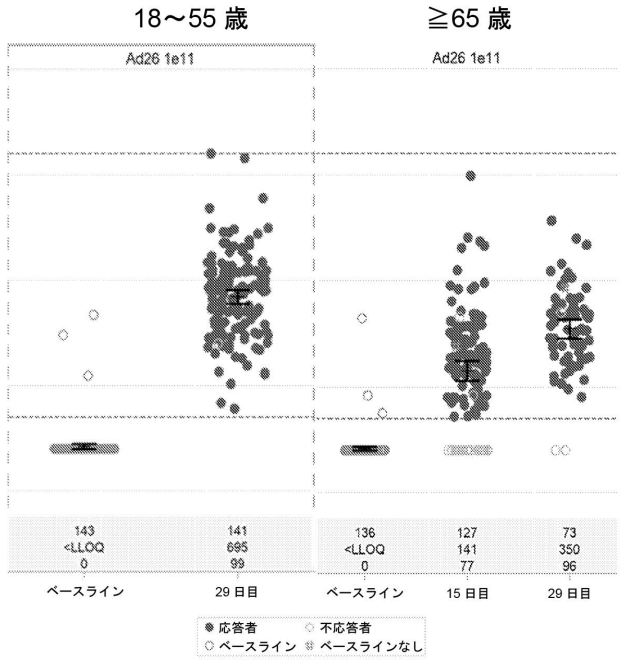


図 109-続き

【図１１０】

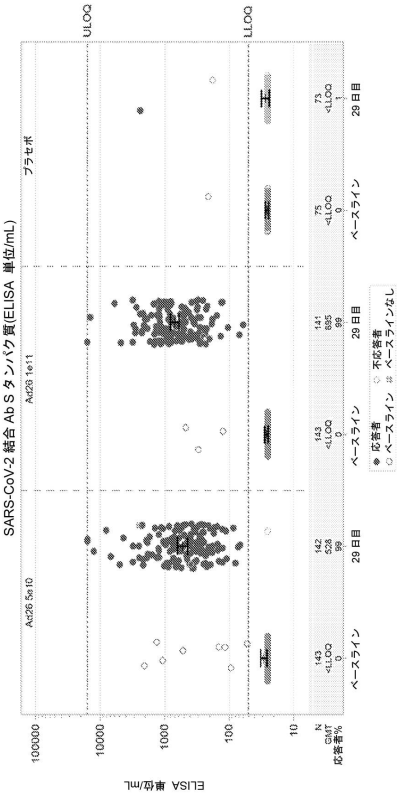


図 110

【図１１１－１】

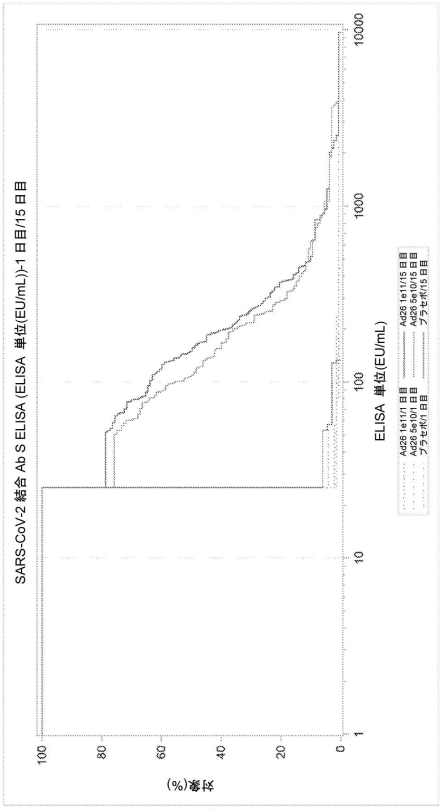


図 111

【図１１１－２】

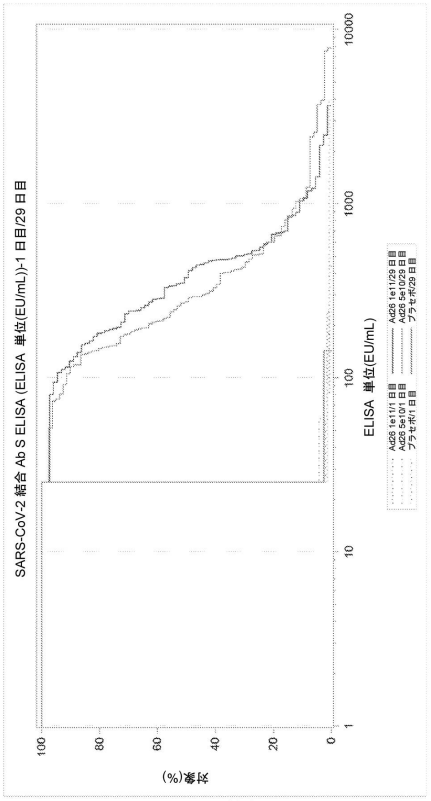
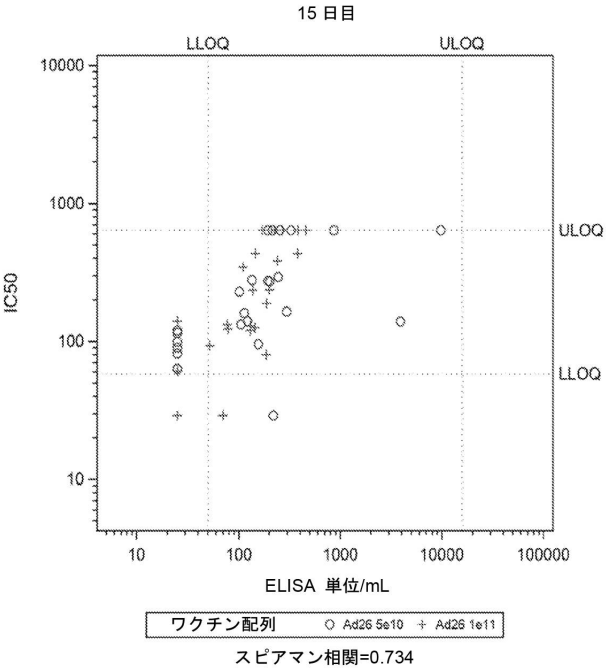


図 111-続き

【図１１２－１】



スピアマン相関=0.734

図 112

【図１１２－２】

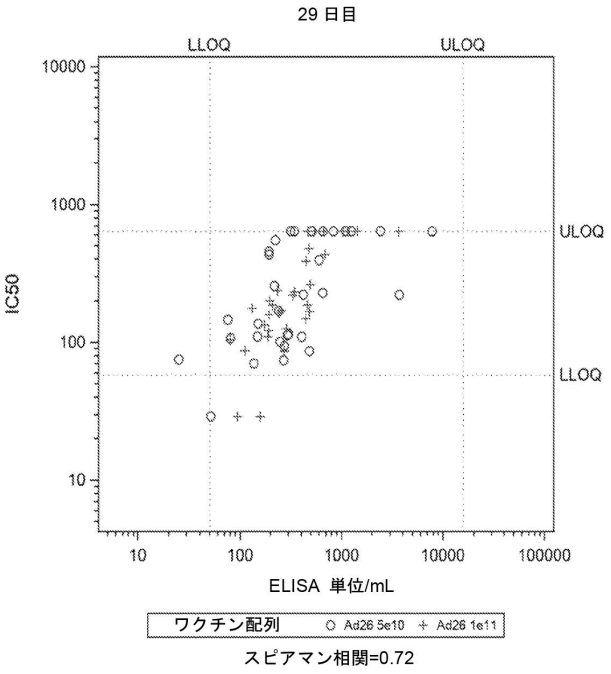


図 112-続き

【図１１３－１】

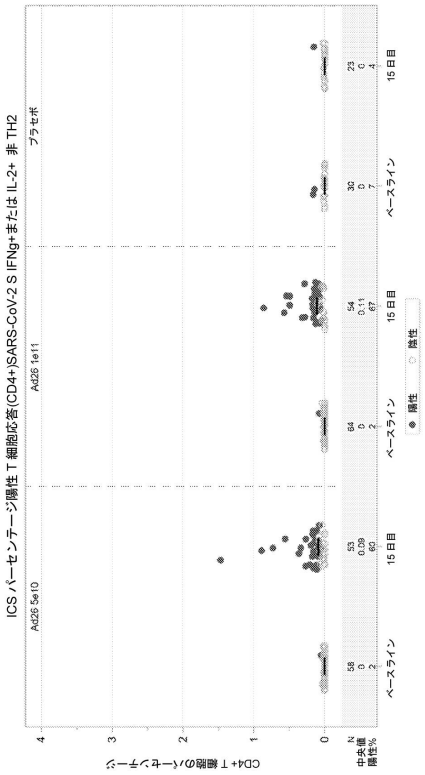


図 113

【図１１３－２】

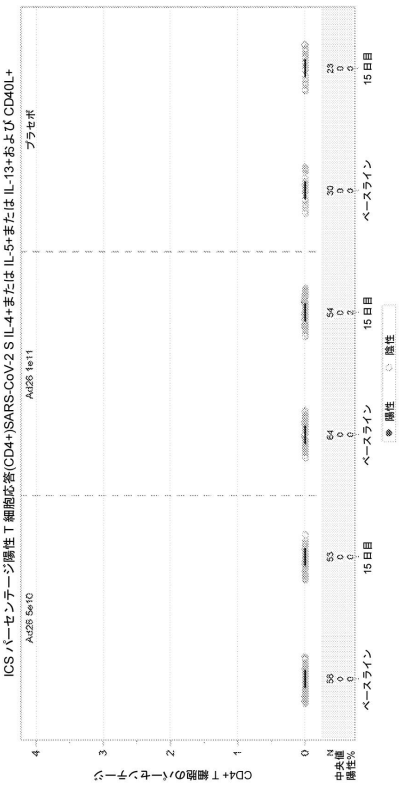


図 113-続き

【図１１４－１】

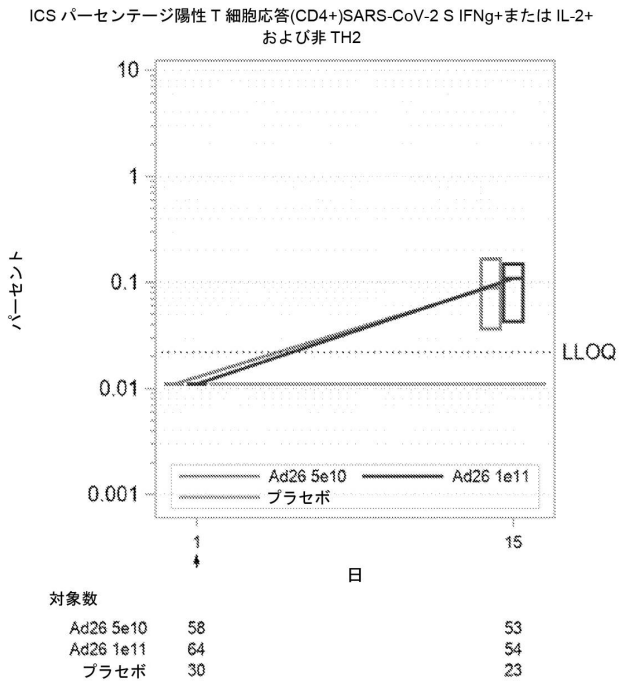


図 114

【図１１４－２】

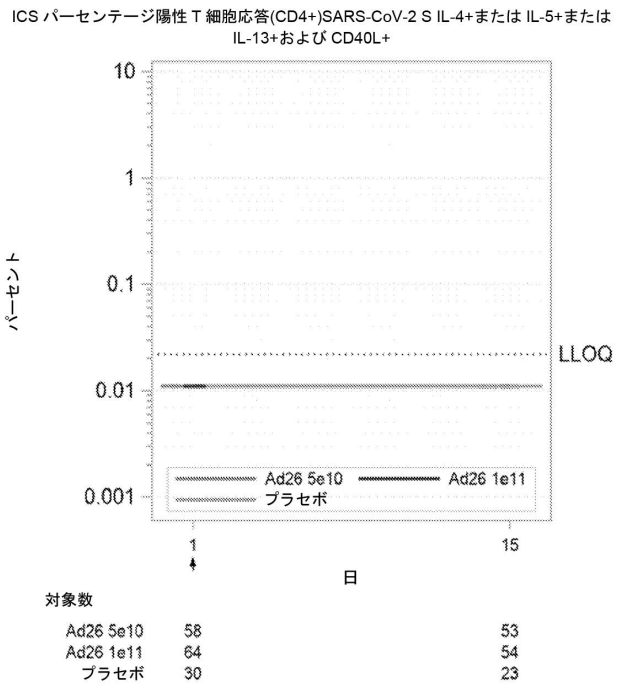


図 114-続き

【図１１５】

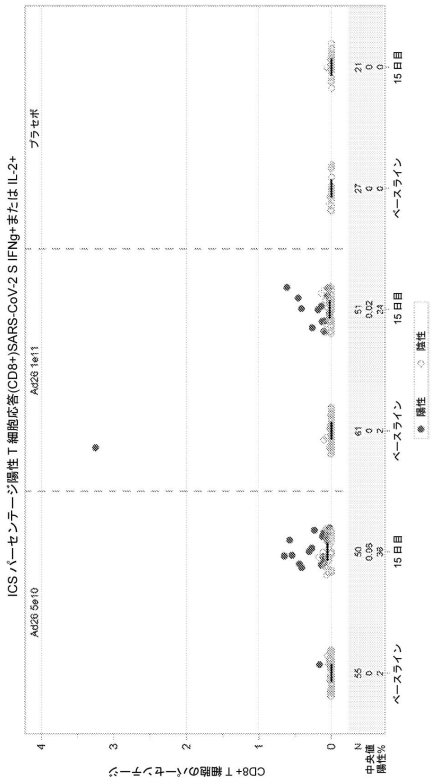


図 115

【図１１６】

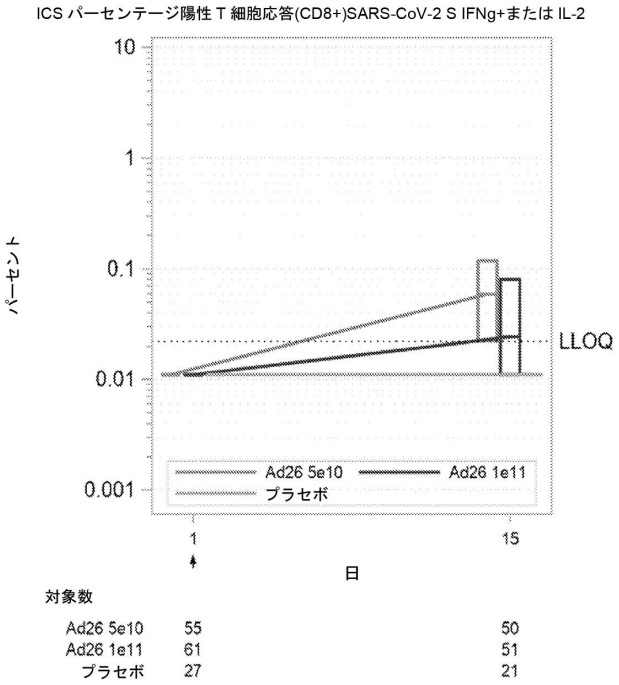


図 116

【図１１７－１】

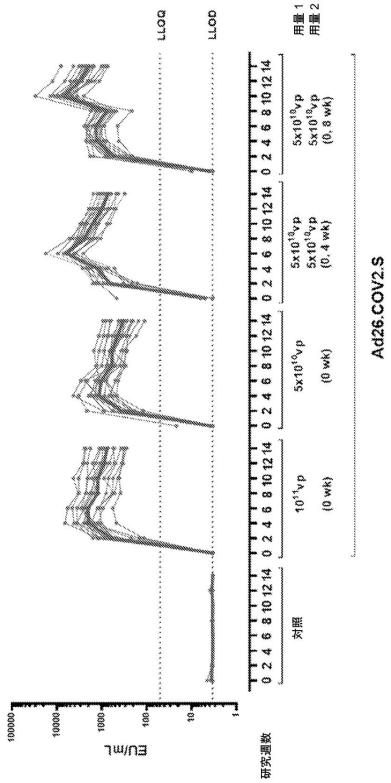


図 117A

【図１１７－２】

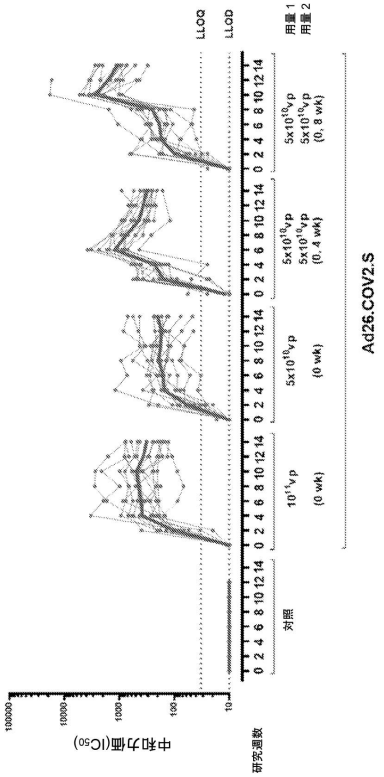


図 117B

【図１１７－３】

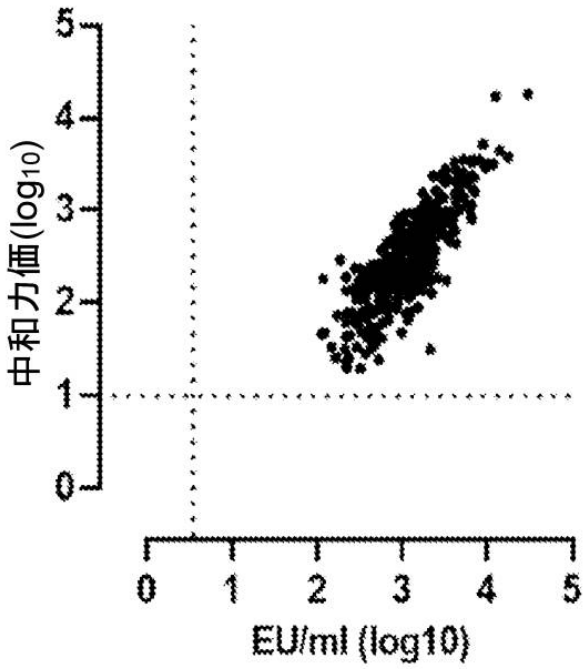


図 117C

【図１１８－１】

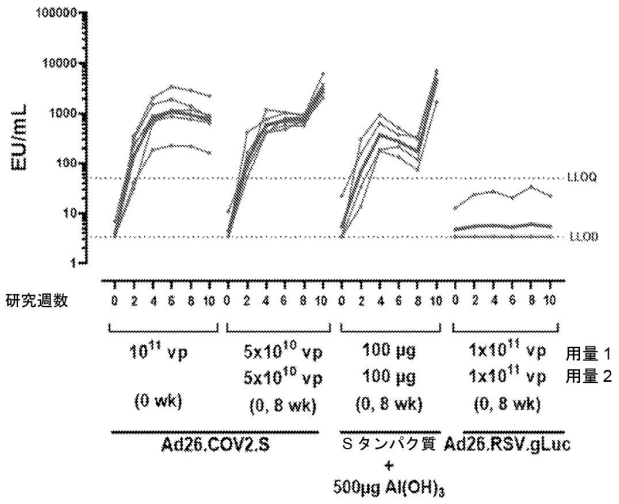


図 118A

【図１１８－２】

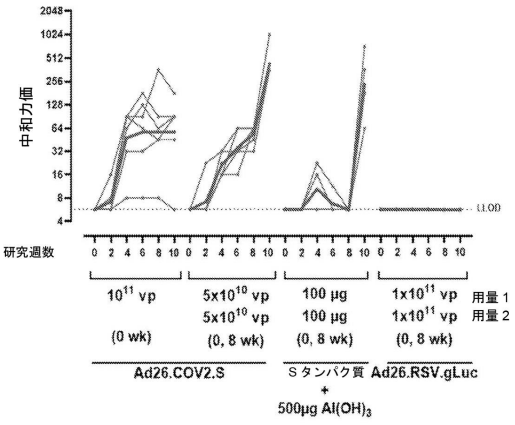


図 118B

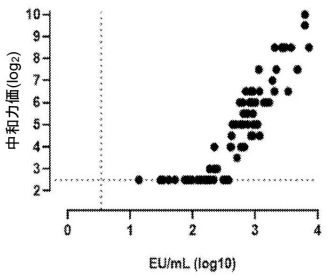


図 118C

【図１１９－１】

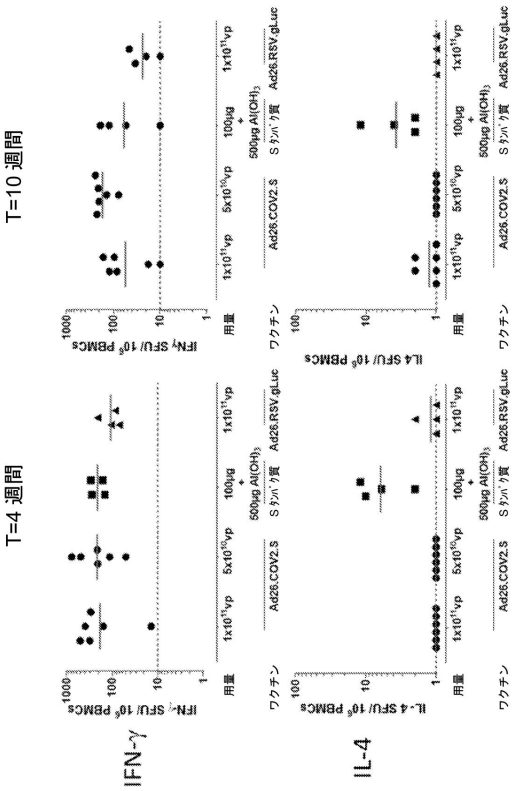


図 119A

【図１１９－２】

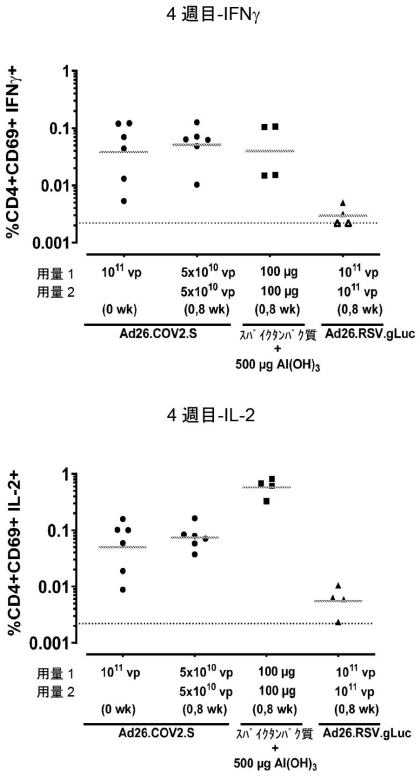


図 119B

【図１１９－３】

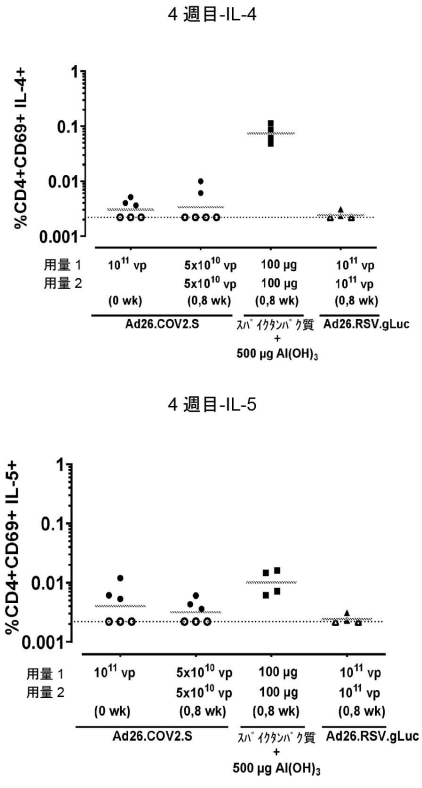


図 119B-続き

【図１１９－４】

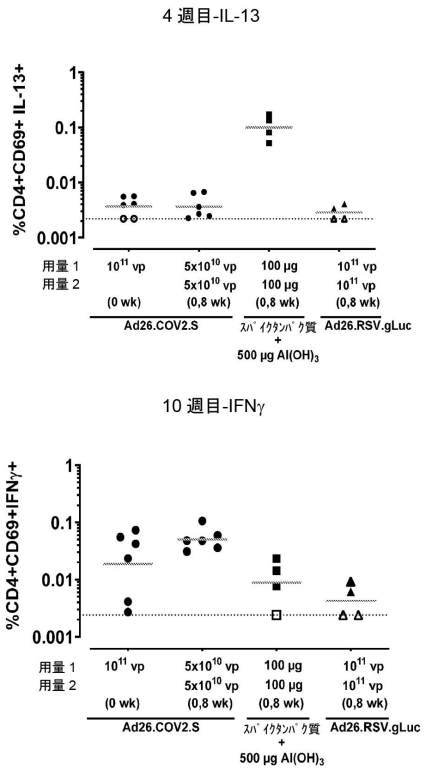
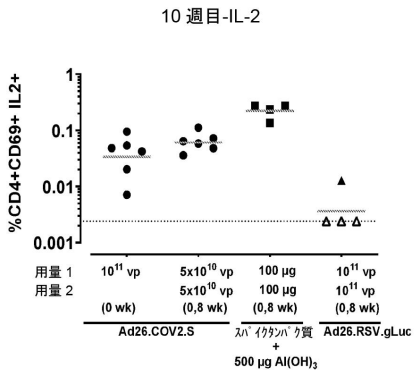


図 119B-続き

【図１１９－５】



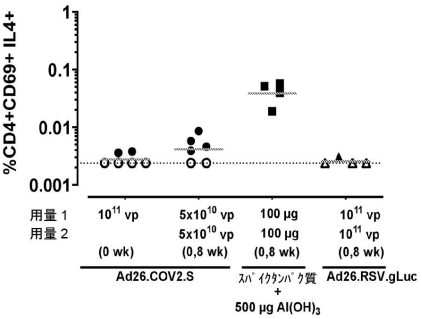
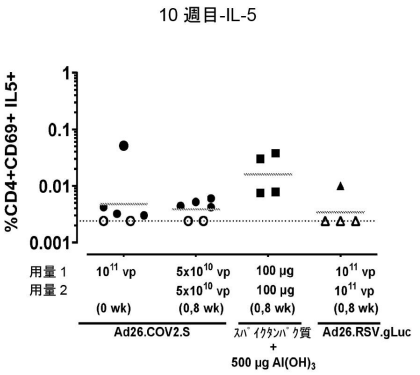


図 119B-続き

【図１１９－６】



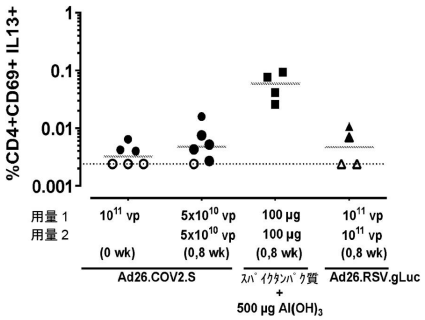


図 119B-続き

【図１１９－７】

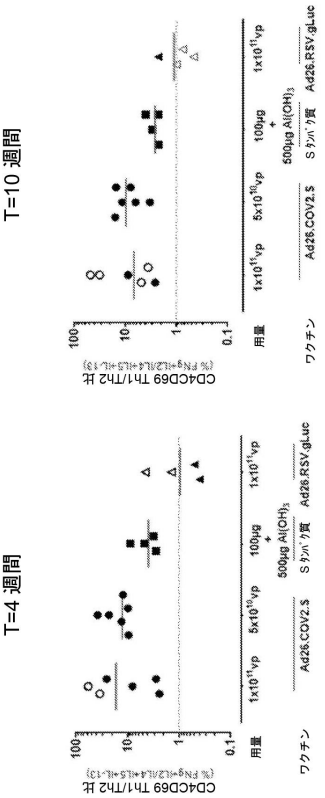
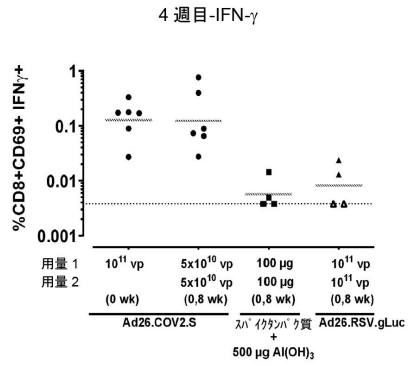


図 119C

【図１２０－１】



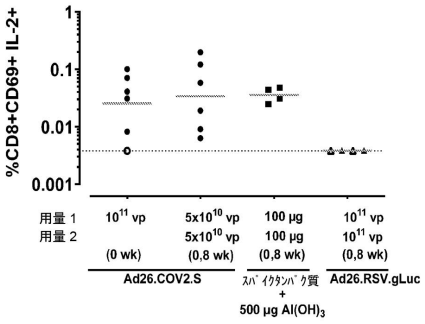
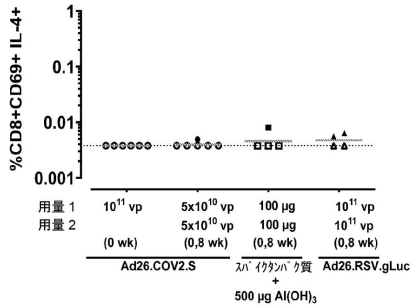


図 120

【図１２０－２】

4 週目-IL-4



4 週目-IL-5

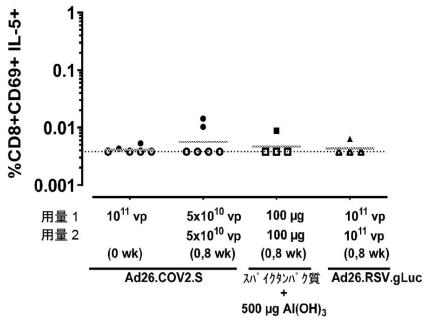
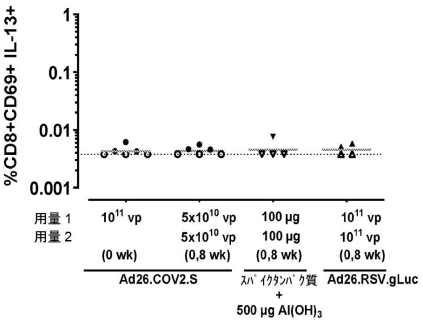


図 120-続き

【図１２０－３】

4 週目-IL-13



10 週目-IFNγ

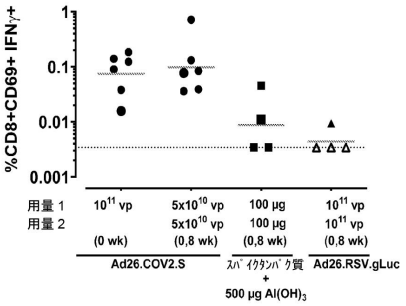
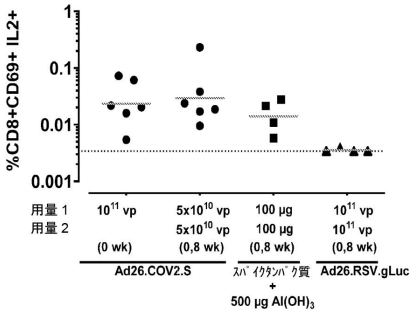


図 120-続き

【図１２０－４】

10 週目-IL-2



10 週目-IL-4

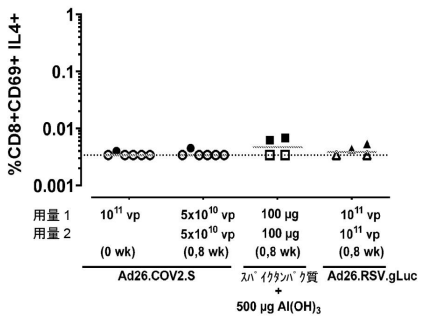
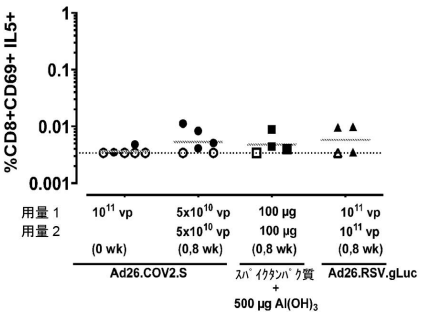


図 120-続き

【図１２０－５】

10 週目-IL-5



10 週目-IL-13

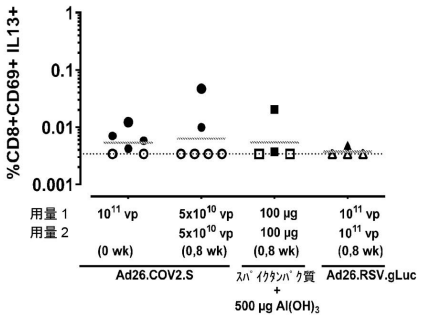


図 120-続き

【図１２１－１】

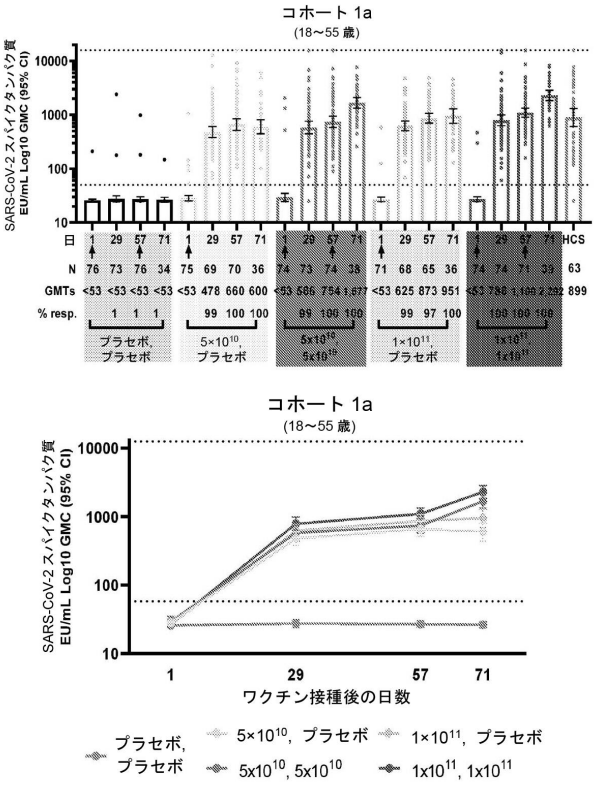


図 121A

【図１２１－２】

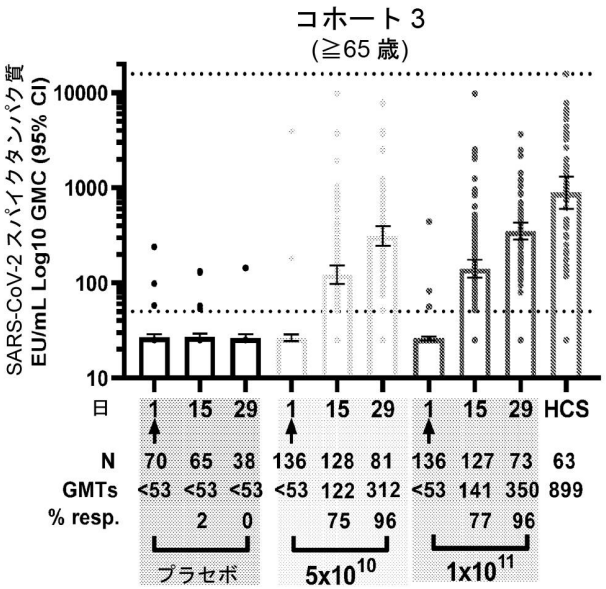


図 121B

【図１２１－３】

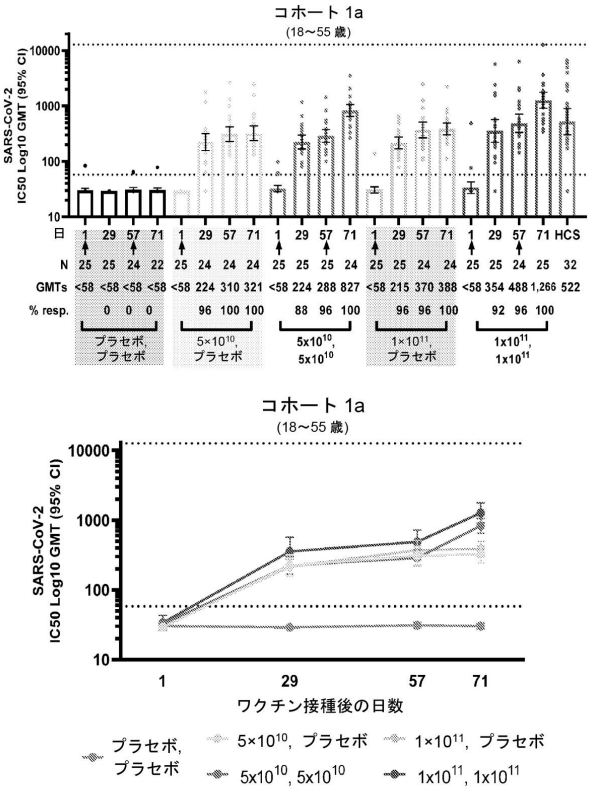


図 121C

【図１２１－４】

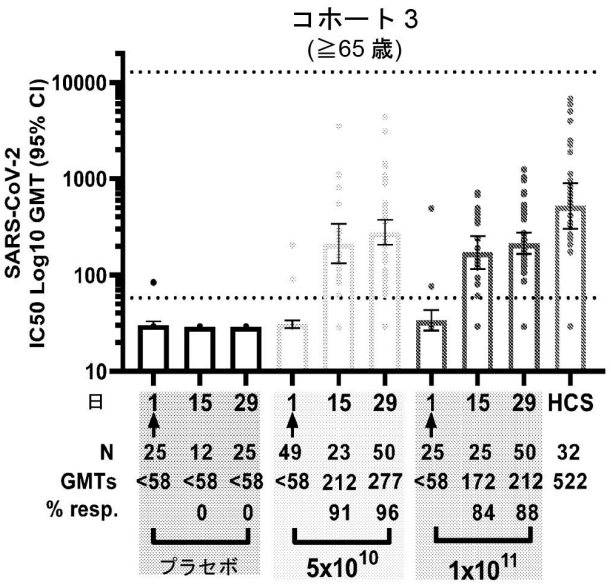


図 121D

【図１２２－１】

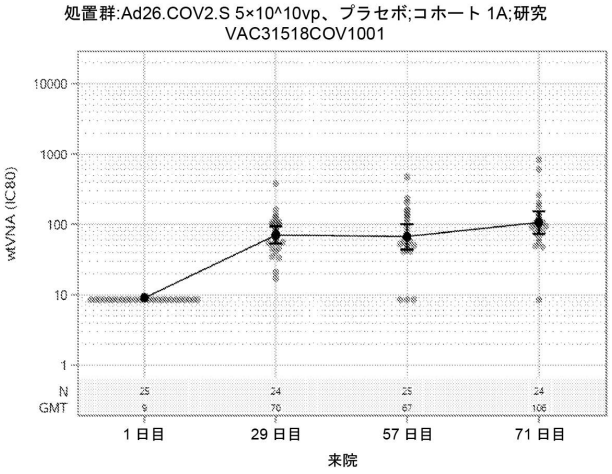


図 122A

【図１２２－２】

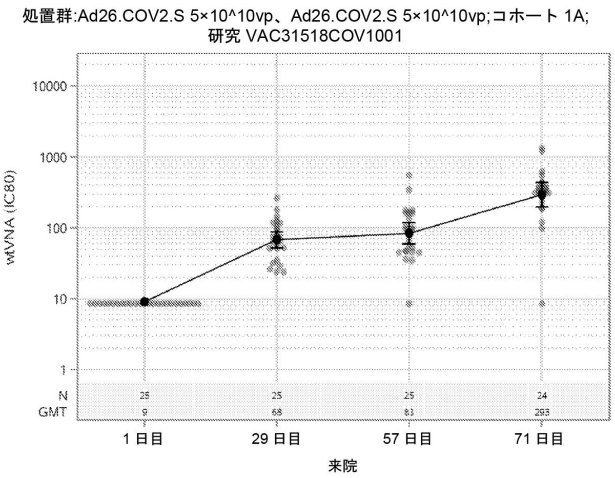


図 122B

【図１２２－３】

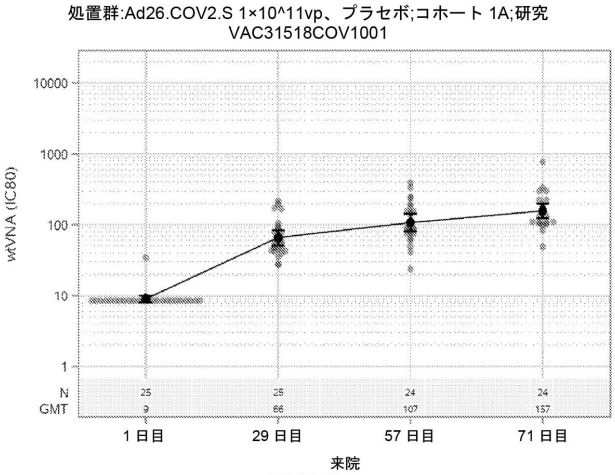


図 122C

【図１２２－４】

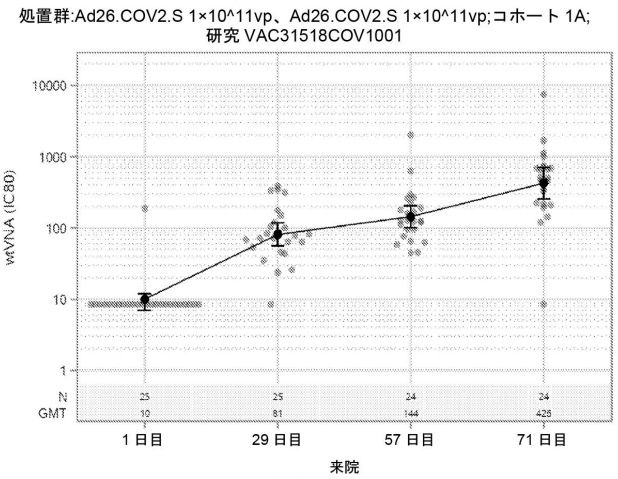


図 122D

【図１２２－５】

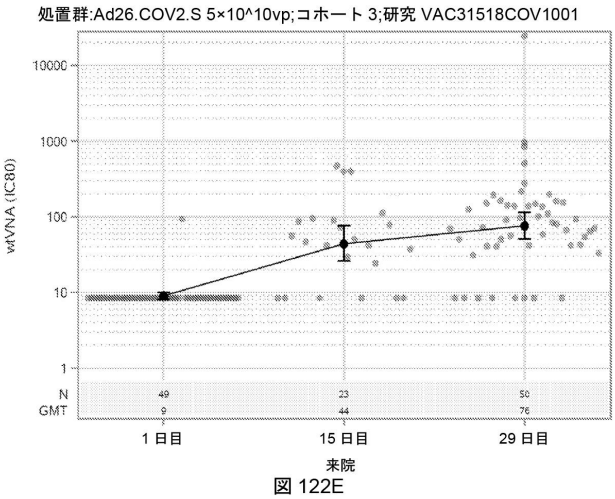


図 122E

【図１２２－６】

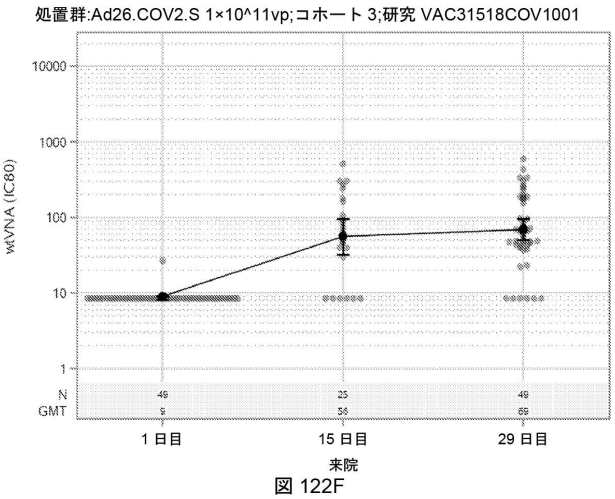


図 122F

【図１２３】

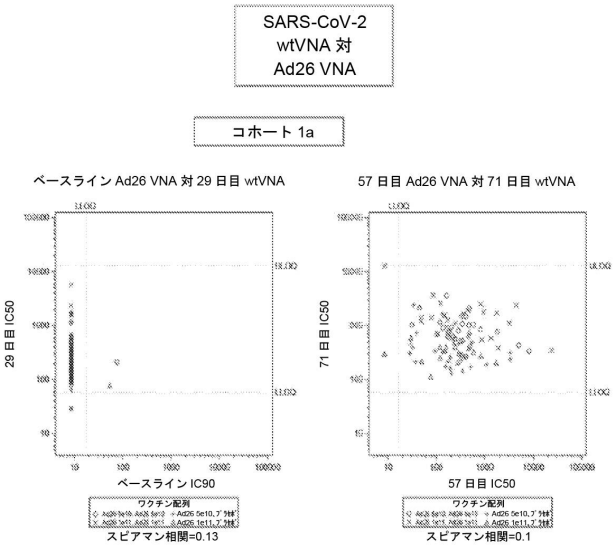


図 123

【図１２４－１】

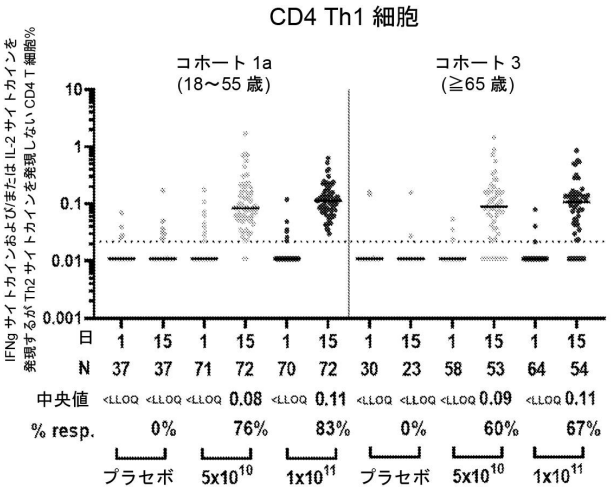


図 124A

【図１２４－２】

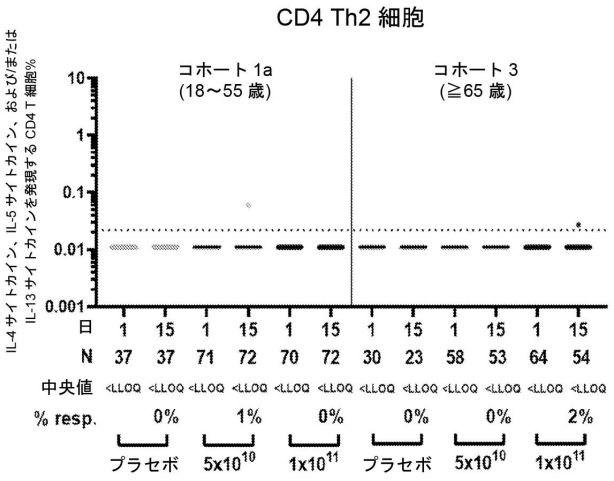


図 124B

【図１２４－３】

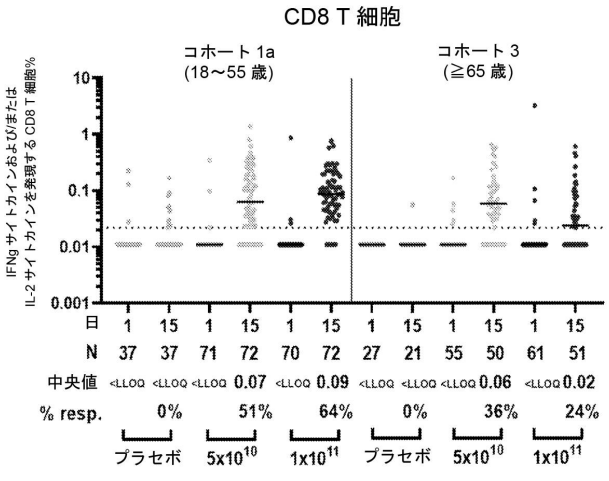


図 124C

【図１２５】

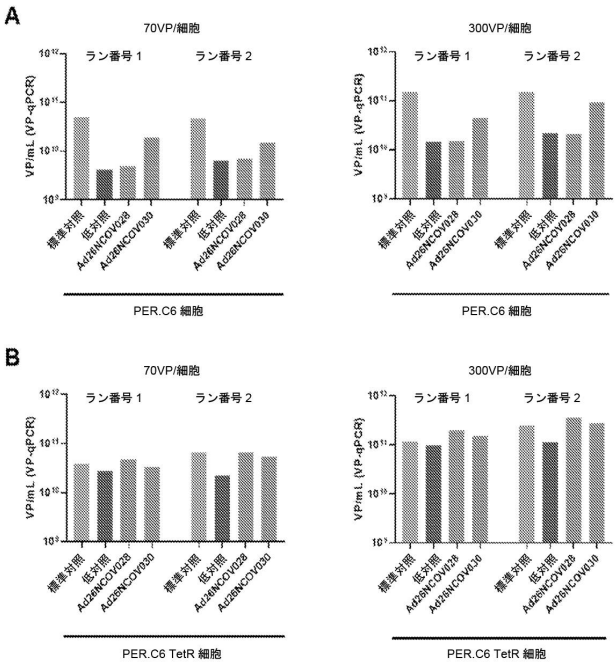


図 125A～125B

【図１２６－１】

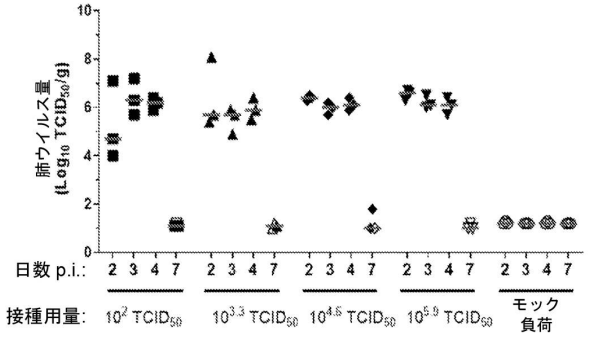


図 126A

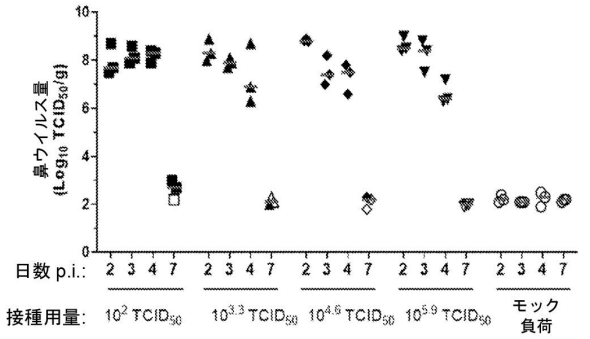


図 126B

【図１２６－２】

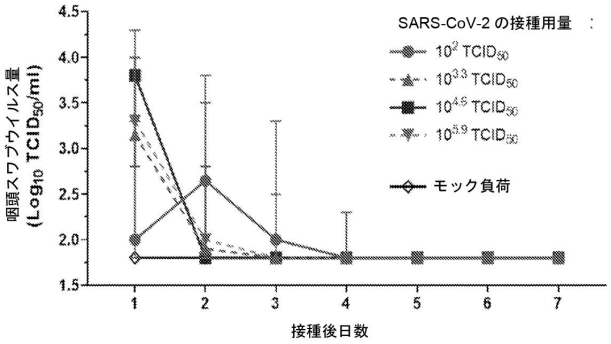


図 126C

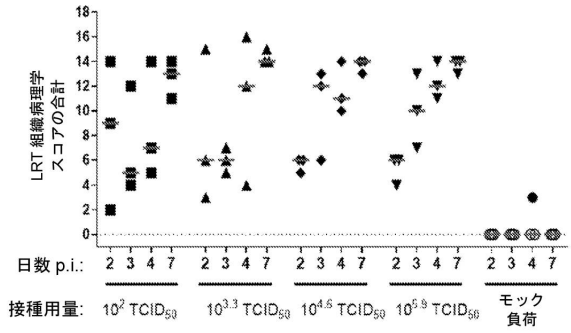


図 126D

【図１２６－３】

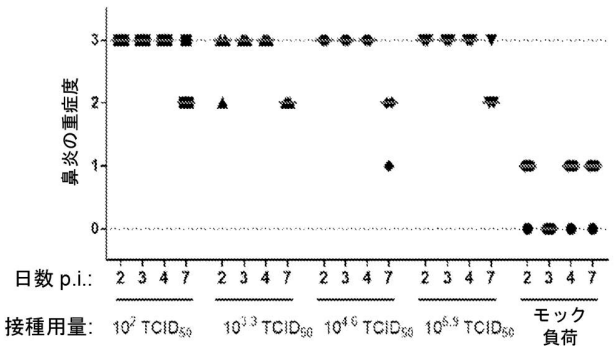


図 126E

【図１２７－１】

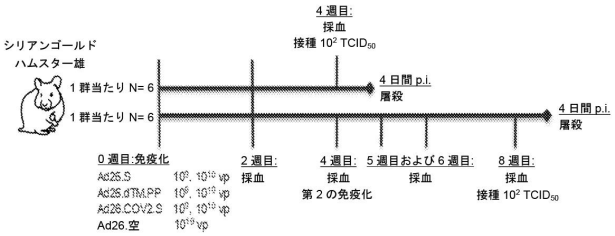


図 127A

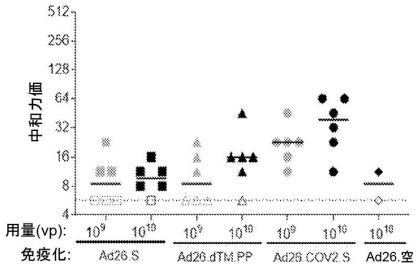


図 127B

【図１２７－２】

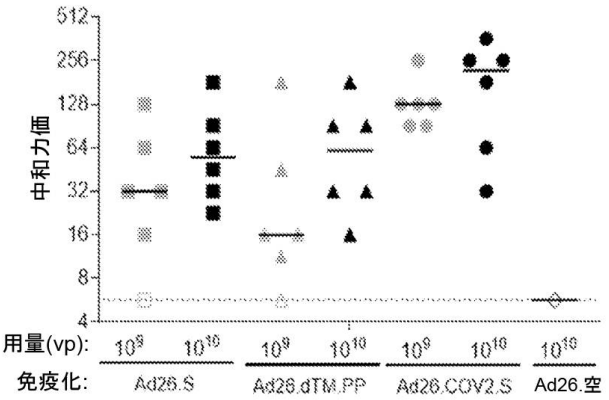


図 127C

【図１２８－１】

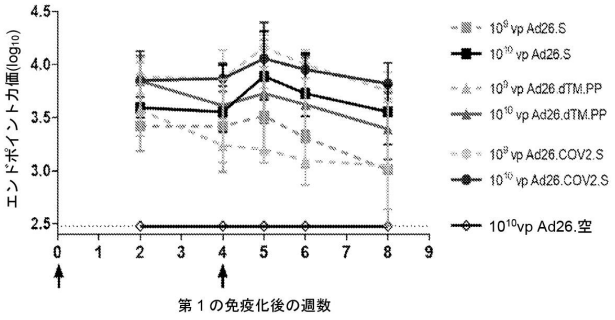


図 128A

【図１２８－２】

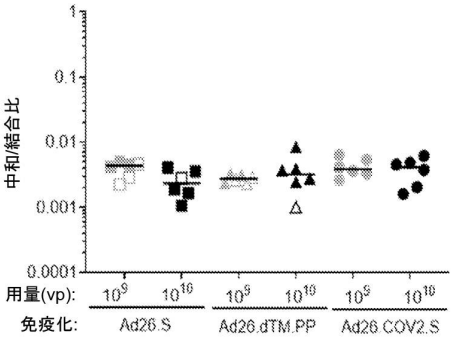


図 128B

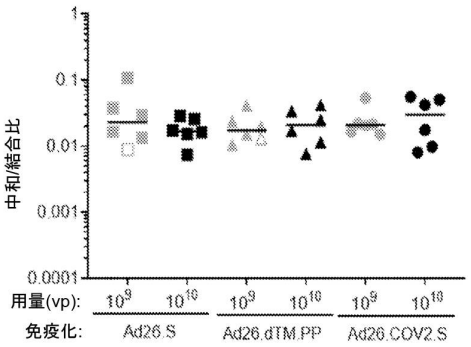


図 128C

【図１２９－１】

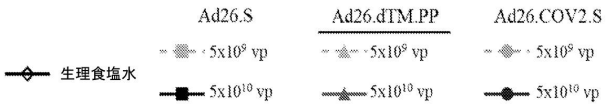


図 129A

【図１２９－２】

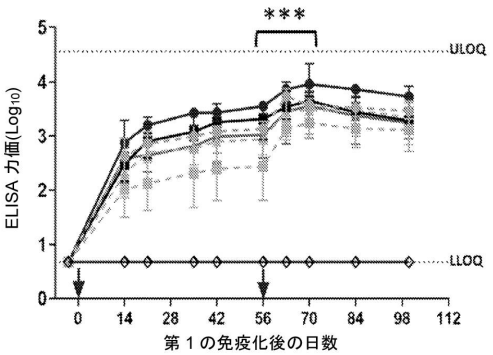


図 129B

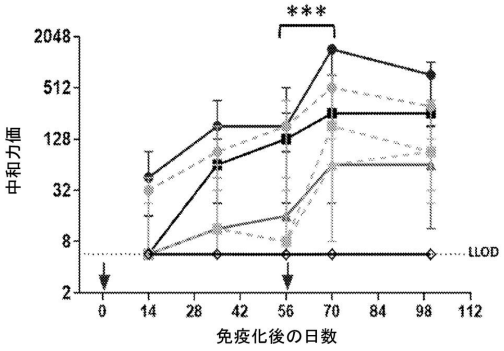


図 129C

【図１３０－１】

a) 1 用量肺 VL

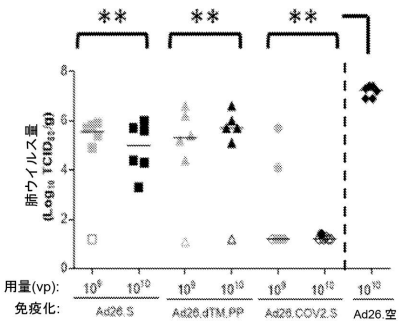


図 130A

b) 2 用量肺 VL

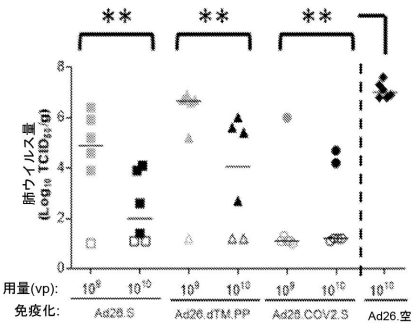


図 130B

【図１３０－２】

c) 1 用量鼻 VL)

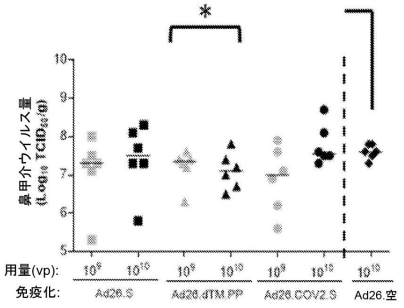


図 130C

d) 2 用量鼻 VL

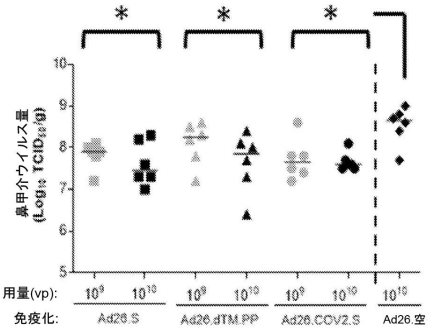


図 130D

【図１３０－３】

e) 1 用量咽頭 VL

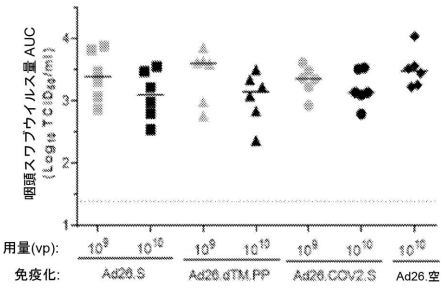


図 130E

f) 2 用量咽頭 VL

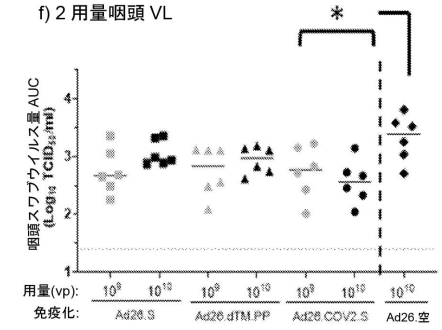


図 130F

【図１３１－１】

a) 1 用量、肺 IHC

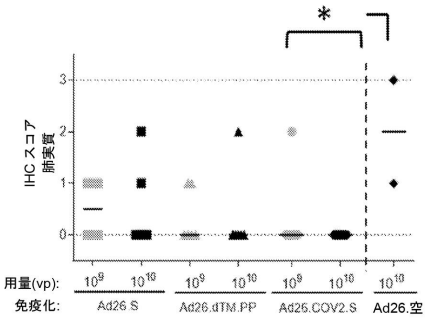


図 131A

b) 2 用量、肺 IHC

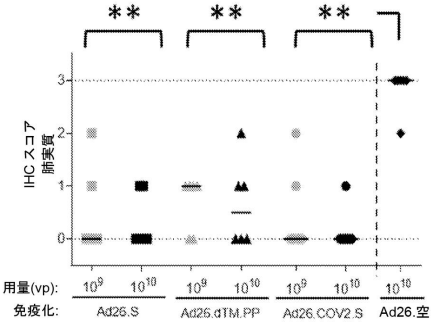


図 131B

【図１３１－２】

c) 1 用量、肺 LRT 組織病理学

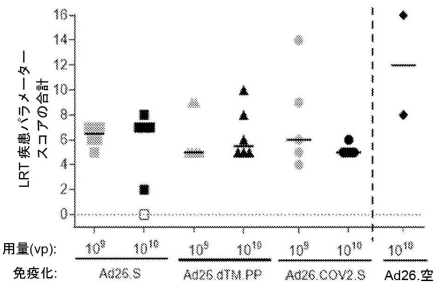


図 131C

d) 2 用量、肺 LRT 組織病理学

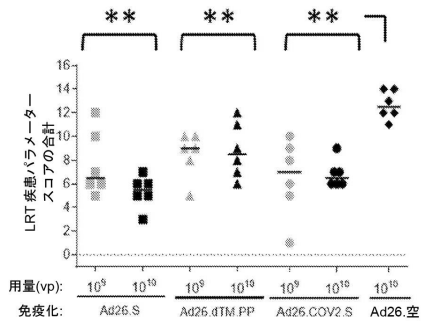


図 131D

【図１３２－１】

a) 1 用量、鼻 IHC

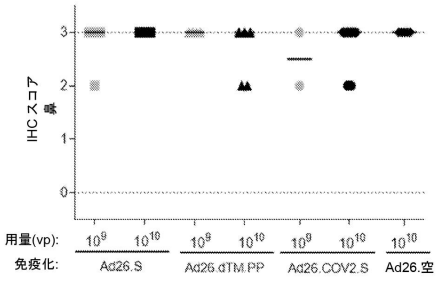


図 132A

b) 2 用量、鼻 IHC

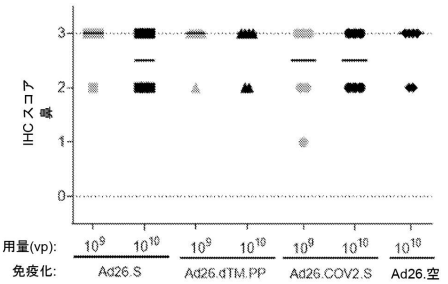


図 132B

【図１３２－２】

c) 1 用量、鼻組織病理学的スコア化

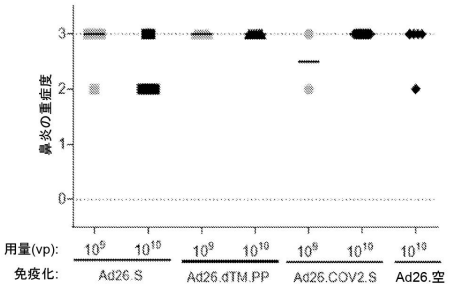


図 132C

d) 2 用量、鼻組織病理学的スコア化

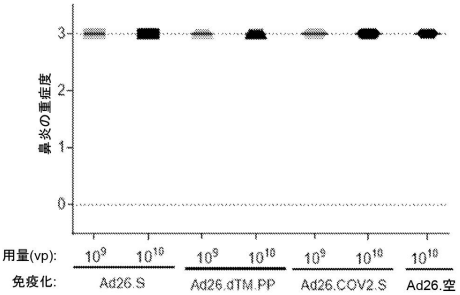


図 132D

【図１３３－１】

a) 結合性抗体

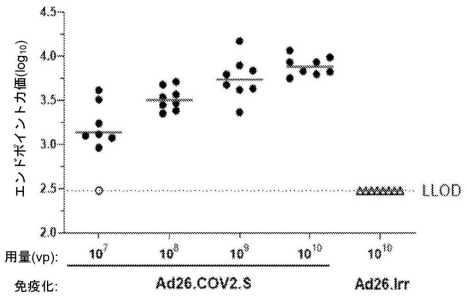


図 133A

b) nAbs

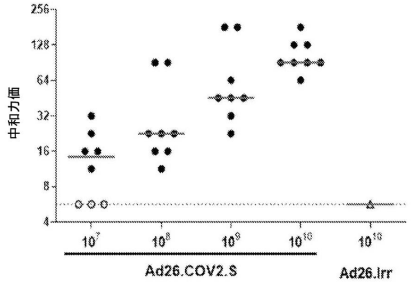


図 133B

【図１３３－２】

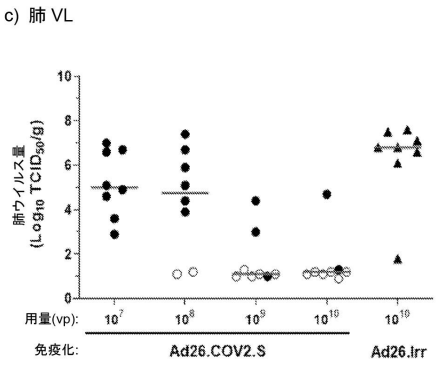


図 133C

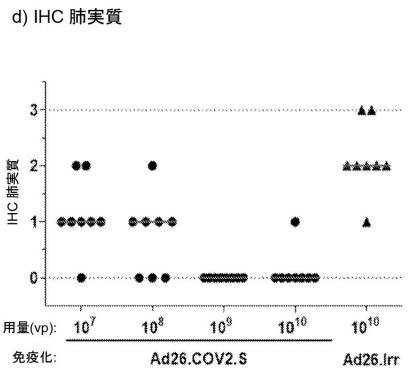


図 133D

【図１３４】

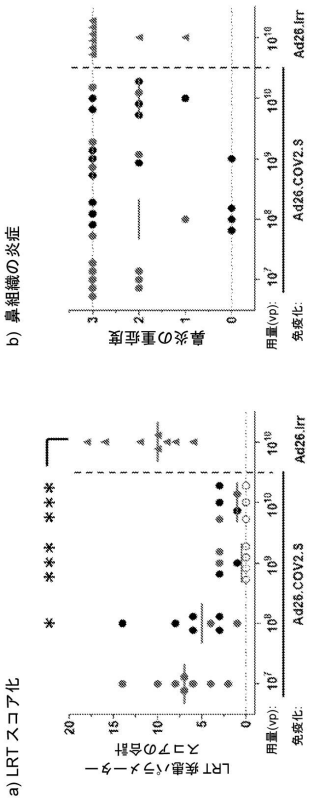


図 134

【図１３５－１】

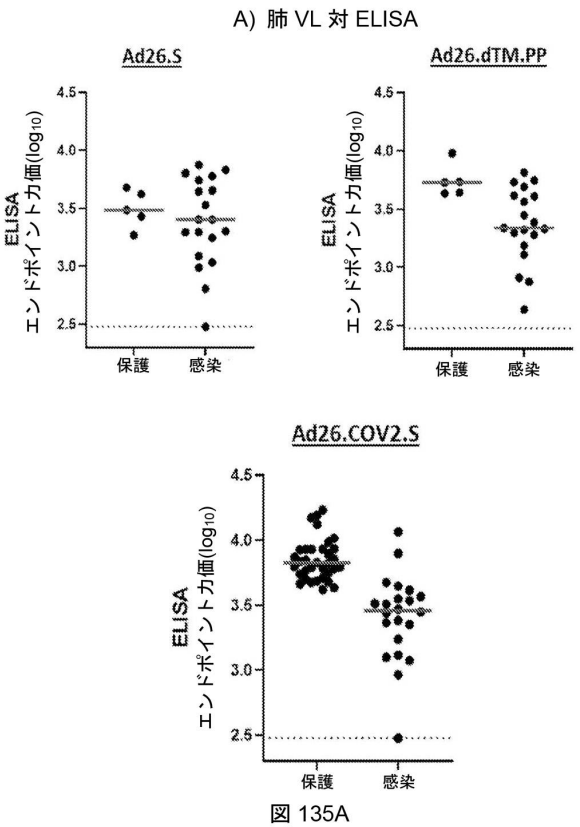


図 135A

【図１３５－２】

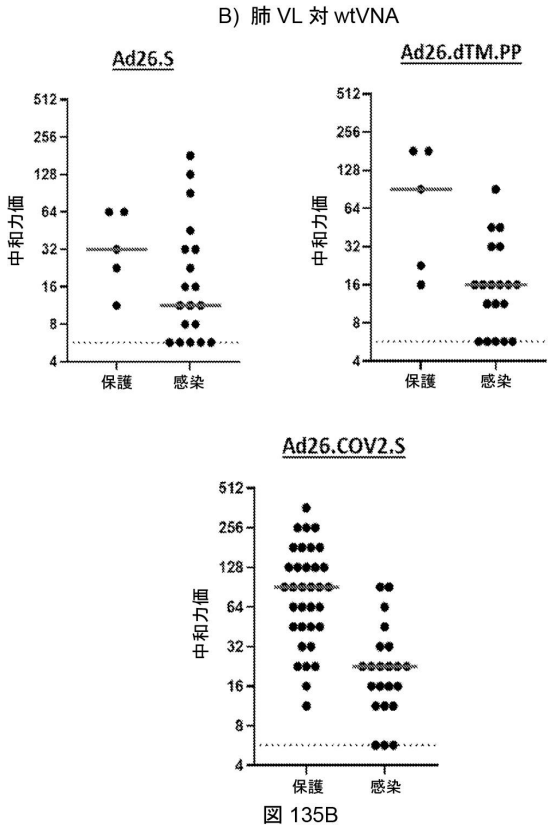


図 135B

【図１３５－３】

c) Ad26.COV2.S 免疫化ハムスターにおけるロジスティック回帰
肺 VL 対 wtVNA および ELISA

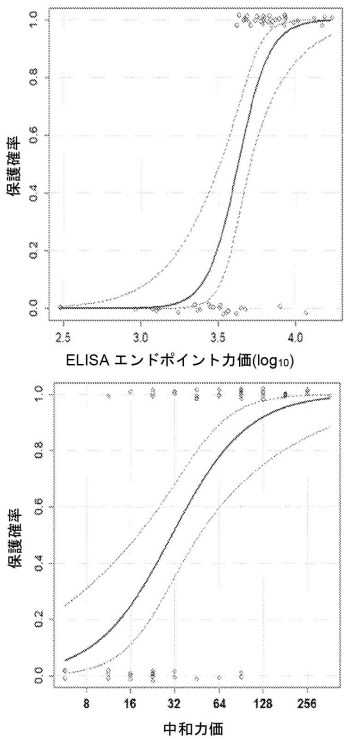


図 135C

【図１３６】

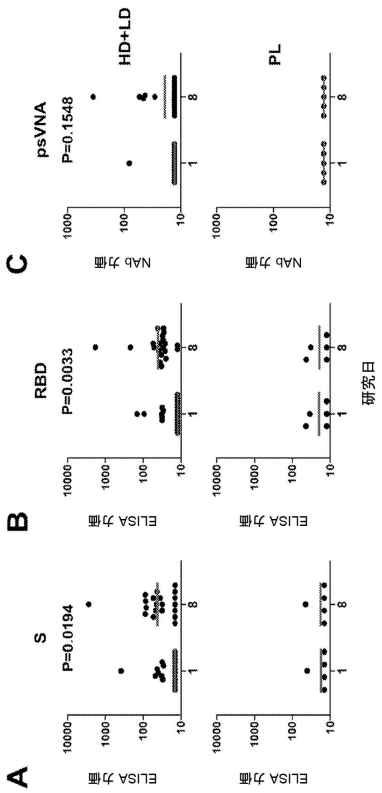


図 136A～136C

【図１３７－１】

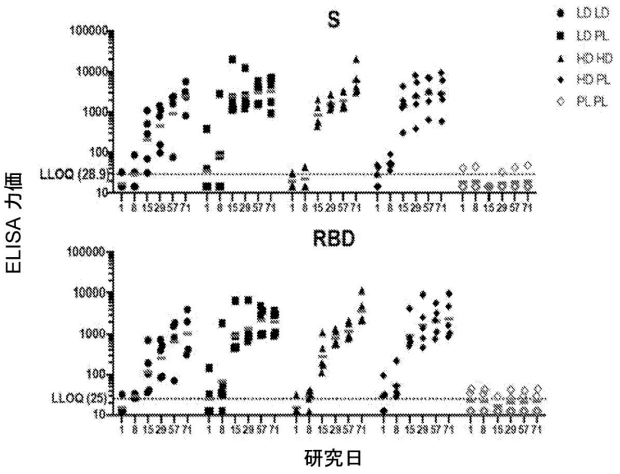


図 137A

【図１３７－２】

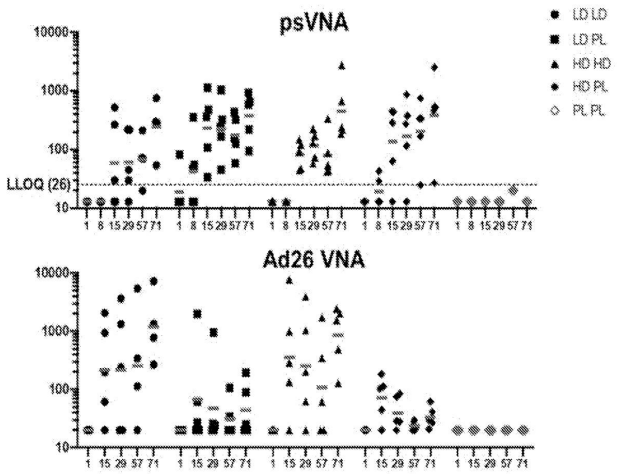


図 137B

【図１３８】

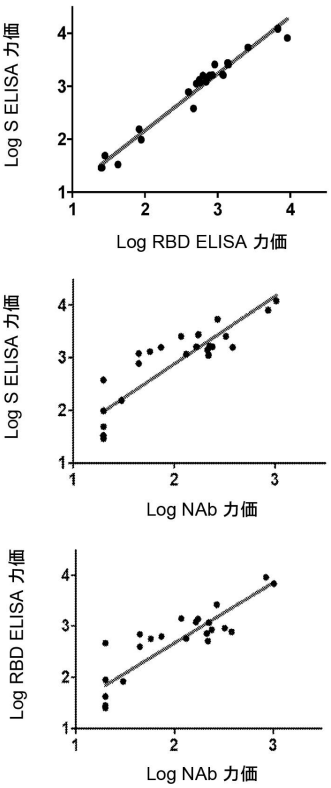


図 138

【図１３９－１】

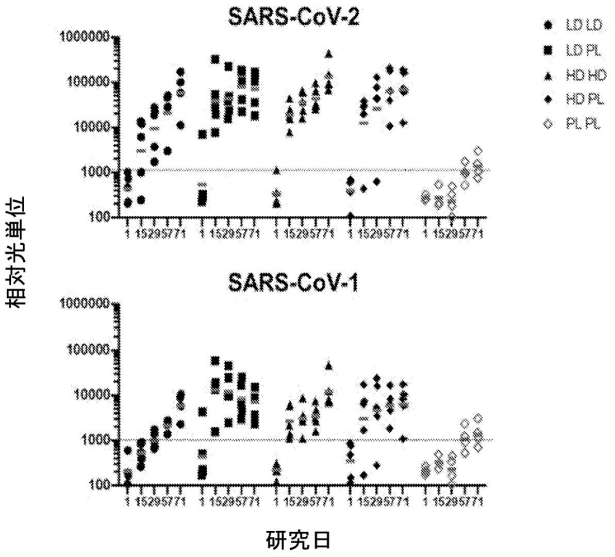


図 139A

【図１３９－２】

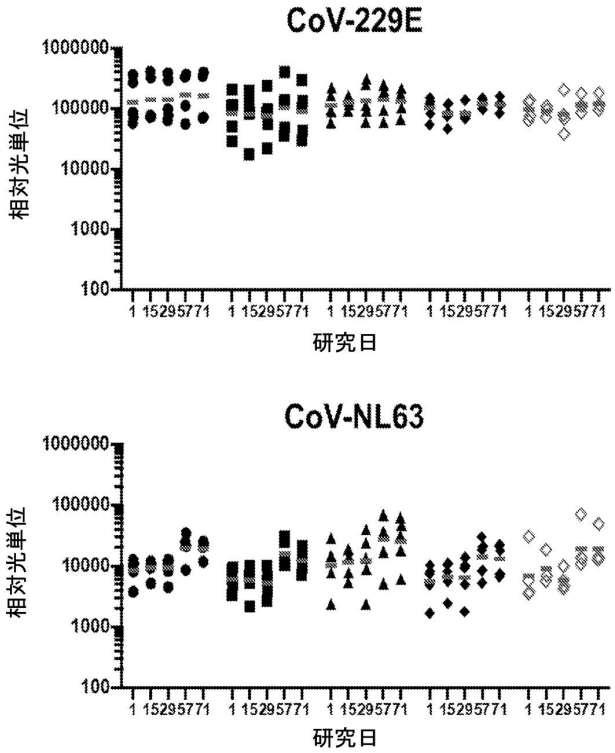


図 139B

【図１３９－３】

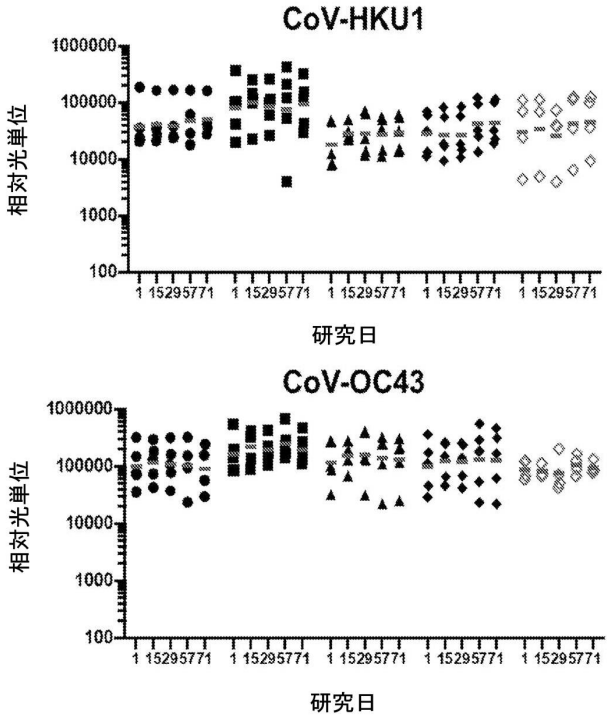


図 139B-続き

【図１４０】

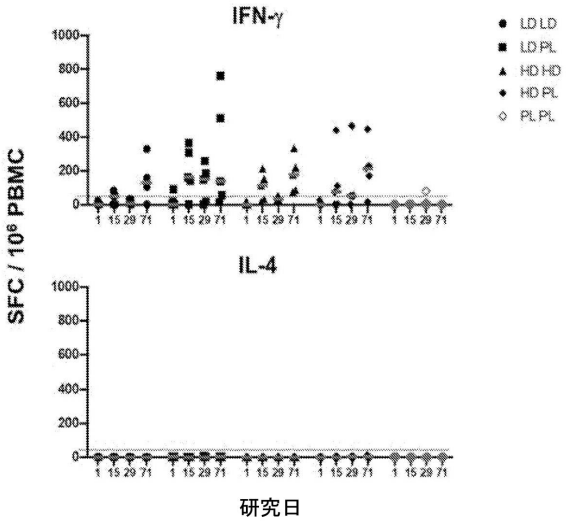


図 140A

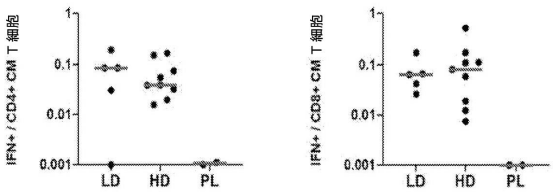


図 140B

【図１４１】

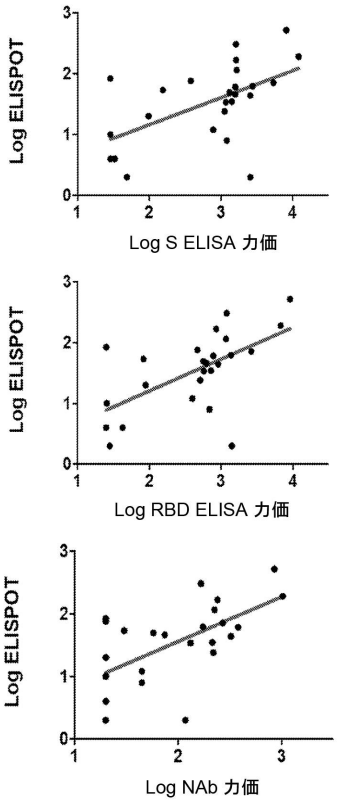


図 141

【図１４２】

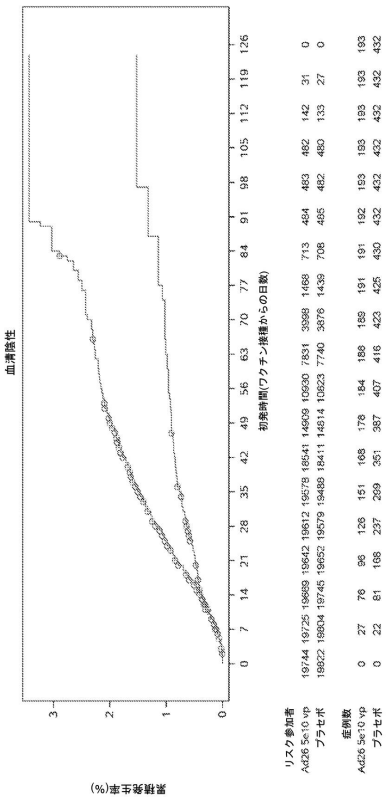


図 142

【図１４３】

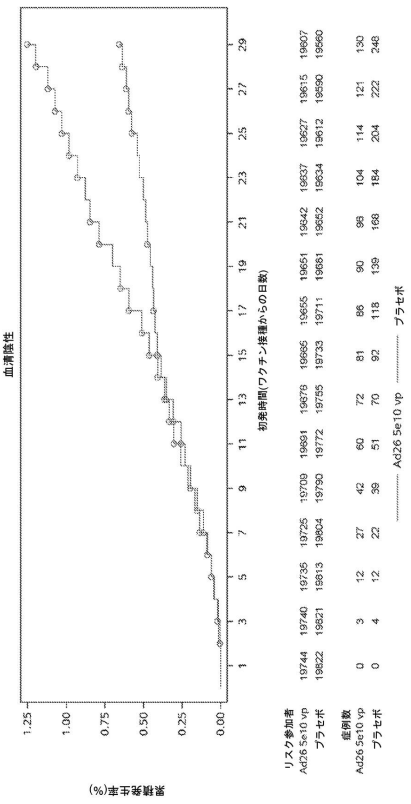


図 143

【図１４４】

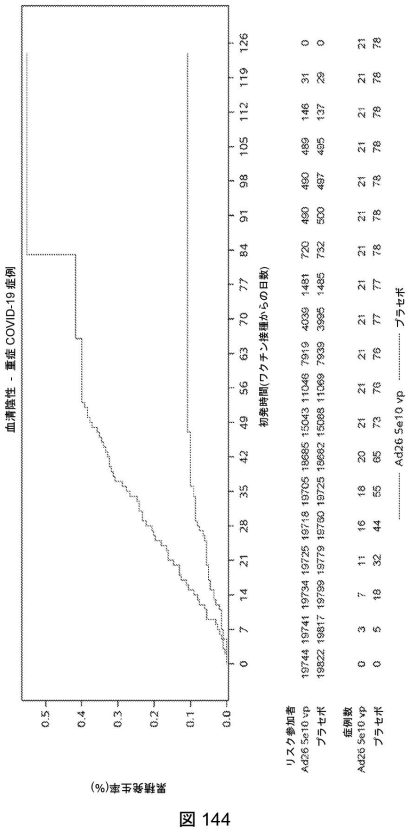


図 144

【図１４５】

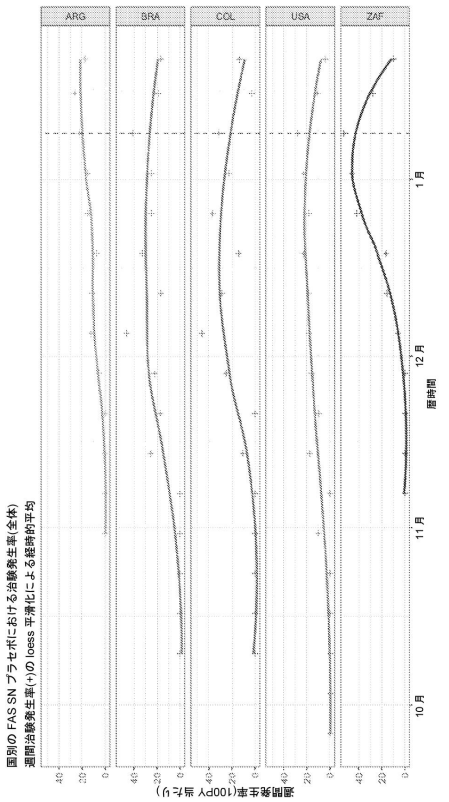


図 145

【配列表】

2023512519000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/15946

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - A61K 39/395, C07K 16/10, C07H 21/00, A61P 31/14 (2021.01)
CPC - A61P 31/12, A61P 31/14, A61K 2039/505, C07K 2317/21

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)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2018/081318 A1 (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES et al.) 03 May 2018 (03.05.2018); especially abstract; pg 2, ln 6-19; pg 3, ln 9-33; pg 6, ln 22-23; pg 12, ln 24; pg 13, ln 1-9; pg 20, ln 3-9; pg 20, ln 35 - pg 21, ln 2; pg 24, ln 24-30; pg 57, ln 12-29; pg 58, ln 13-27; pg 64, ln 29-31	1, 4-6, 13, 15-18, 32-33 --- 2-3, 8, 14
Y — A	CHAN et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. Emerging Microbes & Infections. 28 January 2020 (28.01.2020), Vol. 9, No. 1, pg 221-236; especially pg 223, col 1, para 3; pg 224, col 2, para 1; Figure 2	1, 4-6, 13, 15-18, 32-33 -- 2-3, 8, 14
A	US 2006/0121580 A1 (TER MEULEN et al.) 8 June 2006 (08.06.2006); especially para [0160]; SEQ ID NO: 462	2, 3/2, 8
A	US 2020/0030432 A1 (MODERNATX, INC.) 30 January 2020 (30.01.2020); especially para [0443]; SEQ ID NO: 19	2, 3/2, 8
A	US 2007/0270361 A1 (LU et al.) 22 November 2007 (22.11.2007); especially para [0009]; SEQ ID NO: 1	8
A	US 2005/0112554 A1 (ZHAO et al.) 26 May 2005 (26.05.2005); especially para [0029]; SEQ ID NO: 5	3/1, 14
A	US 2005/0095582 A1 (GILLIM-ROSS et al.) 5 May 2005 (05.05.2005); especially para [0034]; SEQ ID NO: 6	3/1, 14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"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
2 June 2021 (02.06.2021)	JUN 30 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Lee Young Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/15946

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GenBank MN975262.1 "Wuhan seafood market pneumonia virus isolate 2019-nCoV_HKU-SZ-005b_2020, complete genome" (24 January 2020) [retrieved on 02 June 2021, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1800242661?sat=48&satkey=350763] whole doc.	1-6, 8, 13-18, 32-33
A	GenBank QHN73810.1 "surface glycoprotein [Wuhan seafood market pneumonia virus]" (24 January 2020) [retrieved on 02 June 2021, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/QHN73810.1/] whole doc.	1-6, 8, 13-18, 32-33

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/15946

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. ☒ forming part of the international application as filed:

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

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

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/15946

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.:
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:

3. ☒ Claims Nos.: 7, 9-12, 19-31
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:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Continued on Supplemental Page

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 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)) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/15946

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Groups I+: Claims 1-6, 8, 13-18, drawn to an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence that encodes a 2019-NCOV Spike (S) protein comprising mutations. The composition will be searched to the extent that the mutant spike protein encompasses SEQ ID NO: 211 (nucleic acid) and 205 (amino acid). It is believed that claims 1-3, 13-14, 18 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NOs: 211 and 205. Additional mutant spike protein(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected mutant spike protein(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a mutant spike protein encompassing SEQ ID NO: 56 (amino acid) and 148 (nucleic acid) (Claims 1, 6, 8, 13, 17, 18).

Group II: Claims 32-33, drawn to a method of making a vaccine comprising a recombinant human adenovirus of serotype 26 that comprises nucleic acid encoding a SARS-CoV-2 S protein, and a composition thereof.

The inventions listed as Groups I+ and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Groups I+ include the special technical feature of a mutant spike protein, not required by Group II.
Group II includes the special technical feature of a recombinant human adenovirus of serotype 26, not required by Groups I+.

No technical features are shared between the amino acid sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ and II were considered to share the technical features of including: COVID-19 spike protein, these shared technical features are previously disclosed by WO 2018/081318 A1 to the United States of America, as Represented by the Secretary, Department of Health and Human Services et al. (hereinafter 'HHS') and "Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan" by Chan et al. (hereinafter 'Chan') (Emerging Microbes & Infections 9:1, 221-236) (Published online: 28 January 2020)

HHS discloses (instant claim 1) an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence that encodes a COV Spike (S) protein (abstract - "Coronavirus S ectodomain trimers stabilized in a prefusion conformation, nucleic acid molecules and vectors encoding these proteins, and methods of their use and production are disclosed."; pg 6, ln 22-23 - "This disclosure provides CoV Spike glycoprotein (S) ectodomain trimers that are stabilized in the prefusion conformation and which are shown to elicit a neutralizing immune response in animal models.") comprising the following modifications to the full-length amino acid sequence:
a. stabilizing mutations (pg 20, ln 35 - pg 21, ln 2 - "In some embodiments, the recombinant MERS-CoV S ectodomain trimer stabilized in the prefusion conformation by the one or more proline substitutions (such as V1060P and L1061P substitutions) further comprises an additional proline substitution to stabilize the S ectodomain the prefusion conformation, such as one of: K801P; V802P; T803P; V804P; S919P; A920P; A968P; A969P; I970P; F972P; A973P; T1014P; N1042P; T1043P; F1044P; G1045P; A1046P; I1047P; or A1049P."); and
b. mutations to the furin cleavage site (pg 20, ln 3-9 - "In some embodiments, the recombinant MERS-CoV S ectodomain trimer stabilized in the prefusion conformation comprises protomers of single-chain S ectodomains comprising mutations to the S1/S2 and/or S2' protease cleavage sites to prevent protease cleavage at these sites. Non-limiting examples of such mutations include 748-RSVR-751 (residues 748-751 of SEQ ID NO: 1) to 748-ASVG-751 (residues 748- 751 of SEQ ID NO: 3) substitutions to inhibit cleavage at the S1/S2 cleavage site, and 884-RSAR-887 (residues 884-887 of SEQ ID NO: 1) to 884-GSAG-887 (residues 884-887 of SEQ ID NO: 3) substitutions to inhibit cleavage at the S2' site."; pg 3, ln 27-33 - "FIGs. 2A-2D illustrate the architecture of the HKUI-CoV S1 subunit. ... (2D) SD-2 is composed of S1 sequence C-terminal to the CTD, a short peptide following the NTD, and the N-terminal strand of S2, which follows the S1/S2 furin-cleavage site").

HHS does not specifically teach COVID-19 spike protein. Chan discloses a spike protein of 2019-NCoV (pg 224, col 2, para 1 - "The 2019- nCoV genome is arranged in the order of 5'-replicase (orf1/ab)-structural proteins [Spike (S)-Envelope (E)- Membrane (M)-Nucleocapsid (N)]-3' and lacks the hemagglutinin-esterase gene which is characteristically found in lineage A beta-CoVs (Figure 1).") and sequence comparison with other coronaviruses (Figure 2 - "Comparison of protein sequences of Spike stalk S2 subunit. Multiple alignment of Spike S2 amino acid sequences of 2019- nCoV HKU-SZ-005b (accession number MN975262), bat SARS-like coronavirus isolates bat-SL-CoVZXC21 and bat-SL-CoVZXC45 (accession number MG772934.1 and MG772933.1, respectively) and human SARS coronavirus (accession number NC004718) was performed and displayed using CLUSTAL 2.1 and BOXSHADE 3.21 respectively."). Since HHS discloses modifying coronavirus, such as SARS-CoV, spike protein for creating an immunogen, and Chan discloses a spike protein from novel coronavirus 2019 and alignment and similarity to other coronaviruses, including SARS-CoV, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to modify the immunogen, as disclosed by HHS, to include or instead modify 2019-NCoV at similar positions determined through sequence alignment, since this would afford any potential stabilization of the spike protein of the SARS-CoV-2 in the prefusion conformation, thereby enabling its use, or any improvement when used, as an immunogen for vaccination against coronavirus infection.

As said technical features were known in the art at the time of the invention, these cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I+ and II therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Item 4 (continued):
Claims 7, 9-12, 19-31 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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 35/761 (2015.01)		A61K	35/761	
A61P 31/14 (2006.01)		A61P	31/14	
A61P 37/04 (2006.01)		A61P	37/04	

(32)優先日　令和2年9月18日(2020.9.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/969,008
(32)優先日　令和2年1月31日(2020.1.31)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/705,187
(32)優先日　令和2年6月15日(2020.6.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/994,630
(32)優先日　令和2年3月25日(2020.3.25)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/112,900
(32)優先日　令和2年11月12日(2020.11.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/043,090
(32)優先日　令和2年6月23日(2020.6.23)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/133,969
(32)優先日　令和3年1月5日(2021.1.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/135,182
(32)優先日　令和3年1月8日(2021.1.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　3101131
(32)優先日　令和2年11月28日(2020.11.28)
(33)優先権主張国・地域又は機関
カナダ(CA)
(31)優先権主張番号　62/706,676
(32)優先日　令和2年9月2日(2020.9.2)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/142,977
(32)優先日　令和3年1月28日(2021.1.28)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/198,306
(32)優先日　令和2年10月9日(2020.10.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 63/066,147
(32)優先日 令和2年8月14日(2020.8.14)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 63/121,482
(32)優先日 令和2年12月4日(2020.12.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 62/706,366
(32)優先日 令和2年8月12日(2020.8.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 63/198,089
(32)優先日 令和2年9月28日(2020.9.28)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 63/014,467
(32)優先日 令和2年4月23日(2020.4.23)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 63/025,782
(32)優先日 令和2年5月15日(2020.5.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 63/141,913
(32)優先日 令和3年1月26日(2021.1.26)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW
弁理士 片山 英二
(74)代理人 100093676
弁理士 小林 純子
(74)代理人 100153693
弁理士 岩田 耕一
(72)発明者 バルーチ，ダン，エイチ．
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２２１５ ボストン ブルックリン アベニュー ３３０，ベス イスラエル ディーコネス メディカル センター インコーポレイテッド内
(72)発明者 ランゲディク，ヨハネス ペトラス，マリア
アメリカ合衆国 ニュー ジャージー州 ０８５６０，タイタスビル，トレントン－ハーバートン ロード １１２５，ヤンセン ファーマシューティカルズ，インコーポレーテッド内
(72)発明者 ルッテン，ルーシー

アメリカ合衆国 ニュー ジャージー州 ０８５６０，タイタスビル，トレントン－ハーバートン ロード １１２５，ヤンセン ファーマシューティカルズ，インコーポレーテッド内
(72)発明者 バッカーズ，マーク ヨハネス，ゲランダス
アメリカ合衆国 ニュー ジャージー州 ０８５６０，タイタスビル，トレントン－ハーバートン ロード １１２５，ヤンセン ファーマシューティカルズ，インコーポレーテッド内
(72)発明者 ボス，リンク
アメリカ合衆国 ニュー ジャージー州 ０８５６０，タイタスビル，トレントン－ハーバートン ロード １１２５，ヤンセン ファーマシューティカルズ，インコーポレーテッド内
(72)発明者 ウェグマン，フランク
アメリカ合衆国 ニュー ジャージー州 ０８５６０，タイタスビル，トレントン－ハーバートン ロード １１２５，ヤンセン ファーマシューティカルズ，インコーポレーテッド内
(72)発明者 ズィードゲスト，デイビッド アドリアナス テオドルス，マリア
アメリカ合衆国 ニュー ジャージー州 ０８５６０，タイタスビル，トレントン－ハーバートン ロード １１２５，ヤンセン ファーマシューティカルズ，インコーポレーテッド内
(72)発明者 ヴァンデボッシュ，アン
アメリカ合衆国 ニュー ジャージー州 ０８５６０，タイタスビル，トレントン－ハーバートン ロード １１２５，ヤンセン ファーマシューティカルズ，インコーポレーテッド内
(72)発明者 ル ガルス，マシュー クロード，ミシェル
アメリカ合衆国 ニュー ジャージー州 ０８５６０，タイタスビル，トレントン－ハーバートン ロード １１２５，ヤンセン ファーマシューティカルズ，インコーポレーテッド内
(72)発明者 サドフ，ジェラルド，シー．
アメリカ合衆国 ニュー ジャージー州 ０８５６０，タイタスビル，トレントン－ハーバートン ロード １１２５，ヤンセン ファーマシューティカルズ，インコーポレーテッド内

Ｆターム（参考） 4C085 AA03 BA71 CC08 CC33 EE01 GG03
4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 CA12 MA17 MA66 NA14 ZB09 ZB33
4H045 AA10 AA30 BA10 CA01 DA86 EA31 FA74

【要約の続き】
核酸および／または組換え核酸に、ならびにコロナウイルスＳタンパク質に、ならびにワクチンにおける核酸および／またはそれらのタンパク質の使用に関する。