

**TABLE OF CONTENTS**

本項で使用する用語・略語.....2

1. 緒言.....3

## 本項で使用する用語・略語

用語・略号	省略していない表現または定義
ALC-0159	本剤に添加される PEG 脂質
ALC-0315	本剤に添加されるアミノ脂質
DSPC	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
LNP	lipid nanoparticle : 脂質ナノ粒子
modRNA	nucleoside-modified mRNA : 修飾ヌクレオシド mRNA
mRNA	messenger RNA : メッセンジャー RNA
P2 S	stable prefusion S including two proline substitutions : 2 つのプロリン置換を有するスパイク (S) タンパク質の安定的融合前構造体
PEG	polyethylene glycol : ポリエチレングリコール
S	SARS-CoV-2 spike glycoprotein : SARS-CoV-2 スパイク糖タンパク質
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 : 重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2
V8	variant 8 : バリエント 8
V9	variant 9 : バリエント 9

## 1. 緒言

BNT162b2 (BioNTech コード番号 : BNT162, Pfizer コード番号 : PF-07302048) は、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) のスパイク糖タンパク質 (S タンパク質) 全長体をコードする mRNA であり、SARS-CoV-2 による感染症に対する mRNA ワクチンの本質として開発が進められている。BNT162b2 はすべてのウリジンが 1-メチルシュードウリジンに置換された修飾ヌクレシド mRNA (modRNA) であり、この修飾により、自然免疫による影響が低下して翻訳効率が增加すると考えられる。また、BNT162b2 がコードする S タンパク質は 2 箇所のアミノ酸がプロリンに置換されており (P2 S), 抗原として最適な融合前構造に固定される。BNT162b2 の製剤化にあたっては、2 つの機能脂質である ALC-0315 (アミノ脂質) および ALC-0159 (PEG 脂質) ならびに 2 つの構造脂質である DSPC (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) およびコレステロールと混合することで BNT162b2 を封入する脂質ナノ粒子 (LNP) が形成される。これにより RNA は分解から保護され、筋肉内注射後の宿主細胞へのトランスフェクションが可能となる。製造販売承認申請製剤には、この BNT162b2 を封入する LNP に加え、精製白糖、塩化ナトリウム、塩化カリウム、リン酸水素ナトリウム二水和物およびリン酸二水素カリウムが添加されている。なお、本剤に防腐剤は含まれていない。

非臨床試験には主に、本剤の本質である BNT162b2 (V9) が用いられたが、一部の非臨床試験ではその類縁のバリエーションである BNT162b2 (V8) が用いられた。BNT162b2 (V9) は、BNT162b2 (V8) と比べてシトシンを多く含むが、これはコドン最適化を目的とするものであり、両バリエーションがコードするタンパク質のアミノ酸配列は同一である。

本剤の筋肉内への接種後、LNP に封入される modRNA が細胞に取り込まれ、modRNA の翻訳により産生された P2 S が発現することで、強力な中和抗体応答ならびに Th1 偏向性 CD4 陽性細胞および CD8 陽性細胞の応答を引き起こし、ウイルス感染阻害およびウイルス感染細胞傷害をもたらすと考えられる。

本製造販売承認申請における効能・効果および用法・用量を添付文書 (案) (M1.8.1 項) に記載した。

## TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES.....	2
LIST OF FIGURES .....	2
本項で使用する用語・略語.....	4
1. まとめ.....	6
1.1. SARS-CoV-2 S タンパク質について .....	7
2. 効力を裏付ける試験.....	11
2.1. BNT162b2 RNA 由来抗原の in vitro 発現.....	11
2.2. ワクチン抗原としての P2 S の構造的特性および生物物理学的特性評価.....	13
2.3. マウスにおける BNT162b2 (V9)の免疫原性 .....	15
2.4. アカゲザルにおける BNT162b2 (V9)の免疫原性および SARS-CoV-2 感染保護効果.....	21
2.4.1. アカゲザルにおける BNT162b2 (V9)の免疫原性.....	21
2.4.2. アカゲザルにおける BNT162b2 (V9)の SARS-CoV-2 感染保護効果.....	26
2.5. 反復投与毒性試験および生殖発生毒性試験における免疫原性評価 .....	31
2.5.1. 反復投与毒性試験でラットに BNT162b2 (V8)を週 1 回, 計 3 回投与後の免疫原性評価 .....	31
2.5.2. 反復投与毒性試験でラットに BNT162b2 (V9)を週 1 回, 計 3 回投与後の免疫原性評価 .....	32
2.5.3. ラットを用いた生殖発生毒性試験における免疫原性評価 .....	33
3. 副次的薬理試験.....	34
4. 安全性薬理試験.....	34
5. 薬力学的薬物相互作用試験.....	34
6. 考察および結論.....	34
7. 免疫原性および有効性の評価方法.....	34
7.1. SARS-CoV-2 S1 および RBD の直接 ELISA .....	34
7.2. げっ歯類における VSV/SARS-CoV-2 疑似ウイルス中和試験.....	35
7.3. 表面プラズモン共鳴分光法による血清 IgG の SARS-CoV-2 S1 および RBD 結合親和性の検討 .....	35
7.4. SARS-CoV-2 S1 結合 IgG Luminex イムノアッセイ .....	35
7.5. サルにおける SARS-CoV-2 中和試験.....	35
7.6. マウス脾細胞における ELISpot および放出サイトカイン測定.....	36

7.7. マウスリンパ節の免疫表現型解析.....	36
7.8. サルにおける ELISpot および細胞内サイトカイン測定.....	37
7.9. SARS-CoV-2 ウイルス RNA の RT-qPCR.....	37
7.10. サル肺の X 線検査およびコンピュータ断層撮影検査スキャン.....	38
7.11. サル肺の病理組織学的検査.....	38
8. 図表.....	38
参考文献.....	39

### LIST OF TABLES

Table 1	試験 28 日のマウス免疫原性評価の要約.....	18
Table 2	ラットに BNT162b2 (V8)投与後の SARS-CoV-2 S タンパク質に対する IgG 濃度 .....	32
Table 3	ラットに BNT162b2 (V9)投与後の SARS-CoV-2 中和抗体価の幾何平均値.....	33
Table 4	ラットに BNT162b2 (V9)投与後の SARS-CoV-2 中和抗体価の幾何平均値.....	33

### LIST OF FIGURES

Figure 1	コロナウイルスの複製サイクル.....	8
Figure 2	SARS-CoV-2 S タンパク質の構造.....	10
Figure 3	SARS-CoV-2 S タンパク質の構造模式図.....	11
Figure 4	BNT162b2 トランスフェクション頻度のフローサイトメトリー分析.....	12
Figure 5	BNT162b2 (V9)トランスフェクション細胞中 P2 S の免疫蛍光検出.....	12
Figure 6	遺伝子組換え P2 S を発現する細胞表面への結合.....	13
Figure 7	P2 S の ACE2 ペプチドドメインおよび B38 モノクローナル抗体への結合に対 するバイオレイヤー干渉法センサーグラム.....	14
Figure 8	cryoEM による P2 S 構造解析 (解像度 3.29 Å).....	15
Figure 9	マウスに BNT162b2 (V9)投与後 7, 14, 21 および 28 日における抗 S タンパク 質 IgG 応答.....	16
Figure 10	マウス SARS-CoV-2 S1 および RBD に対する特異的 IgG の結合速度.....	17
Figure 11	マウスに BNT162b2 (V9)投与後 14, 21 および 28 日の疑似ウイルス中和抗体価 .....	17
Figure 12	試験 28 日に採取したマウス脾細胞を用いた ELISpot 測定.....	18
Figure 13	試験 28 日に採取したマウス脾細胞を用いた放出サイトカイン測定.....	19

---

Figure 14	BNT162b2 (V9)投与マウスの所属リンパ節中 B 細胞および T 細胞のサブセット解析.....	20
Figure 15	アカゲザルに BNT162b2 (V9)投与後の S1 結合 IgG 濃度 .....	22
Figure 16	アカゲザルに BNT162b2 (V9)投与後のウイルス中和抗体価.....	23
Figure 17	BNT162b2 (V9)を投与したアカゲザルの PBMC を用いた IFN- $\gamma$ および IL-4 ELISpot 測定 .....	24
Figure 18	BNT162b2 (V9)投与アカゲザルにおける S タンパク質特異的 CD4 陽性 T 細胞または CD8 陽性 T 細胞の細胞内サイトカイン .....	25
Figure 19	感染性 SARS-CoV-2 曝露後のアカゲザルから採取した気管支肺胞洗浄液ならびに鼻腔および口腔咽頭検体中の SARS-CoV-2 RNA 発現 .....	27
Figure 20	感染性 SARS-CoV-2 曝露後のアカゲザルの一般症状.....	29
Figure 21	感染性 SARS-CoV-2 曝露後のアカゲザルの肺の X 線および CT 画像スコア .....	30
Figure 22	感染性 SARS-CoV-2 曝露後のアカゲザルの肺の病理組織学的検査.....	31
Figure 23	ラットに BNT162b2 (V8)投与後の疑似ウイルス中和抗体価.....	32

## 本項で使用する用語・略語

用語・略号	省略していない表現または定義
ACE2	angiotensin converting enzyme 2 : アンジオテンシン変換酵素 2
ALC-0159	本剤に添加される PEG 脂質
ALC-0315	本剤に添加されるアミノ脂質
BAL	bronchoalveolar lavage : 気管支肺胞洗浄
BSL3	biosafety level 3 : バイオセーフティレベル 3
CH	central helix : 中央ヘリックス
COVID-19	coronavirus disease 2019 : 新型コロナウイルス感染症
cryoEM	cryo-electron microscopy : 低温電子顕微鏡法
CT	cytoplasmic tail : 細胞質側末端
CT	computed tomography : コンピュータ断層撮影
dLIA	direct Luminex immunoassay : 直接結合 Luminex イムノアッセイ
DMSO	dimethyl sulfoxide : ジメチルスルホキシド
DSPC	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay : 酵素免疫測定法
ELISpot	enzyme-linked immunospot : 酵素免疫スポット
FITC	fluorescein isothiocyanate : フルオレセインイソチオシアネート
FP	fusion peptide : 融合ペプチド
GFP	green fluorescent protein : 緑色蛍光タンパク質
GMC	geometric mean concentration : 幾何平均濃度
GMT	geometric mean titer : 幾何平均抗体価
HCS	human convalescent sera : ヒト回復期血清
HR	heptad repeat : ヘプタッドリピート
HRP	horseradish peroxidase : 西洋ワサビペルオキシダーゼ
ICOS	inducible costimulatory molecule : 誘導性共刺激分子
IFN	interferon : インターフェロン
IgG	immunoglobulin G : 免疫グロブリン G
IL	interleukin : インターロイキン
LLOQ	lower limit of quantification : 定量下限値
LNP	lipid nanoparticle : 脂質ナノ粒子
MERS	Middle East respiratory syndrome : 中東呼吸器症候群
modRNA	nucleoside-modified mRNA : 修飾スクレオシド mRNA
ORF	open reading frame : オープンリーディングフレーム
P2 S	stable prefusion S including two proline substitutions : 2つのプロリン置換を有するスパイク (S) タンパク質の安定的融合前構造体
PBMC	peripheral blood mononuclear cells : 末梢血単核球
PD	peptide domain : ペプチドドメイン
PDB	Protein Data Bank
PFU	plaque forming unit : プラーク形成単位
pVNT	pseudotype neutralization titer : 疑似ウイルス中和抗体価
pVNT <sub>50</sub>	50% pseudovirus neutralizing titer: 疑似ウイルス感染細胞が 50%低下したときの中和抗体価
pVNT <sub>90</sub>	90% pseudovirus neutralizing titer: 疑似ウイルス感染細胞が 90%低下したときの中和抗体価
RBD	receptor binding domain : 受容体結合ドメイン
RNA	ribonucleic acid : リボ核酸

RT-qPCR	reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction : 定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
S	SARS-CoV-2 spike glycoprotein : SARS-CoV-2 スパイク糖タンパク質
S1	SARS-CoV-2 spike glycoprotein subdomains 1 : SARS-CoV-2 スパイク糖タンパク質サブドメイン 1
S2	SARS-CoV-2 spike glycoprotein subdomains 2 : SARS-CoV-2 スパイク糖タンパク質サブドメイン 2
S2'	S2 protease cleavage site : S2 プロテアーゼ開裂部位
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 : 重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2
SFC	spot forming cell : スポット形成細胞
SS	signal sequence : シグナル配列
Tfh	T follicular helper cell : 濾胞性ヘルパーT 細胞
TLR	Toll-like receptor : Toll 様受容体
TM	transmembrane : 膜貫通
TNF	tumor necrosis factor : 腫瘍壊死因子
ULOQ	upper limit of quantification : 定量上限値
USA	United States of America : 米国
V8	variant 8 : バリエント 8
V9	variant 9 : バリエント 9
VNT <sub>50</sub>	50% virus neutralizing titer : ウイルス感染細胞が 50%低下したときの中和抗体価
VSV	vesicular stomatitis virus : 水疱性口内炎ウイルス
WHO	World Health Organization : 世界保健機関

## 1. まとめ

BNT162b2 (BioNTech コード番号 : BNT162, Pfizer コード番号 : PF-07302048) は、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) のスパイク糖タンパク質 (S タンパク質) 全長体をコードする修飾ヌクレオシド mRNA (modRNA) であり、SARS-CoV-2 による感染症に対する mRNA ワクチンの本質として開発が進められている。一部の非臨床試験では、今回製造販売承認申請する BNT162b2 (V9) とは異なるバリエーションである BNT162b2 (V8) を用いたが、BNT162b2 (V9) との違いはコドン最適化のみであり、コードされたタンパク質のアミノ酸配列は同一である。両バリエーションがコードする S タンパク質は 2 箇所のアミノ酸がプロリンに置換されており (P2 S)、これによって、抗原として最適な融合前構造に固定される<sup>1,2</sup>。

BNT162b2 の製剤化にあたっては、溶解された脂質と混合することで BNT162b2 を封入する脂質ナノ粒子 (LNP) が形成され、これにより RNA は分解から保護され、筋肉内注射後の宿主細胞へのトランスフェクションが可能となる。本剤には、ALC-0315 (アミノ脂質) および ALC-0159 (PEG 脂質) が機能脂質として、DSPC (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) およびコレステロールが構造脂質として含まれている。BNT162b2 の薬理試験では、BNT162b2 封入 LNP を被験物質として用いた。LNP を構成する脂質の組成は製造販売承認申請製剤と同一であった。なお、被験物質名を表記する場合は含有する RNA のコード番号 (「BNT162b2 (V9)」等) のみを用いることとし、必要に応じて、該当する項において LNP に関する説明を加えた。

BNT162b2 は 5'末端にキャップ構造を有する一本鎖 mRNA であり、細胞に取り込まれると翻訳される。BNT162b2 は、SARS-CoV-2 の P2 S をコードするオープンリーディングフレーム (ORF) に加えて、高い翻訳効率を発揮するよう最適化した構造要素を含む。また、BNT162b2 はすべてのウリジンが 1-メチルシュードウリジンに置換された modRNA である。この置換により、Toll 様受容体 (TLR) 7 および TLR8 などの自然免疫センサーによるワクチン RNA の認識が低下し、自然免疫による影響が低下することで翻訳効率が増加する<sup>3</sup>。このような modRNA ワクチンの接種により、Th1 偏向性の抗原特異的濾胞性ヘルパー T 細胞 (Tfh) の発現が誘導され、胚中心 B 細胞が刺激されて増殖し、強力かつ持続的かつ高親和性の抗体反応がもたらされると考えられる<sup>4,5</sup>。BNT162b2 の構造要素には、P2 S をコードする RNA 領域の翻訳を強化・持続化することを目的に最適化された非コード配列が含まれる。同様のプラットフォーム技術に基づく他の感染症に対する modRNA ワクチン候補の評価においても、強力な抗体応答誘導ならびに多機能的な T 細胞の増殖が示されている<sup>5,6</sup>。

マウスおよびサルを用いた免疫原性評価の結果、BNT162b2 (V9) 投与後 14 日に抗原結合 IgG および中和抗体応答が検出され、サルにおいてはそれらの応答が 2 回目投与後にさらに増強された。ラットを用いた毒性試験でも同様の免疫原性が認められた。SARS-CoV-2 感染サルモデルでは、SARS-CoV-2 曝露後 3 日から気管支肺胞洗浄液ならびに鼻腔および口腔咽頭検体を経時的に採取したところ、BNT162b2 (V9) の前投与により上気道感染の部分的な保護効果が得られ、下気道に SARS-CoV-2 RNA は検出されなかった。BNT162b2 (V9) を投与後 SARS-CoV-2 を曝露したサルにおいて、疾患増強を示唆する所見は認められなかった。

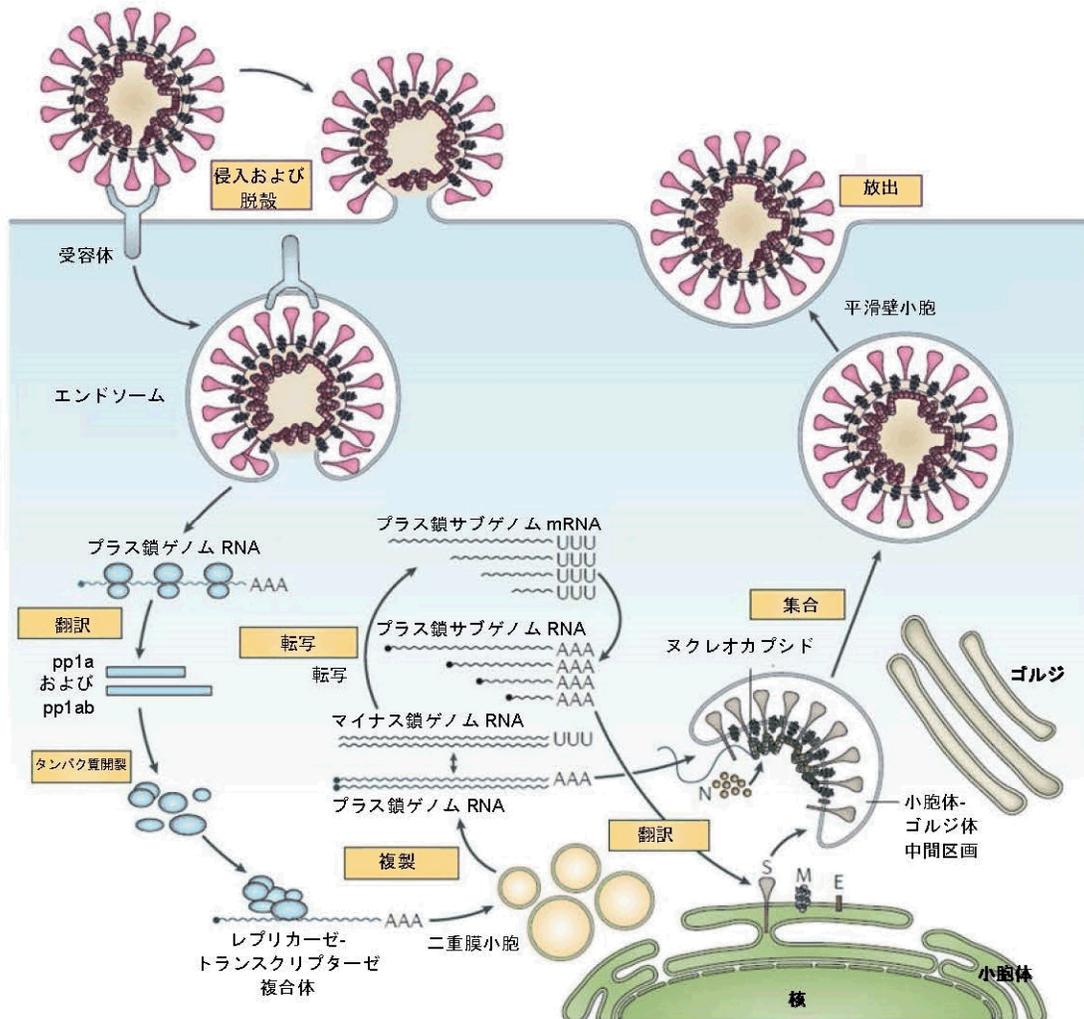
これらの結果より、SARS-CoV-2 に対する中和抗体の主要な標的と考えられている S タンパク質をワクチン抗原としてコードする modRNA を動物に投与することで、強力な中和抗体応答、Th1 偏向性 CD4 陽性 T 細胞応答および IFN- $\gamma$  産生性 CD8 陽性 T 細胞応答が誘導されたと考えられた。

多様な免疫機構が誘導されたことから、防御の最前線としてのウイルスの感染阻害に加え、副次的な防御作用としてウイルス感染細胞除去作用をもたらすことが示唆された。

### 1.1. SARS-CoV-2 S タンパク質について

SARS-CoV-2 はエンベロープ型一本鎖プラス鎖 RNA ウイルスであり、細胞外で粒子構造をとった状態（ビリオン）では表面が S タンパク質で覆われており、王冠（**crown; corona** を語源とする）状の外観を示す（**Figure 1**）。コロナウイルスの S タンパク質は、ウイルス中和抗体の主要な標的であり、ワクチン開発に重要な抗原と考えられている。S タンパク質は、受容体の認識、細胞への接着および宿主細胞膜とウイルスエンベロープとの融合に関与する膜貫通型糖タンパク質であり、S タンパク質の構造変化によりウイルスと宿主細胞膜との融合が引き起こされる。宿主細胞への侵入にあたり、S タンパク質は2種類の宿主プロテアーゼによるタンパク質開裂 [フーリン様プロテアーゼによる S1 と S2 サブユニット間の開裂およびセリンプロテアーゼ TMPRSS2 による融合ペプチドに隣接する保存部位での開裂 (S2')] を必要とする<sup>7,8</sup> (**Figure 3**)。受容体結合ドメイン (RBD) がある膜遠位側の S1 フラグメントは宿主細胞の受容体を認識して結合し、膜近位側の S2 フラグメントは膜融合に関与する。SARS-CoV と SARS-CoV-2 の S タンパク質の構造特性は類似しており、いずれもアンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) を宿主細胞の受容体として認識して結合する<sup>9</sup>。

Figure 1 コロナウイルスの複製サイクル



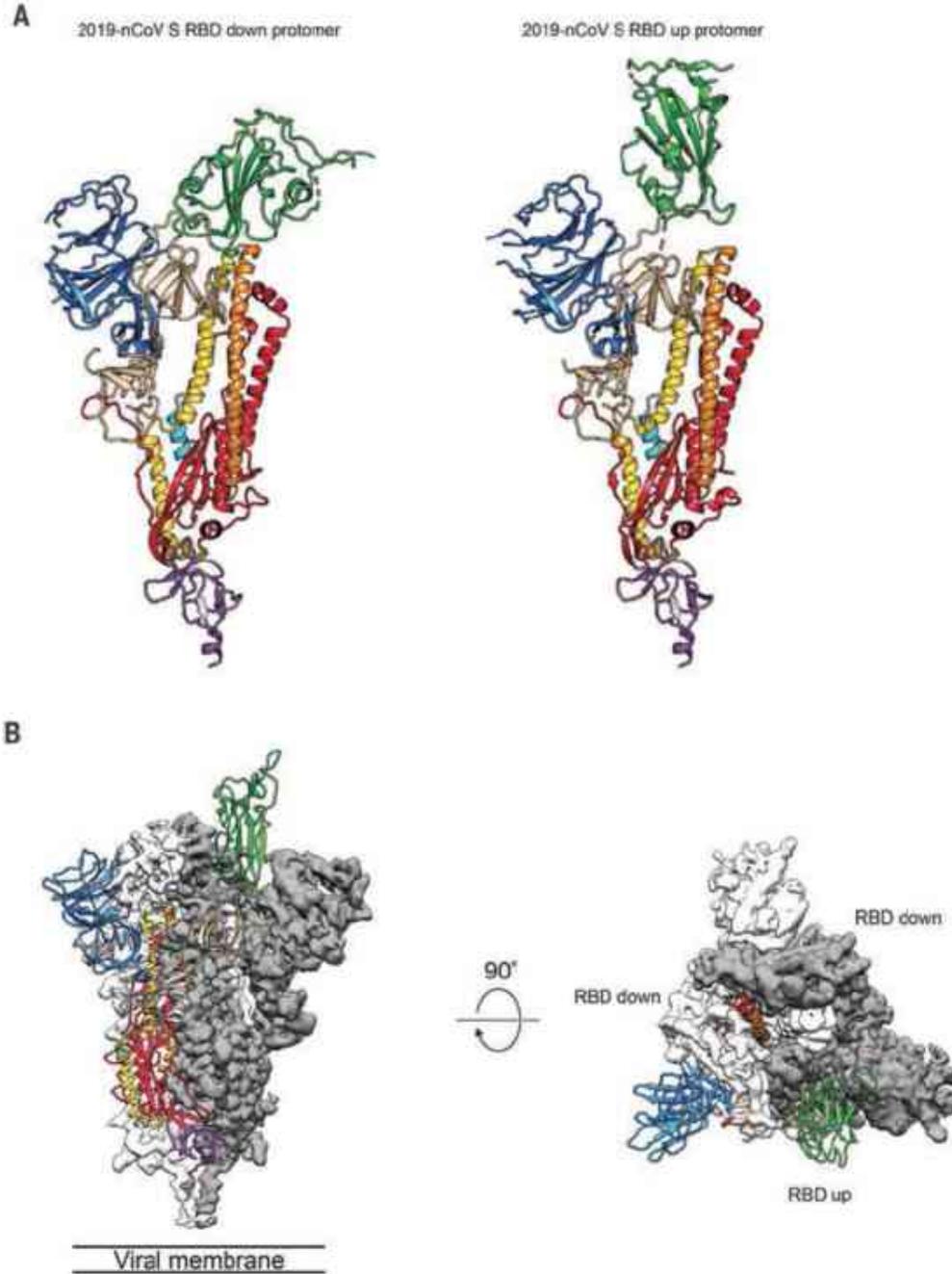
出典：de Wit et al, 2016<sup>10</sup>を改変

S タンパク質は、ビリオン状態では主に融合前構造をとり、ホモ三量体としてウイルス表面上に存在する巨大な糖タンパク質である<sup>11</sup>。細胞侵入時には自然的に S タンパク質から S1 フラグメントが切り離され、S2 フラグメントはウイルスと宿主細胞の融合を進める過程で融合後構造へのリフォールディングを受ける。宿主免疫系によるウイルス中和抗体の誘導において、S タンパク質は重要な標的である<sup>12,13</sup>。S タンパク質に対する幾つかのモノクローナル抗体のうち、特に RBD を認識するものが、SARS-CoV および中東呼吸器症候群 (MERS) -CoV を中和することが *in vitro* および *in vivo* 試験の結果から示されている<sup>14</sup>。したがって、S タンパク質を抗原とするワクチンは、強力な中和免疫応答を誘導するのに適すると考えられる<sup>15</sup>。SARS-CoV-2 に対しても、RBD を標的とする抗体が中和活性を示すことが報告されている<sup>16,17</sup>。

RBD は、S タンパク質三量体上の膜遠位の「ヘッド」部分を構成し、本体との接合領域がヒンジ様の役割を果たすことで、天然の S タンパク質では、開閉の形状（“up” 状態または “down” 状態）を繰り返してとる (Figure 2)。RBD が「ヘッドダウン」の状態、すなわち閉ざされた構造

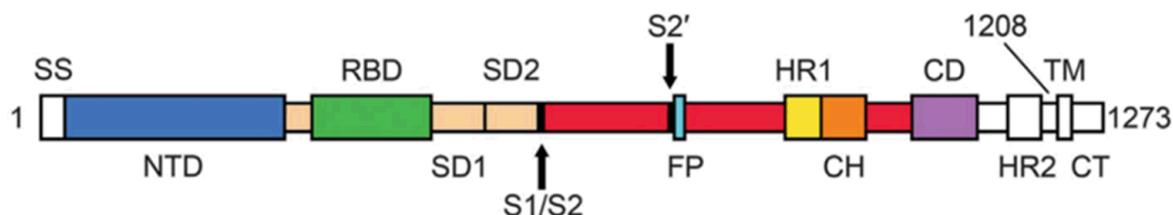
をとるときに中和エピトープを示す可能性についても述べられてはいるが、受容体にアクセス可能となる「ヘッドアップ」構造はより幅広い中和抗体標的としての可能性を有する<sup>18,19,20</sup>。

BNT162b2 がコードする S タンパク質の P2 変異バリエーション (P2 S) は、中央ヘリックス (CH) とヘプタッドリピート配列 1 (HR1) との間に位置する 986 番目および 987 番目のアミノ酸がプロリンに置換されており (Figure 3) , この変異によって S タンパク質は融合前構造に固定される<sup>1,2</sup>。P2 S 三量体のうち 1 つの RBD は「ヘッドアップ」位置に、残りの 2 つの RBD が「ヘッドダウン」位置にあり、ヘッドのヒンジ様構造の上下に伴う動的平衡にあると推測される<sup>21,22</sup> (Figure 2) 。

**Figure 2 SARS-CoV-2 S タンパク質の構造**

A. S タンパク質のプロトマーの構造。RBD は S タンパク質膜遠位の「ヘッド」部分を構成し、本体との接合領域がヒンジ様の役割を果たすことで、開閉の形状（“up”状態または“down”状態）を繰り返してとる。B. S タンパク質三量体の融合前構造体の側面図および上面図。1つのS タンパク質プロトマーのRBDが「ヘッドアップ」位置に、残りの2つのプロトマーのRBDは「ヘッドダウン」位置にある。AおよびBの色は Figure 3 の模式図に対応する（Bの2つのヘッドダウン位置のRBDを含む白およびグレー領域を除き）。出典：Wrapp et al, 2020<sup>2</sup>より抜粋。

Figure 3 SARS-CoV-2 S タンパク質の構造模式図



フーリン開裂部位 (S1/S2) において S1 フラグメントと S2 フラグメントは開裂する。S1 フラグメントは、シグナル配列 (SS), N 末端ドメイン (NTD), 受容体結合ドメイン (RBD: ヒト細胞受容体である ACE-2 に結合する), サブドメイン 1 (SD1) およびサブドメイン 2 (SD2) から成る。S2 フラグメントは、S2 プロテアーゼ開裂部位 (S2') に隣接する融合ペプチド (FP), ヘプタッドリピート配列 (HR1 および HR2), 中央ヘリックスドメイン (CH), コネクタドメイン (CD), 膜貫通ドメイン (TM) および細胞質側末端 (CT) からなる。BNT162b2 は、CH と HR1 との間に位置する 986 番目および 987 番目のアミノ酸がプロリンに置換されている P2 S をコードする。出典: Wrapp et al, 2020<sup>2</sup> より抜粋。

前述のとおり、BNT162b2 は P2 S 全長体をコードする modRNA である。タンパク質発現を増加させるためにコドン最適化がなされたバリエーションが BNT162b2 (V9) であり、BNT162b2 (V8) よりもシトシンを多く含む。この modRNA の翻訳により産生された P2 S が細胞膜上に発現することで強力な液性中和抗体応答ならびに Th1 偏向性 CD4 陽性細胞および CD8 陽性細胞の応答を引き起こし、ウイルス感染阻害およびウイルス感染細胞傷害をもたらすと考えられる。

## 2. 効力を裏付ける試験

### 2.1. BNT162b2 RNA 由来抗原の in vitro 発現

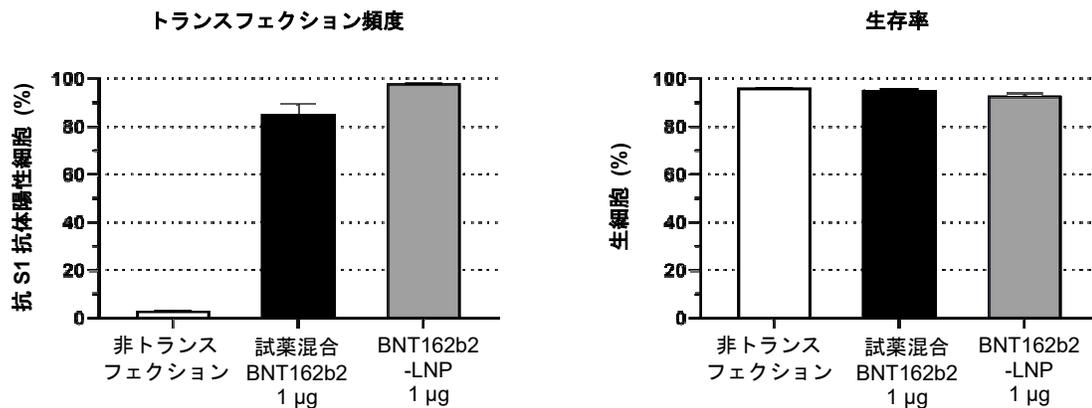
報告書番号: R-0211

種々の in vitro 試験を実施して、BNT162b2 トランスフェクション細胞における SARS-CoV-2 P2 S 発現を解析した。

市販のトランスフェクション試薬と混合した BNT162b2 (試薬混合 BNT162b2), または BNT162b2 の LNP 封入体 (共にバリエーションは V9) を HEK293T 細胞に曝露し、フローサイトメトリー分析法により S タンパク質発現細胞を測定することで、BNT162b2 のトランスフェクション頻度を評価した。また、トランスフェクションした細胞を免疫蛍光染色し、S タンパク質の細胞内局在を観察した。

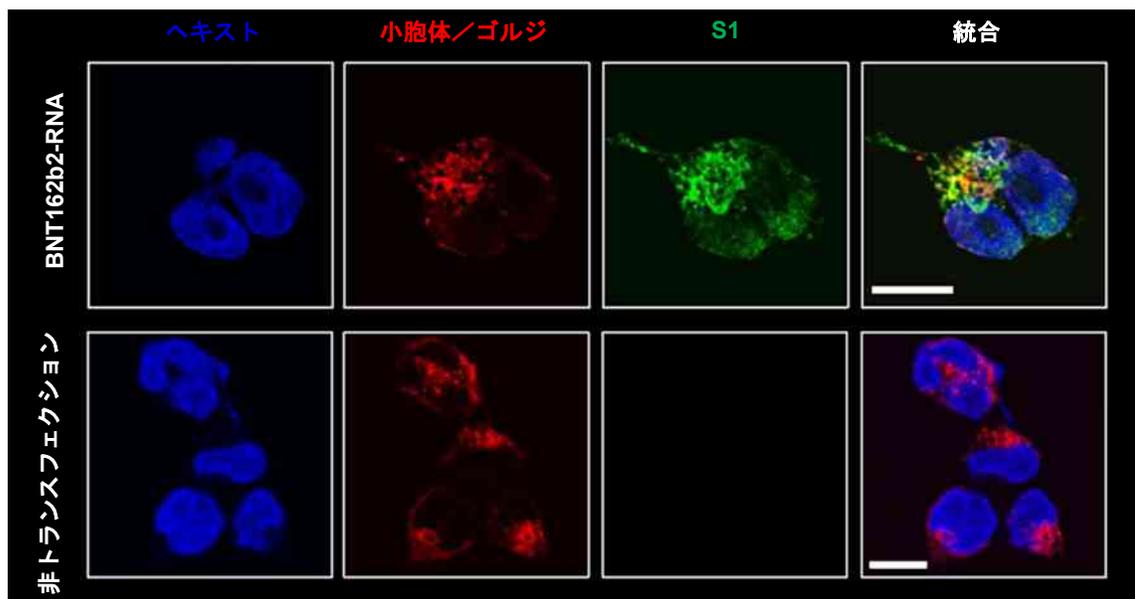
試薬混合 BNT162b2 または LNP 封入 BNT162b2 でトランスフェクション処理した HEK293T 細胞についてフローサイトメトリー分析を行ったところ、いずれにおいても細胞の S タンパク質発現率は高く、高頻度のトランスフェクションが確認された。試薬混合 BNT162b2 よりも LNP 封入 BNT162b2 の方がわずかにトランスフェクション頻度が高かった (Figure 4)。いずれのトランスフェクション細胞においても、トランスフェクション処理後の細胞生存率は非トランスフェクション細胞と同程度であった。さらに、トランスフェクション細胞を免疫蛍光染色したところ、S タンパク質と小胞体マーカーの共局在が示されたことから、S タンパク質が小胞体で合成されてプロセッシングを受けることが示唆された (Figure 5)。

Figure 4 BNT162b2 トランスフェクション頻度のフローサイトメトリー分析



RiboJuice mRNA トランスフェクション試薬と混合した BNT162b2 (試薬混合 BNT162b2) または LNP 封入 BNT162b2 (共にバリエントは V9 であり, RNA 量として 1 µg 含有) を HEK 293T 細胞に曝露し, 18 時間培養した。細胞を生存性色素で染色後, 固定および透過処理し, S1 を認識する AlexaFluor647 標識ウサギモノクローナル抗体で染色した。非トランスフェクション処理細胞を対照として用いた。

Figure 5 BNT162b2 (V9) トランスフェクション細胞中 P2 S の免疫蛍光検出



RiboJuice RNA トランスフェクション試薬を用いて, HEK293T 細胞に BNT162b2 (V9) をトランスフェクションした。18 時間培養した後, 細胞を固定および透過処理し, DNA を可視化するため核をヘキスト (青色) で, 小胞体およびゴルジ体をそれぞれ Alexa Fluor 594 標識 concanavalin A および Alexa Fluor 594 標識 GS-II (いずれも赤色) で染色した。さらに, P2 S に対する Alexa Fluor 488 標識抗 S1 モノクローナル抗体 (緑色) で染色した。各染色画像を重ね合わせると, BNT162b2 (V9) のトランスフェクションにより発現した P2 S が小胞体/ゴルジ体マーカーと共局在することが示された (上段)。対照として, 非トランスフェクション処理細胞の染色画像を下段に示す。スケールは 10 µm を表す。

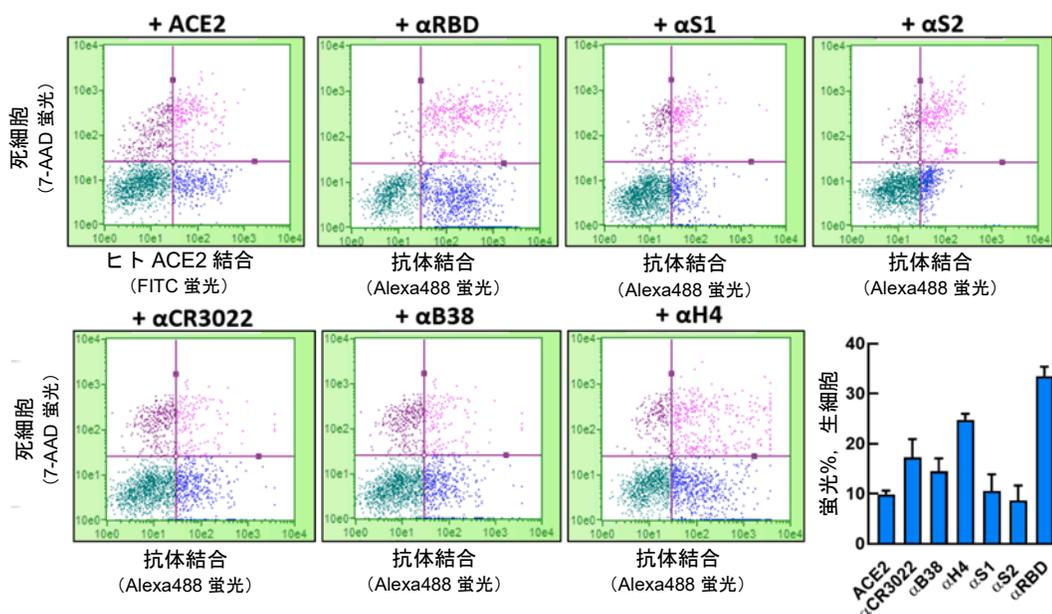
## 2.2. ワクチン抗原としての P2 S の構造的特性および生物物理学的特性評価

報告書番号：VR-VTR-10741

BNT162b2 と同じアミノ酸配列をコードする DNA によって P2 S (アフィニティー精製のため C 末端に TwinStrep タグを付加) を Expi293F 細胞に発現させ、構造的特性を評価した。まず、非透過処理細胞を用いてフローサイトメトリー分析を実施し、タグのない P2 S の細胞表面発現、およびヒト ACE2 への P2 S 結合能を確認した (Figure 6)。この実験では、RBD, S1 または S2 に対する抗体を Alexa Fluor 488 標識抗 IgG Fab 染色剤とプレインキュベートし、生細胞と死細胞を識別するため核酸色素を用いて染色した。次に、細胞表面発現 P2 S とヒト ACE2 の結合を確認するため、ヒト ACE2 の細胞外ドメインと FITC 標識抗体 (抗 ACE2 アフィニティータグ抗体) をプレインキュベートし、それを用いて P2 S 発現細胞を標識した。

COVID-19 回復期患者から単離したヒト抗 RBD 中和抗体である B38 および H4<sup>23</sup>ならびに抗 RBD 治療用抗体である CR3022<sup>24</sup>が、本実験のために作製した細胞表面発現 P2 S に同程度の親和性で結合することが確認された。

Figure 6 遺伝子組換え P2 S を発現する細胞表面への結合

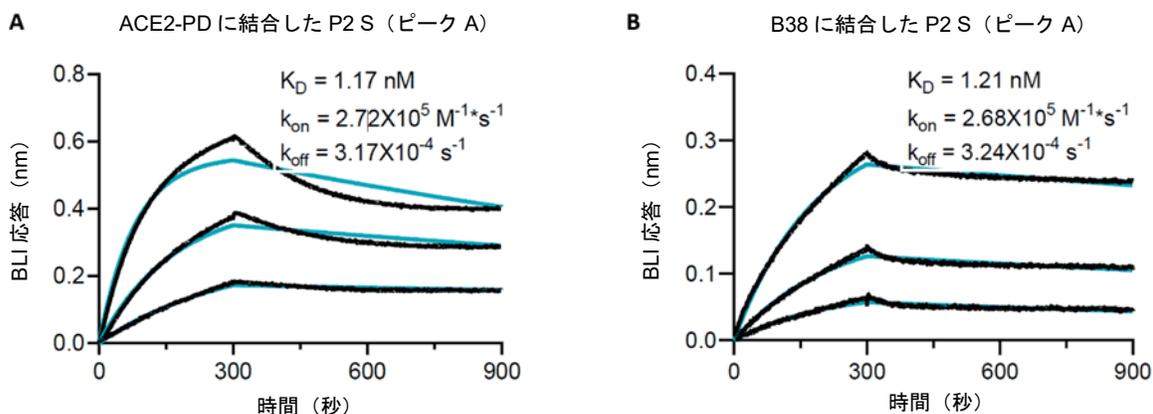


P2 S を Expi293F 細胞に過剰発現させ、S タンパク質全長体のうちの RBD, S1 または S2 領域に対する抗体 (図中それぞれ αRBD, αS1, αS2) で染色することで P2 S の細胞表面発現を確認した。さらに、ヒト ACE2 細胞外ドメイン、治療用抗体 CR3022 (図中 αCR3022) ならびに COVID-19 回復期患者から単離した 2 つの中和抗体 (図中 αB38 および αH4) を用いて、細胞表面発現 P2 S への結合を確認した。細胞の生死判定には核酸色素 7-AAD を使用した。生細胞のうち、各標識または抗体の細胞表面発現 P2 S への結合 (各パネルの右下) が背景値を上回った割合を棒グラフで示した。

遺伝子組換え P2 S の精製は、既報の手順<sup>21</sup>を一部改変して実施した。すなわち、1% NP-40 洗浄液 (界面活性剤) で細胞溶解して P2 S を可溶化した後、まずは TwinStrep タグ付きタンパク質を 0.5% NP-40 中で Strep-Tactin Sepharose HP resin により捕捉した。サイズ排除クロマトグラフィー

で得られた3つの異なるピークのうち最初のピーク（P2 S 全長体, S1 および S2 を含むことが Cai らの報告<sup>21</sup>で示されている）を溶出して P2 S を精製した。本手順で得られた P2 S 三量体とヒト ACE2 のペプチドドメイン（ACE2-PD）またはヒト抗 RBD 中和抗体 B38 との結合親和性をバイオレイヤー干渉法で分析したところ、いずれも高い親和性を示し、見かけの  $K_D$  値は共に約 1 nmol/L であった（Figure 7）。

**Figure 7** P2 S の ACE2 ペプチドドメインおよび B38 モノクローナル抗体への結合に対するバイオレイヤー干渉法センサーグラム



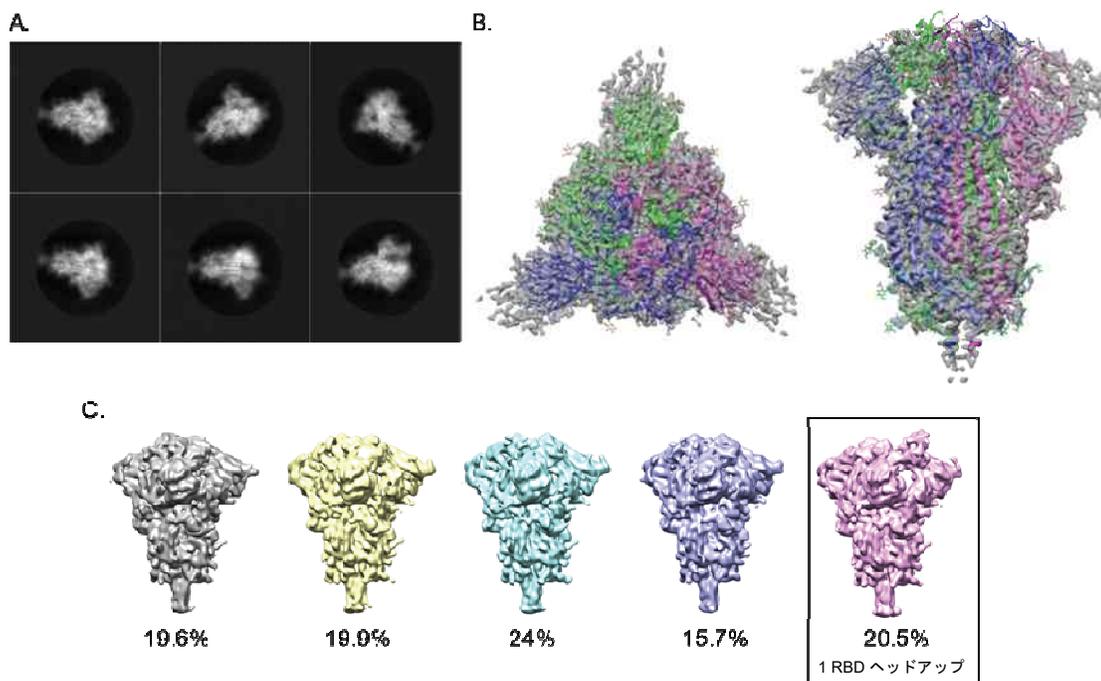
Expi293F 細胞に発現した P2 S（C 末端に TwinStrep タグを付加）を界面活性剤で可溶化し、アフィニティークロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーで精製した。25 mmol/L Tris (pH 7.5), 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA および 0.02 % NP-40 含有ランニングバッファー中で、Octet RED384 を用いて、サイズ排除カラムの最初のピークから得た P2 S 全長体, S1 および S2 を含有するタンパク質をバイオレイヤー干渉法により分析した（25°C 条件下）。固定化したヒト ACE2-PD (A) および B38 モノクローナル抗体 (B) への TwinStrep タグ付き P2 S の結合速度を表すセンサーグラムを示す [分子の結合による干渉波の波長のシフト (BLI 応答) をリアルタイムに計測]。検討に用いた P2 S の最高濃度は 71 nmol/L であり、その 3 倍希釈濃度とあわせて計 2 濃度で評価した。結合曲線は総じて 1:1 Langmuir 結合モデルに当てはまり、 $R^2$  値は 0.95 を上回った。結合実測データを黒色で、そのデータの 1:1 結合モデルへのベストフィットを水色で示した。

$K_D$ : 平衡解離定数,  $k_{on}$ : 結合速度定数,  $k_{off}$ : 解離速度定数

精製した P2 S（TwinStrep タグを付加）の構造を低温電子顕微鏡法 (cryoEM) により解析した。cryoEM データから得た粒子の 2 次元分類により、この粒子群が既報の SARS-CoV-2 S タンパク質の融合前構造三量体と近似することが示された (Figure 8-A)。このデータセットを処理・調整することで、名目解像度 3.29 Å の高品質 3 次元マップ (Figure 8-B) を得て、Protein Data Bank (PDB) で公表された原子モデル (PDB ID: 6VSB) を当てはめて、再構築した。再構築したモデルは、野生型 S タンパク質全長体<sup>21</sup>および P2 S 細胞外ドメイン<sup>2</sup>の報告された構造とよく一致していた。データセットの 3 次元分類 (Figure 8-C) から、「ヘッドアップ」位置に 1 つの RBD (受容体に結合可能な状態), 「ヘッドダウン」位置に 2 つの RBD を有する粒子クラスが示され、この構造は三量体分子構造全体の 20.4% を占めた。その他の構造として 4 種類のクラスが同定されたが、いずれも RBD が「ヘッドダウン」位置にある構造であった。「ヘッドアップ」位置の RBD はその構造中のその他の部位よりも解像度が劣ることから、Cai らおよび Henderson らが述べるように、構造的柔軟性および RBD の「ヘッドアップ」状態と「ヘッドダウン」状態との間の動的平衡が示唆された<sup>21,22</sup>。

以上のように、良好な解像度の S タンパク質融合前構造三量体が示された。また、ACE2 および各種ヒト中和抗体の高い親和性の結合がみられたことから、作製された遺伝子組換え P2 S 全長体が ACE2 結合部位を有し、かつ種々の SARS-CoV-2 中和抗体が標的とするエピトープを有することが示された。

**Figure 8 cryoEM による P2 S 構造解析 (解像度 3.29 Å)**



**A.** TwinStrep タグ付き P2 S 粒子の 2 次元 cryoEM 顕微鏡写真の典型例。ボックスの一边は 39.2 nm。 **B.** TwinStrep タグ付き P2 S の 3.29 Å の cryoEM マップと当てはめて計算した原子モデルの上面図 (3 回転軸に対して垂直) および側面図 (3 回転軸に対して並行)。CryoEM モデルは Protein Data Bank の S タンパク質融合前構造体 (PDB ID : 6VSB) に基づいており、モデル構築ソフト Coot でのマニュアルでの再構築および Phenix での実空間微調整によりその構造に当てはめた。300 kV の加速電圧で動作する Titan Krios 電子顕微鏡を用いて、約 28,000 枚の顕微鏡写真を撮影し、画像処理および 3 次元再構築を行った。 **C.** 3 次元分類により生成した P2 S のマップから、RBD ドメイン位置の不均一性が示された。各クラスの粒子群の割合をモデルの下に示す。5 種類のクラスが同定され、そのうちの 1 種類が 1 つの RBD がヘッドアップの構造をとるクラスであり (最右)、その他はいずれも RBD がヘッドダウン位置にある構造であった。

### 2.3. マウスにおける BNT162b2 (V9)の免疫原性

報告書番号 : R-0085, R-0112

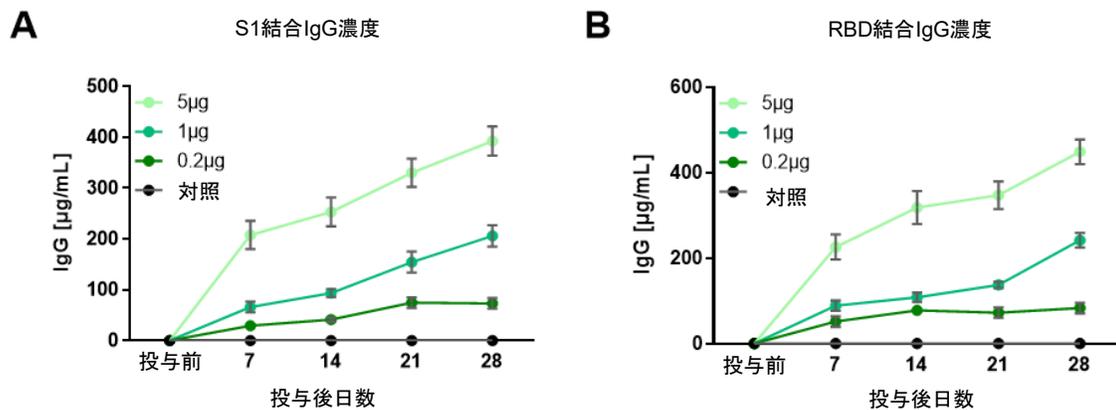
BNT162b2 (V9)をマウスに投与して免疫原性を検討した。

雌性 Balb/c マウス (8 匹/群) に、BNT162b2 (V9)の LNP 封入体 (脂質の組成は製造販売承認申請製剤と同一 : 以下「BNT162b2 (V9)」と表記) を 0 (対照 : 300 mmol/L 精製白糖含有リン酸緩衝生理食塩液)、0.2, 1 または 5 µg RNA の用量で単回筋肉内投与した (試験 0 日)。いずれも投与容量は 20 µL とした。試験 7, 14, 21 および 28 日に採血し、SARS-CoV-2 の RBD または S1 に対する IgG を酵素免疫測定法 (ELISA) により測定した (評価方法 : M2.6.2.7.1 項)。また、

疑似ウイルスに対する中和抗体価 (pVNT) を測定した (評価方法: M2.6.2.7.2 項)。加えて、試験 28 日に BNT162b2 (V9) 群から採取した血清中に存在する IgG の SARS-CoV-2 の RBD または S1 に対する特異的結合速度を評価した (評価方法: M2.6.2.7.3 項)。

ELISA による IgG 測定の結果、対照群では S1 および RBD 結合 IgG が検出されず、BNT162b2 (V9) 群では用量依存的な抗体の増加が認められた。血清試料中抗体濃度は、マウス IgG モノクローナル抗体標準品に基づく標準曲線を用いて算出した (Figure 9)。試験 28 日の各群の抗体濃度について統計処理したところ、BNT162b2 (V9) 群の S1 および RBD 結合 IgG 濃度は、対照群と比べて統計学的に有意に高値であった (S1: 0.2  $\mu\text{g}$  RNA で  $p = 0.0259$ , 1 および 5  $\mu\text{g}$  RNA で  $p < 0.0001$ , RBD: 0.2  $\mu\text{g}$  RNA で  $p = 0.0072$ , 1 および 5  $\mu\text{g}$  RNA で  $p < 0.0001$ )。

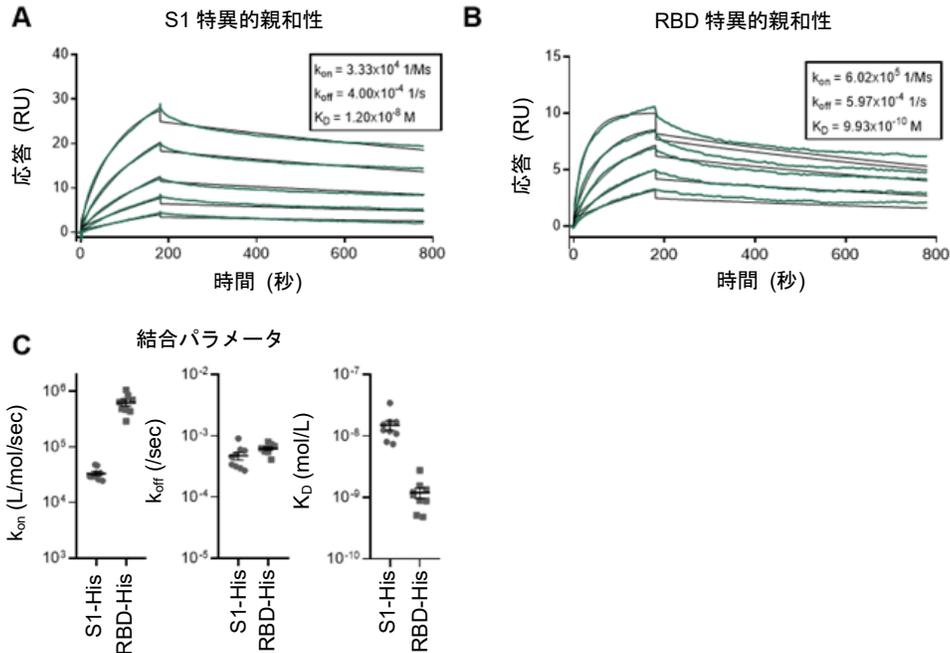
**Figure 9** マウスに BNT162b2 (V9) 投与後 7, 14, 21 および 28 日における抗 S タンパク質 IgG 応答



BALB/c マウス (8 匹/群) に BNT162b2 (V9) を 0, 0.2, 1 または 5  $\mu\text{g}$  RNA の用量で単回筋肉内投与した。試験 7, 14, 21 および 28 日に動物から採血した。得られた血清を用い、ELISA により遺伝子組換え S1 (A) および遺伝子組換え RBD (B) に対する IgG を測定した。ELISA 法に基づき処理した各個体試料の吸光度を測定し、その値に基づいて血清試料中抗体濃度を算出した。グラフは、抗体濃度の群平均 ( $\pm$ 標準誤差) を示す。一元配置分散分析検定と Dunnett の多重比較により、対照群と各 BNT162b2 (V9) 群の試験 28 日の IgG 濃度の統計学的有意差を検定した。いずれの BNT162b2 (V9) 群も IgG 濃度の統計学的有意な増加がみられた。

試験 28 日に採取した血清を用い、S1 および RBD に対する IgG の結合親和性を検討した。BNT162b2 (V9) 投与により誘導された IgG は、S1 および RBD に対して非常に強力な結合親和性を示し、平衡解離定数 ( $K_D$ ) の幾何平均値はそれぞれ 12 nmol/L および 0.99 nmol/L であった (Figure 10)。S1 および RBD に対する結合速度定数 ( $k_{on}$ ) の幾何平均値はそれぞれ  $3.33 \times 10^4$  L/mol/sec および  $6.02 \times 10^5$  L/mol/sec、解離速度定数 ( $k_{off}$ ) の幾何平均値はそれぞれ  $4.00 \times 10^{-4}$ /sec および  $5.97 \times 10^{-4}$ /sec であった。

Figure 10 マウス SARS-CoV-2 S1 および RBD に対する特異的 IgG の結合速度

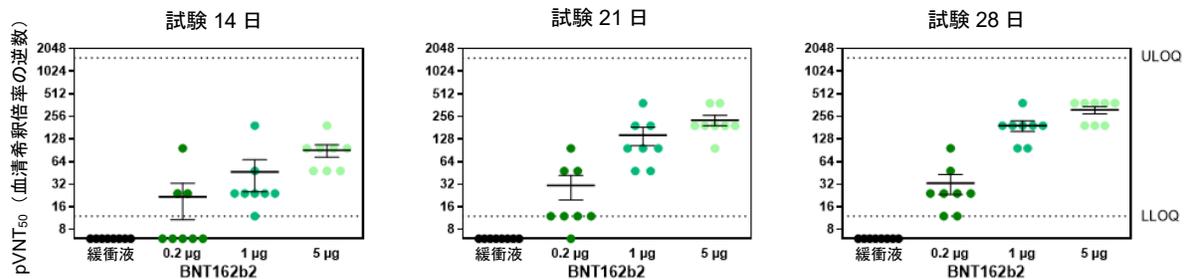


試験 28 日に BNT162b2(V9)の 5  $\mu\text{g}$  RNA 投与群 (8 匹) から血清を採取した。表面プラズモン共鳴分光法を用いて、マルチサイクルモードで、ヒスチジンタグ付きの遺伝子組換え S1 (S1-His) および RBD-His をそれぞれ 25~400 nmol/L および 1.562~50 nmol/L の濃度範囲とし、血清中 IgG の S1-His (A) または RBD-His (B) への結合能を検討した。結合実測データを黒色、そのデータの 1:1 結合モデルへのベストフィットを緑色で示す。1:1 Langmuir モデルへの global kinetic fit により、結合速度を算出した。各結合パラメータ (C) について、個体値を点で、各群の平均値 ( $\pm$ 標準誤差) を水平バーで示す。

$K_D$ : 平衡解離定数,  $k_{on}$ : 結合速度定数,  $k_{off}$ : 解離速度定数

pVNT 測定の結果、BNT162b2 (V9)の用量に伴う中和抗体価の増加が認められた (Figure 11)。

Figure 11 マウスに BNT162b2 (V9)投与後 14, 21 および 28 日の疑似ウイルス中和抗体価



BALB/c マウス (8 匹/群) に BNT162b2 (V9)を 0, 0.2, 1 または 5  $\mu\text{g}$  RNA の用量で単回筋肉内投与した。試験 14, 21 および 28 日に採取した血清を用い、SARS-CoV-2 疑似ウイルス中和活性を評価した。グラフは pVNT<sub>50</sub> (血清非添加の陽性対照に対して感染細胞数が 50%低下したときの血清希釈倍率の逆数)を示す。各個体から得られた試料について duplicate で測定した。個体値を点で、各群の平均値 ( $\pm$ 標準誤差) を水平バーで示す。

LLOQ: 定量下限値, ULOQ: 定量上限値

本試験における試験 28 日の免疫原性データを以下に要約する (Table 1)。

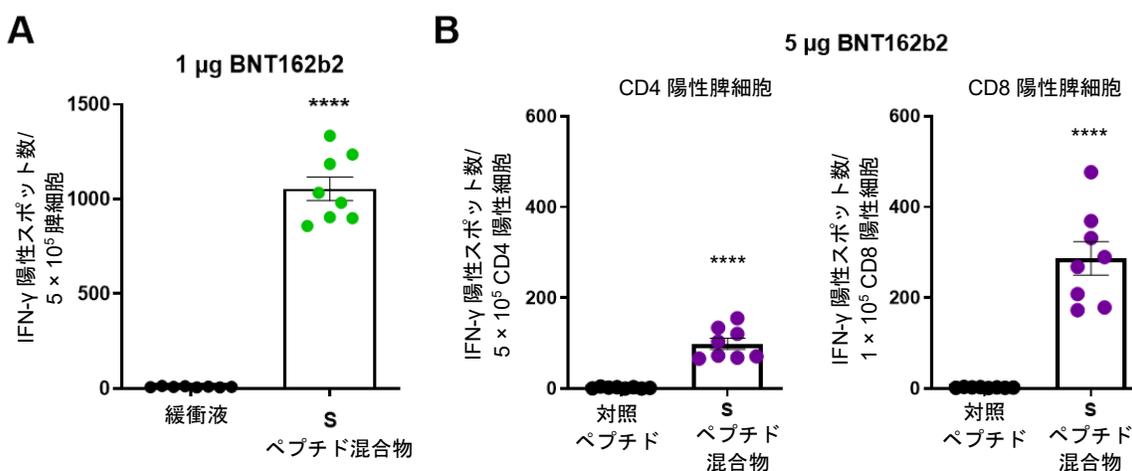
**Table 1** 試験 28 日のマウス免疫原性評価の要約

	BNT162b2 (V9) 0.2 µg	BNT162b2 (V9) 1 µg	BNT162b2 (V9) 5 µg
抗 S1 IgG 総濃度 (µg/mL)	73.0 ± 10.4	205.9 ± 21.0	392.7 ± 28.9
抗 RBD IgG 総濃度 (µg/mL)	83.1 ± 12.3	241.7 ± 17.2	448.6 ± 28.6
pVN <sub>50</sub> 抗体価 (血清希釈倍率の逆数)	33.0 ± 9.8	192.0 ± 31.4	312.0 ± 35.1

平均値±標準誤差

続いて、細胞性免疫応答を解析した。試験 28 日に BNT162b2 (V9)群から脾細胞を単離し、抗原 (S タンパク質全長体の重複ペプチド混合物) 刺激後の IFN-γ 放出を ELISpot 法により評価した (評価方法: M2.6.2.7.6 項)。単離後速やかに脾細胞を抗原刺激した結果、無刺激性の対照ペプチドによる処理と比較して抗原刺激による IFN-γ 分泌細胞数の統計的に有意な増加がみられ、BNT162b2 (V9)投与による S タンパク質特異的 T 細胞の IFN-γ 産生誘導が示唆された (Figure 12-A)。また、T 細胞サブタイプを検討するため、試験 28 日に BNT162b2 (V9)の 5 µg RNA 投与群から得た脾細胞から新鮮な CD4 陽性細胞および CD8 陽性細胞を単離し、追加の ELISpot 測定を実施したところ、CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞の両方が IFN-γ 陽性反応を示した (Figure 12-B)。

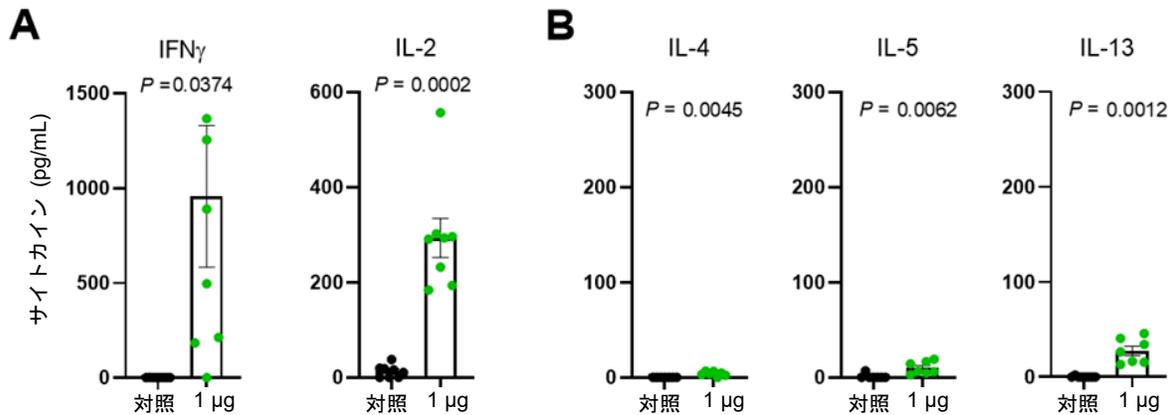
**Figure 12** 試験 28 日に採取したマウス脾細胞を用いた ELISpot 測定



試験 28 日に BNT162b2 (V9)の 1 µg RNA 投与群 (8 匹) から単離した脾細胞 (A) または 5 µg RNA 投与群 (8 匹) から磁気細胞分離により得た CD4 陽性細胞および CD8 陽性細胞 (B) を用いて実施した ELISpot 測定結果を示す。脾細胞を S タンパク質重複ペプチド混合物 (各グラフ右) もしくは緩衝液または対照ペプチド (各グラフ左) で刺激し、IFN-γ を分泌する S タンパク質特異的 T 細胞数を測定した。個体値を点で、群平均値 (±標準誤差) をバーで示す。一元配置分散分析の後、Dunnnett 多重比較検定を実施して、P 値を求めた。\*\*\*\*:  $p < 0.0001$ 。

さらに、試験 28 日に BNT162b2 (V9)群から単離した脾細胞を S タンパク質ペプチド混合物で刺激し、放出されたサイトカインをマルチプレックスシムノアッセイによって測定した (評価方法: M2.6.2.7.6 項)。その結果、Th1 サイトカインである IFN-γ および IL-2 が高濃度で検出され、その一方で Th2 サイトカインである IL-4、IL-5 および IL-13 は微量であった (Figure 13)。

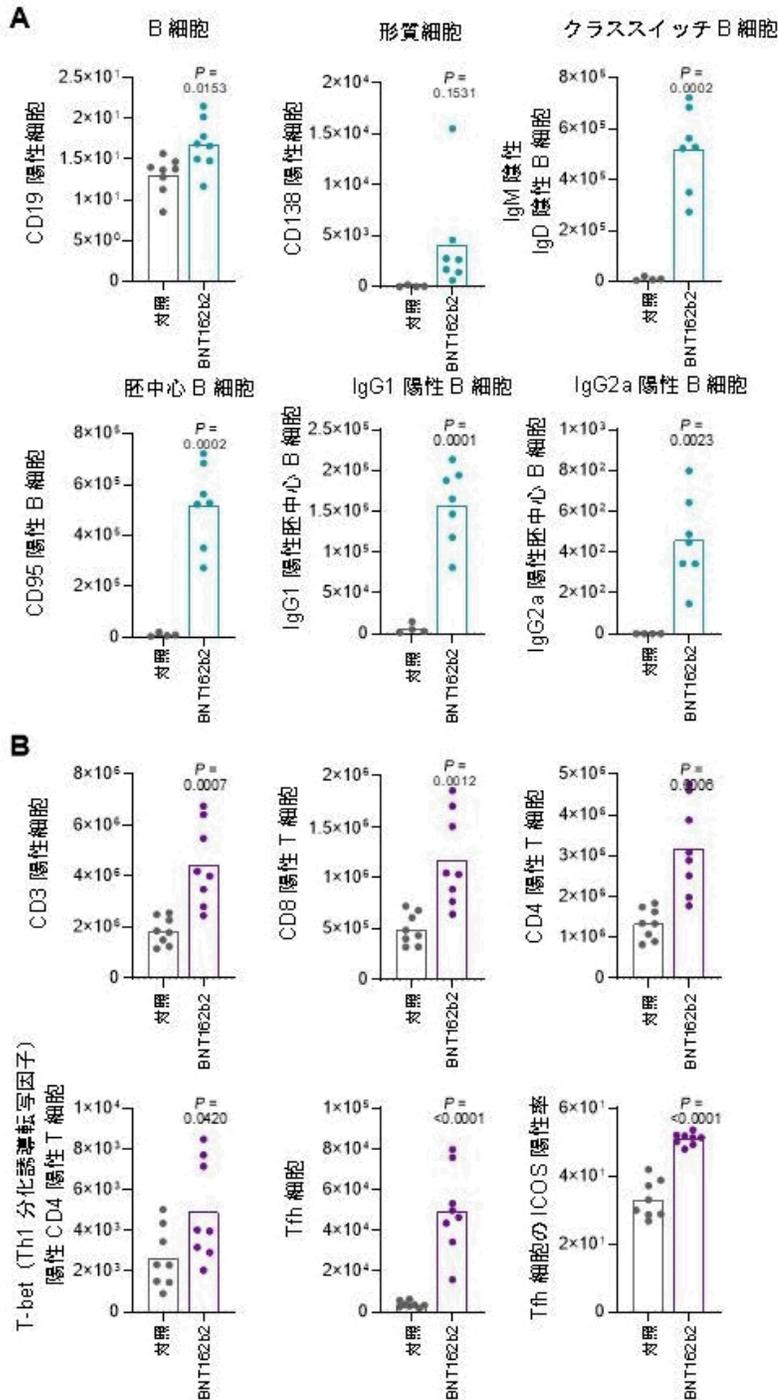
Figure 13 試験 28 日に採取したマウス脾細胞を用いた放出サイトカイン測定



試験 28 日に対照群および BNT162b2 (V9) 群 (8 匹/群) から単離した脾細胞を S タンパク質全長体のペプチド混合物で刺激し、上清のサイトカイン量をマルチプレックスイムノアッセイにより分析した。放出サイトカイン量をビーズを用いたマルチプレックス分析により測定した[ここで図示した 1  $\mu$ g RNA 投与群の IL-4, IL-5 および IL-13 測定値については、Rout 検定 (Q 値 = 1%) に基づき外れ値の 1 例を除外した]。個体値を点で、群平均をバーで示す。対応のある両側 t 検定で P 値を求めた。

次に、BNT162b2(V9)で免疫後の細胞応答をより詳細に検討するため、雌性 Balb/c マウス (8 匹/群) に BNT162b2 (V9) の LNP 封入体 (脂質の組成は製造販売承認申請製剤と同一: 以下「BNT162b2 (V9)」と表記) を 0 (対照: 0.9%塩化ナトリウム水溶液) または 5  $\mu$ g RNA の用量で単回筋肉内投与し免疫表現型解析を行った (評価方法: M2.6.2.7.7 項)。いずれも投与容量は 20  $\mu$ L とした。投与後 12 日に所属リンパ節 (dLN) を採取し、フローサイトメトリー分析法により B 細胞および T 細胞のサブセット解析を実施した (Figure 14)。その結果、対照群と比較して BNT162b2 (V9) 群の dLN に多数の B 細胞 (形質細胞, IgG1 および IgG2a 陽性クラススイッチ B 細胞および胚中心 B 細胞など) が認められた。また、T 細胞数についても BNT162b2 (V9) 群で高値を示し、とりわけ濾胞性ヘルパー T 細胞 (Tfh) 数の増加が顕著にみられた。ICOS (胚中心の形成に必須と考えられている誘導性共刺激分子<sup>25</sup>) 陽性の Tfh 細胞の割合が対照群に比べて高く、Tfh 細胞のアップレギュレートが示唆された。

Figure 14 BNT162b2 (V9)投与マウスの所属リンパ節中 B 細胞および T 細胞のサブセット解析



マウス (8 匹/群) に BNT162b2 (V9) を 0 (対照: 0.9% 塩化ナトリウム水溶液) または 5  $\mu$ g RNA の用量で単回筋肉内投与した。投与後 12 日に所属リンパ節を採取し、B 細胞 (A) および T 細胞 (B) のサブセットをフローサイトメトリーで分析した。対応のない両側 t 検定で P 値を求めた。

以上のように、BNT162b2 (V9) をマウスに単回投与したところ強力な抗体応答が誘導され、S タンパク質結合 IgG 濃度および疑似ウイルスに対する中和抗体価の増加が認められた。また、誘導さ

れた IgG の S1 および RBD に対する高い結合親和性が示された。単回投与後 12 日および 28 日に、CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞の増加がみられ、総じて T 細胞活性の有意な上昇が示された。B 細胞と T 細胞のサブセット解析の結果も踏まえると、BNT162b2 (V9) を投与することで、SARS-CoV-2 の S タンパク質特異的の中和抗体産生と Th1 偏向性の T 細胞応答がともに強力に誘導されることが本試験から示唆された。

#### 2.4. アカゲザルにおける BNT162b2 (V9) の免疫原性および SARS-CoV-2 感染保護効果

BNT162b2 (V9) をアカゲザルに投与して免疫原性および SARS-CoV-2 感染保護効果を評価した。

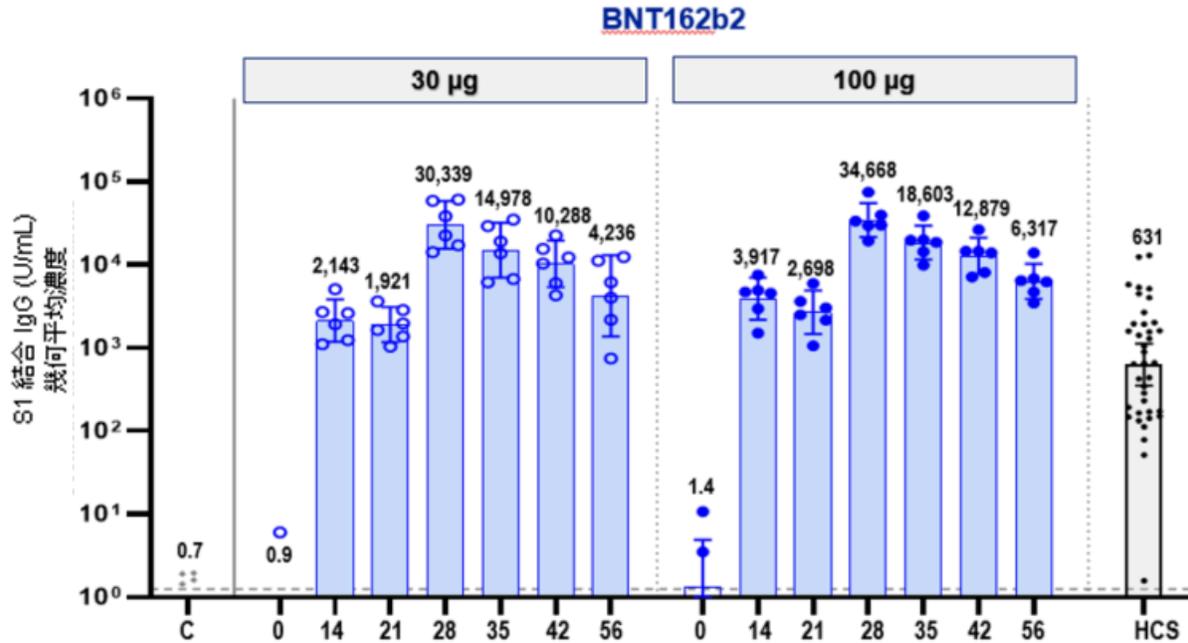
##### 2.4.1. アカゲザルにおける BNT162b2 (V9) の免疫原性

報告書番号：VR-VTR-10671

雄性アカゲザル（2～4 年齢，6 匹/群）に，BNT162b2 (V9) の LNP 封入体（脂質の組成は製造販売承認申請製剤と同一：以下「BNT162b2 (V9)」と表記）を 0 (対照：生理食塩液)，30 または 100 µg RNA の用量で試験 0 日および 21 日に筋肉内投与した。いずれも投与容量は 0.5 mL とした。得られた血清を用いて直接結合 Luminex イムノアッセイ (dLIA) により S1 結合 IgG 濃度を測定した（評価方法：M2.6.2.7.4 項）。その結果，初回投与後速やかに S1 結合 IgG が検出され，2 回目投与後 7 日（試験 28 日）にはさらに S1 結合 IgG 濃度が上昇した。30 または 100 µg RNA 投与群の S1 結合 IgG 濃度の幾何平均値 (GMC) はそれぞれ 30,339 units (U)/mL および 34,668 U/mL であり，SARS-CoV-2 ヒト回復期血清 (HCS) の GMC (631 U/mL) と比較して顕著に高値であった (Figure 15)。

なお，本試験の評価のベンチマークとして使用した HCS は，PCR 診断による SARS-CoV-2 感染確定後 14 日以上が経過し，すでに無症状の 18～83 歳のドナー 38 例から採取した血清である。血清ドナー 38 例のうち 35 例で症候性感染を呈し，うち 1 例が入院を要した。SARS-CoV-2 感染に対する免疫応答が疾患からの保護として働き，中和抗体応答がその保護に寄与することを考えると，ワクチンに対する免疫応答の質を判定する現在評価可能なベンチマークとして HCS は有用と考えられる。

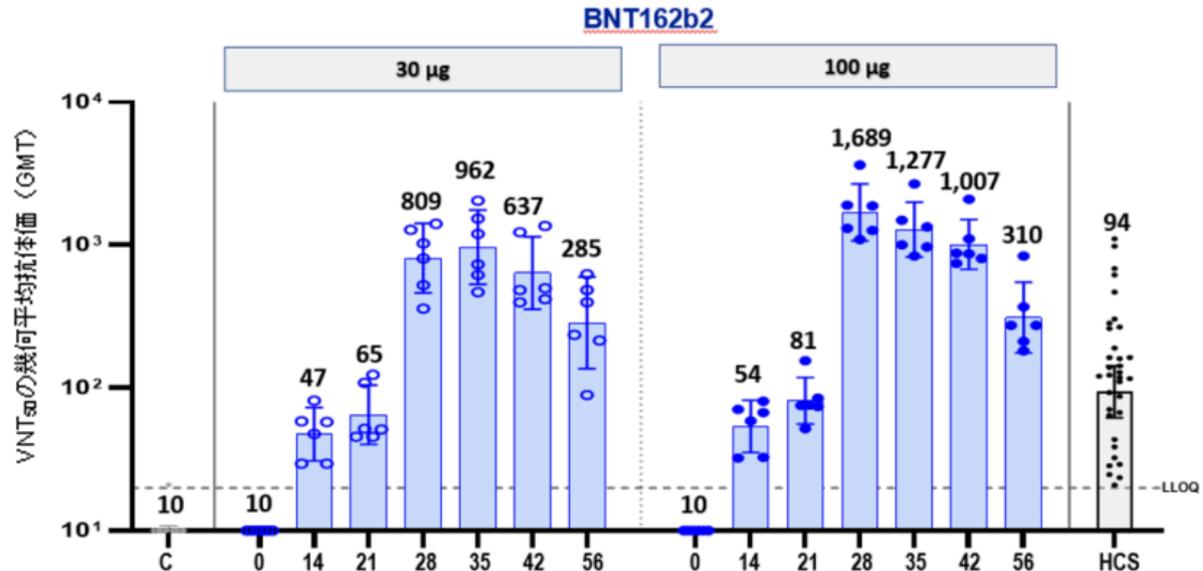
Figure 15 アカゲザルに BNT162b2 (V9)投与後の S1 結合 IgG 濃度



アカゲザルに BNT162b2(V9)を投与することで誘導された S1 結合 IgG 濃度。X 軸には初回投与後日数を示す。任意単位の幾何平均濃度 (GMC) ( $\pm 95\%$ 信頼区間) をバーで、個体値を点で表す。点線は定量下限値 (LLOQ : 1.267 U/mL) を示す。なお、GMC の算出にあたっては、LLOQ 以下の値は LLOQ の 1/2 とした。  
C : 対照群 (生理食塩液投与) , HCS : ヒト回復期血清

Muruato らによって確立された方法で SARS-CoV-2 中和抗体価を測定した<sup>26</sup>(評価方法:M2.6.2.7.5 項)。VNT<sub>50</sub> (ウイルス感染が 50%低下したときの中和抗体価の幾何平均値) は初回投与後 14 日から検出され、30 および 100 µg RNA 投与群の最高 VNT<sub>50</sub> 値はそれぞれ 962 [試験 35 日 (2 回目投与後 14 日)] および 1,689 [試験 28 日 (2 回目投与後 7 日)] であった (Figure 16)。検討した最終時点である試験 56 日における 30 および 100 µg RNA 投与群の VNT<sub>50</sub> 値はそれぞれ 285 および 310 であり、HCS の VNT<sub>50</sub> 値 (94) を上回った。

Figure 16 アカゲザルに BNT162b2 (V9)投与後のウイルス中和抗体価



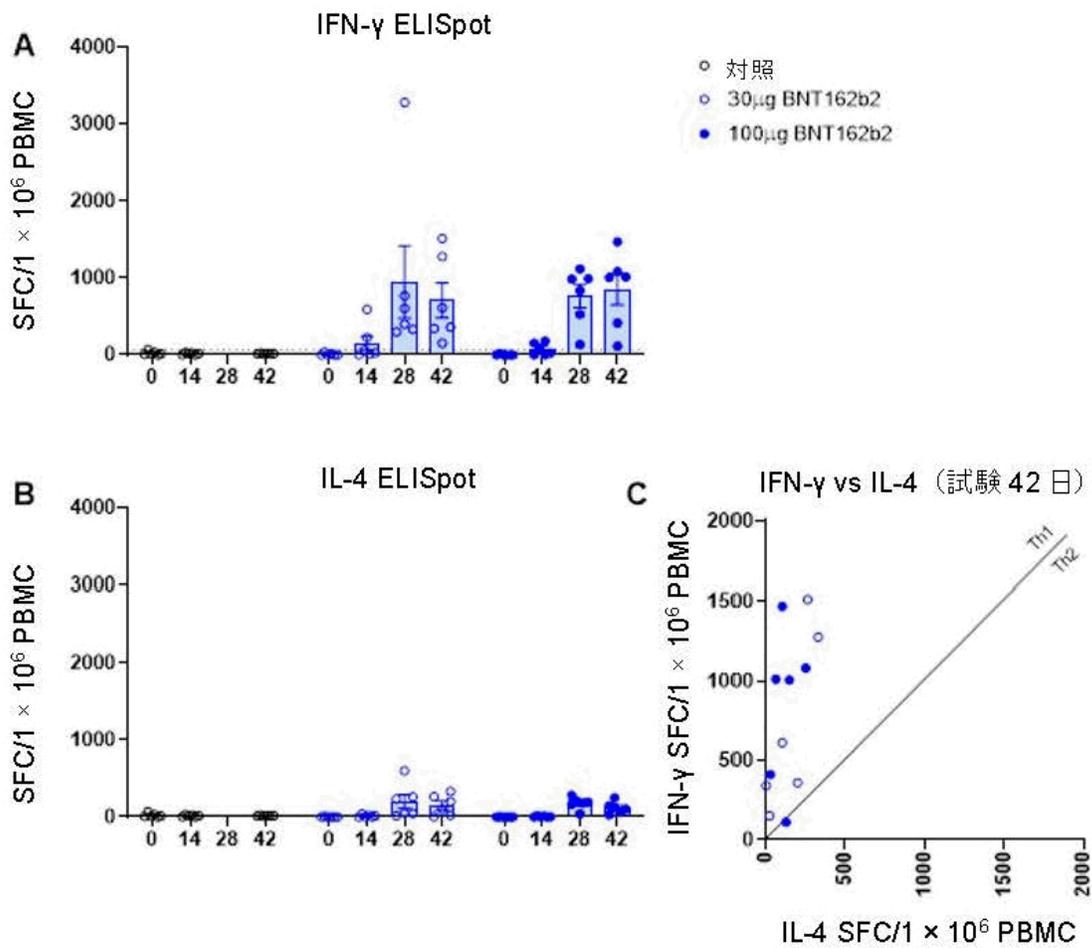
BNT162b2 (V9)を投与後のアカゲザルから採取した血清を用い、SARS-CoV-2 ウイルス中和活性を評価した。グラフはVNT<sub>50</sub> (感染細胞が50%低下したときの血清希釈倍率の逆数)を示す。X軸上の数字は初回投与後日数を示す。VNT<sub>50</sub>の幾何平均値(±95%信頼区間)をバーで、個体値を点で表す。点線は定量下限値(LLOQ:20)を示す。VNT<sub>50</sub>の算出にあたっては、LLOQ以下の抗体価はLLOQの1/2とした。

C: 対照群 (生理食塩液投与), HCS: ヒト回復期血清

抗原特異的 T 細胞応答は、抗原に対する特異的抗体の産生に加え、疾患に対する保護をもたらす感染細胞除去に重要な役割を果たす。各群から試験 0 (初回投与前), 14 (初回投与後 14 日), 28 (2 回目投与後 7 日) および 42 日 (2 回目投与後 21 日) に採取した PBMC を用い、ELISpot 測定および細胞内サイトカイン測定により、S タンパク質特異的 T 細胞応答を解析した (評価方法: M2.6.2.7.8 項)。

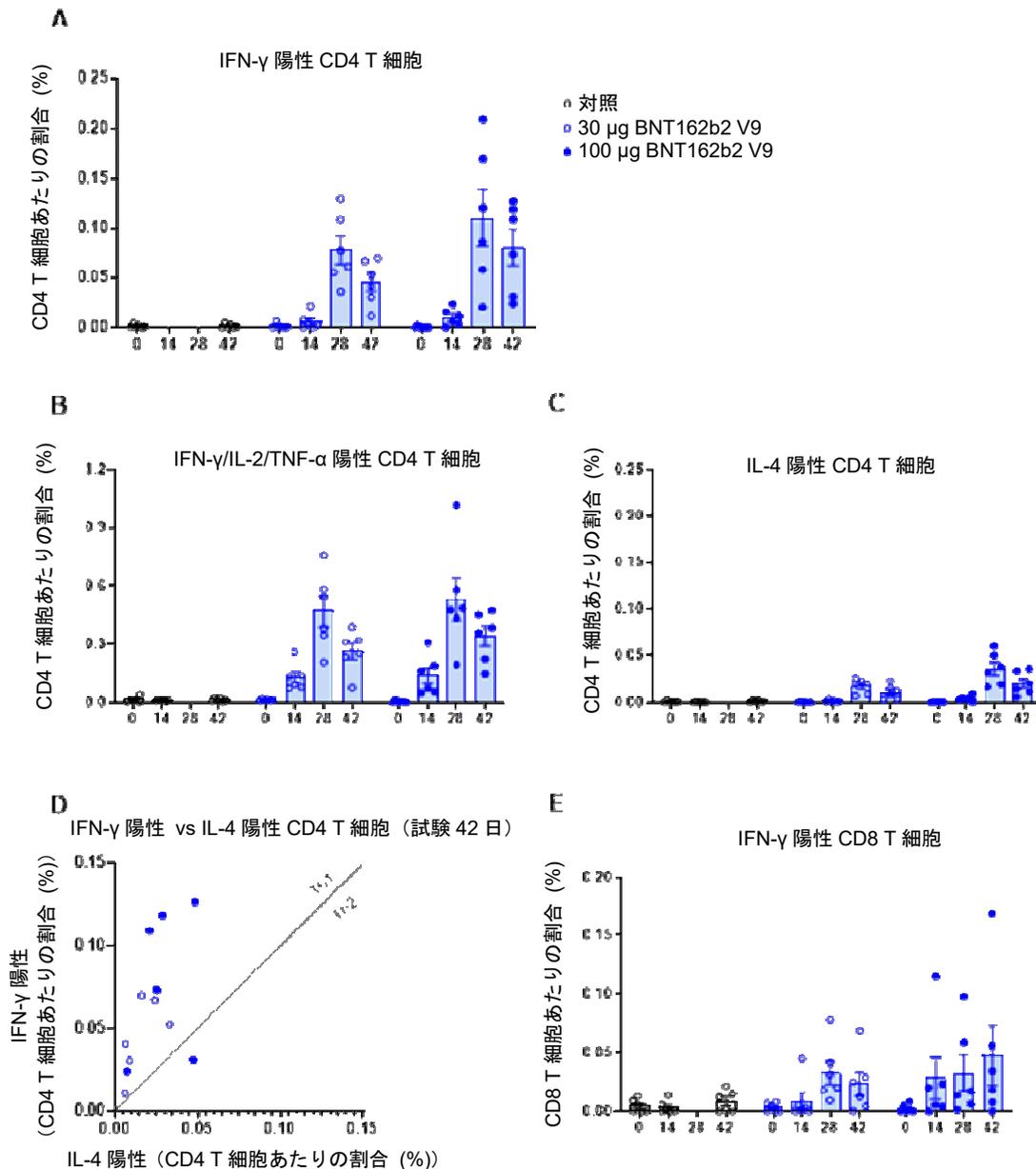
対照群では、S タンパク質特異的 T 細胞応答はほとんど検出されなかった。BNT162b2 (V9)の 30 および 100 µg RNA 投与群では、BNT162b2 (V9)の 2 回目投与後に IFN-γ分泌細胞数の顕著な増加がみられ、一方で IL-4 分泌細胞数の増加は軽微であった (Figure 17)。また、BNT162b2 (V9)群の PBMC を用いた細胞内サイトカイン測定では、S タンパク質刺激による IFN-γ 産生性 T 細胞応答の誘導 (IFN-γ, IL-2 または TNF-α を産生する CD4 陽性細胞の増加) がみられ (Figure 18-A および B), IL-4 産生性 CD4 陽性細胞の割合は低かった (Figure 18-C)。このことから、BNT162b2 (V9) 投与による Th1 偏向性応答の誘導が示された (Figure 18-D)。また、BNT162b2 (V9)は S タンパク質特異的 IFN-γ 産生性 CD8 陽性 T 細胞応答も誘導した (Figure 18-E)。

**Figure 17 BNT162b2 (V9)を投与したアカゲザルの PBMC を用いた IFN- $\gamma$  および IL-4 ELISpot 測定**



雄性アカゲザル (2~4 年齢, 6 匹/群) に BNT162b2 (V9) を 0 (対照: 生理食塩液), 30 または 100  $\mu$ g RNA の用量で試験 0 日および 21 日に筋肉内投与した。試験 0 (初回投与前), 14, 28 および 42 日に採取した PBMC を用い, S タンパク質刺激後の IFN- $\gamma$  (A) および IL-4 (B) 分泌細胞を ELISpot 法により測定した。群平均値 ( $\pm$ 標準誤差) をバーで, 個体値を点で表す。点線は定量下限値を指す。(C) 試験 42 日 (2 回目投与後 21 日) の IFN- $\gamma$  産生細胞 (Th1 細胞) および IL-4 産生細胞 (Th2 細胞) の相関性。

SFC: スポット (各サイトカインの陽性反応を表す) 形成細胞, PBMC: 末梢血単核球

**Figure 18** BNT162b2 (V9)投与アカゲザルにおける S タンパク質特異的 CD4 陽性 T 細胞または CD8 陽性 T 細胞の細胞内サイトカイン

雄性アカゲザル (2~4 年齢, 6 匹/群) に BNT162b2 (V9) を 0 (対照: 生理食塩液), 30 または 100  $\mu$ g RNA の用量で試験 0 日および 21 日に筋肉内投与した。試験 0 (初回投与前), 14, 28 および 42 日に採取した PBMC を用い, フローサイトメトリー分析法による細胞内サイトカイン測定を実施した。(A) CD4 陽性 T 細胞の IFN- $\gamma$  陽性率, (B) CD4 陽性 T 細胞の IFN- $\gamma$ , IL-2 または TNF- $\alpha$  陽性率, (C) CD4 陽性 T 細胞の IL-4 陽性率, (E) CD8 陽性 T 細胞の IFN- $\gamma$  陽性率を各図に示す。群平均値 ( $\pm$ 標準誤差) をバーで, 個体値を点で表す。(D) 試験 42 日 (2 回目投与後 21 日) の IFN- $\gamma$  陽性 CD4 陽性 T 細胞 (Th1 細胞) と IL-4 陽性 CD4 陽性 T 細胞 (Th2 細胞) の発現率の相関性。

#### 2.4.2. アカゲザルにおける BNT162b2 (V9)の SARS-CoV-2 感染保護効果

報告書番号：VR-VTR-10671

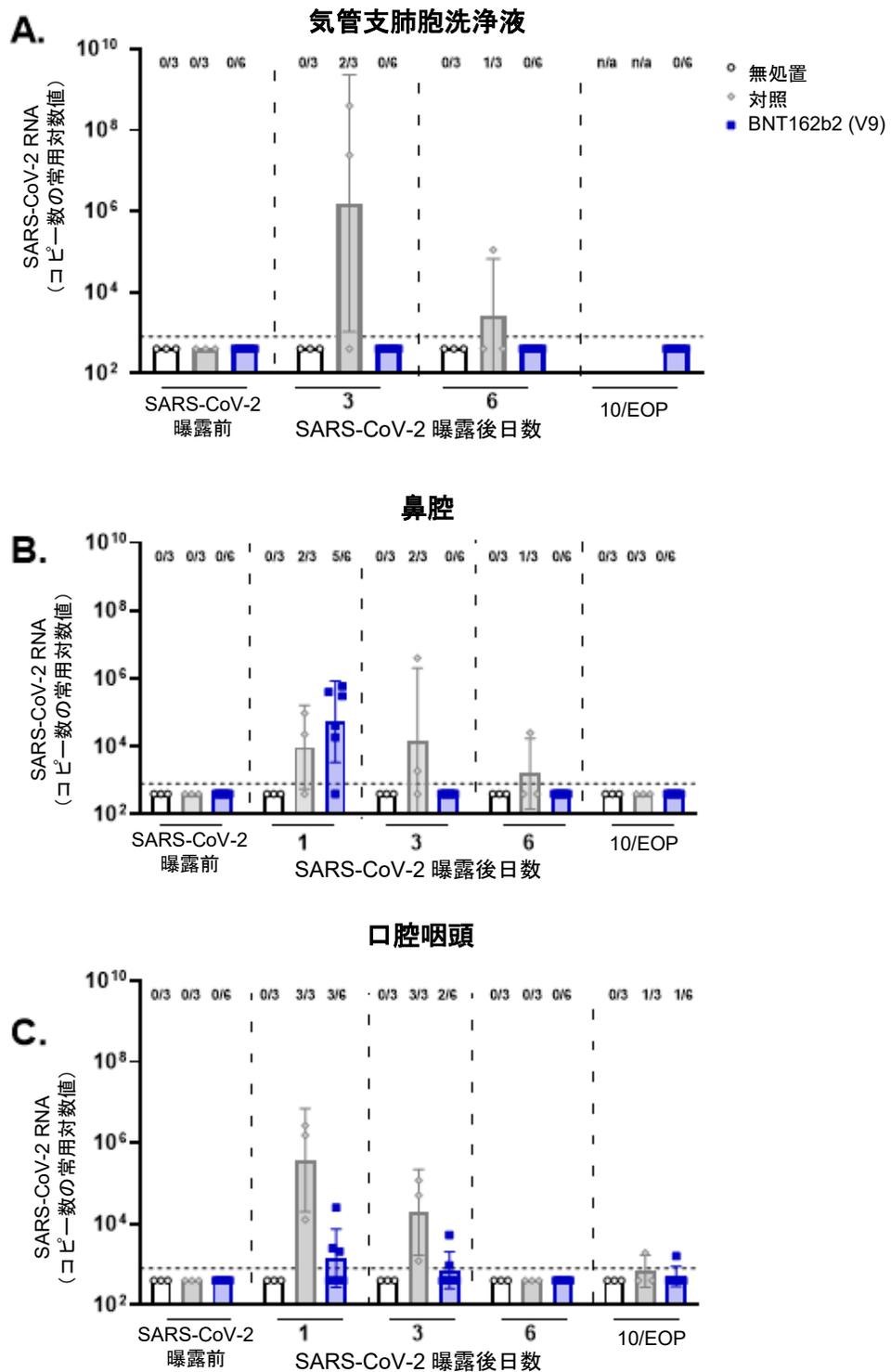
ヒトにおいて、SARS-CoV-2 感染による COVID-19 の徴候、症状およびその程度は多様である。SARS-CoV-2 を感染させたアカゲザルはヒト COVID-19 患者と類似した症状を示し、上気道および下気道における急性かつ一過性の感染がみられ、消化管にもウイルス増殖の徴候を呈する<sup>27,28</sup>。様々な程度の肺炎が主として感染後 2~4 日程度の感染ピーク時にみられることが報告されている<sup>29</sup>。ACE2 受容体の、特に結合に重要とされる領域のアミノ酸配列はヒトとアカゲザルで 100% 相同であり<sup>30</sup>、アカゲザルが SARS-CoV-2 動物モデルとして忠実に感染症患者<sup>9</sup>と類似した症状を呈する要因と考えられる。

雄性アカゲザル (2~4 年齢) に BNT162b2 (V9)の LNP 封入体 (脂質の組成は製造販売承認申請製剤と同一：以下「BNT162b2 (V9)」と表記) を 0 (対照：生理食塩液, 3 匹) または 100 µg RNA (6 匹) の用量で試験 0 および 21 日に筋肉内投与した。いずれも投与容量は 0.5 mL とした。2 回目投与後 55 日に、 $1.05 \times 10^6$  プラーク形成単位の SARS-CoV-2 (系統：USA-WA1/2020) を経鼻および気管内に均等に分けて曝露した<sup>31</sup>。また、無処置群 (上記投与群と同等の年齢, 3 匹) を設定し、ウイルス曝露の代わりに培養液を投与した。鼻腔および口腔咽頭のスワブ検体、ならびに気管支肺胞洗浄 (BAL) 液を経時的に採取し、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-qPCR) により SARS-CoV-2 RNA (ゲノム RNA および転写産物) を検出した (評価方法：M2.6.2.7.9 項)。RT-qPCR 評価に加え、後述の一般症状観察、病理組織学的検査ならびに X 線およびコンピュータ断層撮影 (CT) 検査は盲検化で実施した。

無処置群の全試料ならびに対照群および BNT162b2 (V9)群のウイルス曝露前に得た試料中の SARS-CoV-2 RNA はいずれも検出下限未満であった (Figure 19)。対照群から採取した BAL 液中に SARS-CoV-2 RNA が検出された (SARS-CoV-2 曝露後 3 日：2/3 例, 曝露後 6 日：1/3 例) が、BNT162b2 (V9)群の BAL 液中には検出されず (Figure 19-A) RNA 発現レベルに統計学的有意差が示された ( $p=0.0014$ )。

対照群から採取した鼻腔検体では、SARS-CoV-2 曝露後 1, 3 および 6 日に SARS-CoV-2 RNA が検出された。BNT162b2 (V9)群の鼻腔検体では、投与後 1 日にのみ SARS-CoV-2 RNA が検出され、曝露後 3 日以降は検出されなかった (Figure 19-B)。口腔咽頭検体における SARS-CoV-2 RNA の検出パターンも、鼻腔検体と同様であった (Figure 19-C)。

**Figure 19** 感染性 SARS-CoV-2 曝露後のアカゲザルから採取した気管支肺胞洗浄液ならびに鼻腔および口腔咽頭検体中の SARS-CoV-2 RNA 発現

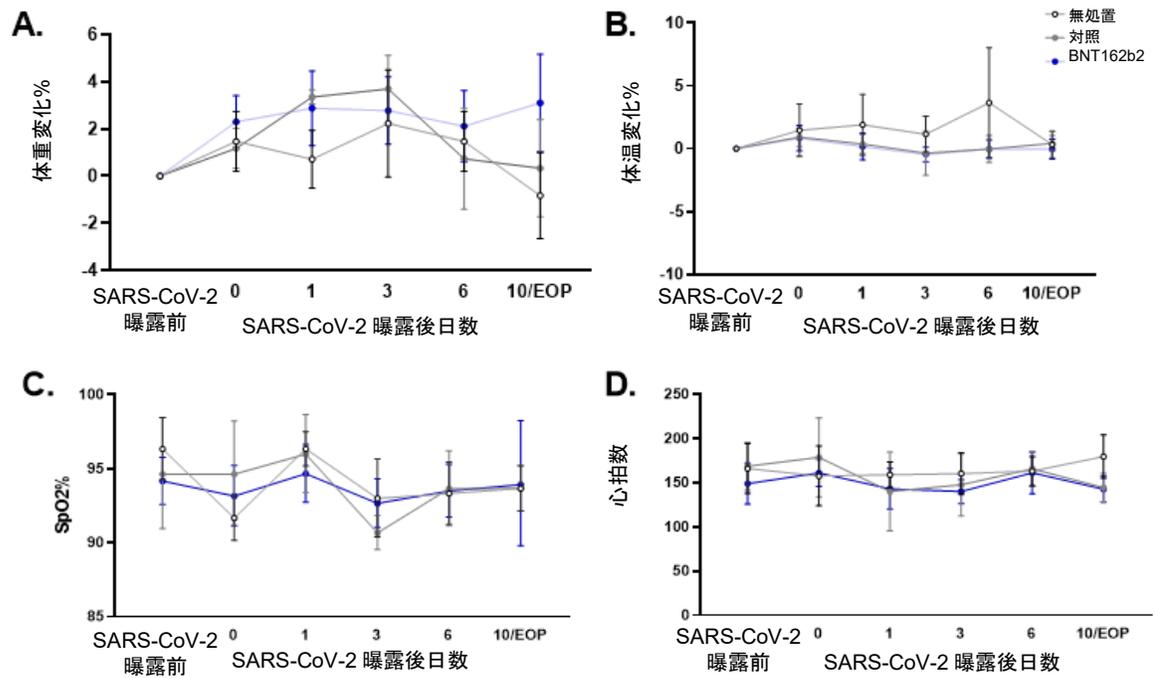


雄性アカゲザル（2～4 年齢）に BNT162b2 (V9)を 0（対照：生理食塩液，3 匹）または 100 µg RNA（6 匹）の用量で試験 0 日および 21 日に筋肉内投与し，2 回目投与後 55 日に， $1.05 \times 10^6$  プラーク形成単位の SARS-CoV-2 を経鼻および気管内に均等に分けて曝露した。また，無処置群（年齢は同等，3 匹）を設定し，ウイルス曝露の代わりに培養液を投与した。RT-qPCRにより，A)気管支肺胞洗浄液，B)鼻腔およびC)口腔咽頭検体中の SARS-CoV-2 RNA を検出した。点線は検出下限値（LLOD）を表す。LLOD 未満の値は LLOD の 1/2 として平均値を算出した。対照群と BNT162b2 (V9)群の SARS-CoV-2 RNA 発現レベルを，ノンパラメトリック検定（Friedman 検定：日内のウイルス RNA shedding データの順位に基づく）により比較したところ，p 値は BAL 液で 0.0014，鼻腔検体で 0.2622，口腔咽頭検体で 0.0007 であった。p 値の算出には，SAS 9.4 の PROC RANK および PROC GLM を使用した。  
EOP：最終測定時点

対照群では BAL 液等の検体で SARS-CoV-2 RNA が検出されたにもかかわらず，いずれの動物においても疾患による一般症状の変化は認められなかったことから（Figure 20），2～4 年齢のアカゲザルは疾患モデルというより感染モデルとしてより有用である可能性が考えられた。資格を有する獣医放射線科医師 2 名により，肺の X 線（Figure 21-A）および CT（Figure 21-B）画像のスコア判定を盲検下で実施した（評価方法：M2.6.2.7.10 項）。各スコアは 2 名のスコアの平均値をとった。肺の異常を示す所見が対照群の X 線および CT 画像で認められたが，BNT162b2 (V9)群および無処置群では認められなかった。SARS-CoV-2 を曝露後 7 日または 8 日に剖検を実施したところ，いずれの臓器においても肉眼的所見はみられなかった。肺の病理組織学的検査では炎症性変化が主な変化として認められた（評価方法：M2.6.2.7.11 項）が，BNT162b2 群において肺に浸潤が認められた炎症性細胞のうち好酸球はごく少数であり，無処置群および対照群で示されたレベルを上回るものではなかった。獣医病理学者による盲検下での半定量的な肺の炎症面積のスコアリングの結果，幾何平均スコアは対照群と BNT162b2 (V9)群で明確な違いはなく，むしろ BNT162b2 (V9)群でわずかに低い傾向がみられ，BNT162b2 (V9)投与による呼吸器疾患増強は示唆されなかった（Figure 22）。

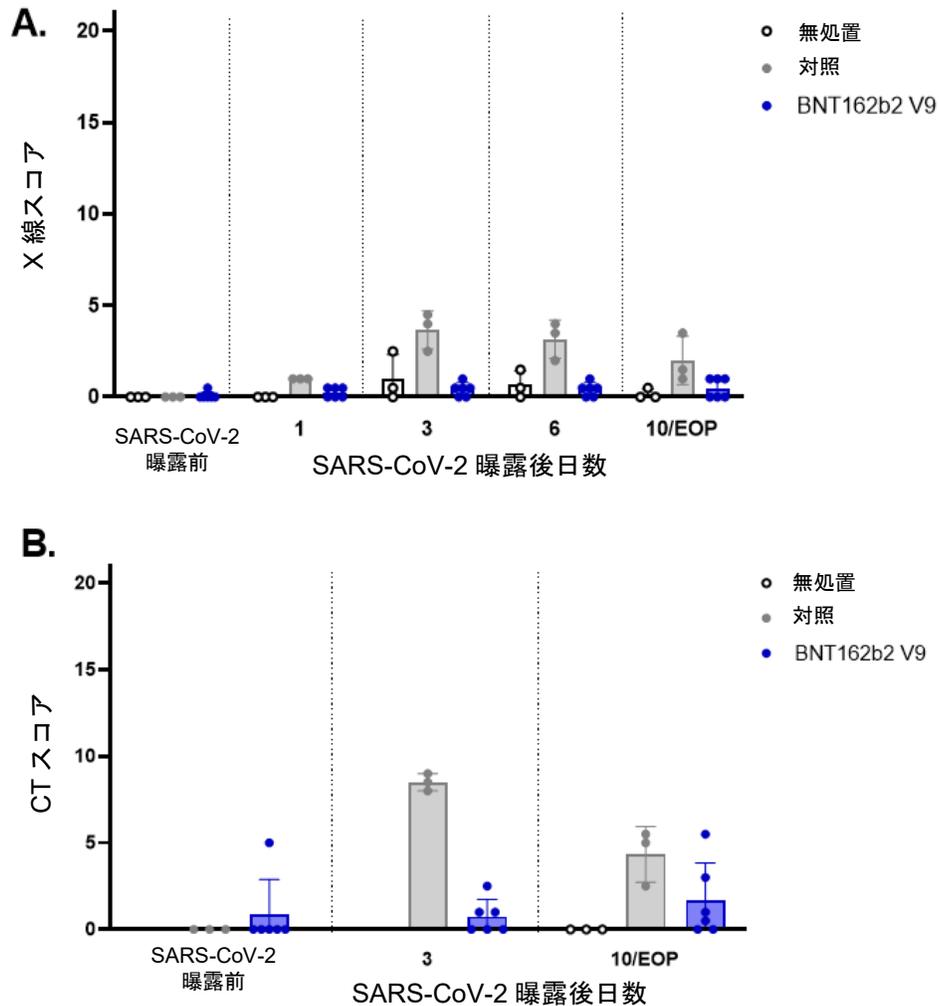
以上のことから，感染性 SARS-CoV-2 を曝露したアカゲザルに対する BNT162b2 (V9)の前投与により肺が保護されることが本試験結果から示された。また，ワクチン関連性の疾患増強は認められなかった。

Figure 20 感染性 SARS-CoV-2 曝露後のアカゲザルの一般症状



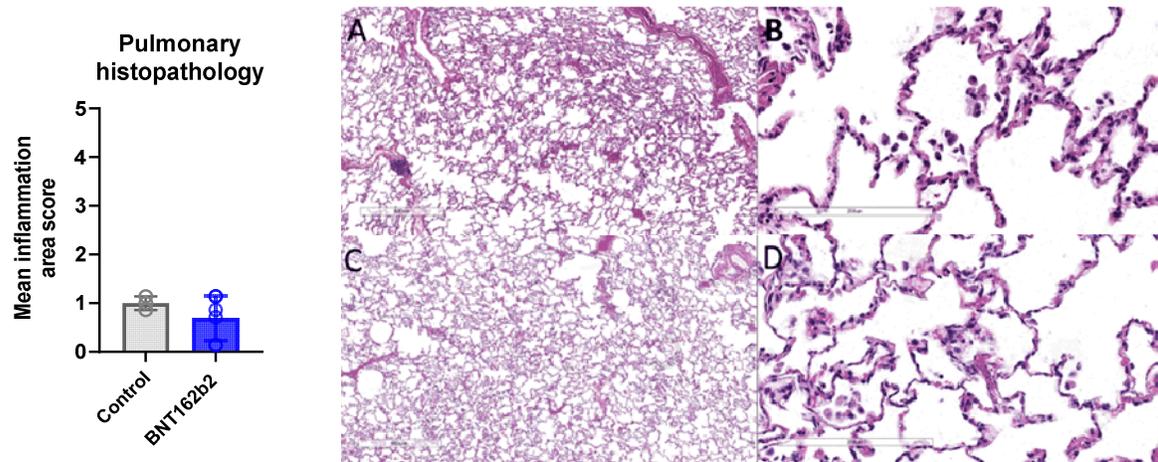
無処置群 (3 匹), 対照群 (3 匹) および BNT162b2 (V9) 群 (6 匹) の体重変化率 (A), 体温変化率 (B), 酸素飽和度 (C), 心拍数 (D)。試験デザインについては Figure 19 の脚注参照。  
EOP: 最終測定時点

Figure 21 感染性 SARS-CoV-2 曝露後のアカゲザルの肺の X 線および CT 画像スコア



無処置群 (3 匹), 対照群 (3 匹) および BNT162b2 (V9) 群 (6 匹) (試験デザインについては Figure 19 の脚注参照) の SARS-CoV-2 曝露前ならびに曝露後 3 日および 10 日に, 胸部 X 線および CT 検査を実施した。有資格の獣医放射線科医師 2 名が画像をスコア判定した。7 つの肺葉の X 線 (A) および CT (B) 画像について, 各肺葉の重症度をスコア化 (各領域 0~3 点) して記録した。個体のスコアを示す図中の点は, 2 名の評価の平均を表す。バーは群平均スコア ( $\pm$ 標準偏差) を示す。

EOP : 最終測定時点

**Figure 22 感染性 SARS-CoV-2 曝露後のアカゲザルの肺の病理組織学的検査**

対照群 (3 匹) および BNT162b2 (V9) 群 (6 匹) の SARS-CoV-2 曝露後 7 日または 8 日の肺炎症面積スコア (左図)。各個体の 7 つの肺葉について、観察した領域当たりの炎症面積の割合に基づいてスコアリングし、その平均を個体のスコアとした。個体スコアを点で、各群の幾何平均スコアをバーで示す。右図は対照群 (A および B) ならびに BNT162b2 (V9) 群 (C および D) の肺の顕微鏡写真の典型例 (ヘマトキシリン・エオジン染色: A および C は 2.5 倍, B および D は 20 倍対物レンズによる観察像)。

## 2.5. 反復投与毒性試験および生殖発生毒性試験における免疫原性評価

ラットを用いた反復投与毒性試験 (2 試験) および生殖発生毒性試験において BNT162b2 の免疫原性を評価した。

### 2.5.1. 反復投与毒性試験でラットに BNT162b2 (V8) を週 1 回、計 3 回投与後の免疫原性評価

報告書番号: [38166](#)

ラットを用いた反復投与毒性試験 (38166 試験: [M2.6.6.3.1](#) 項) において BNT162b2 (V8) の免疫原性を評価した。本製造販売承認申請の対象である BNT162b2 (V9) は、BNT162b2 (V8) と比べてシトシンを多く含むが、これはコドン最適化を目的とするものであり、両バリエントがコードするタンパク質のアミノ酸配列は同一である。

雌雄 Wistar Han ラットに BNT162b2 (V8) の LNP 封入体 (脂質の組成は製造販売承認申請製剤と同一: 以下「BNT162b2 (V8)」と表記) を 100  $\mu\text{g}$  RNA の用量で週 1 回、計 3 回筋肉内投与した。投与容量は 1 回につき 200  $\mu\text{L}$  とした。試験 17 日 (3 回目投与後 2 日) および 38 日 (3 回目投与後 23 日) に雌雄各 5 匹/時点から血清を採取し、抗原特異的 IgG 誘導および疑似ウイルス中和活性を評価した (評価方法: [M2.6.2.7.1](#) 項および [M2.6.2.7.2](#) 項)。

BNT162b2 (V8) の投与により、SARS-CoV-2 S タンパク質の S1 および RBD に対する IgG が誘導された。両測定日で強い抗体応答が認められたが、試験 38 日の方がより高値であり、経時的な上昇が示された。S1 および RBD に対する IgG 濃度を [Table 2](#) に示す。

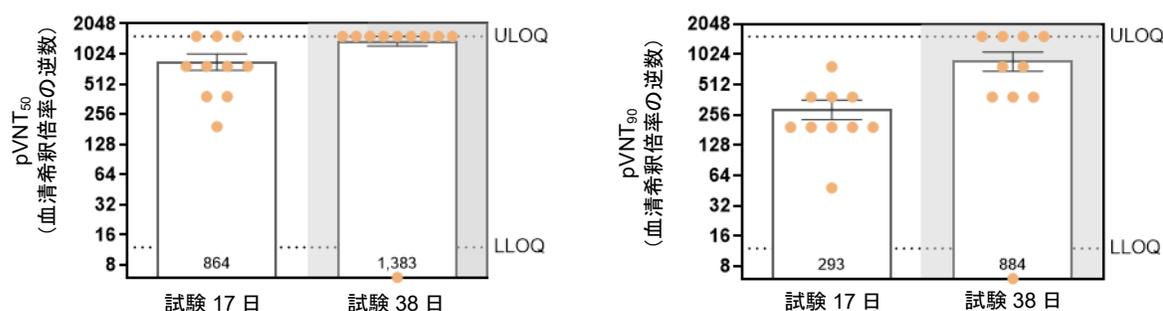
**Table 2** ラットに BNT162b2 (V8)投与後の SARS-CoV-2 S タンパク質に対する IgG 濃度

		IgG 濃度 (mg/mL)
試験 17 日	抗 S1	1.76 ± 0.16
	抗 RBD	2.33 ± 0.19
試験 38 日	抗 S1	3.46 ± 0.52
	抗 RBD	4.90 ± 0.87

平均値±標準誤差

疑似ウイルス中和活性の評価結果は、抗原特異的 IgG 産生の結果を反映するものであった。すなわち、ラットに BNT162b2 (V8)を投与することで、疑似ウイルス感染に対する中和抗体が誘導された。上記の抗原特異的 IgG 産生の結果と同様、中和抗体価も試験 17 日より試験 38 日で高く、経時的な上昇が認められた。試験 38 日に pVNT<sub>50</sub>が 8/10 例で定量上限値である 1536 を超えたことを受け、本試験においては pVNT<sub>90</sub>についても評価した (Figure 23)

**Figure 23** ラットに BNT162b2 (V8)投与後の疑似ウイルス中和抗体価



Wistar Han ラット (雌雄各 10 匹) に BNT162b2 (V8)を 100 µg RNA の用量で週 1 回、計 3 回筋肉内投与した。試験 17 日および 38 日に雌雄 5 匹/時点から採血し、疑似ウイルスに対する血清中和抗体価を測定した。疑似ウイルス感染細胞数が血清非添加の陽性対照と比して 50%低下 (pVNT<sub>50</sub>, 左図) または 90%低下 (pVNT<sub>90</sub>, 右図) を示した個体別中和抗体価 (そのときの血清希釈倍率の逆数) を点で示し、群平均値 (±標準誤差) をバーで示した。なお、対照群の血清中和抗体価はすべてが定量下限値未満であった。  
LLOQ: 定量下限値, ULOQ: 定量上限値

### 2.5.2. 反復投与毒性試験でラットに BNT162b2 (V9)を週 1 回、計 3 回投与後の免疫原性評価

報告書番号: ■ GR142

ラットを用いた反復投与毒性試験 (■ GR142 試験: M2.6.6.3.2 項) において BNT162b2 (V9)の免疫原性を評価した。

雌雄 Wistar Han ラットに BNT162b2 (V9)の LNP 封入体 (脂質の組成は製造販売承認申請製剤と同一: 以下「BNT162b2 (V9)」と表記) を 30 µg RNA の用量で週 1 回、計 3 回筋肉内投与した。投与容量は 1 回につき 60 µL とした。初回投与前 5 日および試験 17 日 (3 回目投与後 2 日) に雌雄各 15 匹、試験 38 日 (3 回目投与後 23 日) に雌雄各 5 匹から血清を採取し、SARS-CoV-2 中和抗体価を測定した。

BNT162b2 (V9)を投与した雌雄ラットにおいて、試験 17 日および 38 日に SARS-CoV-2 感染に対する中和抗体の誘導が認められた (Table 3)。一方、試験開始前および対照群において中和抗体の誘導は示されなかった。

**Table 3** ラットに BNT162b2 (V9)投与後の SARS-CoV-2 中和抗体価の幾何平均値

		対照 (0 µg RNA/回)	BNT162b2 (V9) (30 µg RNA/回)
初回投与前 5 日	雄	5	5
	雌	5	5
試験 17 日	雄	5	1114
	雌	5	2501
試験 38 日	雄	5	5120
	雌	5	5120

中和作用が示されなかった場合は中和抗体価を 5 と定義した。

### 2.5.3. ラットを用いた生殖発生毒性試験における免疫原性評価

報告書番号：■256434

ラットを用いた生殖発生毒性試験 (■256434 試験：M2.6.6.6.1 項) において BNT162b2 (V9)の免疫原性を評価した。

雌性 Wistar Han ラットに BNT162b2 (V9)の LNP 封入体 (脂質の組成は製造販売承認申請製剤と同一：以下「BNT162b2 (V9)」と表記) を 30 µg RNA の用量で計 4 回 (無処置雄性ラットとの交配前 21 日および 14 日ならびに妊娠 9 日および 20 日) 筋肉内投与した。投与容量は 1 回につき 60 µL とした。BNT162b2 (V9)群 44 匹中 22 匹を妊娠 21 日に帝王切開し、胚・胎児発生への影響を評価するサブグループに、残りの 22 匹/群は自然分娩させ、分娩後 21 日まで母動物の哺育状態および出生児の発達への影響を評価するサブグループに割り当てた。初回投与前、交配直前、妊娠 21 日 (帝王切開サブグループ) および分娩後 21 日 (自然分娩サブグループ) に母動物から、妊娠 21 日に胎児から、分娩後 21 日に出生児から血清を採取し、SARS-CoV-2 中和抗体価を測定した。

BNT162b2 (V9)を投与した母動物で SARS-CoV-2 に対する中和抗体応答がいずれの測定日においても認められ、胎児および出生児でも検出された (Table 4)。一方、初回投与前および対照群において中和抗体の誘導は示されなかった。

**Table 4** ラットに BNT162b2 (V9)投与後の SARS-CoV-2 中和抗体価の幾何平均値

		対照 (0 µg RNA/回)	BNT162b2 (V9) (30 µg RNA/回)
母動物	初回投与前	5	5.3
	交配直前	5	3886.4
	妊娠 21 日	5	3445.5
	分娩後 21 日	5	3620.4
胎児	妊娠 21 日	5	640.0
出生児	分娩後 21 日	5	4561.4

中和作用が示されなかった場合は中和抗体価を 5 と定義した。

### 3. 副次的薬理試験

BNT162b2 の副次的薬理試験は実施しなかった。

### 4. 安全性薬理試験

反復投与毒性試験 (M2.6.6.3 項) において, BNT162b2 の毒性は認められず, 中枢神経系, 呼吸系および心血管系などの生理機能への影響が示唆される変化はみられなかったことから, WHO ガイドライン<sup>32</sup>に準拠し, BNT162b2 の安全性薬理試験は実施しなかった。

### 5. 薬力学的薬物相互作用試験

BNT162b2 の薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

### 6. 考察および結論

BNT162b2 にコードされる遺伝子組換え P2 S は, 一過性に哺乳類細胞表面に発現し, 可溶性 ACE2 受容体および SARS-CoV-2 中和モノクローナル抗体と高い親和性を示して結合した。精製した P2 S 三量体構造の cryoEM による解析では, 既報の P2 S 構造との高い類似性が示された。良好な解像度の融合前三量体構造が示され, ACE2 および各種ヒト中和抗体の高い親和性の結合がみられたことから, P2 S 全長体は, ACE2 結合部位および種々の SARS-CoV-2 中和抗体が標的とするエピトープを有することが明確に示された。

マウスおよびサルを用いた免疫原性評価の結果, BNT162b2 (V9)投与後 14 日に抗原結合 IgG および中和抗体応答が検出され, サルにおいてはそれらの応答が 2 回目投与後にさらに増強された。ラットを用いた反復投与毒性試験および生殖発生毒性試験でも同様の免疫原性が認められた。SARS-CoV-2 感染サルモデルでは, SARS-CoV-2 曝露後 3 日から BAL 液ならびに鼻腔および口腔咽頭検体を経時的に採取したところ, BNT162b2 (V9)の前投与により上気道感染の部分的な保護効果が得られ, 下気道に SARS-CoV-2 RNA は検出されなかった。BNT162b2 (V9)を投与後 SARS-CoV-2 を曝露したサルにおいて, 疾患増強を示唆する所見は認められなかった。

以上のように, P2 S 全長体をコードする modRNA である BNT162b2 をマウス, ラットおよびサルに投与したところ, 顕著な免疫応答が誘導された。SARS-CoV-2 S タンパク質は中和抗体の主要な標的と考えられており, それをワクチン抗原としてコードする modRNA を動物に投与することで, 強力な中和抗体応答, Th1 偏向性 CD4 陽性 T 細胞応答および IFN- $\gamma$  産生性 CD8 陽性 T 細胞応答が誘導された。多様な免疫機構が誘導されたことから, 防御の最前線としてのウイルスの感染阻害に加え, 副次的な防御作用としてウイルス感染細胞除去作用をもたらすことが示唆された。

### 7. 免疫原性および有効性の評価方法

#### 7.1. SARS-CoV-2 S1 および RBD の直接 ELISA

げっ歯類を用いた非臨床試験では, 遺伝子組換え S1 タンパク質または遺伝子組換え RBD を抗原とした直接 ELISA 法で, S1 結合 IgG および RBD 結合 IgG の血清試料中濃度を測定した。抗原である遺伝子組換えタンパク質 [炭酸ナトリウム緩衝液中に含有 (100 ng/100  $\mu$ L)] を MaxiSorp プレートに固相化し, 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識二次抗体およびテトラメチルベンジジン基質を用いて固相化抗原結合 IgG を検出した。BioTek Epoch リーダーおよび Gen5 ソフト

ウェア version 3.0.9 を用いて吸光度データを収集した。各試料のシグナルを、アイソタイプ対照の標準曲線を用いて抗体濃度に換算した。

### 7.2. げっ歯類における VSV/SARS-CoV-2 疑似ウイルス中和試験

げっ歯類を用いた免疫原性試験におけるウイルス中和活性評価では、SARS-CoV-2 の代替として疑似ウイルスを用いて中和抗体価 (pVNT) 測定を行った [SARS-CoV-2 の取り扱いはバイオセーフティレベル 3 (BSL3) のバイオハザード対策施設が必要とされる]。疑似ウイルスとして、水疱性口内炎ウイルスの G タンパク質 (VSV-G) の代わりに GFP をコードする遺伝子組換え複製欠損性 VSV ベクター (VSVΔG-GFP) に SARS-CoV-2 S タンパク質を発現させたものを用いた。疑似ウイルス化の手順は公表論文に従った<sup>33,34</sup>。段階希釈したマウス血清と疑似ウイルスを室温で 10 分間インキュベートしたのち、96 ウェルプレート中の単層の Vero-76 細胞に播種した。疑似ウイルス量は 300 IU/ウェルとした。IncuCyte 生細胞解析システムと IncuCyte 2019B Rev2 ソフトウェアを用いて、播種後 16~24 時間における 1 ウェルあたりの GFP 陽性感染細胞数を計測した。血清非添加疑似ウイルス陽性対照と比較して、感染細胞数が 50%低下した最初の血清希釈倍率の逆数を pVNT<sub>50</sub> (疑似ウイルス感染の 50%低下を示す中和抗体価) として中和活性評価のパラメータとした。

### 7.3. 表面プラズモン共鳴分光法による血清 IgG の SARS-CoV-2 S1 および RBD 結合親和性の検討

マウス血清中 IgG の S1 または RBD に対する結合速度を Biacore T200 機器を用いて評価した。CM5 センサーチップ上に約 10,000 反応単位 (RU) の抗マウス Fc 抗体を共有結合により固定した。マウスの希釈血清試料中に存在する IgG を抗マウス Fc 抗体に捕捉させ、ヒスチジンタグ付き S1 (S1-His) および RBD-His への結合について、それぞれ 25~400 nmol/L および 1.5625~50 nmol/L の濃度範囲で評価し、マルチサイクルカイネティクス法を用いて解析した。Biacore T200 Evaluation Software Version 3.1 を用いて、1:1 Langmuir モデルへの global kinetic fit により結合速度を算出した。

### 7.4. SARS-CoV-2 S1 結合 IgG Luminex イムノアッセイ

サルを用いた試験では、免疫原性評価の一環として直接結合 Luminex イムノアッセイ (dLIA) により血清中 S1 結合 IgG 濃度を定量した (VR-MQR-10211)。C 末端を Avitag で標識した遺伝子組換え SARS-CoV-2 S1 をストレプトアビジン固相 Luminex マイクロビーズに結合させ、捕捉した血清 IgG を二次抗体の R-フィコエリスリン標識ヤギ抗ヒトポリクローナル抗体で検出した。Luminex リーダーを用いて蛍光強度中央値 (MFI) を読み取り、標準曲線を用いて IgG 濃度 (U/mL) に換算した。

### 7.5. サルにおける SARS-CoV-2 中和試験

サルを用いた試験では、臨床試験と同一の方法で SARS-CoV-2 中和試験を実施した (VR-MQR-10214)。本試験には、Xie らによって報告された、逆遺伝学的手法により表現型復帰させ、ウイルスゲノムのオープンリーディングフレーム 7 (ORF7) に mNeonGreen 遺伝子をレポーターとして挿入した SARS-CoV-2 の系統 (USA\_WA1/2020) を使用した<sup>35</sup>。このレポーターウイルスのプラーク形態は野生型ウイルスと類似しており、また両者は同様の成長曲線を辿る<sup>26</sup>。本レポーターウイルスのマスターストックは Vero E6 細胞において培養した<sup>35</sup>。感染細胞を正確に定量するため、段階希釈したサル非働化血清とレポーターウイルスを 37°C で 1 時間インキュベートしたのち、96 ウェルプレート中の単層 Vero CCL81 細胞に播種した。10%~30%の細胞を

感染させることを目途とし、ウイルス量は  $2 \times 10^4$  PFU/ウェルとした。播種後 16~24 時間のレポーターウイルス感染巢の蛍光検出を Cytation 7 細胞イメージング・マルチモードプレートリーダーと Gen5 Image Prime version 3.09 を用いて実施し、ウェルあたりの総細胞数については核染色 (Hoechst 33342) により計測した。GraphPad Prism version 8.4.2 を用いて、各血清希釈段階における中和活性率を 4-parameter (4PL) logistical fit に当てはめることで、抗体価を算出した。蛍光ウイルス巢が 50%低下したときの希釈倍率の逆数を、ウイルス感染細胞の 50%低下を示す中和抗体価 (VNT<sub>50</sub>) とした。

### 7.6. マウス脾細胞における ELISpot および放出サイトカイン測定

摘出したマウス脾臓より、70  $\mu$ m のセルストレーナーを用いて脾細胞を単離し、リン酸緩衝液で脾細胞浮遊液を調製した。低張溶解により赤血球を除去した。

マウス IFN- $\gamma$  ELISpot<sup>PLUS</sup> キットを用いて、ELISpot 測定を実施した。S タンパク質全長体のペプチド混合物 (ペプチドの終濃度は 0.1  $\mu$ g/mL) または対照ペプチド [gp70-AH1 (SPSYVYHQF) <sup>36</sup>] を用いて、 $5 \times 10^5$  個に調製した脾細胞を *ex vivo* で刺激した。ストレプトアビジン結合アルカリホスファターゼおよび BCIP/NBT-plus 基質を添加し、ELISpot プレートリーダー (ImmunoSpot S6 Core Analyzer) を用いて IFN- $\gamma$  の陽性反応を表すスポットを読み取り、ImmunoCapture V7.0 および ImmunoSpot V57.0 を用いてスポット形成細胞数を計測した。また、IFN- $\gamma$  陽性 T 細胞のサブセット解析を行うため、MACS MicroBeads [CD4 (L3T4) および CD8a (Ly-2)] を用い、脾細胞浮遊液から CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞を単離した。対照ペプチドまたは S タンパク質全長体のペプチド混合物 (ペプチドの終濃度は 0.1  $\mu$ g/mL) に加え、同系骨髄由来樹状細胞を添加することで、CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞を刺激した。

放出サイトカイン測定では、マウス脾細胞を S タンパク質全長体のペプチド混合物 (ペプチドの終濃度は 0.1  $\mu$ g/mL) または培養液で 48 時間刺激した。11-plex の Th1/Th2 マウス ProcartaPlex マルチプレックス免疫アッセイキットを用い、IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4、IL-5 および IL-13 の培養上清中濃度を測定した。Bioplex200 システムを用いて蛍光強度を測り、ProcartaPlex Analyst 1.0 ソフトウェアで解析した。

### 7.7. マウスリンパ節の免疫表現型解析

マウスより膝窩リンパ節、鼠径リンパ節および腸骨リンパ節を摘出後プールし、細断およびコラゲナーゼ D (1 mg/mL) で処理後、セルストレーナーを用いてリンパ節細胞を単離した。

マウスリンパ節を用いた T 細胞の免疫表現型解析では、リンパ節細胞  $1 \times 10^6$  個について、細胞の生死判定のために Fixable Viability Dye で染色し、さらに各抗原に対する直接標識抗体を用いて、細胞表面発現抗原を染色した。細胞は 2% RotiHistofix で洗浄し、一夜固定した (Fix/Perm バッファー、FoxP3/転写因子染色バッファーセット)。細胞内抗原染色を行う細胞については透過処理した。B 細胞の免疫表現型解析では、リンパ節細胞  $2.5 \times 10^5$  個を Fc block で処理し、T 細胞の手順とほぼ同様に、生死細胞および細胞表面発現抗原を識別するため染色した後、2% RotiHistofix で一夜固定し、一部の細胞については細胞内抗原染色を実施した。

用意した試料について、フローサイトメトリー分析法により T 細胞および B 細胞のサブセット測定を行った。それぞれ BD Symphony A3 および BD Celesta フローサイトメーター (用いたソフト

ウェアは BD FACSDiva version 9.1 および version 8.0.1.1) を用いて各サブセットの細胞数を計測し、FlowJo 10.6 で解析した。

### 7.8. サルにおける ELISpot および細胞内サイトカイン測定

凍結保存したアカゲザルの PBMC を加温したベンゾナーゼ含有無血清培地 AIM-V 中で融解し、1 回洗浄後、細胞数を  $2.5 \times 10^6$  個/mL に調整した。

ELISpot 測定では、サル IFN- $\gamma$  および IL-4 ELISpot 測定キットを使用した。ポリフッ化ビニリデンメンブレン 96 ウェルマイクロプレートを用いてリン酸緩衝生理食塩液で洗浄し、AIM-V でブロッキング処理した。IFN- $\gamma$  測定については  $1.0 \times 10^5$  個、IL-4 測定については  $2.5 \times 10^5$  個の PBMC を各ウェルに添加した。

S タンパク質全長体のペプチド断片 (アミノ酸 15 残基からなるペプチドで、うち 11 残基が重複) 混合物 ( $1 \mu\text{g/mL}$ ) を用いて、IFN- $\gamma$  測定については 24 時間、IL-4 測定については 48 時間、 $37^\circ\text{C}$  の条件下で細胞を刺激した。検査では各ウェルを triplicate で測定した。対照には DMSO、サイトメガロウイルスペプチド混合物および PHA を添加した。細胞除去後にプレートを洗浄し、ビオチン標識抗体およびストレプトアビジン-HRP 標識二次抗体を用いて各サイトカインの陽性反応を表すスポットを検出した。アミノエチルカルバゾール発色基質を添加後、赤色スポットが発生するまで、IFN- $\gamma$  測定については 10 分間、IL-4 測定については 30 分間室温でインキュベートした。CTL ImmunoSpot S6 Universal Analyzer を用いてプレートをスキャンし、スポット形成細胞数を計測した。DMSO 添加ウェルの背景値を差し引き、PBMC  $10^6$  個あたりのスポット形成細胞数を最終的な測定値とした。

フローサイトメトリー分析法による細胞内サイトカイン測定では、融解させた PBMC を 3~4 時間置いた後に無血清培地 AIM-V 入り 96 ウェルプレートに添加し、S タンパク質全長体のペプチド混合物 ( $1 \mu\text{g/mL}$ ) で刺激した。陽性対照としてブドウ球菌エンテロトキシン B ( $2 \mu\text{g/mL}$ ) を、陰性対照として 0.2% DMSO を用いた。アロフィコシアニン標識 CD107 モノクローナル抗体に加え、サイトカインを細胞内に貯留するために細胞内タンパク質輸送阻害剤である GolgiStop および GolgiPlug を各ウェルに添加し、細胞を  $37^\circ\text{C}$  で 12~16 時間インキュベートした。細胞を生死判定色素 eFluor 780 および Fc block で処理後、CD4 および CD8 特異的モノクローナル抗体で細胞表面を染色した。次に、細胞を固定および BDCytoFix/CytoPerm 溶液で透過処理し、各種タンパク質 (CD154, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ , CD3) 特異的モノクローナル抗体 (透過処理バッファーで希釈) を用いて細胞内染色を実施した。細胞を洗浄後、2%ウシ胎児血清 (FBS) 含有リン酸緩衝生理食塩液に再懸濁した。LSRFortessa フローサイトメーターでサイトカイン発現細胞を計測し、FlowJo 10.4.1 でデータを解析した。CD154 陽性 CD4 陽性 T 細胞および CD69 陽性 CD8 陽性 T 細胞におけるサイトカイン発現細胞をゲーティングにより求めた。DMSO 添加試料の背景値を差し引いて最終的な測定値とした。

### 7.9. SARS-CoV-2 ウイルス RNA の RT-qPCR

アカゲザル感染モデルから採取した BAL 液ならびに鼻腔および口腔咽頭検体中の SARS-CoV-2 ウイルス RNA の定量には、米国疾病管理予防センターが確立した 2019-nCoV\_N1 測定法を用いた。この測定法は、ウイルスゲノム RNA と転写産物の両方を検出する高感度 RT-PCR 法に基づくものである<sup>31</sup>。

### 7.10. サル肺の X 線検査およびコンピュータ断層撮影検査スキャン

Singh らおよび Kaushal らの手順に従い、肺の X 線検査および CT 検査を麻酔下で実施した<sup>31,37</sup>。X 線検査では、SARS-CoV-2 曝露前 1 週間、曝露後 1, 3 および 6 日ならびに試験終了時（曝露後 7, 8 または 10 日）に、3 方向（背腹正面および左右両側面）の胸部写真を撮影した。CT 検査では、対照群および BNT162b2 (V9)群については SARS-CoV-2 曝露前 1 週間、曝露後 3 および 6 日に、また、すべての群で試験終了時（試験 7, 8 または 10 日）に、高解像度 CT を実施した。撮影時には、テラゾールを 2~6 mg/kg の用量で初期負荷投与し、その後は Hallowell 2002 吸入麻酔器によりイソフルランを維持投与することで麻酔した。麻酔下で挿管し、吸気終末のタイミングで一時的に呼吸を止めて撮影を実施した。CT 検査には MultiScan LFER150 PET/CT スキャナーを用いた。Vivoquant 画像解析ソフトウェアを用いて得られた画像の解析を行った。資格を有する獣医放射線科医師 2 名が、画像のスコア判定を盲検下で実施した。7 つの肺葉について、各肺葉に 0~3 点の重症度スコアを付けた（最大スコアは 21 点）。なお、ウイルス曝露との関連性が明確でない肺病変（臥位や麻酔による無気肺など）は、0 点とした。

### 7.11. サル肺の病理組織学的検査

対照群および BNT162b2 (V9)群について、SARS-CoV-2 を曝露後 7 日または 8 日に剖検および病理組織学的検査を実施した。病理組織学的検査は、肺（7 つの肺葉）、腎臓、肝臓、脾臓、皮膚、大腸、小腸、心臓（冠動脈を含む）、骨髄、鼻中隔、舌、気管、縦隔リンパ節、粘膜皮膚境界部について実施した。各組織を摘出後に 10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋後、5  $\mu$ m に薄切して標本作製し、ヘマトキシリン・エオジンで染色した。

病理組織学的検査は、2 名の獣医病理学者が盲検下で実施した。肺は、浸潤細胞の種類や分布も踏まえて、半定量的な炎症面積スコアにより評価した。スコアリングの基準は、観察した領域当たりの炎症面積の推定の割合に基づいて「正常=0、炎症の割合が 10%未満=1、10~30%程度=2、30~60%程度=3、60~80%程度=4、80%超=5」と定義した。それぞれの肺の標本について個別にスコアリングした後、個体のすべての標本（各肺葉から 1 枚、計 7 枚の標本を評価）のスコア平均を個体値として群平均を算出し、呼吸器疾患増強の評価に用いた。

## 8. 図表

図表は本文中および概要表に示した。

## 参考文献

---

- <sup>1</sup> Pallesen J, Wang N, Corbett KS, et al. Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017;114(35):E7348-57.
- <sup>2</sup> Wrapp D, Wang N, Corbett KS, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 2020;367(6483):1260-3.
- <sup>3</sup> Kariko K, Buckstein M, Ni H, et al. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity* 2005;23(2):165-75.
- <sup>4</sup> Sahin U, Karikó K, Türeci Ö. mRNA-based therapeutics - developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2014;13(10):759-80.
- <sup>5</sup> Pardi N, Parkhouse K, Kirkpatrick E, et al. Nucleoside-modified mRNA immunization elicits influenza virus hemagglutinin stalk-specific antibodies. *Nat Commun* 2018;9(1):3361.
- <sup>6</sup> Pardi N, Hogan MJ, Pelc RS, et al. Zika virus protection by a single low-dose nucleoside modified mRNA vaccination. *Nature* 2017;543(7644):248-51.
- <sup>7</sup> Bestle D, Heindl MR, Limburg H, et al. TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation and spread of SARS - CoV - 2 in human airway epithelial cells and provide promising drug targets. Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.04.15.042085>. Accessed: 24 Sep 2020.
- <sup>8</sup> Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 2020; 181(2):271-280.e8.
- <sup>9</sup> Zhou M, Zhang X, Qu J. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): a clinical update. *Front Med* 2020;Apr 2:1-10.
- <sup>10</sup> de Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, et al. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 2016;14(8)(08):523-34.
- <sup>11</sup> Ke Z, Oton J, Qu K. et al. Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nature* 2020;10.1038/s41586-020-2665-2.
- <sup>12</sup> Zakhartchouk AN, Sharon C, Satkunarajah M, et al. Immunogenicity of a receptor-binding domain of SARS coronavirus spike protein in mice: implications for a subunit vaccine. *Vaccine* 2007;25(1):136-43.
- <sup>13</sup> Yong CY, Ong HK, Yeap SK, et al. Recent advances in the vaccine development against middle east respiratory syndrome-coronavirus. *Front Microbiol* 2019;10:1781.
- <sup>14</sup> Hulswit RJG, de Haan CAM, Bosch BJ. Coronavirus spike protein and tropism changes. *Adv Virus Res* 2016;96:29-57.

- 15 Al-Amri SS, Abbas AT, Siddiq LA, et al. Immunogenicity of candidate MERS-CoV DNA vaccines based on the spike protein. *Sci Rep* 2017;7:44875.
- 16 Jiang S, Hillyer C, Du L. Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and other human coronaviruses. *Trends Immunol* 2020; 41(5):355-9.
- 17 Zost SJ, Gilchuk P, Chen RE, et al. Rapid isolation and profiling of a diverse panel of human monoclonal antibodies targeting the SARS-CoV-2 spike protein. *BioRxiv* posted May 13, 2020, [www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.05.12.091462v1](http://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.05.12.091462v1).
- 18 Brouwer PJM, Caniels TG, van der Straten K. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science* 2020;369(6504):643-650.
- 19 Liu L, Wang P, Nair MS, et al. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature* 2020;584(7821):450-456.
- 20 Robbiani DF, Gaebler C, Muecksch F, et al. Convergent Antibody Responses to SARS-CoV-2 Infection in Convalescent Individuals. Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.05.13.092619>. Accessed: 24 Sep 2020.
- 21 Cai Y, Zhang J, Xiao T, et al. Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. *Science* 2020;10.1126/science.abd4251.
- 22 Henderson R, Edwards RJ, Mansouri K, et al. Controlling the SARS-CoV-2 spike glycoprotein conformation. *Nat Struct Mol Biol* 2020;27:925-933.
- 23 Wu Y, Wang F, Shen C, et al. A noncompeting pair of human neutralizing antibodies block COVID-19 virus binding to its receptor ACE2. *Science* 2020; 368(6496):1274-8.
- 24 Yuan M, Wu NC, Zhu X, et al. A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Science* 2020; 368(6491):630-3.
- 25 Hutloff A. Regulation of T follicular helper cells by ICOS. *Oncotarget* 2015;6(26)(Sep):21785-6.
- 26 Muruato AE, Fontes-Garfias CR, Ren P, et al. A high-throughput neutralizing antibody assay for COVID-19 diagnosis and vaccine evaluation. *Nat Commun* 2020;11(1):4059.
- 27 Zou L, Ruan F, Huang M, et al. SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *N Engl J Med* 2020;382(12):1177-9.
- 28 Kim JY, Ko JH, Kim Y, et al. Viral load kinetics of SARS-CoV-2 infection in first two patients in Korea. *J Korean Med Sci* 2020;35(7):e86.
- 29 Munster VJ, Feldmann F, Williamson BN, et al. Respiratory disease and virus shedding in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2. Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.03.21.001628>. Accessed: 24 Sep 2020.

- <sup>30</sup> Melin AD, Janiak MC, Marrone F, et al. Comparative ACE2 variation and primate COVID-19 risk. *BioRxiv* posted Apr 11, 2020, <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.09.034967v1.full.pdf>
- <sup>31</sup> Singh DK, Ganatra SR, Singh B, et al. SARS-CoV-2 infection leads to acute infection with dynamic cellular and inflammatory flux in the lung that varies across nonhuman primate species. Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.06.05.136481>. Accessed: 24 Sep 2020.
- <sup>32</sup> World Health Organization. WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines. Annex 1. In: World Health Organization. WHO technical report series, no. 927. Geneva, Switzerland; World Health Organization; 2005:31-63.
- <sup>33</sup> Berger Rentsch M, Zimmer G. A vesicular stomatitis virus replicon-based bioassay for the rapid and sensitive determination of multi-species type I interferon. *PLoS One* 2011; 6(10):e25858.
- <sup>34</sup> Baum A, Fulton BO, Wloga E, et al. Antibody cocktail to SARS-CoV-2 spike protein prevents rapid mutational escape seen with individual antibodies. *Science* 2020; First release
- <sup>35</sup> Xie X, Muruato A, Lokugamage KG, et al. An infectious cDNA clone of SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe* 2020; 27(5):841-848.e3.
- <sup>36</sup> Slansky JE, Rattis FM, Boyd LF, et al. Enhanced antigen-specific antitumor immunity with altered peptide ligands that stabilize the MHC-peptide-TCR complex. *Immunity* 2000; 13(4):529-38.
- <sup>37</sup> Kaushal D, Foreman TW, Gautam US, et al. Mucosal vaccination with attenuated *Mycobacterium tuberculosis* induces strong central memory responses and protects against tuberculosis. *Nat Commun* 2015; 6:8533.

## 2.6.3.1 PHARMACOLOGY: OVERVIEW

Test Article: BNT162b2

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
<b>Primary Pharmacodynamics</b>				
Qualification Report for a Single-plex Direct Luminex Assay (dLIA) for Quantitation of IgG Antibodies to SARS-CoV-2 S1 Protein in Human Sera	dLIA	NA	PWRD	VR-MQR-10211
Qualification of the SARS-CoV-2 mNeonGreen Virus Microneutralization Assay	In vitro cell culture	NA	[REDACTED]	VR-MQR-10214
BNT162b2 (V9) Immunogenicity and Evaluation of Protection against SARS-CoV-2 Challenge in Rhesus Macaques	Rhesus macaques	IM	PWRD [REDACTED]	VR-VTR-10671
<i>In Vitro</i> Expression of BNT162b2 Drug Substance and Drug Product	In vitro cell culture	NA	[REDACTED] ( [REDACTED], Germany)	R-[REDACTED]-0211
COVID-19: Immunogenicity Study Of The LNP-Formulated ModRNA Encoding The Viral S Protein-V9	BALB/c mice	IM	[REDACTED] ( [REDACTED], Germany)	R-[REDACTED]-0085
Characterizing the Immunophenotype In Spleen And Lymph Node Of Mice Treated With SARS-CoV-2 Vaccine Candidates	BALB/c mice	IM	[REDACTED] ( [REDACTED], Germany)	R-[REDACTED]-0112
Structural and Biophysical Characterization of SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein (P2 S) as a Vaccine Antigen	In vitro cell culture	NA	PWRD	VR-VTR-10741
<b>Secondary Pharmacodynamics</b>				
Studies not conducted				
<b>Safety Pharmacology</b>				
Studies not conducted				
<b>Pharmacodynamic Drug Interactions</b>				
Studies not conducted				

COVID-19 – Coronavirus disease 2019; dLIA – Direct Luminex Assay; IgG – immunoglobulin G; SARS-CoV-2 – severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; NA – not applicable; PWRD – Pfizer Worldwide Research & Development; IM - intramuscular; [REDACTED] – [REDACTED].