

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-522907

(P2017-522907A)

(43) 公表日 平成29年8月17日(2017.8.17)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 7/04 (2006.01)	C 1 2 N 7/04 Z N A	4 C 0 8 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 51 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-524123 (P2017-524123)	(71) 出願人	517022005 ザ パープライト インスティテュート イギリス国 ジーユー24 オエヌエフ サリー, ウォーキング, パープライト, ア ッシュ ロード
(86) (22) 出願日	平成27年7月23日 (2015. 7. 23)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(85) 翻訳文提出日	平成29年3月16日 (2017. 3. 16)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(86) 国際出願番号	PCT/GB2015/052124	(74) 代理人	100122389 弁理士 新井 栄一
(87) 国際公開番号	W02016/012793	(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫
(87) 国際公開日	平成28年1月28日 (2016. 1. 28)	(74) 代理人	100169971 弁理士 菊田 尚子
(31) 優先権主張番号	1413020.7		
(32) 優先日	平成26年7月23日 (2014. 7. 23)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コロナウイルス

(57) 【要約】

本発明は、非構造タンパク質 (n s p) - 1 0、n s p - 1 4、n s p - 1 5 または n s p - 1 6 の 1 以上に突然変異を含んでなるポリタンパク質をコードする変異型レプリカ-ゼ遺伝子を含んでなる弱毒化生コロナウイルスを提供する。このコロナウイルスは、対象において、伝染性気管支炎などの疾患を治療および/または予防するためのワクチンとして使用し得る。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

非構造タンパク質 (n s p) - 1 0、n s p - 1 4、n s p - 1 5 または n s p - 1 6 の 1 以上に突然変異を含んでなるポリタンパク質をコードする変異型レプリカーゼ遺伝子を含んでなる、弱毒化生コロナウイルス。

【請求項 2】

前記変異型レプリカーゼ遺伝子が、
配列番号 6 の 8 5 位での P r o から L e u、
配列番号 7 の 3 9 3 位での V a l から L e u、
配列番号 8 の 1 8 3 位での L e u から I l e、
配列番号 9 の 2 0 9 位での V a l から I l e

のリストから選択される 1 以上のアミノ酸突然変異を含んでなるタンパク質をコードする、請求項 1 に記載のコロナウイルス。

10

【請求項 3】

前記レプリカーゼ遺伝子が、配列番号 6 の 8 5 位での P r o から L e u へのアミノ酸突然変異を含んでなるタンパク質をコードする、請求項 1 または 2 に記載のコロナウイルス。

【請求項 4】

前記レプリカーゼ遺伝子が、配列番号 7 の 3 9 3 位での V a l から L e u、配列番号 8 の 1 8 3 位での L e u から I l e、および配列番号 9 の 2 0 9 位での V a l から I l e へのアミノ酸突然変異を含んでなるタンパク質をコードする、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のコロナウイルス。

20

【請求項 5】

前記レプリカーゼ遺伝子が、配列番号 6 の 8 5 位での P r o から L e u、配列番号 7 の 3 9 3 位での V a l から L e u、配列番号 8 の 1 8 3 位での L e u から I l e、および配列番号 9 の 2 0 9 位での V a l から I l e へのアミノ酸突然変異を含んでなるタンパク質をコードする、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のコロナウイルス。

【請求項 6】

前記レプリカーゼ遺伝子が、配列番号 1 として示される配列と比較して、
ヌクレオチド 1 2 1 3 7 位での C から T、
ヌクレオチド 1 8 1 1 4 位での G から C、
ヌクレオチド 1 9 0 4 7 位での T から A、および
ヌクレオチド 2 0 1 3 9 位での G から A

のリストから選択される 1 以上のヌクレオチド置換を含んでなる、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のコロナウイルス。

30

【請求項 7】

伝染性気管支炎ウイルス (I B V) である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のコロナウイルス。

【請求項 8】

I B V M 4 1 である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のコロナウイルス。

40

【請求項 9】

その少なくとも一部は M 4 1 以外の I B V 血清型由来のものである S タンパク質を含んでなる、請求項 8 に記載のコロナウイルス。

【請求項 10】

前記 S 1 サブユニットが M 4 1 以外の I B V 血清型由来のものである、請求項 9 に記載のコロナウイルス。

【請求項 11】

前記 S タンパク質が M 4 1 以外の I B V 血清型由来のものである、請求項 9 に記載のコロナウイルス。

【請求項 12】

50

ウイルスが発育卵に投与された際に、その胚に対して病原性を示さずにそれが複製可能であるように、対応する野生型レプリカーゼを発現するコロナウイルスと比較して病原性が低減されている、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のコロナウイルス。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の変異型レプリカーゼ遺伝子。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の変異型コロナウイルスレプリカーゼ遺伝子によってコードされる、タンパク質。

【請求項 15】

請求項 13 に記載のレプリカーゼ遺伝子を含んでなる、プラスミド。

10

【請求項 16】

請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載のコロナウイルスを作製するための方法であって、次の工程：

(i) 請求項 15 に記載のプラスミドを宿主細胞中にトランスフェクトする工程、

(i i) 前記宿主細胞にレプリカーゼ遺伝子を有するコロナウイルス株のゲノムを含んでなる組換えウイルスを感染させる工程、

(i i i) 改変レプリカーゼ遺伝子を生成するために、前記プラスミド中のレプリカーゼ遺伝子配列と前記組換えウイルスゲノム中の対応する配列との間で相同組換えを起こさせる工程、および

(i v) 前記改変レプリカーゼ遺伝子を含んでなる組換えウイルスについて選択する工程

20

を含んでなる、方法。

【請求項 17】

前記組換えウイルスがワクシニアウイルスである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

(v) 工程 (i v) からの組換えウイルスの DNA から前記改変レプリカーゼ遺伝子を含んでなる組換えコロナウイルスを回収する工程をさらに含む、請求項 16 または 17 に記載の方法。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載のコロナウイルスを産生可能な細胞。

30

【請求項 20】

請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載のコロナウイルスおよび薬学上許容可能な担体を含んでなる、ワクチン。

【請求項 21】

対象における疾患を治療および/または予防するための方法であって、請求項 20 に記載のワクチンをその対象に投与する工程を含んでなる、方法。

【請求項 22】

対象における疾患の治療および/または予防における使用のための、請求項 20 に記載のワクチン。

【請求項 23】

対象における疾患を治療および/または予防するためのワクチンの製造における、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載のコロナウイルスの使用。

40

【請求項 24】

前記疾患が伝染性気管支炎 (I B) である、請求項 21、22 または 23 に記載の方法、ワクチンまたは使用。

【請求項 25】

前記投与方法が、点眼投与、鼻腔内投与、飲水投与、孵化後注射および卵内注射からなる群から選択される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 26】

前記ワクチン接種が卵内ワクチン接種である、請求項 24 に記載の方法。

50

【請求項 27】

請求項 20 に記載のワクチンを生産するための方法であって、
請求項 19 に記載の細胞に請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載のコロナウイルスを感染させる工程を含んでなる、方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、ウイルスの病原性を低減させる変異型レプリカーゼ遺伝子を含んでなる弱毒化コロナウイルスに関する。本発明はまた、疾患を予防および/または治療するためのワクチンにおけるそのようなコロナウイルスの使用に関する。

10

【背景技術】**【0002】**

伝染性気管支炎(infectious bronchitis) (IB) の病原体であるトリ伝染性気管支炎ウイルス(infectious bronchitis virus) (IBV) は、主に気道で複製するが消化管、腎臓および卵管の上皮細胞でも複製する家禽の感染性の高い伝染性の病原体である。IBV は、ニドウイルス目(Nidovirales)、コロナウイルス科(Coronaviridae)、コロナウイルス亜科(Coronavirinae)およびガンマコロナウイルス属(Gammacoronavirus)のメンバーである；遺伝的に非常によく似たコロナウイルスは、シチメンチョウ、ホロホロチョウおよびキジの疾患を引き起こす。

【0003】

20

IB の臨床徴候には、くしゃみ、気管ラ音、鼻汁および喘鳴音が含まれる。肉用鳥類は体重増加の減少があり、一方、産卵鳥類は産卵数が少なくなり、低品質の卵を生産する。呼吸器感染症は、ヒヨコには致命的になる可能性がある二次的細菌感染症にニワトリを罹患しやすくする。このウイルスはまた、卵管（特に、ヒヨコでは、卵の生産および品質の低下につながる）；および腎臓（致命的になる可能性がある腎臓疾患につながる）への恒久的な損傷をもたらす。

【0004】

IBV は、他の感染症よりも多くの、家禽産業にとっての経済的損失に關与することが報告されている。弱毒化生ワクチンおよび不活化ワクチンはIBV の制御に広く使用されているが、ワクチン接種の使用によって得られる保護は、ワクチンの破壊または使用したワクチンに関連していない新たなIBV 血清型の導入のいずれかによって失われる可能性があり、家禽産業に対するリスクとなる。

30

【0005】

さらに、当業界では、ワクチン接種プログラムの効率および費用効果を改善するために、卵内での使用に好適なワクチンを開発する必要がある。卵内ワクチン接種に関連する主要な課題は、ウイルスが、胚に対して病原性を示さずに、ウイルスに対する母体由来抗体の存在下で複製可能でなければならないことである。現在のIBV ワクチンは、発育卵で複数回継代した後に得られ、これは、ニワトリに対する病原性が低減しているウイルスを生じ、弱毒化生ワクチンとしてそれらを使用することができるようになっている。しかしながら、このようなウイルスは、ほとんどの場合、胚に対する病原性の増強を示し、従って、それらは孵化率を減少させることから、卵内ワクチン接種に使用することができない。孵化率の70%減少は一部の状況で見られる。

40

【0006】

発育卵での複数の継代後の弱毒化にはまた他の不都合な点もある。ウイルスの弱毒化はランダムであり、ウイルスが継代されるたびに異なるので経験的な方法であり、弱毒化目的で同じウイルスを異なる一連の卵で継代すると異なる一連の突然変異をもたらして弱毒に至る。また、そのプロセスに関連する有効性の問題もある：いくつかの突然変異はウイルスの複製に影響を与え、それらの突然変異のいくつかはウイルスを弱毒化しすぎる可能性がある。突然変異はまた、免疫原性にも影響を与え得るS 遺伝子でも起こり得、その結果、所望の免疫応答に影響を受け、潜在的なワクチンが必要な血清型から保護し得なくな

50

る。加えて、ワクチンの病原性復帰および安定性に伴う問題もある。

【 0 0 0 7 】

I B Vの制御のために新しいより安全なワクチンが開発されることが重要である。従って、これらの問題点とは関連がないI B Vワクチン、特に、卵内ワクチン接種に使用し得るワクチンが必要である。

【 発明の概要 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 8 】

本発明の態様の概要

本発明者らは、I B Vを合理的に弱毒化するために、逆遺伝学アプローチを使用している。このアプローチは、発育卵での複数の継代後のランダムな弱毒化よりもはるかに制御可能であり、それは、各突然変異の位置がわかっており、ウイルスに及ぼすその効果、すなわち、弱毒化の理由を導出することができるためである。

【 0 0 0 9 】

その逆遺伝学アプローチを用いて、本発明者らは、ウイルスの病原性レベルを低減させる様々な突然変異を同定した。病原性レベルは、ウイルスが発育卵に投与されたときに、その胚に対して病原性を示さずにそれが複製可能であるように、低減され得る。このようなウイルスは、卵内ワクチン接種に好適であり得、これは重要な利点であり、発育卵での複数の継代後に産生された弱毒化I B Vワクチンに比べて改善されている。

【 0 0 1 0 】

従って、第1の態様では、本発明は、非構造タンパク質(non structural protein) (n s p) - 1 0、n s p - 1 4、n s p - 1 5またはn s p - 1 6の1以上に突然変異を含んでなるポリタンパク質をコードする変異型レプリカーゼ遺伝子を含んでなる弱毒化生コロナウイルスを提供する。

【 0 0 1 1 】

前記変異型レプリカーゼ遺伝子は、

配列番号6の85位でのP r oからL e u、

配列番号7の393位でのV a lからL e u、

配列番号8の183位でのL e uからI l e、

配列番号9の209位でのV a lからI l e

のリストから選択される1以上のアミノ酸突然変異を含んでなるタンパク質をコードし得る。

【 0 0 1 2 】

前記レプリカーゼ遺伝子は、配列番号6の85位でのP r oからL e uへのアミノ酸突然変異を含んでなるタンパク質をコードし得る。

【 0 0 1 3 】

前記レプリカーゼ遺伝子は、配列番号7の393位でのV a lからL e u、配列番号8の183位でのL e uからI l e、および配列番号9の209位でのV a lからI l eへのアミノ酸突然変異を含んでなるタンパク質をコードし得る。

【 0 0 1 4 】

前記レプリカーゼ遺伝子は、配列番号6の85位でのP r oからL e u、配列番号7の393位でのV a lからL e u、配列番号8の183位でのL e uからI l e、および配列番号9の209位でのV a lからI l eへのアミノ酸突然変異を含んでなるタンパク質をコードし得る。

【 0 0 1 5 】

前記レプリカーゼ遺伝子は、配列番号1として示される配列と比較して、

ヌクレオチド12137位でのCからT、

ヌクレオチド18114位でのGからC、

ヌクレオチド19047位でのTからA、および

ヌクレオチド20139位でのGからA

のリストから選択される1以上のヌクレオチド置換を含んでなり得る。

【0016】

前記コロナウイルスは伝染性気管支炎ウイルス（IBV）であり得る。

【0017】

前記コロナウイルスはIBV M41であり得る。

【0018】

前記コロナウイルスは、その少なくとも一部はM41以外のIBV血清型のものであるSタンパク質を含んでなり得る。

【0019】

例えば、S1サブユニットまたはSタンパク質全体はM41以外のIBV血清型のものであり得る。

10

【0020】

本発明の第1の態様によるコロナウイルスは、ウイルスが発育卵に投与された際に、その胚に対して病原性を示さずそれが複製可能であるように、対応する野生型レプリカーゼを発現するコロナウイルスと比較して病原性が低減されている。

【0021】

第2の態様では、本発明は、本発明の第1の態様に関連して定義されている変異型レプリカーゼ遺伝子を提供する。

【0022】

第3の態様では、本発明は、本発明の第2の態様による変異型コロナウイルスレプリカーゼ遺伝子によってコードされるタンパク質を提供する。

20

【0023】

第4の態様では、本発明は、本発明の第2の態様によるレプリカーゼ遺伝子を含んでなるプラスミドを提供する。

【0024】

第5の態様では、本発明は、本発明の第1の態様によるコロナウイルスを作製するための方法であって、次の工程：

(i) 本発明の第4の態様によるプラスミドを宿主細胞中にトランスフェクトする工程

(ii) 前記宿主細胞にレプリカーゼ遺伝子を有するコロナウイルス株のゲノムを含んでなる組換えウイルスを感染させる工程、

30

(iii) 改変レプリカーゼ遺伝子を生成するために、前記プラスミド中のレプリカーゼ遺伝子配列と前記組換えウイルスゲノム中の対応する配列との間で相同組換えを起こさせる工程、および

(iv) 前記改変レプリカーゼ遺伝子を含んでなる組換えウイルスについて選択する工程

を含んでなる方法を提供する。

【0025】

前記組換えウイルスはワクシニアウイルスであり得る。

【0026】

前記方法はまた、

(v) 工程(iv)からの組換えウイルスのDNAから前記改変レプリカーゼ遺伝子を含んでなる組換えコロナウイルスを回収する工程

40

も含み得る。

【0027】

第6の態様では、本発明は、本発明の第1の態様によるコロナウイルスを産生可能な細胞を提供する。

【0028】

第7の態様では、本発明は、本発明の第1の態様によるコロナウイルスおよび薬学上許容可能な担体を含んでなるワクチンを提供する。

50

【 0 0 2 9 】

第 8 の態様では、本発明は、対象における疾患を治療および / または予防するための方法であって、本発明の第 7 の態様によるワクチンをその対象に投与する工程を含んでなる方法を提供する。

【 0 0 3 0 】

本発明のさらなる態様は、

- ・対象における疾患の治療および / または予防における使用のための、本発明の第 7 の態様によるワクチン

- ・対象における疾患を治療および / または予防するためのワクチンの製造における、本発明の第 1 の態様によるコロナウイルスの使用

を提供する。

10

【 0 0 3 1 】

前記疾患は伝染性気管支炎 (I B) であり得る。

【 0 0 3 2 】

前記ワクチンの投与方法は、点眼投与、鼻腔内投与、飲水投与、孵化後注射および卵内注射からなる群から選択され得る。

【 0 0 3 3 】

ワクチン接種は卵内ワクチン接種のよるものであり得る。

【 0 0 3 4 】

本発明はまた、本発明の第 7 の態様によるワクチンを生産するための方法であって、本発明の第 6 の態様による細胞に本発明の第 1 の態様によるコロナウイルスを感染させる工程を含んでなる方法を提供する。

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 5 】

【 図 1 】 C K 細胞における、 M 4 1 - C K (M 4 1 E P 4) と比較した、 M 4 1 - R - 6 および M 4 1 - R - 1 2 の増殖動態。

【 図 2 】 M 4 1 - C K (M 4 1 E P 4) および B e a u - R と比較した、 M 4 1 - R - 6 および M 4 1 - R - 1 2 に関連する臨床徴候、スニッキング (snicking) および喘鳴音 (W heezing) (バーは、各時点の左から右に、モック、 B e a u - R 、 M 4 1 - R 6 、 M 4 1 - R 1 2 、 M 4 1 - C K E P 4 を示している)。

30

【 図 3 】 感染したヒヨコから採取された気管から単離された気管輪におけるウイルスの線毛運動。 1 0 0 % 線毛運動はウイルスによる影響がないことを示す ; 非病原性。 0 % 運動は線毛運動の完全消失、すなわち、完全な線毛運動静止を示し、ウイルスが病原性であることを示す (バーは、各時点の左から右に、モック、 B e a u - R 、 M 4 1 - R 6 、 M 4 1 - R 1 2 、 M 4 1 - C K E P 4 を示している)。

【 図 4 】 M 4 1 - R - 1 2 および M 4 1 - C K (M 4 1 E P 5) と比較した、 M 4 1 R - n s p 1 0 r e p および M 4 1 R - n s p 1 4 , 1 5 , 1 6 r e p に関連する臨床徴候、スニッキング (バーは、各時点の左から右に、モック、 M 4 1 - R 1 2 ; M 4 1 R - n s p 1 0 r e p ; M 4 1 R - n s p 1 4 , 1 5 , 1 6 r e p および M 4 1 - C K E P 5 を示している)。

40

【 図 5 】 感染したヒヨコから採取された気管から単離された気管輪における、 M 4 1 - R - 1 2 および M 4 1 - C K と比較した、 M 4 1 R - n s p 1 0 r e p および M 4 1 R - n s p 1 4 , 1 5 , 1 6 r e p の線毛運動 (バーは、各時点の左から右に、モック ; M 4 1 - R 1 2 ; M 4 1 R - n s p 1 0 r e p ; M 4 1 R - n s p 1 4 , 1 5 , 1 6 r e p および M 4 1 - C K E P 5 を示している)。

【 図 6 】 M 4 1 - C K と比較した、 M 4 1 R - n s p 1 0 , 1 5 r e p 、 M 4 1 R - n s p 1 0 , 1 4 , 1 5 r e p 、 M 4 1 R - n s p 1 0 , 1 4 , 1 6 r e p 、 M 4 1 R - n s p 1 0 , 1 5 , 1 6 r e p および M 4 1 - K に関連する臨床徴候、スニッキング (バーは、各時点の左から右に、モック、 M 4 1 R - n s p 1 0 , 1 5 r e p 1 ; M 4 1 R - n s p 1 0 , 1 4 , 1 6 r e p 4 ; M 4 1 R - n s p 1 0 , 1 5 , 1 6 r e p 8 ; M 4 1 R -

50

n s p 1 0 , 1 4 , 1 5 r e p 1 0 ; M 4 1 - K 6 および M 4 1 - C K E P 4 を示して
いる)。

【図7】M41 - CKと比較した、M41R - n s p 1 0 , 1 5 r e p、M41R - n s p 1 0 , 1 4 , 1 5 r e p、M41R - n s p 1 0 , 1 4 , 1 6 r e p、M41R - n s p 1 0 , 1 5 , 1 6 r e p および M41 - K に関連する臨床徴候、喘鳴音(バーは、各時点の左から右に、モック、M41R - n s p 1 0 , 1 5 r e p 1 ; M41R - n s p 1 0 , 1 4 , 1 6 r e p 4 ; M41R - n s p 1 0 , 1 5 , 1 6 r e p 8 ; M41R - n s p 1 0 , 1 4 , 1 5 r e p 1 0 ; M41 - K 6 および M41 - C K E P 4 を示している)。

【図8】感染したヒヨコから採取された気管から単離された気管輪における、M41 - C K と比較した、M41R - n s p 1 0 , 1 5 r e p、M41R - n s p 1 0 , 1 4 , 1 5 r e p、M41R - n s p 1 0 , 1 4 , 1 6 r e p、M41R - n s p 1 0 , 1 5 , 1 6 r e p および M41 - K の線毛運動(バーは、各時点の左から右に、モック、M41R - n s p 1 0 , 1 5 r e p 1 ; M41R - n s p 1 0 , 1 4 , 1 6 r e p 4 ; M41R - n s p 1 0 , 1 5 , 1 6 r e p 8 ; M41R - n s p 1 0 , 1 4 , 1 5 r e p 1 0 ; M41 - K 6 および M41 - C K E P 4 を示している)。

【図9】CK細胞における、M41 - CKと比較した、r I B V の増殖動態。図9Aは、M41 - R および M41 - K についての結果を示している。図9Bは、M41 - n s p 1 0 r e p ; M41R - n s p 1 4 , 1 5 , 1 6 r e p ; M41R - n s p 1 0 , 1 5 r e p ; M41R - n s p 1 0 , 1 5 , 1 6 r e p ; M41R - n s p 1 0 , 1 4 , 1 5 r e p ; および M41R - n s p 1 0 , 1 4 , 1 6 についての結果を示している。

【図10-1】n s p 1 0 および n s p 1 4 の変異配列におけるアミノ酸突然変異の位置

【図10-2】n s p 1 5 および n s p 1 6 の変異配列におけるアミノ酸突然変異の位置

【図11-1】M41 - CKと比較した、r I B V M41R - n s p 1 0 , 1 4 r e p および r I B V M41R - n s p 1 0 , 1 6 r e p のA)スニッキングおよびB)呼吸器症状(喘鳴音およびラ音の組合せ)(バーは、各時点の左から右に、モック、M41R - n s p 1 0 , 1 4 r e p ; M41R - n s p 1 0 , 1 6 r e p および M41 - K を示している)。

【図11-2】M41 - CKと比較した、r I B V M41R - n s p 1 0 , 1 4 r e p および r I B V M41R - n s p 1 0 , 1 6 r e p のC)線毛運動(バーは、各時点の左から右に、モック、M41R - n s p 1 0 , 1 4 r e p ; M41R - n s p 1 0 , 1 6 r e p および M41 - K を示している)。

【発明を実施するための形態】

【0036】

詳細な説明

本発明は、コロナウイルスで発現された場合に、その野生型レプリカーゼ遺伝子を含んでなる対応するコロナウイルスと比較して該ウイルスの病原性を低減させる変異型レプリカーゼ遺伝子を含んでなるコロナウイルスを提供する。

【0037】

コロナウイルス

ガンマコロナウイルス属は、コロナウイルス科に属する動物ウイルスの属である。コロナウイルスは、ポジティブセンス一本鎖RNAゲノムおよびらせん対称性を有するエンベロープウイルスである

【0038】

コロナウイルスのゲノムサイズはおよそ27~32キロベースの範囲であり、これは既知RNAウイルスの最長サイズである。

【0039】

コロナウイルスは、主に、哺乳類および鳥類の上気道または消化管に感染する。5~6

10

20

30

40

50

の異なる現在知られているコロナウイルス株はヒトに感染する。最も多く報道されているヒトコロナウイルスである、重症急性呼吸器症候群(severe acute respiratory syndrome) (SARS) を引き起こす SARS-CoV は、上気道および下気道両方の感染症を引き起こし、胃腸炎も引き起こし得ることから、独自の病因を有している。中東呼吸器症候群コロナウイルス(Middle East respiratory syndrome coronavirus) (MERS-CoV) もまた、ヒトにおいて下気道感染症を引き起こし得る。コロナウイルスは、ヒト成人における全風邪のかなりの割合の原因であると考えられている。

【0040】

コロナウイルスはまた、家畜動物および飼いならされたペットにおいて種々の疾患を引き起こし、その一部は重篤であることがあり、飼育産業にとっての脅威である。家畜動物の経済的に重要なコロナウイルスとしては、主にニワトリにおいて呼吸器疾患を引き起こし、世界的に家禽産業に深刻な影響を与える伝染性気管支炎ウイルス (IBV) ; プタコロナウイルス (伝染性胃腸炎(transmissible gastroenteritis)、TGE) およびウシコロナウイルス (両ウイルスにより幼若動物において下痢を生じる) が挙げられる。ネココロナウイルスは2つの形態を有し、ネコ腸コロナウイルスは臨床上の重要性が低い病原体であるが、このウイルスの自然突然変異によりネコ感染性腹膜炎(feline infectious peritonitis) (FIP)、すなわち、高い死亡率と関連する疾患となり得る。

【0041】

イヌコロナウイルス(canine coronavirus) (CCoV) には2種類あり、1つは軽度消化器疾患を引き起こし、1つは呼吸器疾患を引き起こすことが見出されている。マウス肝炎ウイルス(Mouse hepatitis virus) (MHV) は、特に実験用マウスのコロニーの間で、高死亡率の流行性のネズミの病気を引き起こすコロナウイルスである。

【0042】

コロナウイルスは、以下に示すように4つのグループに分かれる。

アルファ

- ・イヌコロナウイルス (CCoV)
- ・ネココロナウイルス(Feline coronavirus) (FeCoV)
- ・ヒトコロナウイルス 229E (Human coronavirus 229E) (HCoV-229E)
- ・ブタ流行性下痢ウイルス(Porcine epidemic diarrhoea virus) (PEDV)
- ・伝染性胃腸炎ウイルス (TGEV)
- ・ヒトコロナウイルス NL63 (Human Coronavirus NL63) (NLまたはNew Haven)

ベータ

- ・ウシコロナウイルス(Bovine coronavirus) (BCoV)
- ・イヌ呼吸器コロナウイルス(Canine respiratory coronavirus) (CRCoV) - 東南アジアおよびミクロネシアでよく見られる
- ・ヒトコロナウイルス OC43 (Human coronavirus OC43) (HCoV-OC43)
- ・マウス肝炎ウイルス (MHV)
- ・ブタ血球凝集性脳脊髄炎ウイルス (Porcine haemagglutinating encephalomyelitis virus) (HEV)
- ・ラットコロナウイルス(Rat coronavirus) (RCV)。ラットコロナウイルスはオーストラリア東部でかなり流行しており、2008年3月/4月の時点で、それはネイティブおよび野生の齧歯類コロニーの間で発見された。
- ・(現在時点で一般名はない) (HCoV-HKU1)
- 重症急性呼吸器症候群コロナウイルス(Severe acute respiratory syndrome coronavirus) (SARS-CoV)
- ・中東呼吸器症候群コロナウイルス (MERS-CoV)

ガンマ

- ・伝染性気管支炎ウイルス (IBV)
- ・シチメンチョウコロナウイルス(Turkey coronavirus) (紫藍病ウイルス)

10

20

30

40

50

- ・キジコロナウイルス
- ・ホロホロチョウコロナウイルス

デルタ

- ・ヒヨドリコロナウイルス(Bulbul coronavirus) (B u C o V)
- ・ツグミコロナウイルス(Thrush coronavirus) (T h C o V)
- ・キンバラコロナウイルス(Munia coronavirus) (M u C o V)
- ・ブタコロナウイルス(Porcine coronavirus) (P o r C o v) H K U 1 5

【 0 0 4 3 】

本発明のコロナウイルスの変異型レプリカーゼ遺伝子は、TGEVなどのアルファコロナウイルス属(alphacoronavirus) ; MHVなどのベータコロナウイルス属(beta-coronavirus) ; またはIBVなどのガンマコロナウイルス属(Gammaコロナウイルス)に由来し得る。

10

【 0 0 4 4 】

本明細書で使用する場合、用語「由来する」とは、レプリカーゼ遺伝子が関連コロナウイルスの野生型レプリカーゼ遺伝子と実質的に同じヌクレオチド配列を含んでなることを意味する。例えば、本発明の変異型レプリカーゼ遺伝子は、野生型レプリカーゼ配列と最大80%、85%、90%、95%、98%または99%の同一性を有し得る。この変異型コロナウイルスレプリカーゼ遺伝子は、該非構造タンパク質の野生型配列と比較した際に非構造タンパク質(nsp) - 10、nsp - 14、nsp - 15またはnsp - 16の1以上に突然変異を含んでなるタンパク質をコードする。

【 0 0 4 5 】

IBV

トリ伝染性気管支炎(IB)は、重要な経済的損失を引き起こすニワトリの伝染性の高い急性呼吸器疾患である。この疾患は、あえぎ呼吸、咳、くしゃみ、気管ラ音、および鼻汁を含む呼吸徴候を特徴とする。幼若なニワトリでは、重篤な呼吸困難が起こり得る。産卵系鶏では、呼吸困難、腎炎、卵生産の減少、ならびに卵内部の質および卵殻の質の低下がよく見られる。

20

【 0 0 4 6 】

ブロイラーでは、咳およびのど鳴りがよく見られる臨床徴候であり、敷地内の総ての鳥に急速に広がる。罹患率は、非ワクチン接種群では100%である。死亡率は、年齢、ウイルス株、および二次的感染症に依存して変化するが、非ワクチン接種群では最大60%であり得る。

30

【 0 0 4 7 】

同定されるべき最初のIBV血清型はマサチューセッツであったが、米国ではアーカンソーおよびデラウェアを含むいくつかの血清型が、最初に同定されるマサチューセッツ型に加えて、現在循環している。

【 0 0 4 8 】

IBV株Beaudeetteはニワトリ胚での少なくとも150代継代後に誘導された。IBV Beaudeetteは、孵化したニワトリに対してもはや病原性はないが胚を急速に殺す。

【 0 0 4 9 】

H120は、有胚鶏卵でのおよそ120代継代により弱毒化した市販の弱毒化生IBVマサチューセッツ血清型ワクチン株である。H52は、別のマサチューセッツワクチンであり、H120の開発中のより早い段階のわずかに病原性を示す継代ウイルス(52代継代)を表す。H120に基づくワクチンが一般的に使用される。

40

【 0 0 5 0 】

IB QXは、IBVの毒性の強い野外分離株である。1990年代半ばに中国の青島地域で病気が発生した後に最初に単離されたことから、これは「Chinese QX」としても知られている。その時以来、ウイルスはヨーロッパに向かって広がっていった。2004年からは、非常によく似たウイルスに関して重大な卵の生産問題が西ヨーロッパの一部で、主にオランダで確認され、ドイツ、フランス、ベルギー、デンマークからも、

50

英国でも報告されている。

【0051】

オランダの症例から単離されたウイルスは、デーフェンテルのオランダ研究所(the Dutch Research Institute)によって、D388と呼ばれる新たな株として同定された。中国とのつながりは、このウイルスがChinese QXウイルスと99%類似していることを示すさらなる試験からきた。弱毒化生QX様IBVワクチン株は現在開発されている。

【0052】

IBVは、細胞質内で複製し、非分離型の一本鎖ポジティブセンスRNAゲノムを含むエンベロープウイルスである。IBVは、27.6kbのRNAゲノムを有し、総てのコロナウイルスと同様に、4つの構造タンパク質；スパイク糖タンパク質(S)、小型膜タンパク質(E)、内在性膜タンパク質(M)およびゲノムRNAと相互作用するヌクレオキャプシドタンパク質(N)を含む。

10

【0053】

ゲノムは以下のように構成されている：5'UTR - ポリメラーゼ(レプリカーゼ)遺伝子 - 構造タンパク質遺伝子(S - E - M - N) - UTR 3'；ここで、UTRは非翻訳領域である(それぞれIBV中約500ヌクレオチド)。

【0054】

脂質エンベロープは、3つの膜タンパク質：S、MおよびEを含む。IBV Sタンパク質は、小胞体内でオリゴマー化し、膜貫通ドメインを介してビリオン膜に挿入されるホモトリマーに組み立てられ、Mタンパク質と非共有結合性相互作用により会合されるI型糖タンパク質である。コロナウイルス粒子に組み込まれた後、Sタンパク質は標的細胞受容体との結合ならびにウイルス膜と細胞膜との融合に関与する。S糖タンパク質は4つのドメインからなる：合成中に切断されるシグナル配列；ビリオン粒子の外側に存在するエクトドメイン；ビリオン粒子の脂質二重層中にSタンパク質を固定する役割を果たす膜貫通領域；および細胞質尾部。

20

【0055】

総てのコロナウイルスはまた、in vitroでの複製に必要なではないが病因において役割を果たし得る機能不明のアクセサリタンパク質遺伝子セットをコードする。IBVは、2つのアクセサリ遺伝子、遺伝子3および5をコードし、これらはそれぞれ2つのアクセサリタンパク質3a、3bおよび5a、5bを発現する。

30

【0056】

本発明のコロナウイルスの変異型レプリカーゼ遺伝子は、IBVに由来し得る。例えば、IBVはIBV Beaudette、H120、H52、IB QX、D388またはM41であり得る。

【0057】

IBVはIBV M41であり得る。M41は、1941年にUSAで単離されたプロトタイプのマサチューセッツ血清型である。これは、病原性の実験室株(a pathogenic lab stain)として世界中の多くの研究室で使用されている分離株であり、ATCCから得ることができる(VR-21(商標))。弱毒化変異体はまた、この分野で問題を引き起こすマサチューセッツ血清型に対するIBVワクチンとしていくつかのワクチン生産者によって使用されている。本発明者らは、何年もこのウイルスに取り組んできたため、完全ウイルスゲノムの配列が入手可能であることから、この株を使用することを選択した。本発明者らが使用したM41分離株、M41-CKは、初代ニワトリ腎臓(chick kidney)(CK)細胞で増殖するように適合されており、そのため、完全ゲノムのcDNAからの感染性ウイルスとしての回収に適していると考えられた。それは病原性IBVの代表であり、従って、病原性の喪失または低減のいずれかを引き起こす突然変異について解析することができる。

40

【0058】

IBV M41-CKのゲノム配列は配列番号1として示される。

50

【 0 0 5 9 】

配列番号 1 I B V M 4 1 - C K 配列

ACTTAAGATAGATATTAATATATATCTATCACACTAGCCTTGCGCTAGATTTCCAACCTTA
ACAAAACGGACTTAAATACCTACAGCTGGTCCATAGGTGTTCCATTGCAGTGCACCTT
AGTGCCCTGGATGGCACCTGGCCACCTGT CAGGTTTTTGTATFAAAATCTTATTGTTGC
TGGTATCACTGCTTGTGTTTGGCGTGTCTCACTTTATAACATCCGTTGCTTGGGCTACCTAG
TATCCAGCGTCCACGCGCCGCGTGGCTGGTTCGAGTGCGAAGAACCCTCTGGTTCATCTA
GCGGTAGGCGGGTGTGTGGAAGTAGCACTTCAGACGTACCGGTTCTGTTGTGTGAAATAC
GGGTCACCTCCCCCACATACCTCTAAGGGCTTTTGAGCCTAGCGTTGGGCTACGTTCT
CGCATAAGGTGGGCTATACGACGTTTGTAGGGGTAGTGCCAAACAACCCTGAGGTGAC
AGGTTCTGGTGGTGTGTTTAGTGAGCAGACATAACAATAGACAGTGACAACATGGCTTCAAGC
CTAAAACAGGGAGTATCTCCCAAACCTAAGGGATGTCATTCTTGTATCCAAGACATTCCT
GAACAACCTTGTGACGCTTTGTTTTCTATAACGTCACACAACCCTAAGGATTACGCTGAT
GCTTTTGCAGTTAGGCAGAAGTTTGATCGTAATCTGCAGACTGGGAAACAGTTCAAATTT
GAAACTGTGTGTGGTCTCTCCTCTTGAAGGGAGTTGACAAAATAACACCTGGCGTCCCA
GCAAAAGTCTTAAAAGCCACTTCTAAGTTGGCAGATTTAGAAGACATCTTTGGTGTCTCT

CCCTTTGCAAGAAAATATFCGTGAACTTTTGAAGACAGCATGCCAGTGGTCTCTTACTGTA
GAAACACTGGATGCTCGTGCACAAACTCTTGATGAAATTTTTGACCCTACTGAAAFACCTT
TGGCTTCAGGTGGCAGCAAAAATCCAAGTTTCGGCTATGGCGATGCGCAGGCTTGTGGGA
GAAGTAACTGCAAAAAGTCATGGATGCTTTGGGCTCAAATATGAGTGCTCTTTCCAGATT
TTTAAACAACAAATAGTCAGAATTTTTCAAAAAGCGCTGGCTATTTTTGAGAATGTGAGT
GAATTACCACAGCGTATTTGCAGCACTTAAGATGGCTTTTGCTAAGTGTGCCAAGTCCATT
ACTGTTGTGGTTATGGAGAGGACTCTAGTTGTTAGAGAGTTCGCAGGAACCTTGTCTTGCA
AGCATTAAATGGTGCTGTTGCAAAATCTTTGAAGAACTCCCAAATGGTTTCATGGGTGCT
AAAATTTTCACTACACTTGCCTTCTTTAGGGAGGCTGCAGTGA AAAATTTGTGGATAACATA
CCAAATGCACCCGAGAGGCACTAAAGGGTTTGAAGTCGTTGGTAATGCCAAAGGTACACAA
GTTGTTGTGCGTGGCATGCGAAATGACTTAACACTGCTTGACCAAAAAGCTGAAATTCCT
GTGGAGTCAGAAGGTTGGTCTGCAATTTGGGTGGACATCTTTGCTATGTCTTTAAGAGT
GGTGATCGCTTTTACGCGGCACCTCTTTCAGGAAATTTGCATTGCATGATGTGCATTGT
TGTGAGCGTGTGTCTGTCTTTCTGATGTTGTAACACCGGAGATAAATGATGACTTATT
CTTGCAGCAATCTACTCTTCTTTTAGTGTGCGAGA ACTTGTGGCAGCCATTA AAAAGGGGT
GAACCATTTAAGTTTCTGGGT CATAAATTTGTGTATGCAAAGGATGCAGCAGTTCTTTT
ACATTAGCGAAGGCTGCTACTATTGCAGATGTTTTGAAGCTGTTTCAATCAGCGCGTGTG
AAAGTAGAAGATGTTGGTCTTCACTTACTGAAAAGTCTTTTGAATTTCTGGAGGCTTGCA
TATGGAAAAGTGCCTAATCTCGAAGAATTTGTTAAGACTTGTTTTTGTAAGGCTCAAATG
GCGATTGTGATTTTACGACAGTGTCTGGAGAGGGCATTGGCATCTTGTTCGCAAGTC
ATCTATAAAGTAGGTGGTCTTTTACTAAAGTTGTTGACTTTTGTGAAAATATTTGGAAA
GGTTTTTGTGCACAGTTGAAAAGAGCTAAGCTCATTGTCACTGAAACCCTCTGTGTTTTG
AAAGGAGTTGCACAGCATTGTTTTCAACTAATGCTGGATGCAATACAGTTTATGTATAAA
AGTTTTAAGAAGTGTGCACTTGGTAGAATCCATGGAGACTTGTCTTCTGGAAAAGGAGGT
GTGCACAAAATTAATCAAGAGGGCGATGAAATTTGGTTTGACGCCATTGATAGTATTGAT
GTTGAAGATCTGGGTGTTGTTCAAGAAAATTTGATTGATTTTGTGATGTTTGTGATAATGTG
ACACTTCCAGAGAACCAACCCGGTCATATGTTCAAATCGAGGATGACGGAAAAGAACTAC
ATGTTCTTCCGCTTCAA AAAAGGATGAGAACAATTTATTATACACCAATGTCACAGCTTGGT
GCTATTAATGTGGTTTGC AAAAGCAGGCGGTAAAAC TGTACCTTTGGAGAAAAC TACTGTG
CAAGAAATACCACCACCTGATGTTGTGTTTATTAAGGTTAGCATTGAGTGTGTGGTGAA
CCATGGAATACAATCTTCAA AAAAGGCTTATAAGGAGCCATTGAAGTAGAGACAGACCTC
ACAGTTGAACAATTGCTCTCTGTGGTCTATGAGAAAATGTGTGATGATCTCAAGCTGTTT
CCGGAGGCTCCAGAACCACCACCATTTGAGAAATGTCACACTTGTGATAAGAATGGTAAA
GATTTGGATTGCATAAAATCATGCCATCTGATCTATCGTGATFATGAGAGCGATGATGAC
ATCGAGGAAGAAGATGCAGAAGAATGTGACACGGATT CAGGTGATGCTGAGGAGTGTGAC
ACTAATTCAGAATGTGAAGAAGAAGATGAGGATACTAAAGTGTGGCTCTTATACAAGAC
CCGGCAAGTAACAAATATCCTCTGCCTCTTGATGATGATFATAGCGTCTACAATGGATGT
ATTTGTT CATAAGGACGCTCTCGATGTTGTGAATTTACCATCTGGTGAAGAAAACCTTTGTT
GTCAATAACTGCTTTGAAGGGGCTGTTAAAGCTCTTCCGCAGAAAAGTTATTGATGTTCTA
GGTGACTGGGGTGAGGCTGTTGATGCGCAAGAACAATTTGTGTCAACAAGAATCAACTCGG
GTCATATCTGAGAAATCAGTTGAGGGTTTTACTGGTAGTTGTGATGCAATGGCTGAACAA
GCTATTGTTGAAGAGCAGGAAATAGTACCTGTTGTTGAACAAAGTCAGGATGTAGTGT
TTTACACCTGCAGACCTAGAAGTTGTTAAAGAAACAGCAGAAGAGGTTGATGAGTTTATT
CTCATTTCTGCTGTCCCTAAAGAAGAAGTTGTGTCTCAGGAGAAAAGAGGACCCACAGGTT
GAGCAAGAGCCTACCCTAGTTGTTAAAGCACAACTGAGAAGAAGGCTAAAAGTTCAA
GTTAAACCAGCTACATGTGAAAACCCAAATTTTGGAGTACAAAACATGTGTGGGTGAT
TTGGCTGTTGTAATTTGCCAAAAGCATTGGATGAGTTTAAAGAGTTCTGCATTGTAACGCT
GCAAATGAGCACATGTGCGATGGTGGTGGCGTTGCAAAGGCAATTGCAGACTTTTGTGGA
CCGGACTTTGTTGAATATTTGCGCGGACTATGTTAAGAAACATGGTCCACAGCAAAAACCT
GTCACACCTTCATTTGTTAAAGGCATTCAATGTGTGAATAATGTTGTAGGACCTCGCCAT
GGAGACAGCAACTTGCCTGAGAAGCTTGTGCTGCTTACAAGAGTGTCTTGTAGGTGGA
GTGGTTAACTATGTTGTGCCAGTTCTCTCATCAGGGATTTTTGGTGTAGATTTTAAAATA
TCAATAGATGCTATGCGCGAAGCTTTTAAAGGTTGTGCCATACCGGTCTTTTTATTTCT
CTGAGTCAAGAACACATCGATTAATTTGATGCAACTTGTAAAGCAGAAGACAATTTATCTT
ACGGAGGATGGTGTAAATACCGCTCTGTTGTTTTAAAACCTGGTGATCTTTGGGTCAA
TTTTGGACAGTTTTTTGCAAGAAAATAAGGTAGTCTTTTCGGCTGATGATGTTGAGGATAAA
GAAATCCTCTTTATACCCACAAC TGAAGACTATCTTGAATATTAATGTTTAGATGCG

CAAAAGTATGTAACATATTTGCAAACGCTTGCGCAGAAATGGGATGTTCAATATAGAGAC
AATTTTGTATATTAGAGTGGCGTGACGGAAATFGCTGGATTAGTTCAGCAATAGTTCTC
CTTCAAGCTGCTAAAATTAGATTTAAAGGTTTTCTTGCAGAAGCATGGGCTAAACTGTTG
GGTGGAGATCCTACAGACTTTGTTGCCCTGGTGTATGCAAGTTGCAATGCTAAAGTAGGT
GATTTTTTCAGATGCTAATTGGCTTTTGGCCAATTTAGCAGAACATTTTGACGCAGATTAC
ACAAATGCACTTCTTAAGAAGTGTGTGTCGTGCAATTGTGGTGTAAAGAGTTATGAACTT
AGGGGTCTTGAAGCCTGTATTCAGCCAGTTCCGAGCACCTAATCTTCTACATTTTAAAACG
CAATATTCAAATTGCCCAACCTGTGGTGCAAGTAGTACGGATGAAGTAATAGAAGCTTCA
TTACCGTACTTATTGCTTTTTGCTACTGATGGTCTGCTACAGTTGATTGTGATGAAAAT
GCTGTAGGGACTGTTGTTTTCAATGGCTCTACTAATAGTGGCCATTGTTATACACAAGCC
GATGGTAAGGCTTTTGACAATCTTGCTAAGGATAGAAAATTTGGAAGGAAGTCGCCTTAC
ATTACAGCAATGTATACACGTTTTTCTCTTAGGAGTGAAAATCCCCTACTTGTGTTGAA
CATAGTAAGGGTAAAGCTAAAGTAGTAAAAGAAGATGTTTTCTAACCTTGCTACTAGTTCT
AAAGCCAGTTTTGACGATCTTACTGACTTTGAAACAGTGGTATGATAGCAACATCTATGAG
AGTCTTAAAGTGCAGGAGACACCTGATAATCTTGATGAATATGTGTCATTTACGACAAAG
GAAGATTCTAAGTTGCCACTGACACTTAAAGTTAGAGGTATCAAATCAGTTGTTGACTTT
AGGTCTAAGGATGGTTTTACTTATAAGTTAACACCTGATACTGATGAAAATTCAAAAACA
CCAGTCTACTACCCAGTCTTGGATTCTATTAGTCTTAGGGCAATATGGGTTGAAGGCAGT
GCTAATTTTTGTTGTTGGGCATCCAAATTATTATAGTAAGTCTCTCCGAATTCACACGTTT
TGGGAAAATGCCGAGAGCTTTGTTAAAATGGGTTATAAAAATTGATGGTGTAACTATGGGC
CTTTGGCGTGCAGAACACCTTAATAAACCTAATTTGGAGAGAATTTTTAACATTGCTAAG
AAAGCTATTGTTGGATCTAGTGTGTTACTACGCAGTGTGGTAAAATACTAGTTAAAGCA
GCTACATACGTTGCCGATAAAGTAGGTGATGGTGTAGTTCGCAATATTACAGATAGAATT
AAGGGTCTTTGTGGATTACACAGTGGCCATTTTTGAAAAGAAAATGTCCCTACAATTTCTA
AAGACACTTGTGTTCTTTTTCTTTATTCTTAAAGGCTAGTGTCTAAGAGTTTAGTTTTCT
AGCTATAAGATTGTGTTATGTAAGGTGGTGTGTTGCTACCTTACTTATAGTGTGGTTTATA
TACACAAGTAATCCAGTAGTGTTTACTGGAATACGTGTGCTAGACTTCTATTTGAAGGT
TCTTTATGTGGTCTTATAATGACTACGGTAAAGATTTCTTTTGATGTGTTACGCTATTGT
GCAGGTGATTTTACTTGTGCTGTGTTTACATGATAGAGATTCACTTCATCTGTACAAA
CATGCTTATAGCGTAGAACAAATTTATAAGGATGCAGCTTCTGGCATTAACTTTAATTGG
AATTTGGCTTTATTTGGTCTTTCTAATATTATTTGTTAAGCCAGTGGCAGGTTTTGTTATT
ATTTGTTATTGTGTTAAGTATTTGGTATTGAGTTCAACTGTGTTGCAAACTGGTGTAGGT
TTTCTAGATTGGTTGTAAAAACAGTTTTTTACCCATTTTAATTTTATGGGAGCGGGATTT
TATTTCTGGCTCTTTTACAAGATATACGTACAAGTGCATCATATATTGTACTGTAAGGAT
GTAACATGTGAAGTGTGCAAGAGAGTTGCACGCAGCAACAGGCAAGAGGTTAGCGTTGTA
GTTGGTGGACGCAAGCAATAGTGCATGTTTACACTAATTTCTGGCTATAACTTTTGTAAAG
AGACATAATTTGGTATTGTAGAAATTTGTGATGATTATGGTCAACAAAATACATTTATGTCC
CCTGAAGTTGCTGGCGAGCTTTCTGAAAAGCTTAAAGCGCCATGTTAAACCTACAGCATAT
GCTTACCACGTTGTGATGAGGCATGCGTGGTTGATGATTTGTTAATTTAAAATATAAG
GCTGCAATTCCTGGTAAGGATAATGCATCTTCTGCTGTAAAGTGTTCAGTGTACAGAT
TTTTTAAAGAAAGCTGTTTTTCTTAAAGGAGGCATTGAAAATGTGAACAAATATCTAATGAT
GGTTTTATAGTGTGTAATACACAGAGTGCAGCATGCACTAGAGGAAGCAAAGAATGCAGCC
GTCATATTATGCGCAATATCTGTGTAAGCCAATACTTATACTTGACCAGGCACTTTATGAG
CAATTAATAGTAGAGCCGTGTGCTAAGAGTGTATAGATAAAGTGTGTAGCATTTTGTCT
AATATAATATCTGTAGATACTGCAGCTTTAAATTTATAAGGCAGGCACACTTCGTGATGCT
CTGCTTTCTATTACTAAAGACGAAGAAGCCGTAGATATGGCTATCTTCTGCCACAATCAT
GAAGTGGAAATACACTGGTGACGGTTTTACTAATGTGATAACCGTCATATGGTATGGACACT
GATAAGTTGACACCTCGTGATAGAGGGTTTTTGGATAAATGCAGATGCTTCTATTGCTAAT
TTAAGAGTCAAAAATGCTCCTCCGGTAGTATGGAAGTTTTCTGATCTTATTAATTTGTCT
GACAGTTGCCTTAAATATTTAATTTTCTAGCTACTGTCAAGTCCAGGAGGTCGTTTCTTTATA
ACAAAGTCTGGTGCTAAACAAGTTATTTCTTGTATACCCAGAACTGTTGGTAGAGAAA
AAGGCAGGTGGTGTATTATAACACTTTTAAATGGTTTATGAGTTGTTTTAAATGGCTT
TTTTGCTTTTTATATACTTTTTACAGCATGTTGTTTGGGTTACTACTATATGGAGATGAAT
AAAAGTTTTGTTACCCCATGTATGATGTAACTCCACACTGCATGTTGAAGGGTTCAA
GTTATAGACAAAGGTGTTATTAGAGAGATTGTGTCAGAAGATAAATGTTTTCTTAATAAG
TTTTGTTAATTTTACGCCTTTTTGGGGTAAATCATATGAAAATAATAAAAATGTCCAATT
GTTACAGTTGTTATAGATGGTGACGGGACAGTAGCTGTTGGTGTCTCGGTTTTGTATCA

TGGGTTATGGATGGTGTATGTTTGTGCATATGACACAGACTGATCGTAGACCTTGGTAC
ATTCCCTACCTGGTTTAAATAGAGAAATGTTGGTTACACTCAGGATTCAATFATCACTGAG
GGTAGTTTTTATACATCTATAGCATTATTTTCTGCTAGATGTTTATATTTAACAGCCAGC
AATACACCTCAATTGTATGTTTTAATGGCGACAATGATGCACCTGGAGCCTTACCATTT
GGTAGTATFATTCCTCATAGAGTATACTTCCAACCTAATGGTGTAGGCTTATAGTTCCA
CAACAAATACTGCATACACCCTACATAGTGAAGTTTGTTCAGACAGCTATTGTAGAGGT
AGTGTATGTGAGTATACTAAACCAGGTTACTGTGTGTCACTAGACTCCCAATGGGTTTTG
TTAATGATGAATACATTAGTAAACCTGGCGTTTTCTGTGGTTCTACTGTTAGAGAACTT
ATGTTTAAATATGGTTAGTACATTCTTACTGGTGTCAACCCTAATATTTATATTCAGCTA
GCAACTATGTTTTAATACTAGTTGTTATTGTGTTAATTTTTGCAATGGTTATAAAGTTT
CAAGGTGTTTTTAAAGCTTATGCGACCAATTGTGTTTACAATAATGTTAGTTTGGGTTATT
AATGCATTTGTTTTGTGTACATAGTTATAAATAGTGTTTTGTAGCTGTTATATATTAGTA
CTCTATTGCTATGCATCATTGGTTACAAGTCGCAATACTGCTATAATAATGCATTGTTGG
CTTGTTTTTACCTTTGGTTAATAGTACCCACATGGTTGGCTTGTGCTATCTGGGATTT
ATTCTTTATATGTACACACCCTTGGTTTTCTGGTGTACGGFACTACTAAAAATACTCGT
AAGTGTATGATGGCAACGAGTTTGTGGTAATTATGACCTGCTGCGAAGAGCACTTTT
GTTATTCTGCTACTGAATTTGTTAAGCTTACGAATGAGATAGGTGATAAATTTGAAGCC
TATCTTTCTGCGTATGCTAGACTTAAATACTATTACAGGCACTGGTAGTGAGCAAGATTAC
TTGCAAGCTTGTGCTGATGGTTAGCTTATGCTTTGGACCAATATAGAAATAGTGGTGT
GAGGTTGTTTTATACCCACCGCTTACTCTATTGGTGTAGTAGACTACACGCTGGTTTT
AAAAAAGTAGTTTTCTCCTAGTAGTGTGTTGAGAAGTGCATTTAGTGTCTCTTATAGA
GGCAATAATCTTAATGGACTGTGGCTGGGTGATTCTATTTACTGCCACGCCATGTGTTA
GGTAAGTTTAGTGGTGACCAGTGGGGTGACGTACTAAACCTGCTAATAATCATGAGTTT
GAAGTTGTAACCTCAAAATGGTGTACTTTGAATGTTGTCAGCAGGCGGCTTAAAGGAGCA
GTTTTAATTTACAAACTGCAGTTGCCAATGCTGAAACTCCTAAGTATAAGTTTGTAAA
GCTAATTTGTGGTGATAGTTTCACTATAGCTTGTCTTATGGTGGTACAGTTATAGGACTT
TACCCTGTCACTATGCGTCTAATGGTACTATTAGAGCATCTTTCCTAGCAGGAGCCTGT
GGCTCAGTTGGTTTTAATATAGAAAAGGGTGTAGTTAATTTCTTTTATATGCACCATCTT
GAGTTACCTAATGCATTACACACTGGAACCTGACCTAATGGGTGAGTTTTATGGTGGTTAT
GTAGATGAAGAGGTTGCGCAAAGAGTGCCACCAGATAATCTAGTTACTAACAATATTGTA
GCATGGCTCTATGCGCAATTATTAGTGTAAAGAAAGTAGTTTTTACAACTAAATGG
TTGGAGAGTACTACTGTTCTATTGAAGATTACAATAGGTGGGCTAGTGATAATGGTTTT
ACTCCATTTTCCACTAGTACTGCTATTACTAAATTAAGTGTATAACTGGGGTTGATGTT
TGTAACCTCCTTCGCACTATTATGGTAAAAAGTGCTCAATGGGGTAGTGATCCCATTTTA
GGACAATATAAATTTGAAGACGAATTGACACCAGAATCTGTATTAATCAAGTTGGTGGT
GTTAGGTTACAGTCTTCTTTTGTAAAGAAAAGCTACATCTTGGTTTTGGAGTAGATGTGTA
TTAGCTTGCTTCTTGTGTTGTGTGCTATTGTCTTATTTACGGCAGTGCCACTTAAG
TTTTATGTACATGCAGCTGTTATTTTGTGATGGCTGTGCTCTTATTTCTTTTACTGTT
AAACATGTTATGGCATAACATGGACACTTTCTTATGCTTACATGATTACAGTTATTATT
GGAGTTTGTGCTGAAGTCCCTTTTATATAACAATACTCTAATTAGTCAAGTTGTTATTTT
TTAAGCCAATGGTATGATCCTGTAGTCTTTGATACTATGGTACCATGGATGTTATTGCCA
TTAGTGTGTACACTGCTTTTAAAGTGTGTACAAGGCTGCTATATGAATTTCTTCAACT
TCTTTGTTAATGCTGTATCAGTTTATGAAGTTAGGTTTTGTTATTTACACCTCTTCAAAC
ACTCTTACTGCATATACAGAAGGTAATTTGGGAGTTATTCTTTGAGTTGGTTACACTATT
TGTTGGCTAATGTTAGTAGTAATTCCTAATTTGGTTAATTGTTTTAAGTGTGCTAAG
TGGATTTTATATTATTGCAATGCAACATACTTTAATAATTATGTGTTAATGGCAGTCATG
GTTAATGGCATAGGCTGGCTTTGCACCTGTTACTTTGGATTGTATGGTGGGTTAATAAA
GTTTTTGGTTAACCTTAGGTAATAACAATTTTAAAGTTTTCAGTAGATCAATATAGGTAT
ATGTGTTTGCATAAGGTAATCCACCTAAAAGTGTGTGGGAGGCTTTACTACAAATATA
CTTATACAAGGAATTTGGAGGCGATCGTGTGTTGCCTATAGCTACAGTGCAATCTAAATG
AGTGATGTAAAGTGTACAACCTGTTGTTTTAATGCAGCTTTTACTAAGCTTAATGTTGAA
GCAAATTCAAAATGCATGCTTATCTTGTGAGTTACACAATAAAAATCCTCGCATCTGAT
GATGTTGGAGAGTGCATGGATAATTTATTGGGTATGCTTATAACACTAFTTTGTATAGAT
TCTACTATTGATTTGGGTGAGTATTGTGATGATAACTTAAAGAGGTCAACTGTATTACAA
TCGGTTACTCAAGAGTTTTTCGCACATAACCCTCGTATGCTGAATATGAAAGAGCTAAGAGT
ATTTATGAAAAGGTTTTAGCCGATTTCTAAAAATGGTGGTGTAAACACAGCAAGAGCTTGGT
GCATATCGTAAAGCTGCCAATATTGCAAAGTCAAGTTTTTGATAGAGACTTGGCTGTTCAA

AAGAAGTTAGATAGCATGGCAGAACGTGCTATGACAACAATGTATAAAGAGGCGCGTGTA
ACTGATAGAAGAGCAAATAGTTTCATCATTACATGCACTACTTTTTTCAATGCTTAAG
AAAATAGATTCTGAGAAGCTTAATGTCTTATTTGACCAGGCGAATAGTGGTGTGTACCC
CTAGCAACTGTTCCAATTTGTTTGTAGTAATAAGCTTACCCTTGTATACCAGACCCAGAG
ACGTGGGTCAAGTGTGTGGAGGGTGTGCATGTTACATATTC AACAGTTGTTTGGAAATATA
GACTGTGTTACTGATGCCGATGGCACAGAGTTACACCCACTTCTACAGSTAGTGGATTG
ACTTACTGTATAAGTGGTGATAATATAGCATGGCCTTTAAAGGTTAACTGACTAGGAAT
GGGCATAATAAGGTTGATGTTGCCTTGCAAATAATGAGCTTATGCCTCACGGTGTAAAG
ACAAAGGCTTGGTAGCAGGTGTAGATCAAGCACATTGTAGCGTTGAGTCTAAATGTTAT
TATACAAGTATTAGTGGCAGTTCAAGTTGTAGCTGCTATTACCTCTTCAAATCCTAATCTG
AAAGTAGCCTCTTTTTTGAATGAGGCAGGTAATCAGATTTATGTAGACTTAGACCCACCA
TGTAATTTGGTATGAAAGTGGGTGATAAGGTTGAAGTTGTTTACCTGTATTTTATAAAA
AATACGAGGTCTATTGTAAGAGGTATGGTACTTGGTGCTATATCTAATGTTGTTGTGTTA
CAATCTAAAGGTCATGAGACAGAGGAAGTGGATGCTGTAGGCATTCTCTCACTTTGTTCT
TTTGCAGTAGATCCTGCGGATACATATTGTAATATGTGGCAGCAGGTAATCAACCTTTA
GGTAACTGTGTTAAAATGTTGACAGTACATAATGGTAGTGGTTTTGCAATAACATCAAAG
CCAAGTCCAACCTCCGGATCAGGATTCTTATGGAGGAGCTTCTGTGTGTCTTTATTGTAGA
GCACATATAGCACACCCTGGCGGAGCAGGAATTTAGATGGACGCTGTCAATTTAAAGGT
TCTTTTGTGCAAATACCTACTACGGAGAAAGATCCTGTTGGATTCTGTCTACGTAACAAG
GTTTGCAGTGTGTTGTCAGTGTGGATTGGTTATGGATGTCAGTGTGATTCACTTAGACAA
CCTAAACCTTCTGTTCAAGTCAAGTTGCTGTTGCATCTGGTTTTGATAAGAATTATTTAAAC
GGGTACGGGGTAGCAGTGAGGCTCGGCTGATACCCCTAGCTAATGGATGTGACCCCGATG
TTGTAAAGCGAGCCTTTGATGTTTGTAAATAAGGAATCAGCCGGTATGTTTCAAATTTGA
AGCGTAACTGTGCACGATTCCAAGAAGTACGTGATACTGAAGATGGAAATCTTGAGTATT
GTGATTCTTATTTTGTGGTTAAACAAACCCTCCTAGTAATTTATGAACATGAGAAAGCTT
GTTATGAAGACTTAAAGTCAGAAGTAACAGCTGATCATGATTTCTTTGTGTTCAATAAGA
ACATTTATAATATTAGTAGGCAGAGGCTTACTAAGTATACTATGATGGATTTTGTCTATG
CTTTGCGGCACTTTGACCCAAAGGATTGCGAAGTTCTTAAAGAAATACTTGTCACTTATG
GTTGTATAGAAGATATCACCCCTAAGTGGTTTTGAAGAGAATAAGGATTGGTACGACCCAA
TAGAAAACCCCTAAATATTATGCCATGTTGGCTAAAATGGGACCTATTGTACGACGTGCTT
TATTGAATGCTATTGAGTTCGGAAACCTCATGGTTGAAAAAGGTTATGTTGGTGTATTATA
CACTTGATAACCAAGATCTTAATGGCAAATTTTATGATTTTGGTGTATTTT CAGAAGACAG
CGCTGGTGTGGTGTTCCTGTTTTTGTATACGTATTATTCTTACATGATGCCCATCATAG
CCATGACTGATGCGTTGGCACCTGAGAGGTATTTTGAATATGATGTGCATAAGGGTTATA
AATCTTATGATCTCCTCAAGTATGATTATACTGAGGAGAAACAAGATTTGTTT CAGAAGT
ACTTTAAGTATTGGGATCAAGAGTATCACCCCTAACTGTGCGGACTGTAGTGTGACAGGT
GTTTGATACATTGTGCAAACCTTCAACATCTTGTTTTCTACACTTGTACCGCAGACTTCTT
TCGGTAATTTGTGTAGAAAGGTTTTTGTGTTGATGGTGTACCATTTATAGCTACTTGTGGCT
ATCATTCTAAGGAACTTGGTGTATTATGAATCAAGATAACACCATGTCATTTTCAA AAA
TGGGTTTGTAGTCAACTCATGCAGTTTGTGGAGATCCTGCCTTGTAGTGGGGACATCCA
ATAAATTAGTGGATCTTAGAACGTCTTGTTTTGTAGTGTGTTGCTTTAGCGTCTGGTATTA
CTCATCAAACGGTAAAACCAGGTCACCTTAAACAAGGATTTCTACGATTTTGCAGAGAAGG
CTGGTATGTTTAAAGGAAGGTTCTTCTATACCCTTAAACATTTCTTCTACCCACAGACTG
GTAATGCTGCTATAAACGATTATGATTATATCCTTATAACAGGCCTACCATGTTTGATA
TACGTCAACTTTTATTTTGTTTAGAAGTACTTCTAAATATTTGAAATGTTATGAAGGCG
GCTGTATACCAGCAAGCCAAGTTGTAGTTAACAATTTAGATAAGAGTGCAGGTTATCCGT
TCAATAAGTTTGGAAAGGCCCTCTCTATATGAAATGAGTCTAGAGGAGCAGGACCAAC
TCTTTGAGAGTACAAAGAAGAAGCTCCTGCCTACTATAACTCAGATGAATTTAAATATG
CCATATCCGCGAAAAATAGAGCGCGTACAGTGGCAGGTGTGTCTATCCTTTCTACTATGA
CTAATAGGCAGTTTCATCAGAAGATTCTTAAGTCTATAGTCAACACTAGAAACGCTCCTG
TAGTTATTGGAACAACCAAGTTTTATGGCGGTTGGGATAACATGTTGAGAAACCTTATTC
AGGGTGTGAAAGACCCGATTCTTATGGGTTGGGATTATCCAAAGTGTGATAGAGCAATGC
CTAATTTGTTGCGTATAGCAGCATCTTTAGTACTCGCTCGTAAACACACTAATTTGTTGTA
CTTGGTCTGAACCGGTTTATAGGTTGTATAATGAATGCGCTCAGGTTTTATCTGAAACTG
TCTTAGCTACAGGTGGTATATATGTGAAACCTGGTGGTACTAGCAGTGGAGATGCTACTA
CTGCTTATGCAAACAGTGTTTTCAACATAATAACAAGCCACATCTGCTAATGTTGCGCGTC
TTTTGAGTGTATAACCGGTGATATTGTATATGATGACATTAAGAGCTTGCAGTATGAAT

TGTACCAGCAGGTTTATAGGCGAGTCAATTTTGACCCAGCATTGTTGAAAAGTTTATT
CTTATTTGTGTAAGAATTTCTCATTGATGATCTTGTCTGACGACGGTGTGTTTGTATA
ACAACACATTAGCCAAACAAGGTCTTGTAGCAGATATTTCTGGTTTTAGAGAAGTTCTCT
ACTATCAGAACAATGTTTTTATGGCTGATTCTAAATGTTGGGTTGAACCAGATTTAGAAA
AAGGCCACATGAATTTTGTTCACAGCACACAATGTTAGTGGAGGTTGATGGTGAGCCTA
GATACTTGCCATATCCAGACCCATCACGTATTTTGTGTGCATGTGTTTTTGTAGATGATT
TGGATAAGACAGAATCTGTGGCTGTATGGAGCGTTATATCGCTCTTGCCATAGATGCGT
ACCCACTAGTACATCATGAAAATGAGGAGTACAAGAAGTATTCTTTGTGCTTCTTTTCAT
ACATCAGAAAACCTCTATCAAGAGCTTTCTCAGAATATGCTTATGGACTACTCTTTTGTAA
TGGATATAGATAAAGGTAGTAAATTTGGGAACAGGAGTCTATGAAAATATGTATAGAG
CCCCTACAACATTACAGTCTTGTGGCGTTTGTGTAGTGTGTAATAGTCAAACCTATATTGC
GCTGTGGTAATTTGATTCGCAAACCAATTTTGTGTTGTAAGTGTGCTATGACCATGTCA
TGCACACAGACCACAAAATGTTTTGTCTATAAATCCTTACATTTGCTCACAGCCAGGTT
GTGGTGAAGCAGATGTTACTAAATGTACCTCGGAGGTATGTCATACTTCTGCGGTAATC
ATAAACCAAAGTTATCAATACCGTTAGTATCTAATGGTACAGTGTGTTGGAATTTACAGGG
CTAATTTGTGCAGGTAGCGAAAATGTTGATGATTTTAATCAACTAGCTACTACTAATTTGGT
CTACTGTGGAACCTTATATTTTGGCAAATCGTTGTGTAGATTCGTTGAGACGCTTTGCTG
CAGAGACAGTAAAAGCTACAGAAGAATTACATAAGCAACAATTTGCTAGTGCAGAAGTGA
GAGAAGTACTCTCAGATCGTGAATTTGATCTGTCTTGGGAGCCAGGTAACCAGGCCTC
CATTGAATAGAAAATATGTTTTCACTGGCTTTCACTTTACTAGAAGTAAAGTTTACAGC
TCGGTGAATTTTACATTTGAAAAGGTGAAGGTAAGGACGTTGTCTATTATCGAGCGACGT
CTACTGCTAAATTTGTCTGTTGGAGACATTTTTGTTTTAACCTCACACAATGTTGTTTCTC
TTATAGCGCCAACGTTGTGTCTCAGCAAACCTTTTCTAGGTTTGTGAATTTAAGACCTA
ATGTGATGGTACCTGCGTGTGTTTGTAAATAACATTCATTTGTACCATTTAGTAGGCAAGC
AGAAGCGTACTACAGTACAAGGCCCTCCGCGAGTGGTAAATCCCATTTTGTCTATAGGAT
TGGCGGCTTACTTTAGTAACGCCCGTGTGCTTTTTACTGCATGCTCTCATGCAGCTGTTG
ATGCTTTATGTGAAAAGCTTTTAAAGTTTCTTAAAGTAGATGATTGCACTCGTATAGTAC
CTCAAAGGACTACTATCGATTGCTTCTCTAAGTTTAAAGCTAATGACACAGGCAAAAAGT
ACATTTTTAGTACTATTAATGCCTTGCCAGAAGTTAGTTGTGACATTTCTTTTGGTTGACG
AGGTTAGTATGTTGACCAATTACGAATTTGCTTTTTATTAATGGTAAGATAAACTATCAAT
ATGTTGTGTATGTAGGTGATCCTGCTCAATTAACGGCGCCCGTACGTTGCTTAACGGTT
CACTCTCTCCAAAGGATTATAATGTTGTACAAACCTTATGGTTTGTGTTAAACCTGACA
TTTTCTTGGCAAAGTGTACCCTGTTCTTAAAGAAATTTAGATACTGTTTCTACTCTTG
TATATGATGGAAAAGTTTATTGCAAATAACCCGGAATCACGTCAGTGTTCAGGTTATAG
TTAATAATGGTAATTTCTGATGTAGGACATGAAAGTGGCTCAGCCTACAACATAACTCAAT
TAGAATTTGTGAAAGATTTTGTCTGTGCAATAAGGAATGGCGGGAAGCAACATTCATTT
CACCTTATAATGCTATGAACCAGAGAGCCTACCGTATGCTTGGACTTAATGTTTACAGACAG
TAGACTCGTCTCAAGGTTCCGGAGTATGATTATGTTATCTTTGTGTTACTGCAGATTCGC
AGCATGCACTGAATATTAACAGATTCAATGTAGCGCTTACAAGAGCCAAGCGTGGTATAC
TAGTTGTGATGCGTCAGCGTATGAACTATAATTCAGCTCTTAAGTTTATAGAGCTTGATA
GTGTAGCAAGTCTGCAAGGTACAGGCTTGTTTAAAATTTGCAACAAAGAGTTTGTGGTGT
TTCACCCAGCTTATGCAGTACAACTAAGGCTCTTGTGCAACTTATAAAGTTAATGATG
AACTTGTGCACTTGTAAACGTGGAAGCTGGTTCAGAAATAACATATAAACATCTTATTT
CTTTGTTAGGGTTTAAAGATGAGTGTAAATGTTGAAGGCTGCCACAACATGTTTATAACAC
GTGATGAGGCTATCCGCAACGTAAGAGGTTGGGTAGGTTTGTGATGTAGAAGCAACACATG
CTTGGCGTACTAACATTTGGTACTAACCTGCCTTTCCAAGTAGGTTTCTCTACTGTTGCGAG
ACTTTGTAGTTACGCCTGAGGGACTTGTAGATACTTCAATAGGCAATAATTTTGTAGCCTG
TGAATTTCTAAAGCACCTCCAGGTGAACAATTTAATCACTGAGAGCGTTATTCAAAGTG
CTAAACCTTGGCATGTTGTAAGGCCAAGGATTTGTGCAATGTTAGCGGATAACCTGTGCA
ACGTTTACAGATTGTGTAGTGTGTTGTACAGTGGTGTGATGGCCTAGAAGTAAACCTTTGC
GCTATTTTGTAAAATAGGCAAGGACCAAGTTGTTCTTGGCGTTCTAGAGCAACAACCTT
TTAATTTCTCATACTCAGGCTTATGCTTGTGGAAGCATTGCTTGGGTTTTGATTTTGTGTT
ATAATCCACTCTTAGTGGATATTAACAGTGGGTTATTCTGTTAACCTACAATTTAACC
ATGATTTGCATTTGTAATGTGCATGGACACGCACATGTAGCTTCTGCGGATGCTATTTATGA
CGCGTTGTCTTGAATTAATAATGCATTTTGTCAAGATGTCAACTGGGATTTAACTTACC
CTCATATAGCAAATGAGGATGAAGTCAATTTCTAGCTGTAGATATTTACAACGCATGTATC
TTAATGCATGTGTTGATGCTCTTAAAGTTAACGTTGTCTATGATATAGGCAACCCCTAAG

GTATAAAATGTGTTAGACGTGGAGACTTAAATTTTATGATTCTATGATAAGAATCCAATAG
TACCCAATGTCAAGCAGTTTGGAGTATGACTATAATCAGCACAAAGATAAGTTTGGCTGATG
GTCTTTGTATGTTTTGGAATTTGTAATGTGGATTGTTATCCCGACAATTCCTTAGTTTGT
GGTACGACACACGAAATTTGAGTGTGTTTAACTACCTGGTTGTAATGGTGGTAGCTTGT
ATGTTAACAAGCATGCATTCACACACCTAAATTTGATCGCACTAGCTTTCGTAATTTGA
AAGCTATGCCATTTCTTTTCTATGACTCATCGCCTTTCGAGACCATTCAATTTGGATGGAG
TTGCGCAAGACCTTGTGTCATTAGCTACGAAAGATTGTATCACAAAATGCAACATAGGCG
GTGCTGTTTGTAAAAAGCACGCACAAAATGTATGCAGATTTTGTGACTTCTTATAATGCAG
CTGTTACTGCTGGTTTTACTTTTTGGGTTACTAATAATTTTAAACCATATAATTTGTGGA
AAAGTTTTTTCAGCTCTCCAGTCTATCGACAATATTGCTTATAATATGTATAAGGTTGGTC
ATTATGATGCTATTGCAGGAGAAATGCCACTATCGTAACTGGAGATAAAGTTTTTGTTA
TAGATCAAGGCGTAGAAAAAGCAGTTTTTTTTTAAATCAAACAATCTGCCTACATCTGTAG
CGTTTTGAGCTGTATGCGAAGAGAAATATTCGCACACTGCCAAACAACCGTATTTTGAAG
GTTTTGGGTGTAGATGTGACTAATGGATTTGTAATTTGGGATTACACGAACCAACACCAC
TATACCGTAATACTGTTAAGGTATGTGCATATACAGACATAGAACCATAATGGCCTAATAG
TGCTGTATGATGATAGATATGGTGATTACCAGTCTTTTTCTAGCTGCTGATAATGCTGTTT
TAGTTTTCTACACAGTGTACAGCGGTATTCGATGTAGAAATACCGTCAAACCTGCTTG
TTCAGAACGGTATTCCGTTAAAAGATGGAGCGAACCTGTATGTTTATAAGCGTGTAAATG
GTGCGTTTTGTTACGCTACCTAACACATTAAACACACAGGGTCGCAGTTATGAACTTTTG
AACCTCGTAGTGATGTTGAGCGTGATTTTTCTCGACATGTCTGAGGAGAGTTTTGTAGAAA
AGTATGGTAAAGAATFAGGTCTACAGCACATACTGTATGGTGAAGTTGATAAGCCCCAAT
TAGGTGGTTTACACACTGTTATAGGTATGTGCAGACTTTTTACGTGCGAATAAGTTGAACG
CAAAGTCTGTTACTAATTTCTGATTTCTGATGTCAATGAAAATTTTGTATTGGCAGACA
ATGTTTCTTACAAGCAAGTGTGTTACTGTTGTGGATTTGCTGCTTGATGATTTCTTAGAAC
TTCTTAGGAACATACTGAAAAGATGTTACTAATAAGTCTAAAGTTGTAACAGTGTCAA
TTGATTACCATAGCATAAAATTTTATGACTTGGTTTGAAGATGGCATTATTAACACATGTT
ATCCACAGCTTCAATCAGCATGGACGTGTGGTTATAATATGCCTGAACTTTTATAAAGTTC
AGAATTGTGTTATGGAACCTTGCAACATTCTAATTTATGGTGTGGAATAGCGTTGCCAA
GTGGTATTATGATGAATGTGGCAAAGTATACACAACCTCTGTCAATACCTTTCGAAAACAA
CAATGTGTGFACCGCATAATATGCGAGTAATGCATTTTGGAGCTGGAAGTGACAAAGGAG
TGGCTCCAGGTAGTACTGTTCTTAAACAATGGCTCCCAGAAGGGACACTCCTTGTGATA
ATGATATTGTAGACTATGTGCTGATGCACATGTTTCTGTGCTTTCAGATTGCAATAAAT
ATAAGACAGAGCACAAGTTTTGATCTTGTGATATCTGATATGTATACAGACAATGATTCAA
AAAGAAAGCATGAAGGCGTGATAGCCAATAATGGCAATGATGACGTTTTTCATATATCTCT
CAAGTTTTTCTCGTAATAATTTGGCTCTAGGTGGTAGTTTTGCTGTAAAAGTGACAGAGA
CAAGTTGGCACGAAGTTTTTATATGACATTGCACAGGATTGTGCATGGTGACAATGTTTT
GTACAGCAGTGAATGCCTCTTCTCAGAAGCATTTCTGGTTGGTGTAAATTTTGGGTG
CAAGTGAAGGTTAAGGTTAGTGGAAAACGCTGCACGCAAATTATATTTTTGGAGGA
ATTGTAATTTATTTACAAACCTCTGCTTATAGTATATTTGACGTTGCTAAGTTTGATTTGA
GATTGAAAGCAACACCAGTTGTTAATTTGAAAACCTGAACAAAAGACAGACTTAGTCTTTA
ATTTAATTAAGTGTGGTAAGTTACTGGTAAGAGATGTTGGTAAACACCTCTTTTACTAGTG
ACTCTTTTGTGTGTTACTATGTAGTGTGCTTTTGTATGACAGTAGTTCTTACGTTTACTAC
TACCAAAGTGCCTTTAGACCACCTAATGGTTGGCATTACACGGGGGTGCTTATGCGGTA
GTTAATATTTCTAGCGAATCTAATAATGCAGGCTCTTACCTGGGTGTATTGTTGGTACT
ATTCATGGTGGTTCGTTGTTAATGCTTCTTCTATAGCTATGACGGCACCGTTCATCAGGT
ATGGCTTGGTCTAGCAGTCAGTTTTGTTACTGCACACTGTAACTTTTTCAGATACTACAGTG
TTTGTACACATTTGTTATAAATATGATGGGTGTCTATAACTGGCATGCTTCAAAGAAT
TTTTTACGTGTTTCTGCTATGAAAAATGGCCAGCTTTTCTATAATTTAACAGTTAGTGTA
GCTAAGTACCCTACTTTTTAAATCATTTTCAGTGTGTTAATAATTTAACATCCGTATATTTA
AATGGTGTCTTGTTTACACCTCTAATGAGACCACAGATGTTACATCTGCAGGTGTTTTAT
TTTTAAAGCTGGTGGACCTATAACTTATAAAGTTATGAGAGAAGTTAAAGCCCTGGCTTAT
TTTTGTTAATGGTACTGCACAAGATGTTATTTTGTGTGATGGATCACCTAGAGGCTTGTTA
GCATGCCAGTATAATACTGGCAATTTTTTCAGATGGCTTTTTATCCTTTTATTAATAGTAGT
TTAGTTAAGCAGAAGTTTTATTGTCTATCGTGAAAATAGTGTTAATACTACTTTTACGTTA
CACAATTTCACTTTTCATAATGAGACTGGCGCCAACCTAATCCTAGTGGTGTTCAGAAT
ATTCAAACTTACCAACACAAACAGCTCAGAGTGGTTATTATAATTTTAAATTTTCCCTTT
CTGAGTAGTTTTTGTATAAGGAGTCTAATTTTTATGTATGGATCTTATCACCCAAGTTGT

AATTTTAGACTAGAACTATTAATAATGGCTTGTGGTTAATTCACCTTCAGTTTCAATT
GCTTACGGTCCTCTTCAAGGTGGTTGCAAGCAATCTGTCTTCTAGTGGTAGAGCAACTTGT
TGTTATGCTTATTCATATGGAGGTCCTTCGCTGTGTAAGGTGTTTATTTCAGGTGAGTTA
GATCTTAATTTTGAATGTGGACTGTTAGTTTATGTTACTAAGAGCGGTGGCTCTCGTATA
CAAACAGCCACTGAACCGCCAGTTATAACTCGACACAATTATAATAATATTACTTTAAAT
ACTTGTGTTGATTATAATATATATGCGAGAAGTGGCCAAGGTTTATTACTAATGTAACC
GACTCAGCTGTTAGTTATAAATFCTAGCAGACGCAGGTTTGGCTATTTTAGATACATCT
GGTCCATAGACATCTTGTGTGACAAGGTGAATATGGTCTTACTTATTATAAGGTTAAC
CCTTGCAGAGATGTCAACCAGCAGTTTGTAGTTTCTGGTGGTAAATFAGTAGGTATTCTT
ACTTCACGTAATGAGACTGGTTCAGCTTCTTGAGAACCAGTTTACATTAATAACTACT
AATGGAACACGTCGTTTGTAGACGTTCTATTACTGAAAATGTTGCAAATGCCCCTTATGTT
AGTTATGGTAAGTTTTGTATAAAACCTGATGGTCAATGCCCACAAATAGTACCAAAACAA
TTGGAACAGTTTGTGGCACCTTACTTAATGTTACTGAAAATGTTGCTCATAACCTAACAGT
TTTAATTTAACTGTTACAGATGAGTACATACAAACCGGTATGGATAAGGTCCAAATTAAT
TGTCTGCAGTATGTTTGTGGCAATCTCTGGATGTTAGAGATTTGTTTCAACAATATGGG
CCTGTTTGTGACAACATATGTTCTGTAGTAAATAGTATTGGTCAAAAAGAAGATATGGAA
CTTTTGAATTTCTATTCTTCTACTAAACCGGCTGGTTTTAATAACACCATTCTTAGTAAT
GTTAGCACTGGTGGTAAATATTTCTCTCTGTTAACAACCTAGTAGTCTTAGAAGG
CGTTCTTTTATGGAAGACCTTCTATTTACAAGCGTTGAATCTGTTGGATTACCAACAGAT
GACGCATACAAAATGCACTGCAGGACCTTTAGGTTTTCTTAAGGACCTTGCCTGTGCT
CGTGAATATAATGGTTTGGCTTGTGTTGCCTCCCATTATAACAGCAGAAATGCAAATTTTG
TATACTAGTCTCTAGTAGCTTCTATGGCTTTTGGTGGTATTACTGCAGCTGGTGTATA
CCTTTTGGCCACACAACCTGCAGGCTAGAATTAATCACTTGGGTATTACCCAGTCACTTTTG
TTGAAGAATCAAGAAAAAATGCTGCTTCTTTAATAAGGCCATTGGTCTATGCAGGAA
GGTTTTAGAAGTACATCTCTAGCATTACAACAAATCAAGATGTTGTTAATAAGCAGAGT
GCTATTCTTACTGAGACTATGGCATCACTTAATAAAAATTTTGGTGTATTCTTCTATG
ATTCGAAGAAATCTACCAGCAACTGACGCCATACAAGCAAATGCTCAAGTGGATCGTCTT
ATAACTGGTAGATTGTCATCACTTCTGTTTTAGCATCTGCTAAGCAGGCGGAGCATATT
AGAGTGTCAACAACAGCGTGAAGTACTCAGAAAAATTAATGAGTGTGTTAAGTACAG
TCTATTAGGFACTCCTTTTGTGGTAATGGACGACATGTTCTAACCATACCGCAAATGCA
CCTAATGGTATAGTGTATATACACTTTTCTTATACTCCAGATAGTTTTGTTAATGTTACT
GCAATAGTGGGTTTTTGTGTAAGCCAGCTAATGCTAGTCAAGTATGCAATAGTACCCGCT
AATGGTAGGGGTATTTTTATAACAAGTTAATGGTAGTTACTACATCACAGCAGAGATATG
TATATGCCAAGAGCTATTACTGCAGGAGATATAGTTACGCTTACTTCTTGTCAAGCAAAT
TATGTAAGTGTAAATAAGACCGTCAATTACTACATTCGTAGACAATGATGATTTTGATTTT
AATGACGAATGTCAAATGGTGGAAATGACACTAAGCATGAGCTACCAGACTTTGACAAA
TTCAATTACACAGTACCTATACTTGACATTGATAAGTGAATGATCGTATFCAAGGCGTT
ATACAGGGTCTTAATGACTCTTTAATAGACCTTGAACAACTTTCAATACTCAAACCTTAT
ATTAAGTGGCCTTGGTATGTGTGGTTAGCCATAGCTTTTGGCACTATTATCTTCACTTA
ATACTAGGATGGGTTTTCTTCACTGACTGGATGTTGTGGTTGTTGTTGTGGATGCTTTGGC
ATTATGCCTCTAATGAGTAAGTGTGGTAAGAAATCTTCTTATTACACGACTTTTGATAAC
GATGTGGTAACTTAACAATACAGACCTAAAAGTCTGTTAATGATTCÀAAGTCCCACGT
CCTTCCATAATAGTATTAATTTTTCTTTGGTGTAAACTTGFACTAAGTTGTTTTAGAGAGT
TTATTATAGCGCTCCAACAATAATAACAAGTTTTACTCCAAATTATCAATAGTAACTTAC
AGCCTAGACTGACCCTTTGTACAGCTCTAGACTAATGTTAAACTTAGAAGCAAATTATTGA
AACTGGTGGAGCAAGTGAATCAAATAATCAGTTTTCAATTTACAGCATATTTCAAGTGTATT
AAACACAGAAGTATTTGACCCCTTTGACTATTTGTTATTACAGAGGAGGTAATTTTTGGGA
AATAGAGTCAAGTATTTGTTTCAAGGTGATGATGAATTTATTGAATAAGTCCCTAGAGG
AAAATGGAAGTTTTCTAACAGCGCTTTATATATTTGTAGGATTTTTAGCACTTTATCTTC
TAGGTAGAGCACTTCAAGCATTGTACAGGCTGCTGATGCTTGTGTTTATTTTGGTATA
CATGGGTAGTAATCCAGGAGCTAAGGGTACAGCCTTTGTATATAAGTATAACATATGGTA
GAAAATTAACAATCCGGAATTAGAAGCAGTTATTGTCAACGAGTTTCCTAAGAACGGTT
GGAATAATAAAAATCCAGCAAATTTTTCAAGATGTCCAACGAGACAAATTTACTCTTGAC
TTTGAACAGTCAAGTTGAGCTTTTTAAAGAGTATAAATTTATTATACTGCATTTCTGTTG
TTCTTAACCATAATACTTCAAGTATGGCTATGCAACAAGAAGTAAGTTTATTATATACTG
AAAATGATAGTGTATGGTGTCTTTGGCCCTTAAACATTGCAGTAGGTGTAATTTCAATGT
ATATACCCACCAAACACAGGAGGCTTGTGCGCAGCGATAATACTTACAGTGTGTTGCGTGT

CTGTCTTTTGTAGGTTATTGGATCCAGAGTATTAGACTCTTTAAGCGGTGTAGGTCATGG
 TGGTCATTTAACCAGAACTAATGCCGTAGGTTCAATACTCCTAACTAATGGTCAACAA
 TGTAATTTTGTCTATAGAGAGTGTGCCAATGGTGCTTCTCCAATTATAAAGAATGGTGTT
 CTTTATTGTGAGGGTCAGTGGCTTGCTAAGTGTGAACCAGACCACTTGCCTAAAGATATA
 TTTGTTTGTACACCGGATAGACGTAATATCTACCGTATGGTGCAGAAATATACTGGTGAC
 CAAAGCGGAAATAAGAAACGGTTTGCTACGTTTGTCTATGCAAAGCAGTCAGTAGATACT
 GGCGAGCTAGAAAAGTGTAGCAACAGGAGGGAGTAGTCTTTACACCTAAATGTGTGTGTGT
 AGAGAGTATTTAAAATTATTCTTTAATAGTGCCTCTATTTAAGAGCGCATAATAGTATT
 ATTTTTGAGGATATTAATAAAATCCTCTCTGTTTTATACTCTCTTTTCAAGAGCTATTA
 TTTAAAAACAGTTTTTCCACTCTTTTGTGCCAAAACTATTGTTGTTAATGGTGTAACC
 TTTCAAGTAGATAATGGAAAAGTCTACTACGAAGGAAAACCAATTTTTTCAGAAAGGTTGT
 TGTAGGTTGTGGTTGAGTTATAAAAAAGATTAAACTACCTACTACACTTATTTTTATAAG
 AGGCGTTTTATCTTACAAGCGCTTAATAAATACGGACGATGAAATGGCTGACTAGTTTTG
 TAAGGGCAGTTATTTTCATGTTATAAACCCTATTATTAACCTCAATTAAGAGTATTAGATA
 GGTTAATCTTAGATCATGGACCAAAACACATCTTAACGTGTGTTAGGTGCGTGATTTTTGT
 TTCAATTAGATTTAGTTTTATAGGTTGGCGTATACGCCCTACTCAATCGCTGGTATGAATA
 TAGTAAAGATAATCCTTTTTGCGGAGCAATAGCAAGAAAAGCGCGAATTTATCTGAGAGA
 AGGATTAGATTTGTGTTTACTTTCTTAACAAAGCAGGACAAGCAGAGTCTTGTCCCGCGTG
 TACCTCTCTAGTATTCAGGGGAAAACCTTGTGAGGAACACAAATATAATAATAATCTTTT
 GTCATGGCAAGCGGTAAGGCAACTGGAAAGACAGATGCCCCAGCTCCAGTCATCAAATA
 GGAGGACCAAAGCCACCTAAAGTTGGTCTTCTGGAAATGTATCTTGGTTTCAAGCAATA
 AAAGCCAAGAAGTTAAATTCACCTCCGCCTAAGTTTGAAGGTAGCGGTGTTCCCTGATAAT
 GAAAATCTAAAACCAAGTCAGCAGCATGGATATTGGAGACGCCAAGCTAGGTTAAGCCA
 GGTAAGGTGGAAGAAAACCAAGTCCCAGATGCTTGGTATTTTTACTATACTGGAACAGGA
 CCAGCCGCTAACCTGAATFGGGGTGATAGCCAAGATGGTATAGTGTGGGTTGCTGGTAAG
 GGTGCTGATACTAAATTTAGATCTAATCAGGGTACTCGTGACTCTGACAAGTTTGACCAA
 TATCCGCTACGGTTTTTCAGACGGAGGACCTGATGGTAATTTCCGTTGGGATTTCAATTCCT
 CTGAATCGTGGCAGGAGTGGGAGATCAACAGCAGCTTCATCAGCAGCATCTAGTAGAGCA
 CCATCACGTGAAGTTTCGCGTGGTTCGAGGAGTGGTCTGAAGATGATCTTATTGCTCGT
 GCAGCAAGGATAAATTCAGGATCAGCAGAAGAAGGGTCTCGCATTACAAAGGCTAAGGCT
 GATGAAATGGCTCACCGCCGTTATTGCAAGCGCACTATTCCACCTAATTATAAGGTTGAT
 CAAGTGTTTGGTCCCCGTACTAAAGGTAAGGAGGGAAATTTGGTGATGACAAGATGAAT
 GAGGAAGGTATTAAGGATGGGCGCGTTACAGCAATGCTCAACCTAGTTCCCTAGCAGCCAT
 GCTTGTCTTTTCGGAAGTAGAGTGACGCCAGACTTCAACCAGATGGGCTGCACTTGAAA
 TTTGAATTTACTACTGTGGTCCCACGTGATGATCCGCAGTTTGATAATTATGTAATAAATT
 TGTGATCAGTGTGTTGATGGTGTAGGAACACGTCCTCAAAGATGATGAACCAAGACCAAAG
 TCACGCTCAAGTTCAAGACCTGCAACAAGAGGAAATTTCTCCAGCGCCAAGACAGCAGCGC
 CCTAAGAAGGAGAAAAAGCCAAAGAAGCAGGATGATGAAGTGGATAAAGCATTGACCTCA
 GATGAGGAGAGGAACAATGCACAGCTGGAATTTGATGATGAACCAAGGTAATTAACCTGG
 GGGGATTCAGCCCTAGGAGAGAATGAACTTTGAGTAAAATTTCAATAGTAAGAGTTAAGGA
 AGATAGGCATGTAGCTTGATTACCTACATGTCTATCGCCAGGGAAATGTCTAATTTGTCT
 ACTTAGTAGCCTGGAAACGAACGGTAGACCCCTTAGATTTTAATTTAGTTTAATTTTGTAGT
 TTAGTTTAAGTTAGTTTAGAGTAGGTATAAAGATGCCAGTGCCGGGGCCACGCGGAGTAC
 GACCCAGGGTACAGCACTAGGACGCCCATTAGGGGAAGAGCTAAATTTTAGTTTAAGTTA
 AGTTTAATTTGGCTATGTATAGTTAAAATTTATAGGCTAGTATAGAGTTAGAGCAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【 0 0 6 0 】

レプリカーゼ

構造遺伝子およびアクセサリ-遺伝子に加えて、コロナウイルスゲノムの3分の2は、2つのポリタンパク質、pp1aおよびpp1abとして発現されるレプリカーゼ遺伝子を(ゲノムの5'末端に)含んでなり、ここで、pp1abは-1リボソームシフト機構の結果としてのpp1aの伸長産物である。2つのポリタンパク質は2種のウイルスコード化プロテイナーゼによって切断され、通常、16種類の非構造タンパク質(Nsp1~16)を生じる；IBVはNsp1を欠き、それによりNsp2~16をコードする。

【 0 0 6 1 】

従って、IBV中の遺伝子1は、RNA複製および転写に関連する15種類の非構造タ

ンパク質（他のコロナウイルスでは16種類）（nsp2～16）をコードする。

【0062】

用語「レプリカーゼタンパク質」は、本明細書では、ポリタンパク質pp1aおよびpp1abまたは個々のnspサブユニットを意味するために使用される。

【0063】

用語「レプリカーゼ遺伝子」は、本明細書では、レプリカーゼタンパク質をコードする核酸配列を意味するために使用される。

【0064】

コロナウイルスnspタンパク質の機能の概要を表1に示す。

【0065】

【表1】

10

Nsp タンパク質	重要な特徴
1	コロナウイルス遺伝子群間でなければ保存されている;宿主細胞において潜在的調節機能
2	組織培養におけるMHVおよびSARS-CoV複製には重要でない
3	酸性ドメイン;ADRPおよびポリ(ADP-リボース)結合活性を有するマクロドメイン;1または2つのZBD含有パピイン様プロテアーゼ;Yドメイン
4	膜貫通ドメイン
5	3C様主要プロテアーゼ,ホモ二量体
6	膜貫通ドメイン
7	nsp8と相互作用して16量複合体を形成
8	非古典的RNAポリメラーゼ;nsp7と相互作用して16量複合体を形成
9	ssRNA結合タンパク質,2量体
10	RNA結合タンパク質,ホモ12量体,亜鉛結合ドメイン,nsp14およびnsp16と相互作用することが知られる
11	未知
12	RNA依存性RNAポリメラーゼ
13	亜鉛結合ドメイン,NTPアーゼ,dNTPアーゼ,5'→3'RNAおよびDNAヘリカーゼ,RNA5'-3リン酸
14	3'→5'エキソリボヌクレアーゼ,亜鉛結合ドメインおよびN7-メチルトランスフェラーゼ
15	ウリジル酸特異的エンドリボヌクレアーゼ,ホモ6量体
16	推定リボース-2'-O-メチルトランスフェラーゼ

【0066】

本発明のコロナウイルスによってコードされる変異型レプリカーゼ遺伝子は、nsp-10、nsp-14、nsp-15またはnsp-16をコードする配列の部分の1以上に突然変異を含んでなる。

【0067】

Nsp10は、RNA結合活性を有し、pp1a/pp1ab領域の他のnsp内での同型および/または異型相互作用に関与すると思われる。これは、5つの α -ヘリックス、1つの β -ヘリックスおよび3つの β 鎖から構成される β 折りたたみ構造をとる。保存されたシステイン残基および1つのヒスチジン残基により形成される2つの亜鉛結合部位が同定されている(Cys-74/Cys-77/His-83/Cys-90;Cys-117/Cys-120/Cys-128/Cys-130)。このタンパク質は、明らかな特異性なく一本鎖および二本鎖のRNAおよびDNAに結合することが確認されている。Nsp-10はnsp-9と架橋することができ、nsp-7、-8、-9および-10を含むタンパク質-タンパク質相互作用の複雑なネットワークの存在を示唆している。加えて、nsp-10は、nsp-14およびnsp-16と相互作用することが知られている。

40

50

【0068】

Nsp-14は、アミノ末端領域に3' 5'エキソリボヌクレアーゼ(エキソン)活性ドメインを含んでなる。SARS-CoVエキソンは、DNAではなく、一本鎖および二本鎖RNAの両方に作用する金属イオン依存性の3' 5'エキソリボヌクレアーゼ活性を有することが実証されている。Nsp-14は、プルーフリーディング活性を有することが示されている。このnspはまた、カルボキシル末端領域にN7-メチルトランスフェラーゼ(MT)活性を有することも示されている。

【0069】

Nsp-15関連NendoU(Uに特異的なニドウイルスエンドリボヌクレアーゼ)RNAーゼ活性は、SARS-CoV、MHVおよびIBVを含む複数のコロナウイルスで報告されている。これらの活性は、Mn²⁺イオンによって著しく増強されることが一貫して報告され、Mg²⁺およびCa²⁺の存在下ではほとんど活性がなかった。NendoUは、一本鎖および二本鎖RNAの両方のウリジル酸残基の3'側で切断する。コロナウイルスNendoUの生物学的に関連する基質はまだ同定されていない。

10

【0070】

Nsp-16は、リボース-2'-O-メチルトランスフェラーゼ(2'-O-MTアーゼ)活性を媒介すると推定されており、逆遺伝学実験によって、2'-O-MTアーゼドメインがHCoV-229EおよびSARS-CoVにおけるウイルスRNA合成に不可欠であることが示されている。この酵素は、コロナウイルスRNAのcap1構造の生成に関与している可能性があり、また、他のRNAプロセッシング経路においてNendoUおよびエキソンと共働することもある。2'-O-Mtアーゼはまた、NendoUを介した切断から保護するために、特異的なRNAをメチル化し得る。

20

【0071】

nsp-10、-14、-15および-16のゲノムおよびタンパク質の配列はそれぞれ配列番号2~5および6~9として提供される。

【0072】

配列番号2 (nsp-10ヌクレオチド配列 - 配列番号1のヌクレオチド11884~12318)

```
TCTAAAGGTCATGAGACAGAGGAAGTGGATGCTGTAGGCATTCTCTCACTTTGTTCTTTTGCAGTA
GATCCTGCGGATACATATTGTAAATATGTGGCAGCAGGTAATCAACCTTAGGTAAGTGTGTTAAA
ATGTTGACAGTACATAATGGTAGTGGTTTTGCAATAACATCAAAGCCAAGTCCAACCTCCGGATCAG
GATTCTTATGGAGGAGCTTCTGTGTGTCTTTATTGTAGAGCACATATAGCACACCTTGGCGGAGCA
GGAAATTTAGATGGACGCTGTCAATTTAAAGGTTCTTTTGTGCAAATACCTACTACGGAGAAAGAT
CCTGTTGGATTCTGTCTACGTAACAAGGTTTGCACCTGTTTGTGTCAGTGTGGATTGGTTATGGATGT
CAGTGTGATTCACCTTAGACAACCTAACCTTCTGTTTCAG
```

【0073】

配列番号3 (nsp-14ヌクレオチド配列 - 配列番号1のヌクレオチド16938~18500)

GGTACAGGCTTGTTTTAAAATTTGCAACAAAGAGTTTAGTGGTGTTACCCAGCTTATGCAGTCACA
 ACTAAGGCTCTTGCTGCAACTTATAAAGTTAATGATGAACTTGCTGCACTTGTTAACGTGGAAGCT
 GGTTCAGAAATAACATATAAACATCTTATTTCTTTGTTAGGGTTTAAGATGAGTGTTAATGTTGAA
 GGCTGCCACAACATGTTTATAACACGTGATGAGGCTATCCGCAACGTAAGAGGTTGGGTAGGTTTT
 GATGTAGAAGCAACACATGCTTGCGGTAACATTGGTACTAACCTGCCTTTCCAAGTAGGTTTC
 TCTACTGGTGCAGACTTTGTAGTTACGCCTGAGGGACTTGTAGATACTTCAATAGGCAATAATTTT
 GAGCCTGTGAATTCTAAAGCACCTCCAGGTGAACAATTTAATCACTTGAGAGCGTTATTCAAAGT
 GCTAAACCTTGGCATGTTGTAAGGCCAAGGATTGTGCAAATGTTAGCGGATAACCTGTGCAACGTT
 TCAGATTGTGTAGTGTTTGTACGTGGTGTGTCATGGCCTAGAATAACCCTTTGCGCTATTTTGT
 AAAATAGGCAAGGACCAAGTTTGTCTTGGCGTTCTAGAGCAACAACCTTTAATCTCATACTCAG
 GCTTATGCTTGTTGGAAGCATGCTTGGGTTTTGATTTTGTTTATAATCCACTCTTAGTGGATATT
 CAACAGTGGGGTATTCTGGTAACCTACAATTTAACCATGATTTGCATTGTAATGTGCATGGACAC
 GCACATGTAGCTTCTGCGGATGCTATTATGACCGGTTGTCTTGCAATTAATAATGCATTTTGTCAA
 GATGTCAACTGGGATTTAACTTACCCTCATATAGCAAATGAGGATGAAGTCAATCTAGCTGTAGA
 TATTTACAACGCATGTATCTAATGCATGTGTTGATGCTCTTAAAGTTAACGTTGTCTATGATATA
 GGCAACCCATAAGGTATTAAATGTGTTAGACGTGGAGACTTAAATTTTAGATTCTATGATAAGAAT
 CCAATAGTACCCAATGTCAAGCAGTTTGAGTATGACTATAATCAGCACAAAGATAAGTTTGCTGAT

GGTCTTTGTATGTTTTGGAATTGTAATGTGGATTGTTATCCCGACAATTCCTTACTTTGTAGGTAC
 GACACACGAAATTTGAGTGTGTTAACCTACCTGGTTGTAATGGTGGTAGCTTGATGTTAACAAG
 CATGCATTCCACACACCTAAATTTGATCGCACTAGCTTTGTAATTTGAAAGCTATGCCATTCTTT
 TTCTATGACTCATCGCCTTGGGAGACCATTCAATTTGGATGGAGTTGCGCAAGACCTTGTGTCTATTA
 GCTACGAAAGATTGTATCACAAAATGCAACATAGGCGGTGCTGTTTGTAAAAGCACGCACAAATG
 TATGCAGATTTTGTGACTTCTTATAATGCAGCTGTTACTGCTGCTTTTACTTTTTGGGTTACTAAT
 AATTTTAACCCATATAATTTGTGAAAAGTTTTTCAGCTCTCCAG

【 0 0 7 4 】

配列番号 4 (n s p - 1 5 ヌクレオチド配列 - 配列番号 1 のヌクレオチド 1 8 5 0 1 ~ 1
 9 5 1 4)

TCTATCGACAATAFTGCTTATAATATGTATAAAGGTGGTCATTATGATGCTATTGCAGGAGAAATG
 CCCACTATCGTAACTGGAGATAAAGTTTTTGTATAGATCAAGGCGTAGAAAAGCAGTTTTTTTT
 AATCAAACAATTCTGCCTACATCTGTAGCGTTTGGAGCTGTATGCGAAGAGAAATATTCGCACACTG
 CCAAACAACCGTATTTTTGAAAAGTTTTGGGTGTAGATGTGACTAATGGATTTGTAATTTGGGATTAC
 ACGAACCAAACACCCTATAACCGTAATACTGTTAAGGTATGTGCATATACAGACATAGAACCAAT
 GGCTAATAGTGTGCTGATGATGATAGATATGGTGATTACCAGTCTTTTCTAGCTGCTGATAATGCT
 GTTTTAGTTTCTACACAGTGTACAAGCGGTATTCGTATGTAGAAATACCGTCAAACCTGCTTGT
 CAGAACGGTATTCGTTAAAAGATGGAGCGAACCCTGTATGTTTATAAGCGTGTAAATGGTGCCTTT
 GTTACGCTACCTAACACAATAAACACACAGGGTCGAAGTTATGAAACTTTTGAACCTCGTAGTGAT
 GTTGAGCGTATTTTTCTCGACATGTCTGAGGAGAGTTTTGTAGAAAAGTATGGTAAAGAATTAGGT
 CTACAGCACATACTGTATGGTGAAGTTGATAAGCCCCAATTAGGTGGTTTCCACACTGTTATAGGT
 ATGTGCAGACTTTTACGTGCGAATAAGTTGAACGCAAAGTCTGTTACTAATTCTGATTCTGATGTC
 ATGCAAAATTAATTTGTATTGGCAGACAATGGTTCCCTACAAGCAAGTGTGTACTGTTGTGGATTTG
 CTGCTTGATGATTTCTTAGAACTTCTTAGGAACATACTGAAAGAGTATGGTACTAATAAGCTTAAA
 GTTGTAACAGTGTCAATTGATTACCATAGCATAAATTTTATGACTTGGTTTGAAGATGGCATTATT
 AAAACATGTTATCCACAGCTTCAA

【 0 0 7 5 】

配列番号 5 (n s p - 1 6 ヌクレオチド配列 - 配列番号 1 のヌクレオチド 1 9 5 1 5 ~ 2
 0 4 2 3)

TCAGCATGGACGTGTGGTTATAATATGCCTGAACTTTATAAAAGTTCAGAATTGTGTTATGGAACCT
 TGCAACATTCCTAATTATGGTGTGGAAATAGCGTTGCCAAGTGGTATTATGATGAATGTGGCAAAG
 TATACACAACCTCTGTCAATACCTTTTCGAAAACAACAATGTGTGTACCGCATAATATGCGAGTAATG
 CTTTTGGAGCTGGAAGTGACAAAGGAGTGGTGCCAGGTAGTACTGTTCTTAAACAATGGCTCCCA
 GAAGGGACACTCCTTGTGCGATAATGATATTGTAGACTATGTGTCTGATGCACATGTTTCTGTGCTT
 TCAGATTGCAATAAATAAAGACAGAGCACAAGTTGATCTTGTGATATCTGATATGTATACAGAC
 AATGATTCAAAAAGAAAGCATGAAGGCGTGATAGCCAATAATGGCAATGATGACGTTTTTCATATAT
 CTCTCAAGTTTTCTTCGTAATAATTTGGCTCTAGGTGGTAGTTTTGCTGTAAAAGTGACAGAGACA
 AGTTGGCACGAAGTTTTATATGACATTGCACAGGATTGTGCATGGTGGACAATGTTTTGTACAGCA
 GTGAATGCCTCTTCTCAGAAGCATTCTTGATTGGTGTAAATTATTTGGGTGCAAGTGAAAAGGTT
 AAGGTTAGTGGAACAAACGCTGCACGCAAATTATATATTTTGGAGGAATTGTAATTATTTACAAACC
 TCTGCTTATAGTATATTTGACGTTGCTAAGTTTGATTTGAGATTGAAAGCAACGCCAGTTGTTAAT
 TTGAAAACCTGAACAAAAGACAGACTTAGTCTTTAATTTAATTAAGTGTGGTAAGTTACTGGTAAGA
 GATGTTGGTAACACCTCTTTTACTAGTGACTCTTTTGTGTGACTATGTAG

【 0 0 7 6 】

配列番号 6 (n s p - 1 0 アミノ酸配列)

SKGHETEEVDAVGILSLCSFAVDPADTYCKYVAAGNQPLGNCVKMLTVHNGSGFAITSKPSPTPDQ
 DSYGGASVCLYCRAHIAHPGGAGNLDGRQCQFKGSFVQIPTTEKDPVGFCLRNKVCTVCQCWIGYGC
 QCDSLROPKPSVQ

【 0 0 7 7 】

配列番号 7 (n s p - 1 4 アミノ酸配列)

GTGLFKICNKEFSGVHPAYAVTTKALAATYKVNDELALVNVEAGSEITYKHLISLLGFKMSVNVE
 GCHNMFITRDEAIRNVRGWVGFVDEATHACGTNIGTNLFPQVGFSTGADFVVTPEGLVDTSIGNNF
 EPVNSKAPPEGEQFNHLRALFKSAKPWHVVRPRIVQMLADNLCNVSDCVVFTWCHGLELTLRYFV
 KIGKDQVCSCGSRATTFNSHTQAYACWKHCLGDFVYNPLLVDIQQWGYSGNLQFNHDLHCNVHGH
 AHVASADAIMTRCLAINNAFCQDVNWDLTYPHIANEDEVNSSCRYLQRMYNACVDALKVNVVYDI
 GNPKGIKCVRRGDLNFRFYDKNPIVNVKQFEYDYNQHKDKFADGLCMFWNCNVDCYPDNSLVCRY
 DTRNLSVFNLPNGGSLYVNVKHAFHTPKFDRTSFRNLKAMPFFFYDSSPCETIQLDGVAQDLVSL
 ATKDCITKCNIGGAVCKKHAQMYADFVTSYNAAVTAGFTFWVTNNFNPNLWKSFSALQ

20

【 0 0 7 8 】

配列番号 8 (n s p - 1 5 アミノ酸配列)

SIDNIAYNMYKGGHYDAIAGEMPTIVTGDKVFV IDQGVKAVFFNQFILPTSVAFELYAKRNIRTL
 PNNRILKGLGVDVTNGFV IWDYTNQTPLYRNTVKVCAYTDIEPNGLIVLYDDRYGDYQSFLAADNA
 VLVSTQCYKRSYVEIPSNLLVQNGIPLKDGANLYVYKRVNGAFVTLPTLNTQGRSYETFEPRSD
 VERDFLDMSEESFVEKYGKELGLQHILYGEVDKPOLGGLHTVIGMCRLLRANKLNAKSVTNSDSV
 MQNYFVLADNGSYKQVCTVVDLLLDFFLELLRNILKEYGTNKSQVVTVS IDYHSINEMTFEDGII
 KTCYPQLQ

30

【 0 0 7 9 】

配列番号 9 (n s p - 1 6 アミノ酸配列)

SAWTCGYNMPELYKVQNCVMEPCNIPNYGVGIALPSGIMNVAKYTQLCQYLSKTTMCPVPHNMRVM
 HFGAGSDKGVAPGSTVLKQWLPEGTLVNDIVDYVSDAHVSVLSDCNKYKTEHKFDLVISDMYTD
 NDSKRKHEGVIANNGNDDVFIYLSFLRNNLALGGSFAVKVTETSWHEVLYDIAQDCAWWTFCTA
 VNASSSEAFVGVNYLGASEKVKVSGKTLHANYIFWRNCNYLQTSAYSIFDVAKFDLRLKATPVVN
 LKTEQKTDLVFNLIKCGKLLVRDVGNTSFTSDSFVCTM

【 0 0 8 0 】

病原性の低減

本発明の弱毒化生コロナウイルスは、対応する野生型遺伝子を発現するコロナウイルスと比較して該ウイルスの病原性を低減させる変異型レプリカーゼ遺伝子を含んでなる。

【 0 0 8 1 】

本明細書で使用される「弱毒化」という用語は、前記病原性低減を示し、非毒性として

50

分類され得るウイルスを意味する。弱毒化生ウイルスは、実際の病気を引き起こさないが免疫応答を刺激し、免疫をもたらすことがまだ可能である弱められた複製ウイルスである。

【0082】

用語「病原性」は、本明細書において、その通常の意味に従って、対象において疾患を引き起こすウイルスの可能性を意味するために使用される。典型的には、コロナウイルスの病原性は、疾患に関連する症状、例えば、くしゃみ、スニッキングおよび気管線毛運動低下をアッセイすることによって決定される。

【0083】

用語「病原性の低減」は、コロナウイルスの病原性のレベルが対応する野生型コロナウイルスと比較して低下することを記載するために使用される。

10

【0084】

1つの実施形態では、本発明のコロナウイルスは、それが由来する親M41-CKウイルスまたは対照コロナウイルスと比較して病原性が低減されている。対照コロナウイルスは、既知の病原性を有するコロナウイルス、例えば、野生型レプリカーゼタンパク質を発現するコロナウイルスであり得る。

【0085】

コロナウイルスの病原性は、当技術分野で周知の方法を利用して評価し得る。典型的には、病原性は、ウイルスを投与した対象、例えば、ニワトリにおいて臨床症状をアッセイすることによって評価される。

20

【0086】

例として、ニワトリは、8～24日齢で鼻腔または眼接種によりウイルス投与をすることができる。IBV感染に関連する臨床症状は、感染3～10日後に評価し得る。コロナウイルス、例えば、IBVの病原性を決定するために一般的に評価される臨床症状には、あえぎ呼吸、咳、くしゃみ、スニッキング、抑鬱、羽の逆立ておよび気管線毛運動低下が含まれる。

【0087】

本発明の変異型レプリカーゼは、コロナウイルスで発現された場合に、野生型レプリカーゼを発現するコロナウイルスと比較して臨床症状のレベルを低減させ得る。

【0088】

例えば、変異型レプリカーゼを発現するコロナウイルスは、野生型レプリカーゼを発現するウイルスによって引き起こされるスニックの数の90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満または10%未満の、1羽当たり1分間当たりのスニック数を引き起こし得る。

30

【0089】

本発明による変異型レプリカーゼを発現するコロナウイルスは、野生型レプリカーゼを発現するウイルスに感染した群の鳥の数の70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満または10%未満に喘鳴音を引き起こし得る。

【0090】

本発明による変異型レプリカーゼを発現するコロナウイルスは、感染していない鳥での気管線毛運動のレベルの少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも95%である気管線毛運動をもたらし得る。

40

【0091】

本発明による変異型レプリカーゼを発現するコロナウイルスは、野生型レプリカーゼを発現するコロナウイルスよりも低いレベルで、表2に定義される臨床症状を引き起こし得る。

【0092】

【表2】
表2 臨床徴候に基づくIBV重篤度の限界:

スニッキング(くしゃみ)	}	IBV特異: 軽度(N.B.呼吸器兆候が 発生しようとしていれば2~3dpiから 著明となり、最大7日継続し得る)
鼻汁		
涙目		
眼窩下洞の腫脹		
ラ音(気管または気管支の振動)		
円背/抑鬱	}	軽度、2日を越えれば 中等度へ引き上げ
羽の逆立て		
飲食低下		
過剰な飲水:液体充填作物または水分摂取の測定により明らか		IBV特異的: 軽度、24時間越えれば最長2日 で中等度へ引き上げ。依然として過剰な飲水 であれば計画1の方法により殺処分
活動低下ながらなお捕捉回避	}	軽度、1日を越えれば 中等度へ引き上げ
体重減少		
飲食しない		
鳥が単独で座り、捕捉回避しない	}	中等度: エンドポイントにある鳥。 計画1の方法により殺処分
重度の呼吸困難:例えば過度のあえぎ		
合計7日間のスニッキングおよび/またはラ音		
死骸で発見		重度: プロジェクトライセンス保持者に報告 総ての検死を実施すべき

【0093】

本発明の変異型レプリカーゼは、コロナウイルスで発現された場合に、ウイルスを卵内で非病原レベルで複製させ得る。

30

【0094】

卵内のニワトリ胚に投与するワクチンを開発する際には、ワクチンに対する母体抗体の影響と胚に対するワクチンの影響の2点に注意を払わなければならない。母体抗体は能動免疫に干渉することが知られている。例えば、弱毒系統を用いたワクチンは、母体抗体とともにプロイラー種のニワトリに投与すると、これらの株は母体抗体プールにより中和されるので、防護的抗体レベルを誘導しない。

【0095】

従って、ウイルス粒子は、それがウイルスに対する母体由来抗体のより中和されないように、複製および増殖において十分に効率的でなければならない。母体由来抗体は有効抗体の有限プールであり、それはニワトリの齢とともに減少し、この様式でのウイルスの中和は、胚/ニワトリの長期免疫の確立には釣り合わない。ウイルスに対する長期免疫を発達させるためには、胚および孵化したニワトリは、母体由来抗体の効果とは異なる適切な防御免疫応答を発達させなければならない。

40

【0096】

卵内ワクチン接種に有用であるためには、ウイルスは、それを胚に対して病原性とするレベルで複製および増殖してはならない。

【0097】

胚に対する病原性の低減は、そのコロナウイルスが、対応する野生型対照コロナウイルスと比較して孵化率の低下を少なくすることを意味する。よって、「胚に対して病原性を示さずに」という用語は、本発明に関して、対照コロナウイルスと比較した場合に「孵化

50

率の低下を生じずに」を意味し得る。

【0098】

好適な変異型レプリカーゼは、当技術分野で公知の方法を用いて同定され得る。例えば、母体由来抗体を伴ったまたは伴わない胚の卵内ワクチン接種の後に比較ウイルス投与試験を行ってもよい（すなわち、この場合、産卵鶏をIBVに対してワクチン接種したか、またはしなかった）。

【0099】

変異型レプリカーゼが、高すぎるレベルでウイルスの増殖を可能とすれば、胚は孵化しないか、または孵化後に存続しない（すなわち、ウイルスは胚に対して病原性を示す）。胚に対して病原性を示すウイルスは胚を殺す場合がある。

10

【0100】

変異型レプリカーゼがウイルス複製および増殖に大きすぎる低減を生じれば、そのウイルスは母体由来抗体により中和される。従って、ウイルスに対して効果的な免疫が惹起できなかったために、その後のニワトリのIBV投与の結果、臨床症状（例えば、喘鳴音、スニッキング、線毛運動の低下）が生じ、ウイルスを投与した鶏に疾患が発症する。

【0101】

変異体

本明細書で使用する場合、用語「変異体」は、「突然変異体」と同義であり、対応する野生型配列と比較して異なる核酸配列またはアミノ酸配列を意味する。

【0102】

変異型/突然変異型配列は、天然に生じ得るか、または人為的に作出され得る（例えば、部位特異的突然変異誘発による）。突然変異体は、野生型配列の対応する部分と少なくとも70、80、90、95、98または99%の配列同一性を持ち得る。突然変異体は、野生型配列の対応する部分に20未満、10、5、4、3、2または1つの突然変異を持ち得る。

20

【0103】

用語「野生型」は、それぞれ天然遺伝子またはタンパク質（すなわち、ウイルス遺伝子またはタンパク質）と同一のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を有する遺伝子またはタンパク質を意味するために使用される。

【0104】

同一性の比較は目により、またはより通常には容易に入手可能な配列比較プログラムの助けで行うことができる。これらの市販のコンピュータープログラムは、2以上の配列間の同一性%を計算することができる。このようなアラインメントを実行するため好適なコンピュータープログラムとしては、GCG Wisconsin Bestfitパッケージ（ウイスコンシン大学、U.S.A.; Devereux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12:387）である。配列比較を実行することができる他のソフトウェアの例として、限定されるものではないが、BLASTパッケージ（Ausubel et al., 1999 ibid Chapter 18参照）、FASTA（Atschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 403 410）および比較ツールClustal XのGENEWORKSスーツ（Larkin et al. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics, 23:2947 2948参照）が挙げられる。BLASTおよびFASTAはいずれもオフラインおよびオンライン検索で利用可能である（Ausubel et al., 1999同書, 758~760頁参照）。しかしながら、適用によっては、GCG Bestfitプログラムを使用することが好ましい。BLAST2 Sequencesと呼ばれる新ツールもまたタンパク質およびヌクレオチド配列を比較するために利用可能である（FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247 50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187 8 and tatiana@ncbi.nlm.nih.gov参照）。

30

40

【0105】

配列はまた、サイレント変異を作出して機能的に同等の分子が得られるアミノ酸残基の1以上の欠失、挿入、または置換を有してもよい。活性が保持される限り、残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性、および/または両親媒性の類似性に基づいて意図的なア

50

ミノ酸置換を行ってもよい。例えば、負電荷アミノ酸にはアスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれ、正電荷アミノ酸にはリジンおよびアルギンが含まれ、類似の親水性値を有する非荷電極性頭基を有するアミノ酸には、ロイシン、イソロイシン、バリン、グリシン、アラニン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、フェニルアラニン、およびチロシンが含まれる。

【 0 1 0 6 】

保存的置換は、例えば、下記の表に従って行える。第2列の同じブロック内の、好ましくは、第3列の同列のアミノ酸は互いに置換可能である。

【 0 1 0 7 】

脂肪族	非極性	G A P
		I L V
	極性 - 非荷電	C S T M
		N Q
	極性 - 荷電	D E
		K R
芳香族		H F W Y

【 0 1 0 8 】

本発明のコロナウイルスは、コロナウイルスで発現された場合に、対応する野生型レプリカーゼを発現するコロナウイルスと比較して該ウイルスの病原性を低減させる、配列番号6、7、8または9のいずれかと比較して突然変異を含んでなるタンパク質をコードする変異型レプリカーゼ遺伝子を含んでなり得る。

【 0 1 0 9 】

前記変異型レプリカーゼ遺伝子は、n s p - 1 0、n s p - 1 4、n s p - 1 5およびn s p - 1 6の任意の組合せに少なくとも1以上のアミノ酸突然変異を含んでなるタンパク質をコードし得る。

30

【 0 1 1 0 】

本発明のコロナウイルスの変異型レプリカーゼ遺伝子は、図10に示されたM 4 1 m o d配列に定義されている突然変異を含んでなるタンパク質をコードし得る。

【 0 1 1 1 】

本発明のコロナウイルスの変異型レプリカーゼ遺伝子は、
配列番号6の85位でのP r oからL e u、
配列番号7の393位でのV a lからL e u、
配列番号8の183位でのL e uからI l e、
配列番号9の209位でのV a lからI l e、
のリストから選択される1以上のアミノ酸突然変異を含んでなるタンパク質をコードし得る。

40

【 0 1 1 2 】

本発明のコロナウイルスの変異型レプリカーゼ遺伝子は、n s p - 2、n s p - 3、n s p - 6またはn s p - 1 3に突然変異を含まないタンパク質をコードし得る。

【 0 1 1 3 】

本発明のコロナウイルスの変異型レプリカーゼ遺伝子は、A m m a y a p p a n r a (A r c h V i r o l (2009) 154:495-499)により報告されている遺伝子のヌクレオチド1 2 , 0 0 8位での突然変異によって引き起されるトレオニンからイソロイシンへの突然変異に相当す

50

る n s p 1 0 での突然変異を含まないタンパク質をコードし得る。

【 0 1 1 4 】

A m m a y a p p a n ら（上記）は、B V 株アーカンソー D P I の弱毒化に寄与する配列変化の同定を報告している。この研究では、発育卵でのウイルスの多回、およそ 1 0 0 回の継代の後の、様々な I B V タンパク質において 1 7 のアミノ酸変化が同定された。弱毒化ウイルス（A r k D P I 1 0 1 ）が卵内で、胚に対して病原性を示さずに、ウイルスに対する母体由来抗体の存在下で複製可能であるかどうかは検討されなかった。このウイルスが古典的 I B V ワクチンの方法論と同様に S P F 発育卵での多回継代により生産されたことを考えれば、このウイルスは胚に対して病原性を示す可能性がある。このウイルスはまた、雌鳥が同じ血清型で接種を受けていれば、母体由来抗体に対して感受性であり得る。

10

【 0 1 1 5 】

本発明のコロナウイルスの変異型レプリカーゼ遺伝子は、上記のリストに提供される 1 以上のアミノ酸突然変異の任意の組合せを含んでなるタンパク質をコードし得る。

【 0 1 1 6 】

前記変異型レプリカーゼ遺伝子は、配列番号 6 の 8 5 位での P r o から L e u へのアミノ酸突然変異を含んでなるタンパク質をコードし得る。

【 0 1 1 7 】

前記変異型レプリカーゼ遺伝子は、配列番号 7 の 3 9 3 位での V a l から L e u へのアミノ酸突然変異を含んでなるタンパク質をコードし得る。

20

【 0 1 1 8 】

前記変異型レプリカーゼ遺伝子は、配列番号 8 の 1 8 3 位での L e u から I l e へのアミノ酸突然変異を含んでなるタンパク質をコードし得る。

【 0 1 1 9 】

前記変異型レプリカーゼ遺伝子は、配列番号 9 の 2 0 9 位での V a l から I l e へのアミノ酸突然変異を含んでなるタンパク質をコードし得る。

【 0 1 2 0 】

前記変異型レプリカーゼ遺伝子は、配列番号 6 の 8 5 位での P r o から L e u 、および配列番号 7 の 3 9 3 位での V a l から L e u へのアミノ酸突然変異を含んでなるタンパク質をコードし得る。

30

【 0 1 2 1 】

前記変異型レプリカーゼ遺伝子は、配列番号 6 の 8 5 位での P r o から L e u 配列番号 8 の 1 8 3 位での L e u から I l e へのアミノ酸突然変異を含んでなるタンパク質をコードし得る。

【 0 1 2 2 】

前記変異型レプリカーゼ遺伝子は、配列番号 6 の 8 5 位での P r o から L e u および配列番号 9 の 2 0 9 位での V a l から I l e へのアミノ酸突然変異を含んでなるタンパク質をコードし得る。

【 0 1 2 3 】

前記変異型レプリカーゼ遺伝子は、配列番号 7 の 3 9 3 位での V a l から L e u および配列番号 8 の 1 8 3 位での L e u から I l e へのアミノ酸突然変異を含んでなるタンパク質をコードし得る。

40

【 0 1 2 4 】

前記変異型レプリカーゼ遺伝子は、配列番号 7 の 3 9 3 位での V a l から L e u および配列番号 9 の 2 0 9 位での V a l から I l e へのアミノ酸突然変異を含んでなるタンパク質をコードし得る。

【 0 1 2 5 】

前記変異型レプリカーゼ遺伝子は、配列番号 8 の 1 8 3 位での L e u から I l e および配列番号 9 の 2 0 9 位での V a l から I l e へのアミノ酸突然変異を含んでなるタンパク質をコードし得る。

50

【0126】

前記変異型レプリカーゼ遺伝子は、配列番号6の85位でのProからLeu、配列番号7の393位でのValからLeuおよび配列番号8の183位でのLeuからIleへのアミノ酸突然変異を含んでなるタンパク質をコードし得る。

【0127】

前記変異型レプリカーゼ遺伝子は、配列番号6の85位でのProからLeu、配列番号8の183位でのLeuからIleおよび配列番号9の209位でのValからIleへのアミノ酸突然変異を含んでなるタンパク質をコードし得る。

【0128】

前記変異型レプリカーゼ遺伝子は、配列番号6の85位でのProからLeu、配列番号7の393位でのValからLeuおよび配列番号9の209位でのValからIleへのアミノ酸突然変異を含んでなるタンパク質をコードし得る。

10

【0129】

前記変異型レプリカーゼ遺伝子は、配列番号7の393位でのValからLeu、配列番号8の183位でのLeuからIleおよび配列番号9の209位でのValからIleへのアミノ酸突然変異を含んでなるタンパク質をコードし得る。

【0130】

前記変異型レプリカーゼ遺伝子は、配列番号6の85位でのProからLeu、配列番号7の393位でのValからLeu、配列番号8の183位でのLeuからIleおよび配列番号9の209位でのValからIleへのアミノ酸突然変異を含んでなるタンパク質をコードし得る。

20

【0131】

前記変異型レプリカーゼ遺伝子はまた、ヌクレオチドレベルで定義し得る。

【0132】

例えば、本発明のコロナウイルスの変異型レプリカーゼ遺伝子のヌクレオチド配列は、配列番号1の11884~12318、16938~18500、18501~19514および19515~20423のリストから選択される領域内に1以上のヌクレオチド置換を含んでなり得る。

【0133】

例えば、本発明のコロナウイルスの変異型レプリカーゼ遺伝子のヌクレオチド配列は、配列番号1として示される配列と比較して、

30

ヌクレオチド12137位でのCからT、

ヌクレオチド18114位でのGからC、

ヌクレオチド19047位でのTからA、および

ヌクレオチド20139位でのGからA

のリストから選択される1以上のヌクレオチド置換を含んでなり得る。

【0134】

本明細書で使用する場合、用語「置換」は、用語突然変異と同義であり、特定された位置のヌクレオチドが野生型ヌクレオチド配列のものと異なることを意味する。

【0135】

40

前記ヌクレオチド配列は、配列番号1として示される配列と比較して、

ヌクレオチド12137位でのCからT、

ヌクレオチド18114位でのGからC、

ヌクレオチド19047位でのTからA、および

ヌクレオチド20139位でのGからA

のリストから選択されるヌクレオチド置換の任意の組合せを含んでなり得る。

【0136】

前記ヌクレオチド配列は、置換C12137Tを含んでなり得る。

【0137】

前記ヌクレオチド配列は、置換G18114Cを含んでなり得る。

50

【 0 1 3 8 】

前記ヌクレオチド配列は、置換 T 1 9 0 4 7 A を含んでなり得る。

【 0 1 3 9 】

前記ヌクレオチド配列は、置換 G 2 0 1 3 9 A を含んでなり得る。

【 0 1 4 0 】

前記ヌクレオチド配列は、置換 C 1 2 1 3 7 T および G 1 8 1 1 4 C を含んでなり得る。

【 0 1 4 1 】

前記ヌクレオチド配列は、置換 C 1 2 1 3 7 T および T 1 9 0 4 7 A を含んでなり得る。

【 0 1 4 2 】

前記ヌクレオチド配列は、置換 C 1 2 1 3 7 T および G 2 0 1 3 9 A を含んでなり得る。

【 0 1 4 3 】

前記ヌクレオチド配列は、置換 G 1 8 1 1 4 C および T 1 9 0 4 7 A を含んでなり得る。

【 0 1 4 4 】

前記ヌクレオチド配列は、置換 G 1 8 1 1 4 C および G 2 0 1 3 9 A を含んでなり得る。

【 0 1 4 5 】

前記ヌクレオチド配列は、置換 T 1 9 0 4 7 A および G 2 0 1 3 9 A を含んでなり得る。

【 0 1 4 6 】

前記ヌクレオチド配列は、置換 C 1 2 1 3 7 T、G 1 8 1 1 4 C および T 1 9 0 4 7 A を含んでなり得る。

【 0 1 4 7 】

前記ヌクレオチド配列は、置換 C 1 2 1 3 7 T、T 1 9 0 4 7 A および G 2 0 1 3 9 A を含んでなり得る。

【 0 1 4 8 】

前記ヌクレオチド配列は、置換 C 1 2 1 3 7 T、G 1 8 1 1 4 C および G 2 0 1 3 9 A を含んでなり得る。

【 0 1 4 9 】

前記ヌクレオチド配列は、置換 G 1 8 1 1 4 C、T 1 9 0 4 7 A および G 2 0 1 3 9 A を含んでなり得る。

【 0 1 5 0 】

前記ヌクレオチド配列は、置換 C 1 2 1 3 7 T、G 1 8 1 1 4 C、T 1 9 0 4 7 A および G 2 0 1 3 9 A を含んでなり得る。

【 0 1 5 1 】

前記ヌクレオチド配列は、Ammayappanら(上記)により報告されている C 1 2 0 0 8 T 置換に相当する置換を含まなくてよい。

【 0 1 5 2 】

ヌクレオチド配列は、天然、合成または組換えであり得る。ヌクレオチド配列は、二本酸または一本鎖であり得、DNAまたはRNAまたはそれらの組合せであり得る。ヌクレオチド配列は、例えば、cDNA、PCR産物、ゲノム配列またはmRNAであり得る。

【 0 1 5 3 】

ヌクレオチド配列は、選択された宿主/宿主細胞での生産に関してコドンが最適化されていてよい。

【 0 1 5 4 】

ヌクレオチド配列は、単離されてもよいし、またはプラスミド、ウイルスまたは宿主細胞の一部であってもよい。

10

20

30

40

50

【 0 1 5 5 】

プラスミド

プラスミドは、染色体DNAとは別の染色体外DNA分子であり、染色体DNAとは独立に複製することができる。プラスミドは通常、環状で二本鎖である。

【 0 1 5 6 】

プラスミド、またはベクター（それらが時に既知である場合）は、宿主細胞でタンパク質を発現させるために使用され得る。例えば、特定のタンパク質を発現させるために、細菌宿主細胞を、特定のタンパク質をコードし得るプラスミドでトランスフェクトすればよい。この用語にはまた、より長いDNA部分を収容することができる酵母人工染色体および細菌人工染色体も含まれる。

【 0 1 5 7 】

本発明のプラスミドは、レプリカーゼタンパク質の定義された領域をコードし得るヌクレオチド配列を含んでなる。本プラスミドはまた、1以上の付加的コロナウイルスヌクレオチド配列、または1以上の他のコロナウイルスタンパク質、例えば、S遺伝子および/または遺伝子3をコードし得るヌクレオチド配列も含んでなり得る。

【 0 1 5 8 】

本プラスミドはまた、キサントシンおよびヒポキサントシンの存在下でミコフェノール酸(MPA)耐性を付与し、かつ、ワクシニアウイルスP7.5前期/後期プロモーターによって制御される、大腸菌(*Escherichia coli*)由来グアニンキサントシンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子(gpt)などの耐性マーカーも含んでなる。

【 0 1 5 9 】

組換えワクシニアウイルス

本発明はまた、本明細書で定義される変異型レプリカーゼ遺伝子を含んでなる組換えワクシニアウイルス(rVV)に関する。

【 0 1 6 0 】

組換えワクシニアウイルス(rVV)は、逆遺伝学系に基づきワクシニアウイルスを用いて作製してもよい。

【 0 1 6 1 】

この点に関して、本発明はまた、

(i) 前の項に記載のプラスミドを宿主細胞中にトランスフェクトする工程、

(ii) 前記宿主細胞にレプリカーゼ遺伝子を有するコロナウイルス株のゲノムを含んでなる組換えウイルスを感染させる工程、

(iii) 改変レプリカーゼ遺伝子を生成するために、前記プラスミド中のレプリカーゼ遺伝子配列と前記組換えウイルスゲノム中の対応する配列との間で相同組換えを起こさせる工程、および

(iv) 前記改変レプリカーゼ遺伝子を含んでなる組換えウイルスについて選択する工程

によりウイルス粒子を作製するための方法を提供する。

【 0 1 6 2 】

用語「改変レプリカーゼ遺伝子」は、本発明の第1の態様に関して記載されているように変異型レプリカーゼ遺伝子を含んでなるレプリカーゼ遺伝子を意味する。具体的には、この用語は、野生型レプリカーゼ遺伝子に由来するが、それに本明細書で定義される変異型レプリカーゼタンパク質をコードさせるヌクレオチド配列を含んでなる遺伝子を意味する。

【 0 1 6 3 】

組換えは、レプリカーゼ遺伝子の全部を含んでも、または一部を含んでもよい。例えば、組換えは、nsp-10、nsp-14、nsp-15および/またはnsp-16の任意の組合せをコードするヌクレオチド配列を含み得る。組換えは、上記で定義されるように、アミノ酸突然変異をコードするかまたはヌクレオチド置換を含んでなるヌクレオチド配列を含んでもよい。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 4 】

コロナウイルス株のゲノムは、プラスミドにより提供される部分に相当するレプリカーゼタンパク質の部分を欠いていてもよく、これにより、プラスミドにより提供されるヌクレオチド配列の挿入を介して改変タンパク質が形成される。

【 0 1 6 5 】

組換えウイルスは、そのゲノムとプラスミドの間の相同組換えを可能とするのに好適なものである。ワクシニアウイルスは、ワクシニアウイルスゲノムの配列の挿入および欠失に相同組換えが通常用いられるので、特に好適である。

【 0 1 6 6 】

上記方法は、所望により、

(v) 工程 (i v) からの組換えウイルスの DNA から前記改変レプリカーゼ遺伝子を含んでなる組換えコロナウイルスを回収する工程を含む。

10

【 0 1 6 7 】

組換え I B V などの組換えコロナウイルスを回収するための方法は当技術分野で公知である (Britton et al (2005)24頁参照 ; および P C T / G B 2 0 1 0 / 0 0 1 2 9 3 参照) 。

【 0 1 6 8 】

例えば、工程 (i v) からの組換えウイルスに由来する DNA をプラスミドに挿入し、細胞質 T 7 RNA ポリメラーゼを発現する細胞をトランスフェクトするために使用することができる。これらの細胞に、例えば、T 7 RNA ポリメラーゼを発現する鶏痘ウイルスを予め感染させてもよい。次に、組換えコロナウイルスは、例えば増殖培地から単離され得る。

20

【 0 1 6 9 】

プラスミドがワクシニアウイルスゲノムに挿入される場合には、不安定な中間体が形成される。プラスミドを含んでなる組換え体は、例えばプラスミド上の耐性マーカーを用いて選択され得る。

【 0 1 7 0 】

次に、陽性組換え体は、例えば P C R およびシーケンシングにより改変レプリカーゼ遺伝子を含むことが確認され得る。

【 0 1 7 1 】

工程 (v) を行うために、改変レプリカーゼ遺伝子を含む組換えウイルス (例えば、組換えワクシニアウイルス (r V V)) の多量の原株を増殖させ、DNA を抽出することができる。

30

【 0 1 7 2 】

好適な逆遺伝学系は当技術分野で公知である (Casais et al (2001) J. Virol 75:12359 12369; Casais et al (2003) J. Virol. 77:9084 9089; Britton et al (2005) J. Virological Methods 123:203 211; Armesto et al (2008) Methods in Molecular Biology 4 54:255 273) 。

【 0 1 7 3 】

細胞

コロナウイルスは、細胞に感染させるために使用可能である。

40

【 0 1 7 4 】

コロナウイルス粒子は、例えば、上清から、当技術分野で公知の方法により採取し、場合により精製することができる。

【 0 1 7 5 】

この細胞をコロナウイルス粒子を生産するために使用することができる。

【 0 1 7 6 】

よって、本発明はまた、次の工程 :

(i) 細胞に本発明によるコロナウイルスを感染させる工程、

(i i) 前記細胞での前記ウイルスの複製を可能にする工程、および

50

(i i i) 後代ウイルスを採取する工程
を含んでなる、コロナウイルスの生産方法を提供する。

【 0 1 7 7 】

本発明はまた、逆遺伝学系を用いて本発明によるコロナウイルスを産生可能な細胞を提供する。例えば、これらの細胞は、本発明のレプリカーゼ遺伝子をコードし得るヌクレオチド配列を含んでなる組換えウイルスゲノムを含んでなり得る。

【 0 1 7 8 】

この細胞は、レプリカーゼ遺伝子を含有する組換えウイルス（例えば、ワクシニアウイルス）を産生可能であり得る。

【 0 1 7 9 】

あるいは、この細胞は、逆遺伝学系により組換えコロナウイルスを産生可能であり得る。この細胞は、組換えウイルス粒子を救済するために T 7 ポリメラーゼを発現し得るか、または発現が誘導され得る。

【 0 1 8 0 】

ワクチン

コロナウイルスは、ワクチンを生産するために使用可能である。ワクチンは、本発明のコロナウイルスの生きた弱毒化型であり得、薬学上許容可能な担体をさらに含んでなり得る。本明細書で定義される本発明での使用に好適な「薬学上許容可能な担体」は当業者に周知である。このような担体としては、限定されるものではないが、水、生理食塩水、緩衝生理食塩水、リン酸バッファー、アルコール/水溶液、エマルションまたは懸濁液が含まれる。他の慣用されている希釈剤および賦形剤は、従来の技術に従って添加可能である。このような担体としては、エタノール、ポリオール、およびそれらの好適な混合物、植物油、ならびに注射可能な有機エステルを含み得る。バッファーおよび pH 調整剤もまた使用可能である。バッファーとしては、限定されるものではないが、有機酸または塩基から調製される塩が含まれる。代表的なバッファーとしては、限定されるものではないが、有機酸塩、例えば、クエン酸の塩、例えば、クエン酸バッファー、アスコルビン酸バッファー、グルコン酸バッファー、ヒスチジン - H e l バッファー、炭酸バッファー、酒石酸バッファー、コハク酸バッファー、酢酸バッファー、またはフタル酸バッファー、T r i s バッファー、塩酸トリメタンミン(trimethanmine)バッファー、またはリン酸バッファーが含まれる。非経口担体としては、塩化ナトリウム溶液、ブドウ糖加リンゲル液、デキストロース、トレハロース、スクロース、および塩化ナトリウム、乳酸加リンゲル液または硬化油を含み得る。静脈内担体としては、体液および栄養補給液、電解質補給液、例えば、ブドウ糖加リンゲル液に基づくものなどを含み得る。保存剤およびその他の添加剤、例えば、抗微生物剤、酸化防止剤、キレート剤（例えば E D T A ）、不活性ガスなども医薬担体中に提供され得る。本発明は、担体の選択により限定されない。上記成分からの、適当な pH、等張性(appropriate pH isotonicity)、安定性および他の慣例の特徴を有する、これらの薬学上許容可能な組成物の調製は当技術分野の技術の範囲内である。例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第20版, Lippincott Williams & Wilkins, publ., 2000; and The Handbook of Pharmaceutical Excipients, 第4版, R. C. Rowe et al編, APhA Publications, 2003などの教本を参照。

【 0 1 8 1 】

本発明のワクチンは、「治療上有効な量」で投与され、これは、対象または患者に投与された際に有益なまたは所望の結果を果たすのに十分な有効成分、例えば、本発明による薬剤の量を意味する。有効量は、1回以上の投与、適用または用量で投与され得る。本発明による組成物の治療上有効な量は、当業者により容易に決定され得る。本発明に関して「治療上有効な量」は、伝染性気管支炎の病態に関連する1以上のパラメーターにおいて、客観的に測定される有益なまたは所望の結果を果たすのに十分な変化を生じる量である。有効量は1回以上の投与で投与することができる。本発明の目的では、有効量の薬物、化合物、または医薬組成物は、伝染性気管支炎の罹患率を低減するのに十分な量である。本明細書で使用する場合、用語「治療上」とは、疾患、病態または障害に対する処置の全

10

20

30

40

50

域を包含する。本発明の「治療」薬は、リスクがあると特定され得る動物を標的とするように設計された手順（薬理遺伝学）を組み込んだものを含む、防止または予防的な様式で；または本質的に改善的もしくは治療的である様式で働き得るか、あるいは処置される疾患もしくは障害の少なくとも1つの症状の進行の速度もしくは程度緩徐化するために働き得る。

【0182】

本発明はまた、細胞、例えば、Vero細胞に、本発明の第1の態様に関連して定義されているレプリカーゼタンパク質を含んでなるウイルス粒子を感染させる工程を含んでなる、このようなワクチンの生産方法に関する。

【0183】

ワクチン接種法

本発明のコロナウイルスは、疾患を治療および/または予防するために使用され得る。

【0184】

「治療する」ことは、疾患に関連する少なくとも1つの症状を減らす、軽減するもしくは改善するため、および/または疾患の進行を緩徐化、低減もしくは遮断するために、既存の疾患を有する対象にワクチンを投与することを意味する。

【0185】

「予防する」ことは、まだ疾患に罹っていない対象および/または疾患のいずれの症状も示していない対象に、疾患の過程（例えば感染）を予防するもしくは傷害するため、または疾患に関連する少なくとも1つの症状の発生を軽減もしくは予防するため、またはワクチンを投与することを意味する。

【0186】

疾患は、コロナウイルスにより引き起こされる任意の疾患、例えば、ヒトにおける呼吸器疾患および/または胃腸炎、ならびに他の動物における肝炎、胃腸炎、脳炎、もしくは呼吸器疾患であり得る。

【0187】

疾患は、伝染性気管支炎（IB）；ブタ伝染性下痢症；伝染性胃腸炎；マウス肝炎ウイルス；ブタ赤血球凝集性脳脊髄炎；重症急性呼吸器症候群（SARS）；または紫藍病であり得る。

【0188】

疾患は伝染性気管支炎であり得る。

【0189】

ワクチンは、孵化したヒヨコまたは親鳥に、例えば、点眼剤または鼻腔内投与に投与され得る。厳密ではあるが、これらの方法は、例えば大きなブロイラー群にはコストがかかり得る。別法としては、飲料水への噴霧接種投与を含むが、このような方法を用いて均一なワクチン適用を保證するのは困難であり得る。

【0190】

ワクチンは、眼内用の点眼剤などのその投与に好適な形態で提供してもよい。

【0191】

ワクチンは、卵内接種、例えば、発育卵への注射によって投与してもよい。卵内ワクチン接種は、疾患に早期耐性を提供するという利点を持つ。卵内接種はまた、噴霧接種および飲料水を介した投与とは異なり、各対象に均一な用量の投与を助長する。

【0192】

ワクチンは、尿膜腔液、卵黄嚢、羊膜、気室または胚を含む、卵の任意の好適な区画に投与してよい。ワクチンは卵殻（気室）膜下および漿尿膜下に投与してよい。

【0193】

通常、ワクチンは、胚発生の後期、一般に、孵卵期間の最後の4分の1の間、例えば、孵化前3～4日に発育卵に注入する。ニワトリでは、ワクチンは、21日の孵卵期間の15～19日の間、例えば、17日目または18日目に投与され得る。

【0194】

10

20

30

40

50

この工程は、WO 2004/078203に記載されているものなどのロボット注入法を用いて自動化することができる。

【0195】

ワクチンは、1以上の他のワクチン、例えば、ニューカッスル病ウイルス（NDV）などの他の疾患のワクチンとともに投与してよい。本発明はまた、本発明によるワクチンを1以上の他のワクチンとともに含んでなるワクチン組成物を提供する。本発明はまた、本発明によるワクチンを、個別、逐次または同時投与のための1以上の他のワクチンとともに含んでなるキットも提供する。

【0196】

本発明のワクチンまたはワクチン組成物は、ヒト、動物または鳥類対象を処置するために使用可能である。例えば、対象はヒヨコ、ニワトリまたはマウス（例えば、実験用マウス、例えば、トランスジェニックマウス）であり得る。

10

【0197】

一般に、医師または獣医は、個々の対象または対象群に最も好適な実際の用量を決定し、特定の対象の齢、体重および応答によって変更する。

【0198】

本組成物は、場合により、薬学上許容可能な担体、希釈剤、賦形剤またはアジュバントを含んでなり得る。医薬担体、賦形剤または希釈剤の選択肢は、意図される投与経路および標準的な製薬慣行に関して選択することができる。医薬組成物は、担体、賦形剤または希釈剤として（またはそれに加えて）、任意の好適な結合剤、滑沢剤、沈殿防止剤、着色剤、可溶化剤、およびウイルスの送達または免疫原性を補助または増強し得るその他の担体薬剤を含んでなるとよい。

20

【0199】

以下、本発明を実施例によりさらに説明するが、これらの実施例は、本発明を実施する上で当業者を補助するために役立てることを意図し、本発明の範囲を何ら限定するものではない。

【実施例】

【0200】

実施例1 - M41 - CKに基づくIBV逆遺伝学系の作出

M41 - CK全長cDNAは、PCT/GB2010/001293（引用することにより本明細書の一部とする）に従前に記載されているワクシニアウイルス逆遺伝学系におけるBeaudette cDNAをM41コンセンサス配列から誘導された合成cDNAで置換することによって作製した。

30

【0201】

IBV Beaudette株由来のレプリカーゼと構造遺伝子およびアクセサリ遺伝子とIBV M41 - CK由来の3' UTRからなった、Armesto, Cavanagh and Britton (2009). PLoS ONE 4(10): e7384. doi:10.1371/journal.pone.0007384に記載の組換えワクシニアウイルス(rVV)内のIBV cDNA、rVV - BeauR - Rep - M41構造を、Beaudette 5' UTR - Nsp2 - Nsp3配列をIBV M41 - CK由来の対応する配列で置換することによりさらに改変した。得られたIBV cDNAは、M41由来の5' UTR - Nsp2 - Nsp3と、Beaudette由来のNsp4 - Nsp16と、構造遺伝子とアクセサリ遺伝子と、M41由来の3' UTRからなった。このcDNAを、Beaudette Nsp4 - Nsp16配列の欠失によりさらに改変した。得られた、Nsp4 - 16を欠くcDNAを、欠失したNspをM41 - CK由来の対応する配列で順次置換するというさらに4段階で改変し、これらの置換cDNAは、M41 - CK Nsp4 - 8、Nsp9 - 12、Nsp12 - 14および最後にNsp15 - 16を示した。各置換cDNAは、5'末端に、先に挿入された3'のほとんどのM41配列に相当するおよそ500ヌクレオチドと、3'末端に、M41 S遺伝子配列に相当するおよそ500ヌクレオチドを含んでいた。これは、相同組換えによるM41 cDNA配列の挿入および続いての連続するM41レプリカー

40

50

ゼ遺伝子配列の付加を可能とした。M41由来Nsp配列を含有する合成cDNAは、発明者が従前に記載したトランジェントドミナントセレクション(TDS)系(PCT/G B 2 0 1 0 / 0 0 1 2 9 3 参照)を用いた相同組換えにより付加した。M41 Nsp s - 1 0、- 1 4、- 1 5および- 1 6に相当する配列を含有するM41由来cDNAは、図10に示されるように、それぞれ85、393、183および209位に改変アミノ酸を含んでいた。

【0202】

M41-CKのゲノムを提示する全長cDNAは、これらの合成配列を提示するワクシニアウイルスで作製された。M41-R-6およびM41-R-12の2つのrIBVが救済され、M41-CKと同様の方法で増殖することが示された(図1)。

10

【0203】

実施例2 - 救済されたM41ウイルスの病原性の決定

実施例1で救済されたウイルスを用い、8日齢の特定病原体除去(SPF)鶏に眼および鼻腔接種により感染させ、感染後3~7日の毎日の臨床徴候および感染後4日および6日の線毛運動により観察されるようなそれらの病原性を試験した。線毛運動の低下は、IBVの病原性を決定するために十分に確立された方法である。これら2つのM41-Rウイルスは、非感染対照鶏と比較していくつかの臨床徴候(図2)と、一貫したものではないがいくらかの線毛運動低下(図3)を示したとしても、M41-CKと比較した場合には非病原性であることが判明した。

【0204】

よって、M41-CKのM41-R分子クローンは、親ウイルスM41-CKと比較した場合に病原性は無かった。

20

【0205】

本発明者らは、M41-CK配列と比較してM41-Rにいくつかのヌクレオチド差異を同定した。これらの大部分は、そのヌクレオチド変化は、その配列に関連するタンパク質のアミノ酸配列に影響を与えなかったことから、同義的突然変異であった。しかしながら、IBVレプリカーゼ遺伝子に、レプリカーゼ遺伝子のNsp-10、Nsp-14、Nsp-15およびNsp-16成分に特異的な4つの非同義的突然変異が同定され、これらの突然変異はアミノ酸変化を生じた(表3)。

【0206】

【表3】

30

表3. M41-R 全長ゲノムのNspにおいて同定された非同義的突然変異

レプリカーゼの領域	ヌクレオチドの位置	ヌクレオチド突然変異	アミノ酸変化
Nsp10	12137	C→T	Pro→Leu
Nsp14	18114	G→C	Val→Leu
Nsp15	19047	T→A	Leu→Ile
Nsp16	20139	G→A	Val→Ile

【0207】

実施例3 - M41-R rIBVの修復

同定された突然変異がM41-Rに関連する病原性の低下に寄与したかどうかを決定するために、Nsp10突然変異を修復し、Nsp-14、-15および-16の突然変異

50

を修復したところ、M41-CKと同様の方法で増殖することが示された(図9)。よって、発明者らは、発明者らが従前に記載した(TDS)系(PCT/GB2010/001293参照)を用い、補正ヌクレオチドを含有する合成cDNAを用いてrIBVであるM41R-nsp10repおよびM41R-nsp14,15,16repを作製した。

【0208】

これらのrIBVを、従前に記載したようにニワトリで病原性を評価した。両rIBVとも、M41-CKで見られたレベルと比較した場合にはそうではなかったが、M41-Rと比較した場合には病原性の増大を示した(図4および5)。M41R-nsp14,15,16repは、M41R-nsp10repよりも多い臨床徴候および線毛運動の低下を示し、これらの結果は全体として、これら4つのNspに関連する変化が病原性に影響を与えると見られることを示した。

10

【0209】

病原性におけるこれらのNspの役割を決定するために、M41R-nsp10repに相当する全長cDNAを使用し、TDS系を用い、補正ヌクレオチドを含有する合成cDNAを用いてNsp14,15および16の突然変異を修復した。

【0210】

以下のrIBVを作製した：

M41R-nsp10,15rep-Nsp-10およびNsp-15の突然変異が修復されたM41-R

20

M41R-nsp10,14,15rep-Nsp-10、-14および-15の突然変異が修復されたM41-R

M41R-nsp10,14,16rep-Nsp-10、-14および-16の突然変異が修復されたM41-R

M41R-nsp10,15,16rep-Nsp-10、-15および-16の突然変異が修復されたM41-R

M41-K-M41-Rにおいて4つの突然変異Nsp-10、-14、-15および-16の総てが修復されたもの。

【0211】

これらのrIBVは、M41-CKと同様の方法で増殖することが示され(図9)、従前に記載したように病原性を評価した。M41-K(4つ総ての突然変異が修復された)は、感染後4日で臨床徴候および線毛運動の100%(完全な線毛運動障害)の低下をもたらした(図6、7および8)。M41R-nsp10,15,16repを除く他のrIBVは様々なレベルの病原性を示し、これは本質的に非病原性であった。これらの結果から、4つのNspの総ての修復がM41-Rに対する病原性を回復させたことが確認され、この場合にも、これら4つのNspにおいて記載された突然変異がM41-CKの弱毒化に関連付けられるというこれまでのエビデンスを裏づける。

30

【0212】

本発明者らはまた、rIBV M41R-nsp10,14rep(nsp10と14が修復され、nsp15と16が突然変異を含む)およびrIBV M41R-nsp10,16rep(nsp10と16が修復され、nsp14と15が突然変異を含む)も作製し、これらのウイルスの病原性を評価した。

40

【0213】

rIBV M41R-nsp10,14repはM41-Kよりも病原性は低かったが、感染後4~6日に50%前後の線毛運動障害を生じた。rIBV M41R-nsp10,16repはほぼ非病原性であり、線毛運動障害を生じなかった(図11a~c参照)。

【0214】

よって、M41-Rに関連するゲノムは、合理的に弱毒化されたIBVの潜在的骨格ゲノムである。

50

【0215】

実施例4 - ワクチン接種 / M41 - R の投与試験

候補ワクチンウイルスを、受精鶏卵が胚発生18日目に卵内ワクチン接種されて接種卵の孵化率が決定される試験に供試した。ニワトリの臨床健康を調べ、21日齢のニワトリに、毒性の強いIB M41投与ウイルスを1用量当たり $10^{3.65}$ EID₅₀で投与した。

【0216】

ワクチンによるウイルス投与保護後の臨床徴候を調べ、ウイルス投与後5日目に線毛運動障害検査を行い、線毛の運動に対する投与ウイルスの影響および線毛運動障害（線毛運動の阻害）に対するワクチンによる保護を検討した。

【0217】

市販のプロイラー卵における卵内ワクチン接種

この実験の計画を表4に示し、臨床結果を表5に示す。IB M41 - Rを接種した卵の孵化率は良好であり、ニワトリは健康であった。IB M41 - Rは、プロイラーにおいてウイルス投与後の臨床徴候から保護し（プラセボ：19 / 19罹患、IB M41 - R：3 / 18罹患および1羽の死）。線毛運動障害検査の結果を表6に示す。IB M41 - Rは、線毛運動障害に対して保護を生じた。

【0218】

【表4】

表4 - 市販卵における孵化率、安全性、有効性試験の計画

処理	処理の説明	用量当たりのEID ₅₀ ¹	投与経路	投与日	ウイルス投与日 ²	試験の終了	処置当たりの卵の数
T01	無し	NA	NA	NA	NA	NA	30
T02	IB M41-R	104	卵内	胚発生18日	21日齢, 各群20羽	26日齢	30
NTX	生理食塩水	NA	卵内				30

¹ 投与容量0.1 ml, NA, 適用できず

² 1用量当たり $10^{3.65}$ EID₅₀

【0219】

【表5】

表5 - 商業的ニワトリにおける孵化率およびウイルス投与前後の臨床データ、計画に関しては表1参照

処理	孵化/総数	生存/総数	ウイルス投与前		ウイルス投与後	
			死亡/総数	症状/総数	死亡/総数	症状/総数
無し	28/30	採血のため孵化後そのまま安楽死				
IB M41-R	28/30	28/28	1/20	0/19	1/19	3/18 ^{1,7}
生理食塩水	29/30	29/29	1/20	0/19	0/19	19/19 ^{1,2,3,4,5,6,7}

¹ 呼吸器系の障害

² あえぎ

³ 声の変化

⁴ 呼吸困難

⁵ 眼窩内洞の腫脹

⁶ 一様でない成長

⁷ 虚弱

【 0 2 2 0 】

【 表 6 】

表6-ウイルス投与後の専門運動障害検査の結果, 計画に関しては表1参照

処理	保護/総数	保護率%
Saline	0/19	0%
IB M41R	5/18	28%

【 0 2 2 1 】

特定病原体除去 (S P F) 卵における卵内ワクチン接種

S P F 卵における試験計画を表7示し、I B M 4 1 - R のワクチン接種用量が高い (1 用量当たり 10^5 E I D₅₀) こと以外は、市販のプロイラーを用いた試験計画と同様である。

【 0 2 2 2 】

結果 (表 8) は、I B M 4 1 - R 孵化に関する孵化率%は低く、40のうち19が孵化し、ニワトリは虚弱であった。8羽が死亡した。残りの11羽にウイルス投与を行い、生理食塩水を接種した卵から孵化した11羽にウイルス投与を行った。

20

【 0 2 2 3 】

ウイルス投与後の線毛運動障害検査では、I B M 4 1 - R で卵内ワクチン接種を行った総てのニワトリが保護されたが、対照には保護されたものはいなかったことが明らかである、表9参照。

【 0 2 2 4 】

【 表 7 】

表7. SPF 卵における孵化率、安全性、効力試験の計画

処理	処理の説明	用量 当たりの EID ₅₀ ¹	投与 経路	投与日	ウイルス投 与日 ²	試験の 終了	処置当たり の卵の数
T01	IB M41-R	10^5	卵内	胚発生 18日	21日齢	26日 齢	40
T04	生理食塩水	NA	卵内				40
NTX	NA	NA	NA		NA		10

¹ 投与容量 0.1 ml, NA, 適用できず² ウイルス投与用量 0.2ml 中 $10^{3.3}$ EID₅₀

【 0 2 2 5 】

【表 8】

表 8. SPF 鶏における孵化率およびウイルス投与前後の臨床データ、計画に関しては表 7 参照

処理	孵化/総数	生存/総数	ウイルス投与前		ウイルス投与後	
			死亡/総数	症状/総数	死亡/総数	症状/総数
IB M41-R	19/40	11/40	8/40	虚弱	0	0
Saline	30/40	30/40	0	-	0	0
NA	9/10	9/10	0	-	-	-

【0226】

【表 9】

表 9. ウイルス投与後の線毛運動障害検査の結果、計画に関しては表 7 参照

処理	保護/総数	保護率%
生理食塩水	0/11	0%
IB M41R	11/11	100%

【0227】

結論として、IB M41-R は市販卵で安全であり、臨床徴候に対して、また、ある程度まで線毛運動障害に対しても保護を生じた。

【0228】

IB M41 R でワクチン接種を行った SPF 卵では、孵化したニワトリの数は比較的少なかった。これは、1 卵当たり 10^5 EID₅₀ の IB M41-R を使用したことによるものであり得る。これは、より高いレベルの孵化率であった従前の試験で使用した用量の 10 倍であった。他の試験で胚死亡率の程度がこれまでに見られたものよりも高かったことから、このより低い孵化率%は、この SPF 卵バッチの特に高いウイルス感受性により引き起こされた可能性もある。

30

【0229】

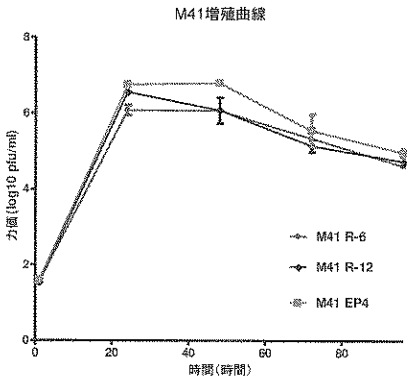
ウイルス投与後に、孵化後に生存していた総てのニワトリが線毛運動障害から完全に保護された。卵内投与されるワクチンとして大きな可能性を持つと結論づけられる。

【0230】

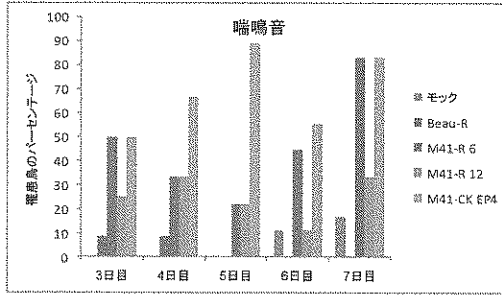
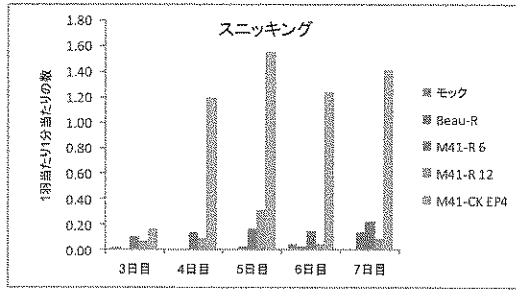
上記の明細書に挙げられた総ての刊行物は引用することにより本明細書の一部とされる。記載される本発明の方法および系の様々な改変および変形が、本発明の範囲および趣旨から逸脱することなく、当業者に自明である。本発明は特定の好ましい実施形態に関して記載されているが、特許請求される本発明はこのような特定の実施形態に不当に限定されるべきではないと理解されるべきである。実際に、分子生物学、ウイルス学または関連の分野の熟練者に自明である、本発明を実施するための記載の様式の様々な改変は、以下の特許請求の範囲の範囲内にあるものとする。

40

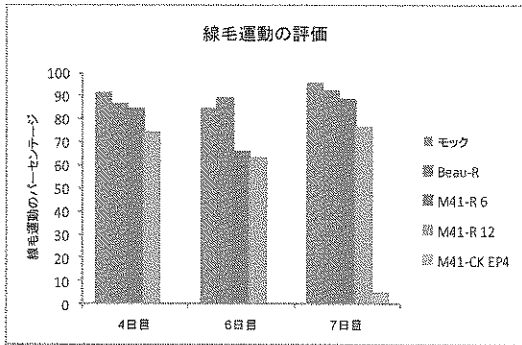
【 図 1 】



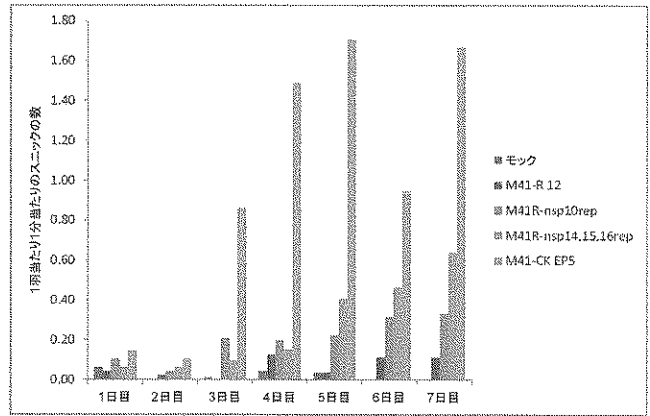
【 図 2 】



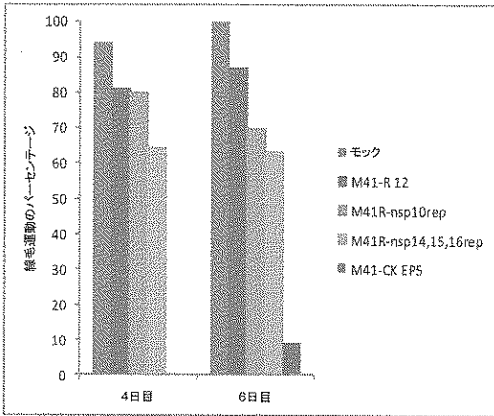
【 図 3 】



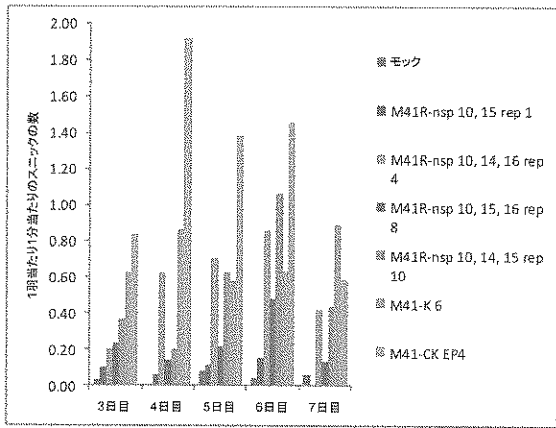
【 図 4 】



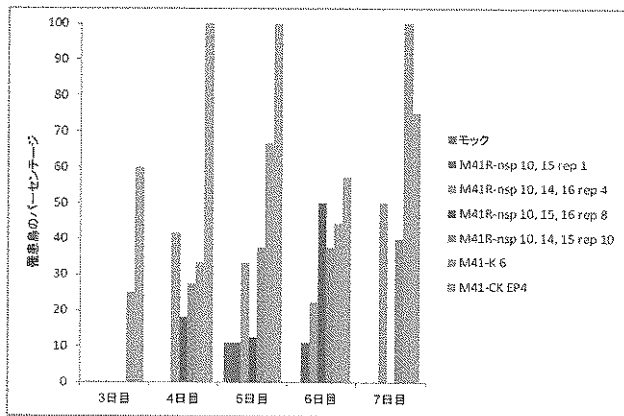
【 図 5 】



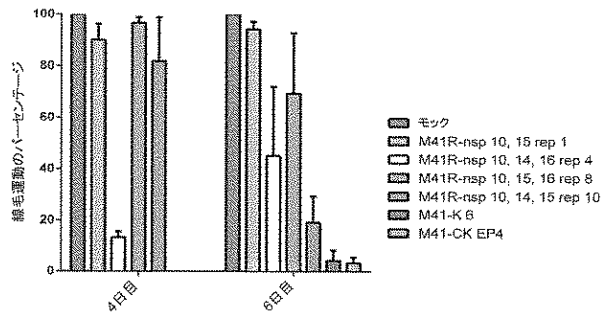
【 図 6 】



【 図 7 】

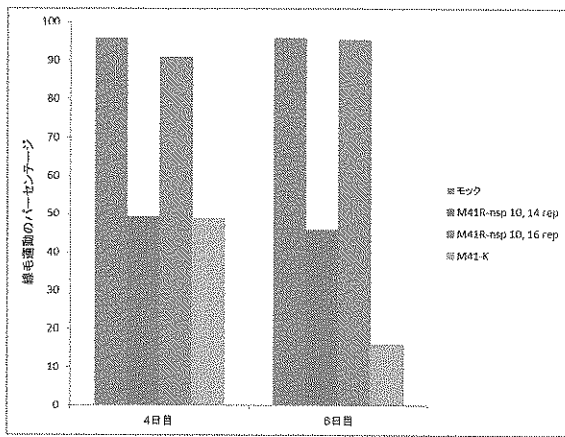


【 図 8 】



【図 11-2】

C)



【配列表】

2017522907000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2015/052124

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C12N7/04	C07K14/165	A61K39/00 A61K39/215
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C12N C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	V. D. MENACHERY ET AL: "Attenuation and Restoration of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Mutant Lacking 2'-O-Methyltransferase Activity", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 88, no. 8, 29 January 2014 (2014-01-29), pages 4251-4264, XP055215583, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.03571-13	1,12-16, 18-23, 25,27
A	abstract page 4252, left-hand column, last paragraph; figures 1-8 ----- -/--	2-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
25 September 2015		09/10/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schulz, Regine

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2015/052124

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARIA ARMESTO ET AL: "The Replicase Gene of Avian Coronavirus Infectious Bronchitis Virus Is a Determinant of Pathogenicity", PLOS ONE, vol. 4, no. 10, 9 October 2009 (2009-10-09), page e7384, XP055215449, DOI: 10.1371/journal.pone.0007384 cited in the application	19
A	abstract page 1 - page 10, left-hand column; figures 1-7; table 1	7,9-12, 20-27
X	CAVANAGH ET AL: "Manipulation of the infectious bronchitis coronavirus genome for vaccine development and analysis of the accessory proteins", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 25, no. 30, 10 July 2007 (2007-07-10), pages 5558-5562, XP022148593, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2007.02.046	19
A	page 5559 - page 5562; figures 1-3; table 1	1,7-12, 20-27
X	R. CASAIS ET AL: "Reverse Genetics System for the Avian Coronavirus Infectious Bronchitis Virus", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 75, no. 24, 15 December 2001 (2001-12-15), pages 12359-12369, XP055215746, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.75.24.12359-12369.2001	19
A	abstract page 12359 - page 12368; figures 1-6; table 1	7,9-11, 20-27
X	YAN-QUAN WEI ET AL: "Development and characterization of a recombinant infectious bronchitis virus expressing the ectodomain region of S1 gene of H120 strain", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 98, no. 4, 1 February 2014 (2014-02-01), pages 1727-1735, XP055132063, ISSN: 0175-7598, DOI: 10.1007/s00253-013-5352-5	19
A	page 1728 - page 1735; figures 1-5; table 1	7,9-11, 20-27
	----- -/--	

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2015/052124

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005049814 A2	02-06-2005	CA 2546355 A1	02-06-2005
		EP 1533370 A1	25-05-2005
		JP 2007511237 A	10-05-2007
		KR 20060123291 A	01-12-2006
		US 2008044426 A1	21-02-2008
		WO 2005049814 A2	02-06-2005
WO 2004092360 A2	28-10-2004	AU 2004230485 A1	28-10-2004
		AU 2009201478 A1	14-05-2009
		CA 2522379 A1	28-10-2004
		EP 1618127 A2	25-01-2006
		ES 2529736 T3	25-02-2015
		NZ 543467 A	31-07-2008
		US 2006257852 A1	16-11-2006
		WO 2004092360 A2	28-10-2004
WO 2011004146 A1	13-01-2011	CN 102574897 A	11-07-2012
		EP 2451827 A1	16-05-2012
		US 2012177675 A1	12-07-2012
		WO 2011004146 A1	13-01-2011

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 0 7 K 14/46 (2006.01)	C 0 7 K	14/46	
A 6 1 K 39/215 (2006.01)	A 6 1 K	39/215	
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P	31/14	

(81)指定国 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,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,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,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100144794

弁理士 大木 信人

(72)発明者 ビッカートン, エリカ

イギリス国 ジーユー 2 4 0 エヌエフ サリー, ウォーキング, パープライト, アッシュ ロード, ザ パープライト インスティテュート

(72)発明者 キープ, サラ

イギリス国 ジーユー 2 4 0 エヌエフ サリー, ウォーキング, パープライト, アッシュ ロード, ザ パープライト インスティテュート

(72)発明者 ブリットン, ポール

イギリス国 ジーユー 2 4 0 エヌエフ サリー, ウォーキング, パープライト, アッシュ ロード, ザ パープライト インスティテュート

F ターム(参考) 4B065 AA90X AA95X AB01 BA01 BA14 CA24 CA44

4C085 AA03 BA71 CC08 DD62 EE01 GG01 GG08 GG10

4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 EA20 FA74