



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 120098946 A

(43) 申请公布日 2025.06.06

(21) 申请号 202411677449.1

C12N 9/12 (2006.01)

(22) 申请日 2015.07.23

C12N 15/50 (2006.01)

(30) 优先权数据

1413020.7 2014.07.23 GB

C12N 15/54 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201580037402.1 2015.07.23

A61K 39/215 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

C12R 1/93 (2006.01)

(71) 申请人 皮尔布莱特研究所

地址 英国萨里皮尔布莱特

(72) 发明人 E·比克顿 S·基普 P·布里顿

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理人 张文辉

(51) Int.Cl.

C12N 7/04 (2006.01)

权利要求书2页 说明书32页

C07K 14/165 (2006.01)

序列表(电子公布) 附图11页

(54) 发明名称

冠状病毒

(57) 摘要

本发明提供了活的减毒冠状病毒,其包含编码多聚蛋白的变体复制酶基因,所述多聚蛋白包含在非结构蛋白(nsp)-10、nsp-14、nsp-15或nsp-16之一个或多个中的突变。所述冠状病毒可以用作疫苗用于治疗和/或预防受试者中的疾病(例如传染性支气管炎)。

1. 活的减毒冠状病毒,其包含编码多聚蛋白 (polyprotein) 的变体复制酶基因,所述多聚蛋白包含在非结构蛋白 (nsp) -10、nsp-14、nsp-15 或 nsp-16 之一个或多个中的突变。

2. 根据权利要求1所述的冠状病毒,其中所述变体复制酶基因编码包含选自下列的一个或多个氨基酸突变的蛋白:

在SEQ ID NO: 6第85位的Pro到Leu,

在SEQ ID NO: 7第393位的Val到Leu;

在SEQ ID NO: 8第183位的Leu到Ile;

在SEQ ID NO: 9第209位的Val到Ile。

3. 根据权利要求1或2所述的冠状病毒,其中所述复制酶基因编码包含在SEQ ID NO:6 的第85位的氨基酸突变Pro到Leu的蛋白。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的冠状病毒,其中所述复制酶基因编码包含以下氨基酸突变的蛋白:在SEQ ID NO:7第393位的Val到Leu;在SEQ ID NO:8第183位的Leu到Ile;和在SEQ ID NO:9第209位的Val到Ile。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的冠状病毒,其中所述复制酶基因编码包含以下氨基酸突变的蛋白:在SEQ ID NO:6第85位的Pro到Leu;在SEQ ID NO:7第393位的Val到Leu;在SEQ ID NO:8第183位的Leu到Ile;和在SEQ ID NO:9第209位的Val到Ile。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的冠状病毒,其中与SEQ ID NO:1所示的序列相比,所述复制酶基因包含选自下列的一个或多个核苷酸取代:

在核苷酸第12137位的C到T;

在核苷酸第18114位的G到C;

在核苷酸第19047位的T到A;和

在核苷酸第20139位的G到A。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的冠状病毒,其是传染性支气管炎病毒 (IBV)。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的冠状病毒,其是IBV M41。

9. 根据权利要求8所述的冠状病毒,其包含S蛋白,所述S蛋白的至少一部分来自除M41 之外的IBV血清型。

10. 根据权利要求9所述的冠状病毒,其中S1亚基来自除M41之外的IBV血清型。

11. 根据权利要求9所述的冠状病毒,其中所述S蛋白来自除M41之外的IBV血清型。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的冠状病毒,其与表达相应野生型复制酶的冠状病毒相比具有降低的致病性,使得当将所述病毒施用于含胚卵 (embryonated egg) 时,其能够复制而对胚胎无致病性。

13. 权利要求1至6中任一项定义的变体复制酶基因。

14. 由根据权利要求13的变体冠状病毒复制酶基因编码的蛋白。

15. 包含根据权利要求13的复制酶基因的质粒。

16. 制造根据权利要求1-12中任一项的冠状病毒的方法,其包含以下步骤:

(i) 将根据权利要求15的质粒转染至宿主细胞;

(ii) 用重组病毒感染所述宿主细胞,所述重组病毒包含具有复制酶基因的冠状病毒株基因组;

(iii) 允许在质粒中的复制酶基因序列和重组病毒基因组中的相应序列之间发生同源

重组,以产生修饰的复制酶基因;和

(iv) 选择包含所述修饰的复制酶基因的重组病毒。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述重组病毒是痘苗病毒。

18. 根据权利要求16或17所述的方法,其还包括以下步骤:

(v) 回收重组冠状病毒,其包含来自步骤(iv)的重组病毒的DNA中的修饰的复制酶基因。

19. 能够产生根据权利要求1至12中任一项的冠状病毒的细胞。

20. 疫苗,其包含根据权利要求1至12中任一项的冠状病毒和药学上可接受的载体。

21. 治疗和/或预防受试者中疾病的方法,其包含向受试者施用根据权利要求20的疫苗的步骤。

22. 根据权利要求20的疫苗,其用于治疗和/或预防受试者中的疾病。

23. 根据权利要求1至12中任一项的冠状病毒在制备用于治疗和/或预防受试者中疾病的疫苗中的用途。

24. 根据权利要求21,22或23的方法、疫苗或应用,其中所述疾病是传染性支气管炎(IB)。

25. 根据权利要求21所述的方法,其中所述施用方法选自由以下组成的组:滴眼施用,鼻内施用,饮用水施用(drinking water administration),孵化后注射和卵内注射。

26. 根据权利要求24所述的方法,其中疫苗接种是卵内接种。

27. 产生根据权利要求20的疫苗的方法,其包含用根据权利要求1至12中任一项的冠状病毒感染根据权利要求19的细胞的步骤。

冠状病毒

[0001] 本申请是基于申请日为2015年07月23日,优先权日为2014年07月23日,申请号为201580037402.1,发明名称为“冠状病毒”的专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及包含变体复制酶基因的减毒冠状病毒,其导致所述病毒具有降低的致病性。本发明还涉及此类冠状病毒在疫苗中预防和/或治疗疾病的用途。

发明背景

[0004] 禽传染性支气管炎病毒 (IBV),传染性支气管炎 (IB) 的病原体,是家禽的高度传染性 (infectious) 和接触传染性 (contagious) 病原体,其主要在呼吸道中复制,但也在肠、肾和输卵管的上皮细胞中复制。IBV是网巢病毒目 (Nidovirales),冠状病毒 (Coronaviridae) 科,冠状病毒 (Coronavirinae) 亚科和Gammacoronavirus属的成员;遗传上非常相似的冠状病毒导致火鸡、珍珠鸡和野鸡中的疾病。

[0005] IB的临床症状包括打喷嚏、气管痉挛、流鼻涕 (nasal discharge) 和哮喘。肉型鸟具有减少的体重增加,而产卵鸟产较少的卵和产生质量差的卵。呼吸道感染使鸡倾向于继发细菌感染,其在雏鸡中可以是致命的。病毒还可以对输卵管造成永久性损伤,特别是在雏鸡中,导致减少的卵产生和质量;和对肾脏造成永久性损伤,有时导致肾脏疾病,其可以是致命的。

[0006] 已经报道了IBV比任何其他传染病对家禽业造成更多的经济损失。虽然活的减毒疫苗和灭活疫苗通常用于IBV的控制,但是由于疫苗分解 (breakdown) 或与所使用的疫苗无关的新IBV血清型的引入可以使得由使用疫苗所获得的保护丧失,这对家禽业造成风险。

[0007] 此外,为了改善接种程序的效率和成本效益,在工业上需要开发适合用于卵内使用的疫苗。与卵内接种相关的主要挑战在于病毒必须能够在母体衍生的针对病毒的抗体的存在下复制,而不对胚胎致病。当前IBV疫苗是在含胚卵中多次传代后衍生的,这导致对鸡具有降低的致病性的病毒,使得它们可以用作活减毒疫苗。然而,此类病毒几乎总是对胚胎显示出增加的毒力,并因此不能用于卵内接种,因为它们引起降低的孵化率。在一些情况下观察到孵化率70%的降低。

[0008] 在含胚卵中多次传代后的减毒还具有其他缺点。其是一种经验方法,因为病毒的减毒是随机的,并且在每次传代病毒时都不同,因此为了减毒的目的,相同病毒通过不同系列的卵的传代将导致引起减毒的不同突变的集合。还存在与该过程相关的功效问题:一些突变将影响病毒的复制,而一些突变可能使病毒过于减毒。突变也可以发生在S基因中,其也可以影响免疫原性,使得所需的免疫应答受到影响,并且潜在的疫苗可能不能针对所需的血清型进行保护。此外,存在与毒性的逆转和疫苗稳定性相关的问题。

[0009] 重要的是开发新的和更安全的疫苗用于控制IBV。因此,需要与这些问题不相关的IBV疫苗,特别是可用于卵内接种的疫苗。

发明概述

[0011] 为了合理地减毒IBV,本发明人已经使用反向遗传学方法。该方法比在含胚卵中多次传代后的随机减毒更可控,因为每个突变的位置是已知的,并且可以推导其对病毒的作用,即减毒的原因。

[0012] 使用它们的反向遗传学方法,本发明人已经鉴定了导致病毒具有降低的致病性水平的各种突变。可以降低致病性水平,使得当将病毒施用于含胚卵时,其能够复制而对胚胎无致病性。此类病毒可适用于卵内接种,这是一个显著的优点,并且对在含胚卵中多次传代后产生的减毒IBV疫苗具有改进。

[0013] 因此,在第一方面,本发明提供了活的减毒冠状病毒,其包含编码多聚蛋白(polyprotein)的变体复制酶基因,所述多聚蛋白包含在非结构蛋白(nsp)-10、nsp-14、nsp-15或nsp-16之一个或多个中的突变。

[0014] 所述变体复制酶基因可以编码包含选自下列的一个或多个氨基酸突变的蛋白:

[0015] 在SEQ ID NO:6第85位的Pro到Leu,

[0016] 在SEQ ID NO:7第393位的Val到Leu;

[0017] 在SEQ ID NO:8第183位的Leu到Ile;

[0018] 在SEQ ID NO:9第209位的Val到Ile。

[0019] 所述复制酶基因可以编码包含在SEQ ID NO:6的第85位的氨基酸突变Pro到Leu的蛋白。

[0020] 所述复制酶基因可以编码包含以下氨基酸突变的蛋白:在SEQ ID NO:7第393位的Val到Leu;在SEQ ID NO:8第183位的Leu到Ile;和在SEQ ID NO:9第209位的Val到Ile。

[0021] 所述复制酶基因可以编码包含以下氨基酸突变的蛋白:在SEQ ID NO:6第85位的Pro到Leu;在SEQ ID NO:7第393位的Val到Leu;在SEQ ID NO:8第183位的Leu到Ile;和在SEQ ID NO:9第209位的Val到Ile。

[0022] 与SEQ ID NO:1所示的序列相比,所述复制酶基因可以包含选自下列的一个或多个核苷酸取代:

[0023] 在核苷酸第12137位的C到T;

[0024] 在核苷酸第18114位的G到C;

[0025] 在核苷酸第19047位的T到A;和

[0026] 在核苷酸第20139位的G到A。

[0027] 所述冠状病毒可以是感染性支气管炎病毒(IBV)。

[0028] 所述冠状病毒可以是IBV M41。

[0029] 所述冠状病毒可以包含至少一部分来自除M41之外的IBV血清型的S蛋白。

[0030] 例如,S1亚基或整个S蛋白可以来自除M41之外的IBV血清型。

[0031] 与表达相应野生型复制酶的冠状病毒相比,根据本发明第一方面的冠状病毒具有降低的致病性,使得当将病毒施用于含胚卵时,其能够复制而对胚胎无致病性。

[0032] 在第二方面,本发明提供了如与本发明第一方面相关所定义的变体复制酶基因。

[0033] 在第三方面,本发明提供了由根据本发明第二方面的变体冠状病毒复制酶基因编码的蛋白。

[0034] 在第四方面,本发明提供了包含根据本发明第二方面的复制酶基因的质粒。

[0035] 在第五方面,本发明提供用于制造根据本发明第一方面的冠状病毒的方法,其包含以下步骤:

[0036] (i) 将根据本发明第四方面的质粒转染至宿主细胞中;

[0037] (ii) 用重组病毒感染宿主细胞,该重组病毒包含具有复制酶基因的冠状病毒株基因组;

[0038] (iii) 允许质粒中的复制酶基因序列和重组病毒基因组中的相应序列之间发生同源重组,以产生修饰的复制酶基因;和

[0039] (iv) 选择包含所述修饰的复制酶基因的重组病毒。

[0040] 所述重组病毒可以是疫苗病毒。

[0041] 所述方法还可以包括以下步骤:

[0042] (v) 回收重组冠状病毒,其包含来自步骤(iv)的重组病毒的DNA中的修饰的复制酶基因。

[0043] 在第六方面,本发明提供了能够产生根据本发明第一方面的冠状病毒的细胞。

[0044] 在第七方面,本发明提供了包含根据本发明第一方面的冠状病毒和药学上可接受的载体的疫苗。

[0045] 在第八方面,本发明提供了用于治疗和/或预防受试者中疾病的方法,其包含向所述受试者施用根据本发明第七方面的疫苗的步骤。

[0046] 本发明的另外方面提供:

[0047] • 根据本发明第七方面的疫苗,其用于治疗和/或受试者中的疾病。

[0048] • 根据本发明第一方面的冠状病毒在制备用于治疗和/或预防受试者中疾病的疫苗中的用途。

[0049] 所述疾病可以是传染性支气管炎 (IB)。

[0050] 疫苗的施用方法可以选自由以下组成的组:滴眼施用,鼻内施用,饮用水施用 (drinking water administration), 孵化后注射和卵内注射 (in ovo injection)。

[0051] 接种可以是通过卵内接种。

[0052] 本发明还提供了用于生产根据本发明第七方面的疫苗的方法,其包含用根据本发明第一方面的冠状病毒感染根据本发明第六方面的细胞的步骤。

附图说明

[0053] 图1-M41-R-6和M41-R-12与M41-CK (M41EP4) 相比在CK细胞上的生长动力学。

[0054] 图2-相比于M41-CK (M41EP4) 和Beau-R, 与M41-R-6和M41-R-12相关的临床症状, snicking和哮喘 (wheezing) (柱从左至右显示每个时间点的模拟物、Beau-R、M41-R 6、M41-R 12, M41-CK EP4)。

[0055] 图3-气管环中病毒的纤毛活动,所述气管环从感染的雏鸡所取的气管分离。100% 的纤毛活动表明没有病毒的影响;无致病性,0% 活动表示纤毛活动的完全丧失,完全纤毛停滞,表明病毒是致病性的(柱从左至右显示每个时间点的模拟物、Beau-R、M41-R 6、M41-R 12、M41-CK EP4)

[0056] 图4-相比于M41-R-12和M41-CK (M41 EP5), 与M41R-nsp10rep和M41R-nsp14, 15, 16rep相关的临床症状, snicking (柱从左至右显示每个时间点的模拟物、M41-R12; M41R-

nsp10rep; M41R-nsp14,15,16rep和M41-CK EP5)。

[0057] 图5-相比于M41-R-12和M41-CK,气管环中M41R-nsp10rep和M41R-nsp14,15,16rep的纤毛活动,所述气管环从感染的雏鸡所取的气管分离(柱从左至右显示每个时间点的模拟物;M41-R12;M41R-nsp10rep;M41R-nsp14,15,16rep和M41-CK EP5)。

[0058] 图6-相比于M41-CK,与M41R-nsp10,15rep,M41R-nsp10,14,15rep,M41R-nsp10,14,16rep,M41R-nsp10,15,16rep和M41-K相关的临床症状,snicking(柱从左至右显示每个时间点的模拟物、M41R-nsp10,15rep1;M41R-nsp10,14,16rep4;M41R-nsp10,15,16rep8;M41R-nsp10,14,15rep10;M41-K6和M41-CK EP4)。

[0059] 图7-相比于M41-CK,与M41R-nsp10,15rep,M41R-nsp10,14,15rep,M41R-nsp10,14,16rep,M41R-nsp10,15,16rep和M41-K相关的临床症状,哮喘(wheezing)(柱从左至右显示每个时间点的模拟物、M41R-nsp10,15rep1;M41R-nsp10,14,16rep4;M41R-nsp10,15,16rep8;M41R-nsp10,14,15rep10;M41-K6和M41-CK EP4)。

[0060] 图8-相比于M41-CK,气管环中M41R-nsp10,15rep,M41R-nsp10,14,15rep,M41R-nsp10,14,16rep,M41R-nsp10,15,16rep和M41-K的纤毛活动,所述气管环从感染的雏鸡所取的气管分离(柱从左至右显示每个时间点的模拟物、M41R-nsp10,15rep1;M41R-nsp10,14,16rep4;M41R-nsp10,15,16rep8;M41R-nsp10,14,15rep10;M41-K6和M41-CK EP4)。

[0061] 图9-与M41-CK相比,rIBVs在CK细胞上的生长动力学。图9A显示M41-R和M41-K的结果。图9B显示M41-nsp10 rep;M41R-nsp14,15,16rep;M41R-nsp10,15rep;M41R-nsp10,15,16rep;M41R-nsp10,14,15rep;和M41R-nsp10,14,16的结果。

[0062] 图10-突变的nsp10,nsp14,nsp15和nsp16序列中的氨基酸突变的位置。

[0063] 图11-相比于M41-CK,rIBV M41R-nsp 10,14rep和rIBV M41R-nsp10,16rep的A) Snicking;B) 呼吸道症状(哮喘和罗音(rales)组合)和C)纤毛活动。

发明详述

[0065] 本发明提供了包含变体复制酶基因的冠状病毒,所述变体复制酶基因当在冠状病毒中表达时,其导致该病毒与包含野生型复制酶基因的相应冠状病毒相比具有降低的致病性。

[0066] 冠状病毒

[0067] Gammacoronavirus是属于冠状病毒科的动物病毒的一个属。冠状病毒是具有正义单链RNA基因组和螺旋对称性的包膜病毒。

[0068] 冠状病毒的基因组尺寸范围为从约27至32千碱基,其是任何已知RNA病毒的最长尺寸。

[0069] 冠状病毒主要感染哺乳动物和鸟类的上呼吸道或胃肠道。五至六种目前已知的冠状病毒株感染人类。最广为人知的人冠状病毒SARS-CoV,其引起严重的急性呼吸综合征(SARS),具有独特的发病机制,因为它引起上呼吸道和下呼吸道两者的感染,且还可导致胃肠炎。中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)也引起人类的下呼吸道感染。冠状病毒被认为在人类成人中引起显著百分比的所有常见感冒。

[0070] 冠状病毒还在家畜动物和家养宠物中引起一系列疾病,其中一些可能是严重的,并且对农业产业构成威胁。经济上意义重大的家畜动物冠状病毒包括传染性支气管炎病毒

(IBV), 其主要在鸡中引起呼吸道疾病并严重影响全世界的家禽业; 猪冠状病毒(可传染的胃肠炎, TGE)和牛冠状病毒, 它们都导致年幼动物中的腹泻。猫冠状病毒有两种形式, 猫肠道冠状病毒是一种具有次要临床意义的病原体, 但这种病毒的自发突变可导致猫传染性腹膜炎(FIP), 一种与高死亡率相关的疾病。

[0071] 还有两种类型的犬冠状病毒(CCoV), 其中一种引起轻微的胃肠道疾病, 且另一种已发现引起呼吸道疾病。小鼠肝炎病毒(MHV)是导致具有高死亡率的流行性鼠类疾病的冠状病毒, 特别是在实验室小鼠的群落中。

[0072] 冠状病毒可以分为四组, 如下所示:

[0073] Alpha

[0074] • 犬冠状病毒(CCoV)

[0075] • 猫冠状病毒(FeCoV)

[0076] • 人冠状病毒229E(HCoV-229E)

[0077] • 猪流行性腹泻病毒(PEDV)

[0078] • 可传染的胃肠炎病毒(TGEV)

[0079] • 人冠状病毒NL63(NL或New Haven)

[0080] Beta

[0081] • 牛冠状病毒(BCoV)

[0082] • 犬呼吸道冠状病毒(CRCoV) - 常见于东南亚和密克罗尼西亚

[0083] • 人冠状病毒OC43(HCoV-OC43)

[0084] • 小鼠肝炎病毒(MHV)

[0085] • 猪血凝性脑脊髓炎病毒(HEV)

[0086] • 大鼠冠状病毒(RCV)。大鼠冠状病毒在东澳大利亚相当流行, 在2008年3月/4月, 它在原生和野生啮齿动物群落中发现。

[0087] • (还没有通用名称)(HCoV-HKU1)

[0088] 严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)

[0089] • 中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)

[0090] Gamma

[0091] • 传染性支气管炎病毒(IBV)

[0092] • 火鸡冠状病毒(Bluecomb病病毒)

[0093] • 野鸡冠状病毒

[0094] • 珍珠鸡冠状病毒

[0095] Delta

[0096] • Bulbul冠状病毒(BuCoV)

[0097] • Thrush冠状病毒(ThCoV)

[0098] • Munia冠状病毒(MuCoV)

[0099] • 猪冠状病毒(PorCov)HKU15

[0100] 本发明的冠状病毒的变体复制酶基因可以衍生自alphacoronavirus例如TGEV; betacoronavirus例如MHV; 或gammacoronavirus例如IBV。

[0101] 如本文所使用的, 术语“衍生自”意指包含与相关冠状病毒的野生型复制酶基因基

本相同的核苷酸序列的复制酶基因。例如,本发明的变体复制酶基因可以具有与野生型复制酶序列高达80%、85%、90%、95%、98%或99%的同一性。所述变体冠状病毒复制酶基因编码蛋白,当与非结构蛋白的野生型序列相比时,该蛋白包含在非结构蛋白(nsp)-10、nsp-14、nsp-15或nsp-16之一个或多个中的突变

[0102] IBV

[0103] 禽传染性支气管炎(IB)是鸡的急性和高接触传染性呼吸道疾病,其引起重大的经济损失。该疾病的特征在于呼吸症状,包括喘气、咳嗽、打喷嚏、气管罗音(rales)和流鼻涕(nasal discharge)。在年幼的鸡中,可能发生严重的呼吸窘迫。在产卵者(layers)中,呼吸窘迫、肾炎、产卵率下降,以及内部卵质量和卵壳质量的损失是常见的。

[0104] 在肉鸡中,咳嗽和嘎嘎声是常见的临床症状,在房舍的所有鸟类中迅速蔓延。未接种鸡群的发病率为100%。死亡率根据年龄,病毒株和继发性感染而变化,但在未接种的鸡群中可高达60%。

[0105] 鉴定的第一种IBV血清型是马萨诸塞型(Massachusetts),但在美国,除了最初鉴定的马萨诸塞型之外,目前还流行有几种血清型,包括阿肯色型(Arkansas)和特拉华型(Delaware)。

[0106] IBV株Beaudette是在鸡胚中至少传代150次后所衍生的。IBV Beaudette不再对孵化的鸡有致病性,但快速杀死胚胎。

[0107] H120是市售的活的减毒IBV马萨诸塞血清型疫苗株,通过在含胚鸡卵中大约120代来减毒。H52是另一种马萨诸塞型疫苗,并且代表在H120发育期间更早和稍微更致病的传代病毒(第52代)。基于H120的疫苗是常用的。

[0108] IB QX是IBV的毒性野外分离株。从2004年起,在西欧部分地区,主要是在荷兰,但也有来自德国,法国,比利时,丹麦和英国的报告,严重的卵生产问题被确定为具有非常相似的病毒。

[0109] 从荷兰病例分离的病毒由位于Deventer的荷兰研究所鉴定为新的病毒株,他们称之为D388。与IB QX的联系来自于进一步的测试,其显示所述病毒具有与IB QX病毒99%相似。现已开发出活的减毒QX-样IBV疫苗病毒株。

[0110] IBV是在细胞质中复制的包膜病毒,并且包含非分段的单链正义RNA基因组。IBV具有27.6kb的RNA基因组,并且像所有冠状病毒含有四种与基因组RNA相互作用的结构蛋白;刺突糖蛋白(spike glycoprotein)(S)、小膜蛋白(small membrane protein)(E),膜整合蛋白(M)和核衣壳蛋白(N)。

[0111] 基因组以下述方式组织:5'UTR-聚合酶(复制酶)基因-结构蛋白基因(S-E-M-N)-UTR 3';其中UTR是非翻译区(IBV中每个~500个核苷酸)。

[0112] 脂质包膜含有三种膜蛋白:S、M和E。IBV S蛋白是I型糖蛋白,其在内质网中寡聚化并且组装成经由跨膜结构域插入病毒膜中的同型三聚体,并通过非共价相互作用与M蛋白的相关联。在掺入冠状病毒颗粒后,S蛋白负责结合靶细胞受体以及病毒和细胞膜的融合。S糖蛋白由四个结构域组成:在合成期间被切割的信号序列;存在于病毒粒子颗粒外部的胞外域;负责将所述S蛋白锚定到所述病毒粒子颗粒的脂质双层中的跨膜区;和细胞质尾。

[0113] 所有冠状病毒还编码一组未知功能的辅助蛋白质基因,其对于体外复制不是必需的,但可以在发病机理中起作用。IBV编码两个辅助基因,基因3和基因5,两者分别表达两种

辅助蛋白3a、3b和5a、5b。

[0114] 本发明的冠状病毒的变体复制酶基因可以衍生自IBV。例如，该IBV可以是IBV Beaudette、H120、H52、IB QX、D388或M41。

[0115] IBV可以是IBV M41。M41是在1941年于美国分离的原型马萨诸塞血清型。它是在世界各地的许多实验室中作为致病性实验室病毒株使用的分离株，并且可以从ATCC (VR-21TM) 获得。减毒变体也被几个疫苗生产者用作针对引起本领域问题的马萨诸塞血清型的IBV疫苗。本发明人选择使用该病毒株，因为他们已经对该病毒工作了多年，并且因为完整的病毒基因组的序列是可获得的。本发明人使用的M41分离株，M41-CK被适应以在原代鸡肾(CK) 细胞中生长，并因此被认为适于作为传染性病毒从完整基因组的cDNA中恢复。它是病原性IBV的代表，并因此可以分析导致致病性丧失或降低的突变。

[0116] IBV M41-CK的基因组序列作为SEQ ID NO:1提供。

[0117] SEQ ID NO:1 IBV M41-CK序列

ACTTAAGATAGATATTAATATATATCTATCACACTAGCCTTGCCTAGATTCCAACCTTA
ACAAAACGGACTTAAATAACCTACAGCTGGTCCCTAGGTGTTCCATTGCAGTGCACTTT
AGTGCCCTGGATGGCACCTGCCACCTGTCAGGTTTTGTTATTAAAATCTTATTGTTGC
TGGTATCACTGCTTGTGTTGCCGTGTCACTTATACATCCGTTGCTTGGGCTACCTAG

TATCCAGCGTCCTACGGGCGCCGTGGCTGGTTCGAGTGCAGAACCTCTGGTTCATCTA
GCGGTAGGCGGGTGTGGAAGTAGCACTCAGACGTACCGGTTCTGTTGTGAAATAC
GGGGTCACCTCCCCCACATACCTCTAAGGGCTTTGAGCCTAGCGTGGGCTACGTTCT
CGCATAAGGTGCGCTATACGACGTTGTAGGGGGTAGTGCAAAACAACCCCTGAGGTGAC
AGGTTCTGGTGGTTAGTGAGCAGACATACAATAGACAGTGACAACATGGCTCAAGC
CTAAAACAGGGAGTATCTCCAAACTAAGGGATGTCATTCTGTATCCAAGACATTCT
GAACAACTTGTGACGCTTGTCTTCTATACGTACACAACCTAAGGATTACGCTGAT
GCTTTGCAGTTAGGCAGAAGTTGATCGTAATCTGCAGACTGGGAAACAGTTCAAATT
GAAACTGTGTGGTCTCTCCTCTGAAGGGAGTTGACAAAATAACACCTGGCGTCCCA
GCAAAAGTCTTAAAGCCACTCTAAGTTGGCAGATTAGAAGACATCTTGGTGTCTCT
CCCTTGCAAGAAAATATCGTAACTTTGAAGACAGCATGCCAGTGGTCTCTACTGTA
GAAACACTGGATGCTCGTCACAAACTCTTGATGAAATTGGACCTACTGAAATACTT
TGGCTTCAGGTGGCAGCAAAATCCAAGTTGGCTATGGCAGTGCAGGCTTGGGA
GAAGTAACTGCAAAGTCATGGATGCTTGGCTCAAATATGAGTGCTTTCCAGATT
TTAAACAAACAAATAGTCAGAATTTCAGAAAAGCGCTGGCTATTGGAGAATGTGAGT
GAATTACACAGCGTATTGCAGCACTTAAGATGGCTTGTCTAAGTGTGCAAGTCCATT
ACTGTTGTGGTTATGGAGAGGACTCTAGTGTAGAGAGTTGCAGGAACCTGTCTGCA
AGCATTAAATGGTGTGCAAAATTCTTGAGAACACTCCAAATGGTTCATGGTGCT
AAAATTTCACTACACTTGCTCTTAGGGAGGCTGCAGTGAAAATTGTGGATAACATA
CCAAATGCACCGAGAGGCACTAAAGGGTTGAAGTCGTTGGTAATGCCAAAGGTACACAA
GTGTTGTGCGTGGCATGCAAATGACTAACACTGCTTGACCAAAAGCTGAAATTCT
GTGGAGTCAGAAGGTTGGCTGCAATTGGGCTGGACATCTTGCTATGTTAAGAGT
GGTGATCGCTTACCGGGCACCTCTTCAGGAATTGGCATGTCATGATGTGATTGT
TGTGAGCGTGTGCTGTCTTGTGTTGTAACACCGGAGATAATGATGGACTTATT
CTTGCAAGCAATCTACTCTTCTTAGTGTGCGAGAACCTGTGGCAGCCATTAAAAGGGT
GAACCATTAAAGTTCTGGGTCAAAATTGTGATGCAAAGGATGCGAGTTCTT
ACATTAGCGAAGGCTGCTACTATTGAGATGTTGAAGCTTCAATCAGCGTGTG
AAAGTAGAAGATGTTGGCTTCACTTACTGAAAAGTCTTGAATTCTGGAGGCTTGCA
TATGAAAAGTGCATACTCGAAGAATTGTTAAGACTTGTGTTGAAGGCTCAAATG
GCGATTGTGATTTAGCGACAGTGCTGGAGAGGGCATTGGCATCTGTTGCAAGTC
ATCTATAAAAGTAGGTGGCTTTACTAAAGTTGTTGACTTTGTGAAAATATTGAAA
GGTTTTGTGACAGTTGAAAGAGCTAACGCTATTGTCACTGAAACCCCTGTGTTT
AAAGGAGTTGCACAGCATTGTTCAACTATTGCTGGATGCAATACAGTTATGTATAAA
AGTTTAAGAAGTGTGCACTTGGTAGAATCCATGGAGACTTGCTCTGGAAAGGAGT
GTGCACAAAATTATTCAAGAGGGCGATGAAATTGGTTGACGCCATTGATAGTATTGAT
GTTGAAGATCTGGGTGTTCAAGAAAATTGATTGATGTTGATAATGTG
ACACTCCAGAGAACCAACCGGTATGGTCAAATCGAGGATGACGAAAGAAACTAC
ATGTTCTCCGCTTCAAAAGGATGAGAACATTATACACCAATGTCACAGCTTGGT
GCTATTAAATGGTTGCAAGCAGGGTAAACTGTCACCTTGGAGAAACTACTGTG
CAAGAAATACCACCACTGATGTTGTTATTAGGTTAGCATTGAGTGTGGTGGTGA
CCATGGAATACAATCTCAAAAGGCTTATAAGGAGGCCATTGAGTAGAGACAGACCTC
ACAGTTGAAACAATTGCTCTGTGGTCTATGAGAAAATGTTGATGATCTCAAGCTGTT
CCGGAGGCTCCAGAACCAACCAATTGAGAATGTCACACTGTTGATAAGAATGGTAAA
GATTGGATTGCATAAAATCATGCCATCTGATCTATCGTGAATTACCATCTGGTGAAGAAACCTTGT
GTCAATAACTGCTTGAAGGGCTGTTAAAGCTCTCCGAGAAAGTTATTGATGTTCTA
GGTGAAGGGTGGCTGTTGATGCCAGAACATTGTCACAAAGAATCAACTCGG
GTCATATCTGAGAAATCAGTTGAGGGTTACTGGTAGTTGATGCAATGGCTGAACAA
GCTATTGTTGAAGAGCAGGAAATAGTACCTGTTGAACAAAGTCAGGATGAGTT
TTTACACCTGCAGACCTAGAAGTTGTTAAAGAACAGCAGAAGAGGTTGATGAGTTATT
CTCATTCTGCTGCCCTAAAGAAGAAGTTGTCACAGGAGAAAGAGGCCACAGGTT
GAGCAAGAGCCTACCTAGTGTAAAGAACAGCAGAAGAGGTTGATGAGTTATT
GTTAAACCAGCTACATGTGAAAACCCAAATTGGAGTACAAAACATGTTGGGTGAT
TTGGCTGTTGTAATTGCCAAAGCATTGGATGAGTTAAAGAGTCTGCATTGTAACGCT

GCAAATGAGCACATGTCGATGGTGGTGGCGTTGCAAAGGCATTGCAGACTTTGTGGA
 CGCGACTTGTGAATATTGCGCGACTATGTTAAGAACATGGTCCACAGCAAAACTT
 GTCACACCTCATTGTTAAAGGCATTCAATGTTGAGAATAATGTTGAGGACCTCGCCAT
 GGAGACAGCAACTTGCCTGAGAAGCTGTTGCTGCTTACAAGAGTGTCTGTAGGTGGA
 GTGGTTAACTATGTTGTCAGTTCTCATCAGGGATTGGTAGATTTAAAATA
 TCAATAGATGCTATGCGGAAGCTTTAAAGGTTGTCAGACAGCTTGTAGGAGGAA
 CTGAGTCAGAACACATCGATTATTCGATGCAACTGTAAGCAGAACATTTATCTT
 ACGGAGGATGGTAAATACCGCTCTGTTAAAACCTGGTATTCTGGTCAA
 TTTGGACAGGTTTGCAAGAAATAAGGTAGTCTTCGGCTGATGATGTTGAGGATAAA
 GAAATCCTCTTATACCCACAACGTACAAGACTATTCTGAAATATTATGGTTAGATGCG
 CAAAAGTATGTAACATATTGCAAACGCTGCGCAGAAATGGGATGTTCAATATAGAGAC
 AATTTGTTATATTAGAGTGGCGTGACGAAATTGCTGGATTAGTTAGCAATAGTCTC
 CTTCAAGCTGCTAAATTAGATTAAAGGTTCTGAGAACATGGCTAAACTGTTG
 GGTGGAGATCCTACAGACTTGTGCTGGTATTGCAAGTTGCAATGCTAAAGTAGGT
 GATTTTCAGATGCTAATTGGCTTTGGCCAATTAGCAGAACATTTGACGCAGATTAC
 ACAAAATGCACTTCTTAAGAAGTGTGCTGCAATTGTTGTTAAGAGTTATGAACTT
 AGGGGTCTTGAAGCCTGTATTCCAGGCTGAGCACCTAATCTTACATTAAAACG
 CAATATTCAAATTGCCAACCTGTGGTGCAAGTAGTACGGATGAAAGTAATAGCCTCA
 TTACCGTACTTATTGCTTTGCTACTGATGGTCTGCTACAGTTGATTGTGATGAAAT
 GCTGTAGGGACTGTTGTTTCATTGGCTCTACTAATAGTGGCATTGTTACACAGCC
 GATGGTAAGGTTTGACAATCTGCTAAGGATAGAAAATTGGAAGGAAGTCGCCTAC
 ATTACAGCAATGTATAACGTTTCTCTAGGAGTAAAATCCCCTACTGTTGAA
 CATAGTAAGGGTAAAGCTAAAGTAGTAAAAGAAGATGTTCTAACCTGCTACTAGTT
 AAAGCCAGTTTGACGATCTACTGACTTGAACAGTGGTATGATGAAACATCTAG
 AGTCTAAAGTGCAGGAGACACCTGATAATCTGATGAAATATGTCATTACGACAAAG
 GAAGATTCTAAGTGTGCAACTGACACTTAAAGTTAGGGTATCAAACTGTTGACTTT
 AGGTCTAAGGATGGTTTACTTATAAGTAAACACCTGATACTGATGAAATTC
 CCAGTCTACTACCCAGTCTGGATTCTATTAGCTTAGGGCAATATGGGTGAAGGCAGT
 GCTAATTGTTGGCATCCAAATTATTAGTAAAGTCTCTCCGAATTCCCACGTT
 TGGGAAAATGCCAGAGCTTGTAAAATGGGTATAAAATTGATGGTAACTATGGC
 CTTTGGCGTGCAGAACACCTTAATAACCTAATTGGAGAGAATTAAACATTGCTAAG
 AAAGCTATTGTTGGATCTAGTGTGTTACTACGCAGTGTGGTAAACTAGTTAAAGCA
 GCTACATACGTTGCCATAAAGTAGGTGATGGTGTAGTCGCAATTACAGATAGAATT
 AAGGGTCTTGTGGATTACACGTGGCATTGAAAAGAAATGTCCTACAATTCTA
 AAGACACTTGTGTTCTTTCTTTATTCTAAAGGCTAGTGTCTAAGAGTTAGTT
 AGCTATAAGATTGTTATGTAAGGTGGTGTGCTACCTTACTTATAGTGTGGTTATA
 TACACAAGTAATCCAGTAGTGTGTTACTGGAATACGTTGCTAGACTCCTATTGAAAGT
 TCTTATGTGGCCTTATAATGACTACGGTAAAGATTCTTGTGTTACGCTATTG
 GCAGGTGATTACTTGTGTTACATGATAGAGATTCACTTCATCTGTACAAA
 CATGCTTATAGCGTAGAACAAATTATAAGGATGCAGCTCTGGCATTAACCTTAATTGG
 AATTGGCTTATTGGCTTTCTAATATTATTGTTAAGGCCAGTGGCAGGTTGGTATT
 ATTGTTATTGTGTTAAGTATTGGTATTGAGTTCAACTGTTGCAAAACTGGTAGGT
 TTTCTAGATTGGTTGAAAACAGTTTACCCATTAAATTATGGGAGCGGGATT
 TATTCTGGCTCTTACAAGATATACTGACAGTCATCATATTGTACTGTAAGGAT
 GTAACATGTGAAGTGTGCAAGAGAGTTGCACGCAGCAACAGGGCAAGAGGTTAGCGTTGTA
 GTTGGTGGACGCAAGCAAATAGTCATGTTACACTAATTCTGGCTATAACTTTGTAAG
 AGACATAATTGGTATTGTAGAAATTGTGATGATTGGTCACCAAAATACATTGTC
 CCTGAAGTGTGCTGGCGAGCTTCTGAAAAGCTTAAGGCCATTGTTAACCTACAGCATAT
 GCTTACCACTGTTGTTGATGAGGCTGCGTGGTTGATGATTGTTAATTAAATATAAG
 GCTGCAATTCTGGTAAGGATAATGCATCTGCTGTTAAGTGTGTTCACTGTTACAGAT
 TTTTAAAGAAAGCTGTTCTAAGGAGGATTGAAATGTGAAACAAATATCTAATGAT
 GGTTTATAGTGTGTAATACACAGAGTGCCTGCACTAGAGGAAGCAAAGAATGCA
 GTCTATTATGCGCAATATCTGTTAAGCCAATTACTTACATTGACCGAGGACTTATGAG
 CAATTAAAGTAGAGCCTGTTAAGAGTGTATAGATAAAGTGTGAGCATTGCT
 AATATAATATCTGAGACTGAGCTTAAATTATAAGGCAGGCACACTCGTGTGCT
 CTGCTTCTATTAAAGACGAAGAAGCCGTAGATATGGCTATCTTCTGCCACAATCAT
 GAAGTGAATACACTGGTGACGGTTTACTAATGTGATACCGTCATATGGTATGGACACT

[0120]

GATAAGTTGACACCTCGTGTAGAGGGTTTGATAAATGCAGATGCTTCTATTGCTAAT
TTAAGAGTCAAAATGCTCCCGTAGTATGGAAGTTCTGATCTTATTAAATTGCT
GACAGTGCCTTAAATATTAACTTCAGCTACTGTCAAGTCAGGAGGTCGTTCTTATA
ACAAAGTCTGGTGTAAACAAGTTATTCTGTACACCCAGAAACTGTTGGTAGAGAAA
AAGGCAGGTGGTTATTAAACACTTTAAATGGTTATGAGTTGGTAAATGGCTT
TTTGTCTTTATATACCTTACAGCATGTTGGTTACTACTATGGAGATGAAT
AAAAGTTTGTTCACCCATGTATGATGTAACCTCCACACTGCATGTTGAAGGGTCAAA
GTTATAGACAAAGGTATTAGAGAGATTGTCAGAAGATAATTGTTCTAATAAG
TTTGTAACTTGGCCTTGGGTTAAATCATATGAAAATAAAAAACTGTCATT
GTTACAGTTGTTATAGATGGTACGGGACAGTAGCTGTTGGTGTCCCTGGTTGATCA
TGGGTTATGGATGGTGTATTGTTGTGCATATGACACAGACTGATGTCAGACCTGGTAC
ATTCTACCTGGTTAATAGAGAAATTGTTGGTACACTCAGGATTCAATTATCACTGAG
GGTAGTTTATACATCTAGCATTATTCTGCTAGATGTTATATTAAACAGCCAGC
AATACACCTCAATTGTATTGTTTAATGGCAGACATGATGCACCTGGAGCCTTACCAATT
GGTAGTATTATTCTCATAGAGTATACTTCAACCTAATGGTGTAGGCTTATAGTCCA
CAACAAATACTGCATACACCCATAGTGAAGTTGTTAGACAGCTATTGTTAGAGGT
AGTGTATGTGAGTATACTAAACAGGTTACTGTGTGTCACTAGACTCCAATGGGTTTG
TTAATGATGAATACATTAGTAAACCTGGCTTCTGTGTTACTGTTAGAGAACTT
ATGTTAATATGGTAGTACATTCTTACTGGTGTCAACCTTAATATTATTCAGCTA
GCAACTATGTTTAATACTAGTGTATTGTTAATTTGCAATGGTTATAAGTT
CAAGGTGTTTAAAGCTTATGCGACCATTGTTACAATAATGTTAGTTGGTTATT
AATGCATTGTTTGTGTACATAGTTATAATAGTGTATTAGCTGTATATTAGTA
CTCTATTGCTATGCATATTGTTACAAGTCGCAACTGTATAATAATGCATTGTTGG
CTTGTGTTTACCTTGGTTAATAGTACCCACATGGTGGCTTGTGCTATCTGGGATT
ATTCTTATATGTACACACCGTGGTTCTGTGTTACGGTACTACTAAAAACTCGT
AAGTTGATGATGGCAACGAGTTGTTGGTAATTATGACCTTGTGCGAAGAGCACTTT
GTTATTGTTGTTACTGAATTGTTAAGCTTACGAATGAGATAGGTGATAAATTGAAAGCC
TATCTTCTGCGTATGCTAGACTAAATACTATTGAGGACTGGTAGTGTGAGCAAGATTAC
TTGCAAGCTTGTGCGTACGGTTAGCTTATGCTTGGACCAATAAGAAATAGTGGTGT
GAGGTTGTTATACCCACCGGTTACTCTATTGTTAGTAGACTACACGCTGGTTTT
AAAAAAACTAGTTCTCTAGTAGTGCTGGTAGAGAAGTGCATTGTTAGTGTCTTATAGA
GGCAATAATCTTAATGGACTGTGGCTGGGTGATTCTATTACTGCCACGCCATGTGTT
GGTAAGTTAGTGGTGACCAAGTGGGTGACGTTAAACCTGCTAATAATCATGAGTT
GAAGTTGTAACTCAAATGGTTACTTGAATGTTGTCAGCAGGCGCTAAAGGAGCA
GTTTAATTTCACAAACTGCAGTTGCCAATGCTGAAACTCTTAAGTATAAGTTGTTAA
GCTAATTGTTGATAGTTCACTATAGCTGTTCTATGGTGGTACAGTTATAGGACTT
TACCCCTGTCACTATGCGTTCAATGGTACTATTAGAGCATTTCTAGCAGGAGCCTGT
GGCTCAGTTGTTTAATATAGAAAAGGGTAGTTAATTCTTATATGACCCATCTT
GAGTTACCTAATGCATTACACACTGGAACACTGCTAATGGTGGTTATGGTGGTTAT
GTAGATGAAGAGGGTGGCAGGAGTGCACCAAGATAATCTAGTTACTAACATATTGTA
GCATGGCTCATGGCGCAATTAGTGTAAAGAAAAGTAGTTTCAACACCTAAATGG
TTGGAGAGTACTACTGTTCTATTGAAGAGATTACAATAGTGGGGCTAGTGATAATGGTT
ACTCCATTTCACACTGCTTACTAAATTAGTGTATAACTGGGGTAGTGATCCCATT
GGACAATATAATTGAAAGACGAATTGACACCAGAATCTGTATTAAATCAAGTTGGTGGT
GTTAGGTTACAGTCTCTTGTAAAGAAAAGCTACATCTGGTTGGAGTAGATGTGTA
TTAGCTGCTTCTGTTGTGTGCTATTGCTTATTACGGCAGTGCCTAAAG
TTTATGTACATGCAGCTGTATTGTTGATGGCTGTGCTTTATTCTTACTGTT
AAACATGTTATGGCATACATGGACACTTCTTACATTGCTACATTGATTACAGTTATT
GGAGTTGCTGAAGTCCCTTCATATAACAAACTCTAATTAGTCAGTTGTTATT
TTAAGCCAATGGTATGATCCTGAGTCTTGTACTATGGTACCATGGATGTTATTGCCA
TTAGTGTGACACTGCTTAAAGTGTACAGGCTGCTATATGAATTCTTCAACT
TCTTGTAAATGCTGTACGTTATGAAGTTAGGTTATTACACCTCTCAAAC
ACTCTTACTGCATATAACAGAAGGTAATTGGGAGTTATTCTTGAGTTGGTCAACT
GTGTTGGCTAATGTTAGTAGTAATTCTTAATTGGTTAATTGTTAAGTGTGCTAAG
TGGATTATTATTGCAATGCAACATACTTTAATAATTGTTAATGGCAGTCATG
GTAAATGGCATAGGCTGGCTTGCACCTGTTACTTGGGATGTTATTGGTGGTTAATAAA

GTTCCTGGTTAACCTAGGTAATACAATTAAAGTTCACTAGATCAATATAGGTAT
ATGTGTTGCATAAGGTAATCCACCTAAAAGTGTGGGAGGTCTTACTACAAATATA
CTTATACAGGAATTGGAGGCATCGTGTGCTATAGCTACAGTGCATCTAAATTG
AGTGATGTAAGTGTACAACAGTTGTTAATGCAGCTTGTGACTAACGTTAATGTTGAA
GCAAATTCAAAATGCATGCTTATCTGTTGAGTTACACAATAAAATCCTGCATCTGAT
GATGTTGGAGAGTGCATGGATAATTATTGGGTATGCTTATAACACTATTGTATAGAT
TCTACTATTGATTGGGTGAGTATTGTGATGATATACTTAAGAGGTCAACTGTATTACAA
TCGGTTACTCAAGAGTTCGCACATACCCCTGTATGCTGAATATGAAAGAGCTAAGAGT
ATTATGAAAAGGTTAGCCGATTCTAAAAATGGTGGTGTAAACACAGCAAGAGCTTGCT
GCATATCGTAAAGCTGCCAATTGCAAAGTCAGTTGATAGAGACTTGGCTGTTCAA
AAGAAGTTAGATAGCATGGCAGAACGTGCTATGACAACAATGTATAAAGAGGCGCGTGT
ACTGATAGAAGAGCAAAATTAGTTCATCATTACATGCACTACTTTTCAATGCTTAAG
AAAATAGATTCTGAGAAGCTTAATGTTATTGACCAGGCGAATAGTGGTGTGACCC
CTAGCAACTGTTCCAATTGTTGAGTAAAGCTTACCCCTGTTATACCAAGACCCAGAG
ACGTGGGTCAAGTGTGGAGGGTGTGCATGTTACATATTCAACAGTTGTTGGAATATA
GACTGTTACTGATGCCATGGCACAGAGTTACACCCACTTCTACAGGTAGTGGATTG
ACTTACTGTTAAAGTGGTATAATAGCATGGCCTTAAAGGTTAACTTGACTAGGAAT
GGGCATAATAAGGTTGATGTTGCCCTGCAAATAATGAGCTTACGCTCACGGTGTAAAG
ACAAAGGCTTGCCTAGCAGGTAGATCAAGCACATTGTTAGCAGTCTAAATGTTAT
TATACAAAGTATTAGTGGCAGTTAGTGTAGCTGCTATTACCTCTCAAATCTAATCTG
AAAGTAGCCTCTTTGAATGAGGCAGGTAAATCAGATTATGTAGACTTAGACCCACCA
TGTAATTTGGTATGAAAGTGGGTATAAGGTTGAAGTTGTTACCTGTATTTTATAAAA
AATACGAGGTCTATTGTAAGAGGTATGGTACTTGGTGTATATCTAATGTTGTTGTTA
CAATCTAAAGGTATGAGACAGAGGAAGTGGATGCTGTAGGCATTCTCTCAATTGTTCT
TTTGCAGTAGATCCTCGGGATACATATTGAAATATGTGGCAGCAGGTAAATCACCTTAA
GGTAACTGTTAAATGTTGACAGTACATAATGGTAGTGGTTTGCAATAACATCAAAG
CCAAGTCCAACCTCGGATCAGGATTCTATGGAGGAGCTCTGTGTCTTATTGAGA
GCACATATAGCACACCCCTGGCGAGCAGGAAATTAGTGGACGCTGTCAATTAAAGGT
TCTTGTGCAAATACACTACGGAGAAAGATCCTGTTGATCTGTCTACGTAACAAAG
GTTTGCAGTGTGTTGTCAGTGTGGATTGGTTATGGATGTCAGTGTGATTCACTTAGACAA
CCTAACACCTCTGTTGTCAGTCAGTGTGCTGTGCATCTGGTTTGATAAGAAATTAAAC
GGGTACGGGGTAGCAGTGGCTCGGCTGATAACCCCTAGCTAATGGATGTGACCCCGATG
TTGTAAGCGAGCCTTGATGTTGTAATAAGGAATCAGCCGGTATGTTCAAATTGTA
AGCGTAACTGTCACGATTCAAGAAGTACGTGATACTGAAGATGGAATCTTGAGTATT
GTGATTCTTATTGTTGTTAAACAAACCACTCCTAGTAATTATGAACATGAGAAAGCTT
GTTATGAAGACTTAAAGTCAGAAGTAACAGCTGATCATGATTCTTGTGTTCAATAAGA
ACATTATAATATTAGTAGGCAGAGGCTTAAGTATACTATGATGGATTGCTATG
CTTGCGGCACCTTGACCCAAAGGATTGCGAAGTTCTAAAGAAATACTTGTCACTTATG
GTGTTAGAAGATTATCACCCCTAAGTGGTTGAAGAGAATAAGGATTGGTACGACCCAA
TAGAAAACCTAAATATTGCGATGTTGGCTAAAGGACCTATTGACGACGTGCTT
TATTGAATGCTATTGAGTTGGAAACCTCATGGTTGAAAAGGTTATGTTGTTTATT
CACTTGATAACCAAGATCTTAAATGGCAAATTGATTGTTGGTATTTCAGAAGACAG
CGCCTGGTGTGGCTGGCTGTTGATACGTATTACTTACATGATGCCATCATAG
CCATGACTGATGCGTGGCACCTGAGAGGTATTGAAATATGATGTGCATAAGGGTTATA
AATCTTATGATCTCCTCAAGTATGATTACTGAGGAGAAACAAGATTGTTCTAGAAGT
ACTTTAAGTATTGGGATCAAGAGTATCACCTAACTGTCGCGACTGTAGTGTGACAGGT
GTTTGATACATTGTGCAAACCTCAACATCTGTTCTACACTGTACCGCAGACTTCTT
TCGGTAATTGTTGAGAAAGGTTGTTGATGGTGTACCTTATAGCTACTTGTGGCT
ATCATTCTAAGGAACCTGGTTATTATGAATCAAGATAACACCATGTCTTCAA
TGGGTTGAGTCAACTCATGCAGTTGTTGGAGATCCTGCCTGTTAGCGTCTGGTATT
CTCATCAAACGGTAAACCAAGGTCACTTAAACAAGGATTCTACGATTTGCAGAGAAGG
CTGGTATGTTAAGGAAGGTTCTTCTATACCACTAAACATTCTTACCCACAGACTG
GTAATGCTGCTATAAACGATTATGATTATTACGTTATAACAGGCCTACCATGTTGATA
TACGTCAACTTATTGTTAGAAGTGAACCTCTAAATATTGAAATGTTATGAAAGGCG
GCTGTATACCAAGGCCAAGTTGAGTTAACAAATTAGATAAGAGTGCAGGTTATCCGT
TCAATAAGTTGAAAGGCCGCTCTATTATGAAATGAGTCTAGAGGAGCAGGACCAAC

TCCTTGAGAGTACAAAGAAGAACGTCTGCCTACTATAACTCAGATGAATTAAAATATG
 CCATATCCGCAAAATAGAGCGCGTACAGTGGCAGGTGTCTATCCTTCTACTATGA
 CTAATAGGCAGTTCATCAGAAGATTCTTAAGTCTATAGTCACACACTAGAAACGCTCCTG
 TAGTTATTGGAACAACCAAGTTTATGGCGGTTGGGATAACATGTTGAGAAACCTTATTG
 AGGGTGTGAAGACCCGATTCTTATGGGTTGGGATTATCCAAAGTGTGATAGAGCAATGC
 CTAATTGTTGCGTATAGCAGCATCTTAGTACTCGCTCGTAACACACTAATTGTTGTA
 CTTGGTCTGAACCGTTTATAGGTTGATAATGAATGCGCTCAGGTTTATCTGAAACTG
 TCTTAGCTACAGGTGGTATATGTGAAACCTGGTGGTACTAGCAGTGGAGATGCTACTA
 CTGCTTATGCAAACAGTGTGTTCAACATAATACAAGGCCACATCTGCTAATGTTGCGCGTC
 TTTGAGTGTATAACCGTGATATTGATATGATGACATTAAGAGCTTGCAGTATGAAT
 TGTACCAGCAGGTTTATAGGCGAGTCATTTGACCCAGCATTGTTGAAAAGTTTATT
 CTTATTGTTGTAAGAATTCTCATTGATGATCTGCTCTGACGACGGTGTGTTGTTATA
 ACAACACATTAGCCAAACAAGGCTTGTAGCAGATATTCTGGTTTAGAGAAGTTCTCT
 ACTATCAGAACAAATGTTTATGGCTGATTCTAAATGTTGGGTTGAACCAGATTAGAAA
 AAGGCCACATGAATTGTTCACAGCACACAATGTTAGTGGAGGTTGATGGTGAACCTA
 GATACTTGCCATATCCAGACCCATCACGTATTTGTTGTCATGTTGTTGAGATGATT
 TGGATAAGACAGAATCTGTTGTTATGGAGCGTTATATCGCTCTGCCATAGATGCGT
 ACCCACTAGTACATCATGAAAATGAGGAGTACAAGAAGGTATTCTTGCTTCTTCT
 ACATCAGAAAACCTCTATCAAGAGCTTCTCAGAATATGCTTATGGACTACTCTTGTAA
 TGGATATAGATAAGGGTAGTAAATTGGAACAGGAGTCTATGAAAATATGTATAGAG
 CCCCTACAAACATTACAGTCTGTTGCTGTAGTGTAAATAGTCAAACTATATTG
 GCTGTGTTATTGATTGCAACCATTTGTTGTTGTAAGTGTGCTATGACCATGTC
 TGCAACACAGACCACAAAATGTTGCTATAAACCTTACATTGCTCACAGCCAGGTT
 GTGGTGAAGCAGATGTTACTAAATTGACCTCGGAGGTATGTCATACTCTGCGGTAACT
 ATAAACCAAAGTTATCAATACCGTTAGTATCTAATGGTACAGTGTGTTGAAATTACAGG
 CTAATTGTCAGGTAGCAAAATGTTGATGTTAATCAACTAGCTACTACTAATTGGT
 CTACTGTGGAACCTTATATTGGCAATCGTTGTTGAGATTGCTGAGACGCTTGCTG
 CAGAGACAGTAAAAGCTACAGAAGAATTACATAAGCAACAATTGCTAGTGCAGAAGTGA
 GAGAAGTACTCTCAGATCGTGAATTGATTGCTTGGAGACATTGTTAACCTCACACAATGTTG
 CATTGAATAGAAATTATGTTTCACTGGCTTCACTTACTAGAAACTAGTAAAGTTCA
 TCGGTGATTTCACATTGAAAAGGTGAAGGTAAGGACGTTGCTATTATCGAGCGACGT
 CTACTGCTAAATTGCTGTTGGAGACATTGTTAACCTCACACAATGTTG
 TTATAGCGCCAACGTTGTCCTCAGCAAACCTTCTAGGTTGTAATTAAAGACCTA
 ATGTGATGGTACCTGCGTGTGTTGAAATAAACATTCCATTGACCTATTAGTAGGCAAGC
 AGAAGCGTACTACAGTACAAGGCCCTCTGGCAGTGGTAAATCCATTGCTATAGGAT
 TGGCGCTTACTTAGTAACGCCGTGCTGTTTACTGCATGCTCTCATGCAGCTGTTG
 ATGCTTATGAAAAGCTTTAAGTTCTAAAGTAGATGATTGCACTCGTATAGTAC
 CTCAAAGGACTACTATCGATTGCTCTCAAGTTAAAGCTAATGACACAGGCAAAAGT
 ACATTTTAGTACTATTAAATGCCATTGCGAGAAGTTAGTGTGACATTCTTGGTGACG
 AGGTTAGTATGTTGACCAATTGCAATTGCAATTGCTTAAAGTAGATAAAACTATCAAT
 ATGTTGTTGATGTTGAGGTGATCCTGCTCAATTACGGCGCCTCGTACGTTGCTAACGGTT
 CACTCTCTCAAAGGATTATAATGTTGTCACAAACCTTATGGTTGTTAACCTGACA
 TTTCTTGCAAAGTGTACCGTTGCTAAAGAAATTGAGATACTGTTCTACTCTG
 TATATGATGGAAAGTTATTGCAAATAACCGGAATCAGTCAGTGTGTTCAAGGTTATAG
 TTAATAATGGTAATTGATGTTGAGGACATGAAAGTAGGCTCAGCCTACAACATAACTCAAT
 TAGAATTGTTGAAAGATTGCTGTCGCAATAAGGAATGGCGGAAGCAACATTCAATT
 CACCTTATAATGCTATGAACCAGAGAGCCTACCGTATGCTGGACTTAATGTTCAGACAG
 TAGACTCGTCTCAAGGTTGGAGTATGATTGTTATCTTGTGTTACTGCAGATTG
 AGCATGCACTGAATATTACAGATTCAATGTCAGCCTACAAGAGCCAAGCGTGGTATAC
 TAGTTGTCATGCGTCAGCGTGATGAACTATATTCACTCTTAAGTTATAGAGCTTGATA
 GTGTTAGCAAGTCTGCAAGGTACAGGCTTAAAGGTTGCAACAAAGAGTTAGTGGTG
 TTCACCCAGCTTATGCACTCACAACAAAGGCTTGTGCAACTTATAAAGTTAATGATG
 AACCTGCTGCACTGTTAACGTGGAAGCTGGTTCAGAAATAACATATAAACATCTTATT
 CTTGTTAGGGTTAAGATGAGTGTAAATGTTGAGGCTGCCACAACATGTTATAACAC
 GTGATGAGGCTATCCGCAACGTAAGAGGTTGGTAGGTTGATGTTAGAAGCAACACATG
 CTTGCGGTACTAACATTGTTACACCTGCTTCCAAAGTAGGTTCTACTGGTGCAG
 ACTTTGTTAGTTACGCCGTAGGGACTTGTAGATACTTCATAGGCAATAATTGAGCCTG

[0123]

TGAATTCTAAAGCACCTCCAGGTGAACAATTAACTGAGAGCGTTATTCAAAAGTG
CTAAACCTTGGCATGTTGTAAGGCCAAGGATTGTCAAATGTTAGCGGATAACCTGTGCA
ACGTTTCAGATTGTGAGTGTGTCACGGTGTCACTGGCTAGAACTAACCACTTGC
GCTATTGGTAAAGGCAAGGACCAAGTTGTTCTGCGGTTCTAGAGCAACAACCT
TTAATTCTCATACTCAGGCTTATGCTGTTGAAAGCATTGCTGGGTTTGATTTGTT
ATAATCCACTCTAGTGGATATTCAACAGTGGGTTATTCTGTTAACCTACAATTAAACC
ATGATTGATTGTAATGTGCATGGACACGCACATGTAGCTCTGCGGATGCTATTATGA
CGCGTTGCTTGCAATTAAATGCATTTGTCAGATGTCAACTGGGATTAACTTACCC
CTCATATAGCAAATGAGGATGAAGTCATTCTAGCTGAGATATTACACGCATGTATC
TTAATGCATGTGTTGATGCTCTAAAGTTAACGTTGCTATGATATTAGGCAACCTAAAG
GTATAAAATGTGTTAGACGTGGAGACTAAATTAGATTCTATGATAAGAATCCAATAG
TACCCAATGTCAAGCAGTTGAGTATGACTATAATCAGCACAAAGATAAGTTGCTGATG
GTCTTGATGTTGAAATTGTAATGTGATTGTTATCCGACAATTCTTAGTTGTA
GGTACGACACACGAAATTGAGTGTGTTAACCTACCTGGTTGTAATGGGGTAGCTG
ATGTTAACAAAGCATGCATTCCACACACCTAAATTGATCGCACTAGCTTCGTAATTG
AAGCTATGCCATTCTTTCTATGACTCATCGCCTTGCAGACATTCAATTGGATGGAG
TTGCGCAAGACCTTGTGTCATTAGCTACGAAAGATTGTATCACAAATGCAACATAGGCG
GTGCTGTTGAAAAGCACGCAAATGTATGAGATTGACTCTTATAATGCAAG
CTGTTACTGCTGGTTACTTTGGGTTACTAATAATTAAACCCATATAATTGTTGGA
AAAGTTTCAGCTCCAGTCTACGACAATTGCTTATAATTGTTAAGGGTGGC
ATTATGATGCTATTGAGGAGAAATGCCACTATCGTAACTGGAGATAAAGTTGTTA
TAGATCAAGGCGTAGAAAAGCAGTTTTTAATCAAACAATTGCTACATCTGAG
CGTTGAGCTGTATGCGAAGAGAAATTGCGCACACTGCCAACACCGTATTGAAAG
GTTTGGGTGAGATGTGACTAATGGATTGTAATTGGGATTACAGAACCAACACCAC
TATACCGTAATACTGTTAAGGTATGTCATATACAGACATAGAACCAAATGGCTAATAG
TGCTGTATGATGATAGATATGGTATTACAGCTTTCTAGCTGCTGATAATGCTGTT
TAGTTCTACACAGTGTACAAGCGGTATTGCTATGAGAAATTACCGTCAAACCTGCTG
TTCAAGAACGGTATTCCGTTAAAGATGGAGCGAACCTGTATGTTATAAGCGTGT
GTGCGTTGTTACGCTACCTAACACATTAAACACACAGGGTGCAGTTATGAAACTTTG
AACCTCGTAGTGTGAGCGTGATTCTCGACATGTCTGAGGAGAGTTGAGAAA
AGTATGGTAAAGAATTAGGTCTACAGCACATACTGTATGGTGAAGTTGATAAGCCC
TAGGTGGTTACACACTGTTAGGTATGTCAGACTTTACGTGCGAATAAGTTGAA
CAAAGTCTGTTACTAATTGATTCTGATGTCTGACAAATTATTTGTATTGGCAGACA
ATGGTTCTACAAGCAAGTGTACTGTTGGATTGCTGCTGATGATTCTTAAAC
TTCTAGGAACATACTGAAAGAGTATGGTACTAATAAGTCTAAAGTTGTAACAGTGT
TTGATTACCATAGCATAAATTGACTGGTTGAAAGATGGCATTATTAAACATGTT
ATCCACAGCTCAATCAGCATGGACGTGGTTATAATATGCTGAACTTTATAAGTTC
AGAATTGTTATGGAACCTTGCACATTCTAATTATGGTGTGGAATAGCGTGC
GTGGTATTATGATGAATGTGCAAAGTACACAACTCTGTCATAACCTTCGAA
CAATGTGTACCGCATAATATGCGAGTAATGCATTGGAGCTGAAAGTGACAAAGGAG
TGGCTCCAGGTAGTACTGTTCTAAACAATGGCTCCAGAAGGGACACTCCTGTC
ATGATATTGAGACTATGTCGTGATGCACATGTTCTGTGCTTCAGATTGCA
ATAAGACAGAGCACAAGTTGATCTGTGATATCTGATATGTATACAGACA
AAAGAAAGCATGAAGGCAGTACGCCAATAATGGCAATGATGACGTTTCA
CAAGTTCTCGTAATAATTGGCTCTAGGTGGTAGTTGCTGAAAGTGACAGAGA
CAAGTGGCACGAAGTTTATATGACATTGCACAGGATTGTCATGGGACAATGTT
GTACAGCAGTGAATGCCCTCTCAGAACGATTCTGGTTGGTTAATTATTTGGG
CAAGTAAAAGGTTAAGGTTAGTGGAAAAGCCTGCGACGCAAATTATATTTGGAGGA
ATTGTAATTATTTACAAACCTCTGCTTATAGTATATTGACGTTGCTAAGTTGATTGA
GATTGAAAGCAACACCAGTTGTAATTGAAAAGTAAACAAAGACAGACTAGTCTT
ATTAAATTAGTGTGTAAGTTACTGGTAAGAGATGGTGTACACCTCTTACTAGT
ACTCTTTGTGTACTATGTAAGTGTGCTGCTTGTATGACAGTAGTTCTACGTT
TACCAAAGTGCCTTAGACCACCTAATGGTGGCATTACACGGGGTGCCTATGCG
GTTAATATTCTAGCGAATCTAATAATGCAAGGCTCTCACCTGGGTATTGTTGG
ATTCACTGGGGCGTGTGTTAATGCTTCTATAGCTATGACGGCACCGTC
ATGGCTGGTCTAGCAGTTGACTGCAACTGTAACCTTCAGATACTACAGT
TTGTTACACATTGTTATAATTGATGGGTGTCCTATAACTGGCATGCT
CAAAGAAT

[0124]

TTTTACGTGTTCTGCTATGAAAAATGGCCAGCTTTCTATAATTAAACAGTTAGTGTA
 GCTAAGTACCCCTACTTTAAATCATTCAGTGTGTTAATAATTAAACATCCGTATATTAA
 AATGGTGATCTGTTACACCTCTAATGAGACCACAGATGTTACATCTGCAGGTGTTAT
 TTTAAAGCTGGTGGACCTATAACTTAAAGTTATGAGAGAAGTTAAAGCCCTGGCTTAT
 TTTGTTAATGGTACTGCACAAGATGTTATTTGTTGATGGATCACCTAGAGGTTGTTA
 GCATGCCAGTATAACTGGCAATTTCAGATGGCTTATCCTTTATTAAATAGTAGT
 TTAGTTAAGCAGAAGTTATTGCTATCGAAAATAGTGTAAACTACTTACGTTA
 CACAATTTCACCTTCTATAATGAGACTGGGCCAACCTAATCCTAGTGGTGTTCAGAAT
 ATTCAAACCTACAAACACAAACAGCTCAGAGTGGTTATTATAATTAAATTTCCCTT
 CTGAGTAGTTGTTATAAGGAGTCTAATTATGTTAGGATCTTACCCAAGTTGT
 AATTAGACTAGAAACTATTAAATGGCTGTGGTTAATTCACTTCAGTTCAATT
 GCTTACGGCTCTTCAGGTGGTCAAGCAATCTGCTTAGTGGTAGAGCAACTGTT
 TGTTATGCTTATTCAATGGAGGCTTCGCTGTAAAGGTTATTCAAGGTGAGTTA
 GATCTTAATTGAAATGTGGACTGTTAGTTACTAAGAGCGGTGGCTCTCGTATA
 CAAACAGCCACTGAACGCCAGTTAAACTCGACACAATTATAATAATTACTTAAAT
 ACTTGTGTTGATTATAATATATGGCAGAACTGGCAAGGTTTATTACTAATGTAACC
 GACTCAGCTGTTAGTTAAATTACTAGCAGACGAGGTTGGCTATTAGATAACATCT
 GGTCATAGACATTTGTTACAAGGTAATGGCTTACTTATTATAAGGTTAAC
 CCTTGCAGATGTCAACCAGCAGTTGTTAGTTCTGGTAAATTAGTAGGTATTCTT
 ACTTCACGTAATGAGACTGGTCTCAGCTTGTGAGAACCAAGTTACATTAAACT
 AATGGAACACGTCGTTAGCCTCTATTACTGAAATGTTGCAATTGCCCTATGTT
 AGTTATGGTAAGTTGTTATAAAACCTGATGGTCAATTGCCACAATAGTACCAAAACAA
 TTGGAACAGTTGTCACCTTACTTAATGTTACTGAAAATGTCATACCTAACAGT
 TTTAATTAACTGTTACAGATGAGTACATACAAACCGTATGGATAAGGTCATTAAAT
 TGTCTGAGTATGTTGGCAATTCTCTGGATTGAGATTGTTCAACAAATATGGG
 CCTGTTGACAACATATTGCTGTAGTAAATAGTATTGGTCAAAAGAAGATATGGAA
 CTTTGAATTCTATTCTACTAAACGGCTGGTTAATACACCATTCTTAGTAAT
 GTAGCACTGGTGGTTAATATTCTCTGTAAACACTCTAGTAGTCCTAGAAGG
 CGTTCTTATTGAAGACCTCTATTACAGCTGAGGACCTTCTGGATTACCAACAGAT
 GACGCATAACAAATTGCACTGCAGGACCTTCTGGATTCTTAAGGACCTTGCCTGCT
 CGTGAATATAATGGTTGCTTGTGTTGCCCTCATTATAACAGCAGAAATGCAAATTG
 TATACTAGTTCTCTAGTAGCTCTATGGCTTTGGTATTACTGCAGCTGGTCTATA
 CCTTTGCCACACAACCTGCAGGCTAGAATTAACTGGTATTACCCAGTCACCTTG
 TTGAGAATCAAGAAAAATTGCTGCTCTTAATAAGGCCATTGGTGTATGCAGGAA
 GGTTTAGAAGTACATCTAGCATTACAACAAATTCAAGATGTTGTTAATAGCAGAGT
 GCTATTCTACTGAGACTATGGCATCACTTAATAAAATTGGTGTATTCTCTATG
 ATTCAAGAAATCTACCACTGACGCCATACAAGCAAATGCTCAAGTGGATCGTCTT
 ATAACGGTAGATTGTCATCACTTCTGTTAGCATCTGCTAAGCAGGGAGCATATT
 AGAGTGTACAACAGCGTAGGTTAGCTACTCAGAAAATTAAATGAGTGTGTTAAGTCACAG
 TCTATTAGGTACTCCTTGTGTAATGGACGACATGTTCTAACCTACCGCAAATGCA
 CCTAATGGTATAGTGTAACTACCTTCTACTCCAGATAGTTGTTAATGTTACT
 GCAATAGTGGTTTGTGTAAGCCAGCTAATGCTAGTCAGTATGCAATAGTACCGCT
 AATGGTAGGGTATTAACTACAAGTTAATGGTAGTTACTACATCACAGCACGAGATATG
 TATAGCCAAGAGCTATTACTGCAGGAGATATGTTACGCTTACTTGTCAAGCAAAT
 TATGTAAGTGTAAATAAGACCGTCAATTACACTACATTGCTAGACAATGATGATTGATT
 AATGACGAATTGTCAAATGGGAAATGACACTAACGATGAGCTACAGACTTGACAAA
 TTCAATTACACAGTACCTATACGGTACATTGATAGTGAATTGATCGTATTCAAGGCGTT
 ATACAGGGCTTAATGACTCTTAATAGACCTGAAAATTTCAACTACTCAAACATTAT
 ATTAAGTGGCCTGGTATGTTGTTAGCCATAGCTTGTGCTATTATCTCATCTTA
 ATACTAGGATGGTTTCTCATGACTGGATGTTGTTGTTGTTGAGCTTTGATAAC
 GATGTGGTAACCTAACAAACAGACCTAAAAAGTGTGTTAATGATTCAAAGTCCCACGT
 CCTCCTAAAGTATTAAATTGTTGGTAAACTGTTACTAAGTGTGTTAGAGAGT
 TTATTAGCGCTCCAACAACAACTAACAGTTACTCCAAATTATCAATAGTAACCTAC
 AGCCTAGACTGACCCCTTGTACAGTCTAGACTAACGTTAAACTAGAAGCAATTATTGA
 AACTGGTGAGCAAGTGTGATTCAAAAAATCAGTTCAATTACAGCATATTCAAGTGTATT
 AACACAGAAGTATTGACCCCTTGACTATTGTTATTACAGAGGAGGTAATTGGGA

[0125]

AATAGAGTCAGCTGAAGATTGTCAGGTGATGATGAATTATTGAATAAGTCGCTAGAGG
 AAAATGGAAGTTTCTAACAGCGCTTATATATTGTAGGATTTAGCACTTATCTTC
 TAGGTAGAGCACTTCAAGCATTGTACAGGCTGCTGATGCTTGTGTTATTTGGTATA
 CATGGGTAGTAATTCCAGGAGCTAAGGGTACAGCCTTGTATATAAGTATAACATATGGT
 GAAAACCTAACAAATCCGAATTAGAAGCAGTTATTGTCAACGAGTTCTAACAGAACGGT
 GGAATAATAAAATCCAGCAAATTTCAGAAGATGTCAACGAGACAATTGTACTCTTGAC
 TTTGAACAGTCAGTTGAGCTTTAAAGAGTATAATTATTATAACTGCATTCTGTTG
 TTCTTAACCATAACTTCAGTATGGCTATGCAACAAGAAGTAAGTTATTATAACTG
 AAAATGATAGTGTATGGTGTCTTGGCCCTAACATTCAGTAGGTGTAATTTCATGT
 ATATAACCCACCAAACACAGGAGGTCTTGTGCAACGCGATAATACACAGTGTGCGTGT
 CTGTCTTTGTAGGTTATTGGATCCAGAGTATTAGACTCTTAAGCGGTGAGGTGATGG
 TGGTCATTAAACCCAGAATCTAATGCCGTAGGTTCAATACTCCTAACTAATGGTCAACAA
 TGTAAATTGCTATAGAGAGTGTGCCAATGGTGTCTTCTCAATTATAAGAATGGTGT
 CTTTATTGTGAGGGTCAGTGGCTGCTAAGTGTGAACCAGACACTTGCCCTAAAGATATA
 TTTGTTGTACACCGGATAGACGTAATATCTACCGTATGGTCAGAAATATACTGGTGC
 CAAAGCGGAAATAAGAACGGTTGCTACGTTGTCTATGCAAAGCAGTCAGTAGACT
 GGCAGCTAGAAAGTAGCAACAGGAGGTAGTCTTACACCTAAATGTGTGTGT
 AGAGAGTATTAAATTATTCTTAATAGTGCCTCTATTAAAGAGCGATAATAGTATT
 ATTTTGAGGATATTAATATAACCTCTGTGTTTAACTCTCTTCAAGAGCTATTAA
 TTTAAAAAACAGTTTCCACTCTTGCCAAAAACTATTGTTGTTAATGGTGTAAACC
 TTTCAAGTAGATAATGGAAAAGTCTACTACGAAGGAAAACCAATTTCAGAAAGGTTG
 TGTAGGTTGTGGTTAGTTATAAAAAGATTAAACTACCTACTACACTTATTAAAG
 AGGCCTTTATCTAACAGCCTTAATAAACGAGATGAAATGGCTGACTAGTTG
 TAAGGGCAGTTATTCATGTTAAACCCCTATTAAACTCAATTAAAGAGTATTAGATA
 GGTAAATCTTAGATCATGGACCAAAACACATCTAACGTGTGTTAGGTGCGTGATTG
 TTCAATTAGATTAGTTATAGGTTGGCGTATACGCCTACTCAATCGCTGGTATGAATAA
 TAGTAAAGATAATCCTTTGCGGAGCAATAGCAAGAAAAGCGCAATTCTGAGAGA
 AGGATTAGATTGTTACTTCTAACAAAGCAGGACAAGCAGAGTCTGTCCCGCGTG
 TACCTCTAGTATTCCAGGGAAAACCTGTGAGGAACACAAATATAATAATCTTT
 GTCATGGCAAGCGGTAAAGCAACTGGAAAGACAGATGCCAGCTCCAGTCATCAA
 GGAGGACCAAAGCCACCTAAAGTTGGCTCTGGAAATGTATCTGGTTCAAGCAATA
 AAAGCCAAGAAGTTAAATTACACCTCCGCTAACGTTGAAGGTAGCGGTGTTCTGATA
 GAAAATCTAAAACCAAGTCAGCAGCATGGATATTGGAGACGCCAGCTAGGTTAAC
 GGTAAAGGTGGAAGAAAACCAGTCCAGATGCTGGTATTAACTACTGGAACAGGA
 CCAGCGCTAACCTGAATTGGGTGATAGCCAAGATGGTATAGTGTGGTTGCTGTAAG
 GGTGCTGATACTAAATTAGATCTAACGAGTACTCGTGAACAGTTGACCA
 TATCCGCTACGGTTTCAGACGGAGGACCTGATGGTAATTCCGTTGGGATTTCATT
 CTGAATCGTGGCAGGAGTGGGAGATCAACAGCAGCTTCATCAGCAGCATCTAG
 CCATCACGTGAAGTTCGCTGGTCGAGGAGTGGTCTGAAGATGATCTTATTGCTCG
 GCAGCAAGGATAATTCAAGGATCAGCAGAAGAAGGGTCTCGCATTACAAAGGCTAAG
 GATGAAATGGCTACCGCCGGTATTGCAAGCGCACTATTCCACCTAACGTTGAT
 CAAGTGTGTTGGTCCCCGACTAAAGGTAGGAGGAAATTGGTGTGACAAGATGAAT
 GAGGAAGGTATTAAGGATGGCGCTTACAGCAATGCTAACCTAGTCTAGCAGCC
 GCTGTCTTCCGGAAGTAGAGTACGCCCAGACTCAACCAGATGGCTGACTGAAA
 TTTGAATTACTACTGTGGTCCCACGTGATGATCCGAGTTGATAATTATGAAAAA
 TGTGATCAGTGTGTTGATGGTAGGAACACGTCCAAAGATGATGAACCAAGACAAAG
 TCACGCTCAAGTCAAGACCTGCAACAAAGAGGAAATTCTCCAGCGCAAGACAGCAG
 CCTAAGAAGGAGAAAAGCCAAAGAAGCAGGATGATGAAGTGGATAAGCATTGAC
 GATGAGGAGAGGAACAATGCACAGCTGGAATTGATGATGAACCCAAGGTAATT
 GGGGATTGCCCTAGGAGAGAATGAACCTTGAGTAAATTCAATAGTAAGAGTTAAG
 AGATAGGCATGTTGATTACCTACATGTCTATGCCAGGGAAATGTCTAATTGCT
 ACTTAGTAGCCTGGAAACGAACGGTAGACCCTAGTTAACGTTAATTGTTAG
 TTAGTTAACGTTAGTTAGAGTAGGTATAAGATGCCAGTGGCCGGGCCACGCG
 GACCGAGGGTACAGCACTAGGACGCCATTAGGGGAAGAGCTAAATTGTTAAG
 AGTTAACGTTAGTATAAGTTAACGTTAGGCTAGTATAGAGTTAGAGCAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAA

[0126]

复制酶

[0128] 除了结构和辅助基因外,冠状病毒基因组的三分之二包含复制酶基因(在基因组

的5'端),其被表达为两种多聚蛋白pp1a和pp1ab,其中pp1ab是作为-1核糖体移码机制(ribosomal shift mechanism)的结果的pp1a的延伸产物。这两种多聚蛋白被两种类型的病毒编码的蛋白酶切割,通常产生16种非结构蛋白(Nsp1-16);IBV缺少Nsp1,因而编码Nsp2-16。

[0129] 因此,IBV中的基因1编码与RNA复制和转录相关的15个(其他冠状病毒中为16个)非结构蛋白(nsp2-16)。

[0130] 术语“复制酶蛋白”在本文中用于指pp1a和pp1ab多聚蛋白或单个nsp亚基。

[0131] 术语“复制酶基因”在本文中用于指编码复制酶蛋白的核酸序列。

[0132] 表1中提供了冠状病毒nsp蛋白的功能的概述。

[0133] 表1

Nsp蛋白	关键特征
1	在冠状病毒基因组内但不在冠状病毒基因群之间保守; 在宿主细胞中的潜在调节功能。
2	对组织培养中MHV和SARS-CoV的复制是非必要的
3	酸性结构域; 具有ADRP和聚(ADP-核糖)-结合活性的宏结构域(macro domain); 一种或两种含ZBD的木瓜蛋白酶样蛋白酶; Y结构域
4	跨膜结构域
5	3C样主要蛋白酶, 同型二聚体
6	跨膜结构域
7	与nsp8相互作用形成十六聚体复合物
8	非典型RNA聚合酶; 与nsp7相互作用以形成十六聚体复合物
9	ssRNA结合蛋白, 二聚体
10	RNA结合蛋白, 同型十二聚体, 锌结合结构域, 已知与nsp14和nsp16相互作用

[0134]

11	未知
12	RNA依赖性RNA聚合酶
13	锌结合结构域, NTPase, dNTPase, 5'至3' RNA和DNA解旋酶, RNA 5'-三磷酸
14	3'至5'核糖核酸外切酶, 锌结合结构域和N7-甲基转移酶
15	尿嘧啶-特异性内切核糖核酸酶, 同型六聚体
16	推定的核糖-2'-O-甲基转移酶

[0135]

[0136] 由本发明的冠状病毒编码的变体复制酶基因包含在编码nsp-10、nsp-14、nsp-15或nsp-16的序列的一个或多个区段中的突变。

[0137] Nsp10具有RNA结合活性,并且似乎参与来自pp1a/pp1ab区域的其他nsp内的同型和/或异型相互作用。它采用包含五个 α 螺旋,一个 3_{10} -螺旋和三个 β 链的 α / β 折叠。已经鉴定了由保守的半胱氨酸残基和一个组氨酸残基(Cys-74/Cys-77/His-83Cys-90;Cys-117/Cys-120/Cys-128/Cys-130)形成的两个锌-结合位点。已经证实该蛋白质结合单链和双链RNA和DNA而没有明显的特异性。Nsp-10可以与nsp-9交联,表明存在涉及nsp-7,nsp-8,nsp-9和-nsp10的蛋白-蛋白相互作用的复杂网络。此外,已知nsp-10与nsp-14和nsp-16相互作用。

[0138] Nsp-14在氨基末端区域包含3'至5'核糖核酸外切酶(ExoN)活性结构域。已经证明SARS-CoV ExoN具有金属离子依赖性的3'至5'核糖核酸外切酶活性,其作用于单链和双链RNA两者,但不作用于DNA。Nsp-14已经显示具有校对(proof-reading)活性。还已经显示该nsp在羧基末端区域具有N7-甲基转移酶(MT)活性。

[0139] 已经在许多冠状病毒(包括SARS-CoV、MHV和IBV)中报道了Nsp-15相关的NendoU(nidoviral核糖核酸内切酶,对U具有特异性)RNase活性。一致地报道了所述活性被Mn²⁺离子显著增强,并且在Mg²⁺和Ca²⁺存在下几乎没有活性。NendoU在单链和双链RNA两者中的尿苷酸残基的3'侧切割。冠状病毒NendoUs的生物相关底物仍有待鉴定。

[0140] 已经预测Nsp-16介导核糖-2'-0-甲基转移酶(2'-0-MTase)活性,并且反向遗传学实验已经显示2'-0-MTase结构域对于HCoV-229E和SARS-CoV中的病毒RNA合成是必需的。该酶可以参与冠状病毒RNA的帽1结构的产生,并且它还可以在其它RNA加工途径中与NendoU和ExoN合作。2'-0-MTase还可以甲基化特定RNA以保护它们免受NendoU介导的切割。

[0141] nsp-10,-14,-15和-16的基因组和蛋白质序列分别作为SEQ ID NO:2-5和6-9提供。

[0142] SEQ ID NO:2 (nsp-10核苷酸序列-SEQ ID NO:1的核苷酸11884-12318)

TCTAAAGGTATGAGACAGAGGAAGTGGATGCTGAGGCATTCTCACTTTGTTCTTGCAGTAGAT
CCTGCGGATACATATTGTAATATGTGGCAGCAGGTAAATCAACCTTAGGTAACTGTGTTAAATGTTG
ACAGTACATAATGGTAGTGGTTTGCAATAACATCAAAGCCAAGTCAAACCTCCGGATCAGGATTCTTAT
[0143] GGAGGAGCTCTGTGTCTTATTGTAGAGCACATATAGCACACACCTGGCGGAGCAGGAAATTAGAT
GGACGCTGTCATTAAAGGTTCTTGTGCAAATACCTACTACGGAGAAAGATCCTGTTGGATTCTGT
CTACGTAACAAGGTTGCACTGTTGTCAGTGGATTGGTATGGATGTCAGTGTGATTCACTTAGA
CAACCTAACCTTCTGTTCA

[0144] SEQ ID NO:3 (nsp-14核苷酸序列-SEQ ID NO:1的核苷酸16938-18500)

GGTACAGGCTGTTAAAATTGCAACAAAGAGTTAGTGGTGTTCACCCAGCTTATGCAGTCACA
AAGGCTCTGCTGCAACTTATAAAAGTTAATGATGAACCTGCTGCACTTGTAAACGTGGAAGCTGGTCA
GAAATAACATATAAACATCTTATTCTTGTAGGGTTAAGATGAGTGTAAATGTTGAAGGCTGCCAC
AACATGTTATAACACGTGATGAGGCTATCCGCAACGTAAGAGGTTGGTAGGTTGATGAGAAGCA
ACACATGCTTGCAGGTTACTAACATGGTACTAACCTGCCCTTCAAGTAGGTTCTACTGGTCAGAC
TTGTAGTTACGCCCTGAGGGACTTGTAGATACTCAATAGGCAATAATTGAGCCTGTGAATTCTAA
GCACCTCAGGTGAACAATTAACTTGAGAGCGTTATTCAAAAGTGTAAACCTGGCATGTTGTA
AGGCCAAGGATTGTGCAAATGTTAGCGATAACCTGTGCAACGTTCAGATTGTGAGTGTGTTGTCAG
TGGTGTATGCCCTAGAACTAACCAACTTGCCTATTGTAAAGAGGCAAGGACCAAGTTGTTCT
TGCAGGTTCTAGAGCAACAACTTTAATTCTCATACTCAGGCTTATGCTTGTGGAAGCATTGCTGGGT
TTGATTGTTATAATCCACTCTTAGTGGATATTCAACAGTGGGTTATTCTGGTAACCTACAATT
AACCATGATTGCAATTGTAATGTGCATGGACACGCACATGTAGCTCTGCGGATGCTATTATGACGCGT
TGTCTGCAATTAAATGCAATTGTAAGATGTCAACTGGGATTTAACTTACCCCATATAGCAAAT
GAGGATGAAGTCATTCTAGCTGTAGATATTACAACGCATGTATCTTAAATGCATGTTGATGCTTT
AAAGTTAACGTTGTCTATGATATAGGCAACCCCTAAAGGTATTAAATGTTAGACGTGGAGACTAAAT
TTAGATTCTATGATAAGAATCCAATAGTACCCATGTCAAGCAGTTGAGTATGACTATAATCAGCAC
AAAGATAAGTTGCTGATGGCTTGTATGTTGGAAATTGTAATGTGGATTGTTATCCGACAATTCC
TTACTTGTAGGTACGACACAGAAATTGAGTGTGTTAACCTACCTGGTTGATGGTGGTAGCTTG
TATGTTAACAGCATGCATTCCACACACCTAAATTGATCGCACTAGCTTGTAAATTGAAAGCTATG
CCATTCTTTCTATGACTCATGCCCTGCGAGACCAATTCAATTGGATGGAGTTGCGCAAGACCTTGTG
TCATTAGCTACGAAAGATTGTATCACAAAATGCAACATAGGCGGTGCTGTTGTAAGCAGCACA
ATGTATGCAAGATTGTTGTGACTTCTATAATGCAAGCTGTAACTGCTGGTTTACTTTGGGTTACTAAT
AATTGTTAACCCATATAATTGTTGAAAAGTTTCAAGCTCTCCAG

[0146] SEQ ID NO:4(nsp-15核苷酸序列-SEQ ID NO:1的核苷酸18501-19514)

TCTATCGACAATATTGCTTATAATATGTATAAGGGTGGCATTATGCTATTGAGAAATGCC
ACTATCGTAAGTGGAGATAAAAGTTTTGTTAGATCAAGGCGTAGAAAAAGCAGTTTTTAATCAA
ACAATTCTGCCTACATCTGTAGCGTTGAGCTGTATGCAAGAGAAATATTGCAACTGCCAAACAA
CGTATTGAAAGGTTGGGTGAGATGTGACTAATGGATTGTAAATTGGATTACACGAACCAAACA
CCACTATACCGTAATACTGTTAAGGTATGTGATACAGACATAGAACCAATGCCAAATAGTGTG
TATGATGATAGATATGGTATTACAGCTTTCTAGCTGCTGATAATGCTGTTAGTTCTACACAG
TGTTACAAGCGGTATCGTATGTAGAAATACCGTAAACCTGCTTGTCAAGCGTATTCCGTTAAAA
GATGGAGCGAACCTGTATGTTATAAGCGTGTAAATGGTGCCTTGTACGCTACCTAACACAATAAAC
ACACAGGGTCAAGTTATGAAACTTGTAAACCTCGTAGTGATGTTGAGCGTGATTTCTGACATGTCT
GAGGAGAGTTGTAGAAAAGTATGGTAAAGAATTAGGTCTACAGCACATACTGTATGGTGAAGTTGAT
AAGCCCCAATTAGGTGGTTCCACACTGTTATAGGTATGTGAGACTTTACGTGCGAATAAGTTGAC
GCAAAGTCTGTTACTAATTCTGATTCTGATGTCATGCAAAATTATTTGTATTGGCAGACAATGGTCC
TACAAGCAAGTGTGACTGTTGTGGATTGCTGCTGATGATTCTTAGAACTTCTTAGAACATACTG
AAAGAGTATGGTACTAATAAGTCTAAAGTGTAAACAGTGTCAATTGATTACCATAGCATAAATTGAT
ACTGGTTGAAGATGGCATTATTAACATGTTATCCACAGCTTCAA

[0148] TACAAGCAAGTGTGACTGTTGGGATTGCTGCTTGAATGATTCTAGAACATCTG
AAAGAGTATGGTACTAATAAGTCTAAAGTTGTAACAGTGTCAATTGATTACCATAGCATAAATTATG
ACTTGGTTGAAGATGGCATTATTAAAACATGTATCCACAGCTTCAA

[0149] SEQ ID NO:5(nsp-16核苷酸序列-SEQ ID NO:1的核苷酸19515-20423)

TCAGCATGGACGTGGTTATAATATGCCCTGAACCTTATAAAGTTCAGAATTGTTATGGAACCTTGC
AACATTCCAATTATGGTGGAAATAGCCTGCCAAGTGGTATTATGATGAATGTGGCAAAGTATAACA
CAACTCTGCAATACCTTCGAAAACAACAAATGTGTACCCATAATATGCCAGTAATGCATTGG
GCTGGAAGTGACAAAGGAGTGGTGCAGGTAGTACTGTTCTAAACAATGGCTCCAGAAGGGACACTC
CTTGTGATAATGATATTGTAGACTATGTGATGCACATGTTCTGCTTCAGATTGAAATAAA
TATAAGACAGAGCACAAGTTGATCTGTGATATCTGATATGTATAACAGACAATGATTCAAAAAG
CATGAAGGCGTAGCCAATAATGGCAATGATGACGTTTCAATATATCTCTCAAGTTCTCGTAAT
AATTGGCTCTAGGTGGTAGTTGCTGAAAAGTGACAGAGACAAGTGGCACGAAGTTTATATGAC
ATTGCACAGGATTGTGCATGGGACAATGTTGACAGCAGTGAATGCCTCTCTCAGAACGATTC
TTGATTGGTGTAAATTATGGGTCAGTGAAAGTTAAGGTTAGTGGAAAACGCTGCACGCAAAT
TATATATTGGAGGAATTGTAATTATACAAACCTCTGCTTATAGTATATTGACGTTGCTAAGTT
GATTGAGATTGAAAGCAACGCCAGTTGTTAATTGAAAAGTGAACAAAAGACAGACTTAGTCTTAAT
TTAATTAAAGTGTGGTAAGTTACTGGTAAGAGATGTTGGTAACACCTCTTACTAGTGACTCTTGTG
TGTACTATGTA

[0151] SEQ ID NO:6 (nsp-10氨基酸序列)

SKGHETEEVDAVGILSLCSFAVDPADTYCKYVAAGNQPLGNCVKMLTVHNGSGFAITSKPSPTPDQDSY
GGASVCLYCRRAHIAHPGGAGNLDGRQFKGSFVQIPTTEKDPVGFCRNKVCQCWIGYGCQCDSLR
QPKPSVO

[0153] SEQ ID NO:7 (nsp-14氨基酸序列)

GTGLFKICNKEFSGVHPAYAVTTKALAATYKVNDELAALVNVEAGSEITYKHLISLLGFKMSVNEGCH
NMFITRDEAIRNRGWRGVGFDEATHACGTNIGTNLPFQVGFSTGADFVVTPEGLVDTSIGNNFEPVNSK
APPGEQFNHLRALFKSAKPWHVVRPRIVQMLADNLNCVSDCVFVTWCHGLELTLRYFVKIGKDQVCS
CGSRATTFNSHTQAYACWKHCLGFDFVYNPLLVDIQQWGYSGNLQFNHDLHCNVGHGAHVASADAIMTR
CLAINNAFCQDVNWDLTYPHIANEDEVNSSCRYLQRMYLNACVDALKVNVYDIGNPKGIKCVRRGDLN
FRFYDKNPIVPNVKQFYEYDYNQHDKFADGLCMFWNCVDCYPDNSLVCRYDTRNLSVFNLPGCNGSL
YVNKHAFHTPKFDRTSFRNLKAMPFFFYDSSPCETIQLDGVAQDLVSLATKDCITKCNIGGAVCKKHAQ
MYADFVTSYNAAVTAGFTFWVTNNFNPYNLWKSFSALQ

[0155] SEQ ID NO:8 (nsp-15氨基酸序列)

SIDNIAYNMYKGGHYDAIAGEMPTIVTGDKFVIDQGVEKAVFFNQTIILPTSAFELYAKRNIRTLPPN
RILKGLGVDTVNGFVIWDYTNQTPLYRNTVKCAYTDIEPNGLIVLYDDRYGDYQSFLAADNAVLVSTQ
CYKRYSYVEIPSNLVQNGIPLKDGANLYVYKRVNGAFVTLPTNLTQGRSYETFEPRSDVERDFLDMS
EESFVEKYGKELGLQHILYGEVDKPQLGGIHTVIGMCRLLRANKLNAKSVTNSDSDVMQNYFVLADNGS
YKQVCTVVDLLDFLELLRNILKEYGTNSKSKVVTVSIDYHSINFMTWFEDGIIKTCYPQLQ

[0157] SEQ ID NO:9 (nsp-16氨基酸序列)

SAWTCGYNMPELYKVQNCVMEPCNIPNYGVGIALPSGIMMNVAKYTQLCQYLSKTTMCVPHNMVRMHFG
AGSDKGVAPGSTVLKQWLPEGTLLVDNDIVDYVSDAHVSVLSDCNKYKTEHKFDLVISDMYTDNDSKRK
HEGVIANNNGNDDFIYLLSSFLRNNNLAQGGSFAVKVTETSWEVLYDIAQDCAWWTMFCATAVNASSEAF
LVGVNYLGASEKEVKVKGKTLHANYIFWRNCNYLQTSAYSIFDVAKFDLRLKATPVVNLKTEQKTDLVFN
LIKCGKLLVRDVGNTSFTSDSFVCTM

[0159] 降低的病原性

[0160] 本发明的活的减毒冠状病毒包含变体复制酶基因,其导致该病毒与表达相应野生型基因的冠状病毒相比具有降低的致病性。

[0161] 本文所用的术语“减毒的”是指表现出所述降低的致病性并可以被归类为非毒性的病毒。活的减毒病毒是弱化的复制病毒,其仍然能够刺激免疫应答并产生免疫力但不引起实际的疾病。

[0162] 术语“致病性”在本文中根据其正常含义使用,指病毒在受试者中引起疾病的潜力。通常,冠状病毒的致病性通过测定疾病相关症状(例如打喷嚏,snicking和气管纤毛活动的降低)来确定。

[0163] 术语“降低的致病性”用于描述与相应的野生型冠状病毒相比,冠状病毒的致病性水平是降低的,减轻的(lessened)或减少的(diminished)。

[0164] 在一个实施方案中,本发明的冠状病毒与衍生该病毒的亲本M41-CK病毒或对照冠状病毒相比具有降低的致病性。对照冠状病毒可以是具有已知致病性的冠状病毒,例如表达野生型复制酶蛋白的冠状病毒。

[0165] 可以使用本领域熟知的方法评估冠状病毒的致病性。通常,通过测定用病毒攻击的受试者(例如鸡)中的临床症状来评估致病性。

[0166] 作为说明,可以通过鼻或眼接种在8-24天龄时对鸡进行攻击。可以在感染后3-10天评估与IBV感染相关的临床症状。通常评估以确定冠状病毒(例如IBV)的致病性的临床症状包括喘气、咳嗽、打喷嚏、snicking、抑郁、褶皱的羽毛和气管纤毛活动丧失。

[0167] 与表达野生型复制酶的冠状病毒相比,本发明的变体复制酶当在冠状病毒中表达时可导致临床症状水平降低。

[0168] 例如,表达变体复制酶的冠状病毒可以引起的每只鸟每分钟snick的次数与由表达野生型复制酶的病毒引起的snicks的次数相比少于90%、少于80%、少于70%、少于60%、少于50%、少于40%、少于30%、少于20%或少于10%。

[0169] 表达根据本发明的变体复制酶的冠状病毒可以以使用表达野生型复制酶的病毒感染的鸟群中的次数的少于70%、少于60%、少于50%、少于40%、少于30%，少于20%或少于10%引起哮喘。

[0170] 表达根据本发明的变体复制酶的冠状病毒可以导致气管中纤毛活动是未感染鸟中的气管纤毛活动水平的至少60%、至少70%、至少80%，至少90%或至少95%。

[0171] 表达根据本发明的变体复制酶的冠状病毒可以导致如表2中定义的临床症状，其水平低于表达野生型复制酶的冠状病毒。

[0172] 表2基于临床症状的IBV严重性限度：

Snicking	IBV特异性：轻度(如果它们开始发生，N. B. 呼吸道症状自2-3dpi开始显现，并可以持续至多达7d)。
鼻分泌物	
眼睛流泪	
眶下窦肿胀	
罗音(气管或支气管区振动)	轻度，如果超过2d则增大到中度
弯腰姿势/抑郁	
蓬松的羽毛	
饮食较少	
饮用过量：通过流体填充的嗉囊或测量的水摄入显示	IBV特异性：轻度，如果超过24h则增大到中度最大为2d。如果仍然过量饮用，则通过计划1方法杀死。
较少活动但仍逃避捕捉	
体重损失	
不吃不喝	
鸟独自坐着且不逃避捕捉	轻度，如果超过1d则增大到中度。
严重呼吸窘迫：过度喘气	
总共7d的Snicking和/或罗音	中度：鸟在终点。通过计划1方法杀死。
发现死亡	
	严重：向项目许可持有人报告。 待进行全面尸检。

[0174] 当在冠状病毒中表达时，本发明的变体复制酶可以引起病毒在卵内以非致病性水平复制。

[0175] 在开发卵内施用于鸡胚的疫苗时，必须注意两点：母体抗体对疫苗的作用和疫苗对胚胎的作用。已知母体抗体干扰主动免疫。例如，当对具有母体抗体的肉鸡施用时，具有温和病毒株的疫苗不诱导保护性抗体水平，因为这些病毒株被母体抗体库中和。

[0176] 因此，病毒颗粒必须在复制和繁殖时足够高效，以确保其不被母体衍生的针对病毒的抗体中和。母体衍生的抗体是有效抗体的有限集合，其随着鸡龄而减少，并且以这种方式的病毒的中和不等同于胚胎/雏鸡建立的长期免疫力。为了形成针对病毒的长期免疫力，胚胎和孵化的鸡必须形成不同于母体衍生抗体的效果的合适的保护性免疫应答。

[0177] 为了有用于卵内接种，病毒还必须不能以导致其对胚胎致病性的水平复制和繁殖。

[0178] 就胚胎而言，降低的致病性可以意味着与相应的野生型对照冠状病毒相比，冠状病毒引起孵化率的较少降低。因此，当与对照冠状病毒相比时，本发明上下文中的术语“对胚胎无致病性”可以意指“不引起降低的孵化率”。

[0179] 可以使用本领域已知的方法鉴定合适的变体复制酶。例如，可以在具有或不具有母体衍生抗体的胚胎的卵内接种(即其中所述产卵者已针对或未针对IBV接种)之后，进行比较攻击实验。

[0180] 如果变体复制酶使得病毒以过高的水平繁殖,则胚胎不会孵化或在孵化后不存活(即病毒对胚胎是致病的)。对胚胎致病的病毒可以杀死胚胎。

[0181] 如果变体复制酶导致病毒复制和繁殖的极大地减少,则病毒将被母体衍生的抗体中和。随后用IBV攻击雏鸡将导致临床症状(例如哮喘,snicking,纤毛活动丧失)的发展和受攻击的雏鸡中的疾病发作;因为它将不能形成针对该病毒的有效免疫力。

[0182] 变体

[0183] 如本文所使用的,术语“变体”与“突变体”同义,并指与相应的野生型序列相比不同的核酸或氨基酸序列。

[0184] 变体/突变序列可以天然产生,或可以人工创造(例如通过定点诱变)。突变体可以与野生型序列的相应部分具有至少70、80、90、95、98或99%的序列同一性。突变体可以在野生型序列的相应部分上具有少于20、10、5、4、3、2或1个突变。

[0185] 术语“野生型”用于意指具有分别与天然基因或蛋白质(即病毒基因或蛋白质)相同的核苷酸或氨基酸序列的基因或蛋白质。

[0186] 同一性比较可以通过肉眼进行,或者更通常地借助于容易获得的序列比对程序进行。这些商业上可获得的计算机程序可以计算两条或多条序列之间的%同一性。用于进行此类比对的合适的计算机程序是GCG Wisconsin Bestfit软件包(威斯康星大学,U.S.A.; Devereux等,1984,Nucleic Acids Research12:387)。可以执行序列比对的其他软件的示例包括但不限于BLAST软件包(参见Ausubel等,1999ibid-第18章)、FASTA(Atschul等,1990,J.Mol.Biol.,403-410)和GENEWORKS比对工具套件、ClustalX(参见Larkin等(2007)Clustal W and Clustal X version 2.0.Bioinformatics,23:2947-2948)。BLAST和FASTA都可用于离线和在线搜索(参见Ausubel等,1999ibid,第7-58至7-60页)。然而,对于一些应用,优先使用GCG Bestfit程序。一种称为BLAST 2Sequences的新工具也可用于比对蛋白质和核苷酸序列(参见FEMS Microbiol Lett 1999 174 (2) :247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177 (1) :187-8和tatiana@ncbi.nlm.nih.gov)。

[0187] 序列可以具有氨基酸残基的一个或多个缺失、插入或取代,其产生沉默变化并导致功能上等同的分子。可以基于残基的极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性和/或两亲性性质的相似性有意地进行氨基酸取代,只要保留活性即可。例如,带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸;带正电荷的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸;具有相似亲水性值的不带电极性头部基团的氨基酸包括亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甘氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。

[0188] 可以例如根据下表进行保守性取代。第二列中相同栏(block)中的氨基酸,且优选在第三列中的同一行中的氨基酸可以彼此取代:

[0189]

脂肪族	非极性	G A P
		I L V
	极性-不带电	C S T M
		N Q
芳香族	极性-带电	D E
		K R
芳香族		H F W Y

[0190] 本发明的冠状病毒可以包含变体复制酶基因,其编码与SEQ ID NO:6,7,8或9中任一个相比包含突变的蛋白,当在冠状病毒中表达时,导致病毒与表达相应野生型复制酶的冠状病毒相比具有减少的致病性。

[0191] 变体复制酶基因可以编码在nsp-10,nsp-14,nsp-15和nsp-16的任意组合中包含至少一个或多个氨基酸突变的蛋白。

[0192] 本发明的冠状病毒的变体复制酶基因可以编码蛋白,该蛋白质包含图10中呈现的M41 mod序列中所定义的突变。

[0193] 本发明的冠状病毒的变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含选自下列的一个或多个氨基酸突变:

[0194] 在SEQ ID NO:6第85位的Pro到Leu,

[0195] 在SEQ ID NO:7第393位的Val到Leu;

[0196] 在SEQ ID NO:8第183位的Leu到Ile;

[0197] 在SEQ ID NO:9第209位的Val到Ile。

[0198] 本发明的冠状病毒的变体复制酶基因可以编码不包含nsp-2,nsp-3,nsp-6或nsp-13中的突变的蛋白。

[0199] 本发明的冠状病毒的变异体复制酶基因可以编码不包含nsp10中的突变的蛋白,其对应于由Ammayappan等报道的nsp10基因中核苷酸位置12,008处的突变所引起的苏氨酸至异亮氨酸的突变(Arch Virol (2009) 154: 495-499)。

[0200] Ammayappan等(如上文)报道了负责IBV病毒株Arkansas DPI的减毒的序列变化的鉴定。该研究在含胚卵中的病毒的多次传代(约100代)后,鉴定出多种IBV蛋白中的17个氨基酸变化。没有研究减毒病毒(Ark DPI 101)是否能够在母体衍生的针对卵内病毒的抗体的存在下复制,而对胚胎是致病性的。鉴于该病毒是通过在SPF含胚卵中多次传代产生的(与用于经典IBV疫苗的相似方法学),可能该病毒对胚胎是致病性的。如果母鸡用相似的血清型接种,则病毒也可能对母体衍生的抗体敏感。

[0201] 本发明的冠状病毒的变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含上文列举的一个或多个氨基酸突变的任何组合。

[0202] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:6第85位的Pro到Leu的氨基酸突变。

[0203] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:7第393位的Val到Leu的氨基

酸突变。

[0204] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:8第183位的Leu到I1e的氨基酸突变。

[0205] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:9第209位的Val到I1e的氨基酸突变。

[0206] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:6第85位的Pro到Leu和在SEQ ID NO:7第393位的Val到Leu的氨基酸突变。

[0207] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:6第85位的Pro到Leu,在SEQ ID NO:8第183位的Leu到I1e的氨基酸突变。

[0208] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:6第85位的Pro到Leu和在SEQ ID NO:9第209位的Val到I1e的氨基酸突变。

[0209] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:7第393位的Val到Leu和在SEQ ID NO:8第183位的Leu到I1e的氨基酸突变。

[0210] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:7第393位的Val到Leu和在SEQ ID NO:9第209位的Val到I1e的氨基酸突变。

[0211] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:8第183位的Leu到I1e和在SEQ ID NO:9第209位的Val到I1e的氨基酸突变。

[0212] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:6第85位的Pro到Leu,在SEQ ID NO:7第393位的Val到Leu,和在SEQ ID NO:8第183位的Leu到I1e的氨基酸突变。

[0213] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:6第85位的Pro到Leu,在SEQ ID NO:8第183位的Leu到I1e,和在SEQ ID NO:9第209位的Val到I1e的氨基酸突变。

[0214] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:6第85位的Pro到Leu,在SEQ ID NO:7第393位的Val到Leu,和在SEQ ID NO:9第209位的Val到I1e的氨基酸突变。

[0215] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:7第393位的Val到Leu,在SEQ ID NO:8第183位的Leu到I1e,和在SEQ ID NO:9第209位的Val到I1e的氨基酸突变。

[0216] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:6第85位的Pro到Leu,在SEQ ID NO:7第393位的Val到Leu,在SEQ ID NO:8第183位的Leu到I1e,和在SEQ ID NO:9第209位的Val到I1e的氨基酸突变。

[0217] 变体复制酶基因也可以在核苷酸水平上定义。

[0218] 例如,本发明的冠状病毒的变体复制酶基因的核苷酸序列可以包含选自下列区域中的一个或多个核苷酸取代:SEQ ID NO:1的11884-12318、16938-18500、18501-19514和19515-20423。

[0219] 例如,本发明冠状病毒的变体复制酶基因的核苷酸序列与示于SEQ ID NO:1的序列相比,可以包含一个或多个选自下列的核苷酸取代:

[0220] 在核苷酸第12137位的C到T;

[0221] 在核苷酸第18114位的G到C;

[0222] 在核苷酸第19047位的T到A;和

[0223] 在核苷酸第20139位的G到A。

[0224] 如本文所用,术语“取代”与术语突变同义,并且意指指定位置处的核苷酸不同于

野生型核苷酸序列的核苷酸。

[0225] 与示于SEQ ID NO:1的序列相比,核苷酸序列可以包括选自以下列中的核苷酸取代的任何组合:

- [0226] 在核苷酸第12137位的C到T;
- [0227] 在核苷酸第18114位的G到C;
- [0228] 在核苷酸第19047位的T到A;和
- [0229] 在核苷酸第20139位的G到A。
- [0230] 核苷酸序列可以包含取代C12137T。
- [0231] 核苷酸序列可以包含取代G18114C。
- [0232] 核苷酸序列可以包含取代T19047A。
- [0233] 核苷酸序列可以包含取代G20139A。
- [0234] 核苷酸序列可以包含取代C12137T和G18114C。
- [0235] 核苷酸序列可以包含取代C12137T和T19047A。
- [0236] 核苷酸序列可以包含取代C12137T和G20139A。
- [0237] 核苷酸序列可以包含取代G18114C和T19047A。
- [0238] 核苷酸序列可以包含取代G18114C和G20139A。
- [0239] 核苷酸序列可以包含取代T19047A和G20139A。
- [0240] 核苷酸序列可以包含取代C12137T、G18114C和T19047A。
- [0241] 核苷酸序列可以包含取代C12137T、T19047A和G20139A。
- [0242] 核苷酸序列可以包含取代C12137T、G18114C和G20139A。
- [0243] 核苷酸序列可以包含取代G18114C、T19047A和G20139A。
- [0244] 核苷酸序列可以包含取代C12137T、G18114C、T19047A和G20139A。
- [0245] 核苷酸序列可以不包含对应于Ammayappan等报道的C12008T取代的取代(如上)。
- [0246] 核苷酸序列可以是天然的、合成的或重组的。其可以是双链或单链,其可以是DNA或RNA或其组合。其可以是例如cDNA、PCR产物、基因组序列或mRNA。
- [0247] 核苷酸序列可以是经密码子优化的,用于在所选择的宿主/宿主细胞中生产。
- [0248] 其可以是分离的,或作为质粒、病毒或宿主细胞的一部分。
- [0249] 质粒
- [0250] 质粒是与染色体DNA分开的染色体外DNA分子,其能够独立于染色体DNA复制。它们通常是环状和双链的。
- [0251] 质粒或载体(如它们有时候被称为的)可用于在宿主细胞中表达蛋白。例如,为了表达该蛋白,可以用能够编码特定蛋白的质粒转染细菌宿主细胞。该术语还包括能够容纳较长部分的DNA的酵母人工染色体和细菌人工染色体。
- [0252] 本发明的质粒包含能够编码复制酶蛋白的确定区域的核苷酸序列。其还可以包含一个或多个另外的冠状病毒核苷酸序列或能够编码一种或多种其它冠状病毒蛋白例如S基因和/或基因3的核苷酸序列。
- [0253] 质粒还可以包含抗性标志物,例如来自大肠杆菌的鸟嘌呤黄嘌呤磷酸核糖基转移酶基因(gpt),其在黄嘌呤和次黄嘌呤的存在下赋予对霉酚酸(MPA)的抗性,并且由痘苗病毒P7.5早期/晚期启动子控制。

[0254] 重组疫苗病毒

[0255] 本发明还涉及包含如本文定义的变体复制酶基因的重组痘苗病毒(rVV)。

[0256] 可以使用基于反向遗传学系统的痘苗-病毒来制备重组痘苗病毒(rVV)。

[0257] 在这方面,本发明还提供了通过以下方法制备病毒颗粒的方法,其通过:

[0258] (i) 将如前述部分所述的质粒转染至宿主细胞;

[0259] (ii) 用包含具有复制酶基因的冠状病毒株的基因组的重组病毒感染

[0260] 染宿主细胞;

[0261] (iii) 允许在质粒中的复制酶基因序列和重组病毒基因组中的相应

[0262] 序列之间发生同源重组,以产生修饰的复制酶基因;

[0263] (iv) 选择包含所述修饰的复制酶基因的重组病毒。

[0264] 术语“修饰的复制酶基因”是指复制酶基因,其包含如本文所述与本发明第一方面相关的变体复制酶基因。具体地,该术语是指衍生自野生型复制酶基因,但包含导致其编码如本文定义的变体复制酶蛋白的核苷酸序列的基因。

[0265] 重组可以涉及全部或部分复制酶基因。例如,重组可以涉及编码nsp-10、nsp-14、nsp-15和/或nsp-16的任何组合的核苷酸序列。重组可涉及核苷酸序列,其编码如上定义的氨基酸突变或包含如上定义的核苷酸取代。

[0266] 冠状病毒株的基因组可缺少复制酶蛋白的部分,其对应于由质粒提供的部分,从而通过由质粒提供的核苷酸序列的插入来形成修饰的蛋白质。

[0267] 重组病毒是适于允许其基因组与质粒之间同源重组的病毒。痘苗病毒是特别适合的,因为同源重组常规地用于痘苗病毒基因组的序列插入和缺失。

[0268] 上述方法任选地包括以下步骤:

[0269] (v) 回收重组冠状病毒,其包含来自步骤(iv)的重组病毒的DNA中的修饰的复制酶基因。

[0270] 用于回收重组冠状病毒(例如重组IBV)的方法是本领域已知的(参见Britton等(2005)参见第24页;和PCT/GB2010/001293)。

[0271] 例如,来自步骤(iv)的重组病毒的DNA可以插入质粒中并用于转染表达胞质T7 RNA聚合酶的细胞。细胞可以例如用表达T7 RNA聚合酶的禽痘病毒预感染。然后可以例如从生长培养基中分离重组冠状病毒。

[0272] 当质粒插入痘苗病毒基因组时,形成不稳定的中间体。可以例如使用质粒上的抗性标志物来选择包含该质粒的重组体。

[0273] 然后可以通过例如PCR和测序验证阳性重组体含有修饰的复制酶基因。

[0274] 可以生长(grown up)大量包括修饰的复制酶基因的重组病毒,例如重组痘苗病毒(rVV),并提取DNA以实施步骤(V)。

[0275] 适合的反向遗传学系统是本领域已知的(Casais等(2001)J.Viro175:12359-12369;Casais等(2003)J.Viro1.77:9084-9089;Britton等(2005)J.Virological Methods 123:203-211;Armesto等(2008)Methods in Molecular Biology 454:255-273)。

[0276] 细胞

[0277] 冠状病毒可用于感染细胞。

[0278] 例如,可以通过本领域已知的方法从上清液中收获冠状病毒颗粒,并任选地纯

化。

[0279] 细胞可用于产生冠状病毒颗粒。

[0280] 因此,本发明还提供了用于生产冠状病毒的方法,其包括以下步骤:

[0281] (i) 用根据本发明的冠状病毒感染细胞;

[0282] (ii) 使所述病毒在所述细胞中复制;和

[0283] (iii) 收获后代病毒。

[0284] 本发明还提供了能够使用反向遗传学系统产生根据本发明的冠状病毒的细胞。例如,细胞可以包含重组病毒基因组,其包含能够编码本发明的复制酶基因的核苷酸序列。

[0285] 细胞可以能够产生含有复制酶基因的重组体重组病毒(例如疫苗病毒)。

[0286] 或者,细胞可以能够通过反向遗传学系统产生重组冠状病毒。细胞可以表达或诱导表达T7聚合酶以拯救(rescue)重组病毒颗粒。

[0287] 疫苗

[0288] 冠状病毒可用于产生疫苗。疫苗可以通过本发明的冠状病毒的活的减毒形式,并且还可以包含药学上可接受的载体。如本文所定义,适用于本发明的“药学上可接受的载体”是本领域技术人员熟知的。此类载体包括但不限于水、盐水、缓冲盐水、磷酸盐缓冲液、醇/水溶液、乳液或悬浮液。可以根据常规技术加入其它常规使用的稀释剂和赋形剂。此类载体可以包括乙醇、多元醇及其适合的混合物、植物油和可注射的有机酯。也可以使用缓冲剂和pH调节剂。缓冲剂包括但不限于由有机酸或碱制备的盐。代表性的缓冲剂包括但不限于有机酸盐,例如柠檬酸的盐,例如柠檬酸盐、抗坏血酸、葡萄糖酸、组氨酸-He1、碳酸、酒石酸、琥珀酸、乙酸或邻苯二甲酸、Tris、盐酸三甲铵,或磷酸盐缓冲液。胃肠外载体可包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、右旋糖、海藻糖、蔗糖,和氯化钠、乳酸林格氏液或不挥发性油。静脉内载体可以包括流体和营养补充剂、电解质补充剂,例如基于林格氏右旋糖等的那些。也可以在药物载体中提供防腐剂和其它添加剂,例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂(例如EDTA)、惰性气体等。本发明不受载体的选择的限制。从上述组分制备这些药学上可接受的组合物,具有合适的pH等渗性、稳定性和其它常规特征在本领域技术范围内。例如参见文章,诸如Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed, Lippincott Williams&Wilkins, pub!., 2000; 和The Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4.sup.th edit., eds. R.C. Rowe等, APhA Publications, 2003。

[0289] 本发明的疫苗将以“治疗有效量”施用,其是指当施用于受试者或患者时足以实现有益或期望结果的活性成分(例如根据本发明的试剂)的量。有效量可以一次或多次施用,应用(applications)或剂量施用(dosages)。根据本发明的组合物的治疗有效量可以容易地由本领域普通技术人员确定。在本发明的上下文中,“治疗有效量”是一个或多个与传染性支气管炎相关的参数中产生客观测量的变化的量,其足以产生有益或期望结果。可以在一次或多次施用施用有效量。为了本发明的目的,药物,化合物或药物组合物的有效量是足以降低传染性支气管炎发病率的量。如本文所用,术语“治疗性”涵盖疾病、病患或病症治疗的全部范围(full spectrum)本发明的“治疗剂”可以以预防(prophylactic)或预防(preventive)的方式(包括整合在旨在靶向可被鉴定为有风险的动物的程序中(药物遗传学))起作用;或者以本质上改善或治愈的方式;或可以起到减缓所治疗的疾病或病症的至少一种症状的进展的速率或程度的作用。

[0290] 本发明还涉及产生此类疫苗的方法,其包含用病毒颗粒感染细胞(例如Vero细胞)的步骤,所述病毒颗粒包含定义于与本发明第一方面有关的复制酶蛋白。

[0291] 接种方法

[0292] 本发明的冠状病毒可用于治疗和/或预防疾病。

[0293] “治疗”意指将疫苗施用于患有既存疾病的受试者以减轻,降低或改善与疾病相关的至少一种症状,和/或减缓,降低或阻断疾病的进展。

[0294] “预防”意指将疫苗施用于尚未感染疾病,和/或未显示疾病的任何症状的受试者,以预防或削弱疾病(例如感染)的起因,或者减少或预防至少一种与疾病相关的症状的发展。

[0295] 疾病可以是由冠状病毒引起的任何疾病,例如人类的呼吸疾病和/或胃肠炎,以及其他动物的肝炎、胃肠炎、脑炎或呼吸道疾病。

[0296] 疾病可以是传染性支气管炎(IB);猪流行性腹泻;传染性胃肠炎;小鼠肝炎病毒;猪血凝性脑脊髓炎;严重急性呼吸综合征(SARS);或蓝冠病。

[0297] 疾病可以是传染性支气管炎。

[0298] 疫苗可以施用于孵化的雏鸡或鸡,例如通过滴眼或鼻内施用。虽然准确,但这些方法例如对于大型肉鸡群体可以是昂贵的。替代方案包括施用至饮用水的喷雾接种(spray inoculation),但是使用这种方法难以确保均匀的疫苗应用。

[0299] 疫苗可以适于其施用的形式提供,例如用于眼内使用的滴眼剂。

[0300] 疫苗可以通过卵内接种施用,例如通过含胚卵注射。卵内疫苗接种具有提供对疾病的早期阶段抗性的优点。与通过饮用水的喷雾接种和施用不同,其还便于每个受试者施用均匀剂量。

[0301] 疫苗可以施用于卵的任何合适的区室(compartment),包括尿囊液、卵黄囊、羊膜、气囊或胚胎。它可以在壳(气室)膜和绒毛尿囊膜下施用。

[0302] 通常在胚胎发育的晚期期间,通常在孵化期的最后四分之一期间(例如孵化前3-4天)将疫苗注射到含胚卵中。在鸡中,疫苗可在21天孵化期的第15-19天之间(例如在第17或18天)施用。

[0303] 该过程可以使用机器人注射过程自动化,例如在W0 2004/078203中描述的那些。

[0304] 疫苗可以与一种或多种其他疫苗一起施用,例如用于其它疾病的疫苗,例如新城疫病毒(Newcastledisease virus)(NDV)。本发明还提供了包含根据本发明的疫苗以及一种或多种其它疫苗的疫苗组合物。本发明还提供了试剂盒,其包含根据本发明的疫苗以及一种或多种用于单独,序贯或同时施用的其它疫苗。

[0305] 本发明的疫苗或疫苗组合物可用于治疗人,动物或禽类受试者。例如,受试者可以是雏鸡,鸡或小鼠(例如实验室小鼠,例如转基因小鼠)。

[0306] 通常,医师或兽医将确定最适合个体受试者或受试者组的实际剂量,并且其将随着具体受试者的年龄,体重和响应而变化。

[0307] 组合物可任选地包含药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或佐剂。药物载体、赋形剂或稀释剂的选择可以根据预期的施用途径和标准药学实践来选择。药物组合物可以包含(或除了)载体、赋形剂或稀释剂、任何合适的粘合剂、润滑剂、悬浮剂、包衣剂、增溶剂,和可以辅助或增加病毒的递送或免疫原性的其它载体剂。

[0308] 现在将通过实施例进一步描述本发明,这些实施例用于帮助本领域普通技术人员实施本发明,而不以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0309] 实施例1:基于M41-CK的IBV反向遗传系统的生成

[0310] 通过用衍生自M41共有序列的合成的cDNA替换先前描述于PCT/GB2010/001293(通过引用并入本文)中的痘苗病毒反向遗传学系统中的Beaudette cDNA,来产生M41-CK全长cDNA。

[0311] 重组痘苗病毒(rVV)的rVV-BeauR-Rep-M41结构中的IBV cDNA描述于Armesto, Cavanagh and Britton (2009) . PLoS ONE 4 (10) : e7384. doi:10.1371/journal.pone.0007384,其由衍生自IBV Beaudette病毒株的复制酶以及来自IBV M41-CK的结构和辅助基因(structural and accessory genes)和3' UTR组成,还进一步用来自IBV M41-CK的相应序列替换Beaudette的5' UTR-Nsp2-Nsp3序列。所得的IBV cDNA由来自M41的5'UTR-Nsp2-Nsp3,来自Beaudette的Nsp4-Nsp16和来自M41的结构和辅助基因和3'UTR组成。该cDNA通过Beaudette Nsp4-Nsp16序列的缺失被进一步修饰。缺失Nsp4-16的所得cDNA在四个进一步的步骤中修饰,其中缺失的Nsps被来自M41-CK的相应序列依次替换,替换cDNA表示为M41-CK Nsp4-8,Nsp9-12,Nsp12-14和最后的Nsp15-16。每个替换cDNA含有在5'端对应于之前插入的M41序列的3'大部分(most)的约500个核苷酸,和在3'端对应于M41 S基因序列的约500个核苷酸。这允许通过同源重组的M41 cDNA序列的插入和连续的(contiguous)M41复制酶基因序列的序贯添加。通过使用本发明人先前描述的瞬时显性选择(TDS)系统(参见PCT/GB2010/001293)的同源重组,加入含有M41衍生的Nsp序列的合成的cDNA。包含对应于M41Nsps-10、-14、-15和-16的序列的M41衍生的cDNA分别在第85、393、183和209位含有修饰的氨基酸,如图10所示。

[0312] 在代表合成的序列的痘苗病毒中产生代表M41-CK基因组的全长cDNA。拯救了两个rIBV,M41-R-6和M41-R-12,并显示以与M41-CK相似的方式生长(图1)。

[0313] 实施例2:确定拯救的M41病毒的致病性

[0314] 使用实施例1中拯救的病毒通过眼部和鼻部接种感染8天龄无特定病原的(SPF)雏鸡,以测试它们的致病性,如通过基于感染后3-7天每天的临床症状,和对感染后第4天和第6天的纤毛活动所观察到的。纤毛活动的丧失是确定IBV的致病性的公认的方法。当与M41-CK相比时,两种M41-R病毒被发现是无致病性的,尽管与未感染的对照雏鸡(图2)相比,它们确实显示出一些临床症状,和一些但不一致(inconsistent)的纤毛活动的丧失。

[0315] 因此,与亲本病毒M41-CK相比,M41-CK的M41-R分子克隆不是致病的。

[0316] 本发明人鉴定了与M41-CK序列相比M41-R中的几个核苷酸差异。这些中的大多数是同义突变,因为核苷酸变化不影响与该序列相关的蛋白的氨基酸序列。然而,在IBV复制酶基因中鉴定出四种非同义突变,其特异于复制酶基因的Nsp-10,Nsp-14,Nsp-15and Nsp-16组分,这些突变导致氨基酸的改变(表3)。

[0317] 表3.在M41-R全长基因组的Nsps中鉴定的非同义突变

复制酶的区域	核苷酸位置	核苷酸突变	氨基酸改变
Nsp10	12137	C→T	Pro→Leu

Nsp14	18114	G→C	Val→Leu
Nsp15	19047	T→A	Leu→Ile
Nsp16	20139	G→A	Val→Ile

[0319] 实施例3:M41-R rIBVs的修复

[0320] 为了确定所鉴定的突变是否负责与M41-R相关的致病性的丧失,修复了Nsp10突变且修复了Nsp-14、-15和-16中的突变,并显示出一与M41-CK相似的方式生长(图9)。因此,发明人利用发明人之前描述的(TDS)系统(参见PCT/GB2010/001293),使用含有正确的核苷酸的合成的cDNA生成了rIBVs、M41R-nsp10rep和M41R-nsp14,15,16rep。

[0321] 如前所述在雏鸡中评估rIBV的致病性。当与M41-R相比时,两种rIBV显示出增加的致病性,但不是用M41-CK观察到的水平(图4和5)。M41R-nsp14,15,16rep比M41R-nsp10rep产生更多的临床症状和更多的纤毛活动减少,总体上这些结果表明与四个Nsps相关的变化似乎影响致病性。

[0322] 为了确定Nsps在致病性中的作用,使用对应于M41R-nsp10rep的全长cDNA以修复Nsps14,15和16中的突变,其利用TDS系统使用含有正确核苷酸的合成的cDNA。

[0323] 产生了以下rIBV:

[0324] M41R-nsp10,15rep—具有Nsp-10和Nsp-15中的突变修复的M41-R

[0325] M41R-nsp10,14,15rep—具有Nsp-10,Nsp-14和Nsp-15中的突变修复的M41-R

[0326] M41R-nsp10,14,16rep—具有Nsp-10,Nsp-14和Nsp-16中的突变修复的M41-R

[0327] M41R-nsp10,15,16rep—具有Nsp-10,Nsp-15和Nsp-16中的突变修复的M41-R

[0328] M41-K-M41-R中所有的四个突变Nsp-10,Nsp-14,Nsp-15和Nsp-16是修复的。

[0329] rIBV显示出以与M41-CK相似的方式生长(图9),并如前所述评估致病性。M41-K(其中所有四种突变已被修复)在感染后4天导致临床症状和100%纤毛活动丧失(完全纤毛停滞)(图6,7和8)。除了M41R-nsp10,15,16rep(其基本上是非致病性的)之外,其他rIBV表现出不同程度的致病性。这些结果证实所有四个Nsps的修复,恢复了M41-R的致病性;再次支持先前的证据,即描述于四个Nsps中的突变涉及减毒的M41-CK。

[0330] 本发明人还生成了rIBV M41R-nsp 10,14rep(nsp 10和nsp 14被修复,nsp15和nsp 16含有突变)和rIBV M41R-nsp 10,16rep(nsp 10和nsp 16被修复,nsp 14和nsp 15含有突变)并评估了这些病毒的致病性。

[0331] rIBV M41R-nsp 10,14rep比M41-K的致病性低,但在感染后第4-6天引起约50%的纤毛停滞。rIBV M41R-nsp 10,16rep几乎无致病性,并且不引起纤毛停滞(参见图11a-c)。

[0332] 因此,与M41-R相关的基因组是用于合理的减毒IBV的潜在骨架基因组。

[0333] 实施例4:用M41-R的接种/攻击研究

[0334] 在研究中测试了候选疫苗病毒,其中受精的鸡卵在18天的胚胎发育中卵内接种,且其中测定接种的卵的孵化率。研究了鸡的临床健康,并在21天龄时用毒性IB M41攻击病毒以每剂 $10^{3.65}$ EID₅₀攻击鸡。

[0335] 在通过疫苗的攻击保护后研究临床症状,并在攻击后5天进行纤毛停滞测试,以研究攻击病毒对纤毛运动的影响和通过疫苗对抗纤毛停滞(纤毛运动的抑制)的保护。

[0336] 商业肉鸡卵的卵内接种

[0337] 实验的设计在表4中给出,且临床结果在表5中给出。用IB M41-R接种的卵的孵化

率良好,且鸡是健康的。在肉鸡中攻击后,IB M41-R保护其免受临床症状(安慰剂:19/19受影响,IB M41-R:3/18受影响和1死亡)。纤毛停滞测试的结果在表6中给出。IB M41-R产生针对纤毛停滞的保护。

[0338] 表4-商业鸡卵的孵化率、安全性、功效研究的设计

处理	处理说明	EID ₅₀ ¹ 每剂	施用 途径	施用 天数	攻击天数 ²	研究 结束	每个处 理的鸡 卵数目
T01	无	NA	NA	NA	NA	NA	30
T02	IB M41-R	10 ⁴	卵内	18天胚 胎发育	在21天 龄, 每组 20只鸡	在26 天龄	30
NTX	盐水	NA	卵内				30

[0340] ¹剂量体积0.1ml,NA,不适用。

[0341] ² 10^{3.65}EID₅₀/每剂量。

[0342] 表5-商业鸡中攻击前后的孵化百分比和临床数据,设计参见表1。

处理	孵化/ 总数	存活/ 总数	攻击前		攻击后	
			死亡/ 总数	症状/ 总数	死亡/ 总数	症状/ 总数
无	28/30	在孵化后直接安乐死用于采血				
IB M41-R	28/30	28/28	1/20	0/19	1/19	3/18 ^{1,7}
盐水	29/30	29/29	1/20	0/19	0/19	19/19 ^{1,2,3,4,5,6,7}

[0344] ¹扰乱的(disturbed)呼吸系统

[0345] ²发出飕飕声(Whizzing)

[0346] ³噪音的改变

[0347] ⁴呼吸困难

[0348] ⁵眶内窦肿胀

[0349] ⁶生长不均

[0350] ⁷弱小

[0351] 表6-攻击后的纤毛停滞测试的结果,设计参见表1。

处理	受保护的/总数	保护百分比
盐水	0/19	0%
IB M41R	5/18	28%

[0354] 无特定病原的(SPF)鸡卵的卵内接种

[0355] 在SPF鸡卵中的研究的设计在表7中给出,并且与使用商业肉鸡的研究的设计相

似,但是IB M41-R的接种剂量更高(10^5 EID₅₀每剂)。

[0356] 结果(表8)显示了IB M41-R孵化的孵化百分比低,40枚中孵化出19枚,且雏鸡弱小。八只雏鸡死亡。攻击剩余的11只鸡,并攻击已用盐水接种的从鸡卵中孵出的雏鸡。

[0357] 在攻击后的纤毛停滞测试中,似乎所有用IB M41-R在卵内接种的鸡都被保护,而没有对照被保护,参见表9。

[0358] 表7.SPF鸡卵中的孵化率、安全性、功效研究的设计

处理	处理说明	EID ₅₀ ¹ 每剂	施用 途径	施用 天数	攻击天数 ²	研究 结束	每个处 理的鸡 卵数目
T01	IB M41-R	10^5	卵内	18天胚 胎发育	在21天龄	在 26 天龄	40
T04	盐水	NA	卵内				40
NTX	NA	NA	NA		NA		10

[0360] ¹剂量体积0.1ml,NA,不适用。

[0361] ²攻击剂量 $10^{3.3}$ EID₅₀在0.2ml中。

[0362] 表8-SPF鸡中攻击前后的孵化百分比和临床数据,设计参见表7。

处理	孵化/ 总数	存活/ 总数	攻击前		攻击后	
			死亡/ 总数	症状/ 总数	死亡/ 总数	症状/ 总数
IB M41-R	19/40	11/40	8/40	弱	0	0
盐水	30/40	30/40	0	-	0	0
NA	9/10	9/10	0	-	-	-

[0364] 表9.攻击后的纤毛停滞测试的结果,设计参见表7。

处理	受保护的/总数	保护百分比
盐水	0/11	0%
IB M41R	11/11	100%

[0366] 总之,IB M41-R在商业卵中是安全的,产生了针对临床症状和一定程度上针对纤毛停滞的保护。

[0367] 在用IB M41 R接种的SPF卵中,孵出相对较少数量的鸡。这可能是由于使用的每个卵 10^5 EID₅₀的IB M41-R。这比之前的具有更高水平孵化率的研究中使用的剂量高10倍。较低的孵化百分比还可以由SPF卵的批次对病毒具有特别高的易感性所引起的,因为在其他研究中胚胎死亡率的水平也高于先前观察到的水平。

[0368] 攻击后,所有孵化后存活的鸡完全针对纤毛停滞受到保护。结论是IB M41-R作为在卵内施用的疫苗具有巨大的潜力。

[0369] 在上述说明书中提及的所有出版物通过引用并入本文。在不脱离本发明的范围和精神的情况下,本发明的所描述的方法和系统的各种修改和变化对于本领域技术人员将是

显而易见的。虽然已经结合具体的优选实施例描述了本发明,但是应当理解,要求保护的本发明不应该不适当限于这些具体实施例。实际上,对于分子生物学,病毒学或相关领域的技术人员来说显而易见的用于实施本发明的所述模式的各种修改旨在以下权利要求的范围内。

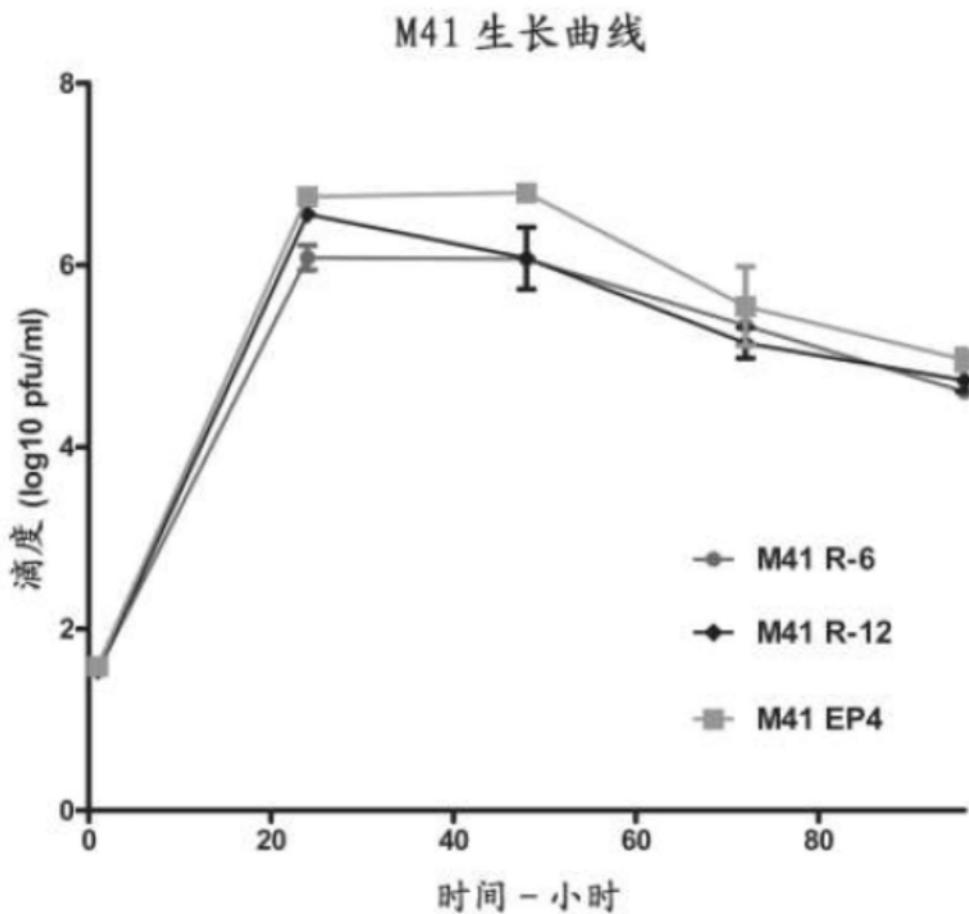


图1

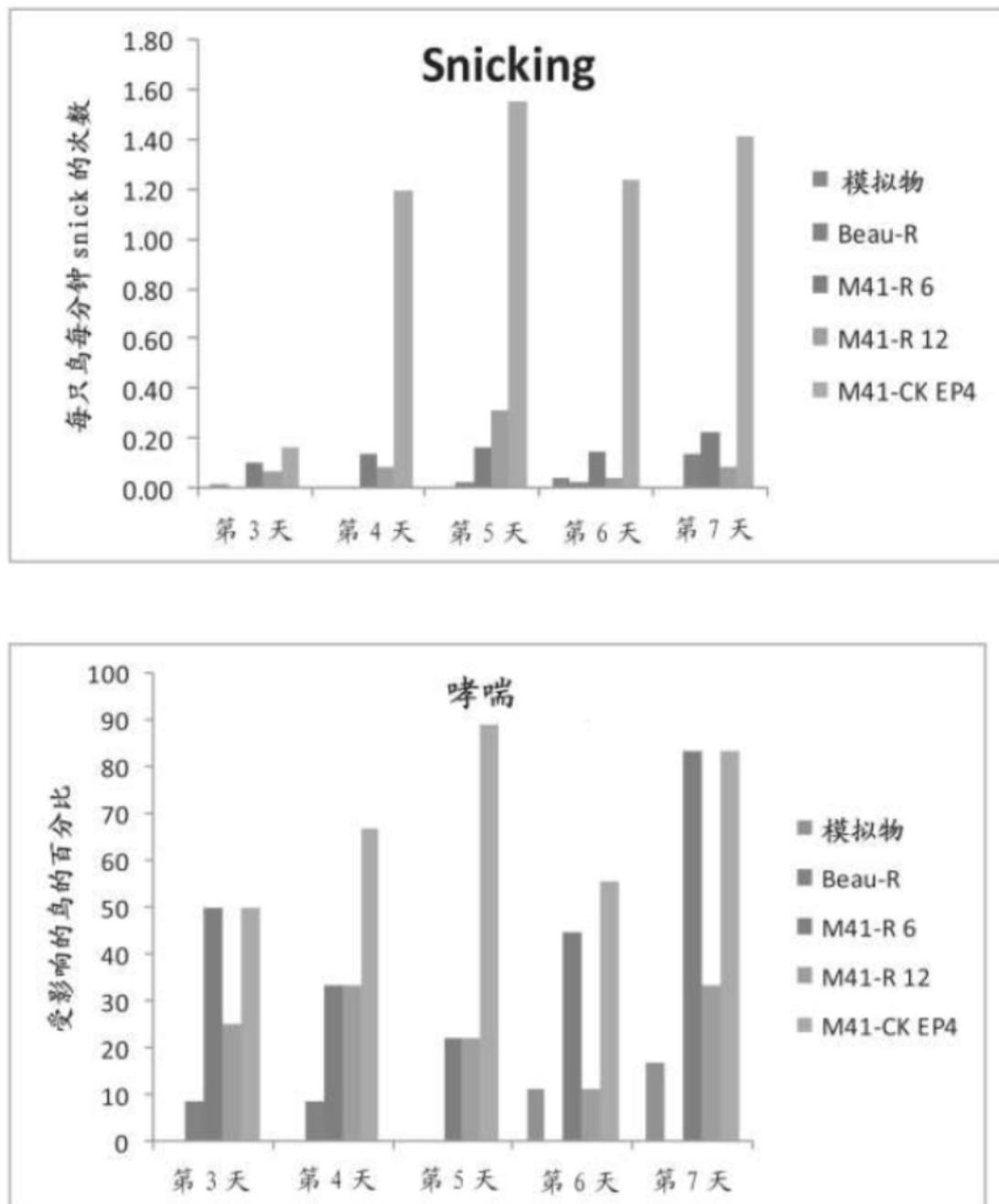


图2

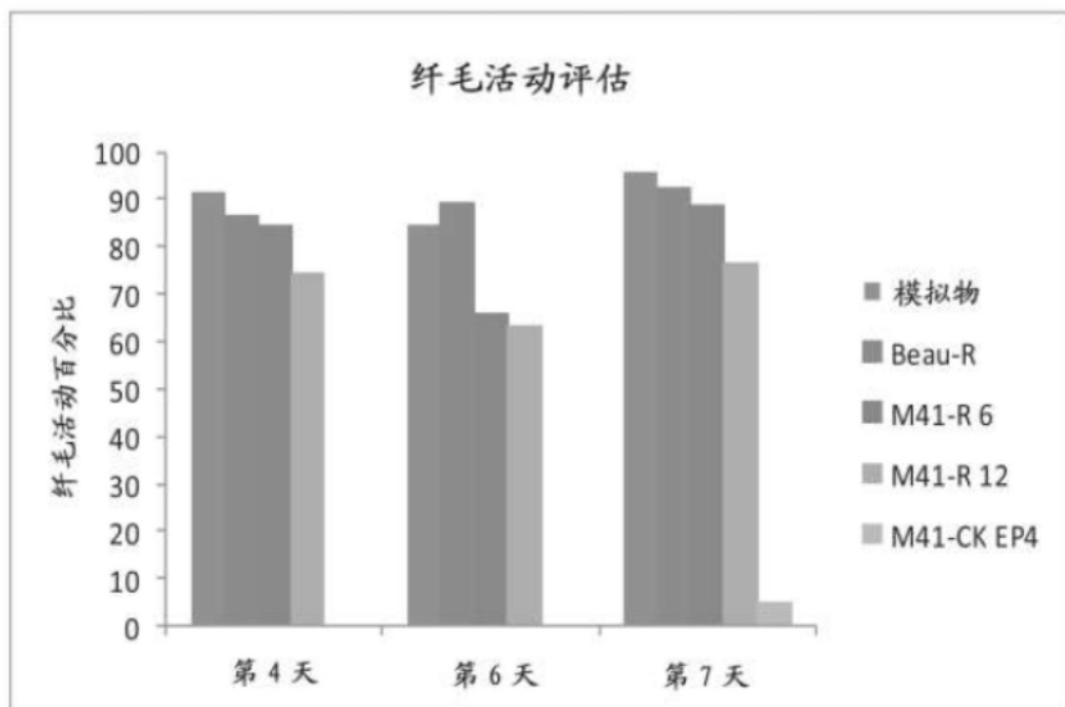


图3

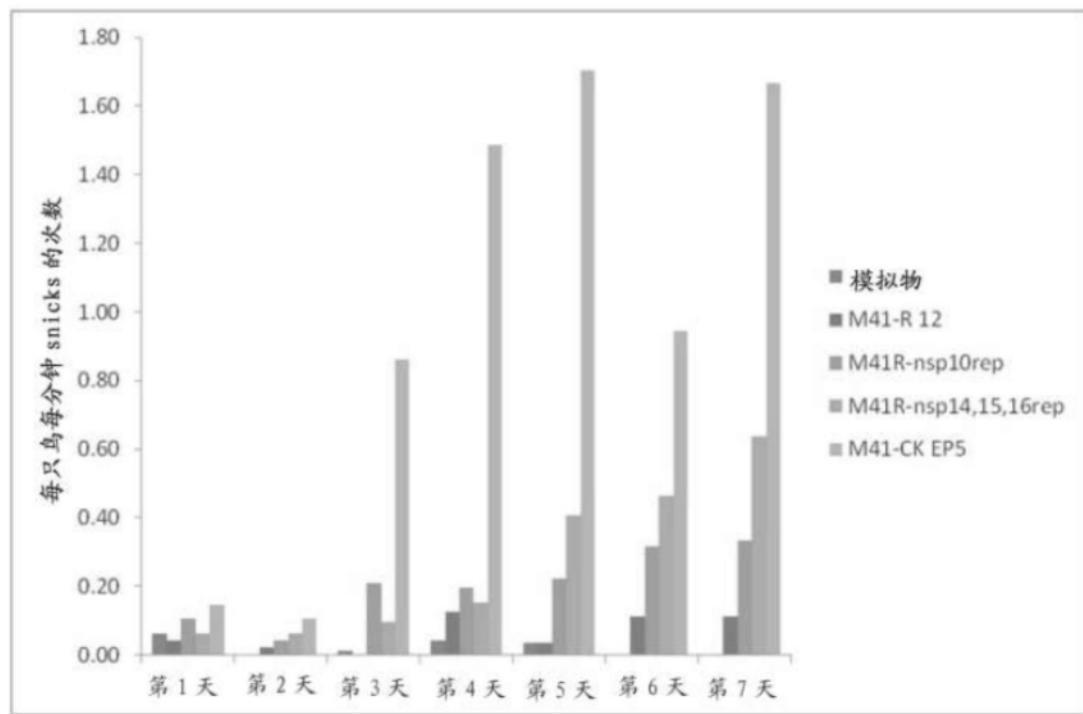


图4

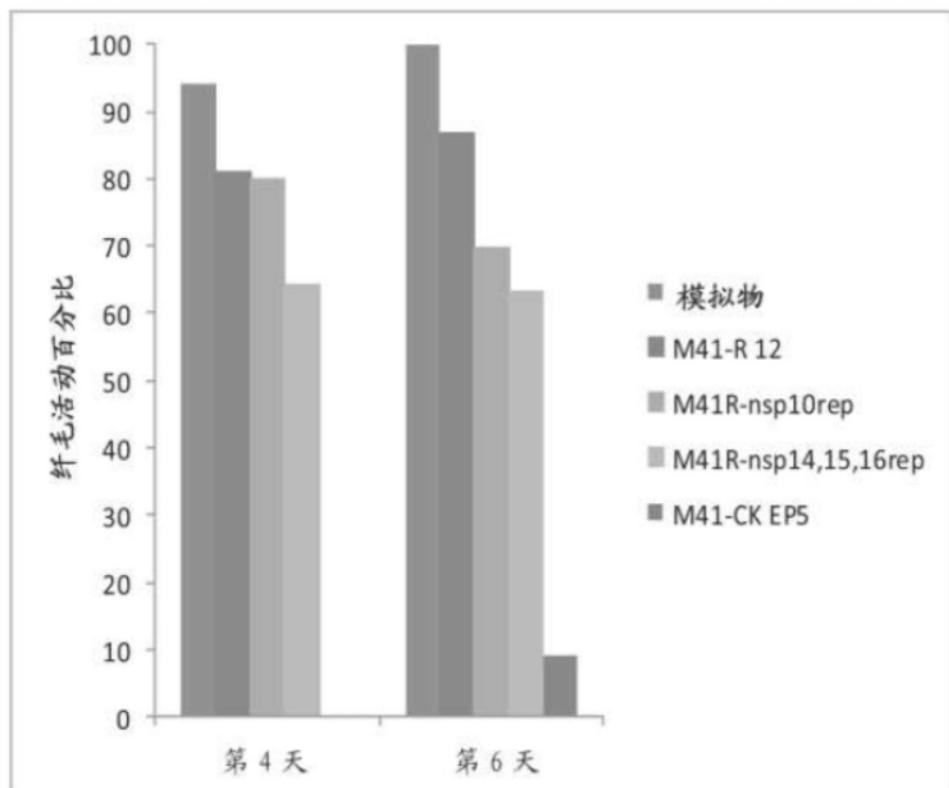


图5

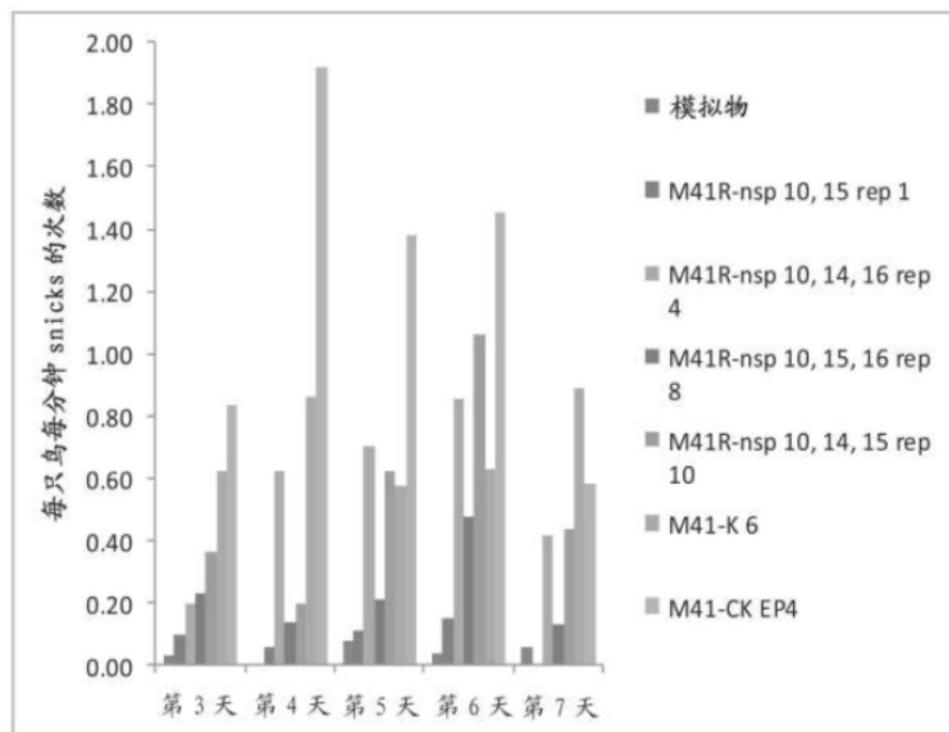


图6

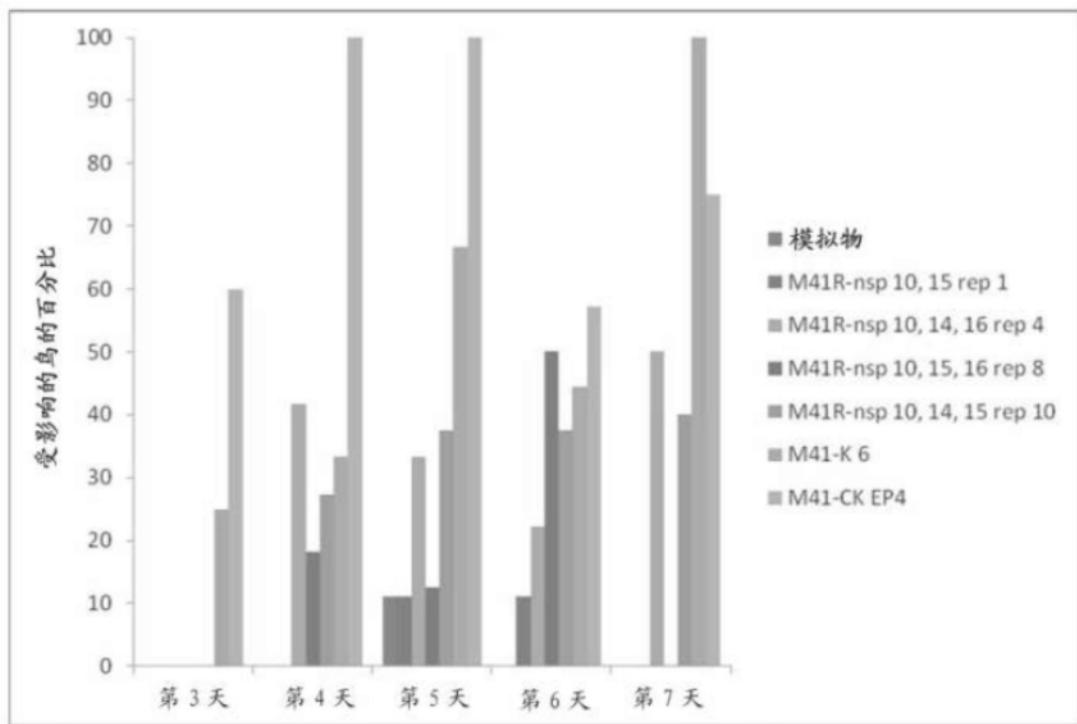


图7

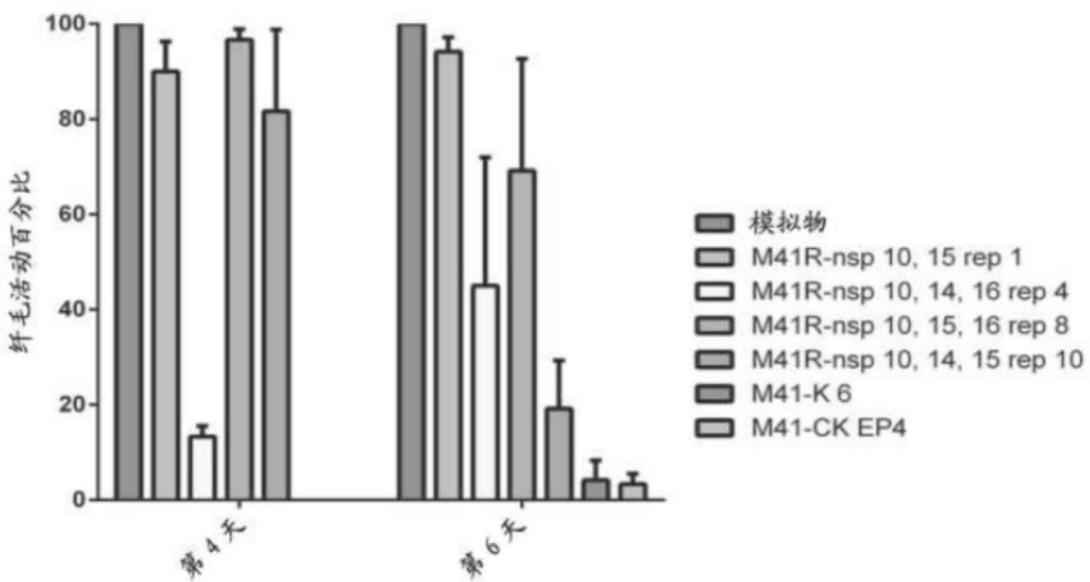


图8

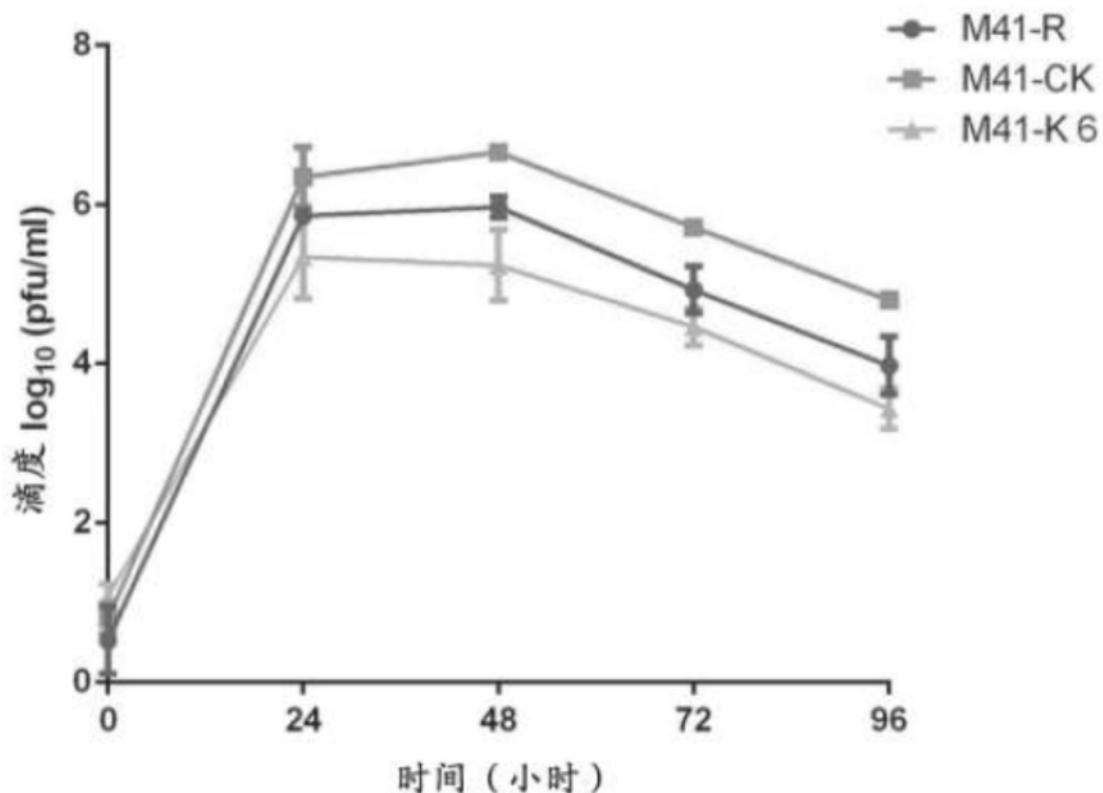


图9A

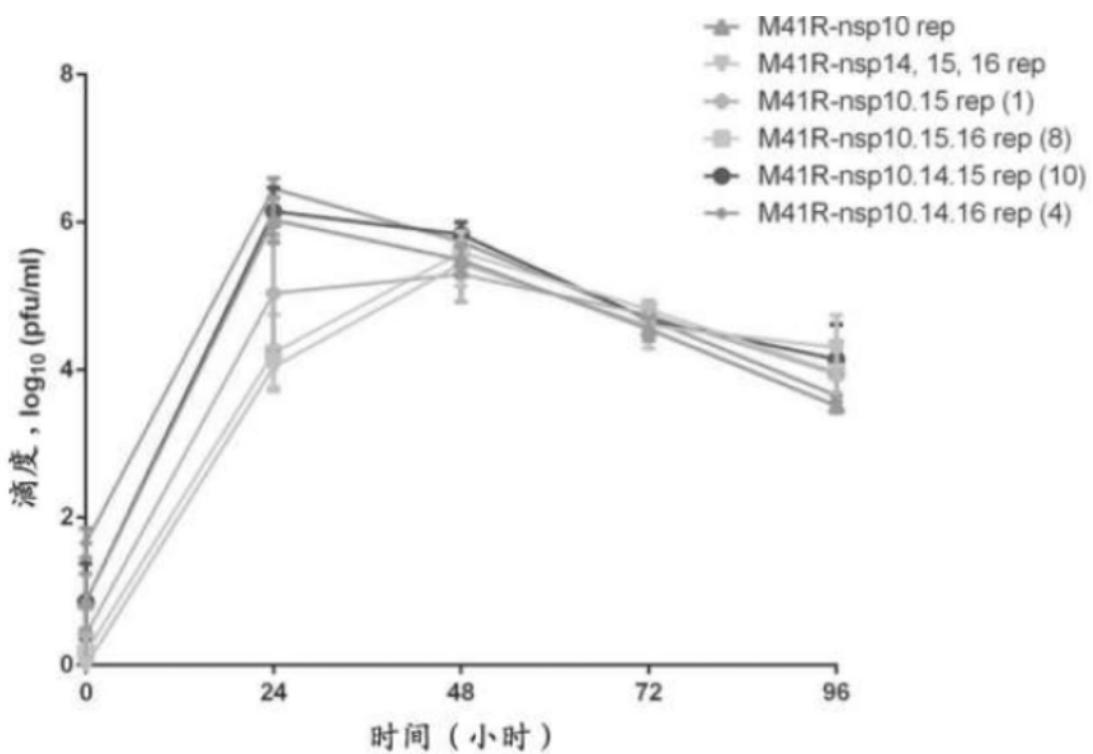


图9B

Nsp10

	* 20		* 40		* 60		* 80
M41_Nsp10:	SKGHETEEVDAVGILSLCSFAVDPADITYCKYVAAGNQPLGNCVKMLTVHNGSGFAITSKPSPTPDQDSYGGASVCLYCRA						
Mod_Nsp10:	SKGHETEEVDAVGILSLCSFAVDPADITYCKYVAAGNQPLGNCVKMLTVHNGSGFAITSKPSPTPDQDSYGGASVCLYCRA						
	* 100		* 120		* 140		
M41_Nsp10:	HIAHGGAGNLGRCQFKGSFVQIPTTEKDPVGFCLRNKVCVQCWIGYGCQCDSLRQPKPSVQ						
Mod_Nsp10:	HIAHGGAGNLGRCQFKGSFVQIPTTEKDPVGFCLRNKVCVQCWIGYGCQCDSLRQPKPSVQ						

Nsp14

	* 20		* 40		* 60		* 80
M41_Nsp14:	GTGLFKICNKEFSGVHPAYAVTICKALAATYKVDELAALVNVEAGSEITYKHLISLLGFKMSVNVEGCHNMFTIRDEAIR						
Mod_Nsp14:	GTGLFKICNKEFSGVHPAYAVTICKALAATYKVDELAALVNVEAGSEITYKHLISLLGFKMSVNVEGCHNMFTIRDEAIR						
	* 100		* 120		* 140		* 160
M41_Nsp14:	NVRGWWGFDWEATHACGINIGINLPFQVGFSTGADFVVTPEGLVDTSIGNNFEPVNSKAPPGEQFNHLRALKSAKPWHV						
Mod_Nsp14:	NVRGWWGFDWEATHACGINIGINLPFQVGFSTGADFVVTPEGLVDTSIGNNFEPVNSKAPPGEQFNHLRALKSAKPWHV						
	* 180		* 200		* 220		* 240
M41_Nsp14:	VRPRIVQMLADNLNCVSDCVVFVITWCNGLELTLLRYFVKIGKDKQVCSGRATTFNSHTQAYACWKHCLGFDFVYNPLLV						
Mod_Nsp14:	VRPRIVQMLADNLNCVSDCVVFVITWCNGLELTLLRYFVKIGKDKQVCSGRATTFNSHTQAYACWKHCLGFDFVYNPLLV						
	* 260		* 280		* 300		* 320
M41_Nsp14:	DIOQWGYSGNLQFNHDLHCNVHGHAVASADAIMTRCLAINNACQDQDVNWDLITYPHIANEDEVNSSCRYLQRMYLNA						
Mod_Nsp14:	DIOQWGYSGNLQFNHDLHCNVHGHAVASADAIMTRCLAINNACQDQDVNWDLITYPHIANEDEVNSSCRYLQRMYLNA						
	* 340		* 360		* 380		* 400
M41_Nsp14:	ALKVNVVYDIGNPKGIKCVRRGDLNFRFYDKNP1VPNVQFYEYDYNQHDKFKADGLCMFWNCNVDCYPDINSI						CRYDTRN
Mod_Nsp14:	ALKVNVVYDIGNPKGIKCVRRGDLNFRFYDKNP1VPNVQFYEYDYNQHDKFKADGLCMFWNCNVDCYPDINSI						CRYDTRN
	* 420		* 440		* 460		* 480
M41_Nsp14:	LSVFNLPGCNGGSILVNHAFHTPKFDRISFRNLKAMPFFYDSSPCETIQLDGVAQDLVSLATKDCITKCNIGGAVCK						
Mod_Nsp14:	LSVFNLPGCNGGSILVNHAFHTPKFDRISFRNLKAMPFFYDSSPCETIQLDGVAQDLVSLATKDCITKCNIGGAVCK						
	* 500		* 520				
M41_Nsp14:	HACMYADFTSYNAAVTAGFTFWVTNNFPYNLWKSFSALQ						
Mod_Nsp14:	HACMYADFTSYNAAVTAGFTFWVTNNFPYNLWKSFSALQ						

图10

Nsp15

	* 30	* 40	* 60	* 80
M41 Nsp15:	SIDNIAYNMYKGGHYDAIAGEMPTIVGDKVVFIDQGVEKAVFTMQTILPTSVAFELYAKRNIRTLPPNNRILKGLGVDV			
Mod Nsp15:	SIDNIAYNMYKGGHYDAIAGEMPTIVGDKVVFIDQGVEKAVFTMQTILPTSVAFELYAKRNIRTLPPNNRILKGLGVDV			
	* 100	* 120	* 140	* 160
M41 Nsp15:	NGFVIWDTINQTPLYRNIVKVCAYTDIEPQNLIVLYDQYQSFIAADNAVLVSTQCYKRYSYVEIPSNLVQNGIPL			
Mod Nsp15:	NGFVIWDTINQTPLYRNIVKVCAYTDIEPQNLIVLYDQYQSFIAADNAVLVSTQCYKRYSYVEIPSNLVQNGIPL			
	* 180	* 200	* 220	* 240
M41 Nsp15:	KDGANLYVYKRVNGAFVTLPTMINTQGRSYEIFEPRSDVERDFLDMSEESFVEKYGKELGLOHILYGEVDKPKQLGGLHTV			
Mod Nsp15:	KDGANLYVYKRVNGAFVTLPTMINTQGRSYEIFEPRSDVERDFLDMSEESFVEKYGKELGLOHILYGEVDKPKQLGGLHTV			
	* 260	* 280	* 300	* 320
M41 Nsp15:	IGMCRLLRANKLNKSVINSDDVMQNYFVLADNGSYKQVCIVVDDLLDDFELLRNILKEYGINKSKVVIVSIDYHSIN			
Mod Nsp15:	IGMCRLLRANKLNKSVINSDDVMQNYFVLADNGSYKQVCIVVDDLLDDFELLRNILKEYGINKSKVVIVSIDYHSIN			
	*			
M41 Nsp15:	FMTWFEDGIIKTCYFQLO			
Mod Nsp15:	FMTWFEDGIIKTCYFQLO			

Nsp16

	* 20	* 40	* 60	* 80
M41 Nsp16:	SAWTCGYNMPPELYKVQNCVMEPCNIPHYGVGIALPSGIMMNVAKYTQLQOYLSKITMCVPHNMKVMHFGAGSDKGVAPGS			
Mod Nsp16:	SAWTCGYNMPPELYKVQNCVMEPCNIPHYGVGIALPSGIMMNVAKYTQLQOYLSKITMCVPHNMKVMHFGAGSDKGVAPGS			
	* 100	* 120	* 140	* 160
M41 Nsp16:	TVLKQWLPEGTLVNDIVDVSADHVSVLSDCNKYKTEHKFDLVISDMDYIDNDSKRKHEGVIANNGNDDVFIYLSSFLR			
Mod Nsp16:	TVLKQWLPEGTLVNDIVDVSADHVSVLSDCNKYKTEHKFDLVISDMDYIDNDSKRKHEGVIANNGNDDVFIYLSSFLR			
	* 180	* 200	* 220	* 240
M41 Nsp16:	NNALALGGSFAVKVIEISWHEVLYDIAQDCAWWIMFCTAVNASSSEAFI	GVNVLGASEKVVKSGKTLRANYIFWRNCNYL		
Mod Nsp16:	NNALALGGSFAVKVIEISWHEVLYDIAQDCAWWIMFCTAVNASSSEAFI	GVNVLGASEKVVKSGKTLRANYIFWRNCNYL		
	* 260	* 280	* 300	
M41 Nsp16:	QTSAYS1FDVAKFDLRLKATPVVNLKTEQKTDLVFNLIKCGKLLVRDVGNNTSFISDSFVCIM			
Mod Nsp16:	QTSAYS1FDVAKFDLRLKATPVVNLKTEQKTDLVFNLIKCGKLLVRDVGNNTSFISDSFVCIM			

图10(续)

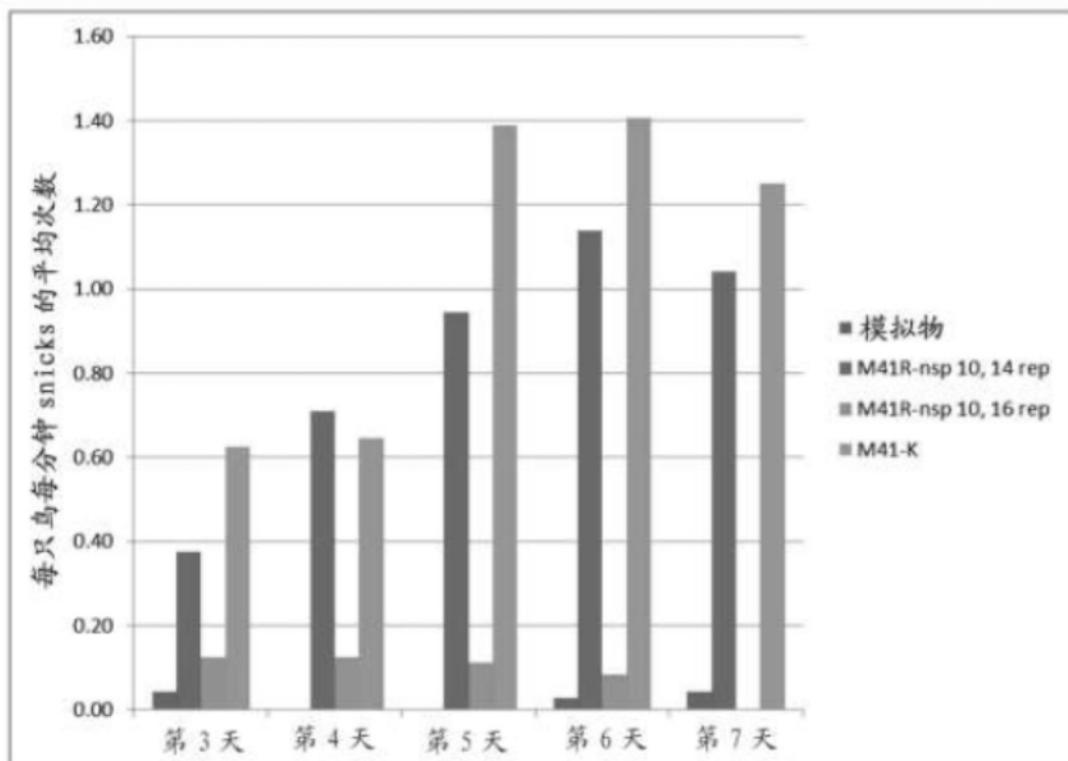


图11A

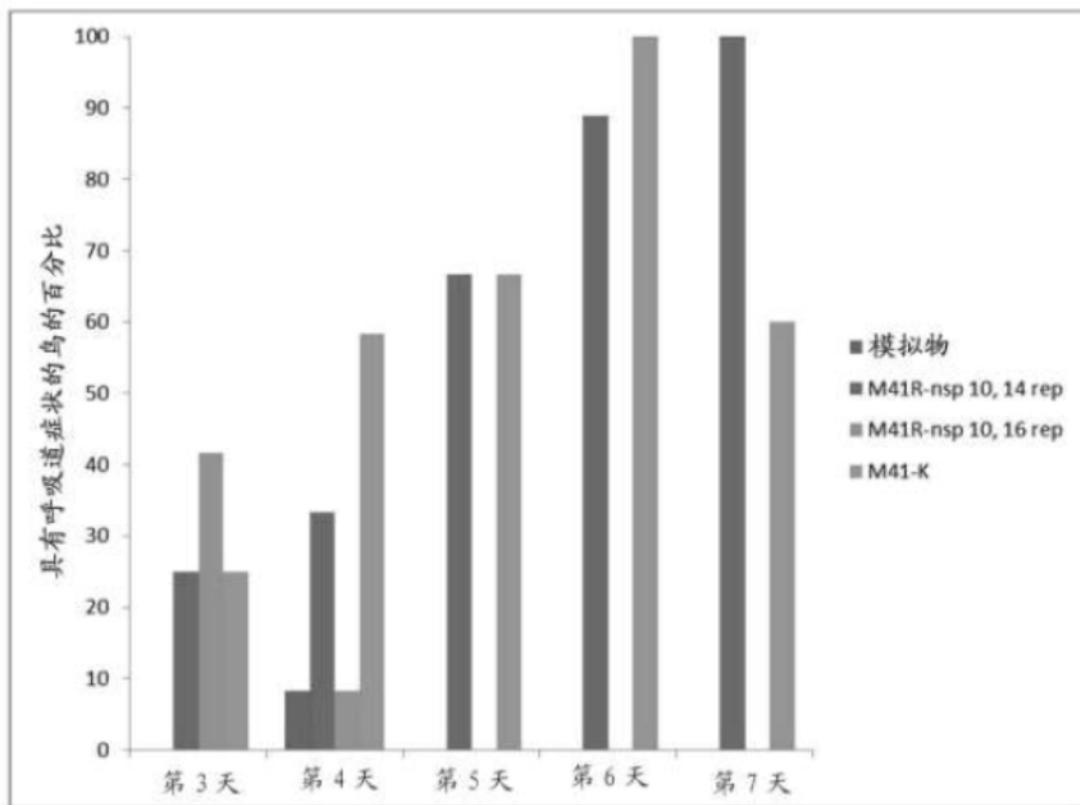


图11B

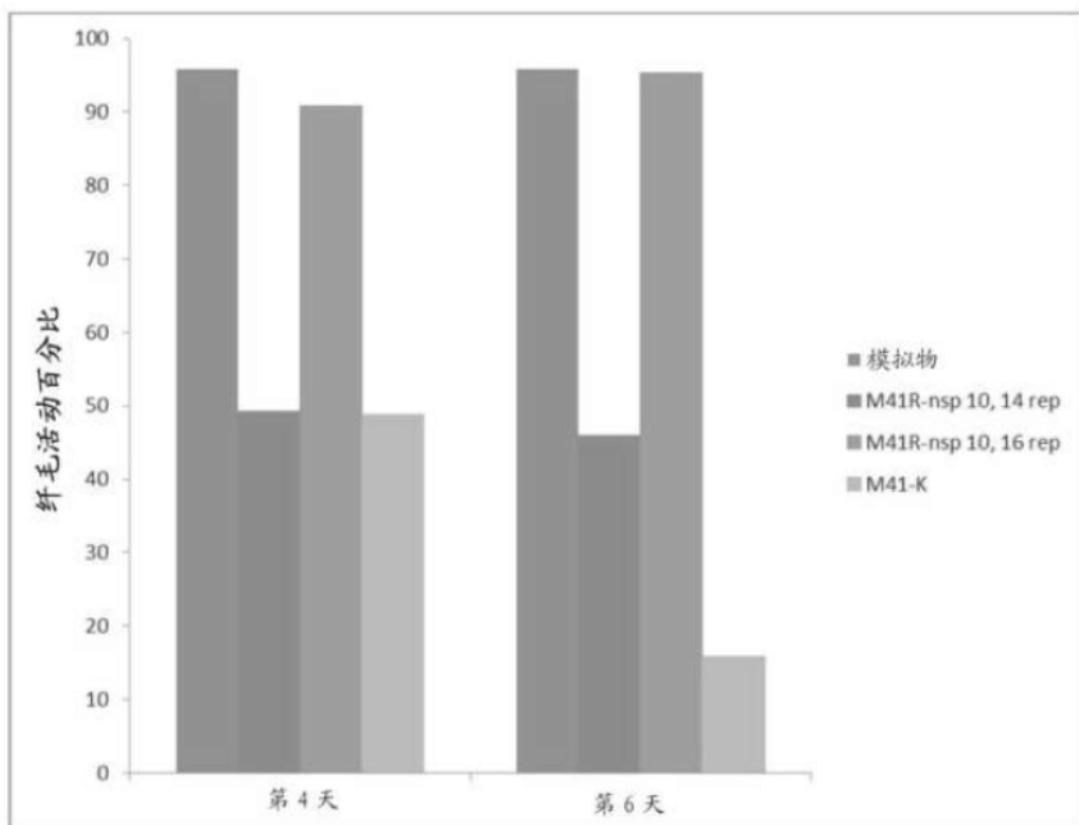


图11C