

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7046014号

(P7046014)

(45)発行日 令和4年4月1日(2022.4.1)

(24)登録日 令和4年3月24日(2022.3.24)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 7/01 (2006.01)

C 1 2 N 7/01

Z N A

C 1 2 N 15/38 (2006.01)

C 1 2 N 15/38

C 1 2 N 15/40 (2006.01)

C 1 2 N 15/40

C 1 2 N 15/869 (2006.01)

C 1 2 N 15/869

Z

A 6 1 P 31/22 (2006.01)

A 6 1 P 31/22

請求項の数 17 (全77頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-565380(P2018-565380)

(86)(22)出願日 平成29年6月15日(2017.6.15)

(65)公表番号 特表2019-517804(P2019-517804 A)

(43)公表日 令和1年6月27日(2019.6.27)

(86)国際出願番号 PCT/EP2017/064662

(87)国際公開番号 WO2017/216287

(87)国際公開日 平成29年12月21日(2017.12.21)

審査請求日 令和2年6月8日(2020.6.8)

(31)優先権主張番号 62/351,471

(32)優先日 平成28年6月17日(2016.6.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 510000976

インターベット インターナショナル ベー・フェー・

オランダ国、5 8 3 1・アー・エヌ・ボツクスメル、ウイム・ドウ・コルベル
ストラート・3 5

(74)代理人 100114188

弁理士 小野 誠

(74)代理人 100119253

弁理士 金山 賢教

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(74)代理人 100129713

弁理士 重森 一輝

(74)代理人 100137213

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 伝染性喉頭気管炎ウイルスおよび伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスの抗原をコードする組換え非病原性マレック病ウイルスコンストラクト

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

組換え非病原性マレック病ウイルス (rMDVnp) であって、rMDVnpゲノム内の第一の非必須部位の中に位置する第一の異種核酸およびrMDVnpゲノム内の第二の非必須部位の中に位置する第二の異種核酸を含み；

第一の異種核酸は、伝染性喉頭気管炎ウイルス糖タンパク質D (ILT V g D) をコードするヌクレオチド配列および伝染性喉頭気管炎ウイルス糖タンパク質I (ILT V g I) をコードするヌクレオチド配列の両方を含み；

第二の異種核酸は、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスのウイルスタンパク質2 (IBDV VP2) をコードするヌクレオチド配列を含み；

第一の非必須部位および第二の非必須部位は、同じであるかまたは異なるかのいずれかであり；そして、第一の非必須部位および第二の非必須部位が異なるときは、一方はUS2部位であり他方はUL54.5部位である、前記組換え非病原性マレック病ウイルス。

【請求項2】

第一の非必須部位および第二の非必須部位がUS2部位である、請求項1のrMDVnp。

【請求項3】

ILT V g Dタンパク質をコードするヌクレオチド配列が作動的に第一のプロモーターの制御下にあり、ILT V g Iタンパク質をコードするヌクレオチド配列が作動的に第二のプロモーターの制御下にあり、そして、IBDV VP2タンパク質をコードするヌクレオチド配列が作動的に第三のプロモーターの制御下にある、請求項1または2のrM

D V n p。

【請求項 4】

第一のプロモーター、第二のプロモーターおよび第三のプロモーターが全て異なるものである、請求項 3 の r M D V n p。

【請求項 5】

第一のプロモーターが内在性 I L T V g D プロモーターであり、第二のプロモーターが内在性 I L T V g I プロモーターであり、そして、第三のプロモーターが、マウスサイトメガロウイルス最初期 1 遺伝子 (m C M V - I E 1) プロモーター、ヒトサイトメガロウイルス最初期 1 遺伝子 (h C M V - I E 1) プロモーターおよびニワトリ β - アクチンプロモーターよりなる群から選択される、請求項 4 の r M D V n p。

10

【請求項 6】

r M D V n p が組換えシチメンチョウヘルペスウイルス (r H V T) である、請求項 1 ～ 5 のいずれかの r M D V n p。

【請求項 7】

r M D V n p が組換えマレック病ウイルス血清型 2 型 (r M D V 2) である、請求項 1、2、3、4 または 5 の r M D V n p。

【請求項 8】

5' から 3' 方向に次の順番で、

(i) マウスサイトメガロウイルス最初期 (m C M V I E) プロモーター；

(i i) 伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスのウイルスタンパク質 2 (I B D V V P 2

20

) のコーディング配列；

(i i i) 転写終結配列；

(i v) 伝染性喉頭気管炎ウイルス糖タンパク質 D (I L T V g D) プロモーター；

(v) I L T V g D タンパク質のコーディング配列；

(v i) 伝染性喉頭気管炎ウイルス糖タンパク質 I (I L T V g I) プロモーター；および

(v i i) I L T V g I タンパク質のコーディング配列、を含む、組換え核酸。

【請求項 9】

配列番号：15 のヌクレオチド配列を含む、請求項 8 の組換え核酸。

【請求項 10】

30

非必須部位内に挿入された請求項 8 または 9 の組換え核酸を含む、組換え非病原性マレック病ウイルス (r M D V n p)。

【請求項 11】

非必須の挿入部位が U S 2 および U L 5 4 . 5 よりなる群から選択される、請求項 10 の r M D V n p。

【請求項 12】

組換えシチメンチョウヘルペスウイルス (r H V T) である、請求項 10 または 11 の r M D V n p。

【請求項 13】

請求項 1、2、3、4、5、6、7、10、11 または 12 の r M D V n p を含む、免疫原性組成物。

40

【請求項 14】

r M D V n p が組換えシチメンチョウヘルペスウイルス (r H V T) である、請求項 13 の免疫原性組成物。

【請求項 15】

r M D V n p が組換えマレック病ウイルス血清型 2 型 (r M D V 2) である、請求項 13 の免疫原性組成物。

【請求項 16】

請求項 13、14 または 15 の免疫原性組成物を含む、ワクチン。

【請求項 17】

50

請求項16のワクチンを投与することを含む、ILT VおよびIBDVに対するニワトリの防御を援助する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、35 U.S.C. § 119 (e) の下、2016年6月17日に出願された米国仮出願第62/351,471号の利益を主張するものであり、その内容はその全体が参照により本明細書中に組み込まれる。

【0002】

本発明の分野

本発明は、伝染性喉頭気管炎ウイルスおよび伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスのタンパク質抗原をコードして発現する新規の組換え多価非病原性マレック病ウイルスコンストラクト、ならびに家禽ワクチンにおけるその使用の方法に関する。

【背景技術】

【0003】

病原性家禽ウイルスは、ニワトリを衰弱させるだけではなく、ニワトリ飼育者にとって損失が大きいものでもあるが、その理由は結果となる疾患の大半が伝染しやすく、家禽産業は狭い大規模飼育施設に重度に依存しているためである。若いヒナへのワクチン接種は、これらのウイルスに対抗するための唯一の実行可能な手段であることが多い。弱毒化または死菌の家禽ウイルスワクチンは未だ市場において重要であるが、近年、病原性ウイルスタンパク質抗原を発現する組換えウイルスコンストラクトを含有するワクチンの開発に対して著しい資源が費やされている。さらには、安定で効果的な複数のウイルス病原体からの外来遺伝子を発現する多価組換え非病原性マレック病ウイルス (rMDV_{np} と略す) ベクターを構築しようとする実質的な試みがなされている。かかる多価ワクチンは、ヒナに与えられる注射数を最少にし、それによって、ワクチン接種されたヒナへの不快感およびストレスを低減させ、並びに労力および材料のコストを顕著に低減させるのに役立つ。かかる単一の多価コンストラクトのワクチン接種はまた、複数の組換え一価rMDV_{np} コンストラクトを含有する代替的な多価rMDV_{np} ワクチンより好ましいが、その理由は、これらの代替的ワクチンは少なくとも今までは単一のウイルス病原体に対する防御しかもたらさなかったためである。かかる代替的ワクチンの失敗は、おそらく、一価rMDV_{np} コンストラクトのうちの1つが他の一価のrMDV_{np} コンストラクトよりも増えすぎて、それによってこれらの他の一価rMDV_{np} コンストラクトが顕著な免疫応答を誘導するのを妨げることが原因である。いずれにせよ、安定で効果的な複数のウイルス病原体からの外来遺伝子を発現する多価rMDV_{np} ベクターを構築しようとする過去の実質的な試みにもかかわらず、実際にかかるワクチンは20年超も前から提案されてきたものであるが [例えばU.S. 5,965,138を参照されたい]、1を超える他の病原体からの抗原をコードする組換えシチメンチョウヘルペスウイルス (rHV T と略す) を含む多価ワクチンが安定かつ効果的であることが示されたのは、ほんの近年である。

【0004】

ワクチン接種を通じて制御することができる1つの家禽ウイルス疾患は、マレック病である。マレック病は、世界的にニワトリに悪影響を及ぼす病原性疾患である。マレック病は、2月齢から5月齢の間の若いニワトリにおいて主に起こる。臨床徴候としては：体肢のうちの1以上の進行性麻痺、肢の麻痺が原因の協調運動障害、翼の関与が原因の脚の垂れ下がり、首の筋肉の関与が原因の頭部位置の低下を含む。急性症例においては重篤な不振が生じ得る。嚢および胸腺の萎縮も発生し得る。

【0005】

マレック病の病原因子は、マレック病ウイルス血清型1型 (MDV 1 と略す) という二本鎖DNAゲノムを持つ細胞随伴性ウイルスである。MDV 1 は、(i) B細胞に感染して細胞溶解をもたらすことができ、かつ(ii) T細胞に潜伏感染してT細胞リンパ腫を誘

10

20

30

40

50

導することができる、リンパ指向性の鳥類アルファヘルペスウイルスである。病毒性MDV 1株の近縁であるマレック病ウイルス血清型2型(MDV 2と略す)は、以前はGalidヘルペスウイルス3型として知られており、ニワトリにおいて病原性をほとんどあるいは全く持たないことが示されている天然の弱毒化MDV株である[Petherbridge et al., J. Virological Methods 158:11-17 (2009)]。SB-1は、MDV 1に対するワクチンにおいて有用であることが示されている特定のMDV 2株である[例えばMurthy and Calnek, Infection and Immunity 26(2) 547-553 (1979)を参照されたい]。

【0006】

別の近縁のアルファヘルペスウイルスであるマレック病ウイルス血清型3型(MDV 3と略す)は、シチメンチョウのヘルペスウイルス(HVTと略す)としてより広範に知られており、家禽シチメンチョウの非病原性ウイルスである[例えばKingham et al., J. of General Virology 82:1123-1135 (2001)を参照されたい]。通常用いられる2つのHVT株は、PB1株およびFC126株である。HVTもまたニワトリにおいて非病原性である一方、これは、ニワトリにおいてMDV 1に対する長期持続性の防御免疫応答を誘導する。したがって、HVTは、長年にわたって病毒性MDV 1に対する家禽ワクチンにおいて、HVTよりもウイルス血性(viraemic)であるが安全性がより低いと考えられるSB-1と一般に組み合わせで用いられている。あるいは、群れを特に病毒性の高いMDV 1株でチャレンジするとき、HVTはRispenワクチンと組み合わせることができる。Rispenワクチンは、軽度に病毒性であるMDV 1株を起源とし、その後に細胞継代によりさらに弱められた分離物である。しかしながら、Rispen株は、高感受性のニワトリ系統に対し、いくらかの病毒性を保持している。

【0007】

HVTの完全ゲノム配列は開示されており[Afonso et al., J. Virology 75(2):971-978 (2001)]、大半のアルファヘルペスウイルスと同じように、HVTは著しい数の潜在的な非必須挿入部位を有する[例えばU. S. 5, 187, 087; U. S. 5, 830, 745; U. S. 5, 834, 305; U. S. 5, 853, 733; U. S. 5, 928, 648; U. S. 5, 961, 982; U. S. 6, 121, 043; U. S. 6, 299, 882 B1を参照されたい]。HVTはまた遺伝的改変を受け入れることができることが示されており、それゆえに長年にわたって組換えベクターとして用いられている[WO87/04463]。したがって、組換えHVTベクターは、例えばニューカッスル病ウイルス(NDV)[Sondermeijer et al., Vaccine, 11:349-358 (1993); Reddy et al., Vaccine, 14:469-477 (1996)]、伝染性ファブリキウス囊病ウイルス(IBDV)[Darteil et al., Virology, 211:481-490 (1995); Tsukamoto et al., J. of Virology 76(11):5637-5645 (2002)]および伝染性喉頭気管炎ウイルス(ILTV)[Johnson et al., Avian Disease, 54(4):1251-1259 (2010); WO92/03554; U. S. 6, 875, 856]からの抗原をコードする外来遺伝子を発現することが報告されている。MDV 2の全ゲノム配列もまた公知である[GenBank acc. nr: AB049735.1、および上のPetherbridge et al.を参照されたい]。MDV 2のゲノム構成はHVTのそれと非常に類似しており、特にUS領域はHVTのそれと同一である[上のKingham et al.を参照されたい]。

【0008】

加えて、新規の鳥類ヘルペスウイルス(NAHV)として知られる、HVTゲノムの特定の領域がMDV 1の対応するゲノム領域により置き換えられている組換えキメラウイルスが構築されている。NAHVはまた、他の家禽ウイルスからの抗原をコードする外来遺伝

10

20

30

40

50

子を発現させるために用いられている [U. S. 5, 965, 138; U. S. 6, 913, 751]。

【0009】

MDVと同じく、伝染性喉頭気管炎ウイルス (ILTVまたはILTと略す) は、世界的にニワトリに悪影響を及ぼすアルファヘルペスウイルスである [Fuchs et al., Veterinary Research 38:261-279 (2007)]。ILTVは、ニワトリにおいて急性呼吸器疾患を引き起こし、これは、呼吸抑制、喘ぎおよび血の滲出物の喀痰を特徴とする。ウイルスの複製は気道の細胞に限定され、気管内で、感染は組織浸食および出血を起こさせる。

【0010】

伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBDVまたはIBDと略す) は、ガンボ口病ウイルスとも呼ばれ、伝染性ファブリキウス嚢病の原因である。IBDVは、急性で高度に伝染しやすいニワトリリンパ組織のウイルス感染を引き起こし、その最初の標的は鳥類の必須の免疫学的器官：ファブリキウス嚢である。感受性の群れにおける罹患率は高く、急激な体重減少および中程度から高い死亡率を有する。この疾患から回復したヒナは、ファブリキウス嚢 (またはその一部) の破壊のために免疫不全を有し得る。このことは、それらを二次感染に対して特に脆弱にする。

【0011】

IBDVは、ビルナウイルス (Birnaviridae) 科のメンバーである。この科のウイルスは、二本鎖RNAの2つのセグメント (AおよびB) からなるゲノムを持つ。IBDVには2つの血清型、血清型1型および2型が存在し、これらはウイルス中和 (VN) 試験により識別することができる。血清型1型ウイルスはニワトリに病原性であることが示されているが、血清型2型ウイルスはシチメンチョウにおいて亜急性の疾患のみ引き起こす。歴史的に、IBDV血清型1型ウイルスは、今は「古典的」IBDウイルスとして知られる1つの型のみからなる。より近年、いわゆる「バリエーション」IBDV株が出現している。IBDVの古典株およびバリエーション株は、モノクローナル抗体のパネルを用いたウイルス中和試験により、またはRT-PCRにより同定して識別することができる [Wu et al., Avian Diseases, 51:515-526 (2007)]。周知の古典的IBDV株としては、D78、Faragher 52/70およびSTCを挙げることができ、一方、89/03は、周知のバリエーション株である。多くの生きたまは不活化されたIBDVワクチンが市販されており、例えば生ワクチン、例えばNOBILIS (登録商標) Gumboro D78 (MSD Animal Health) がある。

【0012】

上に示すように、HVTはマレック病に対する顕著な防御を提供する抗原および組換えベクターの両方として作用することができるため、現在、多価ワクチン、例えばILTVから防御するInnovax (登録商標) -ILT (Merck Animal Healthにより販売)；いずれもNDVから防御するInnovax (登録商標) -ND-SB (Merck Animal Healthにより販売) およびVectormune (登録商標) HVT-NDV (Cevaにより販売)；ならびにいずれもIBDVから防御するVaxxitek (登録商標) HVT+IBD (Merial；旧名称：Gallivac (商標) HVT-IBD) およびVectormune (商標) HVT-IBD (Ceva) などのためのプラットフォームベクターとして用いられる。注目すべきことに、Innovax (登録商標) -ILTは2つの外来遺伝子、すなわちILTV gDおよびILTV gIを含み、これは安全、有効で安定なことが証明されている。しかしながら、これらの2つの外来遺伝子は同じ病原体からのものであり、そのうえ、天然で重複していて、ILTVに対して適当な免疫を与えるために共発現させる必要がある。より近年、組換え型の、安全、有効で安定な、HVT-ILTV-NDVを含む多価ワクチンが開示されている [US 8, 932, 604 B2およびU. S. 9, 409, 954 B2、これらの内容はその全体が参照により本明細書中に組み込まれる]。初期のHVT-ND

10

20

30

40

50

V－IBDVも開示されているが、対応する製品の開発の際に長期試験したところ、主要なコンストラクトのうちの1つであるHVP309は十分な遺伝的安定性も異種インサートの持続的発現も呈さないことが見出された〔WO2013/057,235〕。その後について、より安定で効果的なコンストラクトが開発された〔WO2016/102647〕。

【0013】

それゆえ、2以上の異なる病原体からの異種抗原を有効に発現することができる安定な多価の組換えMDV_{np}コンストラクトの明確な利点、およびそれらを設計しようとする実質的な試みにもかかわらず、今までにほとんどが現れて来ておらず、またそれらのほとんどないもののうちの1つですら必要な要件の全てを達成することができないことが証明された。したがって、任意の所与の多価組換えMDV_{np}のワクチンとしての適合性は、組換えMDV_{np}が2以上の家禽ウイルスの固有のセットから得られる異種抗原の組み合わせを含むとき、予測不可能なままである。それゆえ、多価ワクチンにおいて2以上の異なる非MDV1家禽ウイルス病原体から防御するための単一の活性成分として用いることができる新規の安定な組換えMDV_{np}ベクターを構築することによって、集団的な産業の不成功を克服することへの明確なニーズがある。

【0014】

本明細書中でのあらゆる参考文献の引用は、かかる参考文献が本出願に対する「従来技術」として利用可能であることの承認として解釈されるべきではない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0015】

【文献】U.S. 5,965,138

U.S. 5,187,087

U.S. 5,830,745

U.S. 5,834,305

U.S. 5,853,733

U.S. 5,928,648

U.S. 5,961,982

U.S. 6,121,043

U.S. 6,299,882 B1

WO87/04463

WO92/03554

U.S. 6,875,856

U.S. 6,913,751

US8,932,604 B2

U.S. 9,409,954 B2

WO2013/057,235

WO2016/102647

【非特許文献】

【0016】

【文献】Petherbridge et al., J. Virological Methods 158:11-17 (2009)

Murthy and Calnek, Infection and Immunity 26 (2) 547-553 (1979)

Kingham et al., J. of General Virology 82:1123-1135 (2001)

Afonso et al., J. Virology 75 (2):971-978 (2001)

Sondermeijer et al., Vaccine, 11:349-358 (19

10

20

30

40

50

93)

Reddy et al., Vaccine, 14:469-477 (1996)

Darteil et al., Virology, 211:481-490 (1995)

Tsukamoto et al., J. of Virology 76(11):5637-5645 (2002)

Johnson et al., Avian Disease, 54(4):1251-1259 (2010)

Fuchs et al., Veterinary Research 38:261-279 (2007)

Wu et al., Avian Diseases, 51:515-526 (2007)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0017】

したがって、本発明は、複数のウイルス病原体からの外来遺伝子を発現させるためのベクターとしての使用のための、新規の安定で効果的な多価組換え非病原性マレック病ウイルス(rMDVnp)を提供する。特定の実施形態において、rMDVnpは組換えシメンチョウヘルペスウイルス(rHVT)である。代替的实施形態において、rMDVnpは組換えマレック病ウイルス血清型2型(rMDV2)である。rMDVnp、例えばrHVTまたはrMDV2は、病原性の家禽(poultry)ウイルスに対するワクチンにおいて用いることができる。

【0018】

特定の実施形態において、rMDVnpは、rMDVnpゲノム中の第一の非必須部位内に位置する第一の異種核酸およびrMDVnpゲノム中の第二の非必須部位内に位置する第二の異種核酸を含む。第一の異種核酸は、伝染性喉頭気管炎ウイルス(ILTV)gDタンパク質をコードするヌクレオチド配列および伝染性喉頭気管炎ウイルス(ILTV)gEタンパク質をコードするヌクレオチド配列の両方を含む。第二の異種核酸は、伝染性ファブリキウス囊病ウイルス(IBDV)のウイルスタンパク質2(VP2)をコードするヌクレオチド配列を含む。このタイプの具体的な実施形態において、第一の異種核酸は配列番号:9のヌクレオチド配列を含み、そして、第二の異種核酸は、配列番号:5のヌクレオチド配列を含む。具体的な実施形態において、rMDVnpはrHVTである。代替的实施形態において、rMDVnpはrMDV2である。

【0019】

ある実施形態において、rMDVnpの第一の非必須部位はUS2部位である一方、第二の非必須部位はUS2部位以外のrMDVnpの非必須部位である。関係する実施形態において、rMDVnpの第一の非必須部位はUS2部位であり、そして、rMDVnpの第二の非必須部位はUL7/8部位である。なお他の実施形態において、rMDVnpの第一の非必須部位はUS2部位であり、そして、rMDVnpの第二の非必須部位はUS10部位である。さらに他の実施形態において、rMDVnpの第一の非必須部位はUS2部位であり、そしてrMDVnpの第二の非必須部位はUL54.5部位である。具体的な実施形態において、rMDVnpはrHVTである。代替的实施形態において、rMDVnpはrMDV2である。

【0020】

他の実施形態において、rMDVnpの第二の非必須部位はUS2部位である一方、第一の非必須部位はUS2部位以外のrMDVnpの非必須部位である。関係する実施形態において、rMDVnpの第二の非必須部位はUS2部位であり、そして、rMDVnpの第一の非必須部位はUL7/8部位である。なお他の実施形態において、rMDVnpの第二の非必須部位はUS2部位であり、そして、rMDVnpの第一の非必須部位はUS10部位である。さらに他の実施形態において、MDVnpの第二の非必須部位はUS2部位であり、そして、rMDVnpの第一の非必須部位はUL54.5部位である。具体的な実施形態において、rMDVnpはrHVTである。代替的实施形態において、rM

10

20

30

40

50

D V n p は r M D V 2 である。

【 0 0 2 1 】

他の実施形態において、r M D V n p の第一の非必須部位および第二の非必須部位は同じである。このタイプの具体的な実施形態において、第一の異種核酸および第二の異種核酸は、実際には同じ DNA 分子の一部として構築され、これは r M D V n p の非必須部位内に挿入される。かかる DNA 分子は、伝染性喉頭気管炎ウイルス (I L T V) g D タンパク質、伝染性喉頭気管炎ウイルス (I L T V) g I タンパク質および伝染性ファブリキウス囊病ウイルス (I B D V) V P 2 をコードする発現カセットであることができる。このタイプの特定の実施形態において、DNA 分子は、配列番号：15 のヌクレオチド配列を含む。このタイプの他の実施形態において、DNA 分子は、配列番号：16 のヌクレオチド配列を含む。このタイプのさらに他の実施形態において、DNA 分子は、配列番号：17 のヌクレオチド配列を含む。このタイプのなお他の実施形態において、DNA 分子は、配列番号：18 のヌクレオチド配列を含む。具体的な実施形態において、r M D V n p は r H V T である。代替的实施形態において、r M D V n p は r M D V 2 である。

【 0 0 2 2 】

したがって、特定の実施形態において、r M D V n p の第一の非必須部位および第二の非必須部位は U S 2 部位である。他の実施形態において、r M D V n p の第一の非必須部位および第二の非必須部位は U L 5 4 . 5 部位である。なお他の実施形態において、r M D V n p の第一の非必須部位および第二の非必須部位は U L 7 / 8 部位である。さらに他の実施形態において、r M D V n p の第一の非必須部位および第二の非必須部位は U S 1 0 部位である。具体的な実施形態において、r M D V n p は r H V T である。代替的实施形態において、r M D V n p は r M D V 2 である。

【 0 0 2 3 】

I L T V g D タンパク質、I L T V g I タンパク質および I B D V V P 2 タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、作動的に外来性プロモーター、すなわち天然に M D V n p 中で見出されないプロモーターの制御下にあることができる。ある実施形態において、これらの3つのヌクレオチド配列は、作動的に異なるプロモーターの制御下にあること、すなわち I L T V g D タンパク質をコードするヌクレオチド配列は作動的に第一のプロモーターの制御下にあり、I L T V g I タンパク質をコードするヌクレオチド配列は作動的に第二のプロモーターの制御下にあり、I B D V V P 2 タンパク質をコードするヌクレオチド配列は作動的に第三のプロモーターの制御下にあり、この第一のプロモーター、第二のプロモーターおよび第三のプロモーターは全て異なるものである。特定の実施形態において、I L T V g D タンパク質をコードするヌクレオチド配列のためのプロモーターは、内在性 I L T V g D プロモーターである。ある実施形態において、I L T V g I タンパク質をコードするヌクレオチド配列のためのプロモーターは、内在性 I L T V g I プロモーターである。このタイプの特定の実施形態において、I L T V g D タンパク質をコードするヌクレオチド配列のためのプロモーターは内在性 I L T V g D プロモーターであり、I L T V g I タンパク質をコードするヌクレオチド配列のためのプロモーターは内在性の I L T V g I プロモーターである。具体的な実施形態において、r M D V n p は r H V T である。代替的实施形態において、r M D V n p は r M D V 2 である。

【 0 0 2 4 】

ある実施形態において、I L T V g D タンパク質、I L T V g I タンパク質または I B D V V P 2 タンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターのうちの少なくとも1つは、マウスサイトメガロウイルス最初期 (m C M V I E) プロモーターである。関係する実施形態において、I L T V g D タンパク質、I L T V g I タンパク質または I B D V V P 2 タンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターのうちの少なくとも1つは、ヒトサイトメガロウイルス最初期 (h C M V I E) プロモーターまたはその誘導体 (例えば A D 1 6 9 株からのもの) である。他の実施形態において、I L T V g D タンパク質、I L T V g I タンパク質または I B D V V P 2 タンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結され

たプロモーターのうちの少なくとも1つは、ニワトリβ-アクチンプロモーターである。さらに他の実施形態において、ILTV gDタンパク質、ILTV gIタンパク質またはIBDV VP2タンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターのうちの少なくとも1つは、仮性狂犬病ウイルス (PRV) gpXプロモーターである。

【0025】

特定の実施形態において、IBDV VP2タンパク質をコードするヌクレオチド配列のためのプロモーターは、mCMV IEプロモーターである。関係する実施形態において、IBDV VP2タンパク質をコードするヌクレオチド配列のためのプロモーターは、ヒトサイトメガロウイルス最初期 (hCMV IE) プロモーターまたはその誘導体 (例えばAD169株からのもの) である。他の実施形態において、IBDV VP2タンパク質をコードするヌクレオチド配列のためのプロモーターは、ニワトリβ-アクチン遺伝子プロモーターである。具体的な実施形態において、IBDV VP2タンパク質をコードするヌクレオチド配列のためのプロモーターはmCMV IEプロモーターであり、ILTV gDタンパク質をコードするヌクレオチド配列のためのプロモーターは内在性ILTV gDプロモーターであり、そして、ILTV gIタンパク質をコードするヌクレオチド配列のためのプロモーターは内在性ILTV gIプロモーターである。他の具体的な実施形態において、IBDV VP2タンパク質をコードするヌクレオチド配列のためのプロモーターはhCMV IEプロモーター (またはその誘導体) であり、ILTV gDタンパク質をコードするヌクレオチド配列のためのプロモーターは内在性ILTV gDプロモーターであり、そして、ILTV gIタンパク質をコードするヌクレオチド配列のためのプロモーターは内在性ILTV gIプロモーターである。なお他の具体的な実施形態において、IBDV VP2タンパク質をコードするヌクレオチド配列のためのプロモーターはニワトリβ-アクチンプロモーターであり、ILTV gDタンパク質をコードするヌクレオチド配列のためのプロモーターは内在性ILTV gDプロモーターであり、そして、ILTV gIタンパク質をコードするヌクレオチド配列のためのプロモーターは内在性ILTV gIプロモーターである。

【0026】

ある実施形態において、ILTV gDタンパク質、ILTV gIタンパク質およびIBDV VP2タンパク質をコードするヌクレオチド配列のインサートを包含する本発明のrMDVnpはまた、1以上の外来性転写終結配列を包含する。このタイプの具体的な実施形態において、転写終結配列は、IBDV VP2タンパク質をコードするヌクレオチド配列から下流にある。特定の実施形態において、ILTV gDタンパク質およびILTV gIタンパク質をコードするヌクレオチド配列は1つの転写終結配列を共有し、そして、IBDV VP2タンパク質をコードするヌクレオチド配列は別のものを持つ。特定の実施形態において、転写終結配列のうちの少なくとも1つは、ネコヘルペスウイルスUS-9 (FHV US-9) ポリアデニル化配列を含む。関係する実施形態において、転写終結配列のうちの少なくとも1つは、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (HSV TK) ポリアデニル化配列を含む。具体的な実施形態において、rMDVnpはrHVVTである。代替的实施形態において、rMDVnpはrMDV2である。

【0027】

本発明は、5'から3'方向に次の順番で、(i) マウスサイトメガロウイルス最初期 (mCMV IE) プロモーター、(ii) IBDV VP2タンパク質のコーディング配列、(iii) 転写終結配列、(iv) ILTV gDプロモーター、(v) ILTV gDタンパク質のコーディング配列、(vi) ILTV gIプロモーターおよび(vii) ILTV gIタンパク質のコーディング配列を含む組換え核酸を提供する。このタイプの特定の実施形態において、組換え核酸は、配列番号: 15のヌクレオチド配列を含む。本発明はさらに、5'から3'方向に次の順番で、(i) ヒトサイトメガロウイルス最初期 (hCMV IE) プロモーターまたはその誘導体、(ii) IBDV VP2タンパク質のコーディング配列、(iii) 転写終結配列、(iv) ILTV gDプロモーター、(

v) I L T V g Dタンパク質のコーディング配列、(v i) I L T V g Iプロモーター、および(v i i) I L T V g Iタンパク質のコーディング配列を含む組換え核酸を提供する。本発明はまた、5'から3'方向に次の順番で、(i) ニワトリβ-アクチンプロモーター、(i i) I B D V V P 2タンパク質のコーディング配列、(i i i) 転写終結配列、(i v) I L T V g Dプロモーター、(v) I L T V g Dタンパク質のコーディング配列、(v i) I L T V g Iプロモーター、および(v i i) I L T V g Iタンパク質のコーディング配列を含む組換え核酸を提供する。

【0028】

本発明はさらに、5'から3'方向に次の順番で、(i) 伝染性喉頭気管炎ウイルス(I L T V) g Dプロモーター、(i i) I L T V g Dタンパク質のコーディング配列、(i i i) I L T V g Iプロモーター、(i v) I L T V g Iタンパク質のコーディング配列、(v) ヒトサイトメガロウイルス最初期(h C M V I E)、その誘導体(例えばA D 1 6 9株からのもの)またはm C M V I Eプロモーター、(v i) I B D V V P 2タンパク質のコーディング配列、および(v i i) 転写終結配列を含む組換え核酸を提供する。このタイプの具体的な実施形態において、組換え核酸は、配列番号：17のヌクレオチド配列を含む。

【0029】

本発明はさらに、本発明の組換え核酸がr M D V n pの非必須の挿入部位内に挿入されているr M D V n pを提供する。このタイプのある実施形態において、r M D V n pは、5'から3'方向に次の順番で(i) マウスサイトメガロウイルス最初期(m C M V I E)プロモーター、(i i) I B D V V P 2タンパク質のコーディング配列、(i i i) 転写終結配列、(i v) I L T V g Dプロモーター、(v) I L T V g Dタンパク質のコーディング配列、(v i) I L T V g Iプロモーター、および(v i i) I L T V g Iタンパク質のコーディング配列を含む組換え核酸を含む非必須部位内のインサートを包含する。具体的な実施形態において、介在性のヌクレオチド配列、例えばリンカー、スパーサー配列および／または外来性コーディング配列なども包含することができ、下の実施例1を参照されたい。特定の実施形態において、r H V Tは、非必須部位内に挿入された配列番号：15のヌクレオチド配列を含む。このタイプの特定の実施形態において、非必須部位はU S 2部位である。他のかかる実施形態において、非必須部位はU L 5 4 . 5部位である。さらに他のかかる実施形態において、非必須部位はU L 7 / 8部位である。なお他のかかる実施形態において、非必須部位はU S 1 0部位である。具体的な実施形態において、r M D V n pはr H V Tである。代替的实施形態において、r M D V n pはr M D V 2である。

【0030】

本発明はまた、本発明のr M D V n pを作製する方法を提供する。ある実施形態において、I L T V g Dタンパク質をコードするヌクレオチド配列、I L T V g Iタンパク質をコードするヌクレオチド配列およびI B D V V P 2タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む異種核酸が構築される。異種核酸は次いで本発明のr M D V n pの非必須部位内に挿入される。ある実施形態において、異種核酸は発現カセットである。このタイプの特定の実施形態において、発現カセットは、配列番号：15のヌクレオチド配列を含む。他の実施形態において、I L T V g Dタンパク質をコードするヌクレオチド配列およびI L T V g Iタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第一の異種核酸が構築され；そして、I B D V V P 2タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第二の異種核酸が構築される。第一の異種核酸はr M D V n pのU S 2部位内に挿入され、第二の異種核酸はr M D V n pの代替的な非必須部位内に挿入される。ある実施形態において、かかる異種核酸は発現カセットである。このタイプの特定の実施形態において、第一の異種核酸は配列番号：9のヌクレオチド配列を含み、そして、第二の異種核酸は配列番号：5のヌクレオチド配列を含む。このタイプの他の実施形態において、第一の異種核酸は配列番号：5のヌクレオチド配列を含み、そして、第二の異種核酸は配列番号：9のヌクレオチド配列を含む。具体的な実施形態において、r M D V n pを作製する方法は、r H

V Tを作製する方法である。代替的实施形態において、rMDVnpを作製する方法は、rMDV2を作製する方法である。

【0031】

本発明はさらに、本発明の任意のrMDVnpを含む免疫原性組成物および／またはワクチンを提供する。具体的な実施形態において、rMDVnpはrHVTである。代替的实施形態において、rMDVnpはrMDV2である。加えて、本発明は、かかる本発明のワクチンおよび／または免疫原性組成物を投与することにより、ILTVおよび／またはIBDVおよび／またはMDV1によって引き起こされる疾患に対する家禽の防御を援助する方法を提供する。具体的な実施形態において、かかる方法は、ニワトリの防御を援助する。このタイプの特定の实施形態において、本発明のワクチンは皮下投与される。他の実施形態において、本発明のワクチンは卵内投与される。

10

【0032】

したがって、1つの態様において、本発明は、本発明のrMDVnpを含む免疫原性組成物および／またはワクチンを提供する。特定の实施形態において、これらの免疫原性組成物および／またはワクチンは、安定、安全であり、そして比較的強い抗原発現および／または有効性を持つ。あるいは、または加えて、本発明のrMDVnpを含む免疫原性組成物および／またはワクチンは、ニワトリへの免疫原性組成物および／またはワクチンの投与に続いて、ILTVおよび／またはIBDVおよび／またはMDV1によって引き起こされる疾患に対するニワトリの防御を援助する。

【0033】

本発明はまた、提供される免疫原性を改良して拡大するために、さらに付加的なIBDV、ILTV、および／またはMDV抗原と組み合わせられた本発明の任意のrMDVnpを含む免疫原性組成物および／またはワクチンを提供する。加えて、本発明はまた、さらにMDV、ILTVまたはNDV以外の病原体についての抗原と組み合わせられた本発明の任意のrMDVnpを含む免疫原性組成物および／またはワクチンを提供する。このタイプの特定の实施形態において、抗原は、弱毒化されたまたは軽度の生きたバリエーションIBDV（例えばIBDV 89/03）である。このタイプの別の特定の实施形態において、抗原は、弱毒化された（または軽度の生きた）ニューカッスル病ウイルス（NDV）、例えばNDV C2である。本発明はまた、かかるワクチンおよび／または免疫原性組成物を家禽（例えばニワトリ）に投与することにより、ILTVおよび／またはIBDVおよび／またはMDV1および／またはNDVによって引き起こされる疾患に対する家禽の防御を援助する方法を提供する。このタイプの特定の实施形態において、本発明のワクチンは皮下投与される。他の实施形態において、本発明のワクチンは卵内投与される。

20

30

【0034】

ある実施形態において、本発明の免疫原性組成物および／またはワクチンは、そのUS2部位へのインサートとして、5'から3'に：(i) 伝染性喉頭気管炎ウイルス（ILTV）gDプロモーター；(ii) ILTV gDタンパク質のコーディング配列；(iii) ILTV gIプロモーター；(iv) ILTV gIタンパク質のコーディング配列；(v) マウスサイトメガロウイルス最初期（mCMV IE）プロモーター；(vi) 伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスVP2タンパク質（IBDV V2）のコーディング配列；および(vii) 転写終結配列を含む組換え核酸を含むrHVTを含む。このタイプのさらにより特定の实施形態において、組換え核酸は配列番号：17のヌクレオチド配列を持つ。このタイプの具体的な实施形態において、免疫原性組成物および／またはワクチンはさらに、弱毒化された（または軽度の生きた）バリエーション伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス（IBDV）を含み、例えばIBDVは89/03である。

40

【0035】

本発明はさらに、付加的なIBDV、ILTVおよび／またはMDV抗原、ならびにMDV、ILTVまたはIBDV以外の病原体と組み合わせられた本発明の任意のrMDVnpを含む免疫原性組成物および／またはワクチンを提供する。

【0036】

50

本発明のこれらのおよび他の態様は、以下の図および詳細な説明への参照によって、より良く理解される。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】図1は、ボックスとして表示されるリピート領域に隣接した、各々直線により表示されるユニークロング (unique long、UL) 領域およびユニークショート (unique short、US) 領域からなるHVT (FC126) ゲノムの概略図である。ゲノム概略の下にあるのは、それらのゲノム位置に対するBamHI制限酵素消化断片の位置および各断片に関連した文字命名を指し示すバーである (最も大きい断片は文字「A」を与えられ、次に大きいものは文字「B」を与えられる等である)。HVT (FC126) またはrHVT/ILT/IBDVウイルスのいずれかを再構築するために用いられる各々のクローニングされたサブゲノム断片の位置 (およびそれらの名称) は、BamHI制限酵素地図の下に指し示される。アスタリスク (*) は、挿入部位: 484-1050-2641-10859中のUL54.5; 228509-ILT-435Vec6、1333-85.B6または1386-04.4#1中のUS2の位置を指し示す。

【図2】図2は4つの異なる組換えHVTの概略図であり、HVT骨格内に挿入された遺伝子およびそれらの挿入部位を描写する。Innovax (登録商標) -ILTは、rHVTのUL54.5部位内に挿入されたILTV gDおよびILTV gI遺伝子をコードする発現カセットを包含するrHVTである。1386-48は、rHVTのUS2部位内に挿入されたILTV gD、ILTV gIおよびIBDVウイルスタンパク質2遺伝子をコードする発現カセットを包含するrHVTである。1386-134は、US2部位内に挿入されたILTV gDおよびILTV gI、ならびにIBDVウイルス (vrial) タンパク質2遺伝子をコードする発現カセットの両方をまた包含するが、カセットの順番が入れ替わった (すなわちVP2、次いでILT gDおよびgIである) rHVTである。HVT/ILT/IBDV 484は、rHVTのUL54.5部位内に挿入されたIBDVウイルスタンパク質2、ILTV gDおよびILTV gI遺伝子をコードする発現カセットを包含するrHVTである。

【発明を実施するための形態】

【0038】

本発明は、先行する失敗を克服して、ILTVおよびIBDVの両方からの抗原をコードして発現する単一のrMDVnpベクターを構築することを可能にする。特定の実施形態において、本発明のrMDVnpはILTVおよびIBDVのみからの外来抗原をコードして発現し、そして、マレック病、伝染性ファブリキウス嚢病 (ガンボ口病) および伝染性喉頭気管炎 (Laryngotracheitis) ウイルスに対する防御を援助するように設計される。具体的な実施形態において、rMDVnpはrHVTである。代替的实施形態において、rMDVnpはrMDV2である。完全に異なる態様において、ILTVおよびIBDVからの外来抗原をコードして発現する組換えベクターはrMDVnpではなく、むしろMDV1からの指定されたゲノム配列を、HVTベクター、例えば新規鳥類ヘルペスウイルス (NAHV) 中のそれらの対応する部分を置き換えて含有するキメラマレック病ウイルスである [例えばU.S. 6, 913, 751を参照されたい]。

【0039】

本発明に先行して、US10領域内に挿入されたNDV遺伝子を含有するHVTベクターは既に構築されていた。このHVT-NDVベクターは、安定であること、および対応するNDV遺伝子産物であるNDV Fタンパク質を十分なレベルで発現すること、ワクチン接種されたニワトリを病毒性NDVチャレンジに対して防御することが示された。加えて、HVT UL54.5領域内に挿入されたILTV遺伝子のペアを含有するHVTベクターは既に構築されていた。このHVT-ILTVベクターは、安定であること、および対応するILTV遺伝子産物であるILTV gIおよびgDタンパク質を十分なレベルで発現すること、ワクチン接種されたニワトリを病毒性ILTVチャレンジウイルスに

対して防御することが示された。

【0040】

以前、NDVおよびILTVの両方に対して防御するための多価HVTコンストラクトは、上の成功したコンストラクト、すなわちNDV-F遺伝子をUS10部位内に挿入し、ILTV gDおよびgI遺伝子をUL54.5部位内に挿入したものに基づいて設計された[US8,932,604 B2を参照されたい]。しかしながら意外なことに、このコンストラクトを組織培養において継代した後、組換えウイルスは、ILTV gD、ILTV gIおよびNDV Fタンパク質を発現するその能力を失った。これは、多数の二重組換えHVTコンストラクトに当てはまることが証明された。実際に、これらの組換えウイルスは不安定であり、ワクチンとしてのさらなる開発に不適であった。これらの知見は、NDV Fタンパク質ならびにILTV gDおよびILTV gIタンパク質の両方を安定的に発現することができる単一の多価rHVTベクターの設計が存在する情報から外挿することができる単純なプロセスではなかったことを実証するものである。実際に、かかる安定で効果的な多価rHVTベクターが仮に可能であったとしても、それらの設計は、用いられる挿入部位と挿入されることになる外来ヌクレオチド配列との間の関係に最小限に関与する、予測不可能な複雑な相互作用のセットを前提とする必要がある。したがって、rHVTコンストラクトの設計は、公知技術から予測不可能なままである。

10

【0041】

それゆえ、本発明は、ILTVからの2つの遺伝子およびIBDVからの1つの遺伝子が挿入された組換えMDV npベクターを提供する。本発明の特定の実施形態において、3つの遺伝子は全てHVTゲノムのUS2領域内に挿入された。本発明の別の実施形態において、3つの遺伝子は全てHVTゲノムのUL54.5部位内に挿入された。したがって、かかるrMDV npベクターは、IBDVおよびILTV両方の感染に対する防御を提供するために用いることが可能なものである。以前は、これら2つのウイルスに対する防御のためには、2つの別々の、すなわち一方がILTVに対する防御のための、および他方がIBDVに対する防御のためのrHVTベクターが必要であった。

20

【0042】

それゆえ、本発明は、家禽および／または家禽の卵に単一の組換えMDV npのみを接種することによってILTVおよびIBDVに対する防御を同時に提供することが可能なものであるから、現行の方法よりも有利である。特に、卵内に注入することができる容量には制限があることから、これは卵内経路を介して付加的なワクチンが投与されることを可能にし、さらに、2つよりもむしろ1つだけのベクターを必要とすることから製造コストを節減する。そのうえ、これは、付加的な抗原、例えば弱毒化されたおよび／または軽度の生きたNDVのようなワクチン、例えばC2株中に包含されることを可能にし得る。

30

【0043】

さらには、本発明は、同じワクチンおよび／または免疫原性組成物中に、異なるrMDV npコンストラクト含む実施形態を包含する。このタイプのある実施形態において、ワクチンおよび／または免疫原性組成物は、rMDV 2およびrHVTの両方を含み、これらは各々1以上の外来抗原をコードする。実際に、2つのrHVTの組み合わせが一方コンストラクトの他方に対する顕著な過増殖を必然的に導くとは異なり、rHVTをrMDV 2と組み合わせることはかかる顕著な過増殖を導かない。それゆえ、具体的な実施形態において、本発明のワクチンは、ILTV gDタンパク質、ILTV gIタンパク質およびIBDV VP2タンパク質をコードするrHVTを、なお別家禽ウイルス抗原、例えばNDV Fタンパク質をコードするrMDV 2と共に含む。

40

【0044】

本発明をより十分に理解するため、以下の定義が提供される。

【0045】

記述における便宜上の単数形の使用は、そのように限定する意図は何らないものである。それゆえに、例えば「ポリペプチド (a polypeptide)」を含む組成物への言及は、1以上のかかるポリペプチドへの言及を包含する。

50

【0046】

本明細書中で用いられる「非病原性マレック病ウイルス」または「MDV_{np}」または「npMDV」は、家禽において病原性をほとんどあるいは全く示さないMDVファミリーのウイルスである。用語「MDV_{np}」は、継代されているか、或いは同様に操作された天然起源のMDVを包含するが、1つのMDV血清型のゲノムの特定の領域が異なるMDV血清型の対応する領域により置き換えられることでキメラウイルスが形成されるウイルスコンストラクト、例えば新規鳥類ヘルペスウイルス（NAHV）などを包含しない。ある実施形態において、MDV_{np}はHVTである。他の実施形態において、MDV_{np}はMDV2である。このタイプの特定の実施形態において、MDV2はSB1である。

【0047】

本明細書中で用いられる、異種ヌクレオチド配列（例えば外来遺伝子）をコードするように遺伝子改変されているMDV_{np}は、「組換えMDV_{np}」または「rMDV_{np}」として定義される。用語「rMDV_{np}」は、異種ヌクレオチド配列をコードするように遺伝子改変されている天然起源のMDV_{np}を包含するが、1つのMDV血清型のゲノムの特定の領域が異なるMDV血清型の対応する領域により置き換えられることでキメラウイルスが形成されるウイルスコンストラクト、例えば新規鳥類ヘルペスウイルス（NAHV）などを包含しない。

【0048】

本明細書中で用いられる「新規鳥類ヘルペスウイルス」（「NAHV」）は、シチメンチョウヘルペスウイルス（HVT）において天然に存在するユニークロングウイルスゲノム領域およびマレック病1（MDV1）において天然に存在するユニークショートウイルスゲノム領域を含む組換えキメラウイルスである[U.S. 5, 965, 138、U.S. 6, 183, 753、U.S. 6, 913, 751 B2を参照されたい]。好ましい実施形態（embodiment）において、NAHVは、シチメンチョウヘルペスウイルス（HVT）において天然に存在するユニークロングウイルスゲノム領域、マレック病1（MDV1）において天然に存在するユニークショートウイルスゲノム領域およびHVTの繰り返しウイルス領域を含む[U.S. 6, 913, 751 B2を参照されたい]。

【0049】

本明細書中で用いられる「非必須部位」は、MDV_{np}ゲノム中の（あるいはNAVHゲノム中の）部位であって、その部位への異種ヌクレオチド配列の挿入が宿主細胞中でのMDV_{np}（またはNAVH）の複製を妨げない部位である。非必須部位は、一般にそれらが存在する遺伝子によって、例えばUS2部位のように同定され、または2つの遺伝子の間の領域によって、例えばUL7／8部位のように同定される。用語「非必須部位」の使用は、MDV_{np}（またはNAVH）が宿主細胞中でのその複製能力を維持するために異種核酸の挿入がなされなければならない所与の遺伝子のヌクレオチド配列中に（または2つの遺伝子の間の領域中に）固有のヌクレオチド位置が1つだけであることを示唆することさえ、何ら意図されない。

【0050】

本明細書中で用いられるように、rMDV_{np}（またはNAHV）がrMDV_{np}ゲノム（またはNAHVゲノム）中の非必須部位内に「挿入された」所与の核酸を含むと言われるとき、それは、所与の核酸がMDV_{np}（またはNAHV）のその非必須部位内に位置する異種核酸であることを意味する。したがって、rMDV_{np}ゲノム中の第一の非必須部位内に挿入された第一の核酸およびrMDV_{np}ゲノム中の第二の非必須部位内に挿入された第二の核酸を含むrMDV_{np}は、rMDV_{np}ゲノム中の第一の非必須部位内に位置する第一の異種核酸およびrMDV_{np}ゲノム中の第二の非必須部位内に位置する第二の異種核酸を含むrMDV_{np}と等価であり、逆もまた同様である。

【0051】

本明細書中で用いられる用語「家禽」は、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、ガチョウ、ウズラおよびキジを包含し得る。

【0052】

本明細書中で用いられる「ワクチン」は、1以上の抗原を典型的に薬学的に許容される担体、例えば水を含有する液体などと組み合わせて含む、動物（ある実施形態においてヒトを包含する一方、他の実施形態においてヒトに特異的ではない）への適用に適した組成物であり、動物に投与されると野生型微生物の感染から生じる臨床疾患からの防御を最小限に援助するのに十分な強さの、すなわち、臨床疾患の予防を援助するのにおよび／または臨床疾患を予防、寛解もしくは治療するのに十分な強さの免疫応答を誘導する。USDAにより制定され、連邦規則集タイトル9パート113（9CFR 113）《Standard requirements for Animal Products》中に成文化されるように、生きたウイルスワクチンは、承認を得るために、疾患に関連した臨床徴候または病変から、NDV、IBDVおよびILTVの場合は少なくとも90%の防御を、MDVの場合は少なくとも80%の防御を提供しなければならない。

10

【0053】

本明細書中で用いられる「多価ワクチン」は、2以上の異なる抗原を含むワクチンである。このタイプの特定の実施形態において、多価ワクチンは、2以上の異なる病原体に対するレシピエントの免疫系を刺激する。

【0054】

本明細書中で用いられる用語「防御を援助する」は、感染のあらゆる兆候からの完全な防御を必要とするものではない。例えば、「防御を援助する」は、チャレンジ後に潜在する感染の症状が少なくとも低減されるように、および／または、症状を引き起こす潜在する細胞の生理的もしくは生化学的な原因もしくはメカニズムのうちの1もしくは複数が低減および／もしくは除去されるように、防御が十分であることを意味することができる。本発明との関連で用いられる「低減される」は、感染の生理的状态だけでなく感染の分子状態を包含する感染の状態に対する相対的なものを意味すると理解される。

20

【0055】

本明細書中で用いられる「アジュバント」は、免疫学的イベントのカスケードを支持または増幅し、最終的により良好な免疫学的応答、すなわち、抗原に対する統合された身体的応答を導くことが可能な物質である。アジュバントは、一般的に免疫学的応答を起こさせるために必要とされないが、この応答を支持または増幅する。

【0056】

本明細書中で用いられる用語「薬学的に許容される」は、修飾された名詞が医薬製品における使用のために適切であることを意味するように形容詞的に用いられる。例えば医薬ワクチンにおける添加剤を記述するために用いられるとき、この用語は、添加剤を、組成物中の他の成分と適合しており、対象のレシピエントに対して不利に有害でないものと特徴付ける。

30

【0057】

本明細書中で用いられる「全身投与」は、体の循環系（心血管系およびリンパ系を含む）内への投与であり、それゆえに特定位置、例えば消化管（例えば経口または直腸投与を介するもの）および呼吸器系（例えば鼻腔内投与を介するもの）などよりもむしろ全身に影響を及ぼす。全身投与は、例えば、筋肉組織の中（筋肉内）、真皮の中（皮内または経皮的）、皮膚の下（皮下）、粘膜の下（粘膜下）、静脈の中（静脈内）などに投与することにより実施することができる。

40

【0058】

本明細書中で用いられる用語「非経口投与」は、皮下注射、粘膜下注射、静脈内注射、筋肉内注射、皮内注射および点滴を包含する。

【0059】

用語「およそ」は、用語「約」と交換可能に用いられ、値が指示された値の25パーセント以内であることを表し、すなわち、「およそ」100アミノ酸残基を含有するペプチドは75から125の間のアミノ酸残基を含有することができる。

【0060】

本明細書中で用いられるように、用語「ポリペプチド」は、用語「タンパク質」および「

50

ペプチド」と交換可能に用いられ、ペプチド結合によりつながった2以上のアミノ酸を含むポリマーを意味する。本明細書中で用いられる用語「ポリペプチド」は、フラグメントまたはセグメントを包含し、少なくとも約8アミノ酸、一般に少なくとも約12アミノ酸、典型的に少なくとも約16アミノ酸、好ましくは少なくとも約20アミノ酸、および特に好ましい実施形態において少なくとも約30またはそれより多いアミノ酸、例えば35、40、45、50などの一続きのアミノ酸残基を包含する。かかる断片は、実質的に全ての位置において開始および／または終了する、全ての実際的な組み合わせにおいて、例えば残基1、2、3などにおいて開始し、例えば155、154、153などにおいて終了する末端を持ち得る。

【0061】

場合により、ポリペプチドは、遺伝子によってまたはmRNAによってコードされる、あるアミノ酸残基を欠いてもよい。例えば、遺伝子またはmRNA分子は、最終タンパク質から切断され、それゆえ最終タンパク質の一部ではないものであり得る、ポリペプチドのN末端上のアミノ酸残基の配列（すなわちシグナル配列）をコードし得る。

【0062】

本明細書中で用いられる、特定のタンパク質（例えばタンパク質抗原）に関する用語「抗原性断片」は、抗原性のある、すなわち免疫系の抗原認識分子、例えば免疫グロブリン（抗体）またはT細胞抗原受容体などと特異的に相互作用する能力のある、そのタンパク質の断片（完全長タンパク質から最少で1つのアミノ酸がなくなっている大きい断片を包含する）である。例えば、IBDV VP2タンパク質の抗原性断片は、抗原性のあるVP2タンパク質断片である。好ましくは、本発明の抗原性断片は、抗体および／またはT細胞受容体認識について免疫優性である。

【0063】

本明細書中で用いられるように、2つのアミノ酸配列が同一であるかおよび／または下に定義される中性もしくは保存的置換のみが異なる場合、アミノ酸配列は第二のアミノ酸配列と100%「相同」である。したがって、2つのアミノ酸配列の約80%が同一であるおよび／または下に定義される中性もしくは保存的置換のみが異なる場合、アミノ酸配列は第二のアミノ酸配列と約80%「相同」である。

【0064】

機能的に等価なアミノ酸残基は、しばしば配列内の残基と置換されることが可能であり、これは保存的アミノ酸置換をもたらす。かかる変化は、本明細書中で用いられる用語「保存的置換」を定義する。例えば、配列内の1以上のアミノ酸残基は、同様の極性を持つ別のアミノ酸により置換することができ、これは機能的等価物として作用して、サイレントな変化をもたらす。配列内のアミノ酸の置換は、そのアミノ酸が属する分類の他のメンバーから選択され得る。例えば、非極性（疎水性）のアミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニンが挙げられる。芳香環構造を含有するアミノ酸は、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンである。極性の中性アミノ酸としては、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギンおよびグルタミンが挙げられる。正電荷（塩基性）のアミノ酸としては、アルギニン、リジンおよびヒスチジンが挙げられる。負電荷（酸性）のアミノ酸としては、アスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられる。かかる変化は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により決定される見かけの分子量または等電点に影響しないと予想される。

【0065】

特に好ましい保存的置換は：正電荷が維持され得るLysからArg、逆もまた同様；負電荷が維持され得るGluからAsp、逆もまた同様；遊離の—OHが維持され得るSerからThr；および遊離のNH₂が維持され得るGlnからAsnである。アミノ酸はまた、以下の類似群の中に置くこともできる：（1）プロリン、アラニン、グリシン、セリンおよびスレオニン；（2）グルタミン、アスパラギン、グルタミン酸およびアスパラギン酸；（3）ヒスチジン、リジンおよびアルギニン；（4）システイン；（5）バリ

10

20

30

40

50

ン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン；ならびに（６）フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファン。

【００６６】

関連の実施形態において、２つの高度に相同なDNA配列は、それら自体の相同性によって、またはそれらがコードするアミノ酸の相同性によって同定することができる。かかる配列比較は、配列データバンクにおいて利用可能な標準的ソフトウェアを用いて実施することができる。特定の実施形態において、２つの高度に相同なDNA配列は、約８０％の同一性、より好ましくは約９０％の同一性、およびなおより好ましくは約９５％の同一性を持つアミノ酸配列をコードする。より詳細には、２つの高度に相同なアミノ酸配列は、約８０％の同一性、なおより好ましくは約９０％の同一性、およびなおより好ましくは約

10

【００６７】

本明細書中で用いられるタンパク質およびDNAの配列パーセント同一性は、ソフトウェア、例えばAccelrys (Burlington, Massachusetts) から販売されているMacVector v9、およびClustal Wアルゴリズムを用いて、アラインメントデフォルトパラメータおよびデフォルトの同一性パラメーターを使用して決定することができる。例えばThompson, et al., 1994. Nucleic Acids Res. 22:4673-4680を参照されたい。ClustalWは、例えばEMBLI、欧州バイオインフォマティクス研究所 (European Bioinformatics Institute) から、Dos、MacintoshおよびUnixプラットフォーム用に無料でダウンロード可能である。現在のダウンロードリンクは<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>において見出される。これらおよび他の利用可能なプログラムはまた、同じまたは類似したデフォルトパラメータを用いて配列類似性を決定するために用いることもできる。

20

【００６８】

本明細書中で用いられる用語「ポリヌクレオチド」または「核酸」または「核酸分子」は、交換可能に用いられ、限定されるものではないが、RNA、cDNA、ゲノムDNAおよびさらには合成のDNA配列といったヌクレオチドを含む分子を意味する。この用語はまた、当該技術分野で公知のDNAおよびRNAの塩基アナログのいずれかを含む核酸分子を包含することが意図される。

30

【００６９】

核酸「コーディング配列」または特定のタンパク質またはペプチドを「コードする配列」は、適切な調節エレメントの制御下に置かれたときにインビトロまたはインビボで転写されてポリペプチドに翻訳されるヌクレオチド配列である。

【００７０】

コーディング配列の境界は、５'末端における開始コドンおよび３'末端における翻訳停止コドンにより決定される。コーディング配列としては、限定されるものではないが、原核生物の配列、真核生物mRNAからのcDNA、真核生物（例えば鳥類）DNAからのゲノムDNA配列、およびさらには合成のDNA配列を挙げることができる。転写終結配列は、コーディング配列から３'側に位置することができる。

40

【００７１】

「作動可能に連結される」とは、そのように記載された構成成分がそれらの通常の機能を果たすように設定されるエレメントの配置を指す。それゆえに、コーディング配列に作動可能に連結された制御エレメントは、コーディング配列の発現をもたらす能力がある。制御エレメントは、その発現を指示するように機能するかぎり、コーディング配列と近接する必要はない。それゆえに、例えば、翻訳されないが転写される介在性配列がプロモーターとコーディング配列との間に存在することができ、そのプロモーターはやはりコーディング配列に「作動可能に連結される」ものとみなされる。

【００７２】

本明細書中で用いられる用語「転写終結配列」は、用語「ポリアデニル化調節エレメント

50

」と交換可能に用いられ、一般にDNAコーディング領域から下流にあって、そのDNAコーディング配列の転写の完全な終結に必要とされ得る配列である。転写終結因子は、コーディング領域のRNAへの転写の終結に関与する調節性DNAエレメントである。一般に、かかるエレメントは、セクション、例えばヘアピン構造をコードし、これはRNAポリメラーゼ複合体の転写停止を引き起こすことができる二次構造を持つ。それゆえ、転写終結因子は、常に翻訳されることになる領域から停止コドンの下流、3'非翻訳領域にある。

【0073】

本明細書中で用いられる「発現カセット」は、プロモーターおよびそのプロモーターに作動可能に連結された異種コーディング配列を最小限含む組換え核酸である。多くのかかる実施形態において、発現カセットはさらに転写終結配列を含む。したがって、 $rMDV_{np}$ ゲノムの非必須部位への発現カセットの挿入は、 $rMDV_{np}$ による異種コーディング配列の発現を導くことができる。具体的な実施形態において、 $rMDV_{np}$ は $rHVT$ である。代替的实施形態において、 $rMDV_{np}$ は $rMDV2$ である。

【0074】

本明細書中で用いられる「異種ヌクレオチド配列」は、天然において自然に形成されない核酸を形成させるための組換え法によって本発明のヌクレオチド配列に加えられたヌクレオチド配列である。具体的な実施形態において、本発明の「異種ヌクレオチド配列」は、タンパク質抗原、例えばIBDV VP2タンパク質、ILTV gIタンパク質および／またはILTV gDタンパク質をコードすることができる。異種ヌクレオチド配列はまた、融合（例えばキメラ）タンパク質をコードすることもできる。加えて、異種ヌクレオチド配列は、調節性および／または構造的な特性を含むペプチドおよび／またはタンパク質をコードすることができる。他のかかる実施形態において、異種ヌクレオチド配列は、組換え核酸が発現した後に本発明のヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質またはペプチドを検出する手段として機能するタンパク質またはペプチドをコードすることができる。さらに別の実施形態において、異種ヌクレオチド配列は、本発明のヌクレオチド配列を検出する手段として機能することができる。異種ヌクレオチド配列は、制限部位、調節部位、プロモーターなどといった非翻訳領域配列を含むことができる。「異種核酸」は、異種ヌクレオチド配列を含む。

【0075】

本発明の抗原をコードする核酸の $rMDV_{np}$ ベクターへの挿入は、核酸およびベクターの両方がその末端に互換性のある制限部位を含むとき容易に達成される。これがなされ得ない場合は、制限エンドヌクレアーゼ切断により生成される一本鎖核酸オーバーハング（例えばDNAオーバーハング）を再消化することによってヌクレオチド配列および／もしくはベクターの末端を修飾することで平滑末端を生み出すこと、または一本鎖の末端を適切なポリメラーゼで埋めることによって同じ結果を達成することが必要であり得る。あるいは、所望の部位は、例えばその末端にヌクレオチド配列（リンカー）をライゲーションすることにより生み出され得る。かかるリンカーは、所望の制限部位を規定する特異的なオリゴヌクレオチド配列を含み得る。制限部位はまた、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）の使用を通じて生成させることもできる[例えばSaiki et al., Science 239: 487-491 (1988)を参照されたい]。切断されたベクターおよびDNA断片はまた、必要な場合、ホモポリマーテリングにより修飾され得る。

【0076】

タンパク質抗原およびタンパク質抗原をコードする核酸

ILTV gD遺伝子は、48,477ダルトンの分子量を持つ長さ434アミノ酸の糖タンパク質をコードするように見えるが、他者は下流の開始コドンが377アミノ酸残基のみを含むILTV gDタンパク質を導き、これが実際の開始コドンであることを示唆している[Wild et al., Virus Genes 12: 104-116 (1996)]。ILTV gI遺伝子は、39,753ダルトンの分子量を持つ長さ362アミノ酸の糖タンパク質をコードする[U.S. 6,875,856、参照により本明細

10

20

30

40

50

書中に組み込まれる]。ILT_V g_DおよびILT_V g_Iの天然および／または実験室由来のバリエーションをコードする核酸は、目下、例示されるものを置換し得る。

【0077】

本発明の特定の実施形態において、rMDV_{np}は、配列番号：2のアミノ酸配列を含むILT_V g_Dタンパク質またはその抗原性断片をコードする組換え核酸（例えば発現カセット）を含む。関係する実施形態において、rMDV_{np}は、配列番号：2のアミノ酸配列に対して90%より高い、および／または95%より高い、および／または98%より高い、および／または99%より高い同一性を持つアミノ酸配列を含むILT_V g_Dタンパク質をコードする組換え核酸を含む。特定の実施形態において、ILT_V g_Dタンパク質は、配列番号：1のヌクレオチド配列によりコードされる。具体的な実施形態において、rMDV_{np}はrHVTである。代替的实施形態において、rMDV_{np}はrMDV2である。

10

【0078】

本発明のある実施形態において、rMDV_{np}は、配列番号：4のアミノ酸配列を含むILT_V g_Iタンパク質またはその抗原性断片をコードする組換え核酸（例えば発現カセット）を含む。関係する実施形態において、rMDV_{np}は、配列番号：4のアミノ酸配列に対して90%より高い、および／または95%より高い、および／または98%より高い、および／または99%より高い同一性を持つアミノ酸配列を含むILT_V g_Iタンパク質をコードする組換え核酸を含む。特定の実施形態において、ILT_V g_Iタンパク質は、配列番号：3のヌクレオチド配列によりコードされる。具体的な実施形態において、rMDV_{np}はrHVTである。代替的实施形態において、rMDV_{np}はrMDV2である。

20

【0079】

前で言及されるように、IBDVは、ビルナウイルス（Birnaviridae）科のメンバーであり、二本鎖RNAの2つのセグメント（AおよびB）からなるゲノムを持つ。より大きいセグメントAは110kDaのポリタンパク質をコードし、これは続いて自己タンパク分解により切断されることで成熟ウイルスタンパク質VP2、VP3およびVP4を形成する。これらのうち、VP2およびVP3は、ビリオンの構造カプシドタンパク質であり、VP2タンパク質は主要な宿主防御性免疫原である。IBDVの場合、2つの血清型、血清型1型および2型が存在し、これらはウイルス中和（VN）試験により識別することができる。血清型1型ウイルスはニワトリに病原性であることが示されているが、血清型2型IBDVはシチメンチョウにおいて亜急性の疾患のみ引き起こす。歴史的に、IBDV血清型1型ウイルスは、「古典的」IBDVウイルスとして知られる1つの型のみからなるが、その後いわゆる「バリエーション」IBDV株が出現している。本発明の特定の実施形態において、IBDV VP2遺伝子は、古典的な型であるIBDVからのVP2タンパク質をコードする。かかる遺伝子は周知であり、それらの配列情報は容易に入手可能である[例えばGenBank acc. nr: D00869 (F52/70)、D00499 (STC) またはAF499929 (D78) を参照されたい]。あるいは、この遺伝子は、天然から分離された古典的なIBDVのゲノムから、ビルナウイルスを操作するための通例の技術を用いて入手することができる。古典的な型のIBDVは、血清学または分子生物学を用いて容易に同定することができる。

30

40

【0080】

本発明の特定の実施形態において、rMDV_{np}は、配列番号：6のアミノ酸配列を含むIBDV VP2タンパク質またはその抗原性断片をコードする組換え核酸（例えば発現カセット）を含む。関係する実施形態において、rMDV_{np}は、配列番号：6のアミノ酸配列に対して90%より高い、および／または95%より高い、および／または98%より高い、および／または99%より高い同一性を持つアミノ酸配列を含むIBDV VP2タンパク質をコードする組換え核酸を含む。具体的な実施形態において、IBDV VP2タンパク質は、配列番号：5のヌクレオチド配列によりコードされる。具体的な実施形態において、rMDV_{np}はrHVTである。代替的实施形態において、rMDV_n

50

p は r M D V 2 である。

【 0 0 8 1 】

I B D V に対する通例のワクチン接種は、弱毒化された I B D V 株を用いて家禽の一生のなかで可能なかぎり早く実施されるが、これらは I B D V に対する M D A のレベルが十分に低減したときにのみ適用することができ、これは通常は孵化後 1 5 日から 2 0 日までの間のどこかである。多くの「生きた」または不活化された I B D V ワクチンが市販されており、例えば「生きた」ワクチン、例えば N o b i l i s (商 標) G u m b o r o D 7 8 (M e r c k A n i m a l H e a l t h) などがある。

【 0 0 8 2 】

N D V は、サイズが約 1 5 k b である非分節型の一本鎖マイナス鎖 R N A ゲノムを持ち、6 個の遺伝子を含むが、その中にいわゆる「融合」糖タンパク質 (F タンパク質) をコードする N D V F タンパク質遺伝子がある。F タンパク質は N D V の宿主細胞への付着および侵入に関与し、免疫優性タンパク質として N D V に対する有効な免疫応答の基礎となることができる。N D V F タンパク質はネイティブな F 0 タンパク質として発現し、細胞外ペプチダーゼにより切断されて活性化される。

【 0 0 8 3 】

N D V F タンパク質遺伝子は、例えば、通常の弱毒型 (l e n t o g e n i c) N D V ワクチン株である N D V クローン 3 0 に由来するものであることができる。F タンパク質遺伝子の天然および／または実験室由来のバリエーションをコードする核酸は、弱毒型、中等毒型 (m e s o g e n i c) または強毒型 (v e l o g e n i c) N D V のいずれかから等しく適用可能であって、その理由は、F タンパク質遺伝子配列自体はこれらの異なる N D V 病原型において高度に保存されているためである。

【 0 0 8 4 】

プロモーターおよびポリアデニル化調節エレメント

プロモーターは、下流コーディング領域の転写を指示する生物のゲノム上の機能的領域である。それゆえ、プロモーターは、遺伝子コーディング領域の上流にある。プロモーターにより指示される m R N A 合成は、「転写開始部位」 (T S S) から開始する。生産された m R N A は、今度は、オープンリーディングフレーム中の第一の A T G 配列 (m R N A 中の第一の A U G) である遺伝子の開始コドンから始まってタンパク質へと翻訳される。典型的に、T S S は、開始コドンの 3 0 ~ 4 0 ヌクレオチド上流に位置する。T S S は、遺伝子 m R N A の 5 ' 末端を、例えば R A C E 技術によりシーケンスすることによって決定することができる。一般的に、プロモーターは、一般に A + 1 と表示される開始コドンの A の位置の約 1 0 0 0 ヌクレオチド上流の範囲内に含まれ、大半のプロモーターはヌクレオチド - 5 0 0 から A + 1 の間にある。

【 0 0 8 5 】

プロモーターの命名は、通常はそれが発現を制御する遺伝子の名称に基づく。例えば、マウスサイトメガロウイルス最初期 1 遺伝子 (m C M V - I E 1) プロモーター「m C M V - I E 1 遺伝子プロモーター」とは、m C M V の初期 1 遺伝子 (I E 1 遺伝子) の発現を天然で駆動するプロモーターを指し、したがって、その遺伝子のすぐ上流にある。I E 1 遺伝子は十分な裏付けがあって明確に認識可能である遺伝子であることから、およびいくつかの m C M V のゲノムは (全体がまたは部分的に) シーケンスされていることから、かかるプロモーターは通例の技術によって容易に同定することができる。例えば、基本的なプロトコールにおいて、プロモーターは、2 つの連続した遺伝子の間の領域、例えば上流遺伝子のポリ A シグナルから下流遺伝子の T S S までの領域を概略的にサブクローニングすることによって入手することができる。プロモーターは次いで、標準的な試験によって、例えば徐々に小さくした予想プロモーターのセクションによるマーカー遺伝子の発現によって同定することができる。

【 0 0 8 6 】

一般に、プロモーターは多数の認識可能な調節領域、例えばエンハンサー領域などを含有し、これは転写の時期、期間、条件およびレベルに影響する調節因子の結合に関与する。

エンハンサー領域は普通は上流にあるが、プロモーターは、転写因子の結合およびRNAポリメラーゼ自体の指示に関与するより下流の領域も含有する。この下流領域は、一般に、多数の保存されたプロモーター配列エレメント、例えばTATAボックス、CAATボックスおよびGCボックスを含有する。

【0087】

エンハンサーおよび下流領域の両方を含むプロモーターは「完全」プロモーターと称され、一方で下流領域のみを含むプロモーターは「コア」プロモーターと称される。

【0088】

(ウイルス)ベクターにおける(異種)遺伝子の発現のためのプロモーターは、その下流のコーディング配列の転写を効果的に駆動することが可能である必要がある。これは一般に、遺伝子がプロモーターの「制御下にある」またはプロモーターにより「駆動される」ように、プロモーターがコーディング配列に「作動的に連結される」といわれる。これは一般に、発現カセット中で遺伝子のプロモーターおよびコーディング配列が同じ核酸上に有効に近接して見出され、コーディング配列の有効な転写を干渉するシグナルまたは配列がそれらの間にないことを意味する。

【0089】

mCMV-IE1遺伝子プロモーターは当該技術分野で周知であり、種々の商業的供給源から、例えばクローニングおよび発現のための商業的プラスミドの供給業者から容易に入手することができる。IE1遺伝子は、「主要IE遺伝子」とも呼ばれる。mCMV-IE1タンパク質は、pp89ともいわれている。Dorsch-Hasler et al. [Proc. Nat. Acad. Sci., 82:8325-8329 (1985)] は、1985年にmCMV IE1遺伝子プロモーターを記載しており、異種発現におけるこのプロモーターの使用は、WO87/03,905およびEP728,842中にも記載されている。完全なmCMV IE1遺伝子座のヌクレオチド配列は、GenBankからacc.n.r. L06816.1 (2004年3月からのもの)の下で入手可能である。mCMV自体はATCCから：最初はacc.n.r. VR-194の下で入手可能であり、より近年、これはacc.n.r. VR-1399の下で継続されている。

【0090】

本発明の1つの実施形態において、mCMV-IE1遺伝子プロモーターは完全プロモーターであり、mCMV-IE1遺伝子のコアプロモーター領域、並びにエンハンサー領域の両方を含む。完全なmCMV-IE1遺伝子プロモーターのサイズは約1.4 kbである。しかしながら、本発明はまた、mCMV IE1遺伝子プロモーターのみならず、本発明において使用される組換えDNA発現カセットを構成する他のエレメントについても、その長さはいくらかのばらつきを許容する。これは、クローニングおよび構築のために用いられる厳密な条件の相違により生じることがある。例えば、このばらつきは、異なる制限酵素部位、PCRクローニングプライマーを用いることから、または用いられるクローニング分子の末端を適合させるための異なる条件を用いることから生じ得る。その結果として、構成エレメントの長さのいくらかのばらつきより長いまたはより短い一が、発現カセット全体の安定性ならびに比較的強い抗原発現および/または有効性に影響を与えることなく起こり得る。その場合、これらの長さの相違は重要でなく、本発明の範囲内にある。それゆえ、「約1.4 kb」のmCMV-IE1遺伝子プロモーターは：1.4 kb ± 約25%である。特定の実施形態において、プロモーターは1.4 kb ± 約20%である。さらに他の実施形態において、ばらつきは、1.4 kb ± 約15%、1.4 kb ± 約12%、1.4 kb ± 約10%、1.4 kb ± 約8%、1.4 kb ± 約6%、1.4 kb ± 約5%、1.4 kb ± 約4%、1.4 kb ± 約3%、1.4 kb ± 約2%またはさらに1.4 kb ± 約1%であり得る。

【0091】

同様に、等しく有効かつ安定であるプロモーターエレメントのホモログまたはバリエーションが用いられ得る。それゆえ、ある実施形態において、本発明のmCMV-IE1遺伝子プロモーターは、配列番号：10のヌクレオチド配列に対して少なくとも95%、96%、

10

20

30

40

50

97%、98%またはさらには99%のヌクレオチド配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、約1.4 kbのDNA分子であり得る。特定の実施形態において、mCMV-IE1遺伝子プロモーターは、配列番号：10のヌクレオチド配列からなる。

【0092】

本発明のrMDV_{np}におけるタンパク質抗原またはその抗原性断片をコードする異種遺伝子の発現を駆動するため、多くの代替的なプロモーターを用いることができる。例としては、仮性狂犬病ウイルス(PRV) gpXプロモーター [WO87/04463を参照されたい]、ラウス肉腫ウイルスLTRプロモーター、SV40初期遺伝子プロモーター、配列番号：11のヌクレオチド配列を含むニワトリベーターアクチン遺伝子プロモーター、Towne株hCMV IEプロモーター、配列番号：12のヌクレオチド配列を含むhCMV IEプロモーター (AD169株からのもの) の誘導體、配列番号：7のヌクレオチド配列を含むILTV gDプロモーターおよび配列番号：8のヌクレオチド配列を含むILTV gIプロモーター [例えばU.S. 6,183,753 B1を参照されたい]、ヒトサイトメガロウイルス最初期1 (hCMV IE1) 遺伝子プロモーター [U.S. 5,830,745; U.S. 5,980,906]、ならびにニワトリベーターアクチン遺伝子プロモーター [EP1298139 B1] を含む。IBDV VP2遺伝子の特定の異種プロモーターは、マウス (mCMV IE1) サイトメガロウイルスプロモーターである。このタイプの特定の実施形態において、mCMV IE1は、配列番号：10のヌクレオチド配列を含む [例えばEP728,842; PCT/EP2015/081121を参照されたい]。

【0093】

DNAコーディング領域から下流にポリアデニル化調節エレメントを含むことは、コーディングDNA配列の転写を終結させるためにしばしば必要とされる。したがって、多くの遺伝子は、それらのコーディング配列末端の下流にポリアデニル化調節エレメントを含む。多くのかかる調節エレメントが同定されており、本発明のrMDV_{np}において用いることができる。本明細書中に例示されるポリアデニル化調節エレメントの具体例としては、配列番号：13のヌクレオチド配列を含むFHV US-9ポリアデニル化シグナルおよび配列番号：14のヌクレオチド配列を含むHSVチミジンキナーゼポリアデニル化シグナルを含む。

【0094】

ワクチンおよび免疫原性組成物

本発明は、組換えMDV_{np}の使用、MDV_{np}を構築するために用いられる核酸分子もしくはそれらを増殖させるための宿主細胞、または任意のそれらの組み合わせに関し、これらは全て、家禽のためのワクチンの製造のための本発明によるものである。したがって、本発明は、本発明の多価組換えMDV_{np}を包含するワクチンおよび免疫原性組成物を提供する。かかるワクチンは、伝染性ファブリキウス嚢病 (ガンボ口病) および/またはマレック病および/またはILTV感染に関連した病気の予防の援助および/または予防に用いることができる。本発明によるワクチンは、予防的処置のためおよび/または治療的処置のために用いることができ、それゆえに、疾患の感染および/またはその臨床症状の確立および/または進行を妨げることができる。

【0095】

本発明の組換えMDV_{np}は、当該技術分野において現在実行される任意の手段によって増殖させることができる。例えば、本発明の組換えMDV_{np}は、初代ニワトリ細胞のインビトロ培養の使用を通じて増殖させることができ、例えばニワトリ胚線維芽細胞 (CEF) を用いた下の実施例を参照されたい。CEFは、ニワトリ胚のトリプシン処理により調製することができる。CEFはまた、単層に播き、次いでMDV_{np}を感染させることができる。この特定のプロセスは、工業的サイズの生産へと容易にスケールアップすることができる。

【0096】

それゆえ、本発明のさらなる態様は、宿主細胞に本発明の組換えMDV_{np}を感染させ、

感染させた宿主細胞を回収しおよび回収された感染宿主細胞を薬学的に許容される担体と混合するステップを含む、本発明によるワクチンの調製のための方法に関する。感染、培養および回収に適した方法は当該技術分野で周知であり、本明細書中に記載され例示される。

【0097】

典型的に、感染させた宿主細胞は、組換えMDVnpをその細胞随伴性形態で得るためにインタクトなままで回収される。これらの細胞は、保存および凍結のために、安定化を提供するための適切な担体組成物中に取り入れることができる。感染細胞は、ガラスアンプル中に充填し、これを密封し、凍結して液体窒素中で保存することができる。したがって、本発明のある実施形態において、本発明のワクチンおよび免疫原性組成物は凍結保存され、したがって、凍結感染細胞を保存するために、例えばジメチルスルホキシド（DMSO）のような凍結保存剤（cryopreservative）を含む。

10

【0098】

あるいは、組換えMDVnpが組換えHVTであるとき、これをその宿主細胞から例えば培養終了時に超音波処理を通じて分離し、次いで安定剤中に取り入れ、安定保存のために凍結乾燥（freeze-dried、lyophilized）するか、または、或いは保存のために液量を低減させ、次いで投与の前または投与時に液体希釈剤中で再構成することができる。かかる再構成は、例えばワクチングレードの水を用いて達成し得る。ある実施形態において、多価ワクチンの凍結乾燥された部分は1以上の抗原を含むことができ、希釈剤は1以上の他の抗原を含むことができる。

20

【0099】

特定の実施形態において、本発明のワクチン（またはその一部）は、凍結乾燥形態、例えばWO2010/125084中に記載される方法により生産される錠剤および／またはスフェア剤（sphere）であることができ、この文献はその全体が参照により本明細書中に組み込まれる。特に、WO2010/125084の第15頁28行目から第27頁9行目までの例への参照がなされ、ここではかかる速崩壊性錠剤／スフェア剤を生産するための方法を記載している。かかる凍結乾燥形態は、希釈剤中に容易に溶解させることができ、ワクチンの全身投与を可能にする。

【0100】

ワクチンおよび免疫原性組成物は、生理学的に適合性のあるバッファーおよび生理食塩水など、並びに薬学的に許容されるアジュバントを包含することができるが、必然的に包含するものではない。アジュバントは、免疫応答の改良および／またはワクチン製剤の安定性の増大のために有用であることができる。アジュバントは、免疫系の非特異的刺激物質として典型的に記載されるが、また免疫系の特異的な武器（arm）を標的化するために有用であり得る。この活性を持つ1以上の化合物がワクチンに加えられ得る。それゆえ、本発明の特定のワクチンは、さらにアジュバントを含むことができる。アジュバントとして用いることができる化合物の例としては、限定されるものではないが、アルミニウム化合物（例えば水酸化アルミニウム）、代謝性および非代謝性の油、ミネラルオイル溶液中のオレイン酸マンニド（mannide oleate）誘導体を含むミネラルオイル（例えばSeppic SA, FranceからのMONTANIDE ISA 70）、およびDRAKEOL 6VRのような軽油、ブロックポリマー、ISCOM's（免疫刺激性複合体）、ビタミンおよびミネラル（限定されるものではないが：ビタミンE、ビタミンA、セレンおよびビタミンB12）ならびにCARBOPOL（登録商標）を含む。

30

40

【0101】

他の好適なアジュバントは、時に免疫刺激物質といわれているものであり、これらとしては限定されるものではないが：サイトカイン、増殖因子、ケモカイン、リンパ球の細胞培養物からの上清、単球、リンパ器官からの細胞、植物、細菌もしくは寄生生物からの細胞調製物および／もしくは抽出物（スタフィロコッカス・アウレウス（Staphylococcus aureus）またはリポ多糖調製物）またはマイトジェンを含む。一般に、アジュバントは、本発明の抗原と同時に投与される。しかしながら、アジュバントはま

50

た、あるいは代替的に、ワクチン接種の2週間前以内および／またはワクチン接種後の期間に、すなわち、抗原例えば本発明の組換えMDV_{np}が組織中に残存するかぎり投与することができる。

【0102】

本発明のワクチンおよび免疫原性組成物は、任意の経路によって、例えば卵内に、筋肉内注射、皮下注射、静脈内注射、皮内注射を含む非経口投与によって、乱刺によって、経口投与によって、またはそれらの任意の組み合わせによって投与され得る。

【0103】

さらには、本発明の多価組換えMDV_{np}は、提供される免疫原性を改良して拡大するために付加的なIBDV、ILTVおよび／またはMDV抗原と、および／または他の病原体に対する免疫防御を提供するために他の病原体（例えばNDV）の抗原と共に用い、および／または組み合わせることができる。これらの付加的な抗原は、それらが本発明によるワクチンの安全性ならびに比較的強い抗原発現および／または有効性を伴った安定性をネガティブに妨げないかぎり、生きたまたは死滅させた微生物全体、他の組換えベクター、細胞ホモジネート、抽出物、タンパク質または任意の他のかかる派生物であり得る。

【0104】

本発明の多価組換えMDV_{np}と付加的なMDV、IBDVおよび／またはILTV抗原との組み合わせは、MDV、IBDVまたはILTVの非常に病毒性の高い野外株が蔓延している場合、例えば特定の地域において有利であり得る。これに関して、本発明の多価組換えMDV_{np}とMDV1、MDV2またはHVTとの組み合わせは、Rispen s (MDV1) 株、SB1 (MDV2) 株、FC-126 (HVT) 株および／またはPB1 (HVT) 株を包含する。IBDVに対する応答を改良するため、多価組換えMDV_{np}は、多価ワクチン中で、IBDVワクチン株、例えば軽度の生きたIBDVワクチン株、例えばD78 (クローン化された中等度の株)、PBG98、Cu-1、ST-12 (中等度の株) または89/03 (生きたDelawareバリエーション株) と組み合わせ得る。

【0105】

本発明の多価組換えMDV_{np}と一緒に抗原として用いることができる他の微生物の例としては：(i) ウイルス、例えば伝染性気管支炎ウイルス、アデノウイルス、産卵低下症候群ウイルス、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス、ニワトリ貧血ウイルス、鳥類脳脊髄炎ウイルス、鶏痘ウイルス、シチメンチョウ鼻気管炎ウイルス、アヒルペストウイルス (アヒルウイルス性腸炎)、ハトボックスウイルス、鳥類白血病ウイルス、鳥類ニューモウイルスおよびレオウイルスなど、(ii) 細菌、例えばエシェリキア・コリ (*Escherichia coli*)、サルモネラ属種 (*Salmonella spec.*)、オルニトバクテリウム・ライノトラキアレ (*Ornithobacterium rhinotracheale*)、ヘモフィリス・パラガリナルム (*Haemophilis paragallinarum*)、パスツレラ・ムルトシダ (*Pasteurella multocida*)、エリシペロスリクス・ルジオパシエ (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、エリシペラス属種 (*Erysipelas spec.*)、マイコプラズマ属種 (*Mycoplasma spec.*) およびクロストリジウム属種 (*Clostridium spec.*) など、(iii) 寄生生物、例えばアイメリア属種 (*Eimeria spec.*) など、ならびに(iv) 真菌、例えばアスペルギルス属種 (*Aspergillus spec.*) などが挙げられる。本発明の特定の実施形態において、本発明の組換えMDV_{np}は、軽度の生きたNDVワクチン株、例えばワクチン株C2などと組み合わせることができる。かかる株の多くは商業的ワクチンにおいて用いられる。

【0106】

組み合わせワクチンは、本発明の組換えMDV_{np}をウイルスもしくは細菌もしくは真菌もしくは寄生生物もしくは宿主細胞の調製物と、またはこれらのいずれかおよび／もしくは全ての混合物と組み合わせることによるものを包含する種々の方法で作製することがで

10

20

30

40

50

きる。特定の実施形態において、かかる組み合わせワクチンの構成成分は、好都合には別々に生産され、次いで組み合わされて同じワクチン容器内に充填される。

【0107】

上記のように、本発明によるワクチンは、非常に若齢時のまたは卵内への単回接種によって、複数の疾患に対する家禽における安全で有効な免疫防御を提供するために好都合に用いることができる。あるいは、家禽ワクチンの技術分野における当業者に明らかであるように、上記の組み合わせはまた、本発明の多価組換えMDV_{np}と付加的な抗原とが同時に適用されないワクチン接種スケジュールを包含することもでき；例えば組換えMDV_{np}は卵内に適用され得て、NDV C2および／またはIBDV株（例えば89／03）は同時／同日に適用することができる。

10

【0108】

したがって、本発明のワクチンは、単回用量でまたは複数回用量で鳥類対象に投与することができる。例えば、本発明のワクチンは、孵化日に、および／または16～18日の胚形成日数（Embryonation Day）において卵内に適用され得る。複数回用量が投与されるとき、それらは同時または逐次的のいずれかで、ワクチン製剤に適合性のある方法および時間で、免疫学的に有効であるような量で与えられ得る。それゆえ、本発明のワクチンは、プライミングワクチン接種として効果的に働き得て、これはその後同一のワクチンのブースターワクチン接種によって、または異なるワクチン製剤、例えば古典的な不活化されアジュバント化された全粒子ウイルスワクチンを使用して増幅することができる。

20

【0109】

本発明のワクチンの用量あたりの量は、意図される適用経路に応じて最適化することができる：卵内接種は通常0.05から0.5ml／卵の間の量で適用され、非経口注射は通常0.1から1ml／トリの間の量で行われる。いずれの場合も、ワクチン用量の量の最適化は、十分に当業者の能力の範囲内にある。

【0110】

配列表

30

40

50

【表 1】

配列番号:	説明	タイプ
1	ILTV gD 糖タンパク質	核酸
2	ILTV gD 糖タンパク質	アミノ酸
3	ILTV gI 糖タンパク質	核酸
4	ILTV gI 糖タンパク質	アミノ酸
5	IBDV VP2	核酸
6	IBDV VP2	アミノ酸
7	ILTV gD プロモーター	核酸
8	ILTV gI プロモーター	核酸
9	ILTV インサート	核酸
10	mCMV IE プロモーター	核酸
11	ニワトリ β -アクチンプロモーター	核酸
12	hCMV IE プロモーター (AD169 株からのもの)	核酸
13	FHV US-9 ポリアデニル化シグナル	核酸
14	HSV TK ポリアデニル化シグナル	核酸
15	228509-ILT-435Vec6 (HVT/IBDV/ILT 1386-134) mCMV IEpro-VP2-SV40pA/ILT/HVT	核酸
16	1333-85.B6 (HVT/ILT/IBDV 1386-48.1.1.1) ILT/ニワトリ β -アクチン pro-VP2-FHV US9pA/HVT	核酸
17	1386-04.4#1 (HVT/ILT/IBDV 1386-48.3.1.7) ILT/hCMV IEpro-VP2-HSV TKpA/HVT	核酸
18	484-1050-2641-10859 (HVT/IBDV/ILT 484) mCMV IEpro-VP2-SV40pA/ILT/HVT	核酸
19	SV40 ポリアデニル化シグナル	核酸

【0111】

本発明は以下の限定されない例への参照によってより良く理解され得るものであり、これらは本発明の例示として提供されるものである。以下の例は本発明の実施形態をより十分に説明するために表されるものであり、決して本発明の幅広い範囲を限定するものとして解釈されるべきものではない。

【実施例】

【0112】

実施例 1

組換え HVT / ILTV / IBDV ウイルスベクターの構築

伝染性喉頭気管炎ウイルスおよび伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス両方のタンパク質抗

原をコードして発現する組換え多価非病原性マレック病ウイルスコンストラクトを調製した。本発明は、2つの組換えHVTワクチン、例えばInnovax（登録商標）-ILT（Merck Animal Healthにより販売）およびVaxxitek（登録商標）（Merck Animal Healthにより販売）が同じ動物に与えられたときに遭遇するワクチン干渉の問題を克服する。

【0113】

2つの家禽病原体、伝染性喉頭気管炎ウイルス（ILTV）および伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス（IBDV）からの抗原性ドナー材料をシチメンチョウヘルペスウイルス（HVT）ベクター内に挿入した組換えウイルスコンストラクトを作った〔US 8, 932, 604 B2, WO 2013/057, 235およびWO 2016/102647も参照されたい。これら全ての内容は、その全体が参照により本明細書中に組み込まれる〕。ドナー材料は、ILTVのNVSL Challenge株Lot #83-2からの糖タンパク質D（gD）および糖タンパク質I（gI）の完全長遺伝子、これにプラスして糖タンパク質Eからの部分的コーディング領域（アミノ酸1～101）およびORF5（アミノ酸734～985）をコードする3.563 kbのSalI-HindIII断片〔位置10532～14094；Wild et al., Virus Genes 12: 104-116（1996）；Acc. #U28832〕；ならびにIBDV、Fargher、F52/70型株のウイルスタンパク質2（vp2）遺伝子のコーディング領域からなる発現カセットを包含し、これらは真核生物またはウイルスのプロモーターにより駆動され、また後ろに転写終結配列を持つ。本実施形態において、VP2発現を駆動するプロモーターは、ヒトサイトメガロウイルス（hCMV）AD169株の最初期（IE）遺伝子からの、ニワトリベクターアクチン（cβ-act）遺伝子からの、またはマウスサイトメガロウイルス（mCMV）株ATCC VR-194のIE遺伝子からのものであり得る。転写終結配列およびポリアデニル化配列は、ヒト単純ヘルペスウイルス（HSV）チミジンキナーゼ（TK）遺伝子からの、ネコヘルペスウイルス（FHV）の糖タンパク質B（gB）遺伝子からの、ヒトサイトメガロウイルス（hCMV）AD169株の最初期（IE）遺伝子からの、またはシミアンウイルス40（SV40）からのものであり得る。ドナー材料は、HVTベクター中の2つの非必須部位であるUS2部位〔位置140540/140541、Afonso et al., J. Virology 75（2）：971-978（2001）；Acc. #AF291866、アミノ酸残基124から125の間〕もしくはUL54.5部位〔位置111240/111241、上のAfonso et al., 2001；Acc. #AF291866、アミノ酸残基21から22の間〕のうちの1つに、または1つのインサートが各部位の中に挿入され得る。

【0114】

遺伝的および表現型の安定性は、任意の新たな組換えウイルスワクチン候補の安全性ならびに比較的強い抗原発現および／または有効性プロファイルの主要な要素である。HVT骨格内に挿入されたIBDVおよびILTV発現カセットは、ウイルスの複製のために本来的に必要ではなく、それゆえ組織培養継代におけるウイルスストックの増幅の際の変異が原因で失われ得る。満足なワクチン候補は、外来遺伝子インサートの発現を失うように容易に変異してはならない。ワクチン候補は、組織培養における10回以上の継代の後、少なくとも90%のウイルスプラークが挿入された外来抗原性タンパク質を発現することを実証することができる場合には安定であると考えられる。

【0115】

実施例2

組換えHVT/ILTV/IBDVウイルスベクターの構築

この方法によってヘルペスウイルスを作成することができることは、以前に仮性狂犬病ウイルスについて実証されている〔van Zijl et al., J. Virology 62: 2191-2195（1988）〕。その後について、この手法を使って組換えHVTベクターが構築され〔U.S. 5, 853, 733を参照されたい。この文献は、組

10

20

30

40

50

換えHVTベクターの構築に関して開示された方法論について、参照により本明細書中に組み込まれる]、これを用いて本発明の組換えHVT/ILTV/IBDVベクターが構築された。この方法において、HVTの全ゲノムは、標準的な組換えDNA技術を利用して構築されたいくつかの大きなオーバーラップするサブゲノム断片として、細菌ベクター内にクローニングされる [Maniatis et al., (1982) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York (1982); および Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York (1989)]。HVT株FC126コスミドライリーは、コスミドベクターpWE15 (Stratagene、現在はAgilent Technologies, Santa Clara, Calif.) 内にクローニングされた剪断ウイルスDNAに由来するものであった。加えて、いくつかの大きなゲノムDNA断片を酵素BamHIでの制限消化により分離し、pWE15またはプラスミドベクターpSP64 (Promega, Madison Wis.) のいずれかの中にクローニングした。U. S. 5, 853, 733中に記載されるように、ニワトリ胚線維芽細胞 (CEF) へのこれらの断片のコトランスフェクションは、オーバーラップする断片の領域を横断する相対的組換えにより媒介されるHVTゲノムの再生をもたらす。コトランスフェクションの前に挿入物が1以上のサブゲノム断片の中に入るように直接操作される場合、この手法は挿入物を含有するウイルスを高頻度にもたらす。5個のオーバーラップするサブゲノムクローンがHVT/FC126HVTを作成するために必要であり、全てのHVT/ILTV/IBDV組換えウイルスを作るための基礎として働いた。

【0116】

HVT/ILTV/IBDV 1386-134. 1-2の構築: [図2中に表現される1386-134を参照されたい]

HVT/ILTV/IBDV 1386-134. 1-2のコスミド再建は、本質的にU. S. 5, 853, 733 [例えばU. S. 5, 853, 733の図8; 本明細書の図1中に少なくとも部分的に再描写] 中に記載されるように実施した。FC126 HVTゲノムのUS領域内への組込みを可能にするため、U. S. 5, 853, 733中でコスミドnr. 378-50によりカバーされる領域を、ここでは3つのより小さいプラスミド: pSY640および556-60. 6、ならびにこれら2つとオーバーラップしていて、US2遺伝子座内にIBDV/ILTV発現カセットを含有する1つのトランスファープラスミド (228509-ILTV-435Vec6) から用意した。7個の直線化されたコンストラクトのセット: 3個のコスミドおよび4個のプラスミドを全て一緒にCEF内に、標準的なCaCl₂トランスフェクションプロトコルを用いてトランスフェクトし、得られたウイルスストックを2回プラーク精製した。

【0117】

HVT/ILTV/IBDV 1386-48. 1. 1. 1の構築: [図2中に表現される1386-48を参照されたい]

HVT/ILTV/IBDV 1386-48. 1. 1. 1のコスミド再建は、本質的にU. S. 5, 853, 733 [例えばU. S. 5, 853, 733の図8; 本明細書の図1中に少なくとも部分的に再描写] 中に記載されるように実施した。FC126 HVTゲノムのUS領域内への組込みを可能にするため、U. S. 5, 853, 733中でコスミドnr. 378-50によりカバーされる領域を、ここでは3つのより小さいプラスミド: pSY640および556-60. 6、ならびにこれら2つとオーバーラップしていて、US2遺伝子座内にIBDV/ILTV発現カセットを含有する1つのトランスファープラスミド (1333-85. B6) から用意した。7個の直線化されたコンストラクトのセット: 3個のコスミドおよび4個のプラスミドを全て一緒にCEF内に、標準的なCaCl₂トランスフェクションプロトコルを用いてトランスフェクトし、得られたウイルスストックを2回プラーク精製した。

【0118】

HVT/I LT/I BDV 1386-48.3.1.7の構築：[図2中に表現される1386-48を参照されたい]

HVT/I LT/I BDV 1386-48.3.1.7のコスミド再建は、本質的にU.S. Pat. No. 5, 853, 733 [例えばU.S. 5, 853, 733の図8；本明細書の図1中に少なくとも部分的に再描写]中に記載されるように実施した。FC126 HVTゲノムのUS領域内への組込みを可能にするため、U.S. 5, 853, 733中でコスミドnr. 378-50によりカバーされる領域を、ここでは3つのより小さいプラスミド：pSY640および556-60.6、ならびにこれら2つとオーバーラップしていて、US2遺伝子座内にIBDV/I LT V発現カセットを含有する1つのトランスファープラスミド(1386-04.4#1)から用意した。7個の直線化されたコンストラクトのセット：3個のコスミドおよび4個のプラスミドを全て一緒にCEF内に、標準的なCaCl₂トランスフェクションプロトコルを用いてトランスフェクトし、得られたウイルスストックを2回プラーク精製した。

10

【0119】

HVT/I LT/I BDV 484の構築：[図2中に表現される1386-484を参照されたい]

HVT/I LT/I BDV 484のコスミド再建は、本質的にU.S. 5, 853, 733 [例えばU.S. 5, 853, 733の図8；本明細書の図1中に少なくとも部分的に再描写]中に記載されるように実施した。FC126 HVTゲノムのUL54.5領域内への組込みを可能にするため、U.S. 5, 853, 733中でコスミドnr. 407-32.1C1によりカバーされる領域を、ここでは3つのより小さいプラスミド：672-01.A40および672-07.C40、ならびにこれら2つとオーバーラップしていて、UL54.5遺伝子座内にIBDV/I LT V発現カセットを含有する1つのトランスファープラスミド(484-1050-2641-10859)から用意した。7個の直線化されたコンストラクトのセット：4個のコスミドおよび3個のプラスミドを全て一緒にCEF内に、標準的なCaCl₂トランスフェクションプロトコルを用いてトランスフェクトし、得られたウイルスストックを2回プラーク精製した。

20

【0120】

FC126 HVTを作成するためのサブゲノム断片の説明：

30

サブゲノムクローン407-32.2C3

コスミド407-32.2C3は、およそ40,170塩基対のゲノムHVT DNA領域[左側の末端-位置39,754；上のAfonso et al., 2001；Acc.#AF291866]を含有する。この領域は、HVT BamHI断片F'、L、P、N1、E、D、および断片Bのうちの2,092塩基対を包含する。

【0121】

サブゲノムクローン172-07.BA2

プラスミド172-07.BA2は、25,931塩基対のゲノムHVT DNA領域を含有する。これは、HVT BamHI B断片[位置37,663から63,593；上のAfonso et al., 2001；Acc.#AF291866]をプラスミドpSP64(Promega, Madison Wis.)内にクローニングすることにより構築した。

40

【0122】

サブゲノムクローン407-32.5G6

コスミド407-32.5G6は、39,404塩基対のゲノムHVT DNA領域[位置61,852~101,255；上のAfonso et al., 2001；Acc.#AF291866]を含有する。この領域は、HVT BamHI断片H、C、Q、K1、M、K2、これにプラスして断片Bのうちの1,742塩基対および断片Jのうちの3,880塩基対を包含する。

【0123】

50

サブゲノムクローン 407-31.1C1

コスミド 407-31.1C1 は、37,444 塩基対のゲノム HVT DNA 領域 [位置 96,095~133,538; 上の Afonso et al., 2001; Acc. #AF291866] を含有する。この領域は、HVT BamHI 断片 J、G、I、F、O、これにプラスして断片 K2 のうちの 1,281 塩基対および断片 A のうちの 6,691 塩基対を包含する。

【0124】

サブゲノムクローン 378-50

コスミド 378-50 は、28,897 塩基対のゲノム HVT DNA 領域 [U.S. 5,853,733 の図 8 を参照されたい; 本明細書の図 1 中に少なくとも部分的に再描写] を含有する。この領域は、HVT BamHI 断片 A を包含する。これは、HVT BamHI A 断片 [位置 126,848~155,744; 上の Afonso et al., 2001; Acc. #AF291866] をコスミド pWE15 内にクローニングすることにより構築した。

【0125】

HVT/ILT/IBDV 1386-134.1-2 を作成するための付加的な挿入断片:

サブゲノムクローン 228059-ILT-435Vec6

挿入プラスミド 228059-ILT-435Vec6 は、プラスミド pSP64 (Promega, Madison, WI.) 内にクローニングされた 7311 塩基対の HVT ユニークショート領域 EcoRI 断片 [位置 126880-144190; 上の Afonso et al., 2001; Acc. #AF291866] を含有する。HVT US2 遺伝子内の固有の StuI 部位 [位置 140540/140541; 上の Afonso et al., 2001; Acc. #AF291866、アミノ酸残基 124 と 125 の間] に挿入されるのは、2つのエレメント: mCMV IE プロモーター、IBDV の古典型 F52/70、Faragher 株のウイルスタンパク質 2 遺伝子 (VP2) および SV40 ポリアデニル化シグナルからなる発現カセット、その後に糖タンパク質 D (gD) および糖タンパク質 I (gI) の完全長遺伝子、これにプラスして糖タンパク質 E からの部分的コーディング領域 (アミノ酸 1~101) および ORF5 (アミノ酸 734~985) をコードする ILTV の NVSL Challenge 株 Lot #83-2 からの 3563 塩基対の SalI-HindIII 断片 [位置 10532~14094; Wild et al., Virus Genes 12:104-116 (1996): Acc. #U28832] である。IBDV VP2、ILTV gD および ILTV gI 遺伝子は、HVT US2 遺伝子に対して逆向きに転写される。

【0126】

サブゲノムクローン pSY640

プラスミド pSY640 は、BamHI 断片 A に由来するおよそ 13,600 塩基対のゲノム HVT DNA 領域 (位置 126848~140540; 上の Afonso et al., 2001; Acc. #AF291866) を含有する。このプラスミドを作成するため、US2 遺伝子の上流に位置し、US2 遺伝子内に位置する StuI 部位から始まって BamHI A 断片の末端まで続く DNA 領域を、プラスミド pSP64 (Promega, Madison WI.) 内にクローニングした。

【0127】

サブゲノムクローン 556-60.6

プラスミド 556-60.6 は、BamHI 断片 A に由来するおよそ 12,500 塩基対のゲノム HVT DNA 領域 (およそその位置 143300~155744; 上の Afonso et al., 2001; Acc. #AF291866) を含有する。このプラスミドを作成するため、US2 遺伝子の下流に位置する DNA 領域 (US2 遺伝子内に位置する StuI 部位から始まって BamHI A 断片の末端まで続く) を pSP64 (Promega, Madison WI.) 内にクローニングし、次いでエンドヌクレアー

10

20

30

40

50

ぜで処理することでStuI部位から約150bpを「チューバック(chew back)」し、pBR322プラスミドベクター内に再クローニングした。

【0128】

HVT/ILT/IBDV 1386-48. 1. 1. 1を作成するための付加的な挿入断片：

サブゲノムクローン1333-85. B6

挿入プラスミド1333-85. B6は、プラスミドpSP64 (Promega, Madison, WI.) 内にクローニングされた7311塩基対のHVTユニークショート領域EcoRI断片[位置126880~144190; 上のAfonso et al., 2001; Acc. #AF291866]を含有する。HVT US2遺伝子内の固有のStuI部位[位置140540/140541; 上のAfonso et al., 2001; Acc. #AF291866、アミノ酸残基124と125の間]に挿入されるのは、2つのエレメント：糖タンパク質D(gD)および糖タンパク質I(gI)の完全長遺伝子、これにプラスして糖タンパク質Eからの部分的コーディング領域(アミノ酸1~101)およびORF5(アミノ酸734~985)をコードするILTVのNVSL Challenge株Lot #83-2からの3563塩基対のSalI-HindIII断片[位置10532~14094; Wild et al., Virus Genes 12:104-116(1996); Acc. #U28832]、ならびにニワトリβ-アクチンプロモーター、IBDVの古典型F52/70、Faragher株のウイルスタンパク質2遺伝子(VP2)およびネコヘルペスウイルス(FHV)糖タンパク質B遺伝子からのポリアデニル化シグナルからなる発現カセットである。ILTV gD、ILTV gIおよびIBDV VP2遺伝子は、HVT US2遺伝子に対して逆向きに転写される。

【0129】

サブゲノムクローンpSY640

プラスミドpSY640は、BamHI断片Aに由来するおよそ13,600塩基対のゲノムHVT DNA領域(位置126848~140540; 上のAfonso et al., 2001; Acc. #AF291866)を含有する。このプラスミドを作成するため、US2遺伝子の上流に位置し、US2遺伝子内に位置するStuI部位から始まってBamHI A断片の末端まで続くDNA領域を、プラスミドpSP64 (Promega, Madison WI.) 内にクローニングした。

【0130】

サブゲノムクローン556-60. 6

プラスミド556-60. 6は、BamHI断片Aに由来するおよそ12,500塩基対のゲノムHVT DNA領域(およそその位置143300~155744; 上のAfonso et al., 2001; Acc. #AF291866)を含有する。このプラスミドを作成するため、US2遺伝子の下流に位置するDNA領域(US2遺伝子内に位置するStuI部位から始まってBamHI A断片の末端まで続く)をpSP64 (Promega, Madison WI.) 内にクローニングし、次いでエンドヌクレアーゼで処理することでStuI部位から約150bpを「チューバック(chew back)」し、pBR322プラスミドベクター内に再クローニングした。

【0131】

HVT/ILT/IBDV 1386-48. 3. 1. 7を作成するための付加的な挿入断片：

サブゲノムクローン1386-04. 4#1

挿入プラスミド1386-04. 4#1は、プラスミドpSP64 (Promega, Madison, WI.) 内にクローニングされた7311塩基対のHVTユニークショート領域EcoRI断片[位置126880~144190; 上のAfonso et al., 2001; Acc. #AF291866]を含有する。HVT US2遺伝子内の固有のStuI部位[位置140540/140541; 上のAfonso et al.,

2001; Acc. # AF291866、アミノ酸残基124と125の間]に挿入されるのは、2つのエレメント：糖タンパク質D (gD) および糖タンパク質I (gI) の完全長遺伝子、これにプラスして糖タンパク質Eからの部分的コーディング領域 (アミノ酸1~101) およびORF5 (アミノ酸734~985) をコードするILTVのNVSL Challenge株Lot #83-2からの3563塩基対のSalI-HindIII断片 [位置10532~14094; Wild et al., Virus Genes 12:104-116 (1996); Acc. # U28832]、ならびに、hCMV IEプロモーター、IBDVの古典型F52/70、Faragher株のウイルスタンパク質2遺伝子 (VP2) および単純ヘルペスウイルス (HSV) チミジンキナーゼ遺伝子からのポリアデニル化シグナルからなる発現カセットである。ILTV gD、ILTV gIおよびIBDV VP2遺伝子は、HVT US2遺伝子に対して逆向きに転写される。

【0132】

サブゲノムクローン pSY640

プラスミド pSY640は、BamHI 断片Aに由来するおよそ13,600塩基対のゲノムHVT DNA領域 (位置126848~140540; 上のAfonso et al., 2001; Acc. # AF291866) を含有する。このプラスミドを作成するため、US2遺伝子の上流に位置し、US2遺伝子内に位置するStuI部位から始まってBamHI A断片の末端まで続くDNA領域を、プラスミド pSP64 (Promega, Madison WI.) 内にクローニングした。

【0133】

サブゲノムクローン 556-60.6

プラスミド 556-60.6は、BamHI 断片Aに由来するおよそ12,500塩基対のゲノムHVT DNA領域 (およそその位置143300~155744; 上のAfonso et al., 2001; Acc. # AF291866) を含有する。このプラスミドを作成するため、US2遺伝子の下流に位置するDNA領域 (US2遺伝子内に位置するStuI部位から始まってBamHI A断片の末端まで続く) を pSP64 (Promega, Madison WI.) 内にクローニングし、次いでエンドヌクレアーゼで処理することでStuI部位から約150bpを「チューバック (chew back)」し、pBR322プラスミドベクター内に再クローニングした。

【0134】

HVT/ILTV/IBDV 484を作成するための付加的な挿入断片:

サブゲノムクローン 484-1050-2641-10859

挿入プラスミド 484-1050-2641-10859は、プラスミド pNEB193の誘導体 (AatII-PvuIIを欠失) 内にクローニングされた8636塩基対のゲノムHVTユニーククローニング領域 [位置109489~118124; 上のAfonso et al., 2001; Acc. # AF291866] を含有する。これはAscI部位に隣接しており、HVT BamHI断片I、S、これにプラスして断片Gのうちの1337塩基対および断片Fのうちの1177塩基対を包含する。HVT UL54.5オープンリーディングフレーム内のXhoI部位 [位置111240/111241; 上のAfonso et al., 2001; Acc. # AF291866、アミノ酸残基21と22の間] に挿入されるのは、2つのエレメント：mCMV IEプロモーター、IBDVの古典型F52/70、Faragher株のウイルスタンパク質2遺伝子 (VP2) およびSV40ポリアデニル化シグナルからなる発現カセット、その後に糖タンパク質D (gD) および糖タンパク質I (gI) の完全長遺伝子、これにプラスして糖タンパク質Eからの部分的コーディング領域 (アミノ酸1~101) およびORF5 (アミノ酸734~985) をコードするILTVのNVSL Challenge株Lot #83-2からの3563塩基対のSalI-HindIII断片 [位置10532~14094; Wild et al., Virus Genes 12:104-116 (1996); Acc. # U28832] である。IBDV VP2、ILTV gDおよびILTV

10

20

30

40

50

g I 遺伝子は、HVT UL54.5 遺伝子に対して逆向きに転写される。

【0135】

サブゲノムクローン 672-01. A40

プラスミド 672-01. A40 は、プラスミド pNEB193 の誘導体内にクローニングされた、ユニークロング領域由来の 14,731 塩基対のゲノム HVT DNA 領域 [位置 96095~110825; 上の Afonso et al., 2001; Acc. # AF291866] を含有する。この領域は、HVT BamHI 断片 G、J、および K2 のうちの 1281 塩基対を包含する。

【0136】

サブゲノムクローン 672-07. C40

プラスミド 672-07. C40 は、プラスミド pNEB193 の誘導体内にクローニングされた、ユニークロング領域由来の 12,520 塩基対のゲノム HVT DNA 領域 [位置 116948~129467; 上の Afonso et al., 2001; Acc. # AF291866] を含有する。この領域は、HVT BamHI 断片 F、O、および A のうちの 2620 塩基対を包含する。

【0137】

標準的な CaCl₂ トランスフェクションプロトコール:

2 代目の CEF を 6 ウェル培養プレート上に播種し、38℃、5% CO₂ で 24 時間インキュベートし、コンフルエントな単層を形成させる。各ウェルについて総量 0.5 μg DNA のコスミドおよびプラスミドを Hepes バッファー中で混合し、沈殿が今にも生じそうになるまで 125 mM CaCl₂ を滴下して加えた。この混合物を CEF 細胞単層に加え、2 から 3 時間インキュベートした。上清を除去し、15% グリセロールの上層を加え、細胞上で 1 分間維持した。次いでこれを除去し、PBS で洗浄し、新鮮な培地を加え、細胞を 5 日間インキュベートした。次に細胞をトリプシン処理により回収し、個々のプレートからの細胞を 10 cm プレート内の CEF 細胞の新鮮な単層上に各々播種し、50~90% CPE を達成するまでインキュベートした。次に増幅されたトランスフェクト細胞をトリプシン処理により回収し、10⁻² から 10⁻⁴ の希釈物を、CEF 単層を有する 10 cm プレート上に播いてインキュベートした。翌日、プレートを寒天で覆い、HVT/ILTV/IBDV の多数の個々のプラークを分離して CEF 上で増幅した。10 cm プレート上のコンフルエントな CEF 単層に 10⁻² から 10⁻⁴ に希釈した 1 回目の精製ストックを感染させて細胞をインキュベートすることによって、各ウイルスストックの 2 回目のプラーク精製を行った。翌日、プレートを寒天で覆い、HVT/ILTV/IBDV の多数の個々のプラークを分離して CEF 上で増幅した。

【0138】

実施例 3

組換え HVT/ILTV/IBDV ウイルスストックは、組織培養における連続継代の後、ILT および IBDV タンパク質の発現について表現型的に安定である

3 つのコンストラクト、HVT/IBDV/ILT 1386-134.1-2 を含む 1 つ目のもの、HVT/ILT/IBDV 1386-48.1.1.1 を含む第二のもの、および HVT/ILT/IBDV 1386-48.3.1.7 を含む第三のものを 2 代目の CEF 細胞上で 14 回より多く連続継代し、挿入された ILTV および IBDV 遺伝子の発現を免疫蛍光アッセイにおいて評価した。HVT/ILT/IBDV 484.1-1A3A3 と称する第四のコンストラクトを 2 代目の CEF 細胞上で 15 回より多く連続継代し、挿入された ILTV および IBDV 遺伝子の発現を免疫蛍光アッセイにおいて評価した [下の表 1 および 2 を参照されたい]。

【0139】

組織培養継代ストックの作成:

各組織培養継代のため、10 cm ディッシュ上に播種されたコンフルエントな 2 代目の CEF 単層に 50~100 μL のウイルスストックを接種し、次いで 38℃、5% CO₂ で 2~5 日間、CPE が明らかになるまでインキュベートした。次に細胞をトリプシン処

10

20

30

40

50

理により回収し、継代数 1 (P 1) とした。このプロセスを繰り返してさらなる継代ストック (P 2 ~ P 1 5) を調製した。

【0 1 4 0】

表現型安定性の分析：

6 ウェルプレートに 2 代目の C E F 単層をまいた。この細胞に様々な継代レベル：P 0 ~ P 1 5 で回収したウイルスストックを、または希釈剤のみを接種した。カウント可能な数のプラーク／ウェルを達成するためにプレートに複数の希釈で接種し、3 8 °C、5 % C O 2 でインキュベートした。5 日間のインキュベーション後、上清をデカントし、C E F 単層を 1 0 0 % メタノールで 1 0 ~ 1 5 分間、1 5 ~ 3 0 °C で固定した。メタノールをデカントし、細胞を風乾させた後、I L T V g D (M A B # 6)、I L T V g I (ポリクローナルウサギ抗 g I) および I B D V V P 2 (M C A G D V - R 6 3) 一次抗体で染色した。2 時間のブロッキングステップの後、(P B S 中 5 % の無脂肪乾燥乳)、2 m L / ウェルをディッシュに加え、振動プラットフォーム上で 1 5 ~ 3 0 °C でインキュベートし、一次抗体を適宜希釈し、2 m L / ウェルに加え、次いで 1 5 ~ 3 0 °C で 3 時間、振動プラットフォーム上でインキュベートした。抗体インキュベーション後、プレートを P B S で 3 回洗浄した。F I T C 標識した二次抗体溶液 (ウサギ抗マウスまたはヤギ抗ウサギ) を 1 : 1 0 0 に調製し、各ウェルに 2 m L を加えた。プレートを 1 時間、1 5 ~ 3 0 °C で、振動プラットフォーム上でインキュベートした。インキュベーション後、プレートを P B S で 3 回洗浄し、蛍光視野下で調べた。I L T 抗体で染色されたプラークを蛍光陽性 (+) または陰性 (-) について観察した。I B D V V P 2 タンパク質に対する一次抗体で染色された蛍光プラークをカウントした。プレートを次いで光学顕微鏡下で調べ、プラークを再度カウントした。各継代レベルにおける蛍光プラークのパーセンテージは下の表 1 および 2 中に提供され、並びに、I B D V V P 2 タンパク質発現およびベクター安定性の定性的な決定も提供する。

【0 1 4 1】

表 1

組織培養における継代後の発現の安定性

【表 2】

ウイルス番号	説明	挿入部位	継代レベル	発現		
				ILT gD	ILT gI	IBDV VP2
1386-48.3.1.7	(h)IE-VP2/ILTgDgI	US2	P0	+	+	100%
			P5	+	+	100%
			P9	+	+	100%
			P14	+	+	96%
1386-48.1.1.1	(c)β-act-VP2/ILTgDgI	US2	P0	+	+	100%
			P5	+	+	100%
			P10	+	+	97%
			P15	+	+	98%
1386-134.1-2	(m)IE-VP2/ILTgDgI	US2	P0	+	+	100%
			P5	+	+	100%
			P10	+	+	98%
			P15	+	+	99%
484.1-1A3A3	(m)IE-VP2/ILTgDgI	UL54.5	P0	+	+	100%
			P4	+	+	100%
			P10	+	+	97%
			P15	+	+	94%

【0142】

表2

挿入プラスミドの説明／ベクター特性

【表3】

名称／称号	挿入部位	挿入プラスミド	IBDVプロモーター	IBDV発現	安定性
HVT/ILT/IBDV 1386-48.1.1.1	US2	1333-85.B6	ニワトリ β -アクチン	強	安定
HVT/ILT/IBDV 1386-48.3.1.7	US2	1386-04.4#1	hCMV IE	強	安定
HVT/IBDV/ILT 1386-134.1-2	US2	228509-ILT- 435Vec6	mCMV IE	強	安定
HVT/IBDV/ILT 484	UL54.5	484-1050- 2641-10859	mCMV IE	強	安定

【0143】

実施例4

組換えHVT／ILT／IBDVウイルスストックは、トリへのワクチン接種およびトリからの回収の後、ILTおよびIBDVタンパク質の発現について表現型的に安定である3つのコンストラクト、HVT／IBDV／ILT 1386-134.1-2を含む1つ目のもの、HVT／ILT／IBDV 1386-48.3.1.7を含む別のもの、およびHVT／ILT／IBDV 484.1-1A3A3を含む第三のものを用いて、3群の15日齢のニワトリに皮下（subcutaneous）経路により接種した。第4の群のトリに希釈剤のみをワクチン接種して、陰性対照群として機能させた。脾臓試料を接種7日後に採取し、ニワトリ胚線維芽細胞上でのウイルス分離のために処理した。接種細胞を2回継代して存在する何らかのウイルスを増やした。細胞変性効果がはっきりと視認できたとき、単層を回収してストックを凍結した。これらのストックを用いて2代目のCEFに接種し、プラークをILT／gD、ILT／gIおよびIBDV VP2タンパク質の発現について、各タンパク質に特異的な抗体を使用した免疫蛍光アッセイ（IFA）により分析した。

【0144】

表現型安定性の分析：

6ウェルプレートに2代目のCEF単層をまいた。この細胞に、回収したウイルス分離ストックまたは希釈剤のみを接種した。カウント可能な数のプラーク／ウェルを達成するためにプレートに複数の希釈で接種し、38℃、5% CO₂でインキュベートした。5日間のインキュベーション後、上清をデカントし、CEF単層を100%メタノールで10～15分間、15～30℃で固定した。メタノールをデカントし、細胞を風乾させた後、ILT／gD（MAB #6）、ILT／gI（ポリクローナルウサギ抗gI）およびIBDV VP2（MCA GDV-R63）一次抗体で染色した。2時間のブロッキングステップの後、（PBS中5%の無脂肪乾燥乳）、2mL／ウェルをディッシュに加え、振動プラットフォーム上で15～30℃でインキュベートし、一次抗体を適宜希釈し、2mL／ウェルに加え、次いで15～30℃で3時間、振動プラットフォーム上でインキュベートした。抗体インキュベーション後、プレートをPBSで3回洗浄した。FITC標識した二次抗体溶液（ウサギ抗マウスまたはヤギ抗ウサギ）を1：100に調製し、各ウェルに2mLを加えた。プレートを、1時間15～30℃で、振動プラットフォーム上でインキュベートした。インキュベーション後、プレートをPBSで3回洗浄し、蛍光視野下で調べた。ILT抗体で染色されたプラークを蛍光陽性（+）または陰性（-）について観察した。IBDV VP2タンパク質に対する一次抗体で染色された蛍光プラークをカウントした。プレートを次いで光学顕微鏡下で調べ、プラークを再度カウントした。各継代レベルにおける蛍光プラークのパーセンテージは下の表3A中に提供される。この試験を、ウイルスが接種2週後に回収された場合を除いて本質的に繰り返した（下の表3

Bを参照されたい)。

【0145】

表3A

トリにおける継代後の発現の安定性

【表4】

ワクチン	インサートの説明	挿入部位	用量(PFU)	発現パーセント		
				ILT gl	ILT gD	IBDV VP2
HVT/ILT/IBDV 1386-134.1-2 (p10)	(m)IE-VP2/ ILTgDgl	US2	7737	100%	100%	90%
HVT/ILT/IBDV 1386-48.3.1.7 (p10)	(h)IE-VP2/ ILTgDgl	US2	7003	100%	100%	89%
HVT/IBDV/ILT 484.1-1A3A3 (p10)	(m)IE-VP2/ ILTgDgl	UL54.5	7793	100%	100%	97%
希釈剤	NA	NA	0	NA	NA	NA

10

20

【0146】

表3B

接種2週後に回収されたウイルス

【表5】

ワクチン	インサートの説明	挿入部位	用量(PFU)	発現パーセント		
				ILT gl	ILT gD	IBDV VP2
HVT/ILT/IBDV 1386-48.1.1.1 (p10)	(h)IE-VP2/ ILTgDgl	US2	4785	100%	92%	42%

30

【0147】

実施例5

不成功のコンストラクト

組換えベクターワクチンウイルスは、定義によると外来遺伝子を保有して発現するように操作される。これらの外来(foreign)遺伝子の転写および発現が親ウイルスと比べて増殖の不都合を組換えウイルスに提供するならば、これらの遺伝子がワクチン生産の際に失われることがあり得る。この理由のため、ワクチン候補は、遺伝的および表現型的の両方の安定性について試験されなければならない。

40

【0148】

加えて、用いられる防御判断基準は、USDAにより制定され、連邦規則集タイトル9パート113(9CFR 113)《Standard requirements for Animal Products》中に成文化されているものである。生きたウイルスワクチンは承認を得るために、疾患に関連した臨床徴候または病変から、NDV、IBDVおよびILTVの場合は少なくとも90%の防御を、MDVの場合は少なくとも80%の防御を提供しなければならない。

【0149】

50

ウイルスコンストラクトの遺伝的安定性は、組織培養における規定される継代回数後の最も高い予測ワクチン生産レベルをサザンブロット解析によって決定し、元の分離株からのDNAと比較した。ウイルスストックから抽出されたDNAを制限酵素で消化し、メンブレンにトランスファーし、挿入された外来 (f o r i e g n) 遺伝子の存在を検出するように設計されたプローブとハイブリダイズする。遺伝的安定性はまた、PCR解析によっても決定され得る。外来DNAの内部にあるまたはこれと隣接するDNAにアニールするように設計されたPCRプライマーを用いて、サイズが知られている断片を、組織培養における継代の前後両方のウイルスDNA鋳型から増幅することができる。

【0150】

ウイルスコンストラクトの表現型安定性は、これらの挿入された外来遺伝子のタンパク質産物に対する抗体を使用した個々のウイルスブランクの免疫染色によって決定した。これらの組換えワクチンにより提供される防御は、動物の免疫系を刺激するため、これらのタンパク質産物の発現に依拠する。大半の場合、外来タンパク質発現について陽性に染色されるウイルスのパーセントが90%未満に低下したら、これは組織培養において増殖するウイルスの能力にとっておそらく有害であり、それゆえワクチン候補として不適であった。

【0151】

下の表4Aおよび4Bから容易に明らかであるように、大半のrMDVnpコンストラクトはこれら2つの判断基準、すなわち比較的強い抗原発現および／または有効性を伴った安定性 (s t a b i l i t y) を満たさない。表4Aは、複数の異種インサートを有し、異種インサートのうちの1つがIBDV抗原をコードする一連の組換えHVTコンストラクトを提供する。結果が示すように、表4A中のコンストラクトの全てが比較的強い抗原発現および／または有効性を伴った安定性の判断基準を満たすことができなかった。

【0152】

表4A

二重の組換えHVTおよびIBDVウイルスコンストラクト：

【表6】

名称／称号	挿入	インサート	IBDV プロモーター	IBDV 発現	安定性
HVT 003	UL43	[IBDV] ポリタンパク質 [Ecoli] Bgal	PRV gX	弱	安定
HVT 016	UL43	[IBDV] VP2 [Ecoli] Bgal	hCMV IE	強	不安定
HVT 056	US2	[MDV] gA, gB [IBDV] VP2	hCMV IE	強	不安定
HVT 060	US2	[MDV] gA, gB [IBDV] VP2, 16kD ORF	IE-VP2, gX-16dk ORF	強	不安定
HVT 137	US2 UL54.5	[MDV] gA, gB, gC [IBDV] VP2	[BHV] VP8 (テグメント)	弱	安定
HVT 143	US2 US2 UL54.5	[MDV] gA, gB, gD [NDV] HN, F [IBDV] VP2	[BHV] VP8 (テグメント)	弱	不安定
HVT/NDV/IBDV 1312-92	US2 UL7/UL8	[IBDV] VP2 [NDV] F	hCMV IE	強	不安定
HVT/NDV/IBDV 1312-94	US2 UL7/UL8	[IBDV] VP2 [NDV] F	hCMV IE	強	不安定
HVT/NDV/IBDV 1312-95	US2 UL7/UL8	[IBDV] VP2 [NDV] F	hCMV IE	強	不安定
HVT/NDV/IBDV 1329-54	US2	[IBDV] VP2 [NDV] F	FHV gB	強	不安定

10

20

30

40

50

【0153】

下の表4Bは、各々複数の異種インサートを含み、異種インサートのうちの少なくとも1つがNDVまたはILTVのいずれかの抗原をコードする一連の11個の組換えHVTコンストラクトおよびただ1つのNAHVコンストラクトを提供する¹。結果が示すように、表4B中のコンストラクトの全てが比較的強い抗原発現および／または有効性を伴った安定性の判断基準を満たすことができなかった。

【0154】

脚注

¹ 表4B中のデータは、U.S. 8,932,604 B2の審査の際に本出願の共同発明者の1名により署名された宣誓書において米国特許庁に提出された。

10

【0155】

表4B

二重の組換えHVTおよびNAHVウイルスコンストラクト：

20

30

40

50

【表 7】

名称	挿入部位	インサート	安定性	NDV 防御	MDV 防御	ILT 防御
HVT 048	US2	[MDV] gA, gB [NDV] F	安定	良好	*防御的	--
HVT 049	US2	[MDV] gA, gB [NDV] HN	安定	弱 (< 20%)	未試験	--
HVT 050	US2	[MDV] gA, gB [NDV] F, HN	安定	良好	*防御的	--
HVT 053	US2	[MDV] gA, gB [ILT] gB, gD	不安定	--	未試験	なし
HVT 078	US2	[MDV] gA, gB, gD [NDV] HN, F	不安定	未試験	未試験	--
HVT 079	US2	[MDV] gA, gB, gD [ILT] gB, gD	不安定	--	未試験	(71-100%)
HVT 106	US2	[MDV] gA, gB, gD [NDV] HN, F	安定	**不明	未試験	--
HVT 123	UL54.5 + US2	[ILT] gD, gB/UL54.5 [MDV] gA, gD, gB/US2	不安定	--	未試験	未試験
HVT 125	UL54.5 + US2	[ILT] gDgI, gB/UL54.5 [MDV] gA, gD, gB/US2	不安定	--	未試験	未試験
HVT 128	UL54.5 + US2	[NDV] HN, F /UL54.5 [MDV] gA, gD, gB/US2	不安定	未試験	未試験	--
HVT 139	UL54.5 + US2	[ILT] gDgI /UL54.5 [MDV] gA, gD, gB/US2	不安定	--	未試験	未試験
HVY-198 (NAHV)	US2* (MDV)	[NDV] F + [ILT] gD, gI	不安定			

* 防御的であったが、その後に野外試験において失敗した ** 75%のトリだけが NDV F に抗体陽転した

【0156】

実施例 6

配列

以下の配列が例示的な rHVT コンストラクトにおいて用いられている。下に提供されるコード配列は個々の終止コドンを含む、これは、コーディング配列がコードしているタンパク質抗原の特性を改変することなく代替りの終止コドンで容易に置き換えることができる。

【0157】

配列番号 1 : ILTV gD 糖タンパク質 (1134bp)

10

20

30

40

50

a t g g a c c g c c a t t t a t t t t t g a g g a a t g c t t t t t g g a c t a
 t c g t a c t g c t t t c t t c c t t c g c t a g c c a g a g c a c c g c c g c
 c g t c a c g t a c g a c t a c a t t t t a g g c c g t c g c g c g c t c g a c
 g c g c t a a c c a t a c c g g c g g t t g g c c c g t a t a a c a g a t a c c
 t c a c t a g g g t a t c a a g a g g c t g c g a c g t t g t c g a g c t c a a
 c c c g a t t t t c t a a c g t g g a c g a c a t g a t a t c g g c g g c c a a a
 g a a a a a g a g a a g g g g g g c c c t t t c g a g g c c t c c g t c g t c t
 g g t t c t a c g t g a t t a a g g g c g a c g a c g g c g a g g a c a a g t a
 c t g t c c a a t c t a t a g a a a a g a g t a c a g g g a a t g t g g c g a c
 g t a c a a c t g c t a t c t g a a t g c g c c g t t c a a t c t g c a c a g a
 t g t g g g c a g t g g a c t a t g t t c c t a g c a c c c t t g t a t c g c g
 a a a t g g c g c g g g a c t g a c t a t a t t c t c c c c a c t g c t g c g
 c t c t c t g g c c a a t a c t t g c t g a c c c t g a a a a t c g g g a g a t
 t t g c g c a a a c a g c t c t c g t a a c t c t a g a a g t t a a c g a t c g
 c t g t t t a a a g a t c g g g t c g c a g c t t a a c t t t t t a c c g t c g
 a a a t g c t g g a c a a c a g a a c a g t a t c a g a c t g g a t t t c a a g
 g c g a a c a c c t t t a t c c g a t c g c a g a c a c c a a t a c a c g a c a
 c g c g g a c g a c g t a t a t c g g g g a t a c g a a g a t a t t c t g c a g
 c g c t g g a a t a a t t t g c t g a g g a a a a a g a a t c c t a g c g c g c
 c a g a c c c t c g t c c a g a t a g c g t c c c g c a a g a a a t t c c c g c
 t g t a a c c a a g a a a g c g g a a g g g c g c a c c c c g g a c g c a g a a
 a g c a g c g a a a a g a a g g c c c c t c c a g a a g a c t c g g a g g a c g
 a c a t g c a g g c a g a g g c t t c t g g a g a a a a t c c t g c c g c c c t
 c c c c g a a g a c g a c g a a g t c c c c g a g g a c a c c g a g c a c g a t
 g a t c c a a a c t c g g a t c c t g a c t a t t a c a a t g a c a t g c c c g
 c c g t g a t c c c g g t g g a g g a g a c t a c t a a a a g t t c t a a t g c
 c g t c t c c a t g c c c a t a t t c g c g g c g t t c g t a g c c t g c g c g
 g t c g c g c t c g t g g g g c t a c t g g t t t g g a g c a t c g t a a a a t
 g c g c g c g t a g c t a a

10

20

配列番号2: I L T V g D糖タンパク質 (377アミノ酸)

30

M D R H L F L R N A F W T I V L L S S F A S Q S T A A V T Y D Y I L G R R A L D
 A L T I P A V G P Y N R Y L T R V S R G C D V V E L N P I S N V D D M I S A A K
 E K E K G G P F E A S V V W F Y V I K G D D G E D K Y C P I Y R K E Y R E C G D
 V Q L L S E C A V Q S A Q M W A V D Y V P S T L V S R N G A G L T I F S P T A A
 L S G Q Y L L T L K I G R F A Q T A L V T L E V N D R C L K I G S Q L N F L P S
 K C W T T E Q Y Q T G F Q G E H L Y P I A D T N T R H A D D V Y R G Y E D I L Q
 R W N N L L R K K N P S A P D P R P D S V P Q E I P A V T K K A E G R T P D A E
 S S E K K A P P E D S E D D M Q A E A S G E N P A A L P E D D E V P E D T E H D
 D P N S D P D Y Y N D M P A V I P V E E T T K S S N A V S M P I F A A F V A C A
 V A L V G L L V W S I V K C A R S

40

配列番号3: I L T V g I糖タンパク質 (1089bp)

A t g g c a t c g c t a c t t g g a a c t c t g g c t c t c c t t g c c g c g a
 c g c t c g c a c c c t t c g g c g c g a t g g g a a t c g t g a t c a c t g g
 a a a t c a c g t c t c c g c c a g g a t t g a c g a c g a t c a c a t c g t g
 a t c g t c g c g c c t c g c c c c g a a g c t a c a a t t c a a c t g c a g c
 t a t t t t t c a t g c c t g g c c a g a g a c c c c a c a a a c c t a c t c
 a g g a a c c g t c c g c g t c g c g t t t c g g t c t g a t a t a a c a a a c
 c a g t g c t a c c a g g a a c t t a g c g a g g a g c g c t t t g a a a a t t
 g c a c t c a t c g a t c g t c t t c t g t t t t t g t c g g c t g t a a a g t
 g a c c g a g t a c a c g t t c t c c g c c t c g a a c a g a c t a a c c g g a

50

c c t c c a c a c c c g t t t a a g c t c a c t a t a c g a a a t c c t c g t c
c g a a c g a c a g c g g g a t g t t c t a c g t a a t t g t t c g g c t a g a
c g a c a c c a a a g a a c c c a t t g a c g t c t t c g c g a t c c a a c t a
t c g g t g t a t c a a t t c g c g a a c a c c g c c g c g a c t c g c g g a c
t c t a t t c c a a g g c t t c g t g t c g c a c c t t c g g a t t a c c t a c
c g t c c a a c t t g a g g c c t a t c t c a g g a c c g a g g a a a g t t g g
c g c a a c t g g c a a g c g t a c g t t g c c a c g g a g g c c a c g a c g a
c c a g c g c c g a g g c g a c a a c c c c g a c g c c c g t c a c t g c a a c
c a g c g c c t c c g a a c t t g a a g c g g a a c a c t t t a c c t t t c c c
t g g c t a g a a a a t g g c g t g g a t c a t t a c g a a c c g a c a c c c g
c a a a c g a a a a t t c a a a c g t t a c t g t c c g t c t c g g g a c a a t
g a g c c c t a c g c t a a t t g g g g t a a c c g t g g c t g c c g t c g t g
a g c g c a a c g a t c g g c c t c g t c a t t g t a a t t t c c a t c g t c a
c c a g a a a c a t g t g c a c c c c g c a c c g a a a a t t a g a c a c g g t
c t c g c a a g a c g a c g a a g a a c g t t c c c a a a c t a g a a g g g a a
t c g c g a a a a t t t g g a c c c a t g g t t g c g t g c g a a a t a a a c a
a g g g g g c t g a c c a g g a t a g t g a a c t t g t g g a a c t g g t t g c
g a t t g t t a a c c c g t c t g c g c t a a g c t c g c c c g a c t c a a t a
a a a a t g t g a

10

配列番号4: ILTV g I糖タンパク質 (362アミノ酸)

20

M A S L L G T L A L L A A T L A P F G A M G I V I T G N H V S A R I D D D H I V
I V A P R P E A T I Q L Q L F F M P G Q R P H K P Y S G T V R V A F R S D I T N
Q C Y Q E L S E E R F E N C T H R S S S V F V G C K V T E Y T F S A S N R L T G
P P H P F K L T I R N P R P N D S G M F Y V I V R L D D T K E P I D V F A I Q L
S V Y Q F A N T A A T R G L Y S K A S C R T F G L P T V Q L E A Y L R T E E S W
R N W Q A Y V A T E A T T T S A E A T T P T P V T A T S A S E L E A E H F T F P
W L E N G V D H Y E P T P A N E N S N V T V R L G T M S P T L I G V T V A A V V
S A T I G L V I V I S I V T R N M C T P H R K L D T V S Q D D E E R S Q T R R E
S R K F G P M V A C E I N K G A D Q D S E L V E L V A I V N P S A L S S P D S I
K M

30

配列番号5: IBDV VP2 (1362bp)

a t g a c a a a c c t g c a a g a t c a a a c c c a a c a g a t t g t t c c g t
t c a t a c g g a g c c t t c t g a t g c c a a c a a c c g g a c c g g c g t c
c a t t c c g g a c g a c a c c c t g g a g a a g c a c a c t c t c a g g t c a
g a g a c c t c g a c c t a c a a t t t g a c t g t g g g g g a c a c a g g g t
c a g g g c t a a t t g t c t t t t t c c c t g g a t t c c c t g g c t c a a t
t g t g g g t g c t c a c t a c a c a c t g c a g a g c a a t g g g a a c t a c
a a g t t c g a t c a g a t g c t c c t g a c t g c c c a g a a c c t a c c g g
c c a g c t a c a a c t a c t g c a g a c t a g t g a g t c g g a g t c t c a c
a g t g a g g t c a a g c a c a c t c c c t g g t g g c g t t t a t g c a c t a
a a c g g c a c c a t a a a c g c c g t g a c c t t c c a a g g a a g c c t g a
g t g a a c t g a c a g a t g t t a g c t a c a a t g g g t t g a t g t c t g c
a a c a g c c a a c a t c a a c g a c a a a a t t g g g a a t g t c c t g g t a
g g g g a a g g g g t c a c t g t c c t c a g c c t a c c c a c a t c a t a t g
a t c t t g g g t a t g t g a g g c t t g g t g a c c c c a t t c c c g c t a t
a g g g c t t g a c c c a a a a a t g g t a g c t a c a t g c g a c a g c a g t
g a c a g g c c c a g a g t c t a c a c c a t a a c t g c a g c c g a t g a t t
a c c a a t t c t c a t c a c a g t a c c a a c c a g g t g g g g t a a c a a t
c a c a c t g t t c t c a g c c a a c a t t g a t g c t a t c a c a a g c c t c
a g c a t t g g g g g a g a g c t c g t g t t t c a a a c a a g c g t c c a a g

40

50

g c c t t g t a c t g g g c g c c a c c a t c t a c c t t a t a g g c t t t g a
t g g g a c t g c g g t a a t c a c c a g a g c t g t g g c c g c a g a t a a t
g g g c t g a c g g c c g g c a c c g a c a a t c t t a t g c c a t t c a a t c
t t g t c a t t c c a a c c a a t g a g a t a a c c c a g c c a a t c a c a t c
c a t c a a a c t g g a g a t a g t g a c c t c c a a a a g t g g t g g t c a g
g c a g g g g a t c a g a t g t c a t g g t c g g c a a g t g g g a g c c t a g
c a g t g a c g a t c c a t g g t g g c a a c t a t c c a g g g g c c c t c c g
t c c c g t c a c a c t a g t a g c c t a c g a a a g a g t g g c a a c a g g a
t c c g t c g t t a c g g t c g c t g g g g t g a g t a a c t t c g a g c t g a
t t c c a a a t c c t g a a c t a g c a a a g a a c c t g g t t a c a g a a t a
c g g c c g a t t t g a c c c a g g a g c c a t g a a c t a c a c a a a a t t g
a t a c t g a g t g a g a g g g a c c g t c t t g g c a t c a a g a c c g t c t
g g c c a a c a a g g g a g t a c a c t g a t t t t c g t g a g t a c t t c a t
g g a g g t g g c c g a c c t c a a c t c t c c c c t g a a g a t t g c a g g a
g c a t t t t g g c t t c a a a g a c a t a a t c c g g g c t a t a a g g a g g t
a a

10

配列番号6：IBDV VP2 (453アミノ酸)

MTNLQDQTQQIVPFIRSLLMPTTGPASIPDDTLEKHTLRS
ETSTYNLTVGDTGSGLIVFFPGFPGSIVGAHYTLQSNNGNY
KFDQMLLTAQNLPASYNYCRLVSRSLTVRSSTLPGGVYAL
NGTINAVTFQGSLSSELTDVSYNGLMSATANINDKIGNVLV
GEGVTVLSLPTS YDLGYVRLGDP IPAIGLDPKMOVATCDSS
DRPRVYITITAADDYQFSSQYQPGGVITITLFSANIDAITS L
SIGGELVFQTSVQGLVLGATIYLIIGFDGTAVITRAVAADN
GLTAGTDNLMPFNLVIPTNEITQPITSIKLEIVTSKSGGQ
AGDQMSWSASGSLAVTIHGGNYPGALRPVTLVAYERVATG
SVVTVAGVSNFELIPNPELAKNLVTEYGRFDPGAMNYTKL
ILSERDRLG IKT VWP TREY TDFREY FMEVADLNSPLK IAG
AFGFKDIIRAIRR

20

配列番号7：ILTV gDプロモーター (527bp)

30

a a a c a g c t g t a c t a c a g a g t a a c c g a t g g a a g a a c a t c g g
t c c a g c t a a t g t g c c t g t c g t g c a c g a g c c a t t c t c c g g a
a c c t t a c t g t c t t t t c g a c a c g t c t c t t a t a g c g a g g g a a
a a a g a t a t c g c g c c a g a g t t a t a c t t t a c c t c t g a t c c g c
a a a c g g c a t a c t g c a c a a t a a c t c t g c c g t c c g g c g t t g t
t c c g a g a t t c g a a t g g a g c c t t a a t a a t g t t t c a c t g c c g
g a a t a t t t g a c g g c c a c g a c c g t t g t t t c g c a t a c c g c t g
g c c a a a g t a c a g t g t g g a a g a g c a g c g c g a g a g c a g g c g a
g g c g t g g a t t t c t g g c c g g g g a g g c a a t a t a t a c g a a t g c
a c c g t c c t c a t c t c a g a c g g c a c t c g c g t t a c t a c g c g a a
a g g a g a g g t g c t t a a c a a a c a c a t g g a t t g c g g t g g a a a a
c g g t g c t g c t c a g g c g c a g c t g t a t t c a c t c t t t t c t g g a
c t t g t g t c a g g a t t a t g c g g g a g c a t a t c t g c t t t g t a c g
c a a c g c t

40

配列番号8：ILTV gIプロモーター (264bp)

t g a c t a t t a c a a t g a c a t g c c c g c c g t g a t c c c g g t g g a g
g a g a c t a c t a a a a g t t c t a a t g c c g t c t c c a t g c c c a t a t
t c g c g g c g t t c g t a g c c t g c g c g g t c g c g c t c g t g g g g c t
a c t g g t t t g g a g c a t c g t a a a a t g c g c g c g t a g c t a a t c g
a g c c t a g a a t a g g t g g t t t c t t c c t a c a t g c c a c g c c t c a

50

c g c t c a t a a t a t a a a t c a c a t g g a a t a g c a t a c c a a t g c c
t a t t c a t t g g g a c g t t c g a a a a g c

配列番号9: I L T V インサート (3563bp)

t c g a c g g c a g a g t c g c a g a c g c c c c t a t t g g a c g t c a a a a
t t g t a g a g g t g a a g t t t t c a a a c g a t g g c g a a g t a a c g g c
g a c t t g c g t t t c c a c c g t c a a a t c t c c c t a t a g g g t a g a a
a c t a a t t g g a a a g t a g a c c t c g t a g a t g t a a t g g a t g a a a
t t t c t g g g a a c a g t c c c g c c g g g g t t t t a a c a g t a a t g a
g a a a t g g c a g a a a c a g c t g t a c t a c a g a g t a a c c g a t g g a
a g a a c a t c g g t c c a g c t a a t g t g c c t g t c g t g c a c g a g c c
a t t c t c c g g a a c c t t a c t g t c t t t t c g a c a c g t c t c t t a t
a g c g a g g g a a a a a g a t a t c g c g c c a g a g t t a t a c t t t a c c
t c t g a t c c g c a a a c g g c a t a c t g c a c a a t a a c t c t g c c g t
c c g g c g t t g t t c c g a g a t t c g a a t g g a g c c t t a a t a a t g t
t t c a c t g c c g g a a t a t t t g a c g g c c a c g a c c g t t g t t t c g
c a t a c c g c t g g c c a a a g t a c a g t g t g g a a g a g c a g c g c g a
g a g c a g g c g a g g c g t g g a t t t c t g g c c g g g g a g g c a a t a t
a t a c g a a t g c a c c g t c c t c a t c t c a g a c g g c a c t c g c g t t
a c t a c g c g a a a g g a g a g g t g c t t a a c a a a c a c a t g g a t t g
c g g t g g a a a a c g g t g c t g c t c a g g c g c a g c t g t a t t c a c t
c t t t t c t g g a c t t g t g t c a g g a t t a t g c g g g a g c a t a t c t
g c t t t g t a c g c a a c g c t a t g g a c c g c c a t t t a t t t t t g a g
g a a t g c t t t t t g g a c t a t c g t a c t g c t t t c t t c c t t c g c t
a g c c a g a g c a c c g c c g c c g t c a c g t a c g a c t a c a t t t t a g
g c c g t c g c g c g c t c g a c g c g c t a a c c a t a c c g g c g g t t g g
c c c g t a t a a c a g a t a c c t c a c t a g g g t a t c a a g a g g c t g c
g a c g t t g t c g a g c t c a a c c c g a t t t c t a a c g t g g a c g a c a
t g a t a t c g g c g g c c a a a g a a a a a g a g a a g g g g g c c c t t t
c g a g g c c t c c g t c g t c t g g t t c t a c g t g a t t a a g g g c g a c
g a c g g c g a g g a c a a g t a c t g t c c a a t c t a t a g a a a a g a g t
a c a g g g a a t g t g g c g a c g t a c a a c t g c t a t c t g a a t g c g c
c g t t c a a t c t g c a c a g a t g t g g g c a g t g g a c t a t g t t c c t
a g c a c c c t t g t a t c g c g a a a t g g c g c g g g a c t g a c t a t a t
t c t c c c c a c t g c t g c g c t c t c t g g c c a a t a c t t g c t g a c
c c t g a a a a t c g g g a g a t t t g c g c a a a c a g c t c t c g t a a c t
c t a g a a g t t a a c g a t c g c t g t t t a a a g a t c g g g t c g c a g c
t t a a c t t t t t a c c g t c g a a a t g c t g g a c a a c a g a a c a g t a
t c a g a c t g g a t t t c a a g g c g a a c a c c t t t a t c c g a t c g c a
g a c a c c a a t a c a c g a c a c g c g g a c g a c g t a t a t c g g g g a t
a c g a a g a t a t t c t g c a g c g c t g g a a t a a t t t g c t g a g g a a
a a a g a a t c c t a g c g c g c c a g a c c c t c g t c c a g a t a g c g t c
c c g c a a g a a a t t c c c g c t g t a a c c a a g a a a g c g g a a g g g c
g c a c c c c g g a c g c a g a a a g c a g c g a a a a g a a g g c c c c t c c
a g a a g a c t c g g a g g a c g a c a t g c a g g c a g a g g c t t c t g g a
g a a a a t c c t g c c g c c c t c c c c g a a g a c g a c g a a g t c c c g
a g g a c a c c g a g c a c g a t g a t c c a a a c t c g g a t c c t g a c t a
t t a c a a t g a c a t g c c c g c c g t g a t c c c g g t g g a g g a g a c t
a c t a a a a g t t c t a a t g c c g t c t c c a t g c c c a t a t t c g c g g
c g t t c g t a g c c t g c g c g g t c g c g c t c g t g g g g c t a c t g g t
t t g g a g c a t c g t a a a a t g c g c g c g t a g c t a a t c g a g c c t a

10

20

30

40

50

g a a t a g g t g g t t t c t t c c t a c a t g c c a c g c c t c a c g c t c a
t a a t a t a a a t c a c a t g g a a t a g c a t a c c a a t g c c t a t t c a
t t g g g a c g t t c g a a a a g c a t g g c a t c g c t a c t t g g a a c t c
t g g c t c t c c t t g c c g c g a c g c t c g c a c c c t t c g g c g c g a t
g g g a a t c g t g a t c a c t g g a a a t c a c g t c t c c g c c a g g a t t
g a c g a c g a t c a c a t c g t g a t c g t c g c g c c t c g c c c c g a a g
c t a c a a t t c a a c t g c a g c t a t t t t t c a t g c c t g g c c a g a g
a c c c c a c a a a c c c t a c t c a g g a a c c g t c c g c g t c g c g t t t
c g g t c t g a t a t a a c a a a c c a g t g c t a c c a g g a a c t t a g c g
a g g a g c g c t t t g a a a a t t g c a c t c a t c g a t c g t c t t c t g t
t t t t g t c g g c t g t a a a g t g a c c g a g t a c a c g t t c t c g c c
t c g a a c a g a c t a a c c g g a c c t c c a c a c c c g t t t a a g c t c a
c t a t a c g a a a t c c t c g t c c g a a c g a c a g c g g g a t g t t c t a
c g t a a t t g t t c g g c t a g a c g a c a c c a a a g a a c c c a t t g a c
g t c t t c g c g a t c c a a c t a t c g g t g t a t c a a t t c g c g a a c a
c c g c c g c g a c t c g c g g a c t c t a t t c c a a g g c t t c g t g t c g
c a c c t t c g g a t t a c c t a c c g t c c a a c t t g a g g c c t a t c t c
a g g a c c g a g g a a a g t t g g c g c a a c t g g c a a g c g t a c g t t g
c c a c g g a g g c c a c g a c g a c c a g c g c c g a g g c g a c a a c c c c
g a c g c c c g t c a c t g c a a c c a g c g c c t c c g a a c t t g a a g c g
g a a c a c t t t a c c t t t c c c t g g c t a g a a a a t g g c g t g g a t c
a t t a c g a a c c g a c a c c c g c a a a c g a a a a t t c a a a c g t t a c
t g t c c g t c t c g g g a c a a t g a g c c c t a c g c t a a t t g g g g t a
a c c g t g g c t g c c g t c g t g a g c g c a a c g a t c g g c c t c g t c a
t t g t a a t t t c c a t c g t c a c c a g a a a c a t g t g c a c c c c g c a
c c g a a a a t t a g a c a c g g t c t c g c a a g a c g a c g a a g a a c g t
t c c c a a a c t a g a a g g g a a t c g c g a a a a t t t g g a c c c a t g g
t t g c g t g c g a a a t a a a c a a g g g g g c t g a c c a g g a t a g t g a
a c t t g t g g a a c t g g t t g c g a t t g t t a a c c c g t c t g c g c t a
a g c t c g c c c g a c t c a a t a a a a a t g t g a t t a a g t c t g a a t g
t g g c t c t c c a a t c a t t t c g a t t c t c t a a t c t c c c a a t c c t
c t c a a a a g g g g c a g t a t c g g a c a c g g a c t g g g a g g g g c g t
a c a c g a t a g t t a t a t g g t a c a g c a g a g g c c t c t g a a c a c t
t a g g a g g a g a a t t c a g c c g g g g a g a g c c c c t g t t g a g t a g
g c t t g g g a g c a t a t t g c a g g a t g a a c a t g t t a g t g a t a g t
t c t c g c c t c t t t g t c t t g c g c g c c t a a c t t t t g c g a c g c g a
c a c g t c c t c t t t t t g g a a g g c a c t c a g g c t g t c c t c g g g g
a a g a t g a t c c c a g a a a c g t t c c g g a a g g g a c t g t a a t c a a
a t g g a c a a a a g t c c t g c g g a a c g c g t g c a a g a t g a a g g c g
g c c g a t g t c t g c t c t t c g c c t a a c t a t t g c t t t c a t g a t t
t a a t t t a c g a c g g a g g a a a g a a a g a c t g c c c g c c c g c g g g
a c c c c t g t c t g c a a a c c t g g t a a t t t t a c t a a a g c g c g g c
g a a

配列番号10：mCMV IEプロモーター（1391bp）

a a c t c c g c c c g t t t t a t g a c t a g a a c c a a t a g t t t t t a a t
g c c a a a t g c a c t g a a a t c c c c t a a t t t g c a a a g c c a a a c g
c c c c c t a t g t g a g t a a t a c g g g g a c t t t t t a c c c a a t t t c
c c a c g c g g a a a g c c c c c t a a t a c a c t c a t a t g g c a t a t g a
a t c a g c a c g g t c a t g c a c t c t a a t g g c g g c c c a t a g g g a c
t t t c c a c a t a g g g g g c g t t c a c c a t t t c c c a g c a t a g g g g

10

20

30

40

50

t g g t g a c t c a a t g g c c t t t a c c c a a g t a c a t t g g g t c a a t
 g g g a g g t a a g c c a a t g g g t t t t t c c c a t t a c t g g c a a g c a
 c a c t g a g t c a a a t g g g a c t t t t c c a c t g g g t t t t g c c c a a g
 t a c a t t g g g t c a a t g g g a g g t g a g c c a a t g g g a a a a a c c c
 a t t g c t g c c a a g t a c a c t g a c t c a a t a g g g a c t t t t c c a a t
 g g g t t t t t c c a t t g t t g g c a a g c a t a t a a g g t c a a t g t g g
 g t g a g t c a a t a g g g a c t t t t c c a t t g t a t t c t g c c c a g t a c
 a t a a g g t c a a t a g g g g g t g a a t c a a c a g g a a a g t c c c a t t
 g g a g c c a a g t a c a c t g c g t c a a t a g g g a c t t t t c c a t t g g g
 t t t t g c c c a g t a c a t a a g g t c a a t a g g g g a t g a g t c a a t g
 g g a a a a a c c c a t t g g a g c c a a g t a c a c t g a c t c a a t a g g g
 a c t t t t c c a t t g g g t t t t g c c c a g t a c a t a a g g t c a a t a g g
 g g g t g a g t c a a c a g g a a a g t t c c a t t g g a g c c a a g t a c a t
 t g a g t c a a t a g g g a c t t t t c c a a t g g g t t t t g c c c a g t a c a
 t a a g g t c a a t g g g a g g t a a g c c a a t g g g t t t t t c c c a t t a
 c t g g c a c g t a t a c t g a g t c a t t a g g g a c t t t t c c a a t g g g t
 t t t g c c c a g t a c a t a a g g t c a a t a g g g g t g a a t c a a c a g g
 a a a g t c c c a t t g g a g c c a a g t a c a c t g a g t c a a t a g g g a c
 t t t t c c a t t g g g t t t t g c c c a g t a c a a a a g g t c a a t a g g g g
 g t g a g t c a a t g g g t t t t t c c c a t t a t t g g c a c g t a c a t a a
 g g t c a a t a g g g g t g a g t c a t t g g g t t t t t c c a g c c a a t t t
 a a t t a a a a c g c c a t g t a c t t t t c c c a c c a t t g a c g t c a a t g
 g g c t a t t g a a a c t a a t g c a a c g t g a c c t t t a a a c g g t a c t
 t t c c c a t a g c t g a t t a a t g g g a a a g t a c c g t t c t c g a g c c
 a a t a c a c g t c a a t g g g a a g t g a a a g g g c a g c c a a a a c g t a
 a c a c c g c c c c g g t t t t c c c c t g g a a a t t c c a t a t t g g c a c
 g c a t t c t a t t g g c t g a g c t g c g t t c t a c g t g g g t a t a a g a
 g g c g c g a c c a g c g t c g g t a c c g t c g c a g t c t t c g g t c t g a
 c c a c c g t a g a a c g c a g a g c t c c t c g c t g c a g

配列番号 11：ニワトリβ-アクチンプロモーター（692bp）

（注：「nnn」は高度にGCリッチな領域における不明瞭な配列を表す。3～5個の「g」であり得る）

c g c g c c g g a t c a g a t c t c c a t g g t c g a g g t g a g c c c c a c g
 t t c t g c t t c a c t c t c c c c a t c t c c c c c c c t c c c c a c c c c
 c a a t t t t g t a t t t a t t t a t t t t t a a t t a t t t t g t g c a g c
 g a t g g g g g c g g g g g g g g g g n n n c g c g c g c c a g g c g g g g c
 g g g g c g g g g c g a g g g g c g g g g c g g g g c g a g g c g g a g a g g t
 g c g g c g g c a g c c a a t c a g a g c g g c g c g c t c c g a a a g t t t c
 c t t t t a t g g c g a g g c g g c g g c g g c g g c c c t a t a a a a a
 g c g a a g c g c g c g g c g g g c g g g a g t c g c t g c g c g c t g c c t t
 c g c c c c g t g c c c c g c t c c g c c g c c g c c t c g c g c c g c c c g c
 c c c g g c t c t g a c t g a c c g c g t t a c t c c c a c a g g t g a g c g g
 g c g g g a c g g c c c t t c t c c t c c g g g c t g t a a t t a g c g g c a g
 g a a g g a a a t g g g c g g g g a g g g c c t t c g t g c g t c g c c g c g c
 c g c c g t c c c c t t c t c c c t c t c c a g c c t c g g g g c t g t c c g c
 g g g g g a c g g c t g c c t t c g g g g g g a c g g g g c a g g g c g g g
 g t t c g g c t t c t g g c g t g t g a c c g g c g g c t c t a g a g c c t c t
 g c t a a c c a t g t t c a t g c c t t c t t c t t t t t c c t a c a g c t c c
 t g g g c a a c g t g c t g g t t a t t g t g c t g t c t c a t c a t t t t g g
 c a a a g a a t t g c a

10

20

30

40

50

配列番号12: AD169株からのhCMV IEプロモーター (301bp)

g g c a g t a c a t c t a c g t a t t a g t c a t c g c t a t t a c c a t g g t
g a t g c g g t t t t g g c a g t a c a t c a a t g g g c g t g g a t a g c g g
t t t g a c t c a c g g g g a t t t c c a a g t c t c c a c c c c a t t g a c g
t c a a t g g g a g t t t g t t t t g g c a c c a a a t c a a c g g g a c t t
t c c a a a a t g t c g t a a c a a c t c c g c c c c a t t g a c g c a a a t g
g g c g g t a g g c g t g t a c g g t g g g a g g t c t a t a t a a g c a g a g
c t c g t t t a g t g a a c c g t c a g a t c g c c t g g a g a c g c c a t c c
a c g c t g t t t t g a c c t c c a t a g

配列番号13: FHV US-9ポリアデニル化シグナル (55bp)

c a a t a a a c a t a g c a t a c g t t a t g a c a t g g t c t a c c g c g t c
t t a t a t g g g g a c g a c

配列番号14: HSV TKポリアデニル化シグナル (370bp)

g a t c c a t a a t t g a t t g a c g g g a g a t g g g g g a g g c t a a c t g
a a a c a c g g a a g g a g a c a a t a c c g g a a g g a a c c c g c g c t a t
g a c g g c a a t a a a a g a c a g a a t a a a a c g c a c g g g t g t t g g
g t c g t t t g t t c a t a a a c g c g g g g t t c g g t c c c a g g g c t g g
c a c t c t g t c g a t a c c c c a c c g a g a c c c c a t t g g g g c c a a t
a c g c c c g c g t t t c t t c c t t t t c c c c a c c c c a c c c c c a a g
t t c g g g t g a a g g c c c a g g g c t c g c a g c c a a c g t c g g g g c g
g c a g g c c c t g c c a t a g c c a c t g g c c c c g t g g g t t a g g g a c
g g g g t c c c c c a t g g g g a a t g g t t t a t g g t t c g t g g g g g t t
a t t a t t t t g a

配列番号15: 228509-ILT-435Vec6 (mCMV IEpro-VP2-SV40pA/ILT/HVT) (14113bp)

(HVT EcoRI #7断片中のIBDV+ILT遺伝子カセット。ウイルスno. HVT/IBDV/ILT 1386-134)

g a a t t c c a g a c t a a a t g c c c c g g c c c a a t t t g t c a a g t g t
g c a g t c a c g g a g g c g t c g a c c g t g t c c c c g g c a t t a a a c a
g g a a a g c g t t a a a g t t t t t g a a t g t t a g g t c a c a g g t a c a
a a c a t a a a t g t t t g t a c a a a c a g g t a a c a g g t a c a a a c a t
a a a t g c c c c g g c a t a a a t g t c c c t t a c g g c g g a t c g a a a c
g a c a t t a g g c a t a c t c g g g t a c c a t t t t g c a t t c c g a t c a
g c a c g g a t g a a a t t a g g c a g g a a t g c g g t t t a t a t t a t g c
g g c a t t g g a c a a a c g a t a t g g c a t t g a t t g g c a g t t t a t g
a a t g t c t t c a t g t t g g g c g t a a a c g g a t t c c t a t t g g t t c
a g a a g a c a a c g a c g a t a t a t t t a g a g a g a a a a g c t a c c c
a g c a t a g g a t a a a c a c a c a t t g a g c a t t g a g a g a c a t a g g
t a t c g g t a t g g a t g g g a a a a c t a c a c a c g t g a a c a c c a a a
c g a c t t a t a t a c t c g a g c g g t g a t a c t a c t g a g c a a g a a t
g c a c t g c a t c t g a g c c a c t g a a t g a a g a c t g t g a t g a a a a
t g t g a c c a t c g a t g g a a t t g g a g a a g a a t a t g c g c a g t t c
t t c a t g t c c c c g c a a t g g g t c c c a a a t c t a c a t c g c t t g a
g c g a g g a t a c c a a a a a g g t a t a c c g a t g t a t g g t t t c c a a
c a g a c t c a a t t a t t t t c c c t a t t a t g a g g c g t t c a g g c g g
t c t t t g t t t g a t a t g t a t a t g c t a g g t c g g t t g g g g c g t c
g a c t t a a g c g a t c t g a c t g g g a g a c t a t t a t g c a t c t g t c
a c c a a c g c a a a g t c g g c g t c t a c a t a g a a c t t t a a g a t t t
g t g g a g c g t a g a a t t a t c c c a t c t a a c a g t t a t a t a c g c a
c a t c g g g c c a c g t t c c g c c t t c g a g g g c a c t t c c g a c a g a

10

20

30

40

50

t a c g a a t t t a a a g a t g g a t g a a t a a t t a a a t t g g a a a g a g
t a a c t a c a t t a a t c g a g c g t c a t g a c g g c g t c c c g t g a a a
a t g g g a a t t t t c t a c t c g a a a c a c c g t g a c a t t t g a c a g a
c c t g g a a t t g t t a t t c t g a t a t a t a g t g g g t g t g t c t g g c
c g g c a a c a t a c a t a a t g t g c a t g c g a a a c c a c t t t t t c a g
t g t a c g c t g a c a t t g t g c a a c a c g g a g g g g t a g c a t c t a c
a t a c a a t a t a t g t t g a t t a a t g a t t g g a g a a a a a a c t a t g
c a g c t c g c c g a t c a t a t g g c t a a c t c g c c t t c g t c t a t a t
g g c g g a c c c c g c g g g a a a a a t c g a c g t a c c a t c t g a t t t a
c a a c a c c a g t a a t g a a c a t g t c g c a t c c c t g c c c a g a t c t
g t g c g c c c a t t g g c g c g g a t c g t t g t g a a t g c c g c c g a a a
c a c t t c a g g t c g g t a t g a g a g c c g g g a g g c c g c c a t c a g c
a g g a g t t t g g c g a g a g g t g t t t g a t a g a a t g a t g a c a g c c
t t c c g t g a c c a c g a g c c t a c t g c g a c a t t t a a t g c t g c a a
a t c c c a t t a g a a a a a t g g t c g a g a c a g t t c t a c a g a a t a a
t g a a g a g c c c c c g c g g a c g c a t g c t g a a a t g g g t a a t c g c
c t t a t g a a c a t t a t g t a c t g g t g t t g c t t g g g a c a c g c a g
g a c a a t g c t c g a t a t g g c a g t t g t a c g a g a c g a a t c a g g c
c a t t t t a a g t t t a t t a g a t g a a g t g g t t a t c g g c a c a a c a
a a t c c c t t t t g c a c c c t c g a g c a a t a c t g g a a g c c a t t a t
g c a c c g c a a t c g c c a a c a a g g g g a c c t c a t c g c t t g t t g a
g g a t g c c a a a g t g g c c g a g t a c c t g g t t a g c a t g c g c a a a
t t g a t a t a a c a t a g g c a c g c t c t g a t g t t a c a g a c c a c a a
t a c c g c a t a c a t t t a t t g t a a g g t t g t t a a t a a a g g t t t a
t t c t a t g t a a g a c t a c a a t a c t t t c g a c a t t g c t t g t a t a
c a t a t t a a a t a c t t t c t c a a g t t c c t a t t a c a t a a a a t g g
g a t c t a t c a t t a c a t t c g t t a a g a g t c t g g a t a a t t t t a c
t g t t t g c c a g c t t c g a t c t t g g a a c g t a c t g t g g a t a g t g
c c t t a c t t g g a a t c g t g a a a a t t t g a a a c g t c c a t t a t t t
g g a t a t c t t c c g g t t g t c c c a t a t c c c g c c c t g g t a c c g c
t c g g a t a c c t t g c c c g t a t g g a t t c g t a t t g a c a g t c g c g
c a a t c g g g g a c c a a c a a c g c g t g g g t c c a c a c t c a t t c g g
a a a t t t t c c g a t g a t t c t g a a t a t t t a t t g c c g c t c g t t a
c g a g t c g t t g g a c a t a t c t g t a a t a c a t t t c t t c t t c t g a
a g g a t c g c t g c a c a t t t g a t c t a t a c a t t g g c c a g g a t g t
t c a a g t c t c a g a t g t t g c a t t c t g g c a c a g c a c a a c t t t a
t g g c a t t t c c g a t g t a a t c g t c c g g c a g c c c t g g g g a g t
t c t a t a t t c g c a t a t t g g g a t g g t a a g g a c a a t a g c a g a t
c t c g c a a c c t c c a g g g a g g c t a t a a t a a c g t t t t t a a a g g
a t g g a t t t c t c a t a a a a a t c t g t c g c a a a t t a c a c t g a g a
a t a t c c t t t a c t a g c g c c g a t t g a g a g c a t c g t c g t c c a a
t t t t c t a a a t g g a a a g a a a a c a a g g c g g g c a a g a g t g t t c
c a a a c a t t t t c a t t t t c g g c g a a t c t c t c a a a t c c c a t g g
c g t g c a a t t g a t t g c a a a a t t g g c a c t t c c g t t c a c g t t t
g t a t c t c c a a a c t c t a a g a c a c t t t t a a t t g a a a a a c t a c
g t t c t a g t g t g g a a a g a a a c c t a t a g g c a g a c c a t a g a a c
t a t t t g a c a c c a c a t a t c t t t t t g t a t g t c a a a c t g a c c a
t g a t c g t a t g t t g c t g a a t g c a c t a g g g c a a t t c g c t c g c
g c g a c t c c a t a c a t t g a a t a a t t c c a c a c g t c a g c t c a t c
g g t t a g c a a g g t c c a g t a g t t g a a g t c a t t t a t t t t t c c c

10

20

30

40

50

c g c g g c t g g c c a a a t c t a c c t c t g g g a a t a t c c a a g t t g t
c g a a t a t g a t c g c a c c g g c t c t g g t c a t g g t g a a g g a a c t
g t a g c a t a a a g a c g c a g g t a t c a t a g g g g t a a t a t t t t t t
t a t t c a c t c a c a t a c t a a a a g t a a c g c a t a t t a g c a c c a t
g t a t g g g c t a t c a a t t g a c a t t t g c g t a g c a c t a c a t c a c
g a t t a t g t a c a a c a t a a t g g g a c a a c a t a t g g c a a g t a g a
t g c a a t t t c c t c a c a c t a g t t g g g t t t a t c t a c t a t t g a a
t t t t c c c c t a t c t g t g a t a c a c t t g g g a g c c t c t a c a a g c
a t a t t g c c a t c a t g t a c g t t t t t a t c t a c t g t c t t a a c g c
c c a t g g g a a c g g a g g c g t c g t c g t c a t g t a t t g g a c g g c a
a c a t a g g c a g c a a c a c a a a t t g c g t t t a g g t g g g g t g c a t
g t g g a c t c g a t a c c a a g c c c c t g c a g c t g g g g a a c g t c t g
g t g g a g a g c c g a t a a t t t g a t a t a c g c a c g c c a t a t t a c t
g t c g t t g a a g t a c g c c t t a t c t t c t a t g t t t t c a a a t t t a
g g t t c c c a a g t g g a c g t g a g a a g t g t t t g t a t c t c a c a t g
g a a t g g c c c a a g g c a t t c c a g c c c a g g t g c c t g g t a c t t t
a a t g g c a a a c a a a c g t t t t g g t a g a g g t a t t g a t t c t a t t
g c a g t t c t g c a g a t a t c t g c a g c c c c g a g t a t c c a c a g g c
t a t a c g a t a c g t t a t c g g a g g c a a g c t g c g g c c g c t c t a g
a a c t a g t g g a t c c c c c g g g c t g c a g c c c a a t g t g g a a t t c
g c c c t t g c a c a t t g t t a c t c c t g c a t c t t a a a a t a t a t c
c t g t a g t a a t t t t c a c a g c a a t g t c a t a a c a t c a t c t c g c
t a a a g a a t g a c c t g g g a t t g g a g a a g t a a t g a a t a t t t g c
a a c c a a t g c a t t g a a t a a a c t a a c a t t a a a c g a a t t c a c t
a g t g g a t c c c c c a a c t c c g c c c g t t t t a t g a c t a g a a c c a
a t a g t t t t t a a t g c c a a a t g c a c t g a a a t c c c c t a a t t t g
c a a a g c c a a a c g c c c c c t a t g t g a g t a a t a c g g g g a c t t t
t t a c c c a a t t t c c c a c g c g g a a a g c c c c c t a a t a c a c t c a
t a t g g c a t a t g a a t c a g c a c g g t c a t g c a c t c t a a t g g c g
g c c c a t a g g g a c t t t c c a c a t a g g g g g c g t t c a c c a t t t c
c c a g c a t a g g g g t g g t g a c t c a a t g g c c t t t a c c c a a g t a
c a t t g g g t c a a t g g g a g g t a a g c c a a t g g g t t t t t c c c a t
t a c t g g c a a g c a c a c t g a g t c a a a t g g g a c t t t c c a c t g g
g t t t t g c c c a a g t a c a t t g g g t c a a t g g g a g g t g a g c c a a
t g g g a a a a a c c c a t t g c t g c c a a g t a c a c t g a c t c a a t a g
g g a c t t t c c a a t g g g t t t t t c c a t t g t t g g c a a g c a t a t a
a g g t c a a t g t g g g t g a g t c a a t a g g g a c t t t c c a t t g t a t
t c t g c c c a g t a c a t a a g g t c a a t a g g g g g t g a a t c a a c a g
g a a a g t c c c a t t g g a g c c a a g t a c a c t g c g t c a a t a g g g a
c t t t c c a t t g g g t t t t g c c c a g t a c a t a a g g t c a a t a g g g
g a t g a g t c a a t g g g a a a a a c c c a t t g g a g c c a a g t a c a c t
g a c t c a a t a g g g a c t t t c c a t t g g g t t t t g c c c a g t a c a t
a a g g t c a a t a g g g g g t g a g t c a a c a g g a a a g t t c c a t t g g
a g c c a a g t a c a t t g a g t c a a t a g g g a c t t t c c a a t g g g t t
t t g c c c a g t a c a t a a g g t c a a t g g g a g g t a a g c c a a t g g g
t t t t t c c c a t t a c t g g c a c g t a t a c t g a g t c a t t a g g g a c
t t t c c a a t g g g t t t t g c c c a g t a c a t a a g g t c a a t a g g g g
t g a a t c a a c a g g a a a g t c c c a t t g g a g c c a a g t a c a c t g a
g t c a a t a g g g a c t t t c c a t t g g g t t t t g c c c a g t a c a a a a
g g t c a a t a g g g g g t g a g t c a a t g g g t t t t t c c c a t t a t t g

10

20

30

40

50

g c a c g t a c a t a a g g t c a a t a g g g g t g a g t c a t t g g g t t t t
t c c a g c c a a t t t a a t t a a a a c g c c a t g t a c t t t c c c a c c a
t t g a c g t c a a t g g g c t a t t g a a a c t a a t g c a a c g t g a c c t
t t a a a c g g t a c t t t c c c a t a g c t g a t t a a t g g g a a a g t a c
c g t t c t c g a g c c a a t a c a c g t c a a t g g g a a g t g a a a g g g c a
g c c a a a a c g t a a c a c c g c c c c g g t t t t c c c c t g g a a a t t c
c a t a t t g g c a c g c a t t c t a t t g g c t g a g c t g c g t t c t a c g
t g g g t a t a a g a g g c g c g a c c a g c g t c g g t a c c g t c g c a g t
c t t c g g t c t g a c c a c c g t a g a a c g c a g a g c t c c t c g c t g c
a g g c g g c c g c t c t a g a a c t c g t c g a t c g c a g c g a t g a c a a
a c c t g c a a g a t c a a a c c c a a c a g a t t g t t c c g t t c a t a c g
g a g c c t t c t g a t g c c a a c a a c c g g a c c g g c g t c c a t t c c g
g a c g a c a c c c t g g a g a a g c a c a c t c t c a g g t c a g a g a c c t
c g a c c t a c a a t t t g a c t g t g g g g g a c a c a g g g t c a g g g c t
a a t t g t c t t t t t c c c t g g a t t c c c t g g c t c a a t t g t g g g t
g c t c a c t a c a c a c t g c a g a g c a a t g g g a a c t a c a a g t t c g
a t c a g a t g c t c c t g a c t g c c c a g a a c c t a c c g g c c a g c t a
c a a c t a c t g c a g a c t a g t g a g t c g g a g t c t c a c a g t g a g g
t c a a g c a c a c t c c c t g g t g g c g t t t a t g c a c t a a a c g g c a
c c a t a a a c g c c g t g a c c t t c c a a g g a a g c c t g a g t g a a c t
g a c a g a t g t t a g c t a c a a t g g g t t g a t g t c t g c a a c a g c c
a a c a t c a a c g a c a a a a t t g g g a a t g t c c t g g t a g g g g a a g
g g g t c a c t g t c c t c a g c c t a c c c a c a t c a t a t g a t c t t g g
g t a t g t g a g g c t t g g t g a c c c c a t t c c c g c t a t a g g g c t t
g a c c c a a a a a t g g t a g c t a c a t g c g a c a g c a g t g a c a g g c
c c a g a g t c t a c a c c a t a a c t g c a g c c g a t g a t t a c c a a t t
c t c a t c a c a g t a c c a a c c a g g t g g g g t a a c a a t c a c a c t g
t t c t c a g c c a a c a t t g a t g c t a t c a c a a g c c t c a g c a t t g
g g g g a g a g c t c g t g t t t c a a a c a a g c g t c c a a g g c c t t g t
a c t g g g c g c c a c c a t c t a c c t t a t a g g c t t t g a t g g g a c t
g c g g t a a t c a c c a g a g c t g t g g c c g c a g a t a a t g g g c t g a
c g g c c g g c a c c g a c a a t c t t a t g c c a t t c a a t c t t g t c a t
t c c a a c c a a t g a g a t a a c c c a g c c a a t c a c a t c c a t c a a a
c t g g a g a t a g t g a c c t c c a a a a g t g g t g g t c a g g c a g g g g
a t c a g a t g t c a t g g t c g g c a a g t g g g a g c c t a g c a g t g a c
g a t c c a t g g t g g c a a c t a t c c a g g g g c c c t c c g t c c c g t c
a c a c t a g t a g c c t a c g a a a g a g t g g c a a c a g g a t c c g t c g
t t a c g g t c g c t g g g g t g a g t a a c t t c g a g c t g a t t c c a a a
t c c t g a a c t a g c a a a g a a c c t g g t t a c a g a a t a c g g c c g a
t t t g a c c c a g g a g c c a t g a a c t a c a c a a a a t t g a t a c t g a
g t g a g a g g g a c c g t c t t g g c a t c a a g a c c g t c t g g c c a a c
a a g g g a g t a c a c t g a t t t t c g t g a g t a c t t c a t g g a g g t g
g c c g a c c t c a a c t c t c c c c t g a a g a t t g c a g g a g c a t t t g
g c t t c a a a g a c a t a a t c c g g g c t a t a a g g a g g t a a g c t t c
a g a c a t g a t a a g a t a c a t t g a t g a g t t t g g a c a a a c c a c a
a c t a g a a t g c a g t g a a a a a a t g c t t t a t t t g t g a a a t t t
g t g a t g c t a t t g c t t t a t t t g t a a c c a t t a t a a g c t g c a a
t a a a c a a g t t a a c a a c a a c a a t t g c a t t c a t t t t a t g t t t
c a g g t t c a g g g g g a g g t g t g g g a g g t t t t t c g g a t c c t c
t a g a g t c g a c g g c a g a g t c g c a g a c g c c c c t a t t g g a c g t

10

20

30

40

50

c a a a a t t g t a g a g g t g a a g t t t t c a a a c g a t g g c g a a g t a
a c g g c g a c t t g c g t t t c c a c c g t c a a a t c t c c c t a t a g g g
t a g a a a c t a a t t g g a a a g t a g a c c t c g t a g a t g t a a t g g a
t g a a a t t t c t g g g a a c a g t c c c g c c g g g g t t t t t a a c a g t
a a t g a g a a a t g g c a g a a a c a g c t g t a c t a c a g a g t a a c c g
a t g g a a g a a c a t c g g t c c a g c t a a t g t g c c t g t c g t g c a c
g a g c c a t t c t c c g g a a c c t t a c t g t c t t t t c g a c a c g t c t
c t t a t a g c g a g g g a a a a a g a t a t c g c g c c a g a g t t a t a c t
t t a c c t c t g a t c c g c a a a c g g c a t a c t g c a c a a t a a c t c t
g c c g t c c g g c g t t g t t c c g a g a t t c g a a t g g a g c c t t a a t
a a t g t t t c a c t g c c g g a a t a t t t g a c g g c c a c g a c c g t t g
t t t c g c a t a c c g c t g g c c a a a g t a c a g t g t g g a a g a g c a g
c g c g a g a g c a g g c g a g g c g t g g a t t t c t g g c c g g g g a g g c
a a t a t a t a c g a a t g c a c c g t c c t c a t c t c a g a c g g c a c t c
g c g t t a c t a c g c g a a a g g a g a g g t g c t t a a c a a a c a c a t g
g a t t g c g g t g g a a a a c g g t g c t g c t c a g g c g c a g c t g t a t
t c a c t c t t t t c t g g a c t t g t g t c a g g a t t a t g c g g g a g c a
t a t c t g c t t t g t a c g c a a c g c t a t g g a c c g c c a t t t a t t t
t t g a g g a a t g c t t t t t g g a c t a t c g t a c t g c t t t c t t c c t
t c g c t a g c c a g a g c a c c g c c g c c g t c a c g t a c g a c t a c a t
t t t a g g c c g t c g c g c g c t c g a c g c g c t a a c c a t a c c g g c g
g t t g g c c c g t a t a a c a g a t a c c t c a c t a g g g t a t c a a g a g
g c t g c g a c g t t g t c g a g c t c a a c c c g a t t t c t a a c g t g g a
c g a c a t g a t a t c g g c g g c c a a a g a a a a a g a g a a g g g g g g c
c c t t t c g a g g c c t c c g t c g t c t g g t t c t a c g t g a t t a a g g
g c g a c g a c g g c g a g g a c a a g t a c t g t c c a a t c t a t a g a a a
a g a g t a c a g g g a a t g t g g c g a c g t a c a a c t g c t a t c t g a a
t g c g c c g t t c a a t c t g c a c a g a t g t g g g c a g t g g a c t a t g
t t c c t a g c a c c c t t g t a t c g c g a a a t g g c g c g g g a c t g a c
t a t a t t c t c c c c a c t g c t g c g c t c t c t g g c c a a t a c t t g
c t g a c c c t g a a a a t c g g g a g a t t t g c g c a a a c a g c t c t c g
t a a c t c t a g a a g t t a a c g a t c g c t g t t t a a a g a t c g g g t c
g c a g c t t a a c t t t t t a c c g t c g a a a t g c t g g a c a a c a g a a
c a g t a t c a g a c t g g a t t t c a a g g c g a a c a c c t t t a t c c g a
t c g c a g a c a c c a a t a c a c g a c a c g c g g a c g a c g t a t a t c g
g g g a t a c g a a g a t a t t c t g c a g c g c t g g a a t a a t t t g c t g
a g g a a a a g a a t c c t a g c g c g c c a g a c c c t c g t c c a g a t a
g c g t c c c g c a a g a a a t t c c c g c t g t a a c c a a g a a a g c g g a
a g g g c g c a c c c c g g a c g c a g a a a g c a g c g a a a a g a a g g c c
c c t c c a g a a a g a c t c g g a g g a c g a c a t g c a g g c a g a g g c t t
c t g g a g a a a a t c c t g c c g c c c t c c c c g a a g a c g a c g a a g t
c c c c g a g g a c a c c g a g c a c g a t g a t c c a a a c t c g g a t c c t
g a c t a t t a c a a t g a c a t g c c c g c c g t g a t c c c g g t g g a g g
a g a c t a c t a a a a g t t c t a a t g c c g t c t c c a t g c c c a t a t t
c g c g g c g t t c g t a g c c t g c g c g g t c g c g c t c g t g g g g c t a
c t g g t t t g g a g c a t c g t a a a a t g c g c g c g t a g c t a a t c g a
g c c t a g a a t a g g t g g t t t c t t c c t a c a t g c c a c g c c t c a c
g c t c a t a a t a t a a a t c a c a t g g a a t a g c a t a c c a a t g c c t
a t t c a t t g g g a c g t t c g a a a a g c a t g g c a t c g c t a c t t g g
a a c t c t g g c t c t c c t t g c c g c g a c g c t c g c a c c c t t c g g c

10

20

30

40

50

g c g a t g g g a a t c g t g a t c a c t g g a a a t c a c g t c t c c g c c a
g g a t t g a c g a c g a t c a c a t c g t g a t c g t c g c g c c t c g c c c
c g a a g c t a c a a t t c a a c t g c a g c t a t t t t t c a t g c c t g g c
c a g a g a c c c c a c a a a c c c t a c t c a g g a a c c g t c c g c g t c g
c g t t t c g g t c t g a t a t a a c a a a c c a g t g c t a c c a g g a a c t
t a g c g a g g a g c g c t t t g a a a a t t g c a c t c a t c g a t c g t c t
t c t g t t t t t g t c g g c t g t a a a g t g a c c g a g t a c a c g t t c t
c c g c c t c g a a c a g a c t a a c c g g a c c t c c a c a c c c g t t t a a
g c t c a c t a t a c g a a a t c c t c g t c c g a a c g a c a g c g g g a t g
t t c t a c g t a a t t g t t c g g c t a g a c g a c a c c a a a g a a c c c a
t t g a c g t c t t c g c g a t c c a a c t a t c g g t g t a t c a a t t c g c
g a a c a c c g c c g c g a c t c g c g g a c t c t a t t c c a a g g c t t c g
t g t c g c a c c t t c g g a t t a c c t a c c g t c c a a c t t g a g g c c t
a t c t c a g g a c c g a g g a a a g t t g g c g c a a c t g g c a a g c g t a
c g t t g c c a c g g a g g c c a c g a c g a c c a g c g c c g a g g c g a c a
a c c c c g a c g c c c g t c a c t g c a a c c a g c g c c t c c g a a c t t g
a a g c g g a a c a c t t t a c c t t t c c c t g g c t a g a a a a t g g c g t
g g a t c a t t a c g a a c c g a c a c c c g c a a a c g a a a a t t c a a a c
g t t a c t g t c c g t c t c g g g a c a a t g a g c c c t a c g c t a a t t g
g g g t a a c c g t g g c t g c c g t c g t g a g c g c a a c g a t c g g c c t
c g t c a t t g t a a t t t c c a t c g t c a c c a g a a a c a t g t g c a c c
c c g c a c c g a a a a t t a g a c a c g g t c t c g c a a g a c g a c g a a g
a a c g t t c c c a a a c t a g a a g g g a a t c g c g a a a a t t t g g a c c
c a t g g t t g c g t g c g a a a t a a a c a a g g g g g c t g a c c a g g a t
a g t g a a c t t g t g g a a c t g g t t g c g a t t g t t a a c c c g t c t g
c g c t a a g c t c g c c c g a c t c a a t a a a a a t g t g a t t a a g t c t
g a a t g t g g c t c t c c a a t c a t t t c g a t t c t c t a a t c t c c c a
a t c c t c t c a a a a g g g g c a g t a t c g g a c a c g g a c t g g g a g g
g g c g t a c a c g a t a g t t a t a t g g t a c a g c a g a g g c c t c t g a
a c a c t t a g g a g g a g a a t t c a g c c g g g g a g a g c c c c t g t t g
a g t a g g c t t g g g a g c a t a t t g c a g g a t g a a c a t g t t a g t g
a t a g t t c t c g c c t c t t g t c t t g c g c g c c t a a c t t t t g c g a
c g c g a c a c g t c c t c t t t t t g g a a g g c a c t c a g g c t g t c c t c
g g g g a a g a t g a t c c c a g a a a c g t t c c g g a a g g g a c t g t a a
t c a a a t g g a c a a a a g t c c t g c g g a a c g c g t g c a a g a t g a a
g g c g g c c g a t g t c t g c t c t t c g c c t a a c t a t t g c t t t c a t
g a t t t a a t t t a c g a c g g a g g a a a g a a a g a c t g c c c g c c c g
c g g g a c c c c t g t c t g c a a a c c t g g t a a t t t t a c t a a a g c g
c g g c g a a g c t t a g c t t g c c t c c g a t t c t a g c a t t a c a t a g
c c g g t c a g t a g a t c c t g c c a t t c g g t a g c g c a a c c g g c t a
c a t c t t c a a a c a g t c t c a c g a t a a a t g c a t c t c t c g t t c c
t g c c a a t c c g g a a c c g g g c a t a c c a c t c c c g c c t g c c g a t
t t a a t t c t c a c a a t t g g g c g a t g c c g g c g g g g c a a a a c g a
a t g t g g a t t t g g c a a a c c g a c a c a g g t c t g c t g t a c g g a c
t a a t a t g g g c a c a c c c a c a t c a t t c t t c a g a t g c t c c a t g
c a t t g t t c t a t g a g a a a g a t c c a t a g g g t g g a g g c a g c g t
c a c g a g a t c g c c c a g g c a a t c g a t c g c a t t c g t c t a g t a a
a g t g a c g a g a g t t a t c a t g c a c a c a c c c a t g c c c a c g c c t
t c c g a a t a a c t g g a g c t g t g g a a g a t c g g a a a c g t c t t t t
t g a c t g c c g g t c t c g t a c t a c t t t c g c a c a g g t g t a t a c c

10

20

30

40

50

c g g a c g c g t a c t a t a t a t t t t a t a t c a t c c a a c g t c c g a a
a t t a c a t a c g t g g c g g c g a t g g a a g t a g a t g t t g a g t c t t
c g a a a g t a a g t g c c t c g a a t a t g g g t a t t g t c t g t g a a a a
t a t c g a a a g c g g t a c g a c g g t t g c a g a a c c g t c g a t g t c g
c c a g a t a c t a g t a a c a a t a g c t t c g a t a a c g a a g a c t t c c
g t g g g c c t g a a t a c g a t g t g g a g a t a a a t a c c a g a a a a t c
t g c t a a t c t t g a t c g t a t g g a a t c t t c g t g c c g t g a a c a a
c g a g c g g c g t g c g a a c t t c g a a a g t g t t c g t g t c c t a c g t
c t g c c g t g c g c a t g c a a t a c a g t a t t c t t t c a t c t c t c g c
t c c g g g t t c a g a g g g t c a t g t a t a t a t a t g t a c t a g a t a c
g g g g a c g c g g a c c a a a a a a a t g c a t a g t g a a g g c a g t c g
t t g g a g g a a a g a a t c c c g g g a g g g a a g t g g a t a t t t t a a a
a a c c a t c t c a c a t a a a t c a a t t a t a a a a t t a a t c c a t g c c
t a t a a a a t g g a a a a a t g t t g t g t g t a t g g c a a t g c g t g t a t
a t c g t t a t g a t c t t t t c a c a t a t a t t g a c g g a g t c g g c c c
t a t g c c c c t t c a a c a g a t g a t c t a t a t t c a a c g t g g a c t a
c t a g a g g c g c t a g c a t a c a t a c a t g a a a g g g g c a t c a t t c
a c c g a g a c g t a a a g a c g g a g a a t a t a t t c t t g g a t a a t c a
c g a a a a t g c a g t t t t g g g t g a c t t c g g t g c t g c a t g c c a a
c t a g g a g a t t g t a t a g a t a c g c c c c a a t g t t a c g g t t g g a
g c g g a a c t g t g g a a a c a a a t t c g c c g g a a t t a t c t g c a c t
t g a t c c g t a t t g c a c a a a a a c a g a t a t t t g g a g t g c c g g a
t t g g t t c t a t a t g a g a t g g c a a t t a a a a a t g t a c c a t t g t
t t a g t a a g c a g g t g a a a a g t t c g g g a t c t c a g c t g a g a t c
c a t a a t a c g g t g c a t g c a a g t g c a t g a a c t g g a g t t t c c c
c g c a a c g a t t c t a c c a a c c t c t g t a a a c a t t t c a a a c a a t
a t g c g g t t c g t g t a c g a c c g c c t t a t a c c a t t c c t c g a g t
t a t a a g a a a t g g g g g a t g c c a a t g g a t g t t g a a t a t g t c
a t t t c t a a a a t g c t t a c g t t t g a c c a g g a g t t c a g a c c t t
c t g c t a a g g a a a t a t t g a a t a t g c c c c t a t t t a c t a a g g c
g c c g a t t a a c c t g c t t a a t a t c a c a c c c t c t g a c a g t g t c
t a a c g g t a t a c a g g c g g g a g c g g g t c g t g g c g t c a t c a t c
a c c a c t t g a g a a t t t a t a t t t t g a a t t g t t g a t t g a t a a a
t t a a c c t g a t t c a t t g a g a a c t g a a a c g c c a t a t t g g t t t
c t t g g a t a t g t c t a c a a c a a t t a g t t a a a t t g c t a t g t t c
t a c t g c g a g t a a c a t t t g a t a a g t t g t a a g a g a c g g g c g a
c t c a t g t c g a a g t t g a c g a a t a t a a a g t a c a t a a c g t g t t
t a g a a t a c c c a g a a t c c g a a t a g t c c g c g g g g g c g t c t t c
t c g c g t g a g t a c c a a a t a c t g a g t t g a a c t t g a a a a t g c t
a a a t c t g t g a c a c t c t t t g t g t g a t g a t t a t t g t c a c c a c
t t c g a a g a t g g c t t c g a c a t t c a t g a t g t t c t g g t g t t t g
t t t g g a a t c g t a a t a g c g c t t g t t t c g t c c a a g t c t g a c a
a c a a a g a a a a t c t g a a g a a t t a t a t c a c g g a t a a g t c a a c
c a a t a t t a g a a t a c c c a c g c c a t t a t t t g t a t c a a c g g a a
a a c t c t t a t c c c a c a a a a c a t g t a a t c t a c g a t g a a a a c t
g t g g c t t c g c t g t a c t c a a t c c t a t a a g t g a c c c c a a a t a
t g t c c t t t t g a g c c a g c t t c t a a t g g g a a g g c g c a a a t a t
g a t g c g a c g g t c g c g t g g t t t g t t c t c g g t a a a a t g t g t g
c c a g a t t a a t a t a t t t g c g c g a a t t t t a t a a c t g c t c g a c
a a a t g a g c c t t t t g g c a c a t g t t c t a t g a g c t c t c c t g g a

10

20

30

40

50

t g g t g g g a c a g g c g c t a c g t c t c a a c c a g t t t c a t t t c t c
 g c g a c g a a t t a c a g c t g g t t t t t g c a g c g c c g t c c c g a g a
 a t t a g a t g g t t t a t a t a c g c g c g t a g t a g t t g t c a a c g g g
 g a c t t t a c t a c g g c c g a t a t a a t g t t t a a t g t t a a a g t g g
 c a t g t g c c t t t t c a a a g a c t g g a a t a g a a g a t g a t a c a t t
 a t g c a a a c c c t t t c a t t t c t t t g c c a a t g c a a c a t t g c a c
 a a t t t a a c c a t g a t t a g a t c g g t a a c t c t t c g a g c g c a c g
 a a a g c c a t t t t a a a g g a a t g g g t g g c a c g g a g a g g t g g t a a
 c g t c c c t g c a g t g c t a c t t g a g t c t a c c a t g t a t c a t g c a
 t c c a a t c t g c c t a g a a a t t t c a g g g a t t t c t a c a t a a a g t
 c t c c a g a t g a t t a t a a g t a t a a t c a c c t a g a t g g g c c a t c
 t g t a a t g c t c a t c a c t g a c a g a c c t a g t g a a g a t t t g g a t
 g g g a g g c t c g t t c a c c a a a g t g a c a t t t t t a c t a c t a c a a
 g t c c t a t a a a a c a g g t c c g g t a t g a a g a g c a t c a g t c a c a
 t a c a a a g c a g t a t c c t g t a a a c a a a a t a c a a g c t a t a a t t
 t t t t t g a t a g g g t t a g g c t c g t t c a t t g g a a g c a t a t t c g
 t a g t t t t g g t a g t a t g g a t t a t a c g c a g a t a t t g c a a t g g
 a g c g c g g a g t g g g g g a a c g c c c c c a g t c c t c g c c g g t a t
 g t g t a t a c c a g g c t a t g a t c a c g t g t g a a a c t t g g g c g g a
 c c t g t a t c a t a t g t a c a c c g t c c c t a t t c g t t t a t a g c c a
 g t a c g t g t t a t c t g c a c a t a g a g g a a c a t g t g t c a t a c t g
 g g a t c g c a t g c a t g g t a t g t g t g a c t c t a a t a t t a t t c t g
 t a t c a t a a t a a a a a c a c a g t g c a t g g t a t a t a g a g g a t c g
 c t g g t a a g c a c t a c g g t a g a c c a a t c g g c t c a g a t t g c a t
 t c t t t g g c a t c g a t a c c g t t g t t a a t t t a t a t g g c a a a g t
 c t t g t t c a t g g g a g a t c a g t a t t t g g a g g a a a t a t a c t c t
 g g a a c g a t g g a a a t a c t c a a a t g g a a t c a a g c t a a c c g c t
 g c t a t t c t a t t g c g c a t g c a a c a t a t t a c g c c g a c t g t c c
 t a t a a t c a g t t c t a c g g t a t t c a g a g g a t g c c g g g a c g c c
 g t t g t t t a t a c t a g g c c c c a c a g c a g a a t t c

10

20

30

配列番号 16 : 1333-85. B6 (ILT/ニワトリβ-アクチン pro-VP2
-FHV US9pA/HVT) (13064bp)

(HVT EcoRI #7断片中のILT+IBDV遺伝子カセット)

ウイルスno. HVT/ILT/IBDV 1386-48. 1. 1. 1

g a a t t c c a g a c t a a a t g c c c c g g c c c a a t t t t g t c a a g t g t
 g c a g t c a c g g a g g c g t c g a c c g t g t c c c c g g c a t t a a a c a
 g g a a a g c g t t a a a g t t t t t g a a t g t t a g g t c a c a g g t a c a
 a a c a t a a a a t g t t t g t a c a a a c a g g t a a c a g g t a c a a a c a t
 a a a t g c c c c g g c a t a a a t g t c c c t t a c g g c g g a t c g a a a c
 g a c a t t a g g c a t a c t c g g g t a c c a t t t t g c a t t c c g a t c a
 g c a c g g a t g a a a t t a g g c a g g a a t g c g g t t t a t a t t a t g c
 g g c a t t g g a c a a a c g a t a t g g c a t t g a t t g g c a g t t t a t g
 a a t g t c t t c a t g t t g g g c g t a a a c g g a t t c c t a t t g g t t c
 a g a a g a c a a c g a c g a t a t a t t t a g a g a g a a a a a g c t a c c c
 a g c a t a g g a t a a a c a c a c a t t g a g c a t t g a g a g a c a t a g g
 t a t c g g t a t g g a t g g g a a a a c t a c a c a c g t g a a c a c c a a a
 c g a c t t a t a t a c t c g a g c g g t g a t a c t a c t g a g c a a g a a t
 g c a c t g c a t c t g a g c c a c t g a a t g a a g a c t g t g a t g a a a a
 t g t g a c c a t c g a t g g a a t t g g a g a a g a a t a t g c g c a g t t c
 t t c a t g t c c c c g c a a t g g g t c c c a a a t c t a c a t c g c t t g a

40

50

g c g a g g a t a c c a a a a g g t a t a c c g a t g t a t g g t t t c c a a
c a g a c t c a a t t a t t t t c c c t a t t a t g a g g c g t t c a g g c g g
t c t t t g t t t g a t a t g t a t a t g c t a g g t c g g t t g g g c g t c
g a c t t a a g c g a t c t g a c t g g g a g a c t a t t a t g c a t c t g t c
a c c a a c g c a a a g t c g g c g t c t a c a t a g a a c t t t a a g a t t t
g t g g a g c g t a g a a t t a t c c c a t c t a a c a g t t a t a t a c g c a
c a t c g g g c c a c g t t c c g c c t t c g a g g g c a c t t c c g a c a g a
t a c g a a t t t a a a g a t g g a t g a a t a a t t a a a t t g g a a a g a g
t a a c t a c a t t a a t c g a g c g t c a t g a c g g c g t c c c g t g a a a
a t g g g a a t t t t t c t a c t c g a a a c a c c g t g a c a t t t t g a c a g a
c c t g g a a t t g t t a t t c t g a t a t a t a g t g g g t g t g t c t g g c
c g g c a a c a t a c a t a a t g t g c a t g c g a a a c c a c t t t t t c a g
t g t a c g c t g a c a t t g t g c a a c a c g g a g g g g t a g c a t c t a c
a t a c a a t a t a t g t t g a t t a a t g a t t g g a g a a a a a a c t a t g
c a g c t c g c c g a t c a t a t g g c t a a c t c g c c t t c g t c t a t a t
g g c g g a c c c c g c g g g a a a a a t c g a c g t a c c a t c t g a t t t a
c a a c a c c a g t a a t g a a c a t g t c g c a t c c c t g c c c a g a t c t
g t g c g c c c a t t g g c g c g g a t c g t t g t g a a t g c c g c c g a a a
c a c t t c a g g t c g g t a t g a g a g c c g g g a g g c c g c c a t c a g c
a g g a g t t t g g c g a g a g g t g t t t g a t a g a a t g a t g a c a g c c
t t c c g t g a c c a c g a g c c t a c t g c g a c a t t t a a t g c t g c a a
a t c c c a t t a g a a a a a t g g t c g a g a c a g t t c t a c a g a a t a a
t g a a g a g c c c c c g c g g a c g c a t g c t g a a a t g g g t a a t c g c
c t t a t g a a c a t t a t g t a c t g g t g t t g c t t g g g a c a c g c a g
g a c a a t g c t c g a t a t g g c a g t t g t a c g a g a c g a a t c a g g c
c a t t t t a a g t t t a t t a g a t g a a g t g g t t a t c g g c a c a a c a
a a t c c c t t t t g c a c c c t c g a g c a a t a c t g g a a g c c a t t a t
g c a c c g c a a t c g c c a a c a a g g g g a c c t c a t c g c t t g t t g a
g g a t g c c a a a g t g g c c g a g t a c c t g g t t a g c a t g c g c a a a
t t g a t a t a a c a t a g g c a c g c t c t g a t g t t a c a g a c c a c a a
t a c c g c a t a c a t t t a t t g t a a g g t t g t t a a t a a a g g t t t a
t t c t a t g t a a g a c t a c a a t a c t t t c g a c a t t g c t t g t a t a
c a t a t t a a a t a c t t t c t c a a g t t c c t a t t a c a t a a a a t g g
g a t c t a t c a t t a c a t t c g t t a a g a g t c t g g a t a a t t t t a c
t g t t t g c c a g c t t c g a t c t t g g a a c g t a c t g t g g a t a g t g
c c t t a c t t g g a a t c g t g a a a a t t t g a a a c g t c c a t t a t t t
g g a t a t c t t c c g g t t g t c c c a t a t c c c g c c c t g g t a c c g c
t c g g a t a c c t t g c c c g t a t g g a t t c g t a t t g a c a g t c g c g
c a a t c g g g g a c c a a c a a c g c g t g g g t c c a c a c t c a t t c g g
a a a t t t t c c g a t g a t t c t g a a t a t t t a t t g c c g c t c g t t a
c g a g t c g t t g g a c a t a t c t g t a a t a c a t t t c t t c t t c t g a
a g g a t c g c t g c a c a t t t g a t c t a t a c a t t g g c c a g g a t g t
t c a a g t c t c a g a t g t t g c a t t c t g g c a c a g c a c a a c t t t a
t g g c a t t t t c c g a t g t a a t c g t c c g g c a g c c c t g g g g g a g t
t c t a t a t t c g c a t a t t g g g a t g g t a a g g a c a a t a g c a g a t
c t c g c a a c c t c c a g g g a g g c t a t a a t a a c g t t t t t a a a g g
a t g g a t t t t c t c a t a a a a a t c t g t c g c a a a t t a c a c t g a g a
a t a t c c t t t t a c t a g c g c c g a t t g a g a g c a t c g t c g t c c a a
t t t t c t a a a t g g a a a g a a a a c a a g g c g g g c a a g a g t g t t c
c a a a c a t t t t t c a t t t t c g g c g a a t c t c t c a a a t c c c a t g g

10

20

30

40

50

c g t g c a a t t g a t t g c a a a a t t g g c a c t t c c g t t c a c g t t t
g t a t c t c c a a a c t c t a a g a c a c t t t t a a t t g a a a a c t a c
g t t c t a g t g t g g a a a g a a a c c t a t a g g c a g a c c a t a g a a c
t a t t t g a c a c c a c a t a t c t t t t t g t a t g t c a a a c t g a c c a
t g a t c g t a t g t t g c t g a a t g c a c t a g g g c a a t t c g c t c g c
g c g a c t c c a t a c a t t g a a t a a t t c c a c a c g t c a g c t c a t c
g g t t a g c a a g g t c c a g t a g t t g a a g t c a t t t a t t t t t c c c
c g c g g c t g g c c a a a t c t a c c t c t g g g a a t a t c c a a g t t g t
c g a a t a t g a t c g c a c c g g c t c t g g t c a t g g t g a a g g a a c t
g t a g c a t a a a g a c g c a g g t a t c a t a g g g g t a a t a t t t t t t
t a t t c a c t c a c a t a c t a a a a g t a a c g c a t a t t a g c a c c a t
g t a t g g g c t a t c a a t t g a c a t t t g c g t a g c a c t a c a t c a c
g a t t a t g t a c a a c a t a a t g g g a c a a c a t a t g g c a a g t a g a
t g c a a t t t c c t c a c a c t a g t t g g g t t t a t c t a c t a t t g a a
t t t t c c c c t a t c t g t g a t a c a c t t g g g a g c c t c t a c a a g c
a t a t t g c c a t c a t g t a c g t t t t t a t c t a c t g t c t t a a c g c
c c a t g g g a a c g g a g g c g t c g t c g t c a t g t a t t g g a c g g c a
a c a t a g g c a g c a a c a c a a a t t g c g t t t a g g t g g g g t g c a t
g t g g a c t c g a t a c c a a g c c c c t g c a g c t g g g g a a c g t c t g
g t g g a g a g c c g a t a a t t t g a t a t a c g c a c g c c a t a t t a c t
g t c g t t g a a g t a c g c c t t a t c t t c t a t g t t t t c a a a t t t a
g g t t c c c a a g t g g a c g t g a g a a g t g t t t g t a t c t c a c a t g
g a a t g g c c c a a g g c a t t c c a g c c c a g g t g c c t g g t a c t t t
a a t g g c a a a c a a a c g t t t t g g t a g a g g t a t t g a t t c t a t t
g c a g t t c t g c a g a t a t c t g c a g c c c c g a g t a t c c a c a g g c
t a t a c g a t a c g t t a t c g g a g g c a a g c t t a a t t a a g t a c c g
a g c t c g a a t t g g c g c g c c c g a c g g c a g a g t c g c a g a c g c c
c c t a t t g g a c g t c a a a a t t g t a g a g g t g a a g t t t t c a a a c
g a t g g c g a a g t a a c g g c g a c t t g c g t t t c c a c c g t c a a a t
c t c c c t a t a g g g t a g a a a c t a a t t g g a a a g t a g a c c t c g t
a g a t g t a a t g g a t g a a a t t t c t g g g a a c a g t c c c g c c g g g
g t t t t t a a c a g t a a t g a g a a a t g g c a g a a a c a g c t g t a c t
a c a g a g t a a c c g a t g g a a g a a c a t c g g t c c a g c t a a t g t g
c c t g t c g t g c a c g a g c c a t t c t c c g g a a c c t t a c t g t c t t
t t c g a c a c g t c t c t t a t a g c g a g g g a a a a a g a t a t c g c g c
c a g a g t t a t a c t t t a c c t c t g a t c c g c a a a c g g c a t a c t g
c a c a a t a a c t c t g c c g t c c g g c g t t g t t c c g a g a t t c g a a
t g g a g c c t t a a t a a t g t t t c a c t g c c g g a a t a t t t g a c g g
c c a c g a c c g t t g t t t c g c a t a c c g c t g g c c a a a g t a c a g t
g t g g a a g a g c a g c g c g a g a g c a g g c g a g g c g t g g a t t t c t
g g c c g g g g a g g c a a t a t a t a c g a a t g c a c c g t c c t c a t c t
c a g a c g g c a c t c g c g t t a c t a c g c g a a a g g a g a g g t g c t t
a a c a a a c a c a t g g a t t g c g g t g g a a a a c g g t g c t g c t c a g
g c g c a g c t g t a t t c a c t c t t t t c t g g a c t t g t g t c a g g a t
t a t g c g g g a g c a t a t c t g c t t t g t a c g c a a c g c t a t g g a c
c g c c a t t t a t t t t t g a g g a a t g c t t t t t g g a c t a t c g t a c
t g c t t t c t t c c t t c g c t a g c c a g a g c a c c g c c g c c g t c a c
g t a c g a c t a c a t t t t a g g c c g t c g c g c g c t c g a c g c g c t a
a c c a t a c c g g c g g t t g g c c c g t a t a a c a g a t a c c t c a c t a
g g g t a t c a a g a g g c t g c g a c g t t g t c g a g c t c a a c c c g a t

10

20

30

40

50

t t c t a a c g t g g a c g a c a t g a t a t c g g c g g c c a a a g a a a a a
g a g a a g g g g g g c c c t t t c g a g g c c t c c g t c g t c t g g t t c t
a c g t g a t t a a g g g c g a c g a c g g c g a g g a c a a g t a c t g t c c
a a t c t a t a g a a a a g a g t a c a g g g a a t g t g g c g a c g t a c a a
c t g c t a t c t g a a t g c g c c g t t c a a t c t g c a c a g a t g t g g g
c a g t g g a c t a t g t t c c t a g c a c c c t t g t a t c g c g a a a t g g
c g c g g g a c t g a c t a t a t t c t c c c c a c t g c t g c g c t c t c t
g g c c a a t a c t t g c t g a c c c t g a a a a t c g g g a g a t t t g c g c
a a a c a g c t c t c g t a a c t c t a g a a g t t a a c g a t c g c t g t t t
a a a g a t c g g g t c g c a g c t t a a c t t t t t a c c g t c g a a a t g c
t g g a c a a c a g a a c a g t a t c a g a c t g g a t t t c a a g g c g a a c
a c c t t t a t c c g a t c g c a g a c a c c a a t a c a c g a c a c g c g g a c
g a c g t a t a t c g g g g a t a c g a a g a t a t t c t g c a g c g c t g g a
a t a a t t t g c t g a g g a a a a a g a a t c c t a g c g c g c c a g a c c c
t c g t c c a g a t a g c g t c c c g c a a g a a a t t c c c g c t g t a a c c
a a g a a a g c g g a a g g g c g c a c c c c g g a c g c a g a a a g c a g c g
a a a a g a a g g c c c c t c c a g a a g a c t c g g a g g a c g a c a t g c a
g g c a g a g g c t t c t g g a g a a a a t c c t g c c g c c c t c c c g a a
g a c g a c g a a g t c c c c g a g g a c a c c g a g c a c g a t g a t c c a a
a c t c g g a t c c t g a c t a t t a c a a t g a c a t g c c c g c c g t g a t
c c c g g t g g a g g a g a c t a c t a a a a g t t c t a a t g c c g t c t c c
a t g c c c a t a t t c g c g g c g t t c g t a g c c t g c g c g g t c g c g c
t c g t g g g g c t a c t g g t t t g g a g c a t c g t a a a a t g c g c g c g
t a g c t a a t c g a g c c t a g a a t a g g t g g t t t c t t c c t a c a t g
c c a c g c c t c a c g c t c a t a a t a t a a a t c a c a t g g a a t a g c a
t a c c a a t g c c t a t t c a t t g g g a c g t t c g a a a a g c a t g g c a
t c g c t a c t t g g a a c t c t g g c t c t c c t t g c c g c g a c g c t c g
c a c c c t t c g g c g c g a t g g g a a t c g t g a t c a c t g g a a a t c a
c g t c t c c g c c a g g a t t g a c g a c g a t c a c a t c g t g a t c g t c
g c g c c t c g c c c c g a a g c t a c a a t t c a a c t g c a g c t a t t t t
t c a t g c c t g g c c a g a g a c c c c a c a a a c c c t a c t c a g g a a c
c g t c c g c g t c g c g t t t c g g t c t g a t a t a a c a a a c c a g t g c
t a c c a g g a a c t t a g c g a g g a g c g c t t t g a a a a t t g c a c t c
a t c g a t c g t c t t c t g t t t t t g t c g g c t g t a a a g t g a c c g a
g t a c a c g t t t c t c c g c c t c g a a c a g a c t a a c c g g a c c t c c a
c a c c c g t t t a a g c t c a c t a t a c g a a a t c c t c g t c c g a a c g
a c a g c g g g a t g t t c t a c g t a a t t g t t c g g c t a g a c g a c a c
c a a a g a a c c c a t t g a c g t c t t c g c g a t c c a a c t a t c g g t g
t a t c a a t t c g c g a a c a c c g c c g c g a c t c g c g g a c t c t a t t
c c a a g g c t t c g t g t c g c a c c t t c g g a t t a c c t a c c g t c c a
a c t t g a g g c c t a t c t c a g g a c c g a g g a a a g t t g g c g c a a c
t g g c a a g c g t a c g t t g c c a c g g a g g c c a c g a c g a c c a g c g
c c g a g g c g a c a a c c c c g a c g c c c g t c a c t g c a a c c a g c g c
c t c c g a a c t t g a a g c g g a a c a c t t t a c c t t t c c c t g g c t a
g a a a a t g g c g t g g a t c a t t a c g a a c c g a c a c c c g c a a a c g
a a a a t t c a a a c g t t a c t g t c c g t c t c g g g a c a a t g a g c c c
t a c g c t a a t t g g g g t a a c c g t g g c t g c c g t c g t g a g c g c a
a c g a t c g g c c t c g t c a t t g t a a t t t c c a t c g t c a c c a g a a
a c a t g t g c a c c c c g c a c c g a a a a t t a g a c a c g g t c t c g c a
a g a c g a c g a a g a a c g t t c c c a a a c t a g a a g g g a a t c g c g a

10

20

30

40

50

a a a t t t g g a c c c a t g g t t g c g t g c g a a a t a a a c a a g g g g g
c t g a c c a g g a t a g t g a a c t t g t g g a a c t g g t t g c g a t t g t
t a a c c c g t c t g c g c t a a g c t c g c c c g a c t c a a t a a a a a t g
t g a t t a a g t c t g a a t g t g g c t c t c c a a t c a t t t c g a t t c t
c t a a t c t c c c a a t c c t c t c a a a a g g g g c a g t a t c g g a c a c
g g a c t g g g a g g g g c g t a c a c g a t a g t t a t a t g g t a c a g c a
g a g g c c t c t g a a c a c t t a g g a g g a g a a t t c a g c c g g g g a g
a g c c c c t g t t g a g t a g g c t t g g g a g c a t a t t g c a g g a t g a
a c a t g t t a g t g a t a g t t c t c g c c t c t t g t c t t g c g c g c c t
a a c t t t t g c g a c g c g a c a c g t c c t c t t t t t g g a a g g c a c t
c a g g c t g t c c t c g g g g a a g a t g a t c c c a g a a a c g t t c c g g
a a g g g a c t g t a a t c a a a t g g a c a a a a g t c c t g c g g a a c g c
g t g c a a g a t g a a g g c g g c c g a t g t c t g c t c t t c g c c t a a c
t a t t g c t t t c a t g a t t t a a t t t a c g a c g g a g g a a a g a a a g
a c t g c c c g c c c g c g g g a c c c c t g t c t g c a a a c c t g g t a a t
t t t a c t a a a g c g c g g c g g g c g c g c c g g a t c a g a t c t c c a t
g g t c g a g g t g a g c c c c a c g t t c t g c t t c a c t c t c c c c a t c
t c c c c c c c t c c c c a c c c c c a a t t t t g t a t t t a t t t a t t t
t t t a a t t a t t t t g t g c a g c g a t g g g g g c g g g g g g g g g g n
n n c g c g c g c c a g g c g g g g c g g g g c g g g g c g a g g g g c g g g g
c g g g g c g a g g c g g a g a g g t g c g g c g g c a g c c a a t c a g a g c
g g c g c g c t c c g a a a g t t t c c t t t t a t g g c g a g g c g g c g g c
g g c g g c g g c c c t a t a a a a a g c g a a a g c g c g c g g c g g g c g g g
a g t c g c t g c g c g c t g c c t t c g c c c c g t g c c c c g c t c c g c c
g c c g c c t c g c g c c g c c c g c c c c g g c t c t g a c t g a c c g c g t
t a c t c c c a c a g g t g a g c g g g c g g g a c g g c c c t t c t c c t c c
g g g c t g t a a t t a g c g g c a g g a a g g a a a t g g g c g g g g a g g g
c c t t c g t g c g t c g c c g c g c c g c c g t c c c c t t c t c c c t c t c
c a g c c t c g g g g c t g t c c g c g g g g g g a c g g c t g c c t t c g g g
g g g g a c g g g g c a g g g c g g g g t t c g g c t t c t g g c g t g t g a c
c g g c g g c t c t a g a g c c t c t g c t a a c c a t g t t c a t g c c t t c
t t c t t t t t c c t a c a g c t c c t g g g c a a c g t g c t g g t t a t t g
t g c t g t c t c a t c a t t t t g g c a a a g a a t t g c a g a t c t g g a t
c t a t g a c a a a c c t g c a a g a t c a a a c c c a a c a g a t t g t t c c
g t t c a t a c g g a g c c t t c t g a t g c c a a c a a c c g g a c c g g c g
t c c a t t c c g g a c g a c a c c c t g g a g a a g c a c a c t c t c a g g t
c a g a g a c c t c g a c c t a c a a t t t g a c t g t g g g g g a c a c a g g
g t c a g g g c t a a t t g t c t t t t t c c c t g g a t t c c c t g g c t c a
a t t g t g g g t g c t c a c t a c a c a c t g c a g a g c a a t g g g a a c t
a c a a g t t c g a t c a g a t g c t c c t g a c t g c c c a g a a c c t a c c
g g c c a g c t a c a a c t a c t g c a g a c t a g t g a g t c g g a g t c t c
a c a g t g a g g t c a a g c a c a c t c c c t g g t g g c g t t t a t g c a c
t a a a c g g c a c c a t a a a c g c c g t g a c c t t c c a a g g a a g c c t
g a g t g a a c t g a c a g a t g t t a g c t a c a a t g g g t t g a t g t c t
g c a a c a g c c a a c a t c a a c g a c a a a g t t g g g a a t g t c c t g g
t a g g g g a a g g g g t c a c t g t c c t c a g c c t a c c c a c a t c a t a
t g a t c t t g g g t a t g t g a g g c t t g g t g a c c c c a t t c c c g c t
a t a g g g c t t g a c c c a a a a a t g g t a g c t a c a t g c g a c a g c a
g t g a c a g g c c c a g a g t c t a c a c c a t a a c t g c a g c c g a t g a
t t a c c a a t t c t c a t c a c a g t a c c a a c c a g g t g g g g t a a c a

10

20

30

40

50

a t c a c a c t g t t c t c a g c c a a c a t t g a t g c t a t c a c a a g c c
t c a g c a t t g g g g g a g a g c t c g t g t t t c a a a c a a g c g t c c a
a g g c c t t g t a c t g g g c g c c a c c a t c t a c c t t a t a g g c t t t
g a t g g g a c t g c g g t a a t c a c c a g a g c t g t g g c c g c a g a t a
a t g g g c t g a c g g c c g g c a c c g a c a a t c t t a t g c c a t t c a a
t c t t g t c a t t c c a a c c a a t g a g a t a a c c c a g c c g a t c a c a
t c c a t c a a a c t g g a g a t a g t g a c c t c c a a a a g t g g t g g t c
a g g c a g g g g a t c a g a t g t c a t g g t c g g c a a g t g g g a g c c t
a g c a g t g a c g a t c c a t g g t g g c a a c t a t c c a g g g g c c c t c
c g t c c c g t c a c a c t a g t a g c c t a c g a a a g a g t g g c a a c a g
g a t c c g t c g t t a c g g t c g c t g g g g t g a g t a a c t t c g a g c t
g a t c c c a a a t c c t g a a c t a g c a a a g a a c c t g g t t a c a g a a
t a c g g c c g a t t t g a c c c a g g a g c c a t g a a c t a c a c a a a t
t g a t a c t g a g t g a g a g g g a c c g t c t t g g c a t c a a g a c c g t
c t g g c c a a c a a g g g a g t a c a c t g a t t t t c g t g a g t a c t t c
a t g g a g g t g g c c g a c c t c a a c t c t c c c c t g a a g a t t g c a g
g a g c a t t t t g g c t t c a a a g a c a t a a t c c g g g c t a t a a g g a g
g t a a g a t c c g a t c t c t c g a t t a a t t a a c a a t a a a c a t a g c
a t a c g t t a t g a c a t g g t c t a c c g c g t c t t a t a t g g g g a c g
a c a a g c t t t g c c t c c g a t t c t a g c a t t a c a t a g c c g g t c a g
t a g a t c c t g c c a t t c g g t a g c g c a a c c g g c t a c a t c t t c a
a a c a g t c t c a c g a t a a a t g c a t c t c t c g t t c c t g c c a a t c
c g g a a c c g g g c a t a c c a c t c c c g c c t g c c g a t t t a a t t c t
c a c a a t t g g g c g a t g c c g g c g g g g c a a a a c g a a t g t g g a t
t t g g c a a a c c g a c a c a g g t c t g c t g t a c g g a c t a a t a t g g
g c a c a c c c a c a t c a t t c t t c a g a t g c t c c a t g c a t t g t t c
t a t g a g a a a g a t c c a t a g g g t g g a g g c a g c g t c a c g a g a t
c g c c c a g g c a a t c g a t c g c a t t c g t c t a g t a a a g t g a c g a
g a g t t a t c a t g c a c a c a c c c a t g c c c a c g c c t t c c g a a t a
a c t g g a g c t g t g g a a g a t c g g a a a c g t c t t t t t g a c t g c c
g g t c t c g t a c t a c t t t c g c a c a g g t g t a t a c c c g g a c g c g
t a c t a t a t a t t t t a t a t c a t c c a a c g t c c g a a a t t a c a t a
c g t g g c g g c g a t g g a a g t a g a t g t t g a g t c t t c g a a a g t a
a g t g c c t c g a a t a t g g g t a t t g t c t g t g a a a a t a t c g a a a
g c g g t a c g a c g g t t g c a g a a c c g t c g a t g t c g c c a g a t a c
t a g t a a c a a t a g c t t c g a t a a c g a a g a c t t c c g t g g g c c t
g a a t a c g a t g t g g a g a t a a a t a c c a g a a a a t c t g c t a a t c
t t g a t c g t a t g g a a t c t t c g t g c c g t g a a c a a c g a g c g g c
g t g c g a a c t t t c g a a a g t g t t c g t g t c c t a c g t c t g c c g t g
c g c a t g c a a t a c a g t a t t c t t t c a t c t c t c g c t c c g g g t t c
a g a g g g t c a t g t a t a t a t a t g t a c t a g a t a c g g g g a c g c g
g a c c a a a a a a a a t g c a t a g t g a a g g c a g t c g t t g g a g g a a
a g a a t c c c g g g a g g g a a g t g g a t a t t t t a a a a a c c a t c t c
a c a t a a a t c a a t t a t a a a a t t a a t c c a t g c c t a t a a a t g g
a a a a a t g t t g t g t g t a t g g c a a t g c g t g t a t a t c g t t a t g
a t c t t t t c a c a t a t a t t g a c g g a g t c g g c c c t a t g c c c c t
t c a a c a g a t g a t c t a t a t t c a a c g t g g a c t a c t a g a g g c g
c t a g c a t a c a t a c a t g a a a g g g g c a t c a t t c a c c g a g a c g
t a a a g a c g g a g a a t a t a t t c t t g g a t a a t c a c g a a a a t g c
a g t t t t g g g t g a c t t c g g t g c t g c a t g c c a a c t a g g a g a t

10

20

30

40

50

t g t a t a g a t a c g c c c c a a t g t t a c g g t t g g a g c g g a a c t g
t g g a a a c a a a t t c g c c g g a a t t a t c t g c a c t t g a t c c g t a
t t g c a c a a a a a c a g a t a t t t g g a g t g c c g g a t t g g t t c t a
t a t g a g a t g g c a a t t a a a a a t g t a c c a t t g t t t a g t a a g c
a g g t g a a a a g t t c g g g a t c t c a g c t g a g a t c c a t a a t a c g
g t g c a t g c a a g t g c a t g a a c t g g a g t t t c c c c g c a a c g a t
t c t a c c a a c c t c t g t a a a c a t t t c a a a c a a t a t g c g g t t c
g t g t a c g a c c g c c t t a t a c c a t t c c t c g a g t t a t a a g a a a
t g g g g g g a t g c c a a t g g a t g t t g a a t a t g t c a t t t c t a a a
a t g c t t a c g t t t g a c c a g g a g t t c a g a c c t t c t g c t a a g g
a a a t a t t g a a t a t g c c c c t a t t t a c t a a g g c g c c g a t t a a
c c t g c t t a a t a t c a c a c c c t c t g a c a g t g t c t a a c g g t a t
a c a g g c g g g a g c g g g t c g t g g c g t c a t c a t c a c c a c t t g a
g a a t t t a t a t t t t g a a t t g t t g a t t g a t a a a t t a a c c t g a
t t c a t t g a g a a c t g a a a c g c c a t a t t g g t t t c t t g g a t a t
g t c t a c a a c a a t t a g t t a a a t t g c t a t g t t c t a c t g c g a g
t a a c a t t t g a t a a g t t g t a a g a g a c g g g c g a c t c a t g t c g
a a g t t g a c g a a t a t a a a g t a c a t a a c g t g t t t a g a a t a c c
c a g a a t c c g a a t a g t c c g c g g g g g c g t c t t c t c g c g t g a g
t a c c a a a t a c t g a g t t g a a c t t g a a a a t g c t a a a t c t g t g
a c a c t c t t t g t g t g a t g a t t a t t g t c a c c a c t t c g a a g a t
g g c t t c g a c a t t c a t g a t g t t c t g g t g t t t g t t t g g a a t c
g t a a t a g c g c t t g t t t c g t c c a a g t c t g a c a a c a a a g a a a
a t c t g a a g a a t t a t a t c a c g g a t a a g t c a a c c a a t a t t a g
a a t a c c c a c g c c a t t a t t t g t a t c a a c g g a a a a c t c t t a t
c c c a c a a a a c a t g t a a t c t a c g a t g a a a a c t g t g g c t t c g
c t g t a c t c a a t c c t a t a a g t g a c c c c a a a t a t g t c c t t t t
g a g c c a g c t t c t a a t g g g a a g g c g c a a a t a t g a t g c g a c g
g t c g c g t g g t t t g t t c t c g g t a a a a t g t g t g c c a g a t t a a
t a t a t t t g c g c g a a t t t t a t a a c t g c t c g a c a a a t g a g c c
t t t t g g c a c a t g t t c t a t g a g c t c t c c t g g a t g g t g g g a c
a g g c g c t a c g t c t c a a c c a g t t t c a t t t c t c g c g a c g a a t
t a c a g c t g g t t t t t g c a g c g c c g t c c c g a g a a t t a g a t g g
t t t a t a t a c g c g c g t a g t a g t t g t c a a c g g g g a c t t t a c t
a c g g c c g a t a t a a t g t t t a a t g t t a a a g t g g c a t g t g c c t
t t t c a a a g a c t g g a a t a g a a g a t g a t a c a t t a t g c a a a c c
c t t t c a t t t c t t t g c c a a t g c a a c a t t g c a c a a t t t a a c c
a t g a t t a g a t c g g t a a c t c t t c g a g c g c a c g a a a g c c a t t
t a a a g g a a t g g g t g g c a c g g a g a g g t g g t a a c g t c c c t g c
a g t g c t a c t t g a g t c t a c c a t g t a t c a t g c a t c c a a t c t g
c c t a g a a a t t t c a g g g a t t t c t a c a t a a a g t c t c c a g a t g
a t t a t a a g t a t a a t c a c c t a g a t g g g c c a t c t g t a a t g c t
c a t c a c t g a c a g a c c t a g t g a a g a t t t g g a t g g g a g g c t c
g t t c a c c a a a g t g a c a t t t t t a c t a c t a c a a g t c c t a t a a
a a c a g g t c c g g t a t g a a g a g c a t c a g t c a c a t a c a a a g c a
g t a t c c t g t a a a c a a a a t a c a a g c t a t a a t t t t t t t g a t a
g g g t t a g g c t c g t t c a t t g g a a g c a t a t t c g t a g t t t t g g
t a g t a t g g a t t a t a c g c a g a t a t t g c a a t g g a g c g c g g a g
t g g g g g a a c g c c c c c a g t c c t c g c c g g t a t g t g t a t a c c
a g g c t a t g a t c a c g t g t g a a a c t t g g g c g g a c c t g t a t c a

10

20

30

40

50

t a t g t a c a c c g t c c c t a t t c g t t t a t a g c c a g t a c g t g t t
a t c t g c a c a t a g a g g a a c a t g t g t c a t a c t g g g a t c g c a t
g c a t g g t a t g t g t g a c t c t a a t a t t a t t c t g t a t c a t a a t
a a a a a c a c a g t g c a t g g t a t a t a g a g g a t c g c t g g t a a g c
a c t a c g g t a g a c c a a t c g g c t c a g a t t g c a t t c t t t g g c a
t c g a t a c c g t t g t t a a t t t a t a t g g c a a a g t c t t g t t c a t
g g g a g a t c a g t a t t t g g a g g a a a t a t a c t c t g g a a c g a t g
g a a a t a c t c a a a t g g a a t c a a g c t a a c c g c t g c t a t t c t a
t t g c g c a t g c a a c a t a t t a c g c c g a c t g t c c t a t a a t c a g
t t c t a c g g t a t t c a g a g g a t g c c g g g a c g c c g t t g t t t a t
a c t a g g c c c c a c a g c a g a a t t c

10

配列番号17:1386-04.4#1 (ILT/hCMV IEpro-VP2-HSV
TKpA/HVT) (13017bp)

(HVT EcoRI#7断片中のILT+IBDV遺伝子カセット。

[0158]

ウイルスno. HVT/ILT/IBDV 1386-48.3.1.7)

g a a t t c c a g a c t a a a t g c c c c g g c c c a a t t t g t c a a g t g t
g c a g t c a c g g a g g c g t c g a c c g t g t c c c c g g c a t t a a a c a
g g a a a g c g t t a a a g t t t t t g a a t g t t a g g t c a c a g g t a c a
a a c a t a a a t g t t t g t a c a a a c a g g t a a c a g g t a c a a a c a t
a a a t g c c c c g g c a t a a a t g t c c c t t a c g g c g g a t c g a a a c
g a c a t t a g g c a t a c t c g g g t a c c a t t t t g c a t t c c g a t c a
g c a c g g a t g a a a t t a g g c a g g a a t g c g g t t t a t a t t a t g c
g g c a t t g g a c a a a c g a t a t g g c a t t g a t t g g c a g t t t a t g
a a t g t c t t c a t g t t g g g c g t a a a c g g a t t c c t a t t g g t t c
a g a a g a c a a c g a c g a t a t a t t t a g a g a g a a a a a g c t a c c c
a g c a t a g g a t a a a c a c a c a t t g a g c a t t g a g a g a c a t a g g
t a t c g g t a t g g a t g g g a a a a c t a c a c a c g t g a a c a c c a a a
c g a c t t a t a t a c t c g a g c g g t g a t a c t a c t g a g c a a g a a t
g c a c t g c a t c t g a g c c a c t g a a t g a a g a c t g t g a t g a a a a
t g t g a c c a t c g a t g g a a t t g g a g a a g a a t a t g c g c a g t t c
t t c a t g t c c c c g c a a t g g g t c c c a a a t c t a c a t c g c t t g a
g c g a g g a t a c c a a a a a g g t a t a c c g a t g t a t g g t t t c c a a
c a g a c t c a a t t a t t t t c c c t a t t a t g a g g c g t t c a g g c g g
t c t t t g t t t g a t a t g t a t a t g c t a g g t c g g t t g g g g c g t c
g a c t t a a g c g a t c t g a c t g g g a g a c t a t t a t g c a t c t g t c
a c c a a c g c a a a g t c g g c g t c t a c a t a g a a c t t t a a g a t t t
g t g g a g c g t a g a a t t a t c c c a t c t a a c a g t t a t a t a c g c a
c a t c g g g c c a c g t t c c g c c t t c g a g g g c a c t t c c g a c a g a
t a c g a a t t t a a a g a t g g a t g a a t a a t t a a a t t g g a a a g a g
t a a c t a c a t t a a t c g a g c g t c a t g a c g g c g t c c c g t g a a a
a t g g g a a t t t t c t a c t c g a a a c a c c g t g a c a t t t g a c a g a
c c t g g a a t t g t t a t t c t g a t a t a t a g t g g g t g t g t c t g g c
c g g c a a c a t a c a t a a t g t g c a t g c g a a a c c a c t t t t t c a g
t g t a c g c t g a c a t t g t g c a a c a c g g a g g g g t a g c a t c t a c
a t a c a a t a t a t g t t g a t t a a t g a t t g g a g a a a a a a c t a t g
c a g c t c g c c g a t c a t a t g g c t a a c t c g c c t t c g t c t a t a t
g g c g g a c c c c g c g g g a a a a a t c g a c g t a c c a t c t g a t t t a
c a a c a c c a g t a a t g a a c a t g t c g c a t c c c t g c c c a g a t c t
g t g c g c c c a t t g g c g c g g a t c g t t g t g a a t g c c g c c g a a a

20

30

40

50

c a c t t c a g g t c g g t a t g a g a g c c g g g a g g c c g c c a t c a g c
a g g a g t t t g g c g a g a g g t g t t t g a t a g a a t g a t g a c a g c c
t t c c g t g a c c a c g a g c c t a c t g c g a c a t t t a a t g c t g c a a
a t c c c a t t a g a a a a t g g t c g a g a c a g t t c t a c a g a a t a a
t g a a g a g c c c c c g c g g a c g c a t g c t g a a a t g g g t a a t c g c
c t t a t g a a c a t t a t g t a c t g g t g t t g c t t g g g a c a c g c a g
g a c a a t g c t c g a t a t g g c a g t t g t a c g a g a c g a a t c a g g c
c a t t t t a a g t t t a t t a g a t g a a g t g g t t a t c g g c a c a a c a
a a t c c c t t t t g c a c c c t c g a g c a a t a c t g g a a g c c a t t a t
g c a c c g c a a t c g c c a a c a a g g g g a c c t c a t c g c t t g t t g a
g g a t g c c a a a g t g g c c g a g t a c c t g g t t a g c a t g c g c a a a
t t g a t a t a a c a t a g g c a c g c t c t g a t g t t a c a g a c c a c a a
t a c c g c a t a c a t t t a t t g t a a g g t t g t t a a t a a a g g t t t a
t t c t a t g t a a g a c t a c a a t a c t t t c g a c a t t g c t t g t a t a
c a t a t t a a a t a c t t t c t c a a g t t c c t a t t a c a t a a a a t g g
g a t c t a t c a t t a c a t t c g t t a a g a g t c t g g a t a a t t t t a c
t g t t t g c c a g c t t c g a t c t t g g a a c g t a c t g t g g a t a g t g
c c t t a c t t g g a a t c g t g a a a a t t t g a a a c g t c c a t t a t t t
g g a t a t c t t c c g g t t g t c c c a t a t c c c g c c c t g g t a c c g c
t c g g a t a c c t t g c c c g t a t g g a t t c g t a t t g a c a g t c g c g
c a a t c g g g g a c c a a c a a c g c g t g g g t c c a c a c t c a t t c g g
a a a t t t t c c g a t g a t t c t g a a t a t t t a t t g c c g c t c g t t a
c g a g t c g t t g g a c a t a t c t g t a a t a c a t t t c t t c t t c t g a
a g g a t c g c t g c a c a t t t g a t c t a t a c a t t g g c c a g g a t g t
t c a a g t c t c a g a t g t t g c a t t c t g g c a c a g c a c a a c t t t a
t g g c a t t t c c g a t g t a a t c g t c c g g c a g c c c t g g g g g a g t
t c t a t a t t c g c a t a t t g g g a t g g t a a g g a c a a t a g c a g a t
c t c g c a a c c t c c a g g g a g g c t a t a a t a a c g t t t t t a a a g g
a t g g a t t t c t c a t a a a a a t c t g t c g c a a a t t a c a c t g a g a
a t a t c c t t t t a c t a g c g c c g a t t g a g a g c a t c g t c g t c c a a
t t t t c t a a a t g g a a a g a a a a c a a g g c g g g c a a g a g t g t t c
c a a a c a t t t t c a t t t t c g g c g a a t c t c t c a a a t c c c a t g g
c g t g c a a t t g a t t g c a a a a t t g g c a c t t c c g t t c a c g t t t
g t a t c t c c a a a c t c t a a g a c a c t t t t a a t t g a a a a a c t a c
g t t c t a g t g t g g a a a g a a a c c t a t a g g c a g a c c a t a g a a c
t a t t t g a c a c c a c a t a t c t t t t t g t a t g t c a a a c t g a c c a
t g a t c g t a t g t t g c t g a a t g c a c t a g g g c a a t t c g c t c g c
g c g a c t c c a t a c a t t g a a t a a t t c c a c a c g t c a g c t c a t c
g g t t a g c a a g g t c c a g t a g t t g a a g t c a t t t t a t t t t t c c c
c g c g g c t g g c c a a a t c t a c c t c t g g g a a t a t c c a a g t t g t
c g a a t a t g a t c g c a c c g g c t c t g g t c a t g g t g a a g g a a c t
g t a g c a t a a a g a c g c a g g t a t c a t a g g g g t a a t a t t t t t t
t a t t c a c t c a c a t a c t a a a a g t a a c g c a t a t t a g c a c c a t
g t a t g g g c t a t c a a t t g a c a t t t g c g t a g c a c t a c a t c a c
g a t t a t g t a c a a c a t a a t g g g a c a a c a t a t g g c a a g t a g a
t g c a a t t t c c t c a c a c t a g t t g g g t t t a t c t a c t a t t g a a
t t t t c c c c t a t c t g t g a t a c a c t t g g g a g c c t c t a c a a g c
a t a t t g c c a t c a t g t a c g t t t t t a t c t a c t g t c t t a a c g c
c c a t g g g a a c g g a g g c g t c g t c g t c a t g t a t t g g a c g g c a
a c a t a g g c a g c a a c a c a a a t t g c g t t t a g g t g g g g t g c a t

10

20

30

40

50

g t g g a c t c g a t a c c a a g c c c c t g c a g c t g g g g a a c g t c t g
g t g g a g a g c c g a t a a t t t g a t a t a c g c a c g c c a t a t t a c t
g t c g t t g a a g t a c g c c t t a t c t t c t a t g t t t t c a a a t t t a
g g t t c c c a a g t g g a c g t g a g a a g t g t t t g t a t c t c a c a t g
g a a t g g c c c a a g g c a t t c c a g c c c a g g t g c c t g g t a c t t t t
a a t g g c a a a c a a a c g t t t t g g t a g a g g t a t t g a t t c t a t t
g c a g t t c t g c a g a t a t c t g c a g c c c c g a g t a t c c a c a g g c
t a t a c g a t a c g t t a t c g g a g g c a a g c t t g t t a a t t a a g t c
g a c g g c a g a g t c g c a g a c g c c c c t a t t g g a c g t c a a a a t t
g t a g a g g t g a a g t t t t c a a a c g a t g g c g a a g t a a c g g c g a
c t t g c g t t t c c a c c g t c a a a t c t c c c t a t a g g g t a g a a a c
t a a t t g g a a a g t a g a c c t c g t a g a t g t a a t g g a t g a a a t t
t c t g g g a a a c a g t c c c g c c g g g g t t t t t a a c a g t a a t g a g a
a a t g g c a g a a a c a g c t g t a c t a c a g a g t a a c c g a t g g a a g
a a c a t c g g t c c a g c t a a t g t g c c t g t c g t g c a c g a g c c a t
t c t c c g g a a c c t t a c t g t c t t t t c g a c a c g t c t c t t a t a g
c g a g g g a a a a a g a t a t c g c g c c a g a g t t a t a c t t t a c c t c
t g a t c c g c a a a c g g c a t a c t g c a c a a t a a c t c t g c c g t c c
g g c g t t g t t c c g a g a t t c g a a t g g a g c c t t a a t a a t g t t t
c a c t g c c g g a a t a t t t g a c g g c c a c g a c c g t t g t t t c g c a
t a c c g c t g g c c a a a g t a c a g t g t g g a a g a g c a g c g c g a g a
g c a g g c g a g g c g t g g a t t t c t g g c c g g g g a g g c a a t a t a t
a c g a a t g c a c c g t c c t c a t c t c a g a c g g c a c t c g c g t t a c
t a c g c g a a a g g a g a g g t g c t t a a c a a a c a c a t g g a t t g c g
g t g g a a a a c g g t g c t g c t c a g g c g c a g c t g t a t t c a c t c t
t t t c t g g a c t t g t g t c a g g a t t a t g c g g g a g c a t a t c t g c
t t t g t a c g c a a c g c t a t g g a c c g c c a t t t a t t t t t g a g g a
a t g c t t t t t g g a c t a t c g t a c t g c t t t c t t c c t t c g c t a g
c c a g a g c a c c g c c g c c g t c a c g t a c g a c t a c a t t t t a g g c
c g t c g c g c g c t c g a c g c g c t a a c c a t a c c g g c g g t t g g c c
c g t a t a a c a g a t a c c t c a c t a g g g t a t c a a g a g g c t g c g a
c g t t g t c g a g c t c a a c c c g a t t t c t a a c g t g g a c g a c a t g
a t a t c g g c g g c c a a a g a a a a a g a g a a g g g g g c c c t t t c g
a g g c c t c c g t c g t c t g g t t c t a c g t g a t t a a g g g c g a c g a
c g g c g a g g a c a a g t a c t g t c c a a t c t a t a g a a a a g a g t a c
a g g g a a t g t g g c g a c g t a c a a c t g c t a t c t g a a t g c g c c g
t t c a a t c t g c a c a g a t g t g g g c a g t g g a c t a t g t t c c t a g
c a c c c t t g t a t c g c g a a a t g g c g c g g g a c t g a c t a t a t t c
t c c c c c a c t g c t g c g c t c t c t g g c c a a t a c t t g c t g a c c c
t g a a a a t c g g g a g a t t t g c g c a a a c a g c t c t c g t a a c t c t
a g a a g t t a a c g a t c g c t g t t t a a a g a t c g g g t c g c a g c t t
a a c t t t t t a c c g t c g a a a t g c t g g a c a a c a g a a c a g t a t c
a g a c t g g a t t t c a a g g c g a a c a c c t t t a t c c g a t c g c a g a
c a c c a a t a c a c g a c a c g c g g a c g a c g t a t a t c g g g g a t a c g
a a g a t a t t c t g c a g c g c t g g a a t a a t t t g c t g a g g a a a a
g a a t c c t a g c g c g c c a g a c c c t c g t c c a g a t a g c g t c c c g
c a a g a a a t t c c c g c t g t a a c c a a g a a a g c g g a a g g g c g c a
c c c c g g a c g c a g a a a g c a g c g a a a a g a a g g c c c t c c a g a
a g a c t c g g a g g a c g a c a t g c a g g c a g a g g c t t c t g g a g a a
a a t c c t g c c g c c c t c c c c g a a g a c g a c g a a g t c c c c g a g g

10

20

30

40

50

a c a c c g a g c a c g a t g a t c c a a a c t c g g a t c c t g a c t a t t a
c a a t g a c a t g c c c g c c g t g a t c c c g g t g g a g g a g a c t a c t
a a a a g t t c t a a t g c c g t c t c c a t g c c c a t a t t c g c g g c g t
t c g t a g c c t g c g c g g t c g c g c t c g t g g g g c t a c t g g t t t g
g a g c a t c g t a a a a t g c g c g c g t a g c t a a t c g a g c c t a g a a
t a g g t g g t t t c t t c c t a c a t g c c a c g c c t c a c g c t c a t a a
t a t a a a t c a c a t g g a a t a g c a t a c c a a t g c c t a t t c a t t g
g g a c g t t c g a a a a g c a t g g c a t c g c t a c t t g g a a c t c t g g
c t c t c c t t g c c g c g a c g c t c g c a c c c t t c g g c g c g a t g g g
a a t c g t g a t c a c t g g a a a t c a c g t c t c c g c c a g g a t t g a c
g a c g a t c a c a t c g t g a t c g t c g c g c c t c g c c c c g a a g c t a
c a a t t c a a c t g c a g c t a t t t t t c a t g c c t g g c c a g a g a c c
c c a c a a a c c c t a c t c a g g a a c c g t c c g c g t c g c g t t t c g g
t c t g a t a t a a c a a a c c a g t g c t a c c a g g a a c t t a g c g a g g
a g c g c t t t g a a a a t t g c a c t c a t c g a t c g t c t t c t g t t t t
t g t c g g c t g t a a a g t g a c c g a g t a c a c g t t c t c c g c c t c g
a a c a g a c t a a c c g g a c c t c c a c a c c c g t t t a a g c t c a c t a
t a c g a a a t c c t c g t c c g a a c g a c a g c g g g a t g t t c t a c g t
a a t t g t t c g g c t a g a c g a c a c c a a a g a a c c c a t t g a c g t c
t t c g c g a t c c a a c t a t c g g t g t a t c a a t t c g c g a a c a c c g
c c g c g a c t c g c g g a c t c t a t t c c a a g g c t t c g t g t c g c a c
c t t c g g a t t a c c t a c c g t c c a a c t t g a g g c c t a t c t c a g g
a c c g a g g a a a g t t g g c g c a a c t g g c a a g c g t a c g t t g c c a
c g g a g g c c a c g a c g a c c a g c g c c g a g g c g a c a a c c c c g a c
g c c c g t c a c t g c a a c c a g c g c c t c c g a a c t t g a a g c g g a a
c a c t t t a c c t t t c c c t g g c t a g a a a a t g g c g t g g a t c a t t
a c g a a c c g a c a c c c g c a a a c g a a a a t t c a a a c g t t a c t g t
c c g t c t c g g g a c a a t g a g c c c t a c g c t a a t t g g g g t a a c c
g t g g c t g c c g t c g t g a g c g c a a c g a t c g g c c t c g t c a t t g
t a a t t t c c a t c g t c a c c a g a a a c a t g t g c a c c c c g c a c c g
a a a a t t a g a c a c g g t c t c g c a a g a c g a c g a a g a a c g t t c c
c a a a c t a g a a g g g a a t c g c g a a a a t t t g g a c c c a t g g t t g
c g t g c g a a a t a a a c a a g g g g g c t g a c c a g g a t a g t g a a c t
t g t g g a a c t g g t t g c g a t t g t t a a c c c g t c t g c g c t a a g c
t c g c c c g a c t c a a t a a a a a t g t g a t t a a g t c t g a a t g t g g
c t c t c c a a t c a t t t c g a t t c t c t a a t c t c c c a a t c c t c t c
a a a a g g g g c a g t a t c g g a c a c g g a c t g g g a g g g g c g t a c a
c g a t a g t t a t a t g g t a c a g c a g a g g c c t c t g a a c a c t t a g
g a g g a g a a t t c a g c c g g g g a g a g c c c c t g t t g a g t a g g c t
t g g g a g c a t a t t g c a g g a t g a a c a t g t t a g t g a t a g t t c t
c g c c t c t t g t c t t g c g c g c c t a a c t t t t g c g a c g c g a c a c
g t c c t c t t t t t g g a a g g c a c t c a g g c t g t c c t c g g g g a a g
a t g a t c c c a g a a a c g t t c c g g a a g g g a c t g t a a t c a a a t g
g a c a a a a g t c c t g c g g a a c g c g t g c a a g a t g a a g g c g g c c
g a t g t c t g c t c t t c g c c t a a c t a t t g c t t t c a t g a t t t a a
t t t a c g a c g g a g g a a a g a a a g a c t g c c c g c c c g c g g g a c c
c c t g t c t g c a a a c c t g g t a a t t t t a c t a a a g c g c g g c g a a
a g c t t a g g t c a a t t c c c t g g c a t t a t g c c c a g t a c a t g a c
c t t a t g g g a c t t t c c t a c t t g g c a g t a c a t c t a c g t a t t a
g t c a t c g c t a t t a c c a t g g t g a t g c g g t t t t g g c a g t a c a

10

20

30

40

50

t c a a t g g g c g t g g a t a g c g g t t t g a c t c a c g g g g a t t t c c
a a g t c t c c a c c c c a t t g a c g t c a a t g g g a g t t t g t t t t g g
c a c c a a a a t c a a c g g g a c t t t c c a a a a t g t c g t a a c a a c t
c c g c c c c a t t g a c g c a a a t g g g c g g t a g g c g t g t a c g g t g
g g a g g t c t a t a t a a g c a g a g c t c g t t t a g t g a a c c g t c a g
a t c g c c t g g a g a c g c c a t c c a c g c t g t t t t g a c c t c c a t a
g a a g a c a c c g g g c g c g c c g g a t c t a t g a c a a a c c t g c a a g
a t c a a a c c c a a c a g a t t g t t c c g t t c a t a c g g a g c c t t c t
g a t g c c a a c a a c c g g a c c g g c g t c c a t t c c g g a c g a c a c c
c t g g a g a a g c a c a c t c t c a g g t c a g a g a c c t c g a c c t a c a
a t t t g a c t g t g g g g g a c a c a g g g t c a g g g c t a a t t g t c t t
t t t c c c t g g a t t c c c t g g c t c a a t t g t g g g t g c t c a c t a c
a c a c t g c a g a g c a a t g g g a a c t a c a a g t t c g a t c a g a t g c
t c c t g a c t g c c c a g a a c c t a c c g g c c a g c t a c a a c t a c t g
c a g a c t a g t g a g t c g g a g t c t c a c a g t g a g g t c a a g c a c a
c t c c c t g g t g g c g t t t a t g c a c t a a a c g g c a c c a t a a a c g
c c g t g a c c t t c c a a g g a a g c c t g a g t g a a c t g a c a g a t g t
t a g c t a c a a t g g g t t g a t g t c t g c a a c a g c c a a c a t c a a c
g a c a a a g t t g g g a a t g t c c t g g t a g g g g a a g g g g t c a c t g
t c c t c a g c c t a c c c a c a t c a t a t g a t c t t g g g t a t g t g a g
g c t t g g t g a c c c c a t t c c c g c t a t a g g g c t t g a c c c a a a a
a t g g t a g c t a c a t g c g a c a g c a g t g a c a g g c c c a g a g t c t
a c a c c a t a a a c t g c a g c c g a t g a t t a c c a a t t c t c a t c a c a
g t a c c a a c c a g g t g g g g t a a c a a t c a c a c t g t t c t c a g c c
a a c a t t g a t g c t a t c a c a a g c c t c a g c a t t g g g g g a g a g c
t c g t g t t t c a a a c a a g c g t c c a a g g c c t t g t a c t g g g c g c
c a c c a t c t a c c t t a t a g g c t t t g a t g g g a c t g c g g t a a t c
a c c a g a g c t g t g g c c g c a g a t a a t g g g c t g a c g g c c g g c a
c c g a c a a t c t t a t g c c a t t c a a t c t t g t c a t t c c a a c c a a
t g a g a t a a c c c a g c c g a t c a c a t c c a t c a a a c t g g a g a t a
g t g a c c t c c a a a a g t g g t g g t c a g g c a g g g g a t c a g a t g t
c a t g g t c g g c a a g t g g g a g c c t a g c a g t g a c g a t c c a t g g
t g g c a a c t a t c c a g g g g c c c t c c g t c c c g t c a c a c t a g t a
g c c t a c g a a a g a g t g g c a a c a g g a t c c g t c g t t a c g g t c g
c t g g g g t g a g t a a c t t c g a g c t g a t c c c a a a t c c t g a a c t
a g c a a a g a a c c t g g t t a c a g a a t a c g g c c g a t t t g a c c c a
g g a g c c a t g a a c t a c a c a a a a t t g a t a c t g a g t g a g a g g g
a c c g t c t t g g c a t c a a g a c c g t c t g g c c a a c a a g g g a g t a
c a c t g a t t t t c g t g a g t a c t t c a t g g a g g t g g c c g a c c t c
a a c t c t c c c c t g a a g a t t g c a g g a g c a t t t g g c t t c a a a g
a c a t a a t c c g g g c t a t a a g g a g g t a a g a t c c a t a a t t g a t
t g a c g g g a g a t g g g g g a g g c t a a c t g a a a c a c g g a a g g a g
a c a a t a c c g g a a g g a a c c c g c g c t a t g a c g g c a a t a a a a a
g a c a g a a t a a a a c g c a c g g g t g t t g g g t c g t t t g t t c a t a
a a c g c g g g g t t c g g t c c c a g g g c t g g c a c t c t g t c g a t a c
c c c a c c g a g a c c c c a t t g g g g c c a a t a c g c c c g c g t t t c t
t c c t t t t c c c c a c c c c a c c c c c a a g t t c g g g t g a a g g c c
c a g g g c t c g c a g c c a a c g t c g g g g c g g c a g g c c c t g c c a t
a g c c a c t g g c c c c g t g g g t t a g g g a c g g g g t c c c c c a t g g
g g a a t g g t t t a t g g t t c g t g g g g g t t a t t a t t t t g a a g c t

10

20

30

40

50

t g c c t c c g a t t c t a g c a t t a c a t a g c c g g t c a g t a g a t c c
t g c c a t t c g g t a g c g c a a c c g g c t a c a t c t t c a a a c a g t c
t c a c a a t a a a t g c a t c t c t c g t t c c t g c c a a t c c g g a a c c
g g g c a t a c c a c t c c c g c c t g c c g a t t t a a t t c t c a c a a t t
g g g c g a t g c c g g c g g g g c a a a a c g a a t g t g g a t t t g g c a a
a c c g a c a c a g g t c t g c t g t a c g g a c t a a t a t g g g c a c a c c
c a c a t c a t t c t t c a g a t g c t c c a t g c a t t g t t c t a t g a g a
a a g a t c c a t a g g g t g g a g g c a g c g t c a c g a g a t c g c c c a g
g c a a t c g a t c g c a t t c g t c t a g t a a a g t g a c g a g a g t t a t
c a t g c a c a c a c c c a t g c c c a c g c c t t c c g a a t a a c t g g a g
c t g t g g a a g a t c g g a a a c g t c t t t t t g a c t g c c g g t c t c g
t a c t a c t t t c g c a c a g g t g t a t a c c c g g a c g c g t a c t a t a
t a t t t t a t a t c a t c c a a c g t c c g a a a t t a c a t a c g t g g c g
g c g a t g g a a g t a g a t g t t g a g t c t t c g a a a g t a a g t g c c t
c g a a t a t g g g t a t t g t c t g t g a a a a t a t c g a a a g c g g t a c
g a c g g t t g c a g a a c c g t c g a t g t c g c c a g a t a c t a g t a a c
a a t a g c t t c g a t a a c g a a g a c t t c c g t g g g c c t g a a t a c g
a t g t g g a g a t a a a t a c c a g a a a a t c t g c t a a t c t t g a t c g
t a t g g a a t c t t c g t g c c g t g a a c a a c g a g c g g c g t g c g a a
c t t c g a a a g t g t t c g t g t c c t a c g t c t g c c g t g c g c a t g c
a a t a c a g t a t t c t t t c a t c t c t c g c t c c g g g t t c a g a g g g
t c a t g t a t a t a t a t g t a c t a g a t a c g g g g a c g c g g a c c a a a
a a a a a t g c a t a g t g a a g g c a g t c g t t g g a g g a a a g a a t c c
c g g g a g g g a a g t g g a t a t t t t a a a a a c c a t c t c a c a t a a a
t c a a t t a t a a a a t t a a t c c a t g c c t a t a a a t g g a a a a a t g
t t g t g t g t a t g g c a a t g c g t g t a t a t c g t t a t g a t c t t t t
c a c a t a t a t t g a c g g a g t c g g c c c t a t g c c c c t t c a a c a g
a t g a t c t a t a t t c a a c g t g g a c t a c t a g a g g c g c t a g c a t
a c a t a c a t g a a a g g g g c a t c a t t c a c c g a g a c g t a a a g a c
g g a g a a t a t a t t c t t g g a t a a t c a c g a a a a t g c a g t t t t g
g g t g a c t t c g g t g c t g c a t g c c a a c t a g g a g a t t g t a t a g
a t a c g c c c c a a t g t t a c g g t t g g a g c g g a a c t g t g g a a a c
a a a t t c g c c g g a a t t a t c t g c a c t t g a t c c g t a t t g c a c a
a a a a c a g a t a t t t g g a g t g c c g g a t t g g t t c t a t a t g a g a
t g g c a a t t a a a a a t g t a c c a t t g t t t a g t a a g c a g g t g a a
a a g t t c g g g a t c t c a g c t g a g a t c c a t a a t a c g g t g c a t g
c a a g t g c a t g a a c t g g a g t t t c c c c g c a a c g a t t c t a c c a
a c c t c t g t a a a c a t t t c a a a c a a t a t g c g g t t c g t g t a c g
a c c g c c t t a t a c c a t t c c t c g a g t t a t a a g a a a t g g g g g g
a t g c c a a t g g a t g t t g a a t a t g t c a t t t c t a a a a t g c t t a
c g t t t g a c c a g g a g t t c a g a c c t t c t g c t a a g g a a a t a t t
g a a t a t g c c c c t a t t t a c t a a g g c g c c g a t t a a c c t g c t t
a a t a t c a c a c c c t c t g a c a g t g t c t a a c g g t a t a c a g g c g
g g a g c g g g t c g t g g c g t c a t c a t c a c c a c t t g a g a a t t t a
t a t t t t g a a t t g t t g a t t g a t a a a t t a a c c t g a t t c a t t g
a g a a c t g a a a c g c c a t a t t g g t t t c t t g g a t a t g t c t a c a
a c a a t t a g t t a a a t t g c t a t g t t c t a c t g c g a g t a a c a t t
t g a t a a g t t g t a a g a g a c g g g c g a c t c a t g t c g a a g t t g a
c g a a t a t a a a g t a c a t a a c g t g t t t a g a a t a c c c a g a a t c
c g a a t a g t c c g c g g g g g c g t c t t c t c g c g t g a g t a c c a a a

10

20

30

40

50

t a c t g a g t t t g a a c t t g a a a a t g c t a a a t c t g t g a c a c t c t
 t t g t g t g a t g a t t a t t g t c a c c a c t t c g a a g a t g g c t t c g
 a c a t t c a t g a t g t t c t g g t g t t t g t t t g g a a t c g t a a t a g
 c g c t t g t t t c g t c c a a g t c t g a c a a c a a a g a a a a t c t g a a
 g a a t t a t a t c a c g g a t a a g t c a a c c a a t a t t a g a a t a c c c
 a c g c c a t t a t t t g t a t c a a c g g a a a a c t c t t a t c c c a c a a
 a a c a t g t a a t c t a c g a t g a a a a c t g t g g c t t c g c t g t a c t
 c a a t c c t a t a a g t g a c c c c a a a t a t g t c c t t t t g a g c c a g
 c t t c t a a t g g g a a g g c g c a a a t a t g a t g c g a c g g t c g c g t
 g g t t t g t t c t c g g t a a a a t g t g t g c c a g a t t a a t a t a t t t
 g c g c g a a t t t t a t a a c t g c t c g a c a a a t g a g c c t t t t g g c
 a c a t g t t c t a t g a g c t c t c c t g g a t g g t g g g a c a g g c g c t
 a c g t c t c a a c c a g t t t c a t t t c t c g c g a c g a a t t a c a g c t
 g g t t t t t g c a g c g c c g t c c c g a g a a t t a g a t g g t t t a t a t
 a c g c g c g t a g t a g t t g t c a a c g g g g a c t t t a c t a c g g c c g
 a t a t a a t g t t t a a t g t t a a a g t g g c a t g t g c c t t t t c a a a
 g a c t g g a a t a g a a g a t g a t a c a t t a t g c a a a c c c t t t c a t
 t t c t t t g c c a a t g c a a c a t t g c a c a a t t t a a c c a t g a t t a
 g a t c g g t a a c t c t t c g a g c g c a c g a a a g c c a t t t a a a g g a
 a t g g g t g g c a c g g a g a g g t g g t a a c g t c c c t g c a g t g c t a
 c t t g a g t c t a c c a t g t a t c a t g c a t c c a a t c t g c c t a g a a
 a t t t c a g g g a t t t c t a c a t a a a g t c t c c a g a t g a t t a t a a
 g t a t a a t c a c c t a g a t g g g c c a t c t g t a a t g c t c a t c a c t
 g a c a g a c c t a g t g a a g a t t t g g a t g g g a g g c t c g t t c a c c
 a a a g t g a c a t t t t t a c t a c t a c a a g t c c t a t a a a a c a g g t
 c c g g t a t g a a g a g c a t c a g t c a c a t a c a a a g c a g t a t c c t
 g t a a a c a a a a t a c a a g c t a t a a t t t t t t g a t a g g g t t a g
 g c t c g t t c a t t g g a a g c a t a t t c g t a g t t t t g g t a g t a t g
 g a t t a t a c g c a g a t a t t g c a a t g g a g c g c g g a g t g g g g g a
 a c g c c c c c a g t c c t c g c c g g t a t g t g t a t a c c a g g c t a t
 g a t c a c g t g t g a a a c t t g g g c g g a c c t g t a t c a t a t g t a c
 a c c g t c c c t a t t c g t t t a t a g c c a g t a c g t g t t a t c t g c a
 c a t a g a g g a a c a t g t g t c a t a c t g g g a t c g c a t g c a t g g t
 a t g t g t g a c t c t a a t a t t a t t c t g t a t c a t a a t a a a a a c a
 c a g t g c a t g g t a t a t a g a g g a t c g c t g g t a a g c a c t a c g g
 t a g a c c a a t c g g c t c a g a t t g c a t t c t t t g g c a t c g a t a c
 c g t t g t t a a t t t a t a t g g c a a a g t c t t g t t c a t g g g a g a t
 c a g t a t t t g g a g g a a a t a t a c t c t g g a a c g a t g g a a a t a c
 t c a a a t g g a a t c a a g c t a a c c g c t g c t a t t c t a t t g c g c a
 t g c a a c a t a t t a c g c c g a c t g t c c t a t a a t c a g t t c t a c g
 g t a t t c a g a g g a t g c c g g g a c g c c g t t g t t t a t a c t a g g c
 c c c a c a g c a g a a t t c

配列番号18: 484-1050-2641-10859 (mCMV IEpro-VP
2-SV40pA/ILT/HVT) (15252bp)

(HVT AscI断片中のIBDV+ILT遺伝子カセット) ウイルスno. HVT/
IBDV/ILT 484

g g c g c g c c a c t g g a g a a c g g c a t g a c c g c a a a a g g c g t t g
 t a g a g a t c g a t c c c a c g a a c t c t c a g g c g a t c g t g t c a g t
 c g c c a t a a a c a g c g a c g a t c g t c t c c a g g a t c t g a a c g g t
 t t t c t t c t c a a c g a t c a t c a g t a t a t g a g g a a c t g a a c c t

10

20

30

40

50

g a t a t t t a g c c g a g g g a a a c g c a g g t t a a a a a c c c t a t c a
a g c g a t t g c g a t t t t c g c g t a t c t a g t a a a a a t a g a t g g g
c t t c g g t a c t a g c c t t c g c c g c c a a c t c t g a a t a t g c c c t
t c g t g g a c c t c a t a t a a c a t g g c a t t g t t t g t t g g a t g c g
g g g c c g g a a t t a a g a a g a a c a t t c g a a a t a c g a g c a a a a a
t t t c g g c c c t g g c a t g t g c t g c g c g a g a a t c g g t a c t t c g
g g g a g a a a g t t t t a t c g g a g c t t t g g g t a g t g c a g a g g a a
a c t c t a t c t t g g t t g a a a a t g c a t g c g a c c c t g c a c t t g a
t t c t g g t t a a c c a c g a t c c a a t t t t t a a g a c g g c t g g c g c
g g t c c t a g a t a a c c t c c g c t t a a a a c t a g c c c c a a t a t t g
a t g t g c a g a t a t a a c a c a g a a a a a c g a t c a a t g g a a g a c a
t g c t a c g g c g g t c a t c t c c c g a a g a c a t c a c c g a t t c c c t
a a c a a t g t g c c t g a t t a t g t t a t c g c g c a t t c g t c g t a c c
a t g c g c a c c g c a g g a a a t a a a t a t a g c t a t a t g a t a g a t c
c a a t g a a t c g t a t g t c t a a t t a c a c t c c a g g c g a a t g t a t
g a c a g g t a t a t t g c g a t a t a t t g a c g a a c a t g c t a g a a g g
t g t c c t g a t c a c a t a t g t a a t t t g t a t a t c a c a t g t a c a c
t t a t g c c g a t g t a t g t g c a c g g g c g a t a t t t c t a t t g t a a
t t c a t t t t t t t g t t a g t a a a c t a c c a c a g g c t g t c c g g a a
a t c t a a g t t a a t g a a t a a a g t a g a t g g t t a a t a c t c a t t g
c t t a g a a t t g g a c t a c t t t t a a t t c t c t t t a a t g t t c g t a
t t a a a t a a a a a c a t c t t t a a t a a a c t t c a g c c t c t t c g c t
t a t t g t a g a a a t t g a g t a t t c a a a a t c a t g t t c a a a g c c g
t c t t c g g a g a g t g t a c t c g c c a c g g t g g t t g g a a c a t c a c
t a t g t c t a c a c g t c a a a t t t a a g c a c g t c a g g t c t g t c g a
g g a c a a g a a a t g g t t a a c t a g t g t t t c a a t t a t t c t t a t a
a a c g t t a a g c a t t g t a a g c c c c c g g c c g t c c g c a g c a a c
a a t t t a c t a g t a t g c c g t g g g c t c c g g g a c t a t c a c g g a t
g t c c a a t t c g c a c a t g c a t a t a a t t t t t c t a g g g t c t c t c
a t t t c g a g a a a t c t t c g g g g a t c c a t c a g c a a t g c g g g c t
g t a g t c c c g a t t c c c g t t t c a a a t g a a g g t g c t c c a a c a c
g g t c t t c a a a g c a a c c g g c a t a c c a g c a a a c a c a g a c t g c
a a c t c c c c g c t g c a a t g a t t g g t t a t a a a c a g t a a t c t g t
c t t c t g g a a g t a t a t t t c g c c c g a c a a t c c a c g g c g c c c c
c a a a g t t a a a a a c c a t c c a t g t g t a t t t g c g t c t t c t c t g
t t a a a a g a a t a t t g a c t g g c a t t t t c c c g t t g a c c g c c a g
a t a t c c a a a g t a c a g c a c g a t g t t g c a c g g a c g a c t t t g c
a g t c a c c a g c c t t c c t t t c c a c c c c c c a c c a a c a a a a t g
t t t a t c g t a g g a c c c a t a t c c g t a a t a a g g a t g g g t c t g g
c a g c a a c c c c a t a g g c g c c t c g g c g t g g t a g t t c t c g a g g
c c t t a a g c t t a a g g a t c c c c c a a c t c c g c c c g t t t t a t g a
c t a g a a c c a a t a g t t t t t a a t g c c a a a t g c a c t g a a a t c c
c c t a a t t t g c a a a g c c a a a c g c c c c t a t g t g a g t a a t a c
g g g g a c t t t t t a c c c a a t t t c c c a c g c g g a a a g c c c c c t a
a t a c a c t c a t a t g g c a t a t g a a t c a g c a c g g t c a t g c a c t
c t a a t g g c g g c c c a t a g g g a c t t t c c a c a t a g g g g g c g t t
c a c c a t t t c c c a g c a t a g g g g t g g t g a c t c a a t g g c c t t t
a c c c a a g t a c a t t g g g t c a a t g g g a g g t a a g c c a a t g g g t
t t t t c c c a t t a c t g g c a a g c a c a c t g a g t c a a a t g g g a c t
t t c c a c t g g g t t t t g c c c a a g t a c a t t g g g t c a a t g g g a g

10

20

30

40

50

g t g a g c c a a t g g g a a a a c c c a t t g c t g c c a a g t a c a c t g
a c t c a a t a g g g a c t t t c c a a t g g g t t t t c c a t t g t t g g c
a a g c a t a t a a g g t c a a t g t g g g t g a g t c a a t a g g g a c t t t
c c a t t g t a t t c t g c c c a g t a c a t a a g g t c a a t a g g g g g t g
a a t c a a c a g g a a a g t c c c a t t g g a g c c a a g t a c a c t g c g t
c a a t a g g g a c t t t c c a t t g g g t t t t g c c c a g t a c a t a a g g
t c a a t a g g g g a t g a g t c a a t g g g a a a a c c c a t t g g a g c c
a a g t a c a c t g a c t c a a t a g g g a c t t t c c a t t g g g t t t t g c
c c a g t a c a t a a g g t c a a t a g g g g g t g a g t c a a c a g g a a a g
t t c c a t t g g a g c c a a g t a c a t t g a g t c a a t a g g g a c t t t c
c a a t g g g t t t t g c c c a g t a c a t a a g g t c a a t g g g a g g t a a
g c c a a t g g g t t t t t c c c a t t a c t g g c a c g t a t a c t g a g t c
a t t a g g g a c t t t c c a a t g g g t t t t g c c c a g t a c a t a a g g t
c a a t a g g g g t g a a t c a a c a g g a a a g t c c c a t t g g a g c c a a
g t a c a c t g a g t c a a t a g g g a c t t t c c a t t g g g t t t t g c c c
a g t a c a a a a g g t c a a t a g g g g g t g a g t c a a t g g g t t t t t c
c c a t t a t t g g c a c g t a c a t a a g g t c a a t a g g g g t g a g t c a
t t g g g t t t t t c c a g c c a a t t t a a t t a a a c g c c a t g t a c t
t t c c c a c c a t t g a c g t c a a t g g g c t a t t g a a a c t a a t g c a
a c g t g a c c t t t a a a c g g t a c t t t c c c a t a g c t g a t t a a t g
g g a a a g t a c c g t t c t c g a g c c a a t a c a c g t c a a t g g g a a g
t g a a a g g g c a g c c a a a a c g t a a c a c c g c c c c g g t t t t c c c
c t g g a a a t t c c a t a t t g g c a c g c a t t c t a t t g g c t g a g c t
g c g t t c t a c g t g g g t a t a a g a g g c g c g a c c a g c g t c g g t a
c c g t c g c a g t c t t c g g t c t g a c c a c c g t a g a a c g c a g a g c
t c c t c g c t g c a g g c g g c c g c t c t a g a a c t c g t c g a t c g c a
g c g a t g a c a a a c c t g c a a g a t c a a a c c c a a c a g a t t g t t c
c g t t c a t a c g g a g c c t t c t g a t g c c a a c a a c c g g a c c g g c
g t c c a t t c c g g a c g a c a c c c t g g a g a a g c a c a c t c t c a g g
t c a g a g a c c t c g a c c t a c a a t t t g a c t g t g g g g g a c a c a g
g g t c a g g g c t a a t t g t c t t t t t c c c t g g a t t c c c t g g c t c
a a t t g t g g g t g c t c a c t a c a c a c t g c a g a g c a a t g g g a a c
t a c a a g t t c g a t c a g a t g c t c c t g a c t g c c c a g a a c c t a c
c g g c c a g c t a c a a c t a c t g c a g a c t a g t g a g t c g g a g t c t
c a c a g t g a g g t c a a g c a c a c t c c c t g g t g g c g t t t a t g c a
c t a a a c g g c a c c a t a a a c g c c g t g a c c t t c c a a g g a a g c c
t g a g t g a a c t g a c a g a t g t t a g c t a c a a t g g g t t g a t g t c
t g c a a c a g c c a a c a t c a a c g a c a a a a t t g g g a a t g t c c t g
g t a g g g g a a g g g g t c a c t g t c c t c a g c c t a c c c a c a t c a t
a t g a t c t t g g g t a t g t g a g g c t t g g t g a c c c c a t t c c c g c
t a t a g g g c t t g a c c c a a a a a t g g t a g c t a c a t g c g a c a g c
a g t g a c a g g c c c a g a g t c t a c a c c a t a a c t g c a g c c g a t g
a t t a c c a a t t c t c a t c a c a g t a c c a a c c a g g t g g g g t a a c
a a t c a c a c t g t t c t c a g c c a a c a t t g a t g c t a t c a c a a g c
c t c a g c a t t g g g g g a g a g c t c g t g t t t c a a a c a a g c g t c c
a a g g c c t t g t a c t g g g c g c c a c c a t c t a c c t t a t a g g c t t
t g a t g g g a c t g c g g t a a t c a c c a g a g c t g t g g c c g c a g a t
a a t g g g c t g a c g g c c g g c a c c g a c a a t c t t a t g c c a t t c a
a t c t t g t c a t t c c a a c c a a t g a g a t a a c c c a g c c a a t c a c
a t c c a t c a a a c t g g a g a t a g t g a c c t c c a a a a g t g g t g g t

10

20

30

40

50

c a g g c a g g g g a t c a g a t g t c a t g g t c g g c a a g t g g g a g c c
t a g c a g t g a c g a t c c a t g g t g g c a a c t a t c c a g g g g c c c t
c c g t c c c g t c a c a c t a g t a g c c t a c g a a a g a g t g g c a a c a
g g a t c c g t c g t t a c g g t c g c t g g g g t g a g t a a c t t c g a g c
t g a t t c c a a a t c c t g a a c t a g c a a a g a a c c t g g t t a c a g a
a t a c g g c c g a t t t g a c c c a g g a g c c a t g a a c t a c a c a a a a
t t g a t a c t g a g t g a g a g g g a c c g t c t t g g c a t c a a g a c c g
t c t g g c c a a c a a g g g a g t a c a c t g a t t t t c g t g a g t a c t t
c a t g g a g g t g g c c g a c c t c a a c t c t c c c c t g a a g a t t g c a
g g a g c a t t t t g g c t t c a a a g a c a t a a t c c g g g c t a t a a g g a
g g t a g a t c c a g a c a t g a t a a g a t a c a t t g a t g a g t t t g g a
c a a a c c a c a a a c t a g a a t g c a g t g a a a a a a t g c t t t a t t t
g t g a a a t t t g t g a t g c t a t t g c t t t a t t t g t a a c c a t t a t
a a g c t g c a a t a a a c a a g t t a a c a a c a a c a a t t g c a t t c a t
t t t a t g t t t c a g g t t c a g g g g g a g g t g t g g g a g g t t t t t t
c g g a t c c t c t a g a g t c g a c g g c a g a g t c g c a g a c g c c c c t
a t t g g a c g t c a a a a t t g t a g a g g t g a a g t t t t c a a a c g a t
g g c g a a g t a a c g g c g a c t t g c g t t t c c a c c g t c a a a t c t c
c c t a t a g g g t a g a a a c t a a t t g g a a a g t a g a c c t c g t a g a
t g t a a t g g a t g a a a t t t c t g g g a a c a g t c c c g c c g g g g t t
t t t a a c a g t a a t g a g a a a t g g c a g a a a c a g c t g t a c t a c a
g a g t a a c c g a t g g a a g a a c a t c g g t c c a g c t a a t g t g c c t
g t c g t g c a c g a g c c a t t c t c c g g a a c c t t a c t g t c t t t t c
g a c a c g t c t c t t a t a g c g a g g g a a a a a g a t a t c g c g c c a g a
g t t a t a c t t t t a c c t c t g a t c c g c a a a c g g c a t a c t g c a c a
a t a a c t c t g c c g t c c g g c g t t g t t c c g a g a t t c g a a t g g a
g c c t t a a t a a t g t t t c a c t g c c g g a a t a t t t g a c g g c c a c
g a c c g t t g t t t c g c a t a c c g c t g g c c a a a g t a c a g t g t g g
a a g a g c a g c g c g a g a g c a g g c g a g g c g t g g a t t t c t g g c c
g g g g a g g c a a t a t a t a c g a a t g c a c c g t c c t c a t c t c a g a
c g g c a c t c g c g t t a c t a c g c g a a a g g a g a g g t g c t t a a c a
a a c a c a t g g a t t g c g g t g g a a a a c g g t g c t g c t c a g g c g c
a g c t g t a t t c a c t c t t t t c t g g a c t t g t g t c a g g a t t a t g
c g g g a g c a t a t c t g c t t t g t a c g c a a c g c t a t g g a c c g c c
a t t t a t t t t t g a g g a a t g c t t t t t g g a c t a t c g t a c t g c t
t t c t t c c t t c g c t a g c c a g a g c a c c g c c g c c g t c a c g t a c
g a c t a c a t t t t a g g c c g t c g c g c g c t c g a c g c g c t a a c c a
t a c c g g c g g t t g g c c c g t a t a a c a g a t a c c t c a c t a g g g t
a t c a a g a g g c t g c g a c g t t g t c g a g c t c a a c c c g a t t t c t
a a c g t g g a c g a c a t g a t a t c g g c g g c c a a a g a a a a g a g a
a g g g g g g c c c t t t c g a g g c c t c c g t c g t c t g g t t c t a c g t
g a t t a a g g g c g a c g a c g g c g a g g a c a a g t a c t g t c c a a t c
t a t a g a a a a g a g t a c a g g g a a t g t g g c g a c g t a c a a c t g c
t a t c t g a a t g c g c c g t t c a a t c t g c a c a g a t g t g g g c a g t
g g a c t a t g t t c c t a g c a c c c t t g t a t c g c g a a a t g g c g c g
g g a c t g a c t a t a t t c t c c c c a c t g c t g c g c t c t c t g g c c
a a t a c t t g c t g a c c c t g a a a a t c g g g a g a t t t g c g c a a a c
a g c t c t c g t a a c t c t a g a a g t t a a c g a t c g c t g t t t a a a g
a t c g g g t c g c a g c t t a a c t t t t t a c c g t c g a a a t g c t g g a
c a a c a g a a c a g t a t c a g a c t g g a t t t c a a g g c g a a c a c c t

10

20

30

40

50

t t a t c c g a t c g c a g a c a c c a a t a c a c g a c a c g c g g a c g a c
g t a t a t c g g g g a t a c g a a g a t a t t c t g c a g c g c t g g a a t a
a t t t g c t g a g g a a a a g a a t c c t a g c g c g c c a g a c c c t c g
t c c a g a t a g c g t c c c g c a a g a a a t t c c c g c t g t a a c c a a g
a a a g c g g a a g g g c g c a c c c c g g a c g c a g a a a g c a g c g a a a
a g a a g g c c c c t c c a g a a g a c t c g g a g g a c g a c a t g c a g g c
a g a g g c t t c t g g a g a a a a t c c t g c c g c c c t c c c c g a a g a c
g a c g a a g t c c c c g a g g a c a c c g a g c a c g a t g a t c c a a a c t
c g g a t c c t g a c t a t t a c a a t g a c a t g c c c g c c g t g a t c c c
g g t g g a g g a g a c t a c t a a a a g t t c t a a t g c c g t c t c c a t g
c c c a t a t t c g c g g c g t t c g t a g c c t g c g c g g t c g c g c t c g
t g g g g c t a c t g g t t t g g a g c a t c g t a a a a t g c g c g c g t a g
c t a a t c g a g c c t a g a a t a g g t g g t t t c t t c c t a c a t g c c a
c g c c t c a c g c t c a t a a t a t a a a t c a c a t g g a a t a g c a t a c
c a a t g c c t a t t c a t t g g g a c g t t c g a a a a g c a t g g c a t c g
c t a c t t g g a a c t c t g g c t c t c c t t g c c g c g a c g c t c g c a c
c c t t c g g c g c g a t g g g a a t c g t g a t c a c t g g a a a t c a c g t
c t c c g c c a g g a t t g a c g a c g a t c a c a t c g t g a t c g t c g c g
c c t c g c c c c g a a g c t a c a a t t c a a c t g c a g c t a t t t t t c a
t g c c t g g c c a g a g a c c c c a c a a a c c c t a c t c a g g a a c c g t
c c g c g t c g c g t t t c g g t c t g a t a t a a c a a a c c a g t g c t a c
c a g g a a c t t a g c g a g g a g c g c t t t g a a a a t t g c a c t c a t c
g a t c g t c t t c t g t t t t t g t c g g c t g t a a a g t g a c c g a g t a
c a c g t t c t c c g c c t c g a a c a g a c t a a c c g g a c c t c c a c a c
c c g t t t a a g c t c a c t a t a c g a a a t c c t c g t c c g a a c g a c a
g c g g g a t g t t c t a c g t a a t t g t t c g g c t a g a c g a c a c c a a
a g a a c c c a t t g a c g t c t t c g c g a t c c a a c t a t c g g t g t a t
c a a t t c g c g a a c a c c g c c g c g a c t c g c g g a c t c t a t t c c a
a g g c t t c g t g t c g c a c c t t c g g a t t a c c t a c c g t c c a a c t
t g a g g c c t a t c t c a g g a c c g a g g a a a g t t g g c g c a a c t g g
c a a g c g t a c g t t g c c a c g g a g g c c a c g a c g a c c a g c g c c g
a g g c g a c a a c c c c g a c g c c c g t c a c t g c a a c c a g c g c c t c
c g a a c t t g a a g c g g a a c a c t t t a c c t t t c c c t g g c t a g a a
a a t g g c g t g g a t c a t t a c g a a c c g a c a c c c g c a a a c g a a a
a t t c a a a c g t t a c t g t c c g t c t c g g g a c a a t g a g c c c t a c
g c t a a t t g g g g t a a c c g t g g c t g c c g t c g t g a g c g c a a c g
a t c g g c c t c g t c a t t g t a a t t t c a t c g t c a c c a g a a a c a
t g t g c a c c c c g c a c c g a a a a t t a g a c a c g g t c t c g c a a g a
c g a c g a a g a a c g t t c c c a a a c t a g a a g g g a a t c g c g a a a a
t t t g g a c c c a t g g t t g c g t g c g a a a t a a a c a a g g g g g c t g
a c c a g g a t a g t g a a c t t g t g g a a c t g g t t g c g a t t g t t a a
c c c g t c t g c g c t a a g c t c g c c c g a c t c a a t a a a a a t g t g a
t t a a g t c t g a a t g t g g c t c t c c a a t c a t t t c g a t t c t c t a
a t c t c c c a a t c c t c t c a a a a g g g g c a g t a t c g g a c a c g g a
c t g g g a g g g g c g t a c a c g a t a g t t a t a t g g t a c a g c a g a g
g c c t c t g a a c a c t t a g g a g g a g a a t t c a g c c g g g g a g a g c
c c c t g t t g a g t a g g c t t g g g a g c a t a t t g c a g g a t g a a c a
t g t t a g t g a t a g t t c t c g c c t c t t g t c t t g c g c g c c t a a c
t t t t g c g a c g c g a c a c g t c c t c t t t t t g g a a g g c a c t c a g
g c t g t c c t c g g g g a a g a t g a t c c c a g a a a c g t t c c g g a a g

10

20

30

40

50

g g a c t g t a a t c a a a t g g a c a a a a g t c c t g c g g a a c g c g t g
c a a g a t g a a g g c g g c c g a t g t c t g c t c t t c g c c t a a c t a t
t g c t t t c a t g a t t t a a t t t a c g a c g g a g g a a a g a a a g a c t
g c c c g c c c g c g g g a c c c c t g t c t g c a a a c c t g g t a a t t t t
a c t a a a g c g c g g c g a a a g c t t c c c g g g t t a a t t a a g g c c c
t c g a g g a t a c a t c c a a a g a g g t t g a g t a t t c t c t c t a c a c
t t c t t g t t a a a t g g a a a g t g c a t t t t g c t t g t t c t t a c a a t
c g g c c c g a g t c t c g t t c a c a g c g c c t c g t t c a c a c t t a a a
c c a c a a a t a g t c t a c a g g c t a t a t g g g a g c c a g a c t g a a a
c t c a c a t a t g a c t a a t a t t c g g g g g t g t t a g t c a c g t g t a
g c c c a t t g t g t g c a t a t a a c g a t g t t g g a c g c g t c c t t a t
t c g c g g t g t a c t t g a t a c t a t g g c a g c g a g c a t g g g a t a t
t c a t c c t c g t c a t c g t t a a c a t c t c t a c g g g t t c a g a a t g
t t t g g c a t g t c g t c g a t c c t t t g c c c a t c g t t g c a a a t t a
c a a g t c c g a t c g c c a t g a c c g c g a t a a g c c t g t a c c a t g t
g g c a t t a g g g t g a c a t c t c g a t c a t a c a t t a t a a g a c c a a
c g t g c g a g t c t t c c a a a g a c c t g c a c g c c t t c t t c t t c g g
a t t g t c a a c g g g t t c t t c a g a a t c t a t g c c c a t a t c t g g c
g t t g a g a c c a t t g t g c g t t t a a t g a a c a a t a a a g c g g c a t
g c c a t g g a a a g g a g g g c t g c a g a t c t c c a t t t t c t c a c g c
c a c t a t c c t g g a c g c t g t a g a c g a t a a t t a t a c c a t g a a t
a t a g a g g g g g t a t g t t t c c a c t g c c a c t g t g a t g a t a a g t
t t t c t c c a g a t t g t t g g a t a t c t g c a t t t t c t g c t g c c g a
a c a a a c t t c a t c g c t a t g c a a a g a g a t g c g t g t g t a c a c g
c g c c g g t g g a g t a t a c g g g a a a c t a a a t g t t c a t a g a g g t
c t t t g g g c t a t a t g t t a t t a a a t a a a a t a a t t g a c c a g t g
a a c a a t t t g t t t a a t g t t a g t t t a t t c a a t g c a t t g g t t g
c a a a t a t t c a t t a c t t c t c c a a t c c c a g g t c a t t c t t t a g
c g a g a t g a t g t t a t g a c a t t g c t g t g a a a a t t a c t a c a g g
a t a t a t t t t t a a g a t g c a g g a g t a a c a a t g t g c a t a g t a g
g c g t a g t t a t c g c a g a c g t g c a a c g c t t c g c a t t t t g a g t t
a c c g a a g t g c c c a a c a g t g c t g c g g t t a t g g t t t a t g c g c
a c a g a a t c c a t g c a t g t c c t a a t t g a a c c a t c c g a t t t t t
c t t t t a a t c g c g a t c g a t g t t t g g g c a a c t g c g t t a t t t c
a g a t c t a a a a a a t t t a c c c t t t a t g a c c a t c a c a t c t c t c
t g g c t c a t a c c c c g c t t g g a t a a g a t a t c a t g t a g a t t c c
g c c c t a a g a a a t g c a a a c t a a c a t t a t t g t c g g t t c c a t a
t a c a c t t c c a t c t t g t c c t t c g a a a a t a a c a a a c t c g c g c
a a t a g a c c g t c c g t a c a t g c a t g g c c g a t g t g t g t c a a c a
t c a t t g g t c t g c t a g a t c c c g a t g g g a c g a a t c g t a c a g t
c g t c g c t c c a g c a t t g g c a a a a a t c c c c a g a t a c c c t c c a
t g c g g c a a a t c t a a a t t g c g a c c c c g a a g a g a c t g c a c c a
a a g t c t t a t c g a c g c a c g c t g a t t t t t t t g a a c a g c g g g a
g c c c a t t a t c t t c a g t g g a g c g t a g a c g g g c g a g g c t a a t
t a t g t g a c a t a g c a a c a c t g c a t g t a t g t t t t t a t a a a t c
a a t a a g a g t a c a t a a t t t a t t a c g t a t c a t t t c c g t t t g t
a a t a t a c t g t a t a c a t c a t c c a c a c t a t t a g t c a g c a c t a
g c g c g c g g g c g c a c g t t a c a a t a g c a g c g t g c c c g t t a t c
t a t a t t g t c c g a t a t t t a c a c a t a a c a t t t c a t c g a c a t g
a t t a a a t a c c t a a g t a c t g c a c a c a g a t g t t t a a t g t a t a

10

20

30

40

50

t c g t c a t a t a a a t t a t a t c g c t a g g a c a g a c c c a a a c g a c
c t t t a t c c c a a a c a g t c a g a t c c t c t t c t c a a g t g t c g a t t
t c t g t t a t g g a a t a t g c a t a c c c t g g c c c a g a a a t t g c a c
g c a c g a g c g t a g t g a a t g c g t c a t t g g t t t t a c a t t t a a a
g g c t a a a t g c a c a a a t t c t t t a g a c g a c a g c a c a t c g t t a
a a t a g c a t c t c t a g c g t t c t t a t g a a t g c t a a g c a t t g g a
g t c c t c c t g g t c g g c c a c a a t a a c a g c t g a g t a t c a t a c c
c t g a g c t c c g g g g t t g t c g c a c a t a g c g g a t t c g t a t a a a
c a t a g g a t t t t c c g c g a a t c c a t c a g t t g c a a a a a t c t g t
t a g g c t c c a t c a a c a a c g c t g g a t t t a c t t c a g a t c c a c g
c g t a a a g t a a t g g t g c t c g a a t a c c g t t t t a g a g t t g t c
g g c a t t t c a a g g a a c a a a g a a t t c a t t t c t t c a t t g c a a c
g a c g c g c c a g a a a t c c c a a g a c c t c t t t g g g t a g t a t g t t
c t t g c c t a t a a a a c a c g g c g t t c c a a g t g c c a g g a a c c a c
g c a t g t g t t a c t g t t g g g g c g t a t t c a g a a a t a a a g c g g g
g t t t a t g c g g c t t t t g a a g c t c g g a t a t c c a a a g t a t c g c
t t g c t g a t g a a c g a g c g a t g t a g c t g t t a c a a a a c c t c c t
t t c c a t c c t c c a g t c a a c a t a a t a t t t a t c g g c c t a c c t a
t g t c c g t a a t a a g t a t t g g t c g g g c a a t t a t t c c g t a t g a
g g t c t t g c a g g a a t a a g c t c t t a g g g a c a g c c a g c t t g g a
t a t g g t g c g a a a c a g a c c t t c t c g g c t t c a g a a t g t c g c t
c c g c a g t c t c t t c g t g t c g g t g c a t c t t a g a t c c a c c a t c
a a t g t g t g c a g c a t t g a c t c c c g c c c g t c g a a t a t t c c t t
t t g t t a c g a t g c a g t a a t g a g c a c g a t c a t g g g c g g g g c g
a t g a c g t t c t a t t t g c a t g t c t g c g a a c a a t t t g c g t c a g
t c a t a c a g c t a t g g a g t g g g c c a t t t c t g g c c g t c a a c t t
a a a a a c g c g a a c c g c a g a c a t a t g t a t t t g c a t g c a a a g a
c g t a t c t t c g t a t t t c t g g g c a t c t t c a a a t g c t c t g g c c
a a t a t g g c a a t g a a t t t g g a t t c g t t t g a c g c c g a t g g t a
t g c a g t g c a a a t g t g c c a a t a g c c c a c a t c c g a a a a a g t t
a t t t g t c a t a c a a g c a g g t g t t a a g t a g c a a t c a c a t a a a
g g c a c c a g a c g c c t c a t g g c a t c a t a a t g a a t a g c t c c t t
c t c c c c a c t g g a a c c a c t g a c a a a a t c t g c g a g t a t a t t c
c g c a a a c c a c a t t t t a t t t c t c a t a g a a a c t a c c c t a a a t
c c t t t t a a c g g g a a g a a g a a t c c t a g a t a g t g c t t g a a g t
c a t g a c t g t t a c t g c t g c a a t a a c a c t g t a t a t t a t t t a t
a a a t t c c g t t t g t c t a g g t a t c t g a t g t a g g c a t t c c g a t
c c c t t t a c t a t t g c g t c t t c a c g a c c a a a t g g g a a t g c g c
c a a a a t c c c c a c a c c t c a t c a c c c t g g a g g c a g a t t g t g t
a t t a t t a a t a t c c g c c g a t t g a a g c a c a a a a c g g t a c g g t
a c t g t t c c t a a t t c t g g t a t a g a t t c t a t g g t c a a a a g t c
t g c a t a t c c c c g a c a t t g c c a t g a g a t c a c a c a g t c c a a g
t a g c a t g t t t a t t g a g t c a c t c a g a c t g t c a a c g t c c c t c
g c c g c a c c a c c a a t c g a a a a t a a a g t a t c t a c g c a a g t t a
t a g c t c c g c a t t t t c t a t c g c t a g c a g c a a t c g c g a c g c a
a a a c a t a a a g g c c a t g t t g g g a t t t g a a c t c t c t g g g g g g
c t t g t t a t c t t c t g c a c c g t c g c a g t c g c a g t t t t c c g a a
a t t t a t g t c t a a t a t a t t t t c c g g c c g t g c t c c a a t c g g c
c g a a a a g a a t c t g c g t a t t a c c a g a c t c a t t g a c g g g c c g
a t a a a g a c c a t a a a a c a a a a t t c c t g t g c a c t c c c t c c t c

10

20

30

40

50

c a g t t t t g c c a t c g t c c a a g t c c c g t a a c t t t t t t t g c g t
t t c g a g g a g c a a g c g t t c g t t a t c c c t a c c c a c a c t t g t t
t t c c a c c g t t t t c t t a t t a t a a g c g g t t g t a t c g c c a a c g
c g t c a c c g c a g g t t g t c a c a t a c a g t g a t g g c a t a c t t g a
a c g t g c a a c a a c g c g c t c g c t t t g c a a a t c t a a g t c a t t g
a c c a t c a a a t c g c g t t g a g a g g a t a g c c a g g c a t c t t t t t
t c c t a g t a t g g t g a c g g t g c a g c c a c c c c a a c t c a g t t c t
t g t a a a a a a g c t a t t g g c g g g a a t t t a t g t t c t g a g g t g
c a t t c t a t a t t t a t g a g t c c a t c a a a t g c c a t t a a c c a g a
t t c g t a t t t t t t c g c t c g a c c c g g c a t c a c t a t g g a t a c a
a t a c c t t t c t a t g g c c c a t t t c a g c t c t c g a a c c a a c c a c
a c g g a c a a t t g a c t a a c a t a a g t a t g a t c t t t a t c a c a g t
c g c a c c c a t c t g a g t t a t a t t t a t g g c a t c c g a g c g c t c t
t a c t g t a c g g t c g g a t a c a c c c a t g g t t t t t c c t t t a t a t
a g t c g g g t t a t a g t c t g t c g g g t t t g g c g g t a g c a c g g a g
t a g t t t g a t t t t t a a g a a t c g a a a a c c g g c t t g g a g a g a c
c a c t g t c g a a t a t t t g t c c g t a t a c t c t a c a c g t g a g t g t
t g t c c a t t c c t a g g t a t a t t c a t c t g t t c g g a t a c c t t c a
a t t g c t g t t c a g g c a t a a c c t t a a a g c a t a t g t t a t g t t g
t a c a t c a a a a c t t g g t g a g t t a t g t t c g a t t g c c g c g c a t
a a a g a a t c g t a c a t g a g c g t t t c t g c t a a c a t a c t a t c t a
t a t t c t c a c a c g c c c c t g c a t a t a c t g t t c c t a t t c c a a a
t t c a c g t t t t t g c c c c a t c g g c t a t c t g c t c c c a a a a a g t t
g t a a t a t a g g t g c c g c t g g g t g c g a a a t t t t c a t c a g t t g
t a t t c c t g a t a a a c t g a a t c a c t t t a c a t a a t t t t t g c c a
c a t a t c t g c g t g c a g c c a t a g t a t c g a a c c c g t g g g c t c g
g a g a c g a c a g t g c g t a c a a t g g g t a t t t t a c c t t t c c c c a
a c a a a a t a a t g g t a t a c a a g t t a g g t c c g t a c c t a g a c c t
t a a t g t t t c c a a t t c t t c t g a a t c a c t g c a c t c t c g t a g g
g g a g t a a c g g t a a t a a t t t c g t c t c t g a g c c c c g t t t t g c
g t t g a a a a c t a a t c a c a t t a g a t a a t g t g c a a t c g g t t t c
t t t t a t c c g g a t a c a t c t a a g t a t t a t g a c a t c g g t g g t c
a t t g t t t c c a t c a a c g a c c a t c t t t t a c g a t c g c c c a t a c
t a c t c a t g g a c g t t g t c g g t g t t g a a a a t c a c c a g a a t t
g c a a c g g a t c t c t g g g t a c c a t g c t g c t g a t g g a a t t g g c
g g t t t t a a t t g t t g t t t c a g t c t a t t a t t g c t a t c t t t g g
c g g g g t t g a a t a a t g t g g g g g a g a g t g a t t g c a g g a a t c
c g a a t g g g t c a a t a a a a c g a c c g t g c t c c g t t c t g c c g g c
g c c g a t c c g a t t g a a g c t a t a t a c t t c g c t t c t c t c c c c a
c t t t t c c a a t t t g a t c c g g a a a t a a a a c g g c c c c g g a c a a
c a g t a t c g t a c g a t c c g g a t c c g g a t c c t g c t t g c c t a c a
g a a g a a t c a a c a t c t c g c c c c a a t a t t c t g g t c a a a a c t g
g c t c g c t c a t g g c a a c g c g g a c g t t t c c c c c g g t g g c c a g
t c t t a a t g g t t a a t g t t c t t t t c g g c a a t c t t a t a c a t c a
g c g g g t t g c g t g a a t a c t g g t c a c a g t t c a g t c a t t t a c t
a c a c a c c a g c a a t a c g a c g a c g g a c a g t a c c g t c c c g a c g
a a c g c g a c g c c c a a a a t t g c t a t c g c g a c c g c g t c c g a g g
c g a t g t c g t a c g g g c g g t g c g g g g t t g g a t c c t c g g c a a a
g a g a t c c t c g t a a t t c g g c g g t g g g a g c g g a g g g t a a a g a
c g c g g g t g g g g a t c t c c c t c c g g a c c g c g c g c c g g g c g c g

10

20

30

40

50

g t t c g a a a a t g c t t t c c g c c t c g c t c a g t g t c a a c g c c a a
g t a t t c g g g c g g g c t g g g g g c c g g a a t a t c t c c c g c g a c t
t c t t c t a t c g g c g c g g a a t t g g a g t c g c g g t c g t g g c g c g
c t t c t a g c g t c g t c a a c g g a a g t c c a t t t t c g g g g t c t c c
c g g t g g g c g t t c a g c g t c c a t c g t c g t a t a t g c t c t a a c a
c a c g t c t c g c t a t a t t a a a a a a a g a a g a g t a t c g g t c a g
t g t c g a g t g t c g c c g a c a a t g t c g c g a g t t c t c g g c g a t t
t a a t t t t t g g a a c t g c t c c c t a t g a a t c c c g t a a c t g t a g
c g c c c g c g c a g a a a g c c g c c a t c a g a c c a a c t a c g t g t c t
g t t c g a t g t t t g c c c g c c g a t c g c t t t a c c g a t t a a g g t t
c c g g c g a g a a a t g a c a t g c t c g a t c c a a g a a c a a a g t t t t
t c g c g g t a a a c a a c a a c a t a g t t a c c g t g c g a g a t g g a g a
a a c c a c a t c t c c c g a a t t a g t a g a g g a a a g c c c g c g c t g t
c g g t t t g g g g a c a t a t c g a t c t t t t t t g t g t t t t t c c t a g
g a c c c t t t t g c c a g a t c g t a c a a a g t c g c g t c t t a t g a g c
g g a c g t t c t t a c t g c a g c t c g g t a g g a g t g g g g c a g g g t t
a g a t t t c g t c g g c g t t t c g g c c c c g t a t g c g c c g c g c c a
c c c t c t t c g c c g a g c t c t t t a t g c g c g g t g g g g g t g a g c g
c t t c c g g a g t t g c g a t c t c c g a t c t c g a g c c g c a g c c c g g
c g g t g t c t c t t t c a g t g g a g c g t t a g c g c c a t c a t g t g g t
t c g t g g c g g t g g a a a g g c t a t t a t g t g t t a g g g g a g a g a c
c a c g t g a t c g g c a t g c a a a t g a g c a a g g c g a a c g c g t c a g
c g t t c g c a c t g c g a a c c a a t a a t a t a t a t t a t a c t a t t
g g c t t t a g g t g c g a a c g t c c g g c t a g t c c a a t a g c g g g g t
c g c g t t t c g t a c c a c g t g t t a t a g a c c g c c c t a a a c t c g c
a c t c g g g g g t c c g g c c g c g c c c a g a c a g g g c g g a g a c g t g
c c a c a g g g g c t t t a a a a c a c c g c t t c g g g c a c c g t t c a t c
t c g g c g c g c c

配列番号 19 : SV 40 ポリアデニル化シグナル (199bp)

a g c t t c a g a c a t g a t a a g a t a c a t t g a t g a g t t t g g a c a a
a c c a c a a c t a g a a t g c a g t g a a a a a a a t g c t t t a t t t g t g
a a a t t t g t g a t g c t a t t g c t t t a t t t g t a a c c a t t a t a a g
c t g c a a t a a a c a a g t t a a c a a c a a c a a t t g c a t t c a t t t t
a t g t t t c a g g t t c a g g g g g a g g t g t g g g a g g t t t t t t c g
【0159】

本発明は、本明細書中に記載される具体的な実施形態によって範囲が限定されるものではない。実際、本明細書中に記載されるものに加えて、本発明の様々な改変が前述の説明から当業者に明らかとなるであろう。かかる改変は、添付の特許請求の範囲の範囲内に含まれることが意図される。

【0160】

さらに、核酸またはポリペプチドについて与えられる全ての塩基サイズまたはアミノ酸サイズならびに全ての分子量または分子質量の値はおおよそであり、説明のために提供されるものと理解されるものである。

10

20

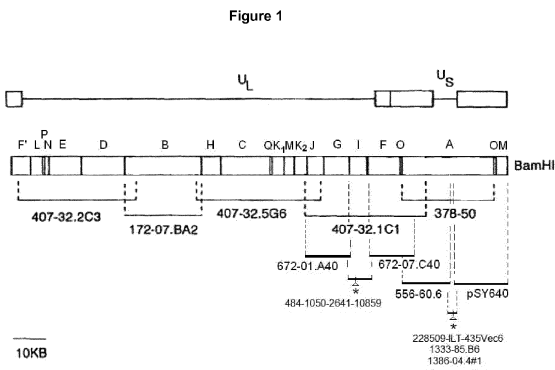
30

40

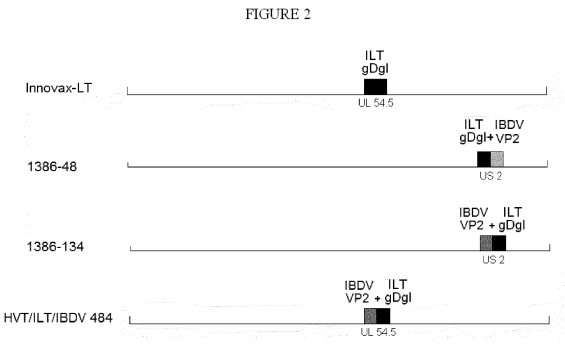
50

【図面】

【図 1】



【図 2】



【配列表】

0007046014000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 31/14 (2006.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)
 A 6 1 K 39/12 (2006.01)
 A 6 1 K 39/245 (2006.01)
 A 6 1 K 39/295 (2006.01)

F I

A 6 1 P 31/14
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 K 39/12
 A 6 1 K 39/245
 A 6 1 K 39/295

弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100143823

弁理士 市川 英彦

(74)代理人 100151448

弁理士 青木 孝博

(74)代理人 100183519

弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483

弁理士 川崎 洋祐

(74)代理人 100203035

弁理士 五味淵 琢也

(74)代理人 100185959

弁理士 今藤 敏和

(74)代理人 100160749

弁理士 飯野 陽一

(74)代理人 100160255

弁理士 市川 祐輔

(74)代理人 100202267

弁理士 森山 正浩

(74)代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812

弁理士 城山 康文

(72)発明者 クック, ステファニー

アメリカ合衆国、ネブラスカ・68022、エルクホーン、ウエスト・センター・ロード・21401

(72)発明者 モーギー, モハマド

アメリカ合衆国、ネブラスカ・68022、エルクホーン、ウエスト・センター・ロード・21401

(72)発明者 タービー, イアン

イギリス国、バッキンガムシャー・エムケー7・7エージェー、ミルトン・ケインズ、ウォルトン・マナー・ウォルトン

(72)発明者 バースターゲン, イワン

オランダ国、5831・アー・エヌ・ボツクスメル、ウイム・ドウ・コルベルストラート・35

(72)発明者 ソンデルメイエル, パウスル・ヤコブス・アントニウス

オランダ国、5831・アー・エヌ・ボツクスメル、ウイム・ドウ・コルベルストラート・35

(72)発明者 ヴァーメイ, ポール

オランダ国、5831・アー・エヌ・ボツクスメル、ウイム・ドウ・コルベルストラート・35

審査官 小倉 梢

(56)参考文献 特表2015-500631 (JP, A)

国際公開第2013/057235 (WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12N 7/00 - 7/08

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)