

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7079197号
(P7079197)

(45)発行日 令和4年6月1日(2022.6.1)

(24)登録日 令和4年5月24日(2022.5.24)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 N 15/45 (2006.01)	C 1 2 N 15/45
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01
C 1 2 N 7/04 (2006.01)	C 1 2 N 7/04
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10

請求項の数 13 (全115頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2018-530548(P2018-530548)	(73)特許権者	309004585 ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリ カ アズ リプリゼンテッド バイ ザ セ クレタリー、デパートメント オブ ヘル ス アンド ヒューマン サービシーズ THE U. S. A. AS REPRES ENTED BY THE SECRET ARY, DEPARTMENT OF H EALTH AND HUMAN SER VICES アメリカ合衆国 20892 メリーラン ド州 ベセスダ ロックレッジ ドライブ 6701 スイート 700 エムエス 7 788 ナショナル インスティチュート オブ ヘルス オフィス オブ テクノロジ 最終頁に続く
(86)(22)出願日	平成28年12月12日(2016.12.12)		
(65)公表番号	特表2018-536428(P2018-536428 A)		
(43)公表日	平成30年12月13日(2018.12.13)		
(86)国際出願番号	PCT/US2016/066146		
(87)国際公開番号	WO2017/100759		
(87)国際公開日	平成29年6月15日(2017.6.15)		
審査請求日	令和1年12月5日(2019.12.5)		
(31)優先権主張番号	62/266,199		
(32)優先日	平成27年12月11日(2015.12.11)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
前置審査			

(54)【発明の名称】 さまざまな弱毒化表現型をもたらすM2-2 ORFにおける突然変異を含む組換えRSV
ウイルス株

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

組換えRSV(respiratory syncytial virus)ゲノムに対する複数の改変によって弱毒化された組換えRSVであって、該複数の改変が、

(a) SEQ ID NO:1の8198Aおよび8200Gに対応する位置でのヌクレオチド変異と組み合せた、SEQ ID NO:1の8203～8436位の234ヌクレオチドの欠失に対応するM2-2 ORFの欠失(「M2-2-AclI」)を含み、かつ該組換えRSVゲノムが、SEQ ID NO:19に示されるポジティブセンス配列を含むか；または

(b) SEQ ID NO:1の8198Aおよび8199Gに対応する位置でのヌクレオチド変異と組み合せた、SEQ ID NO:1の8203～8436位の234ヌクレオチドの欠失に対応するM2-2 ORFの欠失(「M2-2-HindIII」)、RSVのNS2タンパク質におけるアミノ酸置換K51Rをコードするヌクレオチド変異(「NS2」)、およびRSVのNタンパク質におけるアミノ酸置換T24Aをコードするヌクレオチド変異(「N」)を含み、かつ該組換えRSVゲノムが、SEQ ID NO:18に示されるポジティブセンス配列を含み、

該組換えRSVが、感染性であり、弱毒化されており、かつ自己複製性である、前記組換えRSV。

【請求項2】

組換えRSVゲノムのヌクレオチド配列が、SEQ ID NO:19に示されるポジティブセンス配列を含むか、またはそれからなる、請求項1に記載の組換えRSV。

【請求項3】

組換えRSVゲノムのヌクレオチド配列が、SEQ ID NO:18に示されるポジティブセンス配列を含むか、またはそれからなる、請求項1に記載の組換えRSV。

【請求項4】

請求項1～3のいずれか一項に記載の組換えRSVゲノムのヌクレオチド配列、または該RSVゲノムのアンチゲノムcDNAもしくはRNA配列を含む、単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項5】

請求項4に記載のポリヌクレオチド分子を含む、ベクター。

【請求項6】

請求項4に記載のポリヌクレオチド分子または請求項5に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項7】

請求項5に記載のベクターで許容性細胞培養物をトランスフェクトする段階；
該細胞培養物を、ウイルス複製を可能にするのに十分な期間インキュベートする段階；および

複製された組換えRSVを精製する段階

を含む、組換えRSVを產生する方法。

【請求項8】

請求項7に記載の方法によって產生された、組換えRSV。

【請求項9】

請求項1～3または8のいずれか一項に記載の組換えRSVを含む、薬学的組成物。

【請求項10】

請求項1～3または8のいずれか一項に記載の組換えRSVを免疫原として有効な量で含む、
対象においてRSVに対する免疫応答を誘発するための薬学的組成物。

【請求項11】

前記免疫応答が防御免疫応答である、請求項10に記載の薬学的組成物。

【請求項12】

鼻腔内投与される；または

注射、エアロゾル送達、鼻腔用スプレー、もしくは点鼻剤によって投与される、
請求項10または11に記載の薬学的組成物。

【請求項13】

前記対象がヒトである；

前記対象が1～6ヶ月齢である；かつ／または

前記対象がRSVについて血清反応陰性である、

請求項10～12のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる2015年12月11日に出願された米国仮出願第62/266,199号の優先権を主張するものである。

【0002】

分野

本明細書に開示される主題は、RSウイルス(respiratory syncytial virus: RSV)およびワクチンとして使用するのに適したその弱毒化変異株に関する。

【背景技術】

【0003】

背景

ヒトRSウイルス(RSV)は、幼児期に世界中のほぼ全ての人に感染し、かなりの死亡率および罹患率の原因となる。米国だけでも、RSVは毎年75,000～125,000人の入院に関係しており、控えめに見積もっても、RSVは世界中で毎年6400万人の小児感染と16万人以上の小児死亡の原因になっていると推定される。RSVのもう1つの顕著な特徴は、幼児期の

10

20

30

40

50

重度の感染の後に、気道反応性に対する素因を含めて、気道機能不全が頻繁に起こり、一部の個体においては何年間にもわたって続き、青年期以降にまで引きずる可能性があることである。RSV感染は喘息を悪化させ、喘息の発症に関わっている可能性がある。

【0004】

RSVは、パラミクソウイルス科のメンバーであり、したがって、細胞質で複製し、宿主細胞の原形質膜で出芽することによって成熟するエンベロープウイルスである。RSVのゲノムは15.2キロベースのネガティブセンス一本鎖RNAであり、これはゲノムの3'末端の単一のウイルスプロモーターで開始する連續的ストップ-スタート機構により、ウイルスポリメラーゼによって10種のmRNAに転写される。各mRNAは単一の主要タンパク質をコードするが、例外として、2つの重複するオープンリーディングフレーム(ORF)を有するM2 mRNAは、2つの別個のタンパク質M2-1およびM2-2をコードする。11種のRSVタンパク質は、次のものである：RNA結合核タンパク質(N)、リンタンパク質(P)、大きなポリメラーゼタンパク質(L)、結合糖タンパク質(G)、融合タンパク質(F)、小さな疎水性(SH)表面糖タンパク質、内部マトリックスタンパク質(M)、2つの非構造タンパク質NS1およびNS2、ならびにM2-1およびM2-2タンパク質。RSV遺伝子の順序は、3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-Lである。各遺伝子は、遺伝子開始(GS)シグナルおよび遺伝子終止(GE)シグナルと呼ばれる、短い保存された転写シグナルに隣接しており、GSシグナルは、各遺伝子の上流端に存在して、それぞれの遺伝子の転写開始に関与し、GEシグナルは、各遺伝子の下流端に存在して、ポリA尾部の合成とその後のmRNA放出の誘導に関与する。

10

【0005】

RSVワクチンの開発は1960年代から進められてきたが、多くの要因によって複雑化している。例えば、不活化RSVを用いたRSV未感作乳幼児の免疫化は、その後の自然RSV感染時に疾患を増強することが示されており、実験動物での研究は、疾患増強が精製RSVサブユニットワクチンとも関連していることを示している。

20

【0006】

免疫防御のもう1つの障害は、免疫防御の有効性が低下している呼吸気道内腔の表在細胞においてRSVが複製し、疾病を引き起こすことである。したがって、RSV感染の免疫による制御は非効率的であって、不完全であることが多く、可能な限り免疫原性であることがRSVワクチンにとって重要である。RSVワクチンに対する別の障害は、防御免疫応答の強さがウイルス複製(および抗原産生)の程度におおよそ比例することである。したがって、生ワクチンを製造するのに必要なRSVの弱毒化は、一般的に、複製および抗原合成の減少、ならびに付随する免疫原性の低下を同時に引き起こし、そのため、良好な耐容性を示すが、なおも十分に免疫原性である複製のレベルを特定することが有益である。

30

【0007】

もう1つの障害は、RSVが細胞培養中に中程度の力値までしか増殖せず、かつ、精製が困難な長いフィラメント中に存在することが多いことである。RSVは、取り扱い中に容易に感染性を失う。さらなる障害は、弱毒突然変異を同定して開発することの困難さである。適切な突然変異はインビオで弱毒化させるものでなければならないが、インビトロでは複製に対する制限は最小限であるべきである。なぜなら、効率的なワクチン製造にとってそれが好ましいからである。別の障害は、RNAウイルスの特徴である遺伝的不安定性であり、そのため、弱毒突然変異は野生型(wt)のものに、または非弱毒化表現型を付与する別のものに戻りうる。不安定性および脱弱毒化は、点突然変異にとって特に問題である。

40

【0008】

これらの要因を考え合わせると、インビトロで効率的に複製し、最大限に免疫原性であり、十分に弱毒化され、脱弱毒化しにくい、生きた弱毒RSV株が必要とされている。

【発明の概要】

【0009】

概要

本明細書では、さまざまな弱毒化表現型を示すヒトRSVの組換え株を产生する上で、個々に、または他の既知の突然変異との組み合わせで、有用である突然変異が開示される。こ

50

うした突然変異は、ウイルスのM2-2タンパク質をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)の発現を妨害する。また、そのような突然変異を、単独で、または弱毒化表現型の程度を低下させるか、あるいは増加させることができる他の座位での1つまたは複数の追加の突然変異との組み合わせで、含むRSVの組換え株も開示される。したがって、本明細書には、RSVワクチンとして使用するのに適した、さまざまな弱毒化表現型を有する新規な弱毒生RSV株が開示される。いくつかの例では、開示された組換えRSVの具体例は、感染性であり、弱毒化されており、かつ自己複製性であって、ヒト対象において驚くほど高い力価の中和抗体を引き出すことが示される。

【 0 0 1 0 】

いくつかの態様においては、例えば、ウイルスM2-2タンパク質をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)の発現を妨げる改変などの、ウイルスのゲノムに対する1つまたは複数の改変によって弱毒化された、組換えRSVが提供される。いくつかの態様では、組換えRSVのゲノムは、SEQ ID NO:1のT8161、T8167およびT8179に対応する位置での、TからCへの置換などの、ヌクレオチド変異と組み合わせた、SEQ ID NO:1の8189～8429位の241ヌクレオチドの欠失に対応するM2-2 ORFの欠失を含む1つまたは複数の改変を含む(「M2-2」)。該ヌクレオチド変異はこれらの位置での翻訳開始コドンを破壊する。いくつかの態様では、組換えRSVのゲノムは、SEQ ID NO:1のT8198およびC8200に対応する位置でのヌクレオチド変異T8198AおよびC8200Gと組み合わせた、SEQ ID NO:1の8203～8436位の234ヌクレオチドの欠失に対応するM2-2 ORFの欠失を含む1つまたは複数の改変を含む(「M2-2-AcII」)。いくつかの態様では、組換えRSVのゲノムは、SEQ ID NO:1のT8198およびC8199に対応する位置でのヌクレオチド変異T8198AおよびC8199Gと組み合わせた、SEQ ID NO:1の8203～8436位の234ヌクレオチドの欠失に対応するM2-2 ORFの欠失を含む1つまたは複数の改変を含む(「M2-2-HindIII」)；該組換えRSVゲノムは、該1つまたは複数の改変によって弱毒化されたD46ゲノムである。

【 0 0 1 1 】

ウイルスM2-2タンパク質をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)の発現を妨げる改変に加えて、組換えRSVのゲノムは、ウイルスの弱毒化または組換えウイルスの他の特性を増加もしくは減少させるさらなる改変を含むことができる。いくつかの態様では、組換えRSVのゲノムに対する1つまたは複数の改変は、SEQ ID NO:1のC4489、C4492、A4495、A4497、およびG4498に対応する位置でのヌクレオチド変異C4489T、C4492T、A4495T、A4497G、およびG4498Aと組み合わせた、SEQ ID NO:1の4499～4610位に対応する112ヌクレオチドの欠失をさらに含み得る(「6120」)。例えば、いくつかの態様では、組換えRSVは、SEQ ID NO:1のT8198およびC8199に対応する位置でのヌクレオチド変異T8198AおよびC8199Gと組み合わせた、SEQ ID NO:1の8203～8436位の234ヌクレオチドの欠失に対応するM2-2 ORFの欠失(「M2-2-HindIII」)、ならびにSEQ ID NO:1のC4489T、C4492T、A4495T、A4497G、およびG4498Aに対応する位置でのヌクレオチド変異と組み合わせた、SEQ ID NO:1の4499～4610位に対応する112ヌクレオチドの欠失(「6120」)を含む1つまたは複数のゲノム改変によって弱毒化される。

【 0 0 1 2 】

いくつかの態様において、組換えRSVのゲノムに対する1つまたは複数の改変は、該RSVのNタンパク質におけるV267I、Fタンパク質におけるE218AおよびT523I、ならびにLタンパク質におけるC319YおよびH1690Yのアミノ酸置換をコードするヌクレオチド変異(「cp」)をさらに含む。いくつかの態様では、組換えRSVのゲノムに対する1つまたは複数の改変は、該RSVのLタンパク質にY1321K置換を導入するヌクレオチド変異をさらに含み、Lタンパク質はS1313残基を含み、Y1321K置換およびS1313残基をコードするコドンは、それぞれAAAおよびTCAコドンである(「1030s」)。いくつかの態様では、組換えRSVのゲノムに対する1つまたは複数の改変は、該RSVのNS2タンパク質におけるアミノ酸置換K51Rをコードするヌクレオチド変異をさらに含む(「NS2」)。いくつかの態様では

10

20

30

40

50

、組換えRSVのゲノムに対する1つまたは複数の改変は、該RSVのNタンパク質におけるアミノ酸置換T24Aをコードするヌクレオチド変異をさらに含む(「N」)。いくつかの態様では、組換えRSVのゲノムに対する1つまたは複数の改変は、該RSVのNS2タンパク質におけるアミノ酸置換K51RおよびNタンパク質におけるアミノ酸置換T24Aをコードするヌクレオチド変異をさらに含む(「NS2/N」)。いくつかの態様では、組換えRSVのゲノムに対する1つまたは複数の改変は、SEQ ID NO:1の4198～4616位の419ヌクレオチドの欠失に対応するSH ORFの欠失をさらに含む(「SH」)。いくつかの態様では、組換えRSVのゲノムに対する1つまたは複数の改変は、該RSVのGタンパク質をコードするヌクレオチド配列を、臨床分離株A/Maryland/001/11由来のGタンパク質をコードする対応するコドン最適化ヌクレオチド配列(例えば、SEQ ID NO:8、G001BB)と置き換えることをさらに含む。いくつかの態様では、組換えRSVのゲノムに対する1つまたは複数の改変は、該RSVのFタンパク質をコードするヌクレオチド配列を、SEQ ID NO:9 (FBB)として示される対応するコドン最適化ヌクレオチド配列と置き換えることをさらに含む。いくつかの態様では、組換えRSVのゲノムに対する1つまたは複数の改変は、該RSVのFタンパク質をコードするヌクレオチド配列を、臨床分離株A/Maryland/001/11由来のFタンパク質をコードするSEQ ID NO:10 (F001)として示される対応するヌクレオチド配列と置き換えることをさらに含む。いくつかの態様では、組換えRSVのゲノムに対する1つまたは複数の改変は、該RSVのFタンパク質をコードするヌクレオチド配列を、臨床分離株A/Maryland/001/11由来のFタンパク質をコードする対応するコドン最適化ヌクレオチド配列(例えば、SEQ ID NO:11、F001BB)と置き換えることをさらに含む。いくつかの態様では、組換えRSVのゲノムに対する1つまたは複数の改変は、該RSVのFタンパク質におけるアミノ酸置換K66EおよびQ101Pをコードするヌクレオチド変異をさらに含む(「HEK」)。いくつかの態様では、組換えRSVのゲノムに対する1つまたは複数の改変は、該RSVのFタンパク質におけるアミノ酸置換E218AおよびT523Iをコードするヌクレオチド変異をさらに含む(F cp置換)。いくつかの態様では、組換えRSVのゲノムに対する1つまたは複数の改変は、該RSVゲノム中のGタンパク質とFタンパク質をコードする遺伝子の順序を入れ替えることをさらに含む。

【0013】

いくつかの態様において、組換えRSVのゲノムに対する1つまたは複数の改変は、さらに、以下のいずれか1つから選択される突然変異の組み合わせを含むか、またはそれからなる： M2-2、cp/ M2-2、cp/ M2-2/HEK、 M2-2/1030s、NS2/N/ M2-2、NS2/ M2-2、N/ M2-2、 SH/ M2-2、cp/ SH/ M2-2、6120/ M2-2、6120/cp/ M2-2、6120/ M2-2/1030s、6120/NS2/N/ M2-2、6120/G001BB/FBB/ M2-2、6120/FBB/G001BB/ M2-2、6120/G001BB/F/ M2-2、6120/G/FBB/ M2-2、6120/G/FBBHEK/ M2-2、6120/G/FBBcpHEK/ M2-2、6120/FBB/G/ M2-2、6120/G001BB/F001BB/ M2-2、6120/NS2/ M2-2、もしくは6120/N/ M2-2；または M2-2-AcII、cp/ M2-2-AcII、cp/ M2-2-AcII/HEK、 M2-2-AcII/1030s、NS2/N/ M2-2-AcII、NS2/ M2-2-AcII、N/ M2-2-AcII、 SH/ M2-2-AcII、cp/ SH/ M2-2-AcII、6120/ M2-2-AcII、6120/cp/ M2-2-AcII、6120/ M2-2-AcII/1030s、6120/NS2/N/ M2-2-AcII、6120/G001BB/FBB/ M2-2-AcII、6120/FBB/G001BB/ M2-2-AcII、6120/G001BB/F/ M2-2-AcII、6120/G/FBB/ M2-2-AcII、6120/G/FBBHEK/ M2-2-AcII、6120/G/FBBcpHEK/ M2-2-AcII、6120/FBB/G/ M2-2-AcII、6120/G001BB/F001BB/ M2-2-AcII、6120/N/ M2-2-AcII；または M2-2-HindIII、cp/ M2-2-HindIII、cp/ M2-2-HindIII/1030s、NS2/N/ M2-2-HindIII、NS2/ M2-2-HindIII、N/ M2-2-HindIII、 SH/ M2-2-HindIII、cp/ SH/ M2-2-HindIII、6120/ M2-2-HindIII、6120/cp/ M2-2-HindIII、6120/ M2-2-HindIII/1030s、6120/NS2/N/ M2-2-HindIII、6120/G001BB/FBB/ M2-2-HindIII、6120/FBB/G001BB/ M2-2-HindIII、6120/G001BB/F/ M2-2-HindIII、6120/G/FBB/ M2-2-HindIII、6120/G/FBBHEK/ M2-2-HindIII、6120/G/F

10

20

30

40

50

BBcpHEK/ M2-2-HindIII、6120/FBB/G/ M2-2-HindIII、6120/G001BB/F001B
B/ M2-2-HindIII、6120/NS2/ M2-2-HindIII、もしくは6120/N/ M2-2-HindII
I。

【 0 0 1 4 】

いくつかの態様において、組換えRSVのゲノムは、上記で述べたような1つまたは複数の突然変異、ならびにSEQ ID NO:1 (D46配列)と少なくとも90%(例えば、少なくとも95%または少なくとも99%)同一のポジティブセンス配列に対応するヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、組換えRSVのゲノムは、上記で述べたような1つまたは複数の突然変異により改変されたD46ゲノムである。いくつかの態様では、組換えRSVのゲノムは、6120および M2-2変異、ならびにSEQ ID NO:5 (LID/ M2-2配列)と少なくとも90%(例えば、少なくとも95%または少なくとも99%)同一のポジティブセンス配列に対応するヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、組換えRSVのゲノムは、cpおよび M2-2変異、ならびにSEQ ID NO:1 (D46配列)と少なくとも90%(例えば、少なくとも95%または少なくとも99%)同一のポジティブセンス配列に対応するヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、組換えRSVのゲノムは、cpおよび M2-2変異、ならびにSEQ ID NO:15 (D46/cp/ M2-2配列)と少なくとも90%(例えば、少なくとも95%または少なくとも99%)同一のポジティブセンス配列に対応するヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、組換えRSVのゲノムは、6120、 M2-2および1030s変異、ならびにSEQ ID NO:16 (LID/ M2-2/1030s配列)と少なくとも90%(例えば、少なくとも95%または少なくとも99%)同一のポジティブセンス配列に対応するヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、組換えRSVのゲノムは、6120、cpおよび M2-2変異、ならびにSEQ ID NO:17 (LID/cp/ M2-2配列)と少なくとも90%(例えば、少なくとも95%または少なくとも99%)同一のポジティブセンス配列に対応するヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、組換えRSVのゲノムは、NS2、N、 M2-2-HindIII変異、ならびにSEQ ID NO:4 (D46/ M2-2-HindIII配列)と少なくとも90%(例えば、少なくとも95%または少なくとも99%)同一のポジティブセンス配列に対応するヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、組換えRSVのゲノムは、NS2、N、 M2-2-HindIII変異、ならびにSEQ ID NO:18 (D46/NS2/N/ M2-2-HindIII配列)と少なくとも90%(例えば、少なくとも95%または少なくとも99%)同一のポジティブセンス配列に対応するヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、組換えRSVのゲノムは、NS2、N、 M2-2-AcII変異、ならびにSEQ ID NO:3 (D46/ M2-2-AcII配列)と少なくとも90%(例えば、少なくとも95%または少なくとも99%)同一のポジティブセンス配列に対応するヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、組換えRSVのゲノムは、NS2、N、および M2-2-AcII変異、SEQ ID NO:1に対する位置での以下のヌクレオチド変異：404C、779G、C1099の欠失、1139A、1140G、1182G、1210G、5612A、5616A、5640G、6216C、6222C、6387T、7215C、7482T、7560A、7702G、10515T、および13634A、ならびにSEQ ID NO:19 (276配列)と少なくとも90%(例えば、少なくとも95%または少なくとも99%)同一のポジティブセンス配列に対応するヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 1 5 】

いくつかの態様において、組換えRSVのゲノムは、D46/cp/ M2-2ゲノム、LID/ M2-2/1030sゲノム、LID/cp/ M2-2ゲノム、D46/NS2/N/ M2-2-HindIIIゲノム、LID/ M2-2ゲノム、または276ゲノムである。いくつかの態様において、組換えRSVのゲノムは、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、またはSEQ ID NO:19のいずれか1つとして示されるポジティブセンス配列に対応するヌクレオチド配列を含むか、またはそれからなる。

【 0 0 1 6 】

いくつかの態様において、組換えRSVのゲノムは、SEQ ID NO:1に対する次のヌクレオチド変異：404C、779G、1099T、1139A、1140G、1182G、1210G、5612A、5616A、5640G、6216C、6222C、6387T、7215C、7482T、7560A、7702G、10515T

10

20

30

40

50

、および13634Aの導入によってさらに改変された、SEQ ID NO:3として示されるポジティブセンス配列に対応するヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、組換えRSVのゲノムは、SEQ ID NO:1に対する次のヌクレオチド変異：404C、779G、C1099の欠失、1139A、1140G、1182G、1210G、5612A、5616A、5640G、6216C、6222C、6387T、7215C、7482T、7560A、7702G、10515T、および13634Aの導入によってさらに改変された、SEQ ID NO:3として示されるポジティブセンス配列に対応するヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、組換えRSVのゲノムは、SEQ ID NO:1に対する位置での次のヌクレオチド置換：404C、779G、1099T、1139A、1140G、1182G、1210G、1938A、5612A、5616A、5640G、6216C、6222C、6387T、7215C、7482T、7560A、7702G、10515T、13634A、13901Tの1つまたは複数の導入によってさらに改変された、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:4からなる群より選択される配列を含む。

【0017】

本明細書に開示される組換えRSVの態様は、サブタイプA RSVまたはサブタイプB RSVであり得る。本明細書に開示される組換えRSVの態様は、感染性、弱毒性および自己複製性である。

【0018】

開示されたウイルスの発現に関連する方法および組成物も、本明細書において提供する。例えば、記載されたウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをコードする核酸配列を含む、単離されたポリヌクレオチド分子が開示される。

【0019】

組換えRSVを含む薬学的組成物もまた提供する。該組成物はアジュバントをさらに含むことができる。免疫原として有効な量の開示された組換えRSVを対象に投与することによって、該対象において免疫応答を誘発する方法もまた開示する。いくつかの態様では、該対象は、ヒト対象、例えば、1～6ヶ月齢、1～12ヶ月齢、1～18ヶ月齢、またはそれ以上のヒト対象である。

【0020】

[本発明1001]

組換えRSV(respiratory syncytial virus)ゲノムに対する1つまたは複数の改変によって弱毒化された組換えRSVであって、該1つまたは複数の改変が、

(a) SEQ ID NO:1のT8161、T8167およびT8179に対応する位置でのヌクレオチド変異と組み合わせた、SEQ ID NO:1の8189～8429位の241ヌクレオチドの欠失に対応するM2-2オープンリーディングフレーム(ORF)の欠失(「M2-2」)；

(b) SEQ ID NO:1の8198Aおよび8200Gに対応する位置でのヌクレオチド変異と組み合わせた、SEQ ID NO:1の8203～8436位の234ヌクレオチドの欠失に対応するM2-2 ORFの欠失(「M2-2-AcII」)；または

(c) SEQ ID NO:1の8198Aおよび8199Gに対応する位置でのヌクレオチド変異と組み合わせた、SEQ ID NO:1の8203～8436位の234ヌクレオチドの欠失に対応するM2-2 ORFの欠失(「M2-2-HindIII」)。

を含み、

該組換えRSVゲノムが該1つまたは複数の改変によって弱毒化されたD46ゲノムである、組換えRSV。

[本発明1002]

前記1つまたは複数の改変が、SEQ ID NO:1のC4489T、C4492T、A4495T、A4497GおよびG4498Aに対応する位置でのヌクレオチド変異と組み合わせた、SEQ ID NO:1の4499～4610位に対応する112ヌクレオチドの欠失(「6120」)をさらに含む、本発明1001の組換えRSV。

[本発明1003]

組換えRSVゲノムに対する1つまたは複数の改変によって弱毒化された組換えRSVであって、該1つまたは複数の改変が、

10

20

30

40

50

SEQ ID NO:1の8198Aおよび8199Gに対応する位置でのヌクレオチド変異と組み合わせた、SEQ ID NO:1の8203～8436位の234ヌクレオチドの欠失に対応するM2-2 ORFの欠失(「M2-2-HindIII」)；および

SEQ ID NO:1のC4489T、C4492T、A4495T、A4497GおよびG4498Aに対応する位置でのヌクレオチド変異と組み合わせた、SEQ ID NO:1の4499～4610位に対応する112ヌクレオチドの欠失(「6120」)を含む、組換えRSV。

[本発明1004]

前記1つまたは複数の改変が、RSVのNタンパク質におけるV267I、Fタンパク質におけるE218AおよびT523I、ならびにLタンパク質におけるC319YおよびH1690Yのアミノ酸置換をコードするヌクレオチド変異(「cp」)をさらに含む、前記本発明のいずれかの組換えRSV。

10

[本発明1005]

前記1つまたは複数の改変が、RSVのLタンパク質にY1321K置換を導入するヌクレオチド変異をさらに含み、該Lタンパク質が、S1313残基を含み、Y1321K置換およびS1313残基をコードするコドンが、それぞれAAAおよびTCAコドンである(「1030s」)、前記本発明のいずれかの組換えRSV。

[本発明1006]

前記1つまたは複数の改変が、RSVのNS2タンパク質におけるアミノ酸置換K51Rをコードするヌクレオチド変異(「NS2」)をさらに含む、前記本発明のいずれかの組換えRSV。

20

[本発明1007]

前記1つまたは複数の改変が、RSVのNタンパク質におけるアミノ酸置換T24Aをコードするヌクレオチド変異(「N」)をさらに含む、前記本発明のいずれかの組換えRSV。

[本発明1008]

前記1つまたは複数の改変が、RSVのNS2タンパク質におけるアミノ酸置換K51RおよびNタンパク質におけるアミノ酸置換T24Aをコードするヌクレオチド変異(「NS2/N」)をさらに含む、前記本発明のいずれかの組換えRSV。

[本発明1009]

前記1つまたは複数の改変が、SEQ ID NO:1の4198～4616位の419ヌクレオチドの欠失に対応するSH ORFの欠失(「SH」)をさらに含む、前記本発明のいずれかの組換えRSV。

30

[本発明1010]

前記1つまたは複数の改変が、RSVのGタンパク質をコードするヌクレオチド配列を、臨床分離株A/Maryland/001/11由来のGタンパク質をコードする対応するコドン最適化ヌクレオチド配列と置き換えることをさらに含む、前記本発明のいずれかの組換えRSV。

[本発明1011]

臨床分離株A/Maryland/001/11由来のGタンパク質をコードするコドン最適化ヌクレオチド配列が、SEQ ID NO:8 (G001BB)に対応するヌクレオチド配列を含む、本発明1010の組換えRSV。

40

[本発明1012]

前記1つまたは複数の改変が、RSVのFタンパク質をコードするヌクレオチド配列を、SEQ ID NO:9 (FBB)として示される対応するコドン最適化ヌクレオチド配列と置き換えることをさらに含む、前記本発明のいずれかの組換えRSV。

[本発明1013]

前記1つまたは複数の改変が、RSVのFタンパク質をコードするヌクレオチド配列を、臨床分離株A/Maryland/001/11由来のFタンパク質をコードするSEQ ID NO:10 (F001)として示される対応するヌクレオチド配列と置き換えることをさらに含む、本発明1001～1011のいずれかの組換えRSV。

[本発明1014]

前記1つまたは複数の改変が、RSVのFタンパク質をコードするヌクレオチド配列を、臨

50

床分離株A/Maryland/001/11由来のFタンパク質をコードする対応するコドン最適化又クレオチド配列と置き換えることをさらに含む、本発明1001～1011のいずれかの組換えRSV。

[本発明1015]

臨床分離株A/Maryland/001/11由来のFタンパク質をコードするコドン最適化又クレオチド配列が、SEQ ID NO:11 (F001BB)に対応する又クレオチド配列を含む、本発明1014の組換えRSV。

[本発明1016]

前記1つまたは複数の改変が、RSVのFタンパク質におけるアミノ酸置換K66EおよびQ101Pをコードする又クレオチド変異(「HEK」)をさらに含む、前記本発明のいずれかの組換えRSV。

10

[本発明1017]

前記1つまたは複数の改変が、RSVのFタンパク質におけるアミノ酸置換E218AおよびT523Iをコードする又クレオチド変異(F cp置換)をさらに含む、前記本発明のいずれかの組換えRSV。

[本発明1018]

前記1つまたは複数の改変が、RSVゲノム中のGタンパク質とFタンパク質をコードする遺伝子の順序を入れ替えることをさらに含む、前記本発明のいずれかの組換えRSV。

[本発明1019]

前記1つまたは複数の改変が、以下の突然変異：

20

ΔM2-2, cp/ΔM2-2, cp/ΔM2-2/HEK, ΔM2-2/1030s, NS2/N/ΔM2-2, NS2/ΔM2-2, N/ΔM2-2, ΔSH/ΔM2-2, cp/ΔSH/ΔM2-2, 6120/ΔM2-2, 6120/cp/ΔM2-2, 6120/ΔM2-2/1030s, 6120/NS2/N/ΔM2-2, 6120/G001BB/FBB/ΔM2-2, 6120/FBB/G001BB/ΔM2-2, 6120/G001BB/F/ΔM2-2, 6120/G/FBB/ΔM2-2, 6120/G/FBBHEK/ΔM2-2, 6120/G/FBBcpHEK/ΔM2-2, 6120/FBB/G/ΔM2-2, 6120/G001BB/F001BB/ΔM2-2, 6120/NS2/ΔM2-2, もしくは6120/N/ΔM2-2; または

ΔM2-2-AcII, cp/ΔM2-2-AcII, cp/ΔM2-2-AcII/HEK, ΔM2-2-AcII/1030s, NS2/N/ΔM2-2-AcII, NS2/ΔM2-2-AcII, N/ΔM2-2-AcII, ΔSH/ΔM2-2-AcII, cp/ΔSH/ΔM2-2-AcII, 6120/ΔM2-2-AcII, 6120/cp/ΔM2-2-AcII, 6120/ΔM2-2-AcII/1030s, 6120/NS2/N/ΔM2-2-AcII, 6120/G001BB/FBB/ΔM2-2-AcII, 6120/FBB/G001BB/ΔM2-2-AcII, 6120/G/FBB/ΔM2-2-AcII, 6120/G/FBBHEK/ΔM2-2-AcII, 6120/G/FBBcpHEK/ΔM2-2-AcII, 6120/FBB/G/ΔM2-2-AcII, 6120/G001BB/F001BB/ΔM2-2-AcII, 6120/NS2/ΔM2-2-AcII, もしくは6120/N/ΔM2-2-AcII; または

30

ΔM2-2-HindIII, cp/ΔM2-2-HindIII, cp/ΔM2-2-HindIII/HEK, ΔM2-2-HindIII/1030s, NS2/N/ΔM2-2-HindIII, NS2/ΔM2-2-HindIII, N/ΔM2-2-HindIII, ΔSH/ΔM2-2-HindIII, cp/ΔSH/ΔM2-2-HindIII, 6120/ΔM2-2-HindIII, 6120/cp/ΔM2-2-HindIII, 6120/ΔM2-2-HindIII/1030s, 6120/NS2/N/ΔM2-2-HindIII, 6120/G001BB/FBB/ΔM2-2-HindIII, 6120/FBB/G001BB/ΔM2-2-HindIII, 6120/G001BB/F/ΔM2-2-HindIII, 6120/G/FBB/ΔM2-2-HindIII, 6120/G/FBBHEK/ΔM2-2-HindIII, 6120/G/FBBcpHEK/ΔM2-2-HindIII, 6120/FBB/G/ΔM2-2-HindIII, 6120/G001BB/F001BB/ΔM2-2-HindIII, 6120/NS2/ΔM2-2-HindIII, もしくは6120/N/ΔM2-2-HindIII

40

のいずれか1つから選択される突然変異の組み合わせを含むか、またはそれからなる、本発明1001の組換えRSV。

[本発明1020]

組換えRSVゲノムが、前記1つまたは複数の改変と、SEQ ID NO:1と少なくとも90%同一のポジティブセンス配列に対応する又クレオチド配列とを含む、前記本発明のいずれかの組換えRSV。

[本発明1021]

50

組換えRSVゲノムが、前記1つまたは複数の改変と、SEQ ID NO:1と少なくとも95%同一のポジティブセンス配列に対応するヌクレオチド配列とを含む、前記本発明のいずれかの組換えRSV。

[本発明1022]

組換えRSVゲノムが、前記1つまたは複数の改変を含み、該RSVゲノムの残りのヌクレオチドが、SEQ ID NO:1と少なくとも99%同一のポジティブセンス配列に対応するヌクレオチド配列を含む、前記本発明のいずれかの組換えRSV。

[本発明1023]

組換えRSVゲノムが、前記1つまたは複数の改変を含むD46ゲノムである、前記本発明のいずれかの組換えRSV。

10

[本発明1024]

組換えRSVゲノムが、

(a) 6120およびM2-2変異、ならびにSEQ ID NO:5 (LID/ M2-2配列)と少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、および/または少なくとも99%同一のポジティブセンス配列に対応するヌクレオチド配列；

(b) cpおよびM2-2変異、ならびにSEQ ID NO:1 (D46配列)と少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、および/または少なくとも99%同一のポジティブセンス配列に対応するヌクレオチド配列；

(c) cpおよびM2-2変異、ならびにSEQ ID NO:15 (D46/cp/ M2-2配列)と少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、および/または少なくとも99%同一のポジティブセンス配列に対応するヌクレオチド配列；

20

(d) 6120、M2-2、および1030s変異、ならびにSEQ ID NO:16 (LID/ M2-2/1030s配列)と少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、および/または少なくとも99%同一のポジティブセンス配列に対応するヌクレオチド配列；

(e) 6120、cp、およびM2-2変異、ならびにSEQ ID NO:17 (LID/cp/ M2-2配列)と少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、および/または少なくとも99%同一のポジティブセンス配列に対応するヌクレオチド配列；

(f) NS2、N、M2-2-HindIII変異、ならびにSEQ ID NO:4 (D46/ M2-2-HindIII配列)と少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、および/または少なくとも99%同一のポジティブセンス配列に対応するヌクレオチド配列；

30

(g) NS2、N、M2-2-HindIII変異、ならびにSEQ ID NO:18 (D46/NS2/N/ M2-2-HindIII配列)と少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、および/または少なくとも99%同一のポジティブセンス配列に対応するヌクレオチド配列；

(h) NS2、N、M2-2-AcII変異、ならびにSEQ ID NO:3 (D46/ M2-2-AcII配列)と少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、および/または少なくとも99%同一のポジティブセンス配列に対応するヌクレオチド配列；または

(i) NS2、N、およびM2-2-AcII変異、SEQ ID NO:1に対する位置での次のヌクレオチド変異：404C、779G、C1099の欠失、1139A、1140G、1182G、1210G、5612A、5616A、5640G、6216C、6222C、6387T、7215C、7482T、7560A、7702G、10515T、および13634A；ならびにSEQ ID NO:19 (276配列)と少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、および/または少なくとも99%同一のポジティブセンス配列に対応するヌクレオチド配列

40

の1つを含む、本発明1001の組換えRSV。

[本発明1025]

組換えRSVゲノムが、

D46/cp/ M2-2ゲノム；

LID/ M2-2/1030sゲノム；

LID/cp/ M2-2ゲノム；

D46/NS2/N/ M2-2-HindIIIゲノム；

LID/ M2-2ゲノム；または

50

276ゲノムの1つである、本発明1001の組換えRSV。[本発明1026]組換えRSVゲノムのヌクレオチド配列が、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、もしくはSEQ ID NO:19のいずれか1つとして示されるポジティブセンス配列に対応するヌクレオチド配列を含むか、またはそれからなる、本発明1001の組換えRSV。[本発明1027]SEQ ID NO:1に対する次のヌクレオチド変異：404C、779G、1099T、1139A、1140G、1182G、1210G、5612A、5616A、5640G、6216C、6222C、6387T、7215C、7482T、7560A、7702G、10515T、および13634Aの導入によってさらに改変された、SEQ ID NO:3として示されるポジティブセンス配列に対応するヌクレオチド配列を組換えRSVゲノムが含む、本発明1001の組換えRSV。

10

[本発明1028]SEQ ID NO:1に対する次のヌクレオチド変異：404C、779G、C1099の欠失、1139A、1140G、1182G、1210G、5612A、5616A、5640G、6216C、6222C、6387T、7215C、7482T、7560A、7702G、10515T、および13634Aの導入によってさらに改変された、SEQ ID NO:3として示されるポジティブセンス配列に対応するヌクレオチド配列を、組換えRSVゲノムが含む、本発明1001の組換えRSV。

20

[本発明1029]SEQ ID NO:1に対する位置での次のヌクレオチド置換：404C、779G、1099T、1139A、1140G、1182G、1210G、1938A、5612A、5616A、5640G、6216C、6222C、6387T、7215C、7482T、7560A、7702G、10515T、13634A、13901Tの1つまたは複数の導入によってさらに改変された、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:4からなる群より選択された配列を、組換えRSVゲノムまたはアンチゲノムが含む、本発明1001の組換えRSV。[本発明1030]サブタイプAのRSVである、前記本発明のいずれかの組換えRSV。[本発明1031]

30

サブタイプBのRSVである、本発明1001～1019のいずれかの組換えRSV。[本発明1032]感染性であり、弱毒化されており、かつ自己複製性である、前記本発明のいずれかの組換えRSV。[本発明1033]本発明1001～1032のいずれかの組換えRSVゲノムのヌクレオチド配列、または該RSVゲノムのアンチゲノムcDNAもしくはRNA配列を含む、単離されたポリヌクレオチド分子。[本発明1034]本発明1033のポリヌクレオチド分子を含む、ベクター。[本発明1035]

40

本発明1033のポリヌクレオチド分子または本発明1034のベクターを含む、細胞。[本発明1036]本発明1034のベクターで許容性細胞培養物をトランスフェクトする段階；該細胞培養物を、ウイルス複製を可能にするのに十分な期間インキュベートする段階；および複製された組換えRSVを精製する段階を含む、組換えRSVを产生する方法。[本発明1037]本発明1036の方法によって產生された、組換えRSV。[本発明1038]

50

本発明1001～1032または1037のいずれかの組換えRSVを含む、薬学的組成物。

[本発明1039]

免疫原として有効な量の本発明1038の薬学的組成物を対象に投与する段階を含む、対象においてRSVに対する免疫応答を誘発する方法。

[本発明1040]

前記免疫応答が防御免疫応答である、本発明1039の方法。

[本発明1041]

薬学的組成物が鼻腔内投与される、本発明1039または1040の方法。

[本発明1042]

前記RSVが注射、エアロゾル送達、鼻腔用スプレー、または点鼻剤によって投与される

10

本発明1039または1040の方法。

[本発明1043]

前記対象がヒトである、本発明1039～1042のいずれかの方法。

[本発明1044]

前記対象が1～6ヶ月齢である、本発明1039～1043のいずれかの方法。

[本発明1045]

前記対象がRSVについて血清反応陰性である、本発明1039～1044のいずれかの方法。

[本発明1046]

対象においてRSVに対する免疫応答を誘発するための、本発明1001～1032または本発明1037のいずれかの組換えRSVの使用。

20

本開示の上記のおよび他の特徴ならびに利点は、添付の図面を参照しながら進めるいくつかの態様の以下の詳細な説明から、より明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】図1Aおよび1B：RSVゲノムにおける「M2-2」変異は、241nt欠失の導入およびM2-2タンパク質の3つの潜在的翻訳開始コドンの除去により、RSV骨格中のM2-2 ORFをサイレンシングする。配列ナンバリングは、GenBankアクセション番号M74568で表されるwtヒトRSV A2株の完全な配列に従っており、それを参照により本明細書に組み入れる。(図1A) RSVゲノムおよび重複するM2-1 ORFとM2-2 ORFの組織図。M2-2 ORFの3つの潜在的ATG翻訳開始コドンが示される。(図1B) M2-2変異の詳細。上のヌクレオチド配列は生物学的wt RSV (M74568)のものであり、SEQ ID NO:1の8150～8204および8247～8440に対応するヌクレオチドを示す。M74568とSEQ ID NO:1の間のヌクレオチドの番号付けは、SEQ ID NO:1の1099位での单一ヌクレオチドの挿入のために、M74568と比較して1ヌクレオチドずれている。すぐ下のアミノ酸配列はM2-1タンパク質のC末端の配列(SEQ ID NO:12)である。次のアミノ酸配列は、M2-2タンパク質のN末端残基(SEQ ID NO:13)である。M2-2 ORFの3つの潜在的ATG開始コドンは、ボックスで囲まれ、太字で示される。2番目のヌクレオチド配列(M2-2変異の場合)は、M2-2 ORFをサイレンシングする突然変異を示す(SEQ ID NO:1のヌクレオチド8150～8188および8430～8440が示され、その直下にアミノ酸配列SEQ ID NO:13が示される)。 M2-2変異の場合には、3つの潜在的な翻訳ATG開始部位の各々がACGに変更され、かつM74568のヌクレオチド8188～8428が欠失されて、241ヌクレオチドが除去された。TER, 翻訳終止コドン。

30

【図2】 M2-2変異を含む、D46骨格を用いた弱毒化組換えRSVの2つの例の遺伝子マップの描写。これらはD46/ M2-2ウイルス(M2-2変異を含む)およびLID/ M2-2ウイルス(M2-2変異と「6120」変異を含む、図3参照)である。これらの2つの構築物のアンチゲノムcDNA配列は、それぞれ、SEQ ID NO:2およびSEQ ID NO:5で示される。

【図3】図3Aおよび3B：RSVゲノムにおける「6120」変異は、SH遺伝子の下流の非翻訳領域の112ヌクレオチドの欠失を含む。配列ナンバリングは、GenBankアクセション番号M74568で表されるwtヒトRSV A2株の完全な配列に従う。RSVゲノムマップ(図3A)およびLID/ M2-2に存在する「6120」変異を含むSH遺伝子の下流末端(図3B)。本開示

40

50

において、ウイルス名での「6120」の使用は、6120変異の存在を示す。(図3A) RSVゲノムマップ。矢印は、SH遺伝子の下流の非翻訳領域における6120変異の位置を示す。(図3B) 6120変異の詳細。上のヌクレオチド配列は、生物学的wt RSV (M74568)のものであり、SH遺伝子の下流末端に対応するSEQ ID NO:1のヌクレオチド4481～4498および4611～4632を示す。SH ORFの最後の5つのコドンが示され、対応するアミノ酸配列(AR VNT、SEQ ID NO:14)が提供されて、その後に翻訳終止コドン(TER)が続く。この後に右へSH遺伝子の下流非翻訳領域(SEQ ID NO:1のヌクレオチド4611～4632)が続き、SH遺伝子終止シグナルには下線が引かれている。3個のドットは、6120変異において欠失される下流非翻訳領域の112ヌクレオチド(M74568のヌクレオチド4498～4609)を表す。下のヌクレオチド配列(SEQ ID NO:5のヌクレオチド4481～4520を示し、対応するアミノ酸配列(AR VNT、SEQ ID NO:14)が提供される)は、6120変異を示し、この変異は112ヌクレオチドの欠失、ならびにSH ORFの下流の3つのコドンと終止コドンにおける5つのサイレント点突然変異(太字)を含む。天然に存在するXholおよびPacI制限部位はイタリック体で示される。

【図4】1つまたは複数の追加の弱毒突然変異をそれぞれ含む、RSV D46/ M2-2の誘導体の3つの例のゲノムの概略図。M2-2変異が示される。他の弱毒突然変異は、「cp」変異のセット(N、FおよびLタンパク質における5つのアミノ酸置換：N (V267I)、F (E218AおよびT523I)、L (C319YおよびH1690Y))、およびLタンパク質における安定化1030変異(「1030s」変異)を含む；「1030s」変異は、Lアミノ酸1321にAAAコドンを導入することによって生成されたY1321K置換、およびL位置1313でのセリンコドンの安定化バージョン(SEQ ID NO:1のnt 12435～12437；AGCをTCAに変更)を含む(1321K(AA A) + S1313(TCA); Luongo, et al. 2012. J Virol 86:10792-10804)。さらなる変異は、Fタンパク質におけるHEK変化(K66EおよびQ101P)である(Connors, et al. 1995. Virology 208:478-484; Whitehead, et al. 1998. J Virol 72:4467-4471)。

【図5】1つまたは複数の追加の弱毒突然変異をそれぞれ含む、RSV LID/ M2-2の誘導体の4つの例のゲノムの概略図。「LID」骨格は、「6120」変異を含むD46ベースのゲノムである。M2-2変異と6120変異が示される。他の弱毒突然変異は、「cp」変異のセット(N、FおよびLタンパク質における5つのアミノ酸置換：N (V267I)、F (E218AおよびT523I)、L (C319YおよびH1690Y))、SH遺伝子の欠失(図6参照)、およびLタンパク質における「1030s」変異を含む。SH欠失は6120変異を取り除くので、SH遺伝子全体が欠失されているウイルス(RSV SH/ M2-2およびRSV cp/ SH/ M2-2)は、「LID」とは呼ばれないことに留意されたい。

【図6】SH遺伝子をサイレンシングする419ヌクレオチドの欠失である、「SH」変異の詳細。配列ナンバリングは、GenBankアクセション番号M74568で表されるwtヒトRSV A2株の完全な配列に従う。上の配列(SEQ ID NO:1のヌクレオチド4191～4229および4617～4637を示す)において、左から右へ以下の特徴を含む：M遺伝子終止シグナル(下線)、M/SH遺伝子間配列(IGS)、SH遺伝子開始シグナル(下線)、SH遺伝子の本体(M74568のヌクレオチド4229～4615、示されていない)を示す3個のドット、SH遺伝子終止シグナル(下線)、およびSH/G IGSの一部。下の配列(SEQ ID NO:1のヌクレオチド4191～4197および4617～4637)は、SH変異を生じる419ヌクレオチドの欠失を示す。これは操作上SH遺伝子の欠失と呼ばれるが、この欠失は実際にはM遺伝子終止シグナルのすぐ上流からSH遺伝子終止シグナルのすぐ上流まで広がっていることに留意されたい。

【図7】BALB/cマウスにおける例示的な組換えRSVの複製。BALB/cマウスの気道におけるRSV D46(組換え体wt親)、RSV LID/ M2-2、RSV SH/ M2-2、RSV LID/ M2-2/1030s、およびRSV cp/ SH/ M2-2の複製の結果は、鼻甲介および肺における複製をRT-qPCRで評価して、示す。10匹(またはRSV D46については12匹)のグループのマウスに、0.1ml中の5.8 log₁₀ PFUの示されたウイルスを鼻腔内(IN)経路で接種した。ウイルスあたり5匹のマウス(またはRSV D46については6匹)を4日目と5日目(D4、D5)に犠牲にし、鼻甲介および肺を取り出し、ホモジナイズして、RSV M遺伝子に特異的なRT-qPCRで評価し、並行して評価したクローニングM cDNAに対してコピー数を定量した。LoD：検

10

20

30

40

50

出限界。

【図8A】アフリカミドリザル(AGM)の気道における例示的なRSV組換えウイルスの複製。排出(shedding)をRT-qPCRで評価して、AGMの気道におけるRSV LID/ M2-2、RSV SH/ M2-2、RSV LID/ M2-2/1030s、およびRSV cp/ SH/ M2-2の複製データを示す。4匹のグループのAGMに、(部位あたり)0.1ml中の $6.0 \log_{10}$ PFUの示されたウイルスを、INおよび気管内(IT)経路の組み合わせで接種した。表示した日の鼻咽頭(NP)スワブおよび気管洗浄を、RSV M遺伝子に特異的なRT-qPCRで評価し、並行して評価したクローン化M cDNAに基づいてコピー数を定量した。グラフに描いた結果は、実施例2、表1および2に記載のアッセイからの結果である。

【図8B】アフリカミドリザル(AGM)の気道における例示的なRSV組換えウイルスの複製。排出をRT-qPCRで評価して、AGMの気道におけるRSV LID/ M2-2、RSV SH/ M2-2、RSV LID/ M2-2/1030s、およびRSV cp/ SH/ M2-2の複製データを示す。4匹のグループのAGMに、(部位あたり)0.1ml中の $6.0 \log_{10}$ PFUの示されたウイルスを、INおよび気管内(IT)経路の組み合わせで接種した。表示した日の鼻咽頭(NP)スワブおよび気管洗浄を、RSV M遺伝子に特異的なRT-qPCRで評価し、並行して評価したクローン化M cDNAに基づいてコピー数を定量した。グラフに描いた結果は、実施例2、表1および2に記載のアッセイからの結果である。

【図9】図9Aおよび9B：血清反応陰性の乳幼児における例示的な組換えRSVのピーク力価。1回のIN接種後の血清反応陰性乳幼児(6～24ヶ月齢)の鼻洗浄液におけるRSV MEDI/ M2-2およびRSV rA2cp248/404/1030 SH(図9A)またはRSV LID/ M2-2(図9B)のピーク力価を示す。RSV MEDI/ M2-2およびrA2cp248/404/1030 SHについての結果は、Karron, et al. 2015. *Science Transl Med* 2015 7(312):312ra175からのものである。ウイルス力価は鼻洗浄検体のブラークタイトレーション(plaque titration)によって測定した：RSV MEDI/ M2-2およびRSV rA2cp248/404/1030 SH研究からの検体は並べてアッセイしたが、RSV LID/ M2-2研究からの検体は別々にアッセイした。記号は個々の対象のピーク値を示す。平均ピーク力価が示される。ワクチン接種対象は、それぞれ $5.0 \log_{10}$ PFU (RSV MEDI/ M2-2、RSV LID/ M2-2)または $5.3 \log_{10}$ PFU (RSV rA2cp248/404/1030 SH)のワクチンウイルスの単回IN用量を受けていた。rA2cp248/404/1030 SHワクチン候補の最初の報告は、Karron, et al. 2005. *J Infect Dis* 191:1093-1104であった。

【図10】図10Aおよび10B：RSVゲノムに対する「M2-2-AcII」および「M2-2-HindIII」変異。M2-2-AcII変異は、234ヌクレオチドを欠失させかつAcII制限部位と翻訳終止部位(TER)を生じる2つの点突然変異を導入する部位特異的突然変異誘発によって、M2-2 ORFをサイレンシングする。M2-2-HindIII変異は、234ヌクレオチドを欠失させかつHindIII制限部位と翻訳終止部位(TER)を生じる2つの点突然変異を導入する部位特異的突然変異誘発によって、M2-2 ORFをサイレンシングする。配列ナンバリングは、GenBankアクセション番号M74568によって表されるwtヒトRSV A2株の完全な配列による。図10Aは、RSVゲノムと、重複するM2-1およびM2-2 ORFの構成を示す。M2-2 ORFの3つの潜在的ATG翻訳開始コドンが示されるが、これらは M2-2-AcIIおよび M2-2-HindIII変異において改変されない。図10Bは、M2-2-AcIIおよび M2-2-HindIII変異の詳細を示す。上のヌクレオチド配列(SEQ ID NO:1のヌクレオチド8150～8204および8427～8440)は、生物学的wt RSV (M74568)のものである。すぐ下のアミノ酸配列は M2-1タンパク質のC末端の配列(SEQ ID NO:12)である。次のアミノ酸配列は、M2-2タンパク質のN末端部分の配列(SEQ ID NO:13)である。M2-2 ORFの3つの潜在的ATG開始コドンは、ボックスで囲まれ、太字で示される。2番目のヌクレオチド配列(SEQ ID NO:3のヌクレオチド8150～8202)は、M2-2-AcII変異の配列を示し、この変異はヌクレオチド8202～8435の欠失と点突然変異T8197AおよびC8199Gの導入により生じ、M2-2 ORFのコドン13にAcII部位ならびにTAA終止コドンを生成する。アミノ酸配列12および13は、M2-2-AcII配列の下に示される。3番目のヌクレオチド配列(SEQ ID NO:4のヌクレオチド8150～8202)は、M2-2-HindIII変異の配列を示し、この変異はヌクレオチド

10

20

30

40

50

8202～8435の欠失と点突然変異T8197AおよびC8198Gの導入により生じ、M2-2 ORF のコドン13にHindIII部位ならびにTAA終止コドンを生成する。示されるように、M2-2-AcIIと M2-2-HindIIIの両方における変異型M2-2 ORFは、M2-2タンパク質のN末端に相当する12アミノ酸ペプチドをコードしている可能性がある。アミノ酸配列12および13は、M2-2-HindIII配列の下に示される。

【図11】D46/ M2-2-AcIIおよびLID/ M2-2-AcIIと呼ばれる M2-2-AcII変異を有するRSV D46およびLIDゲノムの概略図。これら2つの構築物のアンチゲノムcDNA配列は、それぞれSEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:6に示される。

【図12A】K51R (NS2遺伝子)およびT24A (N遺伝子)変異が導入された M2-2ウイルスの例のゲノムの概略図。ウイルス名では、K51RおよびT24Aをそれぞれ「NS2」および「N」と略記する。図12Aは、D46/ M2-2-AcII骨格およびLID/ M2-2-AcII骨格にK51R変異とT24A変異を一緒に導入することを示す。

【図12B】K51R (NS2遺伝子)およびT24A (N遺伝子)変異が導入された M2-2ウイルスの例のゲノムの概略図。ウイルス名では、K51RおよびT24Aをそれぞれ「NS2」および「N」と略記する。図12Bは、D46/ M2-2骨格にK51R変異とT24A変異を個々にまたは一緒に導入することを示す。

【図12C】K51R (NS2遺伝子)およびT24A (N遺伝子)変異が導入された M2-2ウイルスの例のゲノムの概略図。ウイルス名では、K51RおよびT24Aをそれぞれ「NS2」および「N」と略記する。図12Cは、LID/ M2-2骨格にK51R変異とT24A変異を個々にまたは一緒に導入することを示す。

【図13】「M2-2-HindIII」変異を有するRSV D46およびLIDの誘導体、ならびにK51R変異およびT24A変異と組み合わせて M2-2-HindIIIゲノムを有する誘導体の例のゲノムの概略図。D46またはLID骨格への M2-2-HindIII変異のみの導入は、ゲノムD46/ M2-2-HindIIIおよびLID/ M2-2-HindIII(上から1番目および3番目のゲノム)をもたらした。K51RおよびT24A変異と組み合わせたD46またはLID骨格への M2-2-HindIII変異の導入は、ゲノムD46/NS2/N/ M2-2-HindIIIおよびLID/NS2/N/ M2-2-HindIII(上から2番目と4番目のゲノム)をもたらした。D46/ M2-2-HindIIIおよびRSV LID/ M2-2-HindIII構築物の配列は、それぞれ、SEQ ID NO:4およびSEQ ID NO:7に示される。

【図14A】FおよびG遺伝子に対する追加の改変を含むRSV LID/ M2-2(すなわち、図1に示す M2-2変異と図3に示す6120変異を含む)の誘導体の例のゲノムの概略図。これらの構築物については、6120変異を指すために、「LID」の代わりに識別子「6120」が使用される。G001およびF001は、RSV A/Maryland/001/11と呼ばれるサブグループA株(A2ではない)の臨床分離株のそれぞれGおよびF遺伝子を指す。他の全ての遺伝子はA2株由来である。「BB」はコドン最適化配列を指す。HEKは、Fタンパク質における2つのアミノ酸置換K66EおよびQ101Pを指す。この場合、「FBBcpHEK」は、Fタンパク質内に入るHEK置換および「cp」置換、すなわちE218AおよびT523I、をさらに含むコドン最適化F配列を指す。

【図14B】FおよびG遺伝子に対する追加の改変を含むRSV LID/ M2-2(すなわち、図1に示す M2-2変異と図3に示す6120変異を含む)の誘導体の例のゲノムの概略図。これらの構築物については、6120変異を指すために、「LID」の代わりに識別子「6120」が使用される。G001およびF001は、RSV A/Maryland/001/11と呼ばれるサブグループA株(A2ではない)の臨床分離株のそれぞれGおよびF遺伝子を指す。他の全ての遺伝子はA2株由来である。「BB」はコドン最適化配列を指す。HEKは、Fタンパク質における2つのアミノ酸置換K66EおよびQ101Pを指す。この場合、「FBBcpHEK」は、Fタンパク質内に入るHEK置換および「cp」置換、すなわちE218AおよびT523I、をさらに含むコドン最適化F配列を指す。

【図15】図14Aおよび14Bに示される構築物のVero細胞におけるウイルス収量。P1力価は、トランスフェクション後の第1継代の収量である(盲目的に、すなわち入力感染多重度MOIの定量化なしに、行った)。P2力価は、0.01 PFU/細胞の入力MOIで行った第2継

10

20

30

40

50

代の収量である；1つのウイルスはP3 (MOI 0.001での第3継代の収量)により表されるこ
とに留意されたい。wt LIDは、6120変異を含むD46である。

【図16】RSV D46/276/ M2-2-AcIIのゲノムを示す概略図。

【発明を実施するための形態】

【0022】

配列表

添付の配列表に記載される核酸配列およびアミノ酸配列は、37 C.F.R. 1.822に定義され
るヌクレオチド塩基の標準的な文字略号およびアミノ酸の3文字コードを用いて示される
。配列表は、2016年12月8日に作成された「Sequence.txt」(約240kb)という名前のフ
ァイルの形でASCIIテキストファイルとして提出されており、参照により本明細書に組み
入れられる。添付の配列表において：

SEQ ID NO:1は、組換えRSV株D46のアンチゲノムcDNA配列である。

SEQ ID NO:2は、組換えRSV株D46/ M2-2のアンチゲノムcDNA配列である。

SEQ ID NO:3は、組換えRSV株D46/ M2-2-AcIIのアンチゲノムcDNA配列である。

SEQ ID NO:4は、組換えRSV株D46/ M2-2-HindIIIのアンチゲノムcDNA配列である。

SEQ ID NO:5は、組換えRSV株LID/ M2-2のアンチゲノムcDNA配列である。

SEQ ID NO:6は、組換えRSV株LID/ M2-2-AcIIのアンチゲノムcDNA配列である。

SEQ ID NO:7は、組換えRSV株LID/ M2-2-HindIIIのアンチゲノムcDNA配列である。

SEQ ID NO:8は、G001BBをコードする例示的なポリヌクレオチド配列である。

SEQ ID NO:9は、FBBをコードする例示的なポリヌクレオチド配列である。

SEQ ID NO:10は、F001をコードする例示的なポリヌクレオチド配列である。

SEQ ID NO:11は、F001BBをコードする例示的なポリヌクレオチド配列である。

SEQ ID NO:12は、M2-1タンパク質のC末端アミノ酸配列(SDTNDHAKNNDTT)である。

SEQ ID NO:13は、M2-2タンパク質のN末端アミノ酸配列(MTMPKIMILPDKYPC)である。

SEQ ID NO:14は、SHタンパク質のC末端アミノ酸配列(ARVNT)である。

SEQ ID NO:15は、組換えRSV株D46/cp/ M2-2のアンチゲノムcDNA配列である。

SEQ ID NO:16は、組換えRSV株LID/ M2-2/1030sのアンチゲノムcDNA配列である。

SEQ ID NO:17は、組換えRSV株LID/cp/ M2-2のアンチゲノムcDNA配列である。

SEQ ID NO:18は、組換えRSV株D46/NS2/N/ M2-2-HindIIIのアンチゲノムcDNA配
列である。

SEQ ID NO:19は、組換えRSV株「276」のアンチゲノムcDNA配列である。

SEQ ID NO:20および21は、遺伝子開始転写シグナルのヌクレオチド配列(それぞれ、GG
GGCAAATAおよびGGGGCAAACA)である。

【0023】

詳細な説明

本明細書では、ヒトの弱毒生ワクチンとして使用するのに適した組換えRSV株が提供され
る。該RSV株は、M2-2タンパク質の発現を遮断して弱毒化をもたらす、突然変異を導入
することによって作製される。M2-2タンパク質の発現を遮断する突然変異が、1つまたは
複数の他の座位での1つまたは複数の追加の遺伝子工学的突然変異との組み合わせで存在
する、組換えRSV株がさらに提供され、こうした追加の突然変異は弱毒化の程度を増加ま
たは減少させて、ワクチン候補に段階的レベルの弱毒化を提供する。

【0024】

M2-2 ORFの発現を減少または消失させる突然変異は、防御抗原をコードする遺伝子を含
めたウイルス遺伝子の発現のアップレギュレーションをもたらし(Birmingham and Coll
ins. 1999. Proc Natl Acad Sci USA 96:11259-11264)、かつ免疫原性の増加をもたらす可能
性がある。しかしながら、免疫原性の増加は以前には実証されておらず、また、
チンパンジーなどの実験動物においてはっきりと認められなかった(Teng, et al. 2000. J
Virol 74:9317-9321)。本明細書に記載のM2-2変異を含む本開示の株の臨床評価は、こ
れらの株が免疫原性の増加を示すことを実証した。一次ワクチン標的集団を代表する血清

10

20

30

40

50

反応陰性乳幼児における研究は、本明細書に開示された株が弱毒化され、一般的に耐容性良好であり、RSV中和血清抗体のかなりの力価を誘導することを示した；そのRSV中和血清抗体の力価は、同様の対象集団で評価された、異なる弱毒化の基礎(すなわち、より典型的なタイプの生ワクチン候補を表す、ポリメラーゼを含むいくつかのウイルス遺伝子の一連の点突然変異)を有する以前のRSVワクチン候補(rA2cp248/404/1030 SH)の力価よりも著しく高かった(Karron, et al. 2005. J Infect Dis 191:1093-1104)。

【 0 0 2 5 】

したがって、本開示は、ヒトにおいて増大した免疫原性を保有している、新規なM2-2欠失変異を有する新規で改良された弱毒化RSV株を提供する。ウイルスORFの大部分を取り除く大きな欠失の使用は遺伝的安定性をもたらす。さらに、本開示は、表現型を改変する追加の突然変異と組み合わせてM2-2欠失変異を有する新規な弱毒化RSV株のセットを提供する。これは、段階的な弱毒化表現型を有するウイルス株を提供する。

10

【 0 0 2 6 】

本発明の組換えRSV株は、以下に詳細に記載するような、さらなる改変または突然変異を有する野生型RSVゲノムまたはアンチゲノムを含む。野生型RSVウイルスゲノムまたはアンチゲノムは、以下の11種のタンパク質をコードする：RNA結合核タンパク質(N)、リンタンパク質(P)、大きなポリメラーゼタンパク質(L)、結合糖タンパク質(G)、融合タンパク質(F)、小さな疎水性(SH)表面糖タンパク質、内部マトリックスタンパク質(M)、2つの非構造タンパク質NS1およびNS2、ならびにM2-1およびM2-2タンパク質。RSV遺伝子の順序は次のとおりである：3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L。これらのタンパク質の完全なアミノ酸配列は当技術分野で公知である。

20

【 0 0 2 7 】

様々なRSV株(例えば、RSV A2、RSV B1、RSV Long)が存在することを考えると、当業者は、特定のRSV株が所与の残基の位置を変えるヌクレオチドもしくはアミノ酸の挿入または欠失を持つ可能性があることを理解するであろう。例えば、別のRSV株のタンパク質が、A2株と比較して該タンパク質の上流末端に2個の追加のアミノ酸を有する場合、これはA2株に対する下流残基のアミノ酸ナンバリングを2ずつ増加させるであろう。しかし、これらの株は高度の配列同一性を共有するので、当業者は、A2参照株のヌクレオチドまたはアミノ酸配列を問題の株の該配列と単にアライメントするだけで、対応する配列の位置を決定することができよう。したがって、本明細書に記載されるアミノ酸およびヌクレオチドの位置は、本開示の文脈において明確に列挙されるが、配列シフトが起こったとき、またはウイルス株間の配列変化のために、他の位置に対応し得ることを理解すべきである。2つ以上の関連ウイルス間のタンパク質もしくはタンパク質セグメント、または遺伝子、またはゲノムもしくはゲノムセグメントの比較において、「対応する」アミノ酸またはヌクレオチド残基は、異なる種において全く同じまたはほぼ同じ機能をもつと考えられるものである。

30

【 0 0 2 8 】

文脈が別のことと示さない限り、本開示で使用されるナンバリングは、野生型RSV A2株の配列(GenBankアクセスション番号M74568)に基づき、記載されるウイルスゲノム配列はポジティブセンスである。

40

【 0 0 2 9 】

本発明のいくつかの態様において、組換えRSV株は、D46と呼ばれるA2株の組換え型から誘導された。D46の完全な配列は、米国特許第6,790,449号に示されており、本明細書においてSEQ ID NO:1として示される。(いくつかの例および出版物において、親ウイルスおよび配列はD46ではなくD53と呼ばれているが、これは、アンチゲノムcDNAを増殖するために使用された細菌株を指し、他の知られた有意性または効果を持たない記述上の差異である。本開示において、D46およびD53は相互に交換可能である。) SEQ ID NO:1 (D46のヌクレオチド配列)は、RSV A2株M74568の配列と25個のヌクレオチド位置で異なり、それは1099位に1ヌクレオチドの挿入を含む。したがって、SEQ ID NO:1に関する配列ナンバリングは、そのヌクレオチドがヌクレオチド1099を超える位置にある場合

50

、1ヌクレオチドの増分によってM74568に関するナンバリングと相違する。

【0030】

いくつかの態様において、RSVゲノムまたはアンチゲノムは、M2-2 ORFの欠失によって改変される。RSV M2-2タンパク質は、5'近傍の上流M2-1 ORFとわずかに重複する、M2 mRNA中の第2の下流ORFによってコードされる(図1A)。A2株の場合には長さが90、88および84アミノ酸の産物を生じる3つの潜在的翻訳開始コドンが存在する(図1B中にボックスで囲ってある)。本明細書に記載されるM2-2変異は、M2-2 ORFの大部分を含む多数のヌクレオチド(典型的にはそれぞれ200個を超えるヌクレオチド)の欠失を含み、そのためM2-2タンパク質の発現を大幅にまたは完全に失わせる。したがって、M2-2変異は、弱毒化の消失をもたらす可能性がある補償(compensation)または復帰(reversion)に不応性である。この遺伝的安定性は臨床研究で確認された。以前のRSVワクチン候補のほとんどは、脱弱毒化をもたらす復帰または補償を受けやすい、弱毒点突然変異を含んでいた(例えば、Karron, et al. 2005. J Infect Dis 191:1093-1104; Malkin, et al. 2013. PLoS One 8:e77104; Karron, Buchholz, Collins. 2013. Curr Top Microbiol Immunol 372:259-284)。脱弱毒化は、ワクチン接種対象においてウイルス複製を増加させる可能性があり、これは反応原性/reactogenicityをもたらし、また感染しやすい接触者への低弱毒化誘導体の伝播の可能性をもたらすかもしれない。したがって、本明細書に記載されるM2-2変異は、RSVワクチン開発の大きな懸案事項を未然に防止する。

10

【0031】

いくつかの態様では、M2-2変異は、8188～8428位(SEQ ID NO:1の8189～8429)に位置する241ヌクレオチドの欠失と、3つの潜在的開始コドンを排除する突然変異T8160C、T8166CおよびT8178C (SEQ ID NO:1のT8161C、T8167CおよびT8179C)とを含む。この突然変異は図1Bに説明されており、本明細書では「M2-2」変異と称される。

20

【0032】

いくつかの態様では、M2-2変異は、8202～8435位(SEQ ID NO:1の8203～8436)に位置する234ヌクレオチドの欠失を、AcII制限酵素部位の存在に対応する8197Aおよび8199G (SEQ ID NO:1の8198Aおよび8200G)の存在と組み合わせて、含む。この突然変異は図10に説明されており、本明細書では「M2-2-AcII」変異と称される。

【0033】

いくつかの態様では、M2-2欠失は、8202～8435位(SEQ ID NO:1の8203～8436)に位置する234ヌクレオチドの変異を、HindIII制限酵素部位の存在に対応する8197Aおよび8198G (SEQ ID NO:1の8198Aおよび8199G)の存在と組み合わせて、含む。この突然変異は図10に説明されており、本明細書では「M2-2-HindIII」変異と称される。いくつかの態様では、この株を構築するために使用されるRSV株は、D46 (SEQ ID NO:1)であり得る。その場合、得られる組換え株はD46/ M2-2-HindIIIと呼ばれる。

30

【0034】

本開示におけるウイルス名中の用語「M2-2」の存在は、以下の実施例に記載される異なる突然変異を指す「MEDI/ M2-2」の場合を除き、そのウイルス中に図1に示されるM2-2変異が存在することを示す。他の突然変異は、用語 M2-2-AcIIまたは M2-2-HindIIIによって特定される。

40

【0035】

所望の特性を有するさらなるウイルス株を構築するために、上で定義したM2-2変異のうちの1つと組み合わせて、追加の突然変異をさらに導入することができる。例えば、追加される突然変異は、様々な強さの弱毒化を指定することができるため、弱毒化の漸進的増加をもたらす。こうして、候補ワクチン株は、少なくとも1つの、好ましくは2つ以上の異なる弱毒突然変異、例えば既知の生物学的に誘導された変異型RSV株のパネルから同定される突然変異、を組み込むことにより、さらに弱毒化され得る。このような突然変異のいくつかを例としてここで説明する。この例示的なパネルから、弱毒突然変異の大きな「メニュー」を作成することができ、そこでは、それぞれの変異が、弱毒化レベルおよび他の望ましい表現型を調整するために、該パネル内の任意の他の1つまたは複数の突然変異と

50

組み合わされうる。追加の弱毒突然変異を非RSVネガティブ鎖RNAウイルスにおいて同定して、本発明のRSV変異体に組み込むことができ、そのためには、レシピエントRSVゲノムまたはアンチゲノム中の対応する相同部位に該突然変異をマッピングして、レシピエント中の既存の配列を突然変異遺伝子型に(同一のまたは保存的な突然変異により)変化させる。追加の有用な突然変異は、本明細書に組み入れられた参考文献に記載されるような組換えミニゲノム系および感染性ウイルスを用いた突然変異解析によって、経験的に決定することができる。

【0036】

いくつかの態様において、開示された組換えRSVワクチン株は、逆遺伝学と呼ばれる組換えDNAに基づく技術を用いて作製することができる(Collins, et al. 1995. Proc Natl Acad Sci USA 92:11563-11567)。このシステムは、限定された条件下で、適格な細胞基材中のcDNAから完全に感染性ウイルスをデノボ回収することを可能にする。逆遺伝学は、cDNA中間体を経てRSVゲノムに所定の突然変異を導入する手段を提供する。特定の弱毒突然変異を前臨床研究において特性解析し、それらを組み合わせて所望のレベルの弱毒化を達成した。cDNAからのワクチンウイルスの誘導は、外来性物質による汚染のリスクを最小限にし、かつ継代履歴を簡潔にして文書で十分に裏付けるのに役立つ。回収されると、遺伝子操作されたウイルス株は、生物学的に誘導されたウイルスと同じように増殖する。継代および増幅の結果、該ワクチンウイルスは元の回収からの組換えDNAを含まない。

【0037】

本明細書で述べる突然変異の様々な組み合わせを含む組換えウイルス株は、例示のみを目的とするものであり、本発明の範囲を限定することを意味しない。ここに記載されていない他の弱毒突然変異も、開示されたM2-2変異(例えば、M2-2、M2-2-AcII、またはM2-2-HindIII変異)と組み合わせて使用することができる。

【0038】

例えば、いくつかの態様において、本発明の組換えRSV株は非翻訳配列の欠失をさらに含む。一態様では、このような欠失はSH遺伝子の下流末端で起こり、本明細書では「6120」変異と呼ばれる突然変異を生じる。「6120」変異を図3に示す。これは、SH遺伝子の下流非翻訳領域の112ヌクレオチドの欠失と、SH遺伝子の最後の3つのコドンおよび終止コドンへの翻訳上サイレントな5つの点突然変異の導入を含む(Bukreyev, et al. 2001. J Virol 75:12128-12140)。組換えウイルス名中の用語「LID」または「6120」の存在は、その組換えウイルスが6120変異を含むことを示す。

【0039】

6120変異はアンチゲノムcDNAを細菌内で安定化させ、その結果、それはより容易に操作および調製できるようになる。wt RSVにおいて、この突然変異は、インビトロで複製効率を5倍増加させることが以前に見出されたが(Bukreyev, et al. 2001. J Virol 75:12128-12140)、それがインビトロで複製効率を増加させるとは考えられなかった。RSV LID/M2-2を、6120変異に関連する複製増加の可能性について評価したところ、一貫しないものの穏やかな増殖効率の増加が観察された。

【0040】

6120変異は、血清反応陰性の乳幼児において複製の増加と関連していた。かくして、6120変異は、弱毒化のレベルをシフトさせる別の手段を提供した。この戦略の使用は、本明細書では M2-2変異と併せて実証されるが、これは同じ目的のために他の弱毒化株にも適用され得る。また、SH遺伝子の下流非翻訳領域の6120変異によって例示される配列の欠失は、原理上は、重要なシス作用シグナルを含まない任意の同等なゲノム配列を含むことができよう(Collins and Karron. 2013. Fields Virology 6th Edition, pp 1086-1123)。欠失の候補であるゲノム領域には、限定するものではないが、他の遺伝子における、遺伝子間領域における、およびトレーラー領域における非翻訳領域が含まれる。

【0041】

いくつかの態様において、組換えRSV株は「cp」変異を含みうる。この変異は、3種のタ

10

20

30

40

50

ンパク質における5つのアミノ酸置換のセット(N (V267I)、F (E218AおよびT523I)、L (C319YおよびH1690Y))を指し、それらは一緒にになって(それらだけで)血清反応陰性チンパンジーにおいて複製を約10分の1に減少させて、疾患を軽減させる(Whitehead, et al. 1998. J Virol 72:4467-4471)。このcp変異は、中程度の弱毒化表現型と関連することが以前に示された(Whitehead, et al. 1999. J Virol 72:4467-4471)。

【0042】

さらに、cpRSVの化学的突然変異誘発によって誘導され、温度感受性(ts)表現型について選択された6種の生物学的ウイルスの以前の分析は、合計6つの独立した突然変異をもたらし、これらの突然変異はそれぞれがts弱毒化表現型を付与し、かつ様々な組み合わせて用いられる可能性がある。これらのうち5つは、Lタンパク質におけるアミノ酸置換であり、これらは配列位置ではなくウイルス番号に基づいて命名された：「955」(N43I)、「530」(F521L)、「248」(Q831L)、「1009」(M1169V)、および「1030」(Y1321N) (Juhasz, et al. 1999. Vaccine 17:1416-1424; Collins, et al. 1999. Adv Virus Res 54:423-451; Firestone, et al. 1996. Virology 225:419-422; Whitehead, et al. 1999. J Virol 73:871-877)。6つ目の突然変異(「404」と呼ばれる)は、M2遺伝子の遺伝子開始転写シグナルにおける一塩基変化(GGGGCAAATA (SEQ ID NO:20)からGGGGCAAACA (SEQ ID NO:21)への変化、mRNAセンス)であった(Whitehead, et al. 1998. Virology 247:232-239)。248変異と1030変異の遺伝的安定性を高めるために逆遺伝学が用いられている(Luongo, et al. 2009. Vaccine 27:5667-5676; Luongo, et al. 2012. J Virol 86:10792-10804)。また、Lタンパク質中のコドン1313を欠失させ、増大した遺伝的安定性を付与するために該欠失をI1314L置換と組み合わせることによって、新しい弱毒突然変異が作製された(Luongo, et al. 2013. J Virol 87:1985-1996)。

【0043】

いくつかの態様では、組換え株は、Fタンパク質に1つまたは複数の変化、例えば、Fタンパク質中の2つのアミノ酸置換、すなわちK66EおよびQ101P、を含む「HEK」突然変異(Connors, et al. 1995. Virology 208:478-484; Whitehead, et al. 1998. J Virol 72:4467-4471に記載される)を含むことができる。本開示のA2株のF配列へのHEKアミノ酸割り当ての導入は、A2株の元の臨床分離株の初期継代(ヒト胚性腎細胞継代7、HEK-7)と同一のFタンパク質アミノ酸配列をもたらす(Connors, et al. 1995. Virology 208:478-484; Whitehead, et al. 1998. J Virol 72:4467-4471)。それは、結果的に、膜融合性がかなり低いFタンパク質をもたらし、A2株の元の臨床分離株の表現型を表していると考えられる(Liang et al. J Virol 2015 89:9499-9510)。HEK Fタンパク質はまた、より安定な3量体を形成する(Liang et al. J Virol 2015 89:9499-9510)。これは、おそらく高い免疫原性を示す融合前コンホメーションに富んだ、RSV Fタンパク質のより真正で免疫原性のある形態を提供しうる(McLellan et al. Science 2013 340(6136):1113-7; Science 2013 342(6158):592-8)。したがって、突然変異は、ウイルス複製の強さに対する効果に付加的な効果を加えて導入することができる。

【0044】

いくつかの態様では、組換え株は、Lタンパク質に1つまたは複数の変化、例えば、1321K(AAA)/1313S(TCA)を含む安定化1030または「1030s」突然変異(Luongo, et al. 2012. J Virol 86:10792-10804)を含むことができる。

【0045】

いくつかの態様において、組換え株は1つまたは複数のRSV遺伝子の欠失を含み得る。SH、NS1およびNS2遺伝子の欠失は、個々にまたは組み合わせて、細胞培養において複製する能力を保持するが、SH < NS2 < NS1の増加する大きさの順にインビオで弱毒化されるウイルスを生じることが示された(Bukreyev, et al. 1997. J Virol 71:8973-8982; Whitehead, et al. 1999. J Virol 73:3438-3442; Teng, et al. 2000. J Virol 74:9317-9321)。したがって、SH、NS2、NS1遺伝子、もしくはそのORFの一部の欠失または他の突然変異を、開示したM2-2変異(例えば、M2-2、M2-2-AcII、またはM2-2-HindIII変異)と組み合わせることができる。例えば、いくつかの態様では、組換え株は、SH

10

20

30

40

50

タンパク質の除去または排除を含めて、SHタンパク質の1つまたは複数の変化を含み得る。いくつかの態様では、該ウイルス株はSH遺伝子の欠失を含む。例えば、いくつかの態様では、該ウイルス株は4197～4615位(SEQ ID NO:1の4198～4616)にある419ヌクレオチドの欠失を含み、本明細書では「SH」変異として示される。この欠失は、図6に示されるように、M遺伝子末端、M/SH遺伝子間領域、およびSH ORFの欠失を生じる。いくつかの態様では、組換え株は、NS1またはNS2タンパク質に1つまたは複数の変化を含むことができ、これは該タンパク質の除去または排除を含み得る。いくつかの態様では、突然変異は、NS2タンパク質中のK51Rなどのアミノ酸置換であり得る。いくつかの態様では、組換え株は、Nタンパク質に1つまたは複数の変化、例えばT24Aなどのアミノ酸置換を含み得る。

10

【0046】

開示されたM2-2変異(例えば、M2-2、M2-2-AcII、またはM2-2-HindIII変異)を有するRSV株に、弱毒化以外の方法でウイルスの特性を変える様々な特徴を導入することができる。例えば、タンパク質をコードするORFのコドン最適化を行うことができる。主要な防御抗原FおよびGは抗原合成の増加を生じ得る。発現を増加させるために、Fおよび/またはGタンパク質遺伝子を上流(プロモーターにより近い)にシフトすることができる。しかしながら、本開示はまた、M2-2組換えウイルス株の場合に、この戦略に対する予想外の制限を記載している。Fおよび/またはGタンパク質のアミノ酸配列は、現在流行している株を表すように(分岐しているGタンパク質の場合に関連し得る)、または初期継代臨床分離株を表すように改変することができる。改善された免疫原性または他の所望の特性を得るために、欠失または置換をGタンパク質に導入することができる。例えば、免疫原性を改善するために、Gタンパク質中のCX3Cフラクタルカインモチーフを除去し得る(Chirkova et al. J Virol 2013 87:13466-13479)。

20

【0047】

例えば、いくつかの態様において、該RSVのGタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、臨床分離株A/Maryland/001/11由来の対応するヌクレオチド配列と置き換えることができる。いくつかの態様では、該RSVのFタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、臨床分離株A/Maryland/001/11由来の対応するヌクレオチド配列、例えばF001 (SEQ ID NO:10)、と置き換えることができる。

30

【0048】

いくつかの態様において、該RSVのタンパク質をコードする野生型のまたは天然に存在するヌクレオチド配列は、所定の宿主、特にヒトにおいて発現が増加するように設計されたコドン最適化配列と置き換えることができる。例えば、いくつかの態様では、該RSVのFタンパク質をコードするヌクレオチド配列を、コドン最適化配列FBB(「FBB」)(SEQ ID NO:9)と置き換える。いくつかの態様では、該RSVのFタンパク質をコードするヌクレオチド配列を、臨床分離株A/Maryland/001/11由来のコドン最適化配列(「F001BB」)(SEQ ID NO:11)と置き換える。いくつかの態様では、該RSVのGタンパク質をコードするヌクレオチド配列を、臨床分離株A/Maryland/001/11由来のコドン最適化ヌクレオチド配列G001BB (SEQ ID NO:8)と置き換える(「G001BB」)。

40

【0049】

本発明のさらなる局面は、M2-2欠失変異型RSVを作製または改変するために、遺伝子の位置を変えるまたは遺伝子の順序を改変することを含む。例えば、NS1、NS2、SHおよびG遺伝子を個々に欠失させてもよいし、NS1およびNS2遺伝子を一緒に欠失させてもよく、それによってウイルスプロモーターに対する各下流遺伝子の位置がシフトされる。例えば、NS1とNS2と一緒に欠失させると、Nは遺伝子位置3から遺伝子位置1に移動し、Pは遺伝子位置4から遺伝子位置2に移動し、以下同様である。あるいは、遺伝子順序の範囲内でのその他の遺伝子の欠失は、さらに下流に位置する遺伝子の(プロモーターに対する)位置にのみ影響を及ぼすであろう。例えば、SHは野生型ウイルスでは6位を占め、その欠失は5位のM(またはその他の上流遺伝子)には影響を与えないが、Gをプロモーターに対して7位から6位に移動させる。遺伝子の欠失は生物学的に誘導される変異型ウイルスにおいて

50

も(まれに)起こり得ることに留意すべきである。例えば、細胞培養で広範に継代されたサブグループBのRSVは、自然発生的にSH遺伝子とG遺伝子を欠失した(Karron et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:13961-13966, 1997; 参照により本明細書に組み入れる)。

【0050】

遺伝子順序をシフトする改変(すなわち、1つまたは複数の遺伝子を組換えウイルスゲノム中のよりプロモーター近位またはプロモーター遠位の位置に移動させる位置改変)は、変化した生物学的特性を持ったウイルスをもたらす。例えば、NS1、NS2、SH、G、一緒にNS1とNS2、または一緒にSHとGを欠失しているRSVは、インピトロ、インピボ、またはその両方で弱毒化されることが示されている。特に、GおよびF遺伝子は、それらの野生型遺伝子順序に対して、よりプロモーター近位の位置に、単独でかつタンデムに、シフトされ得る。これらの2つのタンパク質は、通常、RSV遺伝子順序(NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L)の7位(G)と8位(F)を占めている。いくつかの態様では、Gタンパク質およびFタンパク質をコードするヌクレオチド配列の順序を、天然に存在する順序に対して入れ替えることができる。

10

【0051】

RSVのFおよびGタンパク質は、RSV中和抗体を誘導することが知られており、主要な防御抗原である。Fタンパク質は、一般的に、Gタンパク質よりも効果的な中和および防御抗原であると考えられる。Fはまた、RSV株の中で比較的よく保存されているが、Gタンパク質はかなり分岐している可能性がある。Gにおける分岐は、RSV株を2つの抗原サブグループAおよびB(それぞれ、GおよびFについて2つのサブグループ間で約53%および約90%のアミノ酸配列同一性)に分離する際の主要因である。本開示のツールおよび方法は、サブグループAのRSV A2株に焦点を合わせているが、いずれかのサブグループの他の株にも容易に適用することができる。

20

【0052】

いくつかの態様では、組換えRSV株は、M2-2、M2-2-AcII、またはM2-2-HindIII変異を、上記の突然変異の1つまたは複数と組み合わせて含む、組換えRSVゲノムを含んでいる。いくつかの態様では、組換えRSV株は、M2-2、M2-2-AcII、またはM2-2-HindIII変異、ならびに上記の突然変異の1つまたは複数により改変されたD46 (SEQ ID NO:1)ゲノムを含む、組換えRSVゲノムを含んでいる。

30

【0053】

いくつかの態様では、組換え株は、「276」変異を含み、さらに開示されたM2-2変異の1つ、例えばM2-2、M2-2-AcII、またはM2-2-HindIII変異を含む、D46ベースのRSV株であり得る。実施例8で述べるように、「276」変異は以下のヌクレオチド変異を含む：404C、779G、C1099の欠失、1138A、1139G、1181G、1209G、5611A、5615A、5639G、6215C、6221C、6386T、7214C、7481T、7559A、7701G、10514T、および13633A (SEQ ID NO:1に対して、これらの変異は以下の通りである：404C、779G、C1099の欠失、1139A、1140G、1182G、1210G、5612A、5616A、5640G、6216C、6222C、6387T、7215C、7482T、7560A、7702G、10515T、および13634A)。「276」変異を含むM2-2-HindIIIベースのRSV株の例示的なアンチゲノムcDNA配列は、SEQ ID NO:19として提示される。

40

【0054】

いくつかの態様では、組換えRSV株は、上記のM2-2、M2-2-AcII、またはM2-2-HindIII変異の1つを、単独でまたは本明細書で提供される弱毒突然変異の1つまたは複数と組み合わせて、含むように改変された、SEQ ID NO:1として示されるアンチゲノムcDNA配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一または少なくとも99%同一)のアンチゲノムcDNA配列に対応するヌクレオチド配列を含むゲノムを含んでいる。

【0055】

いくつかの態様では、組換えRSV株は、本明細書に記載のcpおよびM2-2変異、ならびにSEQ ID NO:1 (D46配列)と少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、および/または少なくとも99%同一のアンチゲノムcDNA配列に対応するヌクレオチド配列を含むゲノ

50

ムを含んでいる。

【 0 0 5 6 】

いくつかの態様では、組換えRSV株は、本明細書に記載の M2-2変異、ならびにSEQ ID NO:2 (D46/ M2-2配列)と少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、および/または少なくとも99%同一のアンチゲノムcDNA配列に対応するヌクレオチド配列を含むゲノムを含んでいる。

【 0 0 5 7 】

いくつかの態様では、組換えRSV株は、本明細書に記載の M2-2-AcII変異、ならびにSEQ ID NO:3 (D46/ M2-2-AcII配列)と少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、および/または少なくとも99%同一のアンチゲノムcDNA配列に対応するヌクレオチド配列を含むゲノムを含んでいる。 10

【 0 0 5 8 】

いくつかの態様では、組換えRSV株は、本明細書に記載の M2-2-HindIII変異、ならびにSEQ ID NO:4 (D46/ M2-2-HindIII配列)と少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、および/または少なくとも99%同一のアンチゲノムcDNA配列に対応するヌクレオチド配列を含むゲノムを含んでいる。

【 0 0 5 9 】

いくつかの態様では、組換えRSV株は、本明細書に記載のLIDおよび M2-2変異、ならびにSEQ ID NO:5 (LID/ M2-2配列)と少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、および/または少なくとも99%同一のアンチゲノムcDNA配列に対応するヌクレオチド配列を含むゲノムを含んでいる。 20

【 0 0 6 0 】

いくつかの態様では、組換えRSV株は、本明細書に記載のLIDおよび M2-2-AcII変異、ならびにSEQ ID NO:6 (LID/ M2-2-AcII配列)と少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、および/または少なくとも99%同一のアンチゲノムcDNA配列に対応するヌクレオチド配列を含むゲノムを含んでいる。

【 0 0 6 1 】

いくつかの態様では、組換えRSV株は、本明細書に記載のLIDおよび M2-2-HindIII変異、ならびにSEQ ID NO:7 (LID/ M2-2-HindIII配列)と少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、および/または少なくとも99%同一のアンチゲノムcDNA配列に対応するヌクレオチド配列を含むゲノムを含んでいる。 30

【 0 0 6 2 】

いくつかの態様では、組換えRSV株は、本明細書に記載のcpおよび M2-2変異、ならびにSEQ ID NO:15 (D46/cp/ M2-2配列)と少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、および/または少なくとも99%同一のアンチゲノムcDNA配列に対応するヌクレオチド配列を含むゲノムを含んでいる。

【 0 0 6 3 】

いくつかの態様では、組換えRSV株は、本明細書に記載の6120、 M2-2および1030s変異、ならびにSEQ ID NO:16 (LID/ M2-2/1030s配列)と少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、および/または少なくとも99%同一のアンチゲノムcDNA配列に対応するヌクレオチド配列を含むゲノムを含んでいる。 40

【 0 0 6 4 】

いくつかの態様では、組換えRSV株は、本明細書に記載の6120、 cpおよび M2-2変異、ならびにSEQ ID NO:17 (LID/cp/ M2-2配列)と少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、および/または少なくとも99%同一のアンチゲノムcDNA配列に対応するヌクレオチド配列を含むゲノムを含んでいる。

【 0 0 6 5 】

いくつかの態様では、組換えRSV株は、本明細書に記載のNS2、N、 M2-2-HindIII変異、ならびにSEQ ID NO:4 (D46/ M2-2-HindIII配列)と少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、および/または少なくとも99%同一のアンチゲノムcDNA配列に対応するヌ 50

クレオチド配列を含むゲノムを含んでいる。

【 0 0 6 6 】

いくつかの態様では、組換えRSV株は、本明細書に記載のNS2、N、M2-2-HindIII変異、ならびにSEQ ID NO:18 (D46/NS2/N/ M2-2-HindIII配列)と少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、および/または少なくとも99%同一のアンチゲノムcDNA配列に対応するヌクレオチド配列を含むゲノムを含んでいる。

【 0 0 6 7 】

いくつかの態様では、組換えRSV株は、本明細書に記載のNS2、N、M2-2-AcII変異、ならびにSEQ ID NO:3 (D46/ M2-2-AcII配列)と少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、および/または少なくとも99%同一のアンチゲノムcDNA配列に対応するヌクレオチド配列を含むゲノムを含んでいる。 10

【 0 0 6 8 】

いくつかの態様では、組換えRSV株は、本明細書に記載のNS2、N、および M2-2-AcII変異、SEQ ID NO:1に対する位置での次のヌクレオチド変異：404C、779G、C1099の欠失、1139A、1140G、1182G、1210G、5612A、5616A、5640G、6216C、6222C、6387T、7215C、7482T、7560A、7702G、10515T、および13634A、ならびにSEQ ID NO:19 (276配列)と少なくとも90%、少なくとも95%、および/または少なくとも99%同一のアンチゲノムcDNA配列に対応するヌクレオチド配列を含むゲノムを含んでいる。

【 0 0 6 9 】

いくつかの態様では、組換えRSV株は、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、またはSEQ ID NO:19のいずれか1つとして示されるポジティブセンス配列に対応するヌクレオチド配列を含むゲノムを含んでいる。 20

【 0 0 7 0 】

いくつかの態様では、組換えRSVのゲノムは、本明細書で述べられるような1つまたは複数の突然変異を含み、D46 RSVのゲノム配列(SEQ ID NO:1)と比較して、組換えRSVのゲノムの残りの配列の差は、生物学的に有意ではない(例えば、残りの配列の差異は、既知のシス作用シグナルを改変する、またはアミノ酸コードを変化させる、または該ウイルスのインビトロ複製もしくはプラーカサイズに測定可能な影響を及ぼすといった、野生型ゲノム配列に対する変化を含まない)。 30

【 0 0 7 1 】

上記の突然変異に加えて、感染性M2-2欠失変異体(例えば、M2-2、M2-2-AcII、またはM2-2-HindIII変異体)には、任意のRSVまたはRSV様ウイルス、例えばヒト、ウシ、ヒツジ、ネズミ(マウスの肺炎ウイルス)、もしくはトリ(七面鳥鼻気管炎ウイルス)のニューモウイルスに由来するか、または別のエンベロープを持ったウイルス、例えばパラインフルエンザウイルス(PIV)に由来する、異種のコードまたは非コードヌクレオチド配列を組み込むことができる。例示的な異種配列には、あるヒトRSV株に由来のRSV配列を、異なるヒトRSV株に由来の配列と組み合わせたものが含まれる。あるいは、M2-2欠失変異体(例えば、M2-2、M2-2-AcII、またはM2-2-HindIII変異体)は、2つ以上の野生型または変異型ヒトRSVサブグループ由来の配列、例えばヒトRSVサブグループAとサブグループBの配列の組み合わせ、を含むことができる。さらに別の局面では、1つまたは複数のヒトRSVコードまたは非コードポリヌクレオチドを、異種RSVまたは非RSVウイルス由来の対応する配列で置換すると、新規な弱毒化ワクチン株が生じる。 40

【 0 0 7 2 】

本明細書に記載の特定の突然変異およびそれらの突然変異の組み合わせを有する組換えRSVに加えて、開示されたウイルスは、当業者には理解されるように、さらに改変され得る。例えば、組換えRSVは、そのタンパク質の1つまたは複数を欠失させたり、そうでなければ突然変異させたりしてもよく、あるいは異なる生物由来の異種遺伝子を該ゲノムまたはアンチゲノムに追加して、組換えRSVが細胞に感染して複製する際にそのタンパク質を 50

発現するまたは組み込むようにしてもよい。さらに、当業者であれば、RSVに影響を及ぼすことが知られている以前に明らかにされた他の突然変異を、本明細書に記載の突然変異のいずれか1つまたは複数と組み合わせて、望ましい弱毒化または安定性の特性を備えた組換えRSVを作製することができることを理解するであろう。

【 0 0 7 3 】

いくつかの態様では、本明細書に記載の突然変異は、単独でまたは別の突然変異と組み合わせて使用する場合、様々なレベルのウイルス弱毒化を提供し、弱毒化と免疫原性との間のバランスを調整する能力を提供し、かつ親ウイルスよりも安定した遺伝子型を提供し得る。

【 0 0 7 4 】

記載されたウイルスのヌクレオチドおよびアミノ酸配列位置の配列ナンバリングに関して、慣例が採用された；それによって、所与のウイルス配列中の各ヌクレオチドまたはアミノ酸残基は、どのような改変にも関係なく、それが元の15,222ヌクレオチドの生物学的野生型A2ウイルス株(Genbankアクセション番号M74568)において有する配列位置番号を保持した。したがって、多くのゲノムは、ヌクレオチド長および場合によってはアミノ酸長の変化を引き起こす欠失および/または挿入を含むが、ゲノムおよびコードされたタンパク質における他の残基(ヌクレオチドまたはアミノ酸)の全てのナンバリングは不变のままである。当然のことながら、この便利な慣例の手段がなくとも、当業者は、長さが異なる可能性のあるウイルスゲノムまたはタンパク質間の対応する配列位置を容易に明らかにことができ、そうした対応する配列位置は、配列アラインメント、ならびにオープニングリーディングフレームの位置、遺伝子開始シグナルと遺伝子終止シグナルのような周知のRNAの特徴の位置、およびアミノ酸配列の特徴の位置によって導き出される。

10

【 0 0 7 5 】

本開示に記載のウイルスからのさらなる代表的なウイルスは、感染力、複製動態、収量、タンパク質発現の効率、および遺伝的安定性について、本明細書に記載されかつ例示的組換え株を用いて実施例に示される方法を用いて、細胞培養で評価され得る。さらなる代表的な株は、げっ歯類および非ヒト霊長類において、感染力、複製動態、収量、免疫原性、および遺伝的安定性について評価され得る。これらの半許容系は、複製のあらゆる相違を確実に検出できるわけではないが、かなりの相違を特に検出することができる(例えば、RSV D46/ M2-2とLID/ M2-2の間、表4および5)。また、組換え株は、成人および血清反応陽性幼児における評価の前段階なしに、血清反応陰性幼児において直接的に評価してもよい。これは、複数の候補ワクチンの同時評価を可能にする少人数の、例えば、10名のワクチン接種対象と5名のプラセボ投与対象のグループで行うことができる。候補ワクチンは、ワクチンウイルスの感染力、複製動態、ウイルス排出、耐容性、免疫原性、および遺伝的安定性について、予防接種直後の時期に評価することができ、ワクチンを受けた対象は、安全性、RSV疾患、およびRSV特異的血清抗体の変化について、次のRSVシーズングル中に調査を受けうる(Karron, et al. 2015, Science Transl Med 2015 7(312):312ra175に記載のとおりであり、これはその全体が本明細書に組み入れられる)。したがって、選択された代表的なウイルスの分析は、候補を絞り込んで最適なものを同定するための比較的迅速なトリアージ(triage)を提供することができる。

20

【 0 0 7 6 】

タンパク質またはペプチドへの言及は、その天然に存在する形態、ならびにそのようなタンパク質の任意のフラグメント、ドメイン、またはホモロゲを含む。本明細書で使用する用語「ホモロゲ」は、天然に存在するタンパク質またはペプチド(すなわち、「プロトタイプ」または「野生型」タンパク質)とは、天然に存在するタンパク質またはペプチドに対するわずかな修飾によって異なっているが、天然に存在する形態の基本的なタンパク質および側鎖構造を維持しているタンパク質またはペプチドを指すために使用される。そのような変化としては、限定するものではないが、以下が挙げられる：1個または数個のアミノ酸側鎖の変化；欠失(例えば、タンパク質またはペプチドのトランケート型)、挿入および/または置換を含む、1個または数個のアミノ酸の変化；1個または数個の原子の立体化学の

30

40

50

変化；および/またはメチル化、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、ミリストイル化、ブレニル化、パルミトイ化、アミド化を含むがこれらに限定されない、マイナーな誘導体化。ホモログは、天然に存在するタンパク質またはペプチドと比較して、増強された、低下した、または実質的に類似した性質を有し得る。所与のタンパク質のホモログは、基準タンパク質のアミノ酸配列と少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%同一(または全ての整数の増加で、45%～99%の間の任意の同一性パーセント)であるアミノ酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得る。

10

【 0 0 7 7 】

本発明の一局面では、選択された遺伝子セグメント、例えば、あるRSV由来の選択されたタンパク質またはタンパク質領域(例えば、細胞質尾部、膜貫通ドメインもしくは細胞外ドメイン、エピトープ部位もしくは領域、結合部位もしくは領域、活性部位もしくは活性部位を含む領域など)をコードするものは、野生型または親RSV株と比較して所望の表現型の変化を有する新規組換え体を得るために、同じまたは異なるRSVもしくは他の供給源由来の対応する遺伝子セグメントと置換することができる。例えば、このタイプの組換え体は、あるRSVの細胞質尾部および/または膜貫通ドメインが別のRSVの細胞外ドメインに融合されたキメラタンパク質を発現し得る。このタイプの他の例示的な組換え体は、重複するタンパク質領域、例えば重複する免疫原性領域を発現する。本明細書で使用する「対応する」(counterpart)遺伝子、遺伝子セグメント、タンパク質またはタンパク質領域は、典型的には、(例えば、異なるRSV遺伝子に由来するか、異なるRSV株における同じ(すなわち、相同または対立)遺伝子もしくは遺伝子セグメントを表す)異種の供給源に由来する。これに関連して選択される典型的な対応する部分は、全体的な構造的特徴を共有しており、例えば、各対応する部分は、細胞質ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞外ドメイン、結合部位もしくは領域、エピトープ部位もしくは領域などの、同等な構造的「ドメイン」をコードすることができる。対応するドメインおよびそれらをコードする遺伝子セグメントは、ある範囲のサイズおよびアミノ酸(またはヌクレオチド)配列変異を有する種の集合を包含し、その範囲は、該ドメインまたは遺伝子セグメント変異体の間に共通する生物学的活性によって規定される。例えば、本発明内の対応する遺伝子セグメントによってコードされる2つの選択されたタンパク質ドメインは、膜貫通機能、特異的結合活性、免疫学的認識部位などを提供するといった、実質的に同じ質的活性を共有することができる。より典型的には、対応する部分間で、例えば選択されたタンパク質セグメントまたはタンパク質間で、共有される特定の生物学的活性は、量的には実質的に類似している、すなわち、それらは、それぞれの量的活性プロファイルの点で30%を超えて変わることはなく、好みしくは20%、より好みしくは5～10%を超えて変わることはないであろう。

20

【 0 0 7 8 】

本発明の別の局面において、cDNA発現ゲノム(cDNA-expressed genome)またはアンチゲノムから產生される感染性RSVは、RSV株もしくはRSV様株のいずれか、例えばヒト、ウシ、ネズミなど、または任意のニューモウイルスもしくはメタニューモウイルス、例えばマウス肺炎ウイルスもしくはトリメタニューモウイルスのいずれかであり得る。防御免疫応答を生じさせるために、RSV株は、免疫される対象に対して内因性のものであり得、例えば、ヒトの免疫化にはヒトRSVが使用される。しかしながら、内因性RSVのゲノムまたはアンチゲノムは、異なる供給源の組み合わせからRSV遺伝子もしくは遺伝子セグメントを発現するように改変することができ、例えば、異なるRSV種、RSVサブグループもしくはRSV株由来の、またはRSVとヒトパラインフルエンザウイルス(PIV)のような別の呼吸器病原体由来の、遺伝子もしくは遺伝子セグメントの組み合わせを発現するように改変されうる(例えば、以下を参照されたい: Hoffman et al. J. Virol. 71:4272-4277 (1997); Durbin et al. Virology 235(2):323-32 (1997); 1997年5月23日出願のMurphy et al. 米国特許出願第60/047,575号、ならびに感染性PIVクローンを產生するための以

30

40

50

下のプラスミド：p3/7(131) (ATCC 97990)；p3/7(131)2G (ATCC 97889)；およびp218(131) (ATCC 97991)；それぞれ1997年4月18日にブダペスト条約の条項の下でアメリカン・タイプ・カルチャーライブラリ（ATCC）(10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209, USA.)に寄託され、上記の受託番号が付与された)。

【0079】

本発明の特定の態様では、ヒトRSVの個々の内部遺伝子が、例えば、ウシもしくは他のRSVの対応する遺伝子で、またはPIVのような別の呼吸器病原体の対応する遺伝子もしくは外来遺伝子で置き換えられた組換えRSVが提供される。この文脈でのRSV遺伝子または遺伝子セグメントの置換や欠失などとしては、NS1、NS2、N、P、M、SH、およびL遺伝子、もしくはM2-1オープンリーディングフレーム、またはGおよびF遺伝子の非免疫原性部分のうちの1つもしくは複数の一部または全てが挿げられる。また、プロモーターもしくは転写シグナルのようなヒトRSVのシス作用配列も、例えば、それらのウシRSV対応部分で置き換えることができる。逆に、ウシRSVゲノムまたはアンチゲノムのバックグラウンドに、ヒト弱毒遺伝子またはシス作用配列を挿入することによって、弱毒生ウシRSVを作製するための手段が提供される。

【0080】

したがって、ヒトへの投与を意図した感染性組換えRSVは、弱毒化などの目的のために、例えばウシRSVまたはPIV由来の、遺伝子を含むように改変されたヒトRSVであり得る。例えば、PIV由来の遺伝子または遺伝子セグメントを挿入することによって、PIVとRSVの両方に対する二価ワクチンが提供される。あるいは、異種RSV種、サブグループもしくは株、またはPIVなどの異なる呼吸器病原体は、例えば、ヒトRSV感染からの防御を引き出すエピトープまたはタンパク質をコードする遺伝子を含むように、改変され得る。例えば、ヒトRSV糖タンパク質遺伝子をウシ糖タンパク質遺伝子の代わりに用いることができ、その結果、得られたウシRSVは、ヒトRSV表面糖タンパク質を有し、かつ残りのウシ遺伝的バックグラウンドのためにヒト宿主内で制限された複製能力を保持するようになると考えられ、ヒトRSV株に対して防御免疫応答を誘発する。

【0081】

ワクチン開発のために他のタイプの弱毒突然変異を分析して、感染性RSVに組み込む能力は、RSVクローンの標的を定めた変化の広範な集団にまで及ぶ。例えば、増殖に必須ではない任意のRSV遺伝子は、毒性、病原性、免疫原性および他の表現型特性に所望の効果を生じるように取り除かれてもよいし、そうでなければ改変されてもよい。加えて、感染性の組換えRSVへの組み込みのために、組換えRSVゲノムまたはアンチゲノムにおいて、様々な他の遺伝子改変を単独で、または生物学的に誘導された変異RSVから適合された1つもしくは複数の弱毒化点変異と共に、作製することができる。

【0082】

本明細書で使用する「異種遺伝子」は、異なるRSVの株もしくは型、または非RSV源から採取された遺伝子を指す。これらの異種遺伝子を全体的または部分的に挿入して、遺伝子の順序を変更し、遺伝子重複を除去し、RSVゲノムのプロモーターをそのアンチゲノム対応物で置き換え、遺伝子の一部を除去または置換し、遺伝子全体さえも欠失させることができる。様々な遺伝子間領域または他の場所にユニークな制限部位(例えば、G遺伝子とF遺伝子との間にユニークなStuI部位)を挿入するなど、操作を容易にするために、異なるまたは追加の改変を該配列において行うことができる。非翻訳遺伝子配列は、外来配列を挿入する収容能力を高めるために除去され得る。

【0083】

本発明の組換えRSVの全ウイルス遺伝子または遺伝子セグメントの変化を含む欠失、挿入、置換および他の突然変異は、免疫抑制個体の場合に関係しうる、非常に安定したワクチン候補をもたらす。こうした突然変異の多くは、得られるワクチン株の弱毒化をもたらす一方で、他の突然変異は様々なタイプの所望の表現型変化を指定するであろう。例えば、宿主免疫を特異的に妨害するタンパク質をコードする、ある種のウイルス遺伝子が知られている(例えば、Kato et al., EMBO. J. 16:578-87 (1997)を参照されたい)。ワクチン

10

20

30

40

50

ウイルスにおけるこのような遺伝子の除去は、毒性および病原性を減少させ、かつ/または免疫原性を改善することが期待される。

【 0 0 8 4 】

本発明のRSV内の他の突然変異は、ゲノムの3'末端をアンチゲノム由来のその対応部分と置き換えることを含み、これはRNAの複製および転写の変化に関連する。さらに、遺伝子間領域(Collins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4594-4598 (1986))は、短くしたり長くしたり、または配列の内容を変化させたりすることができ、また、天然に存在する遺伝子重複(Collins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5134-5138 (1987))は、本明細書に記載の方法によって除去したり、または異なる遺伝子間領域に変更したりすることができる。

10

【 0 0 8 5 】

別の態様では、所定のRSV遺伝子の翻訳開始部位の周囲の配列(好ましくは、-3位のヌクレオチドを含む)は、単独でまたは上流の開始コドンの導入との組み合わせで、翻訳のアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションを指定することによってRSV遺伝子発現を調節するように改変される。

【 0 0 8 6 】

代替的に、または本明細書に開示される他のRSV改変との組み合わせで、RSV遺伝子発現は、ウイルスの所定の1つまたは複数の遺伝子の転写GSシグナルを変更することによって調節され得る。1つの例示的な態様では、NS2のGSシグナルが、ウイルス複製にts制限を付け加えるための特定の突然変異を含むように改変される。

20

【 0 0 8 7 】

本発明内のさらに別のRSVクローンは、転写GEシグナルに対する改変を含む。例えば、NS1およびNS2遺伝子のGEシグナルをN遺伝子のそれと置き換えるか、または突然変異させて、リードスルームRNAレベルの低下および下流遺伝子からのタンパク質発現の増加をもたらすRSVクローンが提供される。結果として生じる組換えウイルスは、増殖速度の増加およびブラークサイズの増加を示し、RSVゲノム中のシス作用調節エレメントの改変によるRSV増殖特性の変化の一例を提供する。

【 0 0 8 8 】

別の局面において、Gタンパク質の発現は、G mRNAを改変することで高めることができる。Gタンパク質は、膜結合型と分泌型の両方として発現され、後者の形態は、G遺伝子の翻訳オーブンリーディングフレーム内の開始部位での翻訳開始によって発現される。分泌型は、発現されたGタンパク質の半分を占める可能性がある。内部開始部位の除去(例えば、配列の変更、欠失などによる)は、単独でまたは上流開始部位の配列関係の変更と合わせて、Gタンパク質発現の望ましい変化をもたらす。分泌型のGタンパク質の除去はまた、典型的な組換えRSVに対する宿主免疫応答の質を改変するであろう。なぜならば、Gタンパク質の可溶性形態は、中和抗体を捕捉する「おとり」として作用すると考えられるからである。また、可溶性Gタンパク質は、Th2優位な応答のその選択的刺激のために、免疫病理の増進に関与している。

30

【 0 0 8 9 】

関連する局面において、RSV遺伝子発現のレベルは、転写のレベルで改変され得る。一局面では、RSV遺伝子マップにおける所定の遺伝子の位置を、よりプロモーター近位またはプロモーター遠位の位置に変えることができ、それによって、該遺伝子は、それぞれ、より効率的に発現されるようになるか、またはあまり効率よく発現されなくなるだろう。この局面によれば、特定の遺伝子の発現を調節することができ、野生型レベルと比較して2倍から、より典型的には4倍、最大10倍またはそれ以上の遺伝子発現の増減をもたらす。一例では、NS2遺伝子(RSV遺伝子マップの順序では2番目)をSH遺伝子の位置(6番目)に入れ替えると、予測されたNS2発現の低下を生じる。位置変化による所定のRSV遺伝子の発現増加は、10倍、30倍、50倍、100倍またはそれ以上を達成することができ、しばしば相互に位置的に入れ替えられた遺伝子の発現レベルの相応する低下を伴う。

40

【 0 0 9 0 】

50

いくつかの例示的な態様において、F遺伝子とG遺伝子は、より高いまたはより低いレベルの遺伝子発現をそれぞれ達成するために、(組換え)RSV遺伝子マップ内によりプロモーター近位またはプロモーター遠位の位置に単独でまたは一緒に転位することができる。これらおよび他の転位変化は、例えばRNA複製に関与する所定のウイルスタンパク質の発現低下のため、弱毒化表現型を有する新規なRSVクローンをもたらす。さらに他の態様では、ワクチン製剤に有用なRSVは、循環ウイルスの抗原連續変異(antigenic drift)に応えるように、都合よく改変することができる。典型的には、その改変はGおよび/またはFタンパク質におけるものである。GもしくはF遺伝子全体、またはその特定の免疫原領域をコードするセグメントは、感染性クローン中の対応する領域の置き換えによって、またはいくつかの抗原型が表されるように該遺伝子の1つまたは複数のコピーを追加することによって、RSVゲノムまたはアンチゲノムcDNAに組み込まれる。

10

【0091】

改変されたRSV cDNAから產生される子孫ウイルスは、その後、新たな出現ウイルス株に対してワクチン接種プロトコルで使用される。さらに、RSVサブグループBのGタンパク質遺伝子を遺伝子付加として含めると、ヒト集団に存在する比較的多様なサブグループAおよびB株のより広い範囲をカバーするように応答が広がるだろう。

【0092】

本発明の感染性RSVクローンはまた、その免疫原性を増強するように、また、野生型RSVまたは不完全に弱毒化された親ウイルスもしくはクローンによる感染によってもたらされるレベルよりも高い防御レベルを誘導するように、本明細書に開示された方法および組成物に従って遺伝子操作され得る。例えば、異種RSV株もしくは型由来の、またはPIVなどの非RSV源由来の免疫原性エピトープは、RSVゲノムまたはアンチゲノムをコードするポリヌクレオチド配列の適切なヌクレオチド変化によって、付加することができる。組換えRSVはまた、望ましくない免疫病理学的反応に関連するエピトープを同定して、(例えば、アミノ酸の挿入、置換または欠失により)除去するように遺伝子操作することもできる。他の態様では、追加の遺伝子を、独立した一連の転写シグナルの制御下にあるRSVゲノムまたはアンチゲノムの中にまたはそれに近接して挿入することができる。対象となる遺伝子には、限定するものではないが、サイトカイン(例えば、IL-2～IL-15、特にIL-2、IL-6およびIL-12など)、インターフェロンをコードするものが含まれ、サイトカイン(例えば、IL-2～IL-15、特にIL-2、IL-6およびIL-12など)、インターフェロン、およびTヘルパー細胞エピトープに富むタンパク質をコードするものが含まれる。追加のタンパク質は、別個のタンパク質として、またはSHのようなRSVタンパク質の1つの第2のコピーから操作されたキメラとして発現され得る。これは、RSVに対する免疫応答を定量的にも定性的にも改変および改善する能力を提供する。

20

【0093】

組換えRSVに対する上記の改変に加えて、操作を容易にするために、様々な遺伝子間領域または他の場所にユニークな制限部位(例えば、G遺伝子とF遺伝子との間にユニークなStu I部位)を挿入するなどの、異なるまたは追加の改変をRSVクローンにおいて行うことができる。非翻訳遺伝子配列は、外来配列を挿入する収容能力を高めるために除去され得る。

30

【0094】

上述した特定の突然変異を感染性RSVクローンに導入することは、様々な周知の方法によって達成することができる。「感染性クローン」とは、感染性ウイルスを產生することができるゲノムRNAまたはアンチゲノムRNAに転写され得る、合成のまたはその他のcDNAもしくはその産物を意味する。「感染性」という用語は、培養細胞、動物またはヒト宿主内で複製して、同じ活性を有する子孫ウイルスまたはウイルス構造を產生することができるウイルスまたはウイルス構造を指す。したがって、特定された突然変異は、ゲノムまたはアンチゲノムのcDNAコピーに従来技術(例えば、部位特異的突然変異誘発)によって導入することができる。アンチゲノムまたはゲノムcDNAのサブフラグメントを用いて完全なアンチゲノムまたはゲノムcDNAを構築することは、当業者に周知であり、各領域を別々に操作して(小さなcDNAは大きなものよりも操作しやすい)、その後完全なcDNAに容易に

40

50

組み立てることができるという利点を有する。したがって、完全なアンチゲノムもしくはゲノムcDNA、またはその任意のサブフラグメントは、オリゴヌクレオチド指定突然変異誘発のテンプレートとして使用され得る。突然変異したサブフラグメントは、その後、完全なアンチゲノムまたはゲノムcDNAに組み立てることができる。突然変異は、単一のヌクレオチド変化から、1つまたは複数の遺伝子またはゲノム領域を含む大きなcDNAピースの置換まで、様々であり得る。

【0095】

組換えRSVは、RSVのゲノムRNAをコードするcDNAを、転写と複製を担うヌクレオカプシドを生成するのに必要なウイルスタンパク質と共に、細胞内共発現させることによって产生され得る。他のRSVタンパク質をコードするプラスミドも、これらの必須タンパク質と共に含めることができる。別法として、RNAをインビトロ転写反応で合成して、培養細胞にトランスフェクションすることができる。

10

【0096】

したがって、本明細書には、記載された変異型ウイルスをコードする、記載されたゲノムもしくはアンチゲノムを構成する、記載されたゲノムもしくはアンチゲノムを発現する、または組換えRSVをインビトロで作製するのに有用な種々のタンパク質をコードする、単離されたポリヌクレオチドも記載される。本明細書に記載されるSEQ ID NOのいずれかの配列を含むポリヌクレオチドが本発明に含まれる。上記の配列、上記のSEQ ID NOのいずれかに対して少なくとも約70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性(またはその間の任意の%同一性)を有するポリヌクレオチド、ならびに上記の分子にハイブリダイズする、または上記の分子の相補体であるポリヌクレオチドのいずれかからなるか、または本質的にそれらからなる配列を含むポリヌクレオチドが、さらに含まれる。

20

【0097】

これらのポリヌクレオチドは、組換えRSVを产生するために、ベクター内に含まれるか、またはベクターによって発現され得る。したがって、単離されたポリヌクレオチドまたはベクターでトランスフェクションされた細胞もまた、本発明の範囲内であり、本明細書において例示される。

30

【0098】

本発明の関連する局面では、弱毒性を与えるM2-2欠失変異を有する単離された感染性組換えRSV(M2-2、 M2-2-AcII、または M2-2-HindIII変異体など)を产生するための組成物(例えば、RSVをコードするcDNAを組み込んだ単離されたポリヌクレオチドおよびベクター)ならびに方法が提供される。本発明のこれらの局面には、本明細書に記載するように改変されたRSVゲノムまたはアンチゲノムを含む新規な単離されたポリヌクレオチド分子、ならびにそのような分子を組み込んだベクターが含まれる。また、RSVタンパク質をコードする1つまたは複数の単離されたポリヌクレオチド分子を含む同じまたは異なる発現ベクターも提供される。これらのタンパク質はまた、ゲノムまたはアンチゲノムcDNAから直接発現させることもできる。1つまたは複数のベクターは、好ましくは、細胞または無細胞溶解物中で発現または共発現され、それにより感染性のM2 ORF2欠失もしくはノックアウト変異型RSV粒子またはサブウイルス粒子を产生する。

40

【0099】

一局面において、感染細胞内でのRSV増殖を可能にする条件下で、RSV感染を許容する宿主細胞に組換えRSV株を感染させることを含む、1または複数種の精製RSVタンパク質の产生方法が提供される。培養下での複製期間の後、細胞を溶解して、組換えRSVをそこから分離する。ウイルスの分離後、1または複数種の所望のRSVタンパク質を精製し、ワクチン、診断および他の用途のための1または複数種のRSVタンパク質を得る。

【0100】

M2-2欠失変異体(M2-2、 M2-2-AcII、または M2-2-HindIII変異体など)を产生するための上記の方法および組成物は、感染性ウイルスもしくはサブウイルス粒子、または

50

それらの誘導体を生じさせる。感染性ウイルスは、本物のRSVウイルス粒子に匹敵し、そのままで感染性である。それは新鮮細胞に直接感染することができる。感染性サブウイルス粒子は、典型的には、適切な条件下で感染を開始することができるウイルス粒子のサブ成分である。例えば、ゲノムRNAまたはアンチゲノムRNAとN、P、LおよびM2-1タンパク質を含むヌクレオカプシドは、細胞の細胞質に導入された場合に感染を開始することができるサブウイルス粒子の例である。本発明の範囲内で提供されるサブウイルス粒子には、感染力に必須ではない1または複数種のタンパク質、タンパク質セグメント、または他のウイルス成分を欠くウイルス粒子が含まれる。

【0101】

他の態様において、本発明は、上記のようなM2-2欠失変異体(M2-2、 M2-2-AcII、または M2-2-HindIII変異体など)RSVゲノムまたはアンチゲノムをコードする単離されたポリヌクレオチド分子を含む発現ベクターと、RSVのN、P、LおよびRNAポリメラーゼ伸長因子タンパク質をコードする1または複数種の単離されたポリヌクレオチド分子を含む発現ベクター(同じまたは異なるベクター)とを含む細胞または無細胞溶解物を提供する。これらのタンパク質の1または複数種は、ゲノムまたはアンチゲノムcDNAから発現させることもできる。発現されると、ゲノムまたはアンチゲノムとN、P、LおよびRNAポリメラーゼ伸長因子タンパク質が組み合わさって、感染性RSVウイルスまたはサブウイルス粒子を産生する。

【0102】

本発明の組換えRSVは、RSV感染を受けやすい宿主においてRSVに対する所望の免疫応答を引き出すために、様々な組成物中で有用である。本明細書に開示される弱毒性M2-2欠失変異体(M2-2、 M2-2-AcII、または M2-2-HindIII変異体など)RSV株は、感染したヒト宿主において防御免疫応答を誘発することができるが、免疫された宿主において重篤な呼吸器疾患の許容できない症状を引き起こさないように十分に弱毒化されている。弱毒化ウイルスまたはサブウイルス粒子は、細胞培養上清中に存在してもよいし、培養物から分離されてもよいし、部分的または完全に精製されてもよい。ウイルスはまた、凍結乾燥されてもよく、必要に応じて、保存または宿主への送達のために種々の他の成分と組み合わせることができる。

【0103】

別の局面では、M2-2欠失変異体(M2-2、 M2-2-AcII、または M2-2-HindIII変異体など)は、他の病原体、特にパラインフルエンザウイルス(PIV)のような呼吸器病原体の防御抗原のための「ベクター」として使用することができる。例えば、感染性弱毒ワクチンウイルスを産生するために、PIV由来の防御抗原をコードする配列を組み込んだ、M2-2欠失(M2-2、 M2-2-AcII、または M2-2-HindIII変異体など)を有する組換えRSVを遺伝子工学的に作製することができる。

【0104】

関連する局面において、本発明は、対象哺乳動物におけるRSVに対する免疫応答を誘発するために、個体の免疫系を刺激する方法を提供する。この方法は、免疫学的に十分な量の本明細書に記載の弱毒化M2-2欠失変異RSVを生理学的に許容される担体および/またはアジュバント中に含む免疫原性製剤を投与することを含む。

【0105】

本発明はさらに、生理学的に許容される担体および/またはアジュバント、ならびに分離された弱毒化M2-2欠失変異RSV粒子またはサブウイルス粒子を含む新規ワクチンを提供する。好ましい態様においては、ワクチンは、弱毒化と免疫原性の適したバランスを達成するため、上記の通りの、少なくとも1つ、好ましくは2つ以上の弱毒化変異または他のヌクレオチド改変を有するM2-2欠失変異RSVを含む。

【0106】

本明細書で提供される組換えRSV株の宿主から候補ワクチンウイルスを選択するために、生存能力、インビトロでの効率的な複製、インビボでの弱毒性、免疫原性、および表現型安定性の基準が周知の方法に従って決定される。本発明のワクチンにおいて最も望まれる

10

20

30

40

50

ウイルスは、生存能力を維持すべきであり、ワクチンの製造を可能にする許容条件下にインビトロで十分に複製すべきであり、安定した弱毒化表現型を持つべきであり、耐容性が良好であるべきであり、(より低いレベルにもかかわらず)免疫した宿主において複製を示すべきであり、その後の野生型ウイルスの感染により引き起こされる重篤な疾患に対する防御を与えるのに十分なワクチンの免疫応答を効果的に誘発すべきである。

【0107】

ワクチン用および他の目的でRSVウイルスを増殖させるために、RSV増殖を可能にする多くの細胞株を使用することができる。RSVは種々のヒトおよび動物の細胞内で増殖する。ワクチン用の弱毒化RSVウイルスを増殖させるための好ましい細胞株には、DBSFRhL-2、MRC-5およびVero細胞が含まれる。最も高いウイルス収量は、通常、Vero細胞のような上皮細胞株により達成される。典型的には、約0.001～1.0またはそれ以上の範囲の感染多度でウイルスを細胞に接種して、ウイルスの複製を許容する条件下で、例えば約30～37で約3～10日間、またはウイルスが適切な力値に達するのに必要な期間、培養する。温度感受性ウイルスは、「許容温度」として32℃を用いて増殖させることが多い。ウイルスを細胞培養物から取り出して、典型的には周知の清澄化手順、例えば遠心分離によって細胞成分から分離し、当業者に周知の方法を用いて、必要に応じてさらに精製することができる。

10

【0108】

本明細書に記載するように弱毒化されたRSVは、ワクチンでの使用のために適切な弱毒性、表現型復帰に対する抵抗性、および免疫原性を確認するために、種々のよく知られた、一般的に受け入れられたインビトロおよびインビオモデルにおいて試験することができる。インビトロアッセイでは、多重弱毒化された、生物学的に誘導された、または組換えRSVであり得る変型ウイルスが、ウイルス複製の温度感受性または「ts表現型」について、および小さなブラークの表現型について試験される。変型ウイルスはRSV感染の動物モデルにおいてさらに試験される。様々な動物モデル(例えば、ネズミ、コットンラット、および靈長類)が記載されており、当業者には公知である。

20

【0109】

上記の記載に従って、また以下の実施例に基づいて、本発明はまた、ワクチンに利用するための分離された感染性RSV組成物を提供する。ワクチンの成分である弱毒化ウイルスは、分離された、典型的には精製された形態である。分離されたとは、感染個体の鼻咽頭のような、野生型ウイルスの天然環境以外にあるRSVを指すことを意味する。より一般的には、分離されたとは、細胞培養物または他の人工培地の成分として弱毒化ウイルスを含むことを意味する。例えば、本発明の弱毒化RSVは、感染した細胞培養物によって産生され、該細胞培養物から分離されて、スタビライザーに添加され得る。

30

【0110】

本発明のRSVワクチンは、有効成分として、本明細書に記載のように産生されたRSVを免疫原として有効な量で含有する。生物学的に誘導されたまたは組換えRSVは、ワクチン製剤に直接使用することができる。生物学的に誘導されたまたは組換えにより変型されたウイルスは、生理学的に許容される担体および/またはアジュバントと共に宿主に導入され得る。有用な担体は当技術分野において周知であり、例えば、水、緩衝水、0.4%生理食塩水、0.3%グリシン、ヒアルロン酸などが含まれる。得られた水溶液は、そのままで使用するために、または使用前に解凍される凍結形態で、または凍結乾燥して、包装することができ、凍結乾燥製剤は、上記のように、投与前に滅菌溶液と組み合わされる。この組成物は、生理学的条件に近づけるために必要とされる、薬学的に許容される補助物質を含むことができ、それらには、限定するものではないが、以下が含まれる：pH調整・緩衝剤、等張化剤、湿潤剤など、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、スクロース、硫酸マグネシウム、リン酸緩衝剤、HEPES(4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸)緩衝剤、ソルビタンモノラウレート、およびオレイン酸トリエタノールアミン。許容されるアジュバントには、不完全フロイントアジュバント、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、またはミョウバンが

40

50

含まれ、これらは当技術分野で周知の物質である。好ましいアジュバントにはまた、Stimulon(商標)QS-21 (Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Worcester, Mass.)、MPL(商標)(3-O-脱アシル化モノホスホリルリピドA ; RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Mont.)、およびインターロイキン-12 (Genetics Institute, Cambridge, Mass.)も含まれる。

【0111】

宿主は、RSVワクチン組成物で免疫化すると、RSVウイルスタンパク質、例えばFおよびG糖タンパク質、に特異的な抗体を産生することによって該ワクチンに応答する。さらに、自然免疫応答および細胞性免疫応答が誘導され、これは免疫応答を調節するだけでなく、抗ウイルスエフェクターを提供することができる。ワクチン接種の結果、宿主は、RSV感染に対して少なくとも部分的または完全に免疫になるか、または中等度もしくは重度のRSV疾患、特に下気道疾患、の発症に抵抗性を持つようになる。

10

【0112】

本発明の弱毒化RSVを含有するワクチン組成物は、RSVに対する個体の免疫応答能を誘導または増強するのに十分な「免疫原として有効な用量」で、RSV感染を受けやすいか、そうでなければRSV感染のリスクがある対象に投与される。RSVワクチン組成物は、注射、エアロゾル送達、鼻腔用スプレー、点鼻剤、経口接種、または局所適用を含むがこれらに限定されない、任意の適切な方法によって投与することができる。ヒト対象の場合、本発明の弱毒化ウイルスは、十分に確立されたヒトRSVワクチンプロトコルに従って投与される(Karron et al. JID 191:1093-104, 2005)。簡単に説明すると、成人または小児に、典型的には0.5mI量の生理学的に許容される希釈剤または担体中の、RSVワクチンの免疫原として有効な用量を、液滴によって鼻腔内接種する。これは、非複製性ワクチンによる非経口免疫化と比較して、簡便性および安全性の利点を有する。それはまた、RSVに対する抵抗において主要な役割を果たす、局所呼吸器免疫の直接的な刺激をもたらす。さらに、このワクチン接種方法は、一般的には幼い頃に見られる母親由来のRSV特異的血清抗体の免疫抑制作用を効果的に迂回する。また、RSV抗原の非経口投与は免疫病理学的合併症を伴うことがあるが、こうしたことは生ウイルスでは観察されていない。

20

【0113】

いくつかの態様では、ワクチンは鼻腔内、皮下、または筋肉内に投与され得る。いくつかの態様では、それは上気道に投与され得る。これは、スプレー、液滴またはエアロゾル送達を含むがこれらに限定されない、任意の適切な方法によって行うことができる。多くの場合、該組成物は、RSV抗体について血清反応陰性である個体、または経胎盤的に獲得した母親由来のRSV抗体を有する個体に投与される。

30

【0114】

全ての対象において、投与されるRSVワクチンの正確な量ならびに投与時期および頻度は、患者の健康状態と体重、投与方法、製剤の性質などを含む様々な要因によって決定される。投与量は、一般に、患者あたり約3.0 log₁₀ ~ 約6.0 log₁₀ プラーク形成単位('PFU')またはそれ以上のウイルス、より一般には患者あたり約4.0 log₁₀ ~ 5.0 log₁₀ PFUウイルスの範囲である。一態様では、患者あたり約5.0 log₁₀ ~ 6.0 log₁₀ PFUを、例えば1~6ヶ月齢の乳児期に投与することができ、2~6ヶ月またはそれ以上の後に1または複数回の追加のブースター量を投与することができる。別の態様では、乳児に、約5.0 log₁₀ ~ 6.0 log₁₀ PFU/患者の用量を、多くの他の小児期ワクチンの推奨される投与時期である約2、4および6ヶ月齢で投与することができる。さらに別の態様では、追加のブースターモードを約10~15ヶ月齢で投与することができる。どのような場合でも、ワクチン製剤は、抗RSV免疫応答を効果的に刺激または誘発するのに十分な量('有効量')の本発明の弱毒化RSVを提供すべきである。

40

【0115】

いくつかの態様では、ワクチンは、単一のRSV株もしくは抗原サブグループ、例えばAまたはB、に対する免疫応答、または複数のRSV株もしくはサブグループに対する免疫応答を誘発する弱毒化M2-2欠失ウイルスを含み得る。これに関連して、M2-2欠失変異RSVは

50

、1つまたは複数のRSV株またはサブグループに対するより効果的な防御のために、異なる免疫原特性を有する他のRSVワクチン株またはサブグループとワクチン製剤中で組み合わせることができる。それらは、ワクチン混合物として一緒に投与されてもよいし、1つのRSV株または複数のRSV株もしくはサブグループに対するより効果的な防御を誘導するための協調的な治療プロトコルで別々に投与されてもよい。

【0116】

結果として生じる免疫応答は、様々な方法で特徴付けることができる。これらには、RSV特異的抗体の分析用の鼻洗浄液または血清のサンプルを採取することが含まれ、抗体は、補体結合、ブラーク中和、酵素結合免疫吸着アッセイ、ルシフェラーゼ免疫沈降アッセイ、およびフローサイトメトリーを含むがこれらに限定されない試験によって、検出することができる。さらに、免疫応答は、以下によって検出することができる：鼻洗浄液もしくは血清中のサイトカインのアッセイ、いずれかの供給源からの免疫細胞のELISPOT、鼻洗浄液もしくは血清サンプルの定量的RT-PCRまたはマイクロアレイ分析、ならびにインビトロでのウイルス抗原への再曝露による鼻洗浄液もしくは血清由来の免疫細胞の再刺激と、フローサイトメトリーによるサイトカイン、表面マーカーまたは他の免疫相關指標の產生もしくは表示の分析、あるいはRSV抗原を提示するインジケータ標的細胞に対する細胞傷害活性の分析。これに関連して、個体はまた、上気道疾患の兆候および症状についてもモニタリングされる。

【0117】

ワクチンウイルスの弱毒化のレベルは、例えば、免疫された宿主の気道に存在するウイルスの量を定量し、その量を、野生型RSVまたは候補ワクチン株として評価された他の弱毒化RSウイルスによって產生された量と比較することによって、決定することができる。例えば、本発明の弱毒化ウイルスは、野生型ウイルスの複製レベルと比較して、チンパンジーのような高度に感受性の宿主の上気道において、より大きな程度の複製制限を有するであろう(例えば10~1000倍少ない)。上気道でのウイルスの複製に関連した鼻漏の発生をさらに低減させるために、理想的なワクチン候補ウイルスは、上気道と下気道の両方において制限されたレベルの複製を示すべきである。しかしながら、本発明の弱毒化ウイルスは、ワクチン接種個体において防御を与えるために、十分に感染性でありかつヒトにおいて免疫原性であるべきである。感染した宿主の鼻咽頭におけるRSVのレベルを測定する方法は、文献に記載されており周知である。検体は鼻咽頭分泌物の吸引または洗い出しによって得られ、ウイルスは実験室手順による組織培養またはその他で定量化される。例えば、Belshe et al., J. Med. Virology 1:157-162 (1977); Friedewald et al., J. Amer. Med. Assoc. 204:690-694 (1968); Gharpure et al., J. Virol. 3:414-421 (1969); およびWright et al., Arch. Ges. Virusforsch. 41:238-247 (1973)を参照されたい。このウイルスは、チンパンジーのような宿主動物の鼻咽頭において簡便に測定することができる。

【0118】

さらなる態様

項目1. RSVゲノムまたはアンチゲノム配列を含む弱毒化表現型を有する組換えRSV変異体をコードする単離されたポリヌクレオチド分子であって、

(a) 該RSVゲノムまたはアンチゲノムが、SEQ ID NO:1の位置T8161、T8167およびT8179での突然変異と組み合わせた、SEQ ID NO:1の8189~8429位に位置する241ヌクレオチドの欠失を含む欠失に相当するM2-2 ORFの欠失によって改変される；または

(b) 該RSVゲノムまたはアンチゲノムが、SEQ ID NO:1の8198Aおよび8200Gの存在と組み合わせた、SEQ ID NO:1の8203~8436位に位置する234ヌクレオチドの欠失を含む欠失に相当するM2-2 ORFの欠失によって改変される；または

(c) 該RSVゲノムまたはアンチゲノムが、SEQ ID NO:1の8198Aおよび8199Gの存在と組み合わせた、SEQ ID NO:1の8203~8436位に位置する234ヌクレオチドの欠失を含むM2-2 ORFの欠失によって改変されたSEQ ID NO:1で示されるポジティブセンス配列を有する

10

20

30

40

50

ことを特徴とする、単離されたポリヌクレオチド分子。

項目2. aおよびbに記載されるRSVゲノムまたはアンチゲノムが、SEQ ID NO:1で示される配列と少なくとも90%同一である配列によって示されるポジティブセンス配列を有する、項目1記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

項目3. 前記RSVゲノムまたはアンチゲノムが、SEQ ID NO:1の突然変異C4489T、C4492T、A4495T、A4497GおよびG4498Aと組み合わせた、SEQ ID NO:1の4499～4610位に位置する112ヌクレオチドの欠失によってさらに改変される(「6120」)、項目1または2記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

項目4. SEQ ID NO:1と少なくとも90%同一である配列により示されるポジティブセンス配列を有するRSVゲノムまたはアンチゲノムを含む、弱毒化表現型を有する組換えRSV変異体をコードする単離されたポリヌクレオチド分子であって、
10

該RSVゲノムまたはアンチゲノムが、SEQ ID NO:1の8203～8436位に位置する234ヌクレオチドの欠失を含む欠失に相当するM2-2 ORFの欠失によって改変され、

該RSVゲノムまたはアンチゲノムが、SEQ ID NO:1の突然変異C4489T、C4492T、A4495T、A4497GおよびG4498Aと組み合わせた、SEQ ID NO:1の4499～4610位に位置する112ヌクレオチドの欠失によってさらに改変される

ことを特徴とする、単離されたポリヌクレオチド分子。

項目5. 前記RSVゲノムまたはアンチゲノムが、SEQ ID NO:1に対する以下の変化：

該RSVのNタンパク質におけるV267I、Fタンパク質におけるE218AおよびT523I、ならびにLタンパク質におけるC319YおよびH1690Yのアミノ酸置換をコードする突然変異(「cp」)；
20

該RSVのFタンパク質におけるK66EおよびQ101Pのアミノ酸置換をコードする突然変異(「HEK」)；

該RSVのSHタンパク質の欠失をコードするSEQ ID NO:1の4198～4616位に位置する419ヌクレオチドの欠失(SH)；

該RSVのNS2タンパク質におけるK51Rのアミノ酸置換をコードする突然変異(「NS2」)；

該RSVのNタンパク質におけるT24Aのアミノ酸置換をコードする突然変異(「N」)；

該RSVのGタンパク質をコードするヌクレオチド配列が、臨床分離株A/Maryland/001/11由来のGタンパク質をコードする対応するコドン最適化ヌクレオチド配列と置き換えられる；
30

該RSVのFタンパク質をコードするヌクレオチド配列が、臨床分離株A/Maryland/001/11由来のFタンパク質をコードする対応するヌクレオチド配列；または臨床分離株A/Maryland/001/11由来のFタンパク質をコードする対応するコドン最適化ヌクレオチド配列；またはコドン最適化配列FBB(「FBB」)と置き換えられる；および

SEQ ID NO:1の該RSVのGタンパク質とFタンパク質をコードするヌクレオチド配列の順序が入れ替わる

の1つまたは複数の導入によってさらに改変される、項目1、2、3または4記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

項目6. SEQ ID NO:2のヌクレオチド配列を含む、項目1(a)または2記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

項目7. SEQ ID NO:3のヌクレオチド配列を含む、項目1(b)または2記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

項目8. SEQ ID NO:4のヌクレオチド配列を含む、項目1(c)記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

項目9. SEQ ID NO:5のヌクレオチド配列を含む、項目3記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

項目10. SEQ ID NO:6のヌクレオチド配列を含む、項目3または4記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

項目11. SEQ ID NO:7のヌクレオチド配列を含む、項目3または4記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

10

20

30

40

50

項目12. 改変されたRSVゲノムまたはアンチゲノムが、

cp/ M2-2、cp/ M2-2/HEK、 M2-2/1030s、NS2/N/ M2-2、NS2/ M2-2、N / M2-2、NS2/N/ M2-2-AcII、 SH/ M2-2、cp/ SH/ M2-2、6120/cp/ M2-2、6120/ M2-2/1030s、6120/NS2/N/ M2-2、6120/G001BB/FBB/ M2-2、6120/FBB/G001BB/ M2-2、6120/G001BB/F/ M2-2、6120/G/FBB/ M2-2、6120/G/FBB/HEK/ M2-2、6120/G/FBB/cp/HEK/ M2-2、6120/FBB/G/ M2-2、6120/G001BB/F001BB/ M2-2、6120/NS2/ M2-2、6120/N/ M2-2、6120/NS2/N/ M2-2-AcII、NS2/N/ M2-2-HindIII、および6120/NS2/N/ M2-2-HindIII

からなる群より選択される突然変異の組み合わせを含む、項目5記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

項目13. 前記RSVゲノムまたはアンチゲノムが、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:4における次のヌクレオチド置換：404C、779G、1099T、1139A、1140G、1182G、1210G、1939A、5612A、5616A、5640G、6216C、6222C、6387T、7215C、7482T、7560A、7702G、10515T、13634A、13901Tの1つまたは複数の導入によってさらに改変された、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:4からなる群より選択される配列を含む、項目1記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

項目14. 以前に特徴付けられたRSV突然変異または欠失をさらに含む、項目1～12のいずれか一つに記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

項目15. 項目1～13のいずれか一つに記載の単離されたポリヌクレオチド分子を含む、ベクター。

項目16. 項目1～13のいずれか一つに記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、細胞。

項目17. 項目1～13のいずれか一つに記載の単離されたポリヌクレオチド分子によってコードされる組換えRSV変異体を免疫学的に有効な量で含有する、薬学的組成物。

項目18. 項目16記載の薬学的組成物を投与することを含んでなる、RSVに対して対象をワクチン接種する方法。

項目18. 薬学的組成物を鼻腔内投与する、項目17記載の方法。

項目20. RSウイルスを注射、エアロゾル送達、鼻腔用スプレー、または点鼻剤によって投与する、項目17記載の方法。

【0119】

例示的な配列

D46のアンチゲノムcDNA配列(SEQ ID NO:1)

ACGGGAAAAAAATCGTACAACAAACTTGCATAAACAAAAATGGGGCAAATAAGAATTGATAAGTACCACTTAA
ATTTAACTCCCTGGTTAGAGATGGCAGCAATTGAGTATGATAAAAGTTAGATTACAAAATTGTTGACAA
TGATGAAGTAGCATTGTTAAAATAACATGCTATACTGATAAAATTAAATAACATTAACTAATGCTTGGCTAAGGCAG
TGATACATACAATTGAATGGCATTGTGTTGTGATGTTTACAAGTAGTGTGATATTGCCCTAATAATAAT
ATTGTTAGTAAAATCCAATTTCACAACAATGCCAGTACTACAAAATGGAGGTTATATATGGGAAATGATGGAATTAAC
ACATTGCTCTCAACCTAATGGTCTACTAGATGACAATTGTGAAATTAAATTCTCCAAAAACTAAGTGATTCAACAA
TGACCAATTATGAATCAATTCTGAATTACTTGGATTGATCTTAATCCATAATTAAATAACTCAACTAG
CAAATCAATGTCACTAACACCATTAGTTAATATAAAACTTAACAGAAGACAAAATGGGGCAAATAATCAATTCTAG
CCAAACCCAAACCATGGACACAACCCACAATGATAATACACCACAAAGACTGATGATCACAGACATGAGACCGTTGTCA
CTTGAGACCATAATAACATCACTAACCAAGAGACATCATACACACAAATTATATACTTGTATAATCATGAATGCAT
AGTGAGAAAATTGATGAAAGACAGGCCACATTACATTCTGGTCAACTATGAAATGAAACTATTACACAAAGTAG
GAAGCACTAAATATAAAATATACTGAATACAACACAAAATATGGCAGTTCCCTATGCCAATATTCAATCAT
GATGGGTTCTTGAATGCAATTGGCATTAGCCTACAAAGCATACTCCATAATATAAGTAGTGTCTCAATCCATA
AATTTCACACAAATTTCACACAAACTCTATGCATAACTATACTCCATAGTCCAGATGGAGCCTG
AAAATTATAGTAATTAAACTTAAGGAGAGATATAAGATAGAAGATGGGGCAAATAACACCATGGCTTTAGCAA
GTCAAGTTGAATGATAACTCAACAAAGATCAACTTCTGTCATCCAGCAAATAACCCATCCAACGGAGCACAGGAGA
TAGTATTGATGACTCCTAATTATGATGTCAGAAACACATCAATAAGTTATGTGGCATTTAATCACAGAAGATG

10

20

30

40

50

CTAATCATAAATTCACTGGGTTAATAGGTATGTTATGCGATGTCAGGTTAGGAAGAGAAGACACCATAAAAATA
 CTCAGAGATGCGGGATATCATGTAAGGAACTGGAGTAGATGTAACACACATCGTCAGACATTAATGGAAAAGA
 AATGAAATTGAAAGTGTAAACATTGGCAAGCTTAACAACACTGAAATTCAACATTGAGATAGAATCTAGAAAAT
 CCTACAAAAAAATGCTAAAAGAAATGGGAGGGTAGCTCAGAATACAGGCTAGACTCTCTGATTGTGGGATGATA
 ATATTATGTATAGCAGATTAGTAATAACTAATTAGCAGCAGGGGAGATCTGGCTTACAGCGTATTAGGAG
 AGCTAATAATGCTCTAAAATGAAATGAACTGTTACAAAGGCTACTACCCAAGGACATAGCCAACAGCTCTATG
 AAGTGTGAAAACATCCCCACTTTATAGATGTTGTCATTTGGTATAGCACAATCTTACCCAGAGGTGGC
 AGTAGAGTTGAAGGGATTGTCAGGATTGTTATGAATGCTATGGTCAGGGCAAGTGATGTTACGGTGGGAGT
 CTAGCAAATCGGTTAAAATATTGTAGGACATGCTAGTGTGCAAGCAGAAATGAAACAAGTTGAGGTT
 ATGAATATGCCAAAATGGGTGGGAGGATTCTACCATATATTGAACACCCAAAAGCATCATTATTATCT
 TTGACTCAATTCTCTACTTCCAGTTAGTATTAGCAATGCTGTCGCTAGGATAATGGGAGAGTACAGGAG
 TACACCGAGGAATCAAGATCTATGATGCAAGGCAACTGCTGAACTCAAAAGAAATGGTGTGATTAAC
 ACAGTGTACTAGACTGACAGCAGAAACTAGAGGCTATCAAACATCAGCTTAATCCAAAAGATAATGATGAG
 CTTGAGTTAATAAAAATGGGCAAAATCATCATGGAAAAGTTGCTCTGAATTCCATGGAGAAGATGCAA
 CAACAGGCTACTAATTCTAGAATCAAAGGGCAATTACATCACCCAAAGATCCAAGGAAAAGATAAGTA
 TCATACTGCAACTAATAGATAAGTAACCAAAGGCCCATAACATCAAATTCAACTATTATCAACCC
 ACAAAATGAGACAGATGACTGCAGGGAAACAGCCCAATTCAAGAAAACCTCTGTAAGTTCAAAGAAGACCC
 TACACCAAGTGATAATCCTTTCTAACTATCAAAGAACCATAGAAACATTTGATAACAATGAAGAAGAATCCA
 GCTATTCTACAGAAGAAATAATGATCAGACAAACGATAATATAACAGCAAGATTAGATAGGATTGATGAAA
 AGTGAATACTAGGAATGCTCACACATTAGTAGTGTGCAAGTGCAGGACCTACATGCTCGGATGGTATAAGAGA
 TGCCATGTTGTTAAGAGAAGAAAATGAGAAAGCTAGAACTGAGCATTAAATGACCAATGACAGATTAGAAG
 CTATGCAAGACTCAGGAATGAGGAAAGTGAAGGACACATCAGATGAGTGTCTCAATCCTA
 TCAGAGAAATTGAAACAACCTATTGGAGGGATGATAGTGTGAAATGATCTACTGTGAGATTCTGATTGTT
 CAATCTTCACATCACACAAATACCAACAGCAAAACTAACCAACCCATCATCCAACCAAACATCCATC
 CGCCAACTCAGCCAAACAGCCAAACACAGCCAACTCCAAAACCTAACACCACGGGAAAATCTATAATAGTT
 ACAAAAAGGAAAGGGTGGGCAAATATGAAACATAGTGAACAGCTTCACGAAGGCTCCACATACAGCTGC
 TGGTCAATACATGTCTAGAAAAGACGATGACCTGCTCATCTAACATATGGTGCCTATGTTCAATCATACT
 TGCCAGCAGATTACTTAAAGAACTAGCTAATGTCACACTACTGTGAAACAAATCCACACCCAAAGGGACCT
 TCAACTAGAGTCATGATAAACTCAAGAAGTGCAGTGCTAGCACAAATGCCAGCAATTACCATATGCGTAAATGT
 GTCTTGGATGAAAAGCAGGAAACTAGTGTGAAACACCCCTGTGAAATCAAGGCATGTAGTCTAACATGCC
 TAAAATCAAAATATGTTGACTACAGTTAAAGATCTACTATGAAAGACACTCAACCCCTACACATGATATTATGCT
 TTATGTAATTGAAACATGTAACATCAAAAGTCATAATACCAACATACCTAACATGTCAGTGTGAGAAA
 TAAAGATCTGAACACACTGAAAATATAACAAACCACTGAAATTCAAAATGCTATCACAAATGAAAATCATCC
 ACTCAGGATTACTATTAGTCATCACAGTGAACACAAAGGAGCATTCAAAATACATAAGCCACAAAGTCATT
 ATAGTACATCTGGAGCTACCTAGAAAAGAAAGTATATTGTTACCAACAAATTGAAAGCACACAGCTACACG
 ATTGCAATCAACCCATGGAGGATTAAACCTTTCTCATCAGTGTGTTAATCTACAAACTTCTACCTAC
 ATTCTTCACTTCACCATCACAAACACTCTGTTCAACCAACAAACAAACTTATCTGAGTCCCAGAT
 CATCCCAAGTCATTGTTATCAGATCTAGTACTCAAATAGTTAATAAAAATACATGGGCAAAATCATCATT
 GGAGGAAATCCAACTAATCACAAATCTGTTAACATAGACAAGTCCACACACCATAAGAATCAACCAATGGAAAAT
 ACATCCAACAAATAGAATTCTCAAGCAAATTCTGGCTTACTTACACTAACATGATCACAACAAATACTC
 TTGCTAATCTCATCATGATGCAACTAAACAACTTGTGAAATAACGTATTCTACAAACAAACCT
 TTGAGTTACCAAGAGCTGAGTCACACATAGCATTCTACATCCAAACAGGCCAAACAGTAACCTTGCTTAAAA
 ATGAACAAACCCCTACCTTACACACCTTACATCACCCACCATGCAAAACCACTATCCATACTATAAGTAGTT
 AAAAAAAATAGTCATAACATGAACTAGGATATCAAGACTAACATAACATTGGGCAAATGCAAACATGTC
 AACAAAGGACCAACGCACCGCTAAGACATTAGAAAGGACCTGGGACACTCTCAATCATTATTATCATCGTG
 CTATATAAGTTAAATCTTAACTGTGAGCACAATCACATTCTGGCAATGATAATCTCAACTTC
 TAATTGCAAGCATCATATTCTACAGCCTGGCAAACACAAAGTCACACCAACACTGCAATCATAAGATGCAACA
 AGCCAGTCAGAACACACCCAAACATCCTACCCAGAATCTCAGTCAGTCCCTCTAACCGTCTGA
 ATTACATCACAAATCACCACCATACTAGCTTCAACACACCCAGGAGTCAGTCACCTGCAATTCCACAAACAGTC
 AGACCAAAACACAAACAAACACTCAAACACACCCAGGAGTCAGTCACCTGCAATTCCACAAACAGTC
 AAACCCAAATAATGATTTCACCTTGAGTGTCAACTTGTACCTGCTGAGCATATGCAACAAATCAACCTGCTG
 GGCTATGCAAAAGAATACAAACAAAACAGGAAAGAAAACCACTACCAAGCCCACAAAAACCAACCC
 AGACAAACCAAAAGATCCAAACCCACTAAACAGGAAACTACCCACCCAAGCCACAGAAGGCCA
 ACCATCACACACCCAAACACATCAACTACACTCCTCAACACCACAGGAAATCAGAACACTCACAG
 TCAAATGGGAAACCTTCCACTCAACTTCCGAGGCAATCCAAGGCCCTCTCAAGTCTACTACACATCGAGTACC
 CATCACAAACCTCATCTCCACCAACACAGCCAGTAGTTACTTAAACACATATTATCACAAAAGGCCCTGACC
 AACTTAAACAGAATCAAATAAACTCTGGGCAAATAACATGGAGTTCTAATCTCAAGCAATGCAATTACCA
 CAATCCTACTGCACTGCAATTGTTGCTCTGGTCAAACATCACTGAAAGAATTATCAATCACATGCA
 GCAGTTAGCAAGGCTATCTAGTGTGTTAGAAGTGGTGTACCTGTTATAACTATAGAATTAGTAATAT
 CAAGAAAATAAGTGTAAATGAAACAGATGCTAAGGTTAAATTGATAAAAAGAATTAGATAAATATAAAAGTGT
 TAACAGAATTGCACTGCTCATGCAACACACAAAGCAACAAACATCGAGGCCAGAAGAGAACTACCAAGGTTATG
 ATTATACACTCAACAAATGCAAAAAACCAATGTAACATTAAGCAAGAAAAGGAAAAGAAGATTCTTGGTTTT
 GTAGGTTGAGATCTGCAATGCCAGTGGCTGCTGTATCTAAGGCTCTGCACCTAGAAGGGAAAGTGAACAAAGA
 TCAAAAGTGTCTACTATCCACAAACAAAGGCTGAGTCAGTTATCAATGGAGTTAGTGTGTTAACCAGCAAAGT

10

20

30

40

50

TTAGACCTAAAAACTATATAGATAAACATTGTTACCTATTGTAACAAGCAAGCTGCAGCATATCAAATATAGA
AACTGTGATAGAGTTCAACAAAAGAACACAGACTACTAGAGATTACCAAGGAATTAGTGTAAATGCAGGGTAA
CTACACCTGTAGGACTTACATGTTAACAATAGTGAATTATGTCATTAATCATGATATGCCATAACAAATGAT
CAGAAAAAGTTAATGTCACAAATGTCATAAGTAGACAGCAAGTTACTCTATCATGTCATAAAAGAGGA
AGTCTAGACATAGTACAAATACCAACTATGTTGTTAATAGATACACCCCTTGGAAACTACACACATCCCCT
TATGTCACAACCAACACAAAAGAAGGGTCAACATCTGTTAACAGAAACTGACAGAGATGGTACTGTACATGCA
GGATCAGTATCTTCTCCCACAAGCTGAAACATGTAAGGTTCAATCAAATCGAGTATTTGTACACAATGAACAG
TTAACATACCAAGTGAAGTAAATCTCTGCAATGTCACATTCACACCTCTAGGAGCATTGTCATGCTATGCCAAACTAA
ACAAACAGATGTAAGCAGCTCGTATCACATCTAGGAGCATTGTCATGCTATGCCAAACTAAATGTCAC
GCATCCAATAAAATCGGAACTATAAGACATTTCACCGGTCGATTGTCATGTCATAAAAGGGTGGACAC
TGTGTCGTAGGTAACACATTATATTGTAATAAGCAAGGTTAAAGTCTATGTCATGTCATAAAAGGGTGGACAC
TAAATCTCATGACCCATTAGTATCCCCTGTGATTCATGTCATCAATATCTCAAGTCACAGGAGAAATTAA
CAGAGCCTAGCATTTCGTAATCGATGAAATTACATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT
GATAACTACTATAATTAGTGTATTAGTAAATTGTTATCATTAATTGCTGGACTGCTTATACTGTAAGG
CCAGAAGCACACCCAGTCACACTAACGCAAGATCAACTGAGTGTATAAATAATTGTCATTAGTAACTAA
ATAGCACCTAATCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT
TCTGAACTCTCATGAAACCTCTCATCTATAACCCATCTCACTTAACTTAAAGTAGATTCTAGTTATAGTAA
TAAACACAAATTGTCATGCCAGATAACTTACCATCTGTCATAAAATGAAAATGCGGCAAAATGTCAC
TTGCAAATTGTCATGAGGTCTGTTAACAGGTTGTCATTTAGTCATGTCATGTCATGTCAT
CCCATGCACTGCTGTAAGACAAAACCTTATGTTAACAGAAACTTAAGTCTATGGATAAAAGTATAGATACCTA
TCAGAAATAAGTGGAGCTGCAGACTTGGACAGAACAGAAAGAGTATGCTTGGTAGTTGGAGTGCTAGAGGTTA
TATAGGTCATAAAACATAACTAAACATCAGCATGTCATGCCATGAGCAACACTCTCACTGTCATAATGTC
ATGATCTAAAAGCTGAGGGACATGAGGACTAAATTCCACCAAGATAAGAGTGTACATCTGTCAT
ATTGAAAGCACAGGAAAACATAAAACAAATTCCATCTGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT
CATCAAAACACATTGGATATCCATAAGAGCATAACCATCAACACCCAAAAGATCAACTGTTAGTCAT
ACCATGCCAAAATAATGATACTACCTGACAAATATCCTGTCATGTCATGTCATGTCAT
AGTTACTATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT
AAACATTCAATGAAATTCCATTGGACCTCTCAAGAATTGTCATGTCATGTCAT
ATTGAGGATATATACAAATAATAATTAGTGTCACTAAACACTCAACTGTCACCATCGTTCAT
ATTCAAAACATTCAAGTGTGGACAAATGGATCCATTATTAATGTCATGTCATGTCAT
GTTTATTAAGGTTATCTCTCATGAGCTATGTCATGTCATGTCATGTCAT
AATGATTATACCAACTTAATTAGTACAGAAAATCCATTAATGAGACACATGTCAT
GTCCTTAAATCTAAAGTATCATAAAGGTGAAATAATTAGAAGAACCTACTTATTCAGTCAT
ACAAGAGTATGACCTCGCAGAACAGATTGCTACCAACTAAATTACTTAAAGGATAATAAGAGGCTATAGAATA
AGTGTGTCAAAGTCTATGTCATGTCATGTCAT
AGTGAAGAACACTCGTATTACGACCATAACTCAAGAGTATGTCAT
TTAACAGCAGACAAAATCACTTACAAACAAAGACACATCAACACTGTCAT
ATGCAACATCTCCATCATGGTAAATACATTGGTTAACCTACAT
ATCAAATGAGGTTAAAACCATGGTTACATTGATAGATAATCAAACCTTACGGGTTCAATTATTTGACCA
AATATGGTTGATAGTTATCATAAAGGAACTCAAAGAACTACTGTCACACCTATAATCAATTCTGACATGGAAA
GATATTAGCCTTAGTAGTAAATGTTGTTAACATGTCATGTCAT
AGGCTTAAAGATGCGGATCAATATGTTACGGACACAAACTTCTCTTACGGGATTATTAGTCAT
ACAATGAGGTTCTACATAAAAGAGGTGAGGGATTATTAGTCAT
CAACTCAGAAAACGATTTTATAATGAGTATGTCACACATCACAGTCGTCAT
ATCAAGAGTATGTCATACATTAGATAAGACAGTGTCCGATAATATAAAATGGCAGATGGATAATTCTTAA
GTAAGTTCTTAAATTAAAGCTTGCAGGTGACAATAACCTTAAACATCTGAGTGAACATATTGTTGTCAGA
ATATTGGACACCCAATGGTAGATGAAAGACAAACCATGGATGTCAGTAAATTGCAATGAGGACCAATT
CTTGTAAAGCAGCTGAGTGTAAAGAGGTTGCTTATATAGAATTAAAGGGTTGTCAT
GATGGCCTACTTTAAAGGAAATGCTATTGTTACCTTAAAGATGGTAACTTACATCAAACACTTATCTCT
TTGTTGGAACCTTACAGAAAAGAGATTGTTGTTACGGACTCGTTCTATGTCAGTGTGGTTGCTTCAAAA
AGTGGATCTGAAATGATTATAATGATAAGCTATATCACCTCTAAATTGTCATGTCAGTGTGGACTGTTCCCTAGAA
ATTACATGCCATCACACATACAAACATATAGAACATGTCAT
GTATTAGAGTATTAAAGAGATAACAAATTCAATGAAATGTTACACTGTCAGTGTGGTAACTCAAAGTTATC
CAACAAACCTTAATCATGTCAGTGTGGTACATGACAGGCAAGAACAGAACACTGAGTGTGGTAACTCAA
CGGGATGTTGAGCAGACGGTCAAAATTTGGCAGGGAAAATGAGCTGAAAACATTTCACATTCTCAGT
CTTACAAGATATGGTGTAGAAGTACACAAACATTAGAACACTGAAAGCAGGAAATAAGTAAACATCAAC
CAATGTCAT
AIGAAACGTCAGTATTGAGTGTGCTGGATGAACTGTCAGGGTGTACATCTTACATTCTGTTACATT
ACTATTCCCTCATGTCACAAATAATGTCACATAGGCATGCACCCCTATATAGGAGATCATATTGTCAGTCTTAA
CAATGTCAGTGAACAAAGTGGATTATAGATGTCACATGGGTTGCAAGGGTGGTCAAAAACATGGACCA
TAGAACGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT
CAATCAATGAGTATAAGGAAACCAACTCAGACTGTCAGGAGGAAATTCTCAATTACTGTCAT
AAATGCGCTTAAATTACTGTCATGAGGACTGTCAGGAGGCAACAAATTAAAGGAACTGAGACTTATATC
GAGATATGCAATTGAGTAAACATCAACATAACGGTGTATTACCCAGCTAGTATAAGGAAAGTCCTAAGA

10

20

30

40

GTGGGACCGTGGATAAACACTATACTGATGATTCAAAGTGAGTCAGAATCTATAGGTAGTTGACACAAGAATT
 AGAATATAGAGGTGAAAGTCTATTATGCAGTTAATATTAGAAATGTATGGTTATATACTAGATTGCTCTACAAT
 TAAAAAATCATGCATTATGTAACAATAACTATATTGGACATATTAAAGGTTCTGAAACACTAAAAACCTTTTT
 AATCTTGATAATATTGATACAGCATTAACTACATTGTATATGAATTACCCATGTTATTGGTGGTGGTACATCCAACTT
 GTATATCGAAGTTCTATAGAAGAACTCCTGACTTCCTACAGAGGCTATAGTCACACTGTGTTCACTTAGTT
 ATTATACAAACCATGACTTAAAGATAAACTCAAGATCTGTCAGATGATAGATGAAATAAGTTCTAACATGCATA
 ATCACGTTGACAAAAACCTAATGCTGAATTGTAACATTGATGAGAGATCCTCAAGCTTAGGGTCTGAGAGACA
 AGCTAAAATTACTAGCGAAATCAATAGACTGGCAGTTACAGAGGTTGAGTACAGCTCAAACAAATATTCTCCA
 AAAGTGCACAACATTACTACAGAGATAGATCTAAATGATATTAGCAAAATATAGAACCTACATATCCTCAT
 GGGCTAAGAGTTGTTATGAAAGTTACCTTTATAAGCAGAGAAAATAGTAAATCTTATATCAGGTACAAATC
 TATAACTAACATACTGGAAAAACCTCTGCATAGACTTAAACAGATATTGATAGAGCCACTGAGATGATGAGGAAA
 ACATAACTTGCTTATAAGGATACTCCATTGGATTGTAACAGAGATAAAAGAGAGATATTGAGTATGGAAAACCTA
 AGTATTACTGAATTAGCAAATATGTTAGGGAAAGATCTGGCTTATCCAATATAGTTGTTACATCACCCAG
 TATCATGTATACTGACATCAAATATACTACAAGCCTATCTAGTGGCATAATTATAGAGAAATATAATGTTA
 ACAGTTAACACGTTGAGAGAGGACCCACTAAACCATGGGTTCATCTACACAAGAGAAAAACAAATGCCA
 GTTATAATAGACAAGTCTAACCAAAAAACAGAGAGATCAAATAGATCTATTAGCAAATGGATTGGGTATGC
 ATCTATAGATAACAAGGATGAATTCTGGAAGAACTCAGCATAGGAACCCCTGGTTAACATATGAAAAGGCCAAGA
 AATTATTCACAATATTAAAGTGTCAATTATTGCATGCCCTACAGTCAGTAGTAGACCATGTAATTCCCTGCA
 TCAATACCAGCTTATAGAACAAACAAATTACTTTGACACTAGCCCTATTACGCAATTAAACAGAAAAGTATGG
 TGATGAAGATATTGACATAGTATTCCAAAAGTGTATAAGCTTGGCCTTAGTTAATGTCAGTAGTAGAACAAATT
 CTAATGTATGCTTAACAGAATTCTCATACCTAAAGCTTAAAGGATACATTGATGAAACCTCCATATTCA
 GGTGATGTTGATATTCAAAGTTAAACAGTGATACAAAACAGCATATGTTTACAGACAAAATAAGTTGAC
 TCAATATGTGAATTATTCTTAAGTAATAAAACACTCAAATCTGGATCTCATGTTAATTCTAAATTGAC
 ATAAAATATGACTATTTCATAACTTACATTAAAGTACTAATTAGCTGGACATTGGATTCTGATTATACAA
 CTTATGAAAGATTCTAAAGGTATTGAAAAAGATTGGGAGAGGGATATATAACTGATCATATGTTATTAA
 GAAAGTTCTCAATGCTTATAAGACCTATCTTGTGTTTCAAAAGGTTATGGCAAAGCAGCTGGAGTGTG
 ATATGAACACTTCAGATCTTCTATGTGATTGAAATTAGACAGTAGTTATTGAAAGTCTATGCTAAGGTATT
 TTAGAACAAAAGTTATCAAATACATTCTAGCCAAGATGCAAGTTACATAGAGTAAAGGATGTCATAGCTCAA
 ATTATGGTTCTTAAACGTTAAAGTGTAGCAGAATTTCAGTTGCCCTGGGTTAACATAGATTATCATCCAA
 CACATATGAAAGCAATTAAACTTATAGATCTTGTAGAATGGGATTGATAAAATAGATAGAACACATTAA
 AATAAACACAAATTCAATGATGAAATTATTAACCTCTAACTTCTACATTAATTATAACTCTCAGATAACTCA
 TCTATTAACTAAACATATAAGGATGCTATTCTGAATTAGAAAATAATTACACAAATTATCATCCTCACACCAG
 AAACCCTAGAGAAATACTAGCCAATCCGATTAAGTAATGACAAAAAGACACTGAATGACTATTGTATAGGAA
 AATGTTGACTCAATAATGTTACATTGTATCTAAAGAAGCTTAAATTAACGTCATGCAATTAGAACCAATT
 CAGCAAACAAAGATTGTATAATTATCCCTATGGTTGATTGATAGAATTAGATCATCAGGAATACAGCCA
 AATCCAACCAACTTACACTACTTCCCACCAAATATCCTAGTCACAATAGCACACACTTTACTGCATGCT
 CCTTGGCATCATATTAAAGTATTCAATTGTTAGTCTACAGGTTGAAAATTAGTATAGAGTATTTTAA
 AGATCTTAAAGATCCCAATTGTATAGCATTCAAGGTGAAGGAGCAGGGAAATTATTGCGTACAGTAG
 TGGAACTTCATCCTGACATAAGATATATTACAGAAGTCTGAAAGATTGCAATGATCATGTTACCTATTGAGTT
 TTAAGGCTGTACAATGGACATATCAACATTGATTGGTAAAATTGACCATTCCTGCTACAGATGCAACCAACAA
 CATTCAATTGGCTTATTACATATAAAGTTGCTGAACCTATCAGTCTTGTGATGCCGAATTGCTGTAA
 CAGTCAGTAACTGGAGTAAATTATAAGATGGAGCAAGCATGTAAGAAAAGTGCAGTACTGTTCTCAGTTAA
 TGATGTTAATAGTAAATATCATGCTCAAGATGATATTGATTCAAAATTAGACAAATATACTATATTAAA
 TGATGCTTAGGCAGTAAGTAAAGGGATCGGAGGTTACTAGTCCTTACAATAGTCCTGCAATATATTCCAG
 TATTAAATGAGTACAAATGCTTAAATTGATACATCAAGAACCAAAATTCTCATGCTTAAGAACAGCTGATA
 GAGTCATTGATGCAAATTAAAGTTGATACCTTCTTGTGTTACCCATAACAAAAAAAGGAATTAAACTGC
 ATTGTCAAACTAAAGAGTTGTTAGTGGAGATATACTATCATATTCTATAGCTGGACGTAATGAGTTTCAGCA
 ATAAACTTATAATCATGACATGAACTCTAAAGGTTCAATCATGTTAAATTTCAGATCAACAGAACTA
 AACTATAACCATTATATGGTGAATCTACATATCCTACCTAAAGTGAATTGTTAAACAGCTGACACCAATGA
 ACTTAAAAAAACTGATTAAATCACAGGTAGTCGTTATACAACCTTCATAATGAAATAATGAAATAAGATCTTATA
 AAAAATTCCATAGCTATACACTGTTATTCAATTAGTTATTAAAATAAAATCATATAATTGTTAAA
 TAACTTTAGTGAACTAATCCTAAAGTTATCTTAACTTGGAGGAATAATTAAACCTAATCTAATTGGTT
 ATATGTGTTAACTAATTACGAGATATTAGTTGACACTTTTCTCGT

【 0 1 2 0 】

D46 / M2-2のアンチゲノムcDNA配列(SEQ ID NO:2)

ACGGGAAAAAATGCGTACAACAAACTGCTAAACACAAAAAATGGGCAAATAAGAATTGATAAGTACCACTTAA
 ATTTAACTCCCTGGTAGAGATGGCAGCAATTCTGAGTATGATAAAAGTTAGATTACAAAATTGTTGACAA
 TGATGAAGTAGCATTGTTAAAATAACATGCTACTGATAATTAACTACATTAACTATGCTTGGCTAAGGAG
 TGATACATACAATTGAAATGGCATTGTTGCTGATGTTACAGTCAGTAGTGTATTGCCCTAAATAAT
 ATTGTTAGTAAATCCAATTTCACAACATGCCAGTACTACAAAATGGAGGTTATATGGAAATGATGAAATT
 ACATTGCTCTAACCTAATGGCTACTAGATGACAATTGTAACATTCTCAAAACTAAGTGTACACAA
 TGACCAATTATGAAATCAATTCTGAGTACATTGTTGATCTTAATCCATAAAATTATAATTATCAACTAG
 CAAATCAATGTCACTAACACCATTAGTTAACTAAACTTAACAGAACAAAGACACAAATTAAACATTCA

10

20

30

40

50

CCAACCCAACCATGGACACAACCCACAATGATAATACACCACAAAGACTGATGATCACAGACATGAGACCGTTGTCA
 CTGAGACCATATAACATCACTAACAGAGACATCATACACACAAATTATACACTTGATAATCATGAATGCAT
 AGTGAGAAAACCTGATGAAAGACAGGCCACATTACATCTGGTCACATGAAATGAAACTATTACACAAAGTAG
 GAAGCACTAAATATAAAAATATACTGAATACAACACAAATATGGCACTTCCCTATGCCAATATTCAATCAT
 GATGGGTCTTGAATCATGGCATTAAGCCTACAAAGCATACTCCATAATATAACAGTATGATCTAACATCATA
 AATTCAACACAATATTCACACAACTCTATGCATAACTATACCTAGTCAGATGGAGCCTG
 AAAATTATAGTAATTAAAACCTAAGGAGAGATAAAGATAGAAGATGGGCAATACAACCATGGCTTAGCAA
 GTCAAGTGAATGATACACTAACAAAGATCAACTTCTGCATCCAGCAAATACACCATCCAACGGAGCACAGGAGA
 TAGTATGATACCTCATTATGATGTCAGAAACATCAATAAGTTATGTCATGTTATTACACAGAAAGATG
 CTAATCATAAATTCTAGGGTTAATAGGTATATGCGATGTCAGGTTAGGAAGAGACACCAAAATA
 CTAGAGATGGGGATACTGTAAACAGGATAGATGTAACACACATCGTAAGACATTAATGAAAAGA
 AATGAAATTGAAAGTGTAACTTGGCAAGCTAACACTGAAATTCAACATTGAGATAGAATCTAGAAAAT
 CCTACAAAAAAATGCTAAAGAAATGGGAGGGTAGCTCAGAATACAGGCATGACTCTCTGATTGTGGGATGATA
 ATATTATGTATAGCAGCTAGTAATAACTAAATTAGCAGCAGGGGACAGATCTGGCTTACAGCGTGTAGGAG
 AGCTAATATGCTAAAAATGAAATGAAACGTTACAAAGGTTACTACCCAAGGACATAGCCAACACGTTCTATG
 AAGTGTGAAACACATCCCACCTTATAGATGTTGTCATTITGTTAGTACGCAACATCTTACCCAGAGGTTGGC
 AGTAGAGTTGAGGGATTTCAGGATTGTTATGAATGCTTATGGTCAGGGCAAGTGTGTTACGGTGGGAGT
 CTAGCAAATCGGTTAAAAATATTATGTTAGGACATGCTAGTGTGCAAGGAAATGAAAGTTGTTGAGGTT
 ATGAATATGCCAAAATGGGTGGTGAAGCAGGATTCTACCATATATTGAACAACCCAAAGCATCATTATTATCT
 TTGACTCAATTCTCACTTCTCAGTGTAGTATTAGGCAATGCTGCTGGCTAGGCATAATGGGAGAGTACAGAGG
 TACACCGAGGAATCAAGTATATGATGCAAGCAACTTACAGGCTAAAGAAAATGGTGTGTTAACT
 ACAGTGTACTAGACTGACGAGAAACTAGAGGCTATCAAACATCAGCTTAATCCAAAAGATAATGATGTAGAG
 CTTGAGTTAATAAAAATGGGCAATAATCATGCAAGGAAATTTGCTCTGAAATTGAGAAGATGCAA
 CAACAGGGCTACTAAATCTAGAATCAAAAGGCAAAATCACATCACCCAAAGATCCAAGAAAAGATAGTA
 TCATATGTCACACTAAGATATAGAAGTAACCAAGAAAGCCCTATAACATCAAATTCAACTTATCAACCCA
 ACAAAATGAGACAGATGATACTGCAGGGACAAGCCAAATTATCAAAGAAAACCTCTAGTAAGTTCAAAGAAGACCC
 TACACCAAGTATAATCCCTTCTAAACTATACAAAGAAACCATAGAAACATTGATAACAATGAAGAAGATCCA
 GCTATTCTACAGAAGAAAATATGATCAGACAAAGATAATAACACAGAAGATTAGTATGAGTGTGAAAGAAAATTA
 AGTGAATACTAGGAATGCTCACACATAGTAGTGTGCAAGTGCAGGACCTACATCTGCTGGGATGGTATAAGAGA
 TGGCATGGTTAGAGAAGAAAATGAGAATGAGGAACTGAAAGTCAAGCATTAAATGACCAATGACAGATTAGAAG
 CTATGCAAGACTCAGGAAATGAGGAAAGTCAAGCAGGAAATGAGTGTCTCAATCCAACA
 TCAGAGAAATTGAAACACCTATTGGAGGGAAATGAGTGTGACAATGATCTATCACTTGAAGATTCTGATTAGTTAC
 CAATCTTCACATCAACACACAAACAGAACAGAACAAACTAACCAACCCATCATCAACCAACATCCATC
 CGCCAATCAGCCAAACAGCCAAACAAACAGCCAACTCAAACACCAGGGAAAAATCTATAATAGTT
 ACAAAATGAGGAAAGGTGGGCAAATGGAAACATCTGAAACAACCTCACAGAAGGCTCCACATCACAGCTGC
 TGGTCAATACATGTCATTAGAAAAGACATGACCTGCTCATCTAACATATGGGCTCCATGTTCAATCATCTA
 TGCCAGCAGATTACTTATAAAGAAACTAGCTAATGTCACATACTAGTGAACAAACATCCACACCAAGGGACCT
 TCACTAAGAGTCATGATAACTCAAGAATGCTGAGCATTGCAAAATGCCCAGCAAATTACCATATGCGCTAATGT
 GTCCCTGGATGAAAGAAGCAAATGAGTGTAAACCACCCCTGTGAAATCAAGGCATGAGTCTAACATGCC
 TAAAATCAAAATATGACTACAGTTAAAGATCTACTATGAAGACACTCAACCTACACATGATAATTATGCT
 TTATGTAATTGAAACATAGTAACATCAAAAGTCTATAACACACATACCTAACATGATCAGTGTGAGAAA
 TAAAGATCTGAAACACTGAAAATATAACACCAACTGAAATTCAAAATGCTATCACAAATGCAAAATCATCCCT
 ACTCAGGATTACTTATTAGTCATCACAGTACTGACAAACAGGAGCATTCACAAATACATAAGCCACAAAGTCATT
 ATAGTACATCTGGAGCTTACCTAGAAAAGAAAATGATAATTATGTTACCAAAATTGAAAGCACACAGCTACACG
 ATTGCAATCAAACCCATGGAGATTAACTTTCTACATCAGTGTGTTAATTCAACAAACTTCTACTTAC
 ATTCTTCACTTCACCATCACAAACACTCTGTGTTCAACCAATCAAACAAACTTATCTGAAGTCCCAGAT
 CATCCAAGTCATTGTTACAGATCTAGTACTCAAATAAGTTAAATAAAATACACATGGGCAAATACTATT
 GGAGGAATCCAACATCACAAATCTGTTACATGACAAGTCCACACCCATACAGAACAAATGGAAAAT
 ACATCCAATCAAATGAAATTCTCAAGCAATTCTGCTTACTAAACAAACTTGTGAAATATAACGTTACATCATAACAAACCT
 TTGAGTTACCAAGAGTCAGTCAACATAGCATTCTACATCAAACAGGCCAAACAGTAACCTGATTAAAA
 ATGAACAACCCCTACCTCTTACAACACCTCATTAACATCCCACCATGCAAACCAACTATCCATACATAAGTAGTT
 AATTAAAATAGTCATAACATGAACTAGGATATCAAGACTAACAAATAACATGGGCAAATGCAAACATGTC
 AACAAAGGACCAACGCAACGGCTAAGACATTAGAAAGGACTGGGACACTCTCAATCATTTATTATCATCGTG
 CTATATAGTTAAATCTGAGCACAATCACATTCTGCAATGAAATCTCAACTTCACTTCA
 TAATTGAGCTCATCATTCATAGCCTCGCAAACCAAGTCACACCAACAAACTGCAATCATACAAGATGCAACA
 AGCCAGATCAAGAACACACCCAAACATCTCACCCAGAACATCTGAGCTTGGAAATGAGTCCCTTAATCGTCTGA
 AATTACATCACAAATCACCCACATAGCTCAACACACCAGGAGTCAGTCACCCCTGCAATCCACAAACAGTC
 AGACCAAAACACAACAAACTCAAACACACCCAGAACAGCCCACCAACAAACGCAAACAAACACCAAGC
 AAACCCAAATAATGATTTCACTTGAGATGTTCAACTTGTACCCCTGCGCATATGCAAGAACATCAACCTGCTG
 GGCTATCTGCAAAGAATACCAACAAAACCCAGGAAAGAAAACCAACTACCAAGGCCACAAAAAAACCAACCTCA
 AGACAACCAAAAGATCCCAACACCAACTAAATCAAAGGAAGTACCCACCCACCAAGGCCACAGAAGGCCA
 ACCATCAACACCCACCAAAACATCATACACTACACTCACCTCCAAACCCACCAAGGAAATCAGAACTCACAAAG
 TCAAATGAAACCTTCCACTCAACTTCCCGAAGGCAATCCAAGCCCTCTCAAGTCTCACACATCCGAGTACC

10

20

30

40

50

CATCACACACCTTCATCTCACCCAACACACCAGCCAGTAGTTACTTAAACATATTACACAAAAGGCCTTGACC
 AACTTAAACAGAATCAAATAACTCTGGGCAAATAACAAATGGAGTTGCTAATCCTCAAAGCAATGCAATTACCA
 CAATCCTCACTGCAGTCACATTGTTGCTCTGGTCAAACATCACTGAGAAGAATTCTCAATCAACATGCAGT
 GCAGTTAGCAAAGGCTATCTTAGTGTCTGAGAACTGGTTGTTACAGTGTATAACTATAGAATTAAGTAAATAT
 CAAGAAAATAAGTGTATGAAACAGATCTAAGGTAATTGATAAAACAAGAATTAGATAATATAAAATGCTG
 TAACAGAATTGCAGTTGCTCATGCAAAGCACACAAGCAACAAACAATCGAGCCAGAAGAGAACTACCAAGGTTATG
 AATTATACACTCAACAATGCCAAAAACCAATGTAACATTAAGCAAGAAAAGGAAAGAGATTCTGGTTTTT
 GTAGGTGTTGATCTGCAATGCCAGTGGCAGTGGCTGTATCTAAGGCTCTGCACCTAGAAGGGAAAGTGAACAAGA
 TCAAAACTGCTACTATCCACAAACAAGGCTGTAGTCAGCTTACATGGAGTTAGTGTTTAACCGCAAAGTG
 TTAGACCTCAAAAATATAGATAAAACATTGTTACCTATTGTAACAGCAAAGCTGCAGCATATCAAATATAGA
 AACTGTGATAGAGTCAACAAAAGAACACAAGACTACTAGAGATTACAGGAAATTAGTGTAAATGCAGGCTAA
 CTACACCTGTAAGCACTTACATGTTAATAGTGAATTATTGTCATTAATCAATGATATGCCATAACAAATGAT
 CAGAAAAAGTTAATGTCACAAATGTTCAAATAGTTAGACAGCAAAGTTACTCTATCATGTCATAAAAGAGGA
 AGTCTTAGCATATGTAGTACAATTACACTATATGGTTAGATACACCTGTTGGAAACTACACACATCCCTC
 TATGTACAACCAACAAAAGAAGGGTCAACATCTGTTAACAGAACTGACAGGAGATGGTACTGTGACAATGCA
 GGATCAGTATCTTCTCCACAAGCTGAACATGTAAGGCTCAATCAATCGAGTATTGACACAATGACAG
 TTAACATTACAAGTGAAGTAAATCTGCAATGTTGACATATTCAACCCCCAATATGATTGTAAAATTATGACTT
 CAAAAACAGATGTAAGCAGCTCCGTTACATCACATCTAGAGGCCATTGTCATGCTATGCCAAACTAAATGTACA
 GCATCCAATAAAATCGGAACTACATAAGACATTCTAAGGGTGCATTATGTTACAAATAAAAGGGTGGACAC
 TGTGCTGAGGTAACACATTATATTGTAATAAGAAGAAGGTTAAAGTCTCTATGTAAGGTTAAAGGTAACCAATAA
 TAAATTCTATGACCCATTAGTATTCCCTCTGATGAATTGATGCAATCAATATCTCAAGTCACAGAGAAGATTAAAC
 CAGAGCCTAGCATTTATCGTAAATCCGATGAAATTACATAATGTAATGCTGGTAATCCACCAACAAATATCAT
 GATAACTACTATAATTATGTTAGTATGTTACATTGTTAGTGTGACTGCTTTACTGTAAAG
 CCAGAACACACAGTCAACTAGGGTATAATAATTGTCATTTAGTAACAAATGTCATTTAGTAACAAATAAA
 ATAGCACCTAATCATGTTACTATCTGTCATAGACAACCCATGTCATTGATTCTTAA
 TCTGAACTTCATCGAAACTCTCATATAACCATCTACTTACACTATTAAAGTATTCTAGTTATAGTTATA
 TAAAACACAATTGCACTGCCAGATTAACCTACCATCTGTAAAAATGAAAATGGGCAAATATGTCACGAAGGAATCC
 TTGCAATTGAAATTGAGGTCTTACATGTTAAATGGTAAGAGGTGTCATTAGTCATAATTATTGAAATGCCAC
 CCCATGCACTGCTGTTAGAACAAACCTTATGTTAAACAGAAACTTAAAGTCTGTTAGGACTGCTTATGTCATTT
 TCAAGAACAGTGGCAGTGGCAGAGTGGACAGAACAGAGATGCTCTGGTAGTTGGAGTGCTAGAGAGTTA
 TATAGGATCAATAAAACATAACTAACATCAGCAITGTTGCCATGAGCAAACCTCTACTGAACCTAATAGTG
 ATGATATCAAAAGCTGAGGGACAATGAGAGCTAAATTCAACCAAGATAAGAGTGTCATAACTGTCAATCATAT
 ATTGAAAGCAACAGGAAAACAATAACAAACTATCCATCTGTTAAAGGATGCGAGCAGACGTATTGAAAGAAAAC
 CATCAAAACACATTGGATATCCATAAGAGCATAACCATCAACACCCAAAGAATCAACTGTTAGTGTACAAACG
 ACCACGCCCCAAAATACGATACTACCTAACACTCAATTCTAACACTCACCATCGTTACATTAAATTCAACAA
 TTCAAGTGTGGACAAAATGGATCCCATTATGAAATCTGCTAATTGTTATCTAACCGATAGTTATTAA
 AGGTGTTATCTTCTCAGAGTGTAACTGTTAGGAATTACATATTCAATGTTGCTTATCTCAAAATGATTATA
 CCAACTTAAATTAGTAGACAAATCCATTAAAGAACATGAATCTAAAGAAACTAAATAACACAGTCCTTATA
 TCTAAGTATCATAAAGGTGAAATAAAATTAGAAGAACCTACTTATTTCAGTCATTACTTATGACATACAAGAGT
 GACCTGTCAGAACAGATTGCTACCAACTTAAAGATAATAAGAAGAGCTATAGAATAAGTGT
 AAGTCTATGCTATATTGAAATAACTAGGGCTAAAGAAAAGGACAAGGATTAATCCAACATGGACAAGATGAAGAC
 AACTCACTTATACGACCATATCAAAGATGATAACTTCAGCTGTTAAAGATAATCAATCTCATCTAAAGCAGA
 CAAAATCACTACAAAACAAAAGACACATCAAACAAACACTCTGAGAAGAATTGATGTCATGCAACATC
 CTCCATGTTAATCATGTTAACCTATGTTAACCTATACAAAACACATTAACACAGTATGCAATGAAATGAG
 GTAAAAAACCATGGTTACATTGATAGATAATCAAACCTTACTGGATTCAATTGTTCAATTATTGAAACCATATGGTG
 TATAGTTATCATAAGGAACTCAAAGAAATTACTGTGACAACCTATAATCAATTCTGACATGGAAAGATATTAGCC
 TTAGTAGATTAAATGTTGTTAACATGGATTAGTAACCTGCTGAAACACATTAAATAAGCTTAGGCTTAAAG
 TGCGGATTCAATAATGTTACTCTGACACAATTCTCTTACATTGAGATTGTTACACTAAAGCTATTCAACATGAGGG
 GTCTCATATAAAAGAGGTAGAGGGTTATTATGTCATAATTAAATAACAGAAGAAGATCAATTGAGAA
 AACGATTATATAATAGTGTCAACACATCACAGATGCTAATAAGCTCAGAAAATCTGCTATCAAGAGTA
 TGTCATACATTAGATAAGACAGTGTCCGATAATAAAATGGCAGATGGATAATTCTATTAGTAAGTCT
 TAAATTAAATTAGCTGAGGTGACAATAACCTAACATCTGAGTAACATTGTTGTTCAAGATATTGGAC
 ACCCAATGGTAGATGAAAGACAAGCCATGGATGCTTAAATTAGCAATGAGACAAATTACTGTTAAAG
 AGTCTGAGTATGTTAAGGGTGCCTTATATAGAAATTAAAAGGGTTGTAATAATTACAACAGATGGCTAC
 TTAAAGAAATGCTATTGTTACCCCTAAAGTGGTTACTACTATAAAACTAAACACTTATCCTTCTTGGGAAC
 TTACAGAAAAGAGATTGTTGTTACGGACTACGTTTCTATGTTGAGTTGCGTTGCTAAAGGATGCTT
 GAAATGTTATAAAATGATAAGCTATCATCCTCTAAATTGTTAGTGTGACTGTTCCCTAGAAATTACATGCC
 ATCACACATACAAAACATATAGAACATGAAAATTAAATTCCGAGAGTGTAAATTCAAGAAGAGTATTAGAGT
 ATTATTTAAGAGATAACAAATTCAATGAATGTGATTATAACTGTGAGTTAATCAAAGTTATCTCAACACCC
 AATCATGTTGATATTGACAGGCAAAGAAAAGAGAACTCAGTGAGTAGTGAATGTTGCAATGCAACCGGGATGTT
 CAGACAGGTTCAAATAATGGCAGAGAAAATGATAGCTGAAAACATTTCACAATTCTTCTGAAAGTCTTACAAGAT
 ATGGTGATCTAGAACTACAAAATTAGAAGTGTGAAAGCAGGAATAAGTACAACAAATCGCTACAATGATAAT
 TACAACAAATTACATTAGTAAGTGTCTATCATCACAGATCTCAGCAAATTCAACGATTTCGATATGAAACGTC
 ATGTTATTGTTAGTGTGCTGGATGAACTGCAATTGTTACATTCTATTGTTACATTAAACTATTCCCTC

10

20

30

40

50

ATGTCACAATAATGCACATAGGCATGCACCCCCCTATAGGAGATCATATTGAGATCTTAACAATGTAGAT
 GAACAAAGTGATTATAGATATCACATGGTGCATCGAAGGGTGTCAAAACTATGGACCATAGAAGCTAT
 ATCACTATTGATCTAATATCTCTAAAGGAAATCTCAATTACTGCTTAAATTATGGTACAATCAATAG
 ATATAAGCAAACCAATCAGACTCATGGAAAGGTCAAACCTCATGCTCAAGCAGATTATGGTACGATTAATAGCCTT
 AAATTACTGTATAAGAGTATGCAGGCATAGGCCACAAATTAAAGGAACTGAGACTTATATACAGAGATAITGCA
 ATTATGAGTAAAACAAATTCAACATAACGGTGTATTACCCAGCTAGTAAAGGAAAGCTTAAGAGTGGGACCGT
 GGATAAAACACTAATCTGATGTTCAAAAGTGTAGACTAGATCTAGGTGTTGACACAAGAATTAGAATATAGA
 GGTGAAAGTCTATTATGCAGTTAATATTAGAAATGTAGGTATATAATCAGATTGCTCTACAATTAAAGATCA
 TGCAATTATGAAACAATAAACTATATTGGACATATTAAAGGTTCTGAAACACTTAAACCTTTTAATCTTGATA
 ATATTGATAACAGCATTAACATTGTATATGAATTACCCATGTATTGGTGGTGTATCCAACTTGTATATCGA
 AGTTCTATAGAAGAACTCCTGACTCCTCACAGAGGCTATAGTCACCTGTGTCACTTAGTTATTACAAA
 CCATGACTAAAAGATAAACTTCAGATCTGTCAAGTGTAGATGAGATTGAATAAGTCTTAACATGCATAATCACGTTG
 ACAAAAACCTAATGCTGAATTGTAACATTGATGAGAGATCCTCAAGCTTAGGGTCTGAGAGACAAGCTAAATT
 ACTAGCAGAACTCAATAGACTGGCAGTTACAGAGGTTGAGTACAGCTCCAAACAAATTCTCCAAAGTGCACA
 ACATTATACTACTACAGAGATAGATCTAAATGATATTGCAAATATAGAACCTACATATCCTCATGGGCTAAGAG
 TTGTTTATGAAAGTTACCTTTATAAAGCAGAGAAAATAGTAAATCTTATATCAGGTACAAAATCTATAACTAAC
 ATACTGGAAAAAAACTCTGCCATAGACTAACAGATATTGATAGAGGCCACTGAGATGATGAGGAAAAACATAACTT
 GCTTATAAGGATACTTCCATTGGATTGAGACAGATAAAAGAGAGATATTGAGTATGGAAAACCTAAGTATTACTG
 AATTAGCAATATGTTAGGAAAGATCTGGCTTTACAGATATTGATGAGGAAATATAATGTTAACAGTTAAC
 ACAGTGGTGAGAGAGGACCACTAACCATGGTTGTCATCTACACAAGAGAAAAACAAATGCCAGTTATAATA
 GACAAGTCTAACCAAAACAGAGAGATCAAATAGATCTATTGAAATGGATTGGTGTATGCATCTATAGAT
 AACAGGATGAATTGAGAACCTAGCATAGGAACCTTGGGTTACATATGAAAAGGCCAAGAAAATTATTCC
 ACAATATTTAAGTGTCAATTATTGCACTGCCTTACAGTCAGTAGACCATGTAATTCCCTGCATCAATACAG
 CTTATAGAACACAAATTATCACTTGCACACTAGCCCTATTATCGATATTACAGAAAAGTATGGTGTGAAGAT
 ATTGACATAGTATTCCAAAACGTATAAGCTTGGCTTACAGTGTGTTAATGTCAGTAGAGACAATTACTAATGTATG
 TCTAACAGAATTATTCTCATACCTAACGTTAAGGATACATTGATGAAACCTCCATTACAGGTGATGTTG
 ATATTGACAAGTAAAACAGTGTACAAACACGATATTGTTACAGACAAAATAAGTTGACTCAATATGTG
 GAATTATTCTTAAGTAATAAAACACTCAAATCTGGATCTCATGTTAATTCTAATTAAATGGCACAATAAAATCT
 TGACTATTCTCATATAACTTACATTAAAGTACTAATTAGCTGGACATTGGATTCTGATTACAACCTTATGAAAG
 ATTCTAAAGGTTTTGGGAGGGATATAACTGATCTGTTATTGTTAATGTCAGTAGAGACAATTACTAATGTATG
 TTCAATGCTTAAAGACCTATCTTGTGTTTCAAAAGGTTATGGCAAGGAAAGCTGGAGTGTGATATGAACAC
 TTCAAGTCTTCTATGTGATTGAAATTAGACAGTAGTTATGGAAGTCTATGCTAAGGTATTGTTAGAACAAA
 AAGTTATCAAATACATTCTAGCCAAGATGCAAGTTACATAGAGTAAAGGATGTCATAGCTCAATTATGGTT
 CTTAACAGCTTAATGTCAGAACATTGCCCCTGGGTTGTTAACATAGATTATCATCCAACACATATGAA
 AGCAATTAAACTTATAGATCTGGTAAATGGGATTGATAAATAGATAGAACACATTAAAATAAACACA
 AATTCAATGATGAAATTCTAATCTCTACATTAATTAACTCTCAGATAACTCATCTATTAACT
 AAACATATAAGGATTGCTAATTCTGAATTAGAAAATTACACAAATTATCATCCTACACCAGAAACCCCTAGA
 GAATATACTAGCCAATCGGTTAAAGTAATGACAAAAAGACACTGAATGACTATTGTATAGGTAAAATGTTGACT
 CAAATAATGTTACATTGTTATCTAAAGGCTTAAATGTCGCAATGATTAGAACCAATTACAGCAAACAA
 GATTGTATAATTCTCCCTATGGTGTGATTGATAGAATTAGATCATTCAGGCAATACAGCCAAATCCAACCA
 ACTTTACACTACTTCCCAACAAATTCTCTAGTGCACAATAGCACACTTACTGCTGATCTCCCTGGCATE
 ATATTAAAGTATTCAATTGTTGATAGCATTACAGGTGTTAAATTAGTATAGGTATATTAAAGATCTTAA
 ATTAAAGATCCAATTGATAGCATTACAGGTGAAAGGATGCAATGCTGTTTACCTATTGAGTTTAAAGGCTG
 TCTGACATAAGATATTACAGAAGTCTGAAAGGATGCAATGCTGTTTACAGATGCAACAAACATTG
 TCTTATTACATATAAAGGTTGCTGACCTATCAGTCTTGTGATGCCGAAATTGCTGTAACAGTCAGT
 GAGTAAAATTATAATAGAATGGGAGCAAGCATGTAAGAAAAGTGAAGTACTGTTCTCAGTTAACAAATGTATGTTA
 TAGTAAAATCATGCTCAAGATGATATTGATTTCAAATTAGACAAATATAACTATTAAAATCTATGCTTAA
 GGCAGTAAGTAAAGGATCGGAGGTTACTTAGCTTACAATAGGTCTCGGAATATTCCAGTATTAAATG
 AGTACAAAATGCTAAATTGATACTATCAAGAACAAAATTCTCATGCTTAAGGAAAGTGTATAAGAGTCTATTG
 ATGCAAATATAAAAGGTTGATACCCCTTCTTGTACCTATAACAAAAAAAGGAATTAACTGCTTGTCAA
 CTAAGAGTGTGTTAGTGGAGATATACTATCATATTCTATAGCTGGACGTAATGAAAGTTTCAGCAATAACTTAT
 AAATCATAAGGATATAACATGAAACATCTTAAAGGATGCTTACAGTCAACAGAACAACTAAACTATAACC
 ATTATATATGGTAGAATCTACATATCTTACACTAAGTGAATTGTTAAACAGCTGACAAACCAATGAACCTAAAAAA
 CTGATTAAACATCAGGTAGTCTGTTACACAACTTCAATGAAATAAGGATCTTATAATAAAATTTCC
 ATAGCTTACACTAACACTGTATTCAATTAGTTATTAAAATTAAAATCATATAATTCTTAAATAACTTTAG
 TGAACAACTCTAAAGTTATCTTAAATCTGGAGAATTAAACCTTAATCTATTGTTATATGTGAT
 TAACAAATTACGAGATATTGTTGACACTTTCTCGT

【 0 1 2 1 】

D46 / M2-2-AcIIのアンチゲノムcDNA配列(SEQ ID NO:3)

ACGGGAAAAAAATGCGTACAACAAACCTGCATAAACCAAAAAATGGGCAAATAAGAATTGATAAGTACCACTTAA
 ATTAACTCCCTGGTTAGAGATGGGAGCAATTGAGTATGATAAAAGTTAGATTACAAACATTGTTGACAA

10

20

30

40

50

TGATGAAGTAGCATTGTTAAAATAACATGCTACTGATAAATTACATTAACTAATGCTTGGCTAAGGCAG
 TGATACATACAATCAAATTGAAATGGCATTTGTTGCTATGTTTACAAGTAGTGTATTTGCCCTAATAATAAT
 ATTGTAGTAAAATCCAATTTCACAACATGCCAGTACTACAAAATGGAGGTTATATGGGAAATGATGGAATTAAAC
 ACATTGCTCAACCTAATGGCTACTAGATGACAATTGAAATTAAATCTCCTAAACAAACTAAGTGAATTCAACAA
 TGACCAATTATGAATCAATTATCTGAATTACTTGGATTGATCTTAACTCCTAAATTATAATTATCAACTAG
 CAAATCAATGTCACTAACACCATAGTTAATATAAAACTTAACAGAACAAAAATGGGCAATAATCAATTCTAG
 CCAACCCAACCAGGACACAACCCACAATGATAATACACCACAAAGACTGATGATCACAGACATGAGACCGTTGCA
 CTTGAGACCATAATAACATCACTAACAGAGACATCATAACACACAAATTATATACTTGATAATCATGAATGCAT
 AGTGGAAAATCTGTGAAAGACAGGACATTCTACATCTGGTCAACTATGAAATGAAACTATTACACAAAGTAG
 GAAGCACTAAATATAAAATATCTGAATACAACACAAATATGGCACTTCCCTATGCCAATATTCAATCAT
 GATGGGTTCTTAAAGTCAATTGCTTAAAGCTTAACTCCATAATATAACAGTATGATCTCAATTCTAG
 AATTTCACACAAATTCTACACAACTCTATGCTAACTATCTCCATAGTCAGATGGAGCCTG
 AAAATTATAGTAATTAAACTTAAGGAGAGATAAGATAGAAGATGGGCAATAACACATGGCTTAGCAA
 GTCAAGTGAATGATACTCAACAAAGATCAACTTCTGTCTCCAGCAATAACACCATCAACGGAGCACAGGAGA
 TAGTATTGATACTCTAAATTATGATGTCAGAACACATCAATAAGTTATGTTGATGTTAAATCAGAACAGATG
 CTAATCATAATTCTAGGTTAAAGTGTATGCTAGTTAGGTTAGGAGAACACCAATAAGGAA
 CTAGAGATGGGGATATCATGAAAGCAATGGAGTAGATGTAACACACATCGTCAAGACATTAATGGAAAAGA
 AATGAAATTGAAAGTGTAACTTGGCAAGCTTAAACACTGAAATTCAACATGAGATAGAATCTAGAAAAT
 CCTACAAAAAAATGCTAAAGAAATGGGAGGGTAGCTCCAGAAATACAGGCTAGCTCTGTTAGGAG
 ATATTATGTATAGCAGCTAGTAATAACTAAATTAGCAGCAGGGGAGACATCTGGTCTACAGCGTGTAG
 AGCTAATAATGCTCTAAAGAAATGAAACGTTACAAAGGTTACTACCCAAAGGACATAGCCAACAGCTCTATG
 AAGTGTGAAAACATCCCACTTTAGATGTTTGTCTATTTGTGATAGCACAATCTTCTACAGAGGTGGC
 AGTAGAGTGAAGGGATTTCAGGATTGTTATGAATGCTATGGTCAGGGCAAGTGTGTTACGGTGGGAG
 CTTAGCAAAATCGGTTAAATTATGTTAGGACATGCTAGTGTGCAAGCAGAAATGGAACAGTTGTTAGGTT
 ATGAATATGCCAAATTGGGTGGTAGGAGGATTACCATATGAAACACCAAAAGCATCATTATCT
 TTGACTCAATTCTCACTTCTCAGTGTAGTATTAGGCAATGCTGTCGGCTAGGCATAATGGGAGAGTACAGAGG
 TACACCGAGGAATCAAGATCTATGATGCTGCAAAGGCATATGCTGAACAACACTCAAAGAAAATGGTGTGATTAAC
 ACAGTGTACTAGACTGACAGCAGAAACTAGAGGCTATCAAACATCAGCTTAATCCTAAAGATAATGATGAG
 CTTGAGTTAATAAAAATGGGGCAATAATCATGGAAAGTTGCTCTGCTGAAATTCCATGGAGAACATGCCAA
 CAACAGGGCTACTAAATTCTAGAATCAAAAGGCCAATTCTACATGCCAAAGGATCTCAAGGAAAGATAGTA
 TCATATCTGCAACTAAAGATAAGTAACCAAAAGGCCATAACATCAAATTCAACTATTCAACCCA
 ACAAAATGAGACAGATGATACTGCAAGGAAACAAGGCCATTATCAAAGAAAACCTCTAGTAAGTTCAAGAACAGCC
 TACACCAAGTGATAATCCCTTCTAAACTATACAAAGAACCATAGAAACATTGATAACAATGAAGAACATCCA
 GCTATTCTACAGAACAAATGATCAGAACAGATAATATAACAGAACAGATTAGATAGGATTGATGAAAATTA
 AGTGAATATACTAGGAATGCTCACACATTAGTAGTGTGCAAGTGCAAGGACCTACATGCTCGGGATGGTAAAGAGA
 TGCCATGGTTGTTAAAGAGAAGAAATGATAGAAAAAAATCAGAACTGAGCATTATGACCAATGACAGATTAGAAG
 CTATGGCAAGACTCAGGAATGGGAAAGTGAAGGAAACAGATGCAACATCAGATGAAAGTGTCTCAATCCAACA
 TCAGAGAAATTGAAACACCTATTGGAGGAATGATAGTGTGCAACATGATCTACTGTAAGATTCTGATTAGTTAC
 CAATCTTCACATCAACACACAAACAGAACAGAACAAACTAACCAACCCATCATCCAACCAACATCCATC
 CGCCAATCAGCCAAACAGCCAAACAAACAGCCAACTCAAACAAACTAACACCACCGGAAAAATCTATAATAGTT
 ACAAAAGGAAAGGGTGGGCAAATGGAAACATAGTGAACAACCTTCACAGGCTCCACATACAGCTGC
 TGTCAATACAATGCTCTAGAAAAGCAGTGCACCTGCTACTTACAATATGGGTCGGCATGTTCAATCT
 TGCCAGCAGATTACTATAAAAGAAACTAGCTAATGTCACATACTAGTGAAGAACAAATTCACACCAAGGGACCT
 TCAACTAGAGTCATGAAACTCAAGAATGCTGCAAGTGTGCTACAGCAATGGCCAGCAAATTACATGCTATGT
 GTCTTGGATGAAAGCAACTAGCATATGATGTAACCACACCTGTGAAATCAAGGCATGAGTCTAACATGCC
 TAAAATCAAAATATGTTGACTACAGTTAAAGATCTACTATGAAGACACTCAACCTACACATGATATTATGCT
 TTATGTGATTGAAAACATAGTAACATCAAAAAGTCATAATACCAACATACCTAACATGTCAGTGTGAGAAA
 TAAAGATCTGACACACTGAAAATATAACAAACACTGAACTCAAATGCTATCACAAATGCAAAATCATCC
 ACTCAGGATTACTATTAGTCACAGTGTGACTGAAACAAAGGAGCATCAAACATCAAAGCCACAAAGTCATT
 ATAGTAGATCTGGAGCTTACCTAGAAAAGAAAGTATATTATGTTACACAAATGGAGCACACAGCTACACG
 ATTGCAATCAAACCCATGGAGATTAAACCTTTCTACATCAGTGTGTTAATTCTACACAAACTTTCTACCTAC
 ATTCTTCACCTCACCATCACAAACACTCTGTGTTCAACCAATCAAACAAAATCTGAAAGTCCCAGAT
 CATCCCAAGTCATTGTTATCAGATCTAGTACTCAAATAAGTTAATAAAAATACACATGGGCAAAATCATT
 GGAGGAATCCAACATCACAAATCTGTTACACAGAACAGTCCACACACCATAACAGAACATGCAAAATGGAAAAT
 ACATCCAAACATGAAATTCTCAAGCAATTCTGGCTTACTTTACACTAATACACATGATCACAAACAAATAATCTC
 TTGCTAATCTCATTCATGATTGCAACTAAACAAACTTGTGAAATATAACGTTACATCATAACAAACACCT
 TTGAGTTACCAAGAGCTGAGTCACACATGCTTACATCAAACAGGCCAAACAGTAACCTGATTAAAA
 ATGAACAACCCCTACCTCTTACAACACCTCATTAACATCCCACCATGCAAACCAACTATCCATACTATAAGTAGTT
 AATTAAAAATAGTCATAACAAATGAACTAGGATATCAAGACTAACAAATAACATTGGGCAAAATGCAAACATGTC
 AACAAAGGACCAACGCACCGCTAAGACATTAGAAGGACCTGGGACACTCTCAATCATTATATTCTACATCGTG
 CTATATAAGTTAAATCTTAAATCTGAGCACAATCATTATCTGGCAATGATAATCTCAACTTC
 TAATTGCAAGCCATCATTCATAGCCTCGCAACACCAAAAGTCACACCAACAAACTGCAACATACAAGATGCAACA
 AGCCAGATCAAGAACACAAACCCCAACATACCTCACCGAGAACCTCTAGCTTGGAAATCACTCCCTTAATCC
 ATTACATCACAACATCACCACCATAGCTTCAACACACCCAGGAGTCAGTCAACCTGCAATCCACACAGTC

10

20

30

40

50

AGACCAAAACACAACAACACTCAAACACAACCCAGCAAGCCCACCACAAAACAACGCCAAACAAACCAAGC
 AAACCCAATAATGATTTCACTTGAAGTGTCAACTTGTACCTGAGCATAATGAGCAACAAATCCAACCTGCTG
 GGCTATCTGCAAAAGAATAACAAACAAAACCAGGAAGAAAACCACCTACCAAGCCCACAAAACCAACCTCA
 AGACAACCAAAAGATCCCACACCTAAATCAAGGAAGTACCCACCAAGGCCACAGAAGGCC
 ACCATCAACACCAACAAACATCAACTACACTCACCTCAACACCACAGGAATCAGAACTCACAAG
 TCAAATGGAAACCTTCACTCAACTTCCGAAGGCATCCAAGCCCTCTCAAGTCTACAAACATCGAGTAC
 CATCACAACCTCATCTCCACCCAACACACCAGCCAGTAGTTACTTAAACATATTACACAAAAGGCTTGACC
 AACTTAAACAGAATCAAATAACTCTGGGCAAATAACAATGGAGTCTAATCCTCAAAGCAATGCAATTACCA
 CAATCCTCACTGCGACTCACATTGTTCTGCTGAGAACATGGTTATACAGTGTATAACTATAGAATTAGT
 CAAGGAAAGTAAAGTGTAAAGTGAACAGTCAAGGTAATTGATAAAACAAGAATTAGATAAATATAAAAGCTG
 TAACAGAATTGCGAGTCTCATGCAAAGCACACAAGCAACAAACATCGAGCCAGAAGAGAACTACCAAGGTTATG
 AATTATACACTCAACAATGCCAAGAACATGAACTTAAGCAAGAAAAGGAAAGAAGATTCTGGTTTT
 GTAGGTGTGGATCTGCAATGCCAGTGGCTGCTATCTAAGGCTCTGCACCTAGAAGGGAGTGAACAAGA
 TCAAAAGTGTCTACTATCCACAAACAGCTGTAGTCAGCTTATCAATGGAGTTAGTGTTTAACAGCAAAGTG
 TTAGACACTCAAACATGCAACAGACTACTAGAGATTACAGGAAATTTAGTTAATGCGAGGCTAA
 AACTGTGATAGGTTCAACAAAGAACACAGACTACTAGAGATTACAGGAAATTTAGTTAATGCGAGGCTAA
 CTACACCTGTAAGCACTTACATGTAACATAGTGTCAATTATGCTTAACTATGCTTACATGCTTAA
 CAGAAAAAGTTAATGTCAAACATGTTCAATAGTTAGACAGCAAAGTACTCTATCATGCTTAA
 AGTCTTAGCATATGTACTACAATTACACTATATGGTTATAGATAACCCGTGTTAA
 TATGTACAACCAACACAAAAGAAGGGTCAACATCTGTTAACAGAACTGACAGAGGATGGTACTGTGACAATGCA
 GGATCAGTATCTTCTCCACAAGCTGAAACATGTAAGGTTCAATCAAATCGAGTATTTGTGACACAATGACAG
 TTAAACATTACAAGTGAAGTAAATCTGCAATGTTGACATTCAACCCCCAAATATGTTAAATTGACTT
 CAAACACAGATGTAAGCAGCTCCGTTACATCTAGAGGCAATTGCTCATGCTATGGCAAACAAACTAAATGACA
 GCATCCAATAAAATCTGGAATCATAAGACATTCTAACGGGTGCGATTATGTATCAAATAAAGGGTGGACAC
 TGTTCTGTAGGTAACACATTATATTGTAATAAGCAAGAAGGTTAAAGTCTCTATGTAAGGTTAA
 TAAATTCTATGACCCATTAGTATTCCCTCTGATGAAATTGATGCTCATATACTCAAGTCACGAGAAAGATAAC
 CAGAGCCTAGCATTTATCGTAAATCCGATGAAATTACATAATGTTAAATGCTGTTGGACTGCTTATGTAAGG
 GATAACTACTATAATTATGTTAAATGTTATGTTAAATTGCTTAACTATGCTGTTGGACTGCTTATGTAAGG
 CCAGAACACACAGTCAACTAACAGAACTGAGGTTAAATAATTGCTTAACTATGCTGTTGGACTGCTTATGTAAGG
 ATAGCACCTAATCATGTTCTACATGTTAACTATGCTCATGACAAACCCATCTGCTATTGATTCTTAA
 TCTGAACTTCATGCAAACCTCTCATCTAAACCATCTCACTTACACTATTAACTGAGATTCTCTAGTTAGTATA
 TAAACACAAATGCTGAGGTTAACTTACCATCTGTTAAATGTTAAAGGGCAATATGTCACGAAGGAATCC
 TTGCAAATTGAAATTGAGGTCTTAAATGGTAAAGGGTGTCTTAACTGCTTAA
 CCCATGCACTGTTGAGACAAAACCTATGTTAAACAGAAACTTAACTGCTTATGGATAAAAGTATAGATACTTA
 TCAGAAATAAGTGGAGCTGAGGTTGGACAGAAGAGGTTGCTCTGGTGTAGTGGAGTGCTAGAGGTT
 TATAGGATCAATAACAAATAACTAAACAACTGAGCTTAACTTACCCAGTGTGTTGGCATGAGCAAACCTCTCA
 ATGAGTATCAAAGCTGAGGAGCTAAATTACCCAGATAAGAGTGTACAATACTGTATATCATAT
 ATTGAAAGCAACAGGAAAAACAATAACAAACTATCCATCTGTTAAAGGTTAGCCAGCAGACGTATTGAGAAAAC
 CATCAAAACACATTGGATATCCATAAGGCATAACCATCAACAAACCCAAAAGAATCAACTGTTAGTGTATA
 ACCATGCCAAAATAATGATACTACCTGACAATAACCTCAATTCTACACTCACACATCGTACATTAAATT
 CAAACAAATTCAAGTTGGGACAAAATGGATCCCATTAAATGAAATTCTGCTAATGTTATCTAACCGATAGTT
 ATTAAAAAGGGTTATCTCTCTCAGATGTTAGGAAAGTACATTCAATGGCCTTATCTCAAAAT
 GATTATACCAACTTAATTAGACAAACATTCAATTAGAAACACATGAACTTAAAGAACACTAAATAACACAGTC
 CTTAATATCTAAGTATCATAAAGGTGAAATAATTAGAAACCTACTTACCTGCTTAACTTACGATAC
 AGAGTATGACCTCGTCAGAACAGATTGCTACCAACTTAAAGGAGATAATAAGAGGCTATAGAAATAAGT
 GATGTCAAAGTCTATGCTATATTGAAATAACTAGGGCTTAAAGGAAAGACAAGGTTAA
 TGAAGACAACCTAGTATTACGACCATAATCAAAGATGATACTTCTAGCTTAAAGATAATCAATCTCATCTT
 AAGCAGACAAAATCACTACAAACAAAAGACACATCAAACACACTTGAAGAAAATTGATGTTCAATG
 CACATCCTCCATCATGTTAAACATGTTAACTTACACAAAATTAACACATATTAAACACAGTATCGATC
 AAATGAGCTAAAACCATGGTTACATGTTAGATAATCAAACACTTCTAGTGGATTCTCAATTATTGAAACCAAT
 ATGGTTGATAGTTATCATAAGGAACCTAAAGAATTACTGTGACAACCTATAATCAATTCTGACATGGAAAGAT
 ATTAGCCTAGTAGATTAAATGTTGTTAAATTACATGGATTAGTAACGTTGACACATTAATAAAAGCTTAGG
 CTTAAGATGCGATTCAATAATGTTATCTGACACAACTTACCTTATGGAGATTGTTACTAAAGCTATTICACA
 ATGAGGGTTCTACATAATAAAAGGGTAGAGGGATTATTGTTACTCTAATTAAATAACAGAAGAGATCAA
 TTGAGAAAACGATTATTAATAGTGTCTAACACATCACAGATGCTGAAATAAGCTCAGAAAATCTGCTATC
 AAGAGTATGTCATACATTATGATAAGACAGTGTGAGGATAATAATAATGGCAGATGGATAATTCTTAA
 AGTTCTTAAATTAAAGCTTGCAGGTGACAATAACCTTAACAATCTGAGTGAACCTATTGTTGTTGAGA
 TTGGACACCAATGGTAGATGAAAGACAAGCCATGGATGCTTAAATTGCAATGAGACCAATTACT
 GTAAAGCAGTCTGAGTATGTTAAGGGTGTCTTATGTTAGGTTAACTTACCTAAACAAACACTTATCTT
 GGCCTACTTAAAGAAATGCTATTGTTACCCCTTAAGATGGTTAACTTACCTAAACAAACACTTATCTT
 TTGAACTTACAGAAAGAGATTGATTGTTACGGACTACGTTCTATCGTGAAGTTCGGTTGCCTAAAAAGT
 GGATCTGAAATGATTAAATGATAAAACCTATATCACCTCTAAATTGATGAGTGGACTAGTTCCCTAGAAATT
 ACATGCCATCACACATAACAAACTATAGAACATGAAAATTAAATTCCGAGAGTGATAATCAAGAAGAGTA

10

20

30

40

50

TTAGAGTATTATTAAGAGATAACAAATTCAATGAATGTGATTATACAACGTGAGTTAATCAAAGGTATCTCAA
CAACCTAATCATGTGGTATCATTGACAGGAAAGAAAGAGAAACTCAGTGTAGGAGAATGTTGCAATGCAACCGG
GAATGTTGACAGGTTCAAATATTGGCAGAGAAATGATGCTGAAACATTTCATAATCTTCTGAAAGTCTT
ACAAGATATGGTATCTAGAACTACAAAAAAATATTAGAAGTAAAGCAGGAAATAAGTAAACAAATCTGCTACAA
TGATAATTACAACAAATTACATTAGTAAAGTGTCTATCATCACAGATCTCAGAACTTACAATCAGATTGATATG
AAACGTCATGTATTGTAGTGTGTGGTAGACTGCACTGGTGTACAATCTATTTCTGGTTACATTAACT
ATTCTCATGTACAAATATATGCACATATAGGCATGACCCCCCTATATAGGAGATCATATTGTAGATCTTAACAA
TGTAGATGAACAAAGTGGATTATATAGATATCACATGGGTGGCATGAAAGGGTGTCAAAACTATGGACCATAG
AAGCTATACACTATTGGATCTAATATCTCAAAAGGGAAATTCTCAATTACTGCTTAAATTATGGTACAATCAA
TCAATAGATATAAGCACAACCAATCAGACTCATGGAAAGGTCAAACTCATGCTCAACAGATATTGCTAGCATTAA
TAGCCTTAATTACTGTATAAGAGTATGCAGGTCATAGGCCAAATTAAAGGAACTGAGACTTATATACAGAG
ATATGCAATTATGAGTAAACATCAACATAACGGTGTATATTACCCAGCTAGTATAAAAGGAAAGTCTAAGAGTG
GGACCGTGGATAAACACTACTGTGATGTTCAAGTGTAGTGTAGAATCTAGGTAGTTGACACAGAATTAGA
ATATAGAGGTGAAAGTCTATTAGCAGTTAAATTAGAAATGTTAGGTTATAATAGCAGATTGCTCATAACAA
AAAATCATGCATTATGTAACAATAAACTATATTGGACATATTAAAGGTTCTGAAACACTTAAACCTTTTAAT
CTTGATAATTGATACAGCATTAAACATTGATATGAATTACCCATGTTATTGGTGGTGTATCCAACTTGT
ATATGCAAGTTCTATAGAAGAACTCTGACTCTCACAGAGGCTATAGTCACTCTGTGTTCAACTTGT
ATACAAACCATGACTTAAAGGAAATACTCAAGATCTGTCAGTGTAGATGTAAGTAAAGTCTTAACTGCA
ACGTTGCAAAACCTTAATGCTGAATTGCAATTGATCAGGTTGAGAGATCCTCAACCTTGGGTCTGAGAGACAAGC
TAAAATTAATAGCAGAAATCAATAGACTGGCAGTTACAGAGGTTTGTAGTACAGCTCAAACAAATTCTC
GTGCAACACATTACTACAGAGATAGCTAAATGATAATTAGCAGAAATATAGAACCTACATCTCATGG
CTAAGAGTGTATTGAAAGTTACCTTTATAAAGCAGAGAAAATAGTAAATCTTATATCAGGTACAAAATCT
AACTAACATACTGGAAAAAAACTCTGCCATAGACTTAACAGATATTGATAGGCACTGAGATGAGGAAAAACA
TAACTTGCTTATAAGGATACTTCCATTGGATTGTAACAGAGATAAAAGAGAGATTGAGTATGAAAACCTAAGT
ATTACTGAATTAAAGCATAATGTTAGGGAAAGATCTGGTCTTATCCTAATATAGTGTGTTACATCACCAGT
CATGTTACATGGACATCAAATATACAGACTATCTAGTGTGCTATTAATAGGAAATATAATGTTAAACA
GTTTAACACGTGGTGGAGAGGACCACTAAACCATGGTTGTTCATCTACACAAGGAAAAAAACATGCCAGT
TATAATAGACAAGTCTAACCAAAACAGAGAGATCAAATAGATCTATTAGCAAATTGATTGGTGTATGCATC
TATAGATAACAAGGATGAAATTGAGAAACTCAGCATAGGAACCCCTGGTTAACATATGAAAAGGCCAAGAAA
TATTTCCACAATATTAAAGTGTCAATTATTGATCGCCTTACAGTCAGTAGTACAGGATGTGAATTCCCTGCATCA
ATACAGCCTTATAGAACACAAATTATCCTTGTGACACTAGGCCATTAACTCGCATATTAAACAGAAAAGTATGGT
TGAAGATATTGACATGACTTCCAAAATCTATAAGCTTGGCCTTAGTTAATGTCAGTAGTGTAGAACATTACT
ATGTTGCTTAAACAGATTATTCTCATCTAACAGCTTAAAGGATCATTGATGAAACCTCCCATTCACAGGT
GATGTTGATATTCAACAGTAAACAGTGTACAAAAACAGCATGTTTACAGACAAAATAATTGTTGACTCA
ATAATGGAATTATTCTTAAGTAAATAAAACACTCAAATCTGATCTCATGTTAATTCTAAATTATGGCACATA
AAATATCTGACTATTTCATAATACTTAAAGTACTAATTAGCTGGACATTGGATTCTGATTATACAACCT
ATGAAAGATTCTAAAGGTTTTGAAAAGATTGGGAGAGGGATATAACTGATCATATGTTTAAATTGAA
AGTTTCTCAATGCTTATAAGGCTTCTTGTGTTTCAAGGTTATGCAAGGAAAGCTGGAGTGTGATA
TGAACACTTCAGATCTCTATGTTAGGAAATTAGACAGTGTATTGGAAAGTCTATGTCAGGATTTTA
GAACAAAAGTTCTAAACATACATTCTTAGCAGAAGTGCAGTTACATAGGAAAGGATGTCAGTCTCAAATT
ATGGTTCTTAAACGCTTAAAGTGTAGCAGAATTCAACAGTTGGCCTTGGTTGTTAACATGATTATCATGCCAC
ATATGAAAGCAATTAAACTTATAGATCTGTAGAATGGATTGATAAAATAGATAGAATACACATTAAA
AAACACAAATTCAATGTAATTATACCTCTAATCTCTACATTAATTAAACTCTCAGATAATACTCATCT
ATTAACAAACATATAAGGATTGCTAATTGTAATTAGAAAATATTACAAACAAATTATCATCCTACACCAGAAA
CCCTAGAGAATATACTACCCAATCCGATTTAAAGTAATGACAAAAGACACTGAATGACTATTGTTAGCT
CAAACAGATTGTTATAATTCTCTATGGTTGTTGATGAAATTAGATCATTCAGGCAATACAGCCAAAT
CCAACCAACTTACACTACTTCCACCAAAATCTCTAGTCACATAGCAGCATCATTACTGCTGCTTCT
TGGCATCATTAATAGATTCAATTGTTAGTTCTACAGGTTGTAAGGTTAGTATAGGTTATTTAAAAGA
CTTAAATTAAAGATCCAATTGTATAGCATTAGGTGAAGGAGCAGGAAATTATTGCGTACAGTAGTGG
AACTTCATCTGACATAAGATATTACAGAAGTCTGAAAGATTGCAATGATCATGTTACCTATTGAGTT
AGGCTGTAACATGGACATCAACATTGATTGTAAGGTTATTGACCATCTCTCTACAGATGCAACCAACACAT
TCATTGGTCTATTACATATAAAGTTGCTGAACTTACAGTCCTTGTGATGCGGAATTGTCGTAAACAG
TCACATGGAGTAAATTATAGATGGCAAGGATGTAAGGAAAGTGTCAAGTACTGTTCTCAGTTAAATG
ATGTTAATGTTAAATTATCATGCTCAAGATGTTAATGTTCAATTAGACAAATATAACTTAAATTAAATG
ATGCTTACGGAGTAAAGGTTACTTAGTCTTACATAGGCTCTGCAATATCTCAGT
TTAATGTTAGTACAAATGCTTAAATTGATACATCAAGAACAAAATTCTCATGCTTAAGGAAAGTGTATAAGAG
TCTTATTGATGCAATATTAAAGGTTGATACCTTCTTGTACCCCTATAACAAAAAAAGGAAATTATCTGATT
GTCAAAACCTAAAGGTTGTTAGTGTGAGTATACTATCATCTTACAGTCAGTGGACGTAATGAAAGTTCTCAG
AACTTATAACATCAAGCATGTAACATTGTTCAATGTTAAATTCTCAGTCAACAGAACACTAAAC
TATAACCAATTATATAGTGTAGAATCTACATCTTACAGTGTAGAATTGTTAACAGCTGACACAACTGAACT
TAAAAGTGTAAATTACAGGTAGTCTGTTACAACCTTCATAATGAAATAATGAAATTAAAGTCTTAAATTAA
AATTCCCATAGCTATACACTAACACTGTATTCAATTAGTTAAATTAAAGTCTTAAATTAAATGAAATTAAATTAA

CTTTAGTGAACATACTCTAAAGTTATCATTAACTTAACTCTGGAGGAATAAATTTAACCTAATCTAATTGGTTATA
TGTGTATTAACAAATTACGAGATATTAGTTTGACACTTTCTCGT

【 0 1 2 2 】

D46 / M2-2-HindIIIのアンチゲノムcDNA配列(SEQ ID NO:4)

ACGGGAAAAATGCGTACAACAAACTGCATAAACCAAAAAATGGGCAAATAAGAATTGATAAGTACCACTAA
 ATTTAACTCCCTGGTTAGAGATGGGAGCAATTGAGTATGATAAAAGTTAGATTACAAATTGTTGACAA
 TGATGAAGTAGCATTGTTAAAATAACATGCTATACTGATAAAATTATACATTAACATGCTTGCTAAGGAG
 TGATACATACAATCAAATTGAAATGGCATTGTTGCTAGTATTACAAGTAGTGTATTGCCCATAATAAT
 ATTGAGTAAATCCAAATTGCAACAAATGCCAGTACTACAAAATGGAGGTATATATGGGAAATGATGGAATTAA
 ACATTGCTCTAACCTAATGGTCTACTAGACATTGTAATTCTGAAATTAAATTCTCCAAAAACTAAGTGATTCAACAA
 TGACCAATTATATGAATCAATTATCTGAAATTCTGATTCATTCATAATTAAATTATCAACTAG
 CAAATCAATGTCACTAACACCATTAGTTAATATAAAACTAACAGAACAAAATGGGCAAATAATCAATTGAG
 CCAACCCAAACCATGGACACAACCCACAATGATAAACACACCACAAAGACTGATGATCACAGACATGAGACCGTTGCA
 CTTGAGACCATATAACATCACTAACAGAGACATCATAACACACAAATTATACACTTGATAAAATCATGAATGCA
 AGTGAGAAAACCTGATGAAAGACAGGCCACATTACATTCTGGTCAACTATGAAATGAAACTATTACACAAAGTAG
 GAAGCACTAAATATAAAATATACTGAAATAACACAAAATATGGCACTTCCCTATGCCAATATTCTCATCAATCAT
 GATGGGTCTAGAATGCAATTGGCATTAGCCTACAAAGCATACTCCCATATAACAGTATGATCTCAATCCATA
 AATTTCACACAAATATTCACACAATCTAAACAAACTCTATGATAACTATACACTCCATAGTCCAGATGGAGCTG
 AAAATTATAGTAATTAAAACCTAAGGAGAGATAAGATAGAAGATGGGCAAATAACACCATGGCTTAGCAA
 GTCAAGTTGAATGATACACTAACAAAGATCAACTCTGTCATCCAGCAAATACACCATCCAACGGAGCACAGGAGA
 TAGTATTGATACTCTAATTATGATGTCAGAAACACATCAAAAGTTATGTCAGTGTATTAAATCACAGAAGATG
 CTAATCATAAACTACTGGTTAATAGGTATGTTATGCGATGCTAGGTTAGGAAGAGAACACATAAAATA
 CTAGAGATGCGGGATACTGTAACAAAGGAGTAGATGTAACACACATGTCAGACAGATTAATGAAAAGA
 AATGAAATTGAAAGTTAACATTGGCAAGCTTAACACTGAAATTCACATTGAGATAGAATCTAGAAAAT
 CCTACAAAAAAATGCTAAAGAAATGGGAGGGTAGCTCAGAATACAGGATGACTCTCTGATTGAGGATGATA
 ATATTATGATAGCAGCATTAGTAATAACTAAATTAGCAGCAGGGGACAGATCTGGTCTACAGCGTGATTAGGAG
 AGCTAATAATGCTAAAAATGAAATGAAACGTTACAAAGGTTACTACCCAAAGGACATAGCCAACAGCTTCTATG
 AAGTGGTAAAAACATCCCCACTTTAGATGTTTGGTCTTTGGTATAGCACAATCTTCTACAGAGGTGGC
 AGTAGAGTTGAAGGGATTGGCAGGATTGTTATGAAATGCTATGGCAGGGCAAGTGTGTTACGGTGGGAGT
 CTAGCAAATCGGTTAAAATATTGTTAGGACATGCTAGTGTGCAAGCAGAAATGAAAGTGTGAGGTT
 ATGAATATGCCAAAATTGGTGGTGAAGCAGGATCTACCATATATTGACAACACCAAGCATTATTATCT
 TTGACTCAATTCTCACTCTCAGTGTAGTATTAGCAGTGTGGCTAGGCATAATGGAGAGTACAGAGG
 TACACCGAGGAATCAAGACTATGTCAGCAGCAAAGGATAIGCTGAACAACACTCAAAGAAAATGGTGTGATTAACT
 ACAGTGTACTAGACTGACAGCAGAAACTAGAGGCTATCAAACATCAGCTTAATCCAAAAGATAATGATGTTAGAG
 CTTGAGTTAATAAAATGGGCAAAATAATCATCATGGAAAAGTTGCTCTGAAATTCCATGGAGAAGATGCAA
 CAACAGGGCTACTAAATTCTAGAATCAATAAGGCAAATTACATCACCACAGGAAATGCTCAAGGAAAGATAGTA
 TCATATCTGCAACTCAATAGATATAAGATAACCAAGGAAAGCCCTATAACATCAAATCAACTATTATCAACCCA
 ACAAATGAGACAGATGATACTGCAAGGGAAAGCCATTATCAAAGAAAACCTCTAGTAAGTTCAAGAAGACCC
 TACACCAAGTGATAATCCCTTCTAAACTATACAAAGAACATAGAAACATTGATAACAATGAGATTAGATAGGATGAAA
 GCTATTCTACAGAAGAAATAATGATCAGACAAACGATAATATAACAGCAAGATTAGATAGGATGATAAGAAA
 AGTGAATACTAGGAATGCTCACACATTAGTAGTGGCAAGTGCAGGACCTACATCTGCTGGGATGGTATAAGAGA
 TGCCATGGTGGTTAAGAGAAAGAAATGATAGAAAAATCAGAACTGAAGCATTAGACCAATGACAGATTAGAG
 CTATGGCAAGACTCAGGAATGAGGAAGTGGCAAAGACACATCAGATGAGTGTCTCAATCCAACA
 TCAGAGAAATTGAAACACCTATTGGAGGGATGATAGTGCACATGATCTACACTGAGATTCTGATTAGTTAC
 CAATCTTCACATCAACACAAATACCAACAGACAAACTAACCAACCCAACTATCCAACCAACATCCATC
 CGCAAATCAGGCAAACAGGCAAACAAACAGGCAAATCCAAAACAACTAACCCACCGGAAAAAAATCTATAATGTT
 ACAAAGGAAAGGGTGGGCAAATGGAAACACATGTAACAGCTACGAAAGCTTACGAGGGCTCCACATACAGCTGC
 TGTCAATACAATGTTAGAAAAGACATGACCTGATCATCTACATAATGGGTCGGCATGTTCCAATCATCTA
 TGCCAGCAGATTACTTATAAAAGAACTAGCTAATGTCACATACTAGTGAACAAATATCCACACCAAGGGACCT
 TCACTAAGAGTCATGATAAAACTCAAGAAGTGCAGTGTCTAGCACAATGCCAGCAAATTACCATATGCGCTAATGT
 GTCTGGATGAAAGAAGCAAACATGGCATATGATGTAACCCACCCCTGTGAAATCAAGGCATGTTAGCTAACATGCC
 TAAAATCAAAAAATGTTGACTACAGTTAAAGATCTCACTATGAAAGACACTCAACCCATACATGATATTATGCT
 TTATGTAATTGAAACATAGTAACATCAAAAGTCATAATACCAACATACCTAAGATCCATCAGTGTGAGAAA
 TAAAGATCTGAACACACTGAAAATAACAACCACTGAATTCAAAATGCTATCACAATGCAAATCATCCCT
 ACTCAGGATTACTATTAGTCATCACAGTACTGACAAACAAAGGAGCATTCAAAATACATAAAGCCACAAAGTCATT
 ATAGTAGATCTGGAGCTACCTAGAAAAGAAAGTATATATTATGTTACCCACAAATTGGAAGCACACAGCTACACG
 ATTGCAATCAAACCCATGGAGGATTAACACATTCTCTACATCAGTGTGTTAATTACATACAAACTTTCTACCTAC
 ATTCTTCACTCACCATCACAAACACTCTGTTGCTCAACCAATCAAACAAACTTATGAGTCCCAGAT
 CATCCCAAGTCATTGTTATCAGATCTAGTACTCAAAATAAGTTAAATAAAATATACACATGGGCAAATAATCATT
 GGAGGAAATCACAATCACAATATGTTACAGACAGCTACACCCATACAGAATCAACCAATGGAAAAT
 ACATCCATAACAATAGAATTCTCAAGCAAATTCTGCTTACTTTACACTATACACATGATCACAACAAATAATCTC
 TTGCTAATCATATACTCATGATTGCAATACTAAACAAACTTGTGAAATATAACGTATTCCATAACAAAACCT
 TTGAGTTACCAAGAGCTGAGTCACACATAGCATTCAATCCAACAGCCAAAACAGTAACCTTGCAATTAAAA

10

20

30

40

50

ATGAACAACCCCTACCTTTACAACACCTCATTAACATCCCACCATGCAAACCACTATCCATACTATAAAGTAGTT
 AATTAAAAATAGTCATAACAATGAACACTAGGATATCAAGACTAACAAATACATGGGCAAATGCAAACATGTCAAA
 AACAAAGGCCAACGCACCGCTAAGACATTAGAAAGGACCTGGGACTCTCAATCATTATTATTCATATCATCGTG
 CTATATAAGTTAAATCTTAAATCTGTAGCACAATCATTCTGCATGATAATCTCAACTTCACCTTA
 TAATTGAGCCATCATATTCTAGCCTCGCAAACCAACAAAGTCACACCAACACTGAATCATACAAGATGCAACA
 AGCCAGATCAAGAACACAACCCACATACCTCACCCAGAATCTCAGCTTGAATCAGTCCCTAATCGCTGA
 AATTACATCACAATCACCCACATAGCTCAACACACCAGGAGTCAGTCACCCCTGCAATCCACAAACAGTCA
 AGACCAAAACACAACAACACTCAAACACAAACCCAGAAGGCCACCAAAACAAGCCTAAACCAACCCAGC
 AAACCCATAATGTTTCACTTGAAGTGTCACTTGTACCCCTGCAGCATGCAACAAATCCAAACCTGCTG
 GGCTATGCAAAGAACATAACCAACAAACAGGAAAGAACACTACCAAGGCCACCAAAACCAACCCCTCA
 AGACAACCAAAAGATCCCAAACACTAAATCAAAGGAATACCCACCAAGCCACAGAACAGGCCA
 ACCATCAACACACCAAAACAAACATCATACTACACTCACCTCAACACCCAGGAATCAGAACTCACAAG
 TCAAATGGAAACCTTCACTCAACTTCCCGAAGGCAATCCAAGCCCTCTCAAGTCTCACAACATCGAGTACC
 CATCACAACCTCATCTCCACCCACACACCAGCCAGTAGTTACTTAAACATATTACAAACAGGCCCTGACC
 AACTTAAACAGAATCAAATAACTCTGGGCAAATAACATGGAGTTCTAATCCTCAAAGCAATGCAATTACCA
 CAATCCTCACTGCACTCATTTGTTCTGCTCAAACATCACTGAAGAAATTATCAATCAACATGCACT
 GCAGTTGCAAAGGCTATCTAGTGTCTGAGAAGTGGTTATACAGTGTATAACTATAGAATTAAAGTAAATAT
 CAAGAAAATAAGTGTAAATGAAACAGATCTAAAGGTAATTGATAAAACAAGAATTAGATAATATAAAATGCTG
 TAACAGAATTGAGCTCATGCAAAGCACACAAGCAACAAACATCGAGCCAGAACAGAACTACCAAGGTTATG
 AATTATACACTCAACAATGCCAAAAACCAATGTAACATTAAGCAAGAAAAGGAAAGAGATTCTGGTTTTT
 GTAGGTGTGATCTGCAATGCCAGTGGCTGCTATCTAAGGTCTGCACCTAGAAGGGAGTGAAACAAGA
 TCAAAAGTGCTACTATCCACAAACAGGCTGTAGTCAGCTTATCAATGGAGTTAGTGTCTTAAACCAGCAAAGTG
 TTAGACCTCAAACAAACTATAGATAAAACATTGTTACCTATTGTGAACAAGCAGCTGAGCATATCAAATATAGA
 AACTGTGATAGAGTTCAACAAAGAACACAGACTACTAGAGATTACAGGAAATTAGTGTAAATGCAAGGCTAA
 CTACACCTGTAAGCACTACATGTAACTATAGTAAATTGTCATTAATCAATGATATGCCATAACAAATGAT
 CAGAAAAAGTTAATGTCACAAATGTTAGACAGCAAAGTTACTCTATCATGTCATAATAAAAGAGGA
 AGTCTTAGCATATGTAAGTACAATTACCACTATATGGTTATAGATAACCCCTGTTGAAACTACACACATCCCTC
 TATGTAACACAAACACAAAGAAGGGTCAACATCTGTTAACAGAACTGACAGAGGATGGTACTGTGACAATGCA
 GGATCAGTATCTTCTCCACAAGCTGAAACATGTAAGTCTCAATCAATCGAGTATTGTCACAAATGACAG
 TTAACTACACAACTGCAATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT
 CAAAAACAGATGTAAGCAGCTCCGTTATCACATCTAGGAGCATTGTCATGCTATGCCAAACTAAATGTACA
 GCATCCAATAAAATGTTGAACTATAAGACATTCTAAGGGTGCATTATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT
 TGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT
 TAAATTCTATGACCCATTAGTATTCCCTCTGATGAAATTGATGTCATCAATATCTCAAGTCACCGAGAAAGATAAC
 CAGGCTAGCATTTCTGAAATCCGATGAAATTACATAATGTAATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT
 GATAACTACTATAATATGTTAGTATGTTATCTGTTATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT
 CCAGAACACCCAGTCACACTAAAGCAAGATCAACTGAGTGGTATAATAATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT
 TCTGAACTTCTGAAACTCTCATCTATAACCATCTCACTTACACTATTAAAGTAGATTCTAGTTAGTATA
 TAAAACACAATGTCATGCCAGATTAACCTACCATCTGTTAAAGGAAATGTCACGAGGAATCC
 TTGCAATTGAAATTCGAGGTCTTAAATGGTAAGAGGTGTCATTAGTCTGTCATAATTGTCATGTCATGTCAT
 CCCATGCACTGCTTGAAGACAAACCTTATGTTAAACAGAAACTTAAAGTAGTCTGTCATGTCATGTCATGTCAT
 TCAGAAATAAGTGGAGCTGCAAGAGTGGACAGAACAGAGATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT
 TATAGGATCAATAACATAACTAACATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT
 ATGATATCAAAAGCTGAGGAGCAATGAGAGCTAAATTCAACCAAGATAAGAGTGTACAATACTGTCATATCATAT
 ATTGAAAGCAACAGGAAAACAATAACAAACATATCCATCTGTTAAAGGATGTCAGCAGCAGACGTTAGAAGAAAAC
 CATCAAAACACATTGGATATCCATAAGAGCATAACCATCAACACCCAAAGAATCAACTGTTAGTGTATA
 ACCATGCCAAATAATGATACTACCTGCAACATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT
 CAAACAATTCAAGTTGAGGACAAAATGGATCCCATTTAATGGAAATTCTGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT
 ATTAAAAGGGTTATCTCTCTGAGGTGTAATGCTTAAAGGAGTTACATTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT
 GATTATACCAACTTAATTAGTAGACAAACATCTGTTAAAGGAGTTACATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT
 CTTAATATCTAAGTATCATAAAGGTGAAATAAAATTAGAAGAACCTACTTATTTCTGTCATGTCATGTCAT
 AGAGTATGACCTCGTCAGAACAGATTGCTACCACTAATTACTTAAAGAGATAATAAGAAGAGCTATGAAATAAGT
 GATGTCAGGCTATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT
 TGAAGAGCAACTCAGTTATGACCCATAATCAAGAGTATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT
 AAGCAGACAAACACTACAAACAAACAAAGAACACAATCAAACACACTTGTGAAGAAATTGATGTTCAATG
 CAACATCCTCCATCATGTTAAACATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT
 AAATGAGGTTAAACATGGTTACATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT
 ATGGTTGATAGTTATCATAAGGAACATCAAAAGAATTACTGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT
 ATTAGCCTAGTAGGATTAATGTTGTTAATTACATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT
 CTTAAGATGCGATTCAATAATGTTATCTGACACAAACTTCCCTATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT
 ATGAGGGTTTACATAATAAAAGGGATTATTATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT
 TTCAAGAAAAGGATTATAATAGTATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT
 AAGAGTATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCATGTCAT
 10

20

30

30

40

50

AGTTCCCTAAATTAATTAAGCTTGCAGGTGACAATAACCTAACAACTGAGTGAACATATTTTGTTAGAATA
 TTGGACACCCAATGGTAGATGAAAGACAAGCCATGGATGCTGTTAAATTGCAATGAGACCAATTACTT
 GTTAAGCAGTCGAGTATGTTAAGAGGTGCTTATATAGAATTAAAGGGTTGTAATTAAACAGAT
 GGCCTACTTTAAGAAATGCTATTGTTACCCCTTAAGATGGTTACTACTAAACACTTATCCTCTTG
 TTGGAACCTACAGAAAGAGATTGATGTTATCAGGACTACGTTTATCGTGAGTTCGGTGCTAAAAAGT
 GGATCTTGAATGATTATAATGATAAGCTATACACCTCTAAACATTGATATGGACTAGTTCCCTAGAAATT
 ACATGCCATCACACATACAAACTATAGAACATGAAAAATTAAACCTCCGAGAGTGATAAATCAAGAAGAGTA
 TTAGAGTATTATTAAGAGATAACAAATCAATGAATGTTACACTGTGAGTTAATCAAAGTTATCTCAA
 CAACCCATACATGCTCATGGACAGGCAAAGAAGAGAACTCAGTGAGTAGATGTTGCAATGCAACCGG
 GAATGTTGAGACAGGTCACAAATTGGCAGAGAAATGAGCTGAAACACATTCAACATTCTCCTGAAAGTCTT
 ACAAGATATGGTATGAGACTACAAAAAATTAGAAGCTGAAAGCAGGAATAAGTAAACAAATCAAATGCCACAA
 TGATAATTACACAAATTACATTAGTAATGCTCATCATCACAGATCTAGCAAATTCAACGATTCGATATG
 AAACGTCATGTTAGTGTGCTGGATGAACTGCTGGTACAATCTTATTTCTGTTACATTAACT
 ATTCCTCATGTCACAATAATGCACATAGGCATGACCCCCCTATAGGAGATCATATTGAGATCTTAAACAA
 TGAGATGAACAAAGTGGATTATAGAATGATCACATGGTGGCATGGAGGGTGGTCAAAAACATGACCATAG
 AAAGCTATATCTGCTAATACTCTCAAAGGAAATTCTCAATTACTGCTTTAATTAGGTGACAATCAA
 TCAATAGATAAAAGCAACCAACTGAGCTGGAGGAAACTCATGCTCAAGCAGATTATGCTAGCATAAA
 TAGCCTTAAATTACTGTATAAAGAGTATCAGGCACAAATTAAAGGAACGACTGAGACTTATATCAGG
 ATATGCAATTATGAGTAAACAACTAACATAACGGTGTATATTACCCAGCTAGTATAAAGAAAGTCTAAGAGTG
 GGACCGTGGATAAACACTATCTGATGATTCAAAGTGGATCTAGAAATCTATAGTGTAGTTGACACAAGAATTAGA
 ATATAGAGGTGAAAGTCTATTGCAATTATTTAGAATGTTAGGTTATATAATCAGATTGCTCTACAAATTAA
 AAAATCATGCTTATGTAACAAACTATATTGGACATATTAAAGGTTCTGAAACACTTAAACCTTTTAAT
 CTGATAATTATGATAACAGCATTAACATTGTTAGATTGACCTTACAGGGCTAGTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 ATATGCAAGTTCTATAGAAGAACTCTGACTTCTCACAGAGGCTAGTTCTGTGTTCAACTTAGTATT
 ATACAAACCATGACTTAAAGATAACCTCAAGATCTGAGATGATACTTAACTTCAACATGCAATC
 ACGTTTGACAAAACCTTAATGCTGAATTGATGAGAGATCCTCAAGCTTAGGGTCTGAGAGACAAGC
 TAAAATTACTAGCGAAATCAATAGACTGGCAGTTACAGAGGTTTGAGTACAGCTCAAACAAATTCTC
 GTGCAACACATTACTACAGAGATAGCTAAATGATATTGCAAAATAGAACCTACATATCCTCATGG
 CTAAGAGTTGTTAGAAAGTTACCCCTTAAACAGAGAAATAGTAAATCTTATATCAGGTACAAAATCT
 AACTAACATCTGAAACACTCTGCCATAGACTAACAGATATTGAGAGCCACTGAGATGAGGAAAACA
 TAACCTTGCTTAAAGGATACTTCCATTGGATTGAAACAGATAAAAGAGGATATTGAGTATGAAAACCTAAGT
 ATTACTGAATTAAAGCAAATATGTTAGGAAAGATCTGGTCTTATCCAATATAGTTGGTGTACATC
 CATGTTACATGGACATCAAATATACTACAAGCACTATCTAGGGCATAATTAGAGAAATATAATGTTAAC
 GTTTAACACGGTGGAGAGAGGACCCACTAACCATGGTGGTCACTACACAAGAGAAAAAACATGCCAGT
 TATAATGAGACAAGTCTAACACAAAACAGAGAGTAAAGATCTTAACTGCAAATTGGATTGGTCTATGCATC
 TATAGATAACAGGATGAATCTGGAAAGACTCAGCATAGGAACCTTGGGTTACATATGAAAAGGCCAAGAAAAT
 TATTCCACAAATTAAAGTGTCAATTATGCTCATGCCCTACAGTCAGTAGAGGACATGTGAATTCCCTG
 CATCAATACACAAATTATCATTGACACTAGCCCTTAAATCGCATATTAAACAGAAAATGTTGA
 TGAAGATATTGACATAGTATTCCAAAATGTTAAAGCTTGGCTTAGTTAATGTCAGTAGTAAACAAATTACTA
 ATGTTATGCTAACAGAATTCTCATACCTAACGTTAAGGATACATTGATGAAACCTCCATATTCA
 CAGGTGTTGATATTCAACAGTAAACAGTACACAAACAGCATATTGTTTACAGAGACAAAATGTTGACTCA
 ATATGTTGAAATTCTTAAAGTAAACAAACTCAAATCTGGATCTCATGTTAATTCTAAATTGTCACATA
 AAATATGACTATTCTCATACATTGTTAAAGTACTTAAAGTAAATTGTCAGTGGACATGGATTCTG
 ATTACAGATTCTAAAGGTTGGGAGAGGATATAACTGATCATATGTTATTGAA
 AGTTTCTTCAATGCTTAAAGACCTATCTTGTTGTTCAAAAGGTTGGCAAAGGAAAGCTGGAGTGTG
 TGAACACTTCAGATCTCTATGTGTTGGAAATTAGACAGTAGTTATTGGAAGTCTATGTCAGGTT
 GAACAGTTGACATCTTCAATGAGCTTGGCTTAGTTAATGTCAGTAGTAAACAAATTCT
 ATGGTTCTTAAACGCTTAAATGAGCTTGGGATTGATAAAATAGAGATAACACATTAA
 AAACACAAATTCAATGTAATTCTCATCTTCAATTCTCATACATTGTTGACTCA
 ATTAACAAACATATAAGGATTGCTAATTCTGAATTAGAAAATTAACAAATTATCATC
 CCTAGAGAAATATACTAGCCATCCGATTAAAGTAATGACAAAAGACACTGA
 ATGACTATTGTTAGGTTGAGGTTATAACTGTTGAGGTTGAGGTTGAGGTT
 GTGACTCAATAATGTTACATTGTTACATAAGAAGCTTAAATCGTCTGCAATGATTAGAACC
 ATACAGAAGATTGTTAAATGAGCTTGGGATTGATAAAATAGAGATAACACATTAA
 AAACACAAATTCAATGTAATTCTCATCTTCAATTCTCATACATTGTTGACTCA
 ATTAACAAACATATAAGGATTGCTAATTCTGAATTAGAAAATTAACAAATTATCATC
 CCTAGAGAAATATACTAGCCATCCGATTAAAGTAATGACAAAAGACACTGA
 ATGACTATTGTTAGGTTGAGGTTATAACTGTTGAGGTTGAGGTTGAGGTT
 AGGCTGACAATGGACATATCAACATTGTTGAGGTTGAGGTTGAGGTTGAGGTT
 TCATTGGCTTATTACATATAAGGTTGCTGAAACCTATCAGTCTTTGCTG
 TGTGATGCCGAAATTGCTGTAACAG
 TCAACTGGAGTAAATATAATGAGCAAGGAGTGAAGAAAGTCAAGTCTGTT
 ATGTTAATGTTAAAGGATGAGTATTGTTCAATTAGAGATAACATAATTAA
 AGCTTACAGGAGTAAAGGAGTGGAGGTTACTTAGCTTCAACATAGGCT
 TCGGAATTATCCCAGTAT
 TTAATGTAACAAATTGATACTATCAAGAACAAAAATTCTCATG
 CCTAAGAACGCTGATAAAAG

TCTATTGATGCAAATATAAAAGTTGATACCCCTTCTTGTACCCATAACAAAAAAAGGAAATTAAACTGCATT
 GTCAAAACTAAAGAGTGTGTTAGTGGAGATATACTATCATATTCTATAGCTGGACGTAATGAGTTTCAGCAATA
 AACCTATAAACTACAAGCATATGAAACATCTTAAAGGTTCAATTCTCATGTTAAATTCTCAGATCAACAGAAACTAAC
 TATAACCATTTATATATGTTAGAATCTACATACCTTACCTAACGTTAAGTGAATTGTTAAACAGCTTGCACAACTGA
 TAAAAAAACTGATTAAACACAGGTTGAGTCTGTTACAACTTCTCATATAATGAAATAAAGATCTTATAATAAA
 AATTCCCATAGCTACACTAACACTGTTACATTAGTTATTAAAGGATCATATAATTTTAAATAA
 CTTTGTGACTTAAAGTAAACTCTAAAGTATCTTACATTGAGGAAATAAATTAAACCTAACTTAATTAA
 TGTGTTAACTAAATTACAGGAGTATTAGTTGACACTTTCTCGT

【 0 1 2 3 】

LID/ M2-2のアンチゲノムcDNA配列(SEQ ID NO:5)

10

20

30

40

50

ACGGGAAAAAATGCGTACAACAAACTGCATAAACCBBBBBGGGCAAATAAGAATTGATAAGTACCACTTAA
 ATTTAACTCCCTGGTTAGAGATGGGCAATTGATTGAGTATGATAAAAGTTAGATTACAAATTGTTGACAA
 TGATGAAGTAGCATTGTTAAAATAACATGCTACTGATAAAATTAAATAACATTAACTATGCTTTGGCTAAGGCAG
 TGATACATACAATCAAATTGAATGCCATTGTTGTGCATGTTTACAAGTAGTGTATTTGCCCTAATAATAAT
 ATTTGAGTAAATCCAAATTCAACACAATGCCAGTACTACAAAATGGAGGTATATATGGGAAATGATGGAATTAAAC
 ACATTGCTCTAACCTAATGGTCACTAGATGACAATTGAAATTAAATTCTCCAAAAACTAAGTGAATGCAACAA
 TGACCAATTATATGAATCAATTATCTGAATTACTTGGATTGATCTTAATCCATAATTAAATAATCAACTAG
 CAAATCAATGTCACTAACACCATTAGTTAATATAAACTAACAGAACAAAATGGGCAAATAATCAATTCA
 CCAACCCAAACCATGGACACAACCCACAATGATAATACACCAAAAGACTGATGATCACAGACATGAGACCGTTGCA
 CTTGAGACCAATAAACATCACTAACACAGAGACATCATAACACACAAATTATACATTGATAATCATGAATGCA
 AGTGAGAAAACCTTGATGAAAGACAGGCCACATTACATTCTGGTCAACTATGAAATGAAACTATTACACAAAGTAG
 GAAGCACTAAATATAAAATACTGAATACACACAAATATGGCACTTCCCTATGCCATATTCAATCAT
 GATGGGTTCTTAAAGTGCATTGGCATTAAGCTTACAAAGCATACTCCATAATATAACAGTATGATCTCAATCCATA
 AATTCAACACAATATTCAACACAACCTATGATAACTATACCTCCATAGTCCAGATGGAGCCTG
 AAAATTATAGTAATTAAAACCTAAGGAGAGATAAGATAGAAGATGGGCAAATAACACCATGGCTCTAGCAA
 GTCAAGTTGAATGATACTCAACAAAGATCAACTCTGTCACTCCAGCAAATACACCATCCAACGGACACAGGAGA
 TAGTATTGATACTCTAATTATGATGTCAGAAACACATCAATAAGTTATGTCAGTATTAAATCAGAGATG
 CTAATCATAATTCACTGGTTAATAGGTATGTTATGCGATGCTAGGTTAGGAAGAGAACACCAAAAAATA
 CTCAGAGATGCGGGATATCATGTTAAAGCAAATGGAGTAGATGTAACAACACATCGTCAAGACATTAATGGAAAAGA
 AATGAAATTGAAAGTGTAAACATTGGCAAGCTTAACAACTGAAATTCAAATCAACATTGAGATAGAATCTAGAAAAT
 CCTACAAAAAAATGCTAAAGAAATGGGAGAGGTAGCTCCAGAATACAGGCATGACTCTCTGATTGTCAGGAGT
 ATATTATGTAAGCAGCATTAGTAATAACTAAATTAGCAGCAGGGACAGATCTGGTCTTACAGCCGTGATTAGGAG
 AGCTAATAATGCTCTAAACATGGGAAACTGAAACGTTACAAAGGCTACTACCCAAGGACATAGCCAACAGCTTCTATG
 AAGTGTGAAAACATCCCCACTTATAGATGTTTGTCTTACAGGAGTACAGGAGTGGCTACAGGAGTGGC
 AGTAGAGTTGAAGGGATTGTCAGGATTGTTATGAATGCTTACAGGAGTGGTACGGTGGGAGT
 CTTAGCAAATCGGTTAAACATGGACATGCTAGTGTGCAAGCAGAAATGGAACAAGTTGAGGTT
 ATGAATATGCCCTAAACATGGGTTGAAGCAGGATTCTACCATATATTGAACAACCCAAAAGCATCATTATTATCT
 TTGACTCAATTCTCTACTCTCAGTGTAGTATTAGGCAATGCTGTCGGCTAGGCATAATGGGAGAGTACAGGAG
 TACACCGAGGAATCAAGATCTATATGATGCAAGCAAAGGCATATGCTGAACAACCTCAAAGAAAATGGTGTGATTA
 ACAGTGTACTAGACTGACAGCAGAAACTAGAGGCTATCAAACATCAGCTTAATCCAAAAGATAATGATGTTAGAG
 CTTTGAGTTAAACATGGGCAAATAATCATCATGGAAAAGTTGCTCTGAATTCCATGGAGAAGATGCAA
 CAACAGGGCTACTAAATTCTAGAATCAATAAGGGCAAATTACATCACCCAAAGATCCAAGAAAAAGATAGTA
 TCAATCTGTCAACTCAATAGATATAGAAGTAACCAAAGAAAGCCCTATAACATCAAATTCAACTATTCAACCC
 ACAAAATGAGACAGATGATACTGCAGGGAAACAAGCCCAATTCAAAGAAAACCTCTAGTAAGTTCAAAGAACAGCC
 TACACCAAGTGATAATCCCTTTCTAAACTATACAAAGAAACCATAGAAACATTGATAACAATGAAGAACATCCA
 GCTATTCTACGAAGAAATAATGATCAGACAAACGATAATATAACAGCAAGATTAGATAGGATTGATGAAAAATT
 AGTAAATACTAGGAATGCTTACACATTAGTAGTGTGCAAGTGCAGGACCTACATCTGCTCGGGATGGTATAAGAGA
 TGCCATGGTGGTTAAAGAGAAGAAATGATAGAAAAAACTAGAAACTGAGCATTATGACCAATGACAGATTAGAAG
 CTATGGCAAGACTCAGGAATGAGGAAAGTGAAAAGATGGCAAAGACACATCAGATGAAGTGTCTCAATCCAACA
 TCAGAGAAATTGAACACCTATTGGAAGGGATGATAGTGACAATGATCTACTGAAGATTCTGATTAGTTAC
 CAATCTTCACATCAACACACAAATACCAACAGAACCAAACACTAACCAACCCATCATCCAACCAAACATCCATC
 CGCCAACTGCCAACAGCAAACAAACACCAGCAAATCCAAAACATAACCACCCGGAAAAATCTATAATATAGTT
 ACAAAAGGAAAGGGGGCAAATATGGAAACATACGTGAACAAGCTTCAGAAGGCTCCACATACAGCTGC
 TGTTCATAACATGTCTTAGAAAAGACATGACCTGCATCACTTACAATATGGGTGCCATGTTCAATCATCTA
 TGCCAGCAGATTACTTATAAAAGAACTAGCTAATGTCACATACATAGTGAAACAAATATCCACACCCAGGGACCT
 TCACTAAGAGTCATGATAAAACTCAAGAAGTGCAGTGTCTAGCACAATGCCAGCAAATTACCATATGCGCTAATGT
 GTCCTGGATGAAAGAACAAACTAGCATATGATGTAACCAACCCCTGTGAAATCAAGGCATGTTAGTCTAACATGCC
 TAAAATCAAAATATGTTGACTACAGTTAAAGATCTCAGTATGAAGACACTCAACCCCTACACATGATATTGCT
 TTATGTAATTGAAACATAGTAACATCAAAGGAAACTGATAACACATACAGTGTGAGAAA
 TAAAGATCTGAACACACTGAAAATATAACAAACACTGAATTCAAAGGAAACTGCTATCACAAATGCAAAATCATCCCT
 ACTCAGGATTACTATTAGTCATCACAGTGCAGACAAAGGAGCATTCAAATACATAAAGCCACAAAGTCATTC
 ATAGTAGATCTGGAGCTTACCTAGAAAAAGAAAGTATATATTGTTACCAAAATTGGAAGCAGCACAGCTACACG
 ATTTGCAATCAAACCCATGGAAGATTAACCTTTCTACATCAGTGTGTTAATTCAACAAACTTCTACCTAC

10

20

30

40

50

ATTCTTCACTTCACCATCACAACTCACAAACACTCTGGTTCAACCAATCAAACAAAATTATCTGAAGTCCCAGAT
 CATCCCAAGTCATTGTTTACAGATCTAGTACTCAAATAGTTAACATAGAATCTGGCTTACAGACACACCACAGAATCAACCAATGGAAAAT
 ACATCCATAACAAATAGAATTCTCAAGCAAACTCTGGCTTACTTACACTAACATGATCACAACAAATACTC
 TTGCTAATCATATACTCATGATGCAACTAAACTTTGTAATATAACGTATTCTCATACAAACACT
 TTGAGTTACCAAGAGCTGAGTTAACACTGATAAAGTAGTTAACCTAGTCATAACAATGAACCTAGGATATC
 AAGACTAACATAACATTGGGCAAATGCAAACATGTCACAAACAGGACCAACGCACCGCTAAGACATTAGAAAAG
 GACCTGGGACACTCTCATCTTATTATCATACTCATGCTTATATAAGTTAACCTTAAATCTGTAGCACAAA
 TCACATTATCCATTCTGCAATGATAATCTCAACTTCAACTTAAATGAGCCATCATATTCTAGCCCTGGGCAAAC
 CACAAAGTCACACCAACAACTGCAATCACAGATGCAACAAGCCAGTCAGAACACAACACCCAAACATACCTCAC
 CCAGAACCTCTGAGCTTAACTGAGCTTCAACTGAGCTTCAACCTGAGCTTCAACAAACACCCAAACACTCAA
 CAACACCCAGGAGTCAGTCACCCCTGCAATCCACAAACAGTCAGACACAAACAGGACAAACCCATAATGATTTCACTTGAAGTGTCAA
 CTTGTACCTCTGAGCATATGCAACATCCACCTGCTGGCTATCTGCAAAGAAGAACACAAACCCAG
 GAAAGAAAACCAACTAACAGCCACAAAAACCAACCCAGCAACAGGACAAACCCATAATGATTTCACTTGAAGTGTCAA
 AAATCAAAGGAAGTACCCACACCAAGCCACAGGAAATCAGAACACCCAAACAAACATCATAACTAC
 ACTACTCACCCTCAACACCCAGGAAATCAGAACACTCAAAGTCAAATGGAACACCCAAACAAACATCATAACTAC
 GCAATCCAAGCCCTCTCAAGTCTCACACATCGAGTACCCATCACAAACCTCTCATCTCACCCACACACAGC
 CAGTAGTTACTTAAACATATTATCACAAAGGCCTGAGCAACTTAAACAGAACTCAAATAACTCTGGGCAA
 TAACAATGGAGTTGCTAATCTCAAGCAAATGCAATTACCAACATCTACTGAGTCACATTGTTGTTGCTTCT
 GGTCAAACATCACTGAGAATTATCAATCAACATGAGTCAGTAGCAAAGGCTATCTAGTGTCTGAGAAC
 TGGTTGTTACCGAGTTAACATAGAATTCAAGAAAATAAGTGTAAATGGAAACAGATGCTAAGG
 TAAATGATAAAACAGAATTAGATAAAATGCTGAAACAGAATTGAGCTCATGCAAAGCACACAA
 GCAACAAACATCGAGCCAGAAGAGAACTAACAGGTTATGAAATTACACTCAACATGCCAAAAACCAATGT
 AACATTAAAGCAAGAAAAGGAAAGATTCTGGTTTTGTTAGGTGTTGGATCTGCAATGCCAGTGGCTTG
 CTGTATCTAAGGCTCTGCACCTAGAAGGGAAAGTGAACAAAGATCAAAGTGCTACTATCCACAAACAGGCTGTA
 GTCAGCTTATCAAATGGAGTTAGTGTAAACCAAGCTGTTAGACCTCTAAACTATAGATAAAACATGTT
 ACTCTATGTGAAACAAGCTGAGCATATCAAATAGAAACTGTGATAGAGTTCAACAAAGAACACAGAC
 TACTAGAGATTACCGGAAATTAGTGTAAATGCAAGGCTAACTACACCTGTAAGCAGTACTATGTTAACTAATAGT
 GAAATTGTTGCTAATCAATGATGCTTAAACATGAGTCAGGAAAGTAAATGTCACAAACATGTTAACTAATAGT
 TAGACACAAAGTTACTCTATGCTTAAACAGGAAAGTCTAGCATATGTTAGTACAATTACACTATATG
 GTGTTATAGATACACCCCTGTTGAAACTACACACATCCCTCTATGTACAACCAACACAAAGAAGGGTCAACATC
 TGTTAACAGAAACTGACAGAGGATGGTACTGTGACAATGCAAGGATCAGTATCTTCTCCACAGCTGAAACATG
 TAAAGTTCAATCAAATCGAGTATTTGTCACAAATGAACAGTTAACATTACCAAGTGAAGTAAATCTGCAATG
 TTGACATATTCAACCCAAATATGATTTGTTAACTGACTTCAAACAAACAGATGTAAGCAGCTCGTTATCACATCT
 CTAGGAGCCATGTGTCATGCTATGCCAAACTAAATGTCAGCATCCAATAAAATCTGGAATCATAAAGACATT
 TTCTAACGGGGCGATTATGTCATGAAATAAGGGGGTGCACACTGTGTCATGTTAGGTAACACATTATATTGTAATA
 AGCAAGAAGGTTAAAGTCTCATGTTAAAGGTGAACCAATAAAATTCTATGACCCATTAGTATTCCCTCTGAT
 GAATTGATGCAATATCTCAAGTCACGAGAAAGATTAACCAAGGCTAGCATTTCTGAAATCCGATGAAATT
 ATTACATAATGTAATGTTGAAATCCACACAAATCATGATAACTACTATAATTAGTATTAGTAAATAT
 TGTATCTTAAATTGCTGTTGACTGCTCTTAACTGTAAGGGCAGAACACCCAGTCACACTAAGCAAGGATCAA
 CTGAGTGTATAAAATAATGCTTAACTGTAACAAATAAAAGGACCTAATCATGTTTACAATGGTTACTA
 TCTGCTCATAGACAACCCATCTGTCATTGGATTCTTAAATCTGAACTTCATGCAAACACTCTCATATAACCCAT
 CTCACCTACACTATTAAAGTAGTGTATTGTTATGTTAAACACAAATTGCAATGCCAGGATTAACCTACATC
 TGAAAAATGAAAATGGGCAAATATGTCAGGAATCCTGCAAATTGAAATTGAGGTCTTAAATG
 GTAAGAGGTGTCATTTAGTCATAATTGTTGAAATGCCACCCCATGCACTGTTGTAAGACAAAATTGTT
 AACAGAAACTTAAGTCTATGGATAAAAGTATGATGACATTACCTTACAGAAATAAGTGGAGCTGAGAGTTGGACAGAAC
 AGAAGAGATGCTCTGGTAGTGGACTGCTAGAGGTTATGATGACAAATAACATAACTAAACAACTCAG
 CATGTTGCTCATGAGCAAACCTCTACTGCAACTAATGTCATGTTGAAATGCAACAGGAAACAAACAAACTAT
 CCATGTTAAAGGTTGCAAGCTGAGCATATTGAAAGAAAACCATCAAACACATTGATATCATAAGAGCATAA
 CCATCAACAAACCCAAAAGAATCAACTGTTAGTGTACAAACAGGACACGCCAAAATAACGATAACTACCTAACACTCA
 ATTCTAACACTCACCACATGTTACATTAAATTCAACAAATTCAAGTGTGGGACAAAATGGATCCATTATTAA
 TGAAATTCTGCTAATGTTATCTAACCGATAGTTAAAGGTGTTATCTCTCAGAGTGTATGCTT
 GAAGTTACATATCTAACGGCTCTTCTCAAAATGTTACCAACTTAAAGTAGACAAAATCCATTAAATAGAA
 CACATGAACTTAAAGGAAACTAAATACACAGCTCTTAAATCTAAGTGTACAAATGAAATTAGGAAATAAAATTGAAAGA
 ACTCTACTTATCTGAGTCATACTTATGACATACAAGGATGACCTGTCAGAACAGATTGCTACCAACTAATTAC
 TTTAAAGATAATAAGAAGAGCTATAGAATAAGTGTGAAAGTCTATGCTATATTGAAATAAAACTAGGGCTAAA
 GAAAAGGACAAGGTTAACTCAACAAATGGACAAGGACAACCTCAGTTATTACGACCATATCAAAGATGATAT
 ACTTTGAGCTGTTAAAGATAATCAATCTCATCTAAACAGACACAAAATCCTACACAAACAAAAGACACAAATCA
 AAACAAACACTCTGAAAGAAATTGATGTTCAATGCAACATCCTCCATCATGGTTAACATGTTAACTTATAC
 AACAAATTAAACAAACATATTAAACACAGTATGCAAAATGGGTTAACATGTTAACATGAGATAATCA
 AACCTTAAAGTAGGTTCAATTATTGAAACCAATATGGTTGTTAGTACAGTTATCATAGGAACACTCAAAGAATTACTG
 TGACAAACCTATAATCAATTCTGACATGGAAAGATATTGCTTAGTACAGATTAAATGTTGTTAACATGAGATT

10

20

30

40

50

AGTAAC TGTTGAAACACATTAATAAAAGCTTAGGCTTAAGATGCGGATTCAATAATGTTATCTGACACAACATT
 CCTTATGGAGATTGATACTAAAGCTTACAACTGAGGGGTTCTACATAATAAAAAGAGGTAGAGGGATTATTA
 TGTCTAATTAAATATAACAGAAGAGTCATTGAGAAAACGATTATAATAGTATGCTCAACAACATCACA
 GATGCTGCTAATAAAGCTCAGAAAATCTGCTATCAAGAGTATGTCTACATATTAGATAAGACAGTGCCGATAA
 TATAATAATGGCAGATGATAATTCTAAGTAAGTCCTAAATTAAAGCTCAGGTGACAATAACCTTA
 ACAACTGAGTGAACTATATTTTGTCAGAATATGGACACCCATGGTAGATGAAAGACAAGCCATGGATGCT
 GTAAAAATTAGCAATGAGACCAAATTACTTGTTAAGCAGTCTGAGTATGTTAAGAGGTGCCTTATATATAG
 AATTATAAAAGGGTTGTAATAATTACACAGATGGCTACTTAAGAAATGCTATTGTTTACCCCTAAGATGGT
 TAACTACTATAAAACTAACACTTACCTCTCTTGTGGAACTACAGAAAGAGATTGTTAGTGTATCAGGACTA
 CGTTCTATCGTGAGTTGCTGCCTAAAAAGTGGATCTGAAATGATTATAATGATAAAGCTATATCACCTCC
 TAAAATTGATATGGACTAGTTCCCTAGAAATTACATGCCATCACACATAACAAACATATAGAACATGAAAAT
 TAAAATTTCGAGAGTGATAAATCAAGAGTATTAGAGTATTAAAGAGATAACAAATTCAATGAATGTGAT
 TTATACAAC TGTTAGTAACTCAAAGTTCTCAACACCCCTAATCATGTTGATCTATTGACAGGCAAAGAAAAGAGA
 ACTCAGTGTAGTGAAATGTTGCAATGCAACCGGGAAAGTTCAGACAGGTTCAAAATTTGGCAGAGAAAATGATAG
 CTGAAAACATTTCACATTCTTCTGAAAGTCTAACAGATATGGTATCTAGAACTACAAAAAATATTAGAAGT
 AAAGCAGGAATAAGTAACAAATCGCTAACATGATAACAAACATTACATGTTAGTAACTGCTATCATCAC
 AGATCTCAGCAAATTCAACGCTTGTGATGAAACCTGATGTATTGTTAGTGTGCTGGATGAACTGCATG
 GTGTAACATCTCTATTTCCTGGTACATTAACTATTCTCATGTCACAATAATGACACATATAGGCATGCACCC
 CCCTATAGGAGATCATATTGTAGATCTAACATGTAGATGAAACAAAGTGGATTATATAGATATCACATGGTGG
 CATCGAAGGGTGGTGTCAAAAATATGGCCTAGAACAGCTATATCACTATTGGATCTAATATCTCAAAGGGAAAT
 TCTCAATTACTGCTTAAATTATGGTACAATCAATAGATATAAGCAAACCAATCAGACTCATGGAAGGTCAA
 ACTCATGCTCAAGCAGATTATTGCTAGCATTAAAGCTTAAATTACTGTATAAAGAGTATGAGGCTAGGCCA
 CAAATTAAAAGGAACTGAGACTTATATACAGGATATGCAATTATGAGTAAACAACTAACATAACGGTGTAT
 ATTACCCAGCTAGTATAAAGGACTTAAAGGTGGGAGCTTATACAAACACTATATTGATGATTTCAAAGTGGT
 CTAGAACTATAGGACTTTGACACAAAGATTAGAATAAGAGGTGAAAGTCTATTATGAGTTAATTAGAAA
 TGATGGTATATAATCAGATTGCTTACAATTAAAAATCATGCATTATGTAACAAATAACTATATTGGACATAT
 TAAAGGTTCTGAAACACTTAAACCTTTTAATCTGATAATATTGATACAGCATTAACTTGTATATGAAATT
 CCATGTTATTGGTGTGATCCAACTTGTATATCGAAGTTCTATAGAAGAACCTCTGACTTCTCACAGA
 GGCTATAGTTCTGTCTCATCTATTGTTATACAAACCATGACTTAAAGATAAAACTTCAAGATCTGTCAG
 ATGATAGTGAATAACTCTAACATGCAATTACCGTAAAGCAGAACCCCTAATGCTGAATTCTGTAACATTGATG
 AGAGATCCTCAAGCTTAGGGTCTGAGGAGAACAGCTAAATTACTAGCAGAACTAATGAGTCTAAATGATA
 TTATGCAAATATAGAACCTACATATCCTATGGCTAAGAGTTGTTATGAAAGTTACCCCTTATAAGCAGAG
 AAAATAGTAAATCTTATATCAGTACAAATCTATAACTAACATACTGGAAAAACTTCTGCCATAGACTAACAGA
 TATTGATAGGCCACTGAGATGAGGAAACATACTTGCTTAAAGGATACTCCATTGGATTGTAACAGAG
 ATAAAAGAGAGATTGAGTATGGAAACACTAAGTATTACTGAGATAACGAAATATGTTAGGGAAAGATCTGGTCT
 TTATCCAATATAGTTGTTGATCATCACCAGTATCATGTTACATGAACTAACATGACTTAAAGCAGTATATC
 TAGTGGCATAATTATAGAAATATAATGTTAACAGTTAACAGTGTGAGAGAGGACCACTAAACCATGGTGG
 GTCTCATCACAAAGAGAAAAAACATGCCAGTTATAATAGACAAGTCTTAACCAAAACAGAGAGATCAAATA
 GATCTATTAGCAAATTGGATTGGGTATGCATCTAGATAACAAGGATGAATTGAAAGAACCTCAGCATAGG
 AACCCCTGGGTTAACATGAAAGGCCAGAAATTCTCACAAATTAAAGTGTCAATTATTGATCGCCTTA
 CAGTCAGTAGAGCACCATGTAATTCCCTGCTCAATACCAGCTTACAGAACAAATTATCAGTTGACACTAGC
 CCTTATACGCTATTAACAGAAAAGTGGTGTGATGAGATTGACATAGTATTCCAAAAGTGTATAAGCTTGG
 CCTTGTGTTAATGTCAGTAGAGAACTTACTAATGTTAGTGTCTAACAGAAATTATCTCATACCTAACGCTTATG
 AGATACTTGTGAAACCTCCCATATTACAGGTGATGTTGATATTCAAGTTAAACAGTGTATAACAAACAG
 CATATGTTTACCAAGACAAAATAAGTTGACTCAATATGGAATTATTCTAACAGTAAATAAAACACTCAAATCTGG
 ATCTCATGTTAATTCTAACATTAAATATTGACATAAATCTGACTATTCTACATAACTTACATTAAAGTACTA
 ATTAGCTGGCATTGGATTCTGATTACAACTTAAAGGATTGTTGAAAAGATTGTTGAGGAG
 GGATATAACTGATCATGTTTAAATTGAAAGTTCTCTAACGCTTAAAGCCTATCTCTGTTTCA
 TAAAGGTTATGGCAAAGCAAAGCTGGAGTGTGATATGAAACACTTCAAGATCTCTATGTTATTGAAATTAGACA
 GTAGTTATGGAAAGTCTATGCTAACAGTTATTGTTCTAACAGTCTAACAGTGTAGCAGAACTCAGTTG
 CCCTTGGGTTAACATAGATTATCCTAACACATATGAAAGCAATTAAACTATAGATCTGTTAGAATGG
 GATTGATAAAATAGATAGAATAACACATTAAAATAACACAAATTCACTGATGAATTGTTATCTCTAACATTCTTC
 TACATTAATTAAACTCTCAGATAACTCATCTTAACTAAACATATAAGGATTGCTAATTCTGAAATTAGAAAA
 TAATTACACAAATTATATCCTCACACAGAAAACCTGAGAAATATACTAGCCAACTCGGATTAAAGTAATGACA
 AAAAGACACTGAATGACTATTGTTAGGTTAAAGTGTGACTCAATAATGTTAACATTGTTATCTAACAGCTT
 ATTAATCGTCGCAATGATTAGAACCAATTACAGCAACAAAGATTGTTATAATTATTCCCTATGGTTGATTGA
 TAGAATTATAGATCATTCAAGGCAATACAGCAAATCCAACCAACTTACACTACTACTTCCACCAAATATCCTTAG
 TGCAACATAGCACATCACTTACTGCTGCTTCCCTGGCATCATATTAAAGTCAATTGTTAGTATTGTTCTACA
 GTTGTAAAATTAGTATAGAGTATTGTTAAAGATCTTAAAGATCCCAATTGTTAGCATTGATAGGTGA
 AGGAGCAGGGAAATTATTGCGTACAGTAGTGGAACTTCCTGACATAAGATATAATTACAGAAGTCTGAAAG
 ATTGCAATGATCATGTTACCTATTGAGTTTAAAGCTGTACAATGGACATAACATTGATTGTTAGTGTGAAAT
 TTGACCATTCCTGCTACAGATGCAACCAACAACTATTGCTTATTACATATAAAAGTTGCTGAAACCTATCAG

10

20

30

40

50

TCTTTTGTCTGTGATGCCAATTGTCTGTAACAGTCACGGAGTAAATTATAATAGAATGGAGCAAGCATGTAA
 GAAAGTGCAGTACTGTCCTCAGTTAATAATGTATGTTAATAGTAAATATCATGCTCAAGATGATATTGATTTC
 AAATTAGACAATATAACTATATTAAAACCTATGTATGCTTAGGCAGTAAGTTAAGGGATCGGAGGTTACTTAGT
 CCTTACAATAGGTCTGCGAATATATTCCCAGTATTAAATGTACAAAATGCTAAATTGATACTATCAAGAACCA
 AAAATTCTCATGCCTAAGAACAGTGTAAAGAGTCTATTGATGCAAATATTAAAAGTTGATACCCCTTCTTGT
 TACCCCTATAACAAAAAGGAATTAACTGCATTGTCAAAACAAAGAGTGTGTTAGTGGAGATATACTATCATA
 TTCTATAGCTGGACGTAATGAAGTTTCAGCAATAAACTTAAATCATAGCATATGAACATCTTAAATGGTTCA
 ATCATGTTTAAATTCAACAGAACCTATAACCAATTATATGTTAGAATCTACATATCCTTACCTA
 AGTGAATTGTTAACAGCTGACAACCAATGAACCTAAAAAACTGATTTAAATCACAGGTAGTCTGTTACAACTT
 TCATAATGAATAATGAATAAAGATCTATAATAAAAATCCCAGTACACTAACACTGTATTCAATTATAGTT
 ATTAAAAATAAAAATCATATAATTTTAAATACTTTAGTGAACTAATCCTAAAGTTATCATTAAATCTTGA
 GGAATAAATTAAACCTAATCTAATTGGTTATATGTATTAACAAATTACGAGATATTAGTTTGACACTTT
 TTTCTCGT

10

【0124】

LID/ M2-2-AcIIのアンチゲノムcDNA配列(SEQ ID NO:6)

ACGGGAAAAATGCGTACAACAACTTGCATAACCAAAATGGGCAAATAAGAATTGATAAGTACCACTTAA
 ATTTAACTCCCTGGTTAGAGATGGGCAGCAATTGAGTATGATAAAAGTTAGATTACAAATTGTTGACAA
 TGATGAAGTAGCATGTTAAAATAACATGCTACTGATAAAATTACATTTACTAATGCTTTGGCTAAGGCAG
 TGATACATACAATCAAATTGATGGCATGTTATTACAAGTAGTGTATTGCCCTAATAATAAT
 ATGTTAGTAAATCCAAATTTCACACAAATGCCAGTACTACAAAATGGAGGTTATATGGAAATGATGGAATTAAAC
 ACATTGCTCTAACCTAATGGTCTACTAGATGACAATTGAAATTAAATTCTCCAAAATAAGTGAATTCAACAA
 TGACCAATTATATGAATCAATTACTGAAATTACTTGGATTGATCTAATCCATAAAATTATAATTATCAACTAG
 CAAATCAATGTCATAACACACCATTGTTAATAATAAAACTTAACAGAACAGAACAAATGGGCAAATAATCAATTGAG
 CCAACCCAAACCATGGACACAACCCACAATGATAAACACACAAAGACTGATGATCACAGACATGAGACCGTTGTCA
 CTTGAGACCATATAACATCACTAACACAGAGACATCATACACAAATTATGATAATCATGATGCA
 AGTGAGAAAATGATGAAAGACAGGGCACATTACATTCTGGTCAACTATGAAATGAAACTATTACACAAAGTAG
 GAAGCACTAAATATAAAAATACTGAATACAACACAAAATGGCACTTCCCTATGCCAATTTCATCAATCAT
 GATGGGTTCTAGAATGCAATTGCAATTAGCCTACAAAGCATACTCCATAATAACAGTATGATCTCAATCCATA
 AATTCAACACAATTACACAAACTCTATGCAACTATACTACATGCTTAGTCCAGATGGGCTG
 AAAATTATAGTAATTAAAGGAGAGATAAGATAGAAGATGGGCAAATAACACCATTGCAATTTCATCAATCAT
 GTCAAGTTGAATGATACACTCAACAAAGATCAACTTCTGTCATCCAGAACATACACCATTCAACGGAGCACAGGAGA
 TAGTATTGATACTCTAATTATGATGTCAGAACACATCAATAAGTTATGTCAGTGTATTAAATCACAGAACAGATG
 CTAATCATAAATTCACTGGTTAATAGGTATGTTATGCGATGCTAGGTAGGTTAGGAAGAGAACACCATAAAAATA
 CTCAGAGATGCGGGATATCATGTTAAAGCAAATGGAGTAGATGTAACAAACACATGTCAGAACATTAATGAAAGA
 AATGAAATTGAAAGTGTAAACATTGGCAAGCTTAAACACTGAAATTCAACATTGAGATAGAATCTAGAAAAT
 CCTACAAAAAAATGCTAAAGAAATGGGAGAGGTAGCTCAGAACATAGGCATGACTCTCTGATTGTCGATTAGGAG
 ATATTATGTATAGCAGCATTGTAATAACTAAATTAGCAGCAGGGACAGATCTGGCTTACAGCCGTGATTAGGAG
 AGCTAATAATGCTCTAAAGAAATGAAACGTTACAAAGGCTTACTACCCAAGGACATAGCCAACAGCTTCTATG
 AAGTGTGAAAACATCCCCACTTTATAGATGTTTGTTCATTGGTATAGCACAATTCTTACACAGGGTGG
 AGTAGAGITGAAGGGATTGGCAGGATTGTTATGAATGCTAIGGTGCAAGGGCAAGTGTGTTACGGTGGGGAGT
 CTTAGCAAAATCGTTAAAATATTGTTAGGACATGCTAGTGTGCAAGCAGAAATGGAACAAGTTGTTGAGGTT
 ATGAATATGCCAAAATTGGTGGTGAAGCAGGATTCTACCATATATTGAACAAACCCAAAAGCATCATTATTATCT
 TTGACTCAATTCCCTCACTCTCAGTGTAGTATTAGCAATGCTGTCGGCTAGGCATAATGGGAGAGTACAGAGG
 TACACCGAGGAATCAAGATCTATGATGCAGCAAAGGCATATGCTGAACAACCTAAAGAAAATGGTGTGATTAACT
 ACAGTGTACTAGACTGACAGCAGAACAGACTAGAGGCTATCAAACATCAGTTAATCCAAAGATAATGATGAG
 CTTGAGTTAATAAAAATGGGCAAATAATCATGAAAGGTTCTGCTGAAATTCCATGGAGAACAGTCAAA
 CAACAGGGCTACTAAATTCTAGAATCAATAAGGCAAATTCACATCACCCAAAGATCCAAGAAAAAGATAGTA
 TCATATCTGCAACTCAATAGATATAGAAGTACCAAAGAAAGCCCTATAACATCAAATTCAACTATTATCAACCA
 ACAAATGAGACAGATGACTGCAAGGGACAAGCCAAATTCAAAGAAAACCTCTAGTAAGTTCAAAAGAACAGCC
 TACACCAAGTGATAATCCCTTCTAAACTATACAAAGAACCATAGAAACATTGATAACAAATGAAGAACAGAAC
 GCTATTCATAGAAGAATAATGATCAGACAAACGATAATATAACAGCAAGATTAGATAGGATTGATGAAAAATT
 AGTGAATAACTAGGAATGCTCACACATTAGTAGTGGCAAGTGCAGGACCTACATGCTCGGGATGGTATAAGAGA
 TGCCTATGGTTAAGAGAAGAAATGATAGAAAAATCAGAACTGAAGCATTAATGACCAATGACAGATTAGAAG
 CTATGGCAAGACTCAGGAATGAGGAAAGTGAAGGAAAGATGGCAAAGACACATCAGATGAAGTGTCTCAATCCAACA
 TCAGAGAAATTGAACACCTATTGCAAGGGATGATAGTGCACATGATCTACTGCAAGATTCTGATTAGTTAC
 CAATCTCACATCAACACACAATACCAACAGAACCAAACACTAACCAACCCATCATCAACAAACATCCATC
 CGCAATCAGCCAAACAGCAACAAAACACAGCCAACTCCAAAACATCACCCGGAAAAATCTATAATATAGTT
 AAAAAAAAGGAAAGGGGGCAATATGGAAACATACGTGAACAAGCTCAGCAAGGCTCCACATACACAGCTGC
 TGGTCAATACAATGCTTAGAAAAGACGATGACCTGTCATCATTACAATATGGGTGCCATGTTCAATCATCTA
 TGGCAGCAGATTACTTAAAGAGAAGTCAAGAAGTGCAGTGCTAGCACAATGCCCAGCAATTACCATATGCGCTAATGT
 GTCCTGGATGAAAGAACAGCAAACCTAGCATATGATGTAACCAACCCCTGTGAAATCAAGGCATGTTGCTAATG
 TAAATCAAAATATGTTGACTACAGTTAAAGATCTCACTATGAAGACACTCAACCCCTACACATGATATTATTGCT

20

30

40

50

TTATGTGAATTGAAAACATAGTAACATCAAAAAAGTCATAATACCAACATACCTAAGATCCATCAGTGTCAAGAAA
 TAAAGATCTGAACACACTTGGAAATATAACAACCCTGAACTTCAAATGCTATCACAAATGCAAAATCATCCCTT
 ACTCAGGATTACTATTAGTCATCACAGTGAACAAAGCATTCAAATCACATAAAGCCACAAAGTCATT
 ATAGTAGATCTGGAGCTTACCTAGAAAAAGAAAGTATATATTGTTACCAAAATTGGAAGCACACAGCTACAG
 ATTGCAATCAAACCCATGGAGATTAACTTTCTTACATCAGTGTAAATTCAACAAACTTCTACTAC
 ATTCTTCACTTACCATCACAAACACTCTGTGTTCAACCAATCAAACAAACTTATCTGAAGTCCCAGAT
 CATCCCAAGTCATTGTTATCAGATCTAGTACTCAAATAAGTTAATAAAAATACACATGGGCAAAATCATT
 GGAGGAATCCAACTAATCACAATATCTGAAACATAGACAAGTCCACACACCACAGAATCAACCAATGGAAAT
 ACATCCATAACATAGAATTCTCAAGCAAATTCTGGCTTACTTCACTAAACACATGATCACAAACAAATACTC
 TTGCTAATCATATAATCTCCATCATGATTGCAACTAAACACTTGTGAATATAACGTATTCCATAACAAACCT
 TTGAGTTACCAAGAGTCAGGTTAATCTGATAAAGTACTTAAATAAAATAGTCATAACAAATGAACACTAGGATATC
 AAGACTAACAAATAACATGGGCAAATGCAACATGTCACAAACAGGACCAACGGCTAAGACATTAGAAAG
 GACCTGGGACACTCTCAATCATTATTATCATCATGCTGTTATATAAGTTAAATCTTAAATCTGTAGCACAA
 TCACATTATCATTCTGGCAATGATAATCTCAACTTCACTTAAATTGCAAGCCATCATATTCA TAGCCTGGCAAAC
 CACAAACTCACACCAAACTGCAATCACAAAGATGCAACAAAGCCAGTCAGAACACAAACCCACATACCTCAC
 CCAGAACCTCAGCTGGAAATCAGTCCCTAATCCGCTGAAATTACATCACAAACACCACCATACTAGCTC
 CAACACCAGGAGTCAGTCACCTGCAACATCCAAACAGTCAGGACCAAAACACAAACAAACTCAAACACACCC
 AGCAAGCCCACAAACAAACGCCAAACAAACAGGACAAACCCAAATAATGATTTCACTTGAAGTGTCAA
 CTTGTCACCTGAGCATATGCAGCAACATCCAACCTGCTGGGCTATCTGCAAAAGAATACAAACAAAAACAG
 GAAAGAAAACCACTACCAAGCCCACAAAAAAACCAACCTCAAGACAACCAAAAGATCCAAACCTCAAACCC
 AAATCAAAGGAAGTACCCACCAAGGCCACAGAAGGCCACCATCACACACCACAAACATCATAACTAC
 ACTACTCACCTCAACACCACAGGAAATCTCAGAACACTCACAGTCAAATGGAACACCTTCACTCAGTCCGAAG
 GCAATCCAAGCCTCTCAAGTCTCACACATCCGAGTACCCATCACAAACCTTCATCTCCACCAACACACCGC
 CAGTAGTTACTAAAACATATTACAAACAGGCTTACCAACTTAAACAGAATCAAATAAAACTCTGGGCAA
 TAACAATGGAGGTGCTAATCTCAAACAAATGCAATTACCAATCTCACTGCAAGTCACATTGTTGCTTCT
 GGTCAAAACATCACTGAAAGAATTTATCAATCAACATGCGAGTAGCAAAGGCTATCTTAGTGTCTGAGAAC
 TGGTTGGTATACCAGTGTATAACTATAGAATTAAAGTAATATCAAGAAAATAAGTGTATGGAACAGATGCTAAGG
 TAAAATGATAAAACAAAGAATTAGAATATAAAATGCTGAAACAGAATTGCAAGTCTCATGCAAAGCACCAA
 GCAACAAACAAATCGAGCCAGAGAACATACCAAGGTTATGAAATTACACTCACAAATGCAAACAAAACAAATGT
 AACATTAAGCAAGAAAAGGAAAGTATCTGGTTTTGTTAGGTGTTAGGATCTGCAATGCCAGTGGCGTTG
 CTGTATCTAAGTCTGCACCTAGAAGGGAGTCAGAATGCAAAAGTGTCTACTATCCACAAACAGCTGTA
 GTCAAGTCTATCAAATGGAGTTAGTGTCTTAAACCAGCAAAGTGTAGCTCAGGACTATATGTT
 ACCTATTGTGAACAAGCAAGCTGCAGCATATCAAATATAGAAACTGTGATAGGTTCAACAAAGAACACAGAC
 TACTAGAGATTACCAAGGGATTAGTGTAAATGCAAGGCTAACTACACTGTAAGCACTTACATGTTAACTAATAGT
 GAATTATGCTAAATCAATGATATGCCATAACAAATGATCAGAAAAGTTAATGTCACAAATGTCACAAATAGT
 TAGACAGCAAAGTTACTCTATGTCATAAAAGAGGAAGTCTAGCATATGTTAGTACAAATTACCACTATATG
 GTGTTATAGATACACCCGTGTTGAAACTACACACATCCCTCTATGTCACAAACACAAAAGAAGGGTCAAACATC
 TGTTAAACAAGAACTGACAGAGGATGGTACTGTGACAAATGCAAGGATCAGTATCTTCTCCACAAAGCTGAAACATG
 TAAAGTTCAATCAAATCGAGTATTTGTCACAAATGAAACAGTTAACATTACCAAGTGAAGTAAATCTGCAATG
 TTGACATATTCAACCCCAATATGATTGTTAAATTGACTTCAAAACAGATGTAAGCAGCTCCGTTACACATCT
 CTAGGAGCCATTGTCATGCTATGCCAAACTAAATGTCAGCATCCAATAAAATGTTGAATCATAAGACATT
 TTCTAACGGGTGCGATTATGTCATAAAAGGGGTGACACTGTGCTGTTAGGTAACACATTATTTGTAATA
 AGCAAGAAGGTTAAAGGCTCTATGTTAAAGGTGAAACCAATAAAATTCTATGACCCATTAGTATTCCCTCTGAT
 GAATTGAGTCATCAAATCTCAAGTCACCGAGAAAGATTAAACAGAGCTAGATTACCTGAAATCCGATGAATT
 ATTACATAATGTAATGCTGGTAAATCCACACAAATCATGATAACTACTATAATTAGTGTATTAGTAAAT
 TGGTATCATTAATTGCTGGACTGCTTATACTGTAAGGCCAGAAGCACACCGACTCACACTAACAGATCAA
 CTGAGTGTTAAATAATATGCTATTAGTAACTAAATAAAATGACCTAATCATGTTCTAACATGTTTACTA
 TCTGCTCATGACAACCCATGTCATTGTTAAATCTGAACTTCATCGAAACTCTCATCTATAAACCCT
 CTCACTACACTATTAAGTAGTCTGTTAAATGTTAGTATATAAAACACAAATGTCATGCCAGATTAACTTACCATC
 TGTTAAAGGAAACTGCTGGGAAATATGTCAGGAAACTGCTTAAATGTCAGGAAACTGCTTAAATGTT
 GTAAAGAGGTGTCATTAGTCATAATTGTTGAATGCCACCCATGCACTGCTGTTAGGACAAAACCTTATGTT
 AACAGAAACTTAAGTCTATGGATAAAAGTATAGATACCTTACAGAAAATAAGTGGAGCTGCAAGGTTGGACAGAAC
 AGAAGAGTATGCTTGGTAGTTGGAGTGCTAGAGGTTATAGGATCAATAAAACATAACTAACAAATCAG
 CATGTTGTCATGAGCAAACCTCTACTGAACTCAATGATGATGATACTCAAAGGCTAGGGACAATGAAGAGCTA
 AATTCCACCAAGATAAGAGTGTACAATACTGTCATATCATATTGAAAGCAACAGGAAAACAATAACAAACTAT
 CCATCTGTTAAAGGATGTCAGCAGACGACTTGAAGAAAACATCAAAACACATTGGATATCCATAAGAGCATAAA
 CCATCAAACACCCAAAAGATAACTCAACTGTTAGTGTAACTACAGGATGCCAAAATAATGATACTACCTGACAAATA
 AGTTCAATTCTAACACTCACCACATGTTACATTATCAAACAAATTCAAGTTGTTGGACAAAATGGATCCCA
 TTATTAATGGAAATTGCTAATGTTATCAACCGATAGTTATTTAAAGGTTATCTCTTCTCAGAGTGTAAAT
 GCTTTAGGAAGTTACATATTCAATGGCTTATCTCAAAATGTTACCAACTTAATTAGTGTAAAGACAAAATCATT
 AATAGAACACATGAATCTAAAGAAACTAAATAACACAGTCCTTAATATCTAAGTATCATAAAGGTGAATAAAAT
 TAGAAGAACCTACTTATTTCTAGTCACTTACATTGACATACAAAGAGTATGACCTCGTCAAGACAGATTGCTACCACT
 AATTACTAAAAAGATAATAAGAAGACCTAGAAATAAGTGTAAAGTCTATGCTATATTGAAATAAAACTAGG
 GCTTAAAGAAAAGGACAAGATTAAACAAATGGACAAGATGAAGACAACTCAGTTATTACGACCAATAATCAAAG

10

20

30

40

50

ATGATATACTTCACTGTTAAAGATAATCAATCTCATCTAAAGCAGACAAAATCACTACAAAACAAAAGAC
 ACAATCAAACAAACACTCTGAAGAAATTGATGTTCAATGCAACATCCTCATGTTAATACATGGTTAA
 CTTACACAAAATTAAACACATATTAAACACAGTATCGATCAAATGAGGTAAAAACCATGGTTTACATTGATAG
 ATAATCAAACACTCTTAGTGGATTCAATTATTTGAACCAATATGGTGTAGTATTACATAAGGAACCTAAAGA
 ATTACTGTGACACACCTATAATCAATTCTGACATGAAAGATATTAGCCTAGTAGATTAAATGTTGTTAATTAC
 ATGGATTAGTAACGTGTTAACACATTAACAGCTTAAAGCTAGGCTTAAGATGCGGATTCAATAATGTTATCTGACAC
 AACTATTCTTATGGAGATGTACTAAAGCTATTCACAATGAGGGTTCTACATAATAAAAGAGGTAGAGGG
 TTATTATGTCCTAAATTAAATACAGAAGAAGTCATTAGAAAACGATTATAATAAGTATGCTCAACAA
 CATCACAGATGCTGCTAAAGCTCAGAAAATCTGCTATCAAGAGTATGTCATACATTAGATAAGACAGTGT
 CCGATAATAATAAAATGGCAGGTGATAATTCTTAAAGTAAGTCTTAAATTAAAGCTTGAGGTGACAAAT
 AACCTTAACAACTGTGACTATATTGTTGAGAATTTGAGACACCAATGGTAGATGAAAGACAAGCCAT
 GGATGCTGTTAAATTAAATGCAATGAGACCAATTACTGTTAACAGCTGAGTATGTTAGAGGTTGCTTAA
 TATATAGAATTATAAAAGGGTTGTAATAATTACACAGATGCCACTTTAACAGATGCTATGTTTACCTTA
 AGATGGTTAACTTACTATAAAACTAAACACTTACCTTGTGAACTTACAGAAAGAGATTGATTGTTATC
 AGGACTACGTTCTATCGTAGTTGCTGCTAAAGAGCTTGGATCTGAAATGATTATAATGATAAAAGCTATAT
 CACCTCTAAATTTCATGACTGTTCCAGAGTGTAAATTACACATGCCATCACACATAAAACTATAGAACAT
 GAAAATTAAATTTCAGGAGGTGATAAAATCAAGAAGAGTATTAGAGTATTATAAGAGATAACAAATTCAATGA
 ATGTGATTATACAACITGTAGTTAATCAAAGTTATCTACAAACCCATACTATGTTGATCATTGACAGGCAAAG
 AAAGAGAACTCAGTGTAGGAGAATGTTGCAATGCAACCGGGATGTTAGCAGACAGGTTCAAATATTGGCAGAGAAA
 ATGATAGCTGAAAACATTACAATTCTTCTGAAAGTCTAACAGATATGGTAGCTAGAACATACAAAAAATT
 AGAAACTGAAAGCAGGAATAAGTAACAAATCGTACAATGATAATTACAACAAATTACATTAGTAAGTGTCTA
 TCATCACAGATCTCAGCAAATTCAATCAAGCTTGCATGAAACGTCATGTTAGTGTGATGTTGCTGGATGAA
 CTGCGATGGTGTACAATTCTATTTCCTGTTACATTAACTTCTCATGTCACAAATAATGACATATAGGCA
 TGCAACCCCTATATAGGAGATCATATTGAGATCTAACAGATGAGAACAAAGTGGATTATAGATATCACA
 TGGGTGCGATCGAAGGCTGGTGTCAAAACATGGACATAGAACGTTATCACTATTGGATCTAATATCTCTAAA
 GGGAAATTCTCAATTACTGCTTAAATTAGGTGACAATCAATAGATAAAAGCAAACCAATCAGACTCATGGA
 AGGTCAAACATGCTCAAGCAGATTATTGCTAGCATTAATAGCCTTAAATTACTGTATAAGAGTATGCGAGGCA
 TAGGCCACAAATTAAAGGAACCTGAGACTTATATACAGAGATATGCAATTATGAGTAAACAACTATACCTGATTCAA
 GGTGTATTATCCTCAGTATAAGAAAGTCTTAAGAGTGGGGACCTGGATAAAACACTATACCTGATTCAA
 AGTGAGCTGAGATCTATAGGTAGTTGACAGAACAGATAAGAGTAAAGGTTAGCTTATTCAGTTAATAT
 TTAGAATATGTTGTTATATCACTGTTGCTCTACATTAAACCTTTTAAATCTGATAATTGATACAGCTTAAACATTATTTG
 GACATATTAAAGGTTGCTGAAACACTTAAACCTTTTAAATCTGATAATTGATACAGCTTAAACATTGTTAT
 GAATTTCACCATGTTATTGGTGGTGGTGTACCCAACTGTTATATCGAAGTTCTATAGAAGAACTCTGACTTCC
 TCACAGGGCTATAGTCACCTGTGTTACACTTAGTTTACAAACCATGACTTAAAGATAAAACTTCAAGAT
 CTGTCAGATGAGATGAGATGAGTTACATGCAATTACAGCTTGGACAAAACCTTAATGCTGATTCTGTAAC
 ATGATGAGGAGATCTCAAGCTTCTGGGCTGAGAGACAGCTAAACATTACTAGCGAAATCAATAGACTGGCAGTTA
 CAGAGGTTGGAGTACAGCTTCAACAAACAAATTCTCCAAAGTGCACAAACATTACTACTACAGAGATAGCTA
 AATGATATTATGCAAAATATAGAACCTACATATCTCATGGCTAACAGTTGTTTATGAAAGTTACCTTTATAA
 AGCAGAGAAAATAGTAAATCTTATATCAGGTACAAATCTATAACTAACATACTGAAAAAAACTCTGCCATAGACT
 TAACAGATATTGATAGAGCACTGAGATGAGGAAAAACATACTTGTATAAGGATACTCCATTGGATTGT
 AACAGAGATAAAAGAGAGATATTGAGTTGGAAAACCTTAAGTATTACTGAAATTAGCAAATATGTTAGGGAAAGATC
 TTGGTCTTATCCAATATAGTTGGTGTACATCACCAGTATCTGTTACATGACATCAAATATACACAGCA
 CTATATCTAGTGGCATATTATAGAAAGATAATAATGTTAACAGTTAACCTGGTGTAGAGGAGGACCCACTAACCA
 TGGGTTGTTCATCTACACAGAGAAAACATGCCAGTTTAAATAGACAGTCTAACAAAAACAGAGAGA
 TCAAATAGATCTATTACCAAATTGGATTGGGTGTACATCTATAGATAACAGGATGAATTCTGAAAGACTCA
 GCATAGGAACCCCTGGGTTAACATATGAAAGGCCAAGAAATTATTCACAAATATTAAAGTGTCAATTATTGCTAT
 CGCCTTACAGTCAGTAGACCATGTAATTCCCTGCATCAATACCAGTTATAGAACACAAATTACTTGA
 CACTAGGCCCTATTACCGATTAACAGAAAAGTGGTGTAGACAGATATTGACATGCTATTCTCAAACACTGTATAA
 GCTTGGCCTTAAGTTAATGTCAGTAGAACAAATTACTGTTACAGTCTAACAGAATTATCTCATACCTAAG
 CTTAATGAGATACTTGTGAAACACTCCATTACAGGTTGATATTCAACAGTTAAACAAAGTGTATA
 AAAACACCATATGTTTACAGACAAAAAATAGTTGACTCAATATGTTAACAGTTAAACAAACTCTA
 AATCTGGATCTCATGTTAATTCTAATTAAATTGTCACATAAAATCTGACTATTCTCATTAACACTTACATT
 AGTACTAATTAGCTGGATTCTGATTATACAACCTTATGAAAGATTCTAAAGGTATTTGAAAAAGATTG
 GGGAGAGGGATAATACTGATCATATTAAATTGAAAGTTCTCAATGCTTATAAGACCTATCTCTGT
 GTTTCTATAAGGTTATGGCAAAAGCAAGCTGGAGTGTGATATTGAAACACTTCAGATCTCTATGTTATTGGATT
 ATAGACAGTAGTTATTGGAGGTCTATGTCAGGTTAGGTTAGAACAAACAGTTATCAAATACATTCTTAGCCAAGA
 TGCAAGTTACATAGACTAAAGGATGTCAGCTAACATTATGGTTCTAACAGTCTTAATGTTAGCAGAATTCA
 CAGTTGCCCTGGGTTAACATAGATTATCATCCAACACATATGAAAGCAATTAACTTATAGATCTGTT
 AGAATGGGATTGATAATATAGATAACACATTAACACAAATTCAATGATGAATTCTACTCTAA
 TCTCTTCTACATTAATTATACTTCTCAGATAACTCATCTATTAACTAAACATATAAGGATTGCTAATTCTGAAT
 TAGAAAATAATTACAACAAATTATATCATCCTACACCGAAAACCTAGAGAATATACTAGCCAATCCGATTAAAGT
 AATGACAAAAAGACACTGAATGACTATTGTTAGGTTAGCTCAATAATGTTACCATGTTATCTAATAA
 GAAGCTTAAATTACGCTGCAATGATTAGAACCAATTACAGCAAACAAAGATTGTTATAATTCTCATGTTG
 TGATTGATAGAATTATAGATCATTCAAGGCAATACAGCCAATCCAACCAACTTACACTACTTCCCACCAATA

10

20

30

40

50

TCCTTAGTGCACAATAGCACATCACTTACTGCATGCTTCCTGGCATCATTTAATAGATTCAATTGTATTTAG
 TTCTACAGGGTGTAAAATTAGTATAGAGTATATTAAAGATCTAAAATTAAAGATCCAATTGTATAGCATTCA
 TAGGTGAAGGAGCAGGAATTATTGCGTACAGTAGTGGAACTTCATCCTGACATAAGATATATTACAGAAGT
 CTGAAAGATTGCAATGATCATAGTTACCTATTGAGTTTAAGGCTGTACAATGGACATATCAACATTGATTATGG
 TGAAAATTGACCATTCTGCTACAGATGCAACCAACATTGATTGCTTACATATAAAAGTTGCTGAAC
 CTATCAGTCTTGTGTGATGCCGAATTGCTGTAACTGCAACTGGAGTAAAATTATAATAGAATGGAGCAAG
 CATGTAAGAAAGTCAAGTACTGTCCTCAGTTAAATGTTAGTAACTGTTAGTAAAGGATCGGAGGTT
 TGATTCAAAATTAGACAATAACTATATTAAAACCTATGTTAGTCTAGGAGTAAAGGATCGGAGGTT
 ACTTAGCCTTACAATAGGTCTGCGAATATATTCCAGTATTAAATGTTAGTACAAAATGCTAAATTGATACTATCA
 AGAACCAAAATTCTCATGCCTAAGAAAGCTGATAAAAGACTATTGATGCAAATAATTAAAGTTGATACCCCT
 TCTTGTACCCATAACAAAAAGGAAATTAAACTGCTGTAAACTAAAGAGTGTGTTAGTGGAGATATAC
 TATCATATTCTAGCTGGACGTAATGAAGTTTCAGCAACAGAACTAAACTATAACCATTATAATGGTAGAATCTACATATCC
 TTACCTAAGTGAATTGTTAACAGCTGACAACCAATGAACTAAAAACTGATTAAATCACAGGAGTCTGTTAT
 ACAACTTCATAATGAATAATGAATAAGATCTTATAATAAAAATCCCAGTACACTAACACTGTATTCAAT
 TATAGTTATAAAAATAAAATCATATAATTGTTAAACTTTAGTGAACATACTAAAGTTATCATTAA
 TCTTGGAGGAATAATTAAACCTAATCTAATTGGTTATATGTGTTAACTAAATTACAGGAGATTAGTTTG
 ACACTTTTCTCGT

10

【 0 1 2 5 】

LID/ M2-2-HindIIIのアンチゲノムcDNA配列(SEQ ID NO:7)

ACGGGAAAAAAATGCGTACAACAAACTGCATAAACCAAAAAATGGGCAAATAAGAATTGATAAGTACCACTTAA
 ATTAACTCCCTGGTTAGAGATGGGAGCAATTGAGTATGATAAAAGTTAGATTACAAAATTGTTGACAA
 TGATGAAGTAGCATGGTAAAATAACATGCTATACTGATAAAATTAAACTATTAACATTAACTATGCTTGGCTAACCGAG
 TGATACATACAATTGAACTGGCATTGTTGTGATGTTACAGTGTGATATTGCCCATAATAAAAT
 ATTGTTAGTAAATCCAAATTCAACAAATGCCAGTACTACAAAATGGAGGTTATATGTTGAAATGTTGAGGAAATTAAAC
 ACATTGCTCTCAACCTAATGGTCTACTAGATGACAATTGTTGAAATTAAATTCTCAGGAAACTAAAGTGTGATTCAACAA
 TGACCAATTATATGAATCAATTATCTGAATTACTGGATTGATCTTAATCCATAAAATTATAATTAAATCAACTAG
 CAAATCAATGTCATAACACCATTAGTAAATAAAACTAACAGAAGACAAAATGGGCAAATAATCAATTCTAG
 CCAACCCAAACCATGGACACAACCCACAATGATAATACACCACAAAGACTGATGATCACAGACATGAGACCGTTGTC
 CTTGAGACCATATAACATCACTAACAGAGACATCATAACACACAAATTATGATAATCATGAATGCA
 AGTGGAGAAAATTGATGAAAGACAGGCCACATTACATTCTGGTCAACTATGAAATGAAACTATTACACAAAGTAG
 GAAGCACTAAATAAAAATATACTGAATAACACACAAATGGCACTTCCCTATGCCATAATTCAATCAT
 GATGGGTTCTAGAATGCAATTGGCATTAAAGCCTACAAAGCATACTCCATAATACAGTATGATCTCAATCCATA
 AATTCAACACAATTTCACACAATTCTAAACAAACTCTATGCAACTATACCCATAAGTCCAGATGGGCTTAGCAA
 GTCAAGTTGAATGATACTCAACAAAGATCAACTCTGTCATCCAGCAAAATACACCATCAACGGAGCACAGGAGA
 TAGTATTGATACTCTAATTATGATGTCAGAAACACATCAATAAGTTATGTCATGTTAAATCACAGAAGATG
 CTAATCATAAATTCACTGGTTAATAGGTATGTTATGCGATGTCAGGTTAGGAAGAGAACACCAAAATA
 CTCAGAGATGCGGGATATCATGTAAGAACATGGAGTAGATGTAACACACATGTCAGGACATTAATGGAAAAGA
 AATGAAATTGAAAGTGTAACTGGCAAGCTTAACAACTGAAATTCAACATTGAGAATGAAATCTAGAAAAT
 CCTACAAAAAAATGCTAAAGAAATGGGAGAGGTAGCTCCAGAATACAGGATGACTCTCTGATTGGGATGATA
 ATATTATGTATAGCAGCATTAGTAATAACTAAATTAGCAGCAGGGGACAGATCTGGCTTACAGCCGTGATTAGGAG
 AGCTAATAATGCTCTAAAGAACGTTACAAAGGTTACTACCCAAAGGACATAGCCAACAGCTTCTATG
 AAGTGTGAAAACATCCCCACTTATAGATGTTTGTCAATTGGTATAGCACAATTCTTACCAAGGGTGGC
 AGTAGAGTTGAAGGGATTGGCAGGATTGTTATGAATGCTATGGTCAGGGCAAGTGTGTTACGGTGGGAGT
 CTAGCAAATCGGTTAAAATTATGTTAGGACATGCTAGTGTGCAAGCAGAAAATGGAACAAGTTGTTAGGTT
 ATGAATATGCCAAAAATTGGGTGGTGAAGCAGGATTCTACCATATAATTGAAACACCCAAAGCATCATTATTCT
 TTGACTCAATTCTCACTTCTCAGTGTAGTATTAGGCAATGCTGTCGGCTAGGCATAATGGGAGAGTACAGAGG
 TACACCGAGGAATCAAGATCTATATGATGTCAGCAAGGCTATGCTGAACAACTCAAAGAAAATGGTGTGATTAACT
 ACAGTGTACTAGACTGACAGCAGAAGAACTAGAGGCTATCAAACATCAGCTTAATCCAAAGATAATGATGTTAGAG
 CTTGAGTTAATAAAAATGGGCAAATAATCATGAAAAGTTGCTCTGAAATTCCATGGAGAAGATGCAA
 CAACAGGGCTACTAAATTCTAGAATCAATAAGGGCAAATTCACTACCCAAAGATCCAAGAAAAAGATAGTA
 TCATATCTGTCACATCAATAGATATAGAAGTAACTAACAGGAAAGCCCTATAACATCAAATTCAACTATTATCAACCC
 ACAAAATGAGACAGATGACTGCAAGGGAAACAAGCCAAATTCAAAGAAAACCTCTAGTAAGTTCAAAGAACGACCC
 TACACCAAGTGATAATCCCTTCTAAACTATACAAAGAACATGAAACATTGATAACAAATGAAAGAACATCCA
 GCTATTCTACGAAGAAATAATGATCAGACAAACGATAATAACAGCAAGATTAGATAGGATTGATGAAAAATT
 AGTGAATACTAGGAATGCTTCACACATTAGTAGTGGCAAGTGCAGGACCTACATCTGTCGGGATGGTATAAGAGA
 TGCCATGGTGGTTAAGAGAAGAAATGATAGAAAAAAATCAGAACTGAAGCATTATGACCAATGACAGATTAGAAG
 CTATGGCAAGACTCAGGAATGAGGAAGATGGAAAAGACACATCAGATGAAAGTGTCTCAATCCAACA
 TCAGAGAAAATTGAACACCTATTGGAAGGGAAATGATAGTAGTGCACATGATCTATGACTTCACTGAAAGATTCTGATTAGTTAC
 CAATCTTCACATCAACACACAATACCAACAGAACAGACAAACTACCAACCCAAATCATCCAACCAACATCCAC
 CGCCAATCAGCCAAACAGCCAACAAAACAACCCAGCCAATCCAAAACCTAACCAACCCGGAAAAATCTATAATAGTT
 ACAAAAAAGGAAAGGGTGGGCAAATATGGAACACATACGTGAACAGCTTCACGAAGGCTCCACATACACAGCTGC

20

30

40

50

TGTTCATAACATGTCTAGAAAAAGACGATGACCTGCACTTACAATATGGGTGCCATGTTCCAATCATCTA
 TGCCAGCAGATTACTTATAAAAGAACTAGCTAATGTCACACATACTAGTGAACAAATCCACACCCAAAGGGACCT
 TCACTAAGAGTCATGATAAAACTCAAGAAGTGCAGTGCTAGCACAAATGCCAGCAAAATTACCATATGCGCTAATG
 GTCCCTGGATGAAAGAACGAAACTAGCATATGATGTAACCACACCCCTGTGAATCAAGGCATGTAGTCTAACATGCC
 TAAAATCAAAAATATGTTGACTACAGTTAAAGATCTCACTATGAAGACACTCAACCCACACATGATATTATGCT
 TTATGTAATTGAAAACATAGTAACATCAAAAAGTCATAATACCAACATACCTAACATGTCAGTGTAGAAA
 TAAAGATCTGAACACACTGAAAATATAACAACCACTGAAATTCAAAATGCTATCACAAATGCAAAATCATCCCTT
 ACTCAGGATTACTATTAGTCATCACAGTGACTGACAACAAAGGAGCATTCAAAATACATAAAGCCACAAAGTCATT
 ATAGTACATCTGGAGCTACCTGAAAAGAAAGTATATATTATGTTACCAACAAATTGGAAGCACACAGCTACACG
 ATTGCAATCAACACCATGAAAGATTAACCTTTCCCTCATCAGTGTGTTAACATACAAACTTCTACCTAC
 ATTCTTCACTTCACCATCACAAACACTCTGTGTTCAACCAATCAACAAACACTTATCTGAAGTCCCAGAT
 CATCCCAAGTCATTGTTATCAGATCTAGTACTCAAATAGTTAATAAAAATATACACATGGGCAAAATACTT
 GGAGGAAATCCAACTAATACAATATGTTAACATAGACAAGTCCACACACCACAGAACATCAACCAATGGAAAAT
 ACATCCAACAAATAGAATTCTCAAGCAAATTCTGGCCTACTTACACTAATACACATGATCACAACAAATACTC
 TTGCTAATCATATACTCATCATGATTCACAAACTTTGTAATAACATGATTCCATAACAAAACCT
 TTGAGTTACCAAGAGCTGAGTTAATCTGTTAAAGTAGTTAATAAAATAGTCATAACAAATGAACTAGGATATC
 AAGACTAACATAACATGGGCAAATGCAACATGTTCAAAACAAAGGAGCAACGGCACCCTGAAGCATTAGAAAAG
 GACCTGGCACACTCTAACATTATTCATATCATCTGTGTTATAAGTTAAATCTTAGCTAGCACAAA
 TCACATTATCATTCTGGCAATGATAATCTCAACTTCACTTAAATGTCAGGCCATCATATTCTAGCCTCGGCAAAC
 CACAAAGTCACACCAACAACTGCAATCATACAAGATGCAACAGCCAGATCAAGAACACAAACCCACACACTC
 CCAGAACCTCTCAGCTGGAATCAGTCCCTAATCCGCTGAAATTACATCACAAATCACCACATACTAGCTCAA
 CAACACAGGAGTCACCTCACCCACAAAGTCACAGGACAAAAACAAACAAACACTCAAACACAAACCC
 AGCAAGCCCACACAAACGCAACAAACACCAAGAACACAAACCCAAATATGTTTCACTTGAAGTGTCAA
 CTTGTACCTCTGGCAGCATATGCAACATCAACCTGTTGGCTATCTGCAAAGAACATACCAACAAAACCCAG
 GAAAGAAAACCACTACCAAGCCCACACAAACCAACCTCAAGAACACAAAAAGATCCAAACCTCAAACCACT
 AAATCAAAGGAAGTACCCACACCAAGGCCACAGAACGCAACCATCAACACCACAAACAAACATCATAACTAC
 ACTACTCACCTCAACACCAACAGGAATTCAGAACTCACAGTCAAATGGAACCTTCCACTCAACTTCCCTCGAAG
 GCAATCCAAGGCCCTCTCAAGTCTCACACATCCGACTACCCATCACAACTTCTCATCTCACCAACACACAGC
 CAGTAGTTACTAAAAACATATTACACAAAGGCTGTTGACCAACTAACAGAACATCAAATAACTCTGGGCAA
 TAACAATGGGAGTCTAACATCCTCAAACCAAATGCAATTACCAACATCTACTGCACTGACATCATTGTTGCTCT
 GGTCAAACATCACTGAAAGATTATCATCAACATGCACTGAGTTAGCAAGGCTATCTAGTGTGCTGAGAAC
 TGTTGGTATACCAGTGTATAACTATAGAATTAAAGTAATATCAAGAAAATAAGTGTATGGAACAGATGCTAAGG
 TAAAATTGATAAAACAAGAATTAGATAAAATAAAAATGCTGAAACAGAATTGCACTGCTCATGCAAAGCACACAA
 GCAACAAACAAATCGAGCCAGAAGAGAACATACCAAGGTTATGAAATTACACTCAACATGCCAAAAACCAATGT
 AACATTAAGCAAGAAAAGGAAAGAATTCTGGTTTTGTTAGGTGTTGGATCTGCAATGCCAGTGGCGTTG
 CTGTATCTAACGGCTCTGCACAGTAGGGGAAGTGAACAGATCAAAGTGTCTACTATCCACAAACAGGCTGTA
 GTCAAGCTTATCAAATGGAGTTAGTGTATAACCCAGCTGTTAGACAGTGTGACATGCAACCTTCCACAGTCAA
 TAAAGTTCAATCAACATGGAGTTAGTGTATAACCCAGCTGTTAGACAGTGTGACATGCAACCTTCCACAGTCAA
 TTGACATATTCAACCCCAAATATGATTGTTAAATTATGACTTCAAAACAGATGTAAGCAGCTCGTTACATCT
 CTAGGAGCCATTGTCATGCTATGGCAAACACTAAATGACAGCATCCAATAAAATGTTGAACTACAAAGACATT
 TTCTAACGGTGCATTATGATCAAATAAGGGGTGACACTGTGCTGTAGTAAACATTATGAAATA
 AGCAACAGGTTAAAGTCTATGTTAAAGGTGAACCAAATAAAATTCTGACCCATTAGTATTCCCTCTGAT
 GAAATTGATGTCATATCTCAAGTCAACGAGAACATTAACAGAGGCTAGCATTTCTGAAATCCGATGAATT
 ATTACATAATGTAATGTTGAAATCCACACAAATCATGATAACTATAATTATGATTATGTTAATGTTAAT
 TGTTATCATTAATTGCTGTTGACTGCTCTATGTTAGTCAAGGCCAGAACACAGTCACACTAACAGAACATCAA
 CTGAGTGGTATAAAATAATTGCTTAACTAAATAAAATAGCACCTAATCATGTTCTACATGGTTACTA
 TCTGCTCATAGACAACCCATCTGTCATTGGATTCTTAAATCTGAACTTCTCATCGAAACTCTCATATAACCAT
 CTCACTTACACTATTAAAGTAGTATTCTAGTTATGTTATATAAAACACAATTGCACTGCCAGATTACCATC
 TGAAAAATGAAAACCTGGGCAAATATGTCACGAGGAATCCTTGCACAAATTGAAATTGAGGCTATTGCTTAAATG
 GTAAGAGGAGTCATTAGTCATAATTGAAATGCCACCCCTGACTGCTGTGAAAGACAAAACCTTATGTTA
 AACAGAACACTTAAGCTATTGATAAAAGTATAGACCTTATCAGAAATAAGTGGAGTGTGAGGTTGAGAAC
 AGAAGAGTATGCTTGGTAGTTGGAGTGTAGAGGTTATAGGATCAATAAAACAAATAACTAAACATCAG
 CATGTTGCCATGAGCAAACCTCTACTGAACATAGTGTGATATCACAAAGCTGAGGGACAATGAAGAGCTA
 AATTCAACCAAGATAAGAGTGTACAATACTGTCATATCATATATTGAAAGCAACAGGAAAACAATAACAAACTAT
 CCATCTGTTAAAAGATTCAGCAGACGCTATTGAAAGAAAACCATCAAAACACATTGATATCATAAGAGCATAA
 CCATCAACAAACCCAAAAGAACATCAACTGTTAGTGTACACATGACCAAAATAATGATACACTTGTGACAATA
 AGCTTCAATTCTAACACTCACCACATGTTACATTATTAATTCAACAAATTCAAGTTGIGGACAAAATGGATCCCA
 TTATTAAATGGAAATTCTGCTAATGTTTACCTAACCGATAGTTATTAAAAGGTGTATCTTCTCAGAGTGTAAAT

10

20

30

40

50

GCCTTAGGAAGTTACATATTCAATGGCCTTATCTCAAAATGATTACCAACTTAATTAGTAGACAAAATCCATT
 AATAGAACACATGAATCTAAAGAAACTAAATATAACACAGTCCTTAATCTAAGTATCATAAAGGTGAATAAAAT
 TAGAAGAACCTACTTATTTCACTTATGACATACAAGAGTATGACCTCGTCAGAACAGATTGCTACCACT
 AATTACTTAAAGATAATAAGAAGAGCTATAGAAATAAGTGTGATGCTATGCTATATGATAAAACTAGG
 GCTTAAAGAAAAGGACAAGATAATCCACAATGGACAGATGAAGACAACCTCAGTTATTACGACCATAATCAAAG
 ATGATATACTTCAGCTGTTAAAGATAATCAATCTCATCTAAAGCAGACAAAATCACTCTACAAAACAAAAGAC
 ACAATCAAACACACTCTGAAGAAATTGATGTGTTCAATGCAACATCCTCCATATGGTTAACATGGTTAA
 CTATACACAAATTAAACACATATTACACAGTATGATCAAATGAGTAAACACATGGTTACATTGATAG
 ATAATCAAACCTTAGTGTGATTCAATTATTTGAAACCATGGTTGATAGTTATCATAAGGAACCTCAAAGA
 ATACTGTGACAACCTATAATCAATTCTGACATGGAAAGATATTACGCTTAGTAGATTAAATGTTGTTAATTAC
 ATGGATTAGTACTGCTGACAACATTAATAAAAGCTTAGGCTTAAGATGCGGATTCAATAATGTTATCTGACAC
 AACTATTCTTATGGAGATTGTTACTAAAGCTATTTCACAATGAGGGTTCTACATAATAAAAGAGGTAGAGGGA
 TTATTATGTCCTAATTAAATATAACAGAAGATCAATTGAGAAACGATTATAATAGTATGCTCAACAA
 CATCACAGATGCTGCTAATAAGCTCAGAAAATCTGCTATCAAGAGTATGTCATACTTATTAGATAAGACAGTGT
 CCGATAATATAAAATGCGAGATGGATAATTCTATTAGTAAGTCTTAAATTAAATTAAGCTGCTGAGGTGACAAT
 AACCTTAAACAATCTGAGTGAACATATTGTCAGATGAGCAAATTTCAGTGTGAGTGAAGAGCAAGCCAT
 GGATGCTGTTAAATTAAATTGCAATGAGCAAATTTCAGTGTGAGTGAAGAGCTGAGTGTGAGGTCCTTA
 TATATAGAATTATAAAAGGGTTGAAATTAACTACACACTTATCCTCTTGTGAACTTACAGAAAAGAGATTGATTGTTATC
 AGGACTACGTTCTATCGTAGTTGCTTGTGCTAAAAAGTGGATCTGAAATGATTATAATGATAAAAGCTATAT
 CACCTCTAAAATTGACTATGGACTAGTTCCCTAGAAATTACATGCTCACACATACAAAATATAGAACAT
 GAAAATTAAATTCCGAGAGTGTAAATCAAGAAGACTTAAAGTGTATTAAAGATAACAAATTCAATGA
 ATGTGATTATAACACTGTGTTAGTAACTAAAGTTATCTCAACAAACCTTACATGTTGATCTGACAGGCAAAG
 AAAGAGAAACTCAGTAGGTAGATGTTGCAATGCAACGGGAATGTCAGACAGGTTCAAATTGGCAGAGAAA
 ATGATACTGAAAACATTACAATTCTCTGAAAGCTTACAAGATATGGTAGTGTAGAACTACAAAATATT
 AGAACTGAAAGCAGGAATAAGTAACAAATCAAATCGCTACAATGATAATTACAACAAATTACATTAGTAGCTCTA
 TCATCACAGATCTCAGCAAATTCAATCAAGCATTGATGAAACGTCATGTATTGTTAGTGTGCTGGATGAA
 CTGCTATGTCATACTCTATTCTCTGTTACATTAACTATTCCCTCATGTCACAATAATGCACTATAGGCA
 TGCACCCCCCTATAGGAGATCATTTGAGTCTTAAACATGAGTGAACAAAGTGGATTATAGATACTAC
 TGGGTGCGATCGAAGGCTGGTGTCAAAGGACTATGGACATAGAAGCTTACATTCTACTATGGATCTAATCTCTCAA
 GGGAAATTCTCAATTACTGCTTAAATTAAATGGTACAATCAATAGATAAAAGCAAACCAATCAGACTCATGGA
 AGGTCAAACCTCATGCTCAAGCAGATTATTGCTAGCATTAATAGCCTTAAATTACTGTATAAGAGTATGCGAGGCA
 TAGGCCACAAATTAAAGGAACCTGAGACTTATATACAGAGATATGCAATTATGAGTAAACAAATTCAACATAAC
 GGTGTATATTACCCAGCTAGTAAAGAAAGCTTAAAGACTGGGACCGTGGATAAACACTTACATTGATGATTCAA
 AGTAGACTGAGATCTAGGTTAGTGTGACACAAGATAAGGATCTATTGCACTTAAAGGCTTAAATGCACTTAAAT
 TTGAGAATGTTAGGTTATATACTGAGTGTCTACAATTAAAGGCTTAAACATGCTTAACTGCTTAAACAAATTAAACTTATTTG
 GACATATTAAAGGGTTGAAACACTTAAACCTTAAATCTGATAATTGATACAGCATTAACATTGTTAT
 GAATTACCCATGTTATTGGTGTGTTGATCCCAACTGTTATCTGAAAGTTCTATAGAAGACTCTGACTTCC
 TCACAGAGGCTATGTTACTCTGTGTCTACTTGTATTATAACAAACATGACTTAAAGATAAACTTCAAGAT
 CTGTCAGATGAGATTGAAATAGTCTTAAACATGCTTACAGTTGACAAAACCTTACATGCTGAACTCGAAC
 ATTGATGAGAGATCTCAAGCTTGGGCTGAGAGACAGCTAAATTACTAGCGAACATCAATGACTGCGAGTTA
 CAGAGGTTTGGTAGCTCAGCTCAAACAAACATTCTCCAAAAGTGCACAACATTACTACTACAGAGATAGATCTA
 AATGATATTATGCAAAATATAGAACCTATATCTCATGGCTTAAGGTTGTTATGAAAGTTACCCCTTATAA
 AGCAGAGAAATAGTAAATCTTATAGGCTACAAAATCTATAACTACATGTTAAAGGAAACTCTGCCATAGACT
 TAACAGATATTGAGAGCCACTGAGATGATGAGGAAAAACATAACTTGTATAAGGATACTCCATTGGATTG
 AACAGAGATAAAAGAGAGATTGAGTTAGGAAACCTAAGTATTACTGAAATTAGCAAAATATGTTAGGGAAAGATC
 TTGGTCTTATCCAATATAGTGTGTTACATCACCCAGTATCATGTTACAGTTAACAGCTGAGAGGAGCCACTAAACCA
 CTGATCTAGTGGCATAATTAGAGAAATATAATGTTACAGTTAACAGCTTACAGCTGAGAGGAGGAGAGA
 TGGGTGTTCTCTACACAGAGAAAAACAAATGCCAGTTATAAGACAAGCTTAAACAAAAAAACAGAGAGA
 TCAAATGATCTATTGCAAAATTGGGTTGGGTGATGCTCATCTATAGATAACAGGATGAAATTGATGAAAGACTCA
 GCATAGAACCTTGGGTTACATGAAAGGCCAAAGATTATTCCACAAATTAAAGTGTCAATTATTGCT
 CGCCTACAGTCAGTAGACCATGTCATGTTACCTGCTCATCAATACAGCTTATAGAACAACAAATTACTAC
 CACTAGCCCTTAAATCGCATTTAACAGAAAAGTATGGTAGAAGATATTGACATAGTATTCCAAAATGTATAA
 GCCTTGCCTTACTGAGTGTAGAACAATTACTAATGTTGCTTAAACAGAATTATTCTCATACCTAAG
 CTTAATGAGATACATTGATGAAACCTCCCATATTCAACAGGTGATGTTGATATTCAACAGTTAAAACAAGTGTAC
 AAAACAGCATATGTTTACAGACAAAATAAGTTGACTCAATATGTTGAAAGTTATTCTTAAAGTAATAAAACACTCA
 AATCTGGATCTCATGTTATCTAATTATAATTGGCACATAAAATCTGACTTATTCTATAGTAACTTACATT
 AGTACTAATTAGCTGGACATTGGATTCTGATTATAACACTTATGAAAGATTCTAAAGGTATTTGAAAAGATTG
 GGGAGAGGGATATATAACTGATCATATTGTTATTGAAAGTTCTCAATGCTTAAAGACCTATCTCTTGT
 GTTTTCATAAAAGGTTATGGCAAGCAAAGCTGGAGTGTGATATTGAAACACTTCAGATCTCTATGTTATTGAA
 ATAGACAGTAGTTATTGCAAGTCTATGCTAAGGTATTGAAACAAAAGTTACAAATACATTCTAGGCCAAGA
 TGCAAGTTACATAGGATGTCATGCTTAAACATTGTTCTAAACGCTTAATGTCAGAGATTCA
 CAGTTGCCCTGGGTTAACATGAGTATTCTACATGCAACACATGAAAGCAATTAAACTTATATAGATCTGTT
 AGAATGGGATTGATAAAATAGATAAGAATACACATTAAAACACAAATTCAATGATGAATTTTACTCTCAA

10

20

30

40

50

TCTCTTCTACATTAATTATAACTTCTCAGATAATACTCATCTATTAACTAAACATAAAGGATTGCTAATTCTGAAT
 TAGAAAATAATTACAACAAATTATCATCCTACACCAGAAACCCTAGAGAATATACTAGCCAATCCGATTAAAGT
 AATGACAAAAAGACACTGAATGACTATTGTATAGGTAAAATGTTGACTCAATAATGTTACCATGTTATCTAATAA
 GAAGCTTATTAATCGCTGCAATGATTAGAACCAATTACAGCAAACAAGATTGTATAATTATTCCTATGGTG
 TGATTGATAGAATTATAGATCATTAGGCAATACAGCCAACTTACACTACTTACCTACCAACCAATA
 TCCTTAGTGCACAATAGCACATCCTACTGCATGCTCCCTGGCATCATATTAAAGATCAATTGTTATTTAG
 TTCTACAGGGTGTAAAATTAGTATAGGTATTTAAAAGATCTTAAAGATCCCAATTGTTAGCATTCA
 TAGGTGAAGGAGCAGGGAAATTATTGCGTACAGTAGTGGAACTTCATCCTGACATAAGATATAACAGAAGT
 CTGAAAGATGCAATGATCATAGTTACCTATTGAGTTAAGGCTGTACAATGGACATATCAACATTGATTATGG
 TGAAAATTGACCATTCTGCTACAGATGCAACCAACATTGCTTACATATAAGTTGCTGAAC
 CTATCAGTCTTTGCTGTGATGCCGAATTGCTGTAAAGCTTAAAGATGGAGTAAATTATAAGATGGAGCAAG
 CATGTAAGAAAGTGAAGTACTGTCCTCAGTTAAAGTATGTTAATAGTAAAGATCATGCTCAAGATGATAT
 TGATTTCAAATTAGACAATAACTATATTAAAACCTATGTTAGGCAAGTTAAAGGGATCGGAGGTT
 ACTTAGCCTTACAATAGGTCTGCGAATATACTCCAGTATTAAAGTACTGCTAAATTGATACTATCA
 AGAACCAAAATTCTCATGCCTAAAGAACCTGATAAAAGAGTCTATTGATGCAAATTAAAAGTTGATACCTT
 TCTTTGTTACCCCTATAACAAAAAGGAATTAAACTATGCTTAAAGTGTGTTAGTGGAGATATA
 TATCATATTCTATAGCTGGACGTAATGAAGTTTCAAGCAATAACTATAATCATAAGCATATGAACATCTAAA
 TGGTCAATCATGTTTAAATTCAAGATCAACAGAACTAAACTATAACCATTTATATGGTAGAATCTACATATCC
 TTACCTAAGTGAATTGTTAACAGCTTGACAACCAATGAACTAAAAAACTGATTAAACATCAGGTTCTGTT
 ACAACTTCATAATGAATAATGAAATAAGATCTTATAATAAAAATTCCATAGCTATACACTAACACTGTATTCAAT
 TATAGTTTAAATTAAATCATATAATTTTAAACTTTAGTGAACTAATCTAAAGTTATCATTAA
 TCTTGGAGGAATAATTAAACCTAATCTAATTGGTTATATGTGTTAAACTAAATTACGAGATATTAGTTTG
 ACACTTTTCTCGT

10

【0126】

G001BBをコードするポリヌクレオチド配列(SEQ ID NO:8)

ATGTCTAAGACAAAGGATCAGCGGACAGCCAAAACACTGGAACGGACATGGGATACCCGATCACCTCCTCTCAT
 CAGCAGTTGCCGTACAAGCTCAATCTGAAAGTCCATGCCAGATCACTCTCCATCCTGCCATGATCATCTCA
 CAAGCCTCATCATTGCCCAATTATCTTCATGCCAGCGTAACCACAAGGTCCCCCTTACCAAGGCCATTATTAG
 GATGCCACCAACCAGATCAAGAACACAACCCCTACCTACCTGACACAGAACCCCTAGCTTGAATTCACTGAGCAA
 CCTGTCGAAACCACATCTAAACCTACAACCATCTTGGCTCTGACCACACCAACGCCAGTCCACCCCAACAAAGTA
 CCACAGTGAAGACCAAAACACCACACAGATTGAGCAAGCAAGCTACAACTAAGCAAAGGAGAACAAG
 CCACAGAACAAACCAACACGACTTCACTTGAGGTGTTCAACTTTGTCCTGCTCCATTGCTTCAACAAACCC
 TACCTGTTGGCTATCTGCAAGAGGATCCCCAACAGAACAGCCGGCAGGAAGACTACTAAGCCTACTAAACAGC
 CAGCCATTAAAGACCACTAAGAAGGACCAAAAGCCACAGACAACCAAGCCAAAGGAGGTGCTCACTACCAAGCCCAC
 GAGAACAGCCACCATTAACACCACTAAACCAACATCCGACAACATTGCTGACATCAAACATTACAGAGAACCCAGGA
 GCACACAAAGCCAGAAGGAGACACTGCATAGCACTACATCCGAGGCAATCCCAGCCAAAGCCAGGTCTATACTACCT
 CAGAGTACCTGTCAGGCCAGGCCCTAGCAACACTACTAGATGGTAG

20

【0127】

FBBをコードするポリヌクレオチド配列(SEQ ID NO:9)

ATGGAGCTCCTATTCTCAAAGCCAACGCAATCACAAACATTCTGACGCCGTACATTCTGCTTGCCTCCGGACA
 GAACATCACAGAACAGAGTTTACCAAGTACATGCAGCGCGTGAGCAAAGGCTACCTGTCGCCCTGAGGACAGGGT
 GGTACACATCCGTGATTACCATGAGCTGAGTAATATCAAGAACAGTGCACCGCAGTGATGCCAAAGTGAAG
 CTCATTAAACAGGAACCTGATAAGTACAAGAACGCCGTGACTGAGCTCCAGCTGCTGATGCACTCAGGCTAC
 AAACAAACAGGCCGGAGGGAGCTGCCAGGTTATGAACTACACCCCTGAACACGCCAAGAACAGCAACGTGACAT
 TGAGCAAGAACAGGAGGAGCGCGGTCTGGTTCTGCTAGGTGTCAGCGCTATTGCTTCTGGCGTCGCCGT
 TCCAAGGTGTCACCTGGAAGGCGAAGTGAATAAGATTAAGTCCGACTGCTTAGCACCATAAGGCCGTGAG
 CCTGCTAACGGAGTGAAGTGTGCTACAAGCAAGGTCTCGATCTCAAGAAACTACATTGATAAGCAGCTCTGCCCA
 TCGTCAACAAAGCAGTCATGCTCATTAGTAACATCGAGACCGTGATTGAAATTCAACAGAACAAACCCGCTCCTG
 GAGATTACTAGGGAGTTCAGCGTGAACGCCGGGTGACAACACCCAGTCTCCACCTATATGCTTACCAACAGCGAGTT
 GCTCTCCCTGATTAACGATATGCCAATTACAAACGACCAGAACAGTGTCAAACACGCTTGTGAGGCTTGTGAG
 AGCAGTCTACTCAATCATGTCATTATTAAGGAGGAGGCTGGCTTACGTCGTGAGCTGCCCTTTATGGGGTG
 ATCGACACCCCTTGCTGGAAGGCTCCATACATCCCTCTGCACTACCAACCCAAGGAGGGTCCAACATCTGCTT
 GACAAGAACCGATCGCCGCTGGTACTGCGATAACGCAGGGAGTGTCTCTTCCACCTATATGCTTACCAACAGCGAGTT
 TGCGAGTCTAACCGCGTCTCTGCGACACCATGAAACGCCCTGACCCCTCCAGCAGGTGAACCTTTGTAACGTGGAC
 ATCTTCAACCAAAGTATGATTGTAAGATTATGACTAGCAAACCGATGTCAGCAGCAGCGTGATCACTAGCCTGGG
 CGCTATCGTCACTGCTACGGAAAGACTAAGTGCACCGCCAGCAACAGAACAGAGGCTACATCAAGACCTCAGTA
 ATGGATGTGACTACGTGTCACAAAGGGGGTGGATACAGTGAAGCGTGGAAACACATTGTACTACGTGAACAAACAG
 GAGGGGAAGTCCTGTAAGTGAAGGGTGAGGCCATTATCAACTCTACGACCCCTCTCGTGTCCCATCAGACGAGTT
 TGACGCCCTCATCTCCAGGTGAACGAGAACAGTCAATCAGTCAGTCACTGCCCTTATTAGGAAATCCGACGAGCTGCTGC
 ACAACGTCAACGCCGGAAAGTCTACCAACTAACATCATGATCACCAACATCATCATTGATCATCGTCACTCCTG
 AGCTTGATCGCTGTCGGGTTGCTGTTACTGCAAGGCCGGTCCACACCCGTGACTCTGAGCAAGGACCAGCTGTC
 TGGCATTAAACACATGCCCTTAGCAACTAA

40

50

【0128】

F001をコードするポリヌクレオチド配列(SEQ ID NO:10)

ATGGATTTGCCAATCCTCAAGACAAATGCTATTACCACCAATCCTGCTGCAGTCACACTCTGTTGCTCCAGTC
 AAATATCACTGAAGAATTATCAATCAACATGCAGTCAGTTAGCAAAGGCTATCTTAGTGTCTAAGAACTGGTT
 GGTATACTAGTGTATAACTATAGAATTAAGTAATATCAAGAAAATAAGTGTAAAGGCTAAGGTTAAA
 TTGATAAAACAAGAATTAGATAAATATAAAATGCTGTAAAGAACAGTCAGTTGCTCATGCAAAGCACGCCAGCATIC
 CAACAAATCGAGCCAGAAGAGAACTACCAAGATTTATGAATTATACACTCAACAAATACCAAAACACCAATGTAACAT
 TAAGCAAGAAAAGGAAAAGAAGATTCTGGTTTTGTAGGGTTGGATCTGCAATGCCAGTGGCATTGCTGTA
 TCTAAGGTCTGCACTAGAAGGGAAAGTGAACAAATCAAAGTGTCTACTATCCACAAACAAGGCTGTAGTCAG
 CTATCTAATGGAGTCAGTGTCTAACCAAGTGTAGATCTCAAAGTATAAGATAAACAGTTGTTACCTA
 TTGTGAACAAGCAAAGCTGCAGCATATCAAACATTGAAACTGTGATAGAGTCCAACAAAGAACACAGACTACTA
 GAGATTACCAAGGGATTAGTGTAAATGCAGGGTAACTACACCTGTAAGCATTATGTTAACTAATAGTGAATT
 ATTATCTAATCAATGATATGCCATAACAAATGATCAGAAAAGTTAATGTTCAACAAATGTTCAAATAGTAC
 AGCAAAGTTACTCTATCATGTCAATAATAAGGAGGAAGCTTAGCATATGTAGTACAATTACCACTATATGGTGT
 ATAGATACACCTTGTGGAAACTGCACACATCCCCTCTATGTACAACCTACACAAAGGAAGGGTCCAACATCTGCTT
 AACAAAGAACCGACAGGGGATGGTACTGTGACAATGCAGGATCAGTATCTTTCCCACAGCTGAAACATGTAAG
 TTCATCGAATCGGGTATTTGTGACAAATGAACAGTTAACATTACCAAGTGTAGGTAATCTCTGCAACATTGAC
 ATATTCAACCCCAAATATGATTGAAAATTATGACTTCAAAACAGATGTAAGTAGCTCTGTTATCACATCTTAGG
 AGCCATTGTCATGCTATGGCAAACAAATGTCAGCAGTCCAATAAAAATGTTGAGGATCATAAGACATTTCTA
 ATGGGTGTGATTATGTATCAAATAAGGGGTGGAACTGTGCTGTAGGTAATACATTATATTGTAATAAGCAA
 GAAGGCAAAGTCTCTATGTAAGGTAACCAATAATAATTCTATGATCCATTAGTTCCCCTCTGATGAATT
 TGATGCATCAATATCTCAAGTCAGGAGATAACCAGAGTCTAGCATTATCCGTAATCAGATGAATTATTAC
 ATAATGTAATGCTGGTAAATCCACCAAAATCATGATAACTACTATAATTAGTAATGTTAGTAATATTGTTA
 TCATTAAATTGCAGTTGACTGCTCTATACTGCAAGGCCAGAACACCAAGTCACACTAAGTAAGGATCAACTGAG
 TGGTATAAAACAATATTGCATTAGTAGCTGA

10

20

【0129】

F001BBをコードするポリヌクレオチド配列(SEQ ID NO:11)

ATGGACCTTCAATCCTGAAGACCAACGCTATCACCACCATCCTCGAGCTGTGACTCTTGTGCTCGCATCCTCCCA
 AAACATCACCGAAGAGTTCTACCAGTCCACCTGTTCCGAGTCAGTCTAAGGGATACCTTAGCGCTCTCAGAACCGGAT
 GGTACACATCCGTGATCACTATCGAAGTCAGCAACATCAAGGAGAACAGTCACGGCACCAGCTAAGGTGAAG
 CTCATCAAGCAGGAACCTGGACAAGTACAAGAACGCCGTGACCGAACCTCAGCTCCTTATGCACTCTACCCAGCTC
 CAACAAACAGGCCAGAAGGGAGCTCCCAAGGTTATGAACACTACACCTCAACAAACACCAAGAACACCAACGTGACCC
 TGTCCAAGAAGAGGAAGAGGCCGTTCTGGATTCCCTTGGAGTCAGTCTGCTATGCCCTCAGGCATTGCCGTC
 AGTAAAGTGTGATTGGAGGGCAGGTCAACAAATCAAGTCCGCTTGTGTCACAAACAGGCCGTGTC
 TTTGTCCAACGGGTGTCGTGTTGACAAGTAAGGTGTGGACTTGAAGAACTACATCGACAAGCAGCTGCTGCTA
 TCGTCAACAAAGCAGTCTGCTTATCAGCAACATCGAGACCGTGTAGCTGAGTCCAGCAGAACACGGCTGCTG
 GAGATCACAAGGAGTTCACTGTCACGCCGGTCAACACACCTGTCACACTATATGTCAGAAACTCAGAGCT
 GCTGTCAGTCAACGACATGCCATTACCAACGACCAAGAACAGCTGATGAGCAACAACGTGCAAGATCGTGAGGC
 AGCACTACAGCATGTCCATTACCAAGGAGGAAGTCAGTGGCTACGTGGTCAACTGCCTCTGACGGCGTG
 ATTGATACTCATGGAAAGCTGCACACATCACCACGTGTACCACTACACCAAGGAGGGAGTAACATCTGCC
 GACTCGGACAGATAGAGGGTGGATTGCAATGCCGGAGTCAGTGTCTCTTCCCCCAGGCCAGACTTGCAAAG
 TCCAGAGCAATCGGTGTTTGCATAACATGAATAGCTGACACTCCCCAGCGAGGTGAATCTCTGCAATATTGAT
 ATTTCACCCCAAAGTACGACTGCAAGATCATGACCAGCAAGACCGACGTCAAGCAGCGTGAATTACTAGCCTCG
 AGCCATTGAGCTGCTATGGAAAACAAACAGACAGGCTTACAGAACACGGCTTACAGAACACAG
 ACGGGTGCGATTACGTGTCACAAAGGGCGTGGACTGTGAGCGTGGGAAACACACTCTACTACGTGAACAAACAG
 GAGGGGAAAAGCCTGTACGTGAAAGGCGAGCCATTATAACTTTACGACCTCTGGTGTCCAGCGATGAGT
 TGATGCCAGCATCTCCAGGTGAAAGAACATTACCAAGTCCCTCCCTTATCGCAAGAGCGATGAGCTGCTG
 AACACGTGAACGCCGGCAAGTCCACTACAAACATTATGATTACAACATTATTGTCATTGCTCATTCTGCTC
 AGCCTGATTGCCGTCGGCTGCTACTGCAAGGCCAGGTCCACACCGTACACTCAGCAAGGATCAGCTGTC
 CGGCATTAACACATTGCCATTAGCAGCTAA

30

40

【0130】

D46/cp/ M2-2のアンチゲノムcDNA配列(SEQ ID NO:15)

ACGGGAAAAAAATGCGTACAACAAACTTGCATAAAACCAAAAAATGGGCAAATAAGAATTGATAAGTACCACTTAA
 ATTAACTCCCTGGTTAGAGATGGCAGCAATTGAGTATGATAAAAGTTAGATTACAAATTGTTGACAA
 TGATGAAGTAGCATGTTAAAATAACATGCTATACGTATAATGATAAAATTACATTAACTATGCTTGGCTAAGGCAG
 TGATACATACAATTGAATGGCATTGTGTTGCTATACAGTATAACAGTGTATTTGCCCTAATAATAAT
 ATTGTAGTAAAATCAAATTGACACAAATGCCAGTACTACAAATGGAGGTATATGTTGAAATGGAATTAA
 ACATTGCTCTCAACCTAATGGCTACTAGATGACAATTGAAATTAACTCTCCAAAAACTAAGTGTGAAACAA
 TGACCAATTATGAACTAATTCTGAATTACTGGATTGATCTTAATCCATAAAATTATAATTAACTAG
 CAAATCAATGTCACTAACACCATTAGTTAATATAAAACTTAACAGAAGAACAAATGGGCAAATAAAATCAATTG
 CCAACCCAACCATGGACACAAACCCACAATGATAATACACCAACAAAGACTGATGACAGACATGAGACCGTTGTC

50

CTTGAGACCATAATAACATCACTAACAGAGACATCATAACACACAAATTATACTTGATAAATCATGAATGCAT
 AGTGAGAAAATTGATGAAAGACAGGCCACATTACATTCTGGTCACTATGAAATGAAACTATTACACAAAGTAG
 GAAGCACTAAATATAAAAATACTGAATACAACACAAATATGGCACTTTCCCTATGCCAATATTCAATCAT
 GATGGGTTAGAATGCATGGCATTAAAGCTACAAAGCATACTCCATAATATAACAGTATGATCTCAATCCATA
 AATTCAACACAAATTCACACAATCTAAACACAACCTATGCATACTATACTCCATAGTCAGATGGAGCCTG
 AAAATTATAGTAAATTAAACTTAAGGAGAGATAAAAGATAGAAGATGGGCAATAACACCATGGCTTAGCAA
 GTCAAGTGAATGATACTCAACAAAGATCAACTTCTGCATCCAGCAATAACACCATCCAACGGAGCACAGGAGA
 TAGTATTGATACTCCTAATTATGATGTGCAGAAACACATCAATAAGTTATGTCAGTTATTAAATCACAGAAGATG
 CTAACTATAAACTCAGGTTAATAGTATGTTATGCGATGCTAGGTTAGGAAGAGAACCCATAAAATA
 CTAGAGATGGGGATATCATGTAAGAACATGGAGTAGATGTAACACACATCTGAAGACATTAATGGAAAAGA
 AATGAAATTGAAAGTGTAACTTGGCAAGCTTAACACTGAAATTCAACATGAGATAGAATCTAGAAAAT
 CCTACAAAAAAATGCTAAAGAAATGGGAGGGTAGCTCAGAATACAGGCATGACTCTCTGATTGTCAGGATGATA
 ATATTATGTTAGCAGCTAGTAATAACTAAATTAGCAGCAGGGGACAGATCTGGCTTACAGCCGTGATTAGGAG
 AGCTAATAATGCTCTAAAGAAATGAAACGTTACAAAGGTTACTACCCAGACATAGCCAACAGCTCTATG
 AAGTGTGAAAGACATCCCACCTTATAGATGTTGTTCTATTGTTAGCAGGAGATGTTACGGTGGGAGT
 AGTAGAGTTGAGGGATTTTGCAAGGTTAGGATGCTAGTGTGCAAGCAGAAATGGAACAAGTTGTTGAGGTT
 CTAGCAAATGCTCTAAAGAAATGCTTAGGATGCTAGTGTGCAATGCTGCTGGCTAGGCATAATGGGAGAGTACAGG
 TACACCGAGGAATCAAGATCTATGATGCAAGCATACTGCTGAACAACTCAAAGAAAATGGTGTGATTAACT
 ACAGTGTACTAGACTGACAGCAGAAGAACTAGAGGCTATCAAACATCAGCTTAATCCAAAGATAATGATGTAGAG
 CTTGAGTTAAAGAAATGGGCAATAATCATGATGGAAAAGTTGCTCTGAAATTGCTAGGATGTTAGGAG
 CAAACAGGGCTAAATTCCTAGAATCAATAAGGGCAATTTCACATCACCACAAAGATCCCAGAAAAGAGTAGTA
 TCATATGTCACACTAAGATGATGAAAGGCTATAACATCAAATTCAACTTATCAACCC
 ACAAAATGAGACAGATGACTGCAAGGAAACAGCCAAATTCAAAGAAAACCTCTAGTAAGTTCAAGAAGACCC
 TACACCAAGTGATAATCCCTTCTAAACTATACAAAGAAACATAGAAACATTGATAACAATGAAGAAGATCCA
 GCTATTCACTAGAAGAAATAATGATCAGACAAACGATAATATAACAGAAGATTAGATAGGATGTTAGGAA
 AGTGAATACTAGGAATGCTCACACATTAGTAGTGTGCAAGTGCAGGACCTACATCTGCTGGGATGGTAAAGAGA
 TGCCATGGTTGTTAAGAGAAGAAATGATGAGAAAATCAGAACTGAGCATTAACTGACAGATTGACAGATTAGAAG
 CTATGCCAAGACTCAGGAATGGAAAGTGAAGGAAAGATGCCAAAGACATCAGATGAAAGTGTCTCAATCCAACA
 TCAGAGAAATTGAAACACTTGGAGGAATGATGACTGACAATGATCTACTTGAAGATTCTGATTAGTTAC
 CAATCTTCACATCAACACACAAACCAACAGAACAAACAGCCAACTCACCACCCGAAAATCTATAATAGTT
 ACAAAAGGAAAGGGTGGGCAAATATGAAACATAGTGAACAAGCTCACGAAAGGCTCACACAGCTGC
 TTGTCATACATGCTTAGGAAAGCATGACCTGCATCACTTACAATATGGTGCCTATGTCATCT
 TGCCAGCAGATTACTTAAAGAAACTGCTAATGTCACACTAGTGAACAAACATGAAACAAATATCCACACCAAGGGACCT
 TCACTAAGAGTCATGAAACTCAAGAATGCTAGCAGCACAAATGCCCAGCAAAATTACCATATGCGCTAATG
 GTCCCTGGATGAAAGAACACTAGCATATGTAACACACCCCTGTAAGATCAAGGCATGAGTCTAACATGCC
 TAAAATCAAAATATGACTACAGTTAAAGATCTACTATGAAAGACACTCAACCTACACATGATATTGCT
 TTATGTAATTGAAACATAGTAACTACAAAGAAACTGCTATCAGTGTGAGAAA
 TAAAGATCTGAACACACTTGGAAATATAACAAACACTGAACTTCAAATGCAAAATCATCCCTT
 ACTCAGGATTACTTAACTGTCACAGTAACTGACAACAAAGGAGCATTCAAATACATAAAAGCCACAAAGTCATT
 ATAGTAGATCTGGAGCTTACAGTTAAAGAAAGTATGTTACCATGAAACATGGGAGCACACAGCTACAG
 ATTGCAATCAAACCCATGGAGATTAACTTTCTCTACATGTTGTTAACTACAAACTTCTACTAC
 ATTCTTCACCTCACCATCACAAACACTCTGTTCAACCAATCAAACAAACTTATGAAAGTCCCAGAT
 CATCCCAAGTCATTGTTATCAGATCTAGTACTCAAATAAGTTAAATAAAATACACATGGGCAAATACTCATT
 GGAGGAATCCAACATACAATATGTTAACATAGACAAGTCCACACCCATACAGAATCAACCAATGGAAAAT
 ACATCCATAACATGAAACTTCTGGCTTACTTCACTAATACACATGATCACAACAAATACTC
 TTGCTAATCTAAATCTCCATGTTGCAACTAAACAAACTTGTGAATAACGTTACCTCATAACAAACACT
 TTGAGTTACCAAGAGCTGAGTCACACATAGCTCATCAATCCAACAGCCAAACAGTAACTTGCTTAAAGA
 ATGAACACCCCTACCTTCAACACCTCATTAAACATCCCACCATCAAACCAACTATCCATACTAAAGTAGTT
 AATTAAAATAGTCATAACATGAACCTAGGATATCAAGACTAACATAACATTGGGCAAATGCAAACATGCTAAA
 AACAGGACCAACGCAACGCTAACAGACATTAGAAGGACCTGGGACACTCTCAATCATTATTCATCATCGTG
 CTATATGAACTTAACTGACAAATCACATTCTGGCAATGATAATCTCAACTTCACTTA
 TAATTGCAAGCCATATTCTCATAGCTCGGCAACCCAAAGTCACACCAACACTGCAATCATACAAGATGCAACA
 AGCCAGATCAAGAACACACCCAAACATCTCAGCCAACTGTTGAAATGAGTCTGCTTAATCCGCTG
 AATTACATCACAAATCACCCACCATAGCTCAACACACCCAGGAGTCAGTCAACCTGCAATCCACACAGTC
 AGACCAAAACACAACAAACTCAACACACCCAGCAAGGCCACACAAACAGCCAAACAAACCCAGC
 AAACCCAAATAATGATTTCTGGAGTTCAACTTGTACCTGCACTGAGCATATGCGCAACAACTCAACCTGCTG
 GGCTATGCAAAAGAATACAAACAAACCCAGGAAAGAAAACCAACTACCAAGGCCACAAAAAAACCAACCTCA
 AGACAACCCAAAAGATCCAAACCTCAAACACTAACATGAAAGGAGTACCCACCCACAGAAGAGGCCA
 ACCATCAACACCCACCAAAACACATCAACTACACTCACCCTCAACACCCAGGAAATCCAGAACTCACAAG
 TCAAATGAAACCTTCACTCAACTTCTCCAGGCAAGGCAATCCAAGCCCTCTCAAGTCTACACACATCCGAGTACC
 CATCACAAACCTCATCTCCACCAACACACCAGCCAGTAGTTACTTAAACATATTACACAAAGGCTTGACC

10

20

30

40

50

AACTTAAACAGAATCAAATAAACTCTGGGCAAATAACAATGGAGTTGCTAATCCTCAAAGCAAATGCAATTACCA
 CAATCCTCACTGCACTGCACTGCAATTTGTTGCTTCTGGTCAAAACATCACTGAAAGAATTATCAATCAACATGCACTG
 GCAGTTAGCAAAGGCTATCTTAGTGCCTGAGAACTGGTGGTACCTAGTGTATAACTATAGAATTAAAGTAAAT
 CAAGAAAATAAGTGTAAATGGAACAGATGCTAAGGTTAAATTGATAAAACAGAATTAGATAAATATAAAATGCTG
 TAACAGAATTGCACTGCTCATGCAAACACACAAGCAACAAACAATCGAGCCAGAAGAGAACTACCAAAAGTTATG
 AATTATACACTCAACAATGCAAAAAACCAATGTAACATTAAGCAAGAAAAGGAAAAGAAGATTCTTGGTTTTT
 GTAGGTGTTGGATCTGCAATGCCAGTGGCAGTGGCTGTATCTAAGGCTCTGCACCTAGAAGGGAAAGTGAACAAGA
 TCAAAAGTGCCTACTATCCACAAACAAGGCTGTAGTCAGCTTATCAAATGGAGTTAGTGTTTAACCGCAAAGTG
 TTAGACCTCAAAAACTATAGATAAACAATTGTTACCTATTGTGAAACAGCAAAGCTGCAGCATATCAAATATAGC
 AACTGTGATAGGTCCAACAAAAGAACACAGACTAGAGATTACCGGAAATTAGTGTAAATGCAGGGCTAA
 CTACACCTGTAAGCACTACATGTTAECTAATAGTGAATTAGTGTCAATTAATCAATGATAATGCCTATAACAAATGAT
 CAGAAAAAGTTAATGTCACAAATGTTAECTAATAGTGTAGCAGCAAAGTTACTCTATCATGTCATAATAAAAGAGGA
 AGTCTTAGCATATGTAECTAATACCCTATATGGTTATAGATAACCCCTGTGAAACTACACACATCCCCCT
 TATGTACAACCAACACAAAAGAAGGGTCCAACATCTGTTACAAGAACTGACAGAGGATGGTACTGTGACAATGCA
 GGATCACTATCTTCTCCACAAGCTAAACATGTAAGGTTCAATCAATCGAGTATTTGTGACACAATGAAACAG
 TTAACTTACCAAGTGAAGTAAATCTGCAATGTTGACATATTCAACCCCCAAATAATGTTAAAGGTTATGACTT
 CAAAACAGATGTAAGCAGCTCCGTTACATCCTAGGAGCCATTGTCATGCTATGGCAAAACATAATGTACA
 GCATCCAATAAAATCTGGAATCATAAAGACATTTCTAACGGGTGCAATTGTATCAAATAAAGGGTGGACAC
 TGTTCTGTAGGTAACACATTAATTATGTAATAAGCAAGAAGGTTAAAGTCTCTATGTTAAAGGTGAACCAATAA
 TAAATTCTATGACCCATTAGTATTCCCTCTGATGAAATTGATGCAATATCTCAAGTCACGAGAAAGATAAAC
 CAGAGCTAGCATTATCGAAATCCGATGAAATTACATAATGTAATGCTGTAATCCACCAAAATATCAT
 GATAACTACTATAATTATAGTGTAAATGTTATCATTAAATGCTGTTGAGCTGCTCTTATACGTGTAAGG
 CCAGAAGCACCAGTACACTAACAGAAAGTCAACTGAGTGGTATAAATAATTGCTCATTTAGTAACATAAATAAA
 ATAGCACCTAATCATGTTCTACAATGTTACTATCTGTCATAGACAACCCATGTCATTGGATTCTTAAAA
 TCTGAACCTCATCGAAACTCTCATATAAACCATCTACACTATTAAAGTAGATTCTAGTTAGTATA
 TAAAACACAATGCACTCCAGATTAACCTACCATCTGTTAAAGAAACTGGGCAAATATGTCACGAAAGGATCC
 TTGCAAATTGAAATTGAGGTCATTGCTTAAATGGTAAGAGGTGTCATTAGTCATAATTATTTGAATGGCAC
 CCCATGCACTGTTGTAAGACAAAACCTTATGTTAAACAGAAACTTAAGTGTCTATGGTGTAGTGGAGTGCTAGAGGTT
 TCAAGAAATAAGTGGAGCTGAGGTGGACAGAACAGAAAGTATGCTCTGGTGTAGTGGAGTGCTAGAGGTT
 TATAGGATCAATAACATAACTAATGCAATGTTACTTACCATGTTGCAATTGAGCAACTCTCACTGAACTCAATAGTG
 ATGATATCAAAAGCTAGGGACAATGAAGAGCTAAATTCCACCAAGATAAGAGTGTACAATACTGTATATCATAT
 ATTGAAAGCAACAGGAAAACAATAACAAACTATCCATCTGTTAAAGGTTAAAGTGCAGCAGACGTATTGAGAAAAC
 CATCAAAACACATTGGATATCCATAAGAGCATAACCATCAACACCCAAAAGAATCAACTGTTAGTGTACAAACAG
 ACCACGCCAAAATAACGATACTACCAACTCAATTCTAACACTACCACATGTTACATTATAATTCAACAA
 TTCAACTTGTGGGAAATGGATCCATTATAATGGAATTCTGCTAATGTTACTAACCGGATAGTTATTAAA
 AGGTGTTATCTTCTCAGAGTGTAACTGTTAGGAATTACATGTTACATGGTCTTATCTCAAAAGTATTATA
 CCAACTTAATTAGTAGACAATAACATTAAGAGACATGTTAAAGAAGCTAAATGTTACATGGTCTTAA
 TCTAAGTATCATATAAGCTGAAATAAAATTAGAAGACCTACTATTGCTCATTTAGTGTACATCAAGAGTAT
 GACCTCGTCAAGACAGATTGCTACCACTAATTACTTTAAAGATAATAAGAAGAGCTATAGAAATAAGTGTCA
 AAGTCTATGCTATATTGAATAAAACTAGGGTTAAAGAAAAGACAAGATAATCCAACAAATGGACAAGATGAAGAC
 AACTCACTTATACGACCATATAACAGATGATACTTCAGCTGTTAAAGATAATCTCATCTAAAGCAGA
 CAAAACACTCTACAAACAAAAGACACATCAAACAAACACTCTGAAAGAAATTGATGTTCAATGCAACAC
 CTCCATCATGGTTAATCATGGTTATACACAAACACTTAAACACAGTATGCAAAATGAG
 GTAAAAACCATGGTTTACATGTTAGATAATCAAACCTTGTGATTGTTCAATTATTGAAACCAATATGGTT
 TATAGTTTATCATATAAGGAACCTAAAGAAATTACTGTGACAACCTATAATCAATTCTGACATGGAAAGATATTAGCC
 TTAGTAGATTAAATGTTGTTAATTACATGGATTAGTAACTGCTGAAACACATTAAAGCTTAGGCTTAAAGA
 TGGGATTCAATAATGTTACTTGACACAACATTCCCTTATGGAGATTACATAACTAAAGCTATTTCACAAATGAGG
 GTCTACATAATAAAAGAGGTAGAGGGATTATTATGCTCTAATTAAATATAACAAAGAAGTCAATTGAGAA
 AACGATTATAATAGTGTGCAACACATCACAGATGCTGCTAATAAGCTGAGAAAATCTGCTATCAAGAGTA
 TGTCTACATATTAGTAGACAAGCAGTGTGCTGATAATAAAATGGCAGATGGATAATTCTATTAAGTAAAGTCC
 TAAATTAAATTAGCTTCAGGTGACAATAACCTTAACATCTGAGTGTAACTATTGTTGCTGAAATTGGAC
 ACCCAATGGTAGATGAAAGACAAGCCATGGATGCTGTTAAATTGCAATGAGACAAATTGTTAGC
 AGTCTGAGTATGTTAAGAGGTGCCTTATATAGAATTAAAAGGGTTGTAATAATTACACAGATGGCCTAC
 TTAAGAAATGCTATTGTTACCCCTAAAGATGGTTACTACTATAACACTTATCCTCTTGTGGAAC
 TTACAGAAAAGAGATTGTTAGTGTGTTACAGGACTACGTTCTATCGTGTAGTTGCTTAAAGGATCTT
 GAAATGTTAAATGATAAAAGCTATACCTCCTAAATTGATGTTAGTGGACTAGTCCCTAGAAATTACATGCC
 ATCACACATACAAACACTATAAGAACATGAAAAATTAAATTCCAGAGTGTAAATCAAGAAGAGTATTAGAGT
 ATTATTAAAGAGATAACAAATTCAATGATGTTACACTGTTAGTTAATCAAAGTTATCTCAACACCC
 AATCATGTTGATCTTGACAGGCAAAGAAGAGAACTCAGTGTAGGTAAGATGTTGCAATGCAACCGGGAAATGTT
 CAGACAGGTTCAAATAATGGCAGAGAAAATGATGCTGAAACACATTTCACATTCTTCTGAAAGTCTTACAGAT
 ATGGTAGCTAGAACTACAAAAAAATTAGAAGTCAACTGAAAGCAGGAATAAGTAAACAAATCGCTACATGATAAT
 TACAACAAATTACATTAGTAAGTGTCTATCATCACAGATCTGCAACAAATTCAAGCATTGATGAAACGTC
 ATGTATTGTTAGTAGTGTGCTGGATGAACTGCTGTTACAATTCTATTTCCTGGTACATTAACTATTCC
 ATGTCACAATAATATGCAACATATAAGGCATGCACCCCCCTATATAGGAGATCATATTGAGATCTAACAAATGAGAT

10

20

30

40

50

GAACAAAGTGGATTATAGATATCACATGGTGGCATCGAAGGGTGGTGTCAAAACTATGGACCATAAGCTAT
 ATCACTATTGGATCTAATATCTCTAAAGGGAAATTCTCAATTACTGCTTAATTAAATGGTACAATCAATAG
 ATATAAGCAAACCAATCAGACTCATGGAAGGTCAAACCTATGCTCAAGCAGATTATTGCTAGCATTAAATAGCCT
 AAATTACTGTATAAAGAGTATGCAGGCATAGGCCACAAATTAAAGGAACGTGAGACTTATATACCGAGATATGCA
 ATTATGAGTAAACAATTCAACATAACGGTGTATTACCCAGCTAGTATAAAGAAAGTCTAAGAGTGGGACCGT
 GGATAAACACTACTTGATGATTCAAAGTGAGCTAGAATCTATAGTAGTTGACACAAGAATTAGAATATAGA
 GGTGAAAGTCTATTGAGCTTAATTTAGAATGTATGGTTATAATCAGATTGCTACAATTAAAAAAATCA
 TGCATTATGTAACAATAACTATTGGACATATAAAGGTTCTGAAACACTTAAACCTTTAATCTTGATA
 ATATTGATACAGCATTAACTATTGATGATTGATTAACCTGTGTTCTGAGACTTACATGTTATATCGA
 AGTTCTATAGAAGAACTCCTGACTTCTCACAGAGGCTATAGTTCACTCTGTTCTGAGACTTACATGTT
 CCAAAACCTAATGCTGAATTGTAACATTGATGAGAGATCCTCAAGCTTAGGGTCTGAGAGACAAGCTAAATT
 ACTAGCAGAACATCAATAGACTGGCAGTACAGAGGTTGAGTACAGCTCAAACAAATTCTCCTGAGAG
 ACATTATACTACAGAGATAGATCTAAATGATATTGAAACCTACATATCCTGAGAG
 TTGTTATGAAAGTTACCTTTATAAAGCAGAGAAAATAGTAAATCTTATATCAGGTACAAAATCTATAACTAAC
 ATACTGGAAAAAAACTCTGCATAGACTTAACAGATATTGATAGAGCCACTGAGATGATGAGGAAAACATAACTTT
 GCTTATAAGGATACTTCCATTGGATTGTAACAGAGATAAAAGAGAGATATTGAGTATGAAACCTAAGTATTACTG
 AATTAAGCAAATATGTTAGGGAAAGATCTTGGTCTTATCCAATATAGTTGGTGTACATCAGGTATCATGTAT
 ACAATGGACATCAAATATACTACAAGCACTATCTAGTGGCATAATTAGAGAAATATAATGTTAACAGTTAAC
 ACAGTGGTGAGAGGAGCCACTAAACCATGGGTTGGTCATCTACACAAGGAGAAAACAATGCCAGTTATAATA
 GACAAGTCTTAAACAAAAACAGAGAGATCAAATAGATCTATTAGCAAAATTGGATTGGGTGATGCACTATAGAT
 AACAGGATGAATTGATGGAAGAACTCAGCATAGGAACCTGGGTTAACATATGAAAAGGCCAAGAAATTATTCC
 ACAATTTAAGTGTCAATTGATCGCCTACAGTAGTACAGTACAGCTGAAATTCCTGCAATACACAG
 CTATAGAACACAAATTACTCAGCTTGGCCTTAACTGCAATTACAGAAAAGTATGTTGAGACAT
 ATTGACATAGTATTCCAAACACTGTATAAGCTTGGCCTTAGTTAATGTCAGTAGTACAGTAACTTACTAATGTTG
 TCTAACAGAATTACTCTACAGCTTAATGAGATACTTGTGAAACCTCCATATTCACAGGTGATGTTG
 ATATTACAAAGTAAACAAAGTGTACACAAACAGCATATGTTTACAGACAAATAAGTTGACTCAATATGTG
 GAATTATTCTAAGTAAACAACTCAAATCTGGATCTCATGTTAATTCTAATTAAATTGGCACATAAAATATC
 TGACTATTTCTATAACTTACATTAAAGTACTAATTAGCTGGACATTGGATTCTGATTATACAACCTTATGAAAG
 ATTCTAAAGGTATTGGAAAAGATGGGAGAGGGATATAACTGATCATATGTTATTAAATTGAAAGTTTC
 TTCAATGCTTATAAGACCTATCTCTGTGTTTCTAAAGGTATGGCAAAGCAAAGCTGGAGTGTGATATGAAACAC
 TTCAGATCTCTATGTGATTGAAATTAGACAGTAGTTATTGGAAAGTCTATGCTAAAGGTATTGAAACAAA
 AAGTTATCAAATACATTCTAGCCAAGATGCAAGTTACATAGAGTAAAGGATGTCAAGCTTCAAATTATGGTT
 CTAAACGCTTAAATGTCAGCAGATTACAGTTGGCCTTGGGTTAACATAGATTATCATCCAACACATATGAA
 AGCAATTAAACTTATAGATCTTGTAGAATTGGGAGTAAATAGATGAAATACACATTAAAATAACACA
 AATTCAATGATGAAATTCTACTCTAACATTAAATTATAACTCTCAGATAACTCATCTTAAACT
 AAATACATAAGGATTGCTAACTCTGAAATTGAGAAAATAATTACAAACAAATTATCATCTCACACCGAAACCTAGA
 GAATTAACAGCTTACATTGTCTAACAGTAAAGCTTAAATGTCGCAATTGAGTAAACAGCAAACAA
 GATTGTTATAATTATTCCATTGGTGTGATTGAGATAATTAGATCATTAGGCAATTACAGCAAACCAA
 ACTTACACTACTACTTCCACCAAAATCTTAGTGCACATAGCACATACTTACTGCATGCTTGGCATT
 ATATTAAAGTATTCAATTGTTACTACAGGTGTTAAATTAGTATAGAGTATATTAAAGATCTTAA
 ATAAAGATCCAATTGATAGTCAGGTGAGGGAGCAGGGAAATTATTGCGTACAGTAGTGGAACTCTA
 TCCTGACATAAGATATATTACAGAAGTCTGAAAGATTGCAATTGATCATAGTTACCTATTGAGTTTAAGGCTGT
 ACAATGGACATATCAACATTGATTGGTAAAATTGACCATTCCTGCTACAGATGCAACCAACAACTCATGG
 TCTTATTACATATAAAGTTGCTGAACCTATCAGCTTTGTCTGATGCCGAATTGCTGTACAGTCAC
 GAGTAAAATTATAATAGAATTGGAGCAAGCATGTAAGAAAGTGCAGTACTGTTCTCAGTTAACATGTATGTTA
 TAGTAAAATATCATGCTCAAGATGATATTGATTCAAATTAGACAATATAACTATATTAAACTTATGTATGCTT
 GGAGTAAAGGTGAGTGGGAGTAACTATCATATTCTATAGCTGGACGTTAACAGTAAAGTTTCAGCAATTAA
 AGTACAAAATGCTAAATTGATACTATCAAGAACAAAATTTCATCATGCTAAGAAAGCTGATAAAGAGTCTATTG
 ATGCAAATTAAAGTTGATACCCCTTCTTGTGTTACCAAAAGGAAATTACTGCTTAAAGTCAAA
 CTAAGAGTGTGTTAGTGGAGATATACTATCATATTCTATAGCTGGACGTTAACAGTAAAGTTTCAGCAATTAA
 AAATCATACAGCATATGAAACATCTTAAAGTCAATTGTTAAATTCTGAGTAACTGCAACCAATTGAACTTAA
 ATTATATATGTTAGGAAACTACATATCTTACCTAACAGTGAATTGTTAACAGCTGACAACCAATTGAACTTAA
 CTGATTAAACATACAGGTAGTCTGTTACAACTTCTACATGAAATTGAAATAGTCTTATAATTAAACTTAA
 ATAGCTATAACACTGATTCAATTAGTTATTAAACCTAATCTTAAACCTAATTGTTATATGTGTT
 TGAACTAATCTAAAGTTATCTTAAACCTAATTGTTATATGTGTT
 TAACAAATTACGAGATTAGTTGACACTTTCTCGT

【 0 1 3 1 】

LID/ M2-2/1030sのアンチゲノムcDNA配列(SEQ ID NO:16)

ACGGGAAAAAAATGCGTACAACAAACCTGCAAAACAAAAAAATGGGCAAATAAGAATTGATAAGTACCACTTAA
 ATTTAACTCCCTGGTTAGAGATGGGAGCAATTGAGTATGATAAAAGTTAGATTACAAATTGTTGACAA

10

20

30

40

50

TGATGAAGTAGCATTGTTAAAATAACATGCTACTGATAAATTACATTAACTAATGCTTGGCTAAGGCAG
 TGATACATACAATCAAATTGAAATGGCATTTGTTGTCATGTTATTACAAGTAGTGTATTTGCCCTAATAATAAT
 ATTGTAGTAAAATCCAATTTCACAACAATGCCAGTACTACAAAATGGAGGTTATATGGGAAATGATGGAATTAAAC
 ACATTGCTCAACCTAATGGTCACTAGATGACAATTGAAATTAAATCTCCTAAACAAACTAAGTGTGATTCAACAA
 TGACCAATTATGAATCAATTATCTGAATTACTTGGATTGATCTTAACTCCTAAATTATAATTATCAACTAG
 CAAATCAATGTCACTAACACCATAGTTAATATAAAACTTAACAGAAGACAAAATGGGCAATAATCAATTGCA
 CCAACCCAACCAGGACACAACCCACAATGATAATACACCACAAAGACTGATGATCACAGACATGAGACCGTTGCA
 CTTGAGACCATAATAACATCACTAACAGAGACATCATAACACACAAATTATATACTTGATAATCATGATGCT
 AGTGGAAAATCTGATGAAAGACAGGGCACATTCTGCTCACTATGAAATGAAACTATTACACAAAGTAG
 GAAGCACTAAATATAAAATATACTGAATACAACACAAATATGGCACTTCCCTATGCCAATATTCAATCAT
 GATGGGTTCTTAAAGTGTGATGGCTTAAGGCTAACAACTACTCCATAATATAACAGTATGATCTCAATCCATA
 AATTTCACACAAATTACACAACTCTATGCTAACTATACTCCATAGTCAGATGGCCTG
 AAAATTATAGTAATTAAACTTAAGGAGAGATAAGATAGAAGATGGGCAATAACACATGGCTTAGCAA
 GTCAAGTGAATGATACTCAACAAAGATCAACTTCTGCTCATCCAGCAAATACACCATCCAACGGAGCACAGGAGA
 TAGTATGATACTCTAATTATGATGTCAGAAACACATCAATAAGTTATGTTGATGTTATTAAATCAGAAGATG
 CTAATCATAATTCTAGGTTAAAGTGTATGCTAGTTAGGCTAGGAGAAGACACCAATAAAATA
 CTAGAGATGGGGATATCATGAAAGCAATGGAGTAGATGTAACACACATCGTCAAGACATTAATGGAAAAGA
 AATGAAATTGAAAGTGTAACTTGGCAAGCTAACAACTGAAATTCAACATGAGATAAGATCTAGAAAAT
 CCTACAAAAAAATGCTAAAGAAATGGGAGGGTAGCTCAGAAATACAGGCTAGCTCTGTTGAGGTT
 ATATTATGTATAGCAGCTAGTAATAACTAAATTAGCAGCAGGGGAGCAGATCTGGCTTACAGCGTGTAGGAG
 AGCTAATAATGCTCAAAATGAAATGAAACGTTACAAAGGTTACTACCCAAGGACATAGCCAACAGCTCTATG
 AAGTGTGAAAACATCCCCTTATAGATGTTTGTCTATTGTTGATAGCACAATCTTCTACAGAGGTGGC
 AGTAGAGTGAAGGGATTTCAGGATTGTTATGAATGCTATGGTCAGGGCAAGTGTGTTACGGTGGGAGT
 CTAGCAAAATCGGTTAAATTATGTTAGGACATGCTAGTGTGCAAGCAGAAATGGAACAGTTGTTGAGGTT
 ATGAATATGCCCAAAATTGGGTGGTGAAGCAGGATTACCATATATTGAAACAACCCAAAGCATCATTATCT
 TTGACTCAATTCTCACTTCTCAGTGTAGTATTAGGCAATGCTGCTGGCTAGGCATAATGGGAGAGTACAGAGG
 TACACCGAGGAATCAAGATCTATGATGCGCAAAGGCATATGCTGAACAACACTCAAAGAAAATGGTGTGATTAAC
 ACAGTGTACTAGACTGACAGCAGAAACTAGAGGCTATCAAACATCGCTTAATCCAAAAGATAATGATGAG
 CTTGACTTAATAAAAATGGGGCAATAATCATGGGAAAGTTGCTCTGCTGAATTGAGGAGATGCAA
 CAACAGGGCTACTAAATTCTAGAATCAAAAGGCCAATTACATCACACCAAGGATCCAAAGAAAAGATAGTA
 TCATATCTGCACTAAAGATAAGTAACCAAGAACGCCATTATCAAAGAAAACCTCTAGTAAAGTTCAAGAACGCC
 ACAAAATGAGACAGATGATACTGCAAGGCCAAGGCCATTATCAAAGAAAACCTCTAGTAAAGTTCAAGAACGCC
 TACACCAAGTGATAATCCCTTCTAAACTATACAAAGAACATAGAAACATTGATAACAATGAAGAAGATCCA
 GCTATTCTACAGAAGAAATAATGATCAGACAAACGATAATATAACAGAAGATTAGATAGGATTGATGAAAATTA
 AGTGAATATACTAGGAATGCTCAGCATTTAGTGTGCAAGTGCAAGGCCTACATGCTCGGGATGGTATAAGAGA
 TGCCATGGTTGTTAAAGAGAAGAAATGATAGAAAAAAATCAGAACTGAGCATTATGACCAATGAGCAGATTAGAAG
 CTATGGCAAGACTCAGGAATGGGAAAGTGAAGGCAAAAGACATCAGATGAAAGTGTCTCAATCCAACA
 TCAGAAAATTGAAACACCTATTGGAGGAATGATGTTGACAATGATCTATCACTTGAAGATTCTGATTAGTTAC
 CAATCTTCACATCAACACACAAACAGAACAGAACAAACTAACCAACCCATCATCCAACCAACATCCATC
 CGCCAATCAGCCAAACAGCCAAACAAACAGCCAACTCAAACCAACCCGAAAAATCTATAATATAGTT
 ACAAAAAGGAAAGGTGGGCAAATGGAAACATAGTGAACAACGCTTCAGCAAGGCTCCACATACAGCTGC
 TGTCTACATACTGCTTAGAAAAGCAGTGCACCTGCTACTTACAATATGGTGGCCATGTTCAATCT
 TGCCAGCAGATTACTTAAAGAACACTGCTAATGTCACATACTAGTGAAGAACACTCAACCTACACATGATATTATGCT
 TCAACTAAGAGTCATGATAAAACTCAAGAATGCTAGTGTGCTAGCACAAATGCCAGCAAATTACATGCTATGT
 GTCTTGGATGAAAGCAACTAGCATATGATGTAACCACACCTGTGAAATCAAGGCATGTTGCTAACTG
 TAAAATCAAAAATATGTTGACTACAGTTAAAGATCTACTATGAAGACACTCAACCTACACATGATATTATGCT
 TTATGTGATTGAAAACATAGTAACATCAAAAAGTCTATAATACCAACATACCTAAGTCCATGAGTCAGAAA
 TAAAGATCTGAAACACTGAAAATATAACAAACACTGAACTTAAAGTCTATCACAAATGCAAAATCATCC
 ACTCAGGATTACTATTAGTCATCACAGTACTGAAACAAAGGAGCATCAAACATCAAAGGCCACAAAGTCATT
 ATAGTAGATCTGGAGCTACCTAGAAAAGAAAGTATATTATGTTACACAAATGGAGCAGACAGCTACACG
 ATTGCAATCAAACCCATGGAGATTAAACCTTTCTACATCAGTGTGTTAATTCTACACAAACTTTCTACCTAC
 ATTCTTCACTTCACCATCACAAACACTCTGTGTTCAACCAATCAAACAAAATCTGAAAGTCCCAGAT
 CATCCCAAGTCATTGTTATCAGATCTAGTACTCAAATAAGTTAATAAAAAAATACACATGGGCAAAATCATT
 GGAGGAATCCAACATCACAAATCTGTTAACATAGACAAGTCCACACCCATACAGAATCAACCAATGGAAAAT
 ACATCCATAACAACTAGAATTCTCAAGCAAATTCTGGCTTACTTTACACTAATACACATGATCACAAACATAATCTC
 TTGCTAATCTCATCTCCATGATTGCAACTAAACAAACTTGTGAAATATAACGTATTCCATAACAAAACCT
 TTGAGTTACCAAGAGCTGAGTTAATGTTAAAGTGTAAATTAAAATAGTCATAACAAATGAACACTAGGATATC
 AAGACTAACAAATAACATTGGGCAAATGCAAAACATGCTCAAAACAGAACAGGCCACCGCTAAGCAGATTAGAAG
 GACCTGGGACACTCTCAATCATTATTATCATCTGCTTATATAAGTTAATCTTAACTGTCAGCACAAA
 TCACATTATCCATTCTGGCAATGATAATCTCAACTTCACTTACAATTGCAAGGCCATATTCTACAGCCTGGCAAAC
 CACAAACTCACACCAACAAACTGCAATCACAAAGATGCAACAAAGCCAGATCAAGAACACAAACCCACATACCTCAC
 CCAGAATCCTCAGCTGGAAATCAGTCCCTTAATCCGCTGAAATTACATCACAAATCACCACCATACTGCTCAA
 CAACACCAAGGAGTCAGTCAACTCACCTGCAACAGTCAAGACAAAAACACAAACAAACTCAAACACAAACCC
 AGCAAGCCCACACAAACAGCCAAAACAAACCCACCAAGCAACCCATAATGATTTCACTTGAAGTGTCAA

10

20

30

40

50

CTTTGTACCTGCAGCATATGCAGCAACAATCCAACCTGCTGGCTATCTGAAAAGAATACCAACAAAAACAG
 GAAAGAAAACCACTACCAAGGCCACAAAAACCAACCTCAAGAACCAAAAAGATCCAAACCTCAAACCACT
 AAATCAAAGGAAGTACCCACCCAAGGCCACAGAACCCATCAAGAACCAACCAAAAACAAACATCATAACTAC
 ACTACTCACCTCCAACACCAAGGAAACTCAACAGTCAATGGAAACCTCCACTCAACTTCTCCGAAG
 GCAATCCAAGCCTCTCAAGTCTCACACATCCGACTACCCATCACAAACCTCATCTCACCAACACACGC
 CAGTAGTTACTAAAAACATATTACACAAAGGCCTGACCAACTAAACAGAACTCAAATAACTCTGGGCAA
 TAACAATGGAGTTGCTAATCTCAAAGCAAATGCAATTACCAACATCTACTGCAAGTCACATTGTTGCTTCT
 GGTCAAAACATCACTGAAGAATTATCAATCAACATGCAAGTCAGTTGCAAGGCTATCTAGTGCCTGAGAAC
 TGTTGCTATACCGAGTTAACATAGAATTAAAGTAAATCAAGAAAATAAGTGAATGGAAACAGATGCTAAGG
 TAAAGATTGATAAAACAGAATTAGATAAAATGCTGTAACAGAATTGCAAGTGCCTGCTATGCAAAGCACACAA
 GCAACAAACATCGAGCAGAAGAGAACTACCAAGGTTATGAAATTACACTCAACATGCCAAAAACCAATGT
 AACATTAAGCAAGAAAAGGAAAGAAGATTCTGGTTTTGTTAGGTTGGATCTGCAATGCCAGTGGCGTTG
 CTGTATCTAAGGCTCTGCACCTAGAAGGGAAAGTGAACAAGATCAAAGTGCTACTATCCACAAACAAGGCTGTA
 GTCAGCTTACAAATGGAGTTAGTGTAAACCAGCAAAGTGTAGACCTCAAACACTATAGATAAAACATGTT
 ACTCATTTGTGACAAGCAAGCTGCAACATCAAATAGAAACTGTGATAGAGTTCAACAAAGAACACAGAC
 TACTAGAGATTACCGGAAATTAGTGTAAATGCAAGCAGCTACACAGTGAAGTCAACTTACATGTTAACTAATAGT
 GAATTATTGTCATTAATCAATGATGCTATAACAAATGTCAGGAAAGTAAATGTCACATGTTAACTAATGTTCAAATAGT
 TAGACACCAAGGTTACTCTATCATGTCATAATAAAAGGAGAACTACACACATCCCTCTATGTACAACCAACACAAAGAAGGGTCAACATC
 TGTTAACAGAAACTGACAGAGGATGGTACTGTGACAATGCAAGGATCAGTATCTTCTCCCACAAGCTGAAACATG
 TAAAGTTCAATCAAATCGAGATTGGTGCACACAATGAAACAGTTAACATTACCAAGTGAAGTAAATCTGCAATG
 TTGACATATTCAACCCCAAATATGATTGTTAAATTATGACTTCAAACACAGATGTAAGCAGCTCGTTATCACATCT
 CTAGGAGCCATGTCATGCTATGCCAAACTAAATGTCAGCAGTCATAATAAAATGTCAGGAACTCATAAAAGACATT
 TTCAACGGGTGCGATTATGTCATTAATAAAAGGGGTGACACTGTGTCAGTTGAGACACATTATATTGTAATA
 AGCAAGAAGGTTAAAGTCTATGTTAAAGGTGAACCAATAAAATTCTATGACCCATTAGTATTCCCTCTGAT
 GAATTGATGCAATATCTCAAGTCACAGAGAAAGATTAACCAGAGCTAGCATTATTCGTAATCCGATGAATT
 ATTACATAATGTAATGCTGTAATCCACACAAATCATGATAACTACTATAATTAGTGAATTAGTAAATAT
 TGTATCATTAATTGCTGTTGACTGCTCTATACTGTAAGGCCAGAACACAGTCACACTAAGCAAGGATCAA
 CTGAGTGTATAAAATATGTCATTAGTAACTAAATAAAATGACACCTAATGTTACAATGTTACAATGGTTACTA
 TCTGCTCATAGAACACCATCTGTCATTGGATTCTTAATAGTCACTTCATCGAAGTCTCATCTATAAACCAT
 CTCACCTACATTTAAGTGAATTCTAGTTATAGTATATAAAACACAATTGCACTGCCAGATTAACTTACCATC
 TGAAAAATGAAAAGTGGGCAAATATGTCAGGAAGGATCCTGCAAAATTGAAATTGAGGTCAATTGCTTAATG
 GTAAGAGGTGTCATTAGTCATAATTGTCAGGAACTGCTGTGTAAGACAAAACCTTATGTTA
 AACAGAAACTTAAGTCTATGGATAAAAGATAGATACTTACAGAAAATAGTGGAGCTGAGGTTGGACAGAAC
 AGAAGAGTATGCTTGTAGTGGAGTTATAGGATCAATAAAACATAACTAAACAACTCAG
 CATGTTGCCATGAGCAAACCTCTACTGCAACTAGTGTGATGATACTGAAAGCTGAGGAGCAATGAAGAGCTA
 AATTCAACCAAGATAAGAGTGTACAATACTGTATCATATATTGAAAGCAACAGGAAAACATAAAACAAACTAT
 CCATGTTAAAAGATGTCAGCAGCTATTGAAAGAAACCATCAAAACACATTGATATCATAAGAGCATAA
 CCATCAACAAACCCAAAAGAATCAACTGTTAGTGTGATAACAAACGACCACGCCAAAATAACGATACTACCTAACACTCA
 ATTCTAACACTCACCACATGTTACATTATCAACAACTCAAGTGTGGGACAAAATGGATCCATTATTAA
 TGAAATTCTGTAATGTTATCTAACCGATAGTTAAAAGGTGTTATCTCTCAGAGTGTAACTGCTT
 GAAGTACATATTCAATGGCTCTATCTCAAAAATGTTATACCAACTTAATTAGTAGACAAAATCCATTAAATAGAA
 CACATGAATCTAAAGAAACTAAATAACACAGTCTTAATCTAATGTTACATGAAAGTGAATAAAATTAGAAGA
 ACTACTATTTCAGTCATACTTATGACATACAAGATGACCTGTCAGAACAGATTGCTACCACTAATTAC
 TTTAAAGATAATAAGAAGAGCTATAGAAAATAGTGTGTCAGGTTATGCTATATTGAAATAACTAGGGCTAAA
 GAAAAGGACAAGGTTAAATCCAACATGGACAAGATGAAGACAACTCAGTTATTACGACCATAATCAAAGATGATAT
 ACTTTCAGCTGTTAAAGATACTAATCTCATCTAAACAGACAAAATCCTACACAAACAAAAGACACAATCA
 AAACAAACACTCTGAAAGAATTGATGTCATGCAACATCTCCATCATGGTTAATACATTGTTAACTTATAC
 ACAAAATTAAACACATTTAACACAGTCTGATTAAGGTTAAAAGGTTACATTGATAGATAATCA
 AACTCTTAGTGGATTCTCAATTATTTGAAACCAATATTGTTAGTTATGTTACATGAAAGACTCAAAGAATTACTG
 TGACAACCTATAATCAATTCTGACATGGAAAGATATTGCTTAGTATTGAAATGTTGTTAATTACATGGATT
 AGTAACGTGTTGAAACACATTAAATAAGCTTAGGCTTAAGATGCGGATTCAATAATGTTATCTGACACAACTATT
 CCTTATGGAGATTGTTACATAAGCTATTCTACAAATGGGTTCTACATAATAAAAGGGTAGAGGTTATT
 TGTCATTTAAATATAACAGAAGAGATCAATTGAGAAAACGATTTATAATTAGTAGTGTCAACACATCACA
 GATGCTGCTAATAAGCTCAGAAAATCTGCTATCAAGAGTATGTCATACATTAGATAAGACAGTGTCCGATAA
 TATAATAATGGCAGATGGATAATTCTTATTAAGTAAAGTCTTAAATTAGTTACAGGTTGACAATAACCTTA
 ACAATCTGAGTGAACATTGTTGAGGTTACAGGTTACACATGGTAGATGAAAGACAAGCATGGATGCT
 GTTAAATTAAATTGCAATGAGACCAATTACTGTTAAGCAGTCTGAGTATGTTAGAGGTGCTTATATATAG
 AATTATAAAAGGGTTGTAATAATTACAACAGATGGCTACTTTAAGAAATGCTATTGTTACCTTAAGATGGT
 TAACCTACTATAAAACTAAACACTTATCTCTTGTGAGGAACTTACAGAAAAGAGATTGTTAGTGTGTTATCAGGACTA
 CGTTCTATCGTGAGTTGCGTTGCCTAAAAAGTGGACTTGAATGTTATAATGATAAAAGCTATATCACCTCC
 TAAAATTGATATGGACTAGTTCCCTAGAAATTACATGCCATCACACATACAAACACTATAGAACATGAAAAT
 TAAAATTCCGAGAGTGTAAATCAAGAACAGTATTAGAGTTATTAAAGAGATAACAAATTCAATGAATGTGAT
 TTATACAACGTGTTAGTTAATCAAAGTTCTCAACACCTAACTCATGTTGATCTGACAGGCAAAGAAAAGAGA

10

20

30

40

50

ACTCAGTGTAGGTAGAATGTTGAAATGCAACCGGGATGTTCAGACAGGTTCAAATATTGGCAGAGAAAATGATAG
 CTGAAACATTTCACATTCTTCTGAAAGTCTTACAAGATATGGTATCTAGAACTACAAAAAATTAGAAGCTG
 AAAGCAGGAATAAGTAACAAATCAAAATCGTACAATGATAATTACAACAAATTACATTAGTAAGTGCCTATCATC
 AGATCTCAGCAAATTCAATCAGCATTTCGATATGAAACGTCATGTATTGTAGTGTGCTGGATGAAGTCATG
 GTGTACAATCTATTTCTGGTTACATTAACATGTTACATGTCACAATAATGACATATAGGCATGACCC
 CCCTATAGGAGATCATATTGTAGATCTAACATGTTAGATGAACAAAGTGGATTATAGATATCACATGGTGG
 CATCGAAGGGTGGTGTCAAAACTATGGCATAGAAGCTATATCACTATTGGATCTAATATCTCTAAAGGGAAAT
 TCTCAATTACTGCTTAAATTATGGTACAATCAATAGATATAAGCAACCAATCAGACTCATGGAAGGTCAA
 ACTCATGCTCAAGCAGATTATTGCTAGCATTAATAGCTTAAATTACTGTATAAAGAGTATGCAGGCATAGGCCA
 CAAATTAAGGAAGTGCAGACTTATATACAGGATATGAACTTATAGTGAACAAACTAACATAACATGGTGTAT
 ATTACCCAGCTAGTATAAGGAAGTCTAACAGTGGGACCGTGGATAAACACTATATGATGATTCAAAGTGGT
 CTAGAACTATAGGACTTTGACACAAATTAGAATAATAGAGGTGAAAGTCTATTATGAGTTAATTTAGAAA
 TGATGGTTATATAATCAGATTGCTTACAATTAAAAATCATGCATTATGTAACAAATAACTATATTGGACATAT
 TAAAGGTTCTGAAACACTTAAACCTTTTAAATCTGATAATATTGATACAGCATTAACTTGTATATGAAATT
 CCCATGTTATTGGTGTGGTGTACCTGTTATCGAAGTTCTATAGAAGAACCTCTGACTTCTCACAGA
 GGCTATAGTTCACCTGTTCTACACTGTTATACAAACCATGACTTAAAGATAAAACTTCAAGATCTGT
 ATGATAGATGGATAAACTTCTTAAACATGATAATCACGTTGACAAAAACCTTAATGTAACATTGATG
 AGAGATCCTCAAGCTTAGGGTCTGAGAGACAAGCTAAATTACTAGCAGAAATCAATAGCTGGCAGTTACAGAG
 TTGAGTACAGCTCAAACAAAATATTCTCAGGAACTTACTACAGAGATAGCTAAATGATA
 TTATGCAAATATAGAACCTACATATCCTATGGGCTAACAGGTTTATGAAAGTTACCCCTTATAAGCAGAG
 AAAATAGTAAATCTTATTCAGTACAAATCTATAACTAACATACTGGAAAAACTCTGCCATAGACTAACAGA
 TATTGATAGGCCACTGAGATGTAGGAAAAACATAACTTGTCTTAAAGGATACTCCATTGGATTGTAACAGAG
 ATAAAAGAGAGATATTGAGTATGGAAAACCTAAAGTGTAGGAAATTAGCAAAATATGTTAGGGAAAGATCTGGT
 TTATCCAATATAGTGGTGTACATCACCCAGTATCATGATAACATGGACATCAAATACTACAGCACTATATC
 TAGTGGCATAATTATAGAACATATAATGTTAACAGTTAACACGTGTTGAGAGAGGACCACTAAACCATGGT
 GTCTCATCACAAAGAGAAAAACATGCCAGTTATAATAGACAAGCTTAAACAAAAACAGAGAGATCAAATA
 GATCTATTAGCAAATTGGATTGGGTGTATGCATCTATAGATAACAAGGATGAATTCTGGAAAGAACTCTCAATTAG
 AACCCCTGGGTTAACAAAAGAAAAGGCAAGAAATTATCCACAATTAAAGTGTCAATTATGATCGCCTTA
 CAGTCAGTAGAGCATGTGAATTCCCTGCATCAATACCAGCTTAAAGAACAAACAAATTATCCTGGACACTAGC
 CCTATTACCGTATTAACAGAAAATGTTGATGAGATATTGACATAGTATTCCAAAAGCTGATAAGCTTGG
 CCTTAGTTAATGTCAGTAGAGAACATTACTAATGTTGCTTAAAGGATATTCTCATACCTAACGTTAATG
 AGATACATTGATGAAACCTCCATATTACAGGTTGATGTTGATATTCAAGTTAAACAGTGTACAAAAACAG
 CATATGTTTACCAAGACAAAATAAGTTGACTCAATATGTTGAAATTATTCTTAAGTAATAAAACACTCAAATCTGG
 ATCTCATGTTAATTCTAATTAAATATTGGCACATAAAATCTGACTATTCTATAACTTACATTAAAGTACTA
 ATTACGTGGACATTGATTCTGATTACAACTTATGAAAGTCTAAAGGTTTTGAAAAGATTTGGGAGAG
 GGATATATAACTGATCATGTTATTAAAGGTTCTCAATGCTTAAAGCCTATCTCTGTTTCA
 TAAAGGTTATGGCAAAGCAAGCTGGACTGTGATATGAAACACTTCAAGATCTTGTATTGAAATTAGACA
 GTAGTTATGGAAAGTCTATGCTAAGGTTTTAGAACAAAAGTTCAAAATACATTCTAGCCAAGATGCAAGT
 TTACATAGAGTAAAGGATGTCATGCTCAATTATGGTTCTAACGTCTTAAAGTGTACAGGAAATTACAGTTG
 CCCTTGGGTTAACATAGATTATCATCAACACATATGAAAGCAATTAAACTTATAGATCTTGTAGAATGG
 GATTGATAAAATAGATAGAACACATTAAACACAAATTCACTGATGAAATTTTATACTTCTATCTTC
 TACATTAATTAACTCTCAGATAACTCATCTTAACTAAACATATAAGGTTGCTAATTCTGAATTAGAAAA
 TAATTACAAACAAATTATCATCTCACAGGAAACCTTAGAGAAATATACTAGCCAATCCGATTAAAGTAATGACA
 AAAAGACACTGAATGACTATTGTTAGGTTAAAGTGTACTCAATAATGTTACATTGTTATCTAATAAGAAGCTT
 ATTAACATGCTGCAATGATTAGAACCAATTACAGCAACAAAGATTGTATAATTATTCCCTATGGTGTGATTGA
 TAGAATTATAGATCATTCAAGGCAATACAGCAAATCCAACCAACTTACACTACTTCCACCAAAATATCCTTAG
 TGCACAATAGCACATCACTTACTGCATGCTCTTGCATCATATTAGATTCAATTGTTATTTAGTCTACA
 GTTGTAAAATAGTATAGGTTATTAAAGATCTTAAAGATCCAAATTGTATAGCATTGATAGGTGA
 AGGAGCAGGGAAATTATTATGCGTACAGTAGTGGAACTCTGACATAAGGATATTACAGAAGCTGAAAG
 ATTGCAATGATCATGTTACCTATTGAGTTTTAAGGCTGATACTGGACATATAACATTGATTATGGTAAAG
 TTGACCATCTGCTACAGATGCAACCAACATTCTGTTATTACATATAAAAGTTGCTAACCTATCAG
 TCTTTTGCTGTGATGCCGAAATTGCTGTAACAGTCAACTGGAGTAAATTATAAGAATGGAGCAAGCATGTA
 GAAAGTCAAGTACTGTTCTCAGTTAACATGTTATGTTAATAGTAAATATCATGCTCAAGATGATAATTGATT
 AAATTAGACAATATAACTTAAACCTTATGTTACTGTTAGGCAAGTAAAGGATCGGAGGTTACTAGT
 CCTTACAATAGTCTCGAATATTCCAGTATTAAATGTTAGTACAAATGCTAATTGATACTATCAAGAACCA
 AAAATTCTCATGCTCAAGAAAGCTGATAAAAGAGTCTATTGATGCAAAATATAAAAGTTGATACCCCTTCTGT
 TACCCCTATAACAAAAAAAGGAAATTATCTGCTTAAACAAACTTAAAGGTTGTTAGTGGAGATATACTACATA
 TTCTATAGCTGGACGTAATGAAAGTTTCAGCAATAAAACTTATAAAATCATAGCATATGAAACATCTTAAAGT
 ATCATGTTAAATTTCAGATCAACAGAAACTAAACTATAACCAATTATATGGTAAATCTACATATCCTTACCTA
 AGTGAATTGTTAACACGTTGACAACCAATGAACTTAAAGGTTACTGTTAAATACAGGTTGCTGTTATACACTT
 TCATAATGAAATAATGAAATAAGATCTTATAATAAAATCTCCATAGCTTACACTACAGTATTCATTAGTT
 ATTAAAAAATTAAACATATAATTGTTAAACTTGTAGTGAACAAATCTAAAGTTATCATTAACTTAAAGGAGATT
 GGAATAATTAAACCTAACATGTTATGTTATGTTAACTTAAACTTAAACGAGATTAGTTGACACTTT
 TTTCTCGT

10

20

30

40

【 0 1 3 2 】

LID/cp/ M2-2のアンチゲノムcDNA配列(SEQ ID NO:17)

50

ACGGGAAAAAAATGCGTACAACAAACTTGCATAAACCAAAAAATGGGCAAAATAAGAATTGATAAGTACCACTTAA
 ATTTAACCTCCCTGGTTAGAGATGGCAGCAATTCTGAGTATGATAAAAGTTAGATTACAAAATTGTTGACAA
 TGATGAAGTAGCATTGTTAAAATAACATGCTATACTGATAAAATTACATTAACATACTGCTTGGCTAAGGCAG
 TGATACATACAATCAAATTGAATGGCATTGTGTTGTGCACTTATTACAAGTAGTGTATTTGCCCTAATAATAAT
 ATTGTAGTAAATCAATTTCACAACATGCCAGTACTACAAAATGGAGGTATATATGGAAATGATGGAATTAAAC
 ACATTGCTCTCAACCTAATGGTCACTAGATGACAATTGCAAATTCTCCAAAATAACTGATTCAACAA
 TGACCAATTATGAACTCAATTCTGAAATTACTGGATTGTGATCTTACATAATTATAATTATCAACTAG
 CAAATCAATGTCACTAACACATTAGTTAATATAAAACTAACAGAAGACAAAATGGGCAAAATAATCAATTCTG
 CCAACCCAACCATGGACACACACCAATGATAATACACCACAAAGACTGATGATCACAGACATGAGACCGTTGCA
 CTTGAGACCATAATAACATCACTAACACAGAGACATCATAACACACAAATTATATACTTGTATAATCATGAT
 AGTGAGAAAACCTGATGAAAGACAGGCCACATTACATTCTGGTCAACTATGAAACTATTACACAAAGTAG
 GAAGCACTAAATAAAAAATACTGAATACAACACAAAATATGGCCTTCCCTATGCCAATTCTCATCAATCAT
 GATGGGTTCTTAGAATGCAATTGGCTAACAGCATACTCCATAATACAGTGTATGATCTCATCCATA
 AATTTCACACAAATTACACAACTCTATGCAACTATACCTCATAGTCCAGATGGAGCTG
 AAAATTATAGTAAATTAAACTTAAAGGAGAGATAAGATAGAAGATGGGCAAAATACAACCATGGCTCTAGCAA
 GTCAAGTTGAATGATACTCAACAAAGATCAACTCTGTCATCCAGCAAATACACCATCAACGGAGCACAGGAGA
 TAGTATTGATACCTCTAATTATGATGTCAGAAACACATCAATAAGTTATGTCATGTTATTAAATCAGAAGATG
 CTAATCATAAATTCACTGGGTTAATAGGTATGTTATATGCACTGTCAGTTAGGAGAGAAGACACCAATAAA
 CTCAGAGATGCGGATATCATGTAAGGCAAATGGAGTAGATGTAACACACATGTCAGACATTATGGAAAAGA
 AATGAAATTGAAAGTGTAAACATTGGCAAGCTAACAACTGAAATTCAAATCACATTGAGATAGAATCTAGAAAAT
 CCTACAAAAAAATGCTAAAGAAATGGGAGAGGTAGCTCAGAAATACAGGCATGACTCTCTGATTGTGGGATGATA
 ATATTATGTATAGCAGCATTAGTAATAACTAAATTAGCAGCAGGGACAGATCTGGTCTTACAGCGTGTAGGAG
 AGCTAATAATGTCTAAAAATGAAATGAAACGTTACAAAGGTTACTACCCAAAGGACATAGCCAACAGCTCTATG
 AAGTGTGAAAAACATCCCACTTATAGATGTTTGTCAATTGGTATAGCACAATCTTCTACAGAGGTGGC
 AGTAGAGTTGAAGGGATTGTCAGGATTGTTATGAATGCTATGGTCAGGGCAAGTGTACGGTGGGGAGT
 CTTAGCAAAATCGATTAAAATATTGTTAGGACATGCTAGTGTGCAAGCAGAAATGGAAACAAGTGTGAGGTT
 ATGAATATGCCCCAAAATGGGTGAGCAGGATTCTACCATATTGAAACACCAAAAGCATCATTATTACT
 TTGACTCAATTCTCACTCTCAGTGTAGTTAGGCAATGCTGGCTTAGGCATAATGGGAGAGTACAGAGG
 TACACCGAGGAATCAAGACTATATGTCAGCAAAGGCATATGTCAGACAACTCAAAGAAAATGGTGTGATTAACT
 ACAGTGTACTAGACTTGACAGCAGAAGAACTAGAGGCTATCAAACATCAGCTTAATCAAAGATAATGATGAG
 CTTGAGTTAAATAAAATGGGCAAAATAATCATCATGAAAAGTTGCTCTGAATTCCATGGAGAAGATGCAA
 CAACAGGGCTACTAAATTCTAGAATCAATAAGGCAAATTCCACATCACCCAAAGATCCAAGAAAAGATAGTA
 TCATATCTGTCACTCAATAGATATAGAAGTAACCAAAGAACCTATAACATCAAATTCAACTATTATCAACCCA
 ACAAAATGAGACAGATGATACTGCAGGGAAACAAGCCATTATCAAAGAAAACCTCTAGTAAGTTCAAAGAAGACCC
 TACACCAAGTGTAAATCCTTCTAAACTATACAAAGAACCATAGAAACATTGATAACATGAAGAAGAATCCA
 GCTATTCTACGAAGAAATAATGATCAGACAAAGCATAATAACAGCAAGATTAGGATGTTGAGGTTAAGAGA
 AGTGAATAACTAGGAATGCTTCACACATTAGTAGTGGCAAGTGCAGGACCTACATCTGCTGGGATGGTATAAGAGA
 TGGCATGGTGGTTAAGAGAAGAAATGATAGAAGAAAATCAGAATGAGCATTATGACCAATGACAGATTAGAAG
 CTATGGCAAGACTCAGGAATGAGGAAAGTGGAAAAGACATCAGATGAAGTGTCTCATCCAACA
 TCAGAGAAATTGAAACACATTGGAAAGGGATGATAGTGTACATGTCATGTTGAGATTCTGATTAC
 CAATCTTCACATCAACACACAATACCAACAGAACAAACTACCAACCAATCATCCAACCAACATCCATC
 CGCCAATCAGCCAAACAGCCAACAAAACCAGCCAATCCAAAACCTACACCACCGGAAAAATCTATAATATAGT
 ACAAAAAGGAAAGGGGGCAAAATATGAAACATACGTGAACAAGCTCACGAGGCTCCACATACAGCTGC
 TGGTCAATACAATGTCATTAGAAAAGACGATGACCTGTCATCACTACATAATGGGTGCCCATGTTCCATCATCTA
 TGCCAGCAGATTACTATGAAACTAGCTAATGTCACACTACTGAAACAAATATCCACACCCAGGGACCT
 TCACTAAGAGTCATGATAAAACTCAAGAAGTGTCACTGCTACCAAATGCCGCAAATTACCATATGGCTAATG
 GTCTGGATGAAAGAAGCAAACCTAGCATATGATGTAACACACCCCTGTAATCAAGGCTATGTCATACATGCC
 TAAAATCAAAATGTTGACTACAGTTAAAGATCTCACTATGAAAGACACTAACCCCTACACATGATATTATGCT
 TTATGTGAATTGAAACATGTAACATCAAAAGTCATAATACACATACCTAAGATCCATCAGTCAGAAA
 TAAAGATCTGAACACACTTGGAAAATATAACAACACTGAAATTCAAAGGAAACTGCTATCACAAATGCAA
 ACTTCAACACACTGTCAGGTTACCAACACTCTGTTGTCACCAACTAAACAAACTTATCTGAAGTCCCAGAT
 CATCCCAAGTCATTGTTATCAGATCTAGTACTCAAATAAGTTAATAAAAAATACACATGGGCAAATAATCATT
 GGAGGAAATCCAACATACAAATATGTTAACATAGACAAGTGTCCACACACCATCAGAAATCAACCAATGGAAAAT
 ACATCCATAACATAGAATTCTCAAGCAAATTCTGCCCTACTTTACACTAACACATGATCACAAACAAATAATCTC
 TTGCTAATCATATACTCCATCATGATGCAACTAAACAAACTTGTGAATATAACGTATTCCATAACAAAACCT
 TTGAGTTACCAAGAGCTGAGTTAATACTGATAAAAGTAGTTAATTTAAAGTCATAACAAATGAAACTAGGATATC
 AAGACTAACATAACATTGGGCAAATGCAAACATGTCCAAAACAAGGACCAACGCACCGCTAACGACATTAGAAG

10

20

30

40

50

GACCTGGGACACTCTCAATCATTATTATTCATATCATCGTGCTTATATAAGTTAAATCTTAAATCTGTAGCACAAA
 TCACATTATCCATTCTGCAATGATAATCTCAACTTCACTTATAATTGAGCCATCATATTCACTAGGCCCTGGCAAAC
 CACAAAGTCACACCAACAACACTGCAATCATACAAGATGCAACAAGCCAGATCAAGAACACAACCCCAACATACCTCAC
 CCAGAATCCTCAGCTGGAACTCAGTCCCTTAATCCGCTGAAATTACATCACAAATCACCACATACTAGCTCTCAA
 CAACACCAAGGAGTCAACTCACCCGTCAATCCACAACAGTCAAGGACAAAAACACAACAACTCAACACAAACCC
 AGCAAGCCCACACAAAACAAGCCAAACACCACCAAGCAACCCAATAATGATTTCACTTGAAGTGTCAA
 CTTGTACCTGCAGCATATGCAGCAACAATCCAACCTGCTGGGCTATCTGCAAAGAATACCAACAAAAACCG
 GAAAGAAAACCACTACCAAGCCCACAAAAACCAACCTCAAGACAACCAAAAAAGATCCAAACCTCAAACCC
 AAATCAAAGGAAGTACCCACACCAAGCCCAGAGACCAACCTCAAGCACACCAAAACAAACATCATAACTAC
 ACTACTCACCTCCAAACACCACAGGAATCCAGAACTCAAGTCATGGAAACCTCCACTCACTTCCGAAG
 GCAATCCAAGCCCTTCAGTCTCACACATCCAGTACCCATCACAAACCTCATCTCCACCCAACACACCACGC
 CAGTAGTTACTAAAAACATATTACAAAGGCCTGACCAACTTAAACAGAACTCAAATAACTCTGGGCAA
 TAACAATGGAGTTGCTAATCCTCAAAGCAAATGCAATTACCAACATCTACTGCACTGCAGTCACATTGTTGCTTCT
 GGTCAAACATCACTGAAAGAATTTCATCAATCAACATGCACTGCAGTTAGCAAGGCTATCTAGTGTGCTGAGAAC
 TGTTGTATACCAAGTGTATAACTATAGAATTAGTAATTCAGAAAATAAGTGTATGGAAACAGATGCTAAGG
 TAAAGATGATAAAACAAGAATTAGATAATATAAGTGTAAAGAGAATTGCTGAACTGAGTTGCTCATGCAAAGCACAA
 GCAACAAACATCGAGCGAGAGAGAACTACCAAGGTTATGAATTACACTCAACATGCCAAAAAAACCAATGT
 AACATTAAGCAAGAAAAGGAAAGGAAAGATTCTGGTTTTGTTAGGTTGGATCTGCAATGCCAGTGGCTTG
 CTGTATCTAAGGTCTGCACCTAGAAGGGAAAGTGAACAAGATCAAAGTGCTACTATCCACAAACAGGTGTA
 GTCACTTATCAAATGGAGTTAGTGTGTTAACCAGCAAAGTGTAGACCTAAACACTATATAGATAAACATGTT
 ACTTATGTGACAAGCAAGCTGCAGCATATCAAATAGCAACTGTGATAGAGTTCAACAAAGAACACAGAC
 TACTAGAGATTACCAAGGGAAATTAGTGTAAATGCACTGCAGGCTAACTACACTGTGTAAGGACTACATGTTACTAATAGT
 GAATTATGTCTTAACTCAATGATATGCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTGTAAATGTCACAAATGTTCAAATAGT
 TAGACAGCAAAGTACTCTATCATGTCATAATAAAAGGAAAGTCTAGATGTCATAATTACCAACTATATG
 GTGTTATAGATAACCCCTGTGAAACTACACACATCCCTCATGTACAACAAACAAAAGAAGGGTCAAACATC
 TGTTAACAAAGAACTGACAGAGGATGGTACTGTGACAATGCAAGGATCAGTATCTTCTCCCACAAGCTGAAACATG
 TAAAGTTCAATCAAATCGAGTATTTGTGACACAATGAACAGTTAACATTACCAAGTGAAGTAAATCTGCAATG
 TTGACATATTCAACCCCAAATATGATTGTTAAATTATGACTTCAAACACAGATGTAAGCAGCTCGTTATCACATCT
 CTAGGAGCCATGTGTCATGCTATGCCAAACTAAATGTCAGCATCCAAATAAAATCGTGAATCAAAGACATT
 TTCAACGGGGCATTGTCATGCTGTTAACCTGCAACTGTCAGTGTGAGTAAACACATTATATTAGTAAATA
 AGCAAGAAGGTTAAAGTCTATGTAAGGTTGACACAAATAAAATTCTATGACCCATTAGTATTCCCTCTGAT
 GAATTGATGTCATCAATATCTCAAGTCACGAGAAAGATTAACCGAGCCTAGCATTATCGTAAATCCGATGAAATT
 ATTACATAATGTTAAATGCTGGTAAATCACCATAAAATCATGATAACTACTATAATTAGTGTATTAGTAAATA
 GTGTTATCATTAATTGCTGTTGACTGCTTATGTAAGGCCAGAACACCAGTCACACTAAGCAAAGATCAA
 CTGAGTCGTTAAATGTCATTAGTAACTAAATAAGGACCTAATGTCATGTTACAATGTTCTACAATGTTACTA
 TCTGCTCATGACAACCCATCTGTCATTGATTCTTAAATCTGAACTCTCATCGAAACTCTCATCTATAAACCCT
 CTCACTTACACTTTAAAGTAGATTCTGTTAGTTATAGTTATAAAACAAATGTCATGCCAGATTAACTTACCATC
 TGAAAATGAAAAGTGGGCAAATATGTCACGAAGGAATCTGCAAAATTGAAATTGAGGTCTTCATTAAATG
 GTAAGAGGGTGTCTTGTCAATTGTCATGTTGAAATGCCACCCCATGCACTGCTGTAAGACAAAATTGTT
 AACAGAAACTTAAGTCATGGATAAAAGTATAGACATTATCAGAAAATAAGTGGAGCTGCAAGAGTTGGACAGAAC
 AGAAGAGTATGCTTGGTGTAGTGGAGTGTAGAGGTTATAGGATCAATAAAACAAATAACTAAACAACTCAG
 CATGTTGTCATGACAAACTCCTCACTGAACTCAATGATGATGATCAAAAGCTGAGGGACAATGAGAGCTA
 AATTCAACCAAGATAAGAGTACAAACTGTCATATCATATATTGAAAGCACAGGAAAACAAATAAAACAACTAT
 CCATGTTAAAGATGTCAGCAGACTATTGAAAGAACCATCAAAACACATTGATATCATAAGAGCATAAA
 CCATCAACAAACCCAAAAGAATCAACTGTTAGTGTATACAAACGACCAACGCAAAATAACGATACTACCTAACACTCA
 ATTCTAACACTCACCACATGTTACATTATTAATTCAACAAATTCAAGTGTGGGACAAAATGGATCCATTATTA
 TGAAATTCTGTAATGTTATCTAACCGATAGTTATTAAAGGTTATCTCTTCTCAGAGTGTATGCTT
 GAAGTACATATTCAATGTCCTTATCTCAAAATGATGTTACCAACTTAAAGGTTATCTGTT
 CACATGAACTTAAAGAAACTAAATAACACAGTCTTAAATCTAAGTCAATGAAAGGTTAAATTAGAAGA
 ACCTACTTATTTCTGCTTAACTTCAAGTCAATGAAAGTATGACCTCGTCAGAACAGATTGCTACCACTAATTAC
 TTTAAAGATAATAAGAGGCTATAGAAATAGTGTAAAGTCTATGCTATGTTATGAAATAACTAGGGCTAAA
 GAAAAGGACAAGATAATCCAACATGGACAAGATGAAGGACAACCTAGTTATTACGACATAATCAAAGATGATAT
 ACTTCAGCTGTTAAAGATAATCAATCTCATCTAACAGACAAAAACTCTACAAAACAAAAGACACAACTCA
 AAACAAACACTCTGAAAGAATTGATGTTGTCATGCAACATCTCCATCATGGTAAATACATTGTTACTTATAC
 ACAAAATTAACAAACATTTAACACAGTATCGATCAAATGAGGTTAAAACCATGGTTACATTGATAGATAATCA
 AACTCTTAGTGGATTCTTAAATTGAAACCATATGTTGATAGTTATGATAGGAAACTCAAAGAATTACTG
 TGACAACTTAAATCAATTCTGACATGGAAAGATATTGCTTAAAGTCAAGTGTGTTATGTTAATTACATGATT
 AGTAACGTGTTAACACATTAATAAGCTTAGGCTTAAAGATGCGGATTCAATAATGTTATCTGACACAACTATT
 CCTTATGGAGATTACACTAAAGCTATTTCACAATGAGGGTTCTACATAATAAAAGAGGTTAGAGGGATTATT
 TGTCCTAATTAAATAACAGAAGAAGATCAATTGAGAAACGATTATAATAGTGTCTAACACATCACA
 GATGCTCTAATAAGCTGAGAAAATCTGCTATCAAGAGTATGTCATACATTATGATAAGACAGTGTCCGATAA
 TATAATAATGGCAGATGGATAATTCTTAAAGTAAAGTCTTAAATTAAAGCTGAGGTCAGGAGACAAATAACCTTA
 ACAACTGAGTGAACATATTGTTGTCAGAATTGAGGACACCCAAAGGTTAGTAAAGACAGACAAGCCATGGATGCT
 GTAAAATTAAATTGCAATGAGACCAATTACTGTTAACGAGTCAGTGTAGTATGTTAACAGGGTGCCTTATATAG

10

20

30

40

50

AATTATAAAAGGGTTGAAATAATTACAACAGATGGCTACTTTAAGAAATGCTATTGTTACCTTAAGATGGT
 TAACITACTATAAAACTAAACACTTATCTCTTGTGGAACTTACAGAAAAGAGATTGATGTTACAGGACTA
 CGTTTCTATCGTGAGTTCGGTTGCCTAAAAAGTGGATCTTGAATGTTATAAAATGATAAAGCTATATCACCTCC
 TAAAATTTGATATGGACTAGTTCCCTAGAAATTACATGCCATCACACATACAAAACATATAAGAACATGAAAAT
 TAAAATTTCCGAGAGTGATAAAATCAAAGAGTATTAGAGTATTATTTAAGAGATAACAAATTCAATGATGTAT
 TTATACAACGTGTAGTTAATCAAAGTTATCTCAACACCCCTAATCATGTGGTATCATTGACAGGCAAAGAAAGAGA
 ACTCAGTGTAGGTAGAATGTTGCAATGCAACCGGGAAAGTTCAGACAGGTTCAAATATTGGCAGAGAAAATGATAG
 CTGAAAACATTTACAATTCTTCCTGAAAGTCTTACAAGATATGGTATCTAGAACTACAAAATTTAGAAGCTG
 AAAGCAGGAATAAGTAAACAAATCAAATCCTACAATGATAATTACACAAATTACATGTTAGTGCTCTATCATCAC
 AGATCTCAGCAAATTCAATCAGATTGATGAAACGTCATGTATTGAGTGCTGGATGAACTGCATG
 GTGTCACATCTCATTTCCTGGTTACATTAACTATTCATGTCAACATAATGACACATAGGATGCAACCC
 CCTATATAGGAGATCATATTGAGATCTTACAATGAGATGAACAAAGTGGATTATATAGATATCACATGGTGG
 CATCGAAGGGGGTGTCAAAAATGACCATAGAAGCTATATCAGTATTGGATCTAATATCTCAAAGGGAAAT
 TCTCAATTACTGCTTTAATTATGGTACATCAATAGATATAAGCAAACAACTCAGACTCATGGAAGGTCAA
 ACTCATGCTCAAGCAGATTATTGTCAGCATTAAATGCTTAAATTACTGTATAAAGAGTATGCAGGATAGGCCA
 CAAATTAAAAGGAACGACTTATATCAGAGATATGCAATTATGAGTAAACAAATTCAACATAACGGTGTAT
 ATTACCCAGCTAGTATAAGGAAAGTCTAAGAGTGGGAGCTGATAACACTATATGATGATTGATGTTCAAAGTGGAGT
 CTAGAACTATAGGTAGTTGACACAAAGATTAGAATATAGAGGTGAAAGTCTATTATGAGTTAATTTAGAAA
 TGATGGTTATATAATCAGATTGCTCTACAATTAAAATCATGCATTATGTAACAAATAACTATATTGGACATAT
 TAAAGGTTCTGAAACACTTAAACCTTTAATCTGATAATATTGATACAGCATTAAACATTGTATATGAAATTAA
 CCATGTTATTGGTGTGATCCAACTTGTATATCGAAGTTCTATAGAAGAACTCCTGACTTCTCACAGA
 GGCTATAGTTACTCTGTCTCATCTATTGTTATACAAACCATGACTTAAAAGATAAACTTCAAGATCTGTCAG
 ATGATAGATTGAAATAACTCTTAAACATGATAATTACAGTTGACAAAACCTTAATGCTGAATTGTAACATTGATG
 AGAGATCCTCAAGCTTGGGTCTGAGAGACAAGCTAAATTACTAGCGAAATCAATAGACTGGCAGTTACAGGGT
 TTGAGTACAGCTCAAACAAATATTCTCCAAAAGTGCACAAACATTACTACTACACAGATACTAAATGATA
 TTATGCAAATATAGAACCTACATATCTCATGGGCTAAGAGTTGTTATGAAAGTTACCCCTTATAAGCAGAG
 AAAATAGTAAATCTTATATCAGGTACAAATCTATAACTAACATACTGGAAAAACTCTGCCCCATAGACTAACAGA
 TATTGATAGGCCACTGAGATGATGAGGAAAACATAACTTGTCTTAAAGGATAACTCCATTGGATTGTAACAGAG
 ATAAAAGAGAGTATTGAGTATGGAAAACCTAAGTACTGAAATTAGGAAATATGTTAGGGAAAGATCTTGGTCT
 TTATCCAATATAGTGGTGTACATCACCCAGTACATGATAACAACTACAGCTTACACTAACAGCACTATATC
 TAGTGGCATAATTATAGGAAATATAATGTTAACAGTTAACAGCTTACGTTGGTGGAGAGAGGACCACTAAACCATGGTTG
 GTTCATCTACACAAGAGAAAAACATGCCAGTTATAATAGACAAGTCTTAAACCAAAACAGAGAGATCAAATA
 GATCTATTAGCAAATTGGATTGGGTGTATGCATCTATAGATAACAAAGGATGAATTCTGGAAAGAACTCAGCATAGG
 AACCCCTGGTTAACATATGAAAAGGCCAGAAATTATTCACAATATTAGTGTCAATTATGATCAGCCTTA
 CAGTCAGTAGAGCATGTAATTCCCGCATCAACAGCTTATAGAACAAATTATCAGTACACTAGC
 CCTTAAATCGCATTAACAGAAAAGTGGTGTGAGGAGATTTGACATAGTATTCCAAAAGTGTATAAGCTTGG
 CCTTAGTTATGTCAGTAGTGAACAAATTACTAATGTTGCTCTAACAGAAATTCTCATACCTAACGTTAATG
 AGATACTTTGATGAAACCTCCATACAGGTGATGTTGATATTCAACAGTTAAACAGTGTACAAACAG
 CATATGTTTACACAGAAAATAAGTTGACTCAATATGGAATTATTCTTAAAGTAATAAAACACTCAAATCTGG
 ATCTCATGTTAATTCTAATTAAATATGGCACATAAAATCTGACTATTCTATAACTTACATTAAAGTACTA
 ATTAGCTGGACATTGGATTCTGATTATACAACCTTATGAAAGATTCTAAAGGTTATTGAAAAGATTGGGAGAG
 GGATATATAACTGATCATGTTATTGAAAGTTCTCTCAATGCTTATAAGACCTATCTTGTGTTTTCA
 TAAAGGTTATGGCAAAGCAAAGCTGGAGTGATGATGAAACCTCAGATCTTGTATGTTGAAATTAAAGACA
 GTAGTTATGGAAAGTCTATGCTAAGGTATTGTTAGACAAAAAGTTGATCAATACATTCTGGCAAGATGCAAGT
 TTACATAGAGTAAAGGATGTCAGCTCAAATTGTTCTTAAACGCTTAAATGAGCTTACAGTTG
 CCCTTGGTTGTTAACATAGATTATCATCAACACATATGAAAGCAATTAAACTATATAGATCTTGTGAAATGG
 GATTGATAAAATATAGATGAAACACATTAAAATAACACAAATTCAATGATGAAATTTTATCTTAAATCTTC
 TACATTAATTAACTCTCAGATAACTCATCTTAACTAACTACATGAAATTCTGTTGAAATTAGAAA
 TAAATACAACAAATTATCATCTCAGACAGGAAACCTAGAGAAATATGAGCAATTGGATTAAAGTAATGACA
 AAAAGACACTGAATGACTATTGTATAGTAAAGTGTACTAAATGTTACATTGTTATCTAATAAGAACGTT
 ATAAATCGTCGCAATGATAGAACAAATTACAGCAAAAGATTGTTATCTTACCTATGGTTGATTG
 TAGAATTATAGATCATTGAGCAATACAGCAAACCAACTTCAACTACTACATTCCCACCAAATATCTTAG
 TGCAACATAGCACATCACTTACTGCGATGCTCTGGCATCATATTAGATTCAATTGTTGATTCTACA
 GGGTGTAAAATTAGTATAGAGTATTGTTAAAGATCTTAAATTAAAGATCCAAATTGTTATAGCATTAGGTGA
 AGGAGCAGGGAAATTATTGCGTACAGTAGTGGAACTTCATCTGACATAGAATGTTACAGAAGTCTGAAAG
 ATTGCAATGATCATGTTACCTATTGAGTTTAAAGGCTGACATGGACATATCACACATTGATTGGTAAAAT
 TTGACCATCTGCTACAGTCAACCAACATTCTGTTTAAAGTGTACATTGTTGTTGAACTATCAG
 TCTTTTGTCTGTGATGCCGAAATTGCTGTAACAGTCAGTGGAGTAAAATTATAATAGAATGGAGCAAGCATGAA
 GAAAGTGCAGACTGTTCTCAGTTAAATGTTAATAGTAAAATATCATGCTCAAGATGATATTGATT
 AAATTAGACAATATAACTATATTAAACCTTATGTTGTTGCTTAGGAGCTAAGTAAAGGGATCGGAGGTTACTAGT
 CCTTACATAGGTCTGGAAATATCTCCAGTTATGTTGAACTTACAAAGTCTAAATGATACTATCAAAGAACCA
 AAAATTTCATCATGCTAACAGAAAGCTGATAAAAGTCTATTGATGCAAAATTAAAGTGTGATACCCCTTCTTGT
 TACCCCTATAACAAAAAAAGGAAATTAACTGCAATTGCAAAACTAAAGAGTGTGTTAGGGAGATATACTATCATA
 TTCTATAGCTGGACGTAATGAAAGTTCTGCAATAACATTATAATCATGAAACATCTTAAAGTGTCA

ATCATGTTTAAATTCTAGATCAACAGAACTAAACTATAACCAATTATATGGTAGAATCTACATATCCTTACCTA
 AGTGAATTGTTAAACAGCTTGCACAAACCAATGAACTTAAAAAAACTGATTAAAATCACAGGTAGTCTGTTATACAACTT
 TCATAATGAATAATGAATAAAGATCTTATAATAAAATCTCCATAGCTATACACTACAGTCTATTCAATTATAGTT
 ATAAAAATAAAAATCATATAATTGTTAAATACTTTAGTGAACTAATCCTAAAGTTATCATTAAATCTTGTGAA
 GGAATAAAATTAAACCTAATCTAATTGGTTATATGTGTTAAACTAAAGAGTGTGTTAGGGAGATATACTATCATA
 TTCTCTCGT

【0133】

D46/NS2/N/ M2-2-HindIIIのアンチゲノムcDNA配列(SEQ ID NO:18)

10

20

30

40

50

ACAGGGAAAAATGCGTACAACAAACTTGCATAAACCAAAAAATGGGCAAATAAGAATTGATAAGTACCACTTAA
 ATTTAECTCCTGGTTAGAGATGGGCAGCAATTGAGTATGATAAAAGTTAGATTACAAAATTGTTGACAA
 TGATGAAGTAGCATGTTAAAATAACATGCTATACTGATAAAATTACATTTACTATGCTTGGCTAAGGCAG
 TGATACATACAATCAAATTGAATGGCATTGTGTTGCACTGTTATTACAAGTAGTGTATTTGCCCTAATAATAAT
 ATTGTAGTAAATCCAATTTCACAACATGCCAGTACTACAAAATGGAGGTTATATGGGAAATGATGGAATTAAAC
 ACATTGCTCTAACCTAATGGTCACTAGATGACAATTGCAAATTAAATTCTCCAAAAACTAAGTGTCAACAA
 TGACCAATTATGAATCAATTATCTGAATTACTGGATTGATCTTAATCCATAAATTATAATTATCAACTAG
 CAAATCAATGTCACTAACACCATTAGTTAATATAAAACTAACAGAAGACAAAATGGGCAAATAATCAATTCA
 CCAACCCAACCAGGACACAACCCACAATGATAATACACCAAAAGACTGATGATCACAGACATGAGACCGTTGCA
 CTTGAGACCATAATAACATCACTAACAGAGACATCATACACACAAATTATACACACAAATTGATAATCATGAATGCAT
 AGTGAGAAGACTTGATGAAAGACAGGCCACATTACATTCTGGTCAACTATGAAACTATTACACAAAGTAG
 GAAGCACTAAATATAAAATACTGAATACAACACAAAATGGCACTTCCCTATGCCATATTCAATCAT
 GATGGGTTCTAGAATGCAATTGGCATTAAAGCTACAAAGCATACTCCATAATATAACAAGTATGATCTCAATCCATA
 AATTCAACACAATATTCAACAAACTCTATGCATAACTATACCTAGTCCAGATGGAGCTG
 AAAATTATAGTAATTAAAACCTAAGGAGAGATAAGATAGAAGATGGGCAAATAACACCATGGCTTAGCAA
 GTCAAGTTGAATGATACTCAACAAAGATCAACTTCTGTCATCCAGCAAATGCCATCCAACGGGACAGGAGA
 TAGTATTGATACTCTAATTATGATGTCAGAAACACATCAATAAGTTATGTCAGTATTAAATCACAGAAGATG
 CTAATCATAAATTCACTGGTTAATAGGTATGTTATGCGATGCTAGGTTAGGAAGAGAACCCATAAAAATA
 CTCAGAGATGCGGGATATCATGTAAGCAATGGAGTAGATGTAACAACACATCGTCAAGACATTAATGGAAAAGA
 AATGAAATTGAAAGTGTAAACATTGGCAAGCTAACAACTGAAATTCAAATCAACATTGAGATAGAATCTAGAAAAT
 CCTACAAAAAAATGCTAAAGAAATGGGAGAGGTAGCTCAGAATACAGGCATGACTCTCTGATTGTGGATGATA
 ATATTATGTAAGCAGCATTAGTAATAACTAAATTAGCAGCAGGGACAGATCTGGCTTACAGCCGTGATTAGGAG
 AGCTAATAATGCTCTAAAATGAAACGTTACAAGGCTTACTACCCAAGGACATAGCCAACAGCTCTATG
 AAGTGTGAAAACATCCCCACTTATAGATGTTTGTTCATTGGTATAGCACAATCTTACCCAGGGTGG
 AGTAGAGTTGAAGGGATTGGCAGGATTGTTATGAATGCCTATGGTCAGGGCAAGTGTACGGTGGGGAGT
 CTTAGCAAATCGGTTAAAATATTGTTAGGACATGCTAGTGTGCAAGCAGAAATGGAACAAGTGTGAGGTT
 ATGAATATGCCAAAATTGGGTGGTAAGCAGGATTCTACCATATATTGAACAACCCAAAAGCATCATTATCT
 TTGACTCAATTCTCCTACCTCTCAGTGTAGTATTAGGCAATGCTGCTGGCTAGGCATAATGGGAGAGTACAGAGG
 TACACCGAGGAATCAAGATCTATGATGCAAGCAAGGCATATGCTGAACAACCTAAAGAAAATGGTGTGATTA
 ACAGTGTACTAGACTGACAGCAGAAGAACTAGAGGCTATCAAACATCAGCTTAATCCAAAAGATAATGATGAG
 CTTTGAGTTAATAAAATGGGCAAATAATCATCATGAAAAGTTGCTCTGAATTCCATGGAGAAGATGCAA
 CAACAGGGCTACTAAATTCTAGAATCAATAAGGGCAAATTCAACATCACCCAAAGATCCAAGAAAAGATAGTA
 TCATATCTGCAACTCAATAGATATAGAAGTAACCAAGAAAGCCATAAACATCAAATTCAACTATTCAACCC
 ACAAAATGAGACAGATGATACTGCAGGGACAAGCCAAATTCAAAAGAAAACCTCTAGTAAGTTCAAAGAAGACCC
 TACACCAAGTGATAATCCCTTCTAAACTATACAAAGAAACATAGAAACATTGATAACAATGAAGAAGAATCCA
 GCTATTCTACGAAGAAATAATGATCAGACAAACGATAATATAACAGCAAGATTAGATAGGATTGATGAAAATTA
 AGTAAATACTAGGAATGCTCACACATTAGTAGTGTGCAAGTGCAGGACCTACATCTGCTCGGGATGGTATAAGAGA
 TGCCATGGTTGGTTAAGAGAAGAAATGATAGAAAAATCAGAACTGAGCATTATGACCAATGACAGATTAGAAG
 CTATGGCAAGACTCAGGAATGAGGAAAGTGAAAAGATGGCAAAGACACATCAGATGAGTGTCTCAATCCAACA
 TCAGAGAAATTGAACACCTATTGGAAGGGATGATAGTGTACATGATCTACTGAAAGATTCTGATTAGTTAC
 CAATCTTCACATCAACACACAATACCAACAGAACAAACTAACCAACCCATCATCCAACCAAACATCCATC
 CGCCAATCAGCCAAACAGCCAAACAAACAGCCAACTCCAAAACATAACCACCCGGAAAAATCTATAATATAGTT
 ACAAAAGGAAAGGGGGCAAATATGGAAACATACGTGAACAAGCTCAGGAAGGCTCCACATACACAGCTGC
 TGTTCAATACAATGCTTAGAAAAGACGATGACCTCTGCATCACTACAATATGGGTGCCATGTTCCAATCATCTA
 TGCCAGCAGATTACTTATAAAAGAACTAGCTAATGTCACACTACTAGTGAACAAATATCCACACCCAAAGGGACCT
 TOACTAAGAGTCATGATAAAACTCAAGAAGTGCAGTGTGCTAGCACAATGCCAGCAAATTACCATATGCGCTAATGT
 GTCCTGGATGAAAGAAGCAAACCTAGCATATGATGTAACCACACCCCTGTGAAATCAAGGCATGTAGTCTAACATGCC
 TAAAATCAAAAATATGTTGACTACAGTTAAAGACTCTACATGAAAGACACTCAACCCATACATGATATTATTGCT
 TTATGTAATTGAAAACATAGTAACATCAAAAGTCTACATACCAACATACCTAACATGATCCATCAGTGTCA
 TAAAGATCTGAACACACTTGAAAAATATAACACACTGAAATTCAAAATGCTATCACAAATGCAAAATCATCCCTT
 ACTCAGGATTACTATTAGTCATCACAGTGCAGCAACAAAGGAGCATTCAAATACATAAAAGCCACAAAGTCACATT
 ATAGTAGATCTGGAGCTTACCTAGAAAAAGAAAGTATATATTGTTACCCACAAATTGGAGCAGCACAGCTACACG
 ATTGCAATCAAACCCATGGAAGGATTAACCTTTCTACATCAGTGTGTTAATTCAACAAACTTACACAAACTTCTAC
 ATTCTTCACCTCACCATCACAAACACTCTGTTCAACCAATCAAACAAACTTACACAAACTTACACAAACTTCTAC

10

20

30

40

50

10

20

30

40

ATTAGCCTAGTAGATTAAATGTTGTTAATTACATGGATTAGTAAGTCTGAACACATTAATAAAAAGCTTAGG
 CTTAAGATGCGGATTCAATAATGTTATCTGACACAATTCCTTATGGAGATTGATACTAAAGCTATTICACA
 ATGAGGGGTTCTACATAATAAAAGAGGTAGAGGGATTATTATGTCCTAATTAAATAACAGAAGAGATCAA
 TTCAAGAAAACGATTTTATAATAGTATGCTCAACAAACATCACAGATGCTGATAAAAGCTCAGAAAAATCTGCTATC
 AAGAGTATGTCATACTATTAGATAAGCAGTGTCCATAATAATAATGGCAGATGGATAATTCTATTAGTA
 AGTTCTTAAATTAAAGCTTGTGAGGTCAGGACATAACCTTAACAATCTGAGTGAACATATTGTTGTCAGAATA
 TTGGACACCCATGGTAGATGAAAGACAAGCCATGGATGCTTTAAATTGCAATGAGACCAAATTACTT
 GTTAAGCAGTCTGAGTATGTTAAGAGGTGCTTTATGAGATAAAAGGGTTGTAATAATTACAACAGAT
 GGCTACTTAAAGAAATGCTATTGTTTACCCCTAAGATGGTTAACTTACTATAAAACTAAACACTTATCCTTCTTG
 TTGGAACCTACAGAAAGAGATTGATTGTTACAGGACTACGTTCTATCGTGAGTTGGTGCCTAAAAAAAGT
 GGATCTGAAATTGATAATAAGTATAACATCACCTCTAAATTGATATGGACTAGTTCCCTAGAAATT
 ACATGCCATCACACATAAAACTATAGAACATGAAAATTTCGAGAGTGATAAAATAAGAAGAGTA
 TTAGAGTATTATTTAAGAGATAACAAATCAATGAATGTTACACTGTGAGTTACAACTGAGTTAATCAAAGTTATCTCAA
 CAAACCTAATCATGTGATCATTGACAGGCAAAGAAGAGACTCAGTGTAGGAGATAATGGCAATGCAACCGG
 GAATGTTACAGACAGGTCATAATTGGCAGAGAAAATGATAGCTGAAACATTTACAATTCTTCTGAAAGTCTT
 ACAAGATATGGTGACTAGAACTACAAAAAATATTAGAAGCTGAAAGCAGGAATAAGTAAACAAATCAAATCGCTACAA
 TGATAATTACACAAATTACATTAGTAGTGTCTATCATCACAGATCTGCAACGAAATTCAATCAAGCATTGATATG
 AAACGTCATGTATTGAGTGTCTGGATGACTGCTGTTACATGGTGTACATCTATTTCTGTTACATTIACT
 ATTCTCATGTCACAATAATATGCACATATAGGCATGCACCCCCCTATAGGAGATCATATTGAGTCTTAAACAA
 TGAGATGAACAAAGTGGATTATAGATATCACATGGTGGCATCGAAGGGTGGTCAAAACTATGGACCAG
 AAGCTATATCACTATTGGATCTAATATCTCAAAGGAAATTCTCAATTACTGCTTAAATTATGGTACAATCAA
 TCAATAGATATAAGCAACAACTCAGACTCATGGAAAGCTCAACTGCTCAAGCAGATTATTGCTAGCATATAA
 TAGCCTTAAACTTACTGATAAAAGAGATGTCAGGCCATAGGCAACAAATTAAAAGGAAGACTGAGACTTATATACGAG
 ATATGCAATTATGAGTAAACAACTAACATAACGGTATATTACCCAGCTAGTATAAAAGAAAGTCTAAGAGT
 GGACCGTGGATAAACACTATTTGATGATTCAAAGTGTAGTCTAGAACTATAGGAGTTGACACAAGAATTAGA
 ATATAGAGGTGAAAGTCTATTGAGTTAATTTAGAAATGTATGGTTATATAATCAGATTGCTCTACAATTAA
 AAAATCATGCATTATGTAACAAATAACTATATTGGACATATTAAAGGTTCTGAAACACTTAAACCTTTTAAT
 CTGATAATTATGATACAGCATTAAACTGTTATGAAATTACCCATGTTATTGTTGTTGATCCAACTGTT
 ATATCGAAGTTCTATAGAAGAAGCTCTGACTCTCCTCACAGAGGCTATAGTCTACTCTGTTCTACTTAGTT
 ATACAAACATGACTAAAAAGATAAACTTCAAGATCTGAGTGTAGTAACTTCTTAAACATGCTAAATC
 ACGTTTGACAAAAACCTTAATGCTGAATTGTAACATTGATGAGAGATCCTCAAGCTTAGGGTCTGAGAGACAAGC
 TAAAATTACTAGCGAAATCAATAGACTGGCAGTTACAGAGGTTTGAGTACAGCTCCAAACAAATATTCTC
 GTGCACAACATTACTACTACAGAGATAGCTAAATGATATTGCAAATATAGAACCTACATCTCATGGG
 CTAAGAGTTTATGAAAGTTACCTTTATAAAGCAGAGAAAATAGTAAATCTTATATCAGGTACAAAATCT
 AACTAACATACTGGAAAAACTCTGCCTAGACTTAAACAGATTGAGAGCCACTGAGATGATGAGGAAAACA
 TAACTTTGCTTATAAGGATACTTCCATTGGGTTGTAACAGAGATAAAAGAGAGATTGAGTATGGAAAACCTAAGT
 ATTACTGAATTAGCAAAATATGTTAGGGAAAGATCTTGTCTTATCCAATATGTTGTTACATCACCAGTAT
 CATGATAACATGGACATCAAATAACTACAAGCACTATCTAGTGGCATAATTATAGAAATATAATGTTAAC
 GTTAAACACGGTGGAGAGAGGACCCATAAACCATGGTGGTCTACACAAAGAGAAAAAAACATGCCAGT
 TATAATAGACAAGTCTAACAAAAACAGAGAGATCAAATAGATCTATTAGCAAATTGGATTGGTGTATGCATC
 TATAGATAACAAAGGATGAATTCTGAAAGAACTCAGCATAGGAACCTTGGGTTAACATATGAAAAGCCAAGGAAAT
 TATTCTCACAATATTGAGTGTCTTATGCTACGGCTTACAGTCAGTAGAGACCATGTAATTCCCTGCTAC
 ATACCGCTTATAAGCAACAAATTATCAGGACTAGCCCTTAAATCGCATATAACAGAAAATGTTG
 TGAAGATATTGACATGACTTCTAAAGTAAACAGTGTACACAAAACAGCATATGTTTACAGACAAAATAAGTTGACTCA
 ATATGTGAAATTCTTAAAGTAATAAAACACTCAAATCTGGATCTCATGTTAATTCTAATTAAATTGGCACATA
 AAATATCTGACTTCTTCTAACATTACTTAAAGTACTAATTGAGTCTGGACATTGGATTCTGATTACAACTT
 ATGAAAGATTCTAAAGTATTGAAAAGATTGGGAGAGGGATAATAACTGATGTTATTGTTATTGAA
 AGTTTCTTCAATGCTTATAAGACCTATCTGTTGTTTCAAAAGGTTGCGAAAGCAGCTGGAGTGTGATA
 TGAACACTTCAGATCTCTATGTTAGGAAATTAGACAGTAGTTGAGTGTATGCTAAGGTTATT
 GAACAAAAAGTTATCAAATAACATTCTTAGCCAAGATGCAAGTTACATAGAGTAAAGGATGTCAGCTTAA
 ATGGTTCTTAAACGTTAATGTCAGAATTACAGTTGCCCTGGGTTAACATAGATATTATC
 ATATGAAAGCAATATTACTATAGATCTGTTAGAATGGGATTGATAAAATAGATAACACATTAAA
 AAACACAAATTCAATGATGAAATTCTTCTAACATTCTCAGTAACTTACTCTCAGATAACTCATCT
 ATTAACTAAACATATAAGGATTGCTAATTGTAATTAGAAAATAATTACAACAAATTATATCATC
 CCTACACAGAAA
 CCTCTAGAGAATATACTACGCAATTCCGATTAAAGTAATGACAAAAGACTGAACTATTGAGTATGTT
 GTGACTCAATAATGTTACCATGTTCTAATAAGAGCTTAAATCGTCTGCAATGATTAGAACCAATTACAG
 CAAACAGATTGTTAAATTCTTCTGTTGATTGAGATAATTAGACATTGAGGCAATACAGCCAAAT
 CCAACCAACTTACACTACTCTCCACCAAAATATCTTACTGTCACAAATGACACATCCTTACTGCTGCTCCT
 TGGCATCATATAATGAGTCAATTGTTAGTTGTTACAGGTTGAAAATTAGTATAGAGTATATTAA
 TCTTAAATTAAAGATCCCATTGTTAGGATTGACATAGGTGAAGGGAGCAGGGAAATTATTGCGTACAGTGTG
 AACTTGATCTGACATAAGATAATTACAGAAGTCTGAAAGATTGCAATGATGACATTACCTTACCTATTGAGTT
 AGGCTGTACAATGGACATATCACACATTGATTGTTGAAATTGACCTTCTGCTACAGATGCAACCAACACAT

10

20

30

40

50

TCATTGGCTTATTTACATATAAAGTTGCTGAACCTATCAGTCTTTGTCTGTGATGCCAATTGTCGTAAACAG
TCAACTGGAGTAAATTATAATAGAATGGAGCAAGCATGTAAGAAAGTCAAGTACTGTTCTCAGTTAATAATG
ATGTTAATAGTAAATTATCATGCTCAAGATGATATTGATTCAAAATTAGACAATATAACTATATTAAAACCTATG
ATGCTTAGGAGTAAAGGATCGGAGGTTACTTAGTCCTACAATAGGCCTGCAATATATTCCCAGTAT
TTAATGTAGTACAAAATGCTAAATTGATACATCAAGAACCAAAATTTCATCATGCCTAAGAACAGTGTAAAGAG
TCTATTGATGCAAATTAAAAGTTGATACCCCTTCTTGTACCCCTATAACAAAAAAGAATTAAACTGCATT
GTCAAAACCTAAAGAGTGTGTTAGTGGAGATATACTATCATATTCTATAGCTGGACGTAATGAAAGTTTCAGCAATA
AACTTATAAATCATAAGCATATGAACATCTAAATGGTCAATCATGTTAAATTTCAGATCAACAGAACTAAAC
TATAACCATTATATATGGTAACTACATATCCTACCTAAGTGAATTGTTAACAGCTGACAACCAATGAAC
TAAAAAAACTGATTAACACAGGTTAGTCTGTTACAACTTCATAATGAATAATGAATAAGATCTATAATAA
AATTCCCAGTCTATAACTAACACTGTATTCAATTAGTTATTAAAATCATATAATTTTAAATA
CTTTAGTGAACTAATCCTAAAGTTACATTAACTTGTGGAGGAATAATTAAACCCTAATCTAATTGGTTATA
TGTGTTAACTAAATTACGAGATATTAGTTTGACACTTTCTCGT 10

【0134】

RSV 276ゲノムのアンチゲノムcDNA配列(SEQ ID NO:19)

ACGGGAAAAAAATGCGTACAACAACTTGCATAAAACCAAAATGGGCAAATAAGAATTGATAAGTACCACTTAA
ATTTAACTCCCTGGTTAGAGATGGCAGCAATTGAGTATGATAAAAGTTAGATTACAAAATTGTTGACAA
TGATGAAGTAGCATGTTAAAATAACATGCTACTGATAAAATTACATTAACTAATGCTTGGCTAAGGCAG
TGATACATACAATTGAACTGGCATGTTGCTATTACAAGTAGTGTATTTGCTTAATAATAAT
ATGTTAGTAAATCCAATTTCACACAAATGCCAGTACTACAAAATGGAGGTATATATGGGAAATGATGGAATTAA
ACATTGCTCTCAACCTAACGGCTACTAGATGACAATTGAAATTCTCCAAAACTAAGTGATTCAACAA
TGACCAATTATATGAATCAATTACTGAAATTCTGGATTGATCTTAATCCATAAAATTATAATTATCAACTAG
CAAATCAATGTCACTAACACCATTAGTTAATAAAACTTAAACAGAACGAAAGACAAAATGGGCAAATAATCAG
CCAACCCACCATGGACACAAACCCACAATGATAATACACACAAAGACTGATGATCACAGACATGAGAACCGTTGTC
CTTGAGACCCATAATAACATCACTAACACAGAGACATCATACACACAAATTATATACTTGATAATCATGAATGCA
AGTGAGAACGACTTGATGAAAGACAGGCCACATTACATTCTGGTCAACTATGAAATGAAACTATTACACAAAGTAG
GAAGCACTAAATATAAAATACTGAATACACAAATATGGCACTTCCCTATGCCATATTCAATCAT
GATGGGTTCTAGAATGCAATTGGCATTAAAGCTACAAAGCATACTCCATAATAACAGTATGATCTCAATCCATA
AATTCAACACAAATTTCACACAACTCTAAACAAACTCTATGCATAACTATACTCCATAGTCCAGATGGAGCTG
AAAATTATAGTAAATTAAATTAGGAGAGATATAAGATAGAAGATGGGCAAATAAGATGGCTTTAGCAAAG
TCAAGTTGAATGATAACTCAACAAGGATCAACTCTGTCATCCAGCAAATACGCCATCCAACGGAGCACAGGAGAT
AGTATTGATACTCTAAATTATGATGTCAGAACACATCAATAAGTTATGTCATGTTATTAAATCACAGAACGATGC
TAATCATAAATTCACTGGGTTAATAGGTATGTTATGCGATGTCAGGTTAGGAAGAGAACACCATAAAATAC
TCAGAGATGGGGATATCATGTAAGCAAAATGGAGTAGATGTAACACACATCGTCAAGACATTAATGGAAAGAA
ATGAAATTGAGTGTAAACATTGCAAGCTTAACAACAGTAAATTCAACATTGAGATAGAATCTAGAAAATC
CTACAAAAAAATGCTAAAGAAATGGGAGAGTAGCTCAGAACATACAGGATGACTCTGATTGTGGATGATAA
TATTATGTATAGCAGCATTAGTAAACTAAATTAGCAGCAGGGACAGATCTGGCTTACAGCCGTGATTAGGAGA
GCTAATAATGTCCTAAAAATGAAATGAAACGTTACAAAGGCTTACCCAGGACATAGCCAACAGCTTCTATGA
AGTGTGTTAAAAACATCCCCACTTTAGATGTTTGTCATTGGTATAGCACAATCTTACCCAGGGTGGCA
GTAGAGTTGAAGGGATTGGCAGGATTGTTATGATGCTATGGTCAGGGCAAGTGTGTTACGGTGGGAGTC
TTAGCAAAATCGGTTAAAATTATGTTAGGACATGCTAGTGTGCAAGCAGAAATGGAACAAAGTTGTTGAGGTTA
TGAATATGCCAAAATTGGGTTGAAGCAGGATTCTACCATATAATTGAACACCCAAAAGCATCATTATTATCTT
TGACTCAATTCCACTCTCCAGTGTAGTATTAGGCAATGCTGCTGGCTAGGCATAATGGGAGAGTACAGAGGT
ACACCGAGGAATCAAGATCTATGATGCAAGAACAGGATATGCTGAACAACTCAAAGAAAATGGTGTGATTAAC
CAGTGTACTAGACTTGACAGCAGAACAGGATATCAAACATCAGCTTAATCCAAAAGATAATGATGAGAGC
TTGAGTTAATAAAATGGGCAAATAATCATGTTAGGAAAGTGTGCTCTGAAATTCCATGGAGAACGATGCAAAC
AACAGGGCTACTAAATTCTAGAATCAATAAAGGCAATTACATCACATACCCAAAGATCCAAGAAAAAGATAGTAT
CATATCTGCAACTCAATAGATATAGAAGTAACCAAGAAAGCCCTATAACATCAAATTCAACTATTATCAACCCAA
CAAATGAGACAGATGATACTGCAAGGGACAAGCCAATTATCAAAGAAAACCTCTAGTAAGTTCAAAGAACGACCT
ACACCAAGTGATAATCCCTTTCTAAACTATACAAAGAACCATAGAAACATTGATAACATGAAGAACGATCCAG
CTATTACACAGAACAAATGATCAGACAAACGATAATAACAGCAAGATTAGATAGGATTGATGAAATTAA
GTGAAATACTAGGAATGCTTCACACATTAGTAGTGGCAAGTGCAGGACCTACATCTGCTGGGATGGTATAAGAGAT
GCCATGGGTTGTTAAGAGAAGAAATGATAGAAAAAATCAGAACTGAAGCATTATGACCAATGACAGATTAGAAGC
TATGGCAAGACTCAGGAATGAGGAAAGTGAAGGAGACACATCAGATGAAAGTGTCTCTCAATCCAACAT
CAGAGAAATGAAACACCTATTGGAGGGATGATAGTGACAATGATCTACTGAAAGATTCTGATTAGTAC
AATCTTCACATCAACACACAATACCAACAGAACAAACTAACCAACCCAAATCATCCAACAAACATCCATCC
GCCAATCAGCCAAACGCCAACAAAACACAGCCAATCCAAAACCTAACCCACCCGGAAAAATCTATAATATAGTTA
AAAAAAAGGAAAGGGTGGGCAAATAATGAAACATACGTGAACAAAGCTTCAGCAAGGCTCCACATACAGCTGCT
GTTCAATACAATGTTAGAAAAAGACGATGACCTGCTACATTACAATATGGGTGCCATGTTCAATCATCTAT
GCCAGCAGATTACTTATAAAAGAACTAGCTAATGTCAACATACTAGTGAACAAATATCCACACCCAGGGACCTT
CACTAAGAGTCATGATAAAACTCAAGAAGTGCAGTGTAGCACAATGCCAGCAAATTACCATATGCCCTAATGTG
TCCTGGATGAAAGCAAACTAGCATAATGATGTAACCACACCTGTGAAATCAAGGATGATGCTAACATGCC 40

AAAATCAAAAAATATGTTGACTACAGTTAAAGATCTCACTATGAAGACACTCAACCCACACATGATATTATTGCTT
 TATGTAATTGAAAACATAGTAACATCAAAAAAGTCATAATACCAACATACCTAAGATCCATCAGTGTCAAGAAAT
 AAAGATCTGAACACACTTGGAAAATATAACAAACCAACTGAAATTGCAAAATGCTATCACAAATGCAAAAATCATCCCTA
 CTAGGATTACATTAGTCATCACAGTGACTGACAACAAAGGAGCATTCACATACAAAGCCACAAGTCATTCA
 TAGTAGATCTGGAGCTTACTAGAAAAGAAAGTATAATTATGTAACCAAAATTGGAAGCACACAGTACACGA
 TTGCAATCAAACCCATGGAGATTAACCTTTCTACATCAGTGTGTTAATCATACAAACTTCTACCTACA
 TTCTTCACTCACCACATCAAATCACAACACTCTGTGGTCAACCAATCAAACAAACTTATCTGAAGTCCCAGATC
 ATCCCAAGTCATTGTTATCAGATCTAGTACTCAAATAAGTAAATAAAAATATAACATGGGCAAATAATCATTG
 GAGGAATCCAACTAATCACAATCTGTTAACATGACAAGTCCACACCCATACAGAATCAACCAATGAAAATA
 CATCCATAACAAATAGAATTCTCAAGCAAATTGCTTACACTAAACATACATGATCACAAACAATACTCT
 TTGCTAATCATATACTCATGATTGCAACTAAACAACTTGTGAAATAACGTATTCCATAACAAACCTT
 TGAGTACCAAGAGCTCGAGTCACACATAGCATCAATCAAACAGCCAAAACACTAACCTGATTTAA
 TGAACACCCCTACCTCTTACAACACCTCATTAACATCCCACCATGCAACACCACATCCATACTATAAAAGTAGTTA
 ATAAAAAATAGTCATAACAAATGAACTAGGATATCAAGACTAACATAACATTGGGCAATGCAAACATGTCCAAA
 ACAAGGACCAACGCAACCTAAGACATTAGAAAGGACTGGACACTCTCAATCATTATTATTCATATCATCGTGC
 TTATATAAGTTAAATCTTGTAGCACAATCATTATCTGCAACTTCTGCAATGATAATCTCAACTTCACCTT
 AATTGCGCCATCATATCATAGCCTCGGAAACACAAAGTCACACAAACTGCAATCATACAAGATGCAACAA
 GCCAGATCAAGAACACACACCCAAACATACCTCACCCAGAATCCTCAGGTTGGAATCAGTCCCTCTAATCGCTGAA
 ATTACATCACAATCACCACCATACTAGCTTCAACACACCAGGAGTCAGTCAACCTGCAATCCACAACAGTCAA
 GACCAAAACACAACAAACAACTCAAACACAAACCCAGCAAGGCCACCAACAAACAGCAGACACACCAGCAAG
 AACCCAAATAATGATTTTCACTTGTGAAAGTGTCACTTGTACCCGATATGCAACAACTTGTGCTGG
 GCTATCTGCAAAGAACACAAACAAACAGGAAAGAAAACCACACTACCAAGGCCACAAAAAAACCAACCCCTCAA
 GACAACAAAAAAAGATCCAAACCCAAACATCAAACACTAAATCAAAGGAGTACCCACCAAGGCCACAGAAGGCCAA
 CCATCAACACCCACAAACAAACATCATACACTACACTCACCTCCAACACCACAGGAAATCCAGAACTCACAAGT
 CAAATGAAACCTTCACTTCTCGAAGGCAATCCAAGCCCTCTCAAGTCTACAAACATCCAGTACCC
 ATCACAAACCTTCATCTCCACCAACACACCAGCAGTAGTTACTTAAACATATTACAAAAAGCCATGACCA
 ACTTAAACAGAATCAAAGTAAACTCTGGGCAAATAACAATGGAGTTGCTAATCTCAAAGCAATGCAATTACCAC
 AATCCTCACTGCACTGACATTGTTCTGCTGAAACATCTGAAAGAATTTTATCAATCAACATGCACTG
 CAGTTAGCAAAGGCTATCTTAGTGTCTGAGAACTGGTGTACCTAGTGTATAACTATAGAATTAGTAATATC
 AAGAAAATAGTGTAAATGGAACAGATGCTAAGGTTAAATTGATAAAAGAAGTAAATAGATAAATATAAAATGCTG
 AACAGAATTGCAAGTTGCTCATGCAAAGCACACAAAGCAACAAACATGGCCAGAAGAGAAACTACCAAGTTATGA
 ATTATACACTCAACAAATGCCAAAAAAACCAATGTAACATTAAAGCAAGAAAAGGAAAAGAAGATTCTGGTTTTG
 TTAGGTGTGGATCTGCAATGCCAGTGGCGTGTGTATCTAAGGCTCTGCACCTAGAAGGGGAAGTGAACAAGAT
 CAAAAGTCTACTATCCAAACAAAGGCTGAGTCAGCTTATCAAATGGAGTCAGTGTCTAACAGCAAAGTGT
 TAGACCTCAAACAAACTATAGATAAAACATTGTTACCTATTGTGAACAGCAAGCTGAGCATATCAAATATAGAA
 ACTGTGATAGAGTTCCAACAAAAGAACAGACTAGAGATTACAGGGAATTAGTGTAAATGCAAGGTGTAAC
 TACACCTGTAAGCAGTACATGTTACTAATAGTGTAAATTGTCATTAATCAATGATGCTTATAACAAATGATC
 AGAAAAGTTAATGTCACAAATGTTAAATAGTTAGACAGCAAAGTACTATCATGTCATAATAAAAGAGGAA
 GTCTTAGCATATGTAGTACAATTACCACTATATGGTGTATAGATAACCCCTGTTGGAAACTACACACATCCCT
 ATGTACAACCAACACAAAAGAGGTCAACATCTGTTAACAAAGAACTGACAGAGGTGGACTGTGACAATGCAG
 GATCAGTATCTCTCCACAAGCTGAAACATGTAAGATTCAATCAATGAGTATTGTGACACAAATGAAACAGT
 TAAACATTACCAAGTGAAGTAAATCTGCAATGTTGACATATTCAACCCCAAATGTTGTAAGGAAATTATGACTC
 AAAAACAGATGTAAGCAGCTCCGTTATCACATCTTAGGAGCCATTGTCATGCTATGGCAAACACTAAATGACAG
 CATCCAAATAAAATGTCGATCATACAAAGACATTTCATACGGGTGCGATTATGTTGTAACATAAAAGGGTGGACACT
 GTGTCTGTAGGTAAACACATTATGTTAAATAAGCAAGAAGGTTAAAGTCTATGTTAAAGGTGACCAATAAT
 AAATTCTATGACCCATTAGTATTCCCTCTGATGAAATTGATGTCATCAATATCTCAACTCAACGAGAAATTAACC
 AGAGCCTAGCATTATCGTAAATCGATGAAATTACATAATGTAATGCGGTAAATCCACCAACAAATATCATG
 ATAACACTATAATTAGTGTAAATTGTTGTTGTTGACTGCTCTATACTGTGAGC
 CAGAAGCACACAGTCACACTAAGCAAGATCAACTGAGTGTAAATAATGTCATTAGTAAACTAAATAAAA
 TAGCACCTAATGTTCTGAAATGTTACTATCTGCTCATAGACAACCCATCTGTCATTGGGATTTCCTAAAT
 CTGAACTTCATGAAACTCTCATCTATAAAACCATCTCACTTACACTATTAGTGTAAATTGCTTATAGTTAT
 AAAACACAATTGAAATGCCAGATTAACTTACCATCTGTTAAATGAAAACATGGGGCAAATATGTCACGAAGGAATCCT
 TGCAAAATTGAAATTGCGAGGTCTTAAATGGTAAGAGGTGTCTTGTACATAATTGTAATGGCCACC
 GCATGCACTGCTTGTAAAGACAAAACCTTGTAAACAGAATACTAAGTCTATGGATAAAAGTATAGATACCTTAT
 CAGAAAATAGTGGAGCTGCAAGAGTTGGACAGAAGCAGAAGAGTGTCTTGTGAGTGTGGAGTGTAGAGGTTAT
 ATAGGATCAATAAAACAAATAACTAAACACATGAGCATGTTGCGCATGAGCAAACCTCTACTGAAACTCAATAGTGA
 TGATATCAAAGCTGAGGGACAATGAGAGCTAAATTCCACCAAGATAAGAGTGTACAAACTGTCTATCATATA
 TTGAAAGCAACAGGAAAACAATAACAAACTATCCATCTGTTAAAGGATTGCCAGCAGACGTATTGAAAGAAA
 ATCAAAACACATTGGATATCCATAAGAGCATAACCATCAACACCCAAAAGAATCAACTGTTAGTGTACAAATGA
 CCATGCCAAAATAATGATACTACCTGACAATAACGTTCAATTCTAACACTCACCAACATGTTACATTATTAA
 AACAAATCAAGTTGTTGGACAAAATGGATCCATTATTAATGGAAAATTCTGCTAATGTTATCTAACCGGATAGTTA
 TTAAAGGTGTATCTCTCAGAGTGTAAATGCTTAGGAAGTTACATATTCAATGGCTTATCTCAA
 ATATAACCAACTTAATTAGTAGACAAAATCCATTAAATAAGAACACATGAACTAAAGAAAACAAATAACACAGTCC
 TTAATATCTAAGTATCATAAAGGTGAAATAAAATTAGAAGAACCTACTTATTTCAGTCATTACTTATGACATACAA

10

20

30

40

50

GAGTATGACCTCGTCAGAACAGATTGCTACCACTAATTACTAAAAAGATAATAAGAAGAGCTATAGAAATAAGTG
 ATGTCAAAGTCTATGCTATATTGAAATAACCTAGGGCTTAAAGAAAAGGACAAGATTAAATCCAACAATGGACAAGAT
 GAAGACAACCTCAGTTATTACGACCATAATCAAAGATGATACTTCTAGCTGTTAAAGATAATCAATCTCATCTTAA
 AGCAGACAAAAAATCACTCTACAAAACAAAAGACACAATCAAACACACTTGTGAGAAATTGATGTTCAATGC
 AACATCTCCATCATGGTTAATACATTGTTAACTTATACACAAAATTAACACATATTACACAGTATCGATCA
 AATGAGGTTAAAACCAGGGTTACATGATAGATAATCAAACCTCTAGTGGATTCAATTATTTGAACCAATA
 TGTTGTATAGTTATCATAAGGAACCTCAAAGAATTACTGTGACAACCTATAATCAATTCTGACATGGAAAGATA
 TTAGCCTTAGTAGATTAAATGTTTAAATTACATGGATTAGTAACCTGCTGAAACACATTAAATAAAAGCTTAGGC
 TTAAAGATGCGGATTCAATAATGTTATCTGACACAACATTCTTATGGAGATTGTTAATCTAAAGCTATTCTACAA
 TGAGGGTTCTACATAAAAAGAGGTAGAGGATTATTATGTCCTAATTAAATAACAGAAGAGATCAAT
 TCAGAAAACGATTATAATAGTATGCTCACACATCACAGATGCTAATAAAGCTCAGAAAATCTCTATCA
 AGAGTATGTCATACATTAGATAAGACAGTGTCCGATAATATAATAATGGCAGATGGATAATTCTATTAAAGTAA
 GTTCCTTAAATTAAATTAGCTTCAGGTGACAATAACCTTAAACATCTGAGTGAACATATTTTGTTCAGAATAT
 TTGGACACCCATGGTAGATGAAAGACAAGCCATGGATGCTTAAATTAAATTGCAATGAGACCAAATTACTTG
 TTAAAGCAGTCGAGTATGTTAAGAGGTCTTTATATAAGAATTATAAAAGGGTTGTAATAATTACACAGATG
 GCCTACTTAAAGAAACTCTATTGTTACCTTAAAGATGGTTACTACTATAAAACACTTATCCTCTTGT
 TGGAACTTACAGAAAAGAGATTGTTGTTATCAGGACTACGTTTATCTGAGTGGCTTGGCTAAAAAAGTG
 GATCTGAAATGATTAAATGATAACCTATATCACCCTCTAAAATTGATATGGACTAGTTCCCTAGAAATTA
 CATGCCATCACACATACAAAACATATAGAACATGAAAATTAAATTCCGAGAGTGTATAATCAAGAAGAGTAT
 TAGAGTATTATTAAGAGATAACAAATTCAATGAATGTGATTATACAACTGTGTTAATCAAAGTTATCTAAC
 AACCTTAATCATGTGGTATCATTGACAGGAAAGAAAGAGAACTCAGTGTAGGTAGAATGTTGCAATGCAACCGGG
 ATGTTGAGACAGGTTCAAATATTGGCAGAGAAAATGAGTGTGAAACACATTCTTCTGAAAGGCTTA
 CAAGATATGGTGTACTAGAACTACAAAAAATTAGAATTGAAAGCAGGAATAAGTAAACAAATCGCTACAAAT
 GATAATTACAACAAATTACATTAGTAAGTGTCTATCATCACAGATCTGCAAGCAAATTCAAGCATTGATATGA
 AACGTGATGTTGAGTGTGCTGATGAACTGCATGGTGTACAATCTCTATTTCCTGGTTACATTAACTA
 TTCCCTATGTCACAATAATGACACATAGGCATGCACCCCCCTATATAGGAGATCATATTGAGATCTTAAACAT
 GTAGATGAAACAAAGTGGATTATAGAGATATCACATGGGTCATGAAAGGGTGGTGTAAAAACTATGGACCATAGA
 AGCTTATACACTATTGGATCTAAATCTCCTAAAGGGAATTCTCAATTACTGCTTAAATTATGGTACAATCAAT
 CAATAGATATAAGCAACCAATCAGACTCATGGAAAGGTCAAACACTCATGCTCAAGCAGATTCTGCTACAAAT
 AGCCTTAAATTACTGTAAAGAGTGTGAGGCTACGGGCAAAATTAAAGGAACTGAGACTTATATACAGAGA
 TATGCAATTATGAGTAAACAACTAACGGTGTATATTACCCAGCTAGTATAAGGAAAGTCTTAAGAGTGG
 GACCGTGGATAAACACTATACTGATGATTCTAAAGTGTAGTCTAGAATCTATAGGTAGTTGACACAAGAATTAGAA
 TATAGAGGTGAAAGTCTATTAGCAGTTAATATTAGAAATGTATGGTTATAATCAGATTGCTCTACAAATTAA
 AAATCATGATTATGTAACATAAAACTATATTGGACATATTAAAGGTTCTGAAACACTTAAACCTTTTAACT
 TTGATAATTGAGTACAGCATTAAACATTGATATGAAATTACCCAGCTATTGGTGTGGTGTACCCAACTTGT
 TATCGAAGTTCTATAGAAGAACTCCTGACTACCTCCTACAGAGGCTATGTTACTCTGTTCTACACTTAGTT
 TACAAACCATGCTTAAAGGATAAACTTCAAGATCTGTCAGATGATGATTGAAATAAGTCTTAAATGCAATATCA
 CGTTGACAAAACCTAATGCTGAATTGTAACATTGAGAGATCTCAAGCTTAAAGGCTGAGAGACAAGCT
 AAAATTACTAGCGAAATCAATAGACTGGCAGTTACAGAGGTTTGAGTACAGCTCCAACAAAATTCTCCAAAAG
 TGCACAACATTACTACAGAGATAGATCTAAATGATATTATGAAACCTACATATCTCATGGGC
 TAAGAGTTGTTATGAAAGTTACCCATTATAAAGCAGAGAAAATAGTAAATCTTATATCAGGTACAAAATCTATA
 ACTAACACATCTGGAAAAAAACTCTGCCATAGACTTAAACAGATATTGAGAGGCCACTGAGATGAGGAAAACAT
 AACTTGTCTTAAAGGATACTTCCATTGGATTGTAACAGAGAAAAGAGAGATATTGAGTATGAGAAAACCTAAGTA
 TTACTGAAATTAGCAAAATGTTAGGAAAGATCTTGTCTTATCCAAATAGTGTGTTACATACCCAGTATC
 ATGTATACAATGGACATCAAATATACTACAGCACTATCTAGTGGCATAATTATAGAGAAATATAATGTTAACAG
 TTAACACGTGGTGGAGAGAGGACCCACTAAACCATGGGTTGGTCATCTACACAAGAGAAAAAACATGCCAGTT
 ATAATAGACAAGTCTAACAAAAACAGAGAGATCAAATAGATCTATTAGCAAATTGGATTGGGTGTATGCATCT
 ATAGATAACAAAGGATGAACTCATGGAGAGACTCAGGATAGGAACCCCTGGGTTAACATGAAAGGCAAGAAATT
 ATTCCACAATTAAAGTGTCAATTATTGATGCCCTACAGTCAGTAGTGTGAAATTCCCTGCACTCAA
 TACCAAGCTTATAGAACAACAAATTACTCATCTGACACTGGCCCTTAAATGCGATATAACAGAAAAGTATGGT
 GAGAGATATTGACATAGTATCTCCAAAACCTGTTAAGCTTGGCCTTAGTTAATGTCAGTAGTGTGAAATTACTAA
 TGATGTCTAACAGAAATTCTCTACACTAAGCTTAAATGAGATACATTGATGAAACCTCCCCTATTCACAGGTG
 ATGTTGATATTCTACAAAGTAAACAAAGTACACAAACAGCATATGTTTACAGACAAATAAGTTGACTCAA
 TATGTGAAATTACTCTAACAGTAAATAAACACTCAAATCTGGATCTCACTTAAATTCTAATTAAATTGTCACATAA
 AATATCTGACTATTCTCTACATACATTAAAGTACTAATTGAGTGTGACATTGGGATTCTGATTATCAACTTA
 TGAAAGGTTCTAAAGGATTAAAGGATGGGGAGGAGTATAACTGATCATATGTTATTAAATTGAAA
 GTTTCTTCAATGCTTAAAGACCTACTCTGTGTTTCTAAAGGTTATGGCAAGCAAAGCTGGAGTGTGATAT
 GAACACTTCAGATCTCTATGTGTTAGGAAATTAGACAGTAGTTATTGGAGTGTCTAAGGTTATT
 AACAAAAAGTTCTAAACATCATTCTAGCCAAGATGCAAGTTACATAGAGTAAAGGATGTCATAGCTTCAAAATT
 TGTTCTTAAACGTCTTAAAGTAGCAGAAATTCACTGGCTTGGGTTGTTAACATAGATTATCATCCACAC
 ATGAAAGCAATTAAACTTATAGATCTGTTAGAATGGGATTGATAAATATAAGATAGAATAACACATTAA
 AACACAAATTCAATGATGATTCTAATCTCAATTCTCTACATTAATTAAACTCTCAGATAATACTCATCTA
 TTAACAAACATATAAGGATGCTAATTCTGAATTAGAAAATAATTACAAACAAATTATCATCTACACCCAGAAAC
 ACTAGAGAAATATACTAGCCATTCCGATTAAAGTAATGACAAAAGACACTGAACTGACTATTGTTAGGTTAAATG

10

20

30

40

50

TTGACTCAATAATGTTACCATTGTTATCTAATAAGAAGCTTATTAAATCGTCTGCAATGATTAGAACCAATTACAGC
 AAACAAGATTGTATAATTATTCCCTATGGGTGATTGATAGAATTATAGATCATTCAAGCAATACAGCCAAATC
 CAAACCAACTTACACTACTACTTCCCACCAAAATACCTTAGTGCACAAATAGCACATCACTTACTGCATGCTTCCCT
 GGCATCATATAATAGATTCAATTGTATTAGTTCTACAGGTTGAAAATTAGTATAGAGTATATTAAAGAT
 CTAAAATTAAAGATCCAATTGTATAGCATAGGTGAAGGGCAGGGAATTATTGCGTACAGTAGTGG
 ACTTCATCCTGACATAAGATATTTACAGAAGTCTGAAAGATTGCAATGATCATAGTTACCTATTGAGTTTAA
 GGCTGTACAATGGACATATCAACATTGATTATGGTAAAATTGACCATTCTGCTACAGATGCAACCAACAACATT
 CATTGGTCTTATTACATATAAAGTTGCTAACCTATCAGTCTTTGTCTGTGATGCCGAATTGCTGTAAACAGT
 CAACTGGAGTAAATTATAATAGAATGGAGCAAGCATGTAAGAAAGTGCAGTACTGTTCTCAGTTAAATAATGTA
 TGTTAATAGAAAATATCATGCTCAAGATGATATTGATTCAAATTAGACAATATAACTATATTAAAACCTATGTA
 TGCTTAGGCAGTAAGTAAAGGGATCGGAGGTTACTTAGTCCTACAAATAGGCTCTGCGAATATATTCCCAGTATT
 TAATGTAGTACAAATGCTAAATTGATACTATCAAGAACCAAAATTTCATCATGCCTAAGAAAGCTGATAAAGAGT
 CTATTGATGCAAATATTAAAGTTGATACCCTTCTTGTACCCATAACAAAAAAAGGAATTAATACTGCATTG
 TCAAAACTAAAGAGTGTGTTAGTGGAGATATACTATCATATTCTAGCTGGACGTAATGAAGTTTCAGCAATAA
 ACTTATAAATCATAAGCATATGAACATCTAAATGGTCAATCATGTTAAATTTCAGATCAACAGAAACTAAACT
 ATAACCATTATATATGGTAGAATCTACATATCCTTACCTAAGTGAATTGTTAACAGCCTGACAACCAATGAACCT
 AAAAAACTGATTAAACACAGGTAGTCTGTTACAACTTCATAATGAATAAAGATCTTATAATAAAA
 ATTCCCATAGCTATACACTAACACTGTATTCAATTAGTTATTAAAAATACATATAATTTTAAATAAAC
 TTTTAGTGAACATCTAAAGTTATCATTTAATCTTGAGGAATAATTAAACCTAATCTAATTGGTTATAT
 GTGTATTAACTAAATTACGAGATATTAGTTTGACACTTTTCTCGT

【0135】

要約すると、本開示に記載される材料、情報、および方法は、段階的な弱毒化表現型を有する一連の弱毒化株を提供し、かつ臨床的ベンチマークに基づいて適切なワクチン候補株を選択するための指針を提供する。以下の実施例は、限定ではなく例示として提供される。

10

【実施例】

【0136】

1. 本開示において例示される組換えRSV株は、D46と呼ばれるwt A2株の組換えバージョンに由來した(Collins, et al. 1995. Proc Natl Acad Sci USA 92:11563-11567)。D46の完全なヌクレオチド配列は、SEQ ID NO: 1として示される。RSV MEDI/ M2-2ウイルスはD46由来ではない。

【0137】

2. 以下の実施例において、ウイルス名に「LID」または「6120」という用語が含まれる場合、それは、その骨格が図3に示される「6120」変異を含むことを示している。

20

【0138】

3. 本明細書において、ウイルスは、その中に存在する突然変異の組み合わせを表示することによって命名される。ウイルス名(例えば、突然変異cpおよび M2-2を含むRSV D46を示すRSV D46/cp/ M2-2)における記号「/」の使用は、特に本文中に存在する場合、そのウイルス名を読みやすくするために存在すること以外に何の意味もない。それゆえに、RSV D46/cp/ M2-2は、RSV D46cp M2-2と同じである。また、RSV D46/cp/ M2-2は、RSV D46cp M2-2またはRSV D46 cp M2-2などとも同じである。また、ウイルス名は通常、RSV D46/cp/ M2-2のようにRSVで始まる。

30

【0139】

4. 前述のように、「M2-2」変異は、図1に示すとおり、3つの点突然変異を伴う241ヌクレオチドの欠失を指す。M2-2 ORFをサイレンシングする他の突然変異は、異なる名称、例えば図10に示す M2-2-AcIIおよび M2-2-HindIII、により明記される。本開示において、ウイルス名中の「M2-2」の存在は、「M2-2」変異の存在を示す。

40

【0140】

5. インビオでのウイルス複製の程度(magnitude)は、ウイルス弱毒化の指標として使用される：特に、インビオでの複製の減少は、増加した弱毒化の指標として使用され、その逆も言える。これは、RSV複製の増加が、wt RSV感染(例えば、El Saleeb, et al. 2011. J Infect Dis 204:996-1002; DeVincenzo, et al. 2010. Am J Respir Crit Care Med 182:1305-1314)と臨床研究における弱毒化RSV候補(例えば、Karron, et al. 1997. J Infect Dis 176:1428-1436; Karron, et al. 2005. J Infect Dis 191:1093-1104)の両方に関して、疾患の増悪に関連する、という一般的な観察を反映している。これ

50

らの用語は、限定的な定義としてではなく、説明目的で使用される。

【0141】

実施例1

この実施例では、M2-2 ORFの欠失(M2-2)を、単独および追加の突然変異との組み合わせで、含む新規なRSV変異体の設計および構築を記載する。

【0142】

代表的なウイルスを構築して、臨床前に評価した。このパネルの1つの代表的なウイルス、および別の供給源からの第2のM2-2 ORF変異型ウイルスを、一次小児RSVワクチン標的集団を構成する血清反応陰性乳幼児における第1相臨床試験で評価した。この実施例は、最も関連性のあるヒト集団における代表的な例の臨床的ベンチマークと共に、新しいワクチン株を提供する。

10

【0143】

RSV rA2-K5ウイルス：

RSV rA2-K5と呼ばれるRSV株は、(親wt D46 cDNA由来のウイルスから)以前に構築されたものであり、このRSV株では、M2-2 ORFの発現が3種類の突然変異の組み合わせによってサイレンシングされた：(i) M2-2 ORFの途中でフレームシフトを導入すること、(ii) M2-2 ORFの3つの潜在的ATG翻訳開始コドン(RSVゲノムならびに重複するM2-1およびM2-2-ORFの略図については図1Aを参照)をACGコドンに変更すること、および(iii) M2-1 ORFの末端の直後のM2-2配列の3つ全てのレジスタに停止コドンを導入すること(Birmingham and Collins. 1999. Proc Natl Acad Sci USA 96:11259-11264)。このrA2-K5ウイルス(本開示には示されていない)を、血清反応陰性チンパンジーの気道での複製について評価したところ、それは上気道で少なくとも2800倍に制限され、下気道では検出されなかつた(少なくとも55,000倍の減少を表す)ことが示された(Teng, et al. 2000. J Virol 74:9317-9321)。

20

【0144】

RSV D46/ M2-2およびRSV LID/ M2-2の作製：

M2-2 ORFの大部分が欠失された、さらなる組換えウイルスを構築した。M2-2 ORFの3つの潜在的翻訳ATG開始コドンのそれぞれをACGに変更し、かつヌクレオチド8188～8428を欠失させて(全部で241ntの欠失)、M2-2 ORFの大部分を除去するように、wt D46 cDNAを改変した(図1)。したがって、既知の潜在的ATG翻訳開始部位の全てが突然変異され、かつ該ORFの大部分が欠失されると、完全なM2-2タンパク質の発現は可能ではないはずであり、トランケート型M2-2断片の発現もほとんどまたは全くないはずである。得られたRSV D46/ M2-2ウイルスの遺伝子マップを図2に示す。

30

【0145】

さまざまな弱毒化表現型を有する、さらなる M2-2変異体を構築した。上記のように、原型RSV rA2-K5ウイルスはチンパンジーで非常に弱毒化されていたので(Teng, et al. 2000. J Virol 74:9317-9321)、M2-2が発現されないウイルスは過度に弱毒化される可能性があった。他方では、特に血清反応陰性の乳幼児において、それが十分に弱毒化されていない可能性もあった。そのため、複製の減少だけでなく増加を示す誘導体を同定するために、さらなるウイルス変異体を構築した。

40

【0146】

RSV株、特に M2-2変異体、の複製を増加させるための確立された方法はなかった。以前の報告によれば、G遺伝子とF遺伝子を、遺伝子順序が6位および7位の遺伝子(これはSH遺伝子が欠失されたウイルスで行われたため、GおよびFは、7位および8位のそれらの天然の位置ではなく、6位および7位の遺伝子であった)からそれぞれ1位および2位の遺伝子になるように移動させると、インピトロで約10倍の複製増加が生じたが、マウス(Krempl, et al. 2002. J Virol 76:11931-11942)またはAGMでは統計的に有意な複製の増加は認められなかった。1つの制限は、RSVの複製および弱毒化(例えば、細胞株、げっ歯類、およびチンパンジー以外の非ヒト靈長類における複製)を評価するための確立された前臨床アッセイが、比較的半許容性で低感度であり、複製効率の統計的に有意な変化を実証する

50

ことを困難にしている点であり、したがって、全てのアッセイで検出されなくても、複製の変化はどれも注目に値すると考えられる。かくして、G遺伝子とF遺伝子をプロモーター近位の位置に移動するように M2-2/ SHウイルスを改変しようと試みた。(SH欠失は、細菌でのプラスミド増幅中のこの配列の不安定性を回避するために、野生型骨格での初期研究[Krempl, et al. 2002. J Virol 76:11931-11942]に含まれていたことであり、付隨的に起こったと考えられた； SH欠失は M2-2骨格でも用いられた。) G遺伝子とF遺伝子を、それぞれ第1および第2の遺伝子として、またはそれぞれ第2および第1の遺伝子として配置するなど、いくつかの並べ替えを評価した。ところが、これらの改変は、ウイルス複製を100～1000倍減少させて、これらの特定の変化が感染性ウイルスにおいて良好な耐容性を示さなかったことが分かった。 M2-2変異に関連するタンパク質発現の増加と組み合わせた、プロモーター近位の位置へのG遺伝子とF遺伝子の移動に関連することが知られたGおよびFの発現の増加(Krempl, et al. 2002. J Virol 76:11931-11942)は、少なくともこの M2-2/ SH骨格では、RSVによって受け入れられなかつたのかもしぬれない。

【 0 1 4 7 】

さらに、ゲノムの長さの変化が複製効率に影響を与えることも知られている。具体的には、パラミクソウイルスゲノムの長さを増加させることは、その複製効率を低下させ得ることが示されている。例えば、遺伝子発現を混乱させない方法でRSVゲノムの長さを140または160ヌクレオチド増加させると、マウス内での複製が5～25倍制限された(Bukreyev, Murphy, Collins. 2000. J Virol 74:11017-11026)。関連ウイルス、すなわちヒトパラインフルエンザウイルス3型(PIV3)を用いた別の研究では、さらなる遺伝子を追加することによって、または非翻訳領域に挿入する(したがって、遺伝子番号を変化させなかつた)ことによって、ゲノムの長さを増加させると、インビトロで効率的な複製が保持されたが、ハムスターにおいて弱毒性であった(Skiadopoulos, et al. 2000. Virology 272:225-234)。ゲノムの長さの増加に伴う弱毒化は、より長いゲノムを複製することの負担がより大きいために起こると推定される。ゲノムの長さを増加させると複製効率が低下するという観察は、逆の考え、すなわち、ゲノムの長さを短くすると複製効率が増加する可能性があるということを示唆した。この目的のために、RSV D46/ M2-2ウイルスを、「61 20」と呼ばれる突然変異を含むように改変して、RSV LID/ M2-2(図2の下の略図に示されるゲノム図)と呼ばれるウイルスを生じさせた。この文書において、ウイルス名中の「LID」は6120変異の存在を示している。

【 0 1 4 8 】

「6120」変異(図3)は、SH遺伝子の下流非翻訳領域の112ヌクレオチドの欠失と、SH遺伝子の最後の3つのコドンおよび終止コドンへの翻訳上サイレントな5つの点突然変異の導入を含む(Bukreyev, et al. 2001. J Virol 75:12128-12140)。この突然変異の元の設計の主な目的は、アンチゲノムcDNAを細菌内で安定化させて、より容易に操作し調製することができるようになることであり、実際にそうであった。wt RSVにおいて、この突然変異は、インビトロで複製効率を5倍増加させることができが以前に見出されたが(Bukreyev, et al. 2001. J Virol 75:12128-12140)、マウスでは複製効率を増加させないようであった。RSV LID/ M2-2を6120変異に関連したインビトロでの複製増加の可能性について評価したとき、いくつかの実験では若干の増殖効率の増加が観察されたものの、他の実験では認められなかつた。

【 0 1 4 9 】

RSV D46/ M2-2およびRSV LID/ M2-2へのさらなる突然変異の組み入れ：
ある範囲のさらなる弱毒化ウイルスを達成することを目標として、RSV D46/ M2-2およびRSV LID/ M2-2ウイルスの一方または両方に1つまたは複数の追加の突然変異がさまざまに挿入された、該ウイルスの一連のさらなる誘導体を構築した。

【 0 1 5 0 】

RSV D46/ M2-2の誘導体の例を図4に示す。例えば、誘導体RSV D46/cp/ M2-2ウイルス(図4、上の略図)は、 M2-2変異(図1)と「cp」変異とを組み合わせたものであり

10

20

30

40

50

、このcp変異は、3種のタンパク質における5つのアミノ酸置換のセット(N (V267I)、F (E218AおよびT523I)、L (C319YおよびH1690Y))であり、それらは一緒にになって(それだけ)血清反応陰性チンパンジーにおいて複製の約10倍の減少および疾患の軽減をもたらす(Whitehead, et al. 1998. J Virol 72:4467-4471)。チンパンジーからの表現型データの有効性は、この実験動物がRSV複製および疾患に対するその許容性の点でヒトに似ているため、注目に値する。ここで留意すべきは、D46/cp/ M2-2構築物が、DNAレベルで、D46骨格に単一の偶発的なヌクレオチド変化を有したことである:具体的には、M ORF中にサイレントなヌクレオチド変化G3878Aが存在していた。

【0151】

別の誘導体であるRSV D46/ M2-2/1030sウイルス(図4、上から2番目の略図)は、M 10 2-2変異を、1321K(AAA)/S1313(TCA)からなる遺伝的に安定化された1030変異(「10 30s」)との組み合わせで含む(Luongo, et al. 2012. J Virol 86:10792-10804)。10 30s変異は、マウスの上気道および下気道におけるRSV複製を、それぞれ0.6および1.5平均log₁₀に減少させた。それはまた、血清反応陰性チンパンジーにおいても評価されているが、いくつかの追加の弱毒突然変異との組み合わせでのみ評価された(Luongo, et al. 2012. J Virol 86:10792-10804)。

【0152】

別の誘導体であるRSV D46/cp/ M2-2/HEKウイルス(図4、下の略図)は、cpおよび M 20 2-2変異を「HEK」変異と組み合わせたものである。HEK変異は、RSV Fタンパク質の2つのアミノ酸置換K66EおよびQ101Pからなり、該アミノ酸置換は、該配列を、HEK-7と呼ばれる同じ株(A2)の初期継代にアミノ酸レベルで一致させる。このHEK-7株は、元のA2 臨床分離株をヒト胚性腎(HEK)細胞で7回継代することによって誘導されたものであり(Connors, et al. 1995. Virology 208:478-484; Whitehead, et al. 1998. J Virol 72: 4467-4471)、元のA2臨床分離株と最もよく似ている(そしておそらく同一である)と考えられる(Liang, et al. 2014. J Virol 88:4237-4250; Liang, et al. 2015. J Virol 89:9499-9510)。HEK変異はFタンパク質3量体を安定化させ、かつ元の臨床分離株のそれに似ていると考えられる低融合性(hypofusogenic)表現型をもたらしたことが以前に示された(Liang, et al. 2014. J Virol 88:4237-4250; Liang, et al. 2015. J Virol 89: 9499-9510)。元のA2臨床分離株に見出されそうに加えて、HEK割り当ては、Gen Bankに存在するRSVサブグループAのほぼ全ての臨床分離株において見出される(Liang, et al. 2015. J Virol 89:9499-9510)。したがって、HEK変異は、おそらく高い免疫原性を示す融合前コンホメーションに富んだ、RSV Fタンパク質のより真正で免疫原性のある形態を提供することができる(McLellan et al. Science 2013 340(6136):1113-7; Science 2013 342(6158):592-8)。したがって、必然的に弱毒化とそれ自体関連するのではなく、HEK変異は、元のA2臨床分離株ならびに他のRSV臨床分離株をより正確に反映する、ある型のFタンパク質を提供する。

【0153】

RSV LID/ M2-2の誘導体の例を図5に示す。誘導体RSV LID/cp/ M2-2ウイルス(図5、上の略図)は、M2-2変異とcp変異を組み合わせたものである。別の誘導体RSV LID/ M2-2/1030sウイルス(図5、上から2番目の略図)は、M2-2変異と1030s変異を組み合わせたものである。別の誘導体RSV SH/ M2-2ウイルス(図5、上から3番目の略図)は、M2-2変異をSH遺伝子の欠失と組み合わせたものである(SH欠失の構築の詳細については図6参照)。SH遺伝子の欠失は、血清反応陰性チンパンジーにおいてRSV複製の40倍の減少、および疾患の軽減をもたらすことが以前に示された(Whitehead, et al. 1999. J Virol 73:3438-3442)。別の誘導体RSV cp/ SH/ M2-2ウイルス(図5、下の略図)は、M2-2およびcp変異をSH遺伝子の欠失と組み合わせたものである。SH遺伝子の欠失は6120変異を除去するので、SH遺伝子全体が欠失されたウイルスは「LID」と呼ばれないことに留意されたい。

【0154】

図2、4および5に示した変異体の全ては、標準的な方法を用いて逆遺伝学により容易に回

10

20

30

40

50

収された。しかし、以前の研究に基づいた予想に反して(例えば、Bukreyev et al., J Virol 1997 71:8973-8982; Whitehead et al. J Virol 73:3438-3442 1999)、M2-2変異の状況下にあって SH変異を含むウイルスは、他の M2-2変異体よりも約10倍低い効率で複製した。この知見は、ウイルスが実際に作製されて評価されるときに、どれほど予想外の、しかし重要な、影響が現れ得るかを示している。

【0155】

図4および5に示した弱毒突然変異に関して、cp、SH、1030(1030sの親)およびM2-2変異のチンパンジーでの以前の研究は、それらの増加する弱毒化の順序が次のようになることを示した。

cp \approx ΔSH < 1030s < ΔM2-2 (Whitehead, et al. 1999. J Virol 73:3438-3442; Whitehead, et al. 1999. J Virol 73:871-877; Teng, et al. 2000. J Virol 74:9317-9321)

10

したがって、cp、SHおよび1030sの突然変異は、単独でまたは M2-2変異と一緒に組み合わせた場合に、広範囲のレベルの追加の弱毒化を提供する。これらは、関連するワクチン標的集団(血清反応陰性の乳幼児)における臨床研究で評価され得る。

【0156】

実施例2

この実施例では、LIDおよびD46 M2-2ウイルスの臨床前評価を記載する。

【0157】

本開示の代表的なウイルスを、BALB/cマウスの気道での複製について評価した：すなわち、RSV D46 wt、RSV LID/ M2-2、RSV SH/ M2-2、RSV LID/ M2-2/1030s、およびRSV cp/ SH/ M2-2(図7)。動物に5.8 log₁₀の表示したウイルスを鼻腔内接種し、接種後4および5日目に犠牲にし、鼻甲介および肺を採取し、ホモジナイズして、RT-qPCRにより評価した。RT-qPCRは、感染性粒子をアッセイすることよりも感度の高い検出を提供するので、この半許容性の実験動物に有用である。これは、弱毒突然変異を含む全てのウイルスがwt D46ウイルスよりも制限されることを示した。かくして、この半許容性げっ歯類モデルにおける複製のレベルは、詳細な比較ができないほど制限されたが(図7)、様々な弱毒突然変異のさらなる付加はさらに弱毒性であった。

20

【0158】

同じ4つの M2-2含有ウイルスを、AGMの気道での複製について調査した：すなわち、RSV LID/ M2-2、RSV SH/ M2-2、RSV LID/ M2-2/1030s、およびRSV cp/ SH/ M2-2(図8Aおよび8B、表1~3)。AGMは、RSVの天然のヒト宿主とのより近い系統発生学的および解剖学的関連性のため、げっ歯動物よりも信頼のにおけるRSV複製モデルである。さらに、AGMは、アカゲザルおよびカニクイザルと比較して、やや高いレベルのRSV複製を支持するため、最も適切で有用なサルモデルであるようだ。しかしながら、AGMは、それにもかかわらず、RSV複製に対して半許容性であるにすぎず、AGMでのRSV複製のレベルは、チンパンジーまたはヒトでのレベルよりもかなり低い。4グループのAGMに、2つの部位(INおよびIT)につき6 log₁₀ PFU/mlをIN経路とIT経路の組み合わせで接種した。NPスワブを1日目~10日目および12日目に毎日採取し、気管洗浄を2、4、6、8、10および12日目に採取した(表1および2)。これは、1つまたは複数の追加の弱毒突然変異を含む3つのウイルス全てが、RSV LID/ M2-2よりも弱毒化されたことを示した。特に、RSV M2-2/1030sウイルスは最も弱毒化されたようであった。これらのウイルスの3つ全ては、RSV LID/ M2-2よりも約2倍(RSV SH/ M2-2およびRSV cp SH/ M2-2)または4倍(RSV LID/ M2-2/ 1030s)低いRSV中和血清抗体の力値を誘導し(表3)、複製レベルの低下および結果として生じる抗原負荷の減少が免疫原性の低下と関連し得るという一般的な予想と一致した。したがって、耐容性良好であるが十分に免疫原性であるRSVワクチン候補を同定するように注意を払うべきである。

30

【0159】

(表1) RSV LID/ M2-2、RSV SH/ M2-2、RSV LID/ M2-2/1030s、またはRS

40

50

V cp/ SH/ M2-2を接種したAGMからの鼻咽頭スワブサンプルのウイルス力価^a

RSV ワクチン 候補	AGM ID	表示日のNPウイルス力価 (\log_{10} PFU/mL) ^b											排出 の 期間 ^c	ピーク ウイルス 力価	1日力価 の 合計 ^d
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12			
RSV LID/ ΔM2-2	7806	-	1.4	1.7	2.7	2.6	4.0	3.9	1.4	-	2.7	-	9	4.0	21.4
	7705	-	-	-	2.7	2.3	3.6	2.4	1.2	-	-	-	5	3.6	14.3
	7747	-	-	1.3	0.7	-	1.5	1.3	-	-	-	-	5	1.5	7.2
	7674	-	0.7	-	-	-	2.3	1.8	1.5	-	-	-	7	2.3	8.8
	平均:												6.5	2.9	12.9
RSV ΔSH/ ΔM2-2	7811	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0.35	3.9
	7796	-	-	-	-	1.4	-	-	-	-	-	-	1	1.4	4.9
	7789	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0.35	3.9
	7808	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0.35	3.9
	平均:												0.3	0.6	4.1
RSV LID/ΔM2- 2/ 1030s	8033	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0.35	3.9
	7720	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0.35	3.9
	7844	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0.35	3.9
	7847	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0.35	3.9
	平均:												0	0.35	3.9
RSV cp/ ΔSH/ΔM2- 2	8008	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0.35	3.9
	7741	-	-	-	1.2	1.0	-	0.7	-	1.2	-	-	6	1.2	6.6
	7765	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0.35	3.9
	7637	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0.35	3.9
	平均:												1.5	0.6	4.5

a AGMに、部位あたり1mLの接種材料中の6.0 \log_{10} PFUの表示ウイルスを鼻腔内および気管内経路の組み合わせで接種した(全用量:動物あたり6.3 \log_{10} PFU)。

b 組み合わせたNPスワブを、安定化剤としてスクロースリン酸緩衝液を含む2mLのL-15培地に入れた。ウイルス力価測定を37℃でVero細胞にて行った。検出の下限は0.7 \log_{10} PFU/mLであった。検出可能なウイルスを含まないサンプルを「-」として表す。各動物のピーク力価には下線が引かれている。

c ウイルスが検出された最初の日から最後の日までの期間、その間の(もしあれば)不検出日を含む。

d 1日あたりの力価の合計を、ウイルス排出の大きさ(曲線下面積)の推定値として用いる。検出可能なウイルスを含まないサンプルについては0.35の値を用いた。

【0160】

(表2) RSV LID/ M2-2、RSV SH/ M2-2、RSV LID/ M2-2/1030s、またはRSV cp/ SH/ M2-2を接種したAGMからの気管洗浄サンプルのウイルス力価^a

10

20

30

40

50

RSVワクチン候補	AGM ID	表示日の気管洗浄ウイルス力価 (\log_{10} PFU/mL) ^b						排出の期間 ^c	ピークウイルス力価	1日力価の合計 ^d
		2	4	6	8	10	12			
RSV LID/ ΔM2-2	7806	2.5	3.4	<u>4.6</u>	-	-	-	7	<u>4.6</u>	12.6
	7705	1.6	-	<u>3.3</u>	1.5	-	-	9	<u>3.3</u>	8.5
	7747	1.8	1.0	<u>6.0</u>	2.3	-	-	9	<u>6.0</u>	12.5
	7674	-	1.3	<u>2.7</u>	2.3	1.0	-	9	<u>2.7</u>	8.7
	平均:							9.0	4.2	10.6
RSV ΔSH/ ΔM2-2	7811	-	-	-	-	1.3	-	3	1.3	4.8
	7796	-	-	-	-	-	-	0	0.7	4.2
	7789	-	-	-	-	-	-	0	0.7	4.2
	7808	-	1.6	-	-	-	-	3	1.6	5.1
	平均:							1.5	1.1	4.5
RSV LID/ΔM2-2/ 1030s	8033	-	-	-	-	-	-	0	0.7	4.2
	7720	-	-	-	-	-	-	0	0.7	4.2
	7844	-	-	-	-	-	-	0	0.7	4.2
	7847	-	-	-	-	-	-	0	0.7	4.2
	平均:							0	0.7	4.2
RSV cp/ΔSH/ ΔM2-2	8008	-	-	-	-	-	-	0	0.7	4.2
	7741	-	-	-	-	-	-	0	0.7	4.2
	7765	-	-	-	-	-	-	0	0.7	4.2
	7637	1.0	-	-	-	-	-	3	1.0	4.5
	平均:							0.8	0.8	4.3

a AGMに、部位あたり1mLの接種材料中の6.0 \log_{10} PFUの表示ウイルスを鼻腔内および気管内経路の組み合わせで接種した(全用量:動物あたり6.3 \log_{10} PFU)。AGM試験は、NIHのNIAID動物実験委員会によって承認された。

b 2、4、6、8、10および12日目に、3mLのPBSで気管洗浄を行った。ウイルス力価測定を37でVero細胞にて行った。検出の下限は1.0 \log_{10} PFU/mL(洗浄液)であった。検出可能なウイルスを含まないサンプルを「-」として表す。各動物のピーク力価には下線が引かれている。

c ウイルスが検出された最初の日から最後の日までの期間、その間の(もしあれば)不検出日を含む。

d 1日あたりの力価の合計を、ウイルス排出の大きさ(曲線下面積)の推定値として用いる。検出可能なウイルスを含まないサンプルについては0.7の値を用いた。

【0161】

(表3) RSV LID/ M2-2、RSV ΔSH/ M2-2、RSV LID/ M2-2/1030s、またはRSV cp/ ΔSH/ M2-2を接種したAGMからの中和抗体力価^a

10

20

30

40

50

RSVワクチン候補	AGM ID	表示日の中和抗体力価 (PRNT ₆₀ , 逆log ₂) ^b		
		0	21	28
RSV LID/ΔM2-2	7806	<3.3	7.2	7.2
	7705	<3.3	8.8	8.2
	7747	<3.3	8.3	8.4
	7674	<3.3	6.7	6.2
	平均:	<3.3	7.8	7.5
RSV ΔASH/ΔM2-2	7811	<3.3	6.9	5.9
	7796	<3.3	7.2	7.1
	7789	<3.3	6.5	5.8
	7808	<3.3	7.1	7.2
	平均:	<3.3	6.9	6.5
RSV LID/ΔM2-2/1030s	8033	<3.3	5.4	6.6
	7720	<3.3	<3.3	<3.3
	7844	<3.3	<3.3	4.3
	7847	<3.3	6.8	6.8
	平均:	<3.3	4.7	5.2
RSV cp/ΔASH/ΔM2-2	8008	<3.3	6.3	6.8
	7741	<3.3	6.4	5.8
	7765	<3.3	6.0	5.9
	7637	<3.3	6.3	6.3
	平均:	<3.3	6.3	6.2

a AGMに、部位あたり1mLの接種材料中の6.0 log₁₀の表示ウイルスをi.n.およびi.t.接種した(全用量 = 6.3 log₁₀ PFU/動物)。

b 接種後(p.i.) 0、21および28日目に、血清を取得した。中和抗体力価を60% プラーケ減少中和アッセイで測定した。検出の下限は3.3 (1:10)であった。

【0162】

RSV LID/ M2-2を次の3つのウイルス:D46/ M2-2、RSV D46/cp/ M2-2、D46/cp/ M2-2/HEKと比較する別の実験をAGMにおいて行った(表4～6)。これは、RSV LID/ M2-2ウイルスが、RSV D46/ M2-2よりも上気道(表4)および下気道(表5)においてかなり効率的に複製したことを見た。重要なこととして、これらのウイルスの唯一の違いは、6120変異がRSV LID/ M2-2に存在することであったので、これは、6120変異が靈長類宿主において複製の増加をもたらすことを示した。したがって、それは、ウイルスの制限および弱毒化のレベルを徐々に低下させる手段を提供する。かくして、LID骨格およびD46骨格は複製効率の大きな違いをもたらし、その結果、いずれかの骨格への追加の突然変異の組み入れは、さまざまな弱毒化表現型を提供することができる。追加の突然変異を有するRSV D46ウイルス、すなわちRSV D46/cp/ M2-2/HEKおよびRSV D46/cp/ M2-2は、かなり減少した複製を有し、これは弱毒化の増加を示している。全てのウイルスは、RSV中和血清抗体の十分な力価を誘導した(表6)。RSV LID/ M2-2は最高の力価を誘導した; RSV D46/ M2-2およびRSV D46/cp/ M2-2によって誘導された力価は2倍未満低く、RSV D46/cp/ M2-2/HEKによって誘導された力価はほぼ6倍低かった。このことは、様々な程度の弱毒化を特定する突然変異の組み入れが、ある範囲の弱毒化表現型をもたらすことを示した。それはまた、複製の減少が免疫原性の低下をもたらし得るというさらなる示唆を提供した。

【0163】

(表4) D46/cp/ M2-2/HEK、D46/cp/ M2-2、D46/ M2-2、またはRSV LID/ M2-2を接種したAGMからの鼻咽頭スワブサンプルのウイルス力価^a

10

20

30

40

50

RSV ワクチン 候補	AGM ID	表示日のNPウイルス力価 (\log_{10} PFU/mL) ^b											排出 の 期間 ^c	ピーク ウイルス 力価	1日力価 の 合計 ^d
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12			
D46/cp/ ΔM2- 2/HEK	8401	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	1	0.7	4.2
	8195	-	-	-	-	-	-	-	2.0	-	0.7	-	3	2.0	5.8
	7867	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0.35	3.9
	8392	-	-	-	0.7	1.0	0.7	-	-	-	-	-	3	1.0	5.2
	平均:												1.8	1.0	4.8
D46/cp/ ΔM2-2	57413	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	1	0.7	4.2
	8054	-	-	-	-	1.2	-	-	-	-	-	-	1	1.2	4.7
	8172	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0.35	3.9
	8445	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	1	0.7	4.2
	平均:												0.8	0.7	4.2
D46/ΔM2-2	8279	-	-	-	-	-	-	1.2	1.2	-	-	-	2	1.2	5.5
	32956	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0.35	3.9
	8246	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0.35	3.9
	7856	-	-	-	-	-	-	1.9	-	-	-	-	1	1.9	5.4
	平均:												0.8	1.0	4.7
RSV LID/ ΔM2-2	62403	-	1.2	1.9	3.6	3.6	4.2	3.1	1.7	-	-	-	7	4.2	20.7
	8258	-	1.7	3.0	3.2	2.5	1.5	2.7	2.3	1.4	-	-	8	3.2	19.4
	8232	-	2.2	3.0	3.8	3.1	1.5	2.8	2.4	1.7	-	-	8	3.8	21.7
	582126	0.7	2.0	3.0	3.7	3.8	1.6	2.5	2.1	1.0	-	-	9	3.8	22.4
	平均:												8	3.7	21.0

a AGMに、部位あたり1mLの接種材料中の6.7 \log_{10} PFUの表示ウイルスを鼻腔内および気管内経路の組み合わせで接種した(全用量:動物あたり7.0 \log_{10} PFU)。AGM試験は、NIHのNIAID動物実験委員会によって承認された。

b 組み合わせたNPスワップを、安定化剤としてスクロースリン酸緩衝液を含むL-15培地2mL中に入れた。ウイルス力価測定を32でVero細胞にて行った。検出の下限は0.7 \log_{10} PFU/mLであった。検出可能なウイルスを含まないサンプルを「-」として表す。各動物のピーク力価には下線が引かれている。

c ウイルスが検出された最初の日から最後の日までの期間、その間の(もしあれば)不検出日を含む。

d 1日あたりの力価の合計を、ウイルス排出の大きさ(曲線下面積)の推定値として用いる。検出可能なウイルスを含まないサンプルについては0.35の値を用いた。

【0 1 6 4】

(表5) D46/cp/ M2-2/HEK、D46/cp/ M2-2、D46/ M2-2、またはRSV LID/ M2-2を接種したAGMからの気管洗浄サンプルのウイルス力価^a

10

20

30

40

50

RSVワクチン候補	AGM ID	表示日の気管洗浄ウイルス力価 (\log_{10} PFU/mL) ^b						排出の期間 ^c	ピークウイルス力価	1日力価の合計 ^d
		2	4	6	8	10	12			
D46/cp/ ΔM2-2/HEK	8401	1.5	-	-	-	-	-	3	1.5	5.0
	8195	1.3	-	-	1.7	-	-	9	1.7	5.8
	7867	-	-	1.0	1.0	-	-	5	1.0	4.8
	8392	1.5	-	1.0	1.3	-	-	9	1.5	5.6
	平均:							6.5	1.4	5.3
D46/cp/ ΔM2-2	57413	1.0	-	-	-	-	-	3	1.0	4.5
	8054	-	-	1.0	-	-	-	3	1.0	4.5
	8172	1.6	-	-	-	-	-	3	1.6	5.1
	8445	-	1.6	2.2	-	-	-	5	2.2	6.6
	平均:							3.5	1.5	5.4
D46/ΔM2-2	8279	-	-	-	-	-	-	0	0.7	4.2
	32956	1.7	1.8	-	-	-	-	5	1.8	6.3
	8246	1.0	-	1.6	-	-	-	7	1.6	5.4
	7856	-	-	-	-	1.0	-	3	1.0	4.5
	平均:							3.8	1.3	5.1
RSV LID/ ΔM2-2	62403	1.0	3.5	3.9	1.0	-	-	7	3.9	10.5
	8258	1.0	1.7	1.0	2.9	1.8	-	9	2.9	8.8
	8232	1.6	4.2	3.1	2.7	-	-	9	4.2	12.9
	582126	1.6	2.4	2.5	2.8	-	-	9	2.8	10.7
	平均:							8.5	3.5	10.7

a AGMに、部位あたり1mLの接種材料中の $6.7 \log_{10}$ PFUの表示ウイルスを鼻腔内および気管内経路の組み合わせで接種した(全用量:動物あたり $7.0 \log_{10}$ PFU)。

b 2、4、6、8、10および12日目に、3mLのPBSで気管洗浄を行った。ウイルス力価測定を32でVero細胞にて行った。検出の下限は $1.0 \log_{10}$ PFU/mL(洗浄液)であった。検出可能なウイルスを含まないサンプルを「-」として表す。各動物のピーク力価には下線が引かれている。

c ウイルスが検出された最初の日から最後の日までの期間、その間の(もしあれば)不検出日を含む。

d 1日あたりの力価の合計を、ウイルス排出の大きさ(曲線下面積)の推定値として用いる。検出可能なウイルスを含まないサンプルについては0.7の値を用いた。

【0165】

(表6) D46/cp/ M2-2/HEK、D46/cp/ M2-2、D46/ M2-2、またはRSV LID/ M2-2を接種したAGMの中和抗体力価^a

10

20

30

40

50

RSVワクチン候補	AGM ID	表示日の中和抗体力価 (PRNT ₆₀ , 逆log ₂) ^b			
		0	14	21	28
D46/cp/ ΔM2-2/HEK	8401	<3.3	<5.3	5.3	6.3
	8195	<3.3	<5.3	6.9	7.1
	7867	<3.3	<5.3	7.1	7.4
	8392	<3.3	<5.3	5.3	5.9
	平均：	<3.3	<5.3	6.2	6.7
D46/cp/ΔM2- 2	57413	<3.3	5.8	6.8	7.9
	8054	<3.3	7.3	9.9	10.6
	8172	<3.3	<5.3	8.0	8.6
	8445	<3.3	6.0	7.7	8.0
	平均：	<3.3	6.1	8.1	8.8
D46/ΔM2-2	8279	<3.3	<5.3	8.3	7.9
	32956	<3.3	6.1	8.6	8.1
	8246	<3.3	5.8	8.4	8.6
	7856	<3.3	5.6	8.2	9.1
	平均：	<3.3	5.7	8.4	8.4
RSV LID/ΔM2-2	62403	<3.3	5.9	7.8	8.7
	8258	<3.3	<5.3	7.6	8.8
	8232	<3.3	7.8	8.7	9.0
	582126	<3.3	8.2	9.4	10.2
	平均：	<3.3	6.8	8.4	9.2

a AGMに、部位あたり1mLの接種材料中の6.7 log₁₀ PFUの表示ウイルスをi.n.およびi.t.接種した(全用量 = 7.0 log₁₀ PFU/動物)。

b 接種後0、21および28日目に、血清を取得した。中和抗体力価を60%ブラーク減少中和アッセイで測定した。検出の下限は3.3 (1:10)であった。

【0166】

実施例3

この実施例では、RSV MEDI/ M2-2ウイルスの臨床評価を記載する。

【0167】

RSV MEDI/ M2-2と命名された、改変M2-2を含む別のRSV変異体は、以前に記載されたものである(Jin, et al. 2000. J Virol 74:74-82)。RSV MEDI/ M2-2ウイルスは、アンチゲノムcDNAにヌクレオチド位置8197～8201および8431～8436でHindIII部位を導入し、続いてHindIII制限消化およびライゲーションを行って、介在する234ヌクレオチドをM2-2 ORFから欠失させることによって作製した(Jin, et al. 2000. J Virol 74:74-82)。したがって、RSV MEDI/ M2-2ウイルスは、本明細書に記載の「M2-2」変異を含まない(例えば、図1参照)。このウイルスは、CollinsらがRSV A2株の調製物から開発したD46由来ではなかった(Collins et al. Proc Natl Acad Sci USA 1995 92:11563-11567)；代わりに、それはRSV A2株の異なる調製物に由来した(下記の実施例5はこれらの骨格の違いを記載する)。弱毒生鼻腔内ワクチンとしてのヒト評価に適したRSV MEDI/ M2-2の臨床試験材料(CTM)を製造した。RSV MEDI/ M2-2 CTMのヌクレオチド配列を決定したところ、3つの配列位置での2型性(dimorphism)(2つの異なるヌクレオチド割り当ての混合物)を除いて、その起源のcDNAクローンのものと同一であることが判明した：(i) NS1遺伝子中のヌクレオチド285は、cDNAでのAと比べてCTMではA/Gの混合物であり、cDNAでのSと比べてCTMではアミノ酸割り当てS/Gの混合物を生じた；(ii) NS2遺伝子中のヌクレオチド900は、cDNAでのCと比べて、C/Tの混合物であり、ア

10

20

30

40

50

ミノ酸コードへの影響はなかった；および(iii) SH遺伝子中のヌクレオチド4311は、cDNAでのTと比べてCTMではT/Gの混合物であり、cDNAでのNと比べてCTMではアミノ酸割り当てN/Kの混合物を生じた。RNAウイルスに多型を見出すことはよくあることである；このCTMは高レベルの感染性(ラークアッセイで測定)を有し、ラーク表現型に2型性を示さず、インビトロで効率的に複製したので、これらは重要ではなさそうと見なした。実験動物および臨床的対象から排出されたウイルスの配列評価を行って、これらの配列の違いのどれがインビオで支持されるかを判定することができ、それは、これらのどれが重要であるかを示すであろう。ある臨床ワクチン分離株からの配列を取得したところ、示された位置の全てに2型性の痕跡がまだ存在した；このことは、これらの変化のどれも重要な10ではなかったことを示している。

【0168】

RSV MEDI/ M2-2は、鼻腔内ワクチン候補として、第1相臨床試験で逐次的に成人、RSV血清反応陽性幼児、ならびに6～24ヶ月齢のRSV血清反応陰性乳幼児において評価された(ClinicalTrials.gov NCT01459198; Karron, et al. 2015. *Science Transl Med* 2015 7(312):312ra175)。成人での試験はオープンラベルであり、血清反応陽性および血清反応陰性の乳幼児での試験は、二重盲検、無作為化、プラセボ対照であった。この試験は、Johns Hopkins University Bloomberg School of Public Health (JHU)のCenter for Immunization Research (CIR)で行われた。

【0169】

成人およびRSV血清反応陽性幼児で評価すると、この実験用ワクチンは、RSVの弱毒化株について予想されるように、感染力が非常に弱く、免疫原性が非常に低く、耐容性が良好であった。RSV血清反応陰性乳幼児では、ワクチン接種対象20名が $5.0 \log_{10}$ PFUのRSV MEDI/ M2-2ワクチンの単回投与を受け、対象10名がプラセボを受け取った。発熱と咳の発生率は、ワクチン接種対象とプラセボとで似ていたのに対して、上気道疾患は、プラセボに対してワクチン接種対象では2倍の頻度(44%に対して85%)で発生したが、これは統計的な差がなかった。両グループから様々な外来性の呼吸器ウイルスが高頻度で分離された；おそらく、これらが疾患の多くを引き起こし、この特定の試験でのワクチン耐容性の判定を混乱させたと推定される。外来性ウイルスによる感染および疾患の発生率は、異なる試験間で予想外に変動することがあり、この場合には発生率が異常に高かったので、RSV MEDI/ M2-2の耐容性を評価するためのさらなる試験が必要となるだろう。鼻洗浄液中のワクチンウイルスの排出は、ラークアッセイでは20名中12名のレシピエントにおいて、また、RT-qPCRでは20名中17名のレシピエントにおいて検出された。感染性ウイルスを排出した幼児での排出ウイルスの平均力価は、 $1.5 \log_{10}$ PFU/mlであった(図9、左側)。これらの知見が提起した可能性は、研究が一般的に、ラークアッセイに基づいて>90%の排出、および約 $2.5 \log_{10}$ PFU/mlの感染性排出ウイルスの平均力価を目標としているため、このワクチンは複製が過度に制限されている可能性があるということであった。抗体応答に関しては、20名中19名の血清反応陰性幼児がRSV中和血清抗体力価の4倍の増加を有し、平均力価は $6.6 \log_2$ (1:97)であった。これは、RSV MEDI/ M2-2ウイルスが実質的に免疫原性であることを示唆した。しかしながら、20名中12名の対象のみが感染性ウイルスを排出したにすぎないという観察は、排出ワクチンウイルスの低い力価と併せて、RSV MEDI/ M2-2ウイルスが準最適な複製を有し、多少より効率的に複製したM2-2変異型ウイルスがより効果的であるかもしれない、という可能性を提起した。これは、RSVが複製して疾患を引き起こす気道の表層上皮の免疫防御が非効率的であり、したがって可能な限り免疫原性であることがRSVワクチンにとって望ましいので、当該の関心事である。

【0170】

実施例4

この実施例では、RSV LID/ M2-2の臨床評価を記載する。

【0171】

上述したように、AGMでのRSV D46/ M2-2とRSV LID/ M2-2の比較は、RSV LID/ 50

M2-2における「6120」変異の存在が複製の増加に関連することを示した(表4および5)。RSV MEDI/ M2-2のCTMに対するRSV LID/ M2-2のAGMにおける複製を、wt RSVと並行して、さらに比較した(表7～9)。NPスワップ(表7)または気管洗浄検体(表8)における感染性ウイルスの排出の分析は、両方のウイルスが並行して評価されたwt RSVよりも弱毒化されていることを示した。しかし、RSV LID/ M2-2とRSV MEDI/ M2-2の間には、排出の、それゆえに複製の、明らかな違いはなかった。3つ全てのウイルス(RSV LID/ M2-2、RSV MEDI/ M2-2、およびwt RSV)は、RSV中和血清抗体の同様の力価を誘導した(表9)。

【0172】

RSV LID/ M2-2ウイルスは、それがRSV MEDI/ M2-2よりもヒトでより効率的に複製して、より免疫原性であり得るかを判定するために、臨床研究において評価した。実験用の鼻腔内RSVワクチンとしてヒトに投与するのに適したRSV LID/ M2-2のCTMのロットを製造した。スクレオチド配列分析は、このCTMがそのcDNAクローンと同じ配列を有し、検出可能な偶発的な突然変異が製造中に存在しないことを示した。Vero細胞(ワクチン製造に使用される)におけるその複製効率は、RSV MEDI/ M2-2と本質的に同じであった。AGMにおける複製および免疫原性について、RSV LID/ M2-2 CTMをwt RSVと並行して評価した(表10～12)。NPスワップ(表10)および気管洗浄検体(表11)からの感染性ウイルスの力価測定により、RSV LID/ M2-2 CTMの弱毒化表現型が確認された。それにもかかわらず、このCTMによって誘導されたRSV中和血清抗体の力価は、wt RSVによって誘導された力価とほぼ同じであり(表12)、この実験用ワクチンはそのwt親の免疫原性の多くを保持していたことを示している。

【0173】

RSV LID/ M2-2 CTMは、CIR/JHU (ClinicalTrials.gov NCT02040831)およびInternational Maternal Pediatric Adolescent AIDS Clinical Trials Network (IMPAACT, ClinicalTrials.gov NCT02237209)からの7か所の臨床現場で実施された二重盲検プラセボ対照研究で6～24ヶ月齢のRSV血清反応陰性乳幼児において評価した。合計で、20名の対象が $5.0 \log_{10}$ PFUのワクチンの単回用量を受け取り、9名がプラセボを受け取った。ワクチン接種後の呼吸器疾患に関しては、ワクチン接種対象とプラセボ投与対象の両方で呼吸器疾患が頻繁に発生した。発熱、中耳炎、上気道疾患、下気道疾患、咳、または呼吸器疾患もしくは発熱性疾患の発生率は、2つのグループ間で本質的に同じであった。ライノウイルス、アデノウイルス、パラインフルエンザおよびコロナウイルスを含めて、外来性ウイルスがワクチン接種対象とプラセボ投与対象の両方で頻繁に検出された。1名のワクチン接種対象は9日目に発症して11日目に消散した軽度の下気道疾患(低調性連続性副雑音(rhonchi))の短いエピソードを経験し、これは外来性感染物質としてのライノウイルスおよびエンテロウイルスに加えて、ワクチンウイルスの排出と一致した。したがって、この臨床疾患の因果関係は不明なままである。感染性排出ワクチンウイルスは20名中19名のワクチン接種対象から回収され、 $3.4 \log_{10}$ PFU/mlの平均ピーク力価を示した(図9B)。

【0174】

したがって、RSV LID/ M2-2ウイルスは、感染性ウイルスを排出する人数(19/20対12/20)に基づいて、および平均ピーク力価($3.4 \log_{10}$ PFU/ml対 $1.5 \log_{10}$ PFU/ml、これは有意差があった)に基づいて、ヒト宿主においてRSV MEDI/ M2-2よりも感染力が高かった。RSV LID/ M2-2ウイルスはまた、以前の臨床研究で評価されていたrA2cp248/404/1030 SHと呼ばれる以前のリード候補よりも効率的に複製した(Karron, et al. 2005. J Infect Dis 191:1093-1104)：この以前の研究からのいくつかの検体をMEDI/ M2-2研究からの検体と比較して分析したところ、rA2cp248/404/1030 SHは $2.5 \log_{10}$ の平均ピーク力価を有することが示された(図9A、右のパネル)。RSV LID/ M2-2ウイルスはまた、並行して分析したRSV MEDI/ M2-2 (1:97)およびrA2cp248/404/1030 SH (1:34)と比較して、RSV中和血清抗体のより高い平均力価(1:137)を誘導した(Karron, et al. 2015. Science Transl Med 2015 7(312):312ra175)。

10

20

30

40

50

【0175】

上記の臨床研究は、RSV LID/ M2-2ウイルスがヒト宿主においてRSV MEDI/ M2-2よりも感染力が高く、より効率的に複製したことを示した。それは免疫原性も高かった。上記のように、これらの2つのウイルス間のウイルス複製の効率の差は、細胞株またはAGMにおいて再現可能に実証されていなかった；また、MEDI/ M2-2に対するLID/ M2-2のより高い免疫原性もAGMにおいて実証されていなかった。したがって、前臨床研究に反して、RSV LID/ M2-2は、より複製能があり、より免疫原性が高いRSV MEDI/ M2-2の代替物を提供する。

【0176】

1つまたは複数の追加の弱毒突然変異を有するRSV LID/ M2-2のさらなる誘導体を設計して構築した。こうした株の例としては、以下が挙げられる：RSV LID/cp/ M2-2（実施例8参照）、RSV LID/ SH/ M2-2、RSV LID/cp/ SH/ M2-2、およびRSV LID/ M2-2/1030s。血清反応陰性チンパンジーにおけるcp、SH、1030sおよびM2-2変異の以前の評価に基づいて、これらのウイルス株の増加する弱毒化の順序は次のようになると予想される。

RSV LID/cp/ΔM2-2 ≈ RSV LID/ΔSH/ΔM2-2 < RSV LID/cp/ΔSH/ΔM2-2 < RSV LID/ΔM2-2/1030s

実施例5～8に記載の突然変異を含む株などの、さらなる株も提供される。

【0177】

（表7）RSV LID/ M2-2またはwt RSV rA2を接種したAGMからの鼻咽頭スワブサンプル中のウイルスの力価^a

RSV ワクチン 候補	AGM ID	表示日のNPウイルス力価 (\log_{10} PFU/mL) ^b											排出 の 期間 ^c	ピーク ウイルス 力価	1日力価 の 合計 ^d
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12			
RSV LID/ ΔM2-2	7845	-	-	-	-	1.2	<u>1.5</u>	0.7	-	-	-	-	3	1.5	6.2
	7394	-	-	0.7	-	2.1	2.4	<u>2.6</u>	1.9	-	-	-	6	2.6	11.8
	7802	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0.35	3.9
	7832	-	-	-	-	-	<u>2.1</u>	-	-	-	0.7	-	5	2.1	6.0
	平均：											3.5	1.6	7.0	
RSV MEDI/ ΔM2-2	7534	-	-	-	-	-	-	<u>0.7</u>	-	-	-	-	1	0.7	4.2
	7882	-	-	1.2	0.7	0.7	1.0	1.4	1.7	<u>2.2</u>	1.2	-	8	2.2	11.2
	7568	-	-	-	-	<u>0.7</u>	-	-	-	-	-	-	1	0.7	4.2
	7890	-	-	2.2	<u>2.3</u>	1.3	-	1.9	0.7	-	-	-	6	2.3	10.5
	平均：											4.0	1.5	7.5	
wt RSV rA2	7822	-	-	1.0	1.3	1.0	2.6	<u>2.7</u>	0.7	-	1.0	-	8	2.7	11.7
	7894	-	0.7	1.0	0.7	1.4	<u>4.0</u>	3.7	1.7	2.0	1.5	1.0	11	4.0	18.1
	7622	-	-	2.0	1.4	<u>2.5</u>	2.3	-	1.9	1.3	-	-	7	2.5	13.2
	7831	-	-	-	1.0	-	-	-	-	<u>2.1</u>	-	-	6	2.1	6.3
	平均：											8.0	2.9	12.3	

a AGMに、部位あたり1mLの接種材料中の6.0 \log_{10} PFUの表示ウイルスを鼻腔内および気管内経路の組み合わせで接種した(全用量：動物あたり6.3 \log_{10} PFU)。AGM研究は、NIHのNIAID動物実験委員会によって承認された。

b 組み合わせたNPスワブを、安定化剤としてスクロースリン酸緩衝液を含む2mLのL-15培地に入れた。ウイルス力価測定を37℃でVero細胞にて行った。検出の下限は0.7 \log_{10} PFU/mLであった。検出可能なウイルスを含まないサンプルを「-」として表す。各動物のピーク力価には下線が引かれている。

c ウイルスが検出された最初の日から最後の日までの期間、その間の(もしあれば)不検出

10

20

30

40

50

日を含む。

d 1日あたりの力価の合計を、ウイルス排出の大きさ(曲線下面積)の推定値として用いる。検出可能なウイルスを含まないサンプルについては0.35の値を用いた。

【0178】

(表8) RSV LID/ M2-2またはwt RSV rA2を接種したAGMからの気管洗浄サンプル中のウイルスの力価^a

RSVワクチン候補	AGM ID	表示日の気管洗浄ウイルス力価 (\log_{10} PFU/mL) ^b						排出の期間 ^c	ピークウイルス力価	1日力価の合計 ^d
		2	4	6	8	10	12			
RSV LID/ΔM2-2	7845	1.0	1.9	<u>2.2</u>	-	1.3	-	11	2.2	7.7
	7394	1.6	2.5	<u>2.6</u>	-	-	-	7	2.6	9.0
	7802	2.0	1.5	<u>2.3</u>	-	-	-	7	2.3	7.9
	7832	1.0	2.8	<u>4.1</u>	3.3	2.6	-	11	4.1	14.6
	平均:						9.0	2.8	9.8	
RSV MEDI ΔM2-2	7534	1.3	2.1	<u>2.8</u>	2.1	-	-	9	2.8	9.7
	7882	2.4	1.5	<u>2.9</u>	2.3	-	-	9	2.9	10.5
	7568	-	2.0	<u>2.7</u>	1.6	-	-	7	2.7	8.4
	7890	2.4	<u>2.7</u>	2.0	1.9	1.3	-	11	2.7	10.9
	平均:						9.0	2.8	9.9	
wt RSV rA2	7822	2.5	2.5	<u>4.7</u>	2.6	1.3	-	11	4.7	14.2
	7894	3.3	2.9	<u>4.0</u>	3.5	2.0	-	11	4.0	16.4
	7622	2.3	2.8	<u>4.3</u>	2.0	1.0	1.0	13	4.3	13.5
	7831	2.0	3.8	<u>4.3</u>	4.2	2.5	-	11	4.3	17.4
	平均:						11.5	4.3	15.4	

a AGMに、部位あたり1mLの接種材料中の6.0 \log_{10} の表示ウイルスを鼻腔内および気管内経路の組み合わせで接種した(全用量:動物あたり6.3 \log_{10} PFU)。

b 2、4、6、8、10および12日目に、3mLのPBSで気管洗浄を行った。ウイルス力価測定を37℃でVero細胞にて行った。検出の下限は1.0 \log_{10} PFU/mL(洗浄液)であった。検出可能なウイルスを含まないサンプルを「-」として表す。各動物のピーク力価には下線が引かれている。

c ウイルスが検出された最初の日から最後の日までの期間、その間の(もしあれば)不検出日を含む。

d 1日あたりの力価の合計を、ウイルス排出の大きさ(曲線下面積)の推定値として用いる。検出可能なウイルスを含まないサンプルについては0.7の値を用いた。

【0179】

(表9) RSV LID/ M2-2またはWT RSV rA2を接種したAGMの中和抗体力価^a

10

20

30

40

50

RSVワクチン候補	AGM ID	表示日の中和抗体力価 (PRNT ₆₀ , 逆log ₂) ^b		
		0	21	28
RSV LID ΔM2-2	7845	<3.3	3.3	6.7
	7394	<3.3	5.8	6.1
	7802	<3.3	8.9	9.7
	7832	<3.3	6.1	6.2
	平均:	<3.3	6.0	7.2
RSV MEDI ΔM2-2	7534	<3.3	8.7	8.2
	7882	<3.3	6.9	9.1
	7568	<3.3	7	7.5
	7890	<3.3	7.6	8.8
	平均:	<3.3	7.6	8.4
wt RSV rA2	7822	<3.3	8	8.4
	7894	<3.3	7.8	7.7
	7622	<3.3	6.9	8
	7831	<3.3	5.7	6.1
	平均:	<3.3	7.1	7.6

a AGMに、部位あたり1mLの接種材料中の6.0 log₁₀ PFUの表示ウイルスをi.n.およびi.t.接種した(全用量 = 6.3 log₁₀ PFU/動物)。

b 接種後0、21および28日目に、血清を取得した。中和抗体力価を60%ブレーク減少中和アッセイで測定した。検出の下限は3.3 (1:10)であった。

【 0 1 8 0 】

(表10) CTM RSV LID/ M2-2または組換えwt RSV rA2を接種したAGMからの鼻咽頭スワブサンプル中のウイルス力価

ウイルス ^a	AGM ID	表示日のNPウイルス力価(log ₁₀ PFU/mL) ^b											ピーカ ウイルス 力価	1日力価 の 合計 ^c
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12		
RSV LID/ΔM2-2	7728	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	1.2	-	1.2	5.0
	7833	-	-	3.6	2.6	3.6	4.3	1.7	-	1.3	-	-	4.3	18.9
	7706	-	-	-	1.2	2.0	2.7	0.7	-	1.7	-	-	2.7	10.3
	7767	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	1.0	-	1.0	4.8
	平均:												2.3	9.8
RSV rA2 wt RSV	7877	-	-	3.4	3.5	3.4	1.6	3.4	2.9	1.5	-	-	3.5	21.1
	7885	-	-	2.3	3.8	3.3	3.1	2.9	2.3	1.7	-	-	3.8	20.9
	7758	-	0.7	-	0.7	0.7	2.1	2.2	2.7	1.5	1.0	-	2.7	12.6
	7724	-	1.4	2.2	2.8	2.1	3.4	3.0	2.4	3.1	2.0	-	3.4	23.2
	平均:												3.4	19.4

a サルに、部位あたり1mLの接種材料中の5.9 log₁₀ PFUの表示ウイルスをi.n.およびi.t.接種した(全用量 = 6.2 log₁₀ PFU/AGM)。

b ウイルス力価測定を37でVero細胞にて行った。検出の下限は0.7 log₁₀ PFU/mLであった。検出可能なウイルスを含まないサンプルを「-」として表す。各動物のピーカ力価には下線が引かれている。結果は、RSV LID M2-2が、RSV rA2と比較して、AGMのURTにおいて強く制限されることを示す。

c 1日あたりの力価の合計を、ウイルス排出の大きさ(曲線下面積)の推定値として用いる。検出可能なウイルスを含まないサンプルについては0.35の値を用いた。

10

20

30

40

50

【0181】

(表11) CTM RSV LID/ M2-2または組換えwt RSV rA2を接種したAGMからの気管洗浄サンプル中のウイルスの力価

ウイルス 試験物質 ^a	AGM ID	表示日のTLウイルス力価 (\log_{10} PFU/mL) ^b						ピーク ウイルス 力価	1日力価 の 合計 ^c
		2	4	6	8	10	12		
RSV LID ΔM2-2	7728	1.3	-	<u>2.0</u>	-	-	-	2.0	6.1
	7833	2.2	<u>2.6</u>	2.0	2.1	-	-	2.6	10.2
	7706	-	2.5	<u>2.7</u>	1.7	1.3	-	2.7	9.6
	7767	1.0	-	-	<u>2.6</u>	2.0	-	2.6	7.7
平均:								2.5	8.4
RSV rA2 wt RSV	7877	2.4	3.0	<u>3.9</u>	2.8	1.0	-	3.9	13.8
	7885	1.8	2.9	<u>3.5</u>	3.0	-	-	3.5	12.6
	7758	1.9	2.9	<u>3.7</u>	<u>3.9</u>	1.3	-	3.9	14.5
	7724	-	2.3	2.7	3.5	<u>4.1</u>	2.1	4.1	15.4
平均:								3.8	14.1

10

20

a サルに、部位あたり1mLの接種材料中の5.9 \log_{10} PFUの表示ウイルスをi.n.およびi.t.接種した(全用量 = 6.2 \log_{10} PFU/AGM)。

b ウイルス力価測定を32でVero細胞にて行った。検出の下限は1.0 \log_{10} PFU/mLであった。検出可能なウイルスを含まないサンプルを「-」として表す。下線付きの値は各動物の最大力価を示す。予想通り、高度に温度感受性のウイルスRSV LID M2-2は、AGMのLRT(体温39)において複製しなかった。TL, 気管洗浄。

c 1日あたりの力価の合計を、ウイルス排出の大きさ(曲線下面積)の推定値として用いる。検出可能なウイルスを含まないサンプルについては0.7の値を用いる。

【0182】

(表12) CTM RSV LID/ M2-2または組換えwt RSV rA2を接種したAGMにおける血清PRNT₆₀抗体力価

30

ウイルス ^a	AGM ID	下記の日のRSV中和力価 (逆数の \log_2)		
		0	21	28
RSV LID/ΔM2-2	7728	-	8.1	10.1
	7833	-	7.2	7.4
	7706	-	5.7	6.4
	7767	-	6.4	6.3
	平均:	-	6.9	7.6
RSV rA2 wt RSV	7877	-	8.6	8.5
	7885	-	8.2	9.1
	7758	-	7.8	7.9
	7724	-	7.5	7.8
	平均:		8.0	8.3

40

a サルに、部位あたり1mLの接種材料中の5.9 \log_{10} PFUの表示ウイルスをi.n.およびi.t.接種した(全用量 = 6.2 \log_{10} PFU/AGM)。

b 60% プラーク減少アッセイの検出の下限は3.3(希釈逆数の \log_2)である。検出下限以下のサンプルは「-」として記録される。

50

【0183】

実施例5

この実施例では、インピボでの複製効率に影響を及ぼす可能性のあるRSV LID/ M2-2、RSV D46/ M2-2、およびRSV MEDI/ M2-2の違いを記載する。

【0184】

上記のように、RSV D46/ M2-2ウイルスとRSV LID/ M2-2ウイルスは、RSV LID/ M2-2のSH遺伝子における6120変異を除いて、配列が同一である；6120変異は、下流の非翻訳領域から112ヌクレオチドを除去し、かつSH ORFの最後の3つのコドンおよび停止コドンのサイレントヌクレオチド変化をもたらす(図3)。RSV LID/ M2-2は、AGMの上気道(表4)および下気道(表5)において、RSV D46/ M2-2よりもかなり効率的に複製した。これらのウイルスは他の点では同一であるので、これは、6120変異が靈長類における複製の増加と関連しており、その影響がAGMにおいて疑いの余地なく明確に検出するのに十分なほど大きいことを示した。

10

【0185】

上記のように、RSV LID/ M2-2ウイルスとRSV MEDI/ M2-2ウイルスは、細胞培養およびAGMにおける複製効率に関して区別することができなかったが、前者は血清反応陰性乳幼児における複製がより著しく効率的であり、免疫原性がより高かった。したがって、これらのウイルスは複製効率の点で相違するものの、それは十分に許容性のヒト宿主において明らかにされたにすぎなかった。RSV LID/ M2-2は6210変異を有し、RSV MEDI/ M2-2は該変異を有しない。しかし、この場合、6120変異は、半許容性AGMにおける複製の増加と関連していなかったが、許容性の天然宿主である血清反応陰性乳幼児における複製の増加と関連していた。これらの観察は、RSV LID/ M2-2がRSV MEDI/ M2-2よりも高い複製効率を明らかに有するが、これはLIDウイルスとMEDIウイルスとの間の他の何らかの相違によって若干減少しうることを示唆する。6120変異に加えて、そのような相違点が2つある：

20

【0186】

相違点の1つは、M2-2 ORFをサイレンシングする突然変異の詳細が、RSV LID/ M2-2とRSV MEDI/ M2-2の間で異なることである。RSV LID/ M2-2(およびRSV D46/ M2-2)において、該欠失は241ntの長さであり、ヌクレオチド8187の後で開始し、さらに、3つのATG翻訳開始コドンがすべてACGに変更されている；その結果、M2-2由来ペプチドの翻訳はほとんどまたは全くなくなるはずである(図1)。これに対して、RSV MEDI/ M2-2では、該欠失変異は、ヌクレオチド8196で始まる外来のHindIII制限部位の挿入を含み、234ntの欠失を含み、かつM2-2タンパク質の最長バージョンのN末端を表す12アミノ酸ペプチドをコードするであろう(Jin, et al. 2000. J Virol 74:74-82)。

30

【0187】

相違点の2つ目は、RSV MEDI/ M2-2とRSV LID/ M2-2のcDNAが、2つの骨格にわたって散在する21の追加のヌクレオチド配列位置で異なることである(表13)。これらのうち、6つのヌクレオチドの相違(RSV LID/ M2-2の1099位での1-ヌクレオチド挿入を含む)は、D46 cDNAクローニングの構築中に加えられた制限部位に起因する(Collins, et al. 1995. Proc Natl Acad Sci USA 92:11563-11567)。これらの6つの変化は、生物学的wt RSVと組換えwt D46 RSVがチンパンジーにおいて同様の効率で複製し、かつ同様のレベルの疾患を引き起こすので、表現型的にサイレントであると考えられる(例えば、Whitehead, et al. 1998. J Virol 72:4467-4471)。これらの変化はまた、ヒトにおいてこれまでに評価された、いくつかのワクチン候補にも存在している。したがって、これらの6個のヌクレオチドおよびそれらの関連する制限部位が複製に影響を及ぼす可能性は低いようであるが、これは明確には決定されていない。RSV MEDI M2-2とRSV LID/ M2-2との間の残りの15個のヌクレオチドの相違は点突然変異であり、これらの点突然変異は、2つの独立した逆遺伝学系が誘導された、A2株の2つの異なる親生物学的ウイルスストックに存在する偶発的な相違を反映していると考えられる。異なる継代履歴を有する同じRSV株の2つの調製物の間に多数のヌクレオチドの相違を見つけることは珍しいことでは

40

50

ない。これらの15のヌクレオチドの相違のうち2つは、アミノ酸の相違、すなわちNS2タンパク質に1つ(K51R)とNタンパク質にもう1つ(T24A)のアミノ酸相違をもたらす(アミノ酸割り当ては、最初にLIDで、その後にMEDIで示される)。最近の研究から、これらの2つのアミノ酸相違のいずれもインピトロでの複製効率に影響を及ぼさないことが示された(Lawlor, Schickli, and Tang. 2013. J Gen Virol 94:2627-2635)。

【0188】

(表13) 6120および M2-2変異に加えて、RSV MEDI/ M2-2とRSV LID/ M2-2の間のゲノム配列(ポジティブセンス)の相違

遺伝子 領域	RSVヌクレオチド			アミノ酸(注釈)		
	ゲノム ヌクレオチド 位置 ¹	<u>RSV</u> <u>MEDI/</u> <u>AM2-2</u>	<u>RSV</u> <u>LID/AM2-2</u>	アミノ酸 位置	<u>RSV MEDI/</u> <u>AM2-2</u>	<u>RSV LID/AM2-2</u>
		cDNA	cDNA		cDNA	cDNA
NS1	404	C	T	102	N	N
NS2	779	G	A	51	R	K
NS2/N ig	1099	T	C*	ncr ²	n/a	(1-nt挿入、 RSV LID / ΔM2-2中にAf1II制限部位を作る)
N	1138	A	C*	ncr ²	n/a	(RSV LID/ ΔM2-2中にNcoI制限部位を作る)
N	1139	G	C*	ncr ²	n/a	
N	1181	G	A	14	K	K
N	1209	G	A	24	A	T
N	1937	A	G	266	S	S
G/F ig	5611	A	G*	ncr ²	n/a	

G/F ig	5615	A	T*	ncr ²	n/a	(RSV LID/ ΔM2-2中にStuI制限部位を作る)
G/F ig	5639	G	A	ncr ²	n/a	n/a
F	6215	C	T	185	V	V
F	6221	C	T	187	V	V
F	6386	T	C	242	G	G
F	7214	C	T	518	A	A
F	7481	T	C	ncr ²	n/a	n/a
F/M2 ig	7559	A	C*	ncr ²	n/a	(RSV LID/ ΔM2-2中にSphI制限部位を作る)
M2	7701	G	C	32	P	P
L	10514	T	C	673	L	L
L	13633	A	C	1712	T	T
L	13900	T	C	1801	S	S

1 WT RSV A2株(Genbank アクセッション番号M74568)に対して番号付けされたゲノム位置。全ての配列はポジティブセンスである。

2 ncr、非コード領域

4 ig、遺伝子間利用域

* 元のLIDアンチゲノムcDNAクローニングマーカーとして操作された変化(Collins et al. PNAS 92:11563-7 1995 PMID 8524804)。これらの変化は、ヒトで評価された組換え

10

20

30

40

50

RSVワクチン候補の大部分に存在する。

【0189】

したがって、以下のことを示す新しい試薬および情報が提供される：

1. RSV LID/ M2-2は、AGMにおいてRSV D46/ M2-2よりもかなり効率的に複製する。これらのウイルスは、RSV LID/ M2-2中の6120変異の存在のみで異なるので、この変異は、半許容性AGMモデルでさえも検出可能な差異として、靈長類における複製の増加という表現型を与える、と結論づけられる。RSV LID/ M2-2とRSV D46/ M2-2との間の複製効率のこの大きな相違は、弱毒化の点でかなり異なる2つの骨格を提供する。

したがって、共通の弱毒突然変異のセット(例えば、cp、SH、1030s)を各骨格に導入して、ヒトのベンチマークデータ(すなわち、RSV LID/ M2-2の臨床研究)に直接結び付く広範囲の弱毒化表現型を得ることができる。

10

【0190】

2. RSV LID/ M2-2は、AGMにおいてRSV MEDI/ M2-2よりも効率的に複製することはなかったが、より許容性の高い天然の宿主、すなわち血清反応陰性の乳幼児においてはそのようにした。これは、RSV LID/ M2-2がRSV MEDI/ M2-2に対する複製利点を有するが、それがRSV D46/ M2-2に対して有するよりも小さいことを示唆する。したがって、RSV LID/ M2-2およびRSV MEDI/ M2-2についてのヒトにおける複製効率の順序は、RSV LID/ M2-2 > RSV MEDI/ M2-2であり、AGMからのデータは、RSV D46/ M2-2がさらにいっそう弱毒化されて、RSV LID/ M2-2 > RSV MEDI/ M2-2 > D46/ M2-2の弱毒化の順序を与える、というさらなる結論を支持する。これは、D46/LID骨格に対するRSV MEDI/ M2-2の1つまたは複数の相違がその中間表現型に関与していることを示唆する。NS2およびNにおける、それぞれ、K51RおよびT24A変異は、表現型的にサイレントであることを上記の公表されたデータが示唆しているにもかかわらず、最も可能性のある候補はこれらのアミノ酸置換である(Lawlor, Schickli, and Tang. 2013. J Gen Virol 94:2627-2635)。アミノ酸の変化は、シス作用シグナルに含まれないサイレントヌクレオチドシグナルよりも(タンパク質の構造および機能への影響を介して)表現型に影響を及ぼす可能性がより高いため、これらの2つのアミノ酸置換は最も有望な候補であると考えられる。代わりになる別の可能性または追加の可能性は、M2-2変異の構築の細部の違いが影響を及ぼすことである。さらなる可能性は、19のうちの1つまたは複数の他の翻訳上サイレントなヌクレオチドの相違が影響を及ぼすことである。これらの可能性は、以下に記載するパネルから選択された株を用いて、区別することができる。

20

【0191】

実施例6

この実施例では、RSV LID/ M2-2、RSV D46/ M2-2、およびRSV MEDI/ M2-2の特徴の組み合わせを有する追加の M2-2構築物を記載する。

30

【0192】

追加の M2-2ベースのウイルスは、いくつかの M2-2変異の1つ、6120変異、K51R/T24A変異、およびMEDIとD46/LID骨格の間の他の偶然的な差異を含む、様々な組み合わせを得るためにガイダンスとして上記の結果を用いて、構築した。

40

【0193】

さらなるM2-2欠失を生じさせたが、それは、M2-2 ORFの234ヌクレオチド(ヌクレオチド8202～8435)を欠失させ、かつT8197AおよびC8199G点突然変異(AcII部位を生じさせ、M2-2 ORFのコドン13に終止コドンを導入した)を導入する部位特異的突然変異誘発に基づいている(図10)。この変更をRSV D46骨格とRSV LID骨格の両方に対して行って、RSV D46/ M2-2-AcIIおよびRSV LID/ M2-2-AcIIを生じさせた(図11)。これらのウイルスは、D46骨格またはLID骨格(すなわち、それぞれ6120変異なしおよび6120変異ありであるが、それ以外は同一)を、M2-2の12個のN末端アミノ酸を表すペプチドの発現の可能性を含めて、RSV MEDI/ M2-2のものに類似する M2-2変異(M2-2-AcII)と組み合わせたものである(図11)。

【0194】

50

RSV D46/ M2-2-AcIIおよびRSV LID/ M2-2-AcIIのcDNAは、NS2タンパク質にK51R変異を、Nタンパク質にT24A変異を組み入れることによって、さらに改変した(図12A)。したがって、これは、D46/ M2-2およびLID/ M2-2骨格に、MEDI骨格に対する最も顕著な2つの差異を組み込んだ。

【0195】

さらなる例として、NS2タンパク質中のK51R変異およびNタンパク質中のT24A変異はまた、D46/ M2-2骨格に個別に(図12B、上から1番目と2番目の構築物)および一緒に(3番目の構築物)導入した。これらの突然変異はまた、LID/ M2-2骨格(図12C)に個別に(4番目の構築物)と5番目の構築物)および一緒に(下の構築物)導入した。

【0196】

さらに、M2-2-HindIII変異(図10に記載)をD46に導入して、D46/ M2-2-HindIIIおよびLID/ M2-2-HindIII骨格(図13、上から1番目と3番目の構築物)を生じさせた。さらなる誘導体は、NS2およびNタンパク質におけるK51RおよびT24Aアミノ酸置換のさらなる追加を含んでいた(図13、上から2番目と第4番目の構築物)。

【0197】

実施例7

この実施例では、Fおよび/またはG遺伝子に対するさらなる改変を有する追加のM2-2構築物を記載する。

【0198】

RSV LID/ M2-2(図2)は、Fおよび/またはG遺伝子をさらに変更することによって改変した。一般的に、これらの改変は、主として弱毒化に影響を及ぼすのではなく、むしろ抗原発現の効率または別の株由来の遺伝子の組み入れといった他のパラメータに影響を及ぼすように設計された。これらの株は、6120変異の存在を示すために、「LID」ではなく「6120」という用語を使用することに留意されたい。これらの構築物は以下のとおりである：

RSV 6120/G001BB/FBB/ M2-2(図14A)：最近(2011年)の低継代臨床分離株A/Maryland/001/11由来のコドン最適化G遺伝子(G001BB)を含む。この構築物はコドン最適化A2株F遺伝子(FBB)をも含む。G001配列の天然配列は、細菌へのクローニング中に不安定であると分かったことに留意されたい。G001BBをもたらすコドンの最適化は、安定性を付与する効果があった。

【0199】

RSV 6120/FBB/G001BB/ M2-2(図14A)：コドン最適化A2 F遺伝子(FBB)および最近の臨床分離株由来のコドン最適化G遺伝子(G001BB)を含むが、主要なRSV中和および防御抗原であるFタンパク質の発現の増加を得るために、遺伝子マップにおけるそれらの順序がG-FからF-Gに入れ替わっている。

【0200】

RSV 6120/G001BB/F/ M2-2(図14A)：G001BBおよび天然のA2 F遺伝子を含む。

【0201】

RSV 6120/G/FBB/ M2-2(図14A、上から4番目の構築物)：天然のA2 G遺伝子およびコドン最適化A2 F遺伝子(FBB)を含む。

【0202】

RSV 6120/G/FBBHEK/ M2-2(図14B)：天然のA2 G遺伝子と、2つのHEK変異(K66EおよびQ101P)をも有するコドン最適化A2 F遺伝子(FBB)とを含む。

【0203】

RSV 6120/G/FBBcpHEK/ M2-2(図14C)：天然のA2 G遺伝子と、2つのHEK変異(K66EおよびQ101P)およびF遺伝子に含まれる2つのcp変異(すなわち、E218AおよびT523I)をも有するコドン最適化A2 F遺伝子(FBB)とを含む。

【0204】

RSV 6120/FBB/G/ M2-2(図14C)：コドン最適化A2 F (FBB)および天然のA2 G遺伝子を含むが、遺伝子マップにおけるそれらの順序がG-FからF-Gに入れ替わっている。

10

20

30

40

50

【0205】

RSV 6120/G001BB/F001BB/ M2-2 (図14C)：コドン最適化されたG001BB遺伝子およびF001遺伝子(G001BB、F001BB)を含む。

【0206】

簡単に述べると、A/Maryland/001/11と呼ばれる最近の臨床分離株(かなり重症の呼吸器疾患を有する医療従事者から2011年に分離された)由来のGおよび/またはF遺伝子の使用は、これらの組み合わせが改善された複製および/または免疫原性をもたらすかどうかを調べることであった。それはまた、生RSVワクチンが、より最近の株からの表面タンパク質を含むように容易に更新され得ることになろう。コドン最適化(BB)の使用は、主要な防御抗原の一方または両方の発現を増加させるためであった。GおよびFの遺伝子順序のG-FからF-Gへの変更は、抗原発現を増加させるように設計され、また、M2-2変異の状況下で遺伝子マップ内のプロモーター近位の位置にまでFおよびGを移動させると、実施例1に記載したように、意外にもインビトロで複製レベルの低下を示すウイルスが生じる、ということを知って行われた。2つのF cp変異を含むまたは含まない、HEK変異の使用は、中和エピトープの保存ゆえに優れた免疫原性を示す可能性がある、より安定したFタンパク質を得るために行われた。これは、RSV Fタンパク質の準安定性が変性抗原を提示することによって免疫回避に寄与するかもしれない(Sakurai, et al. 1999. J Virol 73: 2956-2962; Collins and Graham, 2008. J Virol 82:2040-2055)、それゆえ、より安定した形態を提供することは、質的に優れた免疫応答を誘導できる可能性がある、という考えに基づいている。

10

【0207】

図14Aおよび14Bに示されるウイルスのそれぞれは、cDNAから容易に回収された。継代P1は、トランスフェクション後の最初の継代であり、接種材料の力価測定なしに行われる(盲継代)。得られた図14Aおよび14Bの構築物のP1収量を、6120変異を含むwt RSV (wt LID)、および該構築物の親であるRSV LID/ M2-2と比較した(図15)。これは、全てのウイルスのP1力価が2つの対照に比べて勝るとも劣らなかったことを示したが、RSV 6120/G001BB/F001BB/ M2-2のP1力価が約3.0 log₁₀減少したことを唯一の例外とした。しかしながら、この力価は、P2継代中に他の構築物と一致するレベルにまで回復した(図15)。総じて、これは、新規遺伝子、遺伝子順序の変化、コドン最適化、ならびにHEKおよび/またはcp変異の導入を含めて、全ての変更が耐容性良好であることを示した。

20

【0208】

実施例8

この実施例では、追加のRSV M2-2構築物の評価を記載する。

【0209】

上述したように、RSV D46/cp/ M2-2 (図4、上のゲノム)は、ワクチン製造に必要なVero細胞において効率的に複製すること、および高度に弱毒化されているもののAGMにおいて高度に免疫原性であることが見出された(表4~6)。そのため、ワクチンの種ウイルスを調製して、D46/cp/ M2-2の臨床試験材料(CTM)を製造するために使用した。上記のように、この構築物は、D46骨格にDNAレベルで単一の偶発的なヌクレオチド変化を有していた：具体的には、M ORF内に存在し、アミノ酸レベルでサイレントであるG3878A。自動配列分析から、このCTMの配列はcDNAの配列と同一であることが示された。AGMにおけるこのCTMの複製および免疫原性の分析から、それは高度に弱毒化されている(表14および15)ものの高度に免疫原性である(表16)ことが確認された。このワクチン候補は、ClinicalTrials.gov識別番号NCT02601612)で実施された、12~59ヶ月齢の15名のRSV血清反応陽性幼児(ワクチン接種対象10名、プラセボ投与対象5名)における二重盲検プラセボ対照研究で評価した。10⁶ PFUの用量で鼻腔内投与した後、ワクチンのウイルス排出は検出されず、D46/cp/ M2-2は血清反応陽性幼児では免疫原性が低かった。これは、該ワクチンが高度に制限されて弱毒化されていることを示し、血清反応陰性乳幼児での評価にとってそれは安全かつ妥当であることを予測している。6~24ヶ月齢のRSV血清反応陰性乳幼児における評価は現在進行中である。これは、有望なワクチン候補に関

30

40

50

する情報を提供して、それが広範な研究に適するかどうかを示すであろう。この情報はまた、前臨床および臨床研究に結び付くさらなるベンチマークを提供するであろう。

【0210】

さらに、このウイルスのLID対応物であるLID/cp/ M2-2(図5、上のゲノム)を構築した。これはVero細胞において効率的に複製することが見出され、AGMにおけるこのウイルスの複製および免疫原性の分析は、それが高度に弱毒化されている(表17および18)ものの高度に免疫原性である(表19)ことを示した。これは、LID/cp/ M2-2を作製するための、LID/ M2-2(血清反応陰性乳幼児では不完全な弱毒化であった(図9B))へのcp変異の追加が、AGMにおいて弱毒化の増加をもたらしたことを示した(すなわち、LID/ M2-2のデータ、表1および2、表4および5、表7および8、ならびに表10および11を、LID/cp/ 10

M2-2のデータ、表17および18と比較されたい)。これは、LID/cp/ M2-2が血清反応陰性ヒトにおいて弱毒化の増加を示すはずであることを示唆するが、これを確認し、弱毒化の増加の程度を決定し、安全性を確認するためには、臨床的評価が必要である。

【0211】

その後、LID/cp/ M2-2の臨床試験材料をアンチゲノムcDNA(その配列をSEQ ID NO:17に示す)を用いて製造した。臨床試験材料(LIDcp M2-2、Lot RSV # 009B)の配列は、ヌクレオチド位置9,972のCからTへの点突然変異を除いて、この組換えウイルスが誘導されたcDNAの配列と一致することが、コンセンサス配列分析によって確認された(全ての配列はポジティブセンスまたはアンチゲノムセンスで報告されることに留意されたい)。この突然変異は、アミノ酸レベルでサイレントであり、LIDcp M2-2、Lot RSV # 009Bを作製するために使用された種ウイルスにも存在していた。偶発的な突然変異は、RNA依存性RNAポリメラーゼの高いエラー率のために、ほとんどのRNAウイルスと同様に、RSVの継代中に現れることがある。このような変化が既知のシス作用シグナルを含まないかまたはアミノ酸コードを変化させない場合、また、それらが該ウイルスのインビトロ複製およびブラークサイズに測定可能な影響を与えないならば、それらは生物学的に重要ではなさそうであると見なされる。LIDcp M2-2臨床試験材料中のサイレントC9972T点突然変異は重要ではなさそうであるが、モニタリングされるであろう。

【0212】

LID/cp/ M2-2ワクチンウイルスは、二重盲検プラセボ対照臨床試験で6～24ヶ月齢の血清反応陰性幼児において評価されている。少なくとも5名の対象が該ワクチンを投与されており、ワクチンウイルスが排出されると予測される期間中に反応原性の証拠はなく、このワクチンが耐容性良好であることを示唆している。

【0213】

既に述べたように、LID/ M2-2/1030sウイルス(図5、上から2番目のゲノム)の非臨床実験ロットが調製され、これはVero細胞において効率的に複製することが見出された。これはAGMにおいて評価され、高度に弱毒化されており(表1および2)、しかも高度に免疫原性である(表3)ことが示された。

【0214】

SEQ ID NO:16に示されるアンチゲノムcDNAを用いて、LID/ M2-2/1030sのCTMを調製した；自動配列分析は、この臨床試験材料(CTM)の配列がcDNAの配列と同一であることを示した。このワクチンを二重盲検プラセボ対照試験で6～24ヶ月齢の血清反応陰性乳幼児において評価した。全部で33名の対象が登録され、予定されたワクチン接種：プラセボ比は2：1であった。30名の参加者からの鼻洗浄液を、ブラークアッセイ(ウイルス培養)によって、ならびにワクチンウイルスLID/ M2-2/1030sの排出についての定量的RT-PCR (qPCR)によって、弱毒化の尺度として評価した。これは、対象のうち17名に明らかにワクチンウイルスの排出があったことを示した(合計20名の対象がワクチン接種を受けたと予測される)。LID/ M2-2/1030s試験において30名中15名の対象はブラークアッセイで陽性であり、また、これらの全15名に加えて2名の追加の対象は、より感度の高いアッセイであるqPCRで陽性であった。ワクチン接種後14～18日の間にウイルスを排出した対象はワクチン接種を受けた者であることが見出され、したがって、これらのデータは 40

10

20

30

40

50

ワクチンウイルス排出、それゆえに弱毒化、の推定上の評価として使用することができる
と予想される。比較すると、6~24ヶ月齢の血清反応陰性乳幼児の比較コホートにおける
RSV LID/ M2-2の同様のウイルス排出分析(ClinicalTrials.gov NCT02040831)から
、ブラークアッセイおよびqRT-PCRによって20名中19名の被接種者におけるウイルス排
出が見出された。LID/ M2-2/1030s試験では、推定上の平均ピーク力価は、PCRによ
り5.1 log₁₀コピー/mlで、培養により2.9 log₁₀ PFU/mlであったが、LID/ M2-2試
験の場合には、平均ピーク力価がPCRにより5.9 log₁₀コピー/mlで、培養により3.4 log
10 PFU/mlであった。したがって、LID/ M2-2/1030sウイルスは、排出ウイルスの感
染率および力価に基づいてLID/ M2-2ウイルスよりも弱毒化されているようであった。L
ID/ M2-2/1030sウイルスでは、3つの最も高い個々のピーク力価が4.7、4.5および4.1
log₁₀ PFU/mlであったのに対して、LID/ M2-2については5.4、5.3および5.1 log₁₀
PFU/mlであった。さらに、LID/ M2-2/1030sウイルスについては、6名の対象が感染
性ウイルスを1日だけ排出させたのに対して、LID/ M2-2ウイルスでは2日であった。し
たがって、これらの尺度のそれぞれによって、LID/ M2-2への1030s変異の挿入は、ワ
クチンの標的である血清反応陰性乳幼児において、ウイルス排出の測定可能で一貫した減
少をもたらした。

【0215】

1030s変異は温度感受性変異であるため、RSV LID/ M2-2/1030sウイルスを温度感受
性表現型について評価した(表20)。この分析は、RSV LID/ M2-2/1030sが40 のシャ
ットオフ温度(T_{SH})および38 のスモールブラーク温度(T_{SP})を有することを示したが、
野生型RSV、LID/ M2-2、MEDI/ M2-2、LID/cp/ M2-2、およびD46/cp/ M2-2
は、T_{SH}およびT_{SP}が> 40 である。したがって、これらの他の野生型および M2-2ベ
ースのウイルスが温度感受性でないのに、RSV LID/ M2-2/1030sは温度感受性表現型
を有する。他の2つの既知の温度感受性ウイルスであるRSV NS2/ 1313/I1314Lおよ
びRSV cps2を陽性対照として加えて、このアッセイが正確であることを確認した。し
たがって、RSV LID/ M2-2への1030s変異の導入は温度感受性表現型を与えた。このこと
は重要である。というのは、温度感受性表現型が、温度のより低い上気道と比較して、温
度のより高い下気道における複製を選択的に制限すると考えられ、それゆえに反応原性に
対するさらなる安全性を付与するからである。これは、T_{SH}および/またはT_{SP}が生理学的
温度より高い場合であってもそうであると考えられる。

【0216】

したがって、これは、弱毒化と免疫原性の様々なバランスを有する、次第に減少した複製
: LID/ M2-2 > LID/cp/ M2-2 > LID/ M2-2/1030sを示す、さまざまな弱毒化ウイ
ルスを提供する。

【0217】

(表14) D46/cp/ M2-2を接種したAGMからの鼻咽頭スワブサンプルのウイルス力価

10

20

30

40

50

RSVワクチン候補 ^a	AGM ID	表示日のNPウイルス力価(\log_{10} PFU/mL) ^b										ピークウイルス力価	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
D46/cp/ ΔM2-2	8573	-	-	0.7	-	-	-	-	-	0.7	-	-	0.7
	N1327	-	-	0.7	-	-	-	1.0	-	-	-	-	1.0
	8555	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.35
	8577	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	0.7
	平均:	-	-	0.5	-	-	-	0.6	-	0.4	-	-	0.7
L-15	8551	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8417	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8489	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8565	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	平均	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a サルに、部位あたり1mLの接種材料中の6 \log_{10} PFUの表示ウイルスをi.n.およびi.t.接種した(全用量 = 6.3 \log_{10} PFU/AGM)。

b 組み合わせたNPスワップを、安定化剤としてスクロースリン酸緩衝液を含むL-15培地2mL中に入れた。ウイルス力価測定を32₂でVero細胞にて行った。検出の下限は0.7 \log_{10} PFU/mLであった。検出可能なウイルスを含まないサンプルを「-」として表す。検出可能なウイルスを含まないサンプルについては0.35の値を用いた。結果は、D46/cp/ M2-2がAGMのURTにおいて強く制限されることを示している。

【0218】

(表15) D46/cp/ M2-2を接種したAGMからの気管洗浄サンプルのウイルス力価

RSVワクチン候補 ^a	AGM ID	表示日のTLウイルス力価(\log_{10} PFU/mL) ^b						ピークウイルス力価
		2	4	6	8	10	14	
D46/cp/ΔM2-2	8573	1.0	-	1.9	1.3	-	-	1.9
	N1327	-	1.0	1.8	1.0	-	-	1.8
	8555	-	-	-	-	-	-	0.7
	8577	-	-	-	-	-	-	0.7
	平均:	0.8	0.8	1.3	0.9	-	-	1.9
L-15	8551	-	-	-	-	-	-	-
	8417	-	-	-	-	-	-	-
	8489	-	-	-	-	-	-	-
	8565	-	-	-	-	-	-	-
	平均:	-	-	-	-	-	-	-

a サルに、部位あたり1mLの接種材料中の6 \log_{10} PFUの表示ウイルスをi.n.およびi.t.接種した(全用量 = 6.3 \log_{10} PFU/AGM)。

b 2、4、6、8、10および14日目に、3mLのPBSで気管洗浄(TL)を行った。ウイルス力価測定を32₂でVero細胞にて行った。検出の下限は1.0 \log_{10} PFU/mLであった。検出可能なウイルスを含まないサンプルを「-」として表す。検出可能なウイルスを含まないサンプルについては0.7の値を用いた。D46/cp/ M2-2はAGMのLRTにおいて強く制限される。

【0219】

(表16) D46/cp/ M2-2を接種したAGMからの血清PRNT₆₀力価

10

20

30

40

50

RSVワクチン候補	AGM ID	表示日の中和抗体力価 (PRNT ₆₀ , 逆log ₂) ^b		
		0	21	29
D46/cp/ΔM2-2 ^a	8573	-	8.4	8.4
	N1327	-	8.4	9.1
	8555	-	6.6	6.1
	8577	-	7.2	6.9
	平均:	-	7.7	7.6
L-15	8551	-	-	-
	8417	-	-	-
	8489	-	-	-
	8565	-	-	-
	平均:	-	-	-

a AGMに、部位あたり1mLの接種材料中の6.0 log₁₀ PFUの表示ウイルスをi.n.およびi.t.接種した(全用量 = 6.3 log₁₀ PFU/動物)。

b 接種後0、21および29日目に、血清を取得した。中和抗体力価を60% プラーク減少中和アッセイで測定した。検出の下限は3.3 (1:10)であった。

【0220】

(表17) LID/cp/ M2-2を接種したAGMからの鼻咽頭スワブサンプルのウイルス力価

RSVワクチン候補 ^a	AGM ID	表示日の中和抗体力価(log ₁₀ PFU/mL) ^b												ピーグウイルス力価
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12		
LID/cp/ΔM2-2	8120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.35	
	8528	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.35	
	8336	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	0.7	
	平均:	-	-	-	0.5	-	-	-	-	-	-	-	0.5	

a サルに、部位あたり1mLの接種材料中の6 log₁₀ PFUの表示ウイルスをi.n.およびi.t.接種した(全用量 = 6.3 log₁₀ PFU/AGM)。検出可能なウイルスを含まないサンプルについては0.35の値を用いた。

b 組み合わせたNPスワブを、安定化剤としてスクロースリン酸緩衝液を含むL-15培地2mL中に入れた。ウイルス力価測定を32でVero細胞にて行った。検出の下限は0.7 log₁₀ PFU/mLであった。検出可能なウイルスを含まないサンプルを「-」として表す。検出可能なウイルスを含まないサンプルについては0.35の値を用いた。結果は、LID/cp/ M2-2がAGMのURTにおいて強く制限されることを示している。

【0221】

(表18) LID/cp/ M2-2を接種したAGMからの気管洗浄サンプルのウイルス力価

RSVワクチン候補 ^a	AGM ID	表示日の中和抗体力価(log ₁₀ PFU/mL) ^b						ピーグウイルス力価
		2	4	6	8	10	12	
LID/cp/ΔM2-2	8120	2.1	-	-	-	-	-	2.1
	8528	1.0	-	-	-	-	-	1.0
	8336	-	1.0	-	-	-	-	1.0
	平均:	1.3	0.8	-	-	-	-	1.4

a AGMに、部位あたり1mLの接種材料中の6 log₁₀ PFUの表示ウイルスを鼻腔内および気管内経路の組み合わせで接種した(全用量 : 6.3 log₁₀ PFU/動物)。

b 2、4、6、8、10および12日目に、3mLのPBSで気管洗浄を行った。ウイルス力価測定を32でVero細胞にて行った。検出の下限は $1.0 \log_{10}$ PFU/mL(洗浄液)であった。検出可能なウイルスを含まないサンプルを「-」として表す。検出可能なウイルスを含まないサンプルについては0.7の値を用いた。LID/cp/ M2-2はAGMのLRTにおいて強く制限される。

【0222】

(表19) LID/cp/ M2-2を接種したAGMからの血清PRNT₆₀力価

RSVワクチン候補	AGM ID	表示日の中和抗体力価 (PRNT ₆₀ , 逆 \log_2) ^b		
		0	21	29
LID/cp/ΔM2-2 ^a	8120	-	10.0	10.5
	8528	-	10.1	9.8
	8336	-	8.1	7.7
	平均:	-	9.4	9.3

a AGMに、部位あたり1mLの接種材料中の $6 \log_{10}$ PFUの表示ウイルスをi.n.およびi.t.接種した(全用量 = $6.3 \log_{10}$ PFU/動物)。

b 接種後0、21および29日目に、血清を取得した。中和抗体力を60%ブラーク減少中和アッセイで測定した。検出の下限は3.3 (1:10)であった。

【0223】

(表20) RSV LID/ M2-2/1030sおよび関連ウイルスの温度感受性

ウイルス	表示した温度(°C)でのウイルス力価(\log_{10} PFU/mL) ^a								
	32	35	36	37	38	39	40	T _{SH} ^b	T _{SP} ^c
RSV A2	7.3	7.2	7.2	7.2	7.3	7.2	7.0	>40	>40
D46 6120	7.7	7.7	7.6	7.6	7.6	7.4	7.4	>40	>40
LID ΔM2-2	5.9	5.9	5.8	5.7	5.7	5.6	5.4	>40	>40
Medi ΔM2-2	7.0	7.0	6.9	7.0	7.0	6.9	6.8	>40	>40
LID cp ΔM2-2	4.5	4.5	4.4	4.2	4.1	3.9	3.5	>40	>40
LID ΔM2-2 1030s	7.1	7.0	7.0	7.0	6.8*	6.1	<u>1.7</u>	40	38
D46 cp ΔM2-2	6.2	6.2	6.1	6.0	5.9	5.7	5.5	>40	>40
RSV ΔNS2 Δ1313 II314L ^{XX}	7.1	6.9	6.8*	6.4	6.4 ^d	<u>≤2</u>	<2	39	36
RSV cps2 ^{XX}	6.4	5.8*	4.7 ^d	<u>≤2</u>	<2	<2	<2	37	35

a 各ウイルスのts表現型を、表示温度でのVero細胞のブラークアッセイにより評価した。ts表現型を有するウイルスについては、シャットオフ温度(T_{SH})での力価を示す(太字、下線)。T_{SH}の定義については、脚注bを参照のこと。

b T_{SH}(太字、下線)は最低の制限温度として定義され、この制限温度では、32と比較した制限が、これら2つの温度でwt RSVについて観察されるものよりも100倍以上である。ts表現型は、40以下(T_{SH})を有すると定義される。

c T_{SP}、スモールブラーク温度は、スモールブラーク表現型が観察される最低の制限温度として定義される。最低制限温度での力価をアスタリスクでマークする。

d イタリック体:マイクロブラーク温度は、スモールブラーク表現型が観察される最低の制限温度として定義される。マイクロブラーク表現型が観察される最低制限温度での力価をアスタリスクでマークする。

XX 対照tsウイルス

【0224】

10

20

30

40

50

実施例9

この実施例では、RSV D46/276/ M2-2-AcIIの構築、ならびにアフリカミドリザルにおけるRSV D46/NS2/N/ M2-2-HindIIIおよび所定の対照ウイルスとのその比較を記載する。

【0225】

追加のM2-2変異型ウイルスを、D46/ M2-2およびMEDI/ M2-2骨格からの特徴のさらなる組み合わせを表すように構築して、RSV D46/276/ M2-2-AcIIと呼ばれるウイルスを生じさせた；このウイルスは本明細書では「RSV 276」または「276」とも称される。

【0226】

RSV 276の構造は図16および表21に要約され、SEQ ID NO:19に提供される。D46(すなわち、完全な野生型アンチゲノムcDNA、SEQ ID NO:1)と比較して、RSV 276は、合計21個のヌクレオチドの相違(1099位での單一ntの欠失を含む)とヌクレオチド8202～8435の欠失(234ヌクレオチドの欠失を生じる)によって異なっていた。これらのヌクレオチド変化は、D46にその元の構築中に意図的に挿入されていた4つの非天然の制限部位(AfIII、Ncol、StuIおよびSphI)を除去し(Collins, et al. 1995 Proc Natl Acad Sci USA 92: 11563-11567)、さらにM2-2欠失にまたがるAcII部位を挿入した(したがって、M2-2-AcII欠失は、図10に記載したものと同じである)。制限部位のこれらの変化には8個のヌクレオチドが関与した。その他の13の変化のほとんどは、RSV MEDI/ M2-2からの所定の割り当てを、新しいRSV 276ウイルスのD46由来の骨格に導入した。

【0227】

(表21) wt RSV D46 (cDNA, SEQ ID NO:1)とRSV 276 (cDNAおよびCTM Lot RSV #014A, SEQ ID NO:19)のゲノム配列(ポジティブセンス)の比較

10

20

30

40

50

遺伝子領域	RSVヌクレオチド(cDNA)				コードされるアミノ酸残基		
	ゲノムnt位置 ¹	SEQ ID NO: 1 位置	WT D46 RSV	RSV 276	アミノ酸位置 ¹	WT D46 RSV	RSV 276
NS1	404	404	T	C	102	N	N
NS2	779	779	A	G	51	K	R ³
NS2/Nig ⁴	1099	1099	C*	-	ncr ²	n/a	n/a
N	1138	1139	C*	A	ncr ²	n/a	n/a
N	1139	1140	C*	G	ncr ²	n/a	n/a
N	1181	1182	A	G	14	K	K
N	1209	1210	A	G	24	T	A ³
G/F ig ⁴	5611	5612	G*	A	ncr ²	n/a	n/a
G/F ig ⁴	5615	5616	T*	A	ncr ²	n/a	n/a
G/F ig ⁴	5639	5640	A	G	ncr ²	n/a	n/a
F	6215	6216	T	C	185	V	V
F	6221	6222	T	C	187	V	V
F	6386	6387	C	T	242	G	G
F	7214	7215	T	C	518	A	A
F	7481	7482	C	T	ncr ²	n/a	n/a
F/M2 ig ⁴	7559	7560	C*	A	ncr ²	n/a	n/a
M2-1	7701	7702	C	G	32	P	P
M2-2	8197	8198	T	A**	13	Y	停止コドン
M2-2	8199	8200	C	G**	15	C	非翻訳
M2-2 欠失				8202-8435 (234 nt)			aa 13-90 ³ : M2-2 欠失
L	10514	10515	C	T	673	L	L
L	13633	13634	C	A	1712	T	T

1 表21において、ヌクレオチドおよびアミノ酸配列のナンバリングは、RSV A2株の最初の完全な配列である生物学的wt RSV A2株(GenBankアクセッション番号M74568)に関する。そのゲノムの長さは15,222ntである。したがって、ウイルスにおける欠失または挿入は、残りのヌクレオチド(またはアミノ酸)の配列ナンバリングを変えない。ヌクレオチドおよびアミノ酸の配列割り当ては、他に指示がない限り、RSV D46 WT (SEQ ID NO:1)に関する。D46は、A2株の組換えで誘導された2番目のバージョンであり、(示されるように)1099位での单一ヌクレオチド挿入のためにヌクレオチドの長さの点で相違しており、ゲノムヌクレオチド長が15,223になる。この挿入はRSV 276では取り除かれ、その位置での割り当てはTになった。

2 ncr, 非コード領域

3 RSV D46と異なるRSV 276のアミノ酸は灰色で陰影付けされる。

4 ig, 遺伝子間領域

* 4つの制限部位マークを作製するためにD46に導入された変化(Collins et al PNAS 92:11563-7 1995 PMID 8524804)。これらはRSV 276では取り除かれた。

** RSV 276においてAclI部位を生じるヌクレオチド変化。

【0228】

276ウイルスは、合成cDNA断片と組み合わせてD46アンチゲノムcDNA (SEQ ID NO:1)を用いて構築した。具体的には、リーダー領域の上流のプラスミドベクター中のユニークなNotI部位から、D46のN遺伝子中の2129～2134位のユニークなAvrII部位にわたるcD

10

20

30

40

50

NAを合成した。D46のユニークなXhol部位(4481～4486位)からユニークなBamHI部位(8499～8505位)にわたる第2のcDNAを合成した。この後者のピースはまた、所望のAcl I部位がHindIII(2つのヌクレオチドの順序の逆位によって異なる制限部位；示されていない)であったことを除いて、M2-2-AclI変異を含んでいた。これらの2つのピースを従来の分子クローニング技術によってD46に代わりに入れて、それによって図16および表21に示される所望のヌクレオチド変化の大部分を達成した。次いで、3つの部位特異的突然変異誘発工程を行った：HindIII部位を所望のAclI部位に変更し(隣接する2つのヌクレオチドをえることを含む)、LにおけるC10514TおよびC13633A置換を行った。これにより、RSV 276のアンチゲノムcDNA (SEQ ID NO:19)が得られた。

【0229】

10

RSV 276ウイルスは実験用のロットとして容易に回収され、Vero細胞内で効率的に複製することが確認された。さらに、RSV 276ウイルス臨床試験材料のロットを回収し、臨床試験に備えて、ヒト使用に適する条件下で製造した。その配列は、偶発的な突然変異がないことが確認された。

【0230】

さらに、ウイルスD46/NS2/N/ M2-2-HindIII(図13の上から2番目のウイルスを参照)の臨床試験材料のロットを作製した。D46/NS2/N/ M2-2-HindIIIアンチゲノムcDNAの配列はSEQ ID NO:18に示される。D46/NS2/N/ M2-2-HindIII(Lot RSV#011B)の臨床試験材料の配列は、3つの多型を除いて、その組換えウイルスが誘導されたcDNAプラスミドの配列と一致した：(1) G2485A(約20～40%A)；コドン：GATからAAT；アミノ酸：P ORF中のD47N；(2) SH遺伝子の3'非翻訳領域中のポリチミジンストレッチ(nt 4537-39)における單一ヌクレオチドチミジン挿入(+1 nt；約30%の亜集団に存在)；(3) L遺伝子終止シグナルのポリアデノシンストレッチ(nt 14,830-35)における2ヌクレオチドアデノシン挿入(集団の約30%が+1A、集団の約70%が+2A)。これらの多型は、生物学的に重要ではないと考えられる。

20

【0231】

一連の研究では、実験用ロットのRSV 276および3つの異なるロットのRSV D46/NS2/N/ M2-2-HindIIIをアフリカミドリザルで複製および免疫原性についてアッセイした。各製剤は、タイミングおよび動物の入手可能性の制約のために別々に評価した。結果は、表1から得られた2つの比較材料(LID/ M2-2およびLID/ M2-2/1030s)のデータと並行して、表22、23および24において一緒に比較される。ウイルスの複製は、ブラークアッセイで定量化される、NPスワップ(表22)および気管洗浄(表23)によってサンプリングしたウイルス排出の定量によって評価した。これは、上気道(NPスワップによる)において、D46/NS2/N/ M2-2-HindIIIの3つのロットのうちの2つ(研究2および3)が5.5～7.3日間にわたって検出可能に排出した(平均ピーク力価1.1～1.6 log₁₀ PFU/ml)のに対して、第3のロット(研究1)の排出は最小限であったことを示した。下気道(気管洗浄)では、3つのロットの結果は非常に類似しており、7.8～9.2日間にわたる中程度のレベルの排出(2.2～2.6 log₁₀ PFU/ml)を示した。比較すると、RSV 276の排出は、上気道ではD46/NS2/N/ M2-2-HindIIIの研究2および3の排出と非常に似ており、また、下気道での排出については3つ全ての研究と非常に類似していた。これに対して、両方の解剖学的区画におけるLID/ M2-2による排出はかなり多かったが、LID/ M2-2/1030sによる排出はかなり少なかった。28日目のこれらのウイルスの60%PRNT力価は、D46/NS2/N/ M2-2-HindIIIのロットのうちの2つについて8.3および8.5逆log₂、第3のロットについて6.3逆log₂であり、そしてRSV 276について8.5逆log₂であった。これらの力価は、LID/ M2-2およびLID/ M2-2/1030sについて示した力価とほぼ同等であったか、またはそれを上回った(表24)。したがって、これらのウイルスは、M2-2骨格に基づくさらなる範囲の弱毒化表現型を提供する。

30

【0232】

40

(表22) LID M2-2、LID M2-2 1030s、D46/NS2/N/ M2-2-HindIII、またはRSV 276を接種したAGMからの鼻咽頭スワップサンプルのウイルス力価^a

50

RSVワクチン候補	AGM ID	表示日のNPウイルス力価 (\log_{10} PFU/mL) ^b											排出の期間 ^c	ピークウイルス力価	1日力価の合計 ^d
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12			
LID ΔM2-2	7806	-	1.4	1.7	2.7	2.6	4.0	3.9	1.4	-	2.7	-	9	4.0	21.4
	7705	-	-	-	2.7	2.3	3.6	2.4	1.2	-	-	-	5	3.6	14.3
	7747	-	-	1.3	0.7	-	1.5	1.3	-	-	-	-	5	1.5	7.2
	7674	-	0.7	-	-	-	2.3	1.8	1.5	-	-	-	7	2.3	8.8
	平均:												6.5	2.9	12.9
LID ΔM2-2 1030s	8033	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0.35	3.9
	7720	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0.35	3.9
	7844	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0.35	3.9
	7847	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0.35	3.9
	平均:												0	0.35	3.9
D46/NS2/N/ΔM2-2-HindIII (研究1)	8417	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0.7	4.2
	8489	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0.35	3.9
	8515	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0.35	3.9
	8574	-	-	-	-	-	-	-	1.2	-	-	-	8	1.2	4.7
	平均:												2.3	0.7	4.2
D46/NS2/N/ΔM2-2-HindIII (研究2)	N1330	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0.35	3.9
	N1326	-	-	-	1.0	0.7	-	1.8	-	1.0	-	-	6	1.8	6.9
	8566	-	-	-	1.0	0.7	0.7	-	0.7	0.7	-	-	6	1.0	5.9
	8551	-	-	-	1.0	0.7	1.0	-	-	-	-	-	3	1.0	5.5
	平均:												3.8	1.1	5.5
D46/NS2/N/ΔM2-2-HindIII (研究3)	9041	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0.35	3.9
	8938	-	-	-	-	1.3	1.3	1.3	1.9	1.0	-	-	5	1.9	8.9
	8926	-	-	-	-	-	0.7	-	1.4	1.4	-	-	4	1.4	6.3
	8911	-	-	-	0.7	1.0	1.0	2.2	2.3	1.0	-	-	6	2.3	10.0
	平均:												3.8	1.6	7.3
RSV 276	8918	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0.35	3.9
	8902	-	1.5	2.0	2.9	2.5	3.0	3.1	2.5	1.4	1.3	-	9	3.1	21.0
	8913	-	-	-	-	-	0.7	1.4	1.0	-	-	-	3	1.4	6.0
	8952	-	-	-	-	0.7	0.7	1.5	-	-	1.2	-	6	1.5	6.5
	平均:												4.5	1.6	9.3

a AGMに、部位あたり1mLの接種材料中の 10^6 PFUの表示ウイルスを鼻咽頭および気管内経路の組み合わせで接種した(全用量: 2×10^6 PFU/動物)。AGM研究は、NIHのNIAID動物実験委員会によって承認された。LID M2-2およびLID M2-2 1030sの以前の研究からの結果を比較のために示す。

b 組み合わせたNPスワブを、安定化剤としてスクロースリン酸緩衝液を含むL-15培地2mL中に入れた。ウイルス力価測定を37℃でVero細胞にて行った。検出の下限は $0.7 \log_{10}$ PFU/mLであった。検出可能なウイルスを含まないサンプルを「-」として表す。各動物のピーク力価には下線が引かれている。

c ウイルスが検出された最初の日から最後の日までの期間、その間の(もしあれば)不検出日を含む。

d 1日あたりの力価の合計を、ウイルス排出の大きさ(曲線下面積)の推定値として用いる。検出可能なウイルスを含まないサンプルについては0.35の値を用いた。

【0233】

(表23) LID M2-2、LID M2-2 1030s、D46/NS2/N/ΔM2-2-HindIII、またはRSV 276を接種したAGMからの気管洗浄サンプルのウイルス力価^a

10

20

30

40

50

RSVワクチン候補	AGM ID	表示日の 気管洗浄ウイルス力価 (\log_{10} PFU/mL) ^b						排出の期間 ^c	ピークウイルス力価	1日力価の合計 ^d
		2	4	6	8	10	12			
LID ΔM2-2	7806	2.5	3.4	<u>4.6</u>	-	-	-	7	4.6	12.6
	7705	1.6	-	<u>3.3</u>	1.5	-	-	9	3.3	8.5
	7747	1.8	1.0	<u>6.0</u>	2.3	-	-	9	6.0	12.5
	7674	-	1.3	<u>2.7</u>	2.3	1.0	-	9	2.7	8.7
	平均:						9	4.2	10.6	10
LID ΔM2-2 1030s	8033	-	-	-	-	-	-	0	0.7	4.2
	7720	-	-	-	-	-	-	0	0.7	4.2
	7844	-	-	-	-	-	-	0	0.7	4.2
	7847	-	-	-	-	-	-	0	0.7	4.2
	平均:						0	0.7	4.2	20
D46/NS2/N/ΔM2-2-HindIII (研究 1)	8417	-	2.3	<u>2.5</u>	1.6	1.3	-	7	2.5	9.1
	8489	1.0	2.7	<u>3.2</u>	3.2	-	-	9	3.2	11.5
	8515	1.3	<u>2.0</u>	-	1.7	-	-	9	2.0	7.1
	8574	1.8	2.1	<u>2.2</u>	1.7	-	-	9	2.2	9.1
	平均:						9	2.5	9.2	20
D46/NS2/N/ΔM2-2-HindIII (研究 2)	N1330	0.7	<u>1.0</u>	0.7	0.7	-	-	3	1.0	4.5
	N1326	1.7	1.7	1.8	<u>2.5</u>	-	-	9	2.5	9.1
	8566	1.8	0.7	<u>3.2</u>	2.4	-	-	9	3.2	9.5
	8551	1.9	<u>2.3</u>	1.7	0.7	-	-	7	2.3	8.0
	平均:						7	2.2	7.8	30
D46/NS2/N/ΔM2-2-HindIII (研究 3)	9041	2.0	1.9	<u>2.3</u>	0.7	-	-	9	2.3	8.3
	8938	1.0	1.6	<u>2.5</u>	2.5	-	-	9	2.5	9.0
	8926	0.7	0.7	<u>2.6</u>	1.7	-	-	9	2.6	7.1
	8911	2.2	2.6	0.7	<u>3.0</u>	-	-	9	3.0	9.8
	平均:						9	2.6	8.6	30
RSV 276	8918	0.7	1.7	<u>2.3</u>	1.6	1.0	-	9	2.3	8.0
	8902	2.2	1.6	<u>2.9</u>	2.1	0.7	-	9	2.9	10.3
	8913	0.7	0.7	<u>3.2</u>	1.3	0.7	-	5	3.2	7.3
	8952	1.8	<u>2.1</u>	1.6	1.8	0.7	-	9	2.1	8.8
	平均:						8.0	2.6	8.6	30

a AGMに、部位あたり1mLの接種材料中の 10^6 PFUの表示ウイルスを鼻咽頭およびIT経路の組み合わせで接種した(全用量: 2×10^6 PFU/動物)。LID ΔM2-2およびLID ΔM2-2 1030sの以前の研究からの結果を比較のために示す。

b 2、4、6、8、10および12日目に、3mLのPBSで気管洗浄を行った。ウイルス力価測定を37でVero細胞にて行った。検出の下限は $1.0 \log_{10}$ PFU/mL(洗浄液)であった。検出可能なウイルスを含まないサンプルを「-」として表す。各動物のピーク力価には下線が引かれている。

c ウイルスが検出された最初の日から最後の日までの期間、その間の(もしあれば)不検出日を含む。

d 1日あたりの力価の合計を、ウイルス排出の大きさ(曲線下面積)の推定値として用いる。検出可能なウイルスを含まないサンプルについては0.7の値を用いた。

【0 2 3 4】

(表24) LID ΔM2-2、LID ΔM2-2 1030s、D46/NS2/N/ΔM2-2-HindIII、またはRSV 276を接種したAGMの中和抗体力価^a

RSVワクチン候補	AGM ID	表示日の中和抗体力価 (PRNT ₆₀ , 逆log ₂) ^b		
		0	21	28
LID ΔM2-2	7806	<3.3	7.2	7.2
	7705	<3.3	8.8	8.2
	7747	<3.3	8.3	8.4
	7674	<3.3	6.7	6.2
	平均:	<3.3	7.8	7.5
LID ΔM2-2 1030s	8033	<3.3	5.4	6.6
	7720	<3.3	<3.3	<3.3
	7844	<3.3	<3.3	4.3
	7847	<3.3	6.8	6.8
	平均:	<3.3	4.7	5.2
D46/NS2/N/ ΔM2-2-HindIII (研究 1)	8417	<3.3	8.8	10.4
	8489	<3.3	6.6	8
	8515	<3.3	6.1	6.4
	8574	<3.3	9.4	8.2
	平均:	<3.3	7.7	8.3
D46/NS2/N/ ΔM2-2-HindIII (研究 2)	N1330	<3.3	8.2	8.8
	N1326	<3.3	8.3	9.1
	8566	<3.3	7	7.3
	8551	<3.3	8.9	8.7
	平均:	<3.3	8.1	8.5
D46/NS2/N/ ΔM2-2-HindIII (研究 3)	9041	<3.3	6.9	6.4
	8938	<3.3	7.1	7.2
	8926	<3.3	6.7	5.5
	8911	<3.3	7.2	5.9
	平均:	<3.3	7.0	6.3
RSV 276	8918	<3.3	6.1	6.2
	8902	<3.3	8.4	8.8
	8913	<3.3	8.8	8.9
	8952	<3.3	9.7	9.9
	平均:	<3.3	8.3	8.5

a AGMに、部位あたり1mLの接種材料中の10⁶ PFUの表示ウイルスをi.n.およびi.t.接種した(全用量 = 10^{6.3} PFU/動物)。LID ΔM2-2およびLID ΔM2-2 1030sの以前の研究からの結果を比較のために示す。

b 接種後0、21および28日目に、血清を取得した。中和抗体力価を60%ブラーク減少中和アッセイで測定した。検出の下限は3.3 (1:10)であった。

【0 2 3 5】

記載された方法または組成物の正確な詳細は、記載された実施態様の精神から逸脱することなく、変更または改変され得ることが明らかであろう。本発明者らは、以下の特許請求の範囲の精神および範囲に含まれる全てのそのような改変および変形を請求するものである。

10

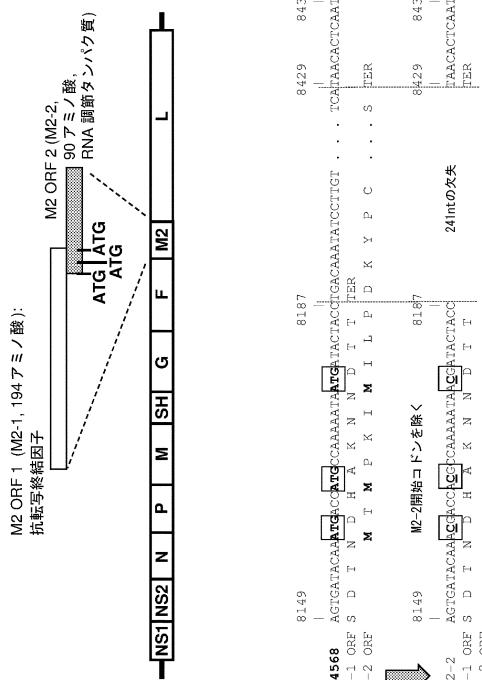
20

30

40

50

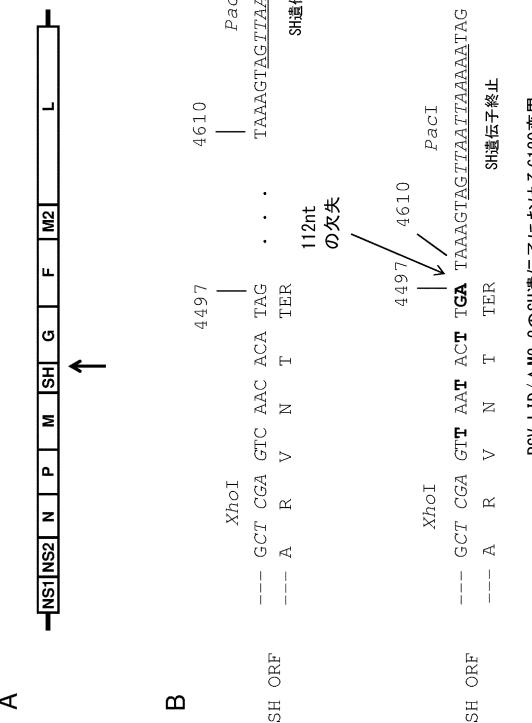
【図1】



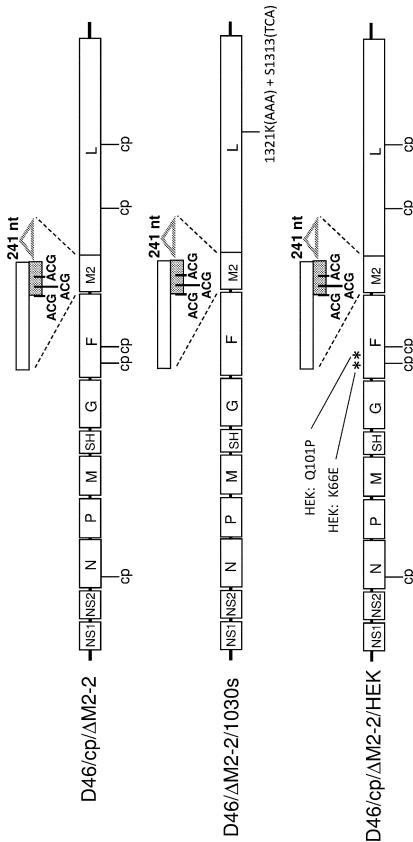
RSV LID/△M2-2のSH遺伝子における△M2-2変異

A

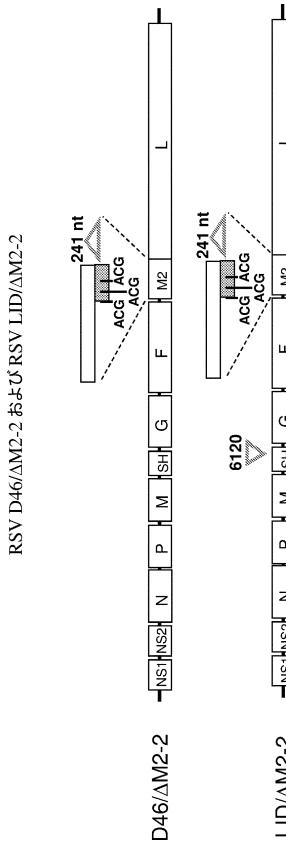
【図3】



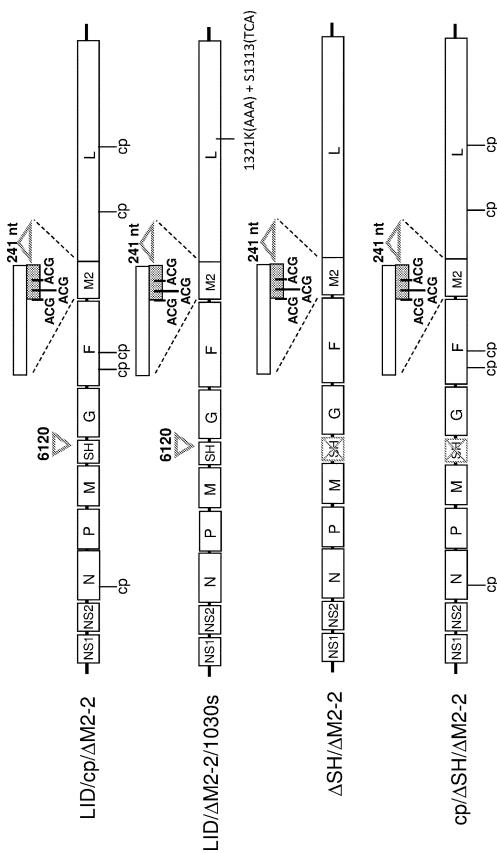
【図4】



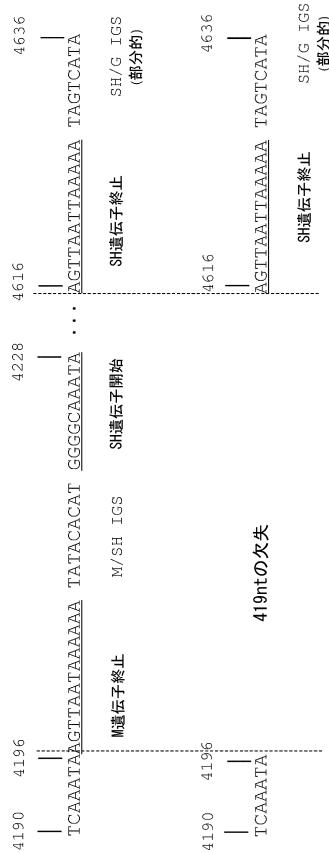
【図2】



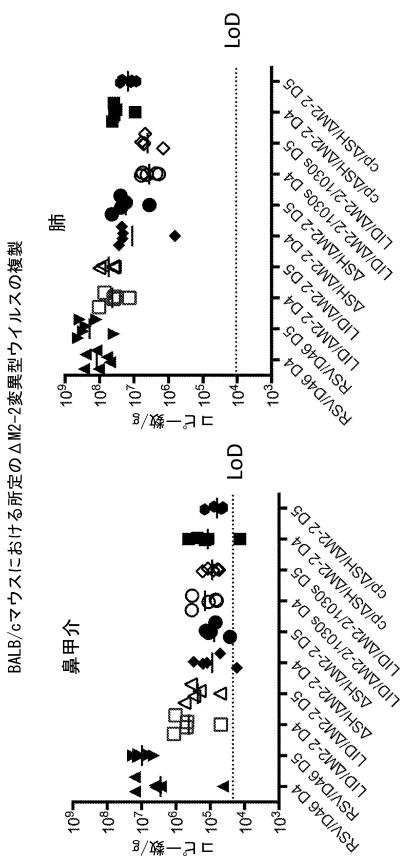
【図 5】



【図 6】

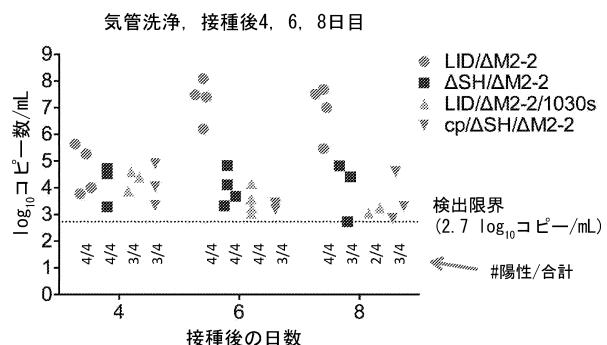


【図 7】



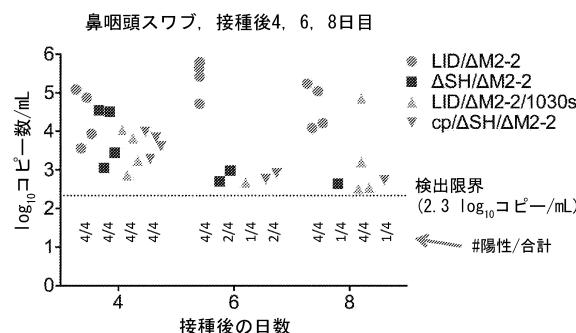
【図 8 A】

アフリカミドリザルにおける所定のΔM2-2変異型ウイルスの複製

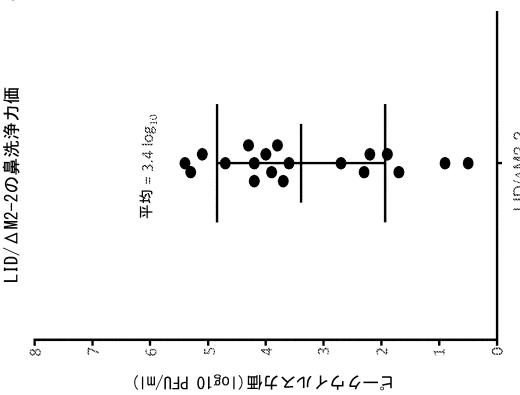


【 図 8 B 】

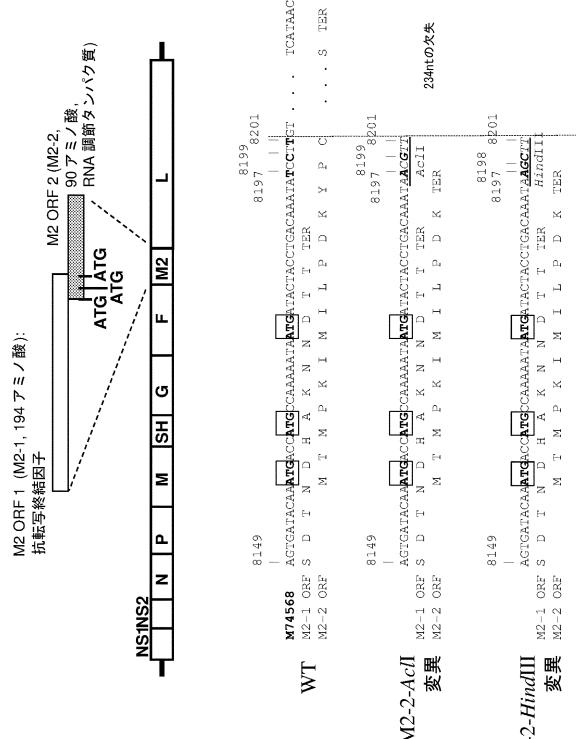
アフリカミドリザルにおける所定の $\Delta M2-2$ 変異型ウイルスの複製



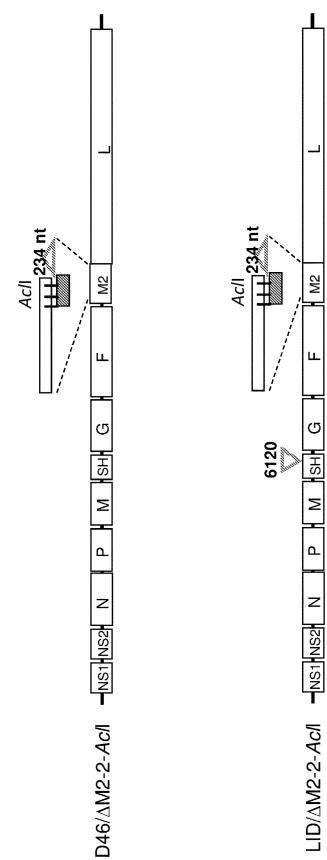
【圖 9】



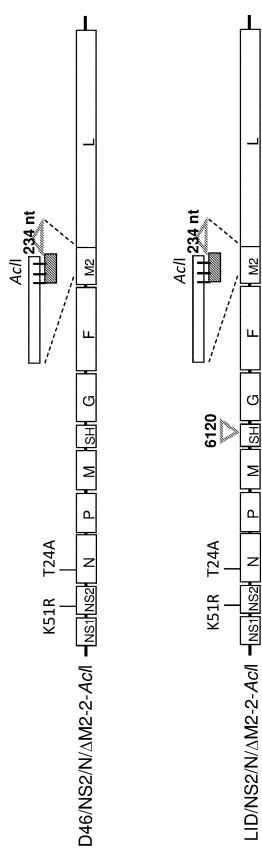
【図10】



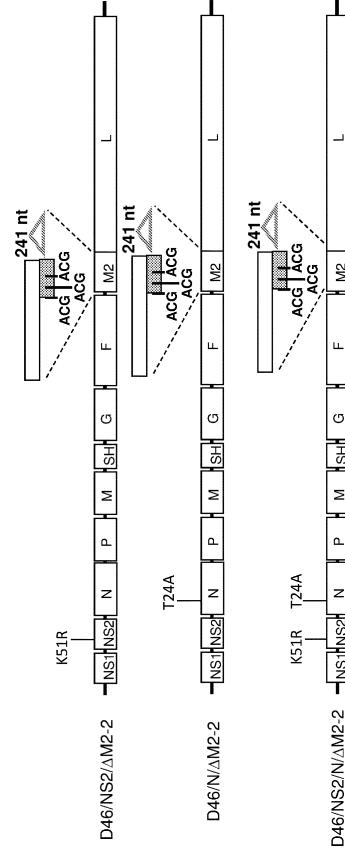
【図11】



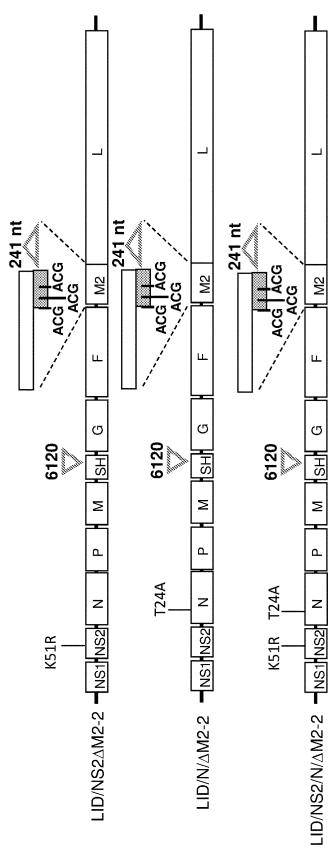
【図 1 2 A】



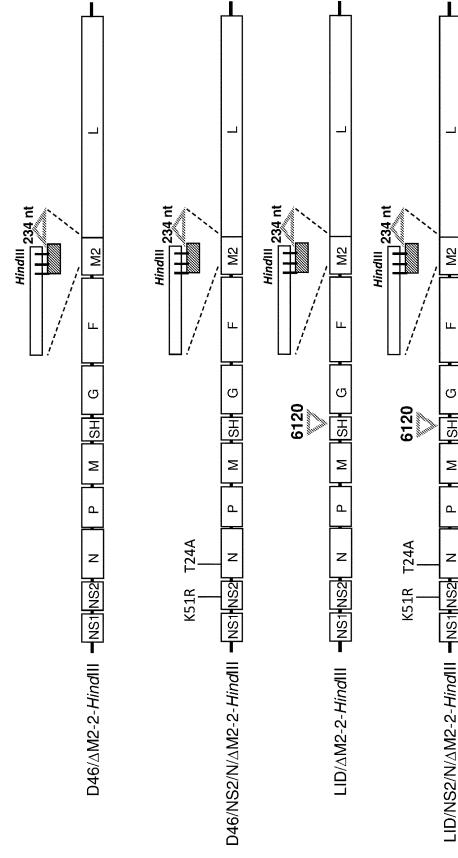
【図 1 2 B】



【図 1 2 C】



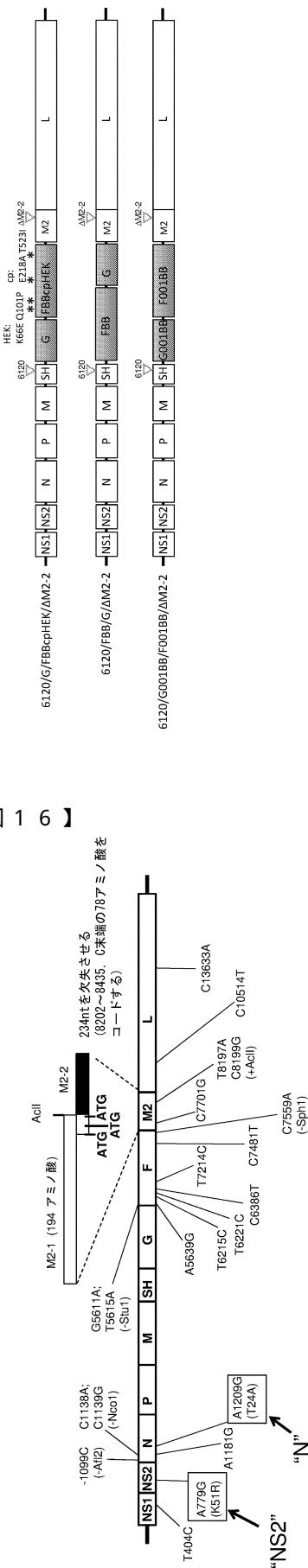
【図 1 3】



【図14A】

32°CでのP1ウイルス力価と32°Cおよび37°CでのP2ウイルス力価の比較									
ウイルス		P1 力価 32°C		P2 力価 32°C (M2-2...0.01)		P2 力価 37°C (M2-2...0.01)		P2 力価 37°C (M2-2...0.01)	
6120/G/001BB/FBB/ΔM2-2		1.7*10 ⁷		1.95*10 ⁷		2.35*10 ⁷		6120/G/001BB/FBB/ΔM2-2	
6120/FBB/G/001BB/ΔM2-2		3.25*10 ⁷		3.1*10 ⁷		3.3*10 ⁷		6120/FBB/G/001BB/ΔM2-2	
6120/G/001BB/F/ΔM2-2		6.66*10 ⁶		4.8*10 ⁷		3.65*10 ⁷		6120/G/001BB/F/ΔM2-2	
6120/G/FBB/ΔM2-2		1.8*10 ⁷		1.05*10 ⁷		1.1*10 ⁷		6120/G/FBB/ΔM2-2	
6120/G/FBBHEK/ΔM2-2		1.55*10 ⁶		7.5*10 ⁶		6.05*10 ⁶		6120/G/FBBHEK/ΔM2-2	
6120/G/FBBcpHEK/ΔM2-2		5.2*10 ⁶		1.0*10 ⁷		1.4*10 ⁷		6120/G/FBBcpHEK/ΔM2-2	
6120/FBB/G/ΔM2-2		2.5*10 ⁷		6.5*10 ⁶		6*10 ⁶		6120/FBB/G/ΔM2-2	
6120/G/001BB/F/001BB/ΔM2-2		5.0*10 ³		1.1*10 ⁷ (P3)		1*10 ⁷ (P3)		6120/G/001BB/F/001BB/ΔM2-2	
wt LiD		2.1*10 ⁷		5*10 ⁶		1.4*10 ⁷		wt LiD	
LiD/ΔM2-2		4.6*10 ⁶		2.35*10 ⁷		2*10 ⁷		LiD/ΔM2-2	

【図 1 4 B】



EFおよびG遺伝子に対する追加の変異を含む△M2-2ウイルスのウイルス収量

〔図 15〕

【図16】

【配列表】

0007079197000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

	F I
A 6 1 K	39/155 (2006.01)
A 6 1 K	35/76 (2015.01)
A 6 1 P	37/04 (2006.01)
A 6 1 P	31/14 (2006.01)
A 6 1 P	11/02 (2006.01)

— トランスファー

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(74)代理人 100102118

弁理士 春名 雅夫

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 コリンズ ピーター エル.

アメリカ合衆国 20910 メリーランド州 シルバー スプリング ウッドストック アベニュー

2921

(72)発明者 バックホルツ ウルスラ ジェイ.

アメリカ合衆国 20901 メリーランド州 シルバー スプリング デイ アベニュー 10108

(72)発明者 ルオンゴ シンディ

アメリカ合衆国 20814 メリーランド州 ベセスタ ティファニー ヒル コート 9819 アパートメント 70

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献 特表2004-534514 (JP, A)

米国特許出願公開第2004/0005542 (US, A1)

米国特許出願公開第2015/0118732 (US, A1)

J. VIROL. , 2000年, Vol. 74, No. 1, pp. 74-82

J. VIROL. , 2001年12月, Vol. 75, No. 24, pp. 12128-12140

J. VIROL. , 1998年, Vol. 72, No. 5, pp. 4467-4471

J. VIROL. , 2012年, Vol. 86, No. 19, pp. 10792-10804

CURR. TOP MICROBIOL. IMMUNOL. , 2013年, Vol. 372, pp. 259-284

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B名)

C 12 N 15/00 - 15/90

C 12 N 7/00 - 7/08

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
P u b M e d