



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 106536723 B

(45) 授权公告日 2025. 03. 25

(21) 申请号 201580037402.1
(22) 申请日 2015.07.23
(65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 106536723 A
(43) 申请公布日 2017.03.22
(30) 优先权数据
 1413020.7 2014.07.23 GB
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2017.01.09
(86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/GB2015/052124 2015.07.23
(87) PCT国际申请的公布数据
 W02016/012793 EN 2016.01.28
(73) 专利权人 皮尔布莱特研究所
 地址 英国萨里皮尔布莱特
(72) 发明人 E.比克顿 S.基普 P.布里顿
(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
 11105
 专利代理师 张文辉

(51) Int.Cl.
 C12N 7/01 (2006.01)
 A61K 39/215 (2006.01)
 A61P 31/14 (2006.01)
(56) 对比文件
 CN 103397002 A,2013.11.20
 US 7452542 B2,2008.11.18
 CN 1647823 A,2005.08.03
 J. E. Phillips等.Changes in
nonstructural protein 3 are associated
with attenuation in avian coronavirus
infectious bronchitis virus.《Virus
Genes》.2011,第44卷第63-74页.
 Vineet D. Menachery等.Attenuation and
Restoration of Severe Acute Respiratory
Syndrome Coronavirus Mutant Lacking 2'-O-
Methyltransferase Activity.《Journal of
Virology》.2014,第88卷 (第8期) ,第4251-4264
页.

审查员 于淼

权利要求书2页 说明书33页
序列表25页 附图11页

(54) 发明名称
冠状病毒

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

1. 活的减毒传染性支气管炎病毒 (IBV) M41, 其包含变体复制酶基因, 其中所述变体复制酶基因编码:

(i) 变体nsp14, 其中所述变体nsp14相对于SEQ ID NO:7的氨基酸突变为第393位的Val到Leu;

(ii) 变体nsp14, 其中所述变体nsp14相对于SEQ ID NO:7的氨基酸突变为第393位的Val到Leu, 和变体nsp15, 其中所述变体nsp15相对于SEQ ID NO:8的氨基酸突变为第183位的Leu到Ile; 或

(iii) 变体nsp10, 其中所述变体nsp10相对于SEQ ID NO:6的氨基酸突变为第85位的Pro到Leu, 变体nsp14, 其中所述变体nsp14相对于SEQ ID NO:7的氨基酸突变为第393位的Val到Leu, 变体nsp15, 其中所述变体nsp15相对于SEQ ID NO:8的氨基酸突变为第183位的Leu到Ile, 和变体nsp16, 其中所述变体nsp16相对于SEQ ID NO:9的氨基酸突变为第209位的Val到Ile。

2. 根据权利要求1所述的IBV M41, 其中所述变体复制酶基因相对于SEQ ID NO:1的核苷酸取代选自:

(i) 在核苷酸第18114位的G到C;

(ii) 在核苷酸第18114位的G到C和在核苷酸第19047位的T到A; 或

(iii) 在核苷酸第12137位的C到T, 在核苷酸第18114位的G到C, 在核苷酸第19047位的T到A, 和在核苷酸第20139位的G到A。

3. 根据权利要求1或2所述的IBV M41, 其与表达相应野生型复制酶的IBV M41相比具有降低的致病性, 使得当将所述病毒施用于含胚卵时, 其能够复制而对胚胎无致病性。

4. 权利要求1至3中任一项定义的变体复制酶基因。

5. 由权利要求4所述的变体复制酶基因编码的蛋白。

6. 包含权利要求4所述的变体复制酶基因的质粒。

7. 制造权利要求1-3中任一项所述的IBV M41的方法, 其包含以下步骤:

(i) 将权利要求6所述的质粒转染至宿主细胞;

(ii) 用重组病毒感染所述宿主细胞, 所述重组病毒包含具有复制酶基因的IBV M41株基因组;

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

(iv) 选择包含所述修饰的复制酶基因的重组病毒。

8. 根据权利要求7所述的方法, 其中所述重组病毒是痘苗病毒。

9. 根据权利要求7或8所述的方法, 其还包括以下步骤:

(v) 回收重组IBV M41, 其包含来自步骤(iv)的重组病毒的DNA中的修饰的复制酶基因。

10. 能够产生权利要求1至3中任一项所述的IBV M41的细胞。

11. 疫苗, 其包含权利要求1至3中任一项所述的IBV M41和药学上可接受的载体。

12. 根据权利要求11所述的疫苗, 其用于治疗 and/或预防受试者中的传染性支气管炎 (IB)。

13. 权利要求1至3中任一项所述的IBV M41在制备用于治疗 and/或预防受试者中传染性支气管炎 (IB) 的疫苗中的用途。

14. 根据权利要求12使用的疫苗,其中所述疫苗通过以下施用:滴眼施用,鼻内施用,饮用水施用,孵化后注射或卵内注射。

15. 根据权利要求12使用的疫苗,其中疫苗接种是卵内接种。

16. 产生权利要求11所述的疫苗的方法,其包含用权利要求1至3中任一项所述的IBV M41感染权利要求10所述的细胞的步骤。

冠状病毒

发明领域

[0001] 本发明涉及包含变体复制酶基因的减毒冠状病毒,其导致所述病毒具有降低的致病性。本发明还涉及此类冠状病毒在疫苗中预防和/或治疗疾病的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 禽传染性支气管炎病毒 (IBV), 传染性支气管炎 (IB) 的病原体, 是家禽的高度传染性 (infectious) 和接触传染性 (contagious) 病原体, 其主要在呼吸道中复制, 但也在肠、肾和输卵管的上皮细胞中复制。IBV 是网巢病毒目 (Nidovirales), 冠状病毒 (Coronaviridae) 科, 冠状病毒 (Coronavirinae) 亚科和 Gammacoronavirus 属的成员; 遗传上非常相似的冠状病毒导致火鸡、珍珠鸡和野鸡中的疾病。

[0004] IB 的临床症状包括打喷嚏、气管痉挛、流鼻涕 (nasal discharge) 和哮喘。肉型鸟具有减少的体重增加, 而产卵鸟产较少的卵和产生质量差的卵。呼吸道感染使鸡倾向于继发细菌感染, 其在雏鸡中可以是致命的。病毒还可以对输卵管造成永久性损伤, 特别是在雏鸡中, 导致减少的卵产生和质量; 和对肾脏造成永久性损伤, 有时导致肾脏疾病, 其可以是致命的。

[0005] 已经报道了 IBV 比任何其他传染病对家禽业造成更多的经济损失。虽然活的减毒疫苗和灭活疫苗通常用于 IBV 的控制, 但是由于疫苗分解 (breakdown) 或与所使用的疫苗无关的新 IBV 血清型的引入可以使得由使用疫苗所获得的保护丧失, 这对家禽业造成风险。

[0006] 此外, 为了改善接种程序的效率和成本效益, 在工业上需要开发适合用于卵内使用的疫苗。与卵内接种相关的主要挑战在于病毒必须能够在母体衍生的针对病毒的抗体的存在下复制, 而不对胚胎致病。当前 IBV 疫苗是在含胚胎中多次传代后衍生的, 这导致对鸡具有降低的致病性的病毒, 使得它们可以用作活减毒疫苗。然而, 此类病毒几乎总是对胚胎显示出增加的毒力, 并因此不能用于卵内接种, 因为它们引起降低的孵化率。在一些情况下观察到孵化率 70% 的降低。

[0007] 在含胚胎中多次传代后的减毒还具有其他缺点。其是一种经验方法, 因为病毒的减毒是随机的, 并且在每次传代病毒时都不同, 因此为了减毒的目的, 相同病毒通过不同系列的卵的传代将导致引起减毒的不同突变的集合。还存在与该过程相关的功效问题: 一些突变将影响病毒的复制, 而一些突变可能使病毒过于减毒。突变也可以发生在 S 基因中, 其也可以影响免疫原性, 使得所需的免疫应答受到影响, 并且潜在的疫苗可能不能针对所需的血清型进行保护。此外, 存在与毒性的逆转和疫苗稳定性相关的问题。

[0008] 重要的是开发新的和更安全的疫苗用于控制 IBV。因此, 需要与这些问题不相关的 IBV 疫苗, 特别是可用于卵内接种的疫苗。

[0009] 发明概述

[0010] 为了合理地减毒 IBV, 本发明人已经使用反向遗传学方法。该方法比在含胚胎中多次传代后的随机减毒更可控, 因为每个突变的位置是已知的, 并且可以推导其对病毒的作用, 即减毒的原因。

[0011] 使用它们的反向遗传学方法, 本发明人已经鉴定了导致病毒具有降低的致病性水

平的各种突变。可以降低致病性水平,使得当将病毒施用于含胚胎时,其能够复制而对胚胎无致病性。此类病毒可适用于卵内接种,这是一个显著的优点,并且对在含胚胎中多次传代后产生的减毒IBV疫苗具有改进。

[0012] 因此,在第一方面,本发明提供了活的减毒冠状病毒,其包含编码多聚蛋白(polyprotein)的变体复制酶基因,所述多聚蛋白包含在非结构蛋白(nsp)-10、nsp-14、nsp-15或nsp-16之一或多个中的突变。

[0013] 所述变体复制酶基因可以编码包含选自下列的一个或多个氨基酸突变的蛋白:

[0014] 在SEQ ID NO:6第85位的Pro到Leu,

[0015] 在SEQ ID NO:7第393位的Val到Leu;

[0016] 在SEQ ID NO:8第183位的Leu到Ile;

[0017] 在SEQ ID NO:9第209位的Val到Ile。

[0018] 所述复制酶基因可以编码包含在SEQ ID NO:6的第85位的氨基酸突变Pro到Leu的蛋白。

[0019] 所述复制酶基因可以编码包含以下氨基酸突变的蛋白:在SEQ ID NO:7第393位的Val到Leu;在SEQ ID NO:8第183位的Leu到Ile;和在SEQ ID NO:9第209位的Val到Ile。

[0020] 所述复制酶基因可以编码包含以下氨基酸突变的蛋白:在SEQ ID NO:6第85位的Pro到Leu;在SEQ ID NO:7第393位的Val到Leu;在SEQ ID NO:8第183位的Leu到Ile;和在SEQ ID NO:9第209位的Val到Ile。

[0021] 与SEQ ID NO:1所示的序列相比,所述复制酶基因可以包含选自下列的一个或多个核苷酸取代:

[0022] 在核苷酸第12137位的C到T;

[0023] 在核苷酸第18114位的G到C;

[0024] 在核苷酸第19047位的T到A;和

[0025] 在核苷酸第20139位的G到A。

[0026] 所述冠状病毒可以是感染性支气管炎病毒(IBV)。

[0027] 所述冠状病毒可以是IBV M41。

[0028] 所述冠状病毒可以包含至少一部分来自除M41之外的IBV血清型的S蛋白。

[0029] 例如,S1亚基或整个S蛋白可以来自除M41之外的IBV血清型。

[0030] 与表达相应野生型复制酶的冠状病毒相比,根据本发明第一方面的冠状病毒具有降低的致病性,使得当将病毒施用于含胚胎时,其能够复制而对胚胎无致病性。

[0031] 在第二方面,本发明提供了如与本发明第一方面相关所定义的变体复制酶基因。

[0032] 在第三方面,本发明提供了由根据本发明第二方面的变体冠状病毒复制酶基因编码的蛋白。

[0033] 在第四方面,本发明提供了包含根据本发明第二方面的复制酶基因的质粒。

[0034] 在第五方面,本发明提供用于制造根据本发明第一方面的冠状病毒的方法,其包含以下步骤:

[0035] (i) 将根据本发明第四方面的质粒转染至宿主细胞中;

[0036] (ii) 用重组病毒感染宿主细胞,该重组病毒包含具有复制酶基因的冠状病毒株基因组;

- [0037] (iii) 允许质粒中的复制酶基因序列和重组病毒基因组中的相应序列之间发生同源重组,以产生修饰的复制酶基因;和
- [0038] (iv) 选择包含所述修饰的复制酶基因的重组病毒。
- [0039] 所述重组病毒可以是痘苗病毒。
- [0040] 所述方法还可以包括以下步骤:
- [0041] (v) 回收重组冠状病毒,其包含来自步骤(iv)的重组病毒的DNA中的修饰的复制酶基因。
- [0042] 在第六方面,本发明提供了能够产生根据本发明第一方面的冠状病毒的细胞。
- [0043] 在第七方面,本发明提供了包含根据本发明第一方面的冠状病毒和药学上可接受的载体的疫苗。
- [0044] 在第八方面,本发明提供了用于治疗和/或预防受试者中疾病的方法,其包含向所述受试者施用根据本发明第七方面的疫苗的步骤。
- [0045] 本发明的另外方面提供:
- [0046] • 根据本发明第七方面的疫苗,其用于治疗 and/或受试者中的疾病。
- [0047] • 根据本发明第一方面的冠状病毒在制备用于治疗 and/或预防受试者中疾病的疫苗中的用途。
- [0048] 所述疾病可以是传染性支气管炎 (IB)。
- [0049] 疫苗的施用方法可以选自由以下组成的组:滴眼施用,鼻内施用,饮用水施用(drinking water administration),孵化后注射和卵内注射(in ovo injection)。
- [0050] 接种可以通过卵内接种。
- [0051] 本发明还提供了用于生产根据本发明第七方面的疫苗的方法,其包含用根据本发明第一方面的冠状病毒感染根据本发明第六方面的细胞的步骤。

附图说明

- [0052] 图1-M41-R-6和M41-R-12与M41-CK (M41EP4) 相比在CK细胞上的生长动力学。
- [0053] 图2-相比于M41-CK (M41EP4) 和Beau-R, 与M41-R-6和M41-R-12相关的临床症状,snicking和哮喘(wheezing) (柱从左至右显示每个时间点的模拟物、Beau-R、M41-R 6、M41-R 12、M41-CK EP4)。
- [0054] 图3-气管环中病毒的纤毛活动,所述气管环从感染的雏鸡所取的气管分离。100%的纤毛活动表明没有病毒的影响;无致病性,0%活动表示纤毛活动的完全丧失,完全纤毛停滞,表明病毒是致病性的 (柱从左至右显示每个时间点的模拟物、Beau-R、M41-R 6、M41-R 12、M41-CK EP4)。
- [0055] 图4-相比于M41-R-12和M41-CK (M41EP5), 与M41R-nsp10rep和M41R-nsp14, 15, 16rep相关的临床症状,snicking (柱从左至右显示每个时间点的模拟物、M41-R12;M41R-nsp10rep;M41R-nsp14, 15, 16rep和M41-CK EP5)。
- [0056] 图5-相比于M41-R-12和M41-CK, 气管环中M41R-nsp10rep和M41R-nsp14, 15, 16rep的纤毛活动,所述气管环从感染的雏鸡所取的气管分离 (柱从左至右显示每个时间点的模拟物;M41-R12;M41R-nsp10rep;M41R-nsp14, 15, 16rep和M41-CK EP5)。
- [0057] 图6-相比于M41-CK, 与M41R-nsp10, 15rep, M41R-nsp10, 14, 15rep, M41R-nsp10,

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

[0058] 图7-相比于M41-CK,与M41R-nsp10,15rep,M41R-nsp10,14,15rep,M41R-nsp10,14,16rep,M41R-nsp10,15,16rep和M41-K相关的临床症状,哮喘(wheezing) (柱从左至右显示每个时间点的模拟物、M41R-nsp10,15rep1;M41R-nsp10,14,16rep4;M41R-nsp10,15,16rep8;M41R-nsp10,14,15rep10;M41-K6和M41-CK EP4)。

[0059] 图8-相比于M41-CK,气管环中M41R-nsp10,15rep,M41R-nsp10,14,15rep,M41R-nsp10,14,16rep,M41R-nsp10,15,16rep和M41-K的纤毛活动,所述气管环从感染的雏鸡所取的气管分离 (柱从左至右显示每个时间点的模拟物、M41R-nsp10,15rep1;M41R-nsp10,14,16rep4;M41R-nsp10,15,16rep8;M41R-nsp10,14,15rep10;M41-K6和M41-CK EP4)。

[0060] 图9-与M41-CK相比,rIBVs在CK细胞上的生长动力学。图9A显示M41-R和M41-K的结果。图9B显示M41-nsp10rep;M41R-nsp14,15,16rep;M41R-nsp10,15rep;M41R-nsp10,15,16rep;M41R-nsp10,14,15rep;和M41R-nsp10,14,16的结果。

[0061] 图10-突变的nsp10,nsp14,nsp15和nsp16序列中的氨基酸突变的位置。

[0062] 图11-相比于M41-CK,rIBV M41R-nsp 10,14rep和rIBV M41R-nsp 10,16rep的A) Snicking;B) 呼吸道症状 (哮喘和罗音 (rales) 组合) 和C) 纤毛活动。

[0063] 发明详述

[0064] 本发明提供了包含变体复制酶基因的冠状病毒,所述变体复制酶基因当在冠状病毒中表达时,,其导致该病毒与包含野生型复制酶基因的相应冠状病毒相比具有降低的致病性。

[0065] 冠状病毒

[0066] Gammacoronavirus是属于冠状病毒科的动物病毒的一个属。冠状病毒是具有正义单链RNA基因组和螺旋对称性的包膜病毒。

[0067] 冠状病毒的基因组尺寸范围为从约27至32千碱基,其是任何已知RNA病毒的最长尺寸。

[0068] 冠状病毒主要感染哺乳动物和鸟类的上呼吸道或胃肠道。五至六种目前已知的冠状病毒株感染人类。最广为人知的人冠状病毒SARS-CoV,其引起严重的急性呼吸综合征(SARS),具有独特的发病机制,因为它引起上呼吸道和下呼吸道两者的感染,且还可导致胃肠炎。中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)也引起人类的下呼吸道感染。冠状病毒被认为在人类成人中引起显著百分比的所有常见感冒。

[0069] 冠状病毒还在家畜动物和家养宠物中引起一系列疾病,其中一些可能是严重的,并且对农业产业构成威胁。经济上意义重大的家畜动物冠状病毒包括传染性支气管炎病毒(IBV),其主要在鸡中引起呼吸道疾病并严重影响全世界的家禽业;猪冠状病毒(可传染的胃肠炎,TGE)和牛冠状病毒,它们都导致年幼动物中的腹泻。猫冠状病毒有两种形式,猫肠道冠状病毒是一种具有次要临床意义的病原体,但这种病毒的自发突变可导致猫传染性腹膜炎(FIP),一种与高死亡率相关的疾病。

[0070] 还有两种类型的犬冠状病毒(CCoV),其中一种引起轻微的胃肠道疾病,且另一种已发现引起呼吸道疾病。小鼠肝炎病毒(MHV)是导致具有高死亡率的流行性鼠类疾病的冠

状病毒,特别是在实验室小鼠的群落中。

[0071] 冠状病毒可以分为四组,如下所示:

[0072] Alpha

[0073] ●犬冠状病毒 (CCoV)

[0074] ●猫冠状病毒 (FeCoV)

[0075] ●人冠状病毒229E (HCoV-229E)

[0076] ●猪流行性腹泻病毒 (PEDV)

[0077] ●可传染的胃肠炎病毒 (TGEV)

[0078] ●人冠状病毒NL63 (NL或New Haven)

[0079] Beta

[0080] ●牛冠状病毒 (BCoV)

[0081] ●犬呼吸道冠状病毒 (CRCoV) -常见于东南亚和密克罗尼西亚

[0082] ●人冠状病毒OC43 (HCoV-OC43)

[0083] ●小鼠肝炎病毒 (MHV)

[0084] ●猪血凝性脑脊髓炎病毒 (HEV)

[0085] ●大鼠冠状病毒 (RCV)。大鼠冠状病毒在东澳大利亚相当流行,在2008年3月/4月,它在原生和野生啮齿动物群落中发现。

[0086] ●(还没有通用名称) (HCoV-HKU1)

[0087] 严重急性呼吸综合征冠状病毒 (SARS-CoV)

[0088] ●中东呼吸综合征冠状病毒 (MERS-CoV)

[0089] Gamma

[0090] ●传染性支气管炎病毒 (IBV)

[0091] ●火鸡冠状病毒 (Bluecomb病病毒)

[0092] ●野鸡冠状病毒

[0093] ●珍珠鸡冠状病毒

[0094] Delta

[0095] ●Bulbul冠状病毒 (BuCoV)

[0096] ●Thrush冠状病毒 (ThCoV)

[0097] ●Munia冠状病毒 (MuCoV)

[0098] ●猪冠状病毒 (PorCov) HKU15

[0099] 本发明的冠状病毒的变体复制酶基因可以衍生自alphacoronavirus例如TGEV; betacoronavirus例如MHV;或gammacoronavirus例如IBV。

[0100] 如本文所使用的,术语“衍生自”意指包含与相关冠状病毒的野生型复制酶基因基本相同的核苷酸序列的复制酶基因。例如,本发明的变体复制酶基因可以具有与野生型复制酶序列高达80%、85%、90%、95%、98%或99%的同一性。所述变体冠状病毒复制酶基因编码蛋白,当与非结构蛋白的野生型序列相比时,该蛋白包含在非结构蛋白 (nsp) -10、nsp-14、nsp-15或nsp-16之一或多个中的突变

[0101] IBV

[0102] 禽传染性支气管炎 (IB) 是鸡的急性和高接触传染性呼吸道疾病,其引起重大的经

济损失。该疾病的特征在于呼吸症状,包括喘气、咳嗽、打喷嚏、气管罗音(rales)和流鼻涕(nasal discharge)。在年幼的鸡中,可能发生严重的呼吸窘迫。在产卵者(layers)中,呼吸窘迫、肾炎、产卵率下降,以及内部卵质量和卵壳质量的损失是常见的。

[0103] 在肉鸡中,咳嗽和嘎嘎声是常见的临床症状,在房舍的所有鸟类中迅速蔓延。未接种鸡群的发病率为100%。死亡率根据年龄,病毒株和继发性感染而变化,但在未接种的鸡群中可高达60%。

[0104] 鉴定的第一种IBV血清型是马萨诸塞型(Massachusetts),但在美国,除了最初鉴定的马萨诸塞型之外,目前还流行有几种血清型,包括阿肯色型(Arkansas)和特拉华型(Delaware)。

[0105] IBV株Beaudette是在鸡胚中至少传代150次后所衍生的。IBV Beaudette不再对孵化的鸡有致病性,但快速杀死胚胎。

[0106] H120是市售的活的减毒IBV马萨诸塞血清型疫苗株,通过在含胚鸡卵中大约120代来减毒。H52是另一种马萨诸塞型疫苗,并且代表在H120发育期间更早和稍微更致病的传代病毒(第52代)。基于H120的疫苗是常用的。

[0107] IB QX是IBV的毒性野外分离株。它有时被称为“中国QX”,因为它最初是在20世纪90年代中期于中国青岛地区疾病的爆发后被分离。从那时起,病毒已经向欧洲蔓延。从2004年起,在西欧部分地区,主要是在荷兰,但也有来自德国,法国,比利时,丹麦和英国的报告,严重的卵生产问题被确定为具有非常相似的病毒,

[0108] 从荷兰病例分离的病毒由位于Deventer的荷兰研究所鉴定为新的病毒株,他们称之为D388。与中国型的联系来自于进一步的测试,其显示所述病毒具有与中国QX病毒99%相似。现已开发出活的减毒QX-样IBV疫苗病毒株。

[0109] IBV是在细胞质中复制的包膜病毒,并且包含非分段的单链正义RNA基因组。IBV具有27.6kb的RNA基因组,并且像所有冠状病毒含有四种与基因组RNA相互作用的结构蛋白;刺突糖蛋白(spikeglycoprotein) (S)、小膜蛋白(smallmembraneprotein) (E),膜整合蛋白(M)和核衣壳蛋白(N)。

[0110] 基因组以下述方式组织:5'UTR-聚合酶(复制酶)基因-结构蛋白基因(S-E-M-N)-UTR3';其中UTR是非翻译区(IBV中每个~500个核苷酸)。

[0111] 脂质包膜含有三种膜蛋白:S、M和E。IBVS蛋白是I型糖蛋白,其在内质网中寡聚化并且组装成经由跨膜结构域插入病毒膜中的同型三聚体,并通过非共价相互作用与M蛋白的相关联。在掺入冠状病毒颗粒后,S蛋白负责结合靶细胞受体以及病毒和细胞膜的融合。S糖蛋白由四个结构域组成:在合成期间被切割的信号序列;存在于病毒粒子颗粒外部的胞外域;负责将所述S蛋白锚定到所述病毒粒子颗粒的脂质双层中的跨膜区;和细胞质尾。

[0112] 所有冠状病毒还编码一组未知功能的辅助蛋白质基因,其对于体外复制不是必需的,但可以在发病机理中起作用。IBV编码两个辅助基因,基因3和基因5,两者分别表达两种辅助蛋白3a、3b和5a、5b。

[0113] 本发明的冠状病毒的变体复制酶基因可以衍生自IBV。例如,该IBV可以是IBVBeaudette、H120、H52、IBQX、D388或M41。

[0114] IBV可以是IBVM41。M41是在1941年于美国分离的原型马萨诸塞血清型。它是在世界各地的许多实验室中作为致病性实验室病毒株使用的分离株,并且可以从ATCC (VR-21™)

获得。减毒变体也被几个疫苗生产者用作针对引起本领域问题的马萨诸塞血清型的IBV疫苗。本发明人选择使用该病毒株,因为他们已经对该病毒工作了多年,并且因为完整的病毒基因组的序列是可获得的。本发明人使用的M41分离株,M41-CK被适应以在原代鸡肾(CK)细胞中生长,并因此被认为适于作为传染性病毒从完整基因组的cDNA中恢复。它是病原性IBV的代表,并因此可以分析导致致病性丧失或降低的突变。

[0115] IBV M41-CK的基因组序列作为SEQ ID NO:1提供。

[0116] SEQ ID NO:1 IBV M41-CK序列

[0117] ACTTAAGATAGATATTAATATATATCTATCACACTAGCCTTGCGCTAGATTTCCAACCTAACAAAACGG
ACTTAAATACCTACAGCTGGTCTCATAGGTGTTCCATTGCAGTGCACCTTAGTGCCCTGGATGGCACCTGGCCACC
TGTCAGGTTTTTGTATTAAAAATCTTATTGTTGCTGGTATCACTGCTTGTGTTGCCGTGTCTCACTTTATACATCCG
TTGCTTGGGCTACCTAGTATCCAGCGTCTACGGGCGCCGTGGCTGGTTCGAGTGCGAAGAACCTCTGGTTCATCTA
GCGGTAGGCGGGTGTGTGGAAGTAGCACTTCAGACGTACCGGTTCTGTTGTGTGAAATACGGGGTCACCTCCCCCA
CATACCTCTAAGGGCTTTTGTAGCCTAGCGTTGGGCTACGTTCTCGCATAAGGTCGGCTATACGACGTTTGTAGGGGG
TAGTGCCAAACAACCCCTGAGGTGACAGGTTCTGGTGGTGTGTTAGTGAGCAGACATACAATAGACAGTGACAACATG
GCTTCAAGCCTAAAACAGGGAGTATCTCCAAACTAAGGGATGTCATTCTTGTATCCAAAGACATTCTGAACAACCT
TTGTGACGCTTTGTTTTTCTATACGTACACAACCCTAAGGATTACGCTGATGCTTTTGCAGTTAGGCAGAAGTTTG
ATCGTAATCTGCAGACTGGGAAACAGTTCAAATTTGAACTGTGTGTGGTCTCTTCCTCTTGAAGGGAGTTGACAAA
ATAACACCTGGCGTCCCAGCAAAAGTCTTAAAGCCACTTCTAAGTTGGCAGATTTAGAAGACATCTTTGGTGTCTC
TCCCTTTGCAAGAAAATATCGTGAACCTTTGAAGACAGCATGCCAGTGGTCTCTTACTGTAGAAACACTGGATGCTC
GTGCACAACTCTTGATGAAATTTTTGACCCTACTGAAATACTTTGGCTTCAGGTGGCAGCAAAAATCCAAGTTTCG
GCTATGGCGATGCGCAGGCTTGTGAGAGAAGTAACTGCAAAAGTCATGGATGCTTTGGGCTCAAATATGAGTGCTCT
TTTCCAGATTTTTAAACAACAAATAGTCAGAATTTTTCAAAAAGCGCTGGCTATTTTTGAGAATGTGAGTGAATTAC
CACAGCGTATTGCAGCACTTAAGATGGCTTTTGCTAAGTGTGCCAAGTCCATTACTGTTGTGGTTATGGAGAGGACT
CTAGTTGTTAGAGAGTTCGCAGGAACCTGTCTTGCAAGCATTAAATGGTGTGTTGCAAAATTCTTTGAAGAACTCCC
AAATGGTTTCATGGGTGCTAAAAATTTTCACTACACTTGCCTTCTTTAGGGAGGCTGCAGTGAAAATTGTGGATAACA
TACCAAATGCACCGAGAGGCACTAAAGGGTTTGAAGTCGTTGGTAATGCCAAAGGTACACAAGTTGTTGTGCGTGGC
ATGCGAAATGACTTAACACTGCTTGACCAAAAAGCTGAAATTCCTGTGGAGTCAGAAGGTTGGTCTGCAATTTTGGG
TGGACATCTTTGCTATGTCTTTAAGAGTGGTGTATCGCTTTTACGCGGCACCTCTTTCAGGAAATTTTGCAATTGCATG
ATGTGCATTGTTGTGAGCGTGTGTCTGTCTTTCTGATGGTGTAAACACCGGAGATAAATGATGGACTTATTCTTGCA
GCAATCTACTCTTCTTTTAGTGTCGCAGAACTTGTGGCAGCCATTAAAAGGGGTGAACCATTTAAGTTTCTGGGTCA
TAAATTTGTGTATGCAAAGGATGCAGCAGTTTCTTTTACATTAGCGAAGGCTGCTACTATTGCAGATGTTTTGAAGC
TGTTTTCAATCAGCGCGTGTGAAAGTAGAAGATGTTTGGTCTTCACTTACTGAAAAGTCTTTTGAATTCTGGAGGCTT
GCATATGGAAGGTGCGTAATCTCGAAGAATTTGTTAAGACTTGTGTTTTGTAAGGCTCAAATGGCGATTGTGATTTT
AGCGACAGTGCTTGGAGAGGGCATTTGGCATCTGTTTCGCAAGTCATCTATAAAGTAGGTGGTCTTTTTACTAAAG
TTGTTGACTTTTGTGAAAAATATTGAAAGGTTTTTGTGCACAGTTGAAAAGAGCTAAGCTCATTGTCACTGAAACC
CTCTGTGTTTTGAAAGGAGTTGCACAGCATTGTTTTCAACTATTGCTGGATGCAATACAGTTTATGTATAAAAGTTT
TAAGAAGTGTGCACTTGGTAGAATCCATGGAGACTTGCTCTTCTGGAAGGAGGTGTGCACAAAATTATTCAAGAGG
GCGATGAAATTTGGTTTGACGCCATTGATAGTATTGATGTTGAAGATCTGGGTGTTGTTCAAGAAAAATTGATTGAT
TTTGATGTTTGTGATAATGTGACACTTCCAGAGAACCAACCCGGTCATATGGTTCAAATCGAGGATGACGGAAAGAA

CTACATGTTCTTCCGCTTCAAAAAGGATGAGAACATTTATTATACACCAATGTCACAGCTTGGTGCTATTAATGTGG
TTTGCAAAGCAGGCGGTAAAACTGTCACCTTTGGAGAACTACTGTGCAAGAAATACCACCACCTGATGTTGTGTTT
ATTAAGGTTAGCATTGAGTGTGTGGTGAACCATGGAATACAATCTTCAAAAAGGCTTATAAGGAGCCCATTGAAGT
AGAGACAGACCTCACAGTTGAACAATTGCTCTCTGTGGTCTATGAGAAAATGTGTGATGATCTCAAGCTGTTTCCGG
AGGCTCCAGAACCACCACCATTTGAGAATGTCACACTTGTGATAAGAATGGTAAAGATTGGATTGCATAAAATCA
TGCCATCTGATCTATCGTGATTATGAGAGCGATGATGACATCGAGGAAGAAGATGCAGAAGAATGTGACACGGATTC
AGGTGATGCTGAGGAGTGTGACACTAATTCAGAATGTGAAGAAGAAGATGAGGATACTAAAGTGTGGCTCTTATAC
AAGACCCGGCAAGTAACAAATATCCTCTGCCTCTTGATGATGATTATAGCGTCTACAATGGATGTATTGTTTCATAAG
GACGCTCTCGATGTTGTGAATTTACCATCTGGTGAAGAAACCTTTGTTGTCAATAACTGCTTTGAAGGGGCTGTAA
AGCTCTTCCGCAGAAAGTTATTGATGTTCTAGGTGACTGGGGTGAGGCTGTTGATGCGCAAGAACAATTGTGTCAAC
AAGAATCAACTCGGGTCATATCTGAGAAATCAGTTGAGGGTTTTACTGGTAGTTGTGATGCAATGGCTGAACAAGCT
ATTGTTGAAGAGCAGGAAATAGTACCTGTTGTTGAACAAAGTCAGGATGTAGTTGTTTTTACACCTGCAGACCTAGA
AGTTGTTAAAGAAACAGCAGAAGAGGTTGATGAGTTTATTCTCATTTCTGCTGTCCCTAAAGAAGAAGTTGTGTCTC
AGGAGAAAGAGGAGCCACAGGTTGAGCAAGAGCCTACCCTAGTTGTTAAAGCACAACGTGAGAAGAAGGCTAAAAAG
TTCAAAGTTAAACCAGCTACATGTGAAAAACCCAAATTTTTGGAGTACAAAACATGTGTGGGTGATTTGGCTGTTGT
AATTGCCAAAGCATTGGATGAGTTTAAAGAGTTCTGCATTGTAAACGCTGCAAATGAGCACATGTCGCATGGTGGTG
GCGTTGCAAAGGCAATTGCAGACTTTTGTGGACCGGACTTTGTTGAATATTGCGCGGACTATGTTAAGAAACATGGT
CCACAGCAAAAACCTTGTACACCTTCATTTGTTAAAGGCATTCAATGTGTGAATAATGTTGTAGGACCTCGCCATGG
AGACAGCAACTTGCGTGAGAAGCTTGTGCTGCTTACAAGAGTGTCTTGTAGGTGGAGTGGTTAACTATGTTGTGC
CAGTTCTCTCATCAGGGATTTTTGGTGATGTTTTAAAAATATCAATAGATGCTATGCGCGAAGCTTTTAAAGGTTGT
GCCATACGCGTTCTTTTATTTTCTCTGAGTCAAGAACACATCGATTATTTGATGCAACTTGTAAGCAGAAGACAAT
TTATCTTACGGAGGATGGTGTTAAATACCGCTCTGTTGTTTTAAACCTGGTGATTCTTTGGGTCAATTTGGACAGG
TTTTTGCAAAGAAATAAGGTAGTCTTTTCGGCTGATGATGTTGAGGATAAAGAAATCCTCTTTATACCCACAACCTGAC
AAGACTATTCTTGAATATTATGGTTTAGATGCGCAAAAGTATGTAACATATTTGCAAACGCTTGCGCAGAAATGGGA
TGTTCAATATAGAGACAATTTTGTTATATTAGAGTGGCGTGACGGAAATTGCTGGATTAGTTCAGCAATAGTTCTCC
TTCAAGCTGCTAAATTAGATTTAAAGGTTTTCTTGCAGAAGCATGGGCTAAACTGTTGGGTGGAGATCCTACAGAC
TTTGTTGCCTGGTGTTATGCAAGTTGCAATGCTAAAGTAGGTGATTTTTTCAAGATGCTAATTGGCTTTTGGCCAATTT
AGCAGAACATTTTGACGCAGATTACACAAATGCACTTCTTAAAGAAGTGTGTGTCGTGCAATTGTGGTGTTAAGAGTT
ATGAACTTAGGGGTCTTGAAGCCTGTATTACGCCAGTTCGAGCACCTAATCTTCTACATTTTAAACGCAATATTCA
AATTGCCCAACCTGTGGTGCAAGTAGTACGGATGAAGTAATAGAAGCTTCATTACCGTACTTATTGCTTTTTTGCTAC
TGATGGTCTCTGCTACAGTTGATTGTGATGAAAAATGCTGTAGGGACTGTTGTTTTTATTGGCTCTACTAATAGTGGCC
ATTGTTATACACAAGCCGATGGTAAGGCTTTTGACAATCTTGCTAAGGATAGAAAATTTGGAAGGAAGTCGCCTTAC
ATTACAGCAATGTATACACGTTTTTCTCTTAGGAGTGAAAAATCCCCTACTTGTTGTTGAACATAGTAAGGGTAAAGC
TAAAGTAGTAAAGAAGATGTTTCTAACCTTGCTACTAGTTCTAAAGCCAGTTTTGACGATCTTACTGACTTTGAAC
AGTGGTATGATAGCAACATCTATGAGAGTCTTAAAGTGCAGGAGACACCTGATAATCTTGATGAATATGTGTCATTT
ACGACAAAGGAAGATTCTAAGTTGCCACTGACACTTAAAGTTAGAGGTATCAAATCAGTTGTTGACTTTAGGTCTAA
GGATGGTTTTACTTATAAGTTAACACCTGATACTGATGAAAAATCAAAAACACCAGTCTACTACCCAGTCTTGGATT
CTATTAGTCTTAGGGCAATATGGGTTGAAGGCAGTGCTAATTTTGTGTTGGGCATCCAAATTATTATAGTAAGTCT
CTCCGAATTCCCACGTTTTTGGGAAAAATGCCGAGAGCTTTGTTAAATGGGTATAAAATTGATGGTGTAACCTATGGG

CCTTTGGCGTGCAGAACACCTTAATAAACCTAATTTGGAGAGAATTTTTAACATTGCTAAGAAAGCTATTGTTGGAT
CTAGTGTTGTTACTACGCAGTGTGGTAAAATACTAGTTAAAGCAGCTACATACGTTGCCGATAAAGTAGGTGATGGT
GTAGTTCGCAATATTACAGATAGAATTAAGGGTCTTTGTGGATTCACACGTGGCCATTTTGAAAAGAAAATGTCCCT
ACAATTTCTAAAGACACTTGTGTTCTTTTTCTTTTATTTCTTAAAGGCTAGTGCTAAGAGTTTAGTTTCTAGCTATA
AGATTGTGTTATGTAAGGTGGTGTGTTGCTACCTTACTTATAGTGTGGTTTATATACACAAGTAATCCAGTAGTGTTT
ACTGGAATACGTGTGCTAGACTTCCTATTTGAAGGTTCTTTATGTGGTCCTTATAATGACTACGGTAAAGATTCTTT
TGATGTGTTACGCTATTGTGCAGGTGATTTTACTTGTGCGTGTGTGTTTACATGATAGAGATTCACCTTCATCTGTACA
AACATGCTTATAGCGTAGAACAATTTATAAGGATGCAGCTTCTGGCATTAACTTTAATTGGAATTGGCTTTATTTG
GTCTTTCTAATATTATTTGTTAAGCCAGTGGCAGGTTTTGTTATTATTTGTTATTGTGTTAAGTATTTGGTATTGAG
TTCAACTGTGTTGCAAACTGGTGTAAGTTTTCTAGATTGGTTTGTAACAGTTTTTACCCATTTTAATTTTATGG
GAGCGGGATTTTATTTCTGGCTCTTTTACAAGATATACGTACAAGTGCATCATATATTGTACTGTAAGGATGTAACA
TGTGAAGTGTGCAAGAGAGTTGCACGCAGCAACAGGCAAGAGGTTAGCGTTGTAGTTGGTGGACGCAAGCAAATAGT
GCATGTTTACACTAATTCTGGCTATAACTTTTGTAAGAGACATAATTGGTATTGTAGAAATTGTGATGATTATGGTC
ACCAAAATACATTTATGTCCCCTGAAGTTGCTGGCGAGCTTTCTGAAAAGCTTAAGCGCCATGTTAAACCTACAGCA
TATGCTTACCACGTTGTGTATGAGGCATGCGTGGTTGATGATTTTGTTAATTTAAAATATAAGGCTGCAATTCCTGG
TAAGGATAATGCATCTTCTGCTGTTAAGTGTTTCAGTGTTACAGATTTTTTAAAGAAAGCTGTTTTTCTTAAGGAGG
CATTGAAATGTGAACAAATATCTAATGATGGTTTTATAGTGTGAATACACAGAGTGCGCATGCACTAGAGGAAGCA
AAGAATGCAGCCGTCTATTATGCGCAATATCTGTGTAAGCCAATACTTATACTTGACCAGGCACTTTATGAGCAATT
AATAGTAGAGCCTGTGTCTAAGAGTGTTATAGATAAAGTGTTAGCATTGTCTAATATAATATCTGTAGATACTG
CAGCTTTAAATTATAAGGCAGGCACACTTCGTGATGCTCTGCTTTCTATTACTAAAGACGAAGAAGCCGTAGATATG
GCTATCTTCTGCCACAATCATGAAGTGGAATACACTGGTGACGGTTTTACTAATGTGATACCGTCATATGGTATGGA
CACTGATAAGTTGACACCTCGTGATAGAGGGTTTTTGATAAATGCAGATGCTTCTATTGCTAATTTAAGAGTCAAAA
ATGCTCCTCCGGTAGTATGGAAGTTTTCTGATCTTATTAATTTGTCTGACAGTTGCCTTAAATATTTAATTTAGCT
ACTGTCAAGTCAGGAGGTCGTTTCTTTATAACAAAGTCTGGTGCTAAACAAGTTATTTCTTGTCATACCCAGAACT
GTTGGTAGAGAAAAAGGCAGGTGGTGTATTAATAACACTTTTAAATGGTTTATGAGTTGTTTTAAATGGCTTTTTG
TCTTTTATATACTTTTTACAGCATGTTGTTTGGGTTACTACTATATGGAGATGAATAAAAGTTTTGTTACCCCATG
TATGATGTAACTCCACACTGCATGTTGAAGGGTTCAAAGTTATAGACAAAGGTGTTATTAGAGAGATTGTGTCAGA
AGATAATTGTTTCTCTAATAAGTTTGTTAATTTGACGCCTTTTGGGGTAAATCATATGAAAATAATAAAACTGTC
CAATTGTTACAGTTGTTATAGATGGTGACGGGACAGTAGCTGTTGGTGTTCCTGGTTTTGTATCATGGGTTATGGAT
GGTGTATGTTTGTGCATATGACACAGACTGATCGTAGACCTTGGTACATTCCTACCTGGTTTAATAGAGAAATTGT
TGGTTACACTCAGGATTCAATTATCACTGAGGGTAGTTTTTATACATCTATAGCATTATTTTCTGCTAGATGTTTAT
ATTTAACAGCCAGCAATACACCTCAATTGTATTGTTTAAATGGCGACAATGATGCACCTGGAGCCTTACCATTTGGT
AGTATTATTCCTCATAGAGTATACTTCCAACCTAATGGTGTTAGGCTTATAGTTCCACAACAAATACTGCATACACC
CTACATAGTGAAGTTTGTTTCAGACAGCTATTGTAGAGGTAGTGATGTGAGTATACTAAACCAGGTTACTGTGTGT
CACTAGACTCCCAATGGGTTTTGTTAATGATGAATACATTAGTAAACCTGGCGTTTTCTGTGGTTCTACTGTTAGA
GAACTTATGTTTAAATATGGTTAGTACATTCTTTACTGGTGTCAACCCTAATATTTATATTCAGCTAGCAACTATGTT
TTTAATACTAGTTGTTATTGTGTTAATTTTTGCAATGGTTATAAAGTTTCAAGGTGTTTTTAAAGCTTATGCGACCA
TTGTGTTTACAATAATGTTAGTTGGGTTATTAATGCATTTGTTTTGTGTGTACATAGTTATAATAGTGTTTTAGCT
GTTATATTATTAGTACTCTATTGCTATGCATCATTGGTTACAAGTCGCAATACTGCTATAATAATGCATTGTTGGCT

TGTTTTTACCTTTGGTTTAATAGTACCCACATGGTTGGCTTGTGCTATCTGGGATTTATTCTTTATATGTACACAC
CGTTGGTTTTCTGGTGTACGGTACTACTAAAAATACTCGTAAGTTGTATGATGGCAACGAGTTTGTGGTAATTAT
GACCTTGCTGCGAAGAGCACTTTTGTATTTCGTGGTACTGAATTTGTAAAGCTTACGAATGAGATAGGTGATAAATT
TGAAGCCTATCTTTCTGCGTATGCTAGACTTAAATACTATTTCAGGCACTGGTAGTGAGCAAGATTACTTGCAAGCTT
GTCGTGCATGGTTAGCTTATGCTTTGGACCAATATAGAAATAGTGGTGTGAGGTTGTTTATACCCACCGCGTTAC
TCTATTGGTGTAGTAGACTACACGCTGGTTTTAAAAAACTAGTTTCTCCTAGTAGTGCTGTTGAGAAGTGCATTGT
TAGTGTCTCTTATAGAGGCAATAATCTTAATGGACTGTGGCTGGGTGATTCTATTTACTGCCCACGCCATGTGTTAG
GTAAGTTTAGTGGTGACCAGTGGGGTGACGTACTAAACCTTGCTAATAATCATGAGTTTGAAGTTGTAACCAAAAT
GGTGTACTTTGAATGTTGTCAGCAGGCGGCTTAAAGGAGCAGTTTTAATTTTACAACTGCAGTTGCCAATGCTGA
AACTCCTAAGTATAAGTTTGTAAAGCTAATTGTGGTGATAGTTTCACTATAGCTTGTCTTATGGTGGTACAGTTA
TAGGACTTTACCCTGTCATATGCGTTCTAATGGTACTATTAGAGCATCTTTCCTAGCAGGAGCCTGTGGCTCAGTT
GGTTTTAATATAGAAAAGGGTGTAGTTAATTTCTTTTATATGCACCATCTTGAGTTACCTAATGCATTACACACTGG
AACTGACCTAATGGGTGAGTTTTATGGTGGTTATGTAGATGAAGAGTTGCGCAAAGAGTGCCACCAGATAATCTAG
TTACTAACAATATTGTAGCATGGCTCTATGCGGCAATTATTAGTGTTAAAGAAAGTAGTTTTTACAACTAAATGG
TTGGAGAGTACTACTGTTTCTATTGAAGATTACAATAGGTGGGCTAGTGATAATGGTTTTACTCCATTTTCCACTAG
TACTGCTATTACTAAATTAAGTGCTATAACTGGGGTTGATGTTTGTAACCTCCTTCGCACTATTATGGTAAAAAGTG
CTCAATGGGGTAGTGATCCCATTTTAGGACAATATAATTTGAAGACGAATTGACACCAGAATCTGTATTTAATCAA
GTTGGTGGTGTAGGTTACAGTCTTCTTTGTAAAGAAAAGCTACATCTTGGTTTTGGAGTAGATGTGTATTAGCTTG
CTTCTTGTGTGTGTGCTATTGTCTTATTACGGCAGTGCCACTTAAGTTTTATGTACATGCAGCTGTTATTT
TGTTGATGGCTGTGCTCTTTATTTCTTTTACTGTAAACATGTTATGGCATACATGGACACTTTCCTATTGCCTACA
TTGATTACAGTTATTATTGGAGTTTGTGCTGAAGTCCCTTTCATATACAATACTCTAATTAGTCAAGTTGTTATTTT
CTTAAGCCAATGGTATGATCCTGTAGTCTTTGATACTATGGTACCATGGATGTTATTGCCATTAGTGTTGTACACTG
CTTTTAAGTGTGTACAAGGCTGCTATATGAATCTTTCAATACTTCTTTGTTAATGCTGTATCAGTTTATGAAGTTA
GGTTTTGTATTATTACACCTCTTCAAACACTCTTACTGCATATACAGAAGGTAATTGGGAGTTATTCTTTGAGTTGGT
TCACACTATTGTGTTGGCTAATGTTAGTAGTAATTCCTTAATTGGTTAATTGTTTTAAGTGTGCTAAGTGGATTT
TATATTATTGCAATGCAACATACTTTAATAATTATGTGTTAATGGCAGTCATGGTTAATGGCATAGGCTGGCTTTGC
ACCTGTTACTTTGGATTGTATTGGTGGGTTAATAAAGTTTTTGGTTTAACTTAGGTAAATACAATTTTAAAGTTTC
AGTAGATCAATATAGGTATATGTGTTTGCATAAGGTAAATCCACCTAAACTGTGTGGGAGGTCTTTACTACAAATA
TACTTATACAAGGAATTGGAGGCGATCGTGTGTTGCCTATAGCTACAGTGCAATCTAAATTGAGTGATGTAAAGTGT
ACAAGTGTGTTTTAATGCAGCTTTTGACTAAGCTTAATGTTGAAGCAAATTCAAAAATGCATGCTTATCTTGTTGA
GTTACACAATAAAATCCTCGCATCTGATGATGTTGGAGAGTGATGGATAATTTATTGGGTATGCTTATAACACTAT
TTTGTATAGATTCTACTATTGATTTGGGTGAGTATTGTGATGATATACTTAAGAGGTCACTGTATTACAATCGGTT
ACTCAAGAGTTTTTCGCACATACCCTCGTATGCTGAATATGAAAGAGCTAAGAGTATTTATGAAAAGGTTTTAGCCGA
TTCTAAAAATGGTGGTGTAACACAGCAAGAGCTTGCTGCATATCGTAAAGCTGCCAATATTGCAAAGTCAGTTTTTG
ATAGAGACTTGGCTGTTCAAAAGAAGTTAGATAGCATGGCAGAACGTGCTATGACAACAATGTATAAAGAGGCGCGT
GTAAGTATAGAAGAGCAAAATTAGTTTCATCATTACATGCACTACTTTTTTCAATGCTTAAGAAAATAGATTCTGA
GAAGCTTAATGTCTTATTTGACCAGGCGAATAGTGGTGTGTACCCCTAGCAACTGTTCCAATTGTTTGTAGTAATA
AGCTTACCCTTGTTATACCAGACCCAGAGACGTGGGTCAAGTGTGTGGAGGTGTGCATGTTACATATTCAACAGTT
GTTTGGAATATAGACTGTGTTACTGATGCCGATGGCACAGAGTTACACCCCACTTCTACAGGTAGTGGATTGACTTA

CTGTATAAGTGGTGATAATATAGCATGGCCTTTAAAGGTTAACTTGACTAGGAATGGGCATAATAAGGTTGATGTTG
CCTTGCAAAATAATGAGCTTATGCCTCACGGTGTAAGACAAAGGCTTGCGTAGCAGGTGTAGATCAAGCACATTGT
AGCGTTGAGTCTAAATGTTATTATACAAGTATTAGTGGCAGTTCAGTTGTAGCTGCTATTACCTCTTCAAATCCTAA
TCTGAAAGTAGCCTCTTTTTTTGAATGAGGCAGGTAATCAGATTTATGTAGACTTAGACCCACCATGTAAATTTGGTA
TGAAAGTGGGTGATAAGGTTGAAGTTGTTTACCTGTATTTTATAAAAAATACGAGGTCTATTGTAAGAGGTATGGTA
CTTGGTGCTATATCTAATGTTGTTGTGTACAATCTAAAGGTCATGAGACAGAGGAAGTGGATGCTGTAGGCATTCT
CTCACTTTGTTCTTTTGCAGTAGATCCTGCGGATACATATTGTAAATATGTGGCAGCAGGTAATCAACCTTTAGGTA
ACTGTGTTAAAATGTTGACAGTACATAATGGTAGTGGTTTTGCAATAACATCAAAGCCAAGTCCAACCTCCGGATCAG
GATTCTTATGGAGGAGCTTCTGTGTGTCTTTATTGTAGAGCACATATAGCACACCCTGGCGGAGCAGGAAATTTAGA
TGGACGCTGTCAATTTAAAGGTTCTTTTGTGCAAAATACCTACTACGGAGAAAGATCCTGTTGGATTCTGTCTACGTA
ACAAGGTTTGCAGTGTGTCAGTGTGGATTGGTTATGGATGTCAGTGTGATTCACTTAGACAACCTAAACCTTCT
GTTTCAGTCAGTTGCTGTTGCATCTGGTTTTGATAAGAATTATTTAAACGGGTACGGGGTAGCAGTGAGGCTCGGCTG
ATACCCCTAGCTAATGGATGTGACCCCGATGTTGTAAAGCGAGCCTTTGATGTTTGAATAAGGAATCAGCCGGTAT
GTTTCAAAATTTGAAGCGTAACCTGTGCACGATTCCAAGAAGTACGTGATACTGAAGATGGAATCTTGAGTATTGTG
ATTCTTATTTTGTGGTTAAACAAACCACTCCTAGTAATTATGAACATGAGAAAGCTTGTTATGAAGACTTAAAGTCA
GAAGTAACAGCTGATCATGATTTCTTTGTGTTCAATAAGAACATTTATAATATTAGTAGGCAGAGGCTTACTAAGTA
TACTATGATGGATTTTTTGTCTATGCTTTGCGGCACTTTGACCCAAAGGATTGCGAAGTTCTTAAAGAAATACTTGTC
CTTATGGTTGTATAGAAGATTATCACCTAAGTGGTTTGAAGAGAATAAGGATTGGTACGACCCAATAGAAAACCT
AAATATTATGCCATGTTGGCTAAAATGGGACCTATTGTACGACGTGCTTTATTGAATGCTATTGAGTTCGGAAACCT
CATGGTTGAAAAAGGTTATGTTGGTGTATTACACTTGATAACCAAGATCTTAATGGCAAATTTTATGATTTTGGTG
ATTTTCAGAAGACAGCGCTGGTGCTGGTGTTCCTGTTTTTGATACGTATTATTCTTACATGATGCCATCATAGCC
ATGACTGATGCGTTGGCACCTGAGAGGTATTTTGAATATGATGTGCATAAGGGTTATAAATCTTATGATCTCCTCAA
GTATGATTATACTGAGGAGAAACAAGATTTGTTTCAGAAGTACTTTAAGTATTGGGATCAAGAGTATCACCTAACT
GTCGCGACTGTAGTGATGACAGGTGTTTGATACATTGTGCAAACTTCAACATCTTGTTTTCTACACTTGTACCGCAG
ACTTCTTTCCGTAATTTGTGTAGAAAGGTTTTTGTGATGGTGTACCATTTATAGCTACTTGTGGCTATCATTCTAA
GGAACCTGGTGTTATTATGAATCAAGATAACACCATGTCATTTTCAAAAATGGGTTTGAGTCAACTCATGCAGTTTG
TTGGAGATCCTGCCTTGTTAGTGGGGACATCCAATAAATTAGTGGATCTTAGAACGTCTTGTTTTAGTGTTTGTGCT
TTAGCGTCTGGTATTACTCATCAACGGTAAACAGGTCACTTTAACAAGGATTTCTACGATTTTGCAGAGAAGGC
TGGTATGTTTAAGGAAGGTTCTTCTATACCACTTAAACATTTCTTCTACCCACAGACTGGTAATGCTGCTATAAACG
ATTATGATTATTATCGTTATAACAGGCCTACCATGTTTGATATACGTCAACTTTTATTTTGTGTTAGAGTGACTTCT
AAATATTTTGAATGTTATGAAGGCGGCTGTATACCAGCAAGCCAAGTTGTAGTTAACAATTTAGATAAGAGTGCAGG
TTATCCGTTCAATAAGTTTGGAAAGGCCGCTCTCTATTATGAAATGAGTCTAGAGGAGCAGGACCAACTCTTTGAGA
GTACAAAGAAGAACGTCCTGCCTACTATAACTCAGATGAATTTAAAATATGCCATATCCGCGAAAAATAGAGCGCGT
ACAGTGGCAGGTGTGTCTATCCTTTCTACTATGACTAATAGGCAGTTTCATCAGAAGATTCTTAAGTCTATAGTCAA
CACTAGAAACGCTCCTGTAGTTATTGGAACAACCAAGTTTTATGGCGGTTGGGATAACATGTTGAGAAACCTTATTC
AGGGTGTTGAAGACCCGATTCTTATGGGTTGGGATTATCCAAAGTGTGATAGAGCAATGCCTAATTTGTTGCGTATA
GCAGCATCTTTAGTACTCGCTCGTAAACACACTAATTGTTGTAAGTGGTCTGAACGCGTTTATAGGTTGTATAATGA
ATGCGCTCAGGTTTTATCTGAAACTGTCTTAGCTACAGGTGGTATATATGTGAAACCTGGTGGTACTAGCAGTGGAG
ATGCTACTACTGCTTATGCAAACAGTGTTTTCAACATAATACAAGCCACATCTGCTAATGTTGCGCGTCTTTTGAGT

GTTATAACGCGTGATATTGTATATGATGACATTAAGAGCTTGCAGTATGAATTGTACCAGCAGGTTTATAGGCGAGT
CAATTTTGACCCAGCATTGTGTTGAAAAGTTTTATTCTTATTTGTGTAAGAATTTCTCATTGATGATCTTGTCTGACG
ACGGTGTGTTTGTGTTATAACAACACATTAGCCAAACAAGGTCTTGTAGCAGATATTTCTGGTTTTAGAGAAGTTCTC
TACTATCAGAACAATGTTTTATGGCTGATTCTAAATGTTGGGTGAACCAGATTTAGAAAAAGGCCACATGAATT
TTGTTACAGCACACAATGTTAGTGAGGTTGATGGTGAGCCTAGATACTGCCATATCCAGACCCATCACGTATTT
TGTGTGCATGTGTTTTGTAGATGATTTGGATAAGACAGAATCTGTGGCTGTTATGGAGCGTTATATCGCTCTTGCC
ATAGATGCGTACCCACTAGTACATCATGAAAATGAGGAGTACAAGAAGGTATTCTTTGTGCTTCTTTCATACATCAG
AAAACCTCTATCAAGAGCTTTCTCAGAATATGCTTATGGACTACTCTTTTGTAATGGATATAGATAAGGGTAGTAAAT
TTTGGGAACAGGAGTTCTATGAAAATATGTATAGAGCCCTACAACATTACAGTCTTGTGGCGTTTGTGTAGTGTGT
AATAGTCAAACCTATATTGCGCTGTGGTAATTGTATTCGCAAACCATTTTTGTGTTGTAAGTGTGCTATGACCATGT
CATGCACACAGACCACAAAAATGTTTTGTCTATAAATCCTTACATTTGCTCACAGCCAGGTTGTGGTGAAGCAGATG
TTACTAAATTGTACCTCGGAGGTATGTCATACTTCTGCGGTAATCATAAACCAAAGTTATCAATACCGTTAGTATCT
AATGGTACAGTGTGTTGAATTTACAGGGCTAATTGTGCAGGTAGCGAAAATGTTGATGATTTAATCAACTAGCTAC
TACTAATTGGTCTACTGTGGAACCTTATATTTTGGCAAATCGTTGTGTAGATTGTTGAGACGCTTTGCTGCAGAGA
CAGTAAAAGCTACAGAAGAATTACATAAGCAACAATTTGCTAGTGCAGAAGTGAGAGAAGTACTCTCAGATCGTGAA
TTGATTCTGTCTTGGGAGCCAGGTAAAACCAGGCCTCCATTGAATAGAAATTATGTTTTACTGGCTTTCACTTTAC
TAGAACTAGTAAAGTTTCAGCTCGGTGATTTTACATTTGAAAAAGGTGAAGGTAAGGACGTTGTCTATTATCGAGCGA
CGTCTACTGCTAAATTGTCTGTTGGAGACATTTTTGTTTTAACCTCACACAATGTTGTTTCTCTTATAGCGCCAACG
TTGTGTCCTCAGCAAACCTTTTCTAGGTTTGTGAATTTAAGACCTAATGTGATGGTACCTGCGTGTTTTGTAAATAA
CATTCCATTGTACCATTTAGTAGGCAAGCAGAAGCGTACTACAGTACAAGGCCCTCCTGGCAGTGGTAAATCCCATT
TTGCTATAGGATTGGCGGCTTACTTTAGTAACGCCCGTGTCGTTTTACTGCATGCTCTCATGCAGCTGTTGATGCT
TTATGTGAAAAAGCTTTTAAAGTTTCTTAAAGTAGATGATTGCACTCGTATAGTACCTCAAAGGACTACTATCGATTG
CTTCTCTAAGTTTAAAGCTAATGACACAGGCAAAAAGTACATTTTTAGTACTATTAATGCCTTGCCAGAAGTTAGTT
GTGACATTCTTTTGGTTGACGAGGTTAGTATGTTGACCAATTACGAATTGTCTTTTATTAATGGTAAGATAAACTAT
CAATATGTTGTGTATGTAGGTGATCCTGCTCAATTACCGGCGCCTCGTACGTTGCTTAACGGTTCCTCTCTCCAAA
GGATTATAATGTTGTCACAAACCTTATGGTTTGTGTTAAACCTGACATTTTCCTTGCAAAGTGTTACCGTTGTCCTA
AAGAAATTGTAGATACTGTTTCTACTCTTGTATATGATGAAAAGTTTATTGCAAATAACCCGGAATCACGTACGTGT
TTCAAGGTTATAGTTAATAATGGTAATTCTGATGTAGGACATGAAAGTGGCTCAGCCTACAACATAACTCAATTAGA
ATTTGTGAAAGATTTTGTCTGTGCAATAAGGAATGGCGGGAAGCAACATTCATTTACCTTATAATGCTATGAACC
AGAGAGCCTACCGTATGCTTGGAATAATGTTTCAGACAGTAGACTCGTCTCAAGGTTTCGGAGTATGATTATGTTATC
TTTTGTGTTACTGCAGATTCGCAGCATGCACTGAATATTAACAGATTCAATGTAGCGCTTACAAGAGCCAAGCGTGG
TATACTAGTTGTCATGCGTCAGCGTGATGAACTATATTCAGCTCTTAAGTTTATAGAGCTTGATAGTGTAGCAAGTC
TGCAAGGTACAGGCTTGTTTAAAATTTGCAACAAAAGAGTTTAGTGGTGTTCACCCAGCTTATGCAGTCACAATAAG
GCTCTTGCTGCAACTTATAAGTTAATGATGAACTTGCTGCACTTGTTAACGTGGAAGCTGGTTCAGAAATAACATA
TAAACATCTTATTTCTTTGTTAGGGTTTAAAGATGAGTGTTAATGTTGAAGGCTGCCACAACATGTTTATAACACGTG
ATGAGGCTATCCGCAACGTAAGAGGTTGGGTAGGTTTTGATGTAGAAGCAACACATGCTTGCGGTACTAACATTGGT
ACTAACCTGCCTTTCCAAGTAGGTTTCTCTACTGGTGCAGACTTTGTAGTTACGCCTGAGGGACTTGTAGATACTTC
AATAGGCAATAATTTTGAAGCTGTGAATTTCTAAAGCACCTCCAGGTGAACAATTTAATCACTTGAGAGCGTTATTCA
AAAGTGCTAAACCTTGCCATGTTGTAAGGCCAAGGATTGTGCAAATGTTAGCGGATAACCTGTGCAACGTTTCAGAT

TGTGTAGTGTGTTGTACGTGGTGTTCATGGCCTAGAACTAACCACCTTTGCGCTATTTTGTAAAAATAGGCAAGGACCA
AGTTTGTCTTTCGCGTTCTAGAGCAACAACCTTTAATTTCTCATACTCAGGCTTATGCTTGTGGAAGCATTGCTTGG
GTTTTGATTTTGTGTTATAATCCACTCTTAGTGGATATTCAACAGTGGGGTTATTCTGGTAACCTACAATTTAACCAT
GATTTGCATTGTAATGTGCATGGACACGCACATGTAGCTTCTGCGGATGCTATTATGACGCGTTGTCTTGCAATTAA
TAATGCATTTTGTCAAGATGTCAACTGGGATTTAACTTACCCTCATATAGCAAATGAGGATGAAGTCAATTCTAGCT
GTAGATATTTACAACGCATGTATCTTAATGCATGTGTTGATGCTCTTAAAGTTAACGTTGTCTATGATATAGGCAAC
CCTAAAGGTATAAAATGTGTTAGACGTGGAGACTTAAATTTTAGATTCTATGATAAGAATCCAATAGTACCCAATGT
CAAGCAGTTTGAGTATGACTATAATCAGCACAAAGATAAGTTTGCTGATGGTCTTTGTATGTTTTGGAATTGTAATG
TGGATTGTTATCCCGACAATTCCTTAGTTGTAGGTACGACACACGAAATTTGAGTGTGTTTAACTACCTGGTTGT
AATGGTGGTAGCTTGTATGTAAACAAGCATGCATTCCACACACCTAAATTTGATCGCACTAGCTTTTCGTAATTTGAA
AGCTATGCCATTCTTTTTCTATGACTCATCGCTTGCAGAGACCATTCAATTGGATGGAGTTGCGCAAGACCTTGTGT
CATTAGCTACGAAAGATTGTATCACAAAATGCAACATAGGCGGTGCTGTTTGTAAAAAGCACGCACAAATGTATGCA
GATTTTGTGACTTCTTATAATGCAGCTGTTACTGCTGGTTTTACTTTTTGGGTACTAATAATTTTAAACCATATAA
TTTGTGGAAAAGTTTTTCAGCTCTCCAGTCTATCGACAATATTGCTTATAATATGTATAAGGGTGGTCATTATGATG
CTATTGCAGGAGAAATGCCCACTATCGTAACTGGAGATAAAGTTTTTGTATAGATCAAGGCGTAGAAAAAGCAGTT
TTTTTTAATCAAACAATTCTGCCTACATCTGTAGCGTTTGAGCTGTATGCGAAGAGAAATATTGCGCACTGCCAAA
CAACCGTATTTTGAAAGGTTTGGGTGTAGATGTGACTAATGGATTGTAAATTTGGGATTACACGAACCAAAACACCAC
TATACCGTAATACTGTAAAGGTATGTGCATATACAGACATAGAACCAAATGGCCTAATAGTGCTGTATGATGATAGA
TATGGTGATTACAGTCTTTTCTAGCTGCTGATAATGCTGTTTTAGTTTCTACACAGTGTTACAAGCGGTATTTCGTA
TGTAGAAATACCGTCAAACCTGCTTGTTTCCAGAACGGTATTCCGTTAAAAGATGGAGCGAACCTGTATGTTTATAAGC
GTGTTAATGGTGCGTTTGTACGCTACCTAACACATTAACACACAGGGTCGCAGTTATGAACTTTTGAACCTCGT
AGTGATGTTGAGCGTGATTTTCTCGACATGTCTGAGGAGAGTTTTGTAGAAAAGTATGGTAAAGAATTAGGTCTACA
GCACATACTGTATGGTGAAGTTGATAAGCCCCAATTAGGTGGTTTACACACTGTTATAGGTATGTGCAGACTTTTAC
GTGCGAATAAGTTGAACGCAAAGTCTGTTACTAATTCTGATTCTGATGTGATGCAAAATTATTTTGTATTGGCAGAC
AATGGTTCCTACAAGCAAGTGTGTACTGTTGTGGATTGCTGCTTGTGATTTCTTAGAAGTTCTTAGGAACATACT
GAAAGAGTATGGTACTAATAAGTCTAAAGTTGTAACAGTGTCAATTGATTACCATAGCATAAATTTTATGACTTGGT
TTGAAGATGGCATTATTAACCATGTTATCCACAGCTTCAATCAGCATGGACGTGTGGTTATAATATGCCTGAACTT
TATAAAGTTCAGAATTGTGTTATGGAACCTTGCAACATTCCTAATTATGGTGTGGAATAGCGTTGCCAAGTGGTAT
TATGATGAATGTGGCAAAGTATACACAACTCTGTCAATACCTTTCGAAAACAACAATGTGTGTACCGCATAATATGC
GAGTAATGCATTTTGGAGCTGGAAGTGACAAAGGAGTGGCTCCAGGTAGTACTGTTCTTAAACAATGGCTCCCAGAA
GGGACACTCCTTGTGATAATGATATTGTAGACTATGTGTCTGATGCACATGTTTCTGTGCTTTTCTAGATTGCAATAA
ATATAAGACAGAGCACAAGTTTGATCTTGTGATATCTGATATGTATACAGACAATGATTCAAAAAGAAAGCATGAAG
GCGTGATAGCCAATAATGGCAATGATGACGTTTTTCATATATCTCTCAAGTTTTCTTCGTAATAATTTGGCTCTAGGT
GGTAGTTTTGCTGTAAAAGTGACAGAGACAAGTTGGCACGAAGTTTTATATGACATTGCACAGGATTGTGCATGGTG
GACAATGTTTTGTACAGCAGTGAATGCCTCTTCTTCAGAAGCATTCTTGGTTGGTGTTAATTATTTGGGTGCAAGTG
AAAAGGTTAAGGTTAGTGGAACCAAGCTGCACGCAAAATATATATTTTGGAGGAATTGTAATTATTTACAAACCTCT
GCTTATAGTATATTTGACGTTGCTAAGTTTGATTGAGATTGAAAGCAACACCAGTTGTTAATTTGAAAACCTGAACA
AAAGACAGACTTAGTCTTTAATTTAATTAAGTGTGGTAAGTTACTGGTAAGAGATGTTGGTAACACCTCTTTTACTA
GTGACTCTTTTGTGTGTACTATGTAGTGCTGCTTTGTATGACAGTAGTTCTTACGTTTACTACTACCAAAGTGCCTT

TAGACCACCTAATGGTTGGCATTACACGGGGGTGCTTATGCGGTAGTTAATATTTCTAGCGAATCTAATAATGCAG
GCTCTTCACCTGGGTGTATTGTTGGTACTATTTCATGGTGGTCGTGTTGTTAATGCTTCTTCTATAGCTATGACGGCA
CCGTCATCAGGTATGGCTTGGTCTAGCAGTCAGTTTTGTACTGCACACTGTAACCTTTTCAGATACTACAGTGTGTGT
TACACATTGTTATAAATATGATGGGTGTCCTATAACTGGCATGCTTCAAAAGAATTTTTTACGTGTTTCTGCTATGA
AAAATGGCCAGCTTTTCTATAATTTAACAGTTAGTGTAGCTAAGTACCCTACTTTTAAATCATTTACAGTGTGTTAAT
AATTTAACATCCGTATATTTAAATGGTGATCTTGTTTACACCTCTAATGAGACCACAGATGTTACATCTGCAGGTGT
TTATTTTAAAGCTGGTGGACCTATAACTTATAAAGTTATGAGAGAAGTTAAAGCCCTGGCTTATTTTGTTAATGGTA
CTGCACAAGATGTTATTTTGTGTGATGGATCACCTAGAGGCTTGTTAGCATGCCAGTATAATACTGGCAATTTTTCA
GATGGCTTTTATCCTTTTATTAATAGTAGTTTAGTTAAGCAGAAGTTTATTGTCTATCGTGAAAATAGTGTTAATAC
TACTTTTACGTTACACAATTTCACTTTTCATAATGAGACTGGCGCCAACCCTAATCCTAGTGGTGTTCAGAATATTC
AAACTTACCAAACACAAACAGCTCAGAGTGGTTATTATAATTTTAAATTTTCTTTCTGAGTAGTTTTGTTTATAAG
GAGTCTAATTTTATGTATGGATCTTATCACCCAAGTTGTAATTTTAGACTAGAACTATTAATAATGGCTTGTGGTT
TAATTCACTTTCAGTTTCAATTGCTTACGGTCCTCTTCAAGGTGGTTGCAAGCAATCTGTCTTTAGTGGTAGAGCAA
CTTGTTGTTATGCTTATTCATATGGAGGTCCTTCGCTGTGTAAAGGTGTTTATTCAGGTGAGTTAGATCTTAATTTT
GAATGTGGACTGTTAGTTTATGTTACTAAGAGCGGTGGCTCTCGTATACAAACAGCCACTGAACCGCCAGTTATAAC
TCGACACAATTATAATAATATTACTTTAAATACTTGTGTTGATTATAATATATATGGCAGAACTGGCCAAGGTTTTA
TTACTAATGTAACCGACTCAGCTGTTAGTTATAATTATCTAGCAGACGCAGGTTTGGCTATTTTAGATACATCTGGT
TCCATAGACATCTTTGTTGTACAAGGTGAATATGGTCTTACTTATTATAAGGTAAACCCTTGCGAAGATGTCAACCA
GCAGTTTGTAGTTTCTGGTGGTAAATTAGTAGGTATTCTTACTTCACGTAATGAGACTGGTCTCAGCTTCTTGAGA
ACCAGTTTACATTAAAATCACTAATGGAACACGTCGTTTTAGACGTTCTATTACTGAAAATGTTGCAAATTGCCCT
TATGTTAGTTATGGTAAGTTTTGTATAAAACCTGATGGTTCAATTGCCACAATAGTACCAAAACAATTGGAACAGTT
TGTGGCACCTTTACTTAATGTTACTGAAAATGTGCTCATACCTAACAGTTTTAATTTAACTGTTACAGATGAGTACA
TACAAACGCGTATGGATAAGGTCCAAATTAATTGTCTGCAGTATGTTTGTGGCAATTCTCTGGATTGTAGAGATTG
TTTCAACAATATGGGCCTGTTTGTGACAACATATTGTCTGTAGTAAATAGTATTGGTCAAAAAGAAGATATGGAAC
TTTGAATTTCTATTCTTCTACTAAACCGGCTGGTTTTAATACACCATTTCTTAGTAATGTTAGCACTGGTGAGTTTA
ATATTTCTCTTCTGTTAACAACCTCCTAGTAGTCCTAGAAGGCGTTCTTTTATTGAAGACCTTCTATTTACAAGCGTT
GAATCTGTTGGATTACCAACAGATGACGCATACAAAAATTGCACTGCAGGACCTTTAGGTTTTCTTAAGGACCTTGC
GTGTGCTCGTGAATATAATGGTTTGCTTGTGTTGCCTCCCATTATAACAGCAGAAATGCAAATTTTGTATACTAGTT
CTCTAGTAGCTTCTATGGCTTTTGGTGGTATTACTGCAGCTGGTGTATACCTTTTGCCACACAACCTGCAGGCTAGA
ATTAATCACTTGGGTATTACCCAGTCACTTTTGTTGAAGAATCAAGAAAAAATTGCTGCTTCCTTTAATAAGGCCAT
TGGTCGTATGCAGGAAGGTTTTAGAAGTACATCTCTAGCATTACAACAAATTCAAGATGTTGTTAATAAGCAGAGTG
CTATTCTTACTGAGACTATGGCATCACTTAATAAAAAATTTGGTGCTATTTCTTCTATGATTCAAGAAATCTACCAG
CAACTTGACGCCATACAAGCAAATGCTCAAGTGGATCGTCTTATAACTGGTAGATTGTCATCACTTTCTGTTTTAGC
ATCTGCTAAGCAGGCGGAGCATATTAGAGTGTACAAACAGCGTGAGTTAGCTACTCAGAAAATTAATGAGTGTGTTA
AGTCACAGTCTATTAGGTACTCCTTTTGTGGTAATGGACGACATGTTCTAACCATACCGCAAAATGCACCTAATGGT
ATAGTGTTTATACACTTTTCTTATACTCCAGATAGTTTTGTTAATGTTACTGCAATAGTGGGTTTTTGTGTAAAGCC
AGCTAATGCTAGTCAGTATGCAATAGTACCCGCTAATGGTAGGGGTATTTTTATACAAGTTAATGGTAGTTACTACA
TCACAGCACGAGATATGTATATGCCAAGAGCTATTACTGCAGGAGATATAGTTACGCTTACTTCTGTCAAGCAAAT
TATGTAAGTGTAATAAGACCGTCATTACTACATTCGTAGACAATGATGATTTTGATTTTAATGACGAATTGTCAAA

ATGGTGAATGACACTAAGCATGAGCTACCAGACTTTGACAAATTCAATTACACAGTACCTATACTTGACATTGATA
GTGAAATTGATCGTATTCAAGGCGTTATACAGGGTCTTAATGACTCTTTAATAGACCTGAAAACTTTCAATACTC
AAAACCTTATATTAAGTGGCCTTGGTATGTGTGGTTAGCCATAGCTTTTGCCACTATTATCTTCATCTTAATACTAGG
ATGGGTTTTCTTCATGACTGGATGTTGTGGTTGTTGTTGTGGATGCTTTGGCATTATGCCTCTAATGAGTAAGTGTG
GTAAGAAATCTTCTTATTACACGACTTTTGATAACGATGTGGTAACTTAACAATACAGACCTAAAAAGTCTGTTTAA
TGATTCAAAGTCCCACGTCCTTCCTAATAGTATTAATTTTTCTTTGGTGTAACTTGTACTAAGTTGTTTTAGAGAG
TTTATTATAGCGCTCCAACAATAACAAGTTTTACTCCAAATTATCAATAGTAACTTACAGCCTAGACTGACCCT
TTGTACAGTCTAGACTAATGTTAACTTAGAAGCAATTATTGAACTGGTGAGCAAGTGATTCAAAAAATCAGTTT
CAATTTACAGCATATTTCAAGTGATTAAACACAGAAGTATTTGACCCCTTTGACTATTGTTATTACAGAGGAGGTA
ATTTTTGGGAAATAGAGTCAGCTGAAGATTGTTCAAGTGATGATGAATTTATTGAATAAGTCGCTAGAGGAAAATGG
AAGTTTTCTAACAGCGCTTTATATATTTGTAGGATTTTAGCACTTTATCTTCTAGGTAGAGCACTTCAAGCATTTG
TACAGGCTGCTGATGCTTGTGTTTATTTGGTATACATGGGTAGTAATTCCAGGAGCTAAGGGTACAGCCTTTGTA
TATAAGTATACATATGGTAGAAACTTAACAATCCGGAATTAGAAGCAGTTATTGTCAACGAGTTTCCTAAGAACGG
TTGGAATAATAAAAAATCCAGCAAATTTCAAGATGTCCAACGAGACAAATTGTACTCTTGACTTTGAACAGTCAGTT
GAGCTTTTTAAAGAGTATAATTTATTTATAACTGCATTCTTGTGTTCTTAACCATAATACTTCAGTATGGCTATGC
AACAAGAAGTAAGTTTATTTATATACTGAAAATGATAGTGTTATGGTGCTTTTGGCCCCTTAACATTGCAGTAGGTG
TAATTTTCATGTATATACCCACCAAACACAGGAGGTCTTGTCGCAGCGATAATACTTACAGTGTTTGCCTGTCTGTCT
TTTGTAGGTTATTGGATCCAGAGTATTAGACTCTTTAAGCGGTGTAGGTCATGGTGGTCATTTAACCAGAATCTAA
TGCCGTAGGTTCAATACTCCTAATAATGGTCAACAATGTAATTTTGCTATAGAGAGTGTGCCAATGGTGCTTTCTC
CAATTATAAAGAATGGTGTTCTTTATTGTGAGGGTCAGTGGCTTGCTAAGTGTGAACCAGACCACTTGCCTAAAGAT
ATATTTGTTGTACACCGGATAGACGTAATATCTACCGTATGGTGCAGAAATATACTGGTGACCAAAGCGGAAATAA
GAAACGGTTTGCTACGTTTGTCTATGCAAAGCAGTCAGTAGATACTGGCGAGCTAGAAAGTGTAGCAACAGGAGGGA
GTAGTCTTTACACCTAAATGTGTGTGTGTAGAGAGTATTTAAAATTATTCTTTAATAGTGCCTCTATTTTAAGAGCG
CATAATAGTATTATTTTGGAGATATTAATATAAATCCTCTCTGTTTTATACTCTCTTTTCAAGAGCTATTATTTAA
AAAACAGTTTTTCCACTCTTTTGTGCCAAAACTATTGTTGTTAATGGTGTAACTTTCAAGTAGATAATGGAAAAG
TCTACTACGAAGGAAAACCAATTTTTCAGAAAGGTTGTTGTAGGTTGTGGTTGAGTTATAAAAAAGATTAACTACC
TACTACACTTATTTTTATAAGAGGCGTTTTATCTTACAAGCGCTTAATAAATACGGACGATGAAATGGCTGACTAGT
TTTGTAAGGGCAGTTATTTTCATGTTATAAACCCTATTATTAACCTCAATTAAGAGTATTAGATAGGTTAATCTTAGA
TCATGGACCAAAACACATCTTAACGTGTGTTAGGTGCGTGATTTTGTTCATTAGATTTAGTTTATAGGTTGGCGT
ATACGCCTACTCAATCGCTGGTATGAATAATAGTAAAGATAATCCTTTTTGCGGAGCAATAGCAAGAAAAGCGCGAA
TTTATCTGAGAGAAGGATTAGATTGTGTTTACTTTCTTAACAAAGCAGGACAAGCAGAGTCTTGTCCCGCGTGTAACC
TCTCTAGTATTCCAGGGGAAAACCTTGAGGGAACACAAATATAATAATAATCTTTTGTGTCATGGCAAGCGGTAAAGGCA
ACTGGAAGACAGATGCCCCAGCTCCAGTCATCAAACCTAGGAGGACCAAAGCCACCTAAAGTTGGTTCTTCTGGA
TGTATCTTGGTTTCAAGCAATAAAAGCCAAGAAGTTAAATTCACCTCCGCCTAAGTTTGAAGGTAGCGGTGTTCTCTG
ATAATGAAAATCTAAAACCAAGTCAGCAGCATGGATATTGGAGACGCCAAGCTAGGTTTAAAGCCAGGTAAAGGTGGA
AGAAAACCAGTCCAGATGCTTGGTATTTTACTATACTGGAACAGGACCAGCCGCTAACCTGAATTGGGGTGATAG
CCAAGATGGTATAGTGTGGGTTGCTGGTAAGGGTGCTGATACTAAATTTAGATCTAATCAGGGTACTCGTGACTCTG
ACAAGTTTGACCAATATCCGCTACGGTTTTAGACGGAGGACCTGATGGTAATTTCCGTTGGGATTTTATTCTCTG
AATCGTGGCAGGAGTGGGAGATCAACAGCAGCTTCATCAGCAGCATCTAGTAGAGCACCATCACGTGAAGTTTCGCG

TGGTCGCAGGAGTGGTTCTGAAGATGATCTTATTGCTCGTGCAGCAAGGATAATTCAGGATCAGCAGAAGAAGGGTT
CTCGCATTACAAAGGCTAAGGCTGATGAAATGGCTCACCGCCGGTATTGCAAGCGCACTATTCCACCTAATTATAAG
GTTGATCAAGTGTGTTGGTCCCCGTAATAAGGTAAGGAGGGAAATTTTGGTGATGACAAGATGAATGAGGAAGGTAT
TAAGGATGGGCGCGTTACAGCAATGCTCAACCTAGTTCCTAGCAGCCATGCTTGTCTTTTCGGAAGTAGAGTGACGC
CCAGACTTCAACCAGATGGGCTGCACTTGAAATTTGAATTTACTACTGTGGTCCCACGTGATGATCCGCAGTTTGAT
AATTATGTAAAAATTTGTGATCAGTGTGTTGATGGTGTAGGAACACGTCCAAAAGATGATGAACCAAGACCAAAGTC
ACGCTCAAGTTCAAGACCTGCAACAAGAGGAAATTTCTCCAGCGCCAAGACAGCAGCGCCCTAAGAAGGAGAAAAAGC
CAAAGAAGCAGGATGATGAAGTGGATAAAGCATTGACCTCAGATGAGGAGAGGAACAATGCACAGCTGGAATTTGAT
GATGAACCCAAGGTAATTAAGTGGGGGATTAGCCCTAGGAGAGAATGAACCTTTGAGTAAAATTCAATAGTAAGAG
TTAAGGAAGATAGGCATGTAGCTTGATTACCTACATGTCTATCGCCAGGGAAATGTCTAATTTGTCTACTTAGTAGC
CTGGAACGAACGGTAGACCTTAGATTTTAATTTAGTTTAATTTTGTAGTTTAAAGTTAGTTTAGAGTAGGTA
TAAAGATGCCAGTGCCGGGGCCACGCGGAGTACGACCGAGGGTACAGCACTAGGACGCCATTAGGGGAAGAGCTAA
ATTTTAGTTTAAAGTTAAGTTTAATTGGCTATGTATAGTTAAAATTTATAGGCTAGTATAGAGTTAGAGCAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

[0118] 复制酶

[0119] 除了结构和辅助基因外,冠状病毒基因组的三分之二包含复制酶基因(在基因组的5'端),其被表达为两种多聚蛋白pp1a和pp1ab,其中pp1ab是作为-1核糖体移码机制(ribosomal shift mechanism)的结果的pp1a的延伸产物。这两种多聚蛋白被两种类型的病毒编码的蛋白酶切割,通常产生16种非结构蛋白(Nsp1-16);IBV缺少Nsp1,因而编码Nsp2-16。

[0120] 因此,IBV中的基因1编码与RNA复制和转录相关的15个(其他冠状病毒中为16个)非结构蛋白(nsp2-16)。

[0121] 术语“复制酶蛋白”在本文中用于指pp1a和pp1ab多聚蛋白或单个nsp亚基。

[0122] 术语“复制酶基因”在本文中用于指编码复制酶蛋白的核酸序列。

[0123] 表1中提供了冠状病毒nsp蛋白的功能的概述。

[0124] 表1

[0125]	Nsp 蛋白	关键特征
	1	在冠状病毒基因组内但不在冠状病毒基因群之间保守；在宿主细胞中的潜在调节功能。
	2	对组织培养中MHV和SARS-CoV的复制是非必要的
	3	酸性结构域；具有ADRP和聚（ADP-核糖）-结合活性的宏结构域（macro domain）；一种或两种含ZBD的木瓜蛋白酶样蛋白酶；Y结构域
	4	跨膜结构域
	5	3C样主要蛋白酶，同型二聚体
	6	跨膜结构域
	7	与nsp8相互作用形成十六聚体复合物
	8	非典型RNA聚合酶；与nsp7相互作用以形成十六聚体复合物
	9	ssRNA结合蛋白，二聚体
[0126]	10	RNA结合蛋白，同型十二聚体，锌结合结构域，已知与nsp14和nsp16相互作用
	11	未知
	12	RNA依赖性RNA聚合酶
	13	锌结合结构域，NTPase，dNTPase，5'至3' RNA和DNA解旋酶，RNA 5'-三磷酸
	14	3'至5'核糖核酸外切酶，锌结合结构域和N7-甲基转移酶
	15	尿嘧啶-特异性内切核糖核酸酶，同型六聚体
	16	推定的核糖-2'-O-甲基转移酶

[0127] 由本发明的冠状病毒编码的变体复制酶基因包含在编码nsp-10、nsp-14、nsp-15或nsp-16的序列的一个或多个区段中的突变。

[0128] Nsp10具有RNA结合活性，并且似乎参与来自pp1a/pp1ab区域的其他nsps内的同型和/或异型相互作用。它采用包含五个 α 螺旋，一个 3_{10} -螺旋和三个 β 链的 α/β 折叠。已经鉴定了由保守的半胱氨酸残基和一个组氨酸残基（Cys-74/Cys-77/His-83Cys-90；Cys-117/Cys-120/Cys-128/Cys-130）形成的两个锌-结合位点。已经证实该蛋白质结合单链和双链RNA和DNA而没有明显的特异性。Nsp-10可以与nsp-9交联，表明存在涉及nsp-7，nsp-8，nsp-9和-nsp10的蛋白-蛋白相互作用的复杂网络。此外，已知nsp-10与nsp-14和nsp-16相互作用。

[0129] Nsp-14在氨基末端区域包含3'至5'核糖核酸外切酶（ExoN）活性结构域。已经证明

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

[0130] 已经在许多冠状病毒 (包括SARS-CoV、MHV和IBV) 中报道了Nsp-15相关的NendoU (nidoviral核糖核酸内切酶,对U具有特异性) RNase活性。一致地报道了所述活性被 Mn^{2+} 离子显著增强,并且在 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 存在下几乎没有活性。NendoU在单链和双链RNA两者中的尿苷酸残基的3'侧切割。冠状病毒NendoUs的生物相关底物仍有待鉴定。

[0131] 已经预测Nsp-16介导核糖-2'-O-甲基转移酶 (2'-O-MTase) 活性,并且反向遗传学实验已经显示2'-O-MTase结构域对于HCoV-229E和SARS-CoV中的病毒RNA合成是必需的。该酶可以参与冠状病毒RNA的帽1结构的产生,并且它还可以在其它RNA加工途径中与NendoU和ExoN合作。2'-O-MTase还可以甲基化特定RNA以保护它们免受NendoU介导的切割。

[0132] nsp-10, -14, -15和-16的基因组和蛋白质序列分别作为SEQ ID NO:2-5和6-9提供。

[0133] SEQ ID NO:2 (nsp-10核苷酸序列-SEQIDNO:1的核苷酸11884-12318)

[0134] TCTAAAGGTCATGAGACAGAGGAAGTGGATGCTGTAGGCATTCTCTCACTTTGTTCTTTTGCAGTAGATCCTGCGGATACATATTGTAAATATGTGGCAGCAGGTAATCAACCTTTAGGTAAGTGTGTTAAATGTTGACAGTACA
TAATGGTAGTGGTTTTGCAATAACATCAAAGCCAAGTCCAACCTCCGGATCAGGATTCTTATGGAGGAGCTTCTGTGT
GTCTTTATTGTAGAGCACATATAGCACACCTTGGCGGAGCAGGAAATTTAGATGGACGCTGTCAATTTAAAGGTTCT
TTTGTGCAAATACCTACTACGGAGAAAGATCCTGTTGGATTCTGTCTACGTAACAAGGTTTGCAGTGTGTCAGTG
TTGGATTGGTTATGGATGTCAGTGTGATTCACTTAGACAACCTAAACCTTCTGTTCAG

[0135] SEQ ID NO:3 (nsp-14核苷酸序列-SEQIDNO:1的核苷酸16938-18500)

[0136] GGTACAGGCTTGTTTAAATTTGCAACAAAGAGTTTAGTGGTGTTCACCCAGCTTATGCAGTCACAAC
AAGGCTCTTGCTGCAACTTATAAAGTTAATGATGAACTTGCTGCACTTGTTAACGTGGAAGCTGGTTCAGAAATAAC
ATATAACATCTTATTTCTTTGTTAGGGTTTAAGATGAGTGTTAATGTTGAAGGCTGCCACAACATGTTTATAACAC
GTGATGAGGCTATCCGCAACGTAAGAGGTTGGGTAGGTTTTGATGTAGAAGCAACACATGCTTGCGGTACTAACATT
GGTACTAACCTGCCTTTCCAAGTAGGTTTCTCTACTGGTGCAGACTTTGTAGTTACGCCTGAGGGACTTGTAGATAC
TTCAATAGGCAATAATTTTGAGCCTGTGAATTCTAAAGCACCTCCAGGTGAACAATTTAATCACTTGAGAGCGTTAT
TCAAAAGTGCTAAACCTTGGCATGTTGTAAGGCCAAGGATTGTGCAAATGTTAGCGGATAACCTGTGCAACGTTTCA
GATTGTGTAGTGTGTTGTCACGTGGTGTGATGGCCTAGAACTAACCACTTTGCGCTATTTTGTAAATAGGCAAGGA
CCAAGTTTGTCTTGCGTTCTAGAGCAACAACCTTTAATTCTCATACTCAGGCTTATGCTTGTTGGAAGCATTGCT
TGGGTTTTGATTTGTTTATAATCCACTCTTAGTGGATATTCAACAGTGGGGTTATTCTGGTAACCTACAATTTAAC
CATGATTTGCATTGTAATGTGCATGGACACGCACATGTAGCTTCTGCGGATGCTATTATGACGCGTTGTCTTGCAAT
TAATAATGCATTTTGTCAAGATGTCAACTGGGATTTAACTTACCCTCATATAGCAAATGAGGATGAAGTCAATTCTA
GCTGTAGATATTTACAACGCATGTATCTTAATGCATGTGTTGATGCTCTTAAAGTTAACGTTGTCTATGATATAGGC
AACCTAAAGGTATTAAATGTGTTAGACGTGGAGACTTAAATTTAGATTCTATGATAAGAATCCAATAGTACCCAA
TGTCAAGCAGTTTGAAGTATGACTATAATCAGCACAAAGATAAGTTTGTGATGGTCTTTGTATGTTTTGGAATTGTA
ATGTGGATTGTTATCCCGACAATTCCTTACTTTGTAGGTACGACACACGAAATTTGAGTGTGTTAACCTACCTGGT
TGTAATGGTGGTAGCTTGTATGTTAACAAGCATGCATTCACACACCTAAATTTGATCGCACTAGCTTTTCGTAATTT
GAAAGCTATGCCATTCTTTTTCTATGACTCATCGCCTTGCGAGACCATTCAATTGGATGGAGTTGCGCAAGACCTTG

TGTCATTAGCTACGAAAGATTGTATCACAAAATGCAACATAGGCGGTGCTGTTTGTA AAAAGCACGCACAAATGTAT
GCAGATTTTGTGACTTCTTATAATGCAGCTGTTACTGCTGGTTTTACTTTTTGGGTACTAATAATTTTAACCCATA
TAATTTGTGGAAGTTTTTCAGCTCTCCAG

[0137] SEQ ID NO:4 (nsp-15核苷酸序列-SEQIDNO:1的核苷酸18501-19514)

[0138] TCTATCGACAATATTGCTTATAATATGTATAAGGGTGGTCATTATGATGCTATTGCAGGAGAAATGCCC
ACTATCGTAACTGGAGATAAAGTTTTTGTATAGATCAAGGCGTAGAAAAAGCAGTTTTTTTTTAATCAAACAATTCT
GCCTACATCTGTAGCGTTTGAGCTGTATGCGAAGAGAAAATATTCGCACACTGCCAAACAACCGTATTTTGAAAGGTT
TGGGTGTAGATGTGACTAATGGATTTGTAATTTGGGATTACACGAACCAAACACCACTATACCGTAATACTGTTAAG
GTATGTGCATATACAGACATAGAACCAAATGGCCTAATAGTGCTGTATGATGATAGATATGGTGATTACCAGTCTTT
TCTAGCTGCTGATAATGCTGTTTTAGTTTCTACACAGTGTTACAAGCGGTATTCGTATGTAGAAATACCGTCAAACC
TGCTTGTTTCAGAACGGTATTCGGTAAAAAGATGGAGCGAACCTGTATGTTTATAAGCGTGTTAATGGTGCGTTTGTT
ACGCTACCTAACACAATAAACACACAGGGTCGAAGTTATGAACTTTTGAACCTCGTAGTGATGTTGAGCGTGATTT
TCTCGACATGTCTGAGGAGAGTTTTGTAGAAAAGTATGGTAAAGAATTAGGTCTACAGCACATACTGTATGGTGAAG
TTGATAAGCCCCAATTAGGTGGTTTCCACACTGTTATAGGTATGTGCAGACTTTTACGTGCGAATAAGTTGAACGCA
AAGTCTGTTACTAATTCTGATTCTGATGTCATGCAAAATTATTTGTATTGGCAGACAATGGTTCCTACAAGCAAGT
GTGTACTGTTGTGGATTTGCTGCTTGATGATTTCTTAGAACTTCTTAGGAACATACTGAAAGAGTATGGTACTAATA
AGTCTAAAGTTGTAACAGTGTCAATTGATTACCATAGCATAAATTTTATGACTTGGTTTGAAGATGGCATTATTA
ACATGTTATCCACAGCTTCAA

[0139] SEQ ID NO:5 (nsp-16核苷酸序列-SEQIDNO:1的核苷酸19515-20423)

[0140] TCAGCATGGACGTGTGGTTATAATATGCCTGAACTTTATAAAGTTCAGAATTGTGTTATGGAACCTTGC
AACATTCCTAATTATGGTGTGGAATAGCGTTGCCAAGTGGTATTATGATGAATGTGGCAAAGTATACACAACCTCTG
TCAATACCTTTCGAAAAACAATGTGTGTACCGCATAATATGCGAGTAATGCATTTTGGAGCTGGAAGTGACAAAG
GAGTGGTGCCAGGTAGTACTGTTCTTAAACAATGGCTCCCAGAAGGGACACTCCTTGTCGATAATGATATTGTAGAC
TATGTGTCTGATGCACATGTTTCTGTGCTTTCAGATTGCAATAAATATAAGACAGAGCACAAGTTTGATCTTGTGAT
ATCTGATATGTATACAGACAATGATTCAAAAAGAAAGCATGAAGGCGTGATAGCCAATAATGGCAATGATGACGTTT
TCATATATCTCTCAAGTTTTCTTCGTAATAATTTGGCTCTAGGTGGTAGTTTTGCTGTAAAAGTGACAGAGACAAGT
TGGCACGAAGTTTTATATGACATTGCACAGGATTGTGCATGGTGGACAATGTTTTGTACAGCAGTGAATGCCTCTTC
TTCAGAAGCATTCTTGATTGGTGTTAATTATTTGGGTGCAAGTGAAGGTTAAGGTTAGTGAAAAACGCTGCACG
CAAATTATATATTTTGGAGGAATTGTAATTATTTACAAACCTCTGCTTATAGTATATTTGACGTTGCTAAGTTTGAT
TTGAGATTGAAAGCAACGCCAGTTGTTAATTTGAAAAGTGAACAAAAGACAGACTTAGTCTTTAATTTAATTAAGTG
TGGTAAGTTACTGGTAAGAGATGTTGGTAACACCTCTTTTACTAGTGACTCTTTTGTGTGTACTATGTAG

[0141] SEQ ID NO:6 (nsp-10氨基酸序列)

[0142] SKGHETEEVDAVGILSLCSFAVDPADTYCKYVAAGNQPLGNCVKMLTVHNGSGFAITSKPSPTPDQDSY
GGASVCLYCRAHIAHPGGAGNLDGRCQFKGSFVQIPTTEKDPVGFCLRNKVCTVCQCWIGYGCQCDSLRLQPKPSVQ

[0143] SEQ ID NO:7 (nsp-14氨基酸序列)

[0144] GTGLFKICNKEFSGVHPAYAVTTKALAATYKVNDELAALVNVEAGSEITYKHLISLLGFKMSVNVEGCH
NMFITRDEAIRNVRGWVGFDEATHACGTNIGTNLPFQVGFSTGADFVVTPEGLVDTSIGNNFEPVNSKAPPGEQFN
HLRALFKSAKPWHVVRPRIVQMLADNLCNVSDCVFVTWCHGLELTTLRYFVKIGKDQVCSCGSRATTFNSHTQAYA
CWKHCLGFDVYNPLLVDIQQWGYSGNLQFNHDLHCNVHGHAVASADAIMTRCLAINNAFCQDVNWDLTYPHIANE

DEVNSSCRYLQRMYLNACVDALKVNVVYDIGNPKGIKCVRRGDLNFRFYDKNP IVPNVKQFEYDYNQHKDKFADGLC
MFWNCNVDCYPDNLVCRYDTRNLSVFNLP GCNGGSLYVNKHAFHTPKFDRTSFRNLKAMPFFFYDSSPCETIQLDG
VAQDLVSLATKDCITKCNIGGAVCKKHAQMYADFVTSYNAAVTAGFTFWVTNNFNPYNLWKSFSALQ

[0145] SEQ ID NO:8 (nsp-15氨基酸序列)

[0146] SIDNIAYNMYKGGHYDAIAGEMPTIVTGDKVFVIDQGVEKAVFFNQ TILPTSVAFELYAKRNIRTL PNN
RILKGLGVDVTNGFVIWDYTNQTPLYRNTVKVCAYTDIEPNGLIVLYDDRYGDYQSFLAADNAVLVSTQCYKRYSYV
EIPSNLLVQNGIPLKDGANLYVYKRVNGAFVTL PNTLNTQGRSYETFEPRSDVERDFLDMSEESFVEKYGKELGLQH
ILYGEVDKPKLGG LHTVIGMCRLLRANKLNAKSVTNSDSVMQNYFVLADNGSYKQVCTVVDLLLDDFLELLRNILK
EYGTNKS KVVTVSIDIYHSINFMTWFEDGIIKTCYPQLQ

[0147] SEQ ID NO:9 (nsp-16氨基酸序列)

[0148] SAWTCGYNMPELYKVQNCVMEPCNIPNYGVGIALPSGIMMNAKYTQLCQYLSKTTMCVPHNMVMHFG
AGSDKGVAPGSTVLKQWLPEGTLLVDNDIVDYVSDAHVSVLSDCNKYKTEHKFDLVISDMYTDNDSKRKHGVIANN
GNDDVFIYLSFLRNALGGSFAVKVTETSWHEVLYDIAQDCAWWTMFCTAVNASSSEAFLVGVNYLGASEKVKVS
GKTLHANYIFWRNCNYLQTSAYSIFDVAKFDLRLKATPVVNLKTEQKTDLVFNLIKCGKLLVRDVGNTSFTSDSFVC
TM

[0149] 降低的病原性

[0150] 本发明的活的减毒冠状病毒包含变体复制酶基因,其导致该病毒与表达相应野生型基因的冠状病毒相比具有降低的致病性。

[0151] 本文所用的术语“减毒的”是指表现出所述降低的致病性并可以被归类为非毒性的病毒。活的减毒病毒是弱化的复制病毒,其仍然能够刺激免疫应答并产生免疫力但不引起实际的疾病。

[0152] 术语“致病性”在本文中根据其正常含义使用,指病毒在受试者中引起疾病的潜力。通常,冠状病毒的致病性通过测定疾病相关症状(例如打喷嚏,snicking和气管纤毛活动的降低)来确定。

[0153] 术语“降低的致病性”用于描述与相应的野生型冠状病毒相比,冠状病毒的致病性水平是降低的,减轻的(lessened)或减少的(diminished)。

[0154] 在一个实施方案中,本发明的冠状病毒与衍生该病毒的亲本M41-CK病毒或对照冠状病毒相比具有降低的致病性。对照冠状病毒可以是具有已知致病性的冠状病毒,例如表达野生型复制酶蛋白的冠状病毒。

[0155] 可以使用本领域熟知的方法评估冠状病毒的致病性。通常,通过测定用病毒攻击的受试者(例如鸡)中的临床症状来评估致病性。

[0156] 作为说明,可以通过鼻或眼接种在8-24天龄时对鸡进行攻击。可以在感染后3-10天评估与IBV感染相关的临床症状。通常评估以确定冠状病毒(例如IBV)的致病性的临床症状包括喘气、咳嗽、打喷嚏、snicking、抑郁、褶皱的羽毛和气管纤毛活动丧失。

[0157] 与表达野生型复制酶的冠状病毒相比,本发明的变体复制酶当在冠状病毒中表达时可导致临床症状水平降低。

[0158] 例如,表达变体复制酶的冠状病毒可以引起的每只鸟每分钟snick的次数与由表达野生型复制酶的病毒引起的snicks的次数相比少于90%、少于80%、少于70%、少于60%、少于50%、少于40%、少于30%、少于20%或少于10%。

[0159] 表达根据本发明的变体复制酶的冠状病毒可以以使用表达野生型复制酶的病毒感染的鸟群中的次数的少于70%、少于60%、少于50%、少于40%、少于30%、少于20%或少于10%引起哮喘。

[0160] 表达根据本发明的变体复制酶的冠状病毒可以导致气管中纤毛活动是未感染鸟中的气管纤毛活动水平的至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。

[0161] 表达根据本发明的变体复制酶的冠状病毒可以导致如表2中定义的临床症状,其水平低于表达野生型复制酶的冠状病毒。

[0162] 表2基于临床症状的IBV严重性限度:

	Snicking 鼻分泌物 眼睛流泪 眶下窦肿胀 罗音(气管或支气管区振动) 弯腰姿势/抑郁 蓬松的羽毛 饮食较少	} }	IBV特异性: 轻度(如果它们开始发生, N.B. 呼吸道症状自2-3dpi开始显现, 并可以持续至多达7d)。 轻度, 如果超过2d则增大到中度
[0163]	饮用过量: 通过流体填充的喙囊或测量的水摄入显示	—	IBV特异性: 轻度, 如果超过24h则增大到中度最大为2d。如果仍然过量饮用, 则通过计划1方法杀死。
	较少活动但仍逃避捕捉 体重损失 不吃不喝 鸟独自坐着且不逃避捕捉 严重呼吸窘迫: 过度喘气 总共7d的Snicking和/或罗音	} }	轻度, 如果超过1d则增大到中度。 中度: 鸟在终点。通过计划1方法杀死。
	发现死亡	—	严重: 向项目许可持有人报告。 待进行全面尸检。

[0164] 当在冠状病毒中表达时,本发明的变体复制酶可以引起病毒在卵内以非致病性水平复制。

[0165] 在开发卵内施用于鸡胚的疫苗时,必须注意两点:母体抗体对疫苗的作用和疫苗对胚胎的作用。已知母体抗体干扰主动免疫。例如,当对具有母体抗体的肉鸡施用时,具有温和病毒株的疫苗不诱导保护性抗体水平,因为这些病毒株被母体抗体库中和。

[0166] 因此,病毒颗粒必须在复制和繁殖时足够高效,以确保其不被母体衍生的针对病毒的抗体中和。母体衍生的抗体是有效抗体的有限集合,其随着鸡龄而减少,并且以这种方式的病毒的中和不等同于胚胎/雏鸡建立的长期免疫力。为了形成针对病毒的长期免疫力,胚胎和孵化的鸡必须形成不同于母体衍生抗体的效果的合适的保护性免疫应答。

[0167] 为了有用于卵内接种,病毒还必须不能以导致其对胚胎致病性的水平复制和繁殖。

[0168] 就胚胎而言,降低的致病性可以意味着与相应的野生型对照冠状病毒相比,冠状病毒引起孵化率的较少降低。因此,当与对照冠状病毒相比时,本发明上下文中的术语“对胚胎无致病性”可以意指“不引起降低的孵化率”。

[0169] 可以使用本领域已知的方法鉴定合适的变体复制酶。例如,可以在具有或不具有母体衍生抗体的胚胎的卵内接种(即其中所述产卵者已针对或未针对IBV接种)之后,进行比较攻击实验。

[0170] 如果变体复制酶使得病毒以过高的水平繁殖,则胚胎不会孵化或在孵化后不存活(即病毒对胚胎是致病的)。对胚胎致病的病毒可以杀死胚胎。

[0171] 如果变体复制酶导致病毒复制和繁殖的极大地减少,则病毒将被母体衍生的抗体中和。随后用IBV攻击雏鸡将导致临床症状(例如哮喘,snicking,纤毛活动丧失)的发展和受攻击的雏鸡中的疾病发作;因为它将不能形成针对该病毒的有效免疫力。

[0172] 变体

[0173] 如本文所使用的,术语“变体”与“突变体”同义,并指与相应的野生型序列相比不同的核酸或氨基酸序列。

[0174] 变体/突变序列可以天然产生,或可以人工创造(例如通过定点诱变)。突变体可以与野生型序列的相应部分具有至少70、80、90、95、98或99%的序列同一性。突变体可以在野生型序列的相应部分上具有少于20、10、5、4、3、2或1个突变。

[0175] 术语“野生型”用于意指具有分别与天然基因或蛋白质(即病毒基因或蛋白质)相同的核苷酸或氨基酸序列的基因或蛋白质。

[0176] 同一性比较可以通过肉眼进行,或者更通常地借助于容易获得的序列比对程序进行。这些商业上可获得的计算机程序可以计算两条或多条序列之间的%同一性。用于进行此类比对的合适的计算机程序是GCG Wisconsin Bestfit软件包(威斯康星大学,U.S.A.; Devereux等,1984,Nucleic Acids Research 12:387)。可以执行序列比对的其他软件的示例包括但不限于BLAST软件包(参见Ausubel等,1999ibid-第18章)、FASTA(Atschul等,1990,J.Mol.Biol.,403-410)和GENEWORKS比对工具套件、ClustalX(参见Larkin等(2007) Clustal W and Clustal X version 2.0.Bioinformatics,23:2947-2948)。BLAST和FASTA都可用于离线和在线搜索(参见Ausubel等,1999ibid,第7-58至7-60页)。然而,对于一些应用,优先使用GCG Bestfit程序。一种称为BLAST 2 Sequences的新工具也可用于比对蛋白质和核苷酸序列(参见FEMS Microbiol Lett 1999 174(2):247-50;FEMS Microbiol Lett 1999 177(1):187-8和tatiana@ncbi.nlm.nih.gov)。

[0177] 序列可以具有氨基酸残基的一个或多个缺失、插入或取代,其产生沉默变化并导致功能上等同的分子。可以基于残基的极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性和/或两亲性性质的相似性有意地进行氨基酸取代,只要保留活性即可。例如,带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸;带正电荷的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸;具有相似亲水性值的不带电极性头部基团的氨基酸包括亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甘氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。

[0178] 可以例如根据下表进行保守性取代。第二列中相同栏(block)中的氨基酸,且优选在第三列中的同一行中的氨基酸可以彼此取代:

[0179]

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

[0180] 本发明的冠状病毒可以包含变体复制酶基因,其编码与SEQ ID NO:6,7,8或9中任一个相比包含突变的蛋白,当在冠状病毒中表达时,导致病毒与表达相应野生型复制酶的冠状病毒相比具有减少的致病性。

[0181] 变体复制酶基因可以编码在nsp-10,nsp-14,nsp-15和nsp-16的任意组合中包含至少一个或多个氨基酸突变的蛋白。

[0182] 本发明的冠状病毒的变体复制酶基因可以编码蛋白,该蛋白质包含图10中呈现的M41mod序列中所定义的突变。

[0183] 本发明的冠状病毒的变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含选自下列的一个或多个氨基酸突变:

[0184] 在SEQ ID NO:6第85位的Pro到Leu,

[0185] 在SEQ ID NO:7第393位的Val到Leu;

[0186] 在SEQ ID NO:8第183位的Leu到Ile;

[0187] 在SEQ ID NO:9第209位的Val到Ile。

[0188] 本发明的冠状病毒的变体复制酶基因可以编码不包含nsp-2,nsp-3,nsp-6或nsp-13中的突变的蛋白。

[0189] 本发明的冠状病毒的变体复制酶基因可以编码不包含nsp10中的突变的蛋白,其对应于由Ammayappan等报道的nsp10基因中核苷酸位置12,008处的突变所引起的苏氨酸至异亮氨酸的突变(Arch Virol (2009) 154:495-499)。

[0190] Ammayappan等(如上文)报道了负责IBV病毒株Arkansas DPI的减毒的序列变化的鉴定。该研究在含胚胎中的病毒的多次传代(约100代)后,鉴定出多种IBV蛋白中的17个氨基酸变化。没有研究减毒病毒(Ark DPI 101)是否能够在母体衍生的针对卵内病毒的抗体的存在下复制,而不对胚胎是致病性的。鉴于该病毒是通过在SPF含胚胎中多次传代产生的(与用于经典IBV疫苗的相似方法学),可能该病毒对胚胎是致病性的。如果母鸡用相似的血清型接种,则病毒也可能对母体衍生的抗体敏感。

[0191] 本发明的冠状病毒的变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含上文列举的一个或多个氨基酸突变的任何组合。

[0192] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:6第85位的Pro到Leu的氨基酸突变。

[0193] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:7第393位的Val到Leu的氨基

酸突变。

[0194] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:8第183位的Leu到Ile的氨基酸突变。

[0195] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:9第209位的Val到Ile的氨基酸突变。

[0196] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:6第85位的Pro到Leu和在SEQ ID NO:7第393位的Val到Leu的氨基酸突变。

[0197] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:6第85位的Pro到Leu,在SEQ ID NO:8第183位的Leu到Ile的氨基酸突变。

[0198] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:6第85位的Pro到Leu和在SEQ ID NO:9第209位的Val到Ile的氨基酸突变。

[0199] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:7第393位的Val到Leu和在SEQ ID NO:8第183位的Leu到Ile的氨基酸突变。

[0200] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:7第393位的Val到Leu和在SEQ ID NO:9第209位的Val到Ile的氨基酸突变。

[0201] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:8第183位的Leu到Ile和在SEQ ID NO:9第209位的Val到Ile的氨基酸突变。

[0202] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:6第85位的Pro到Leu,在SEQ ID NO:7第393位的Val到Leu,和在SEQ ID NO:8第183位的Leu到Ile的氨基酸突变。

[0203] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:6第85位的Pro到Leu,在SEQ ID NO:8第183位的Leu到Ile,和在SEQ ID NO:9第209位的Val到Ile的氨基酸突变。

[0204] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:6第85位的Pro到Leu,在SEQ ID NO:7第393位的Val到Leu,和在SEQ ID NO:9第209位的Val到Ile的氨基酸突变。

[0205] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:7第393位的Val到Leu,在SEQ ID NO:8第183位的Leu到Ile,和在SEQ ID NO:9第209位的Val到Ile的氨基酸突变。

[0206] 变体复制酶基因可以编码蛋白,其包含在SEQ ID NO:6第85位的Pro到Leu,在SEQ ID NO:7第393位的Val到Leu,在SEQ ID NO:8第183位的Leu到Ile,和在SEQ ID NO:9第209位的Val到Ile的氨基酸突变。

[0207] 变体复制酶基因也可以在核苷酸水平上定义。

[0208] 例如,本发明的冠状病毒的变体复制酶基因的核苷酸序列可以包含选自下列区域中的一个或多个核苷酸取代:SEQ ID NO:1的11884-12318、16938-18500、18501-19514和19515-20423。

[0209] 例如,本发明冠状病毒的变体复制酶基因的核苷酸序列与示于SEQ ID NO:1的序列相比,可以包含一个或多个选自下列的核苷酸取代:

[0210] 在核苷酸第12137位的C到T;

[0211] 在核苷酸第18114位的G到C;

[0212] 在核苷酸第19047位的T到A;和

[0213] 在核苷酸第20139位的G到A。

[0214] 如本文所用,术语“取代”与术语突变同义,并且意指指定位置处的核苷酸不同于

野生型核苷酸序列的核苷酸。

[0215] 与示于SEQ ID NO:1的序列相比,核苷酸序列可以包括选自以下列中的核苷酸取代的任何组合:

[0216] 在核苷酸第12137位的C到T;

[0217] 在核苷酸第18114位的G到C;

[0218] 在核苷酸第19047位的T到A;和

[0219] 在核苷酸第20139位的G到A。

[0220] 核苷酸序列可以包含取代C12137T。

[0221] 核苷酸序列可以包含取代G18114C。

[0222] 核苷酸序列可以包含取代T19047A。

[0223] 核苷酸序列可以包含取代G20139A。

[0224] 核苷酸序列可以包含取代C12137T和G18114C。

[0225] 核苷酸序列可以包含取代C12137T和T19047A。

[0226] 核苷酸序列可以包含取代C12137T和G20139A。

[0227] 核苷酸序列可以包含取代G18114C和T19047A。

[0228] 核苷酸序列可以包含取代G18114C和G20139A。

[0229] 核苷酸序列可以包含取代T19047A和G20139A。

[0230] 核苷酸序列可以包含取代C12137T、G18114C和T19047A。

[0231] 核苷酸序列可以包含取代C12137T、T19047A和G20139A。

[0232] 核苷酸序列可以包含取代C12137T、G18114C和G20139A。

[0233] 核苷酸序列可以包含取代G18114C、T19047A和G20139A。

[0234] 核苷酸序列可以包含取代C12137T、G18114C、T19047A和G20139A。

[0235] 核苷酸序列可以不包含对应于Ammayappan等报道的C12008T取代的取代(如上)。

[0236] 核苷酸序列可以是天然的、合成的或重组的。其可以是双链或单链,其可以是DNA或RNA或其组合。其可以是例如cDNA、PCR产物、基因组序列或mRNA。

[0237] 核苷酸序列可以是经密码子优化的,用于在所选择的宿主/宿主细胞中生产。

[0238] 其可以是分离的,或作为质粒、病毒或宿主细胞的一部分。

[0239] 质粒

[0240] 质粒是与染色体DNA分开的染色体外DNA分子,其能够独立于染色体DNA复制。它们通常是环状和双链的。

[0241] 质粒或载体(如它们有时候被称为的)可用于在宿主细胞中表达蛋白。例如,为了表达该蛋白,可以用能够编码特定蛋白的质粒转染细菌宿主细胞。该术语还包括能够容纳较长部分的DNA的酵母人工染色体和细菌人工染色体。

[0242] 本发明的质粒包含能够编码复制酶蛋白的确定区域的核苷酸序列。其还可以包含一个或多个另外的冠状病毒核苷酸序列或能够编码一种或多种其它冠状病毒蛋白例如S基因和/或基因3的核苷酸序列。

[0243] 质粒还可以包含抗性标志物,例如来自大肠杆菌的鸟嘌呤黄嘌呤磷酸核糖基转移酶基因(gpt),其在黄嘌呤和次黄嘌呤的存在下赋予对霉酚酸(MPA)的抗性,并且由痘苗病毒P7.5早期/晚期启动子控制。

[0244] 重组疫苗病毒

[0245] 本发明还涉及包含如本文定义的变体复制酶基因的重组痘苗病毒 (rVV)。

[0246] 可以使用基于反向遗传学系统的痘苗-病毒来制备重组痘苗病毒 (rVV)。

[0247] 在这方面,本发明还提供了通过以下方法制备病毒颗粒的方法,其通过:

[0248] (i) 将如前述部分所述的质粒转染至宿主细胞;

[0249] (ii) 用包含具有复制酶基因的冠状病毒株的基因组的重组病毒感染宿主细胞;

[0250] (iii) 允许在质粒中的复制酶基因序列和重组病毒基因组中的相应序列之间发生同源重组,以产生修饰的复制酶基因;

[0251] (iv) 选择包含所述修饰的复制酶基因的重组病毒。

[0252] 术语“修饰的复制酶基因”是指复制酶基因,其包含如本文所述与本发明第一方面相关的变体复制酶基因。具体地,该术语是指衍生自野生型复制酶基因,但包含导致其编码如本文定义的变体复制酶蛋白的核苷酸序列的基因。

[0253] 重组可以涉及全部或部分复制酶基因。例如,重组可以涉及编码nsp-10、nsp-14、nsp-15和/或nsp-16的任何组合的核苷酸序列。重组可涉及核苷酸序列,其编码如上定义的氨基酸突变或包含如上定义的核苷酸取代。

[0254] 冠状病毒株的基因组可缺少复制酶蛋白的部分,其对应于由质粒提供的部分,从而通过由质粒提供的核苷酸序列的插入来形成修饰的蛋白质。

[0255] 重组病毒是适于允许其基因组与质粒之间同源重组的病毒。痘苗病毒是特别适合的,因为同源重组常规地用于痘苗病毒基因组的序列插入和缺失。

[0256] 上述方法任选地包括以下步骤:

[0257] (v) 回收重组冠状病毒,其包含来自步骤(iv)的重组病毒的DNA

[0258] 中的修饰的复制酶基因。

[0259] 用于回收重组冠状病毒(例如重组IBV)的方法是本领域已知的(参见Britton等(2005)参见第24页;和PCT/GB2010/001293)。

[0260] 例如,来自步骤(iv)的重组病毒的DNA可以插入质粒中并用于转染表达胞质T7RNA聚合酶的细胞。细胞可以例如用表达T7RNA聚合酶的禽痘病毒预感染。然后可以例如从生长培养基中分离重组冠状病毒。

[0261] 当质粒插入痘苗病毒基因组时,形成不稳定的中间体。可以例如使用质粒上的抗性标志物来选择包含该质粒的重组体。

[0262] 然后可以通过例如PCR和测序验证阳性重组体含有修饰的复制酶基因。

[0263] 可以生长(grown up)大量包括修饰的复制酶基因的重组病毒,例如重组痘苗病毒(rVV),并提取DNA以实施步骤(V)。

[0264] 适合的反向遗传学系统是本领域已知的(Casais等(2001)J.Virol 75:12359-12369;Casais等(2003)J.Virol.77:9084-9089;Britton等(2005)J.Virological Methods 123:203-211;Armesto等(2008)Methods in Molecular Biology 454:255-273)。

[0265] 细胞

[0266] 冠状病毒可用于感染细胞。

[0267] 例如,可以通过本领域已知的方法从上清液中收获冠状病毒颗粒,并任选地纯化。

[0268] 细胞可用于产生冠状病毒颗粒。

[0269] 因此,本发明还提供了用于生产冠状病毒的方法,其包括以下步骤:

[0270] (i) 用根据本发明的冠状病毒感染细胞;

[0271] (ii) 使所述病毒在所述细胞中复制;和

[0272] (iii) 收获后代病毒。

[0273] 本发明还提供了能够使用反向遗传学系统产生根据本发明的冠状病毒的细胞。例如,细胞可以包含重组病毒基因组,其包含能够编码本发明的复制酶基因的核苷酸序列。

[0274] 细胞可以能够产生含有复制酶基因的重组体重组病毒(例如痘苗病毒)。

[0275] 或者,细胞可以能够通过反向遗传学系统产生重组冠状病毒。细胞可以表达或诱导表达T7聚合酶以拯救(rescue)重组病毒颗粒。

[0276] 疫苗

[0277] 冠状病毒可用于产生疫苗。疫苗可以通过本发明的冠状病毒的活的减毒形式,并且还可以包含药学上可接受的载体。如本文所定义,适用于本发明的“药学上可接受的载体”是本领域技术人员熟知的。此类载体包括但不限于水、盐水、缓冲盐水、磷酸盐缓冲液、醇/水溶液、乳液或悬浮液。可以根据常规技术加入其它常规使用的稀释剂和赋形剂。此类载体可以包括乙醇、多元醇及其适合的混合物、植物油和可注射的有机酯。也可以使用缓冲剂和pH调节剂。缓冲剂包括但不限于由有机酸或碱制备的盐。代表性的缓冲剂包括但不限于有机酸盐,例如柠檬酸的盐,例如柠檬酸盐、抗坏血酸、葡萄糖酸、组氨酸-Hel、碳酸、酒石酸、琥珀酸、乙酸或邻苯二甲酸、Tris、盐酸三甲铵,或磷酸盐缓冲液。胃肠外载体可包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、右旋糖、海藻糖、蔗糖,和氯化钠、乳酸林格氏液或不挥发性油。静脉内载体可以包括流体和营养补充剂、电解质补充剂,例如基于林格氏右旋糖等的那些。也可以在药物载体中提供防腐剂和其它添加剂,例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂(例如EDTA)、惰性气体等。本发明不受载体的选择的限制。从上述组分制备这些药学上可接受的组合物,具有合适的pH等渗性、稳定性和其它常规特征在本领域技术范围内。例如参见文章,诸如Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed, Lippincott Williams & Wilkins, pub!., 2000; 和The Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4. sup. th edit., eds. R. C. Rowe等, APhA Publications, 2003。

[0278] 本发明的疫苗将以“治疗有效量”施用,其是指当施用于受试者或患者时足以实现有益或期望结果的活性成分(例如根据本发明的试剂)的量。有效量可以一次或多次施用,应用(applications)或剂量施用(dosages)。根据本发明的组合物的治疗有效量可以容易地由本领域普通技术人员确定。在本发明的上下文中,“治疗有效量”是一个或多个与传染性支气管炎相关的参数中产生客观测量的变化的量,其足以产生有益或期望结果。可以在一次或多次施用施用有效量。为了本发明的目的,药物,化合物或药物组合物的有效量是足以降低传染性支气管炎发病率的量。如本文所用,术语“治疗性”涵盖疾病、病患或病症治疗的全部范围(full spectrum)本发明的“治疗剂”可以以预防(prophylactic)或预防(preventive)的方式(包括整合在旨在靶向可被鉴定为有风险的动物的程序中(药物遗传学))起作用;或者以本质上改善或治愈的方式;或可以起到减缓所治疗的疾病或病症的至少一种症状的进展的速率或程度的作用。

[0279] 本发明还涉及产生此类疫苗的方法,其包含用病毒颗粒感染细胞(例如Vero细胞)

的步骤,所述病毒颗粒包含定义于与本发明第一方面有关的复制酶蛋白。

[0280] 接种方法

[0281] 本发明的冠状病毒可用于治疗和/或预防疾病。

[0282] “治疗”意指将疫苗施用于患有既存疾病的受试者以减轻,降低或改善与疾病相关的至少一种症状,和/或减缓,降低或阻断疾病的进展。

[0283] “预防”意指将疫苗施用于尚未感染疾病,和/或未显示疾病的任何症状的受试者,以预防或削弱疾病(例如感染)的起因,或者减少或预防至少一种与疾病相关的症状的发展。

[0284] 疾病可以由冠状病毒引起的任何疾病,例如人类的呼吸疾病和/或胃肠炎,以及其他动物的肝炎、胃肠炎、脑炎或呼吸道疾病。

[0285] 疾病可以是传染性支气管炎(IB);猪流行性腹泻;传染性胃肠炎;小鼠肝炎病毒;猪血凝性脑脊髓炎;严重急性呼吸综合征(SARS);或蓝冠病。

[0286] 疾病可以是传染性支气管炎。

[0287] 疫苗可以施用于孵化的雏鸡或鸡,例如通过滴眼或鼻内施用。虽然准确,但这些方法例如对于大型肉鸡群体可以是昂贵的。替代方案包括施用至饮用水的喷雾接种(spray inoculation),但是使用这种方法难以确保均一的疫苗应用。

[0288] 疫苗可以以适于其施用的形式提供,例如用于眼内使用的滴眼剂。

[0289] 疫苗可以通过卵内接种施用,例如通过含胚卵注射。卵内疫苗接种具有提供对疾病的早期阶段抗性的优点。与通过饮用水的喷雾接种和施用不同,其还便于每个受试者施用均匀剂量。

[0290] 疫苗可以施用于卵的任何合适的区室(compartment),包括尿囊液、卵黄囊、羊膜、气囊或胚胎。它可以在壳(气室)膜和绒毛尿囊膜下施用。

[0291] 通常在胚胎发育的晚期期间,通常在孵化期的最后四分之一期间(例如孵化前3-4天)将疫苗注射到含胚卵中。在鸡中,疫苗可在21天孵化期的第15-19天之间(例如在第17或18天)施用。

[0292] 该过程可以使用机器人注射过程自动化,例如在WO 2004/078203中描述的那些。

[0293] 疫苗可以与一种或多种其他疫苗一起施用,例如用于其它疾病的疫苗,例如新城疫病毒(Newcastle disease virus)(NDV)。本发明还提供了包含根据本发明的疫苗以及一种或多种其它疫苗的疫苗组合物。本发明还提供了试剂盒,其包含根据本发明的疫苗以及一种或多种用于单独,序贯或同时施用的其它疫苗。

[0294] 本发明的疫苗或疫苗组合物可用于治疗人,动物或禽类受试者。例如,受试者可以是雏鸡,鸡或小鼠(例如实验室小鼠,例如转基因小鼠)。

[0295] 通常,医师或兽医将确定最适合个体受试者或受试者组的实际剂量,并且其将随着具体受试者的年龄,体重和响应而变化。

[0296] 组合物可任选地包含药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或佐剂。药物载体、赋形剂或稀释剂的选择可以根据预期的施用途径和标准药学实践来选择。药物组合物可以包含(或除了)载体、赋形剂或稀释剂、任何合适的粘合剂、润滑剂、悬浮剂、包衣剂、增溶剂,和可以辅助或增加病毒的递送或免疫原性的其它载体剂。

[0297] 现在将通过实施例进一步描述本发明,这些实施例用于帮助本领域普通技术人员

实施本发明,而不以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0298] 实施例1:基于M41-CK的IBV反向遗传系统的生成

[0299] 通过用衍生自M41共有序列的合成的cDNA替换先前描述于PCT/GB2010/001293(通过引用并入本文)中的痘苗病毒反向遗传学系统中的Beaudette cDNA,来产生M41-CK全长cDNA。

[0300] 重组痘苗病毒(rVV)的rVV-BeauR-Rep-M41结构中的IBV cDNA描述于Armesto, Cavanagh and Britton(2009). PLoS ONE 4(10):e7384.doi:10.1371/journal.pone.0007384,其由衍生自IBV Beaudette病毒株的复制酶以及来自IBV M41-CK的结构和辅助基因(structural and accessory genes)和3' UTR组成,还进一步用来自IBV M41-CK的相应序列替换Beaudette的5' UTR-Nsp2-Nsp3序列。所得的IBV cDNA由来自M41的5' UTR-Nsp2-Nsp3,来自Beaudette的Nsp4-Nsp16和来自M41的结构和辅助基因和3' UTR组成。该cDNA通过Beaudette Nsp4-Nsp16序列的缺失被进一步修饰。缺失Nsp4-16的所得cDNA在四个进一步的步骤中修饰,其中缺失的Nsps被来自M41-CK的相应序列依次替换,替换cDNA表示为M41-CK Nsp4-8、Nsp9-12、Nsp12-14和最后的Nsp15-16。每个替换cDNA含有在5'端对应于之前插入的M41序列的3'大部分(most)的约500个核苷酸,和在3'端对应于M41S基因序列的约500个核苷酸。这允许通过同源重组的M41 cDNA序列的插入和连续的(contiguous)M41复制酶基因序列的序贯添加。通过使用本发明人先前描述的瞬时显性选择(TDS)系统(参见PCT/GB2010/001293)的同源重组,加入含有M41衍生的Nsp序列的合成的cDNA。包含对应于M41Nsps-10、-14、-15和-16的序列的M41衍生的cDNA分别在第85、393、183和209位含有修饰的氨基酸,如图10所示。

[0301] 在代表合成的序列的痘苗病毒中产生代表M41-CK基因组的全长cDNA。拯救了两个rIBV,M41-R-6和M41-R-12,并显示以与M41-CK相似的方式生长(图1)。

[0302] 实施例2:确定拯救的M41病毒的致病性

[0303] 使用实施例1中拯救的病毒通过眼部和鼻部接种感染8天龄无特定病原的(SPF)雏鸡,以测试它们的致病性,如通过基于感染后3-7天每天的临床症状,和对感染后第4天和第6天的纤毛活动所观察到的。纤毛活动的丧失是确定IBV的致病性的公认的方法。当与M41-CK相比时,两种M41-R病毒被发现是无致病性的,尽管与未感染的对照雏鸡(图2)相比,它们确实显示出一些临床症状,和一些但不一致(inconsistent)的纤毛活动的丧失。

[0304] 因此,与亲本病毒M41-CK相比,M41-CK的M41-R分子克隆不是致病的。

[0305] 本发明人鉴定了与M41-CK序列相比M41-R中的几个核苷酸差异。这些中的大多数是同义突变,因为核苷酸变化不影响与该序列相关的蛋白的氨基酸序列。然而,在IBV复制酶基因中鉴定出四种非同义突变,其特异于复制酶基因的Nsp-10,Nsp-14,Nsp-15and Nsp-16组分,这些突变导致氨基酸的改变(表3)。

[0306] 表3. 在M41-R全长基因组的Nsps中鉴定的非同义突变

[0307]

复制酶的区域	核苷酸位置	核苷酸突变	氨基酸改变
Nsp10	12137	C→T	Pro→Leu
Nsp14	18114	G→C	Val→Leu

Nsp15	19047	T→A	Leu→Ile
Nsp16	20139	G→A	Val→Ile

[0308] 实施例3:M41-R rIBVs的修复

[0309] 为了确定所鉴定的突变是否负责与M41-R相关的致病性的丧失,修复了Nsp10突变且修复了Nsp-14、-15和-16中的突变,并显示出一与M41-CK相似的方式生长(图9)。因此,发明人利用发明人之前描述的(TDS)系统(参见PCT/GB2010/001293),使用含有正确的核苷酸的合成的cDNA生成了rIBVs、M41R-nsp10rep和M41R-nsp14,15,16rep。

[0310] 如前所述在雏鸡中评估rIBV的致病性。当与M41-R相比时,两种rIBV显示出增加的致病性,但不是用M41-CK观察到的水平(图4和5)。M41R-nsp14,15,16rep比M41R-nsp10rep产生更多的临床症状和更多的纤毛活动减少,总体上这些结果表明与四个Nsps相关的变化似乎影响致病性。

[0311] 为了确定Nsps在致病性中的作用,使用对应于M41R-nsp10rep的全长cDNA以修复Nsps14,15和16中的突变,其利用TDS系统使用含有正确核苷酸的合成的cDNA。

[0312] 产生了以下rIBV:

[0313] M41R-nsp10,15rep—具有Nsp-10和Nsp-15中的突变修复的M41-R

[0314] M41R-nsp10,14,15rep—具有Nsp-10,Nsp-14和Nsp-15中的突变修复的M41-R

[0315] M41R-nsp10,14,16rep—具有Nsp-10,Nsp-14和Nsp-16中的突变修复的M41-R

[0316] M41R-nsp10,15,16rep-具有Nsp-10,Nsp-15和Nsp-16中的突变修复的M41-R

[0317] M41-K-M41-R中所有的四个突变Nsp-10,Nsp-14,Nsp-15和Nsp-16是修复的。

[0318] rIBV显示出以与M41-CK相似的方式生长(图9),并如前所述评估致病性。M41-K(其中所有四种突变已被修复)在感染后4天导致临床症状和100%纤毛活动丧失(完全纤毛停滞)(图6,7和8)。除了M41R-nsp10,15,16rep(其基本上是非致病性的)之外,其他rIBV表现出不同程度的致病性。这些结果证实所有四个Nsps的修复,恢复了M41-R的致病性;再次支持先前的证据,即描述于四个Nsps中的突变涉及减毒的M41-CK。

[0319] 本发明人还生成了rIBV M41R-nsp 10,14rep(nsp 10和nsp 14被修复,nsp 15和nsp 16含有突变)和rIBV M41R-nsp 10,16rep(nsp 10和nsp 16被修复,nsp 14和nsp 15含有突变)并评估了这些病毒的致病性。

[0320] rIBV M41R-nsp 10,14rep比M41-K的致病性低,但在感染后第4-6天引起约50%的纤毛停滞。rIBV M41R-nsp 10,16rep几乎无致病性,并且不引起纤毛停滞(参见图11a-c)。

[0321] 因此,与M41-R相关的基因组是用于合理的减毒IBV的潜在骨架基因组。

[0322] 实施例4:用M41-R的接种/攻击研究

[0323] 在研究中测试了候选疫苗病毒,其中受精的鸡卵在18天的胚胎发育中卵内接种,且其中测定接种的卵的孵化率。研究了鸡的临床健康,并在21天龄时用毒性IB M41攻击病毒以每剂 $10^{3.65}$ EID₅₀攻击鸡。

[0324] 在通过疫苗的攻击保护后研究临床症状,并在攻击后5天进行纤毛停滞测试,以研究攻击病毒对纤毛运动的影响和通过疫苗对抗纤毛停滞(纤毛运动的抑制)的保护。

[0325] 商业肉鸡卵的卵内接种

[0326] 实验的设计在表4中给出,且临床结果在表5中给出。用IB M41-R接种的卵的孵化率良好,且鸡是健康的。在肉鸡中攻击后,IB M41-R保护其免受临床症状(安慰剂:19/19受

影响,IB M41-R:3/18受影响和1死亡)。纤毛停滞测试的结果在表6中给出。IB M41-R产生针对纤毛停滞的保护。

[0327] 表4-商业鸡卵的孵化率、安全性、功效研究的设计

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

[0329] ¹剂量体积0.1ml, NA, 不适用。

[0330] ² 10^{3.65}EID₅₀/每剂量。

[0331] 表5-商业鸡中攻击前后的孵化百分比和临床数据, 设计参见表1。

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

[0333] ¹扰乱的 (disturbed) 呼吸系统

[0334] ²发出嗖嗖声 (Whizzing)

[0335] ³嗓音的改变

[0336] ⁴呼吸困难

[0337] ⁵眶内窦肿胀

[0338] ⁶生长不均

[0339] ⁷弱小

[0340] 表6-攻击后的纤毛停滞测试的结果, 设计参见表1。

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

[0343] 无特定病原的 (SPF) 鸡卵的卵内接种

[0344] 在SPF鸡卵中的研究的设计在表7中给出, 并且与使用商业肉鸡的研究的设计相似, 但是IB M41-R的接种剂量更高 (10⁵EID₅₀每剂)。

[0345] 结果(表8)显示了IB M41-R孵化的孵化百分比低,40枚中孵化出19枚,且雏鸡弱小。八只雏鸡死亡。攻击剩余的11只鸡,并攻击已用盐水接种的从鸡卵中孵出的雏鸡。

[0346] 在攻击后的纤毛停滞测试中,似乎所有用IB M41-R在卵内接种的鸡都被保护,而没有对照被保护,参见表9。

[0347] 表7.SPF鸡卵中的孵化率、安全性、功效研究的设计

[0348]	处理	处理说明	EID ₅₀ ¹ 每剂	施用 途径	施用 天数	攻击天数 ²	研究 结束	每个处 理的鸡 卵数目
	T01	IB M41-R	10 ⁵	卵内	18 天 胚	在21天龄	在 26	40
	T04	盐水	NA	卵内	胎发育		天龄	40
	NTX	NA	NA	NA		NA		10

[0349] ¹剂量体积0.1ml,NA,不适用。

[0350] ²攻击剂量10^{3.3}EID₅₀在0.2ml中。

[0351] 表8-SPF鸡中攻击前后的孵化百分比和临床数据,设计参见表7。

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

[0353] 表9.攻击后的纤毛停滞测试的结果,设计参见表7。

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

[0355] 总之,IB M41-R在商业卵中是安全的,产生了针对临床症状和一定程度上针对纤毛停滞的保护。

[0356] 在用IB M41R接种的SPF卵中,孵出相对较少数量的鸡。这可能是由于使用的每个卵10⁵EID₅₀的IB M41-R。这比之前的具有更高水平孵化率的研究中使用的剂量高10倍。较低的孵化百分比还可以由SPF卵的批次对病毒具有特别高的易感性所引起的,因为在其他研究中胚胎死亡率的水平也高于先前观察到的水平。

[0357] 攻击后,所有孵化后存活的鸡完全针对纤毛停滞受到保护。结论是IB M41-R作为在卵内施用的疫苗具有巨大的潜力。

[0358] 在上述说明书中提及的所有出版物通过引用并入本文。在不脱离本发明的范围和精神的情况下,本发明的所描述的方法和系统的各种修改和变化对于本领域技术人员将是显而易见的。虽然已经结合具体的优选实施例描述了本发明,但是应当理解,要求保护的本

发明不应该不适当地限于这些具体实施例。实际上,对于分子生物学,病毒学或相关领域的技术人员来说显而易见的用于实施本发明的所述模式的各种修改旨在以下权利要求的范围内。

序列表

<110> 皮尔布莱特研究所

<120> 冠状病毒

<130> P104637PCT

<150> GB 1413020.7

<151> 2014-07-23

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 27500

<212> DNA

<213> 传染性支气管炎病毒

<400> 1

[0001]

```

acttaagata gatattaata tatatctatc acactagcct tgcgctagat ttccaactta      60
acaaaacgga cttaaatacc tacagctggt cctcataggt gttccattgc agtgcacttt      120
agtgcctctg atggcacctg gccacctgtc aggtttttgt tattaaaatc ttattgttgc      180
tggtatcact gcttgttttg ccgtgtctca ctttatacat ccgttgcttg ggctacctag      240
tatccagcgt cctacgggcg ccgtggctgg ttcgagtgcg aagaacctct ggttcactta      300
gcggtaggcg ggtgtgtgga agtagcactt cagacgtacc gtttctgttg tgtgaaatac      360
ggggtcacct cccccacat acctctaagg gcttttgagc ctacgcttgg gctacgttct      420
cgcataaggt cggtatacag acgtttgtag ggggtagtgc caaacaaccc ctgaggtgac      480
aggttctggt ggtgtttagt gagcagacat acaatagaca gtgacaacat ggcttcaagc      540
ctaaaacagg gagtatctcc caaactaagg gatgtcattc ttgtatcaa agacattcct      600
gaacaacttt gtgacgcttt gtttttctat acgtcacaca accctaagga ttacgtgat      660
gcttttcgag ttaggcagaa gtttgatcgt aatctgcaga ctgggaaaca gttcaaattt      720
gaaactgtgt gtggtctctt cctcttgaag ggagttgaca aaataacacc tggcgtecca      780
gcaaaagtct taaaagccac ttctaagttg gcagatttag aagacatctt tgggtgtctt      840
ccctttgcaa gaaaatctcg tgaacttttg aagacagcat gccagtggtc tcttactgta      900
gaaacactgg atgctcgtgc aaaaactctt gatgaaattt ttgacctac tgaaatactt      960
tggtctcagg tggcagcaaa aatccaagtt tcggctatgg cgatgcgcag gcttgttggg      1020
gaagtaactg caaaagtcag ggatgctttg ggctcaaata tgagtgtctt tttccagatt      1080
tttaaacaac aaatagtcag aatttttcaa aaagcgtcgg ctatttttga gaatgtgagt      1140
gaattaccac agcgtattgc agcacctaag atggcttttg ctaagtgtgc caagtccatt      1200
actgttgtag ttaaggagag gactctagtt gttagagagt tcgcaggaac ttgtcttgca      1260
agcattaatg gtgctgttgc aaaattcttt gaagaactcc caaatgggtt catgggtgct      1320
aaaaatttca ctacacttgc cttctttagg gaggtgcgag tgaaaattgt ggataacata      1380
ccaaatgcac cgagaggcac taaagggttt gaagtcgttg gtaatccaa aggtacacaa      1440
gttgttgtgc gtggcatgcg aaatgactta aactgcttg accaaaaagc tgaaattcct      1500
gtggagtcag aaggttggtc tgcaattttg gttggacatc ttgtcatgt ctttaagagt      1560
ggtgatcgct ttacgcggc acctctttca ggaaattttg cattgcatga tgtgcattgt      1620
tgtgagcgtg ttgtctgtct ttctgatggt gtaacaccgg agataaatga tggacttatt      1680

```

[0002]

```

cttcagcaa tctactctt ttttagtgc gcagaacttg tggcagccat taaaaggggt 1740
gaaccattta agtttctggg tcataaattt gtgtatgcaa aggatgcagc agtttctttt 1800
acattagcga aggtctctac tattgcagat gttttgaagc tgtttcaate agcgcgtgtg 1860
aaagtagaag atgtttggtc ttcacttact gaaaagtctt ttgaattctg gaggcttgca 1920
tatggaaaag tgcgtaatct cgaagaattt gttaagactt gtttttgtaa ggctcaaatg 1980
gcgattgtga ttttagcgac agtgcttgga gagggcattt ggcatcttgt ttcgcaagtc 2040
atctataaag taggtgtctt ttttactaaa gttgttgact ttttgaaaa atattggaaa 2100
ggtttttgtg cacagttgaa aagagctaag ctcatgtgca ctgaaacctt ctgtgttttg 2160
aaaggagtgg cacagcattg ttttcaacta ttgctggatg caatacagtt tatgtataaa 2220
agttttaaga agtgtgcact tggtagaatc catggagact tgctcttctg gaaaggaggt 2280
gtgcacaaaa ttattcaaga gggcgatgaa atttggtttg acgccattga tagtattgat 2340
gttgaagatc tgggtgttgt tcaagaaaaa ttgattgatt ttgatgtttg tgataatgtg 2400
acacttccag agaaccaacc cggtcatatg gttcaaatcg aggatgcagg aaagaactac 2460
atgttcttcc gcttcaaaaa ggatgagaac atttattata caccaatgtc acagcttggg 2520
gctattaatg tggtttgcaa agcaggcggg aaaactgtca cctttggaga aactactgtg 2580
caagaaatac caccacctga tgttgtgttt attaggtta gcattgagtg ttgtggtgaa 2640
ccatggaata caatcttcaa aaaggcttat aaggagccca ttgaagtaga gacagacctc 2700
acagttgaac aattgctctc tgtggctctat gagaaaatgt gtgatgatct caagctgttt 2760
ccggaggctc cagaaccacc accatttgag aatgtcacac ttgttgataa gaatggtaaa 2820
gatttggatt gcataaaatc atgccaictg atctatcgtg attatgagag cgatgatgac 2880
atcgaggaag aagatgcaga agaattgtac acggattcag gtgatgctga ggagtgtgac 2940
actaattcag aatgtgaaga agaagatgag gatactaaag tgttggtctt tatacaagac 3000
ccggcaagta acaaatatcc tctgcctctt gatgatgatt atagcgtcta caatggatgt 3060
attgttcata aggacgtctt cgatgttgtg aatttaccat ctggtgaaga aacctttgtt 3120
gtcaataact gctttgaagg ggctgttaaa gctcttccgc agaaagtat tgatgttcta 3180
ggtgactggg gtgaggctgt tgatgcgcaa gaacaattgt gtcaacaaga atcaactcgg 3240
gtcatatctg agaaatcagt tgagggtttt actggtagtt gtgatgcaat ggctgaacaa 3300
gctattgttg aagagcagga aatagtacct gttgttgaac aaagtcagga tgtagttgtt 3360
tttacacctg cagacctaga agttgttaaa gaaacagcag aagaggttga tgagtttatt 3420
ctcatttctg ctgtccctaa agaagaagtt gtgtctcagg agaaagagga gccacaggtt 3480
gagcaagagc ctaccctagt tgtaaaagca caacgtgaga agaaggctaa aaagtcaaaa 3540
gttaaacacc ctacatgtga aaaacccaaa tttttggagt acaaaacatg tgtgggtgat 3600
ttggctgttg taattgcaa agcattggat gattttaag agttctgcat tgtaaacgct 3660
gcaaatgagc acatgtcgca tgggtgtggc gttgcaaagg caattgcaga cttttgtgga 3720
ccggactttg ttgaatattg cgcggactat gttaagaaac atggtccaca gcaaaaactt 3780
gtcacacctt catttgttaa aggcattcaa tgtgtgaata atgtttagg acctcgccat 3840
ggagacagca acttgcgtga gaagcttgtt gctgcttaca agagtgttct tgtaggtgga 3900
gtggttaact atgttgtgcc agttctctca tcagggaattt ttggtgtaga ttttaaaata 3960

```

[0003]

```

tcaatagatg ctatgcgcga agctttttaa ggttgtgcca tacgcgttct tttattttct 4020
ctgagtcaag aacacatcga ttatttcgat gcaacttgta agcagaagac aatttatctt 4080
acggaggatg gtgttaaata ccgtctgtgt gttttaaaac ctggtgattc tttgggtcaa 4140
tttgacagg ttttgcaag aaataaggta gtcttttcgg ctgatgatgt tgaggataaa 4200
gaaatcctct ttatacccac aactgacaag actattcttg aatattatgg tttagatgcg 4260
caaaagtatg taacatatit gcaaacgctt gcgcagaaat gggatgttca atatagagac 4320
aattttgtta tattagagtg gcgtgacgga aattgctgga ttagttcagc aatagttctc 4380
cttcaagctg ctaaaattag atttaaaggt tttcttgacg aagcatgggc taaactgttg 4440
gggtggagatc ctacagactt tgttgccctg tgttatgcaa gttgcaatgc taaagtaggt 4500
gatttttcag atgctaattg gcttttgccc aatttagcag aacattttga cgcagattac 4560
acaaatgcac ttcttaagaa gtgtgtgtcg tgcaattgtg gtgttaagag ttatgaactt 4620
aggggtcttg aagcctgtat tcagccagtt cgagcaccta atcttctaca ttttaaacg 4680
caatattcaa attgccaac ctgtggtgca agtagtacgg atgaagtaat agaagcttca 4740
ttaccgtact tattgtcttt tgctactgat ggtcctgcta cagttgattg tgatgaaaat 4800
gctgtagga ctgtgtttt cattggtctt actaatagtg gccattgtta tacacaagcc 4860
gatggtaaag cttttgacaa tcttgctaag gatagaaaat ttggaaggaa gtcgccctac 4920
attacagcaa tgtatacacg tttttctctt aggagtgaat atcccctact tgttgttgaa 4980
catagtaagg gtaaagctaa agtagtaaaa gaagatgttt ctaaccttgc tactagtctt 5040
aaagccagtt ttgacgatct tactgacttt gaacagtggg atgatagcaa catctatgag 5100
agicttaaa gtcaggagac acctgataat cttgatgaat atgtgtcatt tacgacaaag 5160
gaagattcta agttgccact gacacttaaa gtttagagta tcaaatcagt tgttgacttt 5220
aggtctaagg atggttttac ttataagtta acacctgata ctgatgaaa ttcaaaaaca 5280
ccagtctact acccagtcct ggattctatt agtcttaggg caatatgggt tgaaggcagt 5340
gctaattttg ttgttgggca tccaaattat tatagtaagt ctctccgaat tcccacgttt 5400
tgggaaaatg ccgagagctt tgttaaaatg ggttataaaa ttgatgggtg aactatgggc 5460
ctttggcgtg cagaacacct taataaacct aatttgaga gaatttttaa cattgctaag 5520
aaagctattg ttggatctag tgttgttact acgcagtgtg gtaaaatact agttaaagca 5580
gctacatcac ttgccgataa agtaggtgat ggtgtagtgc gcaatattac agatagaatt 5640
aagggtcttt gtggattcac acgtggccat ttgaaaaga aaatgtccct acaatttcta 5700
aagacacttg tgttcttttt cttttatttc ttaaaggcta gtgctaagag tttagtttct 5760
agctataaga ttgtgttatg taagggtgtg tttgctacct tacttatagt gtggtttata 5820
tacacaagta atccagtagt gtttactgga atacgtgtgc tagacttcct atttgaaggt 5880
tctttatgtg gtccttataa tgactacggt aaagattctt ttgatgtgtt acgctattgt 5940
gcagggtgatt ttacttgtcg tgtgtgttta catgatagag attcacttca tctgtacaaa 6000
catgcttata gcgtagaaca aatttataag gatgcagctt ctggcattaa ctttaattgg 6060
aattggcttt atttggtctt tctaataatta tttgttaagc cagtggcagg ttttgttatt 6120
atttgttatt gtgttaagta tttggtattg agttcaactg tgttgcaaac tgggttaggt 6180
ttcttagatt ggtttgtaaa aacagttttt acccatttta attttatggg agcgggattt 6240

```

[0004]	tattttctggc tcttttacaa gatatacgta caagtgcac atatatgtga ctgtaaggat	6300
	gtaacatgtg aagtgtgcaa gagagttgca cgcagcaaca ggcaagaggt tagcgttgta	6360
	gttggtggac gcaagcaaat agtgcattgt tacactaatt ctggctataa cttttgtaag	6420
	agacataatt ggtattgttag aaattgtgat gattatggtc accaaaatac atttatgtcc	6480
	cctgaagtgt ctggcgagct ttctgaaaag cttaagcgcc atgttaaacc tacagcatat	6540
	gcttaccacg ttgtgtatga ggcatgcgtg gttgatgatt ttgttaattt aaaatataag	6600
	gctgcaattc ctggttaagga taatgcattc tctgctgtta agtgtttcag tggtacagat	6660
	tttttaaga aagctgtttt tcttaaggag gcattgaaat gtgaacaaat atctaattgat	6720
	ggttttatag tgtgtaatac acagagtgcg catgcactag aggaagcaaa gaatgcagcc	6780
	gtctattatg cgcaatatct gtgtaagcca atacttatac ttgaccagge actttatgag	6840
	caattaatag tagagcctgt gtctaagagt gttatagata aagtgtgtag cattttgtct	6900
	aatataatat ctgtagatac tgcagcttta aattataagg caggcacact tcgtgatgct	6960
	ctgctttcta ttaactaaaga cgaagaagcc gtagatatgg ctatcttctg ccacaatcat	7020
	gaagtggaat aactgtgtga cggttttact aatgtgatac cgtcatatgg tatggacact	7080
	gataagttga caccctgtga tagagggttt ttgataaatg cagatgcttc tattgctaata	7140
	ttaagagtca aaaaatgtcc tccggtagta tggaagtttt ctgatcttat taaattgtct	7200
	gacagttgcc ttaaatattt aatttcagct actgtcaagt caggaggtcg tttctttata	7260
	acaaagctcg gtgctaatac agttatttct tgcataccac agaaactgtt ggtagagaaa	7320
	aaggcaggtg gtgttattaa taacactttt aaatggttta tgagttgttt taaatggctt	7380
	tttgtctttt atatactttt tacagcattg ttgttgggtt actactatat ggagatgaat	7440
	aaaagttttg ttaccccatt gtatgatgta aactccacac tgcattgtga agggttcaaa	7500
	gttatagaca aagggtttat tagagagatt gtgtcagaag ataattgttt ctctaataag	7560
	tttgttaatt ttgacgcctt ttggggtaaa tcatatgaaa ataataaaaa ctgtccaatt	7620
	gttacagttg ttatagatgg tgacgggaca gtagctgttg gtgttcctgg tttgtatca	7680
	tgggttatgg atgggtttat gttgtgtcat atgacacaga ctgatcgtag accttggtac	7740
	attcctacct ggtttaatag agaaattgtt ggttacactc aggattcaat tatcactgag	7800
	ggtagttttt atacatctat agcattattt tctgctagat gtttatattt aacagccagc	7860
	aatcacctc aattgtattg ttttaatggc gacaatgatg caccitggagc cttaccattt	7920
	ggtagtatta ttctcatag agtatacttc caacctaatg gtgttaggct tatagttcca	7980
	caacaaatac tgcatacacc ctacatagtg aagtttggtt cagacagcta ttgtagaggt	8040
	agtgtatgtg agtatactaa accaggttac tgtgtgtcac tagactccca atgggttttg	8100
	tttaattgat aatacattag taaacctggc gttttctgtg gttctactgt tagagaactt	8160
	atgtttaata tggtagtac attctttact ggtgtcaacc ctaatattta tattcagcta	8220
	gcaactatgt ttttaatact agttgttatt gtgttaattt ttgcaatggt tataaagttt	8280
	caagggtgtt ttaaagctta tgcgaccatt gtgtttacaa taatgttagt ttgggttatt	8340
	aatgcatttg ttttgttgtt acatagtatt aatagtgttt tagctgttat attattagta	8400
	ctctattgct atgcatcatt ggttacaagt cgcaatactg ctataataat gcattgttgg	8460
	cttgttttta cctttgggtt aatagtaccc acatgggttg cttgttgcta tctgggattt	8520

[0005]

atctcttata tgiacacacc gttgggtttc tgggtgttac gtactactaa aaatactcgt	8580
aagttgtatg atggcaacga gtttgttggg aattatgacc ttgctgcgaa gagcactttt	8640
gttattcgtg gtactgaatt tgttaagctt acgaatgaga taggtgataa atttgaagcc	8700
tatctttctg cgtatgctag acttaataac tattcaggca ctggtagtga gcaagattac	8760
ttgcaagctt gtctgcatg gttagcttat gctttggacc aatatagaaa tagtgggtgtt	8820
gaggttgttt atacccacc gcgttactct attgggtgta gtagactaca cgctgggttt	8880
aaaaaactag tttctcctag tagtctgttt gagaagtga ttgttagtgt ctcttataga	8940
ggcaataatc ttaatggact gtggctgggt gattctatct actgccacg ccatgtgtta	9000
ggtaagtta gtggtgacca gtgggtgac gtactaaacc ttgctaataa tcatgagttt	9060
gaagttgtaa ctcaaaatgg tgttactttg aatgttgtca gcaggcggct taaaggagca	9120
gttttaattt tacaactgc agttgccaat gctgaaactc ctaagtataa gtttgttaaa	9180
gctaattgtg gtgatagttt cactatagct tgttcttatg gtggtacagt tataggactt	9240
tacctgtca ctatgcgttc taatgggtact attagagcat ctttcctage aggagcctgt	9300
ggctcagttg gttttaatat agaaaagggt gtagttaatt tcttttatat gcaccatctt	9360
gagttaccta atgcattaca cactggaact gacctaatgg gtgagtttta tgggtggtat	9420
gtagatgaag aggttgcga aagagtcca ccagataatc tagttactaa caatattgta	9480
gcatggctct atgcggcaat tattagtgtt aaagaaagta gttttcaca acctaaatgg	9540
ttggagagta ctactgtttc tattgaagat tacaataggt gggctagtga taatggtttt	9600
actccatttt ccactaglac tgctattact aaattaagtg ctataactgg ggttgatgtt	9660
tgtaaacctc ttgcactat tatggtaaaa agtgctcaat ggggtagtga tcccatttta	9720
ggacaatata attttgaaga cgaattgaca ccagaatctg tatttaatac agttggtggg	9780
gtaggttac agtcttcttt tgaagaaaa gctacatctt ggttttggag tagatgtgta	9840
ttagcttgc tcttgtttgt gttgtgtgct attgtcttat ttacggcagt gccacttaag	9900
ttttatgtac atgcagctgt tattttgttg atggctgtgc tctttatttc ttttactgtt	9960
aaacatgtta tggcatacat ggacactttc ctatgccta cattgattac agttattatt	10020
ggagtttgtg ctgaagtccc ttcatatac aatactctaa ttagtcaagt tgttattttc	10080
ttaagccaat ggtagatcc ttagtctttt gatactatgg taccatggat gttattgcca	10140
ttagtgtgt acactgcitt taagtgtgta caaggctgct atatgaattc tttcaatact	10200
tctttgttaa tgctgtatca gtttatgaag ttaggttttg ttattttacac ctcttcaaac	10260
actcttactg catatacaga aggtaatgg gagttattct ttgagttggg tcacactatt	10320
gtgttgcta atgttagtag taattcctta attggtttaa ttgtttttaa gtgtgctaag	10380
tggattttat attattgcaa tgcaacatac tttaataatt atgtgttaat ggcagtcag	10440
gttaatggca taggctggct ttgcacctgt tactttggat tgtattgggt ggtaataaaa	10500
gtttttggtt taaccttagg taaatacaat tttaaagttt cagtagatca atataggtat	10560
atgtgtttgc ataaggtaaa tccacctaaa actgtgtggg aggtctttac taaaaata	10620
cttatacaag gaattggagg cgatcgtgtg ttgcctatag ctacagtga atctaaattg	10680
agtatgtaa agtgtacaac tgttgtttta atgcagcttt tgactaagct taatgttgaa	10740
gcaaatcaaa aaatgcagc ttatcttgtt gaggtaacaca ataaaatcct cgcatctgat	10800

[0006]

gaigtggag agtgcattga taattttatt ggtatgctta taacactatt ttgtatagat	10860
tctactattg atttgggtga gtatttgat gatatactta agagggtcaac tgtattacaa	10920
tcggttactc aagagttttc gcacataccc tcgtatgctg aatatgaaag agctaagagt	10980
atttatgaaa aggttttagc cgatttctaaa aatgggtggg taacacagca agagcttgct	11040
gcatactgta aagctgccaa tattgcaaag tcagtttttg atagagactt ggctgttcaa	11100
aagaagttag atagcatggc agaactgtct atgacaacaa tgtataaaga ggcgctgta	11160
actgatagaa gagcaaaatt agtttcatca ttacatgcac tacttttttc aatgcttaag	11220
aaaatagatt ctgagaagct taatgtctta ttgaccagg cgaatagtggt tgtgtatccc	11280
ctagcaactg ttccaattgt ttgtagtaat aagcttacct ttgttatacc agaccagag	11340
acgtgggtca agtgtgtgga ggggtgtgcat gttacatatt caacagtgtt ttggaatata	11400
gactgtgtta ctgatgccga tggcacagag ttacacccca cttctacagg tagtggattg	11460
acttactgta taagtgggtga taatatagca tggcctttta aggttaactt gactaggaat	11520
gggcataata aggttgatgt tgccttgcaa aataatgagc ttatgcctca cgggtgtaaag	11580
acaaaggctt gcgtagcagg ttagatcaaa gcacattgta gcgttagtc taaatgttat	11640
tatacaagta ttagtggcag ttcagttgta gctgctatta cctcttcaaa tcctaactg	11700
aaagtagcct cttttttgaa tgaggcagg aatcagattt atgtagactt agaccacca	11760
tgtaaatgtg gtatgaaagt ggggtgataag gttgaagtgt ttacctgta tttataaaa	11820
aatacagggt ctattgtaag aggtatggtta cttggtgcta tatctaattg tgtgtgtta	11880
caatctaaag gtcatgagac agaggaagtg gatgctgtag gcattctctc actttgttct	11940
tttgtagtag atcctgcgga tacatatgtt aaatatgtgg cagcaggtaa tcaaccttta	12000
ggtaactgtg ttaaaatgtt gacagtacat aatggtagtg gttttgcaat aacatcaaag	12060
ccaagtccaa ctccgcatca ggattcttat ggaggagctt ctgtgtgtct ttattgtaga	12120
gcacatatag cacacctgg cgagcagga aatttagatg gacgtgtca atttaaaggt	12180
tcctttgtgc aaatacctac tacggagaaa gatcctgttg gattctgtct acgtaacaag	12240
gtttgcactg ttgtcagtg ttggattggt tatggatgac agtgtgattc acttagacaa	12300
cctaaacctt ctgttcagtc agttgtgtt gcactgtgtt ttgataagaa ttatttaaac	12360
gggtacgggg tagcagttag gtcgggtga taccctagc taatggatgt gacccgatg	12420
ttgtaaagcg agcctttgat gtttgaata aggaatcagc cggtagttt caaaattga	12480
agcgtaactg tgcacgattc caagaagtac gtgatactga agatggaaat cttgagtatt	12540
gtgattctta tttgtgggtt aaacaaacca ctctagtaa ttatgaacat gagaaagctt	12600
gttatgaaga cttaaagtca gaagtaacag ctgatcatga tttctttgtg ttcaataaga	12660
acatttataa tattagtagg cagaggctta ctaagtatac tatgatggat tttgtcatg	12720
ctttgcggca ctttgaccca aaggattgag aagttcttaa agaaatactt gtcacttatg	12780
gtgttataga agattatcac ctaagtgtt ttgaagagaa taaggattgg tacgacccaa	12840
tagaaaaccc taaatattat gccatgttgg ctaaaatggg acctattgta cgacgtgctt	12900
tattgaatgc tattgagttc ggaacctca tgggtgaaaa aggttatgtt ggtgttatta	12960
cacttgataa ccaagatctt aatggcaaat tttatgattt tggtagttt cagaagacag	13020
cgctgtgtgc tgggtgttct gttttgata cgtattatc ttacatgatg cccatcatag	13080

[0007]

ccaatgactga tgcgttggca cctgagaggt attttgaata tgatgtgcat aagggttata	13140
aatcttatga tctcctcaag tatgattata ctgaggagaa acaagatttg tttcagaagt	13200
actttaagta ttgggatcaa gagtatcacc ctaactgtcg cgactgtagt gatgacaggt	13260
gtttgataca ttgtgcaaac ttcaacatct tgttttctac acttgtagcg cagacttctt	13320
tcggtaattt gtgtagaaag gttttgttg atggtgtacc atttatagct acttgtagct	13380
atcattctaa ggaacttggg gttattatga atcaagataa caccatgtca ttttcaaaaa	13440
tgggtttgag tcaactcatg cagtttgttg gagatcctgc cttgttagtg gggacatcca	13500
ataaattagt ggatcttaga acgtcttgtt ttagtgtttg tgctttagcg tctggtatta	13560
ctcatcaaac ggtaaaacca ggtcacttta acaaggattt ctacgatttt gcagagaagg	13620
ctggtatgtt taaggaaggt tcttctatac cacttaaaaca ttttctctac ccacagactg	13680
gtaatgctgc tataaacgat tatgattatt atcgttataa caggcctacc atgtttgata	13740
tacgtcaact tttattttgt ttagaagtga cttctaaata ttttgaatgt tatgaaggcg	13800
gctgtatacc agcaagccaa gttgtagtta acaatttaga taagagtga ggttatccgt	13860
tcaataagtt tggaaaggcc cgtctctatt atgaaatgag tctagaggag caggaccaac	13920
tctttgagag tacaagaag aacgtctctgc ctactataac tcagatgaat ttaaaatatg	13980
ccatatccgc gaaaaataga gcgcgtacag tggcaggtgt gtctatcctt tctactatga	14040
ctaataggca gtttcatcag aagattctta agtctatagt caacactaga aacgtctctg	14100
tagttattgg aacaaccaag ttttatggcg gttgggataa catgttgaga aaccttatc	14160
aggggtgtga agaccgatt cttatgggtt gggattatcc aaagtgtgat agagcaatgc	14220
ctaatttgtt gcgtatagca gcatcttag tactcgctcg taaacacact aattgttgta	14280
cttggctga acgcgtttat aggttgtata atgaatgcgc tcagggttta tctgaaactg	14340
tcttagctac aggttgtata tatgtgaaac ctggtggtac tagcagtga gatgctacta	14400
ctgcttatgc aaacagtgtt ttcaacataa tacaagccac atctgcta atgtgcgctc	14460
ttttgagtgt tataacgcgt gatattgtat atgatgacat taagagcttg cagtatgaat	14520
tgtaccagca ggtttatagg cgagtcaatt ttgaccacgc atttgttgaa aagttttatt	14580
cttatttgtg taagaatttc tcattgatga tcttgtctga cgacggtgtt gtttgttata	14640
acaacacatt agccaaacaa ggtctttag cagatatttc tggttttaga gaagttctct	14700
actatcagaa caatgttttt atggctgatt ctaaatgttg ggttgaacca gatttagaaa	14760
aaggccaca tgaattttgt tcacagcaca caatgttagt ggaggttgat ggtgagccta	14820
gatacttgcc atatccagac ccatcacgta ttttgtgtgc atgtgtttt gtagatgatt	14880
tggataagac agaattctgtg gctgttatgg agcgttatat cgctcttgcc atagatgcgt	14940
accactagt acatcatgaa aatgaggagt acaagaaggt attctttgtg cttctttcat	15000
acatcagaaa actctatcaa gagctttctc agaatatgct tatggactac tcttttgtaa	15060
tggatataga taagggtagt aaattttggg aacaggagtt ctatgaaaat atgtatagag	15120
cccctacaac attacagtct tgtggcggtt gtgtagtgtg taatagtcaa actatattgc	15180
gctgtggtaa ttgtattcgc aaaccatttt tgtgttgtaa gtgtgtctat gaccatgtca	15240
tgcacacaga ccacaaaaat gttttgtcta taaatcctta catttgcctc cagccaggtt	15300
gtggtgaagc agatgttact aaattgtacc tcggaggtat gtcatacttc tgcggtaatc	15360

[0008]

ataaaccaaa gttatcaata ccgtagtat ctaatggtac agtgtttga atttacagg	15420
ctaattgtgc aggtagcgaa aatgttgatg attttaatca actagctact actaattggt	15480
ctactgtgga accttatatt ttggcaaatc gttgtgtaga ttcgttgaga cgctttgctg	15540
cagagacagt aaaagctaca gaagaattac ataagcaaca atttgctagt gcagaagtga	15600
gagaagtact ctcatcgct gaattgattc tgtcttggga gccaggtaaa accaggcctc	15660
cattgaatag aaattatgtt ttacttggtt ttactttac tagaactagt aaagttcagc	15720
tcggtgattt tacatttgaa aaaggtgaag gtaaggacgt tgtctattat cgagcgacgt	15780
ctactgctaa attgtctgtt ggagacattt ttgttttaac ctacacaaat gttgtttctc	15840
ttatagcgcc aacgttgtgt cctcagcaaa cttttctag gtttgtgaat ttaagaccta	15900
atgtgatggt acctgcgtgt ttgttaaata acattccatt gtaccattta gtaggcaagc	15960
agaagcgtag tacagtacaa ggccctcctg gcagtggtaa atcccathtt gctataggat	16020
tgccggctta ctttagtaac gcccggtcgt tttttactgc atgctctcat gcagctgttg	16080
atgctttatg tgaanaagct ttttaagttc ttaaagtaga tgattgcaat cgtatagtac	16140
ctcaaggac tactatcgat tgcttctcta agtttaaagc taatgacaca ggcaaaaagt	16200
acatttttag tactattaat gccttgccag aagttagtgt tgacattctt ttggttgacg	16260
aggttagtat gttgaccaat tacgaattgt cttttattaa tggttaagata aactatcaat	16320
atgttgtgta ttaggtgat cctgctcaat taccggcgcc tcgtacgttg cttaacggtt	16380
cactctctcc aaaggattat aatgttgta caaaccttat ggtttgtgtt aaacctgaca	16440
ttttccttgc aaagtgttac cgttgtccta aagaaattgt agatactgtt tctactcttg	16500
tatatgatgg aaagtttatt gcaataaacc cggaatcacg tcagtgtttc aaggttatag	16560
ttaataatgg taattctgat gtaggacatg aaagtggctc agcctacaac ataactcaat	16620
tagaatttgt gaaagatttt gtctgtcgca ataaggaaatg gcgggaagca acattcattt	16680
cacctataa tgctatgaac cagagagcct accgtatgct tggacttaat gttcagacag	16740
tagactcgte tcaaggttcg gactatgatt atgttatctt ttgtgttact gcagattcgc	16800
agcatgcact gaattattaac agattcaatg tagcgcttac aagagccaag cgtggtatac	16860
tagttgtcat gcgtcagcgt gatgaactat attcagctct taagtttata gagcttgata	16920
gttagtagcag tctgcaaggt acaggcttgt ttaaaatttg caacaaagag tttagtgggtg	16980
ttcaccagc ttaatgcagtc acaactaagg ctcttgctgc aacttataaa gttaatgatg	17040
aacttgctgc acttggttaac gtggaagctg gttcagaaat aacatataaa catcttattt	17100
ctttgttagg gtttaagatg agtgttaatg ttgaaggctg ccacaacatg tttataacac	17160
gtgatgaggc tatccgcaac gtaagaggtt gggtaggttt tgatgtagaa gcaacacatg	17220
cttgcggtac taacattggt actaacctgc ctttccaagt aggtttctct actggtgcag	17280
actttgtagt tacgcctgag ggactttag atacttcaat aggcaataat tttagacctg	17340
tgaattctaa agcacctcca ggtgaacaat ttaatcactt gagagcgta ttcaaaagtg	17400
ctaaaccttg gcatgttgta aggccaagga ttgtgcaaat gttagcggtt aacctgtgca	17460
acgtttcaga ttgtgtagt ttgttcacgt ggtgtcatgg cctagaacta accactttgc	17520
gctattttgt taaaatagcg aaggaccaag ttgtttcttg cggttctaga gcaacaactt	17580
ttaattctca tactcaggct tatgcttgtt ggaagcattg cttgggtttt gattttgttt	17640

[0009]

ataatccact cttagtggat attcaacagt ggggttatc tggtaaccta caatttaacc	17700
atgatttgca ttgtaatgtg catggacacg cacatgtagc ttctgcggat gctattatga	17760
cgcgttgctc tgcaattaat aatgcatttt gtcaagatgt caactgggat ttaacttacc	17820
ctcatatagc aaatgaggat gaagtcaatt ctagctgtag atatttaca cgcatgtatc	17880
ttaatgcatg tgttgatgct cttaaagtta acgttgtcta tgatatagge aaccctaaag	17940
gtataaaatg tgttagacgt ggagacttaa attttagatt ctatgataag aatccaatag	18000
taccaaatgt caagcagttt gagtatgact ataatacga caaagataag ttgctgatg	18060
gtctttgtat gttttggaat tgtaatgtgg attgttatcc cgacaattcc ttagtttgta	18120
ggtagcacac acgaaatttg agtgtgttta acctacctgg ttgtaatggt ggtagcttgt	18180
atgttaacaa gcatgcattc cacacaccta aatttgatcg cactagcttt cgtaatttga	18240
aagctatgcc attctttttc tatgactcat cgcttgcga gaccattcaa ttggatggag	18300
ttgcgcaaga ctttgtgtca ttagctacga aagattgtat caaaaatgc aacataggcg	18360
gtgctgtttg taaaaagcac gcacaaatgt atgcagattt tgtgacttct tataatgcag	18420
ctgttactgc tggttttact ttttgggtta ctaataattt taaccatata aatttgtgga	18480
aaagtttttc agctctccag tctatcgaca atattgctta taatatgtat aagggtggtc	18540
attatgatgc tattgcagga gaaatgcccc ctatcgtaac tggagataaa gttttgtta	18600
tagatcaagg cgtagaaaaa gcagtttttt ttaatcaaac aattctgcct acatctgtag	18660
cgtttgagct gtatgcgaag agaaatatc gcacactgcc aaacaaccgt attttgaaag	18720
gtttgggtgt agatgtgact aatggatttg taatttgga ttacacgaac caaacaccac	18780
tataccgtaa tactgttaag gtatgtgcat atacagacat agaaccataa ggcctaatag	18840
tgctgtatga tgatagatat ggtgattacc agtcttttct agctgctgat aatgctgttt	18900
tagtttctac acagtgttac aagcggattt cgtatgtaga aataccgtca aacctgcttg	18960
ttcagaacgg tattccgtta aaagatggag cgaacctgta tgtttataag cgtgttaatg	19020
gtgcgtttgt tacgtacct aacacattaa acacacaggg tcgcagttat gaaacttttg	19080
aacctcgtag tgatgttgag cgtgattttc tcgacatgic tgaggagagt tttgtagaaa	19140
agtatggtaa agaattaggt ctacagcaca tactgtatgg tgaagttgat aagcccaat	19200
taggtggttt acacactgtt ataggtatgt gcagactttt acgtgcgaat aagttgaacg	19260
caaagtctgt tactaattct gattctgatg tcatgcaaaa ttattttgta ttggcagaca	19320
atggttccta caagcaagtg tgtactgttg tggatttgct gcttgatgat ttcttagaac	19380
ttcttaggaa catactgaaa gagtatggta ctaataagtc taaagttgta acagtgtcaa	19440
ttgattacca tagcataaat ttatgactt gggttggaaga tggcattatt aaaacatgtt	19500
atccacagct tcaatcagca tggacgtgtg gttataatat gcctgaactt tataaagttc	19560
agaattgtgt tatggaacct tgcaacattc ctaattatgg tgttggaata gcgttgccaa	19620
gtggtattat gatgaatgtg gcaaagtata cacaactctg tcaatacctt tcgaaaacaa	19680
caatgtgtgt accgcataat atgcgagtaa tgcattttgg agctggaagt gacaaaggag	19740
tggctccagg tagtactgtt cttaaacaat ggctcccaga agggacactc cttgtcgata	19800
atgatattgt agactatgtg tctgatgcac atgtttctgt gcttcagat tgcaataaat	19860
ataagacaga gcacaagttt gatcttgtga tatctgatat gtatacagac aatgattcaa	19920

[0010]

aaagaaagca tgaaggcgtg atagccaata atggcaatga tgacgttttc atatatctct	19980
caagttttct tcgtaataat ttggctctag gtggtagttt tgctgtaaaa gtgacagaga	20040
caagttggca cgaagtttta tatgacattg cacaggattg tgcatggtgg acaatgtttt	20100
gtacagcagt gaatgcctct tcttcagaag cattcttggg ttggtgttaat tatttgggtg	20160
caagtgtaaa ggtaagggtt agtggaaaaa cgctgcacgc aaattatata ttttggagga	20220
attgtaatta ttacaaacc tctgcttata gtatatttga cgttgctaag ttgatttga	20280
gattgaaagc aacaccagtt gttaatttga aaactgaaca aaagacagac ttagtcttta	20340
atttaattaa gtgtggtaag ttactggtaa gagatgttgg taacacctct tttactagt	20400
actcttttgt gtgtactatg tagtgctgct ttgtatgaca gtagttctta cgtttactac	20460
taccaaagtg cctttagacc acctaatggt tggcatttac acgggggtgc ttatgcggt	20520
gttaatatct ctacgcaatc taataatgca ggctcttcac ctgggtgtat tgttgggtact	20580
attcatgggt gtcgtgttgt taatgcttct tctatagcta tgacggcacc gtcacaggt	20640
atggcttggg ctacagtcga gttttgtact gcacactgta acttttcaga tactacagtg	20700
ttgtttacac attgttataa atatgatggg tgtcctataa ctggcatgct tcaaaagaat	20760
tttttacgtg tttctgctat gaaaaatggc cagcttttct ataatttaac agttagtgt	20820
gctaagtacc ctacttttaa atcatttcag tgtgttaata atttaacatc cgtatattta	20880
aatggtgatc ttgtttacac ctctaagatg accacagatg ttacatctgc aggtgtttat	20940
tttaaagctg gtggacctat aacttataaa gttatgagag aagttaaagc cctggcttat	21000
tttgttaatg gtactgcaca agatgttatt ttgtgtgatg gatcacctag aggttgtta	21060
gcatgccagt ataatactgg caatttttca gatggctttt atccttttat taatagtagt	21120
ttagttaaagc agaagtttat tgtctatcgt gaaaatagtg ttaatactac ttttacgtta	21180
cacaatttca cttttcataa tgagactggc gccaacctta atcctagtagg tgttcagaat	21240
attcaaaactt accaaacaca aacagctcag agtggttatt ataattttta tttttccttt	21300
ctgagtagtt ttgtttataa ggagtctaat tttatgtatg gatcttatca cccaagttgt	21360
aatttttagac tagaaactat taataatggc ttgtgttata attcactttc agtttcaatt	21420
gcttacggtc ctcttcaagg tggttgcaag caatctgtct ttagtggttag agcaacttgt	21480
tgttatgctt attcatatgg aggtccctcg ctgtgtaaag gtgtttattc aggtgagtta	21540
gatcttaatt ttgaatgtgg actgttagtt tatgttacta agagcgggtg ctctcgata	21600
caaacagcca ctgaaccgcc agttataact cgacacaatt ataataatat tacttttaat	21660
acttgtgttg attataatat atatggcaga actggccaag gttttattac taatgtaacc	21720
gactcagctg ttagttataa ttatctagca gacgcagggt ttgctatttt agatacatct	21780
ggttccatag acatctttgt tgtacaaggt gaatatggtc ttacttatta taaggttaac	21840
ccttgcgaag atgtcaacca gcagtttgta gtttctgggt gtaaattagt aggtattctt	21900
acttcacgta atgagactgg ttctcagctt cttgagaacc agttttacat taaaactact	21960
aatggaacac gtcgttttag acgttctatt actgaaaatg ttgcaaattg cccttatgtt	22020
agttatggta agttttgtat aaaacctgat ggttcaattg ccacaatagt accaaaacaa	22080
ttggaacagt ttgtggcacc tttacttaat gttactgaaa atgtgctcat acctaacagt	22140
tttaatttaa ctgttacaga tgagtacata caaacgcgta tggataaggt ccaaattaat	22200

[0011]

tgctgcagt atgtttgtgg caattctctg gattgtagag atttgtttca acaatatggg	22260
ccgtttgtg acaacatatt gtctgtagta aatagtattg gtcaaaaaga agatatggaa	22320
cttttgaatt tctattcttc tactaaaccg gctggtttta atacaccatt tcttagtaat	22380
gtagcactg gtgagtttaa tatttctctt ctgttaacaa ctctagtag tcctagaagg	22440
cgttctttta ttgaagacct tctatttaca agcgttgaat ctgttggtatt accaacagat	22500
gacgcataca aaaattgcac tgcaggacct ttaggttttc ttaaggacct tgcgtgtgct	22560
cgtaaatata atggtttgc tgtgttgcc cccattataa cagcagaaat gcaaatittg	22620
tatactagtt ctctagtagc ttctatggct tttggtggta ttactgcagc tgggtctata	22680
ccitttgcca cacaactgca ggctagaatt aatcacttgg gtattacca gtcacttttg	22740
ttgaagaatc aagaaaaaat tgcctgttcc ttttaataagg ccattggctg tatgcaggaa	22800
ggttttagaa gtacatctct agcattacaa caaattcaag atgttgttaa taagcagagt	22860
gctattctta ctgagactat ggcatcactt aataaaaaat ttggtgctat ttcttctatg	22920
attcaagaaa tctaccagca acttgacgcc atacaagcaa atgctcaagt ggatcgtctt	22980
ataactggta gattgtcatc actttctgtt ttagcatctg ctaagcaggc ggagcatatt	23040
agagtgtcac aacagcgtga gttagctact cagaaaatta atgagtgtgt taagtcacag	23100
tctattaggt actccttttg tggtaatgga cgacatgttc taaccatacc gcaaaatgca	23160
cctaattgta tagtgtttat acacttttct tatactccag atagttttgt taatgttact	23220
gcaatagtgg gtttttgtgt aaagccagct aatgctagtc agtatgcaat agtaccgct	23280
aatggtaggg gtatttttat acaagttaat ggtagttact acatcacagc acgagatatg	23340
tatatgcaa gagctattac tgcaggagat atagttagc ttacttcttg tcaagcaaat	23400
tatgtaagtg taaataagac cgtcattact acattcgtag acaatgatga ttttgatttt	23460
aatgacgaat tgtcaaaatg gtggaatgac actaagcatg agctaccaga ctttgacaaa	23520
ttcaattaca cagtacctat acttgacatt gatagtgaat ttgatcgtat tcaaggcgtt	23580
atacagggtc ttaatgactc tttaatagac cttgaaaaac tttcaatact caaaacttat	23640
attaagtggc cttggtagtg gtggttagcc atagcttttg ccaattattat cttcatctta	23700
atactaggat gggttttctt catgactgga tgttgtggtt gttgttggtg atgctttggc	23760
attatgcctc taatgagtaa gtgtggtaag aaatcttctt attacacgac ttttgataac	23820
gatgtggtaa cttacaataa cagaccataa aagctctgtt aatgattcaa agtcccacgt	23880
ccttcctaag agtattaatt tttctttggt gtaaacttgt actaagttgt tttagagagt	23940
ttattatagc gctccaacaa ctaatacaag ttttactcca aattatcaat agtaacttac	24000
agcctagact gaccctttgt cacagtctag actaatgtta aacttagaag caattattga	24060
aactggtgag caagtgtatc aaaaaatcag tttcaattta cagcatattt caagtgtatt	24120
aaacacagaa gtatttgacc ctttgacta ttgttattac agaggaggta atttttggga	24180
aatagagtca gctgaagatt gttcagggtg tgatgaattt attgaataag tcgctagagg	24240
aaaatggaag ttttctaaca gcgctttata tattttagg attttttagca ctttatcttc	24300
taggtagagc acttcaagca tttgtacagg ctgctgatgc ttgttgttta ttttggtata	24360
catgggtagt aattccagga gctaagggtg cagcctttgt atataagtat acatatggta	24420
gaaaacttaa caatccggaa ttagaagcag ttattgtcaa cgagtttctt aagaacggtt	24480

[0012]

ggaataataa aaatccagca aattttcaag atgtccaacg agacaaattg tactcttgac	24540
tttgaacagt cagttgagct ttttaaagag tataatttat ttataactgc attcttggtg	24600
ttcttaacca taatacttca gtatggctat gcaacaagaa gtaagtttat ttatatactg	24660
aaaaatgatag tgttatgggtg cttttggccc cttaacattg cagtaggtgt aatttcattg	24720
atatacccaac caaacacagg aggtcttgtc gcagcgataa tacttacagt gtttgcgtgt	24780
ctgtcttttg taggttattg gatccagagt attagactct ttaagcggtg taggtcatgg	24840
tggtcattta acccagaatc taatgccgta ggttcaatac tcctaactaa tggtaacaa	24900
tgtaattttg ctatagagag tgtgccaatg gtgctttctc caattataaa gaatggtgtt	24960
ctttattgtg agggtcagtg gcttgctaag tgtgaaccag accacttgcc taaagatata	25020
tttgtttgta caccggatag acgtaatatc taccgtatgg tgcagaaata tactgggtgac	25080
caaagcggaa ataagaaacg gtttgctacg tttgtctatg caaagcagtc agtagatact	25140
ggcgagctag aaagtgtagc aacaggaggg agtagtcttt acacctaagt gtgtgtgtgt	25200
agagagtatt taaaattatt ctttaatagt gcctctatgt taagagcgca taatagtatt	25260
atttttgagg atattaatat aaatcctctc tgttttatac tctcttttca agagctatta	25320
tttaaaaaac agtttttcca ctcttttggtg ccaaaaaacta ttgttggtta tgggtgaacc	25380
tttcaagtag ataattgaaa agtctactac gaaggaaaac caatttttca gaaaggttgt	25440
tgtaggttgt ggttgagtta taaaaagat taaactacct actacacta tttttataag	25500
aggcgtttta tcttacaagc gcttaataaa tacggacgat gaaatggctg actagttttg	25560
taagggcagt tatttcatgt tataaacccc tattattaac tcaattaaga gtattagata	25620
ggttaatctt agatcatgga ccaaaacaca tcttaacgtg tgttaggtgc gtgattttgt	25680
ttcaattaga tttagtttat aggttggcgt atacgcctac tcaatcgctg gtatgaataa	25740
tagtaaagat aatccttttt gcggagcaat agcaagaaaa gcgcgaattt atctgagaga	25800
aggattagat tgtgtttact ttcttaacaa agcaggacaa gcagagtctt gtcccgcgtg	25860
tacctctcta gtattccagg ggaacttg tgaggaacac aaatataata ataacttttt	25920
gtcatggcaa gcgtaaggc aactggaag acagatgccc cagctccagt catcaaacta	25980
ggaggaccaa agccacctaa agttggttct tctggaatg tatcttggtt tcaagcaata	26040
aaagccaaga agttaaatc acctccgctt aagtttgaag gtagcgggtg tcctgataat	26100
gaaaatctaa aaccaagtca gcagcatgga tattggagac gccaagctag gtttaagcca	26160
ggtaaagggt gaagaaaacc agtcccagat gcttggtatt ttactatac tggaacagga	26220
ccagccgcta acctgaattg ggggatagc caagatggtg tagtgtgggt tgcgtgtaag	26280
ggtgctgata ctaaatttag atctaatacag ggtactcgtg actctgacaa gtttgaccaa	26340
tatccgctac ggttttcaga cggaggacct gatgtaatt tccgttgga tttcattcct	26400
ctgaatcgtg gcaggagtgg gagatcaaca gcagcttcat cagcagcatc tagtagagca	26460
ccatcacgtg aagtttcgcg tggtcgcagg agtggttctg aagatgatct tattgctcgt	26520
gcagcaagga taattcagga tcagcagaag aagggttctc gcattacaaa ggctaaggct	26580
gatgaaatgg ctaccgccg gtattgcaag cgcactattc cacctaatta taaggttgat	26640
caagtgtttg gtccccgtac taaaggtaag gagggaaatt ttggtgatga caagatgaat	26700
gaggaaggta ttaaggatgg gcgcgttaca gcaatgtca acctagtcc tagcagccat	26760

	gcttgtcttt tcggaagtag agtgacgccc agacttcaac cagatgggct gcacttgaaa	26820
	tttgaattta ctactgtggt cccacgtgat gatccgcagt ttgataatta tgtaaaaatt	26880
	tgtgatcagt gtgttgatgg ttaggaaca cgtccaaaag atgatgaacc aagaccaaag	26940
	tcacgtcaa gttaagacc tgcaacaaga gaaattctc cagcgccaag acagcagcgc	27000
	cctaagaagg agaaaaagcc aaagaagcag gatgatgaag tggataaagc attgacctca	27060
	gatgaggaga ggaacaatgc acagctggaa tttgatgatg aaccaaggt aattaactgg	27120
	ggggattcag ccttaggaga gaatgaactt tgagtaaaat tcaatagtaa gagttaagga	27180
	agataggcat gtagcttgat tacctacatg tctatcgcca gggaaatgtc taatttgtct	27240
	acttagtagc ctggaaacga acggtagacc cttagatttt aatttagttt aatttttagt	27300
	ttagtttaag ttagtttaga gtaggtataa agatgccagt gccggggcca cgcgaggtac	27360
	gaccgaggtt acagcactag gacgcccatt aggggaagag ctaaatttta gttaagtta	27420
	agtttaattg gctatgtata gttaaaattt ataggctagt atagagttag agcaaaaaaa	27480
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa	27500
	<210> 2	
	<211> 435	
	<212> DNA	
	<213> 传染性支气管炎病毒	
	<400> 2	
	tctaaaggtc atgagacaga ggaagtggat gctgtaggca ttctctcact ttgttctttt	60
	gcagtagatc ctgcggatac atattgtaaa tatgtggcag caggtaatca accttaggt	120
[0013]	aactgtgtta aaatgttgac agtacataat ggtagtgggt ttgcaataac atcaaagcca	180
	agtccaactc cggatcagga ttcttatgga ggagcttctg tgtgtcttta ttgtagagca	240
	catatagcac accttggcgg agcaggaaat ttagatggac gctgtcaatt taaaggttct	300
	tttgtgcaaa tactactac ggagaaagat cctgttggat tctgtctacg taacaaggtt	360
	tgcaactgtt gtcagtgttg gattggttat ggatgtcagt gtgattcact tagacaacct	420
	aaaccttctg tttag	435
	<210> 3	
	<211> 1563	
	<212> DNA	
	<213> 传染性支气管炎病毒	
	<400> 3	
	ggtacaggct tgittaaaat ttgcaacaaa gagtttagtg gtgttcaccc agcttatgca	60
	gtcacaacta aggctcttgc tgcaacttat aaagttaatg atgaacttgc tgcacttggt	120
	aacgtggaag ctgggtcaga aataacatat aaacatctta tttctttgtt agggtttaag	180
	atgagtgtta atgttgaagg ctgccacaac atgtttataa cacgtgatga ggctatccgc	240
	aacgtaagag gttgggtagg ttttgatgta gaagcaacac atgcttgcgg tactaacatt	300
	ggtactaacc tgcctttcca agtaggttct tctactgggt cagactttgt agttacgct	360
	gagggacttg tagatacttc aataggcaat aattttgagc ctgtgaattc taaagcacct	420
	ccaggtgaac aatttaatac cttgagagcg ttattcaaaa gtgctaacc ttggcatgtt	480
	gtaaggccaa ggattgtgca aatgttagcg gataacctgt gcaacgtttc agattgtgta	540
	gtgtttgtca cgtgggtgca tggcctagaa ctaaccactt tgcgctattt tgttaaaata	600

	ggcaaggacc aagtttggtc ttgcggttct agagcaacaa cttttaattc tcatactcag	660
	gcttatgctt gttggaagca ttgcttgggt ttgtattttg ttataaatcc actcttagtg	720
	gatattcaac agtgggggta ttctggtaac ctacaattta accatgattt gcattgtaat	780
	gtgcatggac acgcacatgt agcttctcgc gatgctatta tgacgcgttg tcttgcaatt	840
	aataatgcat tttgtcaaga tgtcaactgg gatttfaactt accctcatat agcaaatgag	900
	gatgaagtca attctagctg tagatattta caacgcattg atcttaatgc atgtgttgat	960
	gctcttaaaag ttaacgttgt ctatgatata ggcaacccta aaggtattaa atgtgttaga	1020
	cgtggagact taaatttttag attctatgat aagaatccaa tagtacccaa tgcaagcag	1080
	tttgagtatg actataatca gcacaaagat aagtttgctg atggcttttg tatgttttgg	1140
	aattgtaatg tggattgta tcccagacaat tcttacttt gtaggtacga cacacgaaat	1200
	ttgagtgtgt ttaacctacc tgggtgtaat ggtggtagct tgtatgttaa caagcatgca	1260
	ttccacacac cttaaattga tcgcactagc ttctgtaatt tgaaagctat gccattcttt	1320
	ttctatgact catgccttg cgagaccatt caattggatg gagttgcgca agacctgtg	1380
	tcattagcta cgaaagattg tatcacaaaa tgcaacatag gcggtgctgt ttgtaaaaag	1440
	cacgcacaaa tgtaigcaga ttttgtagct tcttataatg cagctgttac tgctggtttt	1500
	actttttggg ttactaataa ttttaaccca tataatttgt ggaaaagttt ttcagctctc	1560
	cag	1563
[0014]	<210> 4	
	<211> 1014	
	<212> DNA	
	<213> 传染性支气管炎病毒	
	<400> 4	
	tctatcgaca atattgctta taatatgtat aagggtgggc attatgatgc tattgcagga	60
	gaaatgcccc ctatcgtaac tggagataaa gtttttgta tagatcaagg cgtagaaaaa	120
	gcagtttttt ttaatcaaac aattctgcct acatctgtag cgtttgagct gtagcgaag	180
	agaaatatte gcacactgcc aaacaaccgt attttgaaag gtttgggtgt agatgtgact	240
	aatggatttg taatttggga ttacacgaac caaacaccac tataccgtaa tactgttaag	300
	gtatgtgcat atacagacat agaaccaaat ggcctaatag tgctgtatga tgatagatat	360
	ggtgattace agtcttttct agctgtgat aatgctgttt tagtttctac acagtgttac	420
	aagcgttatt cgtatgtaga aataccgtca aacctgcttg ttcagaacgg tattccgtta	480
	aaagatggag cgaacctgta tgtttataag cgtgttaatg gtgcgtttgt tacgtacct	540
	aacacaataa acacacaggc tcgaagtat gaaacttttg aacctcgtag tgatgttag	600
	cgtgatitct tcgacatgic tgaggagagt ttgtagaaa agtatggtaa agaattaggt	660
	ctacagcaca tactgtatgg tgaagttgat aagccccaat taggtggttt ccacactgtt	720
	ataggtatgt gcagactttt acgtgcgaat aagttgaacg caaagtctgt tactaattct	780
	gattctgatg tcatgcaaaa ttattttgta ttggcagaca atggttccta caagcaagt	840
	tgactgttg ttgattttgt gcttgatgat ttcttagaac ttcttaggaa catactgaaa	900
	gagtatggta ctaataagtc taaagttgta acagtgtcaa ttgattacca tagcataaat	960
	tttatgactt ggtttgaaga tggcattatt aaaacatgtt atccacagct tcaa	1014

<210> 5
 <211> 909
 <212> DNA
 <213> 传染性支气管炎病毒

<400> 5
 tcagcatgga cgtgtggtta taatatgcct gaactttata aagttcagaa ttgtgttatg 60
 gaaccttgca acatttcctaa ttatggtgtt ggaatagcgt tgccaagtgg tattatgatg 120
 aatgtggcaa agtatacaca actctgtcaa taccttttca aaacaacaat gtgtgtaccg 180
 cataatatgc gagtaatgca ttttggagct ggaagtgaca aaggagtggg gccaggtagt 240
 actgtttctta aacaatggct cccagaaggg acactccttg tcgataatga tattgtagac 300
 tatgtgtctg atgcacatgt ttctgtgctt tcagattgca ataaatataa gacagagcac 360
 aagtttgatc ttgtgatatc tgatatgtat acagacaatg attcaaaaag aaagcatgaa 420
 ggcgtgatag ccaataatgg caatgatgac gttttcatat atctctcaag ttttcttcgt 480
 aataatttgg ctctaggtgg tagttttgct gtaaaagtga cagagacaag ttggcacgaa 540
 gttttatatg acattgcaca ggattgtgca tgggtggaca tgttttgtac agcagtgaat 600
 gcctcttctt cagaagcatt cttgattggt gttaattatt tgggtgcaag tgaagaggtt 660
 aaggttagtg gaaaaacgct gcacgcaaat tatatatatt ggaggaattg taattattta 720
 caaacctctg cttatagtat atttgacgtt gctaagtttg atttgagatt gaaagcaacg 780
 ccagttgtta atttgaaaac tgaacaaaag acagacttag tctttaattt aattaagtg 840
 ggtaagttac tggtaagaga tgttggtaac acctcttita ctagtgactc ttttgtgtgt 900
 actatgtag 909

[0015]

<210> 6
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> 传染性支气管炎病毒

<400> 6
 Ser Lys Gly His Glu Thr Glu Glu Val Asp Ala Val Gly Ile Leu Ser
 1 5 10 15
 Leu Cys Ser Phe Ala Val Asp Pro Ala Asp Thr Tyr Cys Lys Tyr Val
 20 25 30
 Ala Ala Gly Asn Gln Pro Leu Gly Asn Cys Val Lys Met Leu Thr Val
 35 40 45
 His Asn Gly Ser Gly Phe Ala Ile Thr Ser Lys Pro Ser Pro Thr Pro
 50 55 60
 Asp Gln Asp Ser Tyr Gly Gly Ala Ser Val Cys Leu Tyr Cys Arg Ala
 65 70 75 80
 His Ile Ala His Pro Gly Gly Ala Gly Asn Leu Asp Gly Arg Cys Gln
 85 90 95
 Phe Lys Gly Ser Phe Val Gln Ile Pro Thr Thr Glu Lys Asp Pro Val
 100 105 110
 Gly Phe Cys Leu Arg Asn Lys Val Cys Thr Val Cys Gln Cys Trp Ile

	115	120	125	
	Gly Tyr Gly Cys Gln Cys Asp Ser Leu Arg Gln Pro Lys Pro Ser Val			
	130	135	140	
	Gln			
	145			
	<210> 7			
	<211> 521			
	<212> PRT			
	<213> 传染性支气管炎病毒			
	<400> 7			
	Gly Thr Gly Leu Phe Lys Ile Cys Asn Lys Glu Phe Ser Gly Val His			
	1	5	10	15
	Pro Ala Tyr Ala Val Thr Thr Lys Ala Leu Ala Ala Thr Tyr Lys Val			
	20	25	30	
	Asn Asp Glu Leu Ala Ala Leu Val Asn Val Glu Ala Gly Ser Glu Ile			
	35	40	45	
	Thr Tyr Lys His Leu Ile Ser Leu Leu Gly Phe Lys Met Ser Val Asn			
	50	55	60	
	Val Glu Gly Cys His Asn Met Phe Ile Thr Arg Asp Glu Ala Ile Arg			
	65	70	75	80
[0016]	Asn Val Arg Gly Trp Val Gly Phe Asp Val Glu Ala Thr His Ala Cys			
	85	90	95	
	Gly Thr Asn Ile Gly Thr Asn Leu Pro Phe Gln Val Gly Phe Ser Thr			
	100	105	110	
	Gly Ala Asp Phe Val Val Thr Pro Glu Gly Leu Val Asp Thr Ser Ile			
	115	120	125	
	Gly Asn Asn Phe Glu Pro Val Asn Ser Lys Ala Pro Pro Gly Glu Gln			
	130	135	140	
	Phe Asn His Leu Arg Ala Leu Phe Lys Ser Ala Lys Pro Trp His Val			
	145	150	155	160
	Val Arg Pro Arg Ile Val Gln Met Leu Ala Asp Asn Leu Cys Asn Val			
	165	170	175	
	Ser Asp Cys Val Val Phe Val Thr Trp Cys His Gly Leu Glu Leu Thr			
	180	185	190	
	Thr Leu Arg Tyr Phe Val Lys Ile Gly Lys Asp Gln Val Cys Ser Cys			
	195	200	205	
	Gly Ser Arg Ala Thr Thr Phe Asn Ser His Thr Gln Ala Tyr Ala Cys			
	210	215	220	
	Trp Lys His Cys Leu Gly Phe Asp Phe Val Tyr Asn Pro Leu Leu Val			
	225	230	235	240

Asp Ile Gln Gln Trp Gly Tyr Ser Gly Asn Leu Gln Phe Asn His Asp
 245 250 255
 Leu His Cys Asn Val His Gly His Ala His Val Ala Ser Ala Asp Ala
 260 265 270
 Ile Met Thr Arg Cys Leu Ala Ile Asn Asn Ala Phe Cys Gln Asp Val
 275 280 285
 Asn Trp Asp Leu Thr Tyr Pro His Ile Ala Asn Glu Asp Glu Val Asn
 290 295 300
 Ser Ser Cys Arg Tyr Leu Gln Arg Met Tyr Leu Asn Ala Cys Val Asp
 305 310 315 320
 Ala Leu Lys Val Asn Val Val Tyr Asp Ile Gly Asn Pro Lys Gly Ile
 325 330 335
 Lys Cys Val Arg Arg Gly Asp Leu Asn Phe Arg Phe Tyr Asp Lys Asn
 340 345 350
 Pro Ile Val Pro Asn Val Lys Gln Phe Glu Tyr Asp Tyr Asn Gln His
 355 360 365
 Lys Asp Lys Phe Ala Asp Gly Leu Cys Met Phe Trp Asn Cys Asn Val
 370 375 380
 [0017] Asp Cys Tyr Pro Asp Asn Ser Leu Val Cys Arg Tyr Asp Thr Arg Asn
 385 390 395 400
 Leu Ser Val Phe Asn Leu Pro Gly Cys Asn Gly Gly Ser Leu Tyr Val
 405 410 415
 Asn Lys His Ala Phe His Thr Pro Lys Phe Asp Arg Thr Ser Phe Arg
 420 425 430
 Asn Leu Lys Ala Met Pro Phe Phe Phe Tyr Asp Ser Ser Pro Cys Glu
 435 440 445
 Thr Ile Gln Leu Asp Gly Val Ala Gln Asp Leu Val Ser Leu Ala Thr
 450 455 460
 Lys Asp Cys Ile Thr Lys Cys Asn Ile Gly Gly Ala Val Cys Lys Lys
 465 470 475 480
 His Ala Gln Met Tyr Ala Asp Phe Val Thr Ser Tyr Asn Ala Ala Val
 485 490 495
 Thr Ala Gly Phe Thr Phe Trp Val Thr Asn Asn Phe Asn Pro Tyr Asn
 500 505 510
 Leu Trp Lys Ser Phe Ser Ala Leu Gln
 515 520
 <210> 8
 <211> 338

<212> PRT

<213> 传染性支气管炎病毒

<400> 8

Ser Ile Asp Asn Ile Ala Tyr Asn Met Tyr Lys Gly Gly His Tyr Asp
1 5 10 15

Ala Ile Ala Gly Glu Met Pro Thr Ile Val Thr Gly Asp Lys Val Phe
20 25 30

Val Ile Asp Gln Gly Val Glu Lys Ala Val Phe Phe Asn Gln Thr Ile
35 40 45

Leu Pro Thr Ser Val Ala Phe Glu Leu Tyr Ala Lys Arg Asn Ile Arg
50 55 60

Thr Leu Pro Asn Asn Arg Ile Leu Lys Gly Leu Gly Val Asp Val Thr
65 70 75 80

Asn Gly Phe Val Ile Trp Asp Tyr Thr Asn Gln Thr Pro Leu Tyr Arg
85 90 95

Asn Thr Val Lys Val Cys Ala Tyr Thr Asp Ile Glu Pro Asn Gly Leu
100 105 110

Ile Val Leu Tyr Asp Asp Arg Tyr Gly Asp Tyr Gln Ser Phe Leu Ala
115 120 125

[0018]

Ala Asp Asn Ala Val Leu Val Ser Thr Gln Cys Tyr Lys Arg Tyr Ser
130 135 140

Tyr Val Glu Ile Pro Ser Asn Leu Leu Val Gln Asn Gly Ile Pro Leu
145 150 155 160

Lys Asp Gly Ala Asn Leu Tyr Val Tyr Lys Arg Val Asn Gly Ala Phe
165 170 175

Val Thr Leu Pro Asn Thr Leu Asn Thr Gln Gly Arg Ser Tyr Glu Thr
180 185 190

Phe Glu Pro Arg Ser Asp Val Glu Arg Asp Phe Leu Asp Met Ser Glu
195 200 205

Glu Ser Phe Val Glu Lys Tyr Gly Lys Glu Leu Gly Leu Gln His Ile
210 215 220

Leu Tyr Gly Glu Val Asp Lys Pro Gln Leu Gly Gly Leu His Thr Val
225 230 235 240

Ile Gly Met Cys Arg Leu Leu Arg Ala Asn Lys Leu Asn Ala Lys Ser
245 250 255

Val Thr Asn Ser Asp Ser Asp Val Met Gln Asn Tyr Phe Val Leu Ala
260 265 270

Asp Asn Gly Ser Tyr Lys Gln Val Cys Thr Val Val Asp Leu Leu Leu
275 280 285

Asp Asp Phe Leu Glu Leu Leu Arg Asn Ile Leu Lys Glu Tyr Gly Thr
 290 295 300
 Asn Lys Ser Lys Val Val Thr Val Ser Ile Asp Tyr His Ser Ile Asn
 305 310 315 320
 Phe Met Thr Trp Phe Glu Asp Gly Ile Ile Lys Thr Cys Tyr Pro Gln
 325 330 335
 Leu Gln
 <210> 9
 <211> 302
 <212> PRT
 <213> 传染性支气管炎病毒
 <400> 9
 Ser Ala Trp Thr Cys Gly Tyr Asn Met Pro Glu Leu Tyr Lys Val Gln
 1 5 10 15
 Asn Cys Val Met Glu Pro Cys Asn Ile Pro Asn Tyr Gly Val Gly Ile
 20 25 30
 Ala Leu Pro Ser Gly Ile Met Met Asn Val Ala Lys Tyr Thr Gln Leu
 35 40 45
 Cys Gln Tyr Leu Ser Lys Thr Thr Met Cys Val Pro His Asn Met Arg
 50 55 60
 Val Met His Phe Gly Ala Gly Ser Asp Lys Gly Val Ala Pro Gly Ser
 65 70 75 80
 Thr Val Leu Lys Gln Trp Leu Pro Glu Gly Thr Leu Leu Val Asp Asn
 85 90 95
 Asp Ile Val Asp Tyr Val Ser Asp Ala His Val Ser Val Leu Ser Asp
 100 105 110
 Cys Asn Lys Tyr Lys Thr Glu His Lys Phe Asp Leu Val Ile Ser Asp
 115 120 125
 Met Tyr Thr Asp Asn Asp Ser Lys Arg Lys His Glu Gly Val Ile Ala
 130 135 140
 Asn Asn Gly Asn Asp Asp Val Phe Ile Tyr Leu Ser Ser Phe Leu Arg
 145 150 155 160
 Asn Asn Leu Ala Leu Gly Gly Ser Phe Ala Val Lys Val Thr Glu Thr
 165 170 175
 Ser Trp His Glu Val Leu Tyr Asp Ile Ala Gln Asp Cys Ala Trp Trp
 180 185 190
 Thr Met Phe Cys Thr Ala Val Asn Ala Ser Ser Ser Glu Ala Phe Leu
 195 200 205

[0019]

Val Gly Val Asn Tyr Leu Gly Ala Ser Glu Lys Val Lys Val Ser Gly
 210 215 220

Lys Thr Leu His Ala Asn Tyr Ile Phe Trp Arg Asn Cys Asn Tyr Leu
 225 230 235 240

Gln Thr Ser Ala Tyr Ser Ile Phe Asp Val Ala Lys Phe Asp Leu Arg
 245 250 255

Leu Lys Ala Thr Pro Val Val Asn Leu Lys Thr Glu Gln Lys Thr Asp
 260 265 270

Leu Val Phe Asn Leu Ile Lys Cys Gly Lys Leu Leu Val Arg Asp Val
 275 280 285

Gly Asn Thr Ser Phe Thr Ser Asp Ser Phe Val Cys Thr Met
 290 295 300

<210> 10
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 突变的Nsp10序列

<400> 10

Ser Lys Gly His Glu Thr Glu Glu Val Asp Ala Val Gly Ile Leu Ser
 1 5 10 15

[0020]

Leu Cys Ser Phe Ala Val Asp Pro Ala Asp Thr Tyr Cys Lys Tyr Val
 20 25 30

Ala Ala Gly Asn Gln Pro Leu Gly Asn Cys Val Lys Met Leu Thr Val
 35 40 45

His Asn Gly Ser Gly Phe Ala Ile Thr Ser Lys Pro Ser Pro Thr Pro
 50 55 60

Asp Gln Asp Ser Tyr Gly Gly Ala Ser Val Cys Leu Tyr Cys Arg Ala
 65 70 75 80

His Ile Ala His Leu Gly Gly Ala Gly Asn Leu Asp Gly Arg Cys Gln
 85 90 95

Phe Lys Gly Ser Phe Val Gln Ile Pro Thr Thr Glu Lys Asp Pro Val
 100 105 110

Gly Phe Cys Leu Arg Asn Lys Val Cys Thr Val Cys Gln Cys Trp Ile
 115 120 125

Gly Tyr Gly Cys Gln Cys Asp Ser Leu Arg Gln Pro Lys Pro Ser Val
 130 135 140

Gln
 145

<210> 11
 <211> 521

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的Nsp14序列

<400> 11

Gly Thr Gly Leu Phe Lys Ile Cys Asn Lys Glu Phe Ser Gly Val His
1 5 10 15

Pro Ala Tyr Ala Val Thr Thr Lys Ala Leu Ala Ala Thr Tyr Lys Val
20 25 30

Asn Asp Glu Leu Ala Ala Leu Val Asn Val Glu Ala Gly Ser Glu Ile
35 40 45

Thr Tyr Lys His Leu Ile Ser Leu Leu Gly Phe Lys Met Ser Val Asn
50 55 60

Val Glu Gly Cys His Asn Met Phe Ile Thr Arg Asp Glu Ala Ile Arg
65 70 75 80

Asn Val Arg Gly Trp Val Gly Phe Asp Val Glu Ala Thr His Ala Cys
85 90 95

Gly Thr Asn Ile Gly Thr Asn Leu Pro Phe Gln Val Gly Phe Ser Thr
100 105 110

[0021]

Gly Ala Asp Phe Val Val Thr Pro Glu Gly Leu Val Asp Thr Ser Ile
115 120 125

Gly Asn Asn Phe Glu Pro Val Asn Ser Lys Ala Pro Pro Gly Glu Gln
130 135 140

Phe Asn His Leu Arg Ala Leu Phe Lys Ser Ala Lys Pro Trp His Val
145 150 155 160

Val Arg Pro Arg Ile Val Gln Met Leu Ala Asp Asn Leu Cys Asn Val
165 170 175

Ser Asp Cys Val Val Phe Val Thr Trp Cys His Gly Leu Glu Leu Thr
180 185 190

Thr Leu Arg Tyr Phe Val Lys Ile Gly Lys Asp Gln Val Cys Ser Cys
195 200 205

Gly Ser Arg Ala Thr Thr Phe Asn Ser His Thr Gln Ala Tyr Ala Cys
210 215 220

Trp Lys His Cys Leu Gly Phe Asp Phe Val Tyr Asn Pro Leu Leu Val
225 230 235 240

Asp Ile Gln Gln Trp Gly Tyr Ser Gly Asn Leu Gln Phe Asn His Asp
245 250 255

Leu His Cys Asn Val His Gly His Ala His Val Ala Ser Ala Asp Ala
260 265 270

[0022]

Ile Met Thr Arg Cys Leu Ala Ile Asn Asn Ala Phe Cys Gln Asp Val
 275 280 285
 Asn Trp Asp Leu Thr Tyr Pro His Ile Ala Asn Glu Asp Glu Val Asn
 290 295 300
 Ser Ser Cys Arg Tyr Leu Gln Arg Met Tyr Leu Asn Ala Cys Val Asp
 305 310 315 320
 Ala Leu Lys Val Asn Val Val Tyr Asp Ile Gly Asn Pro Lys Gly Ile
 325 330 335
 Lys Cys Val Arg Arg Gly Asp Leu Asn Phe Arg Phe Tyr Asp Lys Asn
 340 345 350
 Pro Ile Val Pro Asn Val Lys Gln Phe Glu Tyr Asp Tyr Asn Gln His
 355 360 365
 Lys Asp Lys Phe Ala Asp Gly Leu Cys Met Phe Trp Asn Cys Asn Val
 370 375 380
 Asp Cys Tyr Pro Asp Asn Ser Leu Leu Cys Arg Tyr Asp Thr Arg Asn
 385 390 395 400
 Leu Ser Val Phe Asn Leu Pro Gly Cys Asn Gly Gly Ser Leu Tyr Val
 405 410 415
 Asn Lys His Ala Phe His Thr Pro Lys Phe Asp Arg Thr Ser Phe Arg
 420 425 430
 Asn Leu Lys Ala Met Pro Phe Phe Phe Tyr Asp Ser Ser Pro Cys Glu
 435 440 445
 Thr Ile Gln Leu Asp Gly Val Ala Gln Asp Leu Val Ser Leu Ala Thr
 450 455 460
 Lys Asp Cys Ile Thr Lys Cys Asn Ile Gly Gly Ala Val Cys Lys Lys
 465 470 475 480
 His Ala Gln Met Tyr Ala Asp Phe Val Thr Ser Tyr Asn Ala Ala Val
 485 490 495
 Thr Ala Gly Phe Thr Phe Trp Val Thr Asn Asn Phe Asn Pro Tyr Asn
 500 505 510
 Leu Trp Lys Ser Phe Ser Ala Leu Gln
 515 520
 <210> 12
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 突变的Nsp15序列
 <400> 12
 Ser Ile Asp Asn Ile Ala Tyr Asn Met Tyr Lys Gly Gly His Tyr Asp
 1 5 10 15

Ala	Ile	Ala	Gly	Glu	Met	Pro	Thr	Ile	Val	Thr	Gly	Asp	Lys	Val	Phe
			20					25					30		
Val	Ile	Asp	Gln	Gly	Val	Glu	Lys	Ala	Val	Phe	Phe	Asn	Gln	Thr	Ile
		35					40					45			
Leu	Pro	Thr	Ser	Val	Ala	Phe	Glu	Leu	Tyr	Ala	Lys	Arg	Asn	Ile	Arg
		50				55					60				
Thr	Leu	Pro	Asn	Asn	Arg	Ile	Leu	Lys	Gly	Leu	Gly	Val	Asp	Val	Thr
65					70					75					80
Asn	Gly	Phe	Val	Ile	Trp	Asp	Tyr	Thr	Asn	Gln	Thr	Pro	Leu	Tyr	Arg
				85					90					95	
Asn	Thr	Val	Lys	Val	Cys	Ala	Tyr	Thr	Asp	Ile	Glu	Pro	Asn	Gly	Leu
			100					105					110		
Ile	Val	Leu	Tyr	Asp	Asp	Arg	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Gln	Ser	Phe	Leu	Ala
		115					120					125			
Ala	Asp	Asn	Ala	Val	Leu	Val	Ser	Thr	Gln	Cys	Tyr	Lys	Arg	Tyr	Ser
		130				135					140				
Tyr	Val	Glu	Ile	Pro	Ser	Asn	Leu	Leu	Val	Gln	Asn	Gly	Ile	Pro	Leu
145					150					155					160
Lys	Asp	Gly	Ala	Asn	Leu	Tyr	Val	Tyr	Lys	Arg	Val	Asn	Gly	Ala	Phe
				165					170					175	
Val	Thr	Leu	Pro	Asn	Thr	Ile	Asn	Thr	Gln	Gly	Arg	Ser	Tyr	Glu	Thr
			180					185					190		
Phe	Glu	Pro	Arg	Ser	Asp	Val	Glu	Arg	Asp	Phe	Leu	Asp	Met	Ser	Glu
		195					200					205			
Glu	Ser	Phe	Val	Glu	Lys	Tyr	Gly	Lys	Glu	Leu	Gly	Leu	Gln	His	Ile
		210				215					220				
Leu	Tyr	Gly	Glu	Val	Asp	Lys	Pro	Gln	Leu	Gly	Gly	Leu	His	Thr	Val
225					230					235					240
Ile	Gly	Met	Cys	Arg	Leu	Leu	Arg	Ala	Asn	Lys	Leu	Asn	Ala	Lys	Ser
				245					250					255	
Val	Thr	Asn	Ser	Asp	Ser	Asp	Val	Met	Gln	Asn	Tyr	Phe	Val	Leu	Ala
			260					265					270		
Asp	Asn	Gly	Ser	Tyr	Lys	Gln	Val	Cys	Thr	Val	Val	Asp	Leu	Leu	Leu
		275					280					285			
Asp	Asp	Phe	Leu	Glu	Leu	Leu	Arg	Asn	Ile	Leu	Lys	Glu	Tyr	Gly	Thr
		290				295					300				
Asn	Lys	Ser	Lys	Val	Val	Thr	Val	Ser	Ile	Asp	Tyr	His	Ser	Ile	Asn
305				310						315					320

Phe Met Thr Trp Phe Glu Asp Gly Ile Ile Lys Thr Cys Tyr Pro Gln
325 330 335

Leu Gln

<210> 13
<211> 302
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 突变的Nsp16序列

<400> 13

Ser Ala Trp Thr Cys Gly Tyr Asn Met Pro Glu Leu Tyr Lys Val Gln
1 5 10 15

Asn Cys Val Met Glu Pro Cys Asn Ile Pro Asn Tyr Gly Val Gly Ile
20 25 30

Ala Leu Pro Ser Gly Ile Met Met Asn Val Ala Lys Tyr Thr Gln Leu
35 40 45

Cys Gln Tyr Leu Ser Lys Thr Thr Met Cys Val Pro His Asn Met Arg
50 55 60

[0024]

Val Met His Phe Gly Ala Gly Ser Asp Lys Gly Val Ala Pro Gly Ser
65 70 75 80

Thr Val Leu Lys Gln Trp Leu Pro Glu Gly Thr Leu Leu Val Asp Asn
85 90 95

Asp Ile Val Asp Tyr Val Ser Asp Ala His Val Ser Val Leu Ser Asp
100 105 110

Cys Asn Lys Tyr Lys Thr Glu His Lys Phe Asp Leu Val Ile Ser Asp
115 120 125

Met Tyr Thr Asp Asn Asp Ser Lys Arg Lys His Glu Gly Val Ile Ala
130 135 140

Asn Asn Gly Asn Asp Asp Val Phe Ile Tyr Leu Ser Ser Phe Leu Arg
145 150 155 160

Asn Asn Leu Ala Leu Gly Gly Ser Phe Ala Val Lys Val Thr Glu Thr
165 170 175

Ser Trp His Glu Val Leu Tyr Asp Ile Ala Gln Asp Cys Ala Trp Trp
180 185 190

Thr Met Phe Cys Thr Ala Val Asn Ala Ser Ser Ser Glu Ala Phe Leu
195 200 205

Ile Gly Val Asn Tyr Leu Gly Ala Ser Glu Lys Val Lys Val Ser Gly
210 215 220

Lys Thr Leu His Ala Asn Tyr Ile Phe Trp Arg Asn Cys Asn Tyr Leu
225 230 235 240

Gln Thr Ser Ala Tyr Ser Ile Phe Asp Val Ala Lys Phe Asp Leu Arg
245 250 255

[0025] Leu Lys Ala Thr Pro Val Val Asn Leu Lys Thr Glu Gln Lys Thr Asp
260 265 270

Leu Val Phe Asn Leu Ile Lys Cys Gly Lys Leu Leu Val Arg Asp Val
275 280 285

Gly Asn Thr Ser Phe Thr Ser Asp Ser Phe Val Cys Thr Met
290 295 300

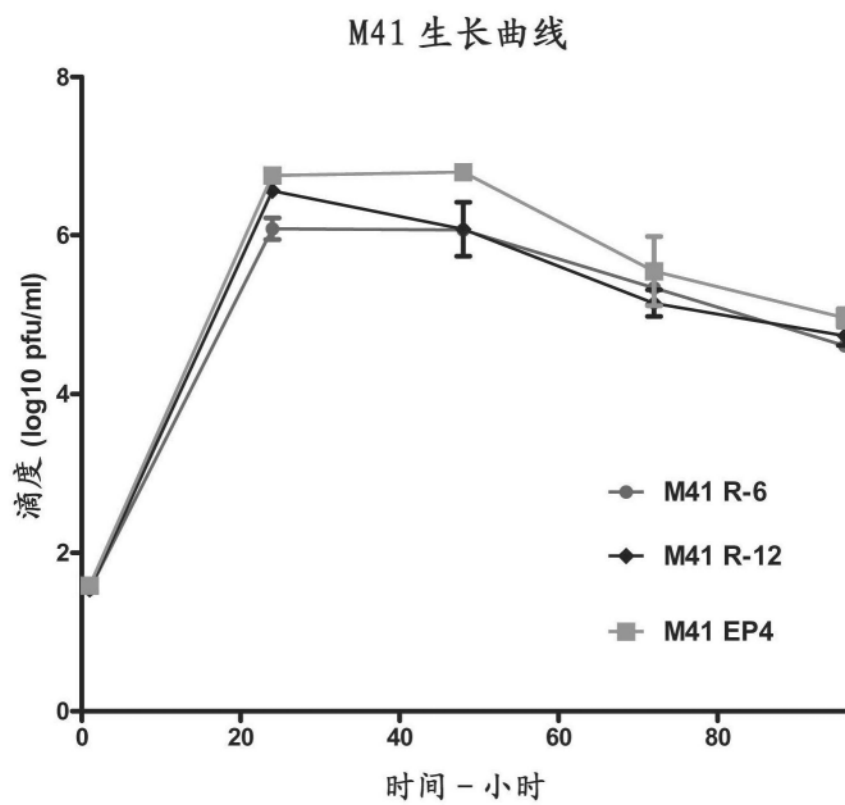


图1

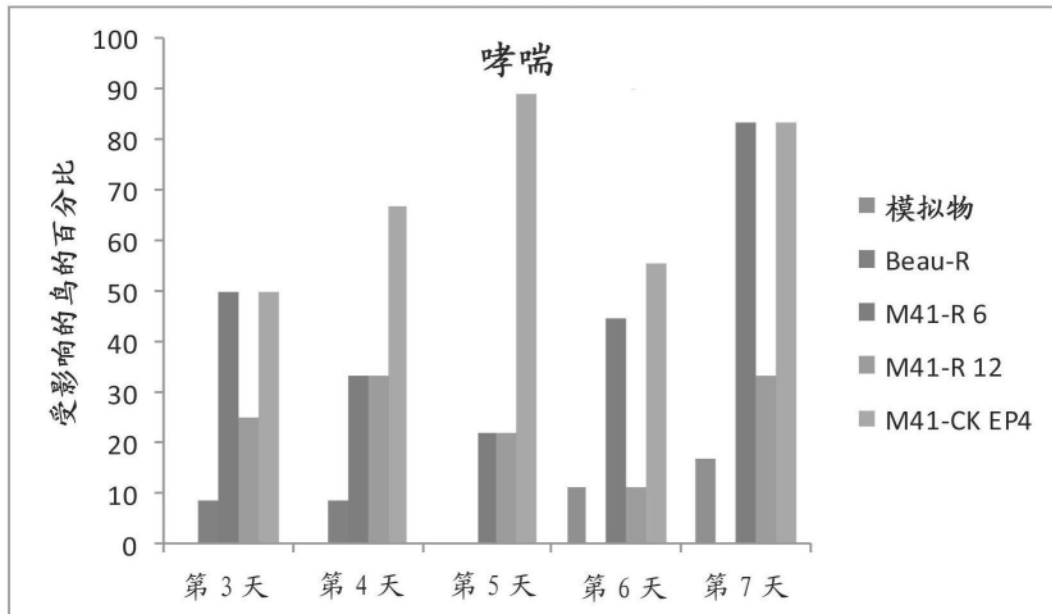
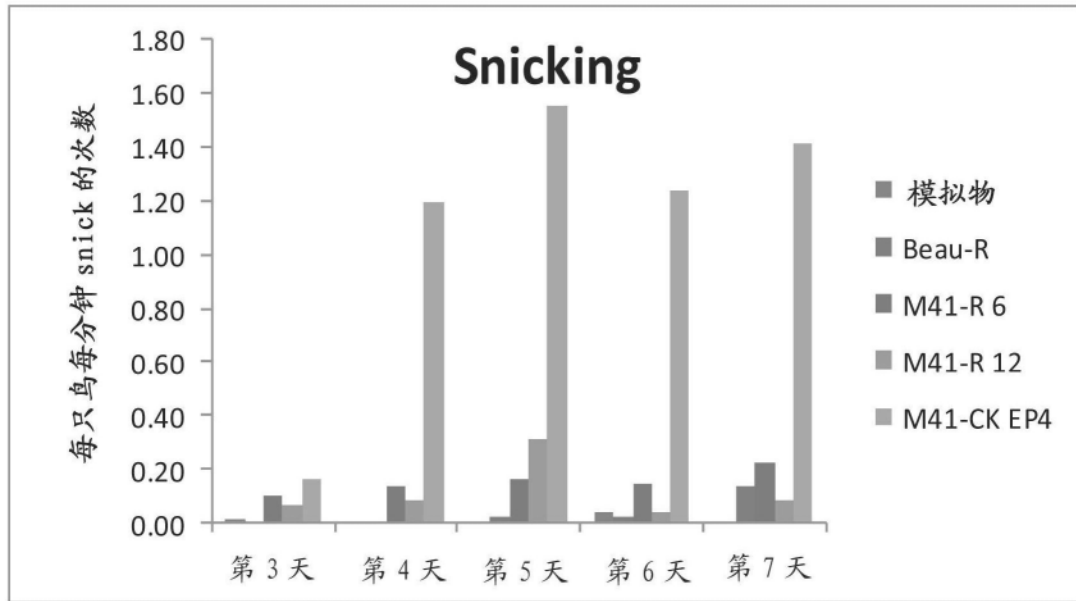


图2

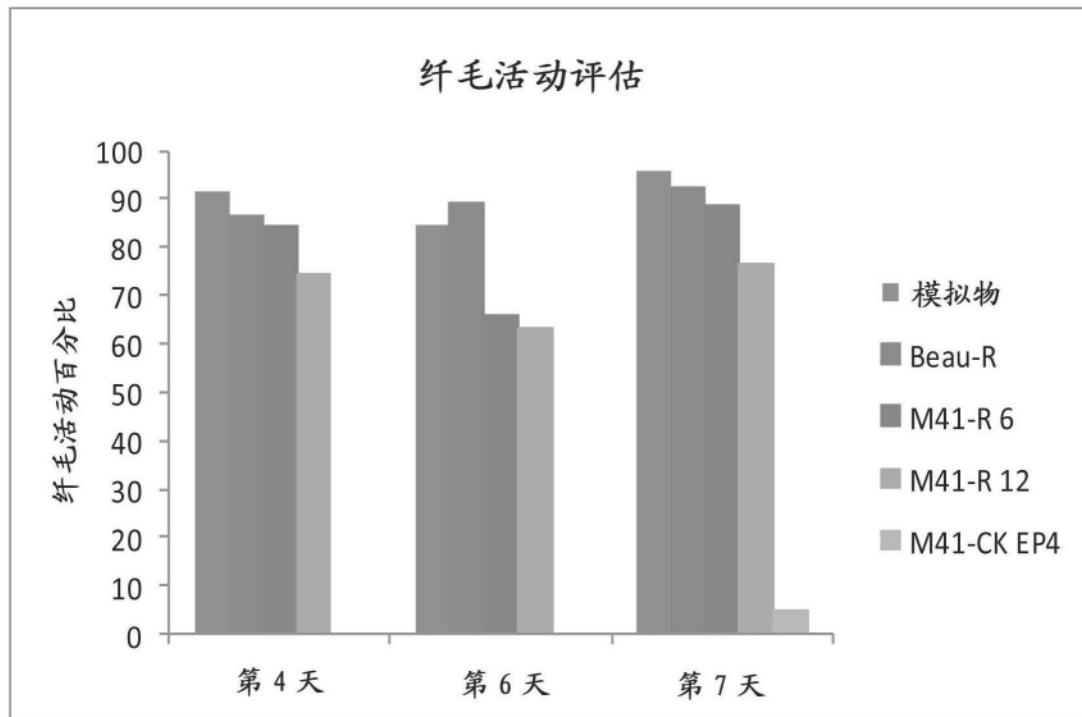


图3

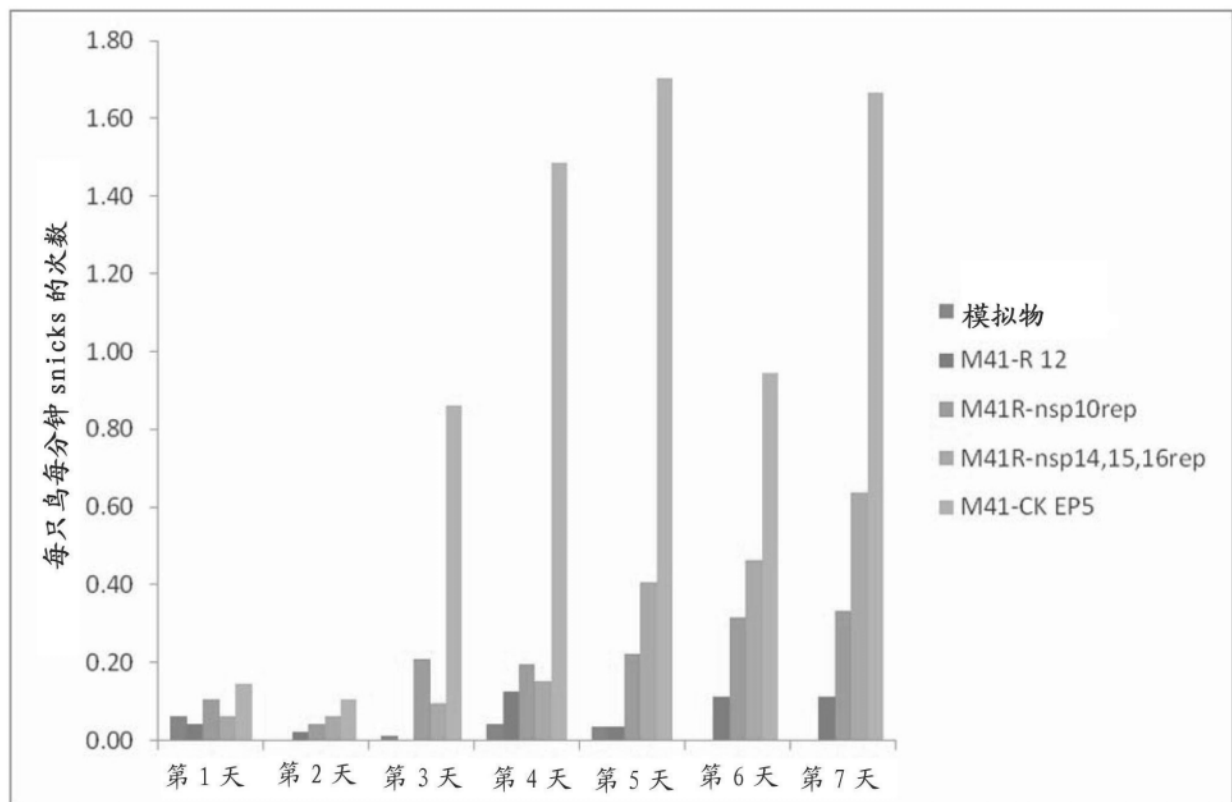


图4

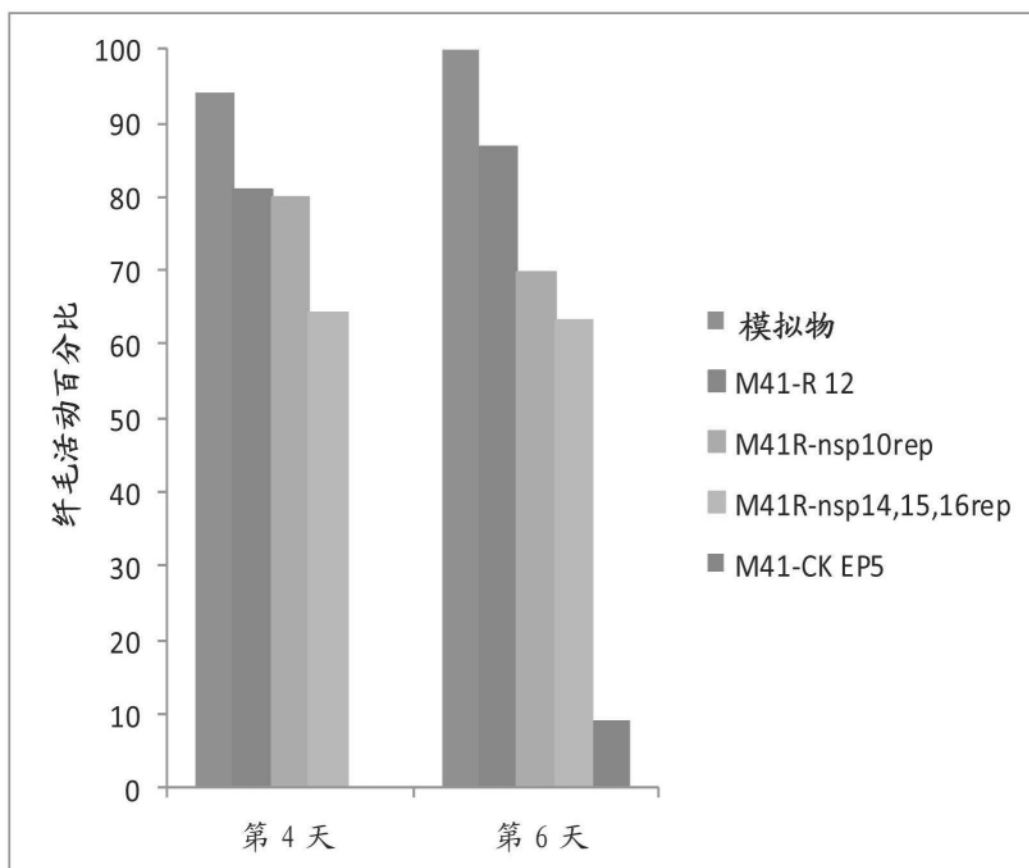


图5

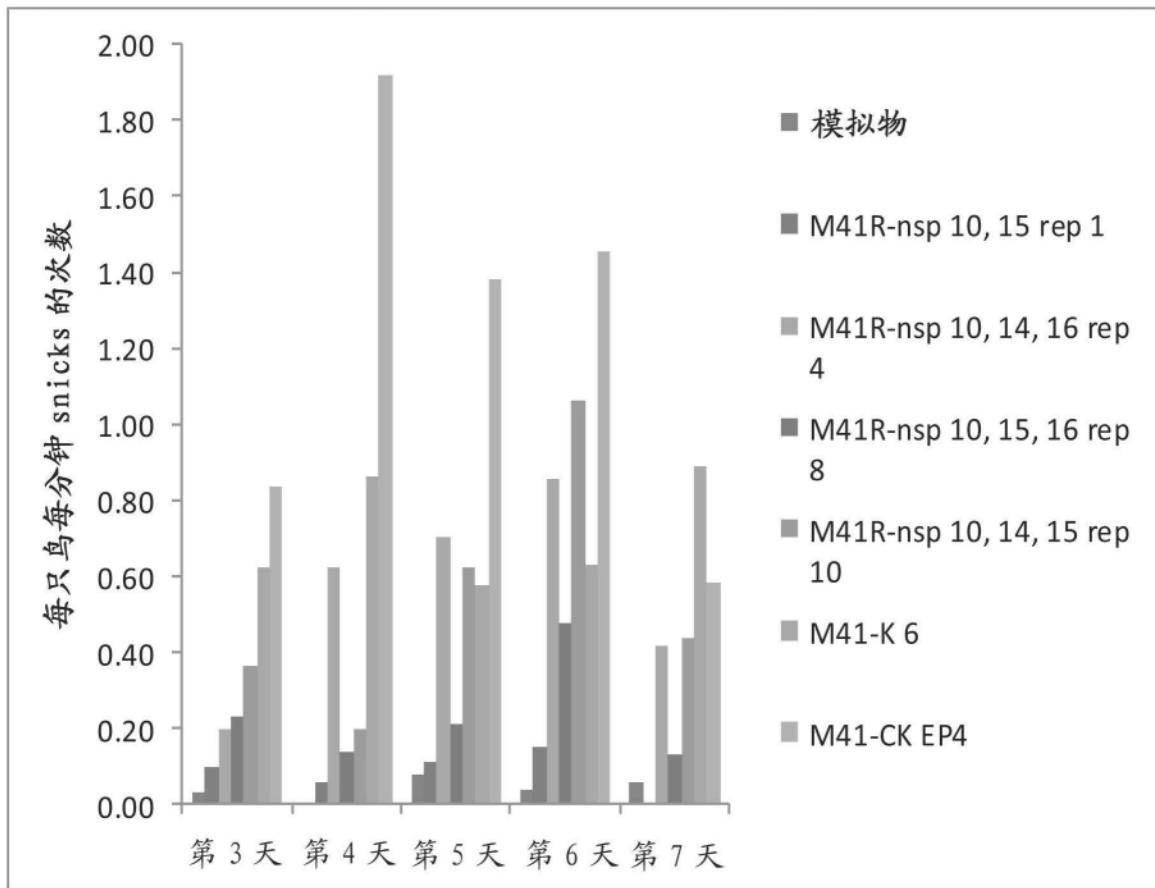


图6

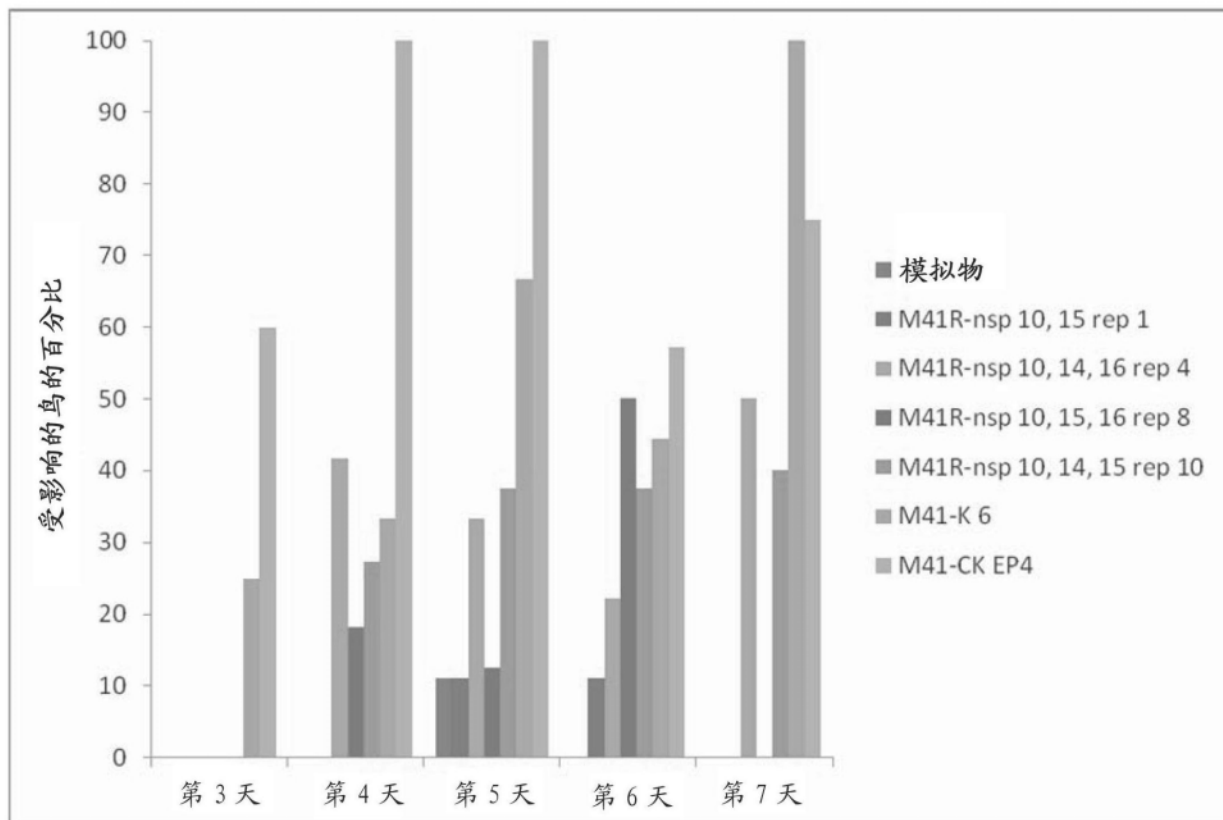


图7

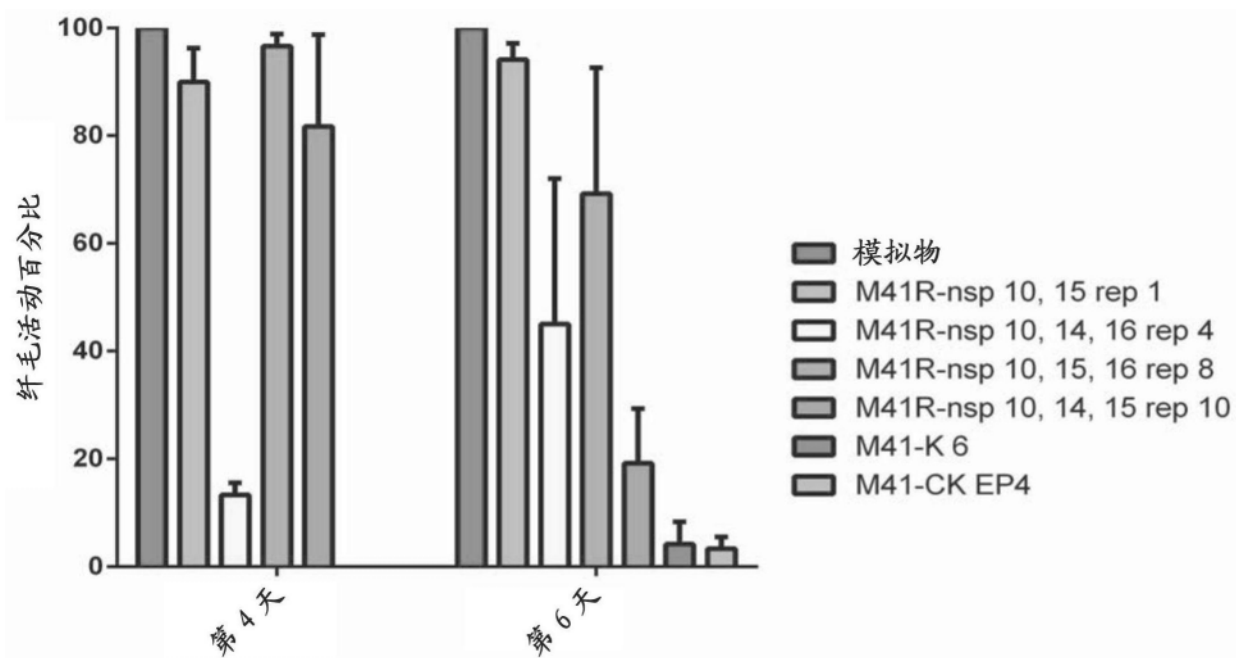


图8

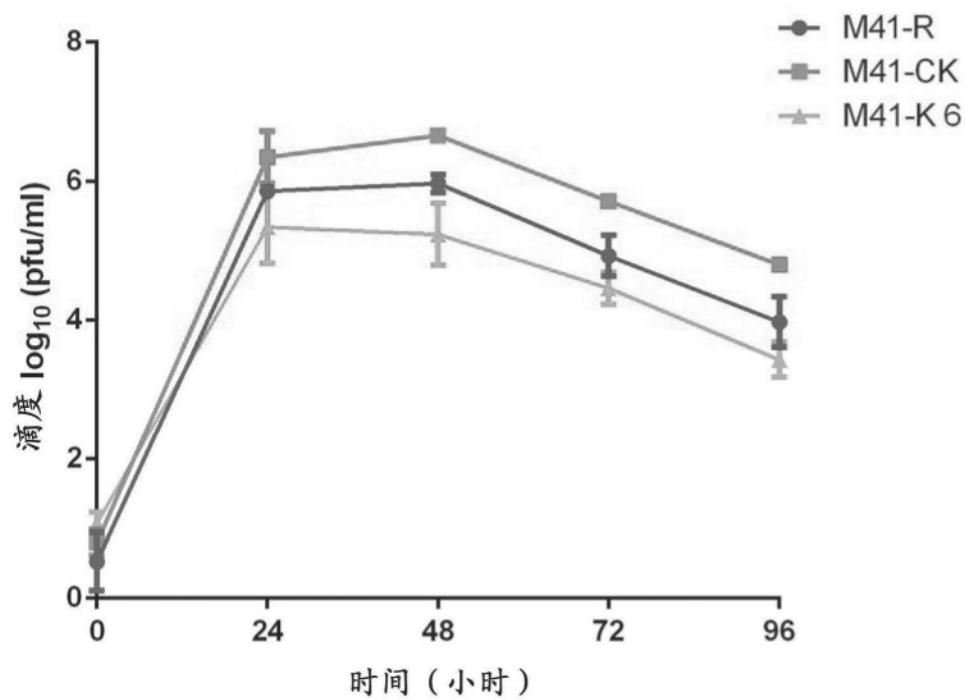


图9A

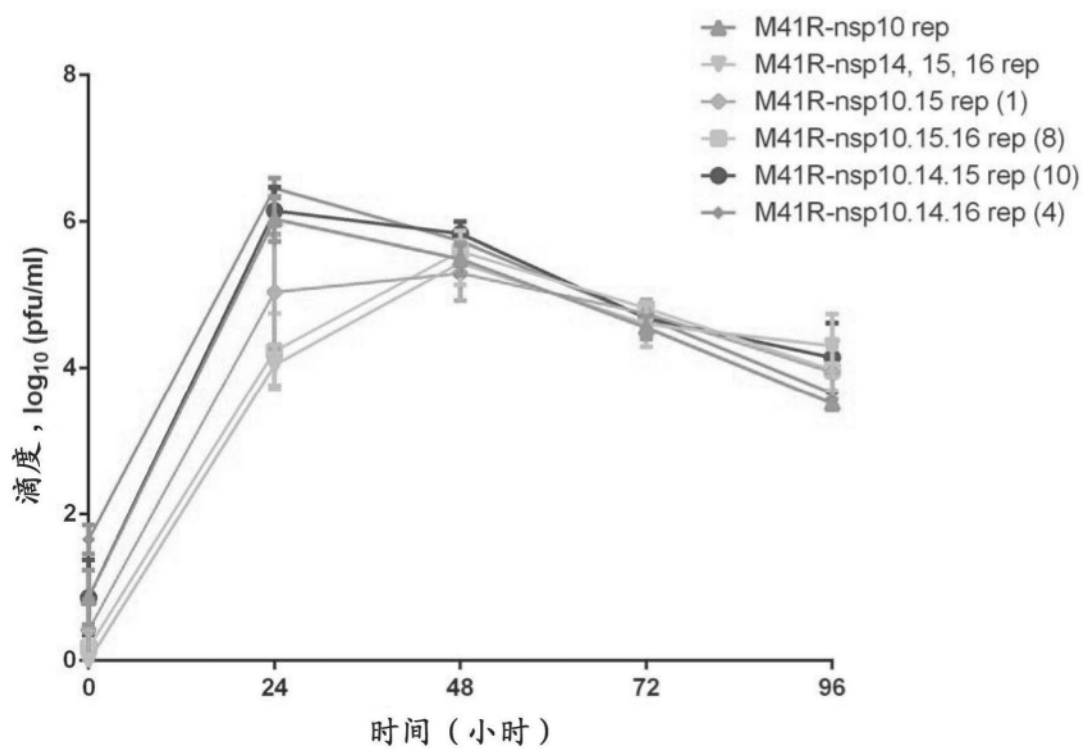


图9B

Nsp10

```

      *      20      *      40      *      60      *      80
M41 Nsp10: SKGHETEEVDVAVGILSLCSFAVDPADTYCKYVAAGNQPLGNCVKMLTVHNGSGFAITSKPSPTPDQDSYGGASVCLYCRA
Mod Nsp10: SKGHETEEVDVAVGILSLCSFAVDPADTYCKYVAAGNQPLGNCVKMLTVHNGSGFAITSKPSPTPDQDSYGGASVCLYCRA

      *      100     *      120     *      140
M41 Nsp10: HIAHFGGAGNLDGRCQFKGSFVQIPTTEKDPVGFCLRNKCTVCQCWIGYGCQCDSLROPKPSVO
Mod Nsp10: HIAHFGGAGNLDGRCQFKGSFVQIPTTEKDPVGFCLRNKCTVCQCWIGYGCQCDSLROPKPSVO

```

Nsp14

```

      *      20      *      40      *      60      *      80
M41 Nsp14: GTGLFKICNKEFSGVHPAYAVTTKALAATYKVNDLALVNVEAGSEITYKHLISLLGFKMSVNVEGCHNMFITRDEAIR
Mod Nsp14: GTGLFKICNKEFSGVHPAYAVTTKALAATYKVNDLALVNVEAGSEITYKHLISLLGFKMSVNVEGCHNMFITRDEAIR

      *      100     *      120     *      140     *      160
M41 Nsp14: NVRGWVGFDVEATHACGTNIGTNLPFQVGFSTGADFVVTPEGLVDTSIGNNFEPVNSKAPPGEQFNHLRALFKSAKPWHV
Mod Nsp14: NVRGWVGFDVEATHACGTNIGTNLPFQVGFSTGADFVVTPEGLVDTSIGNNFEPVNSKAPPGEQFNHLRALFKSAKPWHV

      *      180     *      200     *      220     *      240
M41 Nsp14: VRPRIVQMLADNLCNVSDCVFVTWCHGLELITLRYFVKIGKDQVCSCGSRATTFNSHTQAYACWKHCLGDFVYNPLLV
Mod Nsp14: VRPRIVQMLADNLCNVSDCVFVTWCHGLELITLRYFVKIGKDQVCSCGSRATTFNSHTQAYACWKHCLGDFVYNPLLV

      *      260     *      280     *      300     *      320
M41 Nsp14: DIQQWGYSGNLQFNHDLHCNVHGAHVASADAIMTRCLAINNAFCQDVNWDLTYPHIANEDEVNSSCRYLQRMYNACVD
Mod Nsp14: DIQQWGYSGNLQFNHDLHCNVHGAHVASADAIMTRCLAINNAFCQDVNWDLTYPHIANEDEVNSSCRYLQRMYNACVD

      *      340     *      360     *      380     *      400
M41 Nsp14: ALKVNVVYDIGNPKGIKCVRRGDLNFRFYDKNPVNPVKQFEYDYNQHKDKFADGLCMFWNCNVDCYPDNSILCRYDTRN
Mod Nsp14: ALKVNVVYDIGNPKGIKCVRRGDLNFRFYDKNPVNPVKQFEYDYNQHKDKFADGLCMFWNCNVDCYPDNSILCRYDTRN

      *      420     *      440     *      460     *      480
M41 Nsp14: LSVFNLPGCNGGSLYVNKHAFHTPKFDRTSFRNLKAMPFFFYDSSPCETIQLDGVAQDLVSLATKDCITKCNIGGAVCKK
Mod Nsp14: LSVFNLPGCNGGSLYVNKHAFHTPKFDRTSFRNLKAMPFFFYDSSPCETIQLDGVAQDLVSLATKDCITKCNIGGAVCKK

      *      500     *      520
M41 Nsp14: HAQMYADFVTSYNAAVTAGFTFWVTNNFNPNLWKSFSALQ
Mod Nsp14: HAQMYADFVTSYNAAVTAGFTFWVTNNFNPNLWKSFSALQ

```

图10

Nsp15

```

      *      20      *      40      *      60      *      80
M41 Nsp15: SIDNIAYNMYKGGHYDAIAGEMPTIVTGDKVFVIDQGVEKAVFFNQITILPTSVAFELYAKRNIRTLPNNRILKGLGVDVT
Mod Nsp15: SIDNIAYNMYKGGHYDAIAGEMPTIVTGDKVFVIDQGVEKAVFFNQITILPTSVAFELYAKRNIRTLPNNRILKGLGVDVT

      *      100     *      120     *      140     *      160
M41 Nsp15: NGFVIWDYTNQTPLYRNTVKVCAYTDIEPNGLIVLYDDRYGDYQSFLAADNAVLVSTQCYKRYSYVEIPSNLLVQNGIPL
Mod Nsp15: NGFVIWDYTNQTPLYRNTVKVCAYTDIEPNGLIVLYDDRYGDYQSFLAADNAVLVSTQCYKRYSYVEIPSNLLVQNGIPL

      *      180     *      200     *      220     *      240
M41 Nsp15: KDGANLYVYKRVNGAFVTLPTNTQGRSYETFEPRSDVERDFLDMSEESFVEKYGKELGLQHILYGEVDKPOLGGLHTV
Mod Nsp15: KDGANLYVYKRVNGAFVTLPTNTQGRSYETFEPRSDVERDFLDMSEESFVEKYGKELGLQHILYGEVDKPOLGGLHTV

      *      260     *      280     *      300     *      320
M41 Nsp15: IGMCRLLRANKLNAKSVTNSDSVDMQNYFVLADNGSYKQVCTVVDLLDDFLELLRNILKEYGTNKSQVTVSIDYHSIN
Mod Nsp15: IGMCRLLRANKLNAKSVTNSDSVDMQNYFVLADNGSYKQVCTVVDLLDDFLELLRNILKEYGTNKSQVTVSIDYHSIN

      *
M41 Nsp15: FMTWFEDGLIKTCYPQLQ
Mod Nsp15: FMTWFEDGLIKTCYPQLQ

```

Nsp16

```

      *      20      *      40      *      60      *      80
M41 Nsp16: SAWTCGYNMPELYKVQNCVMEPCNI PNYGVGIALPSGIMNVAKYTQLCQYLSKTTMCVPHNMRVMHFGAGSDKGAVAPGS
Mod Nsp16: SAWTCGYNMPELYKVQNCVMEPCNI PNYGVGIALPSGIMNVAKYTQLCQYLSKTTMCVPHNMRVMHFGAGSDKGAVAPGS

      *      100     *      120     *      140     *      160
M41 Nsp16: TVLKQWLPEGTILLVDNDIVDYVSDAHVSVLSDCNKYKTEHKFDLVISDMYTDNDSKRKHGEGVIANNGNDDVFIYLSSEFLR
Mod Nsp16: TVLKQWLPEGTILLVDNDIVDYVSDAHVSVLSDCNKYKTEHKFDLVISDMYTDNDSKRKHGEGVIANNGNDDVFIYLSSEFLR

      *      180     *      200     *      220     *      240
M41 Nsp16: NNLALGGSFAVKVTETSWHEVLYDIAQDCAWWTMFCTAVNASSSEAFILGVNYLGASEKVKVSGKTLHANYIFWRNCNYL
Mod Nsp16: NNLALGGSFAVKVTETSWHEVLYDIAQDCAWWTMFCTAVNASSSEAFILGVNYLGASEKVKVSGKTLHANYIFWRNCNYL

      *      260     *      280     *      300
M41 Nsp16: QTSAYSIFDVAKFDLRLKATPVVNLKTEQKTDLVFNLIKCGKLLVRDVGNTSFTSDSFVCTM
Mod Nsp16: QTSAYSIFDVAKFDLRLKATPVVNLKTEQKTDLVFNLIKCGKLLVRDVGNTSFTSDSFVCTM

```

图10(续)

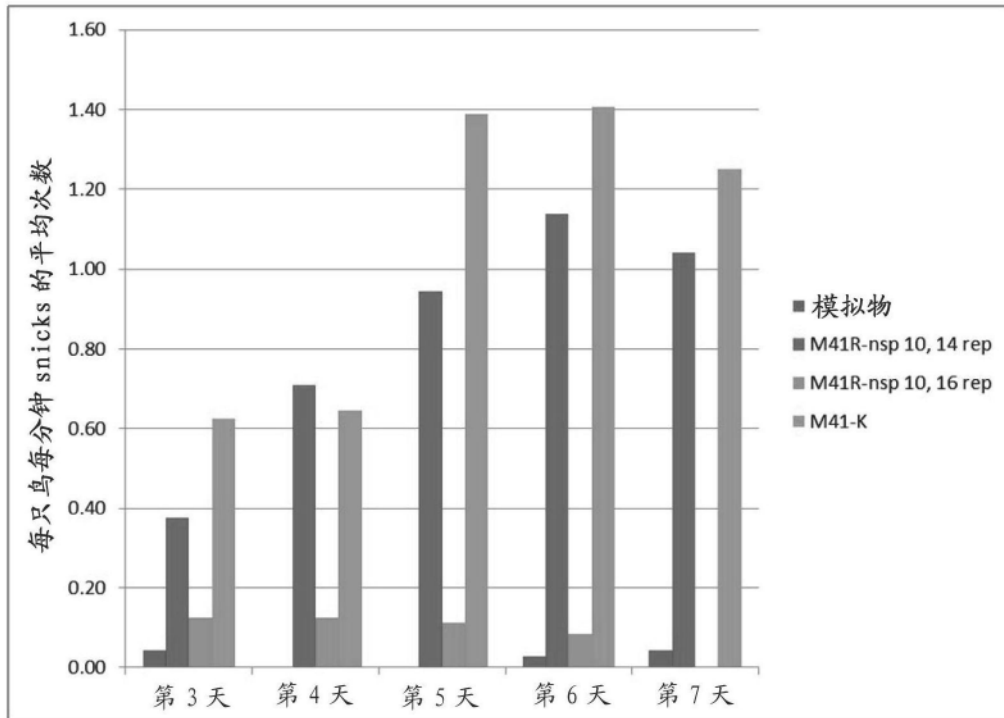


图11A

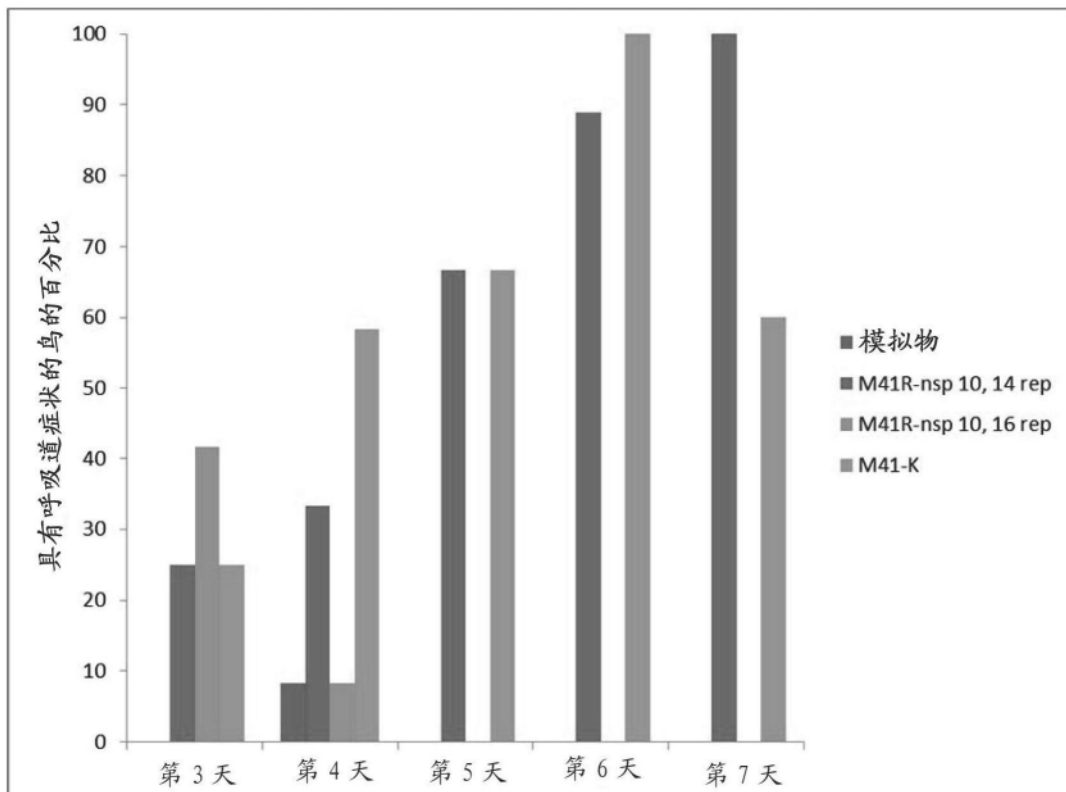


图11B

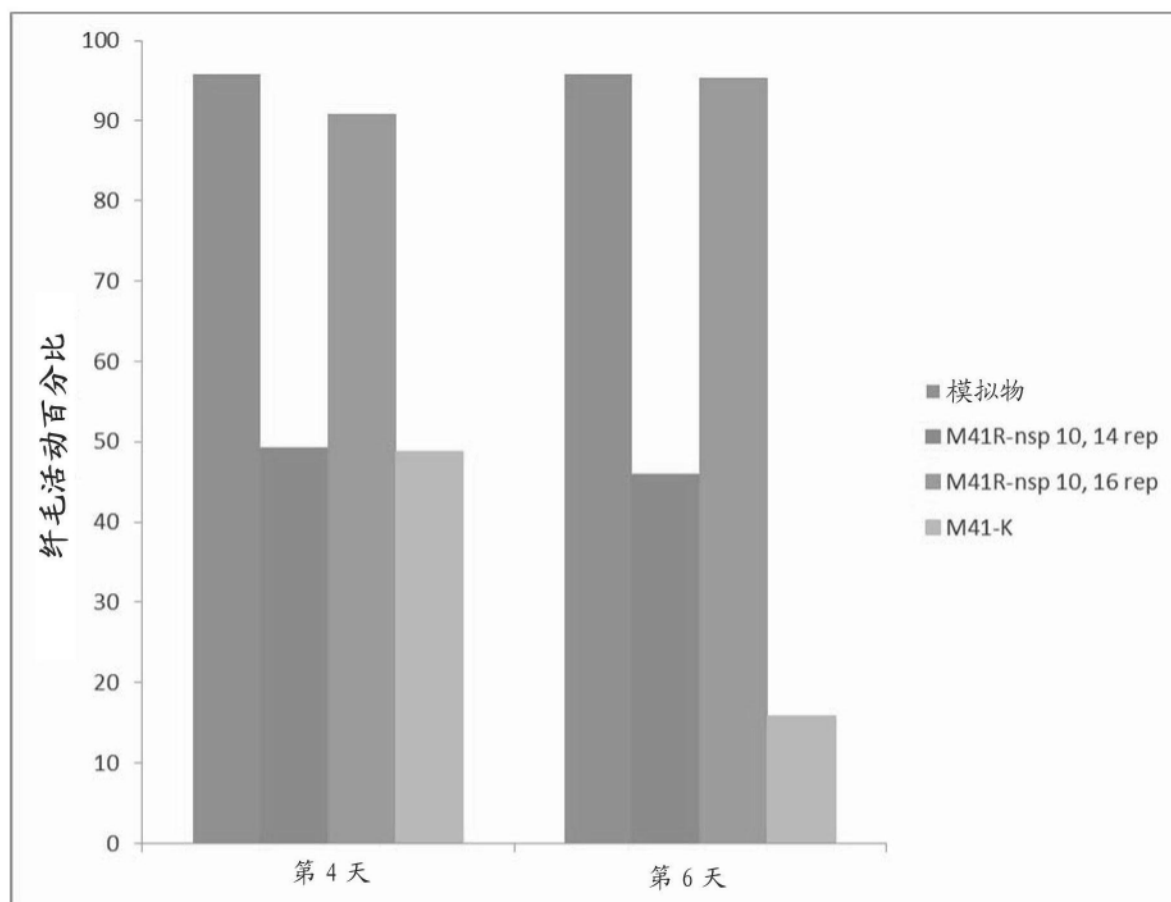


图11C