



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112017001310-0 B1



(22) Data do Depósito: 23/07/2015

(45) Data de Concessão: 28/06/2022

(54) Título: CORONAVÍRUS

(51) Int.Cl.: C12N 7/04; C07K 14/165; A61K 39/00; A61K 39/215.

(30) Prioridade Unionista: 23/07/2014 GB 1413020.7.

(73) Titular(es): THE PIRBRIGHT INSTITUTE.

(72) Inventor(es): ERICA BICKERTON; SARAH KEEP; PAUL BRITTON.

(86) Pedido PCT: PCT GB2015052124 de 23/07/2015

(87) Publicação PCT: WO 2016/012793 de 28/01/2016

(85) Data do Início da Fase Nacional: 23/01/2017

(57) Resumo: CORONAVÍRUS. A presente invenção fornece um coronavírus atenuado vivo compreendendo um gene replicase variante que codifica poliproteínas compreendendo uma mutação em uma ou mais das proteínas não estruturais (nsp)-10, nsp-14, nsp-15 ou nsp-16. O coronavírus pode ser utilizado como uma vacina para tratar e / ou prevenir uma doença, tal como a bronquite infecciosa, em um indivíduo.

CORONAVÍRUS**CAMPO DE INVENÇÃO**

[0001] A presente invenção se refere a um coronavírus atenuado compreendendo um gene replicase variante, o que faz com que o vírus tenha patogenicidade reduzida. A presente invenção também se relaciona com a utilização de tal coronavírus em uma vacina para prevenir e / ou tratar uma doença.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] Vírus da bronquite infecciosa (IBV), o agente etiológico da bronquite infecciosa (IB), é um agente patogênico infeccioso altamente contagioso de aves domésticas que replica principalmente no trato respiratório, mas também em células epiteliais do intestino, rim e oviduto. IBV é um membro da Ordem *Nidovirales*, Família *Coronaviridae*, subfamília *Coronavirinae* e gênero *Gammacoronavirus*; geneticamente coronavírus muito semelhante causa doenças em perus, galinha-de-angola e faisões.

[0003] Os sinais clínicos de IB incluem espirros, estertores traqueais, secreção nasal e respiração ofegante. As aves para cRNAe tem reduzido ganho de peso, enquanto que aves poedeiras põem menos ovos e produzem ovos de má qualidade. A infecção respiratória predispõe galinhas para infecções bacterianas secundárias que podem ser fatais em pintos. O vírus também pode causar danos permanentes no oviduto, especialmente, em filhotes, levando à produção e qualidade reduzida de ovos; e rim, algumas vezes levando a doença renal, que pode ser fatal.

[0004] IBV tem sido relatado para ser responsável pela perda mais econômica para a indústria de aves de capoeira que qualquer outra doença infecciosa. Embora as vacinas vivas atenuadas e as vacinas inativadas sejam universalmente usadas no controle de IBV, a proteção obtida

pela utilização de vacinação pode ser perdida, quer devido à vacina aviária ou a introdução de um novo sorotipo de IBV que não está relacionada com a vacina utilizada, o que representa um risco para a indústria avícola.

[0005] Além disso, existe uma necessidade na indústria para desenvolver vacinas que sejam adequadas para utilização *in ovo*, de modo a melhorar a eficiência e eficácia de custos dos programas de vacinação. Um desafio importante associado com vacinação *in ovo* é que o vírus deva ser capaz de se replicar na presença de anticorpos maternos derivadas contra o vírus, sem ser patogênico para o embrião. As vacinas de IBV correntes são obtidas, de acordo com múltiplas passagens em ovos embrionados, isso resulta em vírus com patogenicidade reduzida para galinhas, de modo que eles podem ser utilizados como vacinas vivas atenuadas. No entanto tais vírus quase sempre mostram um aumento da virulência aos embriões, e, portanto, não pode ser utilizado para vacinação *in ovo* em que causem eclosão reduzida. Uma redução de 70% na taxa de eclosão é visto em alguns casos.

[0006] Atenuação seguinte a múltipla passagem em ovos embrionados também sofre de outras desvantagens. É um método empírico, como a atenuação dos vírus é aleatória e irão diferir de cada vez que o vírus seja passado, de modo que a passagem do mesmo vírus através de uma série diferente de ovos para fins de atenuação irá conduzir a um conjunto diferente de mutações que conduzem a atenuação. Existem também problemas associados com a eficácia do processo: algumas mutações irão afetar a replicação do vírus e algumas das mutações podem também tornar o vírus atenuado. As mutações também podem ocorrer no gene S, que também podem afetar a imunogenicidade, de modo a que a resposta imune desejada seja afetada e o potencial vacinal não pode proteger contra o sorotipo necessário. Além disso,

existem problemas associados com a reversão à virulência e a estabilidade das vacinas.

[0007] É importante que novas e mais seguras vacinas sejam desenvolvidas para o controle de IBV. Assim, existe uma necessidade de vacinas de IBV, que não estejam associadas a estes problemas, em particular, vacinas que podem ser utilizadas para vacinação *in ovo*.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0008] Os presentes inventores utilizaram uma abordagem genética reversa de forma a atenuar racionalmente o IBV. Esta abordagem é muito mais controlável do que a atenuação na sequência aleatória de múltiplas passagens em ovos embrionados, porque a posição de cada mutação é conhecida e o seu efeito sobre o vírus, isto é, a razão de atenuação, pode ser derivada.

[0009] Utilizando a abordagem genética reversa, os presentes inventores identificaram várias mutações que causam o vírus ter níveis reduzidos de patogenicidade. Os níveis de patogenicidade podem ser reduzidos, de tal modo que, quando o vírus é administrado a um ovo embrionado, é capaz de se replicar sem ser patogênico para o embrião. Tais vírus podem ser adequados para a vacinação *in ovo*, o que é uma vantagem significativa e tem melhoria sobre as vacinas IBV vivas atenuadas produzidas após múltiplas passagem em ovos embrionados.

[0010] Assim, em um primeiro aspecto, a presente invenção proporciona um coronavírus vivo atenuado compreendendo um gene da replicase variante codificando poliproteínas que compreendem uma mutação em uma ou mais das proteínas não estruturais (s) (nsp)-10, nsp-14, nsp-15 ou nsp-16.

[0011] A variante do gene da replicase pode codificar uma proteína que compreende uma ou mais mutações de aminoácidos selecionadas a partir da lista de:

Pro para Leu na posição 85 da SEQ ID NO: 6,
Val para Leu na posição 393 da SEQ ID NO: 7;
Leu para Ile na posição 183 da SEQ ID NO: 8;
Val para Ile na posição 209 da SEQ ID NO: 9.

[0012] O gene da replicase pode codificar uma proteína compreendendo a mutação de aminoácidos Pro para Leu na posição 85 da SEQ ID NO: 6.

[0013] O gene da replicase pode codificar uma proteína compreendendo as mutações de aminoácidos Val a Leu na posição 393 da SEQ ID NO: 7; Leu e lie na posição 183 da SEQ ID NO: 8; e Val para Ile na posição 209 da SEQ ID NO: 9.

[0014] O gene da replicase pode codifica uma proteína compreendendo as mutações de aminoácidos Pro para Leu na posição 85 da SEQ ID NO: 6; Val para Leu na posição 393 da SEQ ID NO: 7; Leu para Ile na posição 183 da SEQ ID NO: 8; e Val para Ile na posição 209 da SEQ ID NO: 9.

[0015] O gene da replicase pode compreender uma ou mais substituições de nucleotídeos selecionada a partir da lista de:

C para T na posição de nucleotídeo 12137;
G para C na posição de nucleotídeo 18114;
T para A na posição de nucleotídeo 19047; e
G para A na posição de nucleotídeo 20139;

em comparação com a sequência apresentada como SEQ ID NO: 1.

[0016] O coronavírus pode ser um vírus da bronquite infecciosa (IBV).

[0017] O coronavírus pode ser M41 do IBV.

[0018] O coronavírus pode compreender uma proteína S, pelo menos, parte dos quais é de um sorotipo de IBV que não seja M41.

[0019] Por exemplo, a subunidade S1 ou toda a proteína S pode ser a partir de um sorotipo diferente do

IBV M41.

[0020] O coronavírus, de acordo com o primeiro aspecto da invenção reduziu a patogenicidade em comparação com um coronavírus que expressa uma replicase correspondente do tipo selvagem, de tal modo que quando o vírus é administrado a um ovo embrionado, seja capaz de se replicar sem ser patogênico para o embrião.

[0021] Em um segundo aspecto, a presente invenção proporciona um gene da replicase variante, tal como definidos em ligação com o primeiro aspecto da invenção.

[0022] Em um terceiro aspecto, a presente invenção proporciona uma proteína codificada por um gene da replicase de coronavírus variante de acordo com o segundo aspecto da invenção.

[0023] Em um quarto aspecto, a presente invenção fornece um plasmídeo que compreende um gene da replicase de acordo com o segundo aspecto da invenção.

[0024] Em um quinto aspecto, a presente invenção proporciona um método para fazer o coronavírus de acordo com o primeiro aspecto da invenção que compreende as seguintes etapas:

(i) transfectar um plasmídeo de acordo com o quarto aspecto da invenção em uma célula hospedeira;

(ii) infectar a célula hospedeira com um vírus de recombinação que compreende o genoma de uma cepa de coronavírus com um gene da replicase;

(iii) permitir que a recombinação homóloga ocorra entre as sequências de genes de replicase do plasmídeo e as sequências correspondentes no genoma do vírus de recombinação para produzir um gene da replicase modificada;
e

(iv) selecionar para a recombinação de vírus compreendendo o gene da replicase modificada.

[0025] O vírus de recombinação pode ser um vírus de

vaccinia.

[0026] O método pode também incluir a etapa de:

(v) recuperar o coronavírus recombinante que compreende o gene da replicase modificada a partir do DNA do vírus de recombinação a partir da etapa (iv).

[0027] Em um sexto aspecto, a presente invenção proporciona uma célula capaz de produzir um coronavírus de acordo com o primeiro aspecto da invenção.

[0028] Em um sétimo aspecto, o presente invenção proporciona uma vacina compreendendo um coronavírus de acordo com o primeiro aspecto da invenção e um veículo farmacêuticamente aceitável.

[0029] Em um oitavo aspecto, a presente invenção proporciona um método para o tratamento e / ou prevenção de uma doença em um sujeito que compreende o passo de administração de uma vacina de acordo com o sétimo aspecto da invenção ao sujeito.

[0030] Outros aspectos da invenção proporcionam:

- a vacina de acordo com o sétimo aspecto da invenção para utilização no tratamento e / ou prevenção de uma doença em um sujeito.

- Utilização de um coronavírus de acordo com o primeiro aspecto da invenção na fabricação de uma vacina para o tratamento e / ou prevenção de uma doença em um sujeito.

[0031] A doença pode ser a bronquite infecciosa (IB).

[0032] O modo de administração da vacina pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em; administração de colírio, administração intranasal, administração através de ingestão de água, injeção de pós-eclosão e injeção *in ovo*.

[0033] A vacinação pode ser realizada por vacinação *in ovo*.

[0034] A presente invenção também fornece um método para produzir uma vacina, de acordo com o sétimo aspecto da invenção, que compreende a etapa de infectar uma célula de acordo com o sexto aspecto da invenção com um coronavírus de acordo com o primeiro aspecto da invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0035] A Figura 1 mostra a cinética do crescimento de M41-R-6 e M41-R-12 em comparação com M41-CK (EP4 M41) em células CK

[0036] A Figura 2 mostra os sinais clínicos, snicking e chiado no peito, associado com M41 -R-6 e M41 -R-12 em comparação com M41 -CK (M41 EP4) e Beau-R (barras mostram simulada, Beau-R, M41-R 6, M41-R 12, M41-CK EP4 da esquerda para a direita de cada ponto de tempo).

[0037] A Figura 3 mostra a atividade ciliar do vírus em anéis traqueais isolados de traqueias retiradas de pintos infectados. atividade ciliar 100% indica que não há efeito pelo vírus; apatogênica, 0% de atividade indica a perda completa da atividade ciliar, ciliostase completo, indicando que o vírus patogênico é (barras mostram simulada, Beau-R, M41-R 6, -R 12 M41, M41 -CK EP4 da esquerda para a direita de cada ponto temporal).

[0038] A Figura 4 mostra os sinais clínicos, snicking, associado com M41 R-nsp10rep e M41 R-nsp14,15,16rep comparação com M41 -R-12 e M41 -CK (M41 EP5) (barras mostram simulada, M41-R12; M41 R- nsp10rep; M41 R-nsp14,15,16rep e M41 -CK EP5 a partir da esquerda para a direita de cada ponto de tempo).

[0039] A figura 5 mostra a atividade ciliar do M41 R-nsp10rep e M41 R-nsp14,15,16rep comparação com M41-R-12 e M41-CK em anéis traqueais isolados de traqueias retiradas de pintos infectados (barras mostram simulada; M41-R12; M41 R-nsp10rep; M41 R-nsp14,15,16rep e M41 -CK EP5 da esquerda para a direita de cada ponto de tempo).

[0040] A Figura 6 mostra sinais clínicos, snicking, associado com M41-R nsp10, 15rep, M41-R nsp10, 14, 15rep, M41-R nsp10, 14, 16rep, M41-R nsp10, 15, 16rep M41 e M41 em comparação com -K -CK (barras mostram simulada, M41 R-nsp10,15rep1; M41 R-nsp10,14,16rep4; M41 R-nsp10,15,16rep8; M41 R-nsp10,14,15rep10; M41 -K6 e M41 -CK EP4 de esquerda para a direita de cada ponto de tempo).

[0041] A Figura 7 mostra os sinais clínicos, pieira, associado com M41 R-nsp10, 15rep, M41 R-nsp10, 14, 15rep, M41 R-nsp10, 14, 16rep, M41 R-nsp10, 15, 16rep e M41-K em comparação com M41 -CK (barras mostram simulada, M41 R-nsp10,15rep1; M41 R-nsp10,14,16rep4; M41 R-NSPL 0,15,16rep8; M41 R-nsp10,14,15rep10; M41 -K6 e M41 -CK EP4 da esquerda para a direita de cada ponto de tempo).

[0042] A Figura 8 mostra a atividade ciliar do M41 R-nsp10, 15rep, M41 R-nsp10, 14, 15rep, M41 R-nsp10, 14, 16rep, M41 R-nsp10, 15, 16rep e M41 K em comparação com M41-CK em anéis traqueais isolados de traqueias retiradas de pintos infectados (barras mostram simulada, M41 R-nsp10,15rep1; M41-R nsp10,14,16rep4; M41-R nsp10,15,16rep8; M41-R nsp10,14,15rep10; M41-K6 e M41-CK EP4 da esquerda para a direita de cada ponto de tempo).

[0043] A Figura 9 mostra a cinética do crescimento em comparação com rIBVs M41 -CK em células CK. Figura 9A mostra os resultados de M41 e M41-R -K. Fig 9B mostra os resultados para M41 -nsp1 0 representante; M41-R nsp14, 15, 16 rep; M41 R-nsp10, 15 rep; M41 R-nsp10, 15, 16 rep; M41 R-nsp10, 14, 15 rep; e M41 R-nsp10, 14, 16.

[0044] A Figura 10 mostra a Posição de mutações de aminoácidos em mutado nsp10, nsp14, nsp15 e nsp16 sequências.

[0045] A Figura 11 - A) Snicking; B) Os sintomas respiratórios (respiração asmática e estertores combinado) e C) atividade ciliar do rIBV M41 R-NSP 10,14 representante

e rIBV M41 R-NSP 10,16 representante comparação com M41 -CK (barras mostram simulada, M41 R-nsp10, 14rep; M41 R-nsp10,16rep e M41 K da esquerda para a direita de cada ponto de tempo).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0046] A presente invenção proporciona um coronavírus que compreende um gene da replicase variante que, quando expresso na coronavírus, faz com que o vírus tenha reduzida patogenicidade em comparação com um coronavírus correspondente, que compreende o gene da replicase do tipo selvagem.

CORONAVIRUS

[0047] *Gammacoronavirus* é um gênero de vírus animal pertencente à família *Coronaviridae*. Os coronavírus são vírus com envelope com um genoma de RNA de cadeia simples de sentido positivo e uma simetria helicoidal.

[0048] O tamanho gnômico de coronavírus varia de aproximadamente 27 a 32 quilobases, que é o tamanho mais longo para qualquer vírus de RNA conhecido.

[0049] Os coronavírus infectam principalmente o trato respiratório ou gastrointestinal superior dos mamíferos e aves. Cinco a seis diferentes estirpes atualmente conhecidas de coronavírus infectam os seres humanos. O coronavírus humano mais divulgado, SARS-CoV, que causa a síndrome respiratória aguda grave (SARS), tem uma patogênese único porque ele faz com que ambos superior e infecções do trato respiratório inferior e também pode causar gastroenterite. Médio coronavírus Síndrome Respiratória Leste (MERS-CoV) também provoca uma infecção do trato respiratório inferior em seres humanos. Os coronavírus são acreditados para causar uma percentagem significativa de todos os resfriados comuns em adultos humanos.

[0050] Os coronavírus também causam uma série de

doenças em animais de gado e animais domesticados, alguns dos quais podem ser graves e são uma ameaça para o sector agrícola. Os coronavírus economicamente significativas de animais de gado incluem vírus da bronquite infecciosa (IBV), que provoca principalmente doença respiratória em galinhas e afeta seriamente a indústria avícola em todo o mundo; Coronavirus suíno (gastroenterite transmissível, TGE) e bovina coronavírus, que tanto resultar em diarreia em animais jovens. Coronavírus felino tem duas formas, coronavírus entérico felino é um agente patogênico de significado clínico menor, mas esta mutação espontânea de vírus pode resultar em peritonite infecciosa felina (PIF), uma doença associada com a elevada taxa de mortalidade.

[0051] Há também dois tipos de coronavírus canino (CCoV), uma que causa doença leve gastrointestinal e que tem sido encontrado para causar doença respiratória. Rato vírus da hepatite (MHV) é um coronavírus que provoca uma doença murino epidemia com alta mortalidade, principalmente em colônias de ratos de laboratório.

[0052] Os coronavírus são divididos em quatro grupos, conforme mostrado abaixo:

Alfa

- coronavírus canino (Famílias)
- Feline coronavírus (FeCoV)
- Human coronavírus 229E (HCoV-229E)
- vírus da diarreia epidêmica porcina (PEDV)
- vírus da gastroenterite transmissível (TGEV)
- Coronavirus Humano NL63 (NL ou New Haven)

Beta

- Coronavírus bovino (BCoV)
- coronavírus respiratório Canine (CRCoV) - Comum no sudeste da Ásia e Micronesia
- coronavírus humano OC43 (HCoV-OC43)
- vírus da hepatite de ratos (MHV)

- vírus hemaglutinante encefalomielite de porcos (HEV)
- coronavírus de Rato (VN). Coronavirus de ratos é bastante prevalente na Austrália Oriental, onde, a partir de Março / Abril de 2008, verificou-se entre as colônias de roedores nativas e selvagens.
- (Sem nome comum como de ainda) (HCoV-HKU1)
- [0053] Respiratória aguda grave síndrome de coronavírus (SARS-CoV)
- Médio Oriente respiratória síndrome de coronavírus (MERS-CoV)

Gama

- vírus da bronquite infecciosa (IBV)
- Turquia coronavírus (Bluecomb vírus da doença)
- coronavírus Faisão
- coronavírus pintadas

Delta

- [0054] Bulbul coronavírus (Bucova)
- [0055] Thrush coronavírus (ThCoV)
- [0056] Munia coronavírus (MuCoV)
- [0057] coronavirus suíno (carve) HKU15
- [0058] O gene variante de replicase do coronavírus da presente invenção pode ser derivado de um *alphacoronavirus*, tais como TGEV; um *betacoronavirus*, tais como MHV; ou um *gammacoronavirus*, tais como VBI.

[0059] Tal como aqui utilizado o termo "derivado de" significa que o gene da replicase compreende substancialmente a mesma sequência de nucleotídeos, tal como o gene da replicase do tipo selvagem do coronavírus relevante. Por exemplo, o gene da replicase variante da presente invenção pode ter até 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 99% de identidade com a sequência de tipo selvagem replicase. O gene variante de coronavírus replicase codifica uma proteína compreendendo uma mutação em uma ou

mais das proteínas não estruturais (nsp) -10, NSP-14, NSP-15 ou NSP-16 quando comparada com a sequência do tipo selvagem do não-estrutural proteína.

IBV

[0060] Bronquite infecciosa aviária (IB) é uma doença respiratória aguda e altamente contagiosa das aves que provoca perdas econômicas significativas. A doença é caracterizada por sinais respiratórios, incluindo ofegante, tosse, espirros, estertores traqueais, e corrimento nasal. Em frangos jovens, pode ocorrer insuficiência respiratória grave. Em camadas, dificuldades respiratórias, nefrite, diminuição na produção de ovos, e perda de qualidade interna dos ovos e qualidade da casca do ovo são comuns.

[0061] Em frangos de corte, tosse e sacudindo são sinais clínicos comuns, que se espalha rapidamente em todas as aves do local. Morbidade é de 100% em bandos não vacinados. A mortalidade varia dependendo da idade, a estirpe de vírus e infecções secundárias, mas podem ser de até 60% em bandos não vacinados.

[0062] O primeiro sorotipo IBV a ser identificado foi Massachusetts, mas nos Estados Unidos vários sorotipos, incluindo Arkansas e Delaware, estão circulando, além do tipo de Massachusetts originalmente identificado.

[0063] A cepa de IBV Beaudette foi obtida de acordo com pelo menos 150 passagens em embriões de galinha. IBV Beaudette não é mais patogénica para galinhas chocadas, mas mata rapidamente embriões.

[0064] H120 é uma linhagem comercial de IBV atenuado Massachusetts vacina serotipo vivo, atenuado por aproximadamente 120 passagens em ovos de galinha embrionados. H52 é outra vacina de Massachusetts, e representa um vírus anteriormente e ligeiramente mais patogénica passagem (passagem 52), durante o desenvolvimento de H120. As vacinas baseadas em H120 são

comumente usados.

[0065] IB QX é um isolado de campo virulento de IBV. Às vezes, é conhecido como "QX chinesa", como era originalmente isolado na sequência de focos da doença na região de Qingdao na China em meados de 1990. Desde então, o vírus tem se arrastado para a Europa. A partir de 2004, as questões de produção de ovos graves foram identificados com um vírus muito semelhante em partes da Europa Ocidental, principalmente, na Holanda, mas também relataram da Alemanha, França, Bélgica, Dinamarca e no Reino Unido.

[0066] O vírus isolado a partir dos casos holandeses foi identificado pelo Instituto de Pesquisa holandesa em Deventer como uma nova estirpe que eles chamaram D388. A ligação chinês veio de novos ensaios que mostraram que o vírus foi de 99% semelhantes a vírus QX chinês. A atenuada QX-like IBV estirpe da vacina viva foi agora desenvolvido.

[0067] IBV é um vírus com envelope que se replica no citoplasma da célula e que contém um,, o genoma de RNA de sentido positivo de cadeia simples não segmentado. IBV tem um RNA genoma 27,6 kb e como todos os coronavírus contém os quatro proteínas estruturais; spike glicoproteína (S), a proteína de membrana pequena (E), proteína integrante da membrana (M) e a proteína do nucleocapsídeo (N) que interage com o RNA genômico.

[0068] O genoma é organizado da seguinte maneira: 5'UTR - os genes da polimerase (replicase) do gene da proteína-estruturais (SEMN) - UTR 3'; onde a UTR são regiões não traduzidas (cada ~ 500 nucleotídeos de IBV).

[0069] O envelope lipídico contém três proteínas de membrana: S, M e E. O IBV S proteína é uma glicoproteína de tipo I que oligomeriza no retículo endoplasmático e é montada em homotrímero inserido na membrana virion através do domínio transmembranar e está associado por meio de não-

covalente interações com a proteína M. Após incorporação em partículas de coronavírus, a proteína S é responsável pela ligação ao receptor da célula alvo e a fusão das membranas virais e celulares. A glicoproteína S consiste em quatro domínios: uma sequência de sinal que é clivado durante a síntese; o ectodomínio, que está presente no lado de fora da partícula de virion; a região transmembranar responsável por ancorar a proteína S na bicamada lipídica da partícula de virion; e a cauda citoplasmática.

[0070] Todos os coronavírus também codificam um conjunto de genes de proteínas acessórias de função desconhecida que não são necessários para a replicação in vitro, mas pode desempenhar um papel na patogênese. IBV codifica dois genes acessórios, genes 3 e 5, que ambos expressam dois acessórios proteínas 3A, 3B e 5a, 5b, respectivamente.

[0071] O gene variante de replicase do coronavírus da presente invenção pode ser derivado de um IBV. Por exemplo, o IBV pode ser Beaudette do IBV, H120, H52, IB QX, D388 ou M41.

[0072] O IBV pode ser M41 do IBV. M41 é um serotipo Massachusetts prototípico que foi isolado nos EUA em 1941. É um isolado utilizado em muitos laboratórios de todo o mundo como uma mancha laboratorial patogênica e podem ser obtidas a partir de ATCC (VR-21[™]). variantes atenuadas também são utilizados por vários fabricantes de vacinas como vacinas IBV contra sorotipos Massachusetts causando problemas no campo. Os presentes inventores escolheram usar esta estirpe como haviam trabalhado por muitos anos sobre este vírus, e porque a sequência do genoma do vírus completo está disponível. O M41 isolado, M41-CK, usado pelos presentes inventores foi adaptado para crescer em células de rim de pintainho primário (CK) e, por conseguinte, foi considerado favorável para a recuperação de um vírus

infeccioso a partir de um cDNA do genoma completo. É representativo de um IBV patogénicas e, portanto, podem ser analisadas para mutações que causam a perda ou redução na patogenicidade.

[0073] A sequência do genoma de IBV M41 -CK são fornecidas como SEQ ID NO: 1.

[0074] SEQ ID NO: 1 Sequência de IBV M41 -CK

ACTTAAGATAGATATTAATATATATCTATCACACTAGCCTTGCGCTAGATTTCCAAC TA
 ACAAACGGACTTAAATACCTACAGCTGGTCCTCATAGGTGTTCCATTGCAGTGCAC TT
 AGTGCCCTGGATGGCACCTGGCCACCTGTCAGGTTTTTGTATTAAATCTTATTGTT C
 TGGTATCACTGCTTGTTTTGCCGTGTCTCACTTTATACATCCGTTGCTTGGGCTACCT G
 TATCCAGCGTCCTACGGGCGCCGTGGCTGGTTCGAGTGCGAAGAACCTCTGGTTCATCA
 GCGGTAGGCGGGTGTGTGGAAGTAGCACTTCAGACGTACCGGTTCTGTTGTGTGAAATC
 GGGGTCACCTCCCCCACATACCTCTAAGGGCTTTTGAGCCTAGCGTTGGGCTACGTTT
 CGCATAAGGTCGGCTATACGACGTTTGTAGGGGGTAGTGCCAAACAACCCCTGAGGTGC
 AGGTTCTGGTGGTGTTTAGTGAGCAGACATAACAATAGACAGTGACAACATGGCTTCAAC
 CTA AACAGGGAGTATCTCCCAAAC TAAGGGATGTCATTCTTGATCCAAAGACATTCT
 GAACAAC TTTGTGACGCTTTGTTTTCTATACGTCACACAACCCTAAGGATTACGCTGT
 GCTTTTGCAGTTAGGCAGAAAGTTTGATCGTAATCTGCAGACTGGGAAACAGTTCAAATT
 GAAACTGTGTGTGGTCTCTTCCTCTTGAAGGGAGTTGACAAAATAACACCTGGCGTCCA
 GCAAAGTCTTAAAGCCACTTCTAAGTTGGCAGATTTAGAAAGACATCTTTGGTGTCTT
 CCCTTTGCAAGAAAATATCGTGAAC TTTTGAAGACAGCATGCCAGTGGTCTCTTACTGA
 GAAACACTGGATGCTCGTGCACAAACTCTTGATGAAATTTTGGACCCTACTGAAATACT
 TGGCTTCAGGTGGCAGCAAAAATCCAAGTTTCGGCTATGGCGATGCGCAGGCTTGTTGA
 GAAGTAACTGCAAAAGTCATGGATGCTTTGGGCTCAAATATGAGTGCTCTTTTCCAGAT
 TTTAAACAACAAATAGTCAGAATTTTCAAAAAGCGCTGGCTATTTTGGAGAATGTGAT
 GAATTACCACAGCGTATTGCAGCACTTAAGATGGCTTTTGCTAAGTGTGCCAAGTCCAT
 ACTGTTGTGGTTATGGAGAGGACTCTAGTTGTTAGAGAGTTTCGCAGGAAC TTGTCTTGA
 AGCATTAAATGGTGCTGTTGCAAAATCTTTGAAGAACTCCCAAATGGTTTCATGGGTGT
 AAAATTTTCACTACACTTGCCTTCTTTAGGGAGGCTGCAGTGAAAATTGTGGATAACAA
 CCAAATGCACCGAGAGGCACTAAAGGGTTTGAAGTCGTTGGTAATGCCAAAGGTACACA
 GTTGTTGTGCGTGGCATGCGAAATGACTTAACACTGCTTGACCAAAAAGCTGAAATTCT
 GTGGAGTCAGAAGGTTGGTCTGCAATTTTGGGTGGACATCTTTGCTATGTCTTTAAGAT
 GGTGATCGCTTTTACGCGGCACCTCTTTCAGGAAATTTTGCAATTGCATGATGTGCATTT

TGTGAGCGTGTTGTCTGTCTTTCTGATGGTGTAACACCGGAGATAAATGATGGACTTAT
CTTGCAGCAATCTACTCTTCTTTTAGTGTCGCAGAACTTGTGGCAGCCATTAAAAGGGT
GAACCATTTAAGTTTCTGGGTCATAAATTTGTGTATGCAAAGGATGCAGCAGTTTCTTT
ACATTAGCGAAGGCTGCTACTATTGCAGATGTTTTGAAGCTGTTTCAATCAGCGCGTGG
AAAGTAGAAGATGTTTGGTCTTCACTTACTGAAAAGTCTTTTGAATTCTGGAGGCTTGA
TATGGAAAAGTGCGTAATCTCGAAGAATTTGTTAAGACTTGTTTTTGTAAAGGCTCAAAG
GCGATTGTGATTTTAGCGACAGTGCTTGGAGAGGGCATTGCGCATCTTGTTTCGCAAGC
ATCTATAAAGTAGGTGGTCTTTTTACTAAAGTTGTTGACTTTTGTGAAAAATATTGGAA
GGTTTTTGTGCACAGTTGAAAAGAGCTAAGCTCATTGTCACTGAAACCCTCTGTGTTTG
AAAGGAGTTGCACAGCATTGTTTTCACTATTGCTGGATGCAATACAGTTTATGTATAA
AGTTTTAAGAAGTGTGCACTTGGTAGAATCCATGGAGACTTGCTCTTCTGGAAAGGAGT
GTGCACAAAATTATTCAAGAGGGCGATGAAATTTGGTTTGACGCCATTGATAGTATTGT
GTTGAAGATCTGGGTGTTGTTCAAGAAAAATTGATTGATTTTGATGTTTGTGATAATGG
ACACTTCCAGAGAACCAACCCGGTCATATGGTTCAAATCGAGGATGACGGAAAGAACTC
ATGTTCTTCCGCTTCAAAAAGGATGAGAACATTTATTATACACCAATGTCACAGCTTGT
GCTATTAATGTGGTTTGCAAAGCAGGCGGTAAACTGTACCTTTGGAGAACTACTGG
CAAGAAATACCACCACCTGATGTTGTGTTTATTAAGGTTAGCATTGAGTGTTGTGGTGA
CCATGGAATACAATCTTCAAAAAGGCTTATAAGGAGCCCATTGAAGTAGAGACAGACCC
ACAGTTGAACAATTGCTCTCTGTGGTCTATGAGAAAATGTGTGATGATCTCAAGCTGTT
CCGGAGGCTCCAGAACCACCACCATTTGAGAATGTCACACTTGTTGATAAGAATGGTAA
GATTTGGATTGCATAAAATCATGCCATCTGATCTATCGTGATTATGAGAGCGATGATGC
ATCGAGGAAGAAGATGCAGAAGAATGTGACACGGATTGAGGTGATGCTGAGGAGTGTGC
ACTAATTCAGAATGTGAAGAAGAAGATGAGGATACTAAAGTGTTGGCTCTTATACAAGC
CCGGCAAGTAACAAATATCCTCTGCCTCTTGATGATGATTATAGCGTCTACAATGGATT
ATTGTTTATAAGGACGCTCTCGATGTTGTGAATTTACCATCTGGTGAAGAAACCTTTTG
TCAATAACTGCTTTGAAGGGGCTGTAAAGCTCTTCCGCAGAAAGTTATTGATGTTTCA
GTGACTGGGGTGAGGCTGTTGATGCGCAAGAACAATTGTGTCAACAAGAATCAACTCGG
GTCATATCTGAGAAATCAGTTGAGGGTTTTACTGGTAGTTGTGATGCAATGGCTGAACA
GCTATTGTTGAAGAGCAGGAAATAGTACCTGTTGTTGAACAAAGTCAGGATGTAGTTGT
TTTACACCTGCAGACCTAGAAGTTGTTAAAGAAACAGCAGAAGAGGTTGATGAGTTTAT
CTCATTTCTGCTGTCCCTAAAGAAGAAGTTGTGTCTCAGGAGAAAGAGGAGCCACAGGT
GAGCAAGAGCCTACCCTAGTTGTTAAAGCACACGTGAGAAGAAGGCTAAAAAGTTCAA
GTTAAACCAGCTACATGTGAAAAACCCAAATTTTTGGAGTACAAAACATGTGTGGGTGT
TTGGCTGTTGTAATTGCCAAAGCATTGGATGAGTTTAAAGAGTTCTGCATTGTAAACGT

GCAAATGAGCACATGTCGCATGGTGGTGGCGTTGCAAAGGCAATTGCAGACTTTTGTGA
CCGGACTTTGTTGAATATTGCGCGGACTATGTTAAGAAACATGGTCCACAGCAAAAAC
GTCACACCTTCATTTGTTAAAGGCATTCAATGTGTGAATAATGTTGTAGGACCTCGCCT
GGAGACAGCAACTTGCGTGAGAAGCTTGTTGCTGCTTACAAGAGTGTTCTTGTAGGTGA
GTGGTTAACTATGTTGTGCCAGTTCTCTCATCAGGGATTTTTGGTGTAGATTTTAAAAA
TCAATAGATGCTATGCGCGAAGCTTTTAAAGGTTGTGCCATACGCGTTCTTTTATTTTT
CTGAGTCAAGAACACATCGATTATTTTCGATGCAACTTGTAAGCAGAAGACAATTTATCT
ACGGAGGATGGTGTAAATACCGCTCTGTTGTTTTAAACCTGGTGATTCTTTGGGTCA
TTTGGACAGGTTTTTGCAAGAAATAAGGTAGTCTTTTCGGCTGATGATGTTGAGGATAA
GAAATCCTCTTTATACCCACAACCTGACAAGACTATTCTTGAATATTATGGTTTAGATGG
CAAAAGTATGTAACATATTTGCAAACGCTTGCGCAGAAATGGGATGTTCAATATAGAGC
AATTTTGTTATATTAGAGTGGCGTGACGGAAATTGCTGGATTAGTTCAGCAATAGTTCC
CTTCAAGCTGCTAAAATTAGATTTAAAGGTTTTCTTGCAGAAGCATGGGCTAAACTGTG
GGTGGAGATCCTACAGACTTTGTTGCCTGGTGTATGCAAGTTGCAATGCTAAAGTAGT
GATTTTTTCAGATGCTAATTGGCTTTTGGCCAATTTAGCAGAACATTTTGACGCAGATTC
ACAAATGCACTTCTTAAGAAGTGTGTGTCGTGCAATTGTGGTGTAAAGAGTTATGAACT
AGGGGTCTTGAAGCCTGTATTCAGCCAGTTCGAGCACCTAATCTTCTACATTTTAAAG
CAATATTCAAATTGCCAACCTGTGGTGCAAGTAGTACGGATGAAGTAATAGAAGCTTA
TTACCGTACTTATTGCTTTTTGCTACTGATGGTCCTGCTACAGTTGATTGTGATGAAAT
GCTGTAGGGACTGTTGTTTTTCATTGGCTCTACTAATAGTGGCCATTGTTATACACAAGC
GATGGTAAGGCTTTTGACAATCTTGCTAAGGATAGAAAATTTGGAAGGAAGTCGCCTTC
ATTACAGCAATGTATACACGTTTTTCTCTTAGGAGTGAAAATCCCCTACTTGTTGTTGA
CATAGTAAGGGTAAAGCTAAAGTAGTAAAAGAAGATGTTTCTAACCTTGCTACTAGTTT
AAAGCCAGTTTTGACGATCTTACTGACTTTGAACAGTGGTATGATAGCAACATCTATGG
AGTCTTAAAGTGCAGGAGACACCTGATAATCTTGATGAATATGTGTCATTTACGACAAG
GAAGATTCTAAGTTGCCACTGACACTTAAAGTTAGAGGTATCAAATCAGTTGTTGACTT
AGGTCTAAGGATGGTTTTACTTATAAGTTAACACCTGATACTGATGAAAATTCAAAAAA
CCAGTCTACTACCCAGTCTTGGATTCTATTAGTCTTAGGGCAATATGGGTTGAAGGCAT
GCTAATTTTGTTGTTGGGCATCCAAATTATTATAGTAAGTCTCTCCGAATTCCCACGTT
TGGGAAAATGCCGAGAGCTTTGTTAAAATGGGTTATAAAATTGATGGTGTAACTATGGC
CTTTGGCGTGCAGAACACCTTAATAAACCTAATTTGGAGAGAATTTTAAACATTGCTAG
AAAGCTATTGTTGGATCTAGTGTGTTACTACGCAGTGTGGTAAAATACTAGTTAAAGA
GCTACATACGTTGCCGATAAAGTAGGTGATGGTGTAGTTTCGCAATATTACAGATAGAAT
AAGGGTCTTTGTGGATTACACAGTGGCCATTTTGAAAAGAAAATGTCCTTACAATTTCA

AAGACACTTGTGTTCTTTTTCTTTTATTTCTTAAAGGCTAGTGCTAAGAGTTTAGTTTT
AGCTATAAGATTGTGTTATGTAAGGTGGTGTGTTGCTACCTTACTTATAGTGTGGTTTAA
TACACAAGTAATCCAGTAGTGTTTACTGGAATACGTGTGCTAGACTTCCTATTTGAAGT
TCTTTATGTGGTCCTTATAATGACTACGGTAAAGATTCTTTTGATGTGTTACGCTATTT
GCAGGTGATTTTACTTGTCTGTGTGTTTACATGATAGAGATTCACTTCATCTGTACAA
CATGCTTATAGCGTAGAACAAATTTATAAGGATGCAGCTTCTGGCATTAACTTTAATTG
AATTGGCTTTATTTGGTCTTTCTAATATTATTTGTTAAGCCAGTGGCAGGTTTTGTTAT
ATTTGTTATTGTGTTAAGTATTTGGTATTGAGTTCAACTGTGTTGCAAACCTGGTGTAGT
TTTCTAGATTGTTTTGTAAAAACAGTTTTTACCCATTTTAATTTTATGGGAGCGGGATT
TATTTCTGGCTCTTTTACAAGATATACGTACAAGTGCATCATATATTGTAAGTGT
GTAACATGTGAAGTGTGCAAGAGAGTTGCACGCAGCAACAGGCAAGAGGTTAGCGTTGA
GTTGGTGGACGCAAGCAAATAGTGCATGTTTACACTAATTCTGGCTATAACTTTTGTAG
AGACATAATTGGTATTGTAGAAATTGTGATGATTATGGTCACCAAATACATTTATGTC
CCTGAAGTTGCTGGCGAGCTTTCTGAAAAGCTTAAGCGCCATGTTAAACCTACAGCATT
GCTTACCACGTTGTGTATGAGGCATGCGTGGTTGATGATTTTGTAAATTTAAAATATAG
GCTGCAATTCCTGGTAAGGATAATGCATCTTCTGCTGTTAAGTGTTCAGTGTACAGT
TTTTTAAAGAAAGCTGTTTTTCTTAAGGAGGCATTGAAATGTGAACAAATATCTAATGT
GGTTTTATAGTGTGTAATACACAGAGTGCATGCACTAGAGGAAGCAAAGAATGCAGC
GTCTATTATGCGCAATATCTGTGTAAGCCAATACTTATACTTGACCAGGCACCTTATGG
CAATTAATAGTAGAGCCTGTGTCTAAGAGTGTTATAGATAAAGTGTGTAGCATTTTGT
AATATAATATCTGTAGATACTGCAGCTTTAAATTATAAGGCAGGCACACTTCGTGATGT
CTGCTTTCTATTACTAAAGACGAAGAAGCCGTAGATATGGCTATCTTCTGCCACAATCT
GAAGTGAATACACTGGTGACGGTTTTACTAATGTGATACCGTCATATGGTATGGACAT
GATAAGTTGACACCTCGTGATAGAGGGTTTTTGATAAATGCAGATGCTTCTATTGCTAT
TTAAGAGTCAAAAATGCTCCTCCGGTAGTATGGAAGTTTTCTGATCTTATTAAATTGTT
GACAGTTGCCTTAAATATTTAATTTAGCTACTGTCAAGTCAGGAGGTCGTTTCTTTAA
ACAAAGTCTGGTGCTAAACAAGTTATTTCTTGTACATACCCAGAACTGTTGGTAGAGAA
AAGGCAGGTGGTGTATTATTAATAACACTTTTAAATGGTTTATGAGTTGTTTTAAATGGCT
TTTGTCTTTTATATACTTTTACAGCATGTTGTTTGGGTACTACTATATGGAGATGAT
AAAAGTTTTGTTACCCCATGTATGATGTAACTCCACACTGCATGTTGAAGGGTTCAA
GTTATAGACAAAGGTGTTATTAGAGAGATTGTGTCAGAAGATAATTGTTTCTCTAATAG
TTTGTTAATTTTGACGCCTTTTGGGGTAAATCATATGAAAATAATAAAAACTGTCCAAT
GTTACAGTTGTTATAGATGGTGACGGGACAGTAGCTGTTGGTGTTCCTGGTTTTGTATA
TGGGTTATGGATGGTGTATTGTTTGTGCATATGACACAGACTGATCGTAGACCTTGGTC

ATTCCTACCTGGTTTAAATAGAGAAATTGTTGGTTACACTCAGGATTCAATTATCACTGG
GGTAGTTTTTATACATCTATAGCATTATTTTCTGCTAGATGTTTATATTTAACAGCCAC
AATACACCTCAATTGTATTGTTTTAATGGCGACAATGATGCACCTGGAGCCTTACCATT
GGTAGTATTATTCCTCATAGAGTATACTTCCAACCTAATGGTGTAGGCTTATAGTTCA
CAACAAATACTGCATACACCCTACATAGTGAAGTTTGTTCAGACAGCTATTGTAGAGT
AGTGTATGTGAGTATACTAAACCAGGTTACTGTGTGTCACTAGACTCCCAATGGGTTTG
TTTAATGATGAATACATTAGTAAACCTGGCGTTTTCTGTGGTTCTACTGTTAGAGAACT
ATGTTTAATATGGTTAGTACATTCTTTACTGGTGTCAACCCTAATATTTATATTCAGCA
GCAACTATGTTTTTAATACTAGTTGTTATTGTGTTAATTTTTGCAATGGTTATAAAGTT
CAAGGTGTTTTTAAAGCTTATGCGACCATTGTGTTTACAATAATGTTAGTTTGGGTTAT
AATGCATTTGTTTTGTGTGTACATAGTTATAATAGTGTTTTAGCTGTTATATTATTAGA
CTCTATTGCTATGCATCATTGGTTACAAGTCGCAATACTGCTATAATAATGCATTGTTG
CTTGTTTTTACCTTTGGTTTAATAGTACCCACATGGTTGGCTTGTTGCTATCTGGGATT
ATTCCTTTATATGTACACACCGTTGGTTTTCTGGTGTTACGGTACTACTAAAAATACTCT
AAGTTGTATGATGGCAACGAGTTTGTGGTAATTATGACCTTGCTGCGAAGAGCACTTT
GTTATTCGTGGTACTGAATTTGTTAAGCTTACGAATGAGATAGGTGATAAATTTGAAGC
TATCTTTCTGCGTATGCTAGACTTAAATACTATTACAGGCACTGGTAGTGAGCAAGATTC
TTGCAAGCTTGTCGTGCATGGTTAGCTTATGCTTTGGACCAATATAGAAATAGTGGTGT
GAGGTTGTTTATACCCACCGCGTTACTCTATTGGTGTTAGTAGACTACACGCTGGTTT
AAAAAACTAGTTTCTCCTAGTAGTGCTGTTGAGAAGTGCATTGTTAGTGTCTCTTATAA
GGCAATAATCTTAATGGACTGTGGCTGGGTGATTCTATTTACTGCCCACGCCATGTGTA
GGTAAGTTTAGTGGTGACCAGTGGGGTGACGTACTAAACCTTGCTAATAATCATGAGTT
GAAGTTGTAACCAAAATGGTGTACTTTGAATGTTGTCAGCAGGCGGCTTAAAGGAGA
GTTTTAATTTTACAACTGCAGTTGCCAATGCTGAACTCCTAAGTATAAGTTTGTTAA
GCTAATTGTGGTGATAGTTTCACTATAGCTTGTTCTTATGGTGGTACAGTTATAGGACT
TACCCTGTCACTATGCGTTCTAATGGTACTATTAGAGCATCTTTCCTAGCAGGAGCCTT
GGCTCAGTTGGTTTTAATATAGAAAAGGGTGAGTTAATTTCTTTTATATGCACCATCT
GAGTTACCTAATGCATTACACACTGGAAGTACCTAATGGGTGAGTTTTATGGTGGTTT
GTAGATGAAGAGGTTGCGCAAAGAGTGCCACCAGATAATCTAGTTACTAACAATATTGA
GCATGGCTCTATGCGGCAATTATTAGTGTTAAAGAAAGTAGTTTTTCCACAACCTAAATG
TTGGAGAGTACTACTGTTTCTATTGAAGATTACAATAGGTGGGCTAGTGATAATGGTTT
ACTCCATTTTCCACTAGTACTGCTATTACTAAATTAAGTGCTATAACTGGGGTTGATGT
TGTAAACTCCTTCGCACTATTATGGTAAAAAGTGCTCAATGGGGTAGTGATCCCATTTA
GGACAATATAATTTTGAAGACGAATTGACACCAGAATCTGTATTTAATCAAGTTGGTGT

GTTAGGTTACAGTCTTCTTTTGTAAAGAAAAGCTACATCTTGGTTTTGGAGTAGATGTGA
TTAGCTTGCTTCTTGTTTGTGTTGTGTGCTATTGTCTTATTTACGGCAGTGCCACTTAG
TTTTATGTACATGCAGCTGTTATTTTGTGATGGCTGTGCTCTTTATTTCTTTTACTGT
AAACATGTTATGGCATAACATGGACACTTTCCTATTGCCTACATTGATTACAGTTATTAT
GGAGTTTGTGCTGAAGTCCCTTTTCATATACAATACTCTAATTAGTCAAGTTGTTATTTT
TTAAGCCAATGGTATGATCCTGTAGTCTTTGATACTATGGTACCATGGATGTTATTGCA
TTAGTGTGTGACACTGCTTTTAAGTGTGTACAAGGCTGCTATATGAATTCCTTTCAATAT
TCTTTGTAAATGCTGTATCAGTTTATGAAGTTAGGTTTTGTTATTTACACCTCTTCAAC
ACTCTTACTGCATATACAGAAGGTAATTGGGAGTTATTCTTTGAGTTGGTTCACACTAT
GTGTTGGCTAATGTTAGTAGTAATTCCTTAATTGGTTTAATTGTTTTTAAGTGTGCTAG
TGGATTTTATATTATTGCAATGCAACATACTTTAATAATTATGTGTTAATGGCAGTCAG
GTTAATGGCATAGGCTGGCTTTGCACCTGTTACTTTGGATTGTATTGGTGGGTAAATAA
GTTTTTGGTTTAAACCTTAGGTAAATACAATTTTAAAGTTTCAGTAGATCAATATAGGTT
ATGTGTTTGCATAAGGTAAATCCACCTAAAACCTGTGTGGGAGGTCTTTACTACAAATAA
CTTATACAAGGAATTGGAGGCGATCGTGTGTTGCCTATAGCTACAGTGCAATCTAAATG
AGTGATGTAAAGTGTACAACCTGTTGTTTTAATGCAGCTTTTGACTAAGCTTAATGTTGA
GCAAAATCAAAAATGCATGCTTATCTTGTTGAGTTACACAATAAAAATCCTCGCATCTGT
GATGTTGGAGAGTGCATGGATAATTTATTGGGTATGCTTATAACACTATTTTGTATAGT
TCTACTATTGATTTGGGTGAGTATTGTGATGATATACTTAAGAGGTCAACTGTATTACA
TCGGTTACTCAAGAGTTTTTCGCACATAACCTCGTATGCTGAATATGAAAGAGCTAAGAT
ATTTATGAAAAGGTTTTAGCCGATTCTAAAAATGGTGGTGTAACACAGCAAGAGCTTGT
GCATATCGTAAAGCTGCCAATATTGCAAAGTCAGTTTTTGTAGAGACTTGGCTGTTCA
AAGAAGTTAGATAGCATGGCAGAACGTGCTATGACAACAATGTATAAAGAGGCGCGTGA
ACTGATAGAAGAGCAAAATTAGTTTCATCATTACATGCACTACTTTTTTCAATGCTTAG
AAAATAGATTCTGAGAAGCTTAATGTCTTATTTGACCAGGCGAATAGTGGTGTGTACC
CTAGCAACTGTTCCAATTGTTTGTAGTAATAAGCTTACCCTTGTTATACCAGACCCAGG
ACGTGGGTCAAGTGTGTGGAGGGTGTGCATGTTACATATTCAACAGTTGTTTGAATAA
GACTGTGTTACTGATGCCGATGGCACAGAGTTACACCCCACTTCTACAGGTAGTGGATG
ACTTACTGTATAAGTGGTGATAATATAGCATGGCCTTTAAAGGTAACTTGACTAGGAT
GGGCATAATAAGGTTGATGTTGCCTTGCAAAATAATGAGCTTATGCCTCACGGTGTAAG
ACAAAGGCTTGCGTAGCAGGTGTAGATCAAGCACATTGTAGCGTTGAGTCTAAATGTTT
TATACAAGTATTAGTGGCAGTTCAGTTGTAGCTGCTATTACCTCTTCAAATCCTAATCG
AAAGTAGCCTCTTTTTTGAATGAGGCAGGTAATCAGATTTATGTAGACTTAGACCCACA
TGTAATTTTGGTATGAAAGTGGGTGATAAGGTTGAAGTTGTTTACCTGTATTTTATAAA

AATACGAGGTCTATTGTAAGAGGTATGGTACTTGGTGCTATATCTAATGTTGTTGTGTA
CAATCTAAAGGTCATGAGACAGAGGAAGTGGATGCTGTAGGCATTCTCTCACTTTGTTT
TTTGCAGTAGATCCTGCGGATACATATTGTAAATATGTGGCAGCAGGTAATCAACCTTA
GGTAACTGTGTTAAAATGTTGACAGTACATAATGGTAGTGGTTTTGCAATAACATCAAG
CCAAGTCCAACCTCCGGATCAGGATTCTTATGGAGGAGCTTCTGTGTGTCTTTATTGTAA
GCACATATAGCACACCCTGGCGGAGCAGGAAATTTAGATGGACGCTGTCAATTTAAAGT
TCTTTTGTGCAAATACCTACTACGGAGAAAGATCCTGTTGGATTCTGTCTACGTAACAG
GTTTGCAGTGTGTTGTCAGTGTGGATTGGTTATGGATGTCAGTGTGATTCACTTAGACA
CCTAAACCTTCTGTTTCTGTTGAGTGTGCTGTTGCATCTGGTTTTGATAAGAATTATTTAAC
GGGTACGGGGTAGCAGTGAGGCTCGGCTGATACCCCTAGCTAATGGATGTGACCCCGAG
TTGTAAAGCGAGCCTTTGATGTTTGTAAATAAGGAATCAGCCGGTATGTTTCAAATTTA
AGCGTAACTGTGCACGATTCCAAGAAGTACGTGATACTGAAGATGGAAATCTTGAGTAT
GTGATTCTTATTTTGTGGTTAAACAAACCACTCCTAGTAATTATGAACATGAGAAAGCT
GTTATGAAGACTTAAAGTCAGAAGTAACAGCTGATCATGATTTCTTTGTGTTCAATAAA
ACATTTATAATATTAGTAGGCAGAGGCTTACTAAGTATACTATGATGGATTTTTGCTAG
CTTTGCGGCACCTTTGACCCAAAGGATTGCGAAGTTCTTAAAGAAATACTTGTCACTTAG
GTTGTATAGAAGATTATCACCTAAGTGGTTTGAAGAGAATAAGGATTGGTACGACCCA
TAGAAAACCTTAAATATTATGCCATGTTGGCTAAAATGGGACCTATTGTACGACGTGCT
TATTGAATGCTATTGAGTTCGGAAACCTCATGGTTGAAAAAGGTTATGTTGGTGTATA
CACTTGATAACCAAGATCTTAATGGCAAATTTTATGATTTTGGTGATTTTCAGAAGACG
CGCCTGGTGCTGGTGTTTCTGTTTTTGATACGTATTATTCTTACATGATGCCCATCATG
CCATGACTGATGCGTTGGCACCTGAGAGGTATTTTGAATATGATGTGCATAAGGGTTAA
AATCTTATGATCTCCTCAAGTATGATTATACTGAGGAGAAACAAGATTTGTTTCAGAAT
ACTTTAAGTATTGGGATCAAGAGTATCACCTAACTGTGCGGACTGTAGTGATGACAGT
GTTTGATACATTGTGCAAACCTTCAACATCTTGTTTTCTACACTTGTACCGCAGACTTCT
TCGGTAATTTGTGTAGAAAGGTTTTTGTGATGGTGTACCATTTATAGCTACTTGTGGT
ATCATTCTAAGGAACCTGGTGTTATTATGAATCAAGATAACACCATGTCAATTTCAAAA
TGGGTTTGAGTCAACTCATGCAGTTTGTGAGATCCTGCCTTGTTAGTGGGGACATCA
ATAAATTAGTGGATCTTAGAACGTCTTGTTTTAGTGTTTGTGCTTTAGCGTCTGGTATA
CTCATCAAACGGTAAACAGGTCACCTTAAACAAGGATTTCTACGATTTTGCAGAGAAG
CTGGTATGTTTAAGGAAGGTTCTTCTATAACCACTTAAACATTTCTTCTACCCACAGACG
GTAATGCTGCTATAAACGATTATGATTATTATCGTTATAACAGGCCTACCATGTTTGAA
TACGTCAACTTTTATTTTGTGTTAGAAGTGACTTCTAAATATTTTGAATGTTATGAAGGG
GCTGTATACCAGCAAGCCAAGTTGTAGTTAACAATTTAGATAAGAGTGACAGGTTATCCT

TCAATAAGTTTGGAAAGGCCCGTCTCTATTATGAAATGAGTCTAGAGGAGCAGGACCAC
TCTTTGAGAGTACAAAGAAGAACGTCCTGCCTACTATAACTCAGATGAATTTAAAATAG
CCATATCCGCGAAAAATAGAGCGCGTACAGTGGCAGGTGTGTCTATCCTTTCTACTATA
CTAATAGGCAGTTTCATCAGAAGATTCTTAAGTCTATAGTCAACACTAGAAACGCTCCG
TAGTTATTGGAACAACCAAGTTTTATGGCGGTTGGGATAACATGTTGAGAAACCTTATC
AGGGTGTGTAAGACCCGATTCTTATGGGTGGGATTATCCAAAGTGTGATAGAGCAATC
CTAATTTGTTGCGTATAGCAGCATCTTTAGTACTCGCTCGTAAACACACTAATTGTTGA
CTTGGTCTGAACGCGTTTATAGGTGTATAATGAATGCGCTCAGGTTTTATCTGAAACG
TCTTAGCTACAGGTGGTATATATGTGAAACCTGGTGGTACTAGCAGTGGAGATGCTACA
CTGCTTATGCAAACAGTGTTTTCAACATAATACAAGCCACATCTGCTAATGTTGCGCGC
TTTTGAGTGTTATAACGCGTGATATTGTATATGATGACATTAAGAGCTTGCAGTATGAT
TGTACCAGCAGGTTTATAGGCGAGTCAATTTTGACCCAGCATTTGTTGAAi¾AGTTTTT
TCTTATTTGTGTAAGAATTTCTCATTGATGATCTTGTCTGACGACGGTGTGTTTGT
AACACACATTAGCCAAACAAGGTCTTGTAGCAGATATTTCTGGTTTTAGAGAAGTTCC
TACTATCAGAACAATGTTTTTATGGCTGATTCTAAATGTTGGGTGAACCAGATTTAGA
AAAGGCCACATGAATTTTGTTCACAGCACACAATGTTAGTGGAGGTGATGGTGAGCT
AGATACTTGCCATATCCAGACCCATCACGTATTTTGTGTGCATGTGTTTTGTAGATGT
TTGGATAAGACAGAATCTGTGGCTGTTATGGAGCGTTATATCGCTCTTGCCATAGATGT
ACCCACTAGTACATCATGAAAATGAGGAGTACAAGAAGGTATTCTTTGTGCTTCTTTCT
ACATCAGAAAACCTCTATCAAGAGCTTTCTCAGAATATGCTTATGGACTACTCTTTTGTA
TGGATATAGATAAGGGTAGTAAATTTTGGGAACAGGAGTTCTATGAAAATATGTATAGG
CCCCTACAACATTACAGTCTTGTGGCGTTTGTGTAGTGTGTAATAGTCAAACCTATATTC
GCTGTGGTAATTGTATTCGCAAACCATTTTTGTGTTGTAAGTGTGCTATGACCATGTA
TGCACACAGACCACAAAAATGTTTTGTCTATAAATCCTTACATTTGCTCACAGCCAGGT
GTGGTGAAGCAGATGTTACTAAATTGTACCTCGGAGGTATGTCATACTTCTGCGGTAAC
ATAAACCAAAGTTATCAATACCGTTAGTATCTAATGGTACAGTGTTTGGAATTTACAGG
CTAATTGTGCAGGTAGCGAAAATGTTGATGATTTTAATCAACTAGCTACTACTAATTGT
CTACTGTGGAACCTTATATTTTGGCAAATCGTTGTGTAGATTTCGTTGAGACGCTTTGCG
CAGAGACAGTAAAAGCTACAGAAGAATTACATAAGCAACAATTTGCTAGTGCAGAAGTA
GAGAAGTACTCTCAGATCGTGAATTGATTCTGTCTTGGGAGCCAGGTAAAACCAGGCC
CATTGAATAGAAATTATGTTTTCACTGGCTTTCACTTTACTAGAACTAGTAAAGTTCAC
TCGGTGATTTTACATTTGAAAAAGGTGAAGGTAAGGACGTTGTCTATTATCGAGCGACT
CTACTGCTAAATTGTCTGTTGGAGACATTTTTGTTTTAACCTCACACAATGTTGTTTCC
TTATAGCGCCAACGTTGTGTCCTCAGCAAACCTTTTCTAGGTTTGTGAATTTAAGACCA

ATGTGATGGTACCTGCGTGTTTTGTAAATAACATTCCATTGTACCATTTAGTAGGCAAC
AGAAGCGTACTACAGTACAAGGCCCTCCTGGCAGTGGTAAATCCCATTTTGCTATAGGT
TGGCGGCTTACTTTAGTAACGCCCGTGTCGTTTTTACTGCATGCTCTCATGCAGCTGTG
ATGCTTTATGTGAAAAAGCTTTTAAAGTTTCTTAAAGTAGATGATTGCACTCGTATAGTA
CCTCAAAGGACTACTATCGATTGCTTCTCTAAGTTTAAAGCTAATGACACAGGCAAAAG
TACATTTTTAGTACTATTAATGCCTTGCCAGAAGTTAGTTGTGACATTCTTTTGTTGA
CGAGGTTAGTATGTTGACCAATTACGAATTGTCTTTTATTAATGGTAAGATAAACTATC
AATATGTTGTGTATGTAGGTGATCCTGCTCAATTACCGGCGCCTCGTACGTTGCTTAAG
GTTCACTCTCTCCAAAGGATTATAATGTTGTCACAAACCTTATGGTTTGTGTTAAACCG
ACATTTTCCTTGCAAAGTGTTACCGTTGTCCTAAAGAAATTGTAGATACTGTTTCTACC
TTGTATATGATGGAAAGTTTATTGCAAATAACCCGGAATCACGTCAGTGTTCAGGTA
TAGTTAATAATGGTAATTCTGATGTAGGACATGAAAGTGGCTCAGCCTACAACATAACC
AATTAGAATTTGTGAAAGATTTTGTCTGTCGCAATAAGGAATGGCGGGAAGCAACATTA
TTTCACCTTATAATGCTATGAACCAGAGAGCCTACCGTATGCTTGGACTTAATGTTCAA
CAGTAGACTCGTCTCAAGGTTCTGGAGTATGATTATGTTATCTTTTGTGTTACTGCAGAT
TCGCAGCATGCACTGAATATTAACAGATTCAATGTAGCGCTTACAAGAGCCAAGCGTGG
TATACTAGTTGTCATGCGTCAGCGTGATGAACTATATTCAGCTCTTAAGTTTATAGAGC
TTGATAGTGTAGCAAGTCTGCAAGGTACAGGCTTGTTTAAAATTTGCAACAAAGAGTTT
AGTGGTGTTACCCAGCTTATGCAGTCACAACCTAAGGCTCTTGCTGCAACTTATAAAGT
TAATGATGAACTTGCTGCACTTGTTAACGTGGAAGCTGGTTCAGAAATAACATATAAAC
ATCTTATTTCTTTGTTAGGGTTTAAAGATGAGTGTTAATGTTGAAGGCTGCCACAACATG
TTTATAACACGTGATGAGGCTATCCGCAACGTAAGAGGTTGGGTAGGTTTTGATGTAGA
AGCAACACATGCTTGCGGTACTAACATTGGTACTAACCTGCCTTTCCAAGTAGGTTTCT
CTACTGGTGCAGACTTTGTAGTTACGCCTGAGGGACTTGTAGATACTTCAATAGGCAAT
AATTTTGAGCCTGTGAATTCTAAAGCACCTCCAGGTGAACAATTTAATCACTTGAGAGC
GTTATTCAAAGTGCTAAACCTTGGCATGTTGTAAGGCCAAGGATTGTGCAAATGTTAG
CGGATAACCTGTGCAACGTTTCAGATTGTGTAGTGTGTCACGTGGTGTGTCATGGCCTA
GAACTAACCCTTTGCGCTATTTTGTAAAATAGGCAAGGACCAAGTTTGTCTTGCGG
TTCTAGAGCAACAACCTTTAATTCTCATACTCAGGCTTATGCTTGTTGGAAGCATTGCT
TGGGTTTTGATTTTGTATAATCCACTCTTAGTGGATATTCAACAGTGGGGTTATTCT
GGTAACCTACAATTTAACCATGATTTGCATTGTAATGTGCATGGACACGCACATGTAGC
TTCTGCGGATGCTATTATGACGCGTTGTCTTGCAATTAATAATGCATTTTGTCAAGATG
TCAACTGGGATTTAACTTACCCTCATATAGCAAATGAGGATGAAGTCAATTCTAGCTGT
AGATATTTACAACGCATGTATCTTAATGCATGTGTTGATGCTCTTAAAGTTAACGTTGC

TATGATATAGGCAACCCTAAAGGTATAZ^AATGTGTTAGACGTGGAGACTTAAATTTTA
GATTCTATGATAAGAATCCAATAGTACCCAATGTCAAGCAGTTTGAGTATGACTATAAT
CAGCACAAAGATAAGTTTGCTGATGGTCTTTGTATGTTTTGGAATTGTAATGTGGATTG
TTATCCCGACAATTCCTTAGTTTGTAGGTACGACACACGAAATTTGAGTGTGTTTAACC
TACCTGGTTGTAATGGTGGTAGCTTGTATGTTAACAAGCATGCATTCCACACACCTAAA
TTTGATCGCACTAGCTTTCGTAATTTGAAAGCTATGCCATTCTTTTTCTATGACTCATC
GCCTTGCGAGACCATTCAATTGGATGGAGTTGCGCAAGACCTTGTGTCATTAGCTACGA
AAGATTGTATCACAAAATGCAACATAGGCGGTGCTGTTTGTA AAAAGCACGCACAAATG
TATGCAGATTTTGTGACTTCTTATAATGCAGCTGTTACTGCTGGTTTTACTTTTTGGGT
TACTAATAATTTTAACCCATATAATTTGTGGAAAAGTTTTTCAGCTCTCCAGTCTATCG
ACAATATTGCTTATAATATGTATAAGGGTGGTCATTATGATGCTATTGCAGGAGAAATG
CCCACTATCGTAACTGGAGATAAAGTTTTTGTATAGATCAAGGCGTAGAAAAAGCAGT
TTTTTTAATCAAACAATTCTGCCTACATCTGTAGCGTTTGAGCTGTATGCGAAGAGAAA
TATTTCGCACACTGCCAAACAACCGTATTTTGAAAGGTTTGGGTGTAGATGTGACTAATG
GATTTGTAATTTGGGATTACACGAACCAAACACCACTATACCGTAATACTGTTAAGGTA
TGTGCATATACAGACATAGAACCAAATGGCCTAATAGTGCTGTATGATGATAGATATGG
TGATTACCAGTCTTTTCTAGCTGCTGATAATGCTGTTTTAGTTTCTACACAGTGTTACA
AGCGGTATTTCGTATGTAGAAATACCGTCAAACCTGCTTGTTTCAGAACGGTATTCCGTTA
AAAGATGGAGCGAACCTGTATGTTTATAAGCGTGTTAATGGTGCGTTTGTTACGCTACC
TAACACATTAAACACACAGGGTTCGCAGTTATGAACTTTTGAACCTCGTAGTGATGTTG
AGCGTGATTTTCTCGACATGTCTGAGGAGAGTTTTGTAGAAAAGTATGGTAAAGAATTA
GGTCTACAGCACATACTGTATGGTGAAGTTGATAAGCCCCAATTAGGTGGTTTACACAC
TGTTATAGGTATGTGCAGACTTTTACGTGCGAATAAGTTGAACGCAAAGTCTGTTACTA
ATTCTGATTCTGATGTCATGCAAAATTATTTTGTATTGGCAGACAATGGTTCCTACAAC
AAGTGTGTACTGTTGTGGATTTGCTGCTTGATGATTTCTTAGAACTTCTTAGGAACATA
CTGAAAGAGTATGGTACTAATAAGTCTAAAGTTGTAACAGTGTCAATTGATTACCATAG
CATAAATTTTATGACTTGGTTTGAAGATGGCATTATTA AAACATGTTATCCACAGCTTC
AATCAGCATGGACGTGTGGTTATAATATGCCTGAACTTTATAAAGTTTCAGAATTGTGTT
ATGGAACCTTGCAACATTCCTAATTATGGTGTTGGAATAGCGTTGCCAAGTGGTATTAT
GATGAATGTGGCAAAGTATACACAACCTCTGTCAATACCTTTCGAAAACAACATGTGTG
TACCGCATAATATGCGAGTAATGCATTTTGGAGCTGGAAGTGACAAAGGAGTGGCTCCA
GGTAGTACTGTTCTTAAACAATGGCTCCCAGAAGGGACACTCCTTGTCGATAATGATAT
TGTAGACTATGTGTCTGATGCACATGTTTCTGTGCTTTCAGATTGCAATAAATATAAGA
CAGAGCACAAAGTTTGATCTTGTGATATCTGATATGTATACAGACAATGATTCAAAAAGA

AAGCATGAAGGCGTGATAGCCAATAATGGCAATGATGACGTTTTTCATATATCTCTCAAG
TTTTCTTCGTAATAATTTGGCTCTAGGTGGTAGTTTTGCTGTAAAAGTGACAGAGACAA
GTTGGCACGAAGTTTTATATGACATTGCACAGGATTGTGCATGGTGGACAATGTTTTGT
ACAGCAGTGAATGCCTCTTCTTCAGAAGCATTCTTGGTTGGTGTTAATTATTTGGGTGC
AAGTGAAAAGGTTAAGGTTAGTGGAAAAACGCTGCACGCAAATTATATATTTTGGAGGA
ATTGTAATTATTTACAAACCTCTGCTTATAGTATATTTGACGTTGCTAAGTTTGATTTG
AGATTGAAAGCAACACCAGTTGTTAATTTGAAAACCTGAACAAAAGACAGACTTAGTCTT
AATTTAATTAAGTGTGGTAAGTTACTGGTAAGAGATGTTGGTAACACCTCTTTTACTAT
GACTCTTTTGTGTGTACTATGTAGTGCTGCTTTGTATGACAGTAGTTCTTACGTTTACA
CTACCAAAGTGCCTTTAGACCACCTAATGGTTGGCATTTTACACGGGGGTGCTTATGCGT
AGTTAATATTTCTAGCGAATCTAATAATGCAGGCTCTTCACCTGGGTGTATTGTTGGTC
TATTCATGGTGGTCGTGTTGTTAATGCTTCTTCTATAGCTATGACGGCACCGTCATCAG
TATGGCTTGGTCTAGCAGTCAGTTTTGTACTGCACACTGTAACTTTTCAGATACTACAT
GTTTGTTACACATTGTTATAAATATGATGGGTGTCCTATAACTGGCATGCTTCAAAGA
TTTTTTACGTGTTTCTGCTATGAAAAATGGCCAGCTTTTCTATAATTTAACAGTTAGTT
AGCTAAGTACCCTACTTTTAAATCATTTCAGTGTGTTAATAATTTAACATCCGTATATT
AAATGGTGATCTTGTTTACACCTCTAATGAGACCACAGATGTTACATCTGCAGGTGTTA
TTTTAAAGCTGGTGGACCTATAACTTATAAAGTTATGAGAGAAGTTAAAGCCCTGGCTA
TTTTGTTAATGGTACTGCACAAGATGTTATTTTGTGTGATGGATCACCTAGAGGCTTGT
AGCATGCCAGTATAAATACTGGCAATTTTTTCAGATGGCTTTTATCCTTTTATTAATAGTG
TTTAGTTAAGCAGAAGTTTATTGTCTATCGTGAAAATAGTGTTAATACTACTTTTACGT
ACACAATTTCACTTTTTCATAATGAGACTGGCGCCAACCCTAATCCTAGTGGTGTTTACA
TATTCAACTTACCAAACACAAACAGCTCAGAGTGGTTATTATAATTTTAATTTTTCCT
TCTGAGTAGTTTTGTTTATAAGGAGTCTAATTTTATGTATGGATCTTATCACCCAAGTG
TAATTTTAGACTAGAACTATTAATAATGGCTTGTGGTTTAATTCACTTTCAGTTTCAT
TGCTTACGGTCCTCTTCAAGGTGGTTGCAAGCAATCTGTCTTTAGTGGTAGAGCAACTG
TTGTTATGCTTATTCATATGGAGGTCCTTCGCTGTGTAAAGGTGTTTATTCAGGTGAGT
AGATCTTAATTTTGAATGTGGACTGTTAGTTTATGTTACTAAGAGCGGTGGCTCTCGTT
ACAAACAGCCACTGAACCGCCAGTTATAACTCGACACAATTATAATAATATTACTTTAA
TACTTGTGTTGATTATAATATATATGGCAGAACTGGCCAAGGTTTTATTACTAATGTAC
CGACTCAGCTGTTAGTTATAATTATCTAGCAGACGCAGGTTTGGCTATTTTAGATACAC
TGGTTCCATAGACATCTTTGTTGTACAAGGTGAATATGGTCTTACTTATTATAAGGTTA
CCCTTGCGAAGATGTCAACCAGCAGTTTGTAGTTTCTGGTGGTAAATTAGTAGGTATTT
TACTTCACGTAATGAGACTGGTTCTCAGCTTCTTGAGAACCAGTTTTACATTAAAATCC

TAATGGAACACGTCGTTTTAGACGTTCTATTACTGAAAATGTTGCAAATTGCCCTTATT
TAGTTATGGTAAGTTTTGTATAAAACCTGATGGTTCAATTGCCACAATAGTACCAAAAA
ATTGGAACAGTTTGTGGCACCTTTACTTAATGTTACTGAAAATGTGCTCATAACCTAACG
TTTTAATTTAACTGTTACAGATGAGTACATACAAACGCGTATGGATAAGGTCCAAATTA
TTGTCTGCAGTATGTTTGTGGCAATTCTCTGGATTGTAGAGATTTGTTTCAACAATATG
GCCTGTTTGTGACAACATATTGTCTGTAGTAAATAGTATTGGTCAAAAAGAAGATATGA
ACTTTTGAATTTCTATTCTTCTACTAAACCGGCTGGTTTTAATACACCATTTCTTAGTA
TGTTAGCACTGGTGAGTTTAATATTTCTCTTCTGTTAACAACCTCCTAGTAGTCCTAGAG
GCGTTCTTTTATTGAAGACCTTCTATTTACAAGCGTTGAATCTGTTGGATTACCAACAA
TGACGCATACAAAAATTGCACTGCAGGACCTTTAGGTTTTCTTAAGGACCTTGCGTGTC
TCGTGAATATAATGGTTTGTCTGTGTTGCCTCCCATTTATAACAGCAGAAATGCAAATTT
GTATACTAGTTCTCTAGTAGCTTCTATGGCTTTTGGTGGTATTACTGCAGCTGGTGCTT
ACCTTTTGGCCACACAACCTGCAGGCTAGAATTAATCACTTGGGTATTACCCAGTCACTTT
GTTGAAGAATCAAGAAAAAATTGCTGCTTCCTTTAATAAGGCCATTGGTCGTATGCAGA
AGGTTTTAGAAGTACATCTCTAGCATTACAACAAATTCAGATGTTGTTAATAAGCAGG
TGCTATTCTTACTGAGACTATGGCATCACTTAATAAAAATTTTGGTGCTATTTCTTCTT
GATTCAAGAAATCTACCAGCAACTTGACGCCATACAAGCAAATGCTCAAGTGGATCGTT
TATAACTGGTAGATTGTCATCACTTTCTGTTTTAGCATCTGCTAAGCAGGCGGAGCATT
TAGAGTGTCAACAGCGTGAGTTAGCTACTCAGAAAATTAATGAGTGTGTTAAGTCAA
GTCTATTAGGTACTCCTTTTGTGGTAATGGACGACATGTTCTAACCATACCGCAAAATC
ACCTAATGGTATAGTGTTTATACACTTTTCTTATACTCCAGATAGTTTTGTTAATGTTC
TGCAATAGTGGGTTTTTGTGTAAAGCCAGCTAATGCTAGTCAGTATGCAATAGTACCCC
TAATGGTAGGGGTATTTTTATACAAGTTAATGGTAGTTACTACATCACAGCACGAGATT
GTATATGCCAAGAGCTATTACTGCAGGAGATATAGTTACGCTTACTTCTTGTCAAGCAA
TTATGTAAGTGTAATAAGACCGTCATTACTACATTCGTAGACAATGATGATTTTGATT
TAATGACGAATTGTCAAATGGTGGAATGACACTAAGCATGAGCTACCAGACTTTGACA
ATTCAATTACACAGTACCTATACTTGACATTGATAGTGAAATTGATCGTATTCAAGGCT
TATACAGGGTCTTAATGACTCTTTAATAGACCTTGAAAACTTTCAATACTCAAACTA
TATTAAGTGGCCTTGGTATGTGTGGTTAGCCATAGCTTTTGGCACTATTATCTTCATCT
AATACTAGGATGGGTTTTCTTCATGACTGGATGTTGTGGTTGTTGTTGTGGATGCTTTG
CATTATGCCTCTAATGAGTAAGTGTGGTAAGAAATCTTCTTATTACACGACTTTTGATA
CGATGTGGTAACTTAACAATACAGACCTAAAAAGTCTGTTTAATGATTCAAAGTCCCAG
TCCTTCCTAATAGTATTAATTTTTCTTTGGTGTAACTTGTACTAAGTTGTTTTAGAGG
TTTATTATAGCGCTCCAACAACCTAATACAAGTTTTACTCCAAATTATCAATAGTAACTT

ACAGCCTAGACTGACCCTTTGTCACAGTCTAGACTAATGTTAACTTAGAAGCAATTAT
GAAACTGGTGAGCAAGTGATTCAAAAAATCAGTTTCAATTTACAGCATATTTCAAGTGA
TTAAACACAGAAGTATTTGACCCCTTTGACTATTGTTATTACAGAGGAGGTAATTTTTG
GAAATAGAGTCAGCTGAAGATTGTTCAAGGTGATGATGAATTTATTGAATAAGTCGCTAA
GGAAAATGGAAGTTTTCTAACAGCGCTTTATATATTTGTAGGATTTTTTAGCACTTTATT
TCTAGGTAGAGCACTTCAAGCATTGTACAGGCTGCTGATGCTTGTGTTTATTTTGGTA
TACATGGGTAGTAATTCAGGAGCTAAGGGTACAGCCTTTGTATATAAGTATACATATG
TAGAAAACCTTAACAATCCGGAATTAGAAGCAGTTATTGTCAACGAGTTTCCTAAGAACG
TTGGAATAATAAAAAATCCAGCAAATTTTCAAGATGTCCAACGAGACAAATTGTACTCTG
ACTTTGAACAGTCAGTTGAGCTTTTTAAAGAGTATAATTTATTTATAACTGCATTCTTT
TGTTCTTAACCATAATACTTCAGTATGGCTATGCAACAAGAAGTAAGTTTATTTATATC
TGAAAATGATAGTGTTATGGTGCTTTTGGCCCCCTTAACATTGCAGTAGGTGTAATTTCT
GTATATACCCACCAAACACAGGAGGTCTTGTCGCAGCGATAATACTTACAGTGTTTGCT
GTCTGTCTTTTGTAGGTTATTGGATCCAGAGTATTAGACTCTTTAAGCGGTGTAGGTCA
TGTGGTCATTTAACCCAGAATCTAATGCCGTAGGTTCAATACTCCTAACTAATGGTCAA
CAATGTAATTTTGCTATAGAGAGTGTGCCAATGGTGCTTTCTCCAATTATAAAGAATGG
TGTTCTTTATTGTGAGGGTCAGTGGCTTGCTAAGTGTGAACCAGACCACTTGCCTAAAG
ATATATTTGTTTGTACACCGGATAGACGTAATATCTACCGTATGGTGCAGAAATATACG
GTGACCAAAGCGGAAATAAGAAACGGTTTGCTACGTTTGTCTATGCAAAGCAGTCAGTA
GATACTGGCGAGCTAGAAAGTGTAGCAACAGGAGGGAGTAGTCTTTACACCTAAATGTG
TGTGTGTAGAGAGTATTTAAAATTATTCTTTAATAGTGCCTCTATTTTAAGAGCGCATA
ATAGTATTATTTTTGAGGATATTAATATAAATCCTCTCTGTTTTATACTCTCTTTTCAA
GAGCTATTATTTAAAAACAGTTTTTCCACTCTTTTGTGCCAAAACTATTGTTGTTAA
TGGTGTAACCTTTCAAGTAGATAATGGAAAAGTCTACTACGAAGGAAAACCAATTTTAA
GAAAGGTTGTTGTAGGTTGTGGTTGAGTTATAAAAAAGATTAACTACCTACTACACTT
ATTTTTATAAGAGGCGTTTTATCTTACAAGCGCTTAATAAATACGGACGATGAAATGGC
TGACTAGTTTTGTAAGGGCAGTTATTTATGTTATAAACCCCTATTATTAAGTCAATTA
AGAGTATTAGATAGGTTAATCTTAGATCATGGACCAAAACACATCTTAACGTGTGTTAG
GTGCGTGATTTTGTTCATTAGATTTAGTTTATAGGTTGGCGTATACGCCTACTCAAT
CGCTGGTATGAATAATAGTAAAGATAATCCTTTTTGCGGAGCAATAGCAAGAAAAGCGC
GAATTTATCTGAGAGAAGGATTAGATTGTGTTTACTTTCTTAACAAAGCAGGACAAGCG
AGTCTTGTCCCGCGTGTACCTCTCTAGTATTCAGGGGAAAACCTGTGAGGAACACAAA
TATAATAATAATCTTTTGTGATGGCAAGCGGTAAGGCAACTGGAAAGACAGATGCCCCA
GCTCCAGTCATCAAACTAGGAGGACCAAAGCCACCTAAAGTTGGTTCCTTCTGGAAATGA

TCTTGGTTTCAAGCAATAAAAGCCAAGAAGTTAAATTACCTCCGCCTAAGTTTGAAGG
TAGCGGTGTTCTGATAATGAAAATCTAAAACCAAGTCAGCAGCATGGATATTGGAGAC
GCCAAGCTAGGTTTAAGCCAGGTAAAGGTGGAAGAAAACCAGTCCCAGATGCTTGGTAT
TTTTACTATACTGGAACAGGACCAGCCGCTAACCTGAATTGGGGTGATAGCCAAGATGG
TATAGTGTGGGTTGCTGGTAAGGGTGCTGATACTAAATTTAGATCTAATCAGGGTACTC
GTGACTCTGACAAGTTTGACCAATATCCGCTACGGTTTTTCAGACGGAGGACCTGATGGT
AATTTCCGTTGGGATTTTCATTCCTCTGAATCGTGGCAGGAGTGGGAGATCAACAGCAGC
TTCATCAGCAGCATCTAGTAGAGCACCATCACGTGAAGTTTCGCGTGGTCGCAGGAGTG
GTTCTGAAGATGATCTTATTGCTCGTGCAGCAAGGATAATTCAGGATCAGCAGAAGAAG
GGTTCTCGCATTACAAAGGCTAAGGCTGATGAAATGGCTCACCGCCGGTATTGCAAGCG
CACTATTCCACCTAATTATAAGGTTGATCAAGTGTTTGGTCCCCGTACTAAAGGTAAGG
AGGGAAATTTTGGTGATGACAAGATGAATGAGGAAGGTATTAAGGATGGGCGCGTTACG
CAATGCTCAACCTAGTTCCTAGCAGCCATGCTTGTCTTTTCGGAAGTAGAGTGACGCCC
AGACTTCAACCAGATGGGCTGCACTTGAAATTTGAATTTACTACTGTGGTCCCACGTGA
TGATCCGCAGTTTGATAATTATGTAAAAATTTGTGATCAGTGTGTTGATGGTGTAGGAA
CACGTCCAAAAGATGATGAACCAAGACCAAGTCACGCTCAAGTTCAAGACCTGCAACAA
GAGGAAATTTCTCCAGCGCCAAGACAGCAGCCCCTAAGAAGGAGAAAAAGCCAAAGAAGC
AGGATGATGAAGTGGATAAAGCATTGACCTCAGATGAGGAGAGGAACAATGCACAGCTG
GAATTTGATGATGAACCCAAGGTAATTAAGTGGGGGGATTAGCCCTAGGAGAGAATGA
ACTTTGAGTAAAATTCAATAGTAAGAGTTAAGGAAGATAGGCATGTAGCTTGATTACCT
ACATGTCTATCGCCAGGGAAATGTCTAATTTGTCTACTTAGTAGCCTGGAAACGAACGG
TAGACCCTTAGATTTTAATTTAGTTTAATTTTATAGTTTAAAGTTAGTTTAGAGTA
GGTATAAAGATGCCAGTGCCGGGGCCACGCGGAGTACGACCGAGGGTACAGCACTAGGA
CGCCCATTAGGGGAAGAGCTAAATTTTAGTTTAAAGTTAAGTTTAATTGGCTATGTATAG
TTAAAATTTATAGGCTAGTATAGAGTTAGAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
REPLICASE

[0075] Para além dos genes estruturais e acessórios, dois terços de um genoma de coronavírus compreende o gene da replicase (na extremidade 5' do genoma), que é expressa como duas poliproteínas, PPLA e pplAB, em que pplab é um produto de extensão de PPLA como um resultado de um mecanismo de mudança -1 ribossomal. Os dois poliproteínas são clivados por dois tipos de proteases codificadas por vírus geralmente resultando em 16 proteínas

não-estruturais (NSP1 -16); IBV carece NSP1 codificando assim Nsp2-16.

[0076] Assim, o gene 1 em IBV codifica 15 (16 em outros coronavírus) proteínas não-estruturais (nsp2-16), que estão associados com a replicação e transcrição de RNA.

[0077] O termo 'proteína replicase' é aqui utilizado para se referir a uma e a ppl poliproteínas pplab ou subunidades NSP individuais.

[0078] O termo "gene da replicase" é aqui utilizado para se referir a uma sequência de ácido nucleico que codifica para as proteínas de replicase.

[0079] Um resumo das funções das proteínas nsp do coronavírus é fornecida na Tabela 1.

Tabela 1

Proteína Nsp	Funções chaves
1	Conservado dentro, mas não entre grupos genéticos de coronavírus; Potenciais funções reguladoras na célula hospedeira.
2	Dispensável para MHV e replicação de SARS-CoV em cultura de tecidos
3	Domínio ácido; Domínio macro com atividades de ligação a ADRP e poli (ADP-ribose); Uma ou duas proteases semelhantes a papaína contendo ZBD; Domínio Y
4	Domínio Transmembranar
5	Protease principal como-C, homodímero
6	Domínio Transmembranar
7	Interage com nsp8 para formar um complexo hexadecamérico
8	RNA polymerase não canonical; interage com nsp7 para formar um complexo hexadecamérico
9	Proteína de ligação a ssRNA, dímero

10	Proteína de ligação a RNA, homododecamérica, domínio de ligação a zinco, conhecida para interagir com nsp14 e nsp16
11	desconhecida
12	RNA polymerase dependente de RNA
13	Domínio de ligação a zinco, NTPase, dNTPase, 5'-a-3' helicase RNA e DNA, RNA 5'-trifosfato
14	3'-a 5' exoribonuclease, Domínio de ligação a zinco e N7-metiltransferase
15	endoribonuclease Uridilato-específica, homohexâmero
16	ribose-2'-O-metiltransferase putativa

[0080] A variante do gene da replicase codificada pelo coronavírus da presente invenção compreende uma mutação em uma ou mais das secções de sequência que codifica nsp-10, nsp-14, nsp-15 ou nsp-16.

[0081] Nsp10 tem atividade de ligação a RNA e parece estar envolvido em interações homo e / ou heterotípicas dentro de outros PTS da região de pplA / pplAB. Adota uma dobra α / β composta de cinco α -hélices, um 3^o hélice e três beta-fios. Dois locais de ligação ao zinco foram identificados que são formados por resíduos de cisteína conservados e um resíduo de histidina (Cys-74 / Cis-77 / A-83 / Cis-90; Cis-117 / Cis-120 / Cis-128 / Cys-130). A proteína foi confirmada para se ligarem RNA de cadeia simples e de cadeia dupla e DNA sem especificidade óbvia. NSP-10 pode ser reticulado com NSP-9, sugerindo que o vigor de uma rede complexa de interações proteína-proteína envolvendo NSP-7, -8, -9 e -10. Além disso, NSP-10 é conhecido por interagir com NSP-14 e NSP-16.

[0082] nsp-14 compreende um domínio ativo exoribonuclease 3'-para-5' (éxon) na região do terminal

amino. SARS-CoV éxon tem sido demonstrado ter atividade exoribonuclease de metal dependente de íons de 3'-para-5' que atua em ambos os RNA de cadeia simples e de cadeia dupla, mas não no DNA. NSP-14 tem sido demonstrado ter atividade à prova de leitura. Este NSP também tem sido demonstrado que possuem uma atividade N7-metiltransferase (MT) na região do terminal carboxila.

[0083] nsp-15 associada NendoU (endorribonuclease nidoviral, específico para L) atividade de RNAase foi avaliado para um número de coronavírus, incluindo SARS-CoV, MHV e IBV. As atividades foram consistentemente relatado para ser significativamente melhorada por Mn^{2+} e $iões$ houve pouca atividade na presença de Mg^{2+} e Ca^{2+} . NendoU cliva no lado 3' de resíduos em ambos uridilato de RNA de cadeia simples e de cadeia dupla. O substrato biologicamente relevante (s) de coronavírus NendoUs continua a ser identificado.

[0084] nsp-16 foi previsto para mediar a atividade de ribose-2'-O-metiltransferase (2'-O-MTase) e inverter-genética experiências têm demonstrado que o domínio de 2'-O-MTase é essencial para a síntese de RNA viral em HCoV-229E e SARS-CoV. A enzima pode estar envolvida na produção da tampa 1 estruturas de RNA de coronavírus e pode também cooperar com NendoU éxon e em outras vias de processamento de RNA. 2'-O-MTase também pode metilato RNAs específicos para protegê-los da clivagem NendoU mediada.

[0085] As sequências genômicas e proteínas para nsp-10, nsp-14, nsp-15 e nsp-16 são fornecidas como SEQ ID NO: 2 - 5 e 6 - 9, respectivamente.

SEQ ID NO: 2 (sequência nucleotídica nsp-10- nucleotídeos 1884-12318 de SEQ ID NO: 1)

TCTAAAGGTCATGAGACAGAGGAAGTGGATGCTGTAGGCATTCTCTCACTTTGTTCTTT
TGCAGTAGATCCTGCGGATACATATTGTAAATATGTGGCAGCAGGTAATCAACCTTTAG
GTAACGTGTGTTAAATGTTGACAGTACATAATGGTAGTGGTTTTGCAATAACATCAAAG

CCAAGTCCAACCTCCGGATCAGGATTCTTATGGAGGAGCTTCTGTGTGTCTTTATTGTAG
AGCACATATAGCACACCTTGGCGGAGCAGGAAATTTAGATGGACGCTGTCAATTTAAAG
GTTCTTTTGTGCAAATACCTACTACGGAGAAAGATCCTGTTGGATTCTGTCTACGTAAA
AGGTTTGCAGTGTTCAGTGTGGATTGGTTATGGATGTCAGTGTGATTCACTTAGA
CAACCTAAACCTTCTGTTCAG

[0086] SEQ ID NO: 3 (sequência de nucleotídeos nsp-
14 - nucleotídeos 16938-18500 de SEQ ID NO: 1)

GGTACAGGCTTGTTTAAAATTTGCAACAAAGAGTTTAGTGGTGTTCACCCAGCTTATGC
AGTCACAACCTAAGGCTCTTGCTGCAACTTATAAAGTTAATGATGAACTTGCTGCACTTG
TTAACGTGGAAGCTGGTTCAGAAATAACATATAAACATCTTATTTCTTTGTTAGGGTTT
AAGATGAGTGTAAATGTTGAAGGCTGCCACAACATGTTTATAACACGTGATGAGGCTAT
CCGCAACGTAAGAGGTTGGGTAGGTTTTGATGTAGAAGCAACACATGCTTGCGGTACTA
ACATTGGTACTAACCTGCCTTTCCAAGTAGGTTTCTCTACTGGTGCAGACTTTGTAGTT
ACGCCTGAGGGACTTGTAGATACTTCAATAGGCAATAATTTTGAGCCTGTGAATTCTAA
AGCACCTCCAGGTGAACAATTTAATCACTTGAGAGCGTTATTCAAAAGTGCTAAACCTT
GGCATGTTGTAAGGCCAAGGATTGTGCAAATGTTAGCGGATAACCTGTGCAACGTTTCA
GATTGTGTAGTGTTCACGTGGTGTTCATGGCCTAGAACTAACCACCTTTGCGCTATTT
TGTTAAAATAGGCAAGGACCAAGTTTGTTCCTTGCGGTTCTAGAGCAACAACCTTTTAATT
CTCATACTCAGGCTTATGCTTGTGGAAGCATTGCTTGGGTTTTGATTTTGTTTATAAT
CCACTCTTAGTGGATATTCAACAGTGGGGTTATTCTGGTAACCTACAATTTAACCATGA
TTTGCAATTGTAATGTGCATGGACACGCACATGTAGCTTCTGCGGATGCTATTATGACGC
GTTGTCTTGCAATTAATAATGCATTTTGTCAAGATGTCAACTGGGATTTAACTTACCCT
CATATAGCAAATGAGGATGAAGTCAATTCTAGCTGTAGATATTTACAACGCATGTATCT
TAATGCATGTGTTGATGCTCTTAAAGTTAACGTTGTCTATGATATAGGCAACCCTAAAG
GTATTAAATGTGTTAGACGTGGAGACTTAAATTTTAGATTCTATGATAAGAATCCAATA
GTACCCAATGTCAAGCAGTTTGAGTATGACTATAATCAGCACAAAGATAAGTTTGCTGA
TGGTCTTTGTATGTTTTGGAATTGTAATGTGGATTGTTATCCCGACAATTCCTTACTTT
GTAGGTACGACACACGAAATTTGAGTGTGTTAACCTACCTGGTTGTAATGGTGGTAGC
TTGTATGTTAACAAGCATGCATTCCACACACCTAAATTTGATCGCACTAGCTTTTCGTAA
TTTGAAAGCTATGCCATTCTTTTTCTATGACTCATCGCCTTGCGAGACCATTCAATTGG
ATGGAGTTGCGCAAGACCTTGTGTCATTAGCTACGAAAGATTGTATCACAAAATGCAAC
ATAGGCGGTGCTGTTTGTAAAAAGCACGCACAAATGTATGCAGATTTTGTGACTTCTTT
AATGCAGCTGTACTGCTGGTTTTACTTTTTGGGTTACTAATAATTTTAACCCATATAT
TTGTGGAAGGTTTTTTCAGCTCTCCAG

[0087] SEQ ID NO: 4 (sequência de nucleotídeos nsp-15 - nucleotídeos 18501-19514 de SEQ ID NO: 1)

TCTATCGACAATATTGCTTATAATATGTATAAGGGTGGTCATTATGATGCTATTGCAGG
AGAAATGCCCACTATCGTAACTGGAGATAAAGTTTTTGTATAGATCAAGGCGTAGAAA
AAGCAGTTTTTTTTAATCAAACAATTCTGCCTACATCTGTAGCGTTTGAGCTGTATGCG
AAGAGAAATATTCGCACACTGCCAAACAACCGTATTTTGAAAGGTTTGGGTGTAGATGT
GACTAATGGATTTGTAATTTGGGATTACACGAACCAAACACCACTATACCGTAATACTG
TTAAGGTATGTGCATATACAGACATAGAACCAAATGGCCTAATAGTGCTGTATGATGAT
AGATATGGTGATTACCAGTCTTTTCTAGCTGCTGATAATGCTGTTTTAGTTTCTACACA
GTGTTACAAGCGGTATTTCGTATGTAGAAATACCGTCAAACCTGCTTGTTTCAGAACGGTA
TTCCGTAAAAGATGGAGCGAACCTGTATGTTTATAAGCGTGTTAATGTGCGTTTGTTA
CGCTACCTAACACAATAAACACACAGGGTCGAAGTTATGAACTTTTGACCTCGTAGTG
ATGTTGAGCGTGATTTTCTCGACATGTCTGAGGAGAGTTTTGTAGAAAGTATGGTAAAG
AATTAGGTCTACAGCACATACTGTATGGTGAAGTTGATAAGCCCCAATAGGTGGTTTTCC
ACACTGTTATAGGTATGTGCAGACTTTTACGTGCGAATAAGTTGAACGCAAAGTCTGTT
ACTAATTCTGATTCTGATGTCATGCAAAATTATTTTGTATTGGCAGACAATGGTTCCTC
AAGCAAGTGTGTACTGTTGTGGATTTGCTGCTTGATGATTTCTTAGAACTTCTTAGGAC
ATACTGAAAGAGTATGGTACTAATAAGTCTAAAGTTGTAACAGTGTCAATTGATTACCA
TAGCATAAATTTTATGACTTGGTTTGAAGATGGCATTATTAAAACATGTTATCCACAGC
TTCAA

[0088] SEQ ID NO: 5 (sequência de nucleotídeos nsp-16 - nucleotídeos 19515-20423 de SEQ ID NO: 1)

TCAGCATGGACGTGTGGTTATAATATGCCTGAACTTTATAAAGTTCAGAATTGTGTTAT
GGAACCTTGCAACATTCCTAATTATGGTGTGGAATAGCGTTGCCAAGTGGTATTATGA
TGAATGTGGCAAAGTATACACAACCTCTGTCAATACCTTTCGAAAACAACAATGTGTGTA
CCGCATAATATGCGAGTAATGCATTTTGGAGCTGGAAGTGACAAAGGAGTGGTGCCAGG
TAGTACTGTTCTTAAACAATGGCTCCCAGAAGGGACACTCCTTGTCGATAATGATATTG
TAGACTATGTGTCTGATGCACATGTTTCTGTGCTTTCAGATTGCAATAAATATAAGACA
GAGCACAAGTTTGATCTTGTGATATCTGATATGTATACAGACAATGATTCAAAAAGAAG
CATGAAGGCGTGATAGCCAATAATGGCAATGATGACGTTTTTCATATATCTCTCAAGTTT
TCTTCGTAATAATTTGGCTCTAGGTGGTAGTTTTGCTGTAAAAGTGACAGAGACAAGTT
GGCACGAAGTTTTATATGACATTGCACAGGATTGTGCATGGTGGACAATGTTTTGTACG
CAGTGAATGCCTCTTCTTCAGAAGCATTCTTGATTGGTGTTAATTATTTGGGTGCAAGG
AAAAGGTTAAGTTAGTGGAAAAACGCTGCACGCAAATTATATATTTTGGAGGAATTGT

AATTATTTACAAACCTCTGCTTATAGTATATTTGACGTTGCTAAGTTTGATTTGAGATT
GAAAGCAACGCCAGTTGTTAATTTGAAACTGAACAAAAGACAGACTTAGTCTTTAATT
TAATTAAGTGTGGTAAGTTACTGGTAAGAGATGTTGGTAACACCTCTTTTACTAGTGAC
TCTTTTGTGTGTACTATGTAG

[0089] SEQ ID NO: 6 (sequência de aminoácido nsp-10)

SKGHETEEVDAVGILSLCSFAVDPADTYCKYVAAGNQPLGNCVKMLTVHNGSGFAITSK
PSPTPDQDSYGGASVCLYCRAHIAHPGGAGNLDGRCQFKGSFVQIPTTEKDPVGFCLRN
KVCTVCQCWIGYGCQCDSLRLQPKPSVQ

[0090] SEQ ID NO: 7 (sequência de aminoácido nsp-14)

GTGLFKICNKEFSGVHPAYAVTTKALAATYKVNDELAALVNVEAGSETIYKHLISLLGF
KMSVNVEGCHNMFITRDEAIRNVRGWVGFDVEATHACGTNIGTNLPFQVGFSTGADFWT
PEGLVDTSIGNNFEPVNSKAPPGEQFNHLRALFKSAKPWHWRPRIVQMLDNALCNVSDC
WFVTWCHGLELTTLRYFVKIGKDQVCSCGSRATTFNSHTQAYACWKHCLGDFVYNPLL
VDIQQWGYSGNLQFNHDLHCNVHGHAVASADAIMTRCLAINNAFCQDVNWDLTYPHIA
NEDEVNSSCRYLQRMVNLACVDALKVNVVYDIGNPKGIKCVRRGDLNFRFYDKNPIVFN
VKQFEYDYNQHKDKFADGLCMFWNCNVDCYPDNSLVCRYDTRNLSVFNLPGCNGGSLYV
NKHAFHTPKFDRTSFRNLKAMPFFFFYDSSPCETIQLDGVAQDLVSLATKDCTIKCNIGG
AVCKKHAQMYADVFVTSYNAAVTAGFTFWVTNNFNPYNLWKSFSALQ

[0091] SEQ ID NO: 8 (sequência de aminoácido nsp-15)

SIDNIAYNMYKGGHYDAIAGEMPTIVTGDECVFVIDQGVEKAVFFNQITILPTSVAFELY
AKRNIRTLPNRILKGLGVDVTNGFVIWDYTNQTPLYRNTVKVCAYTDIEPNGLIVLYD
DRYGDYQSFLADNAAVLVSTQCYKRYSYVEIPSNLLVQNGIPLKDGANLYVYKRVNGAF
VTLPNLNTQGRSYETFEPRSDVERDFLDMSEESFVEKYGKELGLQHILYGEVDKPQLG
GLHTVIGMCRLLRANKLNAKSVTNSDSVDMQNYFVLNAGSYKQVCTWDLDDLDFLELL
RNILKEYGTNKSKVVTVSIDYHSINFMTWFEDGIIKTCYPQLQ

[0092] SEQ ID NO: 9 (sequência de aminoácido nsp-16)

SAWTCGYNMPELYKVQNCVMEPCNIPNYGVGIALPSGIMMNVAKYTQLCQYLSKTTMCV
PHNMVRMHFGAGSDKGVAPGSTVLKQWLPEGTLLVDNDIVDYVSDAHVSVLSDCNKYKT
EHKFDLVISDMYTDNDSKRKHGVIANNNGNDDVFIYLSFLRNALGGSFAVICTET
SWHEVLYDIAQDCAWWTMFTAVNASSSEAFLVGVNYLGASEKVKVSGKTLHANYIFWN

CNYLQTSAYSIFDVAKFDLRLKATPWNLKTEQKTDLVFNLIKCGKLLVRDVGNTSFTDS
FVCTM

PATOGENICIDADE REDUZIDA

[0093] O coronavírus vivo, atenuado da presente invenção compreende um gene da replicase variante que faz com que o vírus tenha reduzida patogenicidade em comparação com um coronavírus que expressa o gene de tipo selvagem correspondente.

[0094] O termo "atenuado" tal como aqui utilizado, refere-se a um vírus que apresenta a referida reduzida patogenicidade e podem ser classificadas como não-virulenta. O, vírus vivo atenuado é um vírus de replicação enfraquecida ainda capaz de estimular uma resposta imune e a produção de imunidade, mas que não causa a doença real.

[0095] O termo "patogenicidade" é aqui utilizado de acordo com o seu significado normal, referir-se ao potencial do vírus para causar doença em um indivíduo. Tipicamente, a patogenicidade de um coronavírus é determinada através do ensaio de doença associados sintomas, por exemplo, espirros, snicking e redução da atividade ciliar traqueal.

[0096] O termo "patogenicidade reduzida" é usado para descrever que o nível de patogenicidade de um coronavírus é diminuída, rebaixada ou diminuída em comparação com um correspondente, de tipo selvagem coronavírus.

[0097] Em uma concretização, o coronavírus da presente invenção tem uma patogenicidade reduzida em comparação com o vírus M41-CK parental a partir do qual foi derivado ou um coronavírus controlo. Os coronavírus de controlo podem ser um coronavírus com uma patogenicidade conhecida, por exemplo, um coronavirus replicase expressa a proteína de tipo selvagem.

[0098] A patogenicidade de um coronavírus pode ser

avaliada utilizando métodos bem conhecidos na arte. Tipicamente, a patogenicidade é avaliada analisando os sintomas clínicos em um sujeito desafiado com o vírus, por exemplo, uma galinha.

[0099] Como ilustração, a galinha pode ser contestada em 8-24 dias de idade por nasal ou inoculação ocular. Os sintomas clínicos associados com infecção, IBV, podem ser avaliadas 3-10 dias pós-infecção. Os sintomas clínicos comumente avaliados para determinar a patogenicidade de um coronavírus, por exemplo, um IBV, incluem ofegar, tossir, espirrar, snicking, depressão, penas enrugadas e perda de atividade ciliar traqueal.

[00100] A replicase variante da presente invenção, quando expressa em um coronavírus, podem causar uma redução do nível dos sintomas clínicos em comparação com um coronavírus que expressa uma replicase do tipo selvagem.

[00101] Por exemplo, um coronavírus expressando a replicase variante pode causar um número de snicks por ave por minuto, que é menos do que 90%, menos do que 80%, menos do que 70%, menos do que 60%, menos do que 50%, menos do que 40%, menos do que 30%, menos de 20% ou menos do que 10% do número de snicks causadas por um vírus que expressam o tipo selvagem replicase.

[00102] Um coronavírus expressando uma replicase variante de acordo com a presente invenção podem causar sibilos em menos do que 70%, menos do que 60%, menos do que 50%, menos do que 40%, menos do que 30%, menos de 20% ou menos do que 10% de o número de aves em um rebanho infectado com o vírus expressando o tipo replicase selvagem.

[00103] Um coronavírus expressando uma replicase variante de acordo com a presente invenção pode resultar em atividade ciliar traqueal que é pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou pelo menos 95% do

nível de atividade ciliar traqueal em aves não infectadas.

[00104] Um coronavirus replicase expressa uma variante de acordo com a presente invenção pode fazer com que os sintomas clínicos, tal como definido na Tabela 2, a um nível mais baixo do que um coronavírus que expressam o tipo selvagem replicase.

Snicking (sneezing)	}	IBV specific: Mild (N.B. Respiratory signs become apparent from 2-3 dpi if they are going to occur and can continue for up to 7d).
Nasal exudate		
Watery eyes		
Swollen infraorbital sinuses		
Rales (vibration in trachea or bronchi region)	}	Mild, if exceed 2d increase to moderate
Hunched posture / depressed		
Fluffed up feathers		
Eating and drinking less		
Drinking in excess: evident by fluid filled crop or measured water intake	—	IBV specific: Mild, if exceed 24h increase to moderate for a max of 2d. If still drinking in excess then kill by schedule 1 method.
Less active but still evade capture	}	Mild, if exceed 1d increase to moderate.
Weight loss		
Not eating or drinking		
Birds sit alone and does not evade capture	}	Moderate: birds at end point. Kill by schedule 1 method.
Severe respiratory distress: e.g. excessive gasping		
Snicking and / or rales for 7d in total		
Found dead	—	Severe: report to project license holder. Full post-mortem to be performed.

[00105] A replicase variante da presente invenção, quando expressa em um coronavírus, podem fazer com que o vírus se replica em níveis não-patogênicos in ovo.

[00106] Durante o desenvolvimento de vacinas para ser administrada in ovo a embriões de galinha, deve ser dada atenção a dois pontos: o efeito dos anticorpos maternos sobre as vacinas e o efeito das vacinas no embrião. Os anticorpos maternos são conhecidos por

interferir com a imunização ativa. Por exemplo, as vacinas com estirpes fracas não induzir níveis de anticorpos protetores, quando administradas a frangos de corte com anticorpos maternos como estas estirpes são neutralizados pela associação anticorpos maternos.

[00107] Assim, uma partícula viral deve ser suficientemente eficientes na replicação de propagação e para garantir que ele não é neutralizado pelos anticorpos maternos derivadas contra o vírus. Os anticorpos maternos derivados são uma piscina finito de anticorpos eficazes, que diminuem com a idade do frango e neutralização do vírus dessa maneira não equivale ao estabelecimento da imunidade de longo prazo para o embrião / pinto. A fim de desenvolver a imunidade a longo prazo contra o vírus, o embrião de galinha chocados e deve desenvolver uma resposta imune protetora adequada, que é distinta para o efeito dos anticorpos maternos-derivados.

[00108] Para ser útil para a vacinação in ovo, o vírus deve também não replicar e propagar a um nível que faz com que seja patogênico para o embrião.

[00109] A patogenicidade reduzida em termos de o embrião pode significar que o coronavírus causa uma menor redução na taxa de eclosão de comparação, um controle de coronavírus de tipo selvagem correspondente. Assim, o termo "sem serem patogênicas para o embrião" no contexto da presente invenção pode significar "sem causar eclosão reduzida", quando comparado com um controle coronavírus.

[00110] Uma variante da replicase adequada pode ser identificada utilizando métodos que são conhecidos no estado da técnica. Por exemplo, experiências de desafio comparativos seguintes na vacinação in ovo de embriões com ou sem anticorpos maternos-derivados pode ser executada (ou seja, em que a camada tem ou não tem sido vacinados contra IBV).

[00111] Se a replicase variante permite que o vírus se propagar a um nível que é demasiado elevado, o embrião não chocará ou não será viável incubação seguinte (isto é, o vírus é patogênico para o embrião). Um vírus que é patogênico para o embrião pode matar o embrião.

[00112] Se a variante da replicase provoca uma redução na replicação viral e propagação, que é muito grande, o vírus será neutralizado pelos anticorpos maternos-derivados. desafio subsequente do pintinho com IBV, portanto, resultar no desenvolvimento de sintomas clínicos (por exemplo, pieira, snicking, perda de atividade ciliar) e o aparecimento da doença na pintainho desafiado; uma vez que irá não conseguiram desenvolver uma imunidade eficaz contra o vírus.

VARIANTE

[00113] Tal como aqui utilizado, o termo "variante" é sinónimo de "mutante" e refere-se a um ácido ou sequência de amino ácido nucleico que difere em comparação com a correspondente sequência de tipo selvagem.

[00114] Uma sequência variante / mutante pode surgir naturalmente, ou pode ser criada artificialmente (por exemplo, por mutagênese dirigida ao local). O mutante pode ter pelo menos 70, 80, 90, 95, 98 ou 99% de identidade de sequência com a parte correspondente da sequência de tipo selvagem. O mutante pode ter menos de 20, 10, 5, 4, 3, 2 ou 1 mutação (s) através da porção correspondente da sequência de tipo selvagem.

[00115] O termo "tipo selvagem" é usado para significar um gene ou proteína possuindo uma sequência de ácido nucleotídeo ou amino, o qual é idêntico ao gene nativo ou proteína, respectivamente (isto é, o gene ou proteína viral).

[00116] As comparações de identidade pode ser realizado por olho, ou mais geralmente, com a ajuda de

programas de comparação de sequências facilmente disponível. Estes programas de computador disponíveis comercialmente podem calcular a% de identidade entre duas ou mais sequências. Um programa de computador adequado para realizar esse alinhamento o pacote de GCG é Wisconsin Bestfit (Universidade de Wisconsin, EUA; Devereux et al, 1984, Nucleic Acids Research 12: 387.). Os exemplos de outros softwares que podem realizar comparações de sequências incluem, mas não estão limitados a, o pacote BLAST (ver Ausubel et al, 1999 ibid -. Capítulo 18), FASTA (Atschul et al, 1990, J. Mol Biol, 403-410) ea suite GENWORKS de ferramentas de comparação, ClustalX (ver Larkin et al (2007). Clustal W e Clustal X versão 2.0 Bioinformatics, 23:. 2947-2948). Tanto BLAST e FASTA estão disponíveis para pesquisa off-line e on-line (ver Ausubel et al., 1999 ibid, páginas 7-58 a 7-60). No entanto, para algumas aplicações, prefere-se utilizar o programa GCG Bestfit. Uma nova ferramenta, chamada BLAST 2 Sequences está também disponível para comparação de proteína e sequência de nucleotídeos (ver FEMS Microbiol Lett 1999 174 (2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177 (1): 187-8 e tatiana@ncbi.nlm.nih.gov).

[00117] A sequência pode ter uma ou mais deleções, inserções ou substituições de resíduos de aminoácidos que produzem uma alteração silenciosa e resultam em uma molécula funcionalmente equivalente. As substituições de aminoácidos deliberadas podem ser feitas com base em semelhança em polaridade, carga, solubilidade, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade, e / ou a natureza anfipática dos resíduos desde que a atividade seja retida. Por exemplo, carregado negativamente aminoácidos incluem ácido aspártico e ácido glutâmico; aminoácidos carregados positivamente incluem lisina e arginina; e aminoácidos com grupos de cabeça polares não carregados possuindo valores

de hidrofiliçidade semelhantes incluem leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina e tirosina.

[00118] As substituições conservativas podem ser feitas, por exemplo, de acordo com a Tabela abaixo, os aminoácidos no mesmo bloco na segunda coluna e preferencialmente na mesma linha na terceira coluna podem ser substituídos uns pelos outros:

ALIFÁTICO	Não-polar	G A P
		I L V
	Polar - não carregado	C S T M
		N Q
	Polar - carregado	D E
		K R
AROMÁTICO		H F W Y

[00119] O coronavírus da presente invenção pode compreender uma variante do gene da replicase que codifica uma proteína que compreende uma mutação em comparação com qualquer um dos SEQ ID NO: 6, 7, 8 ou 9, que, quando expressa em um coronavírus, faz com que o vírus ter reduzido patogenicidade em relação a um coronavírus que expressam o correspondente replicase do tipo selvagem.

[00120] O gene da replicase variante pode codificar uma proteína que compreende pelo menos uma ou mais mutações de aminoácidos em qualquer combinação de NSP-10, NSP-14, NSP-15 e NSP-16.

[00121] O gene variante de replicase do coronavírus da presente invenção pode codificar uma proteína compreendendo uma mutação, tal como definido nas sequências mod M41 apresentados na Figura 10.

[00122] O gene variante de replicase do coronavírus da presente invenção pode codificar uma proteína que compreende uma ou mais mutações de aminoácidos seleccionadas a partir da lista de:

[00123] Pro para Leu na posição 85 da SEQ ID NO: 6,

[00124] Val para Leu na posição 393 da SEQ ID NO: 7;

[00125] Leu para Ile na posição 183 da SEQ ID NO: 8;

[00126] Val para Ile na posição 209 da SEQ ID NO: 9.

[00127] O gene variante de replicase do coronavírus da presente invenção pode codificar uma proteína que não compreende uma mutação no nsp-2, nsp-3, nsp-6 ou nsp-13.

[00128] O gene variante de replicase do coronavírus da presente invenção pode codificar uma proteína que não compreende uma mutação no NSPL 0 que corresponde a treonina para isoleucina mutação causada por uma mutação na posição de nucleotídeo 12008 no gene relatado por Ammayappan et al. (Arch Virol (2009) 154: 495-499).

[00129] Ammayappan et al (como acima) relata a identificação da sequência de alterações responsáveis pela atenuação da estirpe de IBV Arkansas DPI. O estudo identificou 17 alterações de aminoácidos em uma variedade de proteínas de IBV após múltiplas passagens, aprox. 100, do vírus em ovos embrionados. Não foi investigado se o vírus atenuado (Arca DP1 101) é capaz de se replicar na presença de anticorpos maternos derivadas contra o vírus in ovo, sem ser patogênico para o embrião. Dado que este vírus foi produzido por múltiplas passagens em ovos SPF embrionados, uma metodologia semelhante para as vacinas IBV clássicas, é provável que este vírus é patogênico para os embriões. O vírus pode também ser sensível a anticorpos maternos-se derivados das galinhas foram vacinados com um serotipo semelhante.

[00130] O gene variante de replicase do coronavírus da presente invenção pode codificar uma proteína que

compreende qualquer combinação de uma ou mais mutações de aminoácidos fornecida na lista acima.

[00131] O gene da replicase variante pode codificar uma proteína que compreende a mutação de aminoácidos Pro para Leu na posição 85 da SEQ ID NO: 6.

[00132] O gene da replicase variante pode codificar uma proteína que compreende a mutação de aminoácidos Val para Leu na posição 393 da SEQ ID NO: 7.

[00133] O gene da replicase variante pode codificar uma proteína que compreende a mutação de aminoácidos Leu para Ile na posição 183 da SEQ ID NO: 8.

[00134] O gene da replicase variante pode codificar uma proteína que compreende a mutação de aminoácidos Val para Ile na posição 209 da SEQ ID NO: 9.

[00135] O gene da replicase variante pode codificar uma proteína que compreende as mutações de aminoácidos Pro para Leu na posição 85 da SEQ ID NO: 6, e Val para Leu na posição 393 da SEQ ID NO: 7.

[00136] O gene da replicase variante pode codificar uma proteína que compreende as mutações de aminoácidos Pro para Leu na posição 85 da SEQ ID NO: 6 Leu para Ile na posição 183 da SEQ ID NO: 8.

[00137] O gene da replicase variante pode codificar uma proteína que compreende as mutações de aminoácidos Pro para Leu na posição 85 da SEQ ID NO: 6 e Val para Ile na posição 209 da SEQ ID NO: 9.

[00138] O gene da replicase variante pode codificar uma proteína que compreende as mutações de aminoácidos Val para Leu na posição 393 da SEQ ID NO: 7 e Leu para se deitar na posição 183 da SEQ ID NO: 8.

[00139] O gene da replicase variante pode codificar uma proteína que compreende as mutações de aminoácidos Val para Leu na posição 393 da SEQ ID NO: 7 e Val para Ile na posição 209 da SEQ ID NO: 9.

[00140] O gene da replicase variante pode codificar uma proteína que compreende as mutações de aminoácidos Leu para Ile na posição 183 da SEQ ID NO: 8 e Val para lie na posição 209 da SEQ ID NO: 9.

[00141] A variante do gene da replicase pode codificar uma proteína que compreende as mutações de aminoácidos Pro para Leu na posição 85 da SEQ ID NO: 6, Val para Leu na posição 393 da SEQ ID NO: 7 e Leu para se deitar na posição 183 da SEQ ID NO : 8.

[00142] A variante do gene da replicase pode codificar uma proteína que compreende as mutações de aminoácidos Pro para Leu na posição 85 da SEQ ID NO: 6 Leu para Ile na posição 183 da SEQ ID NO: 8 e Val para Ile na posição 209 da SEQ ID NO: 9.

[00143] A variante do gene da replicase pode codificar uma proteína que compreende as mutações de aminoácidos Pro para Leu na posição 85 da SEQ ID NO: 6, Val para Leu na posição 393 da SEQ ID NO: 7 e Val para Ile na posição 209 da SEQ ID NO : 9.

[00144] A variante do gene da replicase pode codificar uma proteína que compreende as mutações de aminoácidos Val para Leu na posição 393 da SEQ ID NO: 7, Leu para se deitar na posição 183 da SEQ ID NO: 8 e Val para Ile na posição 209 da SEQ ID NO : 9.

[00145] A variante do gene da replicase pode codificar uma proteína que compreende as mutações de aminoácidos Pro para Leu na posição 85 da SEQ ID NO: 6, Val para Leu na posição 393 da SEQ ID NO: 7, Leu para se deitar na posição 183 da SEQ ID NO : 8 e Val para Ile na posição 209 da SEQ ID nO: 9.

[00146] O gene variante replicase também pode ser definida no nível de nucleotídeos.

[00147] Por exemplo, a sequência de nucleotídeos da variante do gene da replicase do coronavírus da presente

invenção pode compreender um ou mais nucleotídeos dentro das regiões substituições selecionadas a partir da lista de: 11884-12318, 16938-18500, 19515-20423 e 18.501-19.514 de SEQ ID NO: 1.

[00148] Por exemplo, a sequência de nucleotídeos da variante do gene da replicase do coronavírus da presente invenção pode compreender uma ou mais substituições de nucleotídeos selecionada a partir da lista de:

C para T na posição de nucleotídeo 12137;
G para C na posição de nucleotídeo 18114;
T para A na posição de nucleotídeo 19047; e
G para A na posição de nucleotídeo 20139;

em comparação com a sequência apresentada como SEQ ID NO: 1.

[00149] Tal como aqui utilizado, o termo "substituição" é sinónimo do termo mutação e significa que as sequências de nucleotídeos na posição identificada difere ao da sequência de nucleotídeos de tipo selvagem.

[00150] A sequência nucleotídica pode compreender qualquer combinação das substituições de nucleotídeos seleccionada a partir da lista de:

C para T na posição de nucleotídeo 12137;
G para C na posição de nucleotídeo 18114;
T para A na posição de nucleotídeo 19047; e
G para A na posição de nucleotídeo 20139;

em comparação com a sequência apresentada como SEQ ID NO: 1.

[00151] A sequência nucleotídica pode compreender a substituição C12137T.

[00152] A sequência nucleotídica pode compreender a substituição G18114C.

[00153] A sequência nucleotídica pode compreender a substituição T19047A.

[00154] A sequência nucleotídica pode compreender a

substituição G20139A.

[00155] A sequência nucleotídica pode compreender o C12137T substituições e G181 14C.

[00156] A sequência nucleotídica pode compreender as substituições C12137T e T19047A.

[00157] A sequência nucleotídica pode compreender as substituições C12137T e G20139A.

[00158] A sequência nucleotídica pode compreender as substituições G18114C e T19047A.

[00159] A sequência nucleotídica pode compreender as substituições G18114C e G20139A.

[00160] A sequência nucleotídica pode compreender as substituições T19047A e G20139A.

[00161] A sequência nucleotídica pode compreender as substituições C12137T, G18114C e T19047A.

[00162] A sequência nucleotídica pode compreender as substituições C12137T, T19047A e G20139A.

[00163] A sequência de nucleotídeos pode compreender as substituições C12137T, G181 14C e G20139A.

[00164] A sequência de nucleotídeos pode incluir as substituições G18114C, T19047A e G20139A.

[00165] A sequência nucleotídica pode compreender as substituições C12137T, G18114C, T19047A e G20139A.

[00166] A sequência de nucleotídeos pode não compreender uma substituição, o que corresponde à substituição C12008T relatado por Ammayappan et al. (Como acima).

[00167] A sequência de nucleotídeos pode ser natural, sintética ou recombinante. Pode ser dupla ou de cadeia simples, que pode ser DNA ou RNA ou combinações destes. Pode, por exemplo, ser DNAC, produto de PCR, a sequência de DNA gnômico ou RNAm.

[00168] A sequência de nucleotídeos pode ser otimizado para a produção de códon na célula hospedeira /

hospedeiro da escolha.

[00169] Ele pode ser isolado, ou como parte de um plasmídeo, vírus ou célula hospedeira.

PLASMÍDEO

[00170] Um plasmídeo é uma molécula de DNA extra-cromossomal separado a partir do DNA cromossômico que é capaz de se replicar independentemente do DNA cromossômico. Eles são geralmente circular e de cadeia dupla.

[00171] Os plasmídeos ou vetores (como eles são por vezes conhecidos) podem ser utilizados para expressar uma proteína em uma célula hospedeira. Por exemplo, uma célula hospedeira bacteriana pode ser transfectada com um plasmídeo capaz de codificar uma proteína em particular, a fim de expressar essa proteína. O termo também inclui cromossomas artificiais de levedura e cromossomas artificiais de bactérias que são capazes de acomodar mais longas porções de DNA.

[00172] O plasmídeo da presente invenção compreende uma sequência de nucleotídeos capaz de codificar para uma região definida da proteína replicase. Também pode compreender uma ou mais sequência adicional coronavírus nucleotídeo (s) ou sequência (s) nucleotídica capaz de codificar uma ou mais proteínas de outros coronavírus, tais como o gene S e / ou do gene 3.

[00173] O plasmídeo pode também compreender um marcador de resistência, tal como o gene da xantina-guanina fosforribosiltransferase (gpt) de Escherichia coli, que confere resistência ao ácido micofenólico (MPA) na presença de xantina e hipoxantina e é controlado pelo P7.5 do vírus vaccinia precoce / promotor tardio.

VÍRUS VACCINIA RECOMBINANTE

[00174] A presente invenção também se relaciona com um vírus de vaccinia recombinante (rVV) compreendendo um gene da replicase variante, tal como aqui definido.

[00175] O vírus vaccinia recombinante (rVV) pode ser feita utilizando um sistema de genética inversa, com base vaccinia vírus.

[00176] A este respeito, a presente invenção também proporciona um método para fabricar uma partícula viral por:

(i) transfecção de um plasmídeo, tal como descrito na secção anterior para uma célula hospedeira;

(ii) a infecção da célula hospedeira com um vírus de recombinação que compreende o genoma de uma estirpe de coronavírus com um gene da replicase;

(iii) permitir que a recombinação homóloga ocorra entre as sequências de genes de replicase do plasmídeo e as sequências correspondentes no genoma do vírus de recombinação para produzir um gene da replicase modificada;

(iv) selecionar para a recombinação de vírus compreendendo o gene da replicase modificada.

[00177] O termo "gene da replicase modificado" refere-se a um gene da replicase que compreende um gene da replicase variante, tal como descrito em ligação com o primeiro aspecto da presente invenção. Especificamente, o termo refere-se a um gene que é derivado de um gene da replicase do tipo selvagem, mas compreende uma sequência de nucleotídeos que faz com que codifiquem uma proteína variante de replicase, como aqui definido.

[00178] A recombinação pode envolver todo ou parte do gene da replicase. Por exemplo, a recombinação pode envolver uma sequência de nucleotídeos que codifica para qualquer combinação de NSP-10, NSP-14, NSP-15 e / ou NSP-16. A recombinação pode envolver uma sequência de nucleotídeos que codifica para um aminoácido ou mutação compreende uma substituição de nucleotídeos tal como definido acima.

[00179] O genoma da cepa de coronavírus podem não

possuir a parte da proteína replicase correspondente à parte fornecido pelo plasmídeo, de modo que uma proteína modificada é formada através da inserção da sequência nucleotídica proporcionada pelo plasmídeo.

[00180] O vírus da recombinação é uma adequada para permitir a recombinação homóloga entre o seu genoma e do plasmídeo. O vírus vaccinia é particularmente adequado como recombinação homóloga é utilizada rotineiramente para introduzir e eliminar sequências para o genoma do vírus vaccinia.

[00181] O método acima referido inclui, opcionalmente, a etapa de:

(v) recuperação do coronavírus recombinante que compreende o gene da replicase modificada a partir do DNA do vírus de recombinação a partir do passo (iv).

[00182] Os métodos para recuperação de coronavírus recombinante, tais como IBV recombinante, são conhecidos na arte (Ver Britton et al (2005) ver página 24; e PCT / GB2010 / 001293).

[00183] Por exemplo, o DNA do vírus da recombinação a partir da etapa (iv) pode ser inserido em um plasmídeo e utilizados para transfectar células que expressam citoplasmática T7 RNA polimerase. As células podem, por exemplo, ser pré-infectado com um vírus da varíola aviária que expressa RNA-polimerase de T7. O coronavírus recombinante pode então ser isolado, por exemplo, a partir do meio de crescimento.

[00184] Quando o plasmídeo é inserido no genoma do vírus vaccinia, um intermediário instável é formado. Os recombinantes que compreendem o plasmídeo pode ser seleccionada para, por exemplo, utilizando um marcador de resistência no plasmídeo.

[00185] Recombinantes positivos podem então ser verificado para conter o gene da replicase modificada por,

por exemplo, por PCR e sequenciamento.

[00186] Grandes quantidades de recombinação do vírus, incluindo o gene da replicase modificada (por exemplo, vírus vaccinia recombinante, (rVV) podem ser cultivadas e o DNA extraído a fim de levar a cabo o passo (v)).

[00187] Os sistemas de genética inversa adequados são conhecidos no estado da técnica (Casais et al (2001) J. Virol 75: 12359-12369; Casais et al (2003) J. Virol. 77: 9084-9089; Britton et al (2005) J. virológica métodos 123: 203-211; Armesto et al (2008) Methods in Molecular Biology 454: 255-273).

CÉLULA

[00188] O coronavírus pode ser utilizado para infectar uma célula.

[00189] Partículas de Coronavirus podem ser colhidas, por exemplo, a partir do sobrenadante, por meio de métodos conhecidos no estado da técnica, e, opcionalmente, purificado.

[00190] A célula pode ser utilizada para produzir a partícula de coronavírus.

[00191] Assim, a presente invenção também proporciona um método para a produção de um coronavírus que compreende as seguintes etapas:

- (i) a infecção de uma célula com um coronavírus de acordo com a invenção;
- (ii) permitindo que o vírus se replicar na célula; e
- (iii) a colheita do vírus da progênie.

[00192] A presente invenção também proporciona uma célula capaz de produzir um coronavírus de acordo com a invenção utilizando um sistema de genética inversa. Por exemplo, a célula pode compreender um genoma de vírus de recombinação compreende uma sequência de nucleotídeos capaz de codificar para o gene da replicase do presente invenção.

[00193] A célula pode ser capaz de produzir vírus de recombinação recombinante (por exemplo, vírus vaccinia) contendo o gene da replicase.

[00194] Em alternativa, a célula pode ser capaz de produzir coronavírus recombinante por um sistema de genética inversa. A célula pode expressar ou ser induzidas a expressar a polimerase de T7, a fim de resgatar a partícula viral recombinante.

VACINA

[00195] O coronavírus pode ser utilizado para produzir uma vacina. A vacina pode, através de uma forma viva atenuada do coronavírus da presente invenção e pode compreender ainda um veículo farmacêuticamente aceitável. Tal como aqui definido, os "portadores farmacêuticamente aceitáveis" adequados para uso na invenção são bem conhecidos dos técnicos versados no assunto. Tais transportadores incluem, sem limitação, água, solução salina, solução salina tamponada, tampão de fosfato, soluções aquosas / álcool, emulsões ou suspensões. Outros diluentes e excipientes utilizados convencionalmente podem ser adicionados de acordo com técnicas convencionais. Tais transportadores podem incluir etanol, polióis, e misturas adequadas dos mesmos, óleos vegetais, e ésteres orgânicos injetáveis. Tampões e agentes de ajuste de pH, também pode ser empregue. Os tampões incluem, sem limitação, os sais preparados a partir de um ácido orgânico ou base. tampões representativos incluem, sem limitação, sais de ácidos orgânicos, tais como sais de ácido cítrico, por exemplo, citratos, ácido ascórbico, ácido glucônico, histidina-Hel, ácido carbônico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético, ou ácido itálico, Tris, cloridrato trimethanmine, ou tampões de fosfato. Transportadores parentéricos podem incluir solução de cloreto de sódio, dextrose de Ringer, dextrose, trealose, sacarose, e cloreto de sódio, lactato

de Ringer ou óleos fixos. Transportadoras intravenosa pode incluir reabastece fluidos e nutrientes, reabastecedores de electrólitos, tais como aqueles baseados em dextrose de Ringer e semelhantes. Os conservantes e outros aditivos, tais como, por exemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes (por exemplo, EDTA), gases inertes e semelhantes podem também ser fornecidos nos veículos farmacêuticos. A presente invenção não é limitada pela selecção do transportador. A preparação destas composições farmacêuticamente aceitáveis, a partir dos componentes acima descritos, possuindo isotonicidade pH adequado, estabilidade e outras características convencionais está dentro da perícia da arte. Ver, por exemplo, textos como Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20a ed, Lippincott Williams & Wilkins, bar, 2000;!. e The Handbook of Pharmaceutical Excipients, editar 4.sup.th., eds. RC Rowe et ai, APhA Publications, 2003.

[00196] A vacina da presente invenção irá ser administrada em uma "quantidade terapeuticamente eficaz", que refere-se a uma quantidade de um ingrediente ativo, por exemplo, um agente de acordo com a presente invenção, suficiente para efetuar resultados benéficos ou desejados quando administrado a um indivíduo ou paciente. Uma quantidade eficaz pode ser administrada em uma ou mais administrações, aplicações ou dosagens. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição de acordo com a invenção pode ser prontamente determinada por um vulgar perito na arte. No contexto desta invenção, uma "quantidade terapeuticamente eficaz" é uma que produz uma alteração objetiva medida em um ou mais parâmetros associados condição da Bronquite Infecciosa suficiente para efetuar resultados benéficos ou desejados .Uma quantidade eficaz pode ser administrada em uma ou mais administrações. Para os fins desta invenção, uma quantidade eficaz de

medicamento, composto, ou a composição farmacêutica é uma quantidade suficiente para reduzir a incidência da Bronquite Infecciosa. Tal como aqui utilizado, o termo "terapêutico" engloba o espectro completo de tratamentos para uma doença, condição ou desordem. Um agente de "terapêutico" da invenção podem atuar de uma maneira que é profilática ou preventiva, incluindo aqueles que incorporam procedimentos concebidos para dirigir os animais que podem ser identificados como estando em risco (farmacogenética); ou de uma forma que é benéfica ou curativa na natureza; ou pode atuar para retardar a taxa ou extensão da progressão de, pelo menos, um sintoma de uma doença ou distúrbio a ser tratado.

[00197] A presente invenção também se refere a um método para a produção de tal vacina que compreende o passo de infectar células, por exemplo células Vero, com uma partícula viral que compreende uma proteína da replicase, tal como definido em ligação com o primeiro aspecto da invenção.

MÉTODO DE VACINAÇÃO

[00198] O coronavírus da presente invenção podem ser utilizados para tratar e / ou prevenir uma doença.

[00199] Para "tratar" significa administrar a vacina a um indivíduo tendo uma doença existente, a fim de diminuir, reduzir ou melhorar pelo menos um sintoma associado com a doença e / ou para retardar, reduzir ou bloquear a progressão da doença.

[00200] Para "prevenir" significa a administrar a vacina a um paciente que ainda não tenha contraído a doença e / ou que não está a mostrar quaisquer sintomas da doença para impedir ou prejudicar a causa da doença (por exemplo, infecção) ou para reduzir ou prevenir o desenvolvimento de pelo menos um sintoma associado com a doença.

[00201] A doença pode ser qualquer doença causada

por um coronavírus, tal como uma doença respiratória e / ou a gastroenterite em humanos e hepatite, gastroenterite, encefalite, ou uma doença respiratória em outros animais.

[00202] A doença pode ser da bronquite infecciosa (IB); diarreia epidêmica suína; gastroenterite transmissível; vírus da hepatite de ratos; encefalomielite hemaglutinante porcina; síndrome respiratória aguda grave (SARS); ou doença Bluecomb.

[00203] A doença pode ser bronquite infecciosa.

[00204] A vacina pode ser administrada a pintos ou galinhas eclodidas, por exemplo, gotas oculares ou administração intranasal. Embora precisos, estes métodos podem ser, por exemplo, caro para grandes bandos de frangos. As alternativas incluem a inoculação por pulverização de administração para água potável, mas pode ser difícil de assegurar uma aplicação uniforme vacina utilizando tais métodos.

[00205] A vacina pode ser fornecida em uma forma adequada para a sua administração, tais como um conta-gotas para uso intraocular.

[00206] A vacina pode ser administrada por inoculação *in ovo*, por exemplo, por injeção de ovos embrionados. Vacinação *in ovo* tem a vantagem de que ele proporciona uma resistência fase precoce para a doença. Também facilita a administração de uma dose uniforme por objeto, ao contrário de inoculação por pulverização e administração através da água de beber.

[00207] A vacina pode ser administrada a qualquer compartimento apropriado do ovo, incluindo fluido alantóico, saco vitelino, âmnio, ou célula de ar do embrião. Pode ser administrado a seguir a concha (célula de ar) de membrana e da membrana corioalantóica.

[00208] Normalmente, a vacina é injetada em ovos embrionados, nos estágios avançados do desenvolvimento

embrionário, geralmente durante o último trimestre do período de incubação, como 3-4 dias antes de chocar. Em frangos, a vacina pode ser administrada entre o dia 15-19 do período de incubação de 21 a dez dias, por exemplo, no dia 17 ou 18.

[00209] O processo pode ser automatizado usando um processo de injeção robótico, tais como os descritos no documento WO 2004/078203.

[00210] A vacina pode ser administrada em conjunto com uma ou mais outras vacinas, por exemplo, vacinas para outras doenças, tais como o vírus da doença de Newcastle (NDV). A presente invenção também fornece uma composição de vacina que compreende uma vacina de acordo com a invenção em conjunto com uma ou mais outra (s) vacina. A presente invenção também proporciona um kit compreendendo uma vacina de acordo com a invenção em conjunto com uma ou mais outra (s) vacina para administração separada, sequencial ou simultânea.

[00211] A composição de vacina ou de vacina da invenção pode ser utilizada para tratar um ser humano, animal ou objeto aviário. Por exemplo, o sujeito pode ser um pintainho, galinha ou o mouse (como um rato de laboratório, por exemplo, ratinho transgênico).

[00212] Tipicamente, um médico ou veterinário determinará a dosagem atual que será mais adequada para um sujeito individual ou grupo de sujeitos e ela variará com a idade, peso e resposta do sujeito específico (s).

[00213] A composição pode compreender, opcionalmente, um transportador, diluente, excipiente ou adjuvante farmacêuticamente aceitável. A escolha de transportador farmacêutico, excipiente ou diluente pode ser selecionado com respeito à via de administração pretendida e a prática farmacêutica padrão. As composições farmacêuticas podem compreender como (ou em adição ao) o

transportador, excipiente ou diluente, qualquer ligante (s) apropriado, lubrificante (s), agente (s), agente (s) de revestimento de suspensão, agente (s) solubilizante e outros agentes veiculares que pode ajudar ou aumentar a entrega ou imunogenicidade do vírus.

[00214] A invenção será agora adicionalmente descrita por meio de Exemplos, os quais se destinam a servir para auxiliar um perito na arte na realização da invenção e não se destinam de forma alguma a limitar o âmbito da invenção.

EXEMPLOS

Exemplo 1 - Geração de um sistema de genética inversa de IBV baseado em M41 -CK

[00215] Um DNAC de comprimento completo de M41-CK foi produzida por substituição do DNAC Beaudette no sistema de genética inversa de vírus da vacínia previamente descritos em PCT / GB2010 / 001293 (aqui incorporado por referência) com os DNAC sintético derivado da sequência de consenso de M41.

[00216] O DNAC do IBV dentro de vírus da vacínia recombinante estrutura (rVV) rVV-BeauR-M41-Rep descrito no Armesto, Cavanagh e Britton (2009). PLoS ONE 4 (10): e7384. DOI: 10.1371 / journal.pone.0007384, que consistiu na replicase derivado da estirpe Beaudette do IBV e os genes estruturais e acessórios e 3' UTR de IBV M41 -CK, foi ainda modificado pela substituição do Beaudette 5' UTR-Nsp2- NSP3 sequência com a sequência correspondente de IBV M41 -CK. O DNAC do IBV resultante consistia de 5' UTR-Pne2-NSP3 da M41, NSP4-Nsp16 de Beaudette e os genes estruturais e acessórios e 3' UTR de M41. Este cDNA foi ainda modificado pela deleção da sequência de Beaudette-Nsp16 NSP4. O DNAC resultante, com falta Nsp4-16, foi modificado em mais quatro passos em que o PTS suprimido foram sequencialmente substituídas com as sequências correspondentes de M41 -CK,

o DNAC de substituição representado M41 -CK Nsp4-8, Nsp9-12, Nsp12-14 e finalmente Nsp15-16. Cada substituição de DNAC continha aprox. 500 nucleotídeos na extremidade 5' que corresponde à sequência 3' mais M41 previamente inserido e aprox. 500 nucleotídeos na extremidade 3' correspondentes à sequência do gene S do M41. Isto permitiu a inserção da sequência de DNAC de M41, por recombinação homóloga e adição sequencial de sequência contígua gene da replicase M41. Os cDNAs sintéticos contendo o M41 -derived sequências NSP foram adicionados por recombinação homóloga utilizando o sistema do invençãor anterior descreveu transitória selecção dominante (TDS) (ver PCT / GB2010 / 001293). Os cDNAs -derived M41 contendo a sequência correspondente aos M41 nsp-10, -14, -15 e -16 continha os aminoácidos modificados nas posições 85, 393, 183 e 209, respectivamente, como indicado na Figura 10.

[00217] Um DNAC de comprimento completo que representa o genoma de M41 -CK foi gerado no vírus Vaccinia representando as sequências sintéticas. Dois rIBVs, M41-R-6 e M41-R-12, foram resgatadas e mostrado para crescer de uma maneira semelhante como M41 -CK (Fig. 1).

EXEMPLO 2 - Determinar a patogenicidade do vírus resgatado M41

[00218] Os vírus resgatados no Exemplo 1 foram utilizados para infectar agente patogênico específico de 8 dias de idade, livres

[00219] (SPF) pintos de ocular e nasal inoculação para testá-los para patogenicidade, como observado por sinais clínicos em uma base diária 3-7 dias após a infecção e para a atividade ciliar dias 4 e 6 após a infecção. A perda de atividade ciliar é um método bem estabelecido para determinar a patogenicidade do IBV. Os dois vírus M41 -R foram encontrados para ser apatogênico quando comparado com M41-CK embora eles mostram alguns sinais clínicos em

comparação com os pintos de controlo não infectadas (Fig. 2) e um pouco de perda, mas inconsistente da atividade ciliar (Fig. 3).

[00220] Assim, os clones moleculares de M41 M41 -R - CK não eram patogênicos quando em comparação com o vírus parental M41-CK.

[00221] Os inventores identificaram várias diferenças de nucleotídeos no M41 -R em comparação com as sequências de M41-CK. A maioria destes eram mutações sinónimas, como a alteração do nucleotídeo não afecta a sequência de aminoácidos da proteína associada com a sequência. No entanto, quatro mutações não sinónimas foram identificadas no gene da replicase de IBV específico para NSP-10, NSP-14, NSP-15 e NSP-16 componentes do gene da replicase, estas mutações resultou em alterações de aminoácidos (Tabela 3).

Tabela 3. Mutações não-Sinonimous identificados no NSDS de genoma de comprimento completo M41-R

Região da Replicase	Posição do Nucleotídeo	Mutação do Nucleotídeo	Alteração no Aminoácido
Nsp10	12137	C→T	Pro→Leu
Nsp14	18114	G→C	Val→Leu
Nsp15	19047	T→A	Leu→Ile
Nsp16	20139	G→A	Val→Ile

Exemplo 3 - Reparação de M41 -R rIBVs

[00222] A fim de determinar se as mutações identificadas eram responsáveis pela perda de patogenicidade associada com M41 -R, a mutação Nsp-10 foi reparada e as mutações em nsp-14, -15 e -16 foram reparados e mostrado para crescer de uma maneira semelhante como M41 -CK (Figura 9). Os inventores, assim, gerou os rIBVs, M41 R-nsp10rep e M41 R-nsp14, 15, 16rep, usando cDNAs

sintéticas contendo os nucleotídeos corretas utilizando sistema anterior descrito (TDS) do invençãor (ver PCT / GB2010 / 001293).

[00223] Os rIBVs foram avaliados para patogenicidade em pintos como descrito anteriormente. Ambos os rIBVs mostraram aumento da patogenicidade quando comparado com M41-R, mas não ao nível observado com M41 -CK (Figs 4 e 5). M41 R-nsp14, 15, 16rep deu sinais clínicos e mais redução na atividade ciliar do que M41 R-nsp10rep, em geral estes resultados indicaram que as mudanças associadas com os quatro nsp parece afetar patogenicidade.

[00224] Para determinar os papéis do PTS na patogenicidade do DNAC de comprimento completo correspondente a R-M41 nsp10rep foi usada para reparar as mutações em Nsp14, 15 e 16, utilizando um DNAC sintético que contém os nucleotídeos corretos, utilizando o sistema de TDS.

[00225] Os seguintes rIBVs foram produzidos: - R-M41 nsp10, 15rep - M41-R com as mutações em NSP-10 e NSP-15 reparados

M41 R-nsp10, 14, 15rep - M41-R com mutações no nsp-10, -14 e -15 reparado

M41 R-nsp10, 14, 16rep - M41-R com mutações no NSP-10, -14 e -16 reparado

M41 R-nsp10, 15, 16rep - M41 -R com mutações no NSP-10, -15 e -16 reparado

M41-K - Todos as quatro mutações, nsp-10, -14, -15 e -16 reparado em M41 -R

[00226] Os rIBVs foram mostrados para crescer de uma maneira semelhante como M41 -CK (Figura 9) e avaliados quanto à patogenicidade como descrito anteriormente. M41 -K (em que todas as quatro mutações tinha sido reparado) resultou em sinais clínicos e perda de 100% de atividade ciliar (ciliostase completa) por 4 dias pós-infecção (Fig.

6, 7 e 8). Os outros rIBVs demonstrado diferentes níveis de patogenicidade, para além do R-M41 nsp10, 15, 16rep, que era essencialmente apatogênica. Estes resultados confirmaram que o reparo de todos os quatro PTS restaurados patogenicidade para M41 -R; novamente apoiando a evidência anterior de que as mutações descritas nos quatro NSPS estão implicados na atenuação M41-CK.

[00227] Os inventores também gerou rIBV M41 R-NSP 10, 14 rep (NSP 10 e 14 são reparados, NSP 15 e 16 contêm mutações) e rIBV M41 R-NSP 10, 16 rep (NSP 10 e 16 são reparados, NSP 14 e 15 contêm mutações) e avaliou a patogenicidade destes vírus.

[00228] rIBV M41 R-NSP 10, 14 rep menos patogénica do que M41-K, mas causou cerca de 50% ciliostase nos dias 4-6 após a infecção. rIBV M41 R-NSP 10, 16 representante foi quase apatogênica e não causou ciliostase (veja a Figura 11 ac).

[00229] Assim, o genoma associado com M41-R é um potencial genoma espinha dorsal de um IBV atenuado racionalmente.

EXEMPLO 4 - Vacinação / Estudo de Desafio com M41 -R

[00230] O vírus da vacina candidatos foram testados em estudos em que os ovos de galinha fertilizados foram vacinadas in ovo aos 18 dias embrionamento e no qual foi determinada a eclodibilidade dos ovos inoculados. A saúde clínica dos frangos foi investigado e as galinhas foram desafiados aos 21 dias de idade com um vírus desafio IB M41 virulenta em 103,65 EID50 por dose.

[00231] Os sinais clínicos foram investigados após desafio protecção pela vacina e um teste de ciliostase foi realizada a 5 dias após o desafio para investigar o efeito de os vírus de desafio em movimento dos cílios e protecção pela vacina contra a ciliostase (inibição do movimento ciliar).

[00232] Vacinação in ovo em ovos de frango comerciais

[00233] A concepção da experiência é dado na Tabela 4 e os resultados clínicos são apresentados na Tabela 5. eclosão dos ovos inoculados com IB M41 -R foi boa e galinhas eram saudáveis. IB M41-R protegidos contra os sinais clínicos após o desafio nos frangos (placebo: 19/19 afetados, IB M41 -R: 3/18 afetada e um morto). Os resultados do teste de ciliostase são dadas na Tabela 6. IB M41-R gerado protecção contra a ciliostase.

[00234] Tabela 4 - Projeto de um eclodibilidade, segurança, estudo de eficácia em ovos comerciais

Tratamento	Descrição do tratamento	EID ₅₀ ¹ por dose	Rota de admin.	Dia(s) de Admin	Dia(s) de desafio ²	Fim do estudo	Nr. de ovos por tratamento
T01	Nenhum	NA	NA	NA	NA	NA	30
T02	IB M41-R	10 ⁴	In ovo	18 dia de embrionamento	em 21 dias de idade, 20 galinhas por grupo	em 26 dias de idade	30
NTX	Saline	NA	In ovo				30

¹ volume de dose 0.1 ml, NA, não aplicável.

² 10^{3.65} EID₅₀ por dose

Tabela 5 - percentagens Hatch e dados clínicos antes e após o desafio em galinhas comerciais, para o projeto Ver Tabela 1.

Tratamento	eclosão/ total	Vital/ total	Antes do desafio		Após desafio	
			mortes/ total	Sintomas/ total	morte/ total	Sintomas/ total
Nenhum	28/30	Eutanizado imediatamente após a eclosão para coleta de sangue				
IB M41-R	28/30	28/28	1/20	0/19	1/19	3/18 ^{1,7}
Salina	29/30	29/29	1/20	0/19	0/19	19/19 ^{1,2,3,4,5,6,7}

1 Sistema respiratório perturbado

2 Zumbindo

- 3 Mudança de voz
- 4 Respiração difícil
- 5 Fistulas intra-orbital inchados
- 6 Crescimento desigual
- 7 Fraqueza

Tabela 6 - Resultados do teste ciliostase depois e desafio para modelo ver Tabela 1.

Tratamento	Protegido/total	Percentagem de proteção
Salina	0/19	0%
IB M41R	5/18	28%

[00235] Vacinação *in ovo* em ovos específicos isentos de agentes patogênicos (SPF)

[00236] O desenho do estudo em ovos SPF é dado na Tabela 7 e é semelhante à concepção dos estudos com frangos de cRNAe comerciais, mas a dose de vacinação para IB M41 -R foi maior, (105 EID50 por dose).

[00237] Os resultados (Tabela 8) mostram que a porcentagem escotilha para IB M41 -R escotilha foi baixa, e 19 de 40 eclodiram e os filhotes eram fracos. Oito filhotes morreram. Os restantes 11 frangos foram desafiados e 11 dos pintos nascidos de ovos que tinham sido inoculados com solução salina foram desafiados.

[00238] No teste de ciliostase após o desafio verificou-se que todos os frangos vacinadas *in ovo* com IB M41-R foram protegidos, enquanto que nenhum dos controles foi protegido, ver Tabela 9.

[00239] Tabela 7. Projeto de uma Eclodibilidade, segurança, estudo de eficácia em ovos SPF

Tratamento	Descrição do tratamento	EID ₅₀ ¹ por dose	Rota de Admin	Dia de Admin	Dias de desafio ²	Fim de estudo	Nr. de ovos por tratamento
T01	IB M41-R	10 ⁵	In ovo	18 dias embri	At 21 dias de idade	At 26 dias de	40

T04	Salina	NA	In ovo	onamento		idade	40
NTX	NA	NA	NA		NA		10

¹ Dose volume 0.1 ml, NA, não aplicável.

² dose de desafio $10^{3.3}$ EID₅₀ em 0.2 ml

Tabela 8. Percentagens Hatch e dados clínicos antes e depois desafio em galinhas SPF, para o projeto consulte a Tabela 7.

Tratamento	eclosão/ total	Vital/ total	Antes do desafio		Após desafio	
			mortes/ total	Sintomas/ total	mortes/ total	Sintomas/ total
IB M41-R	19/40	11/40	8/40	weak	0	0
Salina	30/40	30/40	0	-	0	0
NA	9/10	9/10	0	-	-	-

Tabela 9. Resultados de teste de ciliostases após desafio, por modelo ver tabela 7.

Tratamento	Protegido/total	Percentage de proteção
Salina	0/11	0%
IB M41R	11/11	100%

[00240] Em conclusão, IB M41 -R era seguro em ovos comerciais, gerado proteção contra os sinais clínicos e até certo ponto contra ciliostase.

[00241] Em ovos SPF vacinadas com IB M41 R um número relativamente baixo de frangos nascidos. Isto pode ser devido ao 10s EID₅₀ por ovo de IB M41 -R utilizado. Este foi 10 vezes mais elevada do que a dose utilizada nos estudos anteriores em que houve um nível elevado de taxa de eclosão. As percentagens mais baixas de escotilha também podem ser causadas por uma particularmente elevada susceptibilidade da batelada de ovos SPF por vírus, como em outros estudos, o nível de mortalidade embrionária foi também mais elevada que tinha sido anteriormente observada.

[00242] Após o desafio todos os frangos

sobreviventes após a eclosão foram completamente protegida contra ciliostase. Conclui-se que o IB M41 -R tem um grande potencial como vacina para ser administrada in ovo.

[00243] Todas as publicações mencionadas na especificação acima são aqui incorporadas por referência. Várias modificações e variações dos métodos descritos e sistema da invenção serão evidentes para os técnicos versados no assunto sem afastamento do escopo e do espírito da invenção. Embora a invenção tenha sido descrita em ligação com concretizações preferidas específicas, deverá ser entendido que a invenção como reivindicada não deve ser indevidamente limitada a tais concretizações específicas. De fato, várias modificações dos modos descritos para realizar a invenção que é óbvia para os especialistas em biologia molecular, virologia ou campos relacionados destinam-se a estar dentro do escopo das reivindicações seguintes.

REIVINDICAÇÕES

1. Coronavírus atenuado vivo **caracterizado pelo** fato de que compreende um gene replicase variante codificando poliproteínas que compreendem uma mutação em uma ou mais das proteínas não estruturais (s) (nsp)-10, nsp-14, em que o gene da replicase variante codifica uma proteína compreendendo uma mutação de aminoácido de Pro para Leu na posição correspondente à posição 85 da SEQ ID NO: 6, e / ou, em que o gene da replicase variante codifica uma proteína compreendendo uma mutação de aminoácido de Val para Leu na posição correspondente à posição 393 da SEQ ID NO: 7.

2. Coronavírus, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que compreende ainda uma mutação em um ou mais de nsp-15 correspondendo a SEQ ID NO: 8 e nsp-16 correspondendo a SEQ ID NO: 9.

3. Coronavírus, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelo** fato de que o gene replicase variante codifica uma proteína compreendendo uma ou mais mutações de aminoácidos selecionadas a partir de: um aminoácido de Leu a Ile na posição correspondente à posição 183 da SEQ ID NO: 8; e uma mutação de aminoácido Val para Ile na posição correspondente à posição 209 de SEQ ID NO: 9.

4. Coronavírus, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado pelo** fato de que o gene replicase codifica uma proteína compreendendo a mutação de aminoácido de Pro para Leu na posição correspondente à posição 85 da SEQ ID NO: 6.

5. Coronavírus, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado pelo** fato de que o gene da replicase codifica uma proteína compreendendo as

mutações de aminoácidos Val a Leu na posição correspondente à posição 393 da SEQ ID NO: 7; Leu para Ile na posição correspondente à posição 183 da SEQ ID NO: 8; e Val a Ile na posição correspondente à posição 209 da SEQ ID NO: 9.

6. Coronavírus, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado pelo** fato de que o gene da replicase codifica uma proteína compreendendo as mutações de aminoácidos Pro a Leu na posição correspondente à posição 85 da SEQ ID NO: 6; Val a Leu na posição correspondente à posição 393 da SEQ ID NO: 7; Leu para Ile na posição correspondente à posição 183 da SEQ ID NO: 8; e Val a Ile na posição correspondente à posição 209 da SEQ ID NO: 9.

7. Coronavírus, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado pelo** fato de que o gene replicase compreende uma ou mais substituições de nucleotídeos selecionada a partir da lista de:

C para T na posição correspondente a posição nucleotídica 12137;

G para C na posição correspondente a posição nucleotídica 18114;

T para A na posição correspondente a posição nucleotídica 19047; e

G para A na posição correspondente a posição nucleotídica 20139;

em comparação com a sequência apresentada como SEQ ID NO: 1.

8. Coronavírus, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado pelo** fato de que é um vírus da bronquite infecciosa (IBV).

9. Coronavírus, de acordo com qualquer das

reivindicações 1 a 8, **caracterizado pelo** fato de que é IBV M41.

10. Coronavírus, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado pelo** fato de que compreende uma proteína S, pelo menos, parte dos quais é de um serotipo de IBV que não seja M41.

11. Coronavírus, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado pelo** fato de que a proteína S é de um serotipo de IBV que não seja M41.

12. Coronavírus, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado pelo** fato de que tem patogenicidade reduzida em relação a um coronavírus que expressa uma replicase do tipo selvagem correspondente, de tal modo que quando o vírus é administrado a um ovo embrionado, é capaz de se replicar sem ser patogênico para o embrião.

13. Gene replicase variante **caracterizado pelo** fato de que é definido conforme qualquer uma das reivindicações 1 a 7.

14. Proteína codificada por um gene replicase coronavírus variante **caracterizado pelo** fato de que é conforme definido pela reivindicação 13.

15. Plasmídeo **caracterizado pelo** fato de que compreende um gene replicase conforme definido pela reivindicação 14.

16. Método para produzir o coronavírus conforme definido por qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **caracterizado pelo** fato de que compreende as seguintes etapas:

(i) transfectar um plasmídeo conforme definido pela reivindicação 15 em uma célula hospedeira;

(ii) infectar a célula hospedeira com um vírus de recombinação que compreende o genoma de uma cepa de coronavírus com um gene replicase;

(iii) permitir que a recombinação homóloga ocorra entre as sequências de genes replicase do plasmídeo e as sequências correspondentes no genoma do vírus de recombinação para produzir um gene replicase modificado; e

(iv) selecionar para a recombinação de vírus compreendendo o gene replicase modificado.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado pelo** fato de que o vírus da recombinação é um vírus *vaccinia*.

18. Método, de acordo com a reivindicação 16 ou 17, **caracterizado pelo** fato de que também inclui a etapa de:

(v) recuperar o coronavírus recombinante compreendendo o gene replicase modificado a partir do DNA do vírus de recombinação a partir da etapa (iv).

19. Vacina **caracterizada pelo** fato de que compreende um coronavírus conforme definido por qualquer uma das reivindicações 1 a 12 e um veículo farmacologicamente aceitável.

20. Uso de um coronavírus conforme definido por qualquer uma das reivindicações 1 a 12 **caracterizado pelo** fato de que é para fabricação de uma vacina para prevenção de uma doença em um sujeito.

21. Uso, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado pelo** fato de que a doença é a bronquite infecciosa (IB).

22. Uso, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado pelo** fato de que a vacina é administrada por colírio, administração intranasal, administração por beber

água, injeção de pós-eclosão e injeção *in ovo*.

23. Uso, de acordo com a reivindicação 22, **caracterizado pelo** fato de que a vacinação é vacinação *in ovo*.

24. Método para produzir uma vacina conforme definido pela reivindicação 19 **caracterizado pelo** fato de que compreende a etapa de infectar uma célula hospedeira com um coronavírus conforme definido por qualquer uma das reivindicações 1 a 12.

FIGURA 1

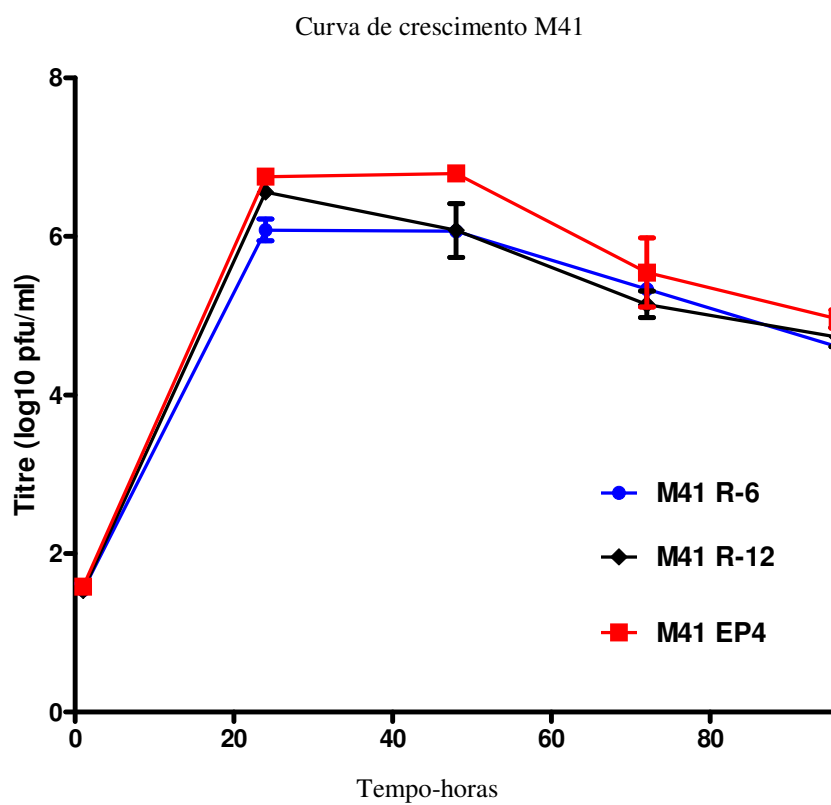


FIGURA 2

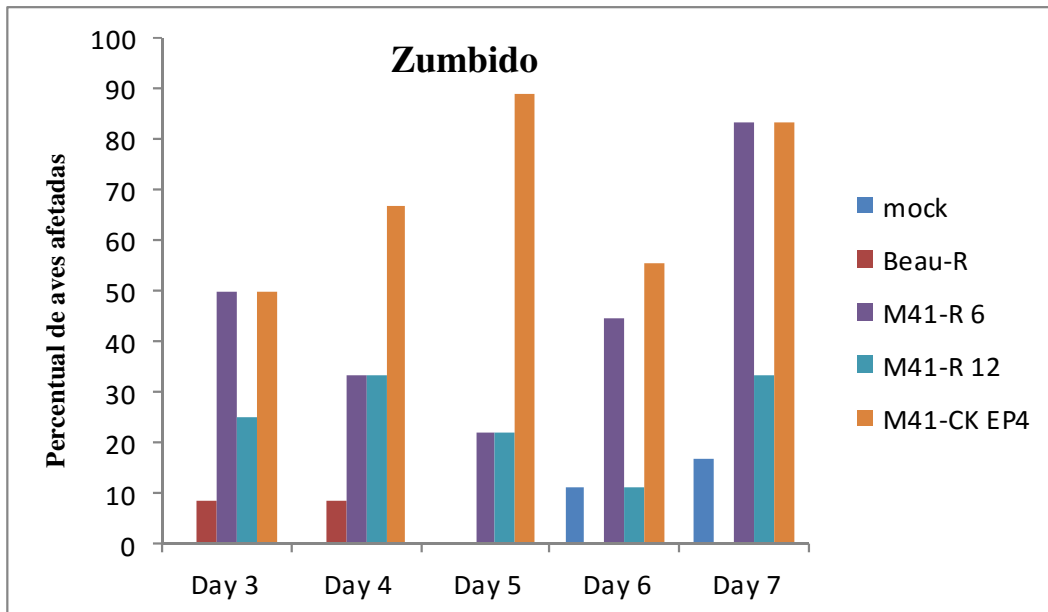
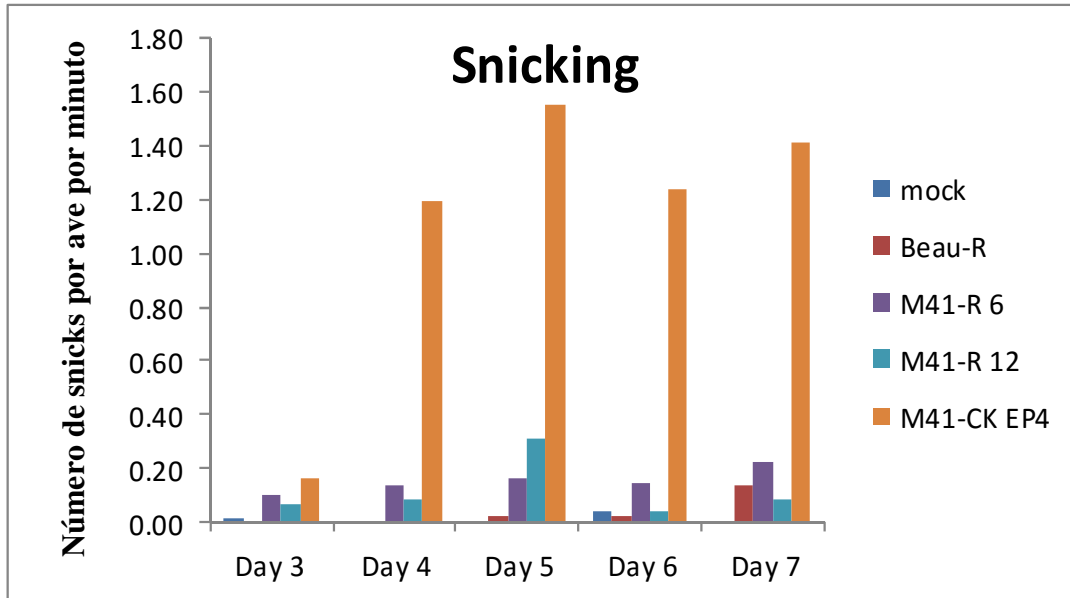


FIGURA 3

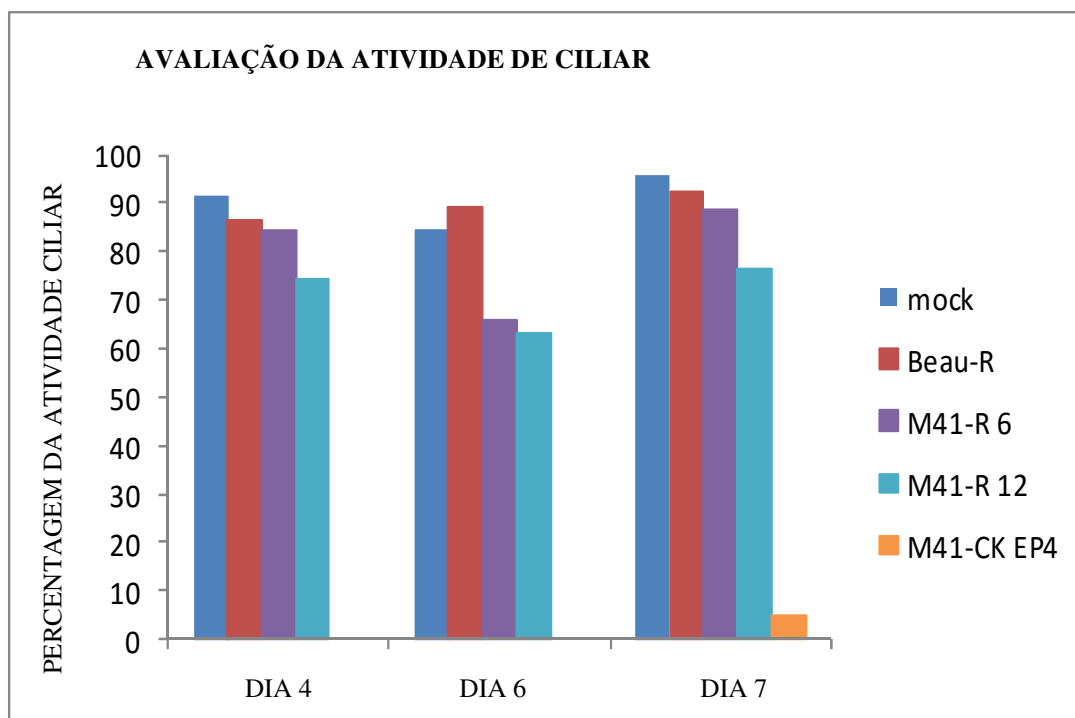


FIGURA 4

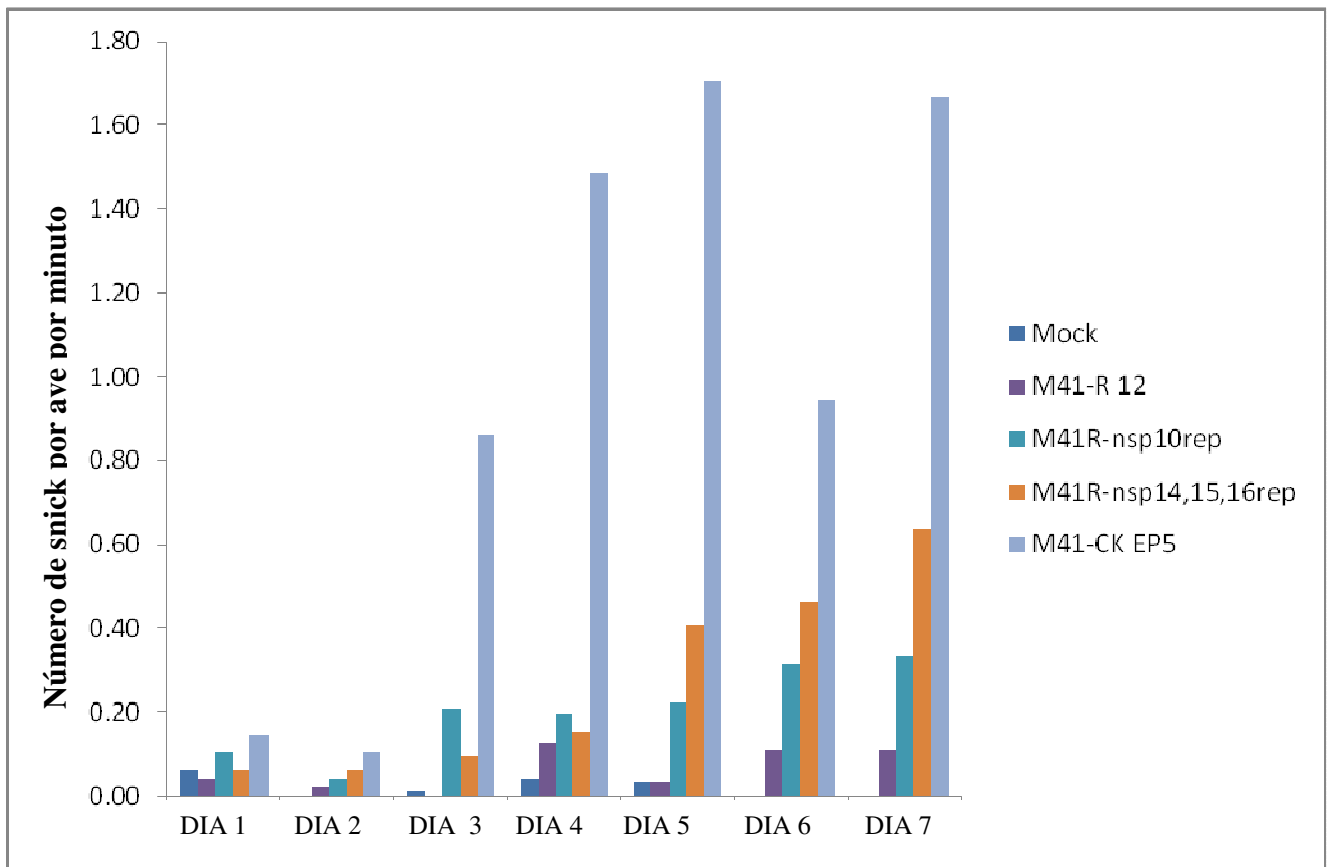


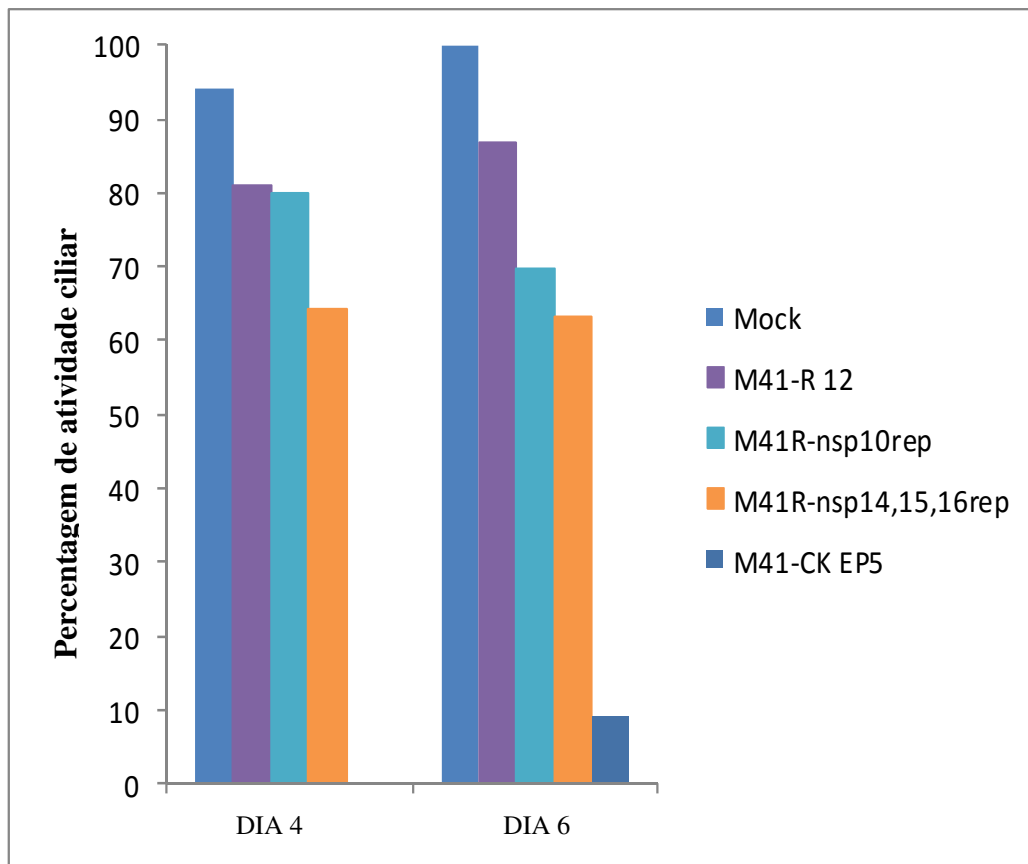
FIGURA 5

FIGURA 6

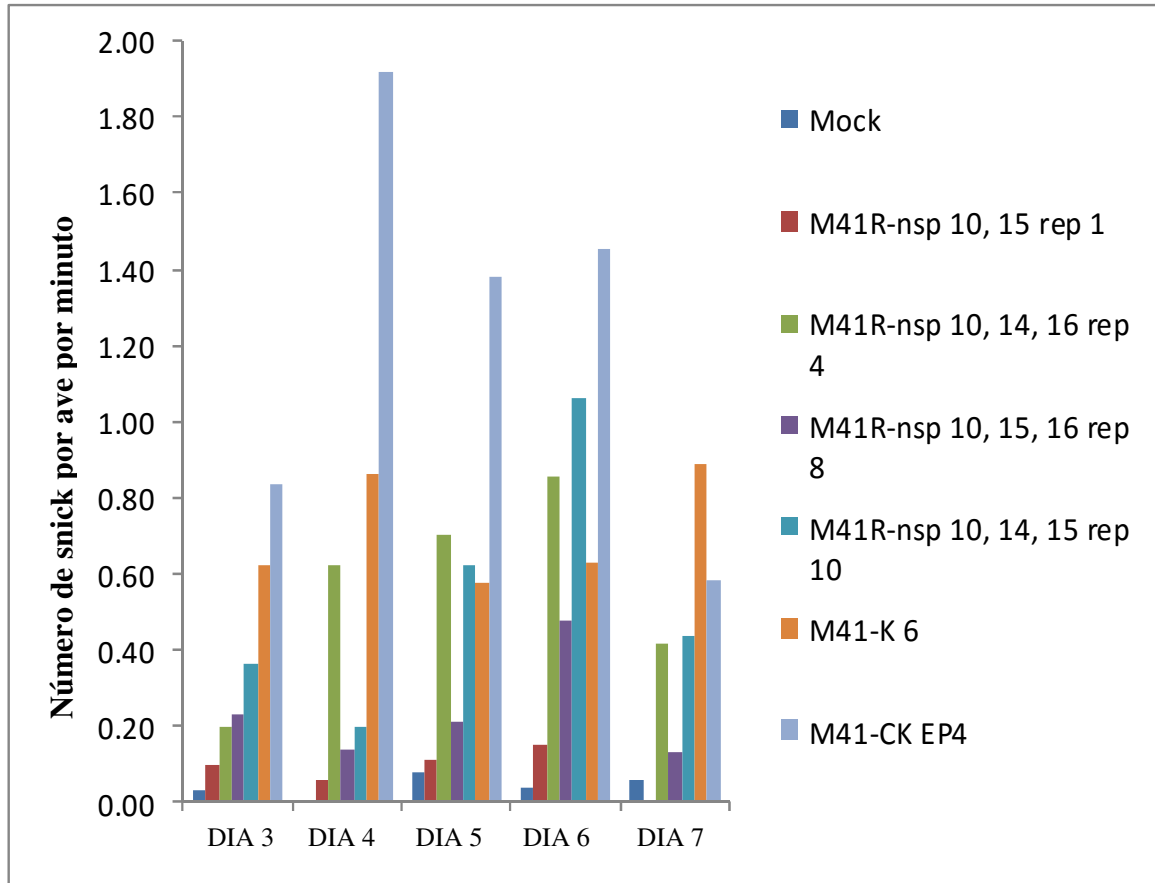


FIGURA 7

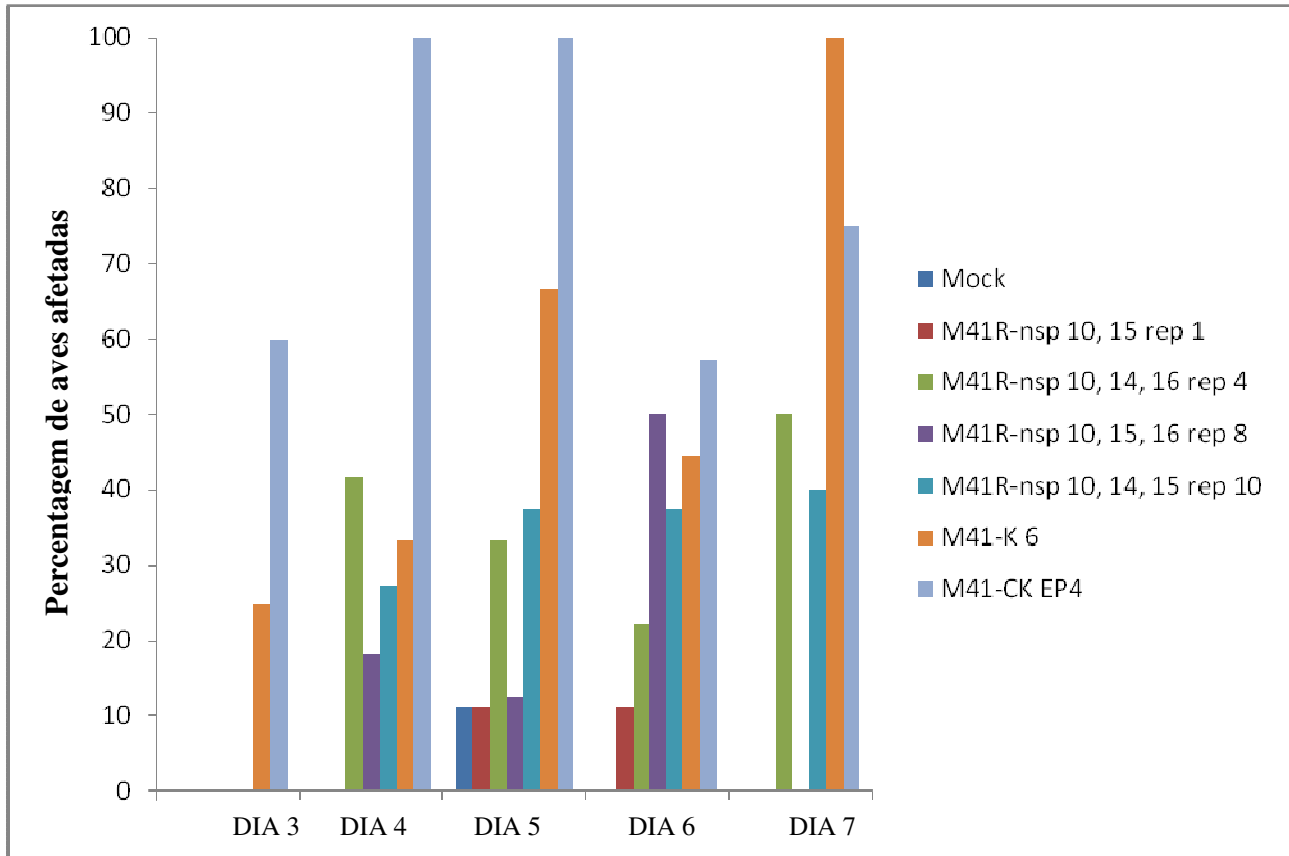


FIGURA 8

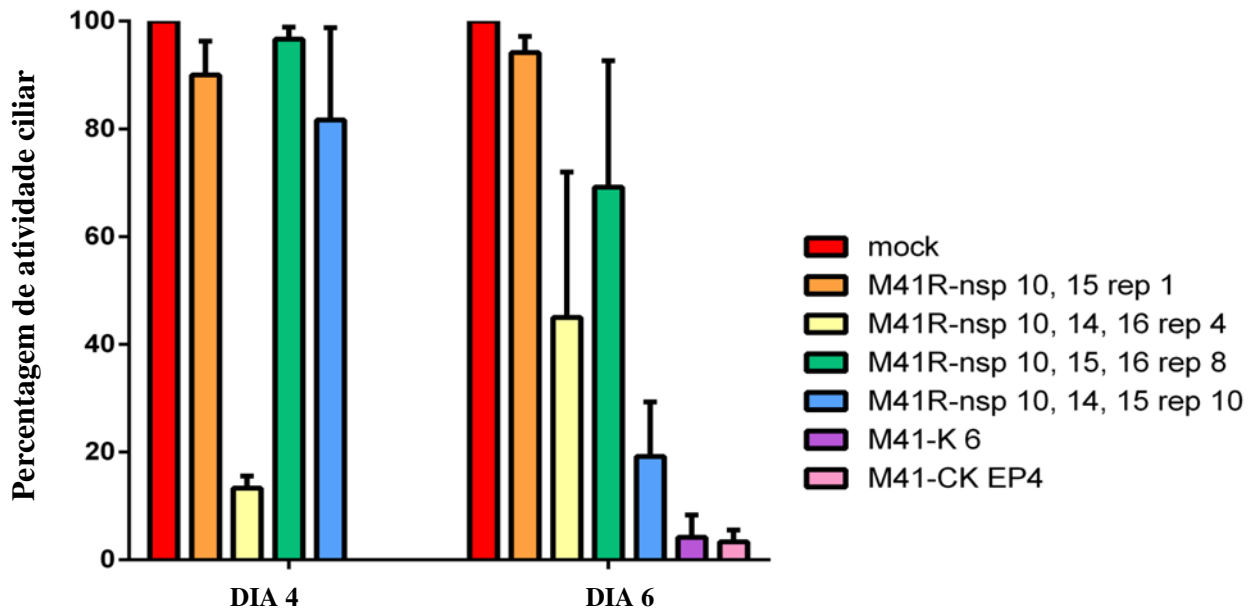
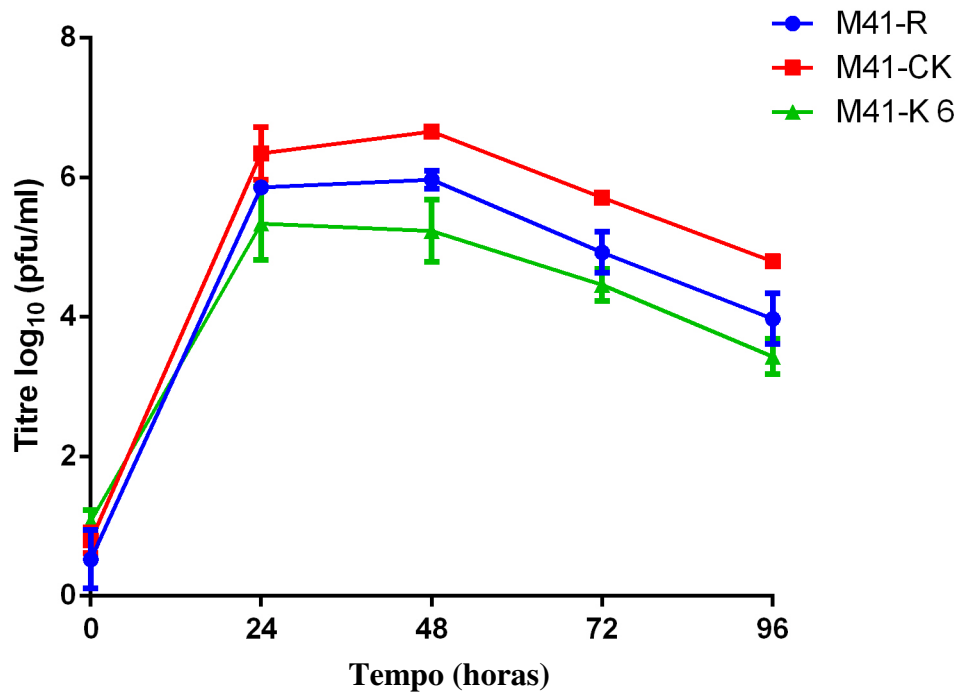


FIGURA 9

A



B

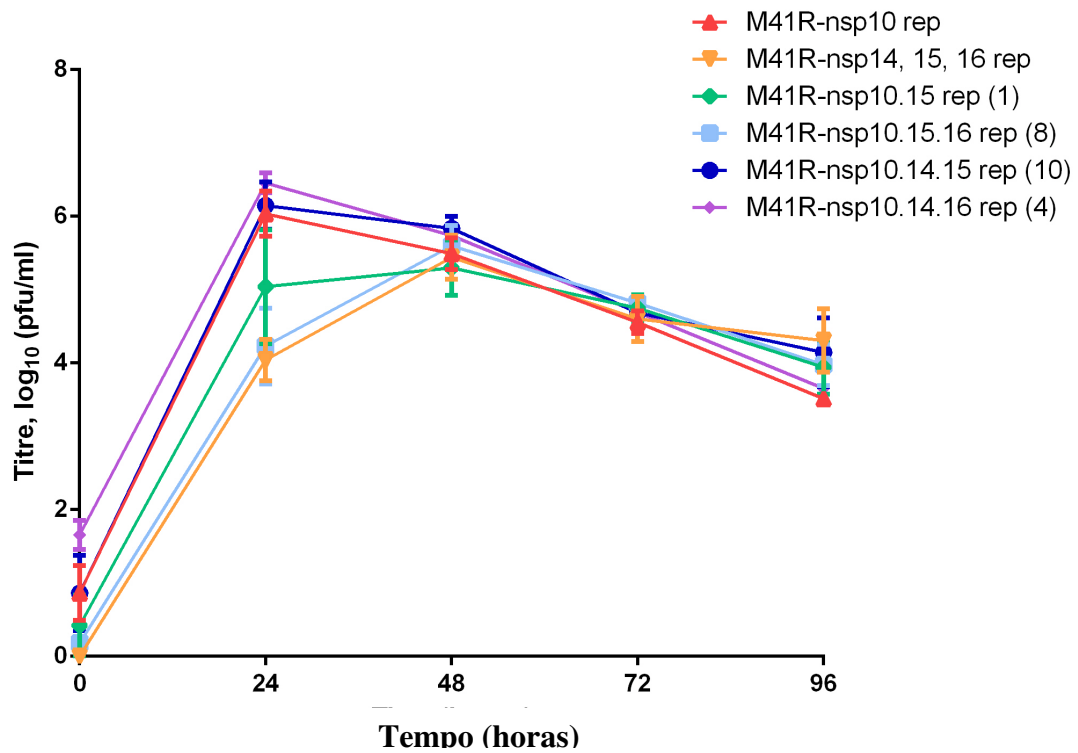


FIGURA 10

Nsp10

```

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

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

```

Nsp14

```

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

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

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

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

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

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

      *      500     *      520
M41 Nsp14: HAQMYADFVTSYNAAVTAGFTFWVINNFNPYNLWKSFSALQ
Mod Nsp14: HAQMYADFVTSYNAAVTAGFTFWVINNFNPYNLWKSFSALQ

```


Nsp15

```

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

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

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

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

      *
M41 Nsp15: FMTWTFEDGI IKTCYPQLQ
Mod Nsp15: FMTWTFEDGI IKTCYPQLQ

```

Nsp16

```

      *      20      *      40      *      60      *      80
M41 Nsp16: SAWTCGYNMPELYKVNQNCVMEPCNIPNYGVGIALPSGIMMNVAKYTLQCYLSKTTMCVPHNMRVMHFGAGSDKGVPAGS
Mod Nsp16: SAWTCGYNMPELYKVNQNCVMEPCNIPNYGVGIALPSGIMMNVAKYTLQCYLSKTTMCVPHNMRVMHFGAGSDKGVPAGS

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

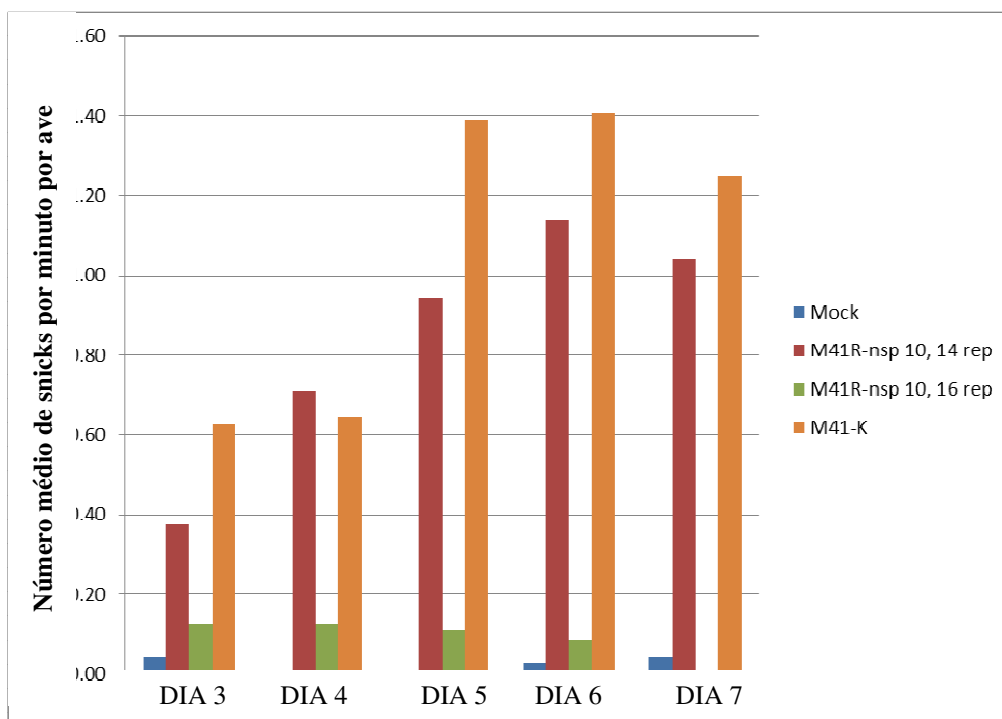
      *      180     *      200     *      220     *      240
M41 Nsp16: NNLALGGSFAVKVTETSWHEVLYDIAQDCAWWTMECTAVNASSSEAFIVGVNYLGASEKVKVSGKTLHANYIFWRNCNYL
Mod Nsp16: NNLALGGSFAVKVTETSWHEVLYDIAQDCAWWTMECTAVNASSSEAFIVGVNYLGASEKVKVSGKTLHANYIFWRNCNYL

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

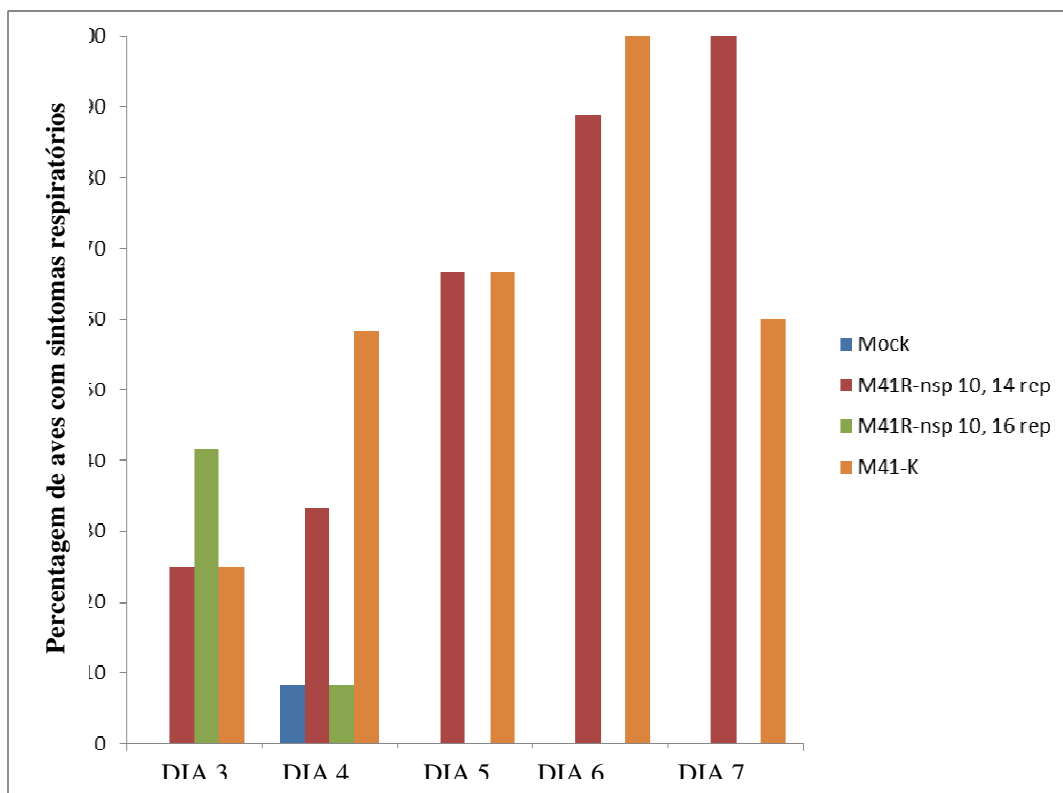
```

FIGURA 11

A)



B)



C)

