

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第5139280号
(P5139280)

(45) 発行日 平成25年2月6日 (2013.2.6)

(24) 登録日 平成24年11月22日 (2012.11.22)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 7/00 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C O 7 K 14/08 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 7/00

C 1 2 N 5/00 1 O 2

C O 7 K 14/08

請求項の数 16 (全 63 頁)

(21) 出願番号	特願2008-518399 (P2008-518399)	(73) 特許権者	305023366
(86) (22) 出願日	平成18年6月23日 (2006.6.23)		リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ
(65) 公表番号	特表2008-543342 (P2008-543342A)		オブ ミネソタ
(43) 公表日	平成20年12月4日 (2008.12.4)		アメリカ合衆国, ミネソタ州 5 5 1 1 4
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/024355		- 8 6 5 8, セント ポール, ウェストゲ
(87) 国際公開番号	W02007/002321		ート ドライブ 1 0 0 0, スイート 1
(87) 国際公開日	平成19年1月4日 (2007.1.4)		6 0
審査請求日	平成21年5月12日 (2009.5.12)	(74) 代理人	100099759
(31) 優先権主張番号	60/694, 021		弁理士 青木 篤
(32) 優先日	平成17年6月24日 (2005.6.24)	(74) 代理人	100077517
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PRRSウイルス、感染性クローン、その変異体及び使用法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 と少なくとも 8 8 % の同一性、及び配列番号 1 のヌクレオチド 2 0 6 2 ~ スクレオチド 3 8 6 4 に対応する少なくとも 5 7 個の連続したヌクレオチドの欠失を有する塩基配列を含む単離された感染性ウイルス粒子を産生するポリヌクレオチド。

【請求項 2】

前記ポリヌクレオチドが細胞に導入されると感染性ウイルス粒子を複製及び産生する、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3】

原核生物の宿主細胞において複製するベクター配列をさらに含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4】

配列番号 1 4 と少なくとも 8 8 % の同一性、及び配列番号 1 4 のヌクレオチド 2 0 6 1 ~ スクレオチド 3 5 4 5 に対応する少なくとも 5 7 個の連続したヌクレオチドの欠失を有する塩基配列を含む単離された感染性ウイルス粒子を産生するポリヌクレオチド。

【請求項 5】

前記ポリヌクレオチドが細胞に導入されると感染性ウイルス粒子を複製及び産生する、請求項 4 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】

原核生物の宿主細胞において複製するベクター配列をさらに含む、請求項 4 に記載のポ

10

20

リヌクレオチド。

【請求項 7】

請求項 1、2、4 又は 5 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 8】

前記ポリヌクレオチドが 2 以上の欠失を含み、各欠失が独立して少なくとも 57 個の連続したヌクレオチドである、請求項 1、2、3、4、5、又は 6 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 9】

請求項 1、2、4 又は 5 に記載のポリヌクレオチドを含むウイルス粒子。

【請求項 10】

前記ポリヌクレオチドが RNA ポリヌクレオチドである、請求項 1、2、4 又は 5 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 11】

請求項 1、2、3、4、5、又は 6 に記載のポリヌクレオチドを含む細胞。

【請求項 12】

RNA ポリメラーゼプロモーターがポリヌクレオチドに操作可能に連結される、請求項 1、2、3、4、5、又は 6 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 13】

前記ポリヌクレオチドが、欠失に存在する外因性ポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 1、2、3、4、5、又は 6 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 14】

前記外因性ポリヌクレオチドが検出可能なマーカーをコードする、請求項 13 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 15】

配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12 又は配列番号 13 の塩基配列を含む単離された感染性 ウイルス粒子を産生する ポリヌクレオチド。

【請求項 16】

配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12 又は配列番号 13 の塩基配列を含む感染性 ウイルス粒子を産生する ポリヌクレオチドによってコードされる n s p 2 ポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

継続出願データ

本出願は、参照により本明細書中に援用される、2005 年 6 月 24 日出願の米国仮特許出願第 60/694,021 号の利益を主張する。

【背景技術】

【0002】

背景

ブタ繁殖及び呼吸障害症候群ウイルス (PRRSV: porcine reproductive and respiratory syndrome virus) は、幼若ブタにおける呼吸器障害及び雌ブタにおける繁殖不全 (Benfield ら、J. Vet. Diagn. Invest., 4:127-133 (1992); Collins ら、J. Vet. Diagn. Invest., 4:117-126 (1992); Wensvoort ら、Vet. Q., 13:121-130 (1991)) によって特徴付けられる疾患の原因物質であり、現在、大部分の国における風土病である。この症候群は、第一に、1987 年、米国において「ミステリーブタ病」として認識され、1990 年、欧州において発見された。2 種の原型ウイルス菌株 (Lelystad 及び VR-2332) は、約 40% まで塩基配列が異なり、2 種の相違する遺伝子型を表す。これらは、ヨ

10

20

30

40

50

ーロッパ菌株（EU又はタイプ1、Lelystad; Meulenbergrら、Virology, 192:62-72 (1993)）及び北アメリカ菌株（NA又はタイプ2、VR-2332; Nelsenら、J. Virol., 73:270-80 (1999)）と呼ばれる（Fangら、Virus Res., 100:229-235 (2004); Mardassira、J. Gen. Virol., 75:681-5 (1994); Mengら、Arch. Virol., 140:745-55 (1995); Roppら、J. Virol., 78:3684-3703 (2004)）。この疾患はまた、ウォバシュ（Wabash）症候群、不思議なブタ疾患、ブタ繁殖及び呼吸障害症候群、ブタ伝染病、ブタ流行性墮胎及び呼吸器障害症候群、青色墮胎疾患、青色耳疾患、青色の墮胎（abortus blau）及びseuchenhafter spatabort der schwineとも呼ばれている。該疾患は、妊娠した雌ブタにおける繁殖不全、あらゆる年齢のブタにおける呼吸器問題によって特徴付けられる。

10

【0003】

PRRSVは、ニドビラルス（Nidovirales）目のアルテリビリダエ（Arteriviridae）科に属するエンベロープを持ったポジティブセンスRNAウイルスである（Cavanagh, Arch. Virol., 142:629:633 (1997)）。PRRSVゲノムは、15.1~15.5kbの長さで変化する（Meulenbergrら、Virology, 192:62-72 (1993); Nelsenら、J. Virol., 73:270-80 (1999)）。このゲノムの最初の75%は、ウイルス複製に本質的なレプリカーゼポリプロテインをコードし、実質的にコードされるプロテアーゼによってより小さなタンパク質に同時翻訳的に加工される2つの大きなオープン・リーディング・フレーム（ORF）（1a及び1b）で構成される（Snijerら、J. Gen. Virol., 79:961-79 (1998)）。構造タンパク質は、7個の下流ORFによってコードされ、3'共通末端の入れ子集合的なサブゲノムRNA（sgmRNA）から翻訳される（Meulenbergrら、Virology, 192:62-72 (1993); Pattnaikら、Cell, 69:1011-1020 (1992)）。VR-2332菌株では、ゲノム（15,411塩基）のコーディング領域は、それぞれ189及び151ヌクレオチドの5'及び3'非翻訳領域の側面に配置される。

20

【0004】

PRRSV菌株のVR-2332は、その完全なゲノム配列（Pattnaikら、Cell, 69:1011-1020 (1992)）、PRRSVのheteroclit es（ラテン語：異常形態）と呼ばれる欠失したサブゲノムRNA種を構成的に生産する能力（Yuanら、Virology, 275:158-169 (2000); Yuanら、Virus Research, 105:75-87 (2004)）、インビトロ及びインビボでのその増殖特性（Murtaughら、Vet. Immunol. Immunopathol., 102:105-349 (2004)）に関して十分に特徴付けられている。さらに、この15.4kb NA PRRSVゲノムの感染性クローンが生産され、ブタにおける疾患を引き起こす能力について調べられている（pVR-HN; Nelsenら、J. Virol., 77:3702-3711 (2003)）。

30

40

【0005】

PRRSVは、世界中で重大な経済的損失を引き起こし続けている。ワクチンは利用可能であるが、それらは、1つのPRRSV菌株に基づいており、PRRSV菌株は抗原レベル及びゲノムレベルで変化することが分かっている。

【発明の開示】

【0006】

従来報告は、PRRSウイルスのいずれかの菌株の欠失及び／又は突然変異は、多くの場合、ウイルス成長に非常に不都合であることが示唆されている。具体的には、個々の研究所は、ウイルスの3'末端において突然変異を行い、得られたウイルスは、不安定であり、野生型配列に直に戻ってしまい、あるいは成長が非常に悪いか又は全く成長しな

50

った (Leeら、Vitol., 331:47-82 (2005); Choiら、J. Virol., 80:723-736 (2006); Leeら、Virolog., 346:238-250 (2005))。したがって、ヨーロッパ (タイプ1 遺伝子型) 及び VR-2332 (タイプ2 遺伝子型) の塩基配列の比較において、あまり不都合ではなかった VR-2332 NSP2 で突然変異を行うことは知られていない。しかしながら、新規なタイプ2 の PRRS ウイルスと VR-2332 の全長のゲノム配列の整列によって、成長する変異体が作製できたという洞察を提供し始めた。更なる欠失突然変異生成は、nsp2 アミノ酸 324~813 との間の領域は、インビトロでの成長に関して必要ではないことを示した。

【0007】

本発明は、配列番号1と少なくとも88%の同一性を有する塩基配列、及び配列番号1のヌクレオチド2062~ヌクレオチド3864から選択される少なくとも39個の連続したヌクレオチドの欠失を有する単離された感染性ポリヌクレオチドを提供する。また、配列番号14と少なくとも88%の同一性を有する塩基配列、及び配列番号14のヌクレオチド2061~ヌクレオチド3545から選択される少なくとも39個の連続したヌクレオチドの欠失を有する単離された感染性ポリヌクレオチドが提供される。単離されたポリヌクレオチドは、ベクター、単離されたウイルス粒子、細胞、又はそれらの組合せに存在することができる。ベクターに存在する場合、RNAポリメラーゼプロモーターは、ポリヌクレオチドに操作可能に連結されてもよい。単離されたポリヌクレオチドは、RNAであってもよい。単離されたポリヌクレオチドは、2以上の欠失を含む、各欠失は、独立して、少なくとも37個の連続したヌクレオチドであってもよい。単離されたポリヌクレオチドは、さらに、欠失に存在する外因性のポリヌクレオチドを含むことができ、外因性のポリヌクレオチドは、検出可能なマーカーなどのポリペプチドをコードしてもよい。

【0008】

本発明はまた、配列番号1と少なくとも88%の同一性を有する塩基配列、及び配列番号1のヌクレオチド2062~ヌクレオチド3864から選択される少なくとも39個の連続したヌクレオチドの欠失を有する単離されたポリヌクレオチドを提供し、該ポリヌクレオチドは、細胞内に導入された場合に感染性ウイルス粒子を複製及び産生する。配列番号14と少なくとも88%の同一性を有する塩基配列、及び配列番号14のヌクレオチド2061~ヌクレオチド3545から選択される少なくとも39個の連続したヌクレオチドの欠失を有する単離されたポリヌクレオチドが提供され、該ポリヌクレオチドは、細胞内に導入された場合に感染性ウイルス粒子を複製及び産生する。単離されたポリヌクレオチドは、ベクター、単離されたウイルス粒子、細胞、又はそれらの組合せに存在することができる。ベクターに存在する場合、RNAポリメラーゼプロモーターは、ポリヌクレオチドに操作可能に連結されてもよい。単離されたポリヌクレオチドは、RNAであってもよい。単離されたポリヌクレオチドは、2以上の欠失を含む、各欠失は、独立して、少なくとも37個の連続したヌクレオチドであってもよい。単離されたポリヌクレオチドは、さらに、欠失に存在する外因性のポリヌクレオチドを含むことができ、外因性のポリヌクレオチドは、検出可能なマーカーなどのポリペプチドをコードしてもよい。

【0009】

本発明は、さらに、配列番号1と少なくとも88%の同一性、及び配列番号1のヌクレオチド2062~ヌクレオチド3864から選択される少なくとも39個の連続したヌクレオチドの少なくとも1つの欠失を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドを有する感染性クローンを提供する。また、配列番号14と少なくとも88%の同一性、及び配列番号1のヌクレオチド2061~ヌクレオチド3545から選択される少なくとも39個の連続したヌクレオチドの少なくとも1つの欠失を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドを有する感染性クローンが提供される。感染性クローンは、細胞に存在してもよい。RNAポリメラーゼプロモーターは、ポリヌクレオチドに操作可能に連結されてもよい。感染性クローンは、2以上の欠失を含んでもよく、各欠失は、独立して、少なくとも37個の連続したヌクレオチドである。単離されたポリヌクレオチドは、さらに、その欠失に存在す

る外因性のポリヌクレオチドを含むことができ、外因性のポリヌクレオチドは、検出可能なマーカーなどのポリペプチドをコードしてもよい。

【0010】

また、本発明によって、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、又は配列番号13の塩基配列を含む単離された感染性ポリヌクレオチド、及び、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、又は配列番号13の塩基配列を含む感染性ポリヌクレオチドによってコードされるnsp2ポリペプチドが提供される。

【0011】

本明細書及び特許請求の範囲に出現する用語「含む (comprise)」及びその変形体は、制限的な意味ではない。他に特定されなければ、「1つの (a)」、「1つの (an)」、「その (the)」、及び「少なくとも1つの」は、交換可能に使用され、1以上を意味する。

【0012】

実施態様の詳細な説明

本発明は、ブタ繁殖および呼吸器疾患症候群ウイルス (PRRSV) VR-2332の感染性クローンを含む。本明細書中で使用するとき、用語「感染性クローン」は、2つの構成要素；原核生物の宿主細胞において複製するベクター配列、本明細書中では感染性ポリヌクレオチドと呼ばれる第二のポリヌクレオチドを有するポリヌクレオチドである。インビトロで転写し、RNAポリヌクレオチドを得て、許容細胞に導入した場合、感染性ポリヌクレオチドは (RNAとして) 複製され、感染性ウイルス粒子を産生する。したがって、感染性ポリヌクレオチドは、DNAとして、ウイルス粒子中のRNAとして、又は単離されたDNA若しくはRNAとしてベクターに存在することができる。用語「ポリヌクレオチド」は、任意の長さのヌクレオチド、リボヌクレオチド又はデオキシヌクレオチドの多量体形態を指し、二重鎖及び一本鎖DNA及びRNAの両方を含む。他に注釈がなければ、ポリヌクレオチドは、その相補体を含む。ポリヌクレオチドの相補体の塩基配列は、当業者によって容易に決定することができる。ポリヌクレオチドは、種々の機能を有する塩基配列、例えば、コード配列、及び制御配列及び／又は非転写領域などの非コード配列を含むことができる。ポリヌクレオチドは、天然源から直接得ることができ、又は組換え、酵素的若しくは化学的技術の援助で調製することができる。ポリヌクレオチドは、トポロジーにおいて直鎖状又は環状であり得る。ポリヌクレオチドは、例えば、発現ベクター若しくはクローニングベクター、又は断片などのベクター部分であり得る。

【0013】

天然に存在していれば、ポリヌクレオチドは、好ましくは単離され、より好ましくは精製される。「単離された」化合物、例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、又はウイルス粒子は、天然環境から分離及び別々にされるものである。「精製された」化合物は、天然に関係付けられている他の化合物が少なくとも60%存在しない、好ましくは75%存在しない、最も好ましくは90%存在しないものである。例えば、化学的又は組換え手段を通じて、天然に存在している生物外に生産されるポリヌクレオチド及びポリペプチドなどの化合物は、それらが天然環境に決して存在しないため、本質的に単離され、精製されていると考えられる。

【0014】

本発明の感染性ポリヌクレオチドの一例では、感染性ポリヌクレオチドVR-V7 (配列番号1) が含まれる。VR-V7はまた本明細書中ではV6G7475Aと呼ばれる。本発明の感染性ポリヌクレオチドの他の例では、VR-V5 (配列番号2)、VR-V5G7475A (配列番号3)、及びVR-V6 (配列番号4) が含まれる。配列番号1、2、3、4、5、6及び他のウイルス分子配列はDNA配列として本明細書中に開示されているが、本発明は、対応するRNA配列、そのRNA及びDNA相補体も同様に意図していることを留意すべきである。

【0015】

本発明の他の感染性ポリヌクレオチドは、参照ポリヌクレオチドと構造的類似性を有するポリヌクレオチドを有する。参照ポリヌクレオチドは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、PRRSウイルスのヨーロッパプロトタイプ菌株、Leelystad (Genbank受入番号M96262; 配列番号14)、及びPRRSウイルスの北アメリカプロトタイプ菌株、VR-2332 (Genbank受入番号U87392; 配列番号15)を含む。類似性は「同一性パーセント」を指し、配列の長さに沿って同一のヌクレオチドの数を最適化するために2つのポリヌクレオチド（即ち、候補感染性ポリヌクレオチドの塩基配列及び参照ポリヌクレオチドの塩基配列）の残基を整列させることによって決定する；共通のヌクレオチドの数を最適化するために、これら配列のいずれか又はその両方におけるギャップは、その整列を作るのに許容されるが、各配列のヌクレオチドは、それでもなお適切な順番で残らなければならない。本発明のいくつかの側面では、ギャップ（欠失とも呼ばれる）は、候補感染性ポリヌクレオチド配列に存在する。候補感染性ポリヌクレオチドは、参照ポリヌクレオチドと比較されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドである。候補感染性ポリヌクレオチドは、PRRSVに感染したブタなどの動物から単離され、培養細胞株から単離され、又は組換え技術を用いて生成され、又は化学的若しくは酵素的に合成することができる。2つのヌクレオチド配列は、塩基配列の整列を生成するために日常的に用いられる市販のコンピュータアルゴリズムのいずれかを用いて比較することができる。好ましくは、2つの塩基配列は、GC Gウィスコンシンパッケージ (Accelrys, Inc.) バージョン10.3 (2001) のGAPプログラムを用いて比較される。GAPプログラムは、マッチ数を最大にし、ギャップ数を最小にする2つの完全な配列の整列を見出すためのNeedlemanら (J. Mol. Biol., 48:443-453 (1970)) のアルゴリズムを使用する。好ましくは、全てのGAPサーチパラメータのデフォルト値を使用し、得点マトリックス=NewsgapDNA.cmp、ギャップ重量=50、長さ重量=3、平均マッチ=10、平均ミスマッチ=0を含む。GAPサーチアルゴリズムを用いた2つのヌクレオチド配列の比較では、構造類似性は、「同一性パーセント」と呼ばれる。好ましくは、ポリヌクレオチドは、構造類似性がGAPプログラムを用いて測定した場合、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性の参照ポリヌクレオチドとの構造類似性を有する。

【0016】

ポリヌクレオチドが感染性ポリヌクレオチドであるかどうかは、ベクターに候補感染性ポリヌクレオチドを挿入し、インビトロで候補感染性ポリヌクレオチドを転写し、得られるRNA分子で許容細胞をトランスフェクトし、子孫ウイルスRNA、子孫ウイルスヌクレオカプシドタンパク質を検出し、感染性ウイルス粒子を検出すること、又はそれらの組合せによって測定することができる。ベクターは、好ましくは、低コピー数であること、大きな（例えば、15 kb）インサートの挿入後に安定のままであるという特徴を有する。適したベクターの例としては、pOK及びpOK12 (Genbank受入AF223639、Vieiraら、Gene, 100:189-194 (1991)) であり、これらの特徴を有する他のベクターは知られ、利用することができる。ベクターでは、候補感染性ポリヌクレオチドは、プロモーターのすぐ下流にある。有用なプロモーターは、T7 RNAポリメラーゼプロモーターなどの高レベルの転写を得るために導入することができるものであり、例えば、TAATACGACTCACA TTA (配列番号16)、又はRNAポリメラーゼプロモーターSP6及びT3である。候補感染性ポリヌクレオチドの転写は、典型的には、それを直鎖にするためにベクターの制限エンドヌクレアーゼ消化を含み、日常的であり周知なインビトロの転写法を用いてRNA転写物を生成させる。インビトロの転写のためのキットは、市販されている（例えば、mMessage mMachine、Ambion, Austin, TXから利用可能である）。

【0017】

インビトロ転写後、RNAは、日常的な方法を用いて精製し、次に、それを用いて許容細胞にトランスフェクトする。許容細胞の例には、例えば、BHK-21（1ラウンドのウイルス粒子産生を可能にする）、CL-2621、MA-104（ATCC CRL-2378）、MARC-145（Kimら、Arch. Virol., 133:477-483（1993））、これらの細胞株からクローニングした細胞株、又は初代ブタ肺胞マクロファージが含まれる。細胞を効率的にトランスフェクトする方法は、1, 2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド及びコレステロール（DMRIE-C）、及び他の市販されている生産物、好ましくはDMRIE-Cの使用を含む。初代ブタ肺胞マクロファージを効率的にトランスフェクトする方法は、当業者に知られている（Groot Bramel-Verheigeら、Virol., 278:380-389（2000））。一般的に、2~3 µgのRNAをトランスフェクションに用いることができるが、より少量及び多量を用いてもよい。適した期間後、子孫ウイルスRNAの存在は、例えば、逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）によって検出することができる。同様に、子孫ウイルスヌクレオカプシドタンパク質は、例えば、ヌクレオカプシド特異的抗体によって検出することができる。さらに、候補感染性ポリヌクレオチドでトランスフェクトした細胞によって産生されるウイルスが別の細胞を感染するかどうかは、感染した細胞からの上清に感染していない許容細胞を晒すことによって検出することができる。場合により、細胞変性効果（CPE）を観察してもよい。候補感染性ポリヌクレオチドは、それが子孫ウイルスRNA、子孫ウイルスタンパク質（ヌクレオカプシド、膜、GP5など）を産生し、他の許容細胞を感染する場合、感染性ポリヌクレオチドであると考えられる。

10

20

【0018】

本発明のいくつかの側面では、感染性ポリヌクレオチドは、ORF1によってコードされるポリプロテインに存在するいくつかの（12個であると予測される）ポリペプチドの1つである非構造タンパク質2（nsp2）をコードするヌクレオチドの検出を含む。PRRSウイルス、及びその感染性ポリヌクレオチドでは、nsp2の第一アミノ酸をコードするヌクレオチドは、VR-2332の383位のORF1アミノ酸グリシン後であると予測される、パパイン様プロテアーゼ1ベータの切断部位を同定することによって決定することができる。

30

【0019】

nsp2の最後のアミノ酸をコードするヌクレオチドの同定に関して、ORF1aをコードされるポリプロテインの正確なnsp2のC末端切断部位は、実験的に決定されておらず、したがって、コード領域の3'末端に対応するヌクレオチドは未知である。しかしながら、C末端切断部位の2つの予測が提案され、1つは、VR-2332のアミノ酸980のGly|Gly（2つのグリシン残基の間の縦線は開裂位置を指す）、及び、他はVR-2332のアミノ酸1197である。全ての利用可能なPRRSV配列の整列では、VR-2332のポリプロテインのnsp2 C末端開裂部位（アミノ酸646、980、1116、1196、1197）でもあり得るこのタンパク質内に、いくつかの完全に保存されたGly|Glyダブレットが存在する。他のウイルス及び感染性ポリヌクレオチドのGly|Glyダブレットの位置は、図12に開示されるnsp2の配列とGly|Glyダブレットの比較によって同定することができる。本研究は、アミノ酸980、1116、1196又は1197に対応するnsp2の少なくとも3つの切断部位が存在し得ることを示唆している。

40

【0020】

nsp2ポリペプチドは、N末端に存在する非常に保存されたキモトリプシン様システインプロテアーゼドメイン（図3ではCP、図9ではPL2として同定される）、及びnsp2のC末端近傍の3~4個の膜貫通ドメイン（膜貫通ドメインの数はC末端切断部位の位置に依存して変化する）を含む。典型的には、PL2ドメインのアミノ酸をコードするヌクレオチド又は予測される膜貫通ドメインの全ての欠失は、許容細胞において複製し

50

得るが、感染性ウイルス粒子を産生しないポリヌクレオチドをもたらす。したがって、本発明の感染性クローンは、典型的には、完全なPL2ドメイン又は予測される膜貫通ドメインの全ての欠失を含まない。

【0021】

キモトリプシン様システインプロテアーゼドメインをコードするヌクレオチドは、VR-V7（配列番号1）のヌクレオチド1474～1776、VR-2332（Genbank受入番号U87392）のヌクレオチド1474～1776、及びLelystad（Genbank受入れ番号M96262）のヌクレオチド1482～1784である。他のPRRSウイルスの塩基配列のキモトリプシン様システインプロテアーゼドメイン位置は、PRRSウイルスによってコードされるnsp2ポリペプチドのアミノ酸配列を図12に開示されるアミノ酸整列を並べ、キモトリプシン様システインプロテアーゼドメインと適合するアミノ酸を核酸がコードするかを決定することによって同定することができる。あるいは、他のPRRSウイルスのnsp2ポリペプチドのアミノ酸配列は、PRRSウイルスによってコードされるnsp2ポリペプチドのアミノ酸配列を、ウマ動脈炎ウイルス（EAV）及び乳酸脱水素酵素上昇ウイルス（LDV）などの他の動脈炎ウイルスによって産生されるnsp2ポリペプチドのアミノ酸配列と並べることによって同定することができる。

10

【0022】

VR-V7（配列番号1）、VR-2332（Genbank受入番号U87392）、及びLelystad（Genbank受入番号M96262）の予測される膜貫通ドメインをコードするヌクレオチドは表1に示される。

20

【0023】

【表1】

表1. 予測される膜貫通ドメインをコードするnsp2ヌクレオチド

	VR-V7	VR-2332	Lelystad
膜貫通ドメインI	881 to 901	881 to 901	761 to 781
膜貫通ドメインII	913 to 934	913 to 934	793 to 814
膜貫通ドメインIII	963 to 980	963 to 980	843 to 860
膜貫通ドメインIV	985 to 1003	985 to 1003	865 to 883

30

【0024】

他のPRRSウイルスのヌクレオチド配列における膜貫通ドメインの位置は、PRRSウイルスによってコードされるnsp2ポリペプチドのアミノ酸配列を図12に開示されるアミノ酸配列整列と並べ、膜貫通ドメインと適合するアミノ酸をヌクレオチドがコードするかを決定することによって同定することができる。あるいは、膜貫通ドメインの位置は、World Wide Webを通じて利用可能である、Rostら（Nucleic Acids Res., 32（Web Server issue）：W321-326（2004））によって記載されるPredict Proteinアルゴリズム、又はKroghら（J. Mol. Biol., 305：567-580（2001））によって記載されるTMHMMアルゴリズムなどのコンピュータプログラムを用いて同定することができる。

40

【0025】

本発明の感染性ポリヌクレオチドに存在する欠失は、典型的には、キモトリプシン様システインプロテアーゼドメインをコードするヌクレオチドと膜貫通ドメインをコードする核酸との間にあり、ORF1のリーディングフレームにおいてフレームシフトを起こさない。上記で検討されるように、欠失は、典型的には、キモトリプシン様システインプロテアーゼドメインをコードする全てのヌクレオチド、膜貫通ドメインをコードする全てのヌ

50

クレオチド、及びそれらの組合せを含まない。いくつかの側面では、例えば、感染性ポリヌクレオチドが配列番号1と構造類似性を有する場合、欠失の5'境界は、ヌクレオチド2305、ヌクレオチド2205、ヌクレオチド2105、又はヌクレオチド2062であり、欠失の3'境界は、ヌクレオチド3774、ヌクレオチド3804、ヌクレオチド3834、又はヌクレオチド3864である。他の側面では、例えば、感染性ポリヌクレオチドが配列番号14と構造類似性を有する場合、欠失の5'境界は、ヌクレオチド2304、ヌクレオチド2204、ヌクレオチド2104、又はヌクレオチド2061であり、欠失の3'境界は、ヌクレオチド3455、ヌクレオチド3495、ヌクレオチド3525、又はヌクレオチド3545である。この欠失は、少なくとも39個のヌクレオチド、48個のヌクレオチド、又は57個のヌクレオチドであり得る。いくつかの側面では、この欠失は、少なくとも267個のヌクレオチド、少なくとも276個のヌクレオチド、又は少なくとも285個のヌクレオチドであり得る。いくつかの側面では、この欠失は、489個未満のヌクレオチド、459個未満、429個未満、又は402個未満のヌクレオチドである。感染性ポリヌクレオチドは、nsp2領域に1を超える欠失を有してもよい。

VR-V7由来であり、欠失を含む感染性ポリヌクレオチドの実施例を表2に開示する。

【0026】

【表2】

表2. VR-V7 (配列番号1) 由来の感染性ポリヌクレオチド

ポリヌクレオチド*	配列番号1の削除したヌクレオチド	削除したORF1のアミノ酸	ウイルス力価 (PFU/ml)	表現型の概要**
Nsp2Δ180-323	1876-2304	563-705	-	生存不可
Nsp2Δ242-323	2056-2304	623-705	-	生存不可
Nsp2Δ324-434	2305-2637	706-816	+ (~10 ⁵)	小さな ブランクサイズ
Nsp2Δ324-523	2305-2904	706-905	+ (~10 ⁵ -10 ⁶)	中間
Nsp2Δ543-632	2962-3231	925-1014	+ (~10 ⁵)	小さな ブランクサイズ
Nsp2Δ633-726	3232-3513	1015-1108	+ (~10 ⁵)	小さな ブランクサイズ
Nsp2Δ543-726	2962-3513	925-1108	+ (~10 ⁵)	小さな ブランクサイズ
Nsp2Δ727-813	3514-3774	1109-1195	+ (~10 ⁵)	小さな ブランクサイズ
Nsp2Δ324-726	2305-3513	706-1108	+ (~10 ¹⁻²)	ND
Nsp2Δ324-813	2305-3774	706-1195	-	生存不可
Nsp2Δ727-845	3514-3870	1109-1227	-	生存不可
Nsp2Δ324-845	2305-3870	706-1227	-	生存不可

【0027】

* 欠失は、例えば、ウイルスNsp2デルタ180-323で削除されるnsp2のアミノ酸を意味し、nsp2のアミノ酸180-323が削除される。

** ブランクサイズは野生型VR-2332によって生成されるブランクと対比される。

【0028】

欠失を含む感染性ポリヌクレオチドは、欠失の位置に挿入される外因性ポリヌクレオチドを含むことができる。「外因性」ポリヌクレオチドは、外来のヌクレオチド配列、即ち、PRRSウイルス及びその感染性クローンに通常は存在しないヌクレオチド配列を意味

する。外因性ポリヌクレオチドは、ポリペプチドをコードすることができ、好ましくはコードしている。適切な外因性ポリヌクレオチドは、検出可能なマーカー、例えば、種々の方法によって容易に検出される分子をコードするものを含む。例としては、蛍光性ポリペプチド（例えば、緑色、黄色、青色又は赤色蛍光性タンパク質）、ルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、及び、蛍光、酵素活性又は免疫学的特徴によって検出可能な他の分子（例えば、c-myc、flag、6×his、HisGln（HQ）金属結合ペプチド、及びV5エピトープ）を含み、典型的には、細胞、例えば、培養細胞、動物から取り出した組織試料において検出される場合に有用である。用いることができる他の外因性ポリヌクレオチドは、細胞及び病原体などの他の実体によって発現されるポリペプチドをコードするものである。外因性ポリヌクレオチドの発現は、外来抗原を発現する感染性ポリヌクレオチドをもたらす。外因性ヌクレオチド配列の例としては、病原体、好ましくはブタ病原体、例えば、ブタサーコウイルス・タイプ2、マイコプラズマ・ヒオニューモニアエ（*Mycoplasma hyopneumoniae*）（例えば、M. ヒオニューモニアエのP46及びP65タンパク質）、ローソニア・イントラセルラリス（*Lawsonia intracellularis*）（例えば、L. イントラセルラリスの外膜タンパク質）、PRRSVの異なる菌株のORF5、及びストレプトコッカス・スイス（*Streptococcus suis*）（例えば、S. スイスの38kDaタンパク質）によって発現されるタンパク質をコードするものが含まれる。nsp2ポリペプチドは、B細胞エピトープを融資、免疫原生であることが期待される。外来エピトープのnsp2ポリペプチドへの封入は、外来エピトープの免疫応答をもたらすことが期待されている。外因性ポリヌクレオチドの追加の実施例は、例えば、IFN-α、IFN-γ、IL-12、IL-2、TNF-α、及びIL-6などの生物学的応答変更因子をコードするものを含む。

【0029】

外因性ポリヌクレオチドは、nsp1α及びnsp1βをコードしているオープン・リーディング・フレームを含むフレーム中にある欠失領域に挿入され、1を超える外因性ポリヌクレオチドは、タンデムに挿入され得て、例えば、3つのc-mycエピトープをコードする塩基配列が存在し得る。この欠失の位置に挿入される外因性ポリヌクレオチドを含む感染性ポリヌクレオチドの全サイズは、典型的には、（ポリAテールを含む）16,000塩基未満、15,800塩基未満、15,600塩基未満、15,400塩基未満、又は15,200塩基未満である。インサートは、Nsp2Δ324-434、Nsp2Δ324-523、Nsp2Δ543-632、Nsp2Δ633-726、Nsp2Δ543-726、Nsp2Δ727-813、又はNsp2Δ324-726欠失、好ましくは、Nsp2Δ324-434、Nsp2Δ543-632、Nsp2Δ633-726、Nsp2Δ543-726、Nsp2Δ727-813、又はNsp2Δ324-726欠失を有する感染性ポリヌクレオチドに存在し得る。欠失の位置に外因性ポリヌクレオチドを含む感染性クローンの好ましい例には、238個のアミノ酸の緑色蛍光タンパク質をコードするコード領域を含むNsp2Δ324-434欠失を有する感染性ポリヌクレオチド、238個のアミノ酸の緑色蛍光タンパク質をコードするコード領域を含むNsp2Δ543-632欠失を有する感染性ポリヌクレオチド、10個のアミノ酸のc-mycエピトープ（EQKLISEEDL、配列番号17）をコードするコード領域を含むNsp2Δ324-434欠失を有する感染性ポリヌクレオチド、10個のアミノ酸のc-mycエピトープをコードするコード領域を含むNsp2Δ324-434欠失を有する感染性ポリヌクレオチド、10個のアミノ酸のc-mycエピトープのタンデムリピートをコードするコード領域をそれぞれ含むNsp2Δ324-726又はNsp2Δ543-726欠失を有する感染性ポリヌクレオチドが含まれる。

【0030】

感染性ポリヌクレオチドは、典型的には、ベクターに存在し、感染性ポリヌクレオチド及びベクターの組合せは、感染性クローンと呼ばれ、逆遺伝学を通じて作製される。ベクターは、接合したポリヌクレオチドの複製をもたらすように別のポリヌクレオチドが接合

10

20

30

40

50

さえてもよいプラスミド、ファージ又はコスミドなどの複製ポリヌクレオチドである。本発明のポリヌクレオチドを含むベクターの構築は、当該技術分野において知られている標準的な組換えDNA技術を採用する（例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)を参照されたい）。さらにクローニング（ポリヌクレオチドの増幅）するためのベクター、即ちクローニングベクターが提供され、又はコード領域によってコードされるポリペプチドを発現させるためのベクター、即ち発現ベクターが提供され、あるいはそれらの組合せが提供される。用語「ベクター」は、限定されないが、プラスミドベクター、ウイルスベクター、コスミドベクター、又は人工染色ベクターを含む。典型的には、ベクターは、細菌宿主、例えば、大腸菌に複製することができる。好ましくは、ベクターはプラスミドである。

10

【0031】

ベクターの選択は、選択マーカー、ベクター複製速度などの得られる構築体における様々な所望の特徴に依存する。好ましくは、感染性クローンの一部として用いるのに適したベクターは、クローニングベクター及び発現ベクターの両方である。有用なベクターは、宿主細胞に低コピー数を有する。本明細書中でベクターをクローニング又は発現するために適切な宿主細胞は、原核細胞又は真核細胞である。好ましくは、宿主細胞は、最少量のタンパク質分解酵素を分泌する。適切な原核細胞は、真正細菌、例えば、グラム陰性生物、例えば、大腸菌又はS.チフムリウム(typhimurium)を含む。感染性クローンを作製し、操作し、維持するのに有用な例示的な宿主細胞は、DH-5 α 、DH-1(ATCC 33849)、及びAG-1、好ましくは、DH-1又はAG-1である。

20

【0032】

ベクターは、感染性ポリヌクレオチドに操作可能に連結した制御配列を含む。用語「操作可能に連結される」とは、成分の並列を意味し、それらは、意図された様式で機能するように許可された関係にある。制御配列は、コード配列の発現が制御配列と適合可能な条件下で達成されるような方法で接続されると、本発明の感染性ポリヌクレオチドに「操作可能に連結される」。典型的には、プロモーターは、RNAポリメラーゼの非常な特異的結合を提供するものであり、このようなプロモーターは、T7、SP6、及びT3を含む。典型的には、プロモーターは、感染性ポリヌクレオチドの第一のヌクレオチドのすぐ上流に位置される。好ましくは、GGTは、プロモーターと感染性ポリヌクレオチドの第一のヌクレオチドとの間に挿入される。場合により及び好ましくは、ベクターはまた、ポリA領域の下流の肝炎デルタウイルスリボザイムを含む。

30

【0033】

ベクターは、場合により及び好ましくは、典型的には、不活性化若しくは検出する、又は成長培地で化合物によって検出される分子をコードする1以上の選択マーカーを含む。例えば、選択マーカー配列の封入は、形質転換された細胞を抗生物質に耐性にさせ、又は形質転換した細胞における化合物の特異的な代謝を与えることができる。選択マーカー配列の例は、カナマイシン、アンピシリン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、及びネオマイシンに対する耐性を与える配列である。

【0034】

40

感染性クローンにおいてnsp2ポリペプチドをコードするヌクレオチドの欠失を生じさせる場合、当該技術分野において知られている標準的な組換えDNA技術を用いることができる（例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)を参照されたい）。当業者は認識するように、欠失又は他の変更などの期待されるヌクレオチド配列の存在及び他の突然変異の不存在を塩基配列分析によって検証することは、感染性クローンの構築中（及び、感染性クローンの構成欠失で場合には）の標準的な実施である。同様に、候補感染性ポリヌクレオチドは、感染性であるかどうかを決定するために試験される場合、野生型ウイルスの不在を塩基配列分析によって検証することが標準的な実施である。

50

【0035】

本発明はまた、配列番号5及び配列番号6に開示される単離された感染性ポリヌクレオチド、及び配列番号5又は配列番号6と構造類似性を有する感染性ポリヌクレオチドを含む。構造類似性を測定する方法は、本明細書中に記載される。好ましくは、本発明のこの側面の感染性ポリヌクレオチドは、配列番号5又は配列番号6と比較して、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の構造類似性を有する。配列番号5又は配列番号6と構造類似性を有するポリヌクレオチドは、ウイルス粒子に存在し、許容細胞に晒される場合、ポリプロピレンが許容細胞において複製され、感染性ウイルス粒子を生産するとすれば、感染性ポリヌクレオチドであると考えられる。

10

【0036】

本発明はまた、単離されたウイルス粒子を含む。本明細書中で使用するとき、用語「ウイルス粒子」及び「ウイルスの粒子」は、互換可能に用いられ、エンベロープによって囲まれた本発明のポリヌクレオチドを意味する。本発明のウイルス粒子は、許容培養細胞に添加される場合、複製され、より多くのウイルス粒子の産生をもたらすことができる。

【0037】

ウイルス粒子は、インビボ又は細胞培養における継代によって成長することができる。インビボでの継代は、ブタの接種を含む（Faabergrら、米国特許第7,041,443号）。細胞培養における継代は、培養細胞にウイルス粒子を晒し、ウイルスがより多くのウイルス粒子を複製及び産生するような安定な条件下で細胞をインキュベートすることを含む。好ましくは、培養細胞は、不死化又は形質転換した細胞株（即ち、細胞は無限に分裂できない）ではない。好ましくは、初代ブタ肺マクロファージは、細胞培養における継代に用いられる（Faabergrら、米国特許第7,041,443号）。

20

【0038】

本発明のウイルスは、不活性であり得て、即ちインビボ及び／又は細胞培養において再生できないようにさせる。不活性の方法は、当業者に知られ、例えば、本発明のウイルス粒子をホルマリン、アセトアルデヒドなどを含むアルデヒド試薬；クレゾール、フェノールなどの反応性酸性アルコール；安息香酸、ベンゼンスルホン酸などの酸；ペータープロピオラクトン及びカプロラクトンなどのラクトン；活性化ラクタム、カルボジイミド及びカルボニルジヘテロ芳香族化合物、例えば、カルボニルジイミダゾールなどの標準的な化学的不活性化剤で処理することを含む。紫外線照射及びγ線照射などの照射はまた、ウイルスを不活化させるために用いることができる。

30

【0039】

弱毒化ウイルス粒子（即ち、ブタにおけるミステリーブタ病の症状を引き起こす能力が減少したウイルス）、及び弱毒化ウイルス粒子を作製する方法もまた本発明において提供される。弱毒化ウイルスを製造する方法は、当業者に知られている。典型的には、本発明のウイルスは、継代され、即ち、使用して、培養中の細胞を感染させ、再生させ、次に回収する。このプロセスは、ブタにおけるウイルスの毒性（virulence）が減少するまで繰り返される。例えば、ウイルスは、細胞培養において10回継代され、ウイルスの毒性を測定する。毒性が減少しなかった場合、動物に注射しなかったウイルスは、細胞培養にさらに10回継代する。このプロセスは、毒性が減少するまで繰り返される。一般的に、毒性は、ウイルスをブタに接種し、臨床的症状の存在及び／又はLD₅₀を評価することによって測定される（例えば、Halburら、J. Vet. Diagn. Invest., 8:11-20（1996）、Halburら、Vet. Pathol., 32:200-204（1995）、及びParkら、Am. J. Vet. Res., 57:320-323（1996）を参照されたい）。好ましくは、毒性は、弱毒化されたウイルスが動物の死を引き起こさず、好ましくは疾患の臨床的症状を引き起こさない程度に減少される。

40

【0040】

50

典型的には、本発明の弱毒化ウイルスを生成するのに有用な細胞培養は、ブタ以外の哺乳動物起源の細胞を含む。ブタ以外の哺乳動物細胞培養の例としては、例えば、細胞株MA-104 (ATCC CRL-2378)、細胞株MARC-145 (Kimら、Arch. Virol., 133: 477-483 (1993))、及び細胞株CL-2621 (Baustitaら、J. Vet. Diagn. Invest., 5: 163-165 (1993))を含む。好ましくは、混合した細胞培養は、本発明の弱毒化ウイルス粒子を生成するために用いられる。混合した細胞培養において、少なくとも2種の細胞が存在する。好ましくは、混合した細胞培養は、不死化又は形質転換した細胞株及び初代細胞培養を含む。混合した細胞培養は、不死化又は形質転換した細胞株においてウイルスがゆっくり再生し、あるいは全く再生しない場合に特に有用である。混合細胞培養における使用のための不死化又は形質転換した細胞株の好ましい例としては、例えば、細胞株MARC-145 (Kimら、Arch. Virol., 133: 477-483 (1993))、及び細胞株MA-104 (ATCC CRL-2378)が挙げられる。好ましくは、混合した細胞培養における使用のための初代細胞培養の好ましい例としては、初代ブタ肺胞マクロファージが挙げられる。

10

【0041】

本発明は、実行可能であるものを含む、表2に開示されるポリヌクレオチドに存在するnsp2コード領域によってコードされるポリペプチドをさらに含む。表2に開示されるポリヌクレオチドに存在するnsp2コードによってコードされるポリペプチドに特異的に結合するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を含む抗体はまた、本発明に含まれる。用語「抗体」は、それとは反対に特定されていなければ、標的抗原に対して結合特異性を保持している全抗体の断片を含む。このような断片は、Fv、F(ab')及びF(ab')₂、並びに一本鎖抗体(scFv)を含む。本明細書中で使用するとき、ポリペプチドに「特異的に結合する」ことができる抗体は、抗体の合成を誘導する抗原のエピトープだけと相互作用し、又は構造的に関連したエピトープと相互作用する抗体である。エピトープに「特異的に結合する」抗体は、適切な条件下で、潜在的な結合標的の多様性の存在下でさえそのエピトープと相互作用する。本明細書中で使用するとき、用語「ポリペプチド：抗体複合体」とは、抗体が、ポリペプチド、又はそのサブユニット若しくは類似体に特異的に結合する場合に生じる複合体を意味する。いくつかの態様では、本発明の抗体は、VR-2332 (Genbank受入番号U87392、ORF1アミノ酸384-1363 (Allendeら、J. Gen. Virol., 80: 307-315 (1999))を併せて参照されたい)又はORF1アミノ酸384-1580 (同様に、Ziebuhrら、J. Gen. Virol., 81: 853-879 (2000))を併せて参照されたい)によってコードされる全長nsp2ポリペプチドに特異的に結合しないものを含む。このような抗体は、当該技術分野において知られる日常的な方法を用いて同定することができる。

20

30

【0042】

本発明の抗体は、無傷のポリペプチドを用いて調製することができる。場合により、本明細書中に記載されるnsp2ポリペプチドは、ポリペプチドの免疫学的な特性を改善するための担体ポリペプチドに共有結合又はコンジュゲートすることができる。有用な担体ポリペプチドは、当該技術分野において知られている。

40

【0043】

ポリクローナル抗体の調製は周知である。ポリクローナル抗体は、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、トリ、ウサギ、マウス、ハムスター、モルモット及びラットなどの種々の温血動物、並びにトランスジェニックヒツジ、ウシ、ヤギ又はブタなどのトランスジェニック動物を免疫原で免疫することによって得ることができる。得られる抗体は、プロテインAなどのFc結合部分を有するアフィニティーカラムを用いることによって他のタンパク質から分離することができる。

【0044】

モノクローナル抗体は、当業者に馴染みの有る様々な技術によって得ることができる。

50

簡単には、所望の抗原で免疫した動物由来の脾臓細胞は、通常、ミエローマ細胞と融合させて不死化される（例えば、A Laboratory Manual, Harlowら、Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York (1998)を参照されたい）。モノクローナル抗体は、当該技術分野において周知な技術によって、ハイブリドーマ培養物から単離及び精製することができる。

【0045】

いくつかの態様では、抗体は、例えば、ファージディスプレイによって、又はコンビナトリアル法によって組換え的に生成することができる。ファージディスプレイ及びコンビナトリアル法は、本明細書に記載されるポリペプチド、又は生物学的に活性なそのサブユニット又は類似体に結合する組換え抗体を分離するために用いることができる（例えば、Ladnerら、米国特許第5,223,409号を参照されたい）。このような方法は、ヒトモノクローナル抗体を生じさせるために用いることができる。

10

【0046】

本発明はまた、感染性ポリヌクレオチド、PRRSポリヌクレオチド、ウイルス粒子、又は本発明の抗体を含む組成物を提供する。このような組成物は、典型的には、医薬として許容される担体を含む。本明細書中で使用するとき、「医薬として許容される担体」には、医薬製剤と適合可能な生理食塩水、溶媒、分散媒体、コーティング剤、抗生剤及び抗真菌剤、等浸透圧及び吸収遅延剤などが含まれる。付加的な活性化合物はまた、組成物に導入することができる。

20

【0047】

組成物は、製薬の技術分野において周知な方法によって調製されてもよい。一般的には、組成物は、意図された投与経路と適合するように調合され得る。投与経路の例には、灌流及び非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口（例えば、吸入）、経皮的（局所的）、及び経粘膜的な投与が含まれる。溶液及び懸濁液は、下記の成分：投与用水、生理食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール又は他の合成溶媒などの無菌希釈剤；ベンジルアルコール又はメチルパラベンなどの抗生物質；アスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミンテトラ酢酸などのキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩又はリン酸塩などの緩衝剤；ナトリウムイオン、塩化物イオン、カリウムイオン、カルシウムイオン、及びマグネシウムイオンなどの電解質；及び塩化ナトリウム又はデキストロースなどの等張性を調整するための薬剤を含むことができる。pHは、塩酸又は水酸化ナトリウムなどの酸又は塩基を用いて調整することができる。組成物は、アンプル、使い捨てシリンジ又はガラス製若しくはプラスチック製の複数回投与用バイアルに封入することができる。

30

【0048】

組成物は、無菌水溶液（水溶性である場合）又は分散液、及び無菌溶液又は分散液の即座の調整のための無菌的な粉末を含むことができる。静脈内投与に関しては、適切な担体は、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（商標）（BASF、Parsippany, N. J.）又はリン酸緩衝食塩水（PBS）を含む。組成物は、典型的には、注射可能な使用に適している場合、容易なシリンジ注入可能性が存在する程度まで流動的でなければならない。製造及び貯蔵の条件下で安定であり、細菌及び真菌などの微生物の汚染作用に対して保存されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど）、及びそれらの適した混合物を含む溶媒又は分散媒体であり得る。微生物の作用の防止は、種々の抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって達成することができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖類、ポリアルコール、例えば、マンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムを組成物中に含むことが好ましい。注入可能な組成物の長期吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを組成物に含めることによってもたらすことが可能である。

40

50

【0049】

無菌溶液は、上記で列挙した成分の1つ又は組合せを含む適した溶媒に必要量で活性化化合物（即ち、本発明の感染性ポリヌクレオチド又はPRRSウイルス）を導入することによって、必要に応じて、ろ過滅菌することによって調製することができる。一般的には、分散剤は、塩基性分散媒体及び上記で列挙した成分から必要な他の成分を含む無菌ベヒクルに活性化化合物を導入することによって調製される。無菌の注入液の調製のための無菌粉末の場合には、調製の好ましい方法は、活性成分、及び予め滅菌ろ過したその溶液から任意の所望の成分の粉末を得る真空乾燥及び凍結乾燥である。

【0050】

経口組成物は、一般的には、不活性希釈剤又は食用担体を含む。経口的治療投与の目的のために、活性成分は、賦形剤を組み込み、錠剤、トローチ、又はカプセル、例えば、ゼラチンカプセルの形態で用いることができる。これらの組成物はまた、粉剤に形成させ、又は無菌溶液に懸濁してもよく、その結果、これらの粉剤及び／又は溶液は、動物用食餌又は動物の飲料水に添加することができる。これらの組成物は、ブタに経口的にワクチン摂取を促進するための種々の既知の薬物によって適切に甘くし又は風味付けることができる。

【0051】

活性化化合物はまた、ポリヌクレオチド剤の投与に適した任意の方法、例えば、遺伝子銃、バイオインジェクター、及びパッチ、並びに無針注射法、例えば、Johnstonら（米国特許第6,194,389号）によって開示されるマイクロ粒子DNAワクチン技術によって投与することができる。さらに、鼻腔内輸送は、例えば、Hamajimaら、Clin. Immunol. Immunopathol., 88:205-210 (1998)に記載されるように可能である。リポソーム及びマイクロカプセル化もまた使用可能である。

【0052】

活性化化合物は、制御放出製剤などの体内から迅速な排出に対する化合物を保護するであろう担体と共に調製されてもよい。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸などの生分解性、生体適合性ポリマーを使用することができる。このような調合物は、標準的な技術を用いて調製することができる。この材料はまた、例えば、Alza Corporation及びNova Pharmaceuticalsから市販され入手可能である。リポゾーム懸濁液はまた、医薬として許容される担体として使用することもできる。これらは、当業者に知られている方法に従って調製することができる。

【0053】

このような活性化化合物の毒性及び治療有効性は、例えば、LD₅₀（個体群の50%までの致死投薬量）及びED₅₀（個体群の50%における治療的に有効な投薬量）を決定するために、細胞培養又は実験動物において標準的な医薬的手法によって測定することができる。毒性効果と治療効果との間の投薬量の比は治療指数であり、LD₅₀/ED₅₀比として表現することができる。高い治療指標を提示する化合物が好ましい。

【0054】

細胞培養アッセイ及び動物試験から得られるデータは、この分野における使用のための投薬量範囲を調製するために用いられる。このような化合物の投薬量は、好ましくは、毒性たぼんどないか又は毒性がないED₅₀を含む血中濃度範囲内にある。投薬量は、採用される剤形及び使用される投薬経路に依存して、この範囲内で変化することができる。

【0055】

組成物は、1日1回以上～1日おきに1回を含む1週間当たり1回以上で投与することができる。当業者は、ある種の因子は、限定されないが、疾患又は障害の重症度、前回の値治療、患者の一般的な健康及び／又は年齢、及び他の既存の疾患を含む、患者を効果的に治療するのに必要な投薬量及び時間に影響を与えるかもしれないことを理解するであろう。さらに、有効量のポリペプチドでの患者の治療は、1回治療を含むことができ、又は、

10

20

30

40

50

好ましくは、一連の治療を含むことができる。

【0056】

本発明は、本明細書中に記載される組成物を用いる方法を含む。一側面では、本発明は、PRRSウイルスによる感染によって引き起こされ得る動物におけるミステリーブタ病の1以上の症候を治療する方法を含む。この方法は、ミステリーブタ病、又はミステリーブタ病の症候を有するか又はその危険性のある動物に有効量の本発明の組成物を投与することを含む。

【0057】

ミステリーブタ病、又はミステリーブタ病の症候の処置は、予防的であり得て、又は、代替的に、その疾患又は症候の後から開始することができる。本明細書中で使用するとき、用語「症候」は、ミステリーブタ病の対象に物的証拠を意味する。ミステリーブタ病と関連した症候、及びこのような症候の評価は、技術分野において日常的であり、知られている。症候の例には、墮胎、発熱、昏睡、肺炎、耳の赤／青変色、強制呼吸（呼吸不全）、及び呼吸数の増加（頻呼吸）が挙げられる。予防的、例えば、PRRSウイルスによって引き起こされる状態の対象の顕性症状の前に開始される処置は、本明細書中では、その疾患又は症候を発症する「危険性」のある対象の処置を意味する。典型的には、「危険な状態にある」動物は、その疾患または症候を有する動物が、PRRSウイルスに晒されていると診断された及び／又はその可能性がある領域にいる動物である。したがって、組成物の投与は、本明細書に記載される状態の出現の前、出現中、出現後に実行することができる。状態の発生後に開始した治療は、状態の1つの症候の重症度の減少、又は症候の完全な除去をもたらすかもしれない。

【0058】

いくつかの側面では、この方法は、典型的には、有効量の本発明のウイルス粒子を含む組成物を動物に投与することを含む。「有効量」とは、ミステリーブタ疾患の症候の発現を妨げ、疾患の症候の重症度を減少させ、及び／又は完全に症候を取り除くために有効な量である。典型的には、有効量は、PRRSウイルスにさらに晒されている最中に動物を保護する体液性及び／又は細胞性免疫応答をもたらす量である。組成物に使用されるウイルス粒子は、本明細書中に記載される欠失を有する感染性ポリヌクレオチドを含むことができる。場合により、感染性ポリヌクレオチドはまた、欠失位置にある外因性ポリプロピレンヌクレオチドを含む。欠失を有するウイルス粒子（又は欠失の位置に存在する外因性ポリヌクレオチド）を用いる利点は、それが、その領域に存在する野生型PRRSウイルスを含む他のPRRSから容易に区別できることである。ウイルス粒子は、動物からウイルスの分離、その後、例えば、配列決定、制限酵素消化、又はPCRを基礎とした特定のヌクレオチドのゾウフルによって同定することができる。このような「マークされた」ウイルス粒子は、多くの場合、当該技術分野において、マーカーワクチンを意味する。

【0059】

本発明の他の側面では、本明細書中に記載される感染性クローン及び／又は感染性ポリヌクレオチドは、可変遺伝子挿入を調査し、全長のウイルスというよりはむしろ二者択一的に発現RAN又はタンパク質のいずれかを調査し、ウイルス組換えを調査し、及び一部切断のnsp2と比べた全長nsp2の免疫原性を調査するために用いることができる。

【実施例】

【0060】

実施例1

北アメリカブタ繁殖及び呼吸障害症候群ウイルス（PRRSV）プロトタイプVR-2332を開発し、各進歩的バージョンは、wt株のVR-2332と比較した場合、従来バージョンよりも少ないヌクレオチド変化を有する。各感染性クローンの子孫ウイルスを回収し、ヌクレオチド配列の確認、インビトロでの増殖率、及びプラークサイズについて分析した。1つの感染性クローンからの子孫は、強固なインビボ複製を確実にし、wtウイルスと比べてα-PRRSV抗体の出現によって見られた。インビボの子孫のノーザンブロット分析はまた、異常形態（heteroclitcs）（稀な形態）と呼ばれる不

完全なサブゲノムRNA種は、全長ゲノムと共に存在していることを明らかにした。継代の感染したMA-104細胞の一致したノーザンブロット分析は、組換えウイルスだけが、インビボ感染に見られるRNA種と類似した全長及び異常なRNAの両方を徐々に得られることを示した。

【0061】

材料及び方法

細胞及びウイルス菌株。MA-104細胞又はその子孫のMARC-145細胞(ATCC CRL-11171)、PRRSV複製を支持するアフリカミドリザル腎臓上皮細胞(Mengら、J. Vet. Diagn. Invest., 8:374-81(1996))は、1mg/ml NaHCO₃、及び10%ウシ胎児血清(FBS)を補足したイーグル最小エッセンシャル培地(EMEM)(JPH Biosciences 56416)中で、5%CO₂下、37℃で維持した。培養細胞は、RNAを用いてトランスフェクトし、又は単相増殖により70~80%コンフルエントに到達した場合に、ウイルスで感染させた。PRRSVの北アメリカプロトタイプ菌株VR-2332及びIngevacc(登録商標)MLVは、前述した(Yuanら、Virus Res., 79:189-200(2001))。菌株VR-2332は、両細胞株で均等なタイターになるまで増殖させる。

【0062】

ウイルスRNA精製。ウイルスRNA(vRNA)は、記載されるように精製した(Chenら、J. Gen. Virol., 75:925-930(1994);Yuanら、Virus Res., 79:189-200(2001))。簡単には、VR-2332で感染させたMARC-145細胞からの上清は、感染の4日後(p.i.)に回収した。12,000rpmでの遠心分離による細胞残屑の除去後、その上清を2mlの0.5Mスクロスクッション上に播種し、76,000×gで4時間遠心分離した。ペレットにしたピリオンh、0.5ml LES(0.1M LiCl/5mM EDTA/1.0% SDS)に再懸濁させ、さらに、100µgのプロテイナーゼKの添加によって、56℃で消化し、全てのタンパク質を除去した。インキュベーションの10分後、vRNAは、酸性フェノール及びフェノール/クロロホルムを用いて数回抽出し、次に、70%v/vエタノールで沈殿させた。ペレット化したvRNAは、即座に、50µl H₂O又はRNase不含TEバッファー(10mM Tris-HCl、1mM EDTA、pH8.0)に再懸濁し、-80℃で保存した。

【0063】

全長ウイルスcDNAの構築。cDNA合成は、Enhanced Avian HS RT-PCRキット(Sigma, HSRT-100)を用いて行った。8個のPCRプライマー(表3)は、完全なVR-2332ゲノムを変換する4個の重複するcDNA断片を増幅するために使用した(図2)。サイクル条件は、94℃、2分、次に、94℃15秒、68℃4~5秒を35サイクル、次に68℃5分であった。各PCR断片は、QIAEX II Gel Extraction Kit(Qiagen)を用いて精製し、TOPO TA Cloning(登録商標)Kit(Invitrogen K450001)を用いてpCR(登録商標)2.1-TOPO(登録商標)にクローニングした。各断片を示すプラスミドは、ヌクレオチド配列分析した。親のVR-2332配列(GenBank寄託番号U87392)と比較して最小のヌクレオチド変異体を含む断片を用いて、図2に示されるように、全長cDNAを組み立てた。各重複領域では、固有の制限酵素部位を利用して、隣接断片を繋げた。4個の消化した断片は、全長ゲノム配列を代表し、修飾した低コピーのプラスミドベクター(pOK12HDV-PacI)に段階的に正確に組み立てた。このベクターは、pOK12(Vieiraら、Gene, 100:189-194(1991))の対応する部位に、HDVアンチゲノムリボザイム及び転写ベクター2.0(Johnsonら、J. Virol., 71:3323-3327(1997);Pattnaikら、Cell, 69:1011-1020(1992))由来のT7 RNAポリメラーゼターミネーターを含む244bpのSmaI-Sa

10

20

30

40

50

c I I を挿入することによって、H D V リボザイムを含むように修飾した。この 2 4 4 b p 断片の N c o I 制限酵素部位は、プライマーセット 5 ' p O K 1 2 H D V - 2 1 5 7 / 3 ' p O K 1 2 H D V - 2 5 7 及び 5 ' p O K 1 2 H D V - 2 5 7 / ポリ A - 修飾 (表 3) でオリゴヌクレオチド変異、次に、融合 P C R によって、固有の P a c I 部位に置換した。全長 c D N A クローンでは、ウイルスゲノム配列は、T 7 R N A ポリメラーゼプロモーター、1 又は 2 個の G 残基及び T 残基によって、次に、5 0 個のヌクレオチドのポリアデニル酸テールによって先行させた。組み立てられたクローンは、大腸菌 D H 5 α 菌株において増殖させ、次に、全ゲノムヌクレオチド配列を決定した。

【 0 0 6 4 】

【表 3】

表 3. 本試験に用いられるオリゴヌクレオチドプライマー。フォワードプライマーは名称後のスラッシュ (/) で示され、リバーズプライマーはスラッシュが先行する。挿入された制限酵素部位は下線イタリックで示される。

プライマー	ゲノム位置*	Sequence
クローニング:		
T7リーダー--VR長/	1-31	5'-ACAT <u>GCA</u> TGC TTAATAGCACTCACTATAGTATGACGTATAGTGTGGCTCTATGCGCTTGG (SEQ ID NO:18)
/3'-4300	4617-4635	5'-CTGGGGGACACAGTCCTA (SEQ ID NO:19)
5'-4056-AscI/	4055-4080	5'-CTTCTC <u>GGG</u> GGC CGAATGGAGT (SEQ ID NO:20)
/3'-7579	7578-7603	5'-TCATCATAC <u>CT</u> AGG GCCTGCTCCACG (SEQ ID NO:21)
5'-7579/	7578-7603	5'-CGTGGAGGAGCC <u>CT</u> AGG TATGATGA (SEQ ID NO:22)
/P32	13293-13310	5'-TGCAGGGCAAGCCCTGAG (SEQ ID NO:23)
VR1509/	11938-11958	5'-GTGAGGACTGGAGGATTACA (SEQ ID NO:24)
/3'末端-FL	15405-15411	5'-GTCT <u>TAA</u> TAA CTAG (T) ₃₀ AATTTCG (SEQ ID NO:25)
突然変異:		
5'-pOK12HDV-257/ (SphI, PacI)	pOK12HDV-PacI 257-282	5'-GAT <u>GCA</u> TGC CA <u>TAA</u> TAA GGGTCGGC (SEQ ID NO:26)
/3'-pOK12HDV-257 (SphI, PacI)	pOK12HDV-PacI 257-282	5'-GCCGACCC <u>TAA</u> TAA <u>TGG</u> ATGC ATC (SEQ ID NO:27)
T7リーダー--VR-2G/	1-5	5'-ACATGCATGCTTAATAGCACTCACTATAGGTATGAC (SEQ ID NO:28)
7475G2A/	7453-7477	5'-5Phos/CTGTGTGGACATGTCACCATTTGAA (SEQ ID NO:29)
13860C2T/	13843-13867	5'-5Phos/GTGTATCGTCCGTTCTGTTTGGT (SEQ ID NO:30)
14979A2G/	14958-14982	5'-5Phos/CAGATGCTGGGTAAGATCATCGCTC (SEQ ID NO:31)
ノーザンブロット解析:		
/3'-UTR	15298-15336	5'-GCACAATGTCAATCAGTGGCATTACCACACATTCTTCC (SEQ ID NO:32)
/1a-p222	221-261	5'-TAGACTTGGCCCTCCGCCATAAACACCCATGGCATTGGGGT (SEQ ID NO:33)

*ゲノム位置はGen Bank寄託U87392に基づく。

【0065】

全長cDNAクローンの修飾及び配列分析。QuickChange (登録商標) Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて、pVR-V4~pVR-V6G7475Aからの全てのcDNAクローンを修飾した。次に、完全なゲノムcDNAプラスミドインサートは、適切な配列プライマー (表3) を用いて、塩基配列分析のためにミネソタ大学のAdvanced Genetic Analysis Center (AGAC) に寄託した。pVR-V6G

10

20

30

40

50

7575Aを通じたpVR-V4、親のVR-23332のそれら、その対応する弱毒化ワクチン菌株、Inglevac MLV、及びpVR-HN、VR-2332の第一の感染性クローンの間の配列の相違を表4に列挙する(Nelsenら、J. Virol., 73:270-80(1999); Uanら、Virus Res., 79:189-200(2001); Nielsenら、J. Virol., 77:3702-3711(2003))。

【0066】

【表4A】

表4. PRRSV菌株とVR-23332感染性クローンとの間のヌクレオチド相違。ヌクレオチド相違が記される位置のみが示される。菌株VR-2332に示されるヌクレオチドは、陰の無いボックスに示される。明るい陰のあるボックスは、感染性クローンに固有のヌクレオチド相違を表し、中程度の陰のあるボックスは、Inglevac (登録商標) MLVにも見られるヌクレオチドを示し、黒く陰のあるボックスは、ブタ固有のヌクレオチドを示す。配列決定しなかった領域は、スラッシュによって示される。

塩基	領域	VR-2332	V4	V5	V5-1-P3	V5-2-P3	V5-SwIn612	V5G7475A	V5G7475A-P3	V6	V6G7475A	V6G7475A-P3	VR-HN	MLV
-4						T				G	G			
-3			G	G		T				G	G		G	
-2			G	G		T				G	G	T/φ	G	
-1			T	T		T		T/φ		T	T	T	T	T
48		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	R(G/A)	A	A
102		A	A	A	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A
258		C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	A	C
309		A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	A
415	NSP1a	T	T	T	-	Y(C/T)	T	T	T	T	T	-	T	T
642		T	C	C	-	C	C	C	C	C	C	-	T	T
784		G	G	G	-	G	G	G	G	G	G	-	G	A
827		C	C	C	-	C	T	C	C	C	C	-	C	C
1074		C	C	C	-	C	C	C	C	C	C	-	T	C
1107	NSP1b	A	C	G	-	G	G	G	G	G	G	-	A	A
1122		A	A	A	-	R(G/A)	A	A	A	A	A	-	A	A
1181		C	C	C	-	C	C	C	C	C	C	-	C	T
1294		A	A	A	-	R(G/A)	A	A	A	A	A	-	A	A
1379		C	C	C	-	C	T	C	C	C	C	-	C	C
1595		C	A	C	-	C	C	C	C	C	C	-	C	C
2192		C	C	C	-	C	C	C	C	C	C	-	C	T
3040	NSP2	G	G	G	-	G	G	G	G	G	G	-	G	A
3457		G	G	G	-	G	G	G	G	G	G	-	G	A
3657		C	C	C	-	Y(C/T)	C	C	C	C	C	-	C	C
4407		T	C	C	-	C	C	C	C	C	C	-	T	T
4593		A	G	G	-	G	G	G	G	G	G	-	A	A
4681		T	G	G	-	G	G	G	G	G	G	-	G	G
4865		T	T	T	-	Y(C/T)	T	T	T	T	T	-	T	T
4866	NSP3	A	G	G	-	G	G	G	G	G	G	-	A	A
5097		G	A	A	-	A	A	A	A	A	A	-	A	A
5247		T	C	C	-	C	C	C	C	C	C	-	T	T
5519		C	C	C	-	C	C	C	C	C	C	-	T	C
5610		T	T	T	-	T	T	T	T	T	T	-	A	T
6345	NSP5	A	A	A	-	A	A	A	A	A	A	-	A	T

10

20

30

40

50

【表 4 B】

	C	T	T	T	T	T	-	-	T	T	T	-	-	C	T
6674	G	G	G	G	G	G	-	-	T	G	G	-	-	A	G
6853	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T
6966	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	R(G/A)	A	A	A
7183	C	C	C	C	C	C	C	Y(C/T)	C	C	C	Y(C/T)	C	C	C
7188	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	Y(C/T)	C	C	C
7189	C	C	C	C	C	C	C	M(A/C)	C	C	C	M(A/C)	C	C	C
7213	C	C	C	C	C	C	C	A	A	A	A	A	G	G	C
7329	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
7475	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	T
7554	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	T
9220	T	C	T	T	T	T	-	-	T	T	T	-	-	T	T
NSP9	G	A	G	G	G	G	-	-	G	G	G	-	-	G	G
9649	T	T	T	T	T	T	-	-	T	T	T	-	-	T	C
9918	G	A	G	G	G	R(G/A)	-	-	G	G	G	-	-	A	A
9958	A	G	A	A	A	A	-	-	A	A	A	-	-	A	A
10040	T	T	T	T	T	T	-	-	T	T	T	-	-	T	C
NSP10	T	T	T	T	T	T	-	-	T	T	T	-	-	C	T
10533	T	T	T	T	T	T	-	-	T	T	T	-	-	C	T
10643	T	T	T	T	T	T	-	-	T	T	T	-	-	C	T
10697	C	C	T	T	T	T	-	-	T	T	T	-	-	C	C
10739	C	T	C	C	C	C	-	-	C	C	C	-	-	C	C
10781	G	A	G	G	G	G	-	-	G	G	G	-	-	A	A
10803	T	C	T	T	T	T	-	-	T	T	T	-	-	C	C
NSP11	C	C	C	C	C	C	-	-	C	C	C	-	-	C	C
10895	C	C	C	C	C	C	-	-	C	C	C	-	-	C	T
11055	T	A	T	T	T	T	-	-	T	T	T	-	-	A	A
11081	G	A	G	G	G	G	-	-	G	G	G	-	-	A	A
11221	G	A	G	G	G	A	-	-	G	G	G	-	-	A	A
NSP12	G	G	G	G	G	G	-	-	G	G	G	-	-	A	A
11229	C	G	G	G	G	G	-	-	G	G	G	-	-	G	T
11259	C	G	C	C	C	C	-	-	C	C	C	-	-	C	C
11327	C	T	C	C	C	C	-	-	C	C	C	-	-	C	C
11329	G	C	C	C	C	C	-	-	C	C	C	-	-	C	C
11501	A	G	A	A	A	A	-	-	A	A	A	-	-	A	A
11666	C	T	C	C	C	C	-	-	C	C	C	-	-	T	T
NSP12	G	C	G	G	G	G	-	-	G	G	G	-	-	G	G
11744	G	G	G	G	G	G	-	-	G	G	G	-	-	G	G
11760	G	G	G	G	R(A/G)	G	-	-	G	G	G	-	-	G	G
11882	A	G	A	A	A	A	-	-	A	A	A	-	-	A	A
12076	A	G	A	A	A	A	-	-	A	A	A	-	-	A	A
ORF2a/b	G	G	G	G	G	G	-	-	G	G	G	-	-	G	T
12102	A	G	A	A	A	A	-	-	A	A	A	-	-	A	A
12153	A	G	A	A	A	A	-	-	A	A	A	-	-	A	A
12432	T	A	T	T	T	T	-	-	A	A	A	-	-	A	A
12501	T	A	T	T	T	T	-	-	T	T	T	-	-	T	T
12600	G	G	G	G	G	G	-	-	G	G	G	-	-	G	T
ORF3	G	G	G	G	G	G	-	-	G	G	G	-	-	G	A
12943	C	C	C	C	C	C	-	-	C	C	C	-	-	C	A
12950	T	C	C	C	C	C	-	-	T	T	T	-	-	T	T
12973	G	G	G	G	G	G	-	-	T	T	T	-	-	T	T
13011	G	G	G	G	G	G	-	-	G	G	G	-	-	A	A
13787	T	T	T	T	T	T	-	-	T	T	T	-	-	C	T

【 0 0 6 8 】

40

【表 4 C】

13825		G	G	G	G	G	G	G	-	G	-	G	A
13860	ORF5	T	T	C	C	C	C	C	-	T	-	T	T
14238		A	A	A	A	A	A	A	-	A	-	A	G
14336		T	T	C	C	C	Y (T/C)	C	-	C	-	T	T
14404		T	T	C	C	C	C	C	-	C	-	T	T
14420	ORF6	C	C	C	C	C	C	C	-	C	-	C	G
14686		A	A	A	A	A	G	A	-	A	-	A	A
14735		C	G	G	G	G	G	G	-	G	-	G	G
14737		G	C	C	C	C	G	C	-	C	-	C	C
14979		G	A	A	A	A	A	A	-	G	-	G	G
15281	3' UTR	A	G	A	A	A	A	A	-	A	-	A	A
15334		T	C	T	T	T	T	T	-	T	-	T	T
15339		C	C	C	C	Y (T/C)	C	C	-	C	-	C	C
15411		T	T	T	T	K (T/G)	Y (T/C)	T	-	T	-	T	T

*ネガティブ塩基は、転写後のRNAに存在し、感染性ポリヌクレオチドの直上流のRNAポリメラーゼプロモーター由来のヌクレオチドを意味する。これらのプロモーター由来のヌクレオチドは、典型的には、9回継代した後には感染性ポリヌクレオチドにもはや存在しない。

【0069】

インビトロ転写。全長cDNAクローンは、ポリ（A）テールの下流で切断するPac Iでの切断により直鎖状にした。キャップ[m7G(5')ppp(5')Gキャップ類似体]RNA転写物は、mMESSAGE MACHINE（商標）キット（Ambion）及び最適化した2：1の比のメチル化キャップ類似体：GTPを用いて生成した。約50～60μgのRNAは、20μlの反応混合物中で2μgのDNA鋳型から生成した。キャップ類似体とGTPの比率の増加により、実質的にRNA収率が減少した。その

10

20

30

40

50

後、RNAを酸性フェノールクロロホルム、その後のイソプロパノール沈殿によって精製し、ヌクレアーゼ不含TEバッファー（pH 8.0）に再懸濁させた。RNAは、1%グリオキサール変性アガロースゲル上で野生型VR-2332ウイルスRNAを用いてサイズ比較により質について評価し、OD₂₆₀で分光光度計により定量した。

【0070】

MARC-145細胞トランスフェクション。修飾した転写法は、Nielsen（Nielsenら、(J. Virol., 77:3702-3711 (2003))）に記載されるアプローチに基づいて生成した。トランスフェクションに関して、MARC-145細胞は、3mlの完全培地[10%ウシ胎児血清(FBS)を補足したEMEM]中の6ウェルプレート(2~3×10⁵細胞/ウェル)に播種し、次に、約80%のコンフルエントになるまで、20~24時間、37℃、5% CO₂でインキュベートした(Collinsら、J. Vet. Diagn. Invest., 4:117-126 (1992))。500μlのOpti-MEM(登録商標)I還元血清培地(Invitrogen)に希釈した4μgのインビトロの転写されたRNA、及び1ml Opti-MEM N(登録商標)培地に希釈した2μlの1, 2-ジミリストリルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド及びコレステロール(DMRIE-C; Invitrogen)を組合せ、手短にボルテックスにより攪拌した。MARC-145細胞を2ml Opti-MEM(登録商標)培地で1回洗浄し、次に、直に、脂質:RNA複合体溶液で覆った。RNAを含まないDMRIE-C(2μl)を負の対照として用い、10~100ngの菌株(野生型)wt VR-2332精製ウイルスRNAを含むDMRIE-Cを正の対照として用いた。脂質:RNA複合体に4時間晒した後、単層を洗浄し、新鮮な完全培地(10%FBSを含む)EMEMを添加した。トランスフェクトした細胞の上清、細胞変性効果(CPE)の出現のために毎日監視し、トランスフェクションの72~96時間後に新鮮なMARC-145に継代させた。

【0071】

子孫ウイルスRNAの検出。子孫ウイルスRNAを検出するために、トランスフェクトされ、感染されたMARC-145細胞の細胞培養上清を回収した。RNAは、QiaAmpウイルスRNAキット(Qiagen)を用いて単離した。RT-PCRは、感染性クローン変異残基を示すVR-2332菌株ヌクレオチドに特異的なセレクトマーカー対を用いて行った(表3)。感染性クローン子孫の確認は、RT-PCR産物に存在するクローン特異的なヌクレオチドの塩基配列の検査によって得た。

【0072】

子孫ウイルスヌクレオカプシドタンパク質の検出。間接免疫蛍光アッセイ(IFA)を用いて、カバースリップ上で調製した、インビトロ転写物RNA転写された、又は子孫ウイルス感染したMARC-145細胞におけるウイルス発現を検出した。感染した細胞は、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を含む3.7%パラホルムアルデヒドで、10分間室温で固定した。固定した細胞をPBSで洗浄し、PRRSVヌクレオカプシドタンパク質特異的なモノクローナル抗体SDOW17(Magarら、Can. J. Vet. Res., 59:232-234 (1995))中で37℃45分間インキュベートし、さらに、フルオレセインイソチオシアネートを結合させたヤギ抗マウス免疫グロブリンG(IgG)(1:100希釈)(Sigma)と共にインキュベートした。カバースリップをPBSで洗浄し、ゲルマウントオイルを用いてスライドにマウントし、蛍光顕微鏡で観察した。

【0073】

ウイルスプラークアッセイ。6ウェルプレート上のMARC-145細胞の単層は、トランスフェクト又は感染させたMARC-145細胞の細胞上清(10倍希釈)で、室温1時間インキュベートすることによって感染させた。感染させた単層は、次に、新鮮なEMEM/10%FBSで1回洗浄し、直に、1×MEM(Sigma M4144)/10%FBS/2%(w/v)NaHCO₃/1×グルタミン/1×非必須アミノ酸/10mM HEPES/2%(v/v)ゲンタマイシン中の無菌の1%SeaPlaque

Agarose (BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, Maine) で覆い、反転させて $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$ で5日間インキュベートした。アガロースを注意深く取り除き、細胞をプラークサイズの視覚化のために、 20% エタノール中の 5% クリスタルバイオレットで $10\sim 30$ 分間染色した。

【0074】

ウイルス増殖曲線。T-75 フラスコ中の MARC-145 単層は、感染の多重度 (MOI) 0.001 で血清不含 MEM に希釈した親又は組換え PRRSV で接種した。室温でゆるやかに攪拌しながら1時間接着後、接種物を除去し、単層を血清不含 MEM で3回洗浄した。洗浄後、 4ml の完全培地を添加し、その後、フラスコは、最大5日間、 37°C で $5\% \text{CO}_2$ にインキュベートした。アリコート (0.5ml) を回収し、培地の添加 (0時間点) 後に、 24 、 48 、 72 、 96 及び 120 時間で即座に回収し、 -80°C で保存した。試料の連続希釈を用いて、新鮮な MARC-145 細胞を感染させ、次に、細胞を処理した。アガロースを除去後、プラークを視覚化し、カウントした。増殖曲線の結果は、PFU/ml として表した。

【0075】

子孫ウイルスのインビボ接種。PRRSV 血清反応陰性群由来の混血及び性別を混ぜた 10 匹の4週齢ブタを3つのグループに分け、各グループは2匹の動物からなる。第一グループは、 $10^3 \cdot 5$ 50% 組織培養感染性投薬量 (TCID_{50}) のクローン性ウイルス (pVR-V5、MARC-145 細胞の第三継代) /ml を受け、第二のグループは、親菌株 VR-2332 の $10^5 \cdot 4$ TCID_{50} /ml (MARC-145 細胞の第四継代) を受け、第三のグループは、模擬的に MEM を接種した。全ての動物は、筋内注射により 2ml の接種材料を受けた。動物は、実験全体で別々の部屋に置かれ、臨床兆候に関して毎日観察された。全てのブタは、接種後の第28日で安楽死させた。ウイルスを回収するために、個々の血清試料を完全な MEM で5倍に希釈し、新鮮な MARC-145 単層上に緩やかに攪拌しながら、室温で $1\sim 2$ 時間置いた。次に、接種材料を除去し、完全 MEM を添加した。感染した細胞は、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ でインキュベートし、毎日観察した。CPE が認められと、感染細胞の上清をさらに特徴付けするまで -80°C で凍結した。

【0076】

ノーザンブロット解析。pVR-V6G7475A 転写物を MA104 細胞にトランスフェクトし、次に、いくつかの継代のために新鮮な細胞に継代させた。続くノーザンブロット解析に関して、継代1 (P1)、P3、P6、P8 及び P10 の上清を $1:50$ に希釈し、次に、同日、感染細胞 ($1\text{ml}/\text{T75}$ フラスコ) に用いた。同時に、感染したブタの血清を 10 倍に希釈し、次に、別々の T75 フラスコを感染させるために用いた (1ml)。細胞変性効果は、全てのフラスコについて、感染後3日で見られた。細胞内 RNA は、以前に記載されるように (Nelsen ら、J. Virol., $73:270-80$ (1999))、RNeasy Midi キット (Qiagen) を用いて抽出し、及びグリオキサール変性ゲル上で電気泳動を行った ($15\mu\text{g}/\text{試料}$)。pVR-V6G7475A 転写 RNA (100ng) を対照として泳動した。RNA を 0.45 ミクロンの MagnaGraph Nylon Transfer Membrane (Osmonics) に移した後、このメンブレンは、以前に記載されるように (Nelsen ら、J. Virol., $73:270-80$ (1999))、ポリヌクレオチドキナーゼ (Promega) を用いて、 γ - 32P -ATP (Amersham) で末端標識した標識化オリゴヌクレオチド / $1\mu\text{g}$ を用いて探査した。

【0077】

子孫ウイルスの核酸配列解析。cDNA 末端の $5'$ - 及び $3'$ - 迅速複製 (RACE) は、QIAmp (登録商標) Viral RNA Mini キット (Qiagen) を用いて単利したウイルス RNA 上で、SMART (商標) RACE cDNA 複製キット (BD Bioscience) 又は $5'$ 若しくは $3'$ - Full Race Core

10

20

30

40

50

Set (TaKaRa Bio Inc) を用いて行った。残った塩基配列は、以前に記載されるように (Yuanら、Virus Res., 79:189-200 (2001)) 菌株VR-2332の全ゲノム (表3) をカバーするように開発したプライマー対のRT-PCR産物から決定した。この産物は、核酸配列の決定のために、ミネソタ大学のAdvanced Genetic Analysis Centerに寄託した。少なくとも3倍のカバーである完全なウイルス配列は、初期には、Lasergene (登録商法) 配列分析ソフトウェア (DNASTAR, Inc.) のSeqManスーツと一緒に組み立て、さらに、GCC Wisconsin Package Version 10.3ソフトウェア (Accelrys Inc.) を用いて解析した。菌株VR-2332 (GenBank受入U87392) 菌株Ingelvac (登録商標) MLV (GenBank受入AF066183) 及びcDNAクローンpVR-HN (GenBank寄託AY150564; Nielsenら、J. Virol., 77:3702-3711 (2003)) は、組換えウイルス菌株との全てのヌクレオチド比較に用いた。

【0078】

結果

pOK12ベクターの修飾。pOK12 (GenBank受入AF223639; Vieiraら、Gene, 100:189-194 (1991))、低コピークローニングベクターは、SmaI (pOK12の273bpの酵素部位) 及びSalI (307bpの部位) で消化し、肝炎デルタウイルス (HDV) リボザイムを含むベクター2.0 (7) の244bpのSmaI-SalI断片を挿入することによって修飾した。次に、ベクター (pOK12HDV) は、さらに、既存のKpnI部位 (273bpでのpOK12HDV) の突然変異によって修飾し、プライマー対5'-pOK12HDV-257SphIPacI/3'-pOK12HDV-257SphIPacIの使用を通じてPacI制限酵素部位を挿入した。HDVリボザイムは、ポリA領域の3'末端で正確に効果的な切断を提供するために添加された。この試験は、修飾は、感染性子孫ウイルスを得るには必要ないことを示した。

【0079】

全長cDNAクローンの構築。クローニングストラテジーは、図2に示される。4つの重複するゲノム断片は、示されたプライマー対を用いたRT-PCRによって精製したVR-2332ウイルスRNAから増幅した (図2、表3)。各断片は、個別にpCR (登録商標) 2.1-TOPO (登録商標) ベクターにクローニングし、中間体クローンpCR-SphI-FseI (セグメントI)、pCR-FseI-AvrII (セグメントII)、pCR-AvrII-BsrGI (セグメントIII)、及びpCR-BsrGI-PacI (セグメントIV) を生成した。次に、cDNAクローンは、クローン名によって示されるように、2つの固有の制限酵素を用いて消化した。4つの断片をゲル精製し、段階的にベクターpOK12HDV-PacIにライゲートし、PRRSVの全長cDNAクローン (pVR-V4) を生成した。全長cDNAクローンでは、ウイルスゲノム配列は、T7 RNAポリメラーゼプロモーターによって、次に50ヌクレオチドのポリアデニル酸によって駆動した。クローンpVR-V4のRNA転写物は、透過性を上げた細胞にトランスフェクトした場合には典型的なPRRSV感染力を示さなかったが、ウイルスRNAはいくつかの継代を通じて検出された。菌株VR-2332と比較すると、21アミノ酸変化をもたらす45ヌクレオチド突然変異の全部 (表4) は検出され (表5)、いくらかの突然変異は、Ingelvac (登録商標) MLVにおいて以前に同定されたのと同じであった (Yuanら、Virus Res., 61:87-98 (1999))。

【0080】

【表 5 A】

表 5. PRRSV 菌株と VR-2332 感染性クローンとの間のアミノ酸相違。ヌクレオチド相違が記される位置のみが、同定されたゲノム領域内の対応するアミノ酸位置と一緒に示される。菌株 VR-2332 に示されるアミノ酸は、陰のないボックスに示され、VR-2332 と同一の感染性クローンのアミノ酸は、ブランクボックスで表される。各ボックスのテキストは、表 2 に示されるヌクレオチド相違によりサイレント又はアミノ酸変化を表す。明るい陰のあるボックスは、感染性クローンに固有のヌクレオチド相違を表し、中程度の陰のあるボックスは、Ingelvac (登録商標) MLV にも見られるヌクレオチドを示し、黒く陰のあるボックスは、ブタ固有のヌクレオチドを示す。スラッシュによって区別されるアミノ酸は、ORF2a/ORF2b アミノ酸数を示す。配列決定しなかった領域は、スラッシュによって示される。

NT 位置	AA 位置	領域	VR-2332	V4	V5	V5-1-P3	V5-2-P3	V5-Sw612	V5G7475A	V6	V6G7475A	VR-HN	MLV
258	23	NSP1 α	V									サイレント	
309	40		Q	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント		
642	151		P	サイレント	サイレント	-	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント		
784	199	NSP1 β	V			-							Y
827	213		A			-		V					
1074	295		Y			-						サイレント	
1107	306		L	サイレント	サイレント	-	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント		
1181	331		S			-							F
1379	397		A			-		V					
1595	469	NSP2	A	D		-							
2192	668		S			-							F
3040	951		D			-							N
3457	1090	NSP3	D			-							N
4407	1406		P	サイレント	サイレント	-	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント		
4593	1468		Q	サイレント	サイレント	-	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント		
4681	1498		S	A	A	-	A	A	A	A	A	A	A
4866	1559		V	サイレント	サイレント	-	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント		
5097	1636		R	サイレント	サイレント	-	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント
5247	1686		V	サイレント	サイレント	-	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント		
5519	1777		T			-						I	
5610	1807		L			-						サイレント	
6345	2052	NSP5	P			-							サイレント

【 0 0 8 1 】

10

20

30

40

【 0 0 8 2 】

	6674	2162	P	L	L	L	-	L	L	L	L	L	N	L
NSP7	6853	2222	D				-						N	
	6966	2259	D				-						サイレント	
	7329	2380	K	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント		
	7475	2429	E	G	G	G	G	G	G	G	G	G	サイレント	
	7554	2455	V	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント	サイレント		
NSP9	9220	3011	L	P			-							
	9649	3154	G	E			-							
NSP10	9918	3244	L				-							サイレント
	9958	3257	G	E			-		G/E				E	E
	10040	3284	V	サイレント			-							
	10533	3449	Y				-							H
	10643	3485	V				-					サイレント		
	10697	3503	A	サイレント			-					サイレント	サイレント	
	10739	3517	H	サイレント			-							
	10781	3531	T	サイレント			-					サイレント	サイレント	
	10803	3539	C	R			-					サイレント	R	
	10895	3569	D				-					サイレント		サイレント
NSP11	11055	3623	S	T			-					T	T	
	11081	3631	P	サイレント			-					サイレント	サイレント	
	11221	3678	G	E			-		E			E	E	
	11229	3681	V				-						L	
	11259	3691	R	G			-							
	11327	3738	H	サイレント			-							
	11329	3739	G	A	A		-	A	A	A	A	A	A	A
	11501	3771	E	サイレント			-							
NSP12	11666	3826	P	サイレント			-						サイレント	サイレント
	11744	3852	W	C			-							
	11882	3898	K	サイレント			-							
	12076	2	K	E			-							
ORF2a/b	12102	1079	L/D				-							F/Y
	12153	27	P/I	P/V			-							
	12432	120	E	サイレント			-							
	12501	143	D	E			-							
	12600	176	G				-							サイレント
	12943	83	G				-							F
ORF3	12950	85	D				-						サイレント	

40

10

20

30

40

50

pVR-V4における多くの突然変異が推定上のヘリカーゼをコードする臨界領域に現れるため、ゲノムセグメントIIIの追加のクローン(pCR-AvrIII-BsrGI)を生成し、完全に配列決定した。得られた最も配列に正確な断片でpVR-V4のセグメントIIIを置換した後、本出願人は、再度、完全なゲノム全長クローン(pVR-V5)の塩基配列を決定した。置換された部位及び自然発生の突然変異(ヌクレオチド1595、13860、14336、及び14404)を除いて、これらの2つのゲノムクロ

ーンを同定した（表4）。pVR-V5の配列解析は、このクローンが菌株VR-2332と比較して全部で23個の突然変異を有していることを示した。これらの23個の変化のうち、たった8個のヌクレオチドがアミノ酸の変化をコードし、アミノ酸残基突然変異の5個は、Inge l v a c（登録商標）MLVと同じであり、したがって、すでにインビトロでの複製に影響を与えるとは予測しなかった（表4）。

【0084】

クローンpVR-V6は、それぞれプライマー13860C2T／及び14979A2G／を用いてヌクレオチド13860及び14979を修復するために、ゲノムセグメントIVの部位特異的突然変異誘発から誘導した。これらの2つのヌクレオチドの突然変異は、GP5のアミノ酸残基（L→F）及びヌクレオカプシドタンパク質の残基31（T→A）を修正する。クローンpVR-V6の配列解析は、ヌクレオチドが、野生型（wt）VR-2332ヌクレオチドの戻すように修正され、pVR-V5と比較した場合に、ゲノムの任意の他のヌクレオチド変化をもたらさないことを確認した（表4及び5）。最後に、オリゴマー7475G2Aを用いたゲノムセグメントIIIにおける部位特異的突然変異誘発は、nt7475でwtVR-2332からの変更を修正するために、pVR-V5及びpVR-V6の両方において修正された。nt7475のG→Aの変化は、親のVR-2332ウイルス菌株において見られるグルタミン酸（E）に対して、2つの組換えクローンのORF1アミノ酸2429のグリシン（G）をもたらした。最終の2つのクローンであるpVR-V5G7475A及びpVR-V6G7475Aを全体として再度配列決定し、それぞれ元々の組換えプラスミドpVR-V5及びpVR-V6から変更した（nt7475）のみを有することを見出した（表5）。したがって、pVR-V6G7475Aは、11個のヌクレオチドを含み、菌株VR-2332からのアミノ酸変化はなく、さらに、それらはまた、Inge l v a c（登録商標）MLVに見られた。

【0085】

最終構築物（pVR-V6G7475A）に関する図3で概略的に見ることができ、表4及び5において詳述されるように、全ての全長クローンは、なお、主として、きちんとは定義されていないORF1の領域において、ゲノムを通じて散乱したヌクレオチド変化を有する。しかしながら、ウイルス複製の完了からpVR-V4を推定上妨げたORF1bヌクレオチド変化の大きなクラスターは、全長ゲノムクローンの後者のバージョンで修復された。たった1つのヌクレオチド突然変異（G3739A変異をコードするnt11329）は、pVR-V5及び後者のクローンのORF1bに残り、この変異は、培養細胞における感染及び効率的な複製からInge l v a c（登録商標）MLVを妨げない。表4及び5はまた、動物において複製することが示されている、以前に公開された感染性クローンであるpVR-HN（Nielsenら、J. Virol., 77:3702-3711（2003））に関する残基情報を示す。最終の構築物であるpVR-V6G7475A（7個のヌクレオチド）に対してInge l v a c（登録商標）MLVを直接的に示すpVR-HN（15個のヌクレオチド）における残基数の実質的な増加がある。

【0086】

組換えウイルスの特徴付け。各cDNAクローンの全長RNA転写物を生成した。cDNA転写物又はwt VR-2332ウイルスRNA（vRNA）を用いたMARC-145細胞トランスフェクションは、CPEをもたらし、トランスフェクション後の48～72時間で、細胞クランピング、続く溶解によって特徴付けられた。組換え転写物によって引き起こされるCPEは進行が遅れ、強制的な凝集、脱着、及び崩壊としてCPEが提示するwt VR-2332によって誘導されるものと比較して幾分区別された。トランスフェクション後96時間で、VR-2332 vRNAでトランスフェクトされた細胞の大部分は、溶解を受け、プレートから脱着したが、一方、比較的軽度のCPEは、クローニングしたインビトロで誘導したRNA転写物で転写した細胞に見られた。

【0087】

ウイルス（P0）は、トランスフェクトした細胞から回収し、アリコート（培養液で1mlまで希釈した10μl）を用いて、子孫ウイルス増幅のためにMARC-145細胞

に感染させた。C P Eが検出された後、ウイルス（P 1）を再度回収し、アリコートを用いてM A R C-1 4 5細胞を感染させた。細胞上清中の組換えウイルス（P 2）は、ウイルスRNAの精製に利用し、次に、これを用いて、プライマー対5'-6800/3'-O R F 1 b（n t 6 7 9 6-7 6 1 4）及びP 5 1/0 5 P 4（n t 1 3 7 5 7-1 4 3 4 1）を用いたR T-P C R断片を得た。得られたP C R断片は、塩基配列解析のために寄託し、観察された感染度が感染性構築物のトランスフェクトされた全長RNA転写物に起因し、w tウイルスによる汚染の結果ではないことを確認した。残基7 3 2 9、7 4 7 5、7 5 5 4、及び1 3 8 6 0でのヌクレオチド相違の突然変異は、p V R-V 5由来の子孫ウイルスに見られ、7 3 2 9、7 5 5 4、及び1 3 8 6 0は、p V R-V 5 G 7 4 7 5 A由来のウイルスで検出された。同様に、残基7 3 2 9、7 4 7 5、及び7 5 5 4の変異は、p V R-V 6子孫において検出され、7 3 2 9及び7 5 5 4での変異は、p V R-V 6 G 7 4 7 5 Aから得られるウイルスにおいて検出された（表4及び5）。対応する変異は、w t v R N A転写物由来のP 2ウイルスには見られなかった。

10

【0088】

組換えウイルスの免疫蛍光分析。直接的免疫蛍光分析を用いて、感染したM A R C-1 4 5細胞におけるP R R S Vヌクレオチドの発現を検出した。組換えウイルス転写物（P 2及びオン）並びにv R A Nによって感染した全ての細胞は、この方法で陽性であった。以前にR o w l a n dら（V i r u s R e s. , 6 4 : 1-1 2（1 9 9 9））によって報告されたように、ヌクレオカプシドタンパク質の巨大な仁蓄積が迅速に出現した。

20

【0089】

p V R-V 5誘導の組換えウイルスによるインビボ感染。c D N Aクローンp V R-V 5のRNA転写物でトランスフェクトしたM A R C-1 4 5細胞のP 3から回収した組換えウイルスは、w t V R-2 3 3 2、ワクチンウイルスI n g e l v a c（登録商標）M、及び生理食塩水（負の対照）と並行して若いブタに接種した。血液試料は、感染後の0、3、5、7、1 4、2 1及び2 8日に回収し、H e r d C h e k P R R S 2 X R E L I S A（I D E X X）によるセロコンバージョンについて、及びウイルス回復について分析した。2 8日に、全ての感染した動物は、大体同じ動力学でセロコンバージョンを受け、p V R-V 5組換えウイルスは、インビボで十分に複製したことを示した（図4）。臨床兆候は、実験期間中には全ての動物では見られなかったが、これは、w t筋株V R-2 3 3 2が、多くの場合、若いブタに明白な疾患を生成せず、一時的に、典型的には感染後1 4日でのみリンパ節の拡大をもたらしたために期待されないことではなかった。

30

【0090】

p V R-V 5（S w 6 1 2）の子孫で感染させた1匹の動物からの血清試料は、感染後1 4日で回収し、インビボ継代の組換えウイルスの回収のために新鮮なM A R C-1 4 5単層を感染させるために使用した。以前に記載されるように、クローンp V R-V 5 R A N転写物のインビトロトランスフェクション由来のウイルスは、単に最小のC P Eを引き起こし（感染した細胞の凝集によって裏づけられる）、試験動物の第1 4日の血清から回収したウイルスは、感染後の9 6時間で典型的なC P E（細胞凝集、脱着、及び崩壊）を引き起こした。これは、ウイルス遺伝型又は表現型のシフトが発生し、p V R-V 5がインビボで複製したことを示唆した。

40

【0091】

表現型の見掛けの変化の理由を明らかにするために、全ゲノム配列分析は、1匹のブタ（S w 6 1 2）から回収したウイルスで完結し、次に、M A R C-1 4 5細胞に1回継代させ、S w 6 1 2子孫を増幅した（図3、表4及び5）。ブタを感染させるために使用したウイルスであるp V R-V 5と対比すると、1 7個の感染性c D N Aクローン特異的なヌクレオチド変化は、S w 6 1 2に残存し、そのいくつかはまた、I n g e l v a c（登録商標）M L Vに見られる（7/1 7ヌクレオチド）。元のp V R-V 5クローン転写物の5'末端に存在する2つの非ウイルス性G残基、続くT残基は、インビボ感染由来のウイルスには見られなかった。縮重は、ヌクレオチド位置9 9 5 8（R）、1 4 3 3 6（Y）及び1 5 4 1 1（Y）で見られた。位置9 9 5 8のw t V R 2 3 3 2様ヌクレオチド

50

(G)は、Inge l v a c (登録商標) M L V様ヌクレオチド(A)との縮重を示した。この変化は、それぞれ、グリシン残基のグルタミン酸残基への変異をもたらす(表2)。位置14336で、縮重は、感染性クローン特異的な塩基(C)及びw t V R-2332特異的塩基(T)として検出され、サイレント変異を反映した。G残基がw t 残基Aに復帰する別の変異(n t 7454)が起こった。しかしながら、この試験において、他のウイルスのいずれにも見られない別の5個のヌクレオチド相違(n t 102、827、1379、14686及び15411)があった。ヌクレオチド102は、リーダー配列に位置するが、翻訳されない。しかしながら、リーダー配列が翻訳されると、コードされたO R F (V R-2332ヌクレオチド1-100)は、1アミノ酸残基(W)によって伸長される。残基827及び1379での変異は、O R F 1 aにおける変異を導き、両方の場合において、S w 6 1 2バリンに対してアラニンをコードするw t V R-2332のアミノ酸変化をもたらす。p V R-V5のn t 7475のグアニン残基はw t アデニンに変異した。これは、G3294A非保存的アミノ酸変異をもたらし、O R F 1 aに位置し、予期されたプロテアーゼ切断産物N S P 7及びこのゲノム領域はこれまで定義された機能はない。ヌクレオチド14686は、O R F 6に位置し、S w 6 1 2におけるw t V R-2332グアニンからアラニンへの変化を示し、やはり、アミノ酸グリシンをコードしている。他の固有のヌクレオチド変化は、ポリAテールの開始前に、ウイルス配列のまさに3'末端(n t 15411)で起こった。この場合、以前に保存されたチミジン残基は、シトシン残基との縮重を示した。これらの遺伝的变化は、参考にはなるが、即座には、観察された成長表現型の変化の原因(単数又は複数)を示さなかった。しかしながら、インビボでのP R R S V複製の誤った性質を示し、w t V R-2332由来の適度に異なったウイルスゲノム配列は、効率的に複製できたことを示唆する(図3)。

【0092】

ウイルスプラークサイズの比較。組換えウイルス及びw t V R-2332のプラークサイズの測定は、感染後の120時間でM A R C-145細胞で並行して完了させた(図5A)。菌株V R-2332は、3mmサイズを平均とするプラークを形成し、p V R-HN c D N A区の継代3の子孫は僅かに小さなプラークを形成した(2.5mm平均)。対照的に、ピンポイントのプラークだけが、p V R-V5及びp V R-V6由来の組換えウイルスから得られ、これらは、単に容易に、顕微鏡試験を通じて明らかとなった(図5A)。クローンp V R-V5 G 7 4 7 5 A及びp V R-V6 G 7 4 7 5 Aから回収した組換えウイルスは、平均して、それぞれ1.5mm及び2mmプラークを形成した。しかしながら、別のアッセイでは、V R-F L V 5由来の組換えウイルスのインビボ感染から回収したウイルス子孫(S w 6 1 2)によって生成したプラークは、非常に大きく、w t V R 2 3 3 2由来のものとほぼ等しいサイズと数であった。

【0093】

各組換えウイルスを含む細胞上清のほんの最小体積が残存した。したがって、プラークサイズの測定のヌクレオチド変化の役割を十分に調べるために、本出願人は、p V R-V5、p V R-V6、p V R-V5 G 7 4 7 5 A及びp V R-V6 G 7 4 7 5 Aから生成した新鮮なRNA転写物をM A R C-145細胞にトランスフェクトした(第二系統と呼ぶ)。感染後5日での各感染性クローンの継代3の子孫ウイルスは、再度、w t V R-2332、V R-HN及びS w 6 1 2と比較してプラークサイズについて分析した。以前のプラークアッセイとは対照的に、全てのサイズは同じようであり、p V R-V5、p V R-V6、p V R-V5 G 7 4 7 5 Aから得た組換えウイルスは、インビボ由来のw t V R-2332、S w 6 1 2、p V R-V6 G 7 4 7 5 Aウイルスよりほんの僅かに小さかった(図6A)。しかしながら、組換えウイルスは、まだ、ブタ(S w 6 1 2)を継代させたw t V R-2332又はp V R-V5組換えウイルスと比較した場合、約10倍低いタイターによって示される真のウイルス感染を直接は模倣していなかった(図6B)。

【0094】

第一及び第二系統ウイルス調製物のヌクレオチド配列分析。ブタに接種した継代3のp V R-V由来のウイルス(V5-1-P3)の制限されたヌクレオチド配列分析(ウイル

10

20

30

40

50

ス保存制限による）及び上記で得られた継代3のpVR-V5由来のウイルス（V5-2-P3）の完全なヌクレオチド配列分析は、プラークサイズ相違の遺伝的理由を明らかにするために完了した。このような分析は、2つの個別に調製したV5ウイルスは、5'末端の配列で異なっていることを示した（表4）。ピンポイントプラークを生成したウイルス（V5-1-P3）は、wt菌株VR-2332のヌクレオチド配列に示されるように、外来の5'末端ヌクレオチドがなく、より大きなプラークを生成するもの（V5-2-P3）は、5'末端の4個の非鋳型のチミジン残基を有していた（表4）。本出願人が得ることができた残ったV5-1-P3ウイルスヌクレオチド配列は、親のクローンのものと同様に、V5-2-P3のものと正確に適合した。しかしながら、V5-2-P3ウイルスの完全な配列は、ウイルスが、いくつかの遺伝部位でヌクレオチド縮重を提示することを示した。同様の見解は、第二系統ウイルスのVR-FLV5G7454A-P3及びVR-FLV6G7454-P3の制限された領域を分析する場合に得られた。これらの最後の2つの感染性クローン子孫は、異なる5'末端を提示し、配列の縮重を示した。

【0095】

ウイルス増殖曲線。同時の1工程ウイルス増殖曲線決定は、MARC-145細胞及び継代3ウイルス（第二系統）を用いて完了した（図7）。pVR-5、pVR-V5G7475A、pVR-V6、及びpVR-V6G7475A及びpVR-HNから回収した組換えウイルスは、同様の1工程ウイルス増殖速度を示したが、それらの複製ピークは全て、wt菌株VR-2332及びSw612、インビボ子孫のpVR-V5より有意に低かった。また、pVR-5、pVR-6及びpVR-HN由来の組換えウイルス調製物の複製速度は、pVR-V5G7475A及びpVR-V6G7475A由来のウイルスと比較して幾分減少した。最後の2つの感染性クローンは、それぞれ、13個及び11個と同程度に少ないヌクレオチド相違をコードし、wt VR-2332配列から2個又は0個のアミノ酸変化をもたらし、その上、この変化は、Ingelvac（登録商標）MLVで見られた。次に、これらのデータは、wt VR-2332及びその弱毒化子孫Ingelvac（登録商標）MLVから11個と同程度に少ないヌクレオチド変化を有するウイルスは、複製においてどういうわけか損なわれることを示す。一致して、wt VR-2332及びSw612ウイルスの得られたタイターは、ブタにおいて継代させなかった組換えウイルスのそれよりも約6～15倍高かった（図7）。

【0096】

vRNAのノーザン分析。PRRSV欠損sgRNA種は、異常形態のサブゲノムRNA（ラテン：異常な形態）として以前に同定され、PRRSV感染の構成成分であることを示し、感染の低い多重度又はスクロース勾配遠心分離で、培養細胞継代などの標準的な方法によって全長ウイルスゲノムから分離できなかった（Yuanら、Virology, 275:158-169; 30(2000); Yuanら、Virus Res., 105:75-87(2004)）。PRRSV異常が全長cDNAゲノムクローンのインビトロ転写中に生じるか、又はその後のトランスフェクション／感染後に見られるのかどうかを探索するために、ノーザンブロット分析を完了した。トランスフェクトしたMA-104細胞から生じたウイルスの全長RNA転写物及び継代1、3、6、8及び10を用いて、10µlの1:100に希釈した上清、及び1:10に希釈したSw612血清でMA-104の新鮮なT-75フラスコを接種した（2ml全量／フラスコ）。4日後、細胞奈PRRSV RNAを回収し、各調製物15µgは変性アガロースゲルを通じて電気泳動により分離され、ナイロンメンブレンに移した。RNA架橋後、メンブレンを全長VR-2332ゲノム及び異常形態（/1a-222; 29）について選択するORF1あの5'末端に相補的な32P-放射線標識プローブを用いてハイブリダイズした。図8に示されるように、RNA転写物は、大部分、一本のバンドであり、全長vRNAとして移動し、継代1及び後者からのPRRSV RNA種は、異常形態として以前に同定された全長及びサブゲノムサイズの種の両方として移動する。さらに、ハイブリダイゼーションの強度は、継代全体で増加する。ウイルスは、同じ時間点で感染した細胞上清の等量から回収したので、この観察は、経時的に複製でより効率的となる。最後に、Sw612か

ら生じたウイルスと細胞培養から生じたウイルスとを比較すると、RNA結合パターンは、区別がつかず、欠損RNA種が容易に形成され、インビトロ及びインビボで複製し、したがって、PRRSV感染の自然な部分であることを強く示唆している。

【0097】

検討

理論的には、ウイルスの感染性cDNAクローンは、野生型感染を模倣する逆の遺伝的システムを生じるために、親配列と同一でなければならない。相当な努力を発揮して、十分に信頼できるPRRSV菌株VR-2332を再生し、いくつかの部位での予期せぬ同時変異により、本出願人は、実験室で配列決定したwt菌株VR-2332との相違がない感染性クローンを誘導することに成功していない。非常に信頼のあるDNAポリメラーゼは、この試験で使用され、人工的な変異を減らすために利用するが、このような変異は、逆転写中にさけることができない(Malletら、J. Virol. Methods, 109:161-70(2003))。さらに、PRRSVが驚くウイルス進化を示し、菌株バリエーション(Changら、J. Virol., 76:4750-6(2002))；Murtaughら、Adv. Exp. Med. Biol., 440:787-94(1998)；Yoonら、Adv. Exp. Med. Biol., 494:25-30(2001))が菌株(Yuanら、Virus Res., 61:87-98(1999))の間の遺伝子間組換えをもたらすように高頻度で容易に再結合するという事実は、PRRSVサブゲノムRNA及び異常形態(Nelsenら、J. Virol., 73:270-80(1999)；Yuanら、Virology, 275:158-169(2000)；Yuanら、Virus Research, 105:75-87(2004))を形成する遺伝子内組換えを受け、多くの場合、当初の目的は時間がかかり、ごくわずかな利益をもたらすのに役立つ野生分離体において予期せぬヌクレオチド部位のヌクレオチド縮重を示す。菌株VR-2332と比較して、11個程度に少ないヌクレオチド変異を有する感染性DNA構築体は、ウイルス複製(5'及び3'末端、ORF1b)に関与することで知られているドメインの外側であり、wtウイルス産生には十分であると考えられ、感染性クローンの顆粒の目的は、発症クエリー及び構造：機能試験のための使用である。pVR-HNは、ヘリカーゼモチーフをコードするウイルスに対する領域(NSP10)におけるIngelvac(登録商標)MLVにより類似する。これら2つの感染性クローンの更なる病理的比較は、親菌株、VR-2332、及びそのワクチン菌株子孫、Ingelvac(登録商標)MLVとの間の差異に明らかになるかもしれない。

【0098】

有用な情報は、PRRSV菌株VR-2332に対する感染性クローンの構築及び評価から誘導され得る。第一に、PRRSV菌株VR-2332は、生存に関して全ての変異を寛容することができない。特定のヌクレオチド又はアミノ酸変異は、ウイルス複製を助けるか又は遅らせるかもしれないし、チャレンジは、どれが生存に致命的であるかを確かめるためである。クローンpVR-V4においては、感染性ビリオンを生産せず、wt親菌株VR-2332との全42個のヌクレオチド相違であった。これらの42個のヌクレオチド変化では、いくつかのヌクレオチドは、サイレント変異(20残基)をもたらし、又は他の吉のPRRSV菌株(9個のアミノ酸残基変異は直接的にIngelvac(登録商標)MLVを模倣する)における存在し、これらの変化がウイルス複製に非致命的であってもよいことを予測させる。12個のアミノ酸変化及び2つの3'UTRヌクレオチド変異へと導く11個のヌクレオチド変化は、各々がIngelvac(登録商標)MLVには見られず、したがって、PRRSV菌株VR-2332に致命的であることが予期された。pVR-V5及び後者の構築体では、19個の変化が修正され、いくつかのサイレントな変異を含む、9個の異常なアミノ酸変化は、Ingelvac(登録商標)MLVのゲノムには見られず、8個のほかの変化は、ワクチン菌株に見られた。これは、構築体が感染性であるという第一の証拠へと導くが、pVR-V5において、2個のアミノ酸変異はやはり存在し、その1つは、部位特異的突然変異誘発を通じて変化し、pVR-V

6を生成する。残りのアミノ酸変化は、pVR-V5G7475A及びpVR-V6G7475Aにおいて修復されるが、これらのクローンは、やはり、菌株VR-2332及びその誘導されたワクチン菌株に見出されないサイレント変異を有する。

【0099】

いくつかの固有の観察は、この試験から得られた。第一に、生成されたウイルスの各系統は、wt菌株VR-2332において検出されなかった固有の5'末端配列をもたらすかもしれない。本出願人はまた、未だに、プラークサイズとヌクレオチド配列とを相関させることができていない。第二に、本出願人は、ブタにおける複製後の固有のヌクレオチド変化を見つけ、それはPRRSVポリメラーゼの固有の性質を反映するかもしれない。全てのヌクレオチド変化は、天然では過渡的であり、バイアスを示さなかった(5A/G及び4C/T)。ヌクレオチド7454でのGA転換は、インビボ継代で見られたが、この部位とその後の増加したプラークサイズとを相関させることはできず、これは、他の非鋳型変化が発生しないためである。さらに、より大きなプラーク(V5-2-P3)を生成したV5由来のウイルスの継代3の全ゲノム配列分析は、ブタを感染させるために使用されるピンポイントプラークを生成するV5ウイルス(V5-1-P3)とは異なる5'末端配列を示した。しかしながら、本出願人は、これらの変異は、ウイルス複製に致命的ではないことを結論づけ、何故なら、このウイルスは、ブタでの継代後、親のウイルスとほぼ同じ速度の成長でMARC-145細胞におけるwtサイズのプラークを生成したためである(図5A、6及び7)。

【0100】

非常に興味深いのは、V5、V5G7454A及びV6G7454Aの第三のインビトロ継代の配列分析が、PRRSVレプリカーゼ複合体が、ウイルス複製を受けながら、頻繁な移行、及び頻繁でない移行を発生させるようにすることを示唆すると思われるという事実である。これは、進化したウイルスレプリカーゼを反映しているようであり、その結果、PRRSVゲノムの新規なゲノム形態を生成し、次に、最適に「フィットする」ウイルスをもたらす、他の変異体の中でそれらのコンピテンスを評価する。これらの観察はまた、インビボでのPRRSVの連続的な継代中に見られた(Changら、J. Virol., 76:4750-63(2002))。現在の配列決定の努力は、より強固な複製が検出される場合、後期の継代の全長ゲノムを調べることである。最後に、現在、PRRSV菌株VR-2332レプリカーゼは、全長vRNAを生成するのと同時に容易に異常形態を合成することは明らかである。このプロトタイプの菌株は、1992年に単離され特徴づけられているが、複製適性の段階的な獲得において独特であってもよく、より最近の感染性クローンを生成する他の研究者は、同じ効果を観察していない(Truongら、Virology, 325:308-319(2004))。異常形態の役割、及び活発なウイルス複製の同時出現は、PRRSV進化における異常形態の有意な役割があることを示唆する。

【0101】

実施例2

一見したところ新規なPRRSVの多くの毒性分離体は、最近、米国ミネソタ州において同定された。ORF5ヌクレオチド配列分析及びMinnesota Veterinary Diagnostic Laboratory PRRSVデータベース(>5000分離体)との比較は、分離体がタイプ2系統であるが、以前の分離体より有意に異なっていたことを示した。さらに、それらは、以前に、1990年代初めにカナダ(Mardassiら、J. Gen. Virol., 75:681-685(1994))及び1998年にミネソタ州で見られた分離体と最も密接して関連していた。ORF5の制限断片の長さ多形(RFLP)分析はまた、それらが、1-8-4分離体(Wesleyら、J. Vet. Diagn. Invest., 10:140-144(1998))として知られるこれらの初期の場合と同じウイルス群に属することを示し、したがって、MN184と命名された。以前に単離された1つのMN PRRSV分離体を除いて全てとは顕著に異なっているため、これらの新規な分離体の2つは、ブタの肺胞マクロファージ(

PAM)、宿主細胞にちょうど1回増幅し、全長ゲノム分析は、MN184A及びMN184Bとして記されるウイルスにおいて完了した。これらの2つの分離体は、2つの分離形態から異なる時間に回収した。

【0102】

材料及び方法

MN184分離体を配列決定するために、ウイルスRNA(vRNA)をPRRSV感染させた細胞上清から、QIAmp(登録商標)Viral RNA Mini Kit(Qiagen, Valencia, CA)を用いて抽出し、RT-PCRを行った(Qiagen(登録商標)One Step RT-PCR Kit)。プライマー(必要に応じて利用可能である)は、GenBankに寄託されているPRRSVの異なる菌株の公開された配列及び新規に生成したMN184配列に基づいて、設計した。2つのPRRSV分離体の5'ヌクレオチド配列は、5'-Full RACE Core Kit(TaKaRa Bio, Madison, WI)を用いて誘導した。3'-RACEは、SMART(商標)RACE cDNA Amplification Kit(Clontech, Mountain View, CA)を用いて行った。RT-PCR産物は、ゲル精製し(QIAquick(登録商標)、Qiagen)、pGEM-Tベクター(Promega, Madison, WI)にクローニングし、各RT-PCRについて3~5個のクローンを配列決定に選んだ。ヌクレオチド配列決定は、PCR特異的プライマー又はSP6及びT7プロモータープライマーをコードするベクターを用いて両方法で完結した。産物をABI377自動化DNA断片解析装置を用いた配列決定のためにミネソタ大学のAdvanced Genetic Analysis Centerに寄託した。少なくとも3倍のゲノム範囲を示す質の高い配列を得た。配列データを集め、GeneTool配列分析プログラム(BioTools Inc., Edmonton, Alberta CA)及びLasergen(DNA STAR, Madison, Wis.)を用いて解析した。

【0103】

複数の配列整列は、CLUSTALX(Thompsonら、Nucleic Acids Res., 24:4876-4882(1997))又はWisconsin Package Version 10.3(Accelrys Inc., San Diego, CA)を用いて生成した。全長PRRSV配列は、ClustalX(バージョン1.83.1; IUB DNA重量マトリックス、ギャップペナルティ15.00、ギャップ長ペナルティ6.66)を用いて整列させた。得られた整列は、さらに、Wisconsin Package Version 10.3 Distances Program(Jukes-Cantor間隔法、考慮される退化シンボルによる部分的マッチ)を用いて分析した。図10に関して、配列は、Wisconsin PackageのPileupプログラム(Blosum62 Scoring Matrix, Gap Weight=8, Length Weight=2, Weighted Ends)を用いて整列させた。整列は、Jalview(Clampら、Bioinformatics, 12:426-427(2004))を用いて、過剰について得点を取り、同一性パーセントについて特色を与えた。次に、グレースケール移行のためにAdobe(登録商標)Photoshop(登録商標)CS、バージョン8.0に移した。図11については、Wisconsin Package(Blosum62 Scoring Matrix, Gap Weight=8, Length Weight=2, Weighted Ends)のPileupプログラムを用いて整列させた。図12については、単一ペプチドは、SignalPサーバー(Bendtsenら、J. Mol. Biol., 340:783-795(2004))を用いて予測した。膜貫通領域は、PHDhtm(Rostら、Protein Sci., 5:1704-1718(1996))によって誘導し、潜在的なN-グリコシル化部位は、PROSITE(Bairochら、Nucleic Acids Res., 25:217-221(1997))によって、Predict Proteinサーバー(Rostら、Nucleic Acids

10

20

30

40

50

Res., 32:W321-W326(2003))を用いて同定した。配列は、Wisconsin Package (Blossum62 Scoring Matrix, Gap Weight=8, Length Weight=2, Weighted Ends)のPileupプログラムを用いて整列させた。

【0104】

結果

ゲノム整列は、これらの2つのPRRSVが、他の北アメリカタイプ2全長配列を決定したゲノムとは全く異なっていた(>14.5%のヌクレオチド非類似性)ことを示した。タイプ1(ヨーロッパ)全長配列との比較は、分離体が単にタイプ2の遺伝型起源であることを確かめた。それらは、EuroPRRSV及びLelystad菌株と約59%のヌクレオチドレベルの類似していただけであった。顕著には、これらのタイプ2のMN184分離株は、今日までに検出された最短のPRRSVゲノムを示した(15019ヌクレオチド、ポリAテールを含まない)。さらに、これらの分離体がタイプ1とタイプ2の菌株との間でウイルス組換えから誘導されたことを示唆する特定領域は識別されなかった。

10

【0105】

全長配列分析は、2つのMN184分離体が、現実的に遺伝的に異なることを示した。それらは、98.0%のヌクレオチド類似性又は2%の相違を共有した。非類似性のこの割合は、ミネソタにおいてそれらの突然の同時出現により期待されなかった。明確な最近の関連した分離体は、当時、本出願人のPRRSVデータベースでは見られなかった。表6は、2つの分離体の間の詳細なヌクレオチド及びアミノ酸比較を示し、図9は、これらの2つの菌株の間で見られたアミノ酸相違を記す。これらの分離体の両方は、ゲノムのいくつかの領域で、主に、ORF1の予測したnsp2流域にヌクレオチド縮重を有していた(表6)。ヌクレオチド縮重がこれらの分離体で見られたという事実は、PRRSVが、しばしば関連はするが区別されるウイルス配列と呼ばれるいくつかの個々の種で、感染した動物で作られることを示唆した。

20

【0106】

【表 6】

表 6. 個々の PRRSV ゲノム領域及び翻訳されたタンパク質、各領域で検出された縮重塩基の数の詳細な解析。縮重は、3 以上のトレースファイルの個別のトレースファイルに基づいて特定の塩基について検出される 1 を超えるヌクレオチドとして定義される。

領域	塩基	ヌクレオチド の長さ	%ヌクレオチド 類似性	%ヌクレオチド 同一性	縮重塩基の数 (184A/184B)	アミノ酸 の長さ	%アミノ酸 類似性	%アミノ酸 同一性
5' UTR	1-190	190	99.5	98.9	1/0	-	-	-
ORF1A	191-7309	7119	98.5	96.7	16/109	2372	96.8	96.5
NSP1a	191-688	498	98.8	98.5	1/0	166	97.6	97.6
NSP1b	689-1339	651	98.3	97.5	2/3	217	97.2	95.9
NSP2	1340-3886	2547	98.0	94.6	10/76	849	94.2	94.2
NSP3	3887-5224	1338	98.7	98.7	0/0	446	99.3	98.9
NSP4	5225-5836	612	98.5	96.4	0/13	204	97.1	97.1
NSP5	5837-6346	510	99.2	95.3	3/17	170	97.1	97.1
NSP6	6347-6394	48	100.0	100.0	0/0	16	100	100
NSP7	6395-7171	777	99.3	99.3	0/0	259	99.6	99.2
NSP8	7172-7309	138	99.3	99.3	0/0	46	97.6	97.6
ORF1B	7306-11679	4374	99.2	98.9	5/4	1457	99.5	99.2
NSP9	7288-9225	1938	98.9	98.8	1/1	646	99.4	98.9
NSP10	9226-10548	1323	99.3	98.9	3/3	441	99.8	99.3
NSP11	10549-11217	669	99.3	99.3	0/0	223	99.5	99.5
NSP12	11218-11679	462	99.6	99.4	1/0	153	99.3	99.3
ORF2a/GP2	11681-12451	771	99.0	98.3	1/0	222	98.0	97.3
ORF2b/E	11686-11907	222	99.6	99.6	0/0	73	100	100
ORF3/GP3	12304-13068	765	98.6	98.6	0/0	254	97.6	97.6
ORF4/GP4	12849-13385	537	98.5	98.5	0/0	178	98.9	98.9
ORF5/GP5	13396-13998	603	97.8	97.7	1/0	200	96.5	96.5
ORF6/M	13983-14507	525	99.6	97.4	0/0	174	100	100
ORF7/N	14497-14868	372	98.9	98.9	0/0	123	97.6	97.6
3' UTR	14869-15019	151	100	98.0	1/1	-	-	-

【0107】

他の PRRSV 菌株とは最も非類似性を示したこれらの MN184 分離体の個別の領域をより密接に特定するために、タイプ 2 のウイルスゲノムの長さにおける相違を説明する領域を与えるために、これらの 2 つの分離体は、プロトタイプのタイプ 2 菌株 VR-2332 の配列と比較した。2 つの分離体との間の相違は、分離株 MN184A より菌株 VR-2332 に僅かに増加した類似性を有する分離体 MN184B と再度識別することができる。VR-2332 とのヌクレオチド及びアミノ酸比較は、個々の MN184 分離株領

10

20

30

40

50

域がそれぞれ81.5～94.7%及び78.4～100%まで変化したが、ORF5（それぞれ86.4～86.7%及び87.0～87.5%）、予測されたnsp1β（それぞれ83.8～84.0%及び84.8%～85.4%）及びnsp2（それぞれ81.5～85.5%及び78.4～79.5%）に対応する領域は、最も変化可能である。最も興味深いのは、予測されたnsp2ゲノム領域だけが、ヌクレオチドの長さにおいて相違を示し、下記に詳述するように、MN184分離株の両方が同じnsp2欠失を有したことを示したことである。この比較はまた、5'及び3'UTRが、ゲノムの最も保存された領域（それぞれ94.7%及び94.0%）であることを示し、ウイルス複製及び転写に重要な領域における配列保存を示す。

【0108】

ORFは、異種のPRRSV構造タンパク質（GP5）をコードし、多くの場合、PRRSV診断的同定（Kapurら、J. Gen. Virol., 77:1271-1276（1996））に用いられる。GP5は、エンドドメイン及びエクトドメインを含む予測される3つの膜貫通型タンパク質である。30個のアミノ酸エクトドメインは、通常、2つの超可変領域によって結合される少なくとも2つのN-グリコシル化部位を含む短高度に保存されたドメインから構成される。この30個のアミノ酸領域の高度に保存されたドメインは、タイプ2菌株におけるウイルス接着エピトープをコードすることで示されている（Plagemann, Virology, 290:11-20（2001）；Ostrowskiら、J. Virol., 76:4241-4250（2002）；Plagemannら、Arch. Virol., 147:2327-2347（2002））。同じセットの全長ゲノムのGP5、及びカナダ（IAF-93-653, IAF-Klop）及びミネソタで1998-1999に（98-3298、98-3403、99-3584）で同定された元のRFLP184分離体を整列させる（図10）。PRRSV GP5の整列は、新規なMN184分離体及び他の非RFLP184タイプ2菌株との間で82.5%～87.7%の範囲でアミノ酸同一性を示した。興味深いことに、新規なMN184分離体及び従来のRFLP184分離体との間のアミノ酸の相違は、極めて大きく（5.7%～12.2%）、したがって、新規なRFLP184ウイルスの明確な起源を検出しなかった。この制限的な整列は、観察された大部分のアミノ酸の相違が、超可変領域に見出されたことを示す（図10）。2つの保存されたN-グリコシル化部位は、分離体MN184Bにおけるアミノ酸44をコードする検出されたヌクレオチド縮重を除いて、MN184分離体で維持されていた。

【0109】

Nsp1βは、パパイン様システインプロテアーゼ（den Boonら、J. Virol., 69:4500-4505（1995））をコードする。MN184分離体と必須的なセットの利用可能なタイプ2のnsp1β配列、並びにタイプ1菌株EuroPPRRSV及びLelystadのアミノ酸整列は、完了した（図11）。nsp1βタンパク質は、多数の完全に保存されたアミノ酸を有し、保存された触媒残基は、全ての配列決定されたゲノムで維持されていたden Boonら、J. Virol., 69:4500-4505（1995）。整列は、アミノ酸類似性によって整理され、MN184分離体は、他の配列決定された全長タイプ2配列よりもタイプ1菌株に類似していることを示す。特に、5個のアミノ酸（図11のボックス）は、直接的にタイプ1菌株を模倣する。しかしながら、他の必須的なタイプ2配列において保存されたアミノ酸はまた、大部分、MN184分離体に保存されていたが、散在したアミノ酸及びアミノ酸類似性（84.8～85.4%）はこれまで明らかにされたというよりはより発散的なタイプ2タンパク質を示した。したがって、この整列は、PRRSVの複製サイクルに重要であってもよいnsp1βの維持された残基をさらに定義する。

【0110】

nsp2の必須的な配列のアミノ酸整列は、対の同定によって整列され、図12に示される。高度に保存されたコモトリプシン様システインプロテアーゼ（PL2）ドメインは、N末端に存在し、従来、ウマ動脈炎ウイルス（EAV）nsp2との整列によって予期

10

20

30

40

50

された (Snijderら、J. Gen. Virol., 79:961-979 (1998); Ziebuhrら、J. Gen. Virol., 81:853-879 (2000))。このタンパク質のC末端近傍に3~4個の予想される膜貫通ドメインがあるが (McGuffinら、Bioinformatics, 16:404-405 (2000))、正確なC末端切断部位は、実験的には決定されていない。C末端切断部位の2つの予想が提案され、1つは、VR-2332 nsp2アミノ酸980のG|G (Allenderら、J. Gen. Virol., 80:307-315 (1999))、及び他は、アミノ酸1197 (Ziebuhrら、J. Gen. Virol., 81:853-879 (2000)) であるが、このタンパク質内にはいくつかの完全に保存されたG|Gダブレットが存在する (VR-2332 nsp2アミノ酸646、980、1116、1196、1197; 図12の下向きの矢印)。従来の作業はまた、予測されたnsp2タンパク質は、プロリンに富み、複数の潜在的なB細胞エпитープを含むことを示した (Oleksiewiczら、J. Virol., 75:3277-3290 (2001); Fangら、Virus Res., 100:229-235 (2004); Roppら、J. Virol., 78:3684-3703 (2004))。PRRSV nsp2 (VR-2332 nsp2アミノ酸148-880) の大きな中間の領域は、指定された機能はないが、長さにおいて非常に可変的である。さらに、配列決定されたPRRSVのタイプ1とタイプ2菌株との間の長さの相違は、nsp2のこの可変の中間領域に対してマップした (図12)。これまで、配列決定されたタイプ1ゲノムは、最大のタイプ2 PRRSV (Meulenbergrら、Virology, 192:62-72 (1993); Fangら、Virus Res., 100:229-235 (2004)、Roppeら、J. Virol., 78:3684-3703 (2004)) よりも313-364塩基短いことが示された。しかしながら、複数の配列整列は、MN184ゲノムがこれまで最短の予測されたnsp2 (2547bp) を含み、プロトタイプのタイプ2菌株VR-2332よりも393bp短いことを確実にした。さらに、それは、111、1及び19個のアミノ酸からなる欠失サイズを有する翻訳タンパク質における3つの不連続な欠失を含み、それぞれ、PRRSV菌株VR-2332 nsp2におけるアミノ酸位置324-434、486及び505-523に対応する (図12)。3つの欠失は、いくつかのプロリン残基及びB細胞エпитープの欠失をもたらす。これらの欠失に加えて、他のタイプ2菌株由来のnsp2アミノ酸配列における有意な変更はまた見られ、時として、同じ相対的位置で見られるタイプ1アミノ酸に対応する (図12)。2つのPRRSV遺伝子型のnsp2の予測されたタンパク質の比較は、タイプ2ウイルスのアミノ酸同一性が66%~99%の範囲であり、タイプ1では88~90%であったことを示し、遺伝子型の間では非常にことなっていた (<45%類似性)。特に、MN184分離体は、全てのタイプ2nsp2の予測されたタンパク質に対して66~80%アミノ酸同一性を示し、タイプ1菌株に対してはたった43~45%同一性であった。図12における複数の配列整列を調査すると、両遺伝子型における挿入又は欠失の全ての場合が、この超可変中間領域で発生することにも気が付いた。この点については、Shenら (Arch. Virol., 145:871-883 (2000)) は、最初に、PRRSV北アメリカタイプ2菌株SPが、PRRSV VR-2332 nsp2のアミノ酸813と814との間の位置に対して36のアミノ酸の独特な挿入を有することを報告した。別の研究者は、PRRSV分離体HB-2 (sh)/2002nsp2におきえる466~477位置で独特の12アミノ酸欠失を見出した (Gaoら、Arch. Virol., 149:1341-1351 (2004))。17アミノ酸欠失は、菌株LVと比較すると、新規に同定したヨーロッパ様PRRSV分離体で起こった (Fangら、Virus Res., 100:229-235 (2004); Roppら、J. Virol., 78:3684-3703 (2004))。変異の例は、アミノ酸の同じストレッチに沿って常に発生しなかったが、MN184分離体及び他のタイプ2ウイルスの間に見られる欠失は、タイプ1と他のタイプ2 PRRSVとの間で検出された最大の欠失の大部分を包含する。これらのデータの全ては、nsp2 ORFが、PRRSVの複製に必要であり得る保存さ

10

20

30

40

50

れたプロテアーゼモチーフ及び予測された膜貫通の長さの領域を含むが、大きな中間セクションにおける変異に非常に感受性であることを示唆した。

【0111】

184RFLPパターンを反映するミネソタにおけるPRRSVのフィールド分離体の突然の出現は、未だにミステリーであるが、このイベントの因果関係は、現在でも実現されている。Minnesota Veterinary Diagnostic Laboratoryは、現在、ORF5配列リクエストの全体数の約4分の1由来の類似した184RFLP分離体の日常的な配列決定を行っている。さらに、184RFLPパターンは、現在、ミネソタだけでなく、アイオワ、ウィスコンシン、サウスダコタ、カンザス、ミズーリ、イリノイ、ネブラスカ、ケンタッキー、オクラハマ、及びワイオミングでも同定されている。2つの分離体からの全長の配列を誘導するために選択し、それは、これが単独以上のウイルスタイプであり得るかどうかを理解し、そして、担当の病理学者によって報告されるように、分離体MN184Aと診断されたブタの群れが、分離体MN184Bで感染した群れよりもPRRSの穏やかなケースで示されたという事実を理解するために必要であったためである。菌株は、ケース提示を確実にするために無傷の動物に接種され、分離体MN184Bが、ゲノムを解析する場合に検出されたより多くの縮重を有し、これが報告された疾患の重症度を反映するかもしれないことに気が付くことは興味深い。

10

【0112】

このゲノム解析は、この分野に存在する巨大なヌクレオチド及びアミノ酸配列バリエーションの理解を増した。このバリエーションを駆動する因子は、ブタが現在管理される方法、ブタ及びイノシシの州間及び国際的な輸送、異なるPRRSV分離体の群れ内での混合、及びウイルスそれ自体の性質と関連してもよい、全ゲノム配列発生はまた、ゲノムバリエーション上のどこが容認されるのか、及びどの領域がより保存されているかの監視を可能にする。この試験の結果として、以前の公開(Roppら、J. Virol., 78:3684-3703(2004))と同様に、nsp2、nsp1β及びORF5が異常に汎用なタンパク質であることを示す理解が浮かび上がっている。

20

【0113】

この試験はまた、nsp2サイズが、もはや2つのPRRSV遺伝子型の間で区別するために用いることができないという明確な証拠を提供している。nsp2は、3つの不連続な欠損を有するタイプ2ゲノムを示すように進化し、これまで最短のゲノム(15,019kb)へと導くという新規な見解は、PRRSVが、重要でないゲノム領域を排除し、ゲノムをよりコンパクトにするように進化していることを示唆する。最後に、PRRSVにおける遺伝子バリエーションの重要性は、現在、推量され得るだけであるが、ORF5、nsp1β、及びnsp2に見られる進化的変化は、選択圧中のPRRSVの生物学的適性に合理的には関連しなければならない。

30

【0114】

本明細書において引用された全ての特許、特許出願、及び刊行物の完全な開示、及び電氣的に利用可能な材料(例えば、GenBank及びRefSeqへのヌクレオチド配列の寄託、例えば、SwissProt、PIR、PRF、PDBへのアミノ酸配列の寄託、GenBank及びRdfSeqへの注釈付きのコード領域からの翻訳)は、参照により援用される。前述の詳細な説明及び実施例は、理解の明快さだけのために与えられる。不要な限定はそこから理解されるべきものではない。本発明は、示され及び記載された正確な詳述に限定されず、当業者に明確なバリエーションは、特許請求の範囲によって定義される発明に含まれる。

40

【0115】

他に指示がなければ、明細書及び特許請求の範囲に用いられる成分量、分子量などを示す全ての数は、用語「約」によって全ての場合に修飾されるものと理解されるべきである。したがって、これに反して他に指示がなければ、明細書及び特許請求の範囲に記載される数値パラメータは、本発明によって得られるべき所望の特性に依存して変化し得る近似

50

である。少なくとも、特許請求の範囲に均等論を限定する試みほどでなく、各数値パラメータは、少なくとも、報告された有意な桁の数値に照らして、一般的な多数の技術の適用によって、構築されるべきである。

【0116】

本発明の広範囲を記載する数値範囲及びパラメータは近似であるにもかかわらず、測定の実施例に記載される数値は、できるだけ正確に報告される。しかしながら、全ての数値は、本質的に、それぞれの試験測定に見出される標準的な誤差から必然的に得られる範囲を含む。

【0117】

全ての見出しは、読者の利便性のためであって、そのように特定されなければ、見出し
10
に続くテキストの意味を限定するために用いられるべきではない。

【図面の簡単な説明】

【0118】

【図1A-1】感染性ポリヌクレオチドVR-V7（本明細書中ではV6G7475Aとも呼ばれる）の塩基配列（配列番号1）。

【図1A-2】感染性ポリヌクレオチドVR-V7（本明細書中ではV6G7475Aとも呼ばれる）の塩基配列（配列番号1）。

【図1A-3】感染性ポリヌクレオチドVR-V7（本明細書中ではV6G7475Aとも呼ばれる）の塩基配列（配列番号1）。

【図1A-4】感染性ポリヌクレオチドVR-V7（本明細書中ではV6G7475Aとも呼ばれる）の塩基配列（配列番号1）。
20

【図1B-1】感染性ポリヌクレオチドVR-V5の塩基配列（配列番号2）。

【図1B-2】感染性ポリヌクレオチドVR-V5の塩基配列（配列番号2）。

【図1B-3】感染性ポリヌクレオチドVR-V5の塩基配列（配列番号2）。

【図1B-4】感染性ポリヌクレオチドVR-V5の塩基配列（配列番号2）。

【図1B-5】感染性ポリヌクレオチドVR-V5の塩基配列（配列番号2）。

【図1C-1】感染性ポリヌクレオチドVR-V5G7475Aの塩基配列（配列番号3）。

【図1C-2】感染性ポリヌクレオチドVR-V5G7475Aの塩基配列（配列番号3）。
30

【図1C-3】感染性ポリヌクレオチドVR-V5G7475Aの塩基配列（配列番号3）。

【図1C-4】感染性ポリヌクレオチドVR-V5G7475Aの塩基配列（配列番号3）。

【図1C-5】感染性ポリヌクレオチドVR-V5G7475Aの塩基配列（配列番号3）。

【図1D-1】感染性ポリヌクレオチドVR-V6の塩基配列（配列番号4）。

【図1D-2】感染性ポリヌクレオチドVR-V6の塩基配列（配列番号4）。

【図1D-3】感染性ポリヌクレオチドVR-V6の塩基配列（配列番号4）。

【図1D-4】感染性ポリヌクレオチドVR-V6の塩基配列（配列番号4）。
40

【図1D-5】感染性ポリヌクレオチドVR-V6の塩基配列（配列番号4）。

【図1E-1】感染性ポリヌクレオチドMN184Aの塩基配列（配列番号5）。

【図1E-2】感染性ポリヌクレオチドMN184Aの塩基配列（配列番号5）。

【図1E-3】感染性ポリヌクレオチドMN184Aの塩基配列（配列番号5）。

【図1E-4】感染性ポリヌクレオチドMN184Aの塩基配列（配列番号5）。

【図1F-1】感染性ポリヌクレオチドMN184Bの塩基配列（配列番号6）。

【図1F-2】感染性ポリヌクレオチドMN184Bの塩基配列（配列番号6）。

【図1F-3】感染性ポリヌクレオチドMN184Bの塩基配列（配列番号6）。

【図1F-4】感染性ポリヌクレオチドMN184Bの塩基配列（配列番号6）。

【図1G-1】感染性ポリヌクレオチドNs p2 Δ324-434の塩基配列（配列番
50

号 7)。

【図 1 G-2】 感染性ポリヌクレオチド N s p 2 $\Delta 3 2 4-4 3 4$ の塩基配列 (配列番号 7)。

【図 1 G-3】 感染性ポリヌクレオチド N s p 2 $\Delta 3 2 4-4 3 4$ の塩基配列 (配列番号 7)。

【図 1 G-4】 感染性ポリヌクレオチド N s p 2 $\Delta 3 2 4-4 3 4$ の塩基配列 (配列番号 7)。

【図 1 H-1】 感染性ポリヌクレオチド N s p 2 $\Delta 3 2 4-5 2 3$ の塩基配列 (配列番号 8)。

【図 1 H-2】 感染性ポリヌクレオチド N s p 2 $\Delta 3 2 4-5 2 3$ の塩基配列 (配列番号 8)。

【図 1 H-3】 感染性ポリヌクレオチド N s p 2 $\Delta 3 2 4-5 2 3$ の塩基配列 (配列番号 8)。

【図 1 H-4】 感染性ポリヌクレオチド N s p 2 $\Delta 3 2 4-5 2 3$ の塩基配列 (配列番号 8)。

【図 1 I-1】 感染性ポリヌクレオチド N s p 2 $\Delta 5 4 3-6 3 2$ の塩基配列 (配列番号 9)。

【図 1 I-2】 感染性ポリヌクレオチド N s p 2 $\Delta 5 4 3-6 3 2$ の塩基配列 (配列番号 9)。

【図 1 I-3】 感染性ポリヌクレオチド N s p 2 $\Delta 5 4 3-6 3 2$ の塩基配列 (配列番号 9)。

【図 1 I-4】 感染性ポリヌクレオチド N s p 2 $\Delta 5 4 3-6 3 2$ の塩基配列 (配列番号 9)。

【図 1 J-1】 感染性ポリヌクレオチド N s p 2 $\Delta 6 3 3-7 2 6$ の塩基配列 (配列番号 10)。

【図 1 J-2】 感染性ポリヌクレオチド N s p 2 $\Delta 6 3 3-7 2 6$ の塩基配列 (配列番号 10)。

【図 1 J-3】 感染性ポリヌクレオチド N s p 2 $\Delta 6 3 3-7 2 6$ の塩基配列 (配列番号 10)。

【図 1 J-4】 感染性ポリヌクレオチド N s p 2 $\Delta 6 3 3-7 2 6$ の塩基配列 (配列番号 10)。

【図 1 K-1】 感染性ポリヌクレオチド N s p 2 $\Delta 5 4 3-7 2 6$ の塩基配列 (配列番号 11)。

【図 1 K-2】 感染性ポリヌクレオチド N s p 2 $\Delta 5 4 3-7 2 6$ の塩基配列 (配列番号 11)。

【図 1 K-3】 感染性ポリヌクレオチド N s p 2 $\Delta 5 4 3-7 2 6$ の塩基配列 (配列番号 11)。

【図 1 K-4】 感染性ポリヌクレオチド N s p 2 $\Delta 5 4 3-7 2 6$ の塩基配列 (配列番号 11)。

【図 1 L-1】 感染性ポリヌクレオチド N s p 2 $\Delta 7 2 7-8 1 3$ の塩基配列 (配列番号 12)。

【図 1 L-2】 感染性ポリヌクレオチド N s p 2 $\Delta 7 2 7-8 1 3$ の塩基配列 (配列番号 12)。

【図 1 L-3】 感染性ポリヌクレオチド N s p 2 $\Delta 7 2 7-8 1 3$ の塩基配列 (配列番号 12)。

【図 1 L-4】 感染性ポリヌクレオチド N s p 2 $\Delta 7 2 7-8 1 3$ の塩基配列 (配列番号 12)。

【図 1 M-1】 感染性ポリヌクレオチド N s p 2 $\Delta 3 2 4-7 2 6$ の塩基配列 (配列番号 13)。

【図 1 M-2】 感染性ポリヌクレオチド N s p 2 $\Delta 3 2 4-7 2 6$ の塩基配列 (配列番号 13)。

号13)。

【図1M-3】感染性ポリヌクレオチドNs p2 Δ324-726の塩基配列(配列番号13)。

【図1M-4】感染性ポリヌクレオチドNs p2 Δ324-726の塩基配列(配列番号13)。

【図2】PRRSV菌株VR-2332の全長クローンのアセンブリー。15.4ゲノムは、ウイルスのcDNAに存在する固有の制限酵素部位(FseI、AverII、BsrGI)を組み込んだ2つのセクション(I-IV)に増幅されるか又は挿入突然変異生成による5'及び3'末端(それぞれSphI、PacI)でPRRSV配列に加えられた。T7ポリメラーゼプロモーター及び2つの鋳型でないG残基及びT残基は、ウイルス配列の前に鉢した。pOK12ベクター(24)は、PacI部位、及び50個のヌクレオチドのポリアデノシンテールの肝炎デルタリボザイム下流を含むように修飾した。

【図3】感染性クローン又はブタ子孫のヌクレオチド変化の概略図。PRRSVゲノム構成の図は、全長ゲノム比較で示される。推定上の非構造タンパク質切断は、下向きの矢印で示されるORF1a及び1bの下に特定される。符号モチーフは、上向きの矢印のORF1a及び1bの下に特定され、PRRSVゲノム[パライン様システインプロテアーゼα及びβ(PCPα、PCPβ)；システインプロテアーゼ(CP)；セリン/3Cプロテアーゼ(SP/3CP)；ポリメラーゼ(POL)；システイン/ヒスチジンリッチ(C/H)；ヘリカーゼ(Hel)；アフリカツメガエルホモログ・ポリ(U)特異的エンドリボヌクレアーゼ(XendoU)；Ivanovaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101:12694-12699(2004)；Ziebuhrら、J. Gen. Virol., 81:853-879(2000)]においてそれらの配置を示す。ヌクレオチドの相違は、縦棒によって示される。1. VR-2332誘導ワクチン(Ingelvac(登録商標)MLV又はResppRRS, AF066183)と比較したwt菌株VR-2332(U87392)。2. pVR-V6G7475Aと比較したwt菌株VR-2332。3. インビボ継代のV5-1-P3(Sw612)と比較したpVR-V5。4. Sw612と比較したwt菌株VR-2332。詳細なヌクレオチド変化は、表4及び5に列挙される。

【図4】PRRSV感染後のブタのセロコンバージョン。成長しているブタに天然のwt菌株VR-2332(□)、Ingelvac(登録商標)MLV(×)、V5-1-P3(O)又は感染しな状態のもの(黒四角)で感染させた。指定した日に、血清試料を採取し、ヌクレオカプシドタンパク質に対する抗PRRSV抗体によるセロコンバージョンの指示に関してIDEXX Elisaによって試験した。

【図5】A. 全ての感染性クローン及びwt菌株VR-2332のP3子孫(第一系統)のプラークアッセイは、好ましくはと成るプラークサイズを示した。B. ブタ(Sw612)の成長後のV5-1-P3の子孫は、wt菌株VR-2332に類似したプラークを生成した。

【図6】A. 全ての感染性クローン及びwt菌株VR-2332のP3子孫(第二系統)のプラークアッセイは、第一系統ウイルス調製物とは異なるプラークサイズを示した。B. P4ウイルスの力価は、感染性クローン子孫が、類似のプラークサイズにもかかわらず、wt菌株VR-2332又はSw612のように複製していなかった。

【図7】wt菌株VR-2332(◆)、Sw612(黒三角)、pVR-HN(□)、pVR-V5(×)、pVR-V5G7475A(*), pVR-V6G7475A(O)のP3子孫は、実施例1に概説されるように一工程成長動力学について同時に調べた。wt菌株VR-2332及びSw612ウイルスは、全ての時間点で約10倍高い力価まで複製した。pVR-V6G7475Aは、天然のウイルス又はワクチンと比較してアミノ酸変化はなく、全ての他の感染性クローン子孫よりも全ての時間点でより高い力価まで複製するウイルスを生成した。各ウイルス調製に関する最終的な力価は、関連した表に列挙される。

【図8】pVR-V6G7475A及びSw612の異なる子孫経過のノーザンブロット

分析。初期のインビトロ転写は、異常性が、P1と同定の初期に生産させ、ゲノムRNAとともに、経過とともにより富むことを示す。しかしながら、転写物RNA (Tx)は、容易に検出可能な異常種を含まない。

【図9】A. PRRSVゲノムの図表示。推定の子構造タンパク質分解は、下向きの矢印によって表されるORF1a及び1b上に示される。符号モチーフは、ORF1a及び1bの下に特定され、PRRSVゲノム [パライン様システインプロテアーゼα及びβ (PL1) ; システインプロテアーゼ (PL2) ; セリン/3Cプロテアーゼ (3CL) ; ポリメラーゼ (RdRp) ; ヘリカーゼ (Hel) ; アフリカツメガエルホモログ・ポリ (U) 特異的エンドリボヌクレアーゼ (N) ; Ziebuhrら、2000年 ; Ivano vら、2004年 ; Gorbalenyaら、2006年においてそれらの配置を示す。B. MN184A及びMN184BのORF1タンパク質 (レプリカーゼ) の比較及び推定のプロセッシングの概略図。nsp2に見られる縮重は、比較に含まれる。C. MN184A及びMN184BのORF2-7タンパク質 (レプリカーゼ) の比較の概略図。

【図10】発散PRRSVのORF5アミノ酸配列。ダークグレーのボックスは、高いアミノ酸保存 (>80% ; 16~19残基の間が同一である) であり、中間グレー (>60% ; 12~15残基の間が同一である) 、明るいグレー (>40% ; 8~11残基の間が同一である) 、影のない (<40% ; 8残基未満が同一である) ボックスは、より少ない保存された残基を特定する。破線領域は、推定のシグナル配列を示し、ボックスの領域は、推奨される膜貫通領域を特定し、超可変領域が示され (HV-1及びHV-2) 、ビリオン中のタンパク質の推奨配向は、ボールドイタリックにおいて同定されている。Mタンパク質と相互作用することが提案される保存されたシステイン残基は、下向きの矢印 (↓) で特定される。1つの保存された推定のN-グリコシル化部位は、星によって特定され、超可変領域1は、菌株/分離株特異的なN-グリコシル化部位 (NxS/T) を含む。下記のGenBank全長配列は比較のために用いた : VR-2332 (U87392) 、 Ingelvac MLV (AF066183) 、 01NP1.2 (DQ056373) 、 PL97-1 (AY58524) 、 PL97-1 (AY58524) 、 PA-8 (AF186348) 、 SP (AF184212) 、 BJ-4 (AF331831) 、 HN1 (AY457635) 、 16244B (AF046869) 、 HB-1 (AY150312) 、 HB-2 (AY262352) 、 CH-1a (AY032626) 、 P129 (AD94042) 、 JA142 (AY424271) 、 SDPRRS-01-08 (AY375474) 、 EuroPRRSV (AY366525) 、 Lelystad (M96262) 、 IAF-93-653 (U64931) 、 IAF-Klop (AY184209) 、 98-3298 (DQ306877) 、 98-3403 (DQ306878) 、 99-3584 (DQ306879) 。

【図11】発散PRRSVのNsp1βアミノ酸配列整理。図の誘導及び色スキームは、図10の凡例に説明されている。2つの完全に保存された推定の触媒残基は星によって特定され、ボックスのアミノ酸は、タイプ1分離体及びEAVを含むMN184配列保存を特定する。提案される切断部位は、下向きの矢印 (↓) によって特定される。

【図12A】発散PRRSVのNsp2アミノ酸配列。完全に保存された推定のシステインプロテアーゼ触媒残基 (Cys及びHis) は星によって特定され、ボックスのアミノ酸は、PRRSV及びEAV内のプロテアーゼ配列保存を意味する。提案される切断部位は、塗りつぶした矢印 (↓) によって特定される ; 追加の可能性のある切断部位は、破線の矢印にyって特定される ; シグナルペプチド、塗りつぶされたグレーのボックス ; 膜貫通領域、破線の黒色のボックス ; 潜在的なN-グリコシル化部位、アステリスク (*) によって特定される。図の誘導及びカラースキームは図10の凡例に説明されている。

【図12B】発散PRRSVのNsp2アミノ酸配列。完全に保存された推定のシステインプロテアーゼ触媒残基 (Cys及びHis) は星によって特定され、ボックスのアミノ酸は、PRRSV及びEAV内のプロテアーゼ配列保存を意味する。提案される切断部位は、塗りつぶした矢印 (↓) によって特定される ; 追加の可能性のある切断部位は、破線の矢印にyって特定される ; シグナルペプチド、塗りつぶされたグレーのボックス ; 膜貫

10

20

30

40

50

Fig. 1A-1

[illegible]

Fig. 1A-2

[illegible]

[illegible][illegible][illegible][illegible]

【図 1 E - 3】

Fig. 1E-3

GGATTGATGGACGCTCTGGGATTTTGAGTCGTGACCACTAAGAGGAAGTCGCACTTAGTGACAAATATACAGGCT
TGTGGCATTAGGGCTGGGATGCTCTGAAGTTGGCTTCCCTTACAGCTGCGACCTGTAGGGACACCCCTGAACTGGT
AAAAGGGTTTGGAAAACAAAGGTTTGGAGACATCTTACAAAGCCCTAGGACGACCTTGGAGGCGCCAGATAGTCGGG
CCGCTGCTGTACGGCTATTCGACCGCTGACTGATGGGCTCTCGTCTGGGACGACATAGGCTCCGGTGTGAG
TTGTATGTGGCAGATCTACAGGCTGTCTTGTAATACCTGTTCGAGGACAGCTGCCCTAAAGCTGTGCGGAGCA
CGGTTGTGAAAATGCTGCAITGAGAGACTCTTCAATAGTGTGTCAGCCAAAGTTTGTGTTGCCGGAGTCTCTCC
GCTCGTGGGAAATATCTGTTTGCCACGCTGGGCAAGTGCCCACTGTCTCATCGGCTCCACCTACCCGGCAAGAAT
TCCATGGCTGGAATAAACGGGAATAGGTTCCGGACAAGGACATTCAGAGATCCTTGAGTGCAGCTCTGTGTGCACA
GGCTGACGAGAACTGGCAGACGCTTACCCCTTGACCTCTCAAGAAAGCATTTGCGGGAAAGGAAAGAACGAGGACCA
TACTGGGTACCAATAACTTATCTGCTGGCTGGCCACGGGACGAGCTGAGTGCTTACCACGAGGCTTATGAAAAGGGT
TTTAACTGGCCATCGCCCTGGGAGAGCAAAATCAAGAGCTACAGACTCCGGTCTGGGACGATGCTTGGGCTGA
TCTTGGCTCTTGGGATGGGTCACTCCGGAGTTGGCTGGTGTGGCCGCACTCTCTTATGAATGCTGCTGGCTG
AGAGACCACTACCGTGATGTGCTGCAATGTGTCATGACTTATGTCACGAGTCCGGTGGGTGACTAAGAAGGT
GGCTGTCTCATCTGGTGCATCGATCACTCTGTATCAACACCATTTACAGTCTGTAATTTATGCGACGACATGCTGCT
CAGTACTCAAAAGTGGTCAACCAATGGTCTCTGTATCTCAGGACCAAGTAAAGTTTGAAGACATGCTTAAAGTTC
AGCCCTGATYGTCTACTCGAGATGCTGTGCTGTATGCGAGTCCCCACCAATGCGAAACTACACTGTGGGTGTGAG
CATCTGAATTTGATGGAGTTTCAAGAGGAGCAAGAGAACCACTTACTGAGTCTGCCATCTTCTTGGGTGTGAG
GATTAATGATGGGTGCACTATCCAAACGTCAGAGATTTCTGGAGCTTGTGCTTACCACATGAGGGGAAATG
TTTCTGAGTACAGCTCCGCTGCTGCATATCTCATGGAAGTGTGCTGTCTGGAGTAGAGCTGAATGGTTGAA
GAACTTGTGGTTGGAATGGGCTATGTGGCGGCGGGGTGATGCTTCCCGGCGCGCGCTTCTTCTATCCATGTG
GGAGAAGCTTAAGTCAATATGAGGGGAAGAGTCAAGGATGTGGGTATGCGGAGCTTGGGCGGATGTCACCTG
CCTGTGGTTGTGAGCTCTGTGTTTACACACTCACTTCAACAGATGTCAAGTCAATCTGGTGTGGCCACCTCGCA
GGTTCCAGGCTCTGTGATGAGTGGAAATCCCCATAGGGAAGGACAGAGGCTCTGGAATGAGTTTGAAGCAAGTCCC
GTATAAGCTCTCAGGACCTGCTCTCATGATGTGAGAGAGGCTCTCAACCTTGTACGAGGAGATATGAGCCGCT
GTGGTTGTGGTTCGCTTAGCGCGGGATGAGGAATGAGTTGATCTTACAGAGTGGTGTATTTCTAGACCGCTCTA
CTCCAACTCTGAMAGATCAAGTCAAGTGGTGTGCTCTTCAATGTTGGCCAGCAGATTTATCATCGGTCACCCGG
TGTGGGAAACATAGTGGCTCTGCTTGGCCGAGGAGTGGATGTTGCTGACGAAGCTGCTTCTGATGAGTGGT
ACATGATGAGCTTTGAGGACGCTGGCGGTTTAACTGCTGGGAGGAGCAAGCTGCAATTTCCCGTCCCTCCGCGAC
GGTCCGTGGTTCGATCTGGCCGCGGGGTGGTGTGCTGGCAAAACTCTGCTGACGAAGCTGGTATTAATGA
TCTTGTGTTCTTGGGCTTCTTAGCAAAACCACTCTCACTTGTGGGGAGTCTCAAAACCTCCACCAAGTGGGTTTTG
ATTCTCATCTGATTTCTTGTGACATATGCTGTGACAGTCAATTTGAAGCACTGTGAGATTTGAGCAAGACTCTGTGAT
GGCATCAACGAGCTACAGAGACAGCTTATGCTGATGCTTCAACCACTGCTGATCTATGAGAAAGCTCTGCA
ATATGGCGAAGTCTCAACCTTTACATAGGAGCGAGAGATGAGCTATATCACTTGACTCAAGTCAAGGCGCACAT
TTGATGTGGTACATGCTTGTGCTGCAAGGCTCAAGTGTGCTTCCGAAGAGCTCTTGTGCTATTACAGGCGAAGA
CATGCCATCTTGTGATGACCATATAGGACATGAGGAGGCTTATGATCTTCTGCAAAAAGCAAGCCGCTCAACT
GGGCTGCGACCAAGTGGGCAACTGATGTGTGAATAGAAATTAAGGAAGTACAGGCTTCCGCAAGCTCTGGGTAAATG
GTGACAAATTTAGGGCGACAGACAGCGGCTGTGGATGTTCTTCCGCGCACTTGTGCTGACAGAGGTGAGAGTCT
CAGCTCCGCAAGGTTGATGATTTCTGATCACTGATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TGGCCGACATCTGGCATGCTGAGCAGCAAGGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCCGACATAGCGCTGGGTGTATGCTGGGCTATATGGTGGGCGCTGGTGTGTTTAGGCAACCCCTGGGGTGTGTCA
TACTACTCTTCAAAATTTTGAAGGGGAGGCTCAAGTGTCTCGGAAGCGTCTTCAAGTCCGGCGAATGAGGTGG
TGTCCGGGAATCTTGTGACGACGGGAGGGAGGTTGGCGCTGCTCCCAACGCTCTTATGGGCACTCAAGGCA
CTACGCTGAGGGTGTGCTTCACTCACTCAAAATGCTTCCGCGCTTCTCCGCAAGGAATAGTGGGTGATGGG
TTGTCAGAGCCCGGAAAAGCAGCGAAAAGAGTGTGTATCTGACAGATGTGTATCTCCGAGCTTGAAGTCTALCTCCA
TCTTAAGACCTGTCTGATGTGGAATGTGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
CCTATTCCAACTCGAAGTGGCGATCTTCACTTGTGATCAACTGTCAAGTGGTGGTCTGATCTGCTTCTTAAAC
TCCAGCTGTACCTGGACGCTGATGGGCGCGCTTGCACAGAAAAGTGTGGTGGCTCACTTATGGGAGTGA
CCTCGAGTCAACCTTATGATTTAGGGGCAAGATTTATTTGTGATGTGCTAGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT

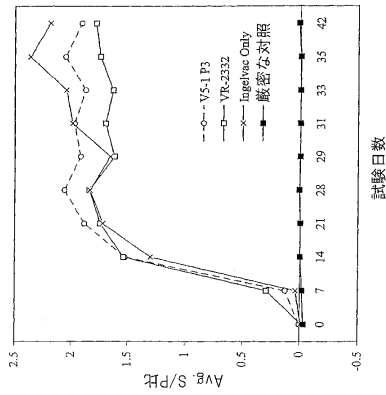
【図 1 E - 4】

Fig. 1E-4

AGATTCTGGGCTGGCGGAGTCTGCTGGAGACGCCAGTCAAGTACAGACACATTTGGGGTTTGACTGGATACAGCG
TACTTGTACGAGTGTCTGCGGAGATTTAGAGGATATACAGACGCTTCTGGCGGACAGAGAAAGAAAT
TTACAAGGCACTGCGCACCAGGCTGAACTGATTTCTCCCGGCTCATCGTGGACCACTTTGGGCGTAGACTGAA
ATGAAGTGGGGGCTGTGCAAGGCTTATTTGATAAAATTTGGGCACTGTTTGGGAGCTTTCAAGGATGTTTGGTGTCC
ATTGTTGATATCATATATTTTGGGCACTTTTGTTCGGCTTCAAACTGGCGTGGGTGGTGTGTTTGCATCAGATT
TTGTTGCTCGGCACTCTGCTTGGGCTCTGCGGTTCACTGAGCAATACAGAGATCTTAAGGATCTTCTTCC
CAGTGGCGGCGGAYATTCCACCTGGGGAACTAAACATCTCTGGGATGCTCTGCGACCAACAGGTGTGACCCCTAAT
TGAATGAATGGTGTGCGTGSAAATGATCCGATCATGGAACAGACAGGAGGCTGCTTGGAAACAGGTGGTGAACAGG
CAAGTGTCTGTGATAGTACGCTTGGATGTGGTGGCTCATTCAGACACCTTGGCCGCAAGACAGAGCTGATGAA
TACTTGGCTCCCGGCTGCCAATGCTGCGACACTCTGGGATGAGAGGGTCAAAATGATACATAGTGTATATAAGCTCT
AGAACAGTGTGTTGCTGTTTCCGACCTCAAGTCTGAGTCTCCGCGCAAGCTCATGATTTTCCGGAATGCTAAGTGTG
ATTCTCCATATCTCTCTTGGGCTCTGCTTACCTTTTGTGCTGTGTGGTGGGTGCTCAATATAGCTACT
GTTTTGTTTTCACTGTTAGGGGCAATTTTCTTCCGAGCTCAGATGACATACAGGCTGTCTCCCTGCCCTCACT
CGGACGGCGGCGCAGAGATCTACAGCACTAGTGGTCTTCTTGTGGTGAAGTAGGCAAGATGATGCTGGGAGAGCA
TCAAGCAGGATAGGATTTTGTGGTGGCGCTGGGCTCTGACGAGGAGGCACTGTACAGATGTTTACGGCTGGTGGGCT
TGTGCTCTTCAAGTACAGCGCCAGTTTCAACCCGAGATTTGGGATAGGGAATGTGGTAAAGTATGTTGATCTGAC
AGCATCAATTTATTTGGCTGTTTCAACGCGCAAAACCACTGCTTCCGATGACAGCTGTCAAGGCTGTGCTTCA
GACTTATACAGCATCAGGTGCAAGGCGAATGGTGTTCACCTGGAATGGTGGCGGCTTCTCTCTGCTGTGG
TTTTGAACCTCTTGGTCTTCAAGGCTGCTGCTGAGCGGTGTTTCAAGTGGCTGTCTGACATTAAGACCAAC
CAACCGAGCTGGAGGCTTGTGCTGCTTCAAGACATGATGTTCTTGAAGGATGGCAGCTGCTGTCTGAGGAGCTCG
AAAAGCGCTCAATGTGCGACGGGATAGGAAGCGCTTATACCTTACTGTACAGCAAGTAAAGCAATGAGAAATTTAT
TGACATGCTTGCAGCTCTGATGCTTCTTCTTGGCTTCTGAGCTTGCAGATGAGTGAAGAGATTTGAGTGTAT
TGTGCAATGCTGAGTACAGGCTGCTGCTGCTTCACTGAGCTTACAGGCTGAGTGAAGTGAAGTGTGAGTGTAT
TGTGCAATGCTGAGGATGCTGAGTGTGCTGCTGCTTCACTGAGCTTACAGGCTGAGTGAAGTGTGAGTGTAT
TTTGTGGTGTGATGCTGCTGCTTGTCTGCTGGCTGCTCAACGCGGAGCAGCAAGAGCTCCCATTAAGTGTAT
TTATAAMTTAAGATATGTGAGTGAATGGACAGACTGGCTGAACATCATTTTGAATGGAGTGGAGCTTGTGTTA
TCTTCTGCTGTGTGACTCATATTTGTTTCTACGGGCGCTCACTACAGGAGCTTCTTGACAGCTGGGCTGATACT
GTGCTGACGCGGAGTGTGCTTGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCTGCTCATAGGTTGAGCAAAATTTGATGCTGTGGCTGCTCATGATGACAGATTAAGCAAGTCTTCTTGGACACCA
AGGGAGAGCTCTATGCTGGGCTGACCCCTCATCATAGAGAAAGGGGTAAATTTGAGTGGAGTGAAGTGAAGTGA
CTCAAGAGAGTGTGCTTGTGGTGGCGGACCCCTGATGCAAAAGTTTCAAGGCAAGCACTGGGTGCTGATGTAGC
GACTCTGCAATGACAGCAGGCTCCACAAAGGTGATCTTGGATTTTCTATGACCACTACAGCATGATGATATGCT
CTTAAAGTGAAGTGTGGCGGCTGTAGGGCTTTTACACCTTGTGATTTTGAATGCTTGTTACCTGCTTGGGATTA
TGAATTTGTGCACTTTTCAAGACCAACAGAGTTGCACTCACTATGGGAGCAGATGTTGAGCAAGTGGGCTGATACT
TACGATTAAGAACTGTGGAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCTGCTCATAGGTTGAGCAAAATTTGATGCTGTGGCTGCTCATGATGACAGATTAAGCAAGTCTTCTTGGACACCA
AGGGAGAGCTCTATGCTGGGCTGACCCCTCATCATAGAGAAAGGGGTAAATTTGAGTGGAGTGAAGTGAAGTGA
CTCAAGAGAGTGTGCTTGTGGTGGCGGACCCCTGATGCAAAAGTTTCAAGGCAAGCACTGGGTGCTGATGTAGC
GACTCTGCAATGACAGCAGGCTCCACAAAGGTGATCTTGGATTTTCTATGACCACTACAGCATGATGATATGCT
CTTAAAGTGAAGTGTGGCGGCTGTAGGGCTTTTACACCTTGTGATTTTGAATGCTTGTTACCTGCTTGGGATTA
TGAATTTGTGCACTTTTCAAGACCAACAGAGTTGCACTCACTATGGGAGCAGATGTTGAGCAAGTGGGCTGATACT
TACGATTAAGAACTGTGGAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCTGCTCATAGGTTGAGCAAAATTTGATGCTGTGGCTGCTCATGATGACAGATTAAGCAAGTCTTCTTGGACACCA
AGGGAGAGCTCTATGCTGGGCTGACCCCTCATCATAGAGAAAGGGGTAAATTTGAGTGGAGTGAAGTGAAGTGA
CTCAAGAGAGTGTGCTTGTGGTGGCGGACCCCTGATGCAAAAGTTTCAAGGCAAGCACTGGGTGCTGATGTAGC
GACTCTGCAATGACAGCAGGCTCCACAAAGGTGATCTTGGATTTTCTATGACCACTACAGCATGATGATATGCT
CTTAAAGTGAAGTGTGGCGGCTGTAGGGCTTTTACACCTTGTGATTTTGAATGCTTGTTACCTGCTTGGGATTA
TGAATTTGTGCACTTTTCAAGACCAACAGAGTTGCACTCACTATGGGAGCAGATGTTGAGCAAGTGGGCTGATACT
TACGATTAAGAACTGTGGAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCTGCTCATAGGTTGAGCAAAATTTGATGCTGTGGCTGCTCATGATGACAGATTAAGCAAGTCTTCTTGGACACCA
AGGGAGAGCTCTATGCTGGGCTGACCCCTCATCATAGAGAAAGGGGTAAATTTGAGTGGAGTGAAGTGAAGTGA
CTCAAGAGAGTGTGCTTGTGGTGGCGGACCCCTGATGCAAAAGTTTCAAGGCAAGCACTGGGTGCTGATGTAGC
GACTCTGCAATGACAGCAGGCTCCACAAAGGTGATCTTGGATTTTCTATGACCACTACAGCATGATGATATGCT
CTTAAAGTGAAGTGTGGCGGCTGTAGGGCTTTTACACCTTGTGATTTTGAATGCTTGTTACCTGCTTGGGATTA
TGAATTTGTGCACTTTTCAAGACCAACAGAGTTGCACTCACTATGGGAGCAGATGTTGAGCAAGTGGGCTGATACT
TACGATTAAGAACTGTGGAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCTGCTCATAGGTTGAGCAAAATTTGATGCTGTGGCTGCTCATGATGACAGATTAAGCAAGTCTTCTTGGACACCA
AGGGAGAGCTCTATGCTGGGCTGACCCCTCATCATAGAGAAAGGGGTAAATTTGAGTGGAGTGAAGTGAAGTGA
CTCAAGAGAGTGTGCTTGTGGTGGCGGACCCCTGATGCAAAAGTTTCAAGGCAAGCACTGGGTGCTGATGTAGC
GACTCTGCAATGACAGCAGGCTCCACAAAGGTGATCTTGGATTTTCTATGACCACTACAGCATGATGATATGCT
CTTAAAGTGAAGTGTGGCGGCTGTAGGGCTTTTACACCTTGTGATTTTGAATGCTTGTTACCTGCTTGGGATTA
TGAATTTGTGCACTTTTCAAGACCAACAGAGTTGCACTCACTATGGGAGCAGATGTTGAGCAAGTGGGCTGATACT
TACGATTAAGAACTGTGGAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCTGCTCATAGGTTGAGCAAAATTTGATGCTGTGGCTGCTCATGATGACAGATTAAGCAAGTCTTCTTGGACACCA
AGGGAGAGCTCTATGCTGGGCTGACCCCTCATCATAGAGAAAGGGGTAAATTTGAGTGGAGTGAAGTGAAGTGA
CTCAAGAGAGTGTGCTTGTGGTGGCGGACCCCTGATGCAAAAGTTTCAAGGCAAGCACTGGGTGCTGATGTAGC
GACTCTGCAATGACAGCAGGCTCCACAAAGGTGATCTTGGATTTTCTATGACCACTACAGCATGATGATATGCT
CTTAAAGTGAAGTGTGGCGGCTGTAGGGCTTTTACACCTTGTGATTTTGAATGCTTGTTACCTGCTTGGGATTA
TGAATTTGTGCACTTTTCAAGACCAACAGAGTTGCACTCACTATGGGAGCAGATGTTGAGCAAGTGGGCTGATACT
TACGATTAAGAACTGTGGAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCTGCTCATAGGTTGAGCAAAATTTGATGCTGTGGCTGCTCATGATGACAGATTAAGCAAGTCTTCTTGGACACCA
AGGGAGAGCTCTATGCTGGGCTGACCCCTCATCATAGAGAAAGGGGTAAATTTGAGTGGAGTGAAGTGAAGTGA
CTCAAGAGAGTGTGCTTGTGGTGGCGGACCCCTGATGCAAAAGTTTCAAGGCAAGCACTGGGTGCTGATGTAGC
GACTCTGCAATGACAGCAGGCTCCACAAAGGTGATCTTGGATTTTCTATGACCACTACAGCATGATGATATGCT
CTTAAAGTGAAGTGTGGCGGCTGTAGGGCTTTTACACCTTGTGATTTTGAATGCTTGTTACCTGCTTGGGATTA
TGAATTTGTGCACTTTTCAAGACCAACAGAGTTGCACTCACTATGGGAGCAGATGTTGAGCAAGTGGGCTGATACT
TACGATTAAGAACTGTGGAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCTGCTCATAGGTTGAGCAAAATTTGATGCTGTGGCTGCTCATGATGACAGATTAAGCAAGTCTTCTTGGACACCA
AGGGAGAGCTCTATGCTGGGCTGACCCCTCATCATAGAGAAAGGGGTAAATTTGAGTGGAGTGAAGTGAAGTGA
CTCAAGAGAGTGTGCTTGTGGTGGCGGACCCCTGATGCAAAAGTTTCAAGGCAAGCACTGGGTGCTGATGTAGC
GACTCTGCAATGACAGCAGGCTCCACAAAGGTGATCTTGGATTTTCTATGACCACTACAGCATGATGATATGCT
CTTAAAGTGAAGTGTGGCGGCTGTAGGGCTTTTACACCTTGTGATTTTGAATGCTTGTTACCTGCTTGGGATTA
TGAATTTGTGCACTTTTCAAGACCAACAGAGTTGCACTCACTATGGGAGCAGATGTTGAGCAAGTGGGCTGATACT
TACGATTAAGAACTGTGGAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCTGCTCATAGGTTGAGCAAAATTTGATGCTGTGGCTGCTCATGATGACAGATTAAGCAAGTCTTCTTGGACACCA
AGGGAGAGCTCTATGCTGGGCTGACCCCTCATCATAGAGAAAGGGGTAAATTTGAGTGGAGTGAAGTGAAGTGA
CTCAAGAGAGTGTGCTTGTGGTGGCGGACCCCTGATGCAAAAGTTTCAAGGCAAGCACTGGGTGCTGATGTAGC
GACTCTGCAATGACAGCAGGCTCCACAAAGGTGATCTTGGATTTTCTATGACCACTACAGCATGATGATATGCT
CTTAAAGTGAAGTGTGGCGGCTGTAGGGCTTTTACACCTTGTGATTTTGAATGCTTGTTACCTGCTTGGGATTA
TGAATTTGTGCACTTTTCAAGACCAACAGAGTTGCACTCACTATGGGAGCAGATGTTGAGCAAGTGGGCTGATACT
TACGATTAAGAACTGTGGAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCTGCTCATAGGTTGAGCAAAATTTGATGCTGTGGCTGCTCATGATGACAGATTAAGCAAGTCTTCTTGGACACCA
AGGGAGAGCTCTATGCTGGGCTGACCCCTCATCATAGAGAAAGGGGTAAATTTGAGTGGAGTGAAGTGAAGTGA
CTCAAGAGAGTGTGCTTGTGGTGGCGGACCCCTGATGCAAAAGTTTCAAGGCAAGCACTGGGTGCTGATGTAGC
GACTCTGCAATGACAGCAGGCTCCACAAAGGTGATCTTGGATTTTCTATGACCACTACAGCATGATGATATGCT
CTTAAAGTGAAGTGTGGCGGCTGTAGGGCTTTTACACCTTGTGATTTTGAATGCTTGTTACCTGCTTGGGATTA
TGAATTTGTGCACTTTTCAAGACCAACAGAGTTGCACTCACTATGGGAGCAGATGTTGAGCAAGTGGGCTGATACT
TACGATTAAGAACTGTGGAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCTGCTCATAGGTTGAGCAAAATTTGATGCTGTGGCTGCTCATGATGACAGATTAAGCAAGTCTTCTTGGACACCA
AGGGAGAGCTCTATGCTGGGCTGACCCCTCATCATAGAGAAAGGGGTAAATTTGAGTGGAGTGAAGTGAAGTGA
CTCAAGAGAGTGTGCTTGTGGTGGCGGACCCCTGATGCAAAAGTTTCAAGGCAAGCACTGGGTGCTGATGTAGC
GACTCTGCAATGACAGCAGGCTCCACAAAGGTGATCTTGGATTTTCTATGACCACTACAGCATGATGATATGCT
CTTAAAGTGAAGTGTGGCGGCTGTAGGGCTTTTACACCTTGTGATTTTGAATGCTTGTTACCTGCTTGGGATTA
TGAATTTGTGCACTTTTCAAGACCAACAGAGTTGCACTCACTATGGGAGCAGATGTTGAGCAAGTGGGCTGATACT
TACGATTAAGAACTGTGGAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCTGCTCATAGGTTGAGCAAAATTTGATGCTGTGGCTGCTCATGATGACAGATTAAGCAAGTCTTCTTGGACACCA
AGGGAGAGCTCTATGCTGGGCTGACCCCTCATCATAGAGAAAGGGGTAAATTTGAGTGGAGTGAAGTGAAGTGA
CTCAAGAGAGTGTGCTTGTGGTGGCGGACCCCTGATGCAAAAGTTTCAAGGCAAGCACTGGGTGCTGATGTAGC
GACTCTGCAATGACAGCAGGCTCCACAAAGGTGATCTTGGATTTTCTATGACCACTACAGCATGATGATATGCT
CTTAAAGTGAAGTGTGGCGGCTGTAGGGCTTTTACACCTTGTGATTTTGAATGCTTGTTACCTGCTTGGGATTA
TGAATTTGTGCACTTTTCAAGACCAACAGAGTTGCACTCACTATGGGAGCAGATGTTGAGCAAGTGGGCTGATACT
TACGATTAAGAACTGTGGAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCTGCTCATAGGTTGAGCAAAATTTGATGCTGTGGCTGCTCATGATGACAGATTAAGCAAGTCTTCTTGGACACCA
AGGGAGAGCTCTATGCTGGGCTGACCCCTCATCATAGAGAAAGGGGTAAATTTGAGTGGAGTGAAGTGAAGTGA
CTCAAGAGAGTGTGCTTGTGGTGGCGGACCCCTGATGCAAAAGTTTCAAGGCAAGCACTGGGTGCTGATGTAGC
GACTCTGCAATGACAGCAGGCTCCACAAAGGTGATCTTGGATTTTCTATGACCACTACAGCATGATGATATGCT
CTTAAAGTGAAGTGTGGCGGCTGTAGGGCTTTTACACCTTGTGATTTTGAATGCTTGTTACCTGCTTGGGATTA
TGAATTTGTGCACTTTTCAAGACCAACAGAGTTGCACTCACTATGGGAGCAGATGTTGAGCAAGTGGGCTGATACT
TACGATTAAGAACTGTGGAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCTGCTCATAGGTTGAGCAAAATTTGATGCTGTGGCTGCTCATGATGACAGATTAAGCAAGTCTTCTTGGACACCA
AGGGAGAGCTCTATGCTGGGCTGACCCCTCATCATAGAGAAAGGGGTAAATTTGAGTGGAGTGAAGTGAAGTGA
CTCAAGAGAGTGTGCTTGTGGTGGCGGACCCCTGATGCAAAAGTTTCAAGGCAAGCACTGGGTGCTGATGTAGC
GACTCTGCAATGACAGCAGGCTCCACAAAGGTGATCTTGGATTTTCTATGACCACTACAGCATGATGATATGCT
CTTAAAGTGAAGTGTGGCGGCTGTAGGGCTTTTACACCTTGTGATTTTGAATGCTTGTTACCTGCTTGGGATTA
TGAATTTGTGCACTTTTCAAGACCAACAGAGTTGCACTCACTATGGGAGCAGATGTTGAGCAAGTGGGCTGATACT
TACGATTAAGAACTGTGGAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCTGCTCATAGGTTGAGCAAAATTTGATGCTGTGGCTGCTCATGATGACAGATTAAGCAAGTCTTCTTGGACACCA
AGGGAGAGCTCTATGCTGGGCTGACCCCTCATCATAGAGAAAGGGGTAAATTTGAGTGGAGTGAAGTGAAGTGA
CTCAAGAGAGTGTGCTTGTGGTGGCGGACCCCTGATGCAAAAGTTTCAAGGCAAGCACTGGGTGCTGATGTAGC
GACTCTGCAATGACAGCAGGCTCCACAAAGGTGATCTTGGATTTTCTATGACCACTACAGCATGATGATATGCT
CTTAAAGTGAAGTGTGGCGGCTGTAGGGCTTTTACACCTTGTGATTTTGAATGCTTGTTACCTGCTTGGGATTA
TGAATTTGTGCACTTTTCAAGACCAACAGAGTTGCACTCACTATGGGAGCAGATGTTGAGCAAGTGGGCTGATACT
TACGATTAAGAACTGTGGAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCTGCTCATAGGTTGAGCAAAATTTGATGCTGTGGCTGCTCATGATGACAGATTAAGCAAGTCTTCTTGGACACCA
AGGGAGAGCTCTATGCTGGGCTGACCCCTCATCATAGAGAAAGGGGTAAATTTGAGTGGAGTGAAGTGAAGTGA
CTCAAGAGAGTGTGCTTGTGGTGGCGGACCCCTGATGCAAAAGTTTCAAGGCAAGCACTGGGTGCTGATGTAGC
GACTCTGCAATGACAGCAGGCTCCACAAAGGTGATCTTGGATTTTCTATGACCACTACAGCATGATGATATGCT
CTTAAAGTGAAGTGTGGCGGCTGTAGGGCTTTTACACCTTGTGATTTTGAATGCTTGTTACCTGCTTGGGATTA
TGAATTTGTGCACTTTTCAAGACCAACAGAGTTGCACTCACTATGGGAGCAGATGTTGAGCAAGTGGGCTGATACT
TACGATTAAGAACTGTGGAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCTGCTCATAGGTTGAGCAAAATTTGATGCTGTGGCTGCTCATGATGACAGATTAAGCAAGTCTTCTTGGACACCA
AGGGAGAGCTCTATGCTGGGCTGACCCCTCATCATAGAGAAAGGGGTAAATTTGAGTGGAGTGAAGTGAAGTGA
CTCAAGAGAGTGTGCTTGTGGTGGCGGACCCCTGATGCAAAAGTTTCAAGGCAAGCACTGGGTGCTGATGTAGC
GACTCTGCAATGACAGCAGGCTCCACAAAGGTGATCTTGGATTTTCTATGACCACTACAGCATGATGATATGCT
CTTAAAGTGAAGTGTGGCGGCTGTAGGGCTTTTACACCTTGTGATTTTGAATGCTTGTTACCTGCTTGGGATTA
TGAATTTGTGCACTTTTCAAGACCAACAGAGTTGCACTCACTATGGGAGCAGATGTTGAGCAAGTGGGCTGATACT
TACGATTAAGAACTGTGGAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCTGCTCATAGGTTGAGCAAAATTTGATGCTGTGGCTGCTCATGATGACAGATTAAGCAAGTCTTCTTGGACACCA
AGGGAGAGCTCTATGCTGGGCTGACCCCTCATCATAGAGAAAGGGGTAAATTTGAGTGGAGTGAAGTGAAGTGA
CTCAAGAGAGTGTGCTTGTGGTGGCGGACCCCTGATGCAAAAGTTTCAAGGCAAGCACTGGGTGCTGATGTAGC
GACTCTGCAATGACAGCAGGCTCCACAAAGGTGATCTTGGATTTTCTATGACCACTACAGCATGATGATATGCT
CTTAAAGTGAAGTGTGGCGGCTGTAGGGCTTTTACACCTTGTGATTTTGAATGCTTGTTACCTGCTTGGGATTA
TGAATTTGTGCACTTTTCAAGACCAACAGAGTTGCACTCACTATGGGAGCAGATGTTGAGCAAGTGGGCTGATACT
TACGATTAAGAACTGTGGAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCTGCTCATAGGTTGAGCAAAATTTGATGCTGTGGCTGCTCATGATGACAGATTAAGCAAGTCTTCTTGGACACCA
AGGGAGAGCTCTATGCTGGGCTGACCCCTCATCATAGAGAAAGGGGTAAATTTGAGTGGAGTGAAGTGAAGTGA
CTCAAGAGAGTGTGCTTGTGGTGGCGGACCCCTGATGCAAAAGTTTCAAGGCAAGCACTGGGTGCTGATGTAGC
GACTCTGCAATGACAGCAGGCTCCACAAAGGTGATCTTGGATTTTCTATGACCACTACAGCATGATGATATGCT
CTTAAAGTGAAGTGTGGCGGCTGTAGGGCTTTTACACCTTGTGATTTTGAATGCTTGTTACCTGCTTGGGATTA
TGAATTTGTGCACTTTTCAAGACCAACAGAGTTGCACTCACTATGGGAGCAGATGTTGAGCAAGTGGGCTGATACT
TACGATTAAGAACTGTGGAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCTGCTCATAGGTTGAGCAAAATTTGATGCTGTGGCTGCTCATGATGACAGATTAAGCAAGTCTTCTTGGACACCA
AGGGAGAGCTCTATGCTGGGCTGACCCCTCATCATAGAGAAAGGGGTAAATTTGAGTGGAGTGAAGTGAAGTGA
CTCAAGAGAGTGTGCTTGTGGTGGCGGACCCCTGATGCAAAAGTTTCAAGGCAAGCACTGGGTGCTGATGTAGC
GACTCTGCAATGACAGCAGGCTCCACAAAGGTGATCTTGGATTTTCTATGACCACTACAGCATGATGATATGCT
CTTAAAGTGAAGTGTGGCGGCTGTAGGGCTTTTACACCTTGTGATTTTGAATGCTTGTTACCTGCTTGGGATTA
TGAATTTGTGCACTTTTCAAGACCAACAGAGTTGCACTCACTATGGGAGCAGATGTTGAGCAAGTGGGCTGATACT
TACGATTAAGAACTGTGGAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCTGCTCATAGGTTGAGCAAAATTTGATGCTGTGGCTGCTCATGATGACAGATTAAGCAAGTCTTCTTGGACACCA
AGGGAGAGCTCTATGCTGGGCTGACCCCTCATCATAGAGAAAGGGGTAAATTTGAGTGGAGTGAAGTGAAGTGA
CTCAAGAGAGTGTGCTTGTGGTGGCGGACCCCTGATGCAAAAGTTTCAAGGCAAGCACTGGGTGCTGATGTAGC
GACTCTGCAATGACAGCAGGCTCCACAAAGGTGATCTTGGATTTTCTATGACCACTACAGCATGATGATATGCT
CTTAAAGTGAAGTGTGGCGGCTGTAGGGCTTTTACACCTTGTGATTTTGAATGCTTGTTACCTGCTTGGGATTA
TGAATTTGTGCACTTTTCAAGACCAACAGAGTTGCACTCACTATGGGAGCAGATGTTGAGCAAGTGGGCTGATACT
TACGATTAAGAACTGTGGAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCTGCTCATAGGTTGAGCAAAATTTGATGCTGTGGCTGCTCATGATGACAGATTAAGCAAGTCTTCTTGGACACCA
AGGGAGAGCTCTATGCTGGGCTGACCCCTCATCATAGAGAAAGGGGTAAATTTGAGTGGAGTGAAGTGAAGTGA
CTCAAGAGAGTGTGCTTGTGGTGGCGGACCCCTGATGCAAAAGTTTCAAGGCAAGCACTGGGTGCTGATGTAGC
GACTCTGCAATGACAGCAGGCTCCACAAAGGTGATCTTGGATTTTCTATGACCACTACAGCATGATGATATGCT
CTTAAAGTGAAGTGTGGCGGCTGTAGGGCTTTTACACCTTGTGATTTTGAATGCTTGTTACCTGCTTGGGATTA
TGAATTTGTGCACTTTTCAAGACCAACAGAGTTGCACTCACTATGGGAGCAGATGTTGAGCAAGTGGGCTGATACT
TACGATTAAGAACTGTGGAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCTGCTCATAGGTTGAGCAAAATTTGATGCTGTGGCTGCTCATGATGACAGATTAAGCAAGTCTTCTTGGACACCA
AGGGAGAGCTCTATGCTGGGCTGACCCCTCATCATAGAGAAAGGGGTAAATTTGAGTGGAGTGAAGTGAAGTGA
CTCAAGAGAGTGTGCTTGTGGTGGCGGACCCCTGATGCAAAAGTTTCAAGGCAAGCACTGGGTGCTGATGTAGC
GACTCTGCAATGACAGCAGGCTCCACAAAGGTGATCTTGGATTTTCTATGACCACTACAGCATGATGATATGCT
CTTAAAGTGAAGTGTGGCGGCTGTAGGGCTTTTACACCTTGTGATTTTGAATGCTTGTTACCTGCTTGGGATTA
TGAATTTGTGCACTTTTCAAGACCAACAGAGTTGCACTCACTATGGGAGCAGATGTTGAGCAAGTGGGCTGATACT
TACGATTAAGAACTGTGGAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCTGCTCATAGGTTGAGCAAAATTTGATGCTGTGGCTGCTCATGATGACAGATTAAGCAAGTCTTCTTGGACACCA
AGGGAGAGCTCTATGCTGGGCTGACCCCTCATCATAGAGAAAGGGGTAAATTTGAGTGGAGTGAAGTGAAGTGA
CTCAAGAGAGTGTGCTTGTGGTGGCGGACCCCTGATGCAAAAGTTTCAAGGCAAGCACTGGGTGCTGATGTAGC
GACTCTGCAATGACAGCAGGCTCCACAAAGGTGATCTTGGATTTTCTATGACCACTACAGCATGATGATATGCT
CTTAAAGTGAAGTGTGGCGGCTGTAGGGCTTTTACACCTTGTGATTTTGAATGCTTGTTACCTGCTTGGGATTA
TGAATTTGTGCACTTTTCAAGACCAACAGAGTTGCACTCACTATGGGAGCAGATGTTGAGCAAGTGGGCTGATACT
TACGATTAAGAACTGTGGAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCTGCTCATAGGTTGAGCAAAATTTGATGCTGTGGCTGCTCATGATGACAGATTAAGCAAGTCTTCTTGGACACCA
AGGGAGAGCTCTATGCTGGGCTGACCCCTCATCATAGAGAAAGGGGTAAATTTGAGTGGAGTGAAGTGAAGTGA
CTCAAGAGAGTGTGCTTGTGGTGGCGGACCCCTGATGCAAAAGTTTCAAGGCAAGCACTGGGTGCTGATGTAGC
GACTCTGCAATGACAGCAGGCTCCACAAAGGTGATCTTGGATTTTCTATGACCACTACAGCATGATGATATGCT
CTTAAAGTGAAGTGTGGCGGCTGTAGGGCTTTTACACCTTGTGATTTTGAATGCTTGTTACCTGCTTGGGATTA
TGAATTTGTGCACTTTTCAAGACCAACAGAGTTGCACTCACTATGGGAGCAGATGTTGAGCAAGTGGGCTGATACT
TACGATTAAGAACTGTGGAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCTGCTCATAGGTTGAGCAAAATTTGATGCTGTGGCTGCTCATGATGACAGATTAAGCAAGTCTTCTTGGACACCA
AGGGAGAGCTCTATGCTGGGCTGACCCCTCATCATAGAGAAAGGGGTAAATTTGAGTGGAGTGAAGTGAAGTGA
CTCAAGAGAGTGTGCTTGTGGTGGCGGACCCCTGATGCAAAAGTTTCAAGGCAAGCACTGGGTGCTGATGTAGC
GACTCTGCAATGACAGCAGGCTCCACAAAGGTGATCTTGGATTTTCTATGACCACTACAGCATGATGATATGCT
CTTAAAGTGAAGTGTGGCGGCTGTAGGGCTTTTACACCTTGTGATTTTGAATGCTTGTTACCTGCTTGGGATTA
TGAATTTGTGCACTTTTCAAGACCAACAGAGTTGCACTCACTATGGGAGCAGATGTTGAGCAAGTGGGCTGATACT
TACGATTAAGAACTGTGGAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCTGCTCATAGGTTGAGCAAAATTTGATGCTGTGGCTGCTCATGATGACAGATTAAGCAAGTCTTCTTGGACACCA
AGGGAGAGCTCTATGCTGGGCTGACCCCTCATCATAGAGAAAGGGGTAAATTTGAGTGGAGTGAAGTGAAGTGA
CTCAAGAGAGTGTGCTTGTGGTGGCGGACCCCTGATGCAAAAGTTTCAAGGCAAGCACTGGGTGCTGATGTAGC
GACTCTGCAATGACAGCAGGCTCCACAAAGGTGATCTTGGATTTTCTATGACCACTACAGCATGATGATATGCT
CTTAAAGTGAAGTGTGGCGGCTGTAGGGCTTTTACACCTTGTGATTTTGAATGCTTGTTACCTGCTTGGGATTA
TGAATTTGTGCACTTTTCAAGACCAACAGAGTTGCACTCACTATGGGAGCAGATGTTGAGCAAGTGGGCTGATACT
TACGATTAAGAACTGTGGAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCTGCTCATAGGTTGAGCAAAATTTGATGCTGTGGCTGCTCATGATGACAGATTAAGCAAGTCTTCTTGGACACCA
AGGGAGAGCTCTATGCTGGGCTGACCCCTCATCATAGAGAAAGGGGTAAATTTGAGTGGAGTGAAGTGAAGTGA
CTCAAGAGAGTGTGCTTGTGGTGGCGGACCCCTGATGCAAAAGTTTCAAGGCAAGCACTGGGTGCTGATGTAGC
GACTCTGCAATGACAGCAGGCTCCACAAAGGTGATCTTGGATTTTCTATGACCACTACAGCATGATGATATGCT
CTTAAAGTGAAGTGTGGCGGCTGTAGGGCTTTTACACCTTGTGATTTTGAATGCTTGTTACCTGCTTGGGATTA
TGAATTTGTGCACTTTTCAAGACCAACAGAGTTGCACTCACTATGG

【図 4】

Fig. 4



【図 5】

Fig. 5A

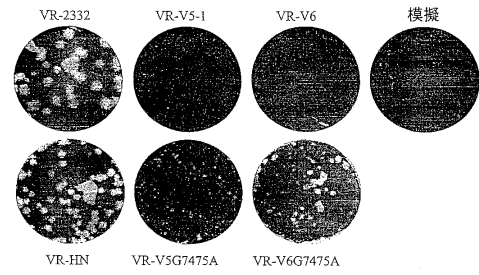
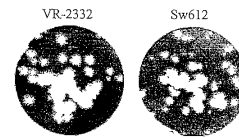


Fig. 5B



【図 6】

Fig. 6A

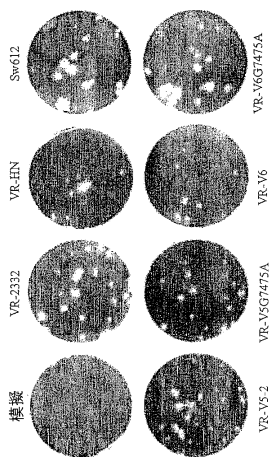


Fig. 6B

ウイルスカ面	VR-2332	Sw612	VR-HN	VR-V5-2	VR-V5-1	VR-V6	VR-V6G7475A	模擬
ウイルスカ面	2.5×10^5	9.8×10^4	1.5×10^4	9.8×10^3	2×10^3	1.5×10^3	3.25×10^3	

【図 7】

Fig. 7A

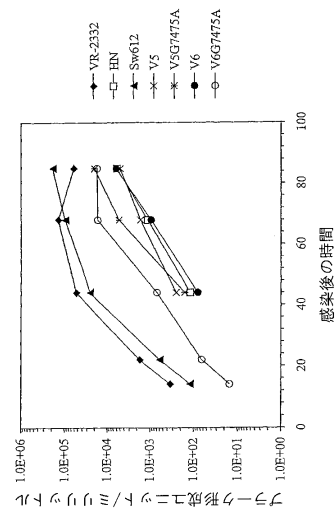
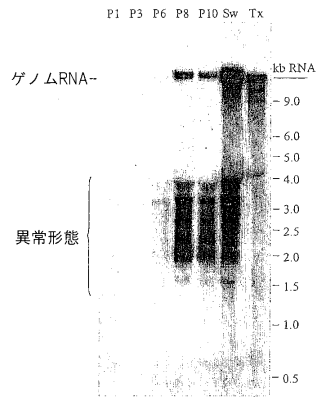


Fig. 7B

ウイルスカ面	VR-2332	Sw612	VR-HN	VR-V5	VR-V6	VR-V6G7475A	模擬
ウイルスカ面	8.12×10^4	2.0×10^4	5.5×10^3	5.0×10^3	4.4×10^3	1.9×10^4	

【図 8】

Fig. 8



【図 9 A】

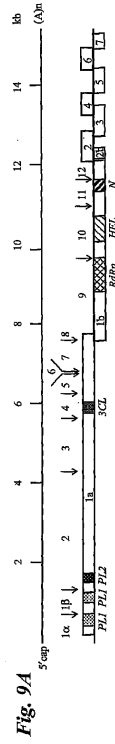


Fig. 9A

【図 9 B】

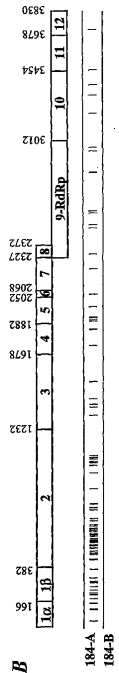


Fig. 9B

【図 9 C】



Fig. 9C

【図 11】

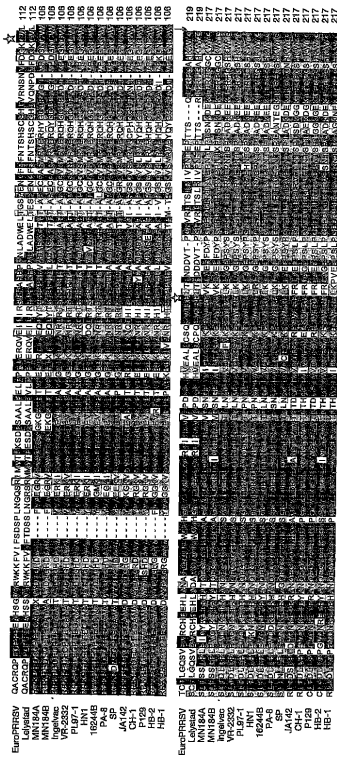


Fig. 11

【図 12 A】

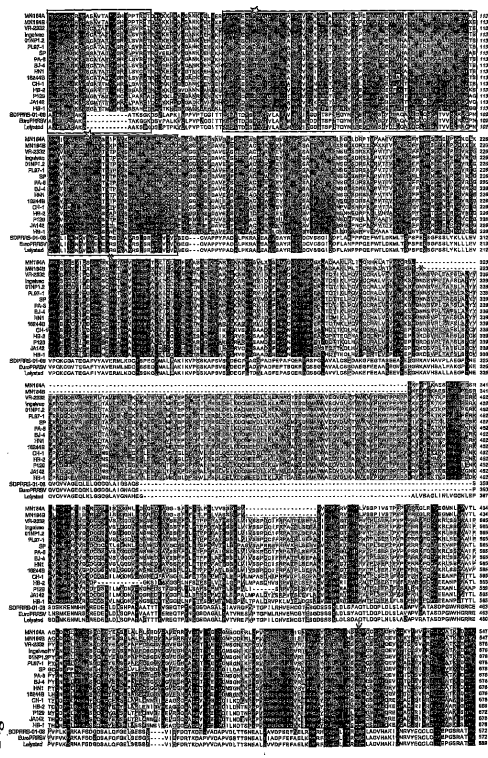


Fig. 12A

【図 12 B】

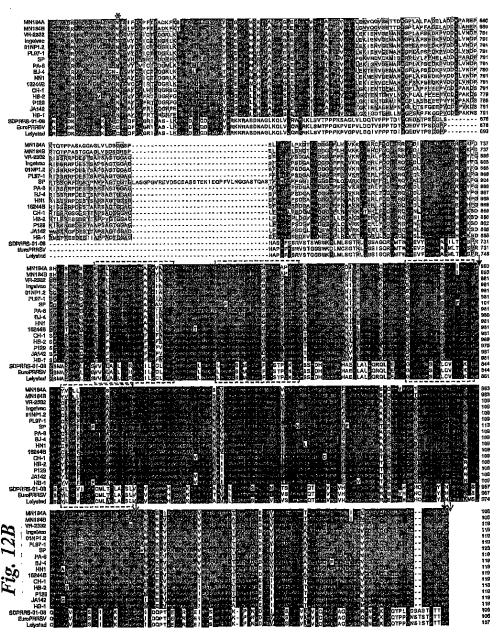


Fig. 12B

フロントページの続き

- (74)代理人 100108903
弁理士 中村 和広
- (74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
- (74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎
- (72)発明者 ファーバーグ, ケイ エス.
アメリカ合衆国, アイオワ 50010, エーズ, ブルックリッジ アベニュー 914
- (72)発明者 ハン, ジュン
アメリカ合衆国, ミネソタ 55108, セント ポール, ナップ アベニュー 1994
- (72)発明者 リュー, ゴンピン
アメリカ合衆国, ミネソタ 55126, セント ポール, ディア トレイル ウェスト 5175
- (72)発明者 ワン, ユウ
アメリカ合衆国, ミネソタ 55108, セント ポール, ギブス アベニュー 1313

審査官 鈴木 崇之

- (56)参考文献 特開2000-189178 (JP, A)
VIRUS RESEARCH, 2004年 3月, Vol.100, No.2, P.229-235, (DATABASE GenBank, [online], Accession No. AY375474, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/ay375474>>)
ARCHIVES OF VIROLOGY, 2004年 7月, Vol.149, No.7, P.1341-1351
ARCHIVES OF VIROLOGY, 2000年, Vol.145, No.5, P.871-883
JOURNAL OF VIROLOGY, 2003年 3月, Vol.77, No.6, P.3702-3711

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09
C12N 7/00-02
C07K 14/08
WPI
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed