

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-513753

(P2025-513753A)

(43)公表日 令和7年4月30日(2025.4.30)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/50 (2006.01)	C 1 2 N 15/50	Z N A 4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z 4 C 0 8 6
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 7
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全56頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2024-557969(P2024-557969)	(71)出願人 519011854
(86)(22)出願日 令和5年3月28日(2023.3.28)	ユニヴェルズイテート ベルン
(85)翻訳文提出日 令和6年11月26日(2024.11.26)	スイス連邦, 3 0 1 2 ベルン, フェア
(86)国際出願番号 PCT/EP2023/058069	ヴァルトゥングスディレクション ホッ
(87)国際公開番号 WO2023/186946	ハシュールストラッセ 6
(87)国際公開日 令和5年10月5日(2023.10.5)	(71)出願人 524360710
(31)優先権主張番号 22164874.4	インスティトゥート フュア ヴィロロギ
(32)優先日 令和4年3月28日(2022.3.28)	ー ウント イムノロギー(アイヴィーア
(33)優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁(EP)	イ) INSTITUT FUR VIROLO
(31)優先権主張番号 22201198.3	GIE UND IMMUNOLOGIE
(32)優先日 令和4年10月12日(2022.10.12)	(I V I)
(33)優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁(EP)	スイス連邦, 3 1 4 7 ミッテルホイゼ
(81)指定国・地域 AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ	ルン、ゼンセマツシュトラッセ 2 9 3
最終頁に続く	Sensemattstrasse 2
	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ワントゥーストップ(one-to-stop)弱毒化SARS-CoV-2ウイルス

(57)【要約】

本発明は、弱毒化SARS-CoV-2またはその断片をコードするポリヌクレオチドに関し、該ポリヌクレオチドは少なくとも20個のワントゥーストップ(one-to-stop)コドンを含む。ポリヌクレオチドはさらなる修飾を含んでいてもよく、弱毒化SARS-CoV-2に含まれていてもよい。本発明はさらに、ポリヌクレオチドの製造方法および医薬品、例えば、医療用途に関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

弱毒化ヒトコロナウイルスまたはその断片をコードするポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドが少なくとも20個のワントゥーストップ (one-to-stop) コドンを含み、

ここで、ワントゥーストップ (one-to-stop) コドンは、以下である：

- i) 天然のヒトコロナウイルスゲノムまたはその断片中の対応するコドンと比較して、異なるが同義のコドン；および
- ii) 終止コドンと1塩基だけが異なる、ポリヌクレオチド。

【請求項 2】

ポリヌクレオチドの断片が、対応するヒトコロナウイルス部分と組み合わせたとき、5000PFUコロナウイルス粒子でマウスを免疫した15日後に免疫応答を誘導し、21日後にWTヒトコロナウイルスでチャレンジし、35日後に測定されたときに、免疫応答の増大を誘導する、コロナウイルス粒子をコードする、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3】

請求項1または2に記載のポリヌクレオチドを製造する方法であって、以下の工程：

- a) 天然のヒトコロナウイルスゲノムのCDS、その断片またはcDNAクローンを提供すること；および
- b) 天然のヒトコロナウイルスゲノム、断片またはcDNAクローンの逆転写されたcDNA配列をそれぞれ改変すること、を含み、

ここで、前記改変は、天然のヒトコロナウイルスゲノム、断片または逆転写されたcDNA配列中の少なくとも20個のコドンを、少なくとも20個のワントゥーストップ (one-to-stop) コドンで置換することを含み、

ここで、ワントゥーストップ (one-to-stop) コドンは、以下である：

- i) 天然のヒトコロナウイルスゲノム、断片または逆転写されたcDNA配列中の対応するコドンと比較して、異なるが同義のコドン；および
- ii) 終止コドンと1塩基だけが異なる、方法。

【請求項 4】

天然のヒトコロナウイルスゲノムまたはその断片が

- a) 配列番号7で規定される配列に含まれるか、またはそれからなるSARS-CoV-2配列、または
- b) 配列番号7で規定される配列に含まれるか、またはそれからなる配列と80%同一であるSARS-CoV-2配列、好ましくは、配列番号7で規定される配列に含まれるか、またはそれからなる配列と80%同一であり、1つ以上のSARS-CoV-2ウイルスタンパク質をコードする能力を維持するSARS-CoV-2塩基配列である、請求項1もしくは2に記載のポリヌクレオチドまたは請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

断片が最小500ヌクレオチドの長さを有する、請求項1、2もしくは4のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、または請求項3もしくは4に記載の方法。

【請求項 6】

ヒトコロナウイルスがSARS-CoV-2であり、ワントゥーストップ (one-to-stop) コドンの少なくとも1つが天然のSARS-CoV-2のORF1abの配列部分、天然のSARS-CoV-2の構造タンパク質をコードする配列部分または天然のSARS-CoV-2のアクセサリータンパク質をコードする配列部分に対応する配列部分または断片中に含まれる、請求項1、2、4または5のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドまたは請求項3から5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 7】

ワントゥーストップ (one-to-stop) コドンの少なくとも1つが天然のSARS-CoV-2のORF1abの配列部分に対応する配列部分または断片に含まれる、請求項6に記載のポリヌクレオチドまたは請求項6に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 8】

ワントゥーストップ (one-to-stop) コドンの少なくとも1つが天然のSARS-CoV-2ゲノムの配列部分をコードするNsp2からNsp15に対応する配列部分または断片に含まれる、請求項7に記載のポリヌクレオチドまたは請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

ワントゥーストップ (one-to-stop) コドンの少なくとも1つが、天然のSARS-CoV-2ゲノムの配列部分をコードするNsp2からNsp7またはNsp13からNsp15に対応する配列部分または断片に含まれる、請求項8に記載のポリヌクレオチドまたは請求項8に記載の方法。

【請求項 10】

ワントゥーストップ (one-to-stop) コドンが天然のSARS-CoV-2ゲノム上の位置に対応する表1から選択される位置を有する少なくとも1つのワントゥーストップ (one-to-stop) コドンを含む、請求項8または9に記載のポリヌクレオチドまたは請求項8または9に記載の方法。

【請求項 11】

少なくとも20個のワントゥーストップ (one-to-stop) コドンによってコードされるアミノ酸がLeu、Ser、Argおよび/またはGlyからなる、請求項1、2、4から10のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドまたは請求項3から10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 12】

ワントゥーストップ (one-to-stop) コドンによりコードされるアミノ酸がLeuおよび/またはSerからなる、請求項11に記載のポリヌクレオチドまたは請求項11に記載の方法。

【請求項 13】

少なくとも20個のワントゥーストップ (one-to-stop) コドンが少なくとも50個のワントゥーストップ (one-to-stop) コドンである、請求項1、2、4から12のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドまたは請求項3から12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 14】

ヒトコロナウイルスがSARS-CoV-2であり、該ポリヌクレオチドが天然のSARS-CoV-2のNsp1機能を有するタンパク質をコードする配列を含まないか、または天然のSARS-CoV-2のNsp1と比較して低下したNsp1機能を有するタンパク質をコードする配列を含み、好ましくは、該ポリヌクレオチドが天然のSARS-CoV-2のNsp1と比較して低下したNsp1機能を有するタンパク質をコードする配列を含み、該ポリヌクレオチドが天然のSARS-CoV-2のNsp1をコードする配列と比較して変異を含み、該変異がK164Aおよび/またはH165Aである、請求項1、2、4から13のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 15】

ヒトコロナウイルスがSARS-CoV-2であり、該ポリヌクレオチドが天然のSARS-CoV-2のORF6遺伝子によりコードされるタンパク質の機能を有するタンパク質をコードする配列を含まないか、または天然のSARS-CoV-2のORF6遺伝子によりコードされるタンパク質の機能を低下させたタンパク質をコードする配列を含む、請求項1、2、4から14のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 16】

ヒトコロナウイルスがSARS-CoV-2であり、該ポリヌクレオチドが天然のSARS-CoV-2のORF7a遺伝子によりコードされるタンパク質の機能を有するタンパク質をコードする配列を含まないか、または天然のSARS-CoV-2のORF7a遺伝子によりコードされるタンパク質の機能を低下させたタンパク質をコードする配列を含む、請求項1、2、4から15のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 17】

ヒトコロナウイルスがSARS-CoV-2であり、該ポリヌクレオチドが天然のSARS-CoV-2のORF7b遺伝子によりコードされるタンパク質の機能を有するタンパク質をコードす

10

20

30

40

50

る配列を含まないか、または天然のSARS-CoV-2のORF7b遺伝子によりコードされるタンパク質の機能を低下させたタンパク質をコードする配列を含む、請求項1、2、4～16のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項18】

ヒトコロナウイルスがSARS-CoV-2であり、該ポリヌクレオチドが天然のSARS-CoV-2のORF8遺伝子によりコードされるタンパク質の機能を有するタンパク質をコードする配列を含まないか、または天然のSARS-CoV-2のORF8遺伝子によりコードされるタンパク質の機能を低下させたタンパク質をコードする配列を含む、請求項1、2、4から17のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項19】

ヒトコロナウイルスがSARS-CoV-2であり、該ポリヌクレオチドがスパイクタンパク質をコードする配列部分を含み、該スパイクタンパク質が天然のSARS-CoV-2のスパイクタンパク質の切断部位と比較して改変または除去された切断部位を含む、請求項1、2、4から18のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項20】

配列番号6で規定された配列からなるか、またはそれを含む、請求項19に記載のポリヌクレオチド。

【請求項21】

請求項1、2、4から20のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項22】

請求項1、2、4から20のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含む遺伝学的改変細胞。

【請求項23】

弱毒化ウイルスの製造方法であって、請求項22に記載の遺伝学的改変細胞を培養する工程を含む、方法。

【請求項24】

請求項1、2、4から20のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含む、弱毒化ウイルス。

【請求項25】

請求項21に記載のベクター、請求項22に記載の遺伝学的改変細胞および/または請求項24に記載の弱毒化ウイルスを含む、医薬品として使用するための医薬品。

【請求項26】

ヒトコロナウイルス感染症、好ましくはSARS-CoV-2感染症の治療および/または予防に使用するための、請求項21に記載のベクター、請求項22に記載の遺伝学的改変細胞および/または請求項24に記載の弱毒化ウイルスを含む、医薬品。

【請求項27】

医薬品がさらに変異原を含む、請求項25または26に記載の使用のための医薬品。

【請求項28】

治療上有効な量の医薬品を対象に投与する工程を含む、治療および/または予防方法であって、医薬品が請求項21に記載のベクター、請求項22に記載の遺伝学的改変細胞および/または請求項24に記載の弱毒化ウイルスを含む、方法。

【請求項29】

治療および/または予防が、ヒトコロナウイルス感染、好ましくはSARS-CoV-2感染の治療および/または予防である、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

治療有効量の変異原を対象に投与することをさらに含む、請求項28または29に記載の方法。

【請求項31】

変異原が5-フルオロウラシルまたはマルヌピラビルである、請求項27に記載の使用のための医薬品または請求項30に記載の方法。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、弱毒化SARS-CoV-2またはその断片をコードするポリヌクレオチドに関し、該ポリヌクレオチドは少なくとも20個のワントゥーストップ (one-to-stop) コドンを含む。ポリヌクレオチドはさらなる修飾を含んでいてもよく、弱毒化SARS-CoV-2に含まれていてもよい。本発明はさらに、ポリヌクレオチドの製造方法および医薬品、例えば、医療用途に関する。

【0002】

重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2 (SARS-CoV-2) は、2019年12月、コロナウイルス感染症2019 (COVID-19) の原因ウイルスとして出現した。このウイルスはヒトの間で高い感染力を有する。数週間のうちに世界中に急速に広がり、世界中で現在もCOVID-19の大流行と戦っている。

10

【0003】

ワクチンの迅速な開発と入手は、多くのウイルスや細菌と闘う上で極めて重要である。適切なワクチンの製造は多段階にわたる複雑なプロセスであり、しばしば高額な投資が行われるにもかかわらず、必ずしも成功するとは限らない。通常、適切なワクチンの開発には何年もかかる。こうした長い開発期間は、特に新しく出現する病原体や変異した病原体に関しては、疫学的見地から、新しい疾病の出現に対応できるとしても遅すぎるといった大きな問題を含んでいる。これとは対照的に、新しい病原体や変異の激しい病原体の分析、同定、さらなる検出は、数週間から数日で可能になり、これは前世紀に比べて大きな進歩である。

20

【0004】

その中でも、ウイルスは突然変異率が高く、他の生物種からヒトへの感染を引き起こすため、特に注目されている。これらのウイルスの急速な拡散は、現代医学にとって大きな課題となっている。新しく出現したウイルスを発見・同定してからワクチンが開発されるまでの期間は、通常数年かかる。十分な予備知識があれば、数ヶ月で実験的ワクチンが提供できる場合もある。しかし、この期間は数千人、数百万人が感染するまでの一般的な期間よりはるかに長い。このような急速な感染拡大は、現代社会の高い移動性の直接的な結果でもある。

【0005】

理想的には、新型ウイルスが特定された直後に、十分な量と最高品質のワクチンが入手でき、新型ウイルスの最初の発生場所に何らかの形で近づいたすべての人に国中でワクチン接種ができることである。さらに、このようなワクチンの理想的な方法は、ウイルスの進化と適応に対応できるものでなければならない。このような理想的な製造の可能性は、今日の本技術分野における当業者には実現不可能であるように思われる。

30

【0006】

特に最近のコロナパンデミックは、ワクチン製造のための適切な手段を開発することの重要性を飛躍的に高めた。コロナウイルスSARS-CoV-2に対するワクチンを開発することが、パンデミックとそれに関連する世界的危機を長期的に抑制する唯一の証明された手段であることは、誰もが認めるところである。

40

【0007】

したがって、コロナウイルスSARS-CoV-2に対するワクチンを大量かつ高品質に製造できる手段や方法を提供する必要がある。

【0008】

上記の技術的課題は、本願明細書に開示され、かつ特許請求の範囲に規定される、一実施形態によって解決される。

【0009】

したがって、本発明は、特に以下の一実施形態に関する：

1. 弱毒化ヒトコロナウイルスまたはその断片をコードするポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドが少なくとも20個のワントゥーストップ (one-to-stop) コドンを

50

含み、

ここで、ワントゥーストップ (one-to-stop) コドンは、以下である：

i) 天然のヒトコロナウイルスゲノムまたはその断片中の対応するコドンと比較して、異なるが同義のコドン；および

ii) 終止コドンと1塩基だけが異なる、ポリヌクレオチド。

2. ポリヌクレオチドの断片が、対応するヒトコロナウイルス部分と組み合わせたとき、5000PFUコロナウイルス粒子でマウスを免疫した15日後に免疫応答を誘導し、21日後にWTヒトコロナウイルスでチャレンジし、35日後に測定されたときに、免疫応答の増大を誘導する、コロナウイルス粒子をコードする、実施形態1に記載のポリヌクレオチド。

10

3. 実施形態1または2に記載のポリヌクレオチドを製造する方法であって、以下の工程：

a) 天然のヒトコロナウイルスゲノムのCDS、その断片またはcDNAクローンを提供すること；および

b) 天然のヒトコロナウイルスゲノム、断片またはcDNAクローンの逆転写されたcDNA配列をそれぞれ改変すること、を含み、

ここで、前記改変は、天然のヒトコロナウイルスゲノム、断片または逆転写されたcDNA配列中の少なくとも20個のコドンを、少なくとも20個のワントゥーストップ (one-to-stop) コドンで置換することを含み、

ここで、ワントゥーストップ (one-to-stop) コドンは、以下である：

i) 天然のヒトコロナウイルスゲノム、断片または逆転写されたcDNA配列中の対応するコドンと比較して、異なるが同義のコドン；および

20

ii) 終止コドンと1塩基だけが異なる、方法。

4. 天然のヒトコロナウイルスゲノムまたはその断片が

a) 配列番号7で規定される配列に含まれるか、またはそれからなるSARS-CoV-2配列、または

b) 配列番号7で規定される配列に含まれるか、またはそれからなる配列と80%同一であるSARS-CoV-2配列、好ましくは、配列番号7で規定される配列に含まれるか、またはそれからなる配列と80%同一であり、1つ以上のSARS-CoV-2ウイルスタンパク質をコードする能力を維持するSARS-CoV-2塩基配列である、実施形態1もしくは2に記載のポリヌクレオチドまたは実施形態3に記載の方法。

30

5. 断片が最小500ヌクレオチドの長さを有する、実施形態1、2もしくは4のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、または実施形態3もしくは4に記載の方法。

6. ヒトコロナウイルスがSARS-CoV-2であり、ワントゥーストップ (one-to-stop) コドンの少なくとも1つが天然のSARS-CoV-2のORF1abの配列部分、天然のSARS-CoV-2の構造タンパク質をコードする配列部分または天然のSARS-CoV-2のアクセサリタンパク質をコードする配列部分に対応する配列部分または断片に含まれる、実施形態1、2、4または5のいずれか1つに記載のポリヌクレオチドまたは実施形態3から5のいずれか1つに記載の方法。

7. ワントゥーストップ (one-to-stop) コドンの少なくとも1つが天然のSARS-CoV-2のORF1abの配列部分に対応する配列部分または断片に含まれる、実施形態6に記載のポリヌクレオチドまたは実施形態6に記載の方法。

40

8. ワントゥーストップ (one-to-stop) コドンの少なくとも1つが天然のSARS-CoV-2ゲノムの配列部分をコードするNsp2からNsp15に対応する配列部分または断片に含まれる、実施形態7に記載のポリヌクレオチドまたは実施形態7に記載の方法。

9. ワントゥーストップ (one-to-stop) コドンの少なくとも1つが、天然のSARS-CoV-2ゲノムの配列部分をコードするNsp2からNsp7またはNsp13からNsp15に対応する配列部分または断片に含まれる、実施形態8に記載のポリヌクレオチドまたは実施形態8に記載の方法。

10. ワントゥーストップ (one-to-stop) コドンが天然のSARS-CoV-2ゲノム上の位置に対応する表1から選択される位置を有する少なくとも1つのワントゥーストップ (on

50

e-to-stop) コドンを含む、実施形態8または9に記載のポリヌクレオチドまたは実施形態8または9に記載の方法。

11. 少なくとも20個のワントゥーストップ(one-to-stop) コドンによってコードされるアミノ酸がLeu、Ser、Argおよび/またはGlyからなる、実施形態1、2、4から10のいずれか1つに記載のポリヌクレオチドまたは実施形態3から10のいずれか1つに記載の方法。

12. ワントゥーストップ(one-to-stop) コドンによりコードされるアミノ酸がLeuおよび/またはSerからなる、実施形態11に記載のポリヌクレオチドまたは実施形態11に記載の方法。

13. 少なくとも20個のワントゥーストップ(one-to-stop) コドンが少なくとも50個のワントゥーストップ(one-to-stop) コドンである、実施形態1、2、4から12のいずれか1つに記載のポリヌクレオチドまたは実施形態3から12のいずれか1つに記載の方法。

14. ヒトコロナウイルスがSARS-CoV-2であり、該ポリヌクレオチドが天然のSARS-CoV-2のNsp1機能を有するタンパク質をコードする配列を含まないか、または天然のSARS-CoV-2のNsp1と比較して低下したNsp1機能を有するタンパク質をコードする配列を含み、好ましくは、該ポリヌクレオチドが天然のSARS-CoV-2のNsp1と比較して低下したNsp1機能を有するタンパク質をコードする配列を含み、該ポリヌクレオチドが天然のSARS-CoV-2のNsp1をコードする配列と比較して変異を含み、該変異がK164Aおよび/またはH165Aである、実施形態1、2、4から13のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド。

15. ヒトコロナウイルスがSARS-CoV-2であり、該ポリヌクレオチドが天然のSARS-CoV-2のORF6遺伝子によりコードされるタンパク質の機能を有するタンパク質をコードする配列を含まないか、または天然のSARS-CoV-2のORF6遺伝子によりコードされるタンパク質の機能を低下させたタンパク質をコードする配列を含む、実施形態1、2、4から14のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド。

16. ヒトコロナウイルスがSARS-CoV-2であり、該ポリヌクレオチドが天然のSARS-CoV-2のORF7a遺伝子によりコードされるタンパク質の機能を有するタンパク質をコードする配列を含まないか、または天然のSARS-CoV-2のORF7a遺伝子によりコードされるタンパク質の機能を低下させたタンパク質をコードする配列を含む、実施形態1、2、4から15のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド。

17. ヒトコロナウイルスがSARS-CoV-2であり、該ポリヌクレオチドが天然のSARS-CoV-2のORF7b遺伝子によりコードされるタンパク質の機能を有するタンパク質をコードする配列を含まないか、または天然のSARS-CoV-2のORF7b遺伝子によりコードされるタンパク質の機能を低下させたタンパク質をコードする配列を含む、実施形態1、2、4~16のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド。

18. ヒトコロナウイルスがSARS-CoV-2であり、該ポリヌクレオチドが天然のSARS-CoV-2のORF8遺伝子によりコードされるタンパク質の機能を有するタンパク質をコードする配列を含まないか、または天然のSARS-CoV-2のORF8遺伝子によりコードされるタンパク質の機能を低下させたタンパク質をコードする配列を含む、実施形態1、2、4から17のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド。

19. ヒトコロナウイルスがSARS-CoV-2であり、該ポリヌクレオチドがスパイクタンパク質をコードする配列部分を含み、該スパイクタンパク質が天然のSARS-CoV-2のスパイクタンパク質の切断部位と比較して改変または除去された切断部位を含む、実施形態1、2、4から18のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド。

20. 配列番号6で規定された配列からなるか、またはそれを含む、実施形態19に記載のポリヌクレオチド。

21. 実施形態1、2、4から20のいずれか1つに記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

22. 実施形態1、2、4から20のいずれか1つに記載のポリヌクレオチドを含む遺伝学的改変細胞。

23. 弱毒化ウイルスの製造方法であって、実施形態22に記載の遺伝学的改変細胞を培養する工程を含む、方法。

24. 実施形態1、2、4から20のいずれか1つに記載のポリヌクレオチドを含む、弱毒化ウイルス。

25. 実施形態21に記載のベクター、実施形態22に記載の遺伝学的改変細胞および/または実施形態24に記載の弱毒化ウイルスを含む、医薬品として使用するための医薬品。

26. ヒトコロナウイルス感染症、好ましくはSARS-CoV-2感染症の治療および/または予防に使用するための、実施形態21に記載のベクター、実施形態22に記載の遺伝学的改変細胞および/または実施形態24に記載の弱毒化ウイルスを含む、医薬品。

27. 医薬品がさらに変異原を含む、実施形態25または26に記載の使用のための医薬品。 10

28. 治療上有効な量の医薬品を対象に投与する工程を含む、治療および/または予防方法であって、医薬品が実施形態21に記載のベクター、実施形態22に記載の遺伝学的改変細胞および/または実施形態24に記載の弱毒化ウイルスを含む、方法。

29. 治療および/または予防が、ヒトコロナウイルス感染、好ましくはSARS-CoV-2感染の治療および/または予防である、実施形態28に記載の方法。

30. 治療有効量の変異原を対象に投与することをさらに含む、実施形態28または29に記載の方法。

31. 変異原が5-フルオロウラシルまたはマルヌピラビルである、実施形態27に記載の使用のための医薬品または実施形態30に記載の方法。

【0010】

従って、一実施形態において、本発明は、弱毒化ヒトコロナウイルス（好ましくは、SARS-CoV-2）またはその断片をコードするポリヌクレオチドに関し、ここで、ポリヌクレオチドは、少なくとも20個のワントゥーストップ（one-to-stop）コドンを含み、ここで、ワントゥーストップ（one-to-stop）コドンは、i)天然のヒトコロナウイルスゲノム（好ましくは、天然のSARS-CoV-2ゲノム）またはその断片中の対応するコドンと比較して、異なるが同義コドンである；およびii)終止コドンから1ヌクレオチドだけ異なる。

【0011】

本明細書で使用される用語「ポリヌクレオチド」は、少なくとも60の核酸モノマー単位（例えば、ヌクレオチド）、典型的には100を超えるモノマー単位、より典型的には200を超えるモノマー単位を含む核酸を指す。ポリヌクレオチドは、任意に、既存または天然の配列の単離、DNA複製または増幅、逆転写、適切な配列のクローニングおよび制限消化、または本技術分野で公知の方法による直接化学合成を含むがこれらに限定されない、任意の適切な方法によって調製される。用語「核酸」は、デオキシリボヌクレオチド（例えばDNA、cDNA、...）もしくはリボヌクレオチド（例えばRNA、mRNA、...）ポリマー、またはデオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチド（例えばDNA/RNA）ポリマーの組み合わせであって、直鎖状または環状、一本鎖状または二本鎖状のものを指す。これらの用語は、天然ヌクレオチドの既知の類似体、ならびに塩基、糖および/またはリン酸部分（例えば、ホスホロチオエート骨格）で修飾されたヌクレオチドを包含し得る。一般に、特定のヌクレオチドのアナログは、同じ塩基対特異性を有する、すなわち、Aの 40
アナログはTと塩基対になる。

【0012】

本明細書で使用される用語「弱毒化ヒトコロナウイルス」は、天然のヒトコロナウイルスと比較して、宿主生物が弱毒化ウイルスと対峙（感染）した後に、宿主生物においてより少ない、および/またはより重篤ではない、あるいは全く症状を引き起こさないヒトコロナウイルスを指す。同時に、生弱毒化ウイルスは、野生型ウイルス感染および/またはその少なくとも1つの症状に対して少なくとも部分的に防御的である、弱毒化ウイルスに対する宿主の免疫応答を誘導する。一実施形態において、ヒトコロナウイルスは、以下からなる群から選択される コロナウイルスなどの コロナウイルスである：MERS-CoV、SARS-CoV-1、およびSARS-CoV-2、好ましくはSARS-CoV-2。 50

【0013】

本明細書で使用される用語「断片」は、天然のヒトコロナウイルス（好ましくはSARS-CoV-2）ゲノムよりも少ないタンパク質および/または少ないアミノ酸長のタンパク質をコードする配列を指す。一実施形態において、断片は、天然のヒトコロナウイルス（好ましくはSARS-CoV-2）配列部分と組み立てられて、弱毒化ヒトコロナウイルス（好ましくはSARS-CoV-2）をコードする配列を形成するために使用され得る。一実施形態において、本明細書に記載した「断片」は、天然ヒトコロナウイルス（好ましくはSARS-CoV-2）ゲノムの少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または100%を一緒にコードする複数の配列である。一実施形態において、断片は、ヒト対象において免疫応答を誘導することができるペプチドをコードするのに十分な長さを有する。

10

【0014】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載したポリヌクレオチドの断片は、対応するヒトコロナウイルス部分と組み合わせたとき、5000PFUコロナウイルス粒子でマウスを免疫した15日後に免疫応答を誘導するコロナウイルス粒子をコードする。

【0015】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載したポリヌクレオチドの断片は、対応するヒトコロナウイルス部分と組み合わせたとき、5000PFUコロナウイルス粒子でマウスを免疫した15日後に免疫応答を誘導し、21日後にWTヒトコロナウイルスでチャレンジし、35日後に測定されたときに、免疫応答の増大を誘導する、コロナウイルス粒子をコードする。

20

【0016】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載したポリヌクレオチドの断片は、対応するヒトコロナウイルス部分と組み合わせたとき、21日後にWTヒトコロナウイルスでチャレンジし、26日後に測定されたときに、S-Tet + CD8 + T細胞の割合を増加させるコロナウイルス粒子をコードする。

【0017】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載したポリヌクレオチドの断片は、対応するヒトコロナウイルス部分と組み合わせたとき、5000PFUコロナウイルス粒子でマウスを免疫した15日後に免疫応答を誘導し、21日後にWTヒトコロナウイルスでチャレンジし、26日後に測定されたときに、S-Tet + CD8 + T細胞の割合を増加させるコロナウイルス粒子をコードする。

30

【0018】

本明細書で使用される「対応するヒトコロナウイルス部分」とは、断片に欠けているウイルスゲノムの部分を指す。当業者はウイルスゲノム断片を組み合わせる方法を知っている。例えば、コロナウイルス粒子は、断片配列とウイルスの欠損タンパク質をコードする配列部分とを組み合わせ、コロナウイルス粒子をコードする完全な配列または実質的に完全な配列にすることができる。あるいは、コロナウイルス粒子はトランス相補性細胞株によって産生されてもよい。当業者は、どの配列が最も近縁のヒトコロナウイルスであり、どの配列部分（単数または複数）が対応するヒトコロナウイルス部分（単数または複数）であるかを同定するために、任意のアラインメント方法を使用することができる。

40

【0019】

「コロナウイルス粒子」とは、断片単独または断片と対応するコロナウイルス配列部分の組み合わせでコードされるタンパク質複合体であり、典型的にはウイルスエンベロープ、好ましくは全構造タンパク質の半分以上、より好ましくは全構造タンパク質を含む。

【0020】

誘導されたおよび/または増加した免疫応答は、好ましくは、中和アッセイにおけるマウスの血清中の中和抗体価の測定によって測定され、より好ましくは、閾値20VNT100が「誘導された免疫応答」とみなされる（図18参照）。

【0021】

50

S-Tet+ CD8+ T細胞の割合の増加は、好ましくはテトラマー染色によって測定される（図18参照）。

【0022】

当業者は、どの動物がそれぞれのコロナウイルスに感受性であるかを知っており、上述の測定セットアップにおいて、マウスを別の動物に置き換えることができる。コロナウイルスの種類に応じて、当業者はマウスの代わりに、WTウイルスの感受性に応じて、例えば、ハムスター、ラット、モルモット、フェレット、サルまたは家畜ブタを選択することができる。さらに当業者は、用量やタイムポイントなどの実験設定に適切な変更を加えることができる。さらに、WTウイルスに対する感受性を高めるために、動物を遺伝子改変してもよい。

【0023】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載した断片は、少なくとも500、少なくとも1000、少なくとも2000、少なくとも3000、少なくとも4000、少なくとも5000、少なくとも6000、少なくとも7000、少なくとも8000、少なくとも9000、少なくとも10000、少なくとも15000、少なくとも20000または少なくとも25000ヌクレオチドの長さを有する。

【0024】

本明細書で使用される用語「終止コドン」は、本技術分野で公知の任意の終止コドンを指す。一実施形態において、終止コドンは、UAA (RNA)、UAG (RNA)、UGA (RNA)、TAA (DNA)、TAG (DNA) およびTGA (DNA) の群から選択される少なくとも1つである。

【0025】

本明細書では、ヌクレオチドおよび/またはヌクレオチドの順序が異なる場合、2つのコドンは「異なる」とみなされる。

【0026】

本明細書では、2つのコドンが同じアミノ酸または類似のアミノ酸をコードする場合、「同義」とみなされる。同義コドンの文脈における「類似のアミノ酸」とは、置換され得るアミノ酸であり、その置換が、それらが一部であるタンパク質の抗原性を変化させないか、または実質的に変化させないアミノ酸である。一実施形態では、同義コドンは、同じアミノ酸をコードする2つのコドンである。

【0027】

例えば、LeuをコードするCUUコドンは、同じくLeuをコードするが、(CUUコドンは逆に)終止コドンから(すなわち、終止コドンUAAから)1ヌクレオチドだけ異なるコドンUUAで置換される。本発明のポリヌクレオチドにおけるワントゥーストップ(one-to-stop)コドン修飾は、ヌクレオチド配列による野生型(例えば、感染性)ヒトコロナウイルスゲノムまたはクローンとの相違を誘導するが、アミノ酸配列による相違は誘導しない(少なくとも最初の複製サイクル以前は)。

【0028】

代替的または補完的に、より特に相補的に、本願の手段は、ThrまたはAlaをコードするコドン(複数可)を、Serをコードし、終止コドンと1ヌクレオチドだけ異なるコドン(複数可)に置換することを含むことができる。例えば、ThrをコードするACAコドンは、SerをコードするUCAコドンに置き換えることができる。このようなコドンの置換は、コードされるタンパク質のアミノ酸配列を変更するので、このタンパク質の抗原性を(実質的に)変更しないように選択される。本発明のポリヌクレオチドは、さらに、終止コドンの近傍にさらなるタイプを含むことができる。

【0029】

一実施形態において、ポリヌクレオチドは、所望の様式でアミノ酸配列に影響を及ぼす、異なる性質のさらなる修飾(すなわち、ワントゥーストップ(one-to-stop)コドン以外の修飾)および/または欠失を有する。

【0030】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される用語「天然ヒトコロナウイルス」は、任意の既知のヒトコロナウイルス、好ましくはSARS-CoV-2またはそれに由来する変異体を指す。本明細書に記載された、天然ヒトコロナウイルス「ゲノム」とは、ゲノム自体またはそのcDNAクローンを指す。天然ヒトコロナウイルスゲノムは、好ましくは天然SARS-CoV-2ゲノムである。一実施形態では、本明細書に記載された天然のSARS-CoV-2ゲノムは、アルファ、ベータ、ガンマ、デルタ、オミクロン、ラムダ、ミュー、イプシロン、ゼータ、イータ、シータおよびイオタの群から選択される変種のゲノムであり、好ましくはオミクロンである。一実施形態では、本明細書に記載された天然のSARS-CoV-2ゲノムは、アルファ、ベータ、ガンマ、デルタ、オミクロン系統B.1.1.529、オミクロン系統BA.2、ラムダ、ミュー、イプシロン、ゼータ、イータ、およびイオタの群から選択される変異体のゲノムである。一実施形態では、本明細書に記載された天然のSARS-CoV-2ゲノムは、デルタ、オミクロン系統B.1.1.529およびオミクロン系統BA.2の群から選択される変異体由来の変異体のゲノムである。一実施形態では、本明細書に記載された天然のSARS-CoV-2ゲノムは、オミクロン系統のゲノムである。当業者は、対応する配列を検索する方法を認識している。ある特定の実施形態において、本明細書に記載されたSARS-CoV-2ゲノムは、全てのSARS-CoV-2タンパク質の少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または100%をコードする配列である。ある特定の実施形態において、本明細書に記載したSARS-CoV-2ゲノムは、SARS-CoV-2変異体を記載するGISAIDデータセットに記載された配列である (Khare, S., et al (2021) GISAID's Role in Pandemic Response. China CDC Weekly, 3(49): 1049-1051)。好ましくは、2023年3月28日の15295201ゲノム配列提出を含むSARS-CoV-2変種を記載するGISAIDデータセットであり、より好ましくは、2022年10月12日のSARS-CoV-2変種を記載するGISAIDデータセットであり、さらに好ましくは、2022年3月28日のSARS-CoV-2変種を記載するGISAIDデータセットである。一実施形態では、本明細書に記載された天然のSARS-CoV-2ゲノムは、アクセッション番号MT108784 (配列番号7) を有する配列である。SARS-CoV-2配列は変異し続けている。当業者は、将来の変異を他のウイルスと区別する方法を知っている。ある特定の実施形態において、本明細書に記載されたSARS-CoV-2ゲノム配列 (単数または複数) と80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%または99.5%同一である配列は、1つ以上のSARS-CoV-2ウイルスタンパク質をコードする能力を維持していれば、天然のSARS-CoV-2ゲノムであると考えられる。一実施形態では、天然のSARS-CoV-2ゲノムは、del 69-70、RSYLTPGD246-253N、N440K、G446V、L452R、Y453F、S477G/N、E484Q、E484K、F490S、N501Y、N501S、D614G、Q677P/H、P681HおよびP681Rの群から選択される少なくとも1つの変異を含むSARS-CoV-2ゲノムである。一実施形態では、天然のSARS-CoV-2ゲノムは、del 69-70、RSYLTPGD246-253N、N440K、G446V、L452R、Y453F、S477G/N、E484Q、E484K、F490S、N501Y、N501S、D614G、Q677P/H、P681H、P681RおよびA701Vからなる群から選択される少なくとも1つの変異を含むSARS-CoV-2ゲノムである。

【0031】

このように、天然のヒトコロナウイルス (好ましくはSARS-CoV-2) ゲノムまたはその断片は、本発明のポリヌクレオチドの参照配列として役立つ。

【0032】

天然ヒトコロナウイルス (好ましくはSARS-CoV-2) ゲノムまたはその断片に関連するコドンの文脈における用語「対応する」は、コドンの位置を意味する。当業者は、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公的に利用可能なコンピューターソフトウェアを使用して、例えばアラインメント技術を使用して対応するコドンの位置を決定する方法を認識している。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアライメントを達成するために必要なアルゴリズムを含め、配列のアライメントおよび位置の決定のための適切なパラメーターを決定することができる。

。

10

20

30

40

50

【0033】

本発明者らは、ヒトコロナウイルス（好ましくはSARS-CoV-2）ウイルスは、コドンと同義のワントゥーストップ（one-to-stop）コドンに置換することにより弱毒化できることを見出した。これらの置換はタンパク質レベルでの変化は生じず、従って元のウイルスと同一または類似の免疫応答を誘導する。ワントゥーストップ（one-to-stop）コドンが存在すると、突然変異によって重要な位置に終止コドンが生じる可能性が高くなり、ウイルスの適性が低下する。本発明者らは、ヒトコロナウイルス（好ましくはSARS-CoV-2）の実質的な減弱を達成するためには、特定数のワントゥーストップ（one-to-stop）コドンが必要であることを見出した。

【0034】

したがって、本発明は、少なくとも部分的には、特定数のワントゥーストップ（one-to-stop）コドンを有するポリヌクレオチドによって、弱毒化ヒトコロナウイルスを安全かつ効率的に達成できるという発見に基づいている。

【0035】

さらに、特異的なワントゥーストップ（one-to-stop）コドン置換は、コドン対の最適化解除のような他の減弱方法と比較して、特異的かつ標的化された置換が可能なゲノム上の位置を増やすことができる。そのため、減弱と免疫原性のバランスを、これまでの方法よりも最適化することができる。さらに、ワントゥーストップ（one-to-stop）コドンは、ワントゥーストップ（one-to-stop）コドンの位置や数、変異原の存在によって調節できる、標的化減弱も可能にする。

【0036】

ある特定の実施形態において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを製造する方法に関し、本法は、以下の工程：a)天然のヒトコロナウイルス（好ましくは、SARS-CoV-2）ゲノムのCDS、その断片またはcDNAクローンを提供する工程およびb)天然ヒトコロナウイルス（好ましくはSARS-CoV-2）ゲノム、断片またはcDNAクローンの逆転写されたcDNA配列をそれぞれ改変する工程を含み、ここで、前記改変は、天然ヒトコロナウイルス（好ましくはSARS-CoV-2）ゲノム中の少なくとも20個のワントゥーストップ（one-to-stop）コドンを置換することを含み、ここで、ワントゥーストップ（one-to-stop）コドンは、以下である：i)天然ヒトコロナウイルス(好ましくはSARS-CoV-2)ゲノム、断片または逆転写cDNA配列中の対応するコドンと比較して異なるが同義のコドン；ii)終止コドンとは1塩基だけが異なる。

【0037】

本明細書で使用される、天然ヒトコロナウイルス（好ましくはSARS-CoV-2）ゲノムの「CDS」という用語は、天然ヒトコロナウイルス（好ましくはSARS-CoV-2）ゲノムのコード配列を指す。

【0038】

本明細書に記載された「改変する」という工程は、配列を変換することを意味する。この変換は、再合成、メガヌクレアーゼ、Crisprを含む本技術分野で公知の方法によって達成することができる。

【0039】

置換は、ポリヌクレオチドから配列部分（例えばコドン）を除去し、所望の配列部分を挿入することによって、および/または所望の配列部分で配列を再合成することによって達成することができる。

【0040】

本発明者らは、天然のヒトコロナウイルス（好ましくはSARS-CoV-2）ゲノムのCDS中の特定のコドンを置換することにより、十分なコドンが置換されれば、コードされたヒトコロナウイルス（好ましくはSARS-CoV-2）の適合性を減弱させることができることを見出した。

【0041】

従って、本発明は、少なくとも部分的には、減弱ヒトコロナウイルス（好ましくはSA

10

20

30

40

50

RS-CoV-2)をコードするポリヌクレオチドが、特定数のコドンでワントゥーストップ(one-to-stop)コドンに置き換えることによって製造できるという発見に基づいている。

【0042】

ある一実施形態において、本発明は、ワントゥーストップ(one-to-stop)コドンの少なくとも1つが、天然のSARS-CoV-2のORF1abの配列部分、天然のSARS-CoV-2の構造タンパク質をコードする配列部分、または天然のSARS-CoV-2のアクセサリータンパク質をコードする配列部分に対応する配列部分または断片中に含まれる、本発明のポリヌクレオチドまたは本発明の方法に関する。

【0043】

本明細書で使用される用語「ORF1ab」は、天然のSARS-CoV-2のオープンリーディングフレーム1aおよび/またはbを指す。

【0044】

本明細書で使用される用語「アクセサリ遺伝子をコードする配列部分」は、アクセサリータンパク質ORF3a、3b、6、7a、7b、8、9b、9c、および/または10を指す。

【0045】

本明細書で使用される用語「構造タンパク質」は、SARS-CoV-2タンパク質S、E、Mおよび/またはNを指す。

【0046】

ORF1ab、アクセサリ遺伝子および構造タンパク質は、SARS-CoV-2の適合性および再生産に関連する情報を含む。本発明者らは、これらの配列部分におけるワントゥーストップ(one-to-stop)コドンが、SARS-CoV-2を減弱させるのに特に有効であることを見出した。理論に束縛されることなく、これらの領域における終止コドンへの変異は、ウイルスの繁殖能力を実質的に低下させるか、除去する。

【0047】

したがって、本発明は、少なくとも部分的には、ORF1ab、アクセサリ遺伝子および構造タンパク質をコードする配列部分のワントゥーストップ(one-to-stop)コドンが、SARS-CoV-2を減弱させるのに特に有効であるという発見に基づくものである。

【0048】

ある一実施形態では、本発明は、ワントゥーストップ(one-to-stop)コドンの少なくとも1つが、天然のSARS-CoV-2のORF1abの配列部分に対応する配列部分または断片中に含まれる、本発明のポリヌクレオチドまたは本発明の方法に関する。

【0049】

ORF1abは、SARS-CoV-2の適合性および再生産に特に関連している。本発明者らは、これらの配列部分におけるワントゥーストップ(one-to-stop)コドンがSARS-CoV-2の減弱に特に有効であることを見出した。理論に束縛されることなく、この部分の終止コドンへの変異は、ウイルスの増殖能力を実質的に低下させるか、除去する。

【0050】

従って、本発明は、少なくとも部分的には、ORF1abをコードする配列部分のワントゥーストップ(one-to-stop)コドンがSARS-CoV-2の減弱に特に有効であるという発見に基づく。

【0051】

ある一実施形態において、本発明は、ワントゥーストップ(one-to-stop)コドンの少なくとも1つが、天然のSARS-CoV-2ゲノムのNsp2からNsp15をコードする配列部分に対応する配列部分または断片中に含まれる、本発明のポリヌクレオチドまたは本発明の方法に関する。

【0052】

したがって、本発明は、少なくとも部分的には、Nsp2からNsp15をコードする配列部分のワントゥーストップ(one-to-stop)コドンが、SARS-CoV-2を減弱させるのに特に有効であるという発見に基づくものである。

【0053】

10

20

30

40

50

ある一実施形態において、本発明は、ワントゥーストップ (one-to-stop) コドンの少なくとも1つが、天然のSARS-CoV-2ゲノムのNsp2からNsp7をコードする配列部分に対応する配列部分または断片中に含まれる、本発明のポリヌクレオチドまたは本発明の方法に関する。

【0054】

ある一実施形態において、本発明は、ワントゥーストップ (one-to-stop) コドンの少なくとも1つが、天然のSARS-CoV-2ゲノムのNsp13からNsp15をコードする配列部分に対応する配列部分または断片中に含まれる、本発明のポリヌクレオチドまたは本発明の方法に関する。

【0055】

したがって、本発明は、少なくとも部分的には、特定の配列部分におけるワントゥーストップ (one-to-stop) コドンがSARS-CoV-2を減弱させるのに特に有効であるという発見に基づくものである。

【0056】

ある特定の実施形態において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドまたは本発明の方法に関し、ここで、ワントゥーストップ (one-to-stop) コドン (複数可) は、少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、または少なくとも19個のワントゥーストップ (one-to-stop) コドンが、天然のSARS-CoV-2ゲノム上の位置に対応する表1から選択される位置を有する。

【0057】

一実施形態において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドまたは本発明の方法に関し、ここで、本発明のポリヌクレオチド中のワントゥーストップ (one-to-stop) コドンの少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%は、天然のSARS-CoV-2ゲノム上の位置に対応する表1から選択される位置を有する。

【0058】

したがって、本発明は、少なくとも部分的には、特定の位置のワントゥーストップ (one-to-stop) コドンがSARS-CoV-2の減弱に特に有効であるという発見に基づく。

【0059】

ある一実施形態において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドまたは本発明の方法に関し、ここで、少なくとも20個のワントゥーストップ (one-to-stop) コドンによってコードされるアミノ酸は、Leu、Ser、Argおよび/またはGlyからなる。

【0060】

ある一実施形態において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドまたは本発明の方法に関し、ここで、ワントゥーストップ (one-to-stop) コドンによってコードされるアミノ酸は、Leuおよび/またはSerからなる。

【0061】

LeuとSerは、ワントゥーストップ (one-to-stop) コドンを設計するために多くの組み合わせを可能にする。

【0062】

したがって、本発明は、少なくとも部分的には、特定のアミノ酸が、特に有効なワントゥーストップ (one-to-stop) コドンであるコドンによってコードされるという発見に基づくものである。

【0063】

ある特定の実施形態において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドまたは本発明の方法に関し、ここで、少なくとも20個のワントゥーストップ (one-to-stop) コドンは、少なくとも20個、少なくとも25個、少なくとも30個、少なくとも35個、少なくとも40

10

20

30

40

50

個、少なくとも45個、少なくとも50個、少なくとも55個、少なくとも60個；少なくとも65個、少なくとも70個、少なくとも75個、少なくとも80個、少なくとも85個、少なくとも90個、少なくとも95個、少なくとも100個、少なくとも105個、少なくとも110個、少なくとも115個、少なくとも120個のワントゥーストップ (one-to-stop) コドンである。

【0064】

したがって、本発明は、少なくとも部分的には、ヒトコロナウイルス（好ましくはSARS-CoV-2）の減弱が、特定数のワントゥーストップ (one-to-stop) コドンで実質的に起こるという発見に基づいている。

【0065】

本発明者らは、ワントゥーストップ (one-to-stop) コドンを含む2つの断片を組み合わせると、コードされたSARS-CoV-2ウイルスが特に減弱することを見出した。

【0066】

ある一実施形態において、本発明は、少なくとも20個、少なくとも25個、少なくとも30個、少なくとも35個、少なくとも40個、少なくとも45個、少なくとも50個、少なくとも55個または少なくとも60個のワントゥーストップ (one-to-stop) コドンが1つの断片中に含まれる、本発明のポリヌクレオチドまたは本発明の方法に関する。

【0067】

一実施形態において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドに関し、ここで、ポリヌクレオチドは、天然のSARS-CoV-2のNsp1機能を有するタンパク質をコードする配列を含まないか、または天然のSARS-CoV-2のNsp1と比較して低下したNsp1機能を有するタンパク質をコードする配列を含む。

【0068】

Nsp1の機能は特徴づけられており（例えば、Min, Yuan-Qin, et al. *Frontiers in microbiology* (2020): 2393を参照）、宿主のmRNA翻訳の阻害や炎症性サイトカインの誘導などが含まれる。したがって、Nsp1の機能が低下または消失すると、弱毒化ウイルスによって誘発される宿主（細胞）のストレスが減少する。したがって、理論に束縛されることなく、ワントゥーストップ (one-to-stop) 機構は、Sars-CoV-2の再生産と感染力を減弱させ、一方、Nsp1の機能低下は減弱したSars-CoV-2によって誘導される副作用を減少させ、細胞翻訳が阻害されないために感染に対する宿主細胞の応答を増加させる。

【0069】

したがって、本発明は、少なくとも部分的には、ワントゥーストップ (one-to-stop) コドンによる減弱と低下したNsp1の組み合わせが相乗効果をもたらすという発見に基づくものである。

【0070】

一実施形態において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドに関し、ここで、ポリヌクレオチドは、天然のSARS-CoV-2のORF6遺伝子によってコードされるタンパク質の機能を有するタンパク質をコードする配列を含まないか、または天然のSARS-CoV-2のORF6遺伝子によってコードされるタンパク質の機能を低下させたタンパク質をコードする配列を含む。

【0071】

一実施形態において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドに関し、ここで、該ポリヌクレオチドは、天然のSARS-CoV-2のORF7a遺伝子によってコードされるタンパク質の機能を有するタンパク質をコードする配列を含まないか、または天然のSARS-CoV-2のORF7a遺伝子によってコードされるタンパク質の機能が低下したタンパク質をコードする配列を含む。

【0072】

一実施形態において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドに関し、ここで、該ポリヌクレオチドは、天然のSARS-CoV-2のORF7b遺伝子によってコードされるタンパク質の

10

20

30

40

50

機能を有するタンパク質をコードする配列を含まないか、または天然のSARS-CoV-2のORF7b遺伝子によってコードされるタンパク質の機能が低下したタンパク質をコードする配列を含む。

【0073】

一実施形態において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドに関し、ここで、ポリヌクレオチドは、天然のSARS-CoV-2のORF8遺伝子によってコードされるタンパク質の機能を有するタンパク質をコードする配列を含まないか、または天然のSARS-CoV-2のORF8遺伝子によってコードされるタンパク質の機能を低下させたタンパク質をコードする配列を含む。

【0074】

ある一実施形態において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドに関し、該ポリヌクレオチドは、以下のa)~f)によりコードされるタンパク質の機能を有するタンパク質をコードする配列を含まないか、または天然のSARS-CoV-2のそれぞれの遺伝子の組み合わせa)~f)によりコードされるタンパク質の機能を低下させたタンパク質をコードする配列を含む：a) ORF8遺伝子およびORF6遺伝子、b) ORF8遺伝子およびORF7a遺伝子、c) ORF8遺伝子およびORF7b遺伝子、d) ORF6遺伝子およびORF7a遺伝子、e) ORF6遺伝子およびORF7b遺伝子、f)天然のSARS-CoV-2のORF7a遺伝子およびORF7b遺伝子。

【0075】

ある一実施形態において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドに関し、該ポリヌクレオチドは、以下のa)~d)によりコードされるタンパク質の機能を有するタンパク質をコードする配列を含まないか、または天然のSARS-CoV-2のそれぞれの遺伝子の組み合わせa)~d)によりコードされるタンパク質の機能を低下させたタンパク質をコードする配列を含む：a) ORF8遺伝子およびORF6遺伝子およびORF7a遺伝子、b) ORF8遺伝子およびORF6遺伝子およびORF7b遺伝子、c) ORF7b遺伝子およびORF6遺伝子およびORF7a遺伝子、またはd)天然のSARS-CoV-2のORF8遺伝子およびORF7b遺伝子およびORF7a遺伝子。

【0076】

ある特定の実施形態において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドに関し、ここで、ポリヌクレオチドは、天然のSARS-CoV-2のORF8遺伝子およびORF6遺伝子ならびにORF7a遺伝子およびORF7b遺伝子によってコードされるタンパク質の機能を有するタンパク質をコードする配列を含まないか、または天然のSARS-CoV-2のORF8遺伝子およびORF6遺伝子ならびにORF7a遺伝子およびORF7b遺伝子によってコードされるタンパク質の機能が低下したタンパク質をコードする配列を含む。

【0077】

ORF6およびORF8の機能は特徴付けられ、免疫回避機構を含み、ウイルス宿主相互作用に関与する。したがって、ORF6遺伝子、ORF7a遺伝子、ORF7b遺伝子、および/またはORF8遺伝子の機能が低下または消失すると、免疫系による確実な認識、または弱毒化ウイルスのウイルス宿主相互作用が損なわれる可能性がある。したがって、理論に束縛されることなく、ワントゥーストップ(one-to-stop)機構は、SARS-CoV-2の再生産および感染性を減弱させ、一方、ORF6遺伝子、ORF7a遺伝子、ORF7b遺伝子、およびORF8遺伝子によって発現されるタンパク質(複数可)の非存在または機能の低下は、免疫系による認識を増強し、および/または減弱したSARS-CoV-2のウイルス宿主相互作用を損ない、および/または一定の免疫応答を誘導するために必要な減弱したSARS-CoV-2の用量を減少させる。

【0078】

したがって、本発明は、少なくとも部分的には、ワントゥーストップ(one-to-stop)コドンの減弱と、ORF6、ORF7a遺伝子、ORF7b遺伝子、および/またはORF8の欠失または改変との組み合わせが相乗効果を有するという発見に基づく。

【0079】

10

20

30

40

50

ある特定の実施形態において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドに関し、ここで、該ポリヌクレオチドは、スパイクタンパク質をコードする配列部分を含み、ここで、該スパイクタンパク質は、天然のSARS-CoV-2のスパイクタンパク質の切断部位と比較して、改変された切断部位または除去された切断部位を含む。

【0080】

本発明者らは、弱毒化したSARS-CoV-2を作製すると、ウイルスが宿主細胞内で変異し、スパイクタンパク質の切断部位を変更したり、切断部位を除去したりする傾向があることを見出した。改変または除去された切断部位を含む配列を出発配列とすることにより、その配列はより均一に、より効率的に複製される。

【0081】

本発明者らは、弱毒化SARS-CoV-2に感染した際、スパイクタンパク質の切断部位を欠く弱毒化SARS-CoV-2を用いると、共同飼育動物へのウイルス伝播がないか、減少することを見出した。

【0082】

本発明者らは、スパイクタンパク質の切断部位を欠いた弱毒化SARS-CoV-2の複製は、上気道の粘膜組織では依然として効率的であったが、肺での複製は減少したことを発見した。

【0083】

したがって、本発明は、少なくとも部分的には、スパイクタンパク質の切断部位を改変または除去することにより、弱毒化SARS-CoV-2ウイルスの産生が改善され、伝播が減少し、下気道での複製が減少するという発見に基づく。

【0084】

ある特定の実施形態において、本発明は、本発明によるポリヌクレオチドに関し、ここで、ポリヌクレオチドは、配列番号6で規定された配列からなるか、またはそれを含む。

【0085】

ある特定の実施形態において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターに関する。

【0086】

本明細書で使用される用語「ベクター」は、細胞に組み込んで発現させるため、または異なる宿主細胞間で移動させるために設計された核酸分子を指す。クローニング又は発現ベクターは、例えば、調節及び/又は転写後調節エレメント及びプロモーターなどのエレメントを含むことができる。ベクターは、細胞内での直接的な自律複製を可能にする配列を含んでもよいし、宿主細胞DNAへの組込みを可能にするのに十分な配列を含んでもよい。一部の実施形態において、本明細書に記載したベクターは、プラスミド（例えば、DNAプラスミドまたはRNAプラスミド）、シャトルベクター、トランスポゾン、コスミド、人工染色体（例えば、細菌、酵母、ヒト）、およびウイルスベクターの群から選択されるベクターである。

【0087】

一実施形態において、本明細書に記載したベクターは、少なくとも1つのトランスフェクションエンハンサー、例えば、オリゴヌクレオチド、リポプレックス、ポリマーソーム、ポリプレックス、デンドリマー、無機ナノ粒子および細胞浸透ペプチドの群から選択されるトランスフェクションエンハンサーと組み合わせて使用される。

【0088】

本発明のベクターによる宿主細胞の形質導入は、安定形質導入または一過性形質導入によって達成することができる（例えば、Stepanenkov, A. A., and Heng, H. H., 2017, Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 773, 91-103を参照のこと）。

【0089】

一実施形態において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含む遺伝学的改変細胞に関する。

10

20

30

40

50

【0090】

本明細書で使用される用語「遺伝学的改変細胞」は、遺伝子組換えによって改変された細胞を指す。本明細書で使用される用語「改変された」およびその他の文法形態は、生物のゲノム内の核酸など核酸の1つ以上の変化を指し得る。

【0091】

一実施形態において、本明細書に記載された遺伝学的改変細胞は、弱毒化ヒトコロナウイルス（好ましくはSARS-CoV-2）の産生用または本発明のポリヌクレオチドの増幅用の宿主細胞である。本明細書で使用される用語「宿主細胞」は、外来性核酸が導入された細胞を指し、そのような細胞の子孫細胞を含む。宿主細胞には「形質転換体」および「形質転換細胞」が含まれ、継代回数に関係なく、一次形質転換細胞およびそれに由来する子孫細胞が含まれる。子孫細胞は、親細胞と核酸含量が完全に同一ではなく、突然変異を含んでいてもよい。本明細書では、最初に形質転換された細胞でスクリーニングまたは選択されたものと同じ機能または生物学的活性を有する変異子孫細胞が含まれる。

10

【0092】

いくつかにおいて、本明細書に記載された宿主細胞は、Vero、VeroE6、VeroE6-TMPRSS2、A549-hACE2、HEK293、MDCK、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）、BHK-21、SF9、MRC 5、Per.C6、PMK、およびWI-38の群から選択される少なくとも1つの細胞型を含む。

【0093】

一実施形態において、遺伝学的改変細胞は、細胞治療に用いる細胞である。

20

【0094】

ある特定の実施形態において、本発明は弱毒化ウイルスの製造方法に関し、本法は本発明の遺伝学的改変細胞を培養する工程を含む。

【0095】

細胞を培養する本方法は本技術分野で知られている（例えば、Celis, Julio E., ed. Cell biology: a laboratory handbook. Vol. 1. Elsevier, 2005）。

【0096】

ある特定の実施形態において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含む弱毒化ウイルスに関する。

【0097】

一実施形態において、本明細書に記載した弱毒化ウイルスは、SARS-CoV-2の構造タンパク質、好ましくはSARS-CoV-2のすべての構造タンパク質をさらに含む。

30

【0098】

ある特定の実施形態において、本発明は、本発明のベクター、本発明の遺伝学的改変細胞および/または本発明の弱毒化ウイルスを含む医薬品に関する。

【0099】

ある特定の実施形態において、本発明は、本発明のベクター、本発明の遺伝学的改変細胞および/または本発明の弱毒化ウイルスを含む、医薬として使用するための医薬品に関する。

【0100】

本明細書で使用する「医薬品」という用語は、その中に含まれる有効成分の生物学的活性が有効であるような形態であり、その製剤が投与される対象にとって許容できないほど有毒な追加成分を含まない製剤を指す。

40

【0101】

本明細書で使用される用語「医薬としての使用」または「治療」（および「治療する」または「処置する」などの文法的変化）は、治療される個体の自然経過を変化させる試みにおける臨床介入を指し、予防のためまたは臨床病理の経過中のいずれかで実施され得る。治療の望ましい効果としては、疾患の発生または再発の予防、症状の緩和、疾患の直接的または間接的な病理学的結果の軽減、疾患の進行速度の低下、疾患状態の改善または緩和、および寛解または予後の改善が挙げられるが、これらに限定されない。

50

【0102】

一実施形態において、医薬品は、例えば、患者の免疫応答を増強するための、担体および/またはアジュバントのような補助物質を含む。一実施形態において、本明細書に記載したアジュバントは、ミョウバンカリウム；水酸化アルミニウム；リン酸アルミニウム；水酸化リン酸カルシウム；硫酸ヒドロキシリン酸アルミニウム；パラフィン油；プロポリス；百日咳菌またはウシマイコバクテリウム種の死菌；キラヤ、ダイズ、および/またはポリガラセネガからの植物サポニン；サイトカインIL-1、IL-2、および/またはIL-12；ならびにフロイントの完全アジュバントからなる群から選択される少なくとも1つである。一実施形態において、本明細書に記載された医薬品は、本発明のベクターと、ベクター安定化剤および/またはLNPなどのナノ粒子とを含む。

10

【0103】

用量は、医薬品が患者によって十分に許容されるが、感染に対する防御または感染の重篤な進行に対する防御などの所望の医療効果を与える免疫応答を誘発するように選択される。一実施形態において、用量は、最低保護用量、最高耐用量、または最低保護用量と最高耐用量との間に位置する用量である。

【0104】

一実施形態において、医薬品は、対象の体重1kgあたり少なくとも 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 、 10^{16} 、またはそれ以上のベクターゲノム(vg/kg)の用量の本発明のベクターを含む。

【0105】

一実施形態において、医薬品は、本発明の弱毒化ウイルスを、 1×10^3 から 1×10^8 プラーク形成単位(PFU)または集束形成単位(FFU)の間、特に 1×10^4 から 1×10^7 PFUまたはFFUの間、特に 1×10^5 から 1×10^6 PFUまたはFFUの間の用量で含む。

20

【0106】

特定の用途に使用される用量には、様々な要因が影響しうる。例えば、投与頻度、治療期間、予防または治療目的、複数の治療薬の使用、投与経路、以前の治療、患者の臨床歴、主治医の判断、疾患、障害および/または状態の重症度などが、投与すべき必要量に影響を及ぼす可能性がある。

【0107】

用量と同様に、様々な因子が、特定の適用に使用される実際の投与頻度に影響を及ぼし得る。例えば、用量、治療期間、複数の治療薬の使用、投与経路、疾患、障害および/または状態の重症度によって、投与頻度の増減が必要となる場合がある。

30

【0108】

場合によっては、本発明の医薬品(および任意の追加治療薬)を投与するための有効期間は、対象に有意な毒性を生じることなく、治療すべき疾患、障害および/または状態の症状の重症度または発生を軽減する任意の期間とすることができる。複数の因子が、特定の治療に使用される実際の有効期間に影響を及ぼし得る。例えば、有効期間は、投与頻度、有効量、複数の治療薬の使用、投与経路、および治療される疾患、障害および/または状態の重症度によって変化し得る。

【0109】

一実施形態において、医薬品は患者に一度に投与される。一実施形態では、医薬品は、患者に少なくとも2回投与され、ここで、第2の投与は、第1の投与から第1の期間により隔てられている。この文脈において、第1の期間は、2週間から36ヶ月の範囲、特に3週間から30ヶ月の範囲、特に4週間から24ヶ月の範囲、特に5週間から21ヶ月の範囲、特に6週間から18ヶ月の範囲、特に7週間から15ヶ月の範囲、特に8週間から12ヶ月の範囲、特に9週間から10ヶ月の範囲、特に10週間から8ヶ月の範囲、特に12週間から6ヶ月の範囲、特に13週間から4ヶ月の範囲にある。

40

【0110】

一実施形態において、医薬品は、患者に異なるワクチン(例えば、ベクターベースのワクチン、mRNAベースのワクチン、タンパク質ベースのワクチンなど)を投与すること

50

、すなわち、患者に異なるワクチンを接種した後またはその前に、一時的にオフセットして患者に投与される。この文脈において、医薬品の投与は、異なるワクチンの投与に対して第2の期間によりオフセットされる。この文脈において、第2の期間は、2週間から36ヶ月の範囲、特に3週間から30ヶ月の範囲、特に4週間から24ヶ月の範囲、特に5週間から21ヶ月の範囲、特に6週間から18ヶ月の範囲、特に7週間から15ヶ月の範囲、特に8週間から12ヶ月の範囲、特に9週間から10ヶ月の範囲、特に10週間から8ヶ月の範囲、特に12週間から6ヶ月の範囲、特に13週間から4ヶ月の範囲にある。

【0111】

ある特定の実施形態において、本発明は、ヒトコロナウイルス（好ましくはSARS-CoV-2）感染の治療および/または予防に使用するための、本発明のベクター、本発明の遺伝学的改変細胞および/または本発明の弱毒化ウイルスを含む医薬品に関する。 10

【0112】

ある特定の実施形態において、本発明は、ヒトコロナウイルス（好ましくはSARS-CoV-2）感染の症状の治療および/または予防に使用するための、本発明のベクター、本発明の遺伝学的改変細胞および/または本発明の弱毒化ウイルスを含む医薬品に関する。

【0113】

SARS-CoV-2感染の症状には、咳、疲労、呼吸困難、悪寒、関節痛または筋肉痛、喀痰、呼吸困難、筋肉痛、関節痛または咽頭痛、頭痛、吐き気、嘔吐、下痢、副鼻腔痛、鼻づまり、嗅覚または味覚の低下または変化、食欲不振、体重減少、胃痛、結膜炎、皮疹、リンパ腫、無気力、傾眠、好ましくは、発熱、咳、疲労、呼吸困難、悪寒、関節や筋肉の痛み、痰、呼吸困難、筋肉痛、頭痛、吐き気、嘔吐、下痢、副鼻腔痛、鼻づまり、嗅覚や味覚の低下や変化が含まれるが、これらに限定されない。 20

【0114】

本発明者らは、本明細書に記載した手段および方法は、ヒトコロナウイルス（好ましくはSARS-CoV-2）感染の治療および/または予防に有用な免疫応答を誘導するために使用できることを見出した。一実施形態において、本明細書に記載した医薬品は、ワクチンおよび/またはワクチンブースターである。

【0115】

ある特定の実施形態において、本発明は、本発明の使用のための医薬品に関し、ここで、医薬品は、変異原をさらに含む。 30

【0116】

治療および/または予防の方法は、治療上有効な量の医薬品を対象に投与する工程を含み、医薬品が本発明のベクター、本発明の遺伝学的改変細胞および/または本発明の弱毒化ウイルスを含む。

【0117】

本発明の治療および/または予防方法は、治療および/または予防が、ヒトコロナウイルス（好ましくはSARS-CoV-2）感染の治療および/または予防である。

【0118】

本発明の治療および/または予防方法は、治療上有効量の変異原を対象に投与することをさらに含む。 40

【0119】

ある特定の実施形態において、本発明は、変異原と、弱毒化ウイルスまたはその断片をコードするポリヌクレオチドとの組み合わせに関し、ここで、ポリヌクレオチドは、少なくとも20個のワントゥーストップ（one-to-stop）コドンを含み、ここで、ワントゥーストップ（one-to-stop）コドンは、i）天然ウイルスゲノムまたはその断片中の対応するコドンと比較して、異なるが同義コドンであり；ii）終止コドンと1ヌクレオチドだけ異なる。弱毒化ウイルスは、好ましくはヒトコロナウイルスであり、より好ましくはコロナウイルスであり、さらに好ましくはSARS-CoV-2である。

【0120】

組み合わせは、同時に投与しても、連続して投与してもよい。このように、本明細書に 50

記載した変異原の投与は、本明細書に記載したポリヌクレオチドの投与の前、同時、および/または後に行われ得る。ある特定の実施形態において、本明細書に記載した組み合わせは、同時投与のための組成物中にあるか、または同時もしくは連続して投与するためのいくつかの別々の組成物中にある。変異原および本明細書に記載したポリヌクレオチドは、同じ投与経路（例えば、非経口）または異なる投与経路（例えば、変異原については経口投与、本明細書に記載したポリヌクレオチドについては非経口投与）で投与され得る。好ましい一実施形態において、本明細書に記載した変異原は、繰り返し投与され、好ましくは、本明細書に記載したポリヌクレオチドよりも頻繁に投与される。

【0121】

したがって、ポリヌクレオチドにコードされている減弱は、変異原によって増強することができる。したがって、変異原は、非典型的な（例えば、より強い副作用、通常よりも多いin vivo増殖）免疫応答が予想または観察される対象において使用され得る。一実施形態において、本明細書に記載した変異原とポリヌクレオチドとの組み合わせは、免疫系機能が変化した対象に投与される。免疫系機能の変化は、限定されないが、疾患または障害（感染、自己免疫疾患、がん、免疫不全（後天性または先天性）または肥満など）により、および/または免疫調節治療（例えば、DMARDs、IMiDsおよび/または腫瘍学的治療）により誘導され得る。

【0122】

あるいは、弱毒化ウイルスに対する免疫応答を測定し、ある閾値に達したら、変異原を投与することによって、その応答を停止させたり、妨害したりすることもできる。

【0123】

変異原はまた、本明細書に記載したポリヌクレオチドの代わりに、本発明の弱毒化ウイルス、本発明の宿主細胞、または本発明のベクターと等価的に組み合わせてもよい。一実施形態において、本明細書に記載した変異原は、RNA-ヌクレオチドアナログである。一実施形態において、本明細書に記載した変異原は、5-フルオロウラシルまたはマルヌピラビルである。

【0124】

このように、本発明は、少なくとも部分的には、ワントゥーストップ（one-to-stop）弱毒化ウイルスの減弱が変異原によって制御できるという発見に基づく。

【0125】

ポリヌクレオチドのすべての実施形態は、任意の所望の方法で組み合わせることができ、減弱ヒトコロナウイルス（好ましくはSARS-CoV-2）、医薬組成物、その使用、治療方法、ベクター、宿主細胞、およびウイルスの産生方法に、個々にまたは任意の組み合わせで移入することができる。

【0126】

「一つ（a）」、「一つ（an）」、及び「その（the）」は、本明細書では、冠詞の文法的対象の1つ、又は2つ以上（すなわち、少なくとも1つ、又は1つ以上）を指すために使用される。「又は」は、選択肢のいずれか一方、両方、又はそれらの組み合わせを意味すると理解されるべきである。「及び/又は」は、選択肢のいずれか一方、または両方を意味すると理解されるべきである。

【0127】

本明細書を通じて、文脈上別段の定めがない限り、「含む」、「含む（複数）」および「含むこと」という語は、記載された工程もしくは要素または工程もしくは要素群を含むことを意味するが、他の工程もしくは要素または工程もしくは要素群を排除することを意図しないと理解される。

【0128】

「含む（include）」と「含む（comprise）」という用語は、同義語として使用される。「好ましくは」とは、他の選択肢を排除しない、一連の選択肢のうちの一つの選択肢を意味する。「例えば」は、言及された例に限定されない一例を意味する。「からなる」とは、「からなる」の後に続くものを含み、それらに限定されることを意味する。

10

20

30

40

50

【0129】

本明細書全体を通して、「一実施形態」、「実施形態」、「特定の実施形態」、「関連する実施形態」、「ある実施形態」、「追加の実施形態」、「いくつかの実施形態」、「特定の実施形態」または「さらなる実施形態」またはそれらの組み合わせへの言及は、実施形態に関連して記載される特定の特徵、構造または特性が、本発明の少なくとも一実施形態に含まれることを意味する。したがって、本明細書を通じて様々な箇所に前述の語句が現れるが、必ずしもすべてが同じ一実施形態を指すわけではない。さらに、特定の特徵、構造、または特性は、一または複数の実施形態において任意の適切な方法で組み合わせることができる。また、一実施形態における特徴の積極的な記載は、特定の実施形態における特徴を除外するための根拠となることが理解される。

10

【0130】

別段の定義がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する本技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載したものと類似または同等の方法および材料を本発明の実施または試験に使用することができるが、好適な方法および材料を以下に記載する。矛盾が生じた場合は、定義を含む本明細書が優先する。さらに、材料および方法、ならびに実施例は例示に過ぎず、限定を意図するものではない。

【0131】

本方法および本明細書に記載した一般的な技術は、本技術分野で周知の従来法に従って、そして特に断りがない限り、本明細書を通して引用され、議論される様々な一般およびより具体的な文献に記載したとおり、実施することができる。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(1989)、およびAusubelら、Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates(1992)、およびHarlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990)を参照のこと。

20

【0132】

本発明の一局面は、図および前述の説明において詳細に図示および説明されているが、このような図示および説明は、例示的または例示的なものであり、拘束性を有するものではない。以下の特許請求の範囲および概念の範囲内で、当業者によって変更および修正がなされ得ることが理解されるであろう。特に、本発明は、上述および後述の異なる実施形態からの特徴の任意の組み合わせを有する更なる一実施形態を対象とする。

30

【図面の簡単な説明】

【0133】

【図1】酵母における「形質転換に伴う組換え」(TAR)クローニングを用いた組換え型SARS-CoV-2の作製、その後の組換え型SARS-CoV-2 RNAゲノムに類似したin vitro転写RNAの作製、およびその後のウイルス表現型の評価の概略図。

【図2】SARS-CoV-2ゲノム；モジュール式「ワントゥーストップ(one-to-stop)」(OTS)クローニング戦略。

【図3】一次気道上皮培養におけるSARS-CoV-2-OTSの複製。ウイルス力価(組織培養感染用量50%; TCID₅₀)は、感染後0(接種)、1、24、48、72、96時間に根管洗浄で測定した。A: OTS-クローン: 33におけるhNECの96時間動態; B: OTS-クローン: 37におけるhNECの96時間動態。

40

【図4】OTS8、OTS4-5の減弱を評価: A: 体重、B: 臨床スコア、C: 病理組織学的スコア、D: ウイルスコピー、E: ウイルス力価。

【図5】OTS2、OTS7、OTS7-8の減弱を評価: A: 体重、B: 臨床スコア、C: 病理組織学的スコア、D: ウイルスコピー、E: ウイルス力価。

【図6】OTS4-5およびOTS7-8の減弱および防御。マウスはOTS4-5、OTS-7-8で免疫された。7日目、解析のために半数のマウスを安楽死させた。免疫後21日目に病原性野生型ウイルスでチャレンジした。A: チャレンジ前生存率 B: チャレンジ後生存率 (A

50

およびBでは、免疫後7日目に50%のマウスが分析のために安楽死させられたことに注意)、C: チャレンジ前体重 D: チャレンジ後の体重 E: チャレンジ前スコア、F: チャレンジ後スコア、G: 免疫後7日目のウイルスコピー H: 26日目(チャレンジ後5日目)のウイルスコピー数、I: 35日目(チャレンジ後14日目)のウイルスコピー数、J: チャレンジ前の口腔咽頭スワブ、K: チャレンジ後の口腔咽頭スワブ、L: チャレンジ後5日目のウイルス力価 M: チャレンジ後14日目のウイルス力価。

【図7】OTS4-5およびOTS7-8の減弱およびプロテクションA: 武漢WTに対する中和抗体アッセイ: 中和抗体価、B: スパイク特異的CD8+ T細胞: T細胞応答、C 組織病理学的スコア。

【図8】OTS4-5およびOTS4-5-7-8の減弱を評価: A: 生存率、B: 臨床スコア、C: 体重、D: スワブ、E-G: RNA、H-I: PFU。 10

【図9】コンストラクトの概要。

【図10】ワントゥーストップ(one-to-stop)4-5/7-8コンストラクトを用いたナイーブシリアハムスター(ferr/マウスも同様)P = 鼻洗浄A: 鼻腔内接種: 5000PFU/ハムスター、OTS4-5/7-8接種N=10、WT接種対照N=4、OTS4-5/7-8接触N=4; 共同飼育: 剖検1: 接種群と対照群の半数を剖検、剖検2: 接種群と接触群5頭を剖検。B: 鼻腔内接種: 5000PFU/ハムスター、OTS4-5/7-8接種N=8、OTS4-5/7-8接触N=3; チャレンジ: WT 5000 PFU/ハムスターによる接種群およびN=4のナイーブコントロールへのチャレンジおよび接触群の共同飼育; 剖検: 接種群および接触群の剖検。5 dp c剖検も適用可能。 20

【図11】A: ハムスター生存率 B: 相対体重。

【図12】A: ゲノムコピー B: ゲノムコピー。

【図13】OTS接種動物と直接接触動物の体液性免疫応答(RBD-ELISA-データ)。FC S欠失は最終的なOTSのナイーブな接触動物への感染を防ぐ。

【図14】WTまたは最終OTS接種5日後の組織特異的遺伝子コピー。

【図15】14dpcにおける体液性免疫応答(RBD-ELISA-データ)。最終OTS(配列番号6)は、ナイーブな接触動物へのチャレンジウイルスの感染を防止する。

【図16】A: 5-FU: 細胞: VeroET細胞; 30分間の前処理; ID3およびID194をMOI: 0.1で1時間感染; 接種細胞を除去し、40~280 μMの範囲の濃度のDMEM + 薬剤を添加; 回収およびTCID50 24h pi。B: モルヌピラビル: 細胞: VeroET細胞; 30分間の前処理; ID3とID194をMOI: 0.1で1時間感染; 接種細胞を除去し、0.1~10 μMの濃度のDMEM + 薬剤を添加; 回収とTCID50 24h pi。 30

【図17】ヒト気管支上皮細胞(hBEC)培養物をSARS-CoV-2 WT、および断片2、7、8のいずれかにOTSコドンを持つSARS-CoV-2(OTS2、7、8)に感染させた。感染後96時間までのウイルス力価をTCID50/mlで示した。OTS2は72時間後および96時間後に有意に減少した。

【図18】免疫応答の評価。A: ウイルス特異的免疫応答を評価するための実験デザイン。マウスは弱毒化したSARS-CoV-2 OTS4-5、OTS7-8、OTS4-5-7-8、OTS-206に感染して免疫されるか、あるいは模擬感染された。21日後にwt SARS-CoV-2でチャレンジした。B: ウイルス中和アッセイにより、15日目(チャレンジ前)および35日目(チャレンジ後)にマウスから得た血清中のSARS-CoV-2中和抗体価を測定した。C: テトラマー染色(H-2K(b) SARS-CoV-2スパイクエピトープ539~546(VNFNGL)配列番号8)による、15日目(チャレンジ前)および26日目(チャレンジ後)のSARS-CoV-2特異的CD8+ T細胞応答の決定。 40

【0134】

実施例

本発明の一局面を、本発明の実施形態およびその多くの利点のより良い理解を提供する以下の例示的な非限定的な実施例によってさらに説明する。以下の実施例は、本発明の好ましい一実施形態を示すために含まれる。以下に続く実施例において開示される技術は、本発明の実施において良好に機能するために本発明において使用される技術を表すもので 50

あり、従って、その実施のための好ましい態様を構成すると考えることができることを、本技術分野の当業者は理解すべきである。しかしながら、当業者は、本開示に照らして、開示されているある特定の実施形態において、多くの変更を加えることができ、それでもなお、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、同様または類似の結果を得ることができることを理解すべきである。

【0135】

実施例1

組換えSARS-CoV-2の作製は、酵母における「形質転換関連組換え」(TAR)クローニング(SASRS-CoV-2ゲノム全体にわたる12個の重複DNA断片)、その後の組換えSARS-CoV-2 RNAゲノムに類似した*in vitro*転写RNAの作製、およびBHK-SARS-N細胞への*in vitro*転写RNAのトランスフェクション後の感染性組換えウイルスのレスキューにより行われた(Thi Nhu Thao, Tran, et al, 2020, Nature 582.7813: 561-565.; および図1)。

10

組換えウイルスは、VeroE6およびVeroE6-TMPRSS2細胞、ならびに初代ヒト気道上皮培養において*in vitro*で特性評価された。*in vivo*ウイルスは、K18-hACE2マウス、hACE2-K1マウス、シリアンハムスターなど、さまざまな動物モデルで評価した(図1)。

【0136】

クローニング:

LeuまたはSerをコードするOTSコドン豊富に含むように、一連の合成DNA断片を設計した(表1参照)。断片2-5,7-8(図2参照)が選択されたのは、これらがウイルスレプリカーゼ遺伝子産物をコードしており、ゲノムのこの領域で終止コドンの出現を増加させることが弱毒ウイルスの生成に最も効果的であると考えられたからである。

20

【0137】

このコンストラクトはクローン化され、さらに解析された。

【0138】

初代気道上皮培養におけるSARS-CoV-2-OTSの複製:

ウイルス力価は、感染後0(接種)、1、24、48、72、96時間に根管洗浄で測定した(図3)。

【0139】

初代気道上皮培養におけるSARS-CoV-2-OTSの複製:

K18-hACE2マウスにおける減弱と防御の評価:

初代ヒト上皮培養で決定された複製速度に基づき、以下の実験が*in vivo*で行われた。

30

【0140】

減弱の評価:

K18-hACE2マウスを5000 PFUで経鼻感染させた。口腔咽頭スワブを毎日採取した。感染後2日目と5/6日目に臓器を採取した。ウイルスRNAをqRT-PCR法で定量し、ウイルス力価をブランクアッセイ法で測定した(PFUを測定)。臨床スコアおよび体重を毎日測定した。

OTS8、OTS4-5の減弱を評価した(図4)。

40

OTS2、OTS7、OTS7-8の減弱を評価した(図5)。

【0141】

減弱と保護の評価

K18-hACE2マウスに5000PFUを経鼻感染させた。口腔咽頭スワブを毎日採取した。感染後2日目と5/6日目に臓器を採取した。ウイルスRNAをqRT-PCR法で定量し、ウイルス力価をブランクアッセイ法で測定した(PFUを測定)。臨床スコアおよび体重を毎日測定した。

【0142】

チャレンジ:

感染後21日以上経過したマウスにwt SARS-CoV-2(5000PFU)をチャレンジし、

50

さらに15日間モニターした。体重および臨床スコアは毎日測定した。チャレンジ後5日目および14/15日目にウイルスRNA量、ウイルス力価を測定した。スワブは週に3-4回採取した。抗体価およびCD8 T細胞応答は、規定の時点で測定された。

【 0 1 4 3 】

OTS4-5とOTS7-8の減弱と保護を分析した(図6、7、8)。

【 0 1 4 4 】

【表 1 - 1】

表 1

ゲノムアノテーション ペプチド	ゲノム 変化	SARS -CoV- 2 WT	OTS 断片 2		OTS 断片 2/3		OTS 断片 4/5		OTS 断片 7		OTS 断片 8		OTS 断片 7/8		OTS 断片 4/5/7/8	
		WT コドン	OTS コドン	ヌク レオ チド 変化	OTS コドン	ヌク レオ チド 変化	OTS コドン	ヌク レオ チド 変化	OTS コドン	ヌク レオ チド 変化	OTS コドン	ヌク レオ チド 変化	OTS コドン	ヌク レオ チド 変化	OTS コドン	ヌク レオ チド 変化
			77	136	164	291	191	335	80	149	66	120	146	269	337	604
NSP1	Leu46Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP1	Leu64Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP1	Leu88Leu	CTG	TTG	1	TTG	1	CTG	0	CTG	0	CTG	0	CTG	0	CTG	0
NSP1	Leu92Leu	CTC	TTG	2	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0
NSP1	Ser100Ser	AGT	TCA	3	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP1	Leu104Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP1	Leu107Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP1	Leu122Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	TTC	0	TTC	0	TTC	0	TTC	0	TTC	0
NSP1	Leu123Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	TTC	0	TTC	0	TTC	0	TTC	0	TTC	0
NSP1	Leu140Leu	CTA	TTA	1	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0
NSP1	Leu149Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP1	Ser166Ser	AGC	TCG	3	TCG	3	AGC	0	AGC	0	AGC	0	AGC	0	AGC	0
NSP1	Ser167Ser	AGT	TCA	3	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP1	Leu173Leu	CTC	TTG	2	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0
NSP1	Leu177Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Leu198Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Leu204Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Leu205Leu	CTA	TTA	1	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0
NSP2	Leu219Leu	CTG	TTG	1	TTG	1	CTG	0	CTG	0	CTG	0	CTG	0	CTG	0
NSP2	Ser245Ser	TCT	TCA	1	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP2	Ser248Ser	AGC	TCG	3	TCG	3	AGC	0	AGC	0	AGC	0	AGC	0	AGC	0
NSP2	Ser279Ser	TCC	TCG	1	TCG	1	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0
NSP2	Leu293Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Ser302Ser	TCT	TCA	1	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0

【 0 1 4 5 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

NSP2	Leu320Leu	CTC	TTG	2	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0
NSP2	Ser383Ser	AGT	TCA	3	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP2	Ser391Ser	TCT	TCA	1	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP2	Leu397Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Ser412Ser	TCT	TCA	1	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP2	Ser428Ser	AGC	TCG	3	TCG	3	AGC	0	AGC	0	AGC	0	AGC	0	AGC	0
NSP2	Ser443Ser	TCC	TCG	1	TCG	1	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0
NSP2	Leu446Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Leu450Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Leu451Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Leu454Leu	CTC	TTG	2	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0
NSP2	Leu469Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Ser479Ser	TCT	TCA	1	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP2	Ser481Ser	TCT	TCA	1	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP2	Ser483Ser	TCC	TCG	1	TCG	1	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0
NSP2	Ser485Ser	AGT	TCA	3	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP2	Ser505Ser	TCC	TCG	1	TCG	1	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0
NSP2	Leu530Leu	CTG	TTG	1	TTG	1	CTG	0	CTG	0	CTG	0	CTG	0	CTG	0
NSP2	Ser531Ser	AGT	TCA	3	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP2	Leu533Leu	CTT	TTG	2	TTG	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Ser549Ser	TCC	TCG	1	TCG	1	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0
NSP2	Leu552Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Ser558Ser	TCT	TCA	1	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP2	Leu570Leu	CTA	TTA	1	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0
NSP2	Leu578Leu	CTG	TTG	1	TTG	1	CTG	0	CTG	0	CTG	0	CTG	0	CTG	0
NSP2	Leu580Leu	CTC	TTG	2	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0
NSP2	Ser588Ser	TCT	TCA	1	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP2	Leu595Leu	CTA	TTA	1	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0
NSP2	Leu613Leu	CTA	TTA	1	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0
NSP2	Leu624Leu	CTC	TTG	2	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0
NSP2	Leu628Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Leu631Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0

10

20

30

40

【 0 1 4 6 】

50

【表 1 - 3】

NSP2	Leu642Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Ser674Ser	AGT	TCA	3	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP2	Leu681Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Ser692Ser	TCT	TCA	1	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP2	Leu700Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Ser723Ser	TCC	TCG	1	TCG	1	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0
NSP2	Leu729Leu	CTA	TTA	1	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0
NSP2	Leu730Leu	CTC	TTG	2	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0
NSP2	Leu733Leu	CTA	TTA	1	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0
NSP2	Leu747Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Ser771Ser	AGT	TCA	3	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP2	Leu788Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP2	Leu791Leu	CTC	TTG	2	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0
NSP2	Leu815Leu	CTC	TTG	2	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0
NSP3	Ser838Ser	AGT	TCA	3	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP3	Leu845Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Leu853Leu	CTT	TTA	2	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Ser858Ser	TCT	TCA	1	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Leu864Leu	CTC	TTG	2	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0
NSP3	Ser887Ser	TCT	TCA	1	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Leu893Leu	CTG	TTG	1	TTG	1	CTG	0	CTG	0	CTG	0	CTG	0	CTG	0
NSP3	Ser901Ser	AGT	TCA	3	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP3	Ser911Ser	TCT	TCA	1	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Ser923Ser	TCT	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Ser966Ser	TCT	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Leu969Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Ser984Ser	AGT	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP3	Ser994Ser	AGT	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP3	Leu1016Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Leu1034Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Leu1065Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Ser1087Ser	TCT	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0

10

20

30

40

【 0 1 4 7 】

50

【表 1 - 4】

NSP3	Leu1097Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Ser1102Ser	AGT	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP3	Leu1110Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Leu1115Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Leu1130Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Leu1131Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Ser1133Ser	AGT	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP3	Leu1144Leu	CTA	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0
NSP3	Leu1145Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Ser1161Ser	TCT	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Leu1182Leu	CTC	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0
NSP3	Leu1186Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Ser1189Ser	AGC	AGC	0	TCG	3	AGC	0	AGC	0	AGC	0	AGC	0	AGC	0
NSP3	Ser1195Ser	AGT	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP3	Leu1243Leu	CTG	CTG	0	TTG	1	CTG	0	CTG	0	CTG	0	CTG	0	CTG	0
NSP3	Leu1249Leu	CTC	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0
NSP3	Leu1255Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Leu1263Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Leu1270Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Ser1272Ser	AGT	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP3	Leu1313Leu	CTA	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0
NSP3	Leu1346Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Leu1356Leu	CTA	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0
NSP3	Ser1358Ser	TCT	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Ser1361Ser	TCT	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Leu1268Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Ser1372Ser	TCT	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Leu1379Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Ser1427Ser	AGT	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP3	Leu1434Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Leu1438Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Leu1441Leu	CTA	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0

10

20

30

40

【 0 1 4 8 】

50

【表 1 - 5】

NSP3	Leu1445Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Leu1450Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Leu1469Leu	CTC	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0
NSP3	Ser1476Ser	TCT	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Ser1478Ser	TCT	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Leu1490Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Ser1492Ser	TCT	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Ser1493Ser	TCT	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Ser1494Ser	TCT	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Leu1507Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Ser1510Ser	TCC	TCC	0	TCG	1	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0
NSP3	Ser1515Ser	TCC	TCC	0	TCG	1	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0
NSP3	Ser1517Ser	TCT	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Ser1520Ser	TCT	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Leu1528Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Ser1534Ser	AGT	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP3	Ser1539Ser	AGT	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP3	Leu1546Leu	CTA	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0
NSP3	Leu1556Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Leu1559Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Leu1560Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Ser1561Ser	TCT	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Leu1579Leu	TTG	TTG	0	CTC	2	TTG	0	TTG	0	TTG	0	TTG	0	TTG	0
NSP3	Leu1627Leu	CTA	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0
NSP3	Ser1641Ser	AGT	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP3	Leu1643Leu	CTG	CTG	0	TTG	1	CTG	0	CTG	0	CTG	0	CTG	0	CTG	0
NSP3	Ser1666Ser	TCT	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Leu1676Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Leu1683Leu	CTC	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0
NSP3	Leu1695Leu	CTA	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0
NSP3	Leu1713Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Ser1733Ser	AGT	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0

10

20

30

40

【 0 1 4 9 】

50

【表 1 - 6】

NSP3	Ser1743Ser	TCT	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Leu1762Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Leu1774Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Ser1775Ser	TCT	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Leu1797Leu	CTA	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0
NSP3	Leu1816Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Ser1825Ser	AGT	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP3	Ser1841Ser	TCT	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Leu1853Leu	CTT	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0
NSP3	Ser2856Ser	TCC	TCC	0	TCG	1	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0
NSP3	Ser1872Ser	AGT	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0
NSP3	Ser1905Ser	TCT	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0
NSP3	Leu2028Leu	CTG	CTG	0	CTG	0	TTG	1	CTG	0	CTG	0	CTG	0	TTG	1
NSP3	Leu2039Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP3	Leu2044Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP3	Ser2048Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Leu2062Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP3	Leu2077Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP3	Ser2083Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP3	Leu2095Leu	TTA	TTA	0	TTA	0	CTA	1	TTA	0	TTA	0	TTA	0	CTA	1
NSP3	Ser2103Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Ser2104Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP3	Ser2114Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Leu2122Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP3	Ser2132Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP3	Leu2146Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP3	Ser2151Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP3	Leu2177Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP3	Ser2185Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP3	Ser2188Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Ser2193Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Ser2205Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3

10

20

30

40

【 0 1 5 0 】

50

【表 1 - 7】

NSP3	Leu2211Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP3	Ser2224Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Leu2226Leu	CTG	CTG	0	CTG	0	TTG	1	CTG	0	CTG	0	CTG	0	TTG	1
NSP3	Leu2235Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP3	Ser2237Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP3	Leu2240Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP3	Ser2242Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Ser2255Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Ser2261Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Ser2273Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Ser2285Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Ser2289Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP3	Leu2292Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP3	Ser2293Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP3	Ser2297Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Ser3303Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Ser2313Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Leu2333Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP3	Leu2341Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP3	Ser2352Ser	AGC	AGC	0	AGC	0	TCG	3	AGC	0	AGC	0	AGC	0	TCG	3
NSP3	Ser2360Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP3	Ser2362Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Leu2364Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP3	Leu2371Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP3	Ser2396Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP3	Ser2433Ser	TCC	TCC	0	TCC	0	TCG	1	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCG	1
NSP3	Leu2447Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP3	Ser2462Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP3	Ser2466Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP3	Leu2475Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP3	Ser2487Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Ser2488Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1

10

20

30

40

【 0 1 5 1 】

50

【表 1 - 8】

NSP3	Ser2493Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP3	Ser2500Ser	TCC	TCC	0	TCC	0	TCG	1	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCG	1
NSP3	Leu2503Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP3	Ser2517Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Leu2518Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP3	Ser2519Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Leu2527Leu	CTG	CTG	0	CTG	0	TTG	1	CTG	0	CTG	0	CTG	0	TTG	1
NSP3	Ser2553Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Ser2558Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Leu2564Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP3	Leu2570Leu	CTG	CTG	0	CTG	0	TTG	1	CTG	0	CTG	0	CTG	0	TTG	1
NSP3	Leu2572Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP3	Ser2578Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Ser2583Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP3	Leu2609Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP3	Leu2612Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP3	Leu2620Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP3	Ser2625Ser	TCC	TCC	0	TCC	0	TCG	1	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCG	1
NSP3	Ser2631Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Leu2655Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP3	Ser2661Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Ser2669Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP3	Leu2675Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP3	Leu2688Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP3	Ser2695Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP3	Ser2706Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP3	Ser2722Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP3	Leu2725Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP3	Ser2731Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP3	Leu2760Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP4	Leu2778Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP4	Leu2781Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2

10

20

30

40

【 0 1 5 2 】

50

【表 1 - 9】

NSP4	Ser2797Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP4	Ser2804Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP4	Ser2822Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP4	Ser2839Ser	AGC	AGC	0	AGC	0	TCG	3	AGC	0	AGC	0	AGC	0	TCG	3
NSP4	Ser2844Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP4	Ser2890Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP4	Leu2902Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP4	Ser2926Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP4	Leu2939Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP4	Ser2942Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP4	Ser2947Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP4	Leu2956Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP4	Ser2960Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP4	Leu2969Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP4	Ser2972Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP4	Ser2981Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP4	Ser2999Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP4	Ser3001Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP4	Leu3006Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP4	Ser3013Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP4	Leu3027Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP4	Leu3034Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP4	Ser3046Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP4	Leu3060Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP4	Ser3075Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP4	Leu3084Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP4	Leu3086Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP4	Leu3092Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TGG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TGG	2
NSP4	Ser3106Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP4	Leu3116Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP4	Ser3121Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP4	Ser3149Ser	TCC	TCC	0	TCC	0	TCG	1	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCG	1

10

20

30

40

【 0 1 5 3 】

50

【表 1 - 1 0】

NSP4	Ser3158Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP4	Leu3161Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP4	Ser3171Ser	TCC	TCC	0	TCC	0	TCG	1	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCG	1
NSP4	Ser3173Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	2	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	2
NSP4	Leu3180Leu	CTG	CTG	0	CTG	0	TTG	1	CTG	0	CTG	0	CTG	0	TTG	1
NSP4	Leu3191Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP4	Ser3195Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP4	Leu3198Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP4	Leu3201Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP4	Leu3210Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP4	Ser3218Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP4	Ser3225Ser	AGC	AGC	0	AGC	0	TCG	3	AGC	0	AGC	0	AGC	0	TCG	3
NSP4	Leu3234Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP4	Leu3238Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP4	Ser3242Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP4	Ser3246Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP4	Leu3249Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP4	Ser3256Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP5	Ser3264Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP5	Ser3273Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP5	Leu3290Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP5	Leu3293Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP5	Leu3295Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP5	Ser3309Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP5	Leu3313Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP5	Leu3321Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP5	Ser3325Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP5	Leu3338Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP5	Ser3344Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP5	Leu3350Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP5	Leu3352Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP5	Ser3386Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1

10

20

30

40

【 0 1 5 4 】

50

【表 1 - 1 1】

NSP5	Leu3404Leu	TTA	TTA	0	TTA	0	CTT	2	TTA	0	TTA	0	TTA	0	CTT	2
NSP5	Ser3410Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP5	Ser3421Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP5	Leu3483Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP5	Leu3490Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP5	Leu3495Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP5	Leu3505Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP5	Leu3513Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP5	Leu3516Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP5	Leu3535Leu	CTG	CTG	0	CTG	0	TTG	1	CTG	0	CTG	0	CTG	0	TTG	1
NSP5	Ser3547Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP6	Ser3570Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP6	Leu3585Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP6	Leu3581Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP6	Ser3597Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP6	Ser3601Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP6	Ser3622Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP6	Leu3636Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP6	Ser3643Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP6	Leu3644Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP6	Ser3658Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP6	Ser3673Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3
NSP6	Ser3675Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP6	Leu3679Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP6	Leu3692Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP6	Leu3694Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP6	Leu3711Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP6	Leu3717Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP6	Ser3732Ser	TCC	TCC	0	TCC	0	TCG	1	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCG	1
NSP6	Leu3736Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP6	Ser3739Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP6	Ser3742Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1

10

20

30

40

【 0 1 5 5 】

50

【表 1 - 1 2】

NSP6	Leu3776Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2
NSP6	Leu3781Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	2	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	2
NSP6	Leu3796Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP6	Leu3828Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1
NSP6	Leu3829Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP6	Ser3834Ser	AGC	AGC	0	AGC	0	TCG	3	AGC	0	AGC	0	AGC	0	TCG	3
NSP6	Leu3840Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP7	Ser3860Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP7	Leu3873Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP7	Leu3879Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2
NSP7	Ser3885Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1
NSP1 2	Leu4792Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2	TTA	2
NSP1 2	Ser4816Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP1 2	Ser4824Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	TCA	3	TCA	3
NSP1 2	Ser4825Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP1 2	Ser4842Ser	AGC	AGC	0	AGC	0	AGC	0	TCG	3	AGC	0	TCG	3	TCG	3
NSP1 2	Leu4851Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	TTA	1	TTA	1
NSP1 2	Leu4860Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	TTA	1	TTA	1
NSP1 2	Leu4861Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	TTA	1	TTA	1
NSP1 2	Leu4889Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	TTA	1	TTA	1
NSP1 2	Leu4905Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP1 2	Ser4911Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	TCA	3	TCA	3
NSP1 2	Leu4918Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP1 2	Leu4935Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP1 2	Ser4940Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	TCA	3	TCA	3
NSP1 2	Ser4952Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP1 2	Ser4955Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	TCA	3	TCA	3
NSP1 2	Ser4983Ser	AGC	AGC	0	AGC	0	AGC	0	TCG	3	AGC	0	TCG	3	TCG	3
NSP1 2	Ser4998Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	TCA	3	TCA	3
NSP1 2	Leu5005Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP1 2	Leu5021Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP1 2	Leu5027Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2

10

20

30

40

【 0 1 5 6 】

50

【表 1 - 1 3】

NSP1 2	Leu5029Le u	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP1 2	Ser5038Ser	AGC	AG C	0	AG C	0	AG C	0	TCG	3	AG C	0	TCG	3	TCG	3
NSP1 2	Ser5055Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	TCA	3	TCA	3
NSP1 2	Leu5064Le u	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	TTA	1	TTA	1
NSP1 2	Ser5083Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	TCA	3	TCA	3
NSP1 2	Leu5098Le u	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP1 2	Ser5100Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP1 2	Leu5118Le u	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP1 2	Leu5122Le u	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	TTG	2	TTG	2
NSP1 2	Leu5149Le u	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	TTG	2	TTG	2
NSP1 2	Ser5150Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP1 2	Ser5159Ser	AGC	AG C	0	AG C	0	AG C	0	TCG	3	AG C	0	TCG	3	TCG	3
NSP1 2	Ser5163Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP1 2	Leu5166Le u	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	TTA	1	TTA	1
NSP1 2	Ser5169Ser	AGC	AG C	0	AG C	0	AG C	0	TCG	3	AG C	0	TCG	3	TCG	3
NSP1 2	Leu5177Le u	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP1 2	Ser5186Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP1 2	Leu5196Le u	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP1 2	Ser5205Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP1 2	Leu5210Le u	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	TTA	1	TTA	1
NSP1 2	Leu5220Le u	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP1 2	Leu5229Le u	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	TTA	1	TTA	1
NSP1 2	Leu5245Le u	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP1 2	Ser5252Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP1 2	Leu5260Le u	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP1 2	Leu5282Le u	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	TTA	1	TTA	1
NSP1 2	Ser5295Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP1 2	Leu5298Le u	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP1 3	Leu5330Le u	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP1 3	Ser5367Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP1 3	Leu5386Le u	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP1 3	Ser5392Ser	AGC	AG C	0	AG C	0	AG C	0	TCG	3	AG C	0	TCG	3	TCG	3

10

20

30

40

【 0 1 5 7 】

50

【表 1 - 1 4】

NSP1 3	Ser5423Ser	AGC	AG C	0	AG C	0	AG C	0	TCG	3	AG C	0	TCG	3	TCG	3
NSP1 3	Leu5453Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	TTG	2	TTG	2
NSP1 3	Leu5455Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP1 3	Leu5461Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	TTG	2	TTG	2
NSP1 3	Leu5470Leu	CTG	CTG	0	CTG	0	CTG	0	TTG	1	CTG	0	TTG	1	TTG	1
NSP1 3	Ser5471Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP1 3	Lez5481Leu	CTG	CTG	0	CTG	0	CTG	0	TTG	1	CTG	0	TTG	1	TTG	1
NSP1 3	Ser5482Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP1 3	Leu5488Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP1 3	Leu5499Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP1 3	Ser5514Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	TCA	3	TCA	3
NSP1 3	Leu5550Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	TTG	2	TTG	2
NSP1 3	Ser5559Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	TCA	3	TCA	3
NSP1 3	Leu5563Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	TTA	1	TTA	1
NSP1 3	Leu5579Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	TTG	2	TTG	2
NSP1 3	Ser5586Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP1 3	Ser5587Ser	AGC	AG C	0	AG C	0	AG C	0	TCG	3	AG C	0	TCG	3	TCG	3
NSP1 3	Ser5601Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP1 3	Leu5603Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTA	2	CTC	0	TTA	2	TTA	2
NSP1 3	Ser5612Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	TCA	3	TCA	3
NSP1 3	Leu5618Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	TTA	1	TTA	1
NSP1 3	Leu5620Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	CTC	0	TTG	2	TTG	2
NSP1 3	Ser5624Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP1 3	Ser5633Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCT	0	TCA	1	TCA	1
NSP1 3	Leu5640Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	TTA	1	TTA	1
NSP1 3	Ser5654Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	TCA	3	TCA	3
NSP1 3	Ser5708Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	AGT	0	TCA	3	TCA	3
NSP1 3	Leu5823Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP1 3	Leu5851Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	CTA	0	TTA	1	TTA	1
NSP1 3	Ser5878Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP1 3	Leu5896Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	CTT	0	TTA	2	TTA	2
NSP1 3	Ser5900Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1

10

20

30

40

【 0 1 5 8 】

50

【表 1 - 15】

NSP1 4	Leu5904Le u	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	TTA	2	TTA	2
NSP1 4	Ser5912Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	TCA	3	TCA	3
NSP1 4	Leu5913Le u	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	TTA	2	TTA	2
NSP1 4	Leu5931Le u	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	TTG	2	TTG	2
NSP1 4	Ser5936Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	TCA	3	TCA	3
NSP1 4	Leu5951Le u	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	TTG	2	TTG	2
NSP1 4	Ser5952Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	TCA	3	TCA	3
NSP1 4	Leu5978Le u	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	TTG	2	TTG	2
NSP1 4	Ser5980Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP1 4	Leu6033Le u	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	TTA	1	TTA	1
NSP1 4	Ser6036Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP1 4	Leu6041Le u	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	TTA	1	TTA	1
NSP1 4	Ser6058Ser	TCC	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCG	1	TCG	1	TCG	1
NSP1 4	Ser6061Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	TCA	3	TCA	3
NSP1 4	Leu6073Le u	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTA	2	TTA	2	TTA	2
NSP1 4	Leu6076Le u	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	TTA	2	TTA	2
NSP1 4	Leu6081Le u	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	TTA	2	TTA	2
NSP1 4	Ser6095Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	TCA	3	TCA	3
NSP1 4	Leu6098Le u	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	TTA	2	TTA	2
NSP1 4	Leu6101Le u	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	TTG	2	TTG	2
NSP1 4	Ser6102Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP1 4	Ser6118Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP1 4	Leu6133Le u	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	TTA	1	TTA	1
NSP1 4	Ser6142Ser	TCC	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCG	1	TCG	1	TCG	1
NSP1 4	Ser6154Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP1 4	Leu6177Le u	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	TTA	1	TTA	1
NSP1 4	Ser6179Ser	AGC	AG C	0	AG C	0	AG C	0	AG C	0	TCG	3	TCG	3	TCG	3
NSP1 4	Leu6183Le u	CTG	CTG	0	CTG	0	CTG	0	CTG	0	TTG	1	TTG	1	TTG	1
NSP1 4	Ser6195Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	TCA	3	TCA	3
NSP1 4	Leu620462	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	TTA	1	TTA	1
NSP1 4	Leu6253Le u	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	TTA	2	TTA	2
NSP1 4	Ser6281Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	TCA	3	TCA	3

10

20

30

40

【 0 1 5 9 】

50

【表 1 - 16】

NSP1 4	Ser6293Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP1 4	Leu6307Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	TTA	1	TTA	1
NSP1 4	Ser6320Ser	TCC	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCC	0	TCG	1	TCG	1	TCG	1
NSP1 4	Leu6330Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	TTA	1	TTA	1
NSP1 4	Ser6331Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP1 4	Leu6333Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	TTA	2	TTA	2
NSP1 4	Ser6342Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	TCA	3	TCA	3
NSP1 4	Ser6358Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	TCA	3	TCA	3
NSP1 4	Ser6372Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP1 4	Ser6374Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	TCA	3	TCA	3
NSP1 4	Ser6378Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP1 4	Leu6392Leu	CTA	CTA	0	CTA	0	CTA	0	CTA	0	TTA	1	TTA	1	TTA	1
NSP1 4	Ser6394Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP1 4	Leu6419Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	TTG	2	TTG	2
NSP1 4	Ser6431Ser	AGC	AGC	0	AGC	0	AGC	0	AGC	0	TCG	3	TCG	3	TCG	3
NSP1 4	Leu6443Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	TTG	2	TTG	2
NSP1 4	Leu6450Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	TTA	2	TTA	2
NSP1 5	Ser6452Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	TCA	3	TCA	3
NSP1 5	Ser6476Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP1 5	Leu6508Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	TTA	2	TTA	2
NSP1 5	Leu6523Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	TTG	2	TTG	2
NSP1 5	Ser6548Ser	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TCA	3	TCA	3	TCA	3
NSP1 5	Ser6554Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP1 5	Leu6570Leu	CTC	CTC	0	CTC	0	CTC	0	CTC	0	TTG	2	TTG	2	TTG	2
NSP1 5	Leu6593Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	TTA	2	TTA	2
NSP1 5	Ser6598Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	TCA	3	TCA	3
NSP1 5	Ser6605Ser	TCT	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCT	0	TCA	1	TCA	1	TCA	1
NSP1 5	Ser6612Ser	AGT	AGT	0	AGT	0	AGT	0	AGT	0	TCA	3	TCA	3	TCA	3
NSP1 5	Leu6613Leu	CTT	CTT	0	CTT	0	CTT	0	CTT	0	TTA	2	TTA	2	TTA	2

10

20

30

40

【0160】

実施例2

Nsp1の変異

本発明者らは、SARS-CoV-2の生-弱毒化ワクチンの開発戦略として検討した。Nsp1二重変異体K164A/H165Aはその阻害能力を失い、SARS-CoV-2 Nsp1変異体感染に対する転写応答の本発明者らの予備的解析により、感染に対する宿主応答の増大が確認された。

【0161】

本発明者らはさらに、Nsp1を2カ所で変異させ（K164A、H165A）、アクセサリー

50

ORF6-8を欠失させた。

【0162】

FCS領域の削除

FCS領域は、Davidson AD, Williamson MK, Lewis S, et al., 2020, *Genome Med.* 2020;12(1):68.に記載された通り削除した。

【0163】

本発明者らは、5000PFU/マウスの鼻腔内投与によりOTSウイルスをハムスターに感染させ、その後、感染21日後に、祖先型SARS-CoV-2 (Wuhan野生型 (WT)) をチャレンジ感染させた (図10)。

【0164】

本発明者らは、OTSウイルスまたはSARS-CoV-2 WTを接種した動物の生存率を評価した (図11)。SARS-CoV-2野生型を接種された動物の75%が、接種後8日以内に病気で死亡するか、あるいは終了基準に達した。対照的に、OTSコンストラクトを接種した動物は一匹も死亡しなかった。

【0165】

SARS-CoV-2 WT、OTS4-5およびOTS7-8ウイルスを接種した動物は、感染と同時に体重が減少した (平均体重はそれぞれ84% (7dpi)、91% (8dpi) および89% (7dpi))。対照的に、OTS 4-5-6-7-8 Nsp1^{K164A/H165A}.delORF6-8およびOTS 4-5-6-7-8 Nsp1^{K164A/H165A}.delORF6-8 FCS (図中、配列番号6をOTS finalと呼ぶ) を接種した動物は徐々に体重が増加し (平均体重 = 106% (7dpi) および108% (8dpi))、高感受性シリアンハムスターモデルにおいてOTS 4-5-6-7-8 Nsp1^{K164A/H165A}.delORF6-8およびOTS 4-5-6-7-8 Nsp1^{K164A/H165A}.delORF6-8.FCSの病原性がないことを示している (図11)。

【0166】

さらに、感染後5日目に円錐骨、気管、肺 (頭側、内側、尾側) サンプル、鼻洗浄サンプルを採取し、ORF1ab (Nsp12) 特異的RT-qPCRで解析した。ゲノムコピー標準を用いて、各サンプルについて1mlあたりのウイルスゲノムコピーの総量 (gc/ml) を算出した。この情報に基づいてウイルスゲノムコピーの量を互いに比較し、変化倍率を算出した (図12-14)。SARS-CoV-2 WT、OTS4-5、OTS7-8に感染したハムスターは、臓器および洗浄サンプル中のウイルスゲノム量に差はなかった。一方、OTS4-5-6-7-8 Nsp1^{K164A/H165A}.delORF6-8およびOTS4-5-6-7-8 Nsp1^{K164A/H165A}.delORF6-8.FCSは、臓器および洗浄サンプル中のウイルスゲノム量が減少した。シリアンハムスターを用いたOTS ワクチン候補OTS4-5、OTS7-8、OTS 4-5-6-7-8 Nsp1^{K164A/H165A}.delORF6-8 および OTS 4-5-6-7-8 Nsp1^{K164A/H165A}.delORF6-8 FCSの *in vivo* 評価は、OTS4-5とOTS7-8の部分的な減弱と、OTS 4-5-6-7-8 Nsp1^{K164A/H165A}.delORF6-8 およびOTS 4-5-6-7-8 Nsp1^{K164A/H165A}.delORF6-8.FCSの特性の改善が確認された。

【0167】

実施例3

5-FluorouracilやMalnupiravirのような変異原を加えると、TCID50ウイルスアッセイにおける感染性ウイルス粒子数が減少する。特に、OTSウイルスはWT SARS-CoV-2よりも変異原によって不活化されやすい。

10

20

30

40

50

【 図面 】
【 図 1 】

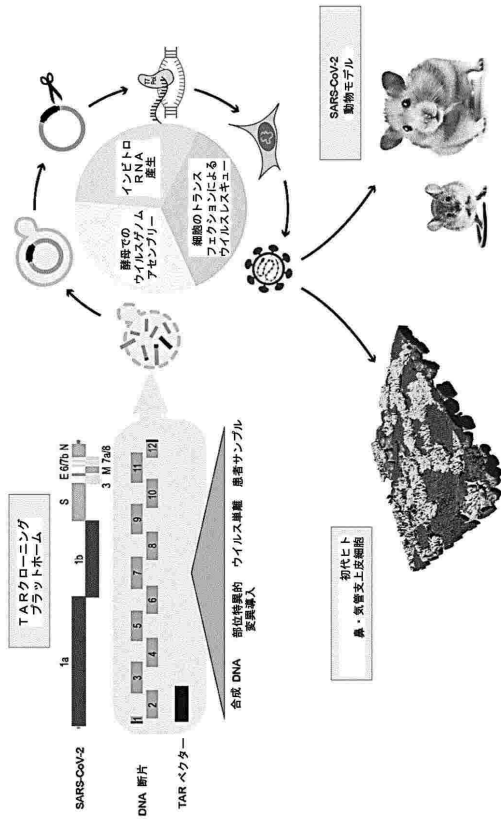


図 1

【 図 2 】

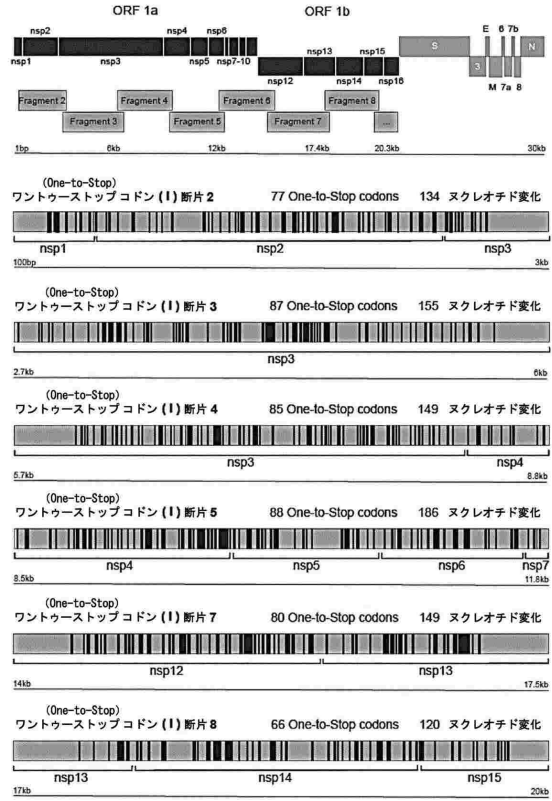


図 2

10

20

【 図 3 】

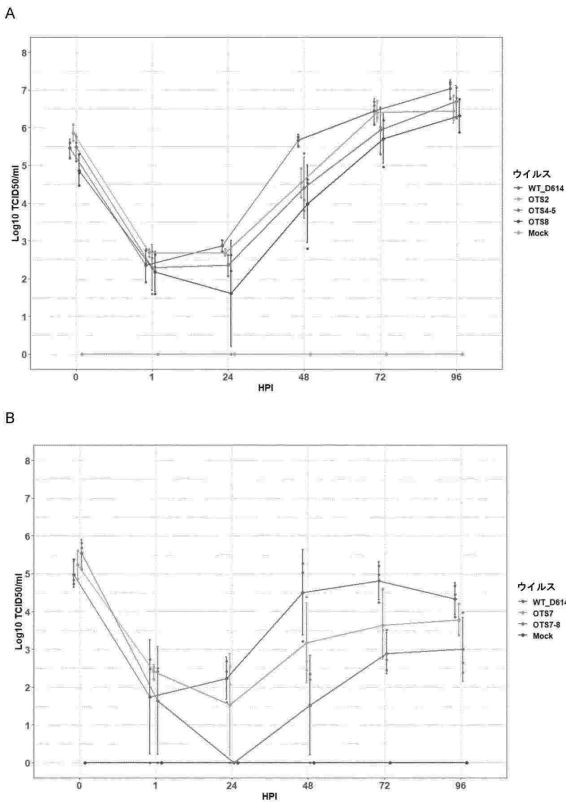


図 3

【 図 4 - 1 】

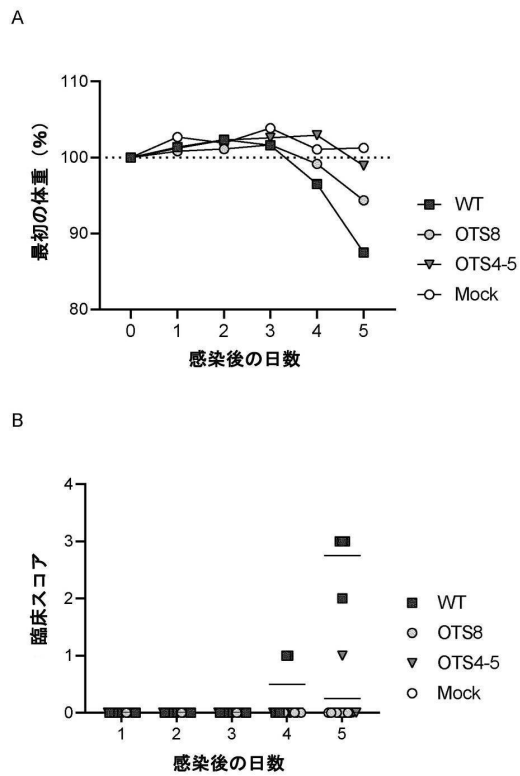


図 4 A, B

30

40

50

【 図 4 - 2 】

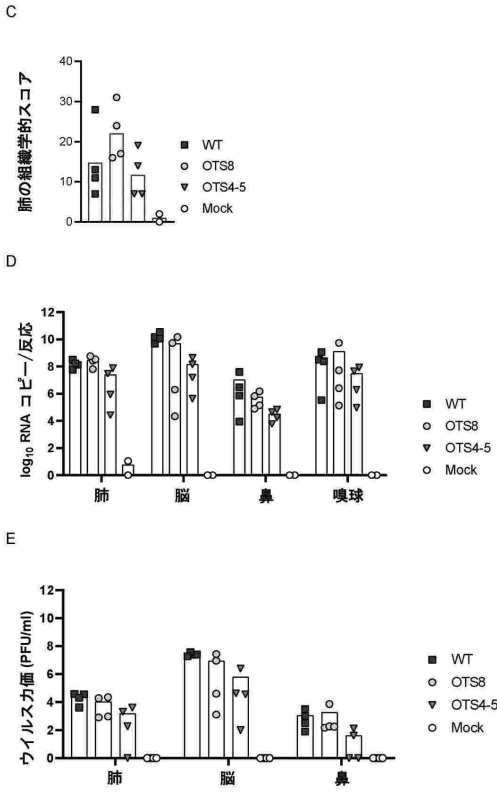


図 4 C,D,E

【 図 5 - 1 】

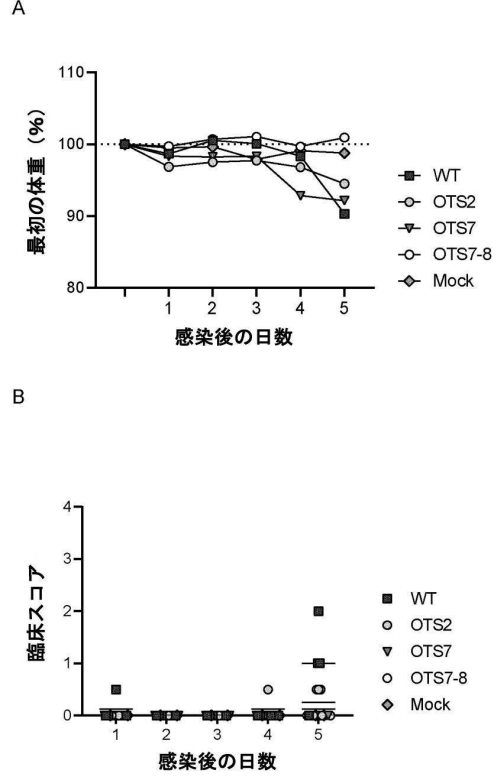


図 5 A, B

【 図 5 - 2 】

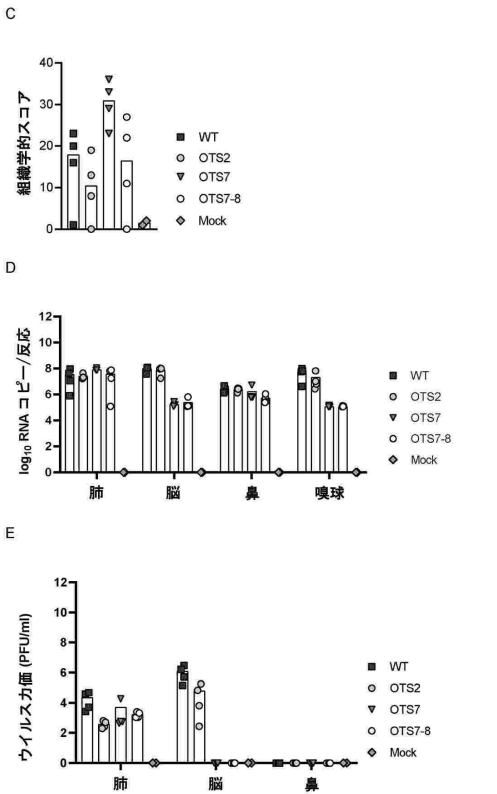


図 5 C, D, E

【 図 6 - 1 】

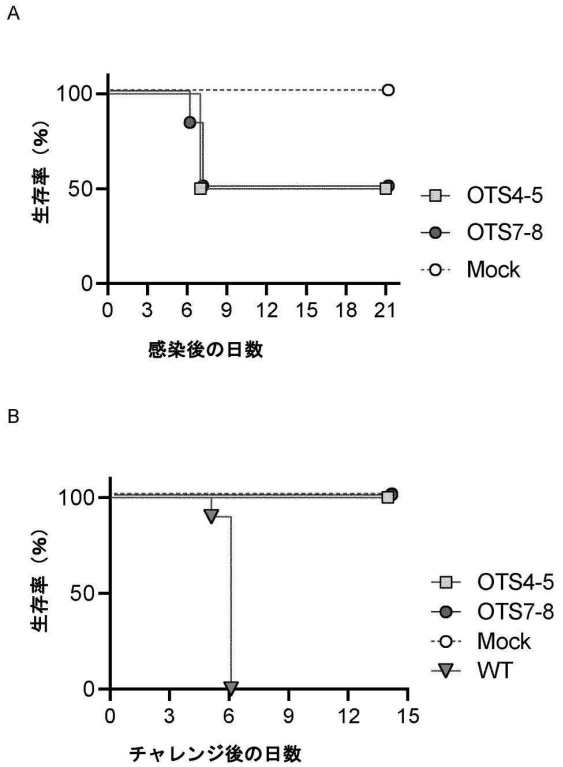


図 6 A, B

10

20

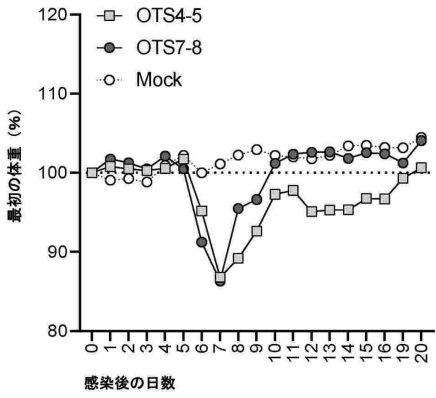
30

40

50

【 図 6 - 2 】

C



D

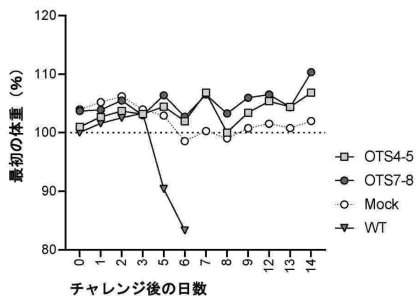
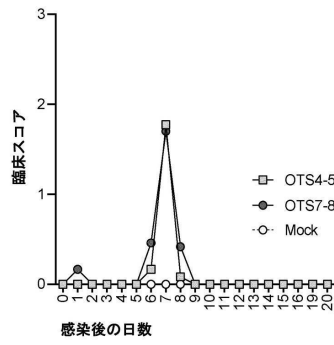


図 6 C, D

【 図 6 - 3 】

E



F

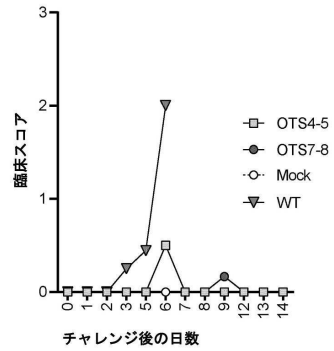


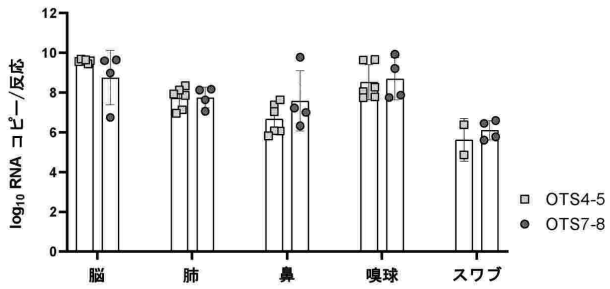
図 6 E, F

10

20

【 図 6 - 4 】

G



H

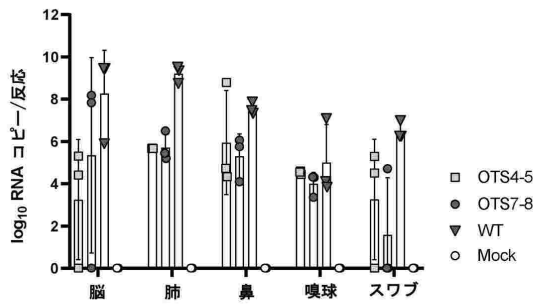
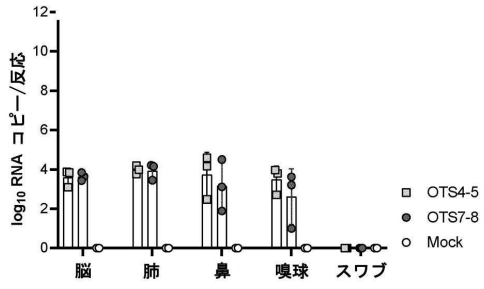


図 6 G, H

【 図 6 - 5 】

I



J

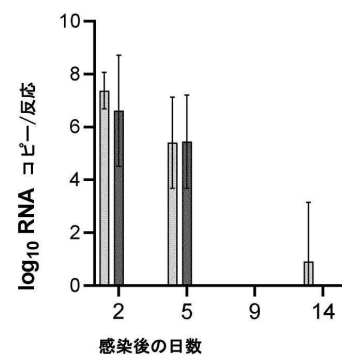


図 6 I, J

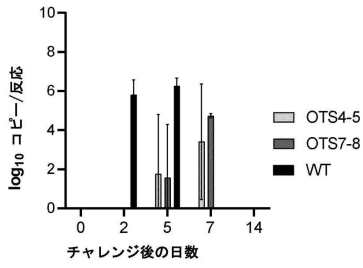
30

40

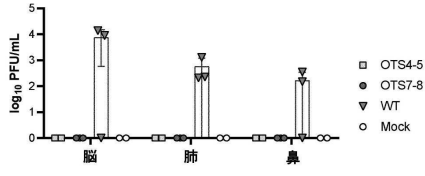
50

【 図 6 - 6 】

K



L



M

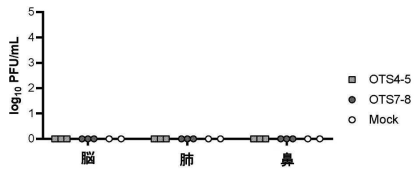
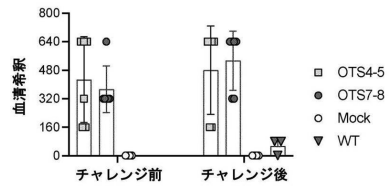


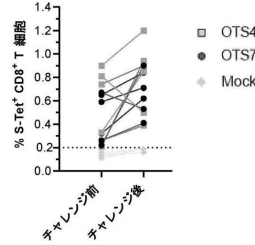
図 6 K, L, M

【 図 7 】

A



B



C

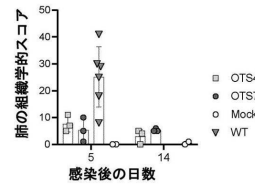


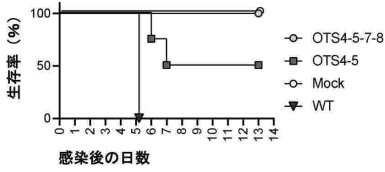
図 7

10

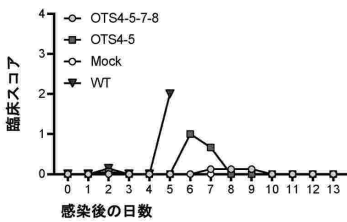
20

【 図 8 - 1 】

A



B



C

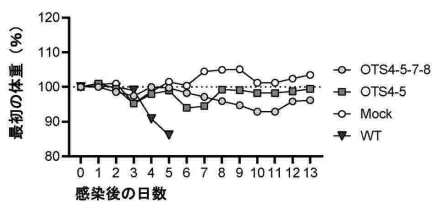
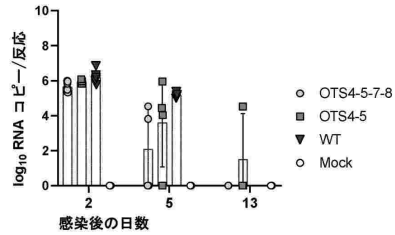


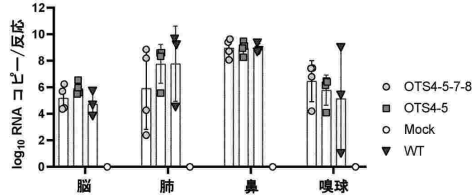
図 8 A, B, C

【 図 8 - 2 】

D



E



F

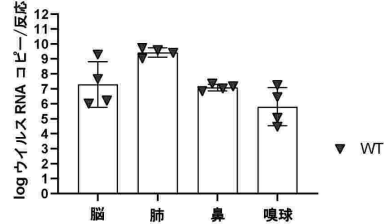


図 8 D, E, F

30

40

50

【 図 8 - 3 】

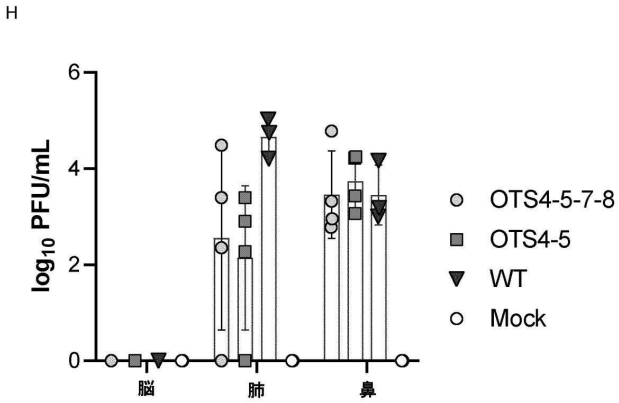
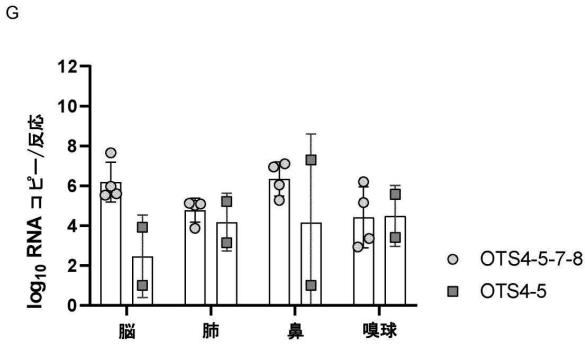


図 8 G, H

【 図 8 - 4 】

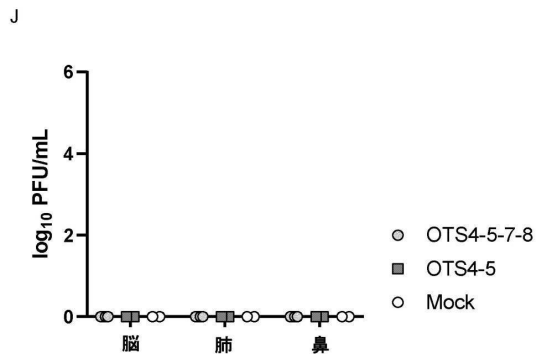
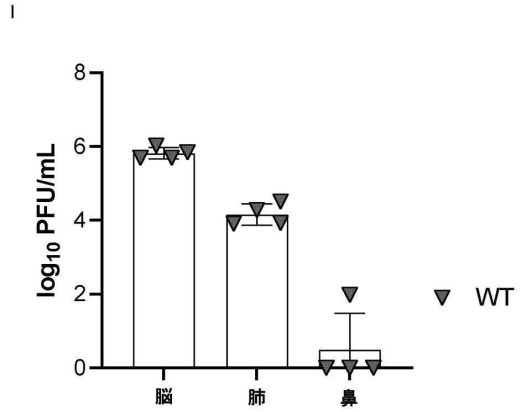


図 8 I, J

【 図 9 】

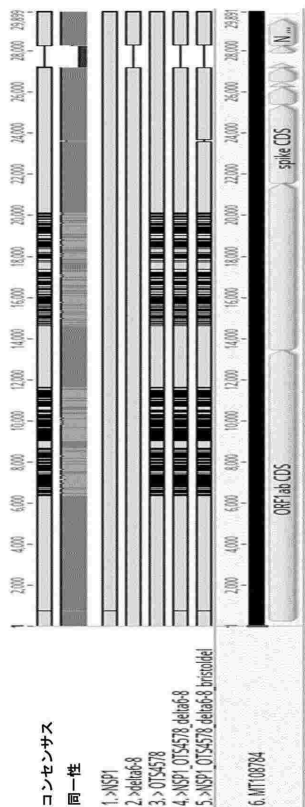


図 9

【 図 10 】

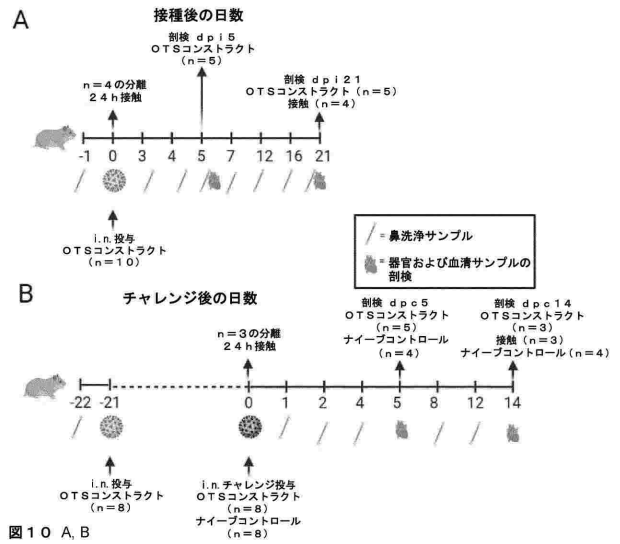


図 10 A, B

10

20

30

40

50

【 図 1 1 】

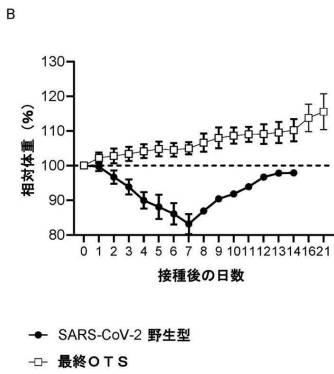
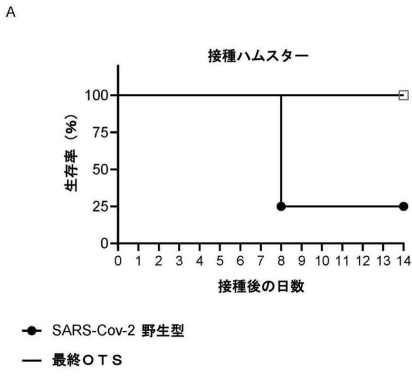


図 11 A, B

【 図 1 3 】

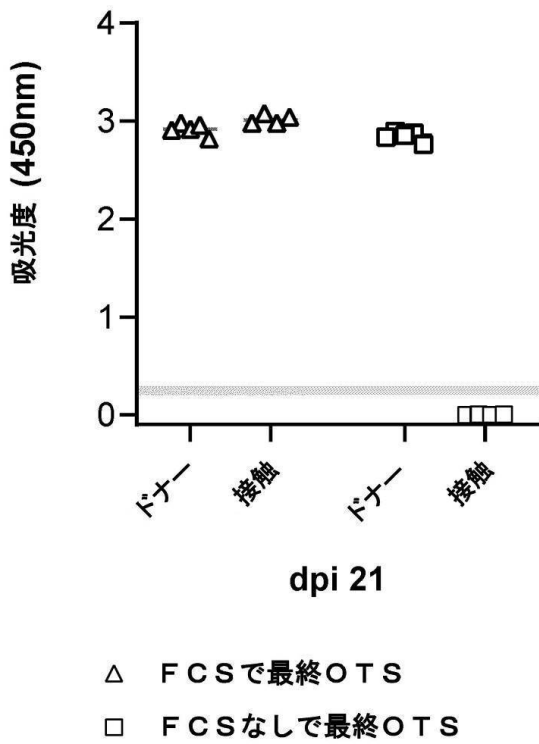


図 1 3

【 図 1 2 】

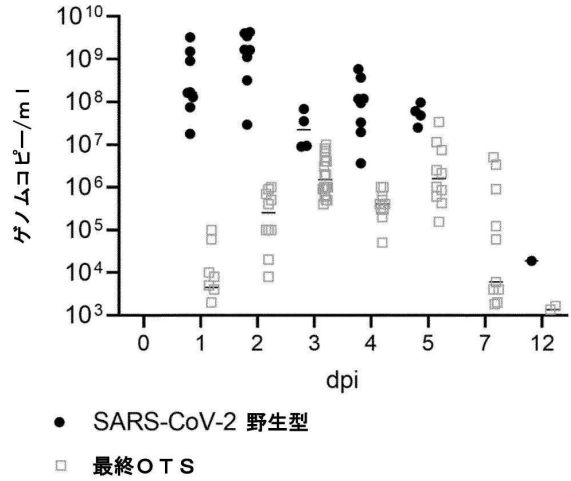


図 1 2

【 図 1 4 】

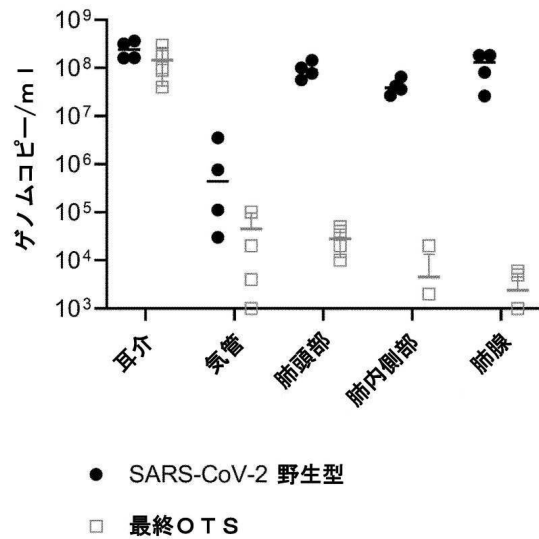


図 1 4

10

20

30

40

50

【 図 1 5 】

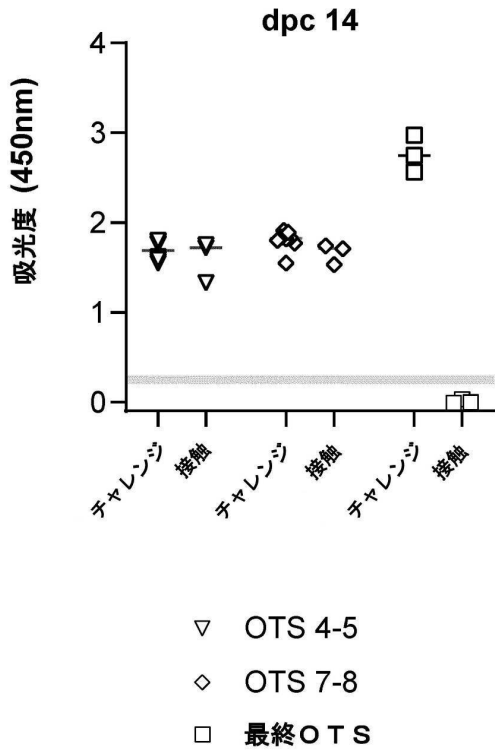


図 1 5

【 図 1 6 】

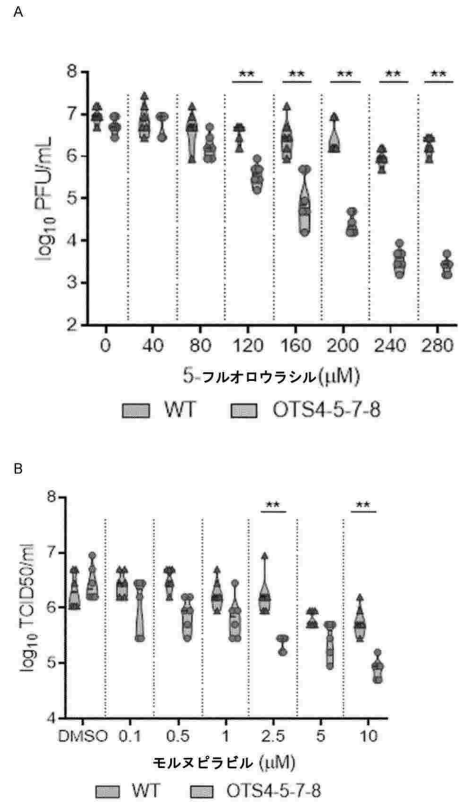


図 1 6 A, B

【 図 1 7 】

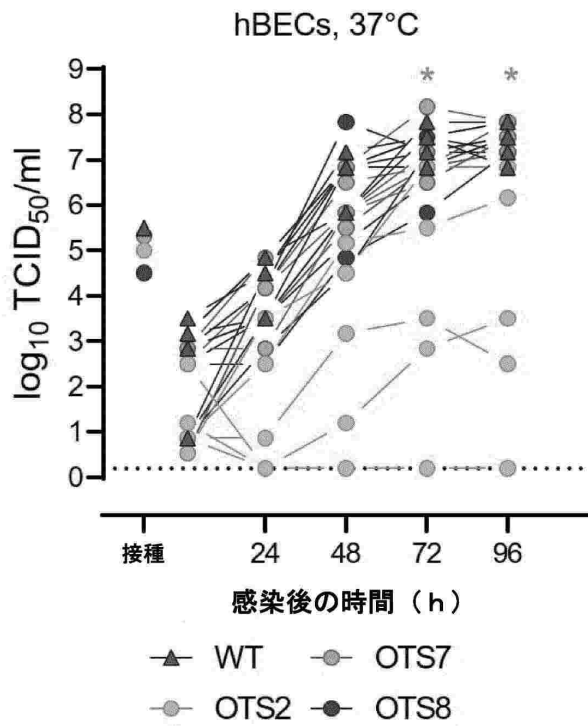


図 1 7

【 図 1 8 】

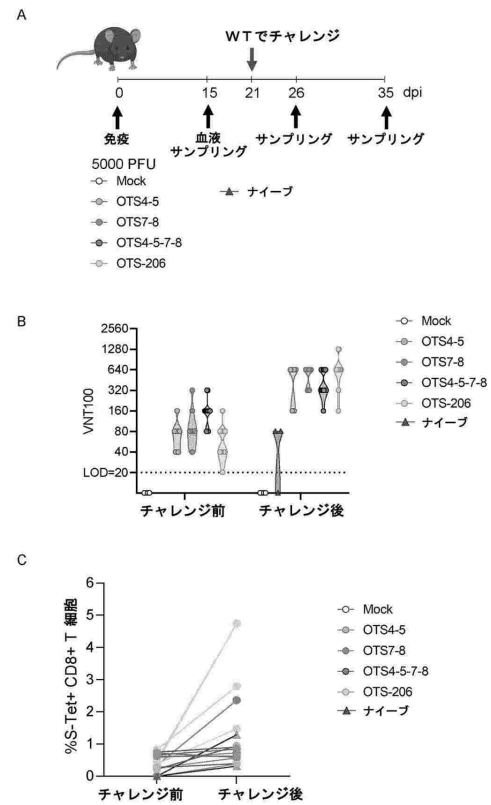


図 1 8 A, B, C

10

20

30

40

50

【配列表】

2025513753000001.xml

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

International application No.

PCT/EP2023/058069

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

- 1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
 - accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
- 2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
- 3. Additional comments:

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/058069

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. **A61K39/215 A61K39/12 A61P31/14**
 ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61P A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TRIMPERT JAKOB ET AL: "Development of safe and highly protective live-attenuated SARS-CoV-2 vaccine candidates by genome recoding", CELL REPORTS, vol. 36, no. 5, 1 August 2021 (2021-08-01), page 109493, XP055961985, US ISSN: 2211-1247, DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109493 vaccine design; abstract; figure 1 ----- -/--	1-31

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 20 June 2023	Date of mailing of the international search report 28/06/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Renggli-Zulliger, N

10

20

30

40

1

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/058069

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WO 2021/154828 A1 (CODAGENIX INC [US]) 5 August 2021 (2021-08-05) paragraph [0094] - paragraph [0113]; table 2 paragraph [0114] - paragraph [0140] paragraph [0012] sequence 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-31
Y	<p>GONÇALVES-CARNEIRO DANIEL ET AL: "Mechanisms of Attenuation by Genetic Recoding of Viruses", MBIO, vol. 12, no. 1, 23 February 2021 (2021-02-23), XP093028975, US ISSN: 2161-2129, DOI: 10.1128/mBio.02238-20 Evolutionary space entrapment; figure 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-31
Y	<p>MORATORIO GONZALO ET AL: "Attenuation of RNA viruses by redirecting their evolution in sequence space", NATURE MICROBIOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP UK, LONDON, vol. 2, no. 8, 5 June 2017 (2017-06-05), XP037065483, DOI: 10.1038/NMICROBIOL.2017.88 abstract; figure 1 figures 4,5 page 9, last para before "method"; page 7</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-31
Y	<p>YUAN SHUAI ET AL: "Coronavirus Nsp1: Immune Response Suppression and Protein Expression Inhibition", FRONTIERS IN MICROBIOLOGY, vol. 12, 28 September 2021 (2021-09-28), XP093029257, Lausanne ISSN: 1664-302X, DOI: 10.3389/fmicb.2021.752214 abstract page 6, left-hand column conclusion</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	14,20

10

20

30

40

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/058069

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>Liu Yang ET AL: "A live-attenuated SARS-CoV-2 vaccine candidate with accessory protein deletions", bioRxiv, 15 February 2022 (2022-02-15), pages 1-44, XP093055958, DOI: 10.1101/2022.02.14.480460 Retrieved from the Internet: URL:https://doi.org/10.1101/2022.02.14.480460 [retrieved on 2023-06-20] abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	15-18,20
Y	<p>KABINGER FLORIAN ET AL: "Mechanism of molnupiravir-induced SARS-CoV-2 mutagenesis", NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP US, NEW YORK, vol. 28, no. 9, 11 August 2021 (2021-08-11), pages 740-746, XP037561659, ISSN: 1545-9993, DOI: 10.1038/S41594-021-00651-0 [retrieved on 2021-08-11] abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	27-31
Y	<p>SMITH EVERETT CLINTON ET AL: "Coronaviruses Lacking Exoribonuclease Activity Are Susceptible to Lethal Mutagenesis: Evidence for Proofreading and Potential Therapeutics", PLOS PATHOGENS, vol. 9, no. 8, 15 August 2013 (2013-08-15) , page e1003565, XP093055898, DOI: 10.1371/journal.ppat.1003565 abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	27-31

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/058069

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2021154828 A1	05-08-2021	AU 2021213121 A1	18-08-2022
		BR 112022014700 A2	11-10-2022
		CA 3168100 A1	05-08-2021
		CL 2022002030 A1	10-03-2023
		CN 115427073 A	02-12-2022
		CO 2022010743 A2	30-08-2022
		EP 4096712 A1	07-12-2022
		IL 295112 A	01-09-2022
		JP 2023519640 A	11-05-2023
		KR 20220132588 A	30-09-2022
		PE 20230166 A1	01-02-2023
		TW 202144570 A	01-12-2021
		US 2023117167 A1	20-04-2023
		WO 2021154828 A1	05-08-2021

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	7/00 (2006.01)	C 1 2 N	7/00	
A 6 1 P	31/14 (2006.01)	A 6 1 P	31/14	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12	
A 6 1 K	31/513(2006.01)	A 6 1 K	31/513	
A 6 1 K	31/7068(2006.01)	A 6 1 K	31/7068	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1

,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,D
E,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,S
M,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,
AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,
ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,L
A,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,P
H,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,
UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

9 3 , 3 1 4 7 M i t t e l h a u s e r n , S w i t z e r l a n d

(74)代理人 100136629

弁理士 鎌田 光宣

(74)代理人 100080791

弁理士 高島 一

(74)代理人 100125070

弁理士 土井 京子

(74)代理人 100121212

弁理士 田村 弥栄子

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(74)代理人 100137729

弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100152308

弁理士 中 正道

(74)代理人 100201558

弁理士 亀井 恵二郎

(74)代理人 100118371

弁理士 駒 谷 剛志

(72)発明者 ティール、フォルカー

スイス連邦、3 0 0 4 ベルン、トゥルペンヴェーク 3

(72)発明者 エーベルト、ナディーネ

スイス連邦、3 0 7 6 ヴォルプ、デンテンベルグシュトラッセ 4 9

(72)発明者 トリューブ、ベッティナー サロメ

スイス連邦、3 0 0 7 ベルン、ベルプシュトラッセ 2 9

(72)発明者 バルト、ギュリズ チューバ

スイス連邦、3 0 0 7 ベルン、ベルプシュトラッセ 2 9

(72)発明者 クラツェル、アニカ

スイス連邦、3 0 0 8 ベルン、シェンクシュトラッセ 3 1

(72)発明者 ヨレス、イェルク

スイス連邦、3 0 9 8 ケーニッツ、タルブリュンリヴェーク 8

(72)発明者 ラブルッサ、ファピアン

スイス連邦、3 0 9 8 ケーニッツ、シュヴァルツェンブルクシュトラッセ 2 9 2

-
- (72)発明者 ビール、マーティン
ドイツ連邦共和国、17498 ノイエンキルヒェン、アルヴィネ - ヴテノー - リング 2ペー
- (72)発明者 ホフマン、ドナータ
ドイツ連邦共和国、17498 メセケンハーゲン、アン デン ゼーヴィーゼン 26
- (72)発明者 シェーン、ヤコブ
ドイツ連邦共和国、17489 グライフスヴァルト、プライヒシュトラーセ 46
- (72)発明者 ハルヴェ、ニコ ヨエル
ドイツ連邦共和国、17489 グライフスヴァルト、シュタインシュトラーセ 5
- (72)発明者 ウルリヒ、ローレンツ
ドイツ連邦共和国、66459 リンバッハ バイ ホンブルグ (ザール)、ハオプトシュトラーセ
40
- F ターム (参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AA95Y AB01 BA02 CA44
4C086 AA01 AA02 BC43 EA11 MA02 MA04 NA14 ZB33 ZC75
4C087 AA01 AA02 BB63 BC83 CA12 MA02 NA14 ZB33 ZC75