



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102083463 B

(45)授权公告日 2017.04.05

(21)申请号 200980118773.7

(22)申请日 2009.05.22

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 102083463 A

(43)申请公布日 2011.06.01

(30)优先权数据

61/071,898 2008.05.23 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2010.11.23

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2009/056240 2009.05.22

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2009/141434 EN 2009.11.26

(73)专利权人 非特生物技术有限责任公司

地址 芬兰坦佩雷

(72)发明人 K·克伊沃 R·斯库特 U·托茨

T·默尔多 A·门尼克

M·乌斯塔夫 K·卡尔德玛

(74)专利代理机构 北京同达信恒知识产权代理有限公司 11291

代理人 黄志华

(51)Int.Cl.

A61K 39/39(2006.01)

A61P 37/04(2006.01)

(56)对比文件

WOLFGANG W. LEITNER et

al..Alphavirus-based DNA vaccine breaks immunological tolerance by activating innate antiviral pathways.《NATURE MEDICINE》.2002,第9卷(第1期),第33-39页.

审查员 李恩

权利要求书2页 说明书24页

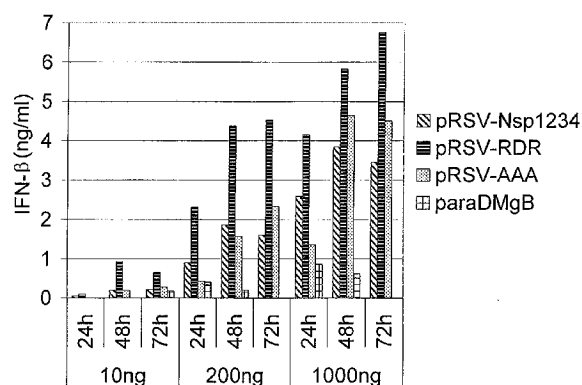
序列表41页 附图8页

(54)发明名称

编码甲病毒属复制酶的表达载体及其作为免疫佐剂的用途

(57)摘要

本发明涉及用作免疫系统调节佐剂的甲病毒属复制酶,特别是Semliki森林病毒复制酶,或编码甲病毒属复制酶的表达载体,所述甲病毒属复制酶包含RNA依赖型RNA聚合酶活性。所述甲病毒属复制酶可与疫苗组合使用,提供佐剂功能,与向需要疫苗的对象仅施用疫苗时相比,当组合中存在所述甲病毒属复制酶时,所述甲病毒属复制酶能够对施用该组合的对象产生额外的免疫应答增强。本发明的目的在于提供一种有效且易于施用的与物种无关的佐剂,该佐剂优于与目前的疫苗组合施用的佐剂。



1. 甲病毒属复制酶在制备免疫系统调节佐剂中的用途,所述复制酶包含RNA依赖型RNA聚合酶,其中,没有为所述佐剂提供包含用于与复制酶佐剂的RNA依赖型RNA聚合酶相互作用的顺式信号的甲病毒属模板RNA。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述甲病毒为Semliki森林病毒。

3. 根据权利要求2所述的用途,其中所述复制酶的氨基酸序列与SEQ ID NO:1具有至少99%的一致性。

4. 根据权利要求3所述的用途,其中所述复制酶在nsP2区域突变,产生在SEQ ID NO:1的1185-1187位点的突变体RRR>RDR。

5. 根据权利要求3所述的用途,其中所述复制酶在nsP2区域突变,产生在SEQ ID NO:1的1185-1187位点的突变体RRR>AAA。

6. 根据权利要求1-5任一项所述的用途,其中所述复制酶与药学上可接受的赋形剂和/或成分一起配制。

7. 根据权利要求1-5任一项所述的用途,其中所述复制酶存在于疫苗组合物中。

8. 根据权利要求1-5中任一项中所定义的甲病毒属复制酶在制备用于调节免疫系统的佐剂中的用途,其中,所述复制酶由表达载体编码,没有为所述佐剂提供包含用于与所述复制酶的RNA依赖型RNA聚合酶相互作用的顺式信号的甲病毒属模板RNA。

9. 根据权利要求8所述的用途,其中所述复制酶由SEQ ID NO:4编码。

10. 根据权利要求9所述的用途,其中所述表达载体为pRSV-Nsp1234、pRSV-RDR或者pRSV-AAA。

11. 根据权利要求8所述的用途,其中所述表达载体为DNA载体。

12. 根据权利要求8-11任一项所述的用途,其中编码所述复制酶的所述表达载体与药学上可接受的赋形剂和/或成分一起配制。

13. 根据权利要求8-11任一项所述的用途,其中所述复制酶存在于疫苗组合物中。

14. 权利要求1-13中的任一项中所定义的甲病毒属复制酶用于制备预防和/或治疗传染性疾病的药物的用途,所述复制酶在疫苗组合物中,其中,没有为所述药物提供包含用于与所述复制酶的RNA依赖型RNA聚合酶相互作用的顺式信号的甲病毒属模板RNA。

15. 根据权利要求14所述的用途,其中所述疫苗组合物用于细菌性疾病的预防和/或治疗。

16. 根据权利要求14所述的用途,其中所述复制酶用于病毒性疾病的预防和/或治疗。

17. 根据权利要求16所述的用途,其中所述病毒性疾病为HIV。

18. 根据权利要求14-17任一项所述的用途,其中所述疫苗组合物包含基于蛋白质的疫苗。

19. 根据权利要求14-17任一项所述的用途,其中所述疫苗组合物包含编码一种或多种抗原的表达载体。

20. 根据权利要求19所述的用途,其中所述复制酶和所述一种或多种抗原由相同的表达载体编码。

21. 根据权利要求19所述的用途,其中所述编码一种或多种抗原的表达载体为DNA载体。

22. 根据权利要求21所述的用途,其中所述DNA载体为包含以下物质的表达载体:

- a) 对有效连接至异源启动子的核锚固蛋白进行编码的DNA序列,所述核锚固蛋白包括:
- i) 结合于特定DNA序列上的DNA结合域,和
- ii) 结合于核组分上的功能域;以及
- b) 用于核锚固蛋白的多聚体DNA结合序列,
- 其中,所述DNA载体缺失在哺乳动物中发挥作用的复制起点。

23. 根据权利要求22所述的用途,其中i) 部分和/或ii) 部分由I型牛乳头状瘤病毒的E2蛋白获得。

24. 根据权利要求19所述的用途,其中编码一种或多种抗原的所述表达载体为GTU-Multi-HIV。

25. 权利要求1-13中的任一项中所定义的甲病毒属复制酶用于制备预防和/或治疗癌症的药物的用途,所述复制酶在疫苗组合物中,其中,没有为所述药物提供包含用于与所述复制酶的RNA依赖型RNA聚合酶相互作用的顺式信号的甲病毒属模板RNA。

26. 根据权利要求25所述的用途,其中所述疫苗组合物包含基于蛋白质的疫苗。

27. 根据权利要求25所述的用途,其中所述疫苗组合物包含编码一种或多种抗原的表达载体。

28. 根据权利要求27所述的用途,其中所述复制酶和所述一种或多种抗原由相同的表达载体编码。

29. 根据权利要求27所述的用途,其中所述编码一种或多种抗原的表达载体为DNA载体。

30. 根据权利要求29所述的用途,其中所述DNA载体为包含以下物质的表达载体:

- a) 对有效连接至异源启动子的核锚固蛋白进行编码的DNA序列,所述核锚固蛋白包括:
- i) 结合于特定DNA序列上的DNA结合域,和
- ii) 结合于核组分上的功能域;以及
- b) 用于核锚固蛋白的多聚体DNA结合序列,
- 其中,所述DNA载体缺失在哺乳动物中发挥作用的复制起点。

31. 根据权利要求30所述的用途,其中i) 部分和/或ii) 部分由I型牛乳头状瘤病毒的E2蛋白获得。

32. 根据权利要求27所述的用途,其中编码一种或多种抗原的所述表达载体为GTU-Multi-HIV。

33. 一种包括表达盒的表达载体,所述表达盒编码甲病毒属复制酶,所述复制酶与SEQ ID NO:1具有至少99%的一致性,但是,其中所述复制酶在nsP2区域发生突变,产生在SEQ ID NO:1的1185-1187位点的突变体RRR>RDR,其中,所述表达载体不表达任何用于与所述复制酶的RNA依赖型RNA聚合酶相互作用的甲病毒属顺式序列。

34. 根据权利要求33所述的表达载体,所述表达盒含有与SEQ ID NO:4具有至少99%的一致性的序列,在所述SEQ ID NO:4的4129-4131位点引入突变,当所述表达载体被表达时,产生在SEQ ID NO:1的1185-1187位点的突变体RRR>RDR。

35. 根据权利要求34所述的表达载体,其中所述表达载体为pRSV-RDR。

36. 根据权利要求33-35任一项所述的表达载体,其用于制备药物。

编码甲病毒属复制酶的表达载体及其作为免疫佐剂的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫用品领域,特别涉及疫苗领域,并且涉及适用于疫苗组合物的佐剂。

背景技术

[0002] 为了在包括定居在如皮肤、肠道、上呼吸道和下呼吸道、泌尿生殖道等小生境中的大量微生物的环境中存活,哺乳动物的免疫系统已经进化。部分小生境如结肠和皮肤本质上被内源性微生物群占据,而其它小生境(内脏器官和下呼吸道)在免疫活性宿主内通常保持无菌。微生物可对宿主发挥积极作用,如很多肠道共生细菌。在其它情况下,微生物侵入对于宿主可能是有害的。这种消极作用取决于宿主免疫系统的情况-某些病原体(称作机会病原体)仅影响免疫系统受损的个体。微生物感染的潜在有害作用已经引起多种宿主防御机能的进化。在有颌类脊椎动物中,存在两种类型的防御:先天性免疫应答和适应性免疫应答。二者的主要区别在于用于识别病原体的受体类型、激发应答需要的时间延迟和是否存在记忆。这两类防御不能完全相互独立地进作。如在下文中所述,先天性免疫系统向适应性免疫系统发出特定信号,有助于激发对特定病原体最有效的应答;反之亦然,即适应性免疫系统也激活先天性免疫系统的部分模块。

[0003] 先天性免疫应答

[0004] 先天性免疫总是存在于健康的个体中,其主要功能在于阻止微生物和病毒侵入,以及快速除去成功侵入宿主组织中的病原体。先天性免疫为多细胞有机体提供即时保护。

[0005] 先天性免疫系统不是单一实体。该体系是在不同进化阶段出现的不同模块或子系统的集合:

[0006] • 产生抗微生物肽、防止宿主被病原体侵入的黏膜上皮;

[0007] • 针对细胞内细菌和细胞外细菌具有抗微生物机能的吞噬细胞;

[0008] • 在血液循环和体液中发挥作用的急性期蛋白和补体系统;

[0009] • 参与杀伤病毒感染的细胞的自然杀伤细胞;

[0010] • 参与抗多细胞寄生虫保护的嗜曙红细胞、嗜碱细胞和肥大细胞;

[0011] • 在病毒防御中起到关键作用的I型干扰素以及由其诱导的蛋白质。

[0012] 先天性免疫应答负责侵入微生物的早期检测和杀伤,并依赖于一组有限的胚系细胞编码的用于检测的模式识别受体 (PRR)。为引发免疫应答,PRR识别病原相关分子模式 (PAMP),并诱导数个细胞外级联激活,例如导致炎症反应的补体途径和各种分子内信号途径。

[0013] 先天性免疫系统利用存在于三个不同分离部分的PRR,所述分离部分为:体液、细胞膜和细胞质。体液中的PRR在PAMP调理作用、补体途径的激活和某些情况下PAMP向其它PRR的转移中起主要作用。位于细胞膜上的PRR具有多种功能,例如呈递PAMP至其它PRR,促进通过吞噬作用进行的微生物摄取以及引发主信号途径。

[0014] 存在功能不同的多种PRR。最具特征的一种为Toll样受体 (TLR)。识别病毒核酸和

多种细菌产物的跨膜受体是产生初级信号的PRR,所述细菌产物包括脂多糖和脂磷壁酸(Akira,S 2006)。另外,细胞质PRR可分为三类:干扰素(IFN)-诱导蛋白、脱天蛋白酶募集域(CARD)螺旋酶和核苷酸结合寡聚化结构域(NOD)样受体(NLR)。研究最充分的IFN诱导型抗病毒蛋白质为抗黏液病毒蛋白(Mx)家族、蛋白激酶R(PKR)、寡腺苷酸合成酶(2'-5' OAS)。这些抗病毒蛋白和CARD螺旋酶(例如RIG-I和Mda5)参与抗病毒防御。相反,NLR主要参与抗菌免疫应答。

[0015] Toll样受体(TLR)

[0016] TLR是PRR中最具特征的信号生成受体。其引发关键的炎症反应,并形成适应性免疫。哺乳动物中已知的所有TLR(TLR1-11)均为I型膜内在糖蛋白,所述膜内在糖蛋白包括负责配体识别的细胞外亮氨酸富集重复(LRR)结构域以及用于引发信号的细胞质Toll-白细胞介素-1受体同源(TIR)结构域。TLR识别细菌、真菌、寄生虫和含核酸病毒中非常不同的微生物成分。尽管通常存在于质膜中以检测细胞外的PAMP,但是包括TLR3、TLR7、TLR8和TLR9的少量TLR识别细胞内部分(例如核内体)的配体。后者中的TLR共有核酸识别能力,以检测dsRNA(双链RNA)(TLR3)、ssRNA(单链RNA)(小鼠中的TLR7,人体中的TLR8)和非甲基化CpG DNA基序(TLR9)。

[0017] TLR通过募集四个含TIR结构域的衔接分子:MyD88、TIRAP、Trif和TRAM的不同组合引发共有信号途径和不同的信号途径。除TLR3以外,所有其它TLR募集髓样分化因子88(MyD88),所述MyD88与IL受体相关激酶(IRAK)家族的成员有关(Mouldy Sioud 2006)。这些信号途径激活核转录因子 κ B(NF- κ B)和激活蛋白-1(AP-1),所述AP-1是所有TLR共有的,导致炎性细胞因子和趋化因子的产生。这些信号途径还激活TLR3、TLR4、TLR7、TLR8和TLR9中的干扰素调节因子-3(IRF3)和/或IRF7,其为产生I型干扰素(如IFN- α 和IFN- β)的先决条件(For review Edwards et al 2007,Vercammen et al 2008,Medzhitov R 2007)。

[0018] 除先天性宿主防御机能的直接活化外,部分PRR与适应性免疫应答的诱导相结合。适应性免疫系统中的两种主要细胞,即T细胞和B细胞,表达具有随机特性的抗原结合受体,从而识别缺失任何指示其来源的固有特征的抗原。因此,T淋巴细胞和B淋巴细胞需要标示其所识别的抗原的来源的指示。这些指示以PRR诱导型特征信号的形式来自先天性免疫系统。对于T细胞,该联系通过树突状细胞进行解释。I型干扰素参与树突状细胞的活化和迁移(在抗病毒应答中更加详细地描述)。当活化树突状细胞迁移至淋巴结时,其将源于病原体的抗原与PRR诱导的信号一起呈递至T细胞。这导致T细胞活化,并使T辅助(Th)细胞分化成多种效应Th细胞(Th1细胞、Th2细胞和Th-17细胞)中的一种。例如TLR衔接(TLR-engagement)通过树突状细胞诱导IL-12的产生,这指示Th细胞分化成Th1细胞。从而,这类效应应答(effector response)由先天性免疫系统指令。另外,I型干扰素还直接或间接地通过诱导IL-15的产生来调节细胞毒T细胞和NK细胞的功能。

[0019] 先天性免疫系统还从适应性免疫系统中接收正反馈信号。例如,效应Th细胞产生适宜的细胞因子,所述细胞因子活化先天性免疫系统的特定模块:巨噬细胞由Th1细胞分泌的细胞因子(干扰素- γ)活化,嗜中性粒细胞由Th-17细胞(白介素-17)活化,肥大细胞和嗜碱细胞由Th2细胞(白介素-4和白介素-5)活化。同样地,结合抗体(IgG)活化补体蛋白,并通过调理病原促进吞噬作用。

[0020] 适应性免疫系统

[0021] 适应性免疫系统使用较宽范围的分子进行活化。其中部分分子还用于先天性免疫系统,如补体蛋白,包括抗原特异性B细胞和T细胞受体的其它物质仅适用于适应性免疫系统。适应性免疫系统区别于先天性免疫的最重要的性质在于B细胞受体和T细胞受体的良好特异性,和应答的更加缓慢的发展以及对先前暴露于抗原的记忆。后一性质形成了疫苗接种的基础—通过减毒的病原体、病原体的选定成分或以其它方式(例如通过编码来自病原体的选择抗原的DNA-疫苗)模拟感染引发免疫系统,导致免疫记忆的发展,在遭遇病原体时,更加迅速和更加有效地引起应答。

[0022] 存在两类适应性免疫,体液免疫和细胞介导免疫。体液免疫通过B细胞介导。活化的B细胞开始向血液循环和黏膜液(mucosal fluid)中分泌受体,在此情况下将其称作抗体(免疫球蛋白)。编码这些受体的基因在遭遇病原体前,于体细胞重组过程中,由可变片段和恒定片段装配而成,得到所有不同成员的受体。每个B细胞或T细胞都能够合成免疫球蛋白或结合特定分子结构(表位)的单一特异性T细胞受体。抗体非共价地结合特定抗原并将其固定,使其无害化或标记抗原以将其破坏(例如通过补体蛋白或巨噬细胞),并通过免疫系统的其它组分除去。细胞介导免疫通过T细胞介导。在大部分适应性免疫应答中,T细胞均是关键物质。其直接参与除去感染细胞(CD8+细胞毒T细胞)或通过产生各种细胞因子(CD4+T辅助细胞)协调和调整其它细胞的活性。通过B细胞进行的抗体诱导在大部分情况下也依赖于T辅助细胞。T细胞抗原受体的显著特征在于无法识别可溶性分子—其可识别细胞表面上的结合于专用肽显示分子(被称作主要组织相容性复合体(MHC))的蛋白质抗原的肽片段。T辅助细胞需要MHC II类分子以识别抗原性肽片段,细胞毒T细胞需要MHC I类分子。该特征使得T细胞能够检测细胞内病原体,否则病原体将不能被免疫系统检测,原因在于来自真核细胞中合成的所有蛋白质的短肽(9-10个氨基酸)(包括衍生自病原体的肽)均暴露于细胞表面上的MHC分子的肽袋(peptide pocket)内。在通过专职抗原呈递细胞(APC)捕获病原体后引发适应性免疫应答。幼稚T淋巴细胞需要遭遇由APC上的MHC抗原呈递的抗原。这些细胞存在于身体的所有上皮中,所述上皮为身体与外界环境间的界面。除此以外,在其它大部分器官内也存在少量的APC。上皮中的APC属于树突状细胞谱系。在皮肤中,表皮树突状细胞称作朗格汉斯细胞。树突状细胞通过吞噬作用或胞饮作用捕获进入上皮组织的微生物抗原。树突状细胞捕获抗原后发生聚集并丧失其对上皮组织的粘附性,树突状细胞脱离上皮组织,并通过淋巴管迁移至排泄该上皮组织的淋巴结中。在迁移过程中所述树突状细胞成熟为能够刺激T细胞的细胞。该成熟体现在以及MHC分子的合成增加和稳定表达中,所述MHC分子将抗原展示给T细胞以及完整的T细胞应答所需的其它分子,共刺激分子。这一连续事件的结果为微生物的蛋白质抗原被输送至淋巴结的特定区域,在该区域抗原很可能遭遇T淋巴细胞。幼稚T淋巴细胞通过淋巴结不断地再循环,推测体内的每个幼稚T细胞每天通过部分淋巴结至少循环一次。从而,T细胞与抗原的初次遭遇发生在淋巴结中,并将其称作致敏(priming)。致敏的CD4+T辅助细胞开始分泌促进免疫系统的其它细胞应答的各种细胞因子。树突状细胞不但向淋巴结传输来自病原体的肽片段,而且还传导由先天性免疫系统发出的PRR诱导信号(如上文所述,I型IFN影响树突状细胞的激活和分化)。树突状细胞将该信息转变成特定T细胞克隆(其识别病原体的肽)的活化以及T辅助细胞的适当类型的分化。CD8+T细胞的致敏也通过树突状细胞实施,但CD8+T细胞向功能完全的杀伤细胞的进一步增殖和熟化依赖于T辅助细胞分泌的细胞因子。

[0023] 总之,在先天性免疫系统和适应性免疫系统之间存在连续且复杂的相互影响。成功开发针对目前尚不存在疫苗的“疑难”病原体(人免疫缺陷病毒1(HIV-1)、结核病(TB)和疟疾)的疫苗也许依赖于开拓全新方法以引发保护性免疫应答。

[0024] 对正链RNA病毒的抗病毒应答及其复制副产物

[0025] 正链RNA病毒

[0026] 正链RNA病毒包括超过1/3的病毒种类。正链RNA病毒基因组是翻译和复制的模板,其导致宿主翻译因子(host translation factor)与RNA复制之间在多水平相互作用。所有已知的正链RNA病毒均携带用于基因组复制的RNA依赖性RNA聚合酶(RdRp)的基因。然而,不同于其它RNA病毒,正链RNA病毒不将该聚合酶壳体化。因此,在新细胞感染时,直至基因组RNA进行翻译以产生聚合酶(对于大部分正链RNA病毒而言还有复制因子)时,才开始病毒RNA复制。所有特征化的正链RNA病毒均将其RNA复制复合体装配到细胞内膜上。在甲病毒样超家族中及其以外,病毒RNA复制的发生与细胞内膜的球形内陷(spherical invagination)相关联。例如,甲病毒采用内体膜和溶酶体膜进行其复制复合体的组装。所述膜提供一个表面,复制因子定位于该表面上,并在该表面上浓缩。这个结构还有助于保护任何dsRNA复制中间体免受dsRNA诱导的宿主防御应答,如RNA干扰或干扰素诱导的应答(Ahlquist P等,2003)。

[0027] 尽管基因组结构、病毒体形态(virion morphology)和宿主范围不同,但正链RNA病毒具有基本上相似的基因组复制策略。明显地,病毒(+) RNA基因组具有与细胞mRNA相同的极性,并且病毒基因组RNA通过细胞翻译体系直接翻译。首先,合成非结构蛋白作为前体多蛋白,并通过病毒蛋白酶将其剪切成成熟的非结构蛋白。大量病毒基因组被用于非结构蛋白,所述非结构蛋白不是病毒体的一部分,在病毒复制期间发挥重要功能。在翻译和多蛋白处理后,组装包括RdRp、进一步附加的非结构蛋白、病毒RNA和宿主细胞因子的复合体。这些所谓的复制复合体(RC)进行病毒RNA的合成。负义病毒RNA在感染早期合成,并在复制复合体形成后,将该负链RNA用作模板以合成全长的正义基因组RNA以及亚基因组RNA。负责这些步骤的关键酶为在复制酶复合体内起作用的RNA依赖型RNA聚合酶(Moradpour等2007, Miller和Krijnse-Locker 2008)。

[0028] 病毒RNA释义

[0029] 正链RNA病毒在复制过程中产生负链RNA、正链RNA、双链RNA(dsRNA)和亚基因组mRNA,这些物质自身即是先天性免疫应答途径的强诱导剂。通过TLR3(dsRNA)、TLR7/8(ssRNA)和识别ssRNA二级结构中特定结构要素的其它TLR诱导该效果。例如,黄热病病毒(正链RNA病毒)减毒活疫苗被明确为可获得的最有效疫苗之一,该减毒活疫苗通过多个Toll样受体激活先天性免疫,对长效抗原特异性T细胞应答质量也引起不同效果(Querec TD and Pulendran B Adv Exp Med Biol.2007;590:43-53)。

[0030] 如上所述,细胞在应答胞质病毒的存在时,利用受体和信号途径来诱导抗病毒基因表达。包括白介素-6(IL-6)、IL-12p40和肿瘤坏死因子(TNF)的多个细胞因子由病毒感染所诱导,但抗病毒应答的标志为I型干扰素的产生。根据具体种类,I型干扰素包括由独立的无内含子基因编码的多个亚型:一个IFN- β 亚型和13-14个IFN- α 亚型。在应答病毒感染时,I型干扰素可由所有有核细胞产生,所述有核细胞包括上皮细胞、黏膜表面的成纤维细胞以及树突状细胞。另外,所有细胞均可通过结合所有亚型的I型干扰素受体(IFNAR)对I型干扰

素作出应答。

[0031] 编码胞质PRR和下游信号途径的成分的基因本身即为诱导型干扰素,并引起可极度放大先天性抗病毒应答的正反馈循环。认为该循环由细胞内dsRNA的存在而引发。由于非感染细胞中缺失长dsRNA分子,但其可通过在RNA病毒复制过程中产生的双链RNA的补充退火(complementary annealing)形成,所以,dsRNA满足作为病毒感染标记物的条件。已知dsRNA激活核因子 κ B (NF- κ B) 和干扰素调节因子-3 (IRF-3) 和干扰素调节因子-7,这些因子在I型IFN的合成中是必需的。干扰素通过特定细胞表面受体IFNAR介导其抗病毒应答,该受体激活移动至细胞核中并激活大量IFN激活基因 (ISG) 的细胞质信号传导及转录活化因子 (STAT) (Rautsi等2007)。

[0032] 视黄酸诱导基因I (RIG-I) 和黑色素瘤分化相关基因5 (MDA5) 为可检测细胞内病毒产物的胞质IFN诱导型DEXD/H盒RNA-螺旋酶,所述病毒产物例如为基因组RNA、用于IRF3与IRF7激活的信号以及用于诱导IFN- α 、IFN- β 和IFN- λ 基因表达的信号。RIG-I为包含RNA结合螺旋酶结构域的两个脱天蛋白酶活化募集结构域 (CARD) 的胞质蛋白。与RIG-I相似,MDA5具有RNA-螺旋酶结构域和两个CARD。RIG-I和MDA5均通过干扰素- β 启动刺激因子-1 (IPS-1) 发出信号。信号衔接头IPS-1位于线粒体上,并包含与RIG-I和Mda5形成同型相互作用的N-末端CARD。这导致C末端催化结构域的激活,并通过NF- κ B和IRF3的激活而引发在细胞因子基因转录中达到极点的信号级联。

[0033] 尽管RIG-I和Mda5均结合聚肌胞苷酸、合成的dsRNA和通过共同途径的信号,但RIG-I和Mda5选择性地对不同病毒作出应答。例如RIG-I检测流感A病毒、疱疹性口炎病毒 (VSV)、日本脑炎病毒 (JEV) 和仙台病毒 (SeV),而MDA5检测微小核糖核酸病毒属,例如脑心肌炎病毒 (EMCV)、Theiler氏脑脊髓炎病毒 (Theiler's encephalomyelitis virus) 和门戈病毒。无论单链或双链,由RNA引起的RIG-I激活中关键要素为存在5'-三磷酸盐。这也提供了RIG-I的病毒特异性的解释。

[0034] I型干扰素影响各种亚型的树突状细胞 (DC)。I型干扰素可作为某些天然干扰素产生细胞的自分泌存活因子,促进外围血液单核细胞向DC的分化,并诱导DC表型及功能的成熟。由于大部分细胞类型均能够表达I型干扰素,非淋巴组织中DC的成熟在邻近细胞感染后引发。这些DC将获得迁移至淋巴器官中并引发T细胞应答的能力 (LeBon和Tough 2002)。

[0035] I型干扰素信号还通过DC和T细胞上调IFN- γ 的产生,从而有助于Th1细胞的诱导和保持。另外,通过直接或间接作用,I型干扰素可影响各种细胞因子的表达和功能。例如增强白介素-6 (IL-6) 发出的信号以及抗炎转化生长因子 β (TGF- β)、IL-1受体拮抗剂和可溶性肿瘤坏死因子 (TNF) 受体的产生。I型干扰素或其诱导剂还可通过DC引起高IL-15表达,从而引起记忆性表型CD8+T细胞强且选择性的刺激 (Theofilopoulos等2005)。

[0036] 上文中已经描述了特定病毒性病原体感染模式(如dsRNA在病毒感染细胞的细胞质中的累积)、对这些模式进行应答的识别因子(如Toll样受体)以及由这些相互作用引起的不同抗病毒防御途径。称作先天性免疫的复合体系被用于引起一系列事件,即从病原体的识别至破坏感染病毒的细胞,并将病毒感染迅速从体内清除。另外,先天性免疫系统的激活是针对病毒抗原而引起的适应性免疫应答的数量和质量的重要决定性因素 (Germain RN 2004)。

[0037] 免疫佐剂

[0038] 免疫佐剂最初被Ramon于1924年描述为用于与特定抗原组合的物质,其与单独抗原相比,产生了更强的免疫应答。这个极宽泛的定义包括多种材料。目前可获得的免疫佐剂大致分为两类:输送体系和免疫增效剂(for review Fraser C.K.,Diener K.R.,Brown M.P.and Hayball J.D. (2007) Expert Reviews in Vaccines 6 (4) 559-578)。

[0039] 输送体系能够改变疫苗中抗原的呈递,使抗原最大化暴露于免疫系统,并以某种形式将抗原导向特定的生理学区域,从而确保专职抗原呈递细胞(APC)捕获抗原。疫苗制剂中作为输送体系型佐剂存在的免疫佐剂例子为明矾、乳剂、皂苷和阳离子脂质。

[0040] 免疫激活剂通过激活对于诱导适应性免疫而言重要的途径而直接作用于免疫细胞。这些免疫激活剂可以是外源微生物成分或病毒成分、其合成衍生物或内源性免疫活性化合物(例如细胞因子、趋化因子和共刺激分子)。这类分子可增强对目标抗原的特异性免疫。迄今为止,toll样受体激动剂、核苷酸寡聚结构域样受体激动剂、重组内源性化合物(例如细胞因子、趋化因子或共刺激分子)是可获得的,并可用作免疫增效剂。然而,需要强调的是,细胞因子和趋化因子为种特异性分子(species-specific molecule),因此,不易于在不同动物中比较,这一点是很重要的。在这些情况下,需要使用各分子的同源物,这使得下列事项相当复杂:这类佐剂的应用和在一个物种中的试验结果的解释以及将其类推至另一物种。

[0041] 如同其他几种基因疫苗,DNA疫苗已经开发了数年,并在试验动物中的特异性免疫应答诱导方面呈现出乐观的进展。然而,事实证明这些疫苗对人体和大型动物是无效的。原因之一可能是反应性和免疫原性低于传统疫苗。这个缺陷的原因可能为体内的蛋白表达能力有限,这在包括人的远交系动物中具有更大的重要性,以及在实际疫苗制备中具有更加均匀的性质和降低了污染病原体衍生的成分。

[0042] 这使得需要开发一种用于制备疫苗的特定的精细调整过的免疫佐剂,所述佐剂目标在于激活免疫系统,而无严重的毒性作用。作为该需求的结果,已经努力使DNA疫苗与细胞因子或趋化因子结合,所述趋化因子例如为造血生长因子(例如GM-CSF(粒细胞巨噬细胞集落刺激因子))或MIP-1a(巨噬细胞炎症蛋白-1a),所述MIP-1a可改善对DNA疫苗编码的抗原的免疫应答。然而,遗憾的是,这些效果仍然较差。在生产可实际应用于动物或人体的良好质量的蛋白质之前,作为蛋白质的细胞因子和趋化因子的共输送需要大量工作。

[0043] 关于基于核酸的、表达用于与DNA疫苗结合的佐剂的表达载体的应用,在特定佐剂分子的适当表达水平和位置,以及该表达对施用疫苗的组织的影响方面,存在问题。

[0044] Gaston Ramon在早期对佐剂在免疫刺激中的潜在有益效果进行了观察,Gaston Ramon发现在接种疫苗后产生脓肿的马匹中抗体滴度较高。使用免疫佐剂改善抗原特异性免疫应答的观念从早期发现就已经与因污染而诱导炎症过程的能力密不可分。结果,使用这样的免疫佐剂可能导致临床上不可接受的毒性和严重的健康担忧。因此,明矾是世界范围内唯一允许用于人体的佐剂,其是一种仅能诱导体液免疫的较弱佐剂。目前可获得的能够诱导体液免疫和细胞介导免疫的所有其它较强佐剂均被限制为仅用于试验用途。

[0045] 已经表明,目前的疫苗佐剂的所有组成成分尚不足以产生对抗包括HIV1、疟疾和结核病在内的重要病原体的有效疫苗(Riedmann等2007;Fraser等20007)。已知佐剂的组合可以克服与可获得的疫苗相关的部分问题,然而,无疑需要一种佐剂形式的可靠、安全且先进的新一代免疫调节剂。

[0046] 鉴于上述解释的现有技术中仍然存在的问题,因此,本发明的目的在于发现一种更有效的佐剂,以补充和改善对目前可用的疫苗的应答。根据本发明的佐剂是一种免疫系统调节剂,这意味着其将改善和强化在施用疫苗的对象中的免疫应答。

发明内容

[0047] 本发明通过提供作为免疫系统调节佐剂的甲病毒属复制酶(alphaviral replicase)或编码甲病毒属复制酶的表达载体的新型医药用途,解决了与目前现有技术中可用的佐剂相关的上述问题,其中所述免疫系统调节佐剂与物种无关,与目前可用的免疫系统调节佐剂相比更有效,并且更易于施用。

[0048] 本发明基于提供单独的甲病毒属复制酶即可在细胞内诱导先天性免疫应答这一出乎预料的发现,其中所述甲病毒属复制酶包含RNA依赖型RNA聚合酶(RdRp)活性并被分隔到细胞内适宜的隔室。这在不存在病毒基因组或任何其它非结构性病毒蛋白或结构性病毒蛋白的情况下是可行的。

[0049] 因此,这是一个考虑到高效佐剂新产品的突破性发现,其中所述佐剂能够激活与仅施用疫苗时相比,在数量上和质量上更有效地应答疫苗抗原的免疫应答。

[0050] 因此,本发明一方面包括用作调节免疫应答的佐剂的含有RNA依赖型RNA聚合酶(RdRp)的甲病毒属复制酶。此外,本发明当然还涉及甲病毒属复制酶在制备调节免疫应答的佐剂中的用途,所述复制酶包括RNA依赖型RNA聚合酶。在一个优选实施方案中,所述复制酶通过表达载体编码,所述表达载体例如为用作调节免疫系统的佐剂的DNA载体。在一个优选实施方案中,所述复制酶为SFV(Semliki森林病毒)复制酶。

[0051] 甲病毒属复制酶的免疫系统调节活性效力可通过复制酶的nSP2亚单元的核定位区域的特异突变调整。因此,本发明涉及用作调节免疫系统的佐剂,在野生型复制酶的nSP2区域具有特异突变的甲病毒属复制酶,以及编码甲病毒属复制酶(用作调节免疫系统的佐剂,在野生型复制酶的nSP2区域具有特异突变)的表达载体,已经显示该突变体与选择的疫苗一起施用更加有效地诱导使用对象的免疫应答。本文中表现为有效的特异突变是存在于野生型SFV复制酶氨基酸序列的1185-1187位点的RDR突变体和AAA突变体,在此对其进行进一步描述。

[0052] 所述甲病毒属复制酶通过放大和增强施用疫苗(例如以基于核酸的疫苗的形式)的对象的免疫应答,已经表现为特别适于作为佐剂。本发明人表明,当将复制酶形式的佐剂与疫苗一起施用,与仅施用疫苗相比,体内干扰素应答增加。

[0053] 此外,本发明涉及甲病毒属复制酶或对甲病毒属复制酶进行编码的表达载体作为调节免疫应答的佐剂的用途。本发明还涉及本文中公开的甲病毒属复制酶作为疫苗组合物中的佐剂的用途,所述疫苗组合物用于制备预防和/或治疗传染病的药物。所述与佐剂搭配的疫苗,其形式例如可以是基于核酸的疫苗或基于蛋白质的疫苗。另外,本文还提供制备包含本发明佐剂的疫苗组合物的方法。本发明还涉及具有复制酶活性的新型蛋白质和编码所述复制酶的表达载体。

附图说明

[0054] 图1为由采用RdRp以不同DNA浓度转染的Cop5细胞培养上清液测定的IFN- β 。将

10ng、200ng或1000ng表达载体pRSV-Nsp1234、pRSV-RDR、pRSV-AAA或HIV多抗原表达载体paraDMgB(阴性对照,无RdRp活性)转染至Cop5细胞。在三个时间点(24h(小时)、48h和72h)收集细胞培养上清液,并分析干扰素- β 的表达。

[0055] 图2为由采用RdRp以不同DNA浓度转染的Cop5细胞培养上清液测定的IFN- β 。将10ng、200ng或1000ng pRSV-RDR、pRSV-GAA、pRSV-RDR-GAA和pRSV-AAA-GAA转染至Cop5细胞。在三个时间点(24h、48h和72h)收集细胞培养上清液,并分析干扰素- β 的表达。

[0056] 图3为由采用转染复制酶(transreplicase)或RdRp构建物转染的Cop5细胞培养上清液测定的IFN- β 。将10ng、200ng或1000ng pRSV-SFV-Rluc、pRSV-Nsp1234和KS123M4-RL(阴性对照,无RdRp活性)转染至Cop5细胞。在三个时间点(24h、48h和72h)收集细胞培养上清液,并分析干扰素- β 的表达。

[0057] 图4为HEK293细胞中的IFN- β 。采用电穿孔并通过添加载体DNA转染HEK293细胞。使用1 μ g质粒DNA或聚肌胞苷酸。在三个时间点(24h、48h和72h)收集细胞培养上清液,并分析干扰素- β 的表达。

[0058] 图5表示HACAT细胞中的IFN- α 和IFN- β 。采用电穿孔并通过添加载体DNA转染细胞。使用1 μ g质粒DNA或聚肌胞苷酸。在三个时间点(24h、48h和72h)收集细胞培养上清液,并分析干扰素- β 和干扰素- α 的表达。1、5、9道(lane)转染pRSV-RDR;2、6、10道转染pRSV-RDR-GAA;3、7、11道转染聚肌胞苷酸;4、8、12道转染模拟品。

[0059] 图6为小鼠IFN- γ 的ELISPOT(酶联免疫斑点法)。当质粒DNA与质粒pRSV-RDR以4:1的比例(800ng疫苗载体和200ng佐剂载体)组合施用,小鼠的细胞免疫应答增强。组1为GTU-MultiHIV;组2为GTU-MultiHIV+pRSV-Nsp1234;组3为GTU-MultiHIV+pRSV-RDR;组4为对照组。

[0060] 图7为当编码流感病毒HA和NA的质粒载体与DNA质粒pRSV-RDR组合施用,对流感病毒抗原的体液免疫应答的增强。

[0061] 图8为以组平均法测定的针对Gag和Env中两个识别表位的累积的IFN- γ ELISPOT结果。采用单独的编码MultiHIV抗原的质粒DNA或与在第一次或第二次免疫中添加的pRSV-RDR一起将三组Balb/C小鼠免疫两次(0周和4周)。第四组是空白组。在第二次免疫后10天由刚分离的脾细胞实施干扰素 γ Elispot。组1为GTU-MultiHIV;组2为在第二次免疫中采用GTU-MultiHIV+pRSV-RDR;组3为在第一次免疫中采用GTU-MultiHIV+pRSV-RDR;组4为未试验小鼠。

[0062] 图9为以组平均法测定的针对在Gag和Env中两个识别表位的累积的颗粒酶B ELISPOT结果。采用单独的编码MultiHIV抗原的质粒DNA或与在第一次或第二次免疫中添加的pRSV-RDR一起将三组Balb/C小鼠免疫两次(0周和4周)。第四组是空白组。在第二次免疫后10天由刚分离的脾细胞实施颗粒酶B Elispot。组1为GTU-MultiHIV;组2为在第二次免疫中采用GTU-MultiHIV+pRSV-RDR;组3为在第一次免疫中采用GTU-MultiHIV+pRSV-RDR;组4为未试验小鼠。

[0063] 定义

[0064] “表达载体”是指以核酸序列形式携带基因信息的基于DNA或RNA的载体或质粒。术语“质粒”、“载体”和/或“表达载体”在本文中可互用。

[0065] “RNA依赖型RNA聚合酶”或“RdRp”为一种具有催化由RNA模板从头合成RNA的酶活

性的酶、蛋白质或肽。复制酶是一种具有RdRp活性,并催化特定病毒RNA复制的病毒多蛋白或多蛋白加工产物的复合体。RdRp和复制酶通常由具有RNA基因组的病毒编码。因此,复制酶不但提供RNA依赖型RNA聚合酶的功能,而且还进一步包括提供除RdRp活性以外的其它功能的额外的病毒非结构性多蛋白亚单元。“区室化的”RdRp (CRdRp (compartmentalized RdRp)) 在本文中定义为能够提供RdRp活性的复制酶的RdRp,所述CRdRp能够指向细胞内正确的隔室以发挥其功能。

[0066] 本文所提到的术语“抗原”和“感兴趣基因”包括当以例如表达载体形式或肽或蛋白质形式施加至需要的对象时,可直接或间接地使施加的对象产生免疫应答的实体。当抗原为可提供抗原蛋白质/肽的表达的基因时,其还可称作“感兴趣基因”。如果所述感兴趣基因以表达载体(例如DNA载体)的形式施用,则当由该载体编码的基因在宿主中表达时,将引发免疫应答。

[0067] 本文所指的“疫苗”是一种用于改善对特定疾病的免疫性的制剂。疫苗可包括衍生自病原体的一种或多种抗原,当所述疫苗施用至需要的对象时,将引起针对所述一种或多种抗原的免疫应答,从而在对后来的“真正的”所述病原体提供保护的對象中诱导免疫。疫苗可以预防疾病,例如可以防止或减轻将来由任何天然病原体引起的感染的影响,或者当已经存在感染时,疫苗可以起到治疗作用。在本发明的情况下,甲病毒属复制酶或编码甲病毒属复制酶的表达载体被确定用作与预防和/或治疗性疫苗一起调节免疫应答的佐剂。疫苗可以是死亡或灭活的微生物或由微生物衍生的纯品。通常,存在四类传统疫苗。存在这样的疫苗,该疫苗包含之前是强毒微生物的灭活微生物、减毒活病毒微生物、类毒素(灭活的有毒化合物)或者减毒或灭活微生物的亚单元。疫苗可以是蛋白质形式,或者可以为表达一种或多种抗原,从而在对象中诱导免疫应答的间接表达载体形式。在本文公开的疫苗组合物中,以上述提供的任意疫苗的例子均可与本发明的佐剂一起施用。因此,在本文中,“疫苗”涉及以下任何一种实体,所述实体包含一种或多种抗原或编码一种或多种感兴趣基因,并在施用时产生本文中解释的免疫应答。“疫苗”还可包括有助于施用于需要的对象的附加组分,例如本文中给出例子的成分和/或赋形剂。

[0068] 本文提及的“佐剂”可定义为能够激活先天性免疫系统并改进其它试剂的效果的免疫剂,例如疫苗。佐剂是可刺激免疫系统并增强对疫苗的应答的试剂,与仅施用疫苗本身时相比,使接种对象获得更强和更有效的免疫应答。因此,佐剂通常用于增强或以任何其它方式影响疫苗的效果,例如通过刺激免疫系统更剧烈地应答疫苗,从而增强对特定疾病的免疫性。佐剂可通过模拟特定的几组进化保守分子实现该任务。这类分子的例子为脂质体、脂多糖(LPS)、细菌的细胞壁组分、双链RNA(dsRNA)、单链DNA(ssDNA)和含未甲基化的CpG二核苷酸的DNA等。佐剂与疫苗组合存在可通过模拟自然感染极大地增强对抗原的先天性免疫应答。当这里提及“佐剂”时,尤其是指提供佐剂功能的甲病毒属复制酶或编码具有本文所述的RNA依赖型RNA聚合酶活性的甲病毒属复制酶的表达载体。所述佐剂还可以是表达包含RNA依赖型RNA聚合酶活性的甲病毒属复制酶的表达载体,如DNA载体。因此,甲病毒属复制酶可原样施用,或可以表达载体形式施用,由所述载体表达所述甲病毒属复制酶,以提供佐剂功能。此处提及的疫苗组合物在部分实施方案中可包含一种或多种疫苗实体,例如为一种或多种表达载体形式,以编码一种或多种感兴趣基因,或者提供一种或多种抗原(例如为基于蛋白质的疫苗),从而提供施用于有需要的患者的疫苗混合物。

[0069] “调节免疫系统”、“调节免疫应答”或“免疫系统调节活性”是指由本文定义的佐剂提供的作用或活性,其效果由上文中的术语佐剂进一步解释。例如可以是以下形式:刺激免疫系统对疫苗作出更加强烈的应答和/或增强对特定疾病的免疫性。根据本发明的佐剂的特征在于,当其与疫苗一起施用,与仅施用疫苗而无佐剂时相比,增强对以疫苗形式施用的抗原的应答。

[0070] 本文公开的“表达盒”包括对一种或多种基因编码的核酸序列或任选地与用于调节基因表达的多种调节序列搭配的编码序列。这些基因可以形成编码各种抗原的疫苗的一部分,所述基因被表达时将在宿主内产生免疫应答。

[0071] 这里提及的“突变”构成缺失、取代、插入和/或已在核酸序列中实施以改变本发明佐剂功能的性能的定点突变。根据本发明,引入复制酶中以改进佐剂性质的特异突变将在本文中进一步举例说明。

[0072] “启动子”是位于朝向基因的反义链的3'区域的上游的调节区,其提供用于调节基因转录的控制点。所述启动子包含特定DNA序列,所述序列也称作应答元素,其由结合于募集RNA聚合酶的启动子序列上的转录因子进行识别,所述酶根据基因的编码区域合成RNA。

[0073] 在本文中,当核酸序列或氨基酸序列基本上相当于某一核酸或氨基酸序列时,这是指与提及的序列具有90%以上一致性的序列,例如与所述序列具有约91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、99%或接近100%的一致性的序列。当然,在部分实施方案中,核酸或氨基酸序列还由特定的序列构成。

具体实施方式

[0074] 本发明人首次披露,当单独施用具有功能性RNA依赖型RNA聚合酶(RdRp)活性的甲病毒属复制酶时,其能够引起免疫系统调节作用,即起到免疫系统调节佐剂的作用,而无需任何提供这个效果的额外结构性或非结构性病毒蛋白质或基因组核酸序列。

[0075] 本文中首次表明,将包含功能性RdRp的甲病毒属复制酶单独施用于细胞,能够诱导I型干扰素,该I型干扰素激活先天性免疫并改进适应性体液和细胞免疫应答的质量和效果。设想具有功能性RdRp的甲病毒属复制酶主要能够用作与任何类型的疫苗或抗原组合的免疫系统调节佐剂。

[0076] 此外,表明作为免疫系统调节佐剂的甲病毒属复制酶的功能可通过在被定义为nSP2亚单元的核内定位信号的复制酶区域诱导特异突变来进一步提高。

[0077] 对于作为免疫系统调节佐剂的活性,无需包含与复制酶的RdRp相互作用的顺式信号(cis-signal)的特异性病毒模板RNA,注意到这一点是重要的,不希望受理论束缚,这意味着RdRp可使用某些细胞RNA作为模板引发细胞质内RNA复制中间体的合成。这是一个突破性进展,其提供了构建佐剂的新方法,仅需要施用例如蛋白质形式或表达载体(例如DNA载体)编码的甲病毒属复制酶,而无需任何其它病毒部分,即可实现免疫应答的激活。

[0078] 因此,在第一方面,本发明涉及用作免疫系统调节佐剂的包含RNA依赖型RNA聚合酶的甲病毒属复制酶。应理解为,在本文中无论何时,无论在哪个实施方案中提及用作免疫系统调节佐剂的包含RNA依赖型RNA聚合酶的甲病毒属复制酶,它都是指使用用于制备免疫应答调节佐剂的包含RNA依赖型RNA聚合酶的甲病毒属复制酶。因此,在类似的方面,本发明还涉及包含RNA依赖型RNA聚合酶的甲病毒属复制酶的用途,例如以表达载体的形式用于制

备免疫应答调节佐剂。

[0079] 在本发明的一个优选方面,所述甲病毒为Semliki森林病毒。应这样理解,在本文中无论何时提及复制酶,其总是包括所述复制酶为SFV复制酶的选择。在一个实施方案中,Semliki森林病毒复制酶的氨基酸序列基本与ID NO:1的序列一致,适于用作调节免疫系统的佐剂。Semliki森林病毒复制酶的氨基酸序列还可由与ID NO:1的序列一致的序列构成,或由与突变型复制酶一致的序列构成。在一个优选实施方案中,所述复制酶在nsP2区域突变,产生在SEQ ID NO:1的1185-1187位点的突变体RRR>RDR,适于用作调节免疫系统的佐剂。该突变序列对应于序列ID NO:2中的氨基酸序列,并且也包含在本发明中,用作调节免疫应答的佐剂。在另一个优选实施方案中,所述复制酶在nsP2区域发生突变,产生在SEQ ID NO:1的1185-1187位点的突变体RRR>AAA,所述复制酶也适于用作调节免疫系统的佐剂。该突变序列对应于SEQ ID NO:3中的氨基酸序列,并且也包含于本发明中,用作调节免疫应答的佐剂。显然,本发明还涉及用作免疫应答调节佐剂的编码本文中任意实施方案中定义的复制酶的表达载体。所述复制酶为肽和/或蛋白质形式和/或通过表达载体编码的复制酶,可与药学上可接受的赋形剂和/或成分(例如本文中列举的)一起配制。在另一个实施方案中,本文中提及的突变型复制酶中的两者或其中任一者和/或与野生型复制酶的混合物(任选地由一种或多种表达载体表达),被用作调节免疫应答的佐剂。

[0080] 本发明人首次发现无需存在任何额外的病毒抗原,甲病毒属复制酶自身即可起到免疫系统调节佐剂的作用,注意到这一点是重要的。例如,当为表达载体形式时,即使没有同时额外使用编码异种抗原的核酸序列或任何其它甲病毒属核酸序列,表达载体在表达时也可在对象中引起免疫系统调节作用。已经表明,复制酶的RdRp活性以及下文中进一步讨论的复制酶进入细胞质的正确部分的能力(即为复制酶的区室化过程)对于提供该效果是至关重要的。

[0081] 不希望受理论束缚,当以表达载体形式施用佐剂时,复制酶似乎被激活,以便在目标组织中转染细胞的细胞核内表达。进一步想到,在转录表达载体时,编码复制酶的mRNA被输送至细胞质,并在其中被翻译成具有胞质RNA依赖型RNA聚合酶活性的复制酶蛋白质。该酶被划分至特定的细胞质隔室,并在其中RNA依赖型RNA聚合酶活性形成效应分子,其中包括但不限于双链RNA,所述效应分子在细胞质内引起大量强烈且长效的细胞抗病毒应答,包括诱导I型干扰素的表达。这类抗病毒应答的诱导是普遍存在的,不依赖于物种,并且激活细胞介导免疫应答和体液免疫应答。

[0082] 因此,在另一方面,本发明涉及编码甲病毒属复制酶(例如为本文中定义的SFV复制酶)的表达载体,优选DNA载体,如质粒DNA表达载体,在一个实施方案中所述表达载体为用作免疫系统调节佐剂的基本上与序列ID NO:5中公开的序列一致的pRSV-Nsp1234。Semliki森林病毒复制酶的核酸序列还可由与序列ID NO:5一致的序列构成,或者由与突变型复制酶一致的序列构成。在一些实施方案中,由表达载体编码的复制酶在nsP2区域突变。作为一般参考,SFV复制酶(SEQ ID NO:1)的nsP2区域大致位于SEQ ID NO:1的538-1336氨基酸位。在一个实施方案中,表达载体对在nsP2区域发生突变的复制酶编码,产生在SEQ ID NO:1的1185-1187位点的突变体RRR>RDR,该复制酶适于用作调节免疫系统的佐剂。在一个实施方案中,所述表达载体由基本上与SEQ ID NO:4一致的序列编码,但其中已经将突变引入该序列的4129-4131位点中,如在一个实施方案中CGG突变为GAC,用作调节免疫应答的佐

剂。Semliki森林病毒复制酶的核酸序列还可由与SEQ ID NO:4一致的序列构成,但其中已经将突变引入至该序列的4129-4131位点,例如在一个实施方案中CGG突变为GAC。在另一个实施方案中,表达载体编码在nsP2区域发生突变,产生在SEQ ID NO:1的1185-1187位点中的突变体RRR>AAA的复制酶,该复制酶用作调节免疫系统的佐剂。在一个实施方案中,表达载体通过基本上与SEQ ID NO:4一致的序列编码,但已经将突变引入该序列的4126-4133位点,例如在一个实施方案中CGGCGGAG突变为GCCGCCGC,以用作调节免疫应答的佐剂。SFV复制酶的核酸序列还可由与SEQ ID NO:4一致的序列构成,但已经将突变引入该序列的4126-4133位点,例如在一个实施方案中CGGCGGAG突变为GCCGCCGC。这意味着在各氨基酸序列中,野生型氨基酸序列在SEQ ID NO:1的1185-1187位点已经由RRR分别变成RDR和AAA。无论是否突变,所述表达载体在一个优选实施方案中可以是DNA载体。所述载体还可以是病毒表达载体,例如腺病毒载体或疱疹病毒基载体或其它任意可用的病毒表达载体。在一个实施方案中,表达载体为基于RNA的载体。在另一个实施方案中,佐剂以甲病毒属复制酶mRNA的形式施用。在一个实施方案中,本发明涉及甲病毒属复制酶质粒DNA表达载体,其为基本上与SEQ ID NO:5中公开的核酸序列一致的pRSV-AAA,其中5126-5133位点已由CGGCGGAG突变为GCCGCCGC,以用作调节免疫系统的佐剂。在另一个实施方案中,本发明涉及甲病毒属复制酶质粒DNA表达载体,其为基本上与SEQ ID NO:5一致的pRSV-RDR,其中5129-5131位点已由CGG突变为GAC,以用作调节免疫系统的佐剂。Semliki森林病毒复制酶的核酸序列还可由与SEQ ID NO:5一致的序列构成,或者由与上述提及的突变体复制酶一致的序列构成。

[0083] 如本领域技术人员所了解的,本发明的编码用作免疫系统调节佐剂的所述复制酶的表达载体显然还可包括通常使用的促进载体表达的额外组分,例如启动子、增强子形式的各种调节序列。编码本文所述的用作免疫系统调节佐剂的复制酶的表达载体还可包括复制起点和/或筛选标记,例如抗生素筛选标记或基于araD基因的筛选体系(如申请人所有的W02005/026364申请中所提供的)。如W02005/026364中所公开的,这类筛选系统包括缺失araD基因的菌细胞,携带有araD基因的载体被加入到该细胞中作为筛选标记,所携带的araD基因优选细菌的araD基因,例如来自大肠杆菌的araD基因、其互补序列或其催化活性片段。所述araD基因编码功能性L-核酮糖-5-磷酸4-差向异构酶(EC 5.1.3.4)。

[0084] 如在实验部分证实的,突变型复制酶的表达也起到免疫系统调节佐剂的作用。另外,突变可调节复制酶的佐剂活性:与(野生型)wt复制酶表达相比,RDR突变体增强了I型IFN诱导的能力(实施例2)。具有RRR>AAA突变的复制酶起到类似于野生型复制酶的免疫系统调节佐剂的作用(实施例2)。在实验部分还证实了仅利用基于复制酶的表达载体转染不同的人类细胞和小鼠细胞,诱导激活了I型干扰素的产生(实施例2)。

[0085] 实验部分描述的结果清楚地证实了复制酶的RNA依赖型RNA聚合酶(RdRp)活性对于免疫调节活性确实是必要的。病毒RNA聚合酶的特征标记GDD基序位于RdRp酶活性所在的甲病毒属复制酶的nsp4区域。该基序的突变GDD>GAA破坏了RdRp活性(Tomar等,2006)。复制酶中GDD>GAA突变的引入完全破坏了I型干扰素应答的诱导(实施例2),从而证实了RdRp活性对免疫系统调节作用的必要性。

[0086] 实验数据还表明,具有功能性RdRp活性的复制酶而非具有GDD>GAA突变的复制酶的表达,导致dsRNA在转染细胞的细胞质中的累积。不希望束缚于理论,这些结果显示,复制酶的免疫系统调节活性至少部分地由dsRNA识别途径介导,在该途径中所述复制酶由细胞

质中的内源RNA产生dsRNA。然而,这并不排除包括其它途径(例如通过识别未加帽的RNA)。在一些情况下,观察到了I型IFN应答的诱导,而未显示dsRNA在细胞质内累积(实施例3)。

[0087] 另外,当通过SFV复制酶表达诱导IFN应答时,观察到了不同于由合成dsRNA(聚肌胞苷酸)转染进行诱导的动力学模式。在采用复制酶表达载体转染的实验中,在转染后的第一天中IFN水平升高。相比之下,在采用合成dsRNA转染后,IFN水平在第一时间点(24h(小时))显示最大值,其后下降(实施例2)。

[0088] 在实验部分中呈现的免疫数据清楚地证实,如果与仅采用DNA疫苗的免疫相比,MultiHIV抗原DNA疫苗(Blazevic等,2006)与编码复制酶(此种情况下为SFV复制酶)的表达载体的组合施用在数量上显著地增强了细胞介导的免疫应答(通过ELISPOT检测进行测定)(图6)。另外,在采用具有RRR>RDR突变的复制酶的情况下,数值明显高于野生型复制酶(实施例4)。因此,免疫数据与IFN应答诱导的结果有关:如果将RdRp活性被(GDD>GAA)突变破坏的复制酶与DNA疫苗组合施用,则观察不到对细胞介导免疫的积极效果。这清楚地表明了RdRp活性对于提供本发明的佐剂效果的重要性。

[0089] 先天性免疫应答的引发(例如SFV感染引起的IFN应答)是本领域公知的。还表明,甲病毒属的免疫调节活性可通过在复制酶的非结构性多肽的nsP2区域引入突变来调整。如果与wt SFV感染相比,采用nsP2 NLS中具有单位点突变RRR>RDR的SFV(Semliki森林病毒)感染初级小鼠成纤维细胞,增强了病毒感染细胞内I型IFN和促炎细胞因子TNF- α 的表达(Breakwell等,2007)。然而,应该指出的是,在Breakwell等中,采用完整病毒颗粒感染细胞,导致全部病毒基因组的输送、表达和复制,从而产生IFN应答。

[0090] 然而,与现有技术不同,本发明已经证实,IFN应答的诱导不但与病毒感染和病毒基因组复制本身相关,而且还可仅通过不含病毒基因组、病毒颗粒或结构蛋白质的病毒非结构性多蛋白(即复制酶)的表达实现。另外,证实了SFV复制酶可以由具有与天然SFV核酸低同源性的密码子优化的cDNA表达,并且仍然提供佐剂效果。SEQ ID NO:4中提供了这类密码子优化序列的例子。表达时,SEQ ID NO:4提供如SEQ ID NO:1公开的氨基酸序列。

[0091] 应这样理解,这里提及的构成部分本发明的核酸和氨基酸序列还包括与这些序列具有约90%一致性(例如与这些序列具有90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性)的核酸和氨基酸序列。这意味着所述序列可比本文中公开的序列更短或更长或具有相同的长度,但其中核酸序列或氨基酸序列的一些位点已经采用适宜的方式改变。然而,当施用突变型甲病毒属复制酶时,突变序列将总是存在,从而在确定与本文中公开的特定序列的序列一致性时被排除在外。因此,本发明中采用的序列可以基于预期的目的,以任意适宜的方式改变,例如通过在核酸序列中插入、替换和/或删除特定的核酸,或者在氨基酸序列中插入、替换和/或删除特定的氨基酸。即使改变序列,由表达载体表达的复制酶仍然保持RNA依赖型RNA聚合酶活性,注意到这一点是重要的。

[0092] 在本发明的一些实施方案中,本文所述的用作免疫系统调节佐剂的佐剂与药学上可接受的赋形剂和/或成分一起配制。所述药学上可接受的赋形剂和/或成分可由任意适宜的来源选择。药用赋形剂的例子为液体,例如水或油,油包括石油、动物油、植物油或合成油,例如花生油、大豆油、矿物油、麻油等。药用赋形剂可以是盐溶液、阿拉伯胶、明胶、淀粉糊、滑石、角蛋白(keratin)、胶体二氧化硅和尿素等。另外,可使用助剂、稳定剂、增稠剂、润滑剂和着色剂。在一个实施方案中,当施用于动物时,药学上可接受的赋形剂为无菌。还可

采用盐溶液、葡萄糖水溶液和甘油溶液作为液态赋形剂,特别是用于可注射溶液的液态赋形剂。适宜的药用赋形剂还包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、米、面粉、白垩(chalk)、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇(glycol)、水、乙醇等。若需要,含有佐剂的组合物还可包含少量润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。本发明的组合物还可采用溶液、悬浮液、乳液、片剂、丸剂、颗粒剂、胶囊、充液胶囊、粉末、缓释剂、栓剂、乳液、气溶胶、喷雾剂、悬浮液形式或其它任意适于使用的形式。在一个实施方案中,组合物为胶囊形式。适宜的药用赋形剂的其它例子记载于Remington's Pharmaceutical Sciences 1447-1676 (Alfonso R.Gennaro ed.,第19版,1995)中。在一个实施方案中,根据常规操作配制本发明的佐剂,作为适合人口服给药的组合物。用于口服给药的组合物可以是例如片剂、锭剂、水或油悬浮液、颗粒、粉末、乳液、胶囊、糖浆或酞剂的形式。口服组合物可包括常规的赋形剂,例如甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素和碳酸镁。在一个实施方案中,赋形剂为药用级。在另一优选实施方案中,可将佐剂配制为用于静脉给药。通常,静脉给药用组合物包括无菌等渗缓冲水溶液。若需要,所述组合物还可包括增溶剂。

[0093] 施用本发明的表达载体的方法包括但不限于皮内、肌肉、腹腔、静脉、皮下、鼻腔内、硬膜外、口服、舌下、脑内、阴道内、透皮、直肠、通过吸入或局部,特别是耳、鼻、眼或皮肤。施用的模式可留给医生判断。在特别优选的实施方案中,本发明佐剂可选地与适宜的疫苗组合,并利用Gen Gun方法学(Gen Gun methodology) (Klein等,1992),通过注射与电穿孔结合(“电穿孔介导的DNA给药(electroporation-mediated DNA drug delivery)”);皮内或肌肉),局部施用于黏膜表面(例如鼻内喷雾形式),从而对需要的患者进行给药。基因佐剂还可与特定输送佐剂结合,这可促进细胞摄取质粒DNA(例如聚乙烯基亚胺(polyethylenimine)或其它类似物)。

[0094] 电穿孔(EP)利用电场的活体应用(in vivo application)来增强感兴趣制剂(agent of interest)在组织的目标区域中的细胞内输送。EP输送技术依赖于将感兴趣制剂分散于所述组织的间隙中后,整个目标组织部位的阈值水平电场(threshold level electrical field)的传播。电场和治疗剂在目标组织中的时间与空间“共位(co-localization)”是实现有效DNA输送的关键要求。

[0095] 已经证明电穿孔对于原核细胞和真核细胞均是有效的,并能够将DNA、大分子(如抗体)、蛋白质、染料、代谢前体(如³²P-ATP)和非渗透性药物以及代谢物高效地导入细胞中(De Lise等,Developmental Biology Protocols;2000年1月21日)。

[0096] 在本发明的一个方面,佐剂可以任选地与疫苗组合物中选择的疫苗一起施用,作为对需要的患者的首次免疫。本发明人提供的一些结果已经表明,与在第二次免疫中将佐剂与疫苗一起施用相比,这类佐剂的施用模式可提供改进的免疫应答(见图8和9)。从而,在一个方面,本发明涉及施用本文所述疫苗组合物的方法,所述疫苗组合物包括本文所述的佐剂,其中所述佐剂作为疫苗组合物的一部分在所述处理的患者的首次免疫中施用。任选地,佐剂与疫苗组合物中疫苗的共同施用仅以首次免疫剂量实施,即如果在后面阶段中向需要的个体施用额外的疫苗剂量,则不施用佐剂。

[0097] 因此,本发明的另一方面涉及甲病毒属复制酶,所述复制酶包括RNA依赖型RNA聚合酶,用于被施用的疫苗组合物中,作为首次免疫剂量。从而,本发明的一个方面涉及在本

文所述的疫苗组合物中施用佐剂的方法,所述佐剂包含甲病毒属复制酶,所述复制酶包含RNA依赖型RNA聚合酶,其中以用于患者的疫苗组合物的首次免疫剂量施用所述佐剂。在本文中,“首次免疫剂量”是指当向需要疫苗的患者首次施用包含一种或多种抗原的疫苗时,随后引起对疫苗(即随其施用的一种或多种抗原)的免疫应答。在另一方面,本发明涉及甲病毒属复制酶(所述复制酶包括RNA依赖型RNA聚合酶)在制备疫苗组合物中的用途,其中所述佐剂以首次免疫剂量施用。

[0098] 然而,应该注意的是,本发明不限于上述提及的施用模式,即(仅任选地)以首次免疫剂量施用,还可以是技术人员发现的以相似并同等优选的方式起作用的其它替代施用方法。

[0099] 在另一方面,本发明涉及甲病毒属复制酶或编码甲病毒属复制酶的表达载体作为调节免疫系统佐剂的用途,其中所述复制酶包括RNA依赖型RNA聚合酶。在一个实施方案中,所述甲病毒为Semliki森林病毒。在另一个实施方案中,用作调节免疫系统的佐剂的所述复制酶基本上与SEQ ID NO:1中公开的氨基酸序列一致。Semliki森林病毒复制酶的氨基酸序列还可以由与SEQ ID NO:1一致的序列构成,或者由与突变体复制酶一致的序列构成。在另一个优选实施方案中,本发明涉及甲病毒属复制酶作为调节免疫系统的佐剂的用途,所述复制酶包括RNA依赖型RNA聚合酶,其中所述复制酶在nsP2区域发生突变,产生在SEQ ID NO:1的1185-1187位点的突变体RRR>RDR,由SEQ ID NO:2表示。在另一个优选实施方案中,复制酶在nsP2区域发生突变,产生在SEQ ID NO:1的1185-1187位点的突变体RRR>AAA,由SEQ ID NO:2表示。在部分实施方式中,所述的复制酶通过表达载体编码,在部分实施方案中所述表达载体为DNA载体。任选地,所述复制酶与药学上可接受的赋形剂和/或成分一起配制。

[0100] 如在实施例5中证实的,具有RRR>RDR突变的复制酶还增强采用表达流感抗原的DNA疫苗进行免疫而引起的抗体应答的数量。实验数据表明,在SFV复制酶单元与流感DNA疫苗共同施用的情况下,抗体水平最高,当与疫苗载体共同施用与良好定义的佐剂GM-CSF表达载体相比,甚至提供更高的值。

[0101] 在另一个优选方面,本发明涉及甲病毒属复制酶在制备用于预防和/或治疗传染性疾病的药物中的用途,所述甲病毒属复制酶为野生型、密码子优化型或突变型(例如本文中进一步限定的具有RDR或AAA突变)或编码本文所述的甲病毒属复制酶的表达载体(如DNA载体),所述复制酶包括RNA依赖型RNA聚合酶,当所述复制酶存在于疫苗组合物中时,作为调节免疫应答的佐剂。本发明还涉及本文所述的甲病毒属复制酶在制备疫苗组合物中作为佐剂的用途。所述疫苗组合物优选用于传染性疾病的预防和/或治疗。本发明还涉及甲病毒属复制酶在传染性疾病的预防和/或治疗中的用途,所述甲病毒属复制酶如本文所述,为野生型、密码子优化型或突变型(例如本文中进一步限定的具有RDR或AAA突变)或编码甲病毒属复制酶的表达载体,所述复制酶包括RNA依赖型RNA聚合酶,当所述复制酶存在于疫苗组合物中时,用作调节免疫应答的佐剂。如前所述,复制酶可与SEQ ID NO:1、2或3中公开的氨基酸序列基本一致。此外,复制酶可由SEQ ID NO:1、2或3中公开的序列构成。在一个实施方案中,所述疫苗组合物用于预防和/或治疗传染性疾病,甲病毒属复制酶作为佐剂存在于所述疫苗组合物中,并可选地由表达载体编码。在一个实施方案中,所述疫苗组合物用于预防和/或治疗细菌性疾病,可选地由表达载体编码的甲病毒属复制酶作为佐剂存在于所述疫

苗组合物中。在另一个实施方案中,所述疫苗组合物用于预防和/或治疗病毒性疾病,该病毒性疾病优选由HIV(人类免疫缺陷病毒;HIV-1、HIV-II,可能导致AIDS)引起,可选地由表达载体编码的甲病毒属复制酶作为佐剂存在于所述疫苗组合物中。在另一个实施方案中,所述疫苗组合物用于预防和/或治疗癌症,可选地由表达载体编码的甲病毒属复制酶作为佐剂存在于所述疫苗组合物中。与提供所述组合物佐剂性质的复制酶组合施用的疫苗可以是任意适用于本发明目的的疫苗。在一些实施方案中,疫苗是基于蛋白质的疫苗,在其它实施方案中,疫苗是编码一种或多种感兴趣抗原或基因的表达载体。所述表达载体可以是任意适宜的编码一种或多种能够在施用疫苗组合物的宿主中诱导特异性免疫应答的感兴趣基因或抗原的基于核酸的表达载体。在一个优选实施方案中,疫苗组合物的载体基于流感病毒。

[0102] 因此,本发明一方面涉及含有在本文任意实施方案中定义的提供佐剂效果的甲病毒属复制酶和本文定义的选择疫苗的疫苗组合物。所述疫苗可任选地为GTU-MultiHIV (Blazevic V等,AIDS Res Hum Retroviruses.2006年7月;22(7):667-77)。因此,在一些方面所述疫苗组合物的疫苗可包含选择的一种或多种结构性或非结构性HIV蛋白质,例如在申请人的公报W002090558中公开的抗原。

[0103] 在本发明情况下,复制酶佐剂和抗原可由相同表达载体编码,其中复制酶提供佐剂性质,载体的疫苗部分为载体的分离的独立部分,提供与复制酶无关的功能。尽管如此,所述复制酶还可任选地与编码抗原的任意表达载体中的任意其它编码序列融合。在部分实施方案中编码佐剂和/或疫苗的表达载体可以是DNA载体。如技术人员理解的,本发明的疫苗组合物还可包含一种或多种疫苗单元,这意味着可将多种疫苗的混合物与本发明的佐剂一起施用于需要疫苗的对象中。

[0104] 在另一实施方案中,本发明涉及疫苗组合物中作为免疫应答调节佐剂的本文所述的甲病毒属复制酶在制备用于预防和/或治疗传染性疾病的药物中的用途,或本文所述的甲病毒属复制酶作为佐剂在疫苗组合物中的用途,包含一种或多种感兴趣基因的疫苗为包含以下成分的表达载体:

[0105] a. 编码有效地结合于异源启动子的核锚固蛋白的DNA序列,所述核锚固蛋白包含:

[0106] (i) 结合于特定DNA序列上的DNA结合域,和

[0107] (ii) 结合于核组分上的功能域或其功能等同体;以及

[0108] b. 用于核锚固蛋白的多聚体DNA结合序列(multimerized DNA binding sequence),其中所述载体缺失在哺乳动物细胞中发挥作用的复制功能起点。

[0109] 如本文中定义的,所述疫苗组合物可用于传染性疾病如HIV感染的治疗和/或预防,以及细菌性疾病或癌症的治疗。

[0110] 本发明还涉及在预防和/或治疗传染性疾病的疫苗组合物中用作免疫应答调节佐剂的本文所述的甲病毒属复制酶,其中包含一种或多种感兴趣基因的疫苗为包含以下成分的表达载体:

[0111] a) 编码有效地结合于异源启动子上的核锚固蛋白的DNA序列,所述核锚固蛋白包含:

[0112] (i) 结合于特定DNA序列上的DNA结合域,和

[0113] (ii) 结合于核组分上的功能域或其功能等同体;和

[0114] b) 用于核锚固蛋白的多聚体DNA结合序列,

[0115] 其中所述载体缺失在哺乳动物细胞中发挥作用的复制功能起点。

[0116] 术语“核锚固蛋白”是指结合于特定DNA序列上,能够向载体即蛋白提供核区室化功能的蛋白,并能够将载体锚固或附着在特定的核部分。在一个实施方案中,所述核锚固蛋白为来自1型牛乳头状瘤病毒的E2蛋白。在另一优选实施方案中,部分i)和/或部分ii),即结合于特定DNA序列上的DNA结合域和/或结合于核组分上的功能域由1型牛乳头状瘤病毒的E2蛋白得到。在一个实施方案中,所述蛋白为重组蛋白和/或合成蛋白。核组分可以是例如有丝分裂染色质、核基质、核内域(nuclear domain)10 (ND10)或核内域POD。

[0117] 可形成与本发明的复制酶佐剂一起使用的疫苗组合物的一部分的载体进一步披露于申请人拥有的作为W002090558公开的申请和(Blazevic V等,AIDS Res Hum Retroviruses.2006年7月;22(7):667-77)中。然而,应该注意的是,这些载体仅为可与本发明的用作佐剂的复制酶结合形成本文所述疫苗组合物的载体例子。任何起到疫苗作用的适宜表达载体均可与本发明的用作佐剂的复制酶一起配制,生产组合物,与单独施用疫苗相比,所述组合物能够在施用所述载体的对象中产生更强烈和更有效的免疫应答。在一个实施方案中,本发明涉及在疫苗组合物中用作免疫系统调节佐剂的甲病毒属复制酶在制备预防和/或治疗传染性疾病的药物中的用途,其中所述复制酶包含RNA依赖型RNA聚合酶。

[0118] 关于使用复制酶作为佐剂的疫苗组合物,应该指出的是,应由技术人员决定用于需要采用本文所述佐剂进行治疗的对象的疫苗组合物中存在的疫苗和/或佐剂的适宜量和剂量。在一个优选的方面,作为疫苗组合物一部分的复制酶由表达载体编码,所述表达载体优选为DNA载体。在一部分实施方案中所述疫苗也可以是表达载体,如DNA载体,或可以是基于蛋白质的疫苗。

[0119] 在另一方面,本发明涉及本文所述的包含用作佐剂的甲病毒属复制酶的疫苗组合物的制备方法,其包括将适宜量的甲病毒属复制酶或编码包含RNA依赖型RNA聚合酶的甲病毒属复制酶的表达载体与适宜量的疫苗混合,以及任选地添加药学上可接受的赋形剂和/或成分。各成分的适宜用量可由技术人员决定;然而,本文中也给出了一部分优选剂量的例子。

[0120] 在另一方面,本发明涉及向需要的对象施用适宜量疫苗组合物的方法,所述疫苗组合物中包含用作本发明的佐剂的甲病毒属复制酶或编码甲病毒属复制酶的表达载体。疫苗组合物的施用途径可以是技术人员决定的任意适宜途径,本文中给出了例子。需要的对象可以是任何哺乳动物,例如人或动物。

[0121] 在另一方面,本发明涉及向需要的对象施用甲病毒属复制酶的方法,所述甲病毒属复制酶包含RNA依赖型RNA聚合酶,任选地通过表达载体编码,并用作调节免疫应答的佐剂,其中所述佐剂以适宜量与疫苗组合施用,当向对象施用疫苗和佐剂时,相对仅施用疫苗,免疫应答增强。

[0122] 在另一方面,本发明涉及基本上与SEQ ID NO:3中公开的氨基酸序列一致的蛋白。所述蛋白也可由SEQ ID NO:3中公开的氨基酸序列组成。在另一方面,本发明涉及基本上与SEQ ID NO:1一致的蛋白,但已经在SEQ ID NO:1的1185-1187位点实施了突变,将氨基酸由RRR变成AAA。所述蛋白也可由与SEQ ID NO:1一致的序列构成,但已经在SEQ ID NO:1的1185-1187位点实施了突变,将氨基酸由RRR变成AAA。在又一方面,本发明涉及用作药物的

基本上与SEQ ID NO:3中公开的氨基酸序列一致的蛋白。在另一方面,本发明涉及用作药物的基本上由SEQ ID NO:3中公开的氨基酸序列构成的蛋白。在另一方面,本发明涉及用作免疫应答调节佐剂的基本上与SEQ ID NO:3中公开的氨基酸序列一致的蛋白。在另一方面,本发明涉及基本上与SEQ ID NO:3中公开的氨基酸序列一致的蛋白在制备免疫应答调节佐剂的用途。在另一方面,本发明涉及由基本上与SEQ ID NO:4中公开的序列一致的核酸序列编码的蛋白,但所述序列已经在4126-4133位点引入突变,将CGGCGGAG变为GCCGCCGC。在另一方面,本发明涉及由SEQ ID NO:4公开的序列构成的核酸序列编码的蛋白,但所述序列已经在4126-4133位点引入突变,将CGGCGGAG变为GCCGCCGC。在另一方面,本发明还涉及基本上与SEQ ID NO:4中公开的序列一致的核酸序列,但已经在4126-4133位点引入突变,将CGGCGGAG变为GCCGCCGC。此外,本发明还涉及由SEQ ID NO:4中公开的序列构成的核酸序列,但已经在4126-4133位点引入突变,将CGGCGGAG变为GCCGCCGC。

[0123] 在另一方面,本发明涉及包含表达盒的表达载体,所述表达盒包含基本上与SEQ ID NO:4中公开的序列一致的序列,但在SEQ ID NO:4的4126-4133位点引入突变,当表达时,产生在SEQ ID NO:1的1185-1187位点的由RRR变为AAA的突变体(SEQ ID NO:3)。在另一方面,本发明涉及包含表达盒的表达载体,所述表达盒由基本上与SEQ ID NO:4公开的序列一致的序列构成,但已经在SEQ ID NO:4的4126-4133位点引入突变,当表达时,产生在SEQ ID NO:1的1185-1187位点的RRR>AAA突变体(SEQ ID NO:3)。在另一方面,本发明涉及用作药物的包含表达盒的表达载体,所述表达盒含有基本上与SEQ ID NO:4公开的序列一致的序列,但已经在SEQ ID NO:4的4126-4133位点引入突变,当表达时,产生在SEQ ID NO:1的1185-1187位点的RRR>AAA突变体,当突变时,产生SEQ ID NO:3中公开的氨基酸序列。

[0124] 在另一方面,本发明涉及包含RNA依赖型RNA聚合酶的甲病毒属复制酶在制备免疫系统调节佐剂的用途。所述甲病毒可任选地为Semliki森林病毒。在一些方面,复制酶的氨基酸序列基本上与SEQ ID NO:1一致。所述复制酶的氨基酸序列也可由与SEQ ID NO:1一致的序列构成,或由本文所述的突变型复制酶构成。在其它方面,所述复制酶在nsP2区域发生突变,产生在SEQ ID NO:1的1185-1187位点的RRR>RDR突变体。在另一方面,复制酶在nsP2区域发生突变,产生在SEQ ID NO:1的1185-1187位点的RRR>AAA突变体。

[0125] 本发明还涉及编码本文所述甲病毒属复制酶的表达载体在制备免疫系统调节佐剂中的用途。在一些方面中,所述表达载体为DNA载体。所述复制酶或编码所述复制酶的所述表达载体也可与药学上可接受的赋形剂和/或成分一起配制。

[0126] 实验部分

[0127] 表达载体

[0128] pRSV-Nsp1234 (SEQ ID NO:5) 为由RSV LTR启动子表达密码子优化SFV复制酶的10342bp质粒载体。由异源兔 β -球蛋白基因衍生的内含子被引入复制酶编码序列中。

[0129] 主要特征:

[0130] 始-终 描述

[0131] 9933-268 pUCori

[0132] 437-963 RSV LTR

[0133] 1001-8869 具有内含子的SFV复制酶编码序列(SEQ ID NO:4)

[0134] 1213-1785 内含子

[0135] 8878-9090 bgh pA

[0136] 9204-9899 araD选择标记

[0137] pRSV-AAA与pRSV-Nsp1234 (SEQ ID NO:5) 相同,但包含SEQ ID NO:1的aa1185-1187由RRR向AAA的突变:在5126-5133位点的核苷酸序列由CGGCGGAG向GCCGCCGC突变。

[0138] pRSV-RDR与pRSV-Nsp1234 (SEQ ID NO:5) 相同,但包含SEQ ID NO:1的aa1185-1187由RRR向RDR的突变:在5129-5131位点的核苷酸序列由CGG向GAC突变。

[0139] pRSV-GAA与pRSV-Nsp1234 (SEQ ID NO:5) 相同,但包含SEQ ID NO:1的aa2283-2285由GDD向GAA的突变:在8424-8427位点的核苷酸序列由ACGA向CCGC突变。

[0140] pRSV-AAA-GAA与pRSV-Nsp1234 (SEQ ID NO:5) 相同,但包含SEQ ID NO:1的aa1185-1187由RRR向AAA的突变:在5126-5133位点的核苷酸序列由CGGCGGAG向GCCGCCGC突变;并且包含Nsp1234的aa2283-2285由GDD向GAA的突变:8424-8427位点的核苷酸序列由ACGA向CCGC突变。

[0141] pRSV-RDR-GAA与pRSV-Nsp1234 (SEQ ID NO:5) 相同,但包含SEQ ID NO:1的aa1185-1187由RRR向RDR的突变:在5129-5131位点的核苷酸序列由CGG向GAC突变;并且含有Nsp1234的aa2283-2285由GDD向GAA的突变:8424-8427位点的核苷酸序列由ACGA向CCGC突变。

[0142] phe1F4A1-Nsp1234 (SEQ ID NO:6) 为由人e1F4A1启动子表达密码子优化SFV复制酶 (SEQ ID NO:4) 的10248bp质粒载体。由异源兔 β -球蛋白基因衍生的内含子被引入复制酶编码序列中。

[0143] 主要特征:

[0144] 始-终 描述

[0145] 9839-268 pUCori

[0146] 367-894 he1F4A1启动子

[0147] 907-8775 具有内含子的SFV复制酶编码序列 (SEQ ID NO:4)

[0148] 1119-1691 内含子

[0149] 8784-8996 bgh pA

[0150] 9110-9805 araD选择标记

[0151] phe1F4A1-AAA与phe1F4A1-Nsp1234 (SEQ ID NO:6) 相同,但包含在SEQ ID NO:1的aa1185-1187中RRR向AAA的突变:在5032-5039位点的核苷酸序列由CGGCGGAG向GCCGCCGC突变。

[0152] phe1F4A1-RDR与phe1F4A1-Nsp1234 (SEQ ID NO:6) 相同,但包含在SEQ ID NO:1的aa1185-1187中RRR向RDR的突变:在5035-5037位点的核苷酸序列由CGG向GAC突变。

[0153] pheF1aHTLV-Nsp1234 (SEQ ID NO:7) 为由人EF1a启动子+HTLV UTR表达密码子优化SFV复制酶 (SEQ ID NO:4) 的10258bp质粒载体。由异源兔 β -球蛋白基因衍生的内含子被引入复制酶编码序列中。

[0154] 主要特征:

[0155] 始-终 描述

[0156] 9849-268 pUCori

[0157] 372-903 hEF1a/HTLV

- [0158] 917-8785 具有内含子的SFV复制酶编码序列 (SEQ ID NO:4)
- [0159] 1129-1701 内含子
- [0160] 8794-9006 bgh pA
- [0161] 9120-9815 araD选择标记

[0162] phEF1aHTLV-AAA与phEF1aHTLV-Nsp1234 (SEQ ID NO:7) 相同,但包含在SEQ ID NO:1的aa1185-1187中RRR向AAA的突变:在5042-5049位点的核苷酸序列由CGGCGGAG向GCCGCCGC突变。

[0163] phEF1aHTLV-RDR与phEF1aHTLV-Nsp1234 (SEQ ID NO:7) 相同,但包含在SEQ ID NO:1的aa1185-1187中RRR向RDR的突变:在5045-5047位点的核苷酸序列由CGG向GAC突变。

[0164] phEF1aHTLV-GAA与phEF1aHTLV-Nsp1234 (SEQ ID NO:7) 相同,但包含在SEQ ID NO:1的aa 2283-2285中GDD向GAA的突变:在8340-8343位点的核苷酸序列由ACGA向CCGC突变。

[0165] 实施例1.表达在nsP2区域具有RRR>RDR突变的SFV复制酶的DNA质粒的构建

[0166] 首先,反译(back-translate)SFV复制酶蛋白质序列(非结构性多肽nsP1234) (SEQ ID NO:1),并合成具有异源兔β球蛋白基因衍生的内含子(被引入编码序列中)的密码子优化合成cDNA (SEQ ID NO:4)。将cDNA插入表达质粒中,使得不同的异源Pol II启动子和UTR要素被用于由密码子优化编码序列表达SFV复制酶(图5)。特别地,采用劳斯肉瘤病毒5' LTR、人e1F4A1启动子和由人EF1a启动子+HTLV UTR构成的嵌合启动子。表达SFV复制酶 (SEQ ID NO:1)的载体称作pRSV-Nsp1234 (SEQ ID NO 5)、phe1F4A1-Nsp1234 (SEQ ID NO 6)和phEF1aHTLV-Nsp1234 (SEQ ID NO 7)。另外,将nsP2 NLS区域内1185-1187氨基酸的突变RRR>AAA引入载体pRSV-Nsp1234、phe1F4A1-Nsp1234和phEF1aHTLV-Nsp1234。质粒分别称为pRSV-AAA、phe1F4A1-AAA和phEF1aHTLV-AAA。

[0167] 由文献数据知晓,与采用野生型病毒感染的细胞相比,编码野生型SFV复制酶的基因在aa1185-1187的特异突变RRR>RDR显著增强了在病毒感染细胞中的IFN应答的诱导(Breakwell等,2007)。从而,将突变RRR>RDR引入载体pRSV-Nsp1234、phe1F4A1-Nsp1234和phEF1aHTLV-Nsp1234中。所述质粒分别称作pRSV-RDR、phe1F4A1-RDR和phEF1aHTLV-RDR。

[0168] 由文献数据已知,在甲病毒属nsP4蛋白的高度保守的GDD基序(SFVNsp1234的aa2283-2285)中的突变GDD>GAA完全破坏了RNA依赖型RNA聚合酶活性(Tomar等,2006)。以前,将GDD>GAA突变引入由载体pRSV-Nsp1234和pRSV-AAA编码的复制酶中。将克隆载体分别称作pRSV-GAA和pRSV-AAA-GAA。另外,将GDD>GAA突变引入质粒pEF1aHTLV-Nsp1234的环境中,形成载体pEF1aHTLV-GAA。为构建在nsP2区域具有RRR>RDR突变的控制载体,将GDD>GAA突变引入pRSV-RDR载体中形成质粒pRSV-RDR-GAA。

[0169] 实施例2:通过RdRp表达诱导I型干扰素应答

[0170] 我们采用Cop5小鼠成纤维细胞系(ATCC CRL-1804号)作为模型细胞系,区分不同的复制酶结构诱导I型干扰素表达的能力。在补充有10%的胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺和链霉素-青霉素的Iscove's改良的Dulbecco's培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM))中繁殖Cop-5细胞。使用其它两种人细胞HEK293和HACAT作为比较。在37℃、5%CO₂下繁殖细胞,并生长至50-70%的融合。

[0171] 转染

[0172] 采用Bio-Rad基因发生器 (Gene Pulser) 实施电穿孔。使用三种质粒DNA浓度 (10ng、200ng和1000ng) 进行转染, 对照质粒使用相同浓度。测试所有五种不同结构 (pRSV-Nsp1234、pRSV-RDR、pRSV-AAA、pRSV-RDR-GAA和pRSV-AAA-GAA) 诱导干扰素应答的能力。利用胰蛋白酶处理细胞, 然后离心收集细胞, 并悬浮于菌种生长培养基 (growth medium) 中, 然后补充5mM NaBes。在50ug载体DNA (鲑鱼精子DNA) 的存在下, 在0.4mm电击杯中实施电穿孔, 并在电击杯中保持15分钟, 用生长培养基洗涤, 并在6孔板上接种。

[0173] β -干扰素分析

[0174] 在转染后24h、48h和72h收获细胞培养上清液, 并在-20℃下冷冻, 直至采用 α -干扰素和 β -干扰素试剂盒 (PBL Biomedical Laboratories) 进一步分析。将细胞培养上清液适度稀释, 并根据生产商指南 (PBL Biomedical Laboratories) 用于酶联免疫吸附测定。

[0175] 结果

[0176] 根据生产商指南, 利用酶联免疫吸附测定 (ELISA) (PBL Biomedical Laboratories) 由收集的上清液定量 β -干扰素的水平。

[0177] 结论

[0178] 干扰素应答的产生归因于区室化的RdRp复合体中RNA依赖型RNA聚合酶 (RdRp) 的活性。当RdRp的酶活性通过将GAA突变引入聚合酶单元的活性中心而被除去时, RdRp的作用完全丧失 (图2)。由采用含GAA突变的结构转染后的细胞培养上清液测定的干扰素表达图谱与不编码任何酶活性的结构类似 (图1, paraDMgB道)。

[0179] 基于细胞培养实验, 选择这样的突变体作为最有前景的佐剂候选对象, 即通过引入RDR突变, 核定位信号 (NLS) 在Nsp2区域被改进。也对在NLS的相同位置具有其它改变 (AAA) 的突变体或野生型RdRp的I型干扰素应答诱导能力进行测试, 但效果大幅降低 (图1)。

[0180] 我们还比较了复制酶表达载体pRSV-Nsp1234 (SEQ ID NO:5) 和表达所述复制酶和含模板RNA的特定病毒顺式序列的载体pRSV-SFV-Rluc。后者作为所述复制酶的特定底物。IFN应答诱导测试的结果表明, 特定模板RNA的存在不是诱导干扰素应答的关键因素 (图3)。在人细胞系HEK293和HACAT中, 我们还能够显示由pRSV-RDR进行的特定 β -干扰素诱导和更小程度上的 α -干扰素诱导 (图4和5)。

[0181] 实施例3: dsRNA在复制酶表达细胞的细胞质中的累积

[0182] 已知在SFV基因组或复制酶模板RNA的复制周期中产生dsRNA中间体。dsRNA在可向细胞发出病毒感染的信号的细胞质部分的存在可能引起包括I型干扰素应答在内的抗病毒应答级联。

[0183] 如上述记载的 (实施例2), 单独的SFV复制酶表达可在转染细胞中诱导I型干扰素应答。另外, 由于采用具有破坏RdRp活性的GDD>GAA突变的表达载体转染后, 未观察到IFN应答 (实施例2), 由此确定复制酶的RdRp活性对于IFN应答是至关重要的。

[0184] 因此, 研究了dsRNA在仅采用复制酶表达载体转染的细胞中的存在和定位。基于该目的, 利用了采用抗dsRNA单克隆抗体J2 (Scicons, Hungary) 的IF分析。该方法以前用于检测采用正链RNA病毒感染后细胞中的dsRNA (Weber等, 2006)。简言之, 采用复制酶表达载体转染细胞, 转染后第二天, 采用抗Nsp1抗体和抗dsRNA抗体 (混合), 对被低聚甲醛固定的细胞进行免疫荧光分析。通过荧光显微法检测信号, 使用荧光染料Alexa488和Alexa568标记二次抗体, 并通过DAPI对细胞核染色。

[0185] 实验1.

[0186] 利用0.5ug phEF1aHTLV-Nsp1234或0.5ug phEF1aHTLV-GAA,通过PEI-DNA复合物转染RD细胞。结果清楚地证实,在两种培养物中均发现了Nsp1信号。在采用phEF1aHTLV-Nsp1234转染的细胞中检测到与抗nsP1着色的球形图案共位的细胞质dsRNA信号,但在采用phEF1aHTLV-Nsp1234-GAA转染的细胞中未检测到。

[0187] 实验2.

[0188] 采用1ug pRSV-Nsp1234、pRSV-GAA、pRSV-RDR或pRSV-RDR-GAA,电穿孔转染Cop5细胞。结果表明,尽管在所有培养物中均观察到Nsp1信号,但在采用pRSV-Nsp1234或pRSV-RDR转染的细胞中能够检测到与复制酶共位的细胞质dsRNA,但在质粒pRSV-GAA或pRSV-RDR-GAA转染的细胞中未检测到。

[0189] 实验3.

[0190] 利用0.5或1ug pRSV-Nsp1234、pRSV-AAA或pRSV-RDR,通过PEI-DNA复合物转染RD细胞。结果证实,在所有培养物中均发现Nsp1信号。在采用pRSV-Nsp1234或pRSV-RDR转染的细胞中检测到与抗nsP1着色的球形图案共位的细胞质dsRNA信号,但在采用pRSV-AAA转染的细胞中未检测到。

[0191] 结论

[0192] 证实了下述内容:如前所述,野生型SFV复制酶或在nsP2区域具有RRR>RDR突变的复制酶的表达,在转染细胞的细胞质中明显诱导与nsp1正球形图案(positive spheric pattern)共位的dsRNA累积。相反,如果采用具有破坏其RdRp活性的GDD>GAA突变的复制酶转染细胞,则不能检测到这样的dsRNA累积。

[0193] 从而,这些结果表明了不同复制酶突变体实施的I型IFN诱导与dsRNA累积之间的关联。然而,尽管在采用复制酶的RRR>AAA突变体转染后,未检测到dsRNA累积,但仍然观察到I型IFN应答的诱导。这表明被诱导的IFN应答不仅仅由dsRNA信号触发,而且还可通过与复制酶的RdRp活性相关的其它途径触发。然而,不能排除复制酶突变体RRR>AAA产生微量dsRNA,而所使用的分析条件无法检测到。

[0194] 实施例4. SFV复制酶的表达在细胞介导免疫应答中的佐剂效果

[0195] 使用基因枪以两周间隔对三组不同的小鼠(Balb/c)(每组5只小鼠)实施2次免疫。两次免疫中均施用1微克质粒DNA。质粒载体GTU-MultiHIV(编码来自HIV-1的选定基因)为用于HIV-1的实验性DNA疫苗。当将GTU-MultiHIV与佐剂pRSV-Nsp1234或pRSV-RDR共同施用,将0.8ug GTU-MultiHIV和0.2ug佐剂质粒混合在一起。对于那些仅接受GTU-MultiHIV载体小鼠,使用1ug质粒DNA。10天后杀死小鼠。采用刚分离的脾细胞实施干扰素 γ ELISPOT分析。使用由HIV-1的p24蛋白质衍生的单肽(AMQMLKETI)刺激细胞,该单肽由Balb/c小鼠的I类MHC分子呈递。另一刺激剂为一组覆盖HIV-1的Rev-蛋白的重叠肽,所述HIV-1的Rev蛋白为由DNA疫苗编码的另一成分。

[0196] 结果表明,当将DNA疫苗与对SFV复制酶编码的载体共同施用时,观察到细胞免疫应答增大至3倍(图6)。

[0197] 实施例5. SFV复制酶表达在针对禽流感病毒的体液免疫应答的诱导中的效果

[0198] 采用编码流感病毒的HA-抗原和NA-抗原的质粒载体pETB-12m-1免疫三组不同的小鼠(每组5只小鼠)。将小鼠以与前述实施例类似的方式免疫(每次免疫采用1ug质粒DNA,

当将质粒与基因佐剂共同施用,则采用4:1比例(800ng免疫载体和200ng佐剂载体)。第二次免疫后两周,用ELISA试验分析血液样品中特定抗体的存在。在此试验中,使用另一种基因佐剂,即已知用于增强体液免疫应答的编码细胞因子GM-CSF的载体,作为对比。

[0199] 结果表明,两次免疫后在将基因佐剂pRSV-RDR与抗原编码质粒混合的组中,检测到最佳滴度(图7)。

[0200] 实施例6. SFV复制酶表达在小鼠的细胞介导免疫应答中的佐剂效果

[0201] 使用基因枪以四周间隔对三组不同的小鼠(Balb/c)(每组4或5只小鼠)实施2次免疫。两次免疫中均施用1微克质粒DNA。质粒载体GTU-MultiHIV(编码来自HIV-1的选定基因)为用于HIV-1的实验性DNA疫苗。当将GTU-MultiHIV与佐剂pRSV-RDR在首次或第二次免疫中共同施用,将0.8ugGTU-MultiHIV和0.2ug佐剂质粒混合在一起。对于那些仅接受GTU-MultiHIV载体的小鼠,使用1ug质粒DNA。第二次免疫后10天,杀死小鼠。采用刚刚分离的脾细胞对干扰素 γ 和颗粒酶B进行ELISPOT分析。使用由HIV-1的Env蛋白衍生的单肽(RGPGRAFVTI)和由HIV-1的p24蛋白衍生的单肽(AMQMLKETI)刺激细胞,其由Balb/c小鼠的I类MHC分子呈递。

[0202] 结果表明,共同施用佐剂SFV复制酶的共同施用时间对细胞免疫应答具有复杂影响。与仅接受GTU-MultiHIV的动物相比,向免疫混合物中添加佐剂增强了干扰素 γ 的应答。颗粒酶B表达分析后,显示了细胞的不同工作能力。当佐剂在首次免疫中施用于小鼠时,颗粒酶反应增强接近3倍。

[0203] 参考文献

[0204] Nature Reviews Microbiology 6,363-374(May 2008)“Modification of intracellular membrane structures for virus replication”Sven Miller and Jacomine Krijnse-Locker.

[0205] Ahlquist P et al“Host Factors in Positive-Strand RNA Virus Genome Replication”Journal of Virology, Aug 2003 vol.77 p8181-8186

[0206] Blazevic V, Mannik A, Malm M et al, 2006, “Induction of human immunodeficiency virus type-1-specific immunity with novel gene transport umt (GTU)-MultiHIV DNA vaccine.”AIDS Research and Human Retroviruses Vol 22, No 7, pp.667-677

[0207] Edwards MR, Slater L, Johnston SL 2007“Signalling pathways mediating type I interferon gene expression”Microbes and infection 9,1245-1251

[0208] Medzhitov R“Recognition of microorganisms and activation of the immune response”Nature, Vol 449, 18 October 2007, p.819-826

[0209] Vercammen E, Staal J, Beyaert R. “Sensing of viral infection and activation of innate immunity by Toll-like receptor 3”Clinical Microbiology Reviews, Jan 2008, p13-25

[0210] Darius Moradpour, Francois Penin, Charles M. Rice, 2007 “Replication of hepatitis C virus”Nature Reviews Microbiology 5, 453-463

[0211] Ventoso I, Sanz MA, Molina S et al 2006 “Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2a phosphorylation: a strategy to overcome the

antiviral effect of protein kinase PKR”Genes and Development 20:87-100.

[0212] Rautsi et al 2007 “Type I interferon response against viral and non-viral gene transfer in human tumor and primary cell lines”.The Journal of Gene Medicine 9:122-135.

[0213] Rikkonen et al 1992.Nuclear and nucleolar targeting signals of SemlikiForest virus non-structural protein nSP2.Virology.189:462-73

[0214] Agnes LeBon and David F Tough 2002.“Links between innate and adaptive immunity via type I interferon”.Current Opinion in Immunology 14:432-436

[0215] Theofilopoulos AN et al 2005.“Type I interferons (α/β) in immunity and autoimmunity”.Annu.Rev.Immunol 25:307-335

[0216] Tomar et al 2006.Catalytic Core of Alphavirus Nonstructural Protein nsP4Possesses Terminal Adenylyltransferase Activity J Virol.80:9962-9

序列表

<110> 非特生物技术有限责任公司

<120> 基因佐剂

<130> PD53981PC00

<150> US61/071,898

<151> 2008-05-23

<160> 7

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 2432

<212> PRT

<213> 病毒

<400> 1

Met Ala Ala Lys Val His Val Asp Ile Glu Ala Asp Ser Pro Phe Ile
1 5 10 15

Lys Ser Leu Gln Lys Ala Phe Pro Ser Phe Glu Val Glu Ser Leu Gln
20 25 30

Val Thr Pro Asn Asp His Ala Asn Ala Arg Ala Phe Ser His Leu Ala
35 40 45

Thr Lys Leu Ile Glu Gln Glu Thr Asp Lys Asp Thr Leu Ile Leu Asp
50 55 60

Ile Gly Ser Ala Pro Ser Arg Arg Met Met Ser Thr His Lys Tyr His
65 70 75 80

Cys Val Cys Pro Met Arg Ser Ala Glu Asp Pro Glu Arg Leu Val Cys
85 90 95

Tyr Ala Lys Lys Leu Ala Ala Ala Ser Gly Lys Val Leu Asp Arg Glu
100 105 110

Ile Ala Gly Lys Ile Thr Asp Leu Gln Thr Val Met Ala Thr Pro Asp
115 120 125

Ala Glu Ser Pro Thr Phe Cys Leu His Thr Asp Val Thr Cys Arg Thr
130 135 140

Ala Ala Glu Val Ala Val Tyr Gln Asp Val Tyr Ala Val His Ala Pro
145 150 155 160

Thr Ser Leu Tyr His Gln Ala Met Lys Gly Val Arg Thr Ala Tyr Trp
165 170 175

Ile Gly Phe Asp Thr Thr Pro Phe Met Phe Asp Ala Leu Ala Gly Ala
180 185 190

Tyr Pro Thr Tyr Ala Thr Asn Trp Ala Asp Glu Gln Val Leu Gln Ala
195 200 205

Arg Asn Ile Gly Leu Cys Ala Ala Ser Leu Thr Glu Gly Arg Leu Gly
210 215 220

Lys Leu Ser Ile Leu Arg Lys Lys Gln Leu Lys Pro Cys Asp Thr Val
225 230 235 240

[0001]

Met Phe Ser Val Gly Ser Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Arg Lys Leu Leu
 245 250 255
 Arg Ser Trp His Leu Pro Ser Val Phe His Leu Lys Gly Lys Gln Ser
 260 265 270
 Phe Thr Cys Arg Cys Asp Thr Ile Val Ser Cys Glu Gly Tyr Val Val
 275 280 285
 Lys Lys Ile Thr Met Cys Pro Gly Leu Tyr Gly Lys Thr Val Gly Tyr
 290 295 300
 Ala Val Thr Tyr His Ala Glu Gly Phe Leu Val Cys Lys Thr Thr Asp
 305 310 315 320
 Thr Val Lys Gly Glu Arg Val Ser Phe Pro Val Cys Thr Tyr Val Pro
 325 330 335
 Ser Thr Ile Cys Asp Gln Met Thr Gly Ile Leu Ala Thr Asp Val Thr
 340 345 350
 Pro Glu Asp Ala Gln Lys Leu Leu Val Gly Leu Asn Gln Arg Ile Val
 355 360 365
 Val Asn Gly Arg Thr Gln Arg Asn Thr Asn Thr Met Lys Asn Tyr Leu
 370 375 380
 Leu Pro Ile Val Ala Val Ala Phe Ser Lys Trp Ala Arg Glu Tyr Lys
 385 390 395 400
 Ala Asp Leu Asp Asp Glu Lys Pro Leu Gly Val Arg Glu Arg Ser Leu
 405 410 415
 Thr Cys Cys Cys Leu Trp Ala Phe Lys Thr Arg Lys Met His Thr Met
 420 425 430
 Tyr Lys Lys Pro Asp Thr Gln Thr Ile Val Lys Val Pro Ser Glu Phe
 435 440 445
 Asn Ser Phe Val Ile Pro Ser Leu Trp Ser Thr Gly Leu Ala Ile Pro
 450 455 460
 Val Arg Ser Arg Ile Lys Met Leu Leu Ala Lys Lys Thr Lys Arg Glu
 465 470 475 480
 Leu Ile Pro Val Leu Asp Ala Ser Ser Ala Arg Asp Ala Glu Gln Glu
 485 490 495
 Glu Lys Glu Arg Leu Glu Ala Glu Leu Thr Arg Glu Ala Leu Pro Pro
 500 505 510
 Leu Val Pro Ile Ala Pro Ala Glu Thr Gly Val Val Asp Val Asp Val
 515 520 525
 Glu Glu Leu Glu Tyr His Ala Gly Ala Gly Val Val Glu Thr Pro Arg
 530 535 540
 Ser Ala Leu Lys Val Thr Ala Gln Pro Asn Asp Val Leu Leu Gly Asn
 545 550 555 560

[0002]

Tyr Val Val Leu Ser Pro Gln Thr Val Leu Lys Ser Ser Lys Leu Ala
 565 570 575
 Pro Val His Pro Leu Ala Glu Gln Val Lys Ile Ile Thr His Asn Gly
 580 585 590
 Arg Ala Gly Arg Tyr Gln Val Asp Gly Tyr Asp Gly Arg Val Leu Leu
 595 600 605
 Pro Cys Gly Ser Ala Ile Pro Val Pro Glu Phe Gln Ala Leu Ser Glu
 610 615 620
 Ser Ala Thr Met Val Tyr Asn Glu Arg Glu Phe Val Asn Arg Lys Leu
 625 630 635 640
 Tyr His Ile Ala Val His Gly Pro Ser Leu Asn Thr Asp Glu Glu Asn
 645 650 655
 Tyr Glu Lys Val Arg Ala Glu Arg Thr Asp Ala Glu Tyr Val Phe Asp
 660 665 670
 Val Asp Lys Lys Cys Cys Val Lys Arg Glu Glu Ala Ser Gly Leu Val
 675 680 685
 Leu Val Gly Glu Leu Thr Asn Pro Pro Phe His Glu Phe Ala Tyr Glu
 690 695 700
 Gly Leu Lys Ile Arg Pro Ser Ala Pro Tyr Lys Thr Thr Val Val Gly
 705 710 715 720
 [0003] Val Phe Gly Val Pro Gly Ser Gly Lys Ser Ala Ile Ile Lys Ser Leu
 725 730 735
 Val Thr Lys His Asp Leu Val Thr Ser Gly Lys Lys Glu Asn Cys Gln
 740 745 750
 Glu Ile Val Asn Asp Val Lys Lys His Arg Gly Leu Asp Ile Gln Ala
 755 760 765
 Lys Thr Val Asp Ser Ile Leu Leu Asn Gly Cys Arg Arg Ala Val Asp
 770 775 780
 Ile Leu Tyr Val Asp Glu Ala Phe Ala Cys His Ser Gly Thr Leu Leu
 785 790 795 800
 Ala Leu Ile Ala Leu Val Lys Pro Arg Ser Lys Val Val Leu Cys Gly
 805 810 815
 Asp Pro Lys Gln Cys Gly Phe Phe Asn Met Met Gln Leu Lys Val Asn
 820 825 830
 Phe Asn His Asn Ile Cys Thr Glu Val Cys His Lys Ser Ile Ser Arg
 835 840 845
 Arg Cys Thr Arg Pro Val Thr Ala Ile Val Ser Thr Leu His Tyr Gly
 850 855 860
 Gly Lys Met Arg Thr Thr Asn Pro Cys Asn Lys Pro Ile Ile Ile Asp
 865 870 875 880
 Thr Thr Gly Gln Thr Lys Pro Lys Pro Gly Asp Ile Val Leu Thr Cys

	885	890	895
	Phe Arg Gly Trp Val Lys Gln Leu Gln Leu Asp Tyr Arg Gly His Glu 900 905 910		
	Val Met Thr Ala Ala Ala Ser Gln Gly Leu Thr Arg Lys Gly Val Tyr 915 920 925		
	Ala Val Arg Gln Lys Val Asn Glu Asn Pro Leu Tyr Ala Pro Ala Ser 930 935 940		
	Glu His Val Asn Val Leu Leu Thr Arg Thr Glu Asp Arg Leu Val Trp 945 950 955 960		
	Lys Thr Leu Ala Gly Asp Pro Trp Ile Lys Val Leu Ser Asn Ile Pro 965 970 975		
	Gln Gly Asn Phe Thr Ala Thr Leu Glu Glu Trp Gln Glu Glu His Asp 980 985 990		
	Lys Ile Met Lys Val Ile Glu Gly Pro Ala Ala Pro Val Asp Ala Phe 995 1000 1005		
	Gln Asn Lys Ala Asn Val Cys Trp Ala Lys Ser Leu Val Pro Val 1010 1015 1020		
	Leu Asp Thr Ala Gly Ile Arg Leu Thr Ala Glu Glu Trp Ser Thr 1025 1030 1035		
[0004]	Ile Ile Thr Ala Phe Lys Glu Asp Arg Ala Tyr Ser Pro Val Val 1040 1045 1050		
	Ala Leu Asn Glu Ile Cys Thr Lys Tyr Tyr Gly Val Asp Leu Asp 1055 1060 1065		
	Ser Gly Leu Phe Ser Ala Pro Lys Val Ser Leu Tyr Tyr Glu Asn 1070 1075 1080		
	Asn His Trp Asp Asn Arg Pro Gly Gly Arg Met Tyr Gly Phe Asn 1085 1090 1095		
	Ala Ala Thr Ala Ala Arg Leu Glu Ala Arg His Thr Phe Leu Lys 1100 1105 1110		
	Gly Gln Trp His Thr Gly Lys Gln Ala Val Ile Ala Glu Arg Lys 1115 1120 1125		
	Ile Gln Pro Leu Ser Val Leu Asp Asn Val Ile Pro Ile Asn Arg 1130 1135 1140		
	Arg Leu Pro His Ala Leu Val Ala Glu Tyr Lys Thr Val Lys Gly 1145 1150 1155		
	Ser Arg Val Glu Trp Leu Val Asn Lys Val Arg Gly Tyr His Val 1160 1165 1170		
	Leu Leu Val Ser Glu Tyr Asn Leu Ala Leu Pro Arg Arg Arg Val 1175 1180 1185		
	Thr Trp Leu Ser Pro Leu Asn Val Thr Gly Ala Asp Arg Cys Tyr 1190 1195 1200		

[0005]

Asp Leu Ser Leu Gly Leu Pro Ala Asp Ala Gly Arg Phe Asp Leu 1205 1210 1215
Val Phe Val Asn Ile His Thr Glu Phe Arg Ile His His Tyr Gln 1220 1225 1230
Gln Cys Val Asp His Ala Met Lys Leu Gln Met Leu Gly Gly Asp 1235 1240 1245
Ala Leu Arg Leu Leu Lys Pro Gly Gly Ser Leu Leu Met Arg Ala 1250 1255 1260
Tyr Gly Tyr Ala Asp Lys Ile Ser Glu Ala Val Val Ser Ser Leu 1265 1270 1275
Ser Arg Lys Phe Ser Ser Ala Arg Val Leu Arg Pro Asp Cys Val 1280 1285 1290
Thr Ser Asn Thr Glu Val Phe Leu Leu Phe Ser Asn Phe Asp Asn 1295 1300 1305
Gly Lys Arg Pro Ser Thr Leu His Gln Met Asn Thr Lys Leu Ser 1310 1315 1320
Ala Val Tyr Ala Gly Glu Ala Met His Thr Ala Gly Cys Ala Pro 1325 1330 1335
Ser Tyr Arg Val Lys Arg Ala Asp Ile Ala Thr Cys Thr Glu Ala 1340 1345 1350
Ala Val Val Asn Ala Ala Asn Ala Arg Gly Thr Val Gly Asp Gly 1355 1360 1365
Val Cys Arg Ala Val Ala Lys Lys Trp Pro Ser Ala Phe Lys Gly 1370 1375 1380
Glu Ala Thr Pro Val Gly Thr Ile Lys Thr Val Met Cys Gly Ser 1385 1390 1395
Tyr Pro Val Ile His Ala Val Ala Pro Asn Phe Ser Ala Thr Thr 1400 1405 1410
Glu Ala Glu Gly Asp Arg Glu Leu Ala Ala Val Tyr Arg Ala Val 1415 1420 1425
Ala Ala Glu Val Asn Arg Leu Ser Leu Ser Ser Val Ala Ile Pro 1430 1435 1440
Leu Leu Ser Thr Gly Val Phe Ser Gly Gly Arg Asp Arg Leu Gln 1445 1450 1455
Gln Ser Leu Asn His Leu Phe Thr Ala Met Asp Ala Thr Asp Ala 1460 1465 1470
Asp Val Thr Ile Tyr Cys Arg Asp Lys Ser Trp Glu Lys Lys Ile 1475 1480 1485
Gln Glu Ala Ile Asp Met Arg Thr Ala Val Glu Leu Leu Asn Asp 1490 1495 1500

[0006]

Asp Val	Glu Leu Thr Thr	Asp Leu Val Arg Val His	Pro Asp Ser
1505		1510	1515
Ser Leu	Val Gly Arg Lys Gly	Tyr Ser Thr Thr Asp	Gly Ser Leu
1520		1525	1530
Tyr Ser	Tyr Phe Glu Gly Thr	Lys Phe Asn Gln Ala	Ala Ile Asp
1535		1540	1545
Met Ala	Glu Ile Leu Thr Leu	Trp Pro Arg Leu Gln	Glu Ala Asn
1550		1555	1560
Glu Gln	Ile Cys Leu Tyr Ala	Leu Gly Glu Thr Met	Asp Asn Ile
1565		1570	1575
Arg Ser	Lys Cys Pro Val Asn	Asp Ser Asp Ser Ser	Thr Pro Pro
1580		1585	1590
Arg Thr	Val Pro Cys Leu Cys	Arg Tyr Ala Met Thr	Ala Glu Arg
1595		1600	1605
Ile Ala	Arg Leu Arg Ser His	Gln Val Lys Ser Met	Val Val Cys
1610		1615	1620
Ser Ser	Phe Pro Leu Pro Lys	Tyr His Val Asp Gly	Val Gln Lys
1625		1630	1635
Val Lys	Cys Glu Lys Val Leu	Leu Phe Asp Pro Thr	Val Pro Ser
1640		1645	1650
Val Val	Ser Pro Arg Lys Tyr	Ala Ala Ser Thr Thr	Asp His Ser
1655		1660	1665
Asp Arg	Ser Leu Arg Gly Phe	Asp Leu Asp Trp Thr	Thr Asp Ser
1670		1675	1680
Ser Ser	Thr Ala Ser Asp Thr	Met Ser Leu Pro Ser	Leu Gln Ser
1685		1690	1695
Cys Asp	Ile Asp Ser Ile Tyr	Glu Pro Met Ala Pro	Ile Val Val
1700		1705	1710
Thr Ala	Asp Val His Pro Glu	Pro Ala Gly Ile Ala	Asp Leu Ala
1715		1720	1725
Ala Asp	Val His Pro Glu Pro	Ala Asp His Val Asp	Leu Glu Asn
1730		1735	1740
Pro Ile	Pro Pro Pro Arg Pro	Lys Arg Ala Ala Tyr	Leu Ala Ser
1745		1750	1755
Arg Ala	Ala Glu Arg Pro Val	Pro Ala Pro Arg Lys	Pro Thr Pro
1760		1765	1770
Ala Pro	Arg Thr Ala Phe Arg	Asn Lys Leu Pro Leu	Thr Phe Gly
1775		1780	1785
Asp Phe	Asp Glu His Glu Val	Asp Ala Leu Ala Ser	Gly Ile Thr
1790		1795	1800

	Phe	Gly	Asp	Phe	Asp	Asp	Val	Leu	Arg	Leu	Gly	Arg	Ala	Gly	Ala
	1805						1810					1815			
	Tyr	Ile	Phe	Ser	Ser	Asp	Thr	Gly	Ser	Gly	His	Leu	Gln	Gln	Lys
	1820						1825					1830			
	Ser	Val	Arg	Gln	His	Asn	Leu	Gln	Cys	Ala	Gln	Leu	Asp	Ala	Val
	1835						1840					1845			
	Glu	Glu	Glu	Lys	Met	Tyr	Pro	Pro	Lys	Leu	Asp	Thr	Glu	Arg	Glu
	1850						1855					1860			
	Lys	Leu	Leu	Leu	Leu	Lys	Met	Gln	Met	His	Pro	Ser	Glu	Ala	Asn
	1865						1870					1875			
	Lys	Ser	Arg	Tyr	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Glu	Asn	Met	Lys	Ala	Thr
	1880						1885					1890			
	Val	Val	Asp	Arg	Leu	Thr	Ser	Gly	Ala	Arg	Leu	Tyr	Thr	Gly	Ala
	1895						1900					1905			
	Asp	Val	Gly	Arg	Ile	Pro	Thr	Tyr	Ala	Val	Arg	Tyr	Pro	Arg	Pro
	1910						1915					1920			
	Val	Tyr	Ser	Pro	Thr	Val	Ile	Glu	Arg	Phe	Ser	Ser	Pro	Asp	Val
	1925						1930					1935			
	Ala	Ile	Ala	Ala	Cys	Asn	Glu	Tyr	Leu	Ser	Arg	Asn	Tyr	Pro	Thr
	1940						1945					1950			
[0007]	Val	Ala	Ser	Tyr	Gln	Ile	Thr	Asp	Glu	Tyr	Asp	Ala	Tyr	Leu	Asp
	1955						1960					1965			
	Met	Val	Asp	Gly	Ser	Asp	Ser	Cys	Leu	Asp	Arg	Ala	Thr	Phe	Cys
	1970						1975					1980			
	Pro	Ala	Lys	Leu	Arg	Cys	Tyr	Pro	Lys	His	His	Ala	Tyr	His	Gln
	1985						1990					1995			
	Pro	Thr	Val	Arg	Ser	Ala	Val	Pro	Ser	Pro	Phe	Gln	Asn	Thr	Leu
	2000						2005					2010			
	Gln	Asn	Val	Leu	Ala	Ala	Ala	Thr	Lys	Arg	Asn	Cys	Asn	Val	Thr
	2015						2020					2025			
	Gln	Met	Arg	Glu	Leu	Pro	Thr	Met	Asp	Ser	Ala	Val	Phe	Asn	Val
	2030						2035					2040			
	Glu	Cys	Phe	Lys	Arg	Tyr	Ala	Cys	Ser	Gly	Glu	Tyr	Trp	Glu	Glu
	2045						2050					2055			
	Tyr	Ala	Lys	Gln	Pro	Ile	Arg	Ile	Thr	Thr	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr
	2060						2065					2070			
	Tyr	Val	Thr	Lys	Leu	Lys	Gly	Pro	Lys	Ala	Ala	Ala	Leu	Phe	Ala
	2075						2080					2085			
	Lys	Thr	His	Asn	Leu	Val	Pro	Leu	Gln	Glu	Val	Pro	Met	Asp	Arg
	2090						2095					2100			
	Phe	Thr	Val	Asp	Met	Lys	Arg	Asp	Val	Lys	Val	Thr	Pro	Gly	Thr

2105	2110	2115
Lys His Thr Glu Glu Arg Pro 2120	Lys Val Gln Val 2125	Ile Gln Ala Ala 2130
Glu Pro Leu Ala Thr Ala Tyr 2135	Leu Cys Gly Ile 2140	His Arg Glu Leu 2145
Val Arg Arg Leu Asn Ala Val 2150	Leu Arg Pro Asn 2155	Val His Thr Leu 2160
Phe Asp Met Ser Ala Glu Asp 2165	Phe Asp Ala Ile 2170	Ile Ala Ser His 2175
Phe His Pro Gly Asp Pro Val 2180	Leu Glu Thr Asp 2185	Ile Ala Ser Phe 2190
Asp Lys Ser Gln Asp Asp Ser 2195	Leu Ala Leu Thr 2200	Gly Leu Met Ile 2205
Leu Glu Asp Leu Gly Val 2210	Asp Gln Tyr Leu Leu 2215	Asp Leu Ile Glu 2220
Ala Ala Phe Gly Glu Ile Ser 2225	Ser Cys His Leu 2230	Pro Thr Gly Thr 2235
Arg Phe Lys Phe Gly Ala 2240	Met Met Lys Ser Gly 2245	Met Phe Leu Thr 2250
Leu Phe Ile Asn Thr Val 2255	Leu Asn Ile Thr Ile 2260	Ala Ser Arg Val 2265
Leu Glu Gln Arg Leu Thr 2270	Asp Ser Ala Cys Ala 2275	Ala Phe Ile Gly 2280
Asp Asp Asn Ile Val His 2285	Gly Val Ile Ser Asp 2290	Lys Leu Met Ala 2295
Glu Arg Cys Ala Ser Trp 2300	Val Asn Met Glu Val 2305	Lys Ile Ile Asp 2310
Ala Val Met Gly Glu Lys 2315	Pro Pro Tyr Phe Cys 2320	Gly Gly Phe Ile 2325
Val Phe Asp Ser Val Thr 2330	Gln Thr Ala Cys Arg 2335	Val Ser Asp Pro 2340
Leu Lys Arg Leu Phe Lys 2345	Leu Gly Lys Pro Leu 2350	Thr Ala Glu Asp 2355
Lys Gln Asp Glu Asp Arg 2360	Arg Arg Ala Leu Ser 2365	Asp Glu Val Ser 2370
Lys Trp Phe Arg Thr Gly 2375	Leu Gly Ala Glu Leu 2380	Glu Val Ala Leu 2385
Thr Ser Arg Tyr Glu Val 2390	Glu Gly Cys Lys Ser 2395	Ile Leu Ile Ala 2400
Met Ala Thr Leu Ala Arg 2405	Asp Ile Lys Ala Phe 2410	Lys Lys Leu Arg 2415

[0008]

Gly Pro Val Ile His Leu Tyr Gly Gly Pro Arg Leu Val Arg
 2420 2425 2430

<210> 2
 <211> 2432
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 在1185-1187位点具有RDR突变的SFV复制酶的氨基酸序列

<400> 2

Met Ala Ala Lys Val His Val Asp Ile Glu Ala Asp Ser Pro Phe Ile
 1 5 10 15

Lys Ser Leu Gln Lys Ala Phe Pro Ser Phe Glu Val Glu Ser Leu Gln
 20 25 30

Val Thr Pro Asn Asp His Ala Asn Ala Arg Ala Phe Ser His Leu Ala
 35 40 45

Thr Lys Leu Ile Glu Gln Glu Thr Asp Lys Asp Thr Leu Ile Leu Asp
 50 55 60

Ile Gly Ser Ala Pro Ser Arg Arg Met Met Ser Thr His Lys Tyr His
 65 70 75 80

Cys Val Cys Pro Met Arg Ser Ala Glu Asp Pro Glu Arg Leu Val Cys
 85 90 95

Tyr Ala Lys Lys Leu Ala Ala Ala Ser Gly Lys Val Leu Asp Arg Glu
 100 105 110

[0009]

Ile Ala Gly Lys Ile Thr Asp Leu Gln Thr Val Met Ala Thr Pro Asp
 115 120 125

Ala Glu Ser Pro Thr Phe Cys Leu His Thr Asp Val Thr Cys Arg Thr
 130 135 140

Ala Ala Glu Val Ala Val Tyr Gln Asp Val Tyr Ala Val His Ala Pro
 145 150 155 160

Thr Ser Leu Tyr His Gln Ala Met Lys Gly Val Arg Thr Ala Tyr Trp
 165 170 175

Ile Gly Phe Asp Thr Thr Pro Phe Met Phe Asp Ala Leu Ala Gly Ala
 180 185 190

Tyr Pro Thr Tyr Ala Thr Asn Trp Ala Asp Glu Gln Val Leu Gln Ala
 195 200 205

Arg Asn Ile Gly Leu Cys Ala Ala Ser Leu Thr Glu Gly Arg Leu Gly
 210 215 220

Lys Leu Ser Ile Leu Arg Lys Lys Gln Leu Lys Pro Cys Asp Thr Val
 225 230 235 240

Met Phe Ser Val Gly Ser Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Arg Lys Leu Leu
 245 250 255

Arg Ser Trp His Leu Pro Ser Val Phe His Leu Lys Gly Lys Gln Ser

	260	265	270
	Phe Thr Cys Arg Cys Asp Thr 275	Ile Val Ser Cys Glu Gly Tyr Val Val 280	
	Lys Lys Ile Thr Met Cys Pro 290	Gly Leu Tyr Gly Lys Thr Val Gly Tyr 300	
	Ala Val Thr Tyr His Ala Glu Gly Phe Leu Val Cys Lys Thr Thr Asp 305	310	315 320
	Thr Val Lys Gly Glu Arg Val Ser Phe Pro Val Cys Thr Tyr Val Pro 325	330	335
	Ser Thr Ile Cys Asp Gln Met Thr Gly Ile Leu Ala Thr Asp Val Thr 340	345	350
	Pro Glu Asp Ala Gln Lys Leu Leu Val Gly Leu Asn Gln Arg Ile Val 355	360	365
	Val Asn Gly Arg Thr Gln Arg Asn Thr Asn Thr Met Lys Asn Tyr Leu 370	375	380
	Leu Pro Ile Val Ala Val Ala Phe Ser Lys Trp Ala Arg Glu Tyr Lys 385	390	395 400
	Ala Asp Leu Asp Asp Glu Lys Pro Leu Gly Val Arg Glu Arg Ser Leu 405	410	415
[0010]	Thr Cys Cys Cys Leu Trp Ala Phe Lys Thr Arg Lys Met His Thr Met 420	425	430
	Tyr Lys Lys Pro Asp Thr Gln Thr Ile Val Lys Val Pro Ser Glu Phe 435	440	445
	Asn Ser Phe Val Ile Pro Ser Leu Trp Ser Thr Gly Leu Ala Ile Pro 450	455	460
	Val Arg Ser Arg Ile Lys Met Leu Leu Ala Lys Lys Thr Lys Arg Glu 465	470	475 480
	Leu Ile Pro Val Leu Asp Ala Ser Ser Ala Arg Asp Ala Glu Gln Glu 485	490	495
	Glu Lys Glu Arg Leu Glu Ala Glu Leu Thr Arg Glu Ala Leu Pro Pro 500	505	510
	Leu Val Pro Ile Ala Pro Ala Glu Thr Gly Val Val Asp Val Asp Val 515	520	525
	Glu Glu Leu Glu Tyr His Ala Gly Ala Gly Val Val Glu Thr Pro Arg 530	535	540
	Ser Ala Leu Lys Val Thr Ala Gln Pro Asn Asp Val Leu Leu Gly Asn 545	550	555 560
	Tyr Val Val Leu Ser Pro Gln Thr Val Leu Lys Ser Ser Lys Leu Ala 565	570	575
	Pro Val His Pro Leu Ala Glu Gln Val Lys Ile Ile Thr His Asn Gly 580	585	590

[0011]

Arg Ala Gly Arg Tyr Gln Val Asp Gly Tyr Asp Gly Arg Val Leu Leu
 595 600 605
 Pro Cys Gly Ser Ala Ile Pro Val Pro Glu Phe Gln Ala Leu Ser Glu
 610 615 620
 Ser Ala Thr Met Val Tyr Asn Glu Arg Glu Phe Val Asn Arg Lys Leu
 625 630 635 640
 Tyr His Ile Ala Val His Gly Pro Ser Leu Asn Thr Asp Glu Glu Asn
 645 650 655
 Tyr Glu Lys Val Arg Ala Glu Arg Thr Asp Ala Glu Tyr Val Phe Asp
 660 665 670
 Val Asp Lys Lys Cys Cys Val Lys Arg Glu Glu Ala Ser Gly Leu Val
 675 680 685
 Leu Val Gly Glu Leu Thr Asn Pro Pro Phe His Glu Phe Ala Tyr Glu
 690 695 700
 Gly Leu Lys Ile Arg Pro Ser Ala Pro Tyr Lys Thr Thr Val Val Gly
 705 710 715 720
 Val Phe Gly Val Pro Gly Ser Gly Lys Ser Ala Ile Ile Lys Ser Leu
 725 730 735
 Val Thr Lys His Asp Leu Val Thr Ser Gly Lys Lys Glu Asn Cys Gln
 740 745 750
 Glu Ile Val Asn Asp Val Lys Lys His Arg Gly Leu Asp Ile Gln Ala
 755 760 765
 Lys Thr Val Asp Ser Ile Leu Leu Asn Gly Cys Arg Arg Ala Val Asp
 770 775 780
 Ile Leu Tyr Val Asp Glu Ala Phe Ala Cys His Ser Gly Thr Leu Leu
 785 790 795 800
 Ala Leu Ile Ala Leu Val Lys Pro Arg Ser Lys Val Val Leu Cys Gly
 805 810 815
 Asp Pro Lys Gln Cys Gly Phe Phe Asn Met Met Gln Leu Lys Val Asn
 820 825 830
 Phe Asn His Asn Ile Cys Thr Glu Val Cys His Lys Ser Ile Ser Arg
 835 840 845
 Arg Cys Thr Arg Pro Val Thr Ala Ile Val Ser Thr Leu His Tyr Gly
 850 855 860
 Gly Lys Met Arg Thr Thr Asn Pro Cys Asn Lys Pro Ile Ile Ile Asp
 865 870 875 880
 Thr Thr Gly Gln Thr Lys Pro Lys Pro Gly Asp Ile Val Leu Thr Cys
 885 890 895
 Phe Arg Gly Trp Val Lys Gln Leu Gln Leu Asp Tyr Arg Gly His Glu
 900 905 910

[0012]

Val Met Thr Ala Ala Ala Ser Gln Gly Leu Thr Arg Lys Gly Val Tyr	915	920	925
Ala Val Arg Gln Lys Val Asn Glu Asn Pro Leu Tyr Ala Pro Ala Ser	930	935	940
Glu His Val Asn Val Leu Leu Thr Arg Thr Glu Asp Arg Leu Val Trp	945	950	955
Lys Thr Leu Ala Gly Asp Pro Trp Ile Lys Val Leu Ser Asn Ile Pro	965	970	975
Gln Gly Asn Phe Thr Ala Thr Leu Glu Glu Trp Gln Glu Glu His Asp	980	985	990
Lys Ile Met Lys Val Ile Glu Gly Pro Ala Ala Pro Val Asp Ala Phe	995	1000	1005
Gln Asn Lys Ala Asn Val Cys Trp Ala Lys Ser Leu Val Pro Val	1010	1015	1020
Leu Asp Thr Ala Gly Ile Arg Leu Thr Ala Glu Glu Trp Ser Thr	1025	1030	1035
Ile Ile Thr Ala Phe Lys Glu Asp Arg Ala Tyr Ser Pro Val Val	1040	1045	1050
Ala Leu Asn Glu Ile Cys Thr Lys Tyr Tyr Gly Val Asp Leu Asp	1055	1060	1065
Ser Gly Leu Phe Ser Ala Pro Lys Val Ser Leu Tyr Tyr Glu Asn	1070	1075	1080
Asn His Trp Asp Asn Arg Pro Gly Gly Arg Met Tyr Gly Phe Asn	1085	1090	1095
Ala Ala Thr Ala Ala Arg Leu Glu Ala Arg His Thr Phe Leu Lys	1100	1105	1110
Gly Gln Trp His Thr Gly Lys Gln Ala Val Ile Ala Glu Arg Lys	1115	1120	1125
Ile Gln Pro Leu Ser Val Leu Asp Asn Val Ile Pro Ile Asn Arg	1130	1135	1140
Arg Leu Pro His Ala Leu Val Ala Glu Tyr Lys Thr Val Lys Gly	1145	1150	1155
Ser Arg Val Glu Trp Leu Val Asn Lys Val Arg Gly Tyr His Val	1160	1165	1170
Leu Leu Val Ser Glu Tyr Asn Leu Ala Leu Pro Arg Asp Arg Val	1175	1180	1185
Thr Trp Leu Ser Pro Leu Asn Val Thr Gly Ala Asp Arg Cys Tyr	1190	1195	1200
Asp Leu Ser Leu Gly Leu Pro Ala Asp Ala Gly Arg Phe Asp Leu	1205	1210	1215

[0013]

Val Phe 1220	Val Asn Ile His Thr 1225	Glu Phe Arg Ile His 1230	His Tyr Gln
Gln Cys 1235	Val Asp His Ala Met 1240	Lys Leu Gln Met Leu 1245	Gly Gly Asp
Ala Leu 1250	Arg Leu Leu Lys Pro 1255	Gly Gly Ser Leu Leu 1260	Met Arg Ala
Tyr Gly 1265	Tyr Ala Asp Lys Ile 1270	Ser Glu Ala Val Val 1275	Ser Ser Leu
Ser Arg 1280	Lys Phe Ser Ser Ala 1285	Arg Val Leu Arg Pro 1290	Asp Cys Val
Thr Ser 1295	Asn Thr Glu Val Phe 1300	Leu Leu Phe Ser Asn 1305	Phe Asp Asn
Gly Lys 1310	Arg Pro Ser Thr Leu 1315	His Gln Met Asn Thr 1320	Lys Leu Ser
Ala Val 1325	Tyr Ala Gly Glu Ala 1330	Met His Thr Ala Gly 1335	Cys Ala Pro
Ser Tyr 1340	Arg Val Lys Arg Ala 1345	Asp Ile Ala Thr Cys 1350	Thr Glu Ala
Ala Val 1355	Val Asn Ala Ala Asn 1360	Ala Arg Gly Thr Val 1365	Gly Asp Gly
Val Cys 1370	Arg Ala Val Ala Lys 1375	Lys Trp Pro Ser Ala 1380	Phe Lys Gly
Glu Ala 1385	Thr Pro Val Gly Thr 1390	Ile Lys Thr Val Met 1395	Cys Gly Ser
Tyr Pro 1400	Val Ile His Ala Val 1405	Ala Pro Asn Phe Ser 1410	Ala Thr Thr
Glu Ala 1415	Glu Gly Asp Arg Glu 1420	Leu Ala Ala Val Tyr 1425	Arg Ala Val
Ala Ala 1430	Glu Val Asn Arg Leu 1435	Ser Leu Ser Ser Val 1440	Ala Ile Pro
Leu Leu 1445	Ser Thr Gly Val Phe 1450	Ser Gly Gly Arg Asp 1455	Arg Leu Gln
Gln Ser 1460	Leu Asn His Leu Phe 1465	Thr Ala Met Asp Ala 1470	Thr Asp Ala
Asp Val 1475	Thr Ile Tyr Cys Arg 1480	Asp Lys Ser Trp Glu 1485	Lys Lys Ile
Gln Glu 1490	Ala Ile Asp Met Arg 1495	Thr Ala Val Glu Leu 1500	Leu Asn Asp
Asp Val 1505	Glu Leu Thr Thr Asp 1510	Leu Val Arg Val His 1515	Pro Asp Ser
Ser Leu	Val Gly Arg Lys Gly	Tyr Ser Thr Thr Asp	Gly Ser Leu

1520	1525	1530
Tyr Ser 1535	Tyr Phe Glu Gly Thr 1540	Lys Phe Asn Gln Ala Ala Ile Asp 1545
Met Ala 1550	Glu Ile Leu Thr Leu 1555	Trp Pro Arg Leu Gln Glu Ala Asn 1560
Glu Gln 1565	Ile Cys Leu Tyr Ala 1570	Leu Gly Glu Thr Met Asp Asn Ile 1575
Arg Ser 1580	Lys Cys Pro Val Asn 1585	Asp Ser Asp Ser Ser Thr Pro Pro 1590
Arg Thr 1595	Val Pro Cys Leu Cys 1600	Arg Tyr Ala Met Thr Ala Glu Arg 1605
Ile Ala 1610	Arg Leu Arg Ser His 1615	Gln Val Lys Ser Met Val Val Cys 1620
Ser Ser 1625	Phe Pro Leu Pro Lys 1630	Tyr His Val Asp Gly Val Gln Lys 1635
Val Lys 1640	Cys Glu Lys Val Leu 1645	Leu Phe Asp Pro Thr Val Pro Ser 1650
Val Val 1655	Ser Pro Arg Lys Tyr 1660	Ala Ala Ser Thr Thr Asp His Ser 1665
[0014] Asp Arg 1670	Ser Leu Arg Gly Phe 1675	Asp Leu Asp Trp Thr Thr Asp Ser 1680
Ser Ser 1685	Thr Ala Ser Asp Thr 1690	Met Ser Leu Pro Ser Leu Gln Ser 1695
Cys Asp 1700	Ile Asp Ser Ile Tyr 1705	Glu Pro Met Ala Pro Ile Val Val 1710
Thr Ala 1715	Asp Val His Pro Glu 1720	Pro Ala Gly Ile Ala Asp Leu Ala 1725
Ala Asp 1730	Val His Pro Glu Pro 1735	Ala Asp His Val Asp Leu Glu Asn 1740
Pro Ile 1745	Pro Pro Pro Arg Pro 1750	Lys Arg Ala Ala Tyr Leu Ala Ser 1755
Arg Ala 1760	Ala Glu Arg Pro Val 1765	Pro Ala Pro Arg Lys Pro Thr Pro 1770
Ala Pro 1775	Arg Thr Ala Phe Arg 1780	Asn Lys Leu Pro Leu Thr Phe Gly 1785
Asp Phe 1790	Asp Glu His Glu Val 1795	Asp Ala Leu Ala Ser Gly Ile Thr 1800
Phe Gly 1805	Asp Phe Asp Asp Val 1810	Leu Arg Leu Gly Arg Ala Gly Ala 1815
Tyr Ile 1820	Phe Ser Ser Asp Thr 1825	Gly Ser Gly His Leu Gln Gln Lys 1830

[0015]

Ser Val 1835	Arg Gln His Asn 1840	Leu Gln Cys Ala Gln 1845	Leu Asp Ala Val 1845
Glu Glu 1850	Glu Lys Met Tyr 1855	Pro Pro Lys Leu Asp 1860	Thr Glu Arg Glu 1860
Lys Leu 1865	Leu Leu Leu Lys 1870	Met Gln Met His Pro 1875	Ser Glu Ala Asn 1875
Lys Ser 1880	Arg Tyr Gln Ser 1885	Arg Lys Val Glu Asn 1890	Met Lys Ala Thr 1890
Val Val 1895	Asp Arg Leu Thr 1900	Ser Gly Ala Arg Leu 1905	Tyr Thr Gly Ala 1905
Asp Val 1910	Gly Arg Ile Pro 1915	Thr Tyr Ala Val Arg 1920	Tyr Pro Arg Pro 1920
Val Tyr 1925	Ser Pro Thr Val 1930	Ile Glu Arg Phe Ser 1935	Ser Pro Asp Val 1935
Ala Ile 1940	Ala Ala Cys Asn 1945	Glu Tyr Leu Ser Arg 1950	Asn Tyr Pro Thr 1950
Val Ala 1955	Ser Tyr Gln Ile 1960	Thr Asp Glu Tyr Asp 1965	Ala Tyr Leu Asp 1965
Met Val 1970	Asp Gly Ser Asp 1975	Ser Cys Leu Asp Arg 1980	Ala Thr Phe Cys 1980
Pro Ala 1985	Lys Leu Arg Cys 1990	Tyr Pro Lys His His 1995	Ala Tyr His Gln 1995
Pro Thr 2000	Val Arg Ser Ala 2005	Val Pro Ser Pro Phe 2010	Gln Asn Thr Leu 2010
Gln Asn 2015	Val Leu Ala Ala 2020	Ala Thr Lys Arg Asn 2025	Cys Asn Val Thr 2025
Gln Met 2030	Arg Glu Leu Pro 2035	Thr Met Asp Ser Ala 2040	Val Phe Asn Val 2040
Glu Cys 2045	Phe Lys Arg Tyr 2050	Ala Cys Ser Gly Glu 2055	Tyr Trp Glu Glu 2055
Tyr Ala 2060	Lys Gln Pro Ile 2065	Arg Ile Thr Thr Glu 2070	Asn Ile Thr Thr 2070
Tyr Val 2075	Thr Lys Leu Lys 2080	Gly Pro Lys Ala Ala 2085	Ala Leu Phe Ala 2085
Lys Thr 2090	His Asn Leu Val 2095	Pro Leu Gln Glu Val 2100	Pro Met Asp Arg 2100
Phe Thr 2105	Val Asp Met Lys 2110	Arg Asp Val Lys Val 2115	Thr Pro Gly Thr 2115
Lys His 2120	Thr Glu Glu Arg 2125	Pro Lys Val Gln Val 2130	Ile Gln Ala Ala 2130

Glu Pro	Leu Ala Thr Ala Tyr	Leu Cys Gly Ile His	Arg Glu Leu
2135	2140	2145	
Val Arg	Arg Leu Asn Ala Val	Leu Arg Pro Asn Val	His Thr Leu
2150	2155	2160	
Phe Asp	Met Ser Ala Glu Asp	Phe Asp Ala Ile Ile	Ala Ser His
2165	2170	2175	
Phe His	Pro Gly Asp Pro Val	Leu Glu Thr Asp Ile	Ala Ser Phe
2180	2185	2190	
Asp Lys	Ser Gln Asp Asp Ser	Leu Ala Leu Thr Gly	Leu Met Ile
2195	2200	2205	
Leu Glu	Asp Leu Gly Val Asp	Gln Tyr Leu Leu Asp	Leu Ile Glu
2210	2215	2220	
Ala Ala	Phe Gly Glu Ile Ser	Ser Cys His Leu Pro	Thr Gly Thr
2225	2230	2235	
Arg Phe	Lys Phe Gly Ala Met	Met Lys Ser Gly Met	Phe Leu Thr
2240	2245	2250	
Leu Phe	Ile Asn Thr Val Leu	Asn Ile Thr Ile Ala	Ser Arg Val
2255	2260	2265	
Leu Glu	Gln Arg Leu Thr Asp	Ser Ala Cys Ala Ala	Phe Ile Gly
2270	2275	2280	
Asp Asp	Asn Ile Val His Gly	Val Ile Ser Asp Lys	Leu Met Ala
2285	2290	2295	
Glu Arg	Cys Ala Ser Trp Val	Asn Met Glu Val Lys	Ile Ile Asp
2300	2305	2310	
Ala Val	Met Gly Glu Lys Pro	Pro Tyr Phe Cys Gly	Gly Phe Ile
2315	2320	2325	
Val Phe	Asp Ser Val Thr Gln	Thr Ala Cys Arg Val	Ser Asp Pro
2330	2335	2340	
Leu Lys	Arg Leu Phe Lys Leu	Gly Lys Pro Leu Thr	Ala Glu Asp
2345	2350	2355	
Lys Gln	Asp Glu Asp Arg Arg	Arg Ala Leu Ser Asp	Glu Val Ser
2360	2365	2370	
Lys Trp	Phe Arg Thr Gly Leu	Gly Ala Glu Leu Glu	Val Ala Leu
2375	2380	2385	
Thr Ser	Arg Tyr Glu Val Glu	Gly Cys Lys Ser Ile	Leu Ile Ala
2390	2395	2400	
Met Ala	Thr Leu Ala Arg Asp	Ile Lys Ala Phe Lys	Lys Leu Arg
2405	2410	2415	
Gly Pro	Val Ile His Leu Tyr	Gly Gly Pro Arg Leu	Val Arg
2420	2425	2430	

[0016]

<210> 3
 <211> 2432
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 在1185-1187位点具有AAA突变的SFV复制酶的氨基酸序列

 <400> 3

 Met Ala Ala Lys Val His Val Asp Ile Glu Ala Asp Ser Pro Phe Ile
 1 5 10 15

 Lys Ser Leu Gln Lys Ala Phe Pro Ser Phe Glu Val Glu Ser Leu Gln
 20 25 30

 Val Thr Pro Asn Asp His Ala Asn Ala Arg Ala Phe Ser His Leu Ala
 35 40 45

 Thr Lys Leu Ile Glu Gln Glu Thr Asp Lys Asp Thr Leu Ile Leu Asp
 50 55 60

 Ile Gly Ser Ala Pro Ser Arg Arg Met Met Ser Thr His Lys Tyr His
 65 70 75 80

 Cys Val Cys Pro Met Arg Ser Ala Glu Asp Pro Glu Arg Leu Val Cys
 85 90 95

 Tyr Ala Lys Lys Leu Ala Ala Ala Ser Gly Lys Val Leu Asp Arg Glu
 100 105 110

 Ile Ala Gly Lys Ile Thr Asp Leu Gln Thr Val Met Ala Thr Pro Asp
 115 120 125

 Ala Glu Ser Pro Thr Phe Cys Leu His Thr Asp Val Thr Cys Arg Thr
 130 135 140

 Ala Ala Glu Val Ala Val Tyr Gln Asp Val Tyr Ala Val His Ala Pro
 145 150 155 160

 Thr Ser Leu Tyr His Gln Ala Met Lys Gly Val Arg Thr Ala Tyr Trp
 165 170 175

 Ile Gly Phe Asp Thr Thr Pro Phe Met Phe Asp Ala Leu Ala Gly Ala
 180 185 190

 Tyr Pro Thr Tyr Ala Thr Asn Trp Ala Asp Glu Gln Val Leu Gln Ala
 195 200 205

 Arg Asn Ile Gly Leu Cys Ala Ala Ser Leu Thr Glu Gly Arg Leu Gly
 210 215 220

 Lys Leu Ser Ile Leu Arg Lys Lys Gln Leu Lys Pro Cys Asp Thr Val
 225 230 235 240

 Met Phe Ser Val Gly Ser Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Arg Lys Leu Leu
 245 250 255

 Arg Ser Trp His Leu Pro Ser Val Phe His Leu Lys Gly Lys Gln Ser
 260 265 270

 Phe Thr Cys Arg Cys Asp Thr Ile Val Ser Cys Glu Gly Tyr Val Val
 275 280 285

[0017]

Lys Lys Ile Thr Met Cys Pro Gly Leu Tyr Gly Lys Thr Val Gly Tyr
 290 295 300
 Ala Val Thr Tyr His Ala Glu Gly Phe Leu Val Cys Lys Thr Thr Asp
 305 310 315 320
 Thr Val Lys Gly Glu Arg Val Ser Phe Pro Val Cys Thr Tyr Val Pro
 325 330 335
 Ser Thr Ile Cys Asp Gln Met Thr Gly Ile Leu Ala Thr Asp Val Thr
 340 345 350
 Pro Glu Asp Ala Gln Lys Leu Leu Val Gly Leu Asn Gln Arg Ile Val
 355 360 365
 Val Asn Gly Arg Thr Gln Arg Asn Thr Asn Thr Met Lys Asn Tyr Leu
 370 375 380
 Leu Pro Ile Val Ala Val Ala Phe Ser Lys Trp Ala Arg Glu Tyr Lys
 385 390 395 400
 Ala Asp Leu Asp Asp Glu Lys Pro Leu Gly Val Arg Glu Arg Ser Leu
 405 410 415
 Thr Cys Cys Cys Leu Trp Ala Phe Lys Thr Arg Lys Met His Thr Met
 420 425 430
 Tyr Lys Lys Pro Asp Thr Gln Thr Ile Val Lys Val Pro Ser Glu Phe
 435 440 445
 Asn Ser Phe Val Ile Pro Ser Leu Trp Ser Thr Gly Leu Ala Ile Pro
 450 455 460
 Val Arg Ser Arg Ile Lys Met Leu Leu Ala Lys Lys Thr Lys Arg Glu
 465 470 475 480
 Leu Ile Pro Val Leu Asp Ala Ser Ser Ala Arg Asp Ala Glu Gln Glu
 485 490 495
 Glu Lys Glu Arg Leu Glu Ala Glu Leu Thr Arg Glu Ala Leu Pro Pro
 500 505 510
 Leu Val Pro Ile Ala Pro Ala Glu Thr Gly Val Val Asp Val Asp Val
 515 520 525
 Glu Glu Leu Glu Tyr His Ala Gly Ala Gly Val Val Glu Thr Pro Arg
 530 535 540
 Ser Ala Leu Lys Val Thr Ala Gln Pro Asn Asp Val Leu Leu Gly Asn
 545 550 555 560
 Tyr Val Val Leu Ser Pro Gln Thr Val Leu Lys Ser Ser Lys Leu Ala
 565 570 575
 Pro Val His Pro Leu Ala Glu Gln Val Lys Ile Ile Thr His Asn Gly
 580 585 590
 Arg Ala Gly Arg Tyr Gln Val Asp Gly Tyr Asp Gly Arg Val Leu Leu
 595 600 605

[0018]

Pro Cys Gly Ser Ala Ile Pro Val Pro Glu Phe Gln Ala Leu Ser Glu
 610 615 620
 Ser Ala Thr Met Val Tyr Asn Glu Arg Glu Phe Val Asn Arg Lys Leu
 625 630 635 640
 Tyr His Ile Ala Val His Gly Pro Ser Leu Asn Thr Asp Glu Glu Asn
 645 650 655
 Tyr Glu Lys Val Arg Ala Glu Arg Thr Asp Ala Glu Tyr Val Phe Asp
 660 665 670
 Val Asp Lys Lys Cys Cys Val Lys Arg Glu Glu Ala Ser Gly Leu Val
 675 680 685
 Leu Val Gly Glu Leu Thr Asn Pro Pro Phe His Glu Phe Ala Tyr Glu
 690 695 700
 Gly Leu Lys Ile Arg Pro Ser Ala Pro Tyr Lys Thr Thr Val Val Gly
 705 710 715 720
 Val Phe Gly Val Pro Gly Ser Gly Lys Ser Ala Ile Ile Lys Ser Leu
 725 730 735
 Val Thr Lys His Asp Leu Val Thr Ser Gly Lys Lys Glu Asn Cys Gln
 740 745 750
 Glu Ile Val Asn Asp Val Lys Lys His Arg Gly Leu Asp Ile Gln Ala
 755 760 765
 [0019] Lys Thr Val Asp Ser Ile Leu Leu Asn Gly Cys Arg Arg Ala Val Asp
 770 775 780
 Ile Leu Tyr Val Asp Glu Ala Phe Ala Cys His Ser Gly Thr Leu Leu
 785 790 795 800
 Ala Leu Ile Ala Leu Val Lys Pro Arg Ser Lys Val Val Leu Cys Gly
 805 810 815
 Asp Pro Lys Gln Cys Gly Phe Phe Asn Met Met Gln Leu Lys Val Asn
 820 825 830
 Phe Asn His Asn Ile Cys Thr Glu Val Cys His Lys Ser Ile Ser Arg
 835 840 845
 Arg Cys Thr Arg Pro Val Thr Ala Ile Val Ser Thr Leu His Tyr Gly
 850 855 860
 Gly Lys Met Arg Thr Thr Asn Pro Cys Asn Lys Pro Ile Ile Ile Asp
 865 870 875 880
 Thr Thr Gly Gln Thr Lys Pro Lys Pro Gly Asp Ile Val Leu Thr Cys
 885 890 895
 Phe Arg Gly Trp Val Lys Gln Leu Gln Leu Asp Tyr Arg Gly His Glu
 900 905 910
 Val Met Thr Ala Ala Ala Ser Gln Gly Leu Thr Arg Lys Gly Val Tyr
 915 920 925
 Ala Val Arg Gln Lys Val Asn Glu Asn Pro Leu Tyr Ala Pro Ala Ser

930	935	940
Glu His Val Asn Val 945	Leu Leu Thr Arg Thr 950	Glu Asp Arg Leu Val Trp 955 960
Lys Thr Leu Ala Gly Asp Pro Trp Ile 965	Lys Val Leu Ser Asn Ile Pro 970 975	
Gln Gly Asn Phe Thr Ala Thr Leu Glu Glu Trp Gln Glu Glu His Asp 980 985 990		
Lys Ile Met Lys Val Ile Glu Gly 995	Pro Ala Ala Pro Val 1000 1005	Asp Ala Phe
Gln Asn Lys Ala Asn Val Cys Trp Ala Lys Ser Leu Val Pro Val 1010 1015 1020		
Leu Asp Thr Ala Gly Ile Arg Leu Thr Ala Glu Glu Trp Ser Thr 1025 1030 1035		
Ile Ile Thr Ala Phe Lys Glu Asp Arg Ala Tyr Ser Pro Val Val 1040 1045 1050		
Ala Leu Asn Glu Ile Cys Thr Lys Tyr Tyr Gly Val Asp Leu Asp 1055 1060 1065		
Ser Gly Leu Phe Ser Ala Pro Lys Val Ser Leu Tyr Tyr Glu Asn 1070 1075 1080		
Asn His Trp Asp Asn Arg Pro Gly Gly Arg Met Tyr Gly Phe Asn 1085 1090 1095		
Ala Ala Thr Ala Ala Arg Leu Glu Ala Arg His Thr Phe Leu Lys 1100 1105 1110		
Gly Gln Trp His Thr Gly Lys Gln Ala Val Ile Ala Glu Arg Lys 1115 1120 1125		
Ile Gln Pro Leu Ser Val Leu Asp Asn Val Ile Pro Ile Asn Arg 1130 1135 1140		
Arg Leu Pro His Ala Leu Val Ala Glu Tyr Lys Thr Val Lys Gly 1145 1150 1155		
Ser Arg Val Glu Trp Leu Val Asn Lys Val Arg Gly Tyr His Val 1160 1165 1170		
Leu Leu Val Ser Glu Tyr Asn Leu Ala Leu Pro Ala Ala Ala Val 1175 1180 1185		
Thr Trp Leu Ser Pro Leu Asn Val Thr Gly Ala Asp Arg Cys Tyr 1190 1195 1200		
Asp Leu Ser Leu Gly Leu Pro Ala Asp Ala Gly Arg Phe Asp Leu 1205 1210 1215		
Val Phe Val Asn Ile His Thr Glu Phe Arg Ile His His Tyr Gln 1220 1225 1230		
Gln Cys Val Asp His Ala Met Lys Leu Gln Met Leu Gly Gly Asp 1235 1240 1245		

[0020]

[0021]

Ala Leu	Arg Leu Leu Lys	Pro Gly Gly Ser Leu Leu	Met Arg Ala
1250		1255	1260
Tyr Gly	Tyr Ala Asp Lys	Ile Ser Glu Ala Val Val	Ser Ser Leu
1265		1270	1275
Ser Arg	Lys Phe Ser Ser	Ala Arg Val Leu Arg	Pro Asp Cys Val
1280		1285	1290
Thr Ser	Asn Thr Glu Val	Phe Leu Leu Phe Ser	Asn Phe Asp Asn
1295		1300	1305
Gly Lys	Arg Pro Ser Thr	Leu His Gln Met Asn Thr	Lys Leu Ser
1310		1315	1320
Ala Val	Tyr Ala Gly Glu	Ala Met His Thr Ala Gly	Cys Ala Pro
1325		1330	1335
Ser Tyr	Arg Val Lys Arg	Ala Asp Ile Ala Thr	Cys Thr Glu Ala
1340		1345	1350
Ala Val	Val Asn Ala Ala	Asn Ala Arg Gly Thr	Val Gly Asp Gly
1355		1360	1365
Val Cys	Arg Ala Val Ala	Lys Lys Trp Pro Ser	Ala Phe Lys Gly
1370		1375	1380
Glu Ala	Thr Pro Val Gly	Thr Ile Lys Thr Val	Met Cys Gly Ser
1385		1390	1395
Tyr Pro	Val Ile His Ala	Val Ala Pro Asn Phe	Ser Ala Thr Thr
1400		1405	1410
Glu Ala	Glu Gly Asp Arg	Glu Leu Ala Ala Val	Tyr Arg Ala Val
1415		1420	1425
Ala Ala	Glu Val Asn Arg	Leu Ser Leu Ser Ser	Val Ala Ile Pro
1430		1435	1440
Leu Leu	Ser Thr Gly Val	Phe Ser Gly Gly Arg	Asp Arg Leu Gln
1445		1450	1455
Gln Ser	Leu Asn His Leu	Phe Thr Ala Met Asp	Ala Thr Asp Ala
1460		1465	1470
Asp Val	Thr Ile Tyr Cys	Arg Asp Lys Ser Trp	Glu Lys Lys Ile
1475		1480	1485
Gln Glu	Ala Ile Asp Met	Arg Thr Ala Val Glu	Leu Leu Asn Asp
1490		1495	1500
Asp Val	Glu Leu Thr Thr	Asp Leu Val Arg Val	His Pro Asp Ser
1505		1510	1515
Ser Leu	Val Gly Arg Lys	Gly Tyr Ser Thr Thr	Asp Gly Ser Leu
1520		1525	1530
Tyr Ser	Tyr Phe Glu Gly	Thr Lys Phe Asn Gln	Ala Ala Ile Asp
1535		1540	1545

[0022]

Met Ala	Glu Ile Leu Thr	Leu	Trp Pro Arg Leu	Gln	Glu Ala Asn
1550		1555		1560	
Glu Gln	Ile Cys Leu Tyr	Ala	Leu Gly Glu Thr	Met	Asp Asn Ile
1565		1570		1575	
Arg Ser	Lys Cys Pro Val	Asn	Asp Ser Asp Ser	Ser	Thr Pro Pro
1580		1585		1590	
Arg Thr	Val Pro Cys Leu	Cys	Arg Tyr Ala Met	Thr	Ala Glu Arg
1595		1600		1605	
Ile Ala	Arg Leu Arg Ser	His	Gln Val Lys Ser	Met	Val Val Cys
1610		1615		1620	
Ser Ser	Phe Pro Leu Pro	Lys	Tyr His Val Asp	Gly	Val Gln Lys
1625		1630		1635	
Val Lys	Cys Glu Lys Val	Leu	Leu Phe Asp Pro	Thr	Val Pro Ser
1640		1645		1650	
Val Val	Ser Pro Arg Lys	Tyr	Ala Ala Ser Thr	Thr	Asp His Ser
1655		1660		1665	
Asp Arg	Ser Leu Arg Gly	Phe	Asp Leu Asp Trp	Thr	Thr Asp Ser
1670		1675		1680	
Ser Ser	Thr Ala Ser Asp	Thr	Met Ser Leu Pro	Ser	Leu Gln Ser
1685		1690		1695	
Cys Asp	Ile Asp Ser Ile	Tyr	Glu Pro Met Ala	Pro	Ile Val Val
1700		1705		1710	
Thr Ala	Asp Val His Pro	Glu	Pro Ala Gly Ile	Ala	Asp Leu Ala
1715		1720		1725	
Ala Asp	Val His Pro Glu	Pro	Ala Asp His Val	Asp	Leu Glu Asn
1730		1735		1740	
Pro Ile	Pro Pro Pro Arg	Pro	Lys Arg Ala Ala	Tyr	Leu Ala Ser
1745		1750		1755	
Arg Ala	Ala Glu Arg Pro	Val	Pro Ala Pro Arg	Lys	Pro Thr Pro
1760		1765		1770	
Ala Pro	Arg Thr Ala Phe	Arg	Asn Lys Leu Pro	Leu	Thr Phe Gly
1775		1780		1785	
Asp Phe	Asp Glu His Glu	Val	Asp Ala Leu Ala	Ser	Gly Ile Thr
1790		1795		1800	
Phe Gly	Asp Phe Asp Asp	Val	Leu Arg Leu Gly	Arg	Ala Gly Ala
1805		1810		1815	
Tyr Ile	Phe Ser Ser Asp	Thr	Gly Ser Gly His	Leu	Gln Gln Lys
1820		1825		1830	
Ser Val	Arg Gln His Asn	Leu	Gln Cys Ala Gln	Leu	Asp Ala Val
1835		1840		1845	

	Glu	Glu	Glu	Lys	Met	Tyr	Pro	Pro	Lys	Leu	Asp	Thr	Glu	Arg	Glu
	1850						1855					1860			
	Lys	Leu	Leu	Leu	Leu	Lys	Met	Gln	Met	His	Pro	Ser	Glu	Ala	Asn
	1865						1870					1875			
	Lys	Ser	Arg	Tyr	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Glu	Asn	Met	Lys	Ala	Thr
	1880						1885					1890			
	Val	Val	Asp	Arg	Leu	Thr	Ser	Gly	Ala	Arg	Leu	Tyr	Thr	Gly	Ala
	1895						1900					1905			
	Asp	Val	Gly	Arg	Ile	Pro	Thr	Tyr	Ala	Val	Arg	Tyr	Pro	Arg	Pro
	1910						1915					1920			
	Val	Tyr	Ser	Pro	Thr	Val	Ile	Glu	Arg	Phe	Ser	Ser	Pro	Asp	Val
	1925						1930					1935			
	Ala	Ile	Ala	Ala	Cys	Asn	Glu	Tyr	Leu	Ser	Arg	Asn	Tyr	Pro	Thr
	1940						1945					1950			
	Val	Ala	Ser	Tyr	Gln	Ile	Thr	Asp	Glu	Tyr	Asp	Ala	Tyr	Leu	Asp
	1955						1960					1965			
	Met	Val	Asp	Gly	Ser	Asp	Ser	Cys	Leu	Asp	Arg	Ala	Thr	Phe	Cys
	1970						1975					1980			
	Pro	Ala	Lys	Leu	Arg	Cys	Tyr	Pro	Lys	His	His	Ala	Tyr	His	Gln
	1985						1990					1995			
[0023]	Pro	Thr	Val	Arg	Ser	Ala	Val	Pro	Ser	Pro	Phe	Gln	Asn	Thr	Leu
	2000						2005					2010			
	Gln	Asn	Val	Leu	Ala	Ala	Ala	Thr	Lys	Arg	Asn	Cys	Asn	Val	Thr
	2015						2020					2025			
	Gln	Met	Arg	Glu	Leu	Pro	Thr	Met	Asp	Ser	Ala	Val	Phe	Asn	Val
	2030						2035					2040			
	Glu	Cys	Phe	Lys	Arg	Tyr	Ala	Cys	Ser	Gly	Glu	Tyr	Trp	Glu	Glu
	2045						2050					2055			
	Tyr	Ala	Lys	Gln	Pro	Ile	Arg	Ile	Thr	Thr	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr
	2060						2065					2070			
	Tyr	Val	Thr	Lys	Leu	Lys	Gly	Pro	Lys	Ala	Ala	Ala	Leu	Phe	Ala
	2075						2080					2085			
	Lys	Thr	His	Asn	Leu	Val	Pro	Leu	Gln	Glu	Val	Pro	Met	Asp	Arg
	2090						2095					2100			
	Phe	Thr	Val	Asp	Met	Lys	Arg	Asp	Val	Lys	Val	Thr	Pro	Gly	Thr
	2105						2110					2115			
	Lys	His	Thr	Glu	Glu	Arg	Pro	Lys	Val	Gln	Val	Ile	Gln	Ala	Ala
	2120						2125					2130			
	Glu	Pro	Leu	Ala	Thr	Ala	Tyr	Leu	Cys	Gly	Ile	His	Arg	Glu	Leu
	2135						2140					2145			
	Val	Arg	Arg	Leu	Asn	Ala	Val	Leu	Arg	Pro	Asn	Val	His	Thr	Leu

	2150	2155	2160
	Phe Asp Met Ser Ala Glu Asp	Phe Asp Ala Ile Ile	Ala Ser His
	2165	2170	2175
	Phe His Pro Gly Asp Pro Val	Leu Glu Thr Asp Ile	Ala Ser Phe
	2180	2185	2190
	Asp Lys Ser Gln Asp Asp Ser	Leu Ala Leu Thr Gly	Leu Met Ile
	2195	2200	2205
	Leu Glu Asp Leu Gly Val Asp	Gln Tyr Leu Leu Asp	Leu Ile Glu
	2210	2215	2220
	Ala Ala Phe Gly Glu Ile Ser	Ser Cys His Leu Pro	Thr Gly Thr
	2225	2230	2235
	Arg Phe Lys Phe Gly Ala Met	Met Lys Ser Gly Met	Phe Leu Thr
	2240	2245	2250
	Leu Phe Ile Asn Thr Val Leu	Asn Ile Thr Ile Ala	Ser Arg Val
	2255	2260	2265
	Leu Glu Gln Arg Leu Thr Asp	Ser Ala Cys Ala Ala	Phe Ile Gly
	2270	2275	2280
	Asp Asp Asn Ile Val His Gly	Val Ile Ser Asp Lys	Leu Met Ala
	2285	2290	2295
[0024]	Glu Arg Cys Ala Ser Trp Val	Asn Met Glu Val Lys	Ile Ile Asp
	2300	2305	2310
	Ala Val Met Gly Glu Lys Pro	Pro Tyr Phe Cys Gly	Gly Phe Ile
	2315	2320	2325
	Val Phe Asp Ser Val Thr Gln	Thr Ala Cys Arg Val	Ser Asp Pro
	2330	2335	2340
	Leu Lys Arg Leu Phe Lys Leu	Gly Lys Pro Leu Thr	Ala Glu Asp
	2345	2350	2355
	Lys Gln Asp Glu Asp Arg Arg	Arg Ala Leu Ser Asp	Glu Val Ser
	2360	2365	2370
	Lys Trp Phe Arg Thr Gly Leu	Gly Ala Glu Leu Glu	Val Ala Leu
	2375	2380	2385
	Thr Ser Arg Tyr Glu Val Glu	Gly Cys Lys Ser Ile	Leu Ile Ala
	2390	2395	2400
	Met Ala Thr Leu Ala Arg Asp	Ile Lys Ala Phe Lys	Lys Leu Arg
	2405	2410	2415
	Gly Pro Val Ile His Leu Tyr	Gly Gly Pro Arg Leu	Val Arg
	2420	2425	2430
	<210> 4		
	<211> 7872		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		

<223> 具有插入的异源内含子的SFV复制酶的再合成序列的核酸序列, 该序列表达时与SEQ ID NO:1一致

<400> 4

```

atggccgcca aggtgcacgt ggacatcgag gccgacagcc cettcatcaa gagcctgcag    60
aaggccttcc ccagcttcga ggtggagtcc ctgcaggtga cccccaacga ccacccaac    120
gccagggcct tcagccacct ggccaccaag ctgacgcagc aggaaaccga caaggacacc    180
ctgacctcgg acatcggcag cgcacctca aggtgagttt ggggaccctt gattgttctt    240
tctttttcgc tatttlaaaa ttcatttat atggaggggg caaagttttc aggggtgtgt    300
ttagaatggg aagatgtccc ttgtaicact atggacctc atgataattt tgtttcttcc    360
actttctact ctgttgacaa ccattgtctc ctcttatttt cttttcattt tctgtaactt    420
tttcgttaaa ctttagcttg catttgtaac gaatttttaa attcactttt gttatattgt    480
cagattgtaa gtactttctc taatacttt tttttcaagg caatcagggt atattatatt    540
gtacttcagc acagttttag agaacaattg ttataattaa atgataaggt agaataattc    600
tgcatataaa ttctggctgg cgtggaaata ttcttattgg tagaacaac tacaccctgg    660
tcatactect gcccttctct ttatggttac aatgatatac actgtttgag atgaggataa    720
aatactctga gtccaaaccg ggccctctg ctaaccatgt tcattgcctt ttctttttcc    780
tacaggcgga tgatgagcac ccacaagtac cactgcgtgt gccccatcgc gagcgccgag    840
gaccccgagc ggctggtgtg ctacgccaag aagctggccg ccgccagcgg caaggtgctg    900
gaccgggaga tcgccggcaa gatcacgac ctgcagaccg tgatggccac ccccgacgcc    960
gagagcccca cttctgcct gcacaccgac gtgacctgcc ggacagccgc cgaggtggcc    1020
gtgtaccagg acgtgtacgc cgtgcacgcc cccacctccc tgtaccacca ggccatgaag    1080
ggcgtgcgga ccgcctactg gatcggttc gacaccacc cttcatgtt cgacgccctg    1140
gccggagcct accccacctc cgccaccaac tgggcccagc agcaggtgct gcaggcccg    1200
aacatcggcc tgtgcgcgc cagcctgacc gagggccggc tgggcaagct gtccatcctg    1260
cggaagaagc agctgaagcc ctgcgacacc gtgatgttca gcgtgggcag cacactgtac    1320
accgagagcc ggaagctgct gcggagctgg cacctgccc gcgtgttcca cctgaagggc    1380
aagcagagct tcacctgcag atcgacacc atcgtgagct gcgagggcta cgtggtgaag    1440
aaaatcacca tgtgccctgg cctgtacggc aagaccgtgg gctacgccgt gacctaccac    1500
gccgagggct ttctggtgtg caagaccacc gataccgtga agggcgagag agtgagcttc    1560
cccgtctgca cctacgtgcc cagcaccatc tgcgaccaga tgaccggtat cctggccacc    1620
gatgtgaccc ccgaggacgc ccagaaactg ctggctcgcc tgaaccagcg gatcgtggtg    1680
aacggccgga ccagcgggaa caccaacacc atgaagaact acctgctgcc catcgtggcc    1740
gtggccttca gcaagtgggc cagagagtac aaggccgacc tggacgacga gaagccctg    1800
ggcgtgcggg agcggagcct gacctgctgc tgcctgtggg cttcaagac ccggaagatg    1860
cacaccatgt acaagaagcc cgacaccag accatcgtga aggtgcccg cgagttcaac    1920
agcttcgtga tccccagcct gtggagcacc ggcctggcca tccccgtcg gagccggatc    1980
aagatgctgc tggccaagaa aaccaagcgg gagctgatcc ccgtgctgga cgcagcagc    2040
gccagggacg ccgagcagga agagaagag cggctggaag ccgagctgac ccgggaggcc    2100
ctgccccccc tggtgcttat cgccttgcc gagaccggcg tgggtggact ggatgtggag    2160
gaactggaat accacgccg agccgggggtg gtggagaccc ccagatccg cctgaagggtg    2220
acagcccagc ccaacgacgt gctgctgggc aactacgtgg tgcgtcccc ccagaccgtg    2280
ctgaagagca gcaagctggc ccccgtcac cctctggccg agcaggtgaa gatcatcacc    2340

```

[0025]

	cacaacggca gggccggcag ataccaggtc gacggctacg acggccgggt gctgctgcca	2400
	tgcggctccg ccataccctgt gcccgagttc caggccctga gcgagagcgc cacaatggtg	2460
	tacaacgagc gggagttcgt gaaccggaag ctgtaccaca ttgccgtgca cgcccttagc	2520
	ctgaacaccg atgaggaaaa ctacgagaaa gtgcggggccg agcggaccga tggcgagtac	2580
	gtgttcgacg tggacaagaa atgctgcgtg aagcgggagg aagccagcgg gctggtgctg	2640
	gtcggggagc tgaccaaccc ccccttcac gaggttgcct acgaggccct gaagatccgg	2700
	ccctccgcc cctacaagac cacagtgtg ggctgttgc gctgcccgg cagcggcaag	2760
	agcgccatca tcaagtcct ggtgaccaag cagcacctgg tgacctccgg caagaaagag	2820
	aactgccagg aaatcgctca cgacgtcaag aagcaccggg gccgggacat ccaggccaag	2880
	acagtggaac gcatacctgt gaacggctgc agacggggccg tggalatcct gtacgtggac	2940
	gaggccttcg cctgccacag cggcacctg ctggccctga tcgccctggt gaagccccgg	3000
	tccaaggtgg tgctgtcgg cgaccccaag cagtgcggct tcttcaacat gatgcagctg	3060
	aagtgaaact tcaaccacaa catctgcacc gaagtgtgcc acaagagcat cagccggcgg	3120
	tgcaccagac ccgtgaccgc catcgtgtcc accctgact acggcggaac galgcgacc	3180
	accaaccct gcaacaagcc catcatcatc galaccaccg gccagaccaa gcccagccc	3240
	ggcgacatcg tgcagactg ctcccgccg tgggtgaagc agctgcagct ggactaccgg	3300
	ggccacgagg tgatgaccgc cggccctcc caggccctga ccagaaagg cgtgtatgcc	3360
	gtgcggcaga aggtgaacga gaacccctg tacgccctg ccagcgagca cgtgaatgig	3420
	ctgctgaccc ggaccgagga caggcgggtg tggaaaaccc tggccggcga cccctggalc	3480
	aaggtgctgt ccaacatccc ccagggaac ttcaccgcca cctggaaga gtggcaggaa	3540
[0026]	gagcacgaca agatcatgaa ggtgatcgag ggccctgcg cccagtgga cgccltcag	3600
	aacaaggcca acgtgtgctg ggccaagagc ctggtccctg tgcctggacac cggccgcatc	3660
	cggctgaccg ccgaagagtg gagcaccatc atcaccgct tcaaagagga ccgggcctac	3720
	agccccgtgg tggccctgaa cgagatctgc accaagtact acggcgtgga cctggacagc	3780
	ggcctgttca cgcgcccaa ggtgtccctg tactacgaga acaaccactg ggacaaccgg	3840
	ccaggcgga ggatgtacgg ctccaacgcc gccaccgccc ccagactgga agcccggcac	3900
	acctttctga agggccagtg gcacaccggc aagcaggccg tgatcgccga gagaaagatc	3960
	cagccctgt cgtgtcggg taacgtgatc cctatcaacc ggccggtgcc ccacgccctg	4020
	gtggccgagt acaagacagt gaagggcagc cgggtggagt ggctggtgaa caaagtgcgg	4080
	ggctaccacg tgctgctggt gcttgagtac aaccggccc tgctcggcg gaggglgacc	4140
	tggctgtccc ctctgaacgt gacaggcgcc gacagggtgt acgacctgag cctgggcctg	4200
	ctgcccagc ccggcagatt cgacctggtg ttctgtaaca tccacaccga gttcagaatc	4260
	caccactacc agcagtgcgt ggaccacgcc atgaagetgc agatgctggg cggcgacgcc	4320
	ctgagctgc tgaagcctgg cggcagcctg ctgatgcggg cctacggcta cggcgacaag	4380
	atctccgagg ccgtggtgtc cagcctgagc cggaagtcca gctccgccag ggtgctgaga	4440
	cccactgagc tgaccagcaa cacagaagtg ttctgtgtg tcagcaactt cgacaacggc	4500
	aagcgccca gcaccctgca ccagatgaac accaagctgt ccgccgtgta cggcgcgag	4560
	gcatgcaca ccgccgatg cggcccccagc taccgggtga agcgggcca catcgccacc	4620
	tgcaccgagg ccgccgtggt gaatgccgcc aatgccaggg gcaccgtggg cgacggcgtg	4680
	tgcaggcgcc tggccaaaa gtggcccagc gccctcaagg gcgagggcac cctgtlgggc	4740
	accatcaaaa ccgtgatgtg cggcagclac cccgtgatcc acgccgtggc cccaatttc	4800

	agcgccacca cagaggccga gggcgaccgg gaactggccg ccgtgtatag agccgtggcc	4860
	gccgaagtga acagactgag cctgagcagc gtggccatcc ctctgtgtgc caccggcgtg	4920
	ttcagcggcg gcagggaccg gctgcagcag agcctgaacc acctgttcac cgctatggac	4980
	gccaccgacg ccgacgtgac aatctactgc cgggacaaga gctgggagaa gaagatccag	5040
	gaagccatcg acatgaggac cgccgtggag ctgctgaacg acgacgtgga gctgacaacc	5100
	gacctggtgc gcgtagcccc cgacagcagc ctggtgggccc ggaagggcta cagcaccacc	5160
	gacggctccc tgtacagcta cttcgagggc accaagttca accaggccgc catcgatatg	5220
	gccgagatcc tgacctgtg gcccaggctg caggaagcca acgagcagat ctgtctgtac	5280
	gccctgggcg agacaatgga caacatccgg tccaagtccc ccgtgaacga cagcgacagc	5340
	agcaccccc ctcggaccgt gccctgcctg tgcagatacg ccatgaccgc cgagcggatc	5400
	gcccggctgc ggagccacca ggtgaagagc atggtggtgt gcagcagctt cccctgccc	5460
	aagtaccacg tggatggcgt gcagaaagtg aagtgcgaga aggtgtgtgt gttcgacccc	5520
	accgtgecta gcgtggtgtc cccccggaag tacgccgcct ccaccaccga ccacagcgac	5580
	agaagcctgc ggggcttcga cctggactgg accaccgact ccagcagcac cgccagcgac	5640
	accatgagcc tgcacagcct gcagagctgc gacatcgaca gcactacga gcctatggcc	5700
	cccacgtgg tgaccgccga cgtgcaccct gagccagccg gcacgcgga cctggccgcc	5760
	gatgtgcacc cagaaccgc cgaccacgtg gatctggaaa accccatccc cctcccaga	5820
	cccaagaggg ccgcctacct ggccagcaga gccgccgaga ggcccgigcc tgccccaga	5880
	aagcccaacc cagcccccag aaccgccttc aggaacaagc tgcccctgac cttcggcgac	5940
[0027]	ttcgacgagc acgaggtgga cgcctggccc agcggcatca cctcggcga ttttgatgac	6000
	gtgtcggcg tgggcagagc cggagcctat atcttcagca gcgacaccgg ctccggccac	6060
	ctgcagcaga aaagcgtgag acagcacaac ctgcagtgcg ccagctgga cgccgtgga	6120
	gaggaagaaga tgtaccccc caagctggat accgagcggg aaaagctgct gctgctgaaa	6180
	atgcagatgc accccagcga ggccaacaag agccgctacc agtctaggaa ggtgggagaa	6240
	atgaaggcca ccgtggtgga ccggtgacc agcggcgcca ggtgtacac aggggcccac	6300
	gtgggcagaa tccctacct cgcctgctgc taccacagc ccgtgtacag cccaccgtg	6360
	atcgagcggg tcagcagccc cgacgtggcc atcgccgcct gcaatgagta cctgtctagg	6420
	aactacccaa ccgtggccag ctaccagatc accgatgagt acgatgcta cctggacatg	6480
	gtggacggca gcgacagctg cctggaccgg gccaccttct gtcccgccaa gctgcggtgc	6540
	taccccaagc accacgccta tcaccagccc accgtgagaa gcgccgtgcc cagcccttc	6600
	cagaataccc tgcagaatgt gctggccgcc gccaccaagc ggaactgcaa cgtgaccag	6660
	atgagagaac tgcccacaat ggacagcgcc gtgtttaacg tggagtgtt caagagatac	6720
	gcctgcagcg gcgagtactg ggaggaatac gccaaagcag ccatccggat caccaccgag	6780
	aacatcacca cctacgtgac caagctgaag ggccccaagg ccgccccct gttcgccaag	6840
	accacaacc tggtgccctt gcaggaagtg cctatggaca ggttcaccgt ggacatgaag	6900
	cgggacgtga aggtgacccc tggcaccaag cacaccgagg aacggcccaa ggtgcaggtg	6960
	atccaggccc ccgagcctct ggccaccgcc tatctgtgcg gcateccacc ggagctggtg	7020
	cggcggtga acgcccgtgt gagcccaac gtgcacaccc tgttcgacat gtccgccgag	7080
	gacttcgacg ccatcatcgc cagccacttc caccggcg acccagtgct gaaaccgat	7140
	atgccagct tcgacaagag ccaggacgac agcctggccc tgaccggcct gatgatcctg	7200

	gaagatcttg gcgtagacca gtacctgctg gatctgatcg aggccgcctt cggcgagatc	7260
	agcagctgcc acctgcctac cggcaccgag ttcaagttcg gcgccatgat gaagagcggc	7320
	atgtttctga cctgttcat caacacagtg ctgaatatca ccategccag cagggtgctg	7380
	gaacagcggc tgaccgacag cgcttgccg cccttcacg gcgacgaca catcgtgcac	7440
	ggcgtgatca gcgacaagct gatggccgag cggtagccca gctgggtgaa catggaagt	7500
	aagattatcg acgccgtgat gggcgaaaag cccccctact tctggcgagg cttcatcgtg	7560
	ttcgacagcg tgacacagac cgctgcaga gtgagcgacc ccctgaagcg gctgttcaag	7620
	ctgggcaaac ctctgacagc cgaggacaag caggacgagg accggcgagg ggcctgtcc	7680
	gacgaggtgt ccaagtgtt ccgaccggc ctggcgccg agctggaagt ggcctgaca	7740
	agccgctacg aggtggaggg ctgcaagagc atcctgatcg ctatggccac cctggcccgg	7800
	gacatcaagg cctttaagaa gctgagaggc cctgtcatcc accgtacgg cggacccgg	7860
	ctggtcggt ga	7872
<210> 5		
<211> 10342		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 质粒pRSV-Nspl234		
<400> 5		
	cacagcccag cttgagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat	60
	gagaaagcgc cagcttccc gaaggagaa aggcggacag gtatccgta agcggcagg	120
	tcggaaacag agagcgacg agggagcttc caggggaaa cgcttggtat ctttatagtc	180
[0028]	ctgtcggtt tcgccctc tgacttgagc gtgattttt gtgatctcg tcagggggc	240
	ggagcctatg gaaaaacgc agcaacgc atgataaata aaagatttta tttagtctcc	300
	agaaaaagg gggaaatgaa gacccacct gtaggtttg caagctagcg tataccctcg	360
	acctgcaggt cgatcgactc tagtatgtg cactctcagt acaatctgct ctgatccgc	420
	atagttaagc cagtatctgc tcctgcttg tgtgttgag gtgcctgag agtgccgag	480
	caaaatttaa gctacaaca ggcaaggctt gaccgacaat tgcatgaaga atctgcttag	540
	ggttagcgt tttcgctgc ttgcgatgt accggccaga tatacgcta tctagggga	600
	ctagggtgtg tttaggcga aagcgggct tcggttgta cgggttagga gtccctcag	660
	gatatagtag tttcgtttt gcataggag ggggaaatgt agtcttatgc aatactctt	720
	tagtcttgca acatggtaac gatgagttag caacatgctt tacaaggaga gaaaaagcac	780
	cgtgcatgcc gattggtgga agtaaggtag tacgatcgt ccttattagg aaggcaacag	840
	acgggtctga catggattg acgaaccact gaattccgca ttgcagagat attgtattta	900
	agtgcctage tcgatacaat aaacgccatt tgaccattca ccacattggt gtgcacctc	960
	aagctgtag aggatcggtc gatcgactct agacgccacc atggccgca aggtgcacgt	1020
	ggacatcgag gccgacagc ccttcataa gagcctcgag aaggccttc ccagcttcga	1080
	ggtggagtcc ctgcagtg ccccaacga ccacccaac gccagggcct tcagccacct	1140
	ggccaccaag ctgacgagc aggaaccga caaggacacc ctgatcctg acatcggcag	1200
	cgcacctca aggtgagttt ggggacctt gattgttctt tctttctgc tattgtaaaa	1260
	ttcatgttat atggagggg caaagtttc aggtgttgt ttagaatggg aagatgtccc	1320
	ttgtatcact atggacctc atgataattt tgtttcttc actttctact ctgttgaca	1380
	ccattgtctc ctctatttt cttttcattt tctgtaactt tttcgtaaa ctttagcttg	1440

[0029]

catttgtaac gaatttttaa attcactttt gtttatttgt cagattgtaa gtacitttctc	1500
taatcacttt tttttcaagg caatcagggt atattatatt gtacttcagc acagtlltag	1560
agaacaattg ttataaattaa atgataaggt agaataattt tgcataataa ttctggctgg	1620
cgtggaaata ttcttattgg tagaaacaac tacaccctgg tcatcatcct gcctttctct	1680
ttatggttac aatgatatac actgtttgag atgaggataa aatactctga gtccaaaccg	1740
ggccccctcg ctaaccatgt tcatgecttc ttctttttcc tacaggcgga tgatgagcac	1800
ccacaagtac cactgcgtgt gcccctatgcg gagcgccgag gaccccgagc ggctgggtlg	1860
ctacgccaaag aagctggccg ccgccagcgg caaggigctg gaccgggaga tcgccggcaa	1920
gatcacccgac ctgcagaccg tgatggccac ccccgacgcc gagagcccca cttctgcct	1980
gcacaccgac gtgacctgcc ggacagccgc cgaggtgccc gtgtaccagg acgtgtacgc	2040
cgtgcacgcc cccacctccc tgtaccacca ggccatgaag ggcgtgcgga ccgcctactg	2100
gatcggttc gacaccacc cttcatgtt cgacgccctg gccggagcct accccacctt	2160
cgccaccaac tgggccgacg agcagggtct gcaggcccg aacatcgcc tgtgcgccgc	2220
cagcctgacc gagggccggc tgggcaagct gtccatcctg cggaagaagc agctgaagcc	2280
ctgcgacacc gtgatgttca gcgtggcgag cacactgtac accgagagcc ggaagctgct	2340
gcggagctgg cacctgccca gcgtgttcca cctgaagggc aagcagagct tcacctgcag	2400
atgcgacacc atcgtgagct gcgagggtta cgtggtgaag aaaatcacca tgtgccctgg	2460
cctgtacggc aagaccgtgg gctacgccgt gacctaccac gccgagggtt ttctgggtg	2520
caagaccacc gataccgtga agggcgagag agtgagcttc cccgtctgca cctacgtgcc	2580
cagcaccatc tgcgaccaga tgaccgttat cctggccacc gatgtgacce ccgaggacgc	2640
ccagaaactg ctggtcgccc tgaaccagcg gatcgtggtg aacggccgga cccagcggaa	2700
caccaacacc atgaagaact acctgctgcc catcgtggcc gtggccttca gcaagtgggc	2760
cagagagtac aagggcgacc tggacgacga gaagccctg ggcgtgcggg agcggagcct	2820
gacctgctgc tgccgtggg ccttcaagac ccggaagatg cacaccatgt acaagaagcc	2880
cgacaccag accatcgtga aggtgcccag cgagtccaac agcttcgtga tccccagcct	2940
gtggagcacc ggccctggcca tccccgtgcg gagccggtc aagatgctgc tggccaagaa	3000
aaccaagcgg gagctgatcc ccgtgctgga ccgagcagc gccaggagc ccgagcagga	3060
agagaagag cggttggaag ccgagctgac ccgggagggc ctgccccccc tgggtgcctat	3120
cgcctctgcc gagaccggcg tgggtggaagt ggatgtggag gaactggaat accacgccgg	3180
agccggggtg gtggagaccc ccagatccgc cctgaagggt acagcccagc ccaacgacgt	3240
gctgctgggc aactacgtgg tctgtcccc ccagaccgtg ctgaagagca gcaagctggc	3300
ccccgtgcac cctctggccg agcaggtgaa gatcatcacc cacaacggca gggccggcag	3360
ataccaggtc gacggctacg acggccgggt gctgctgcca tgcggctccg ccctccctgt	3420
gcccagttc caggccctga gcgagagcgc cacaatggtg tacaacgagc gggagtctgt	3480
gaaccggaag ctgtaccaca ttgccgtgca cgccctagc ctgaacaccg atgaggaaaa	3540
ctacgagaaa gtgcgggccc agcggaccga tgccgagtac gtgttcgacg tggacaagaa	3600
atgctgcgtg aagcgggagg aagccagcgg gctggtgctg gtcggggagc tgaccaaccc	3660
ccccctccac gagtctgcct acgagggcct gaagatccgg cctccgccc cctacaagac	3720
cacagtgggtg ggcgtgttcg gcgtgcccgg cagcggcaag agcggcatca tcaagtcctt	3780
ggtgaccaag cacgacctgg tgacctccgg caagaaagag aactgccagg aaatcgtcaa	3840

[0030]

cgacgtcaag aagcaccggg gcctggacat ccaggccaag acagtggaca gcatcctgct 3900
 gaacggctgc agacgggccc tggatatcct gtacgtggac gaggccttcg cctgccacag 3960
 cggcaccctg ctggccctga tcgccctggg gaagcccccg tccaaggtgg tgctgtgcgg 4020
 cgaccccaag cagtgcggct tcttcaacat gatgcagctg aaggtgaact tcaaccacaa 4080
 catctgcacc gaagtgtgcc acaagagcal cagccggcgg tgcaccagac cctgaccgc 4140
 catcgtgtcc accctgcact acggcggcaa gatgcggacc accaaccctc gcaacaagcc 4200
 catcatcate gataccaccg gccagaccaa gccaagccc ggcgacatcg tgctgacctg 4260
 ctcccgccgc tgggtgaagc agctgcagct ggactaccgg gggcacgagg tgatgaccgc 4320
 cggcgctcc caggcgctga ccagaaaggg cgtgtatgcc gtgcggcaga aggtgaacga 4380
 gaacccctg tacgcccctg ccagcgagca cgtgaatgtg ctgctgacct ggaccaggga 4440
 caggctgggt tggaaaaccc tggccggcga ccctggatc aaggtgctgt ccaacatccc 4500
 ccagggcaac ttcaccgcca cctggaaga gtggcaggaa gacacgaca agatcatgaa 4560
 ggtgatcgag ggccttgcg cccagtgga cgccttcag aacaaggcca acgtgtgctg 4620
 ggccaagagc ctggtgcctg tgctggacac cggcgcatc cggtgaccg ccgaagagt 4680
 gagcaccate ataccgctc tcaagaggga ccggcctac agccccgtgg tggccctgaa 4740
 cgagatctgc accaagtact acggcgtgga cctggacagc ggctgttca gcgccccaa 4800
 ggtgtccctg tactacgaga acaaccactg ggacaaccgg ccaggcgcca ggatgtacgg 4860
 cttaacgcc gccaccgccc ccagactgga agcccgcac acctttctga agggccagtg 4920
 gcacaccgga aagcaggccc tgatgcgga gagaagatc cagccctgt cgtgctgga 4980
 taacgtgatc cctatcaacc ggcggtgcc ccacccctg gtggccgagt acaagacagt 5040
 gaagggcagc cgggtggagt ggtgtgtgaa caaagtgcgg ggctaccacg tgctgctggt 5100
 gtctgagtac aaectggccc tgctcgccg gaggtgacc tggtgtccc ctctgaacgt 5160
 gacaggccgc gacaggtgt acgacctgag cctgggectg cctgccgacg ccggcagatt 5220
 cgacctgggt ttcgtgaaca tccacaccga gttcagaatc caccactacc agcagtgcgt 5280
 ggaccacgcc atgaagctgc agatgtggg cggcgacgcc ctgaggtgc tgaagcctgg 5340
 cggcagcctg ctgatgcggg cctacggcta cggcacaag atctccgagg ccgtggtgtc 5400
 cagcctgagc cggaagtca gctcccccag ggtgctgaga cccgactgcg tgaccagcaa 5460
 cacagaagtg tttctgctgt tcagaaactt cgacaacggc aagcgccca gcacctgca 5520
 ccagatgaac accaagctgt ccgctgtgta cggcgccgag gccatgcaca ccgcccgatg 5580
 cggcccccag taccgggtga agcgggcca catgccacc tgcaccgagg ccgctgtggt 5640
 gaatgccgcc aatgccaggg gcaccgtggg cgacggcgtg tgcagggccg tggccaaaaa 5700
 gtggcccagc gccttcaagg gcgaggccac ccctgtgggc accatcaaaa ccgtgatgtg 5760
 cggcagctac cccgtgatcc acgcccgtgc cccaatttc agcgccacca cagaggccga 5820
 gggcgaccgg gaactggccc cgtgttatag agccgtggcc gccgaagtga acagactgag 5880
 cctgagcagc gtggccatcc ctctgtgtc caccggcgtg ttcagcgccg gcagggaccg 5940
 gctgcagcag agcctgaacc acctgttac cgctatggac gccaccgacg ccgacgtgac 6000
 aatctactgc cgggacaaga gctgggagaa gaagatccag gaagccatcg acatgaggac 6060
 cggcgtggag ctgctgaacg acgacgtgga gctgacaacc gacctgtgc gcgtgcaccc 6120
 cgacagcagc ctggtgggcc ggaagggcta cagaccacc gacggctccc tgtacagcta 6180
 ctccgagggc accaagtcca accaggccgc catcgatatg gccgagatcc tgaccctgtg 6240
 gcccaggctg caggaaagcca acgagcagat ctgtctgtac gccctgggag agacaatgga 6300

	caacatccgg tccaagtgcc ccgtgaacga cagcgacagc agcacccccc ctcggaccgt	6360
	gccctgcctg tgcagatacg ccatgaccgc cgagcggatc gcccggctgc ggagccacca	6420
	ggtgaagagc atggtggtgt gcagcagctt ccccctgccc aagtaccacg tggatggcgt	6480
	gcagaaagtg aagtgcgaga aggtgctgct gttcgacccc accgtgccta gcgtggtgtc	6540
	cccccggaag tacgccgctt ccaccacega ccacagcgac agaagcctgc ggggcttcga	6600
	cctggactgg accaccgact ccagcagcac cgcagcgac accatgagcc tgcccagcct	6660
	gcagagctgc gacatcgaca gcatctacga gcctatggcc cccatcgtgg tgaccgcga	6720
	cgtgcacct gagccagccg gcatcgccga cctggccgcc gatgtgcacc cagaaccgc	6780
	cgaccacgtg gatctggana accccatccc cctcccaga cccaagaggg ccgctacct	6840
	ggccagcaga gccgccgaga ggcctgtgcc tgccccaga aagcccaccc cagccccag	6900
	aaccgccttc aggaacaagc lgccctgac cttcgccgac ttgcagcagc acgaggtgga	6960
	cgccttgccc agcggcatca ccttcggcga ttttgatgac gtgctgcggc lgggcagagc	7020
	cggagcctat atcttcagca gcgacaccgg ctccggccac ctgcagcaga aaagcgtgag	7080
	acagcacaac ctgcagtgcg ccagcttgga cgccgtggaa gaggaanaaga tgtaccccc	7140
	caagctggat accgagcggg aaaagctgct gctgctgaaa atgcagatgc accccagcga	7200
	ggccaacaag agccgtatcc agtctaggaa ggtggagaac atgaaggcca ccgtggigga	7260
	ccggtgacc agcggcgcca ggctglacac aggggccgac gtgggcagaa tccctaccta	7320
	cgcctgtgcg taccacagc ccgtgtacag ccccaccgtg atcgagcggc tcagcagccc	7380
	cgacgtggcc atcgccgctt gcaatgagta cctgtctagg aactacccaa ccgtggccag	7440
	ctaccagatc accgatgagt acgatgccta cctggacatg gtggacggca gcgacagctg	7500
[0031]	cctggaccgg gccacattct glcccgccaa gctgcggctc taccceaagc accacgccta	7560
	tcaccagccc accgtgagaa gcgcctgtcc cagccccttc cagaataccc tgcagaatgt	7620
	gttgccgcc gccaccaagc ggaactgcaa cgtgaccag atgagagaac tgcccacaat	7680
	ggacagcgc gtgtttaacg tggagtgtt caagagatac gcctgcagcg gcgagtactg	7740
	ggaggaatac gccaagcagc ccatccggat caccaccgag aacatcacca cctacgtgac	7800
	caagctgaag ggccccaagg ccgcgcctt gttcgccaag acccacaacc tgggtcccct	7860
	gcaggaagtg cctatggaca ggttcaccgt ggacatgaag cgggacgtga aggtgacccc	7920
	tggcaccaag cacaccgagg aacggcccaa ggtgcagggtg atccaggccg ccgagcctct	7980
	ggccaccgcc tatctgtgcg gcatccaccg ggagctggtg cggcggctga acgccgtgct	8040
	gaggcccaac gtgcacaccc tgttcgacat gtccgccgag gacttcgacg ccatcagtc	8100
	cagccacttc caccgccggc acccagtgct ggaaccgat atcgccagct tcgacaagag	8160
	ccaggacgac agcctggccc tgaccggcct gatgatcctg gaagatctgg gcgtggacca	8220
	gtacctgtg gatctgatc aggcgcctt cggcgagatc agcagctgcc acctgcctac	8280
	cggcaccggg ttcaagttcg gcgccatgat gaagagcggc atgtttctga cctgttcat	8340
	caacacagtg ctgaatatca ccatcgccag cagggtgctg gaacagcggc lgaccgacag	8400
	cgcctgcgcc gccttcacg gcgacgacaa catcgtgcac ggcgtgatca gcgacaagct	8460
	gatggccgag cgggtgcgca gctgggtgaa catggaagtg aagattatcg acgccgtgat	8520
	ggcgcaaaag ccccctact tctcgggcgg ctctcatctg ttgcacagcg tgacacagac	8580
	cgcctgcaga gtgagcgacc cctgaagcg gctgttcaag ctgggcaaac ctctgacagc	8640
	cgaggacaag caggacgagg accggcgag ggcctgtcc gacgaggtgt ccaagtgtt	8700

	ccggaccggc ctgggcgcgc agctggaagt ggccttgaca agccgctacg aggtggagg	8760
	ctgcaagagc atcctgatcg ctatggccac cctggcccgg gacatcaagg cctttaagaa	8820
	gctgagaggc cctgtcatcc acctgtacgg cggaccccgg ctggtgcggt gagagctcgc	8880
	tgatcagcct cgactgtgcc ttctagtgtc cagccatctg ttgtttgccc ctccccctg	8940
	ccttccttga ccctggaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt	9000
	gcacgcatt gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtggggtggg gcaggacagc	9060
	aagggggagg attgggaaga caatagcagg catgettaat taacaggcct tggcgcgccg	9120
	ggtctgggta agctctagtt ctcatgtttg acagcttata atcgataagc ttlaatgcgg	9180
	tagtttagca cgaaggagtc aacatgtag aagatctcaa acgctaggta ttagaagcca	9240
	acctggcgct gccaanaac aacctgtca cgtcacatg gggcaacgtc agcgcggtg	9300
	atcgcgagcg cggcgtcttt gtgatcaaac ctccggcggt cgattacagc gtcatgaccg	9360
	ctgacgatat ggtcgtggtt agcatcgaaa ccggtgaagt ggttgaaggt acgaaaaagc	9420
	cctcctccga cagcccaact caccggctgc tctatcaggc attccccctc attggcgga	9480
	ttgtgcatac gcactcgcgc cagccacca tctggcgca ggcgggtcag tcgattccag	9540
	caaccggcac caccacgcc gactatttct acggcaccat tccctgcacc cgcaaatga	9600
	ccgacgcaga aatcaacggc gaatatgagt gggaaaccgg taacgtcatc gtagaaacct	9660
	ttgaaaaaca ggglatcgat gcagcgcaaa tgcgcggcgt tctggtccat tcccacggcc	9720
	cgtttgatg gggcaaaaat gccgaagatg cgggtcataa cgccatcgtg ctggaagagg	9780
	tcgtttatat ggggatattc tgcgctcagt tagcgccgca gttaccggat atgcagcaaa	9840
	cgtctgtgga taaacactat ctgcgtaagc atggcgcgaa ggcatattac gggcagtaat	9900
[0032]	gacagcccg ctaatgagcg ggcttttttt tccatgacca aaatccccca acgtgagttt	9960
	tcgttcact gagegtcaga ccccgtagaa aagatcaag gatcttcttg agatcctttt	10020
	tttctgcgcg taatctcgtg cttgcaaaaca aaaaaaccac cgtaccagc ggtggtttgt	10080
	ttgccgcatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgag	10140
	ataccaaata ctgtccttct agtgtagcgg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta	10200
	gcaccgccta catacctcgc tctgctaata ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat	10260
	aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggtcg	10320
	ggctgaacgg ggggttcgtg ca	10342
	<210> 6	
	<211> 10248	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 质粒pheIF4A1-Nsp1234	
	<400> 6	
	cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat	60
	gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaaa aggcggacag gtatccggtg agcggcagg	120
	tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc	180
	ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc	240
	ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcat cgataaaata aaagatttta tttagtctcc	300
	agaaaaaggg gggaatgaaa gacccacct gtaggtttgg caagctagcg tatacggatc	360
	ctctagctag atgatttctt tcattccctgg cacacgtcca ggcagtgtcg aatccatctc	420
	tgctacaggg gaaaacaat aacatttgag tccagtggag accgggagca gaagtaaagg	480

[0033]

gaagtataa cccccagagc cgggaagcct ctggaggctg agacctcgcc ccccttgcgt	540
gatatggcct acggagccac atgaccaagg cactgtcgcc tccgcacgtg tgagagtga	600
gggccccaa atggtctcca ggccctgagg cctgactctt ctatgtcact tccgtaccgg	660
cgagaaaggc gggccctcca gccaatgagg ctgcggggcg ggccttcacc ttgataggca	720
ctcgagttat ccaatggtgc ctgcggggcg gagcgactag gaactaacgt catgccgagt	780
tgctgagcgc cggcaggcgg ggccggggcg gccaaaccaa tgcgatggcc ggggcggagt	840
cggcgctct ataagttgtc gataggcggg cactccgcc tagtttctaa ggaaccggtc	900
gccaccatgg ccgccaaggt gcacgtggac atcgaggccg acagccccct catcaagagc	960
ctgcagaagg ccttccccag cttcgaggtg gagtccctgc aggtgacccc caacgaccac	1020
gccaacgcca gggccttcag ccacctggcc accaagctga tcgagcagga aaccgacaag	1080
gacacctga tcctggacat cggcagcgcc cctcaaggt gagtttggg acccttgatt	1140
gttttttct tttcgtatt gtaaaattca tgttatatgg agggggcaaa gttttcagg	1200
tgttgtttag aatgggaaga tgteccctgt atcactatgg accctcatga taattttgtt	1260
tctttcatt tctactctgt tgacaacat tgtctcctct tattttctt tcatttctg	1320
taacttttc gttaaacttt agcttgcat tgaacgaat ttttaattc acttttgtt	1380
atttgtcaga ttgtaagtac tttctctaat cactttttt tcaaggcaat cagggtatat	1440
tatatgtac ttcagcacag ttttagagaa caattgttat aattaaatga taaggtagaa	1500
tatttctga tataaatct ggctggcgtg gaaatattct tattggtaga aacaactaca	1560
ccctggtcat catctgcct ttctctttat gggtacaatg atatacactg ttgagatga	1620
ggataaaata ctctgagtc aaaccgggcc cctctgctaa ccatgttcat gccttcttct	1680
ttttctaca ggcgatgat gaggaccac aagtaccact gcgtgtgcc catgcggagc	1740
gccgaggacc ccgagcgct ggtgtgtac gccagaagc tggccgccg cagcggcaag	1800
gtgctggacc gggagatcgc cggcaagatc accgacctgc agaccgtgat ggccaccccc	1860
gacgcgaga gccccacct ctgcctgcac accgacgtga cctgccggac agccgccgag	1920
gtggccgtgt accaggacgt gtacgccgtg cagccccca cctccctgta ccaccaggcc	1980
atgaaggcgc tgcggaccgc ctactggatc ggcttcgaca ccacccccct catgttcgac	2040
gccttgccg gagctaccc cactacgcc accaactggg ccgacgagca ggtgctgcag	2100
gcccgaaca tcggcctgtg cgcgccagc ctgaccgagg gccggctggg caagctgtcc	2160
atcctgcgga agaagcagct gaagccctgc gacaccgtga tglcagcgt gggcagcaca	2220
ctgtacacc agagccgaa gctgctcgg agctggcacc tgcccagcgt gitccacctg	2280
aagggaagc agagcttcac ctgcagatgc gacaccatc tgagctgcga gggctacgtg	2340
gtgaagaaaa tcacatgtg ccttgccctg tacggcaaga ccgtgggcta gccctgacc	2400
taccacgcc agggctttct ggtgtgcaag accaccgata ccgtgaaggg cgagagagt	2460
agcttcccc tctgcacct cgtgccagc accatctgcg accagatgac cgtatcctg	2520
gccaccgat tgacccccga ggacccccag aaactgctgg tcggcctgaa ccagcggatc	2580
gtggtgaac gccggacca gcggaacacc aacacatga agaactacct gctgccatc	2640
gtggccgtg ccttcagcaa gtgggcccaga gattacaagg ccgacctgga cgacgagaag	2700
cccctggcg tgcgggagcg gagcctgacc tgctgtgcc tgtggcctt caagaccgg	2760
aagatgcaca ccatgtacaa gaagcccgc acccagacca tcgtgaaggt gccagcgag	2820
ttcaacagct tcgtgatccc cagcctgtgg agcaccggcc tggccatccc cgtgcggagc	2880

[0034]

cggatcaaga tgctgctggc caagaaaacc aagcgggagc tgatccccgt gctggacgcc 2940
 agcagcgcca gggacgccga gcaggaagag aaagagcggc tggaaagcga gctgacccgg 3000
 gaggcctgc ccccccgtgt gccatcgcc cctgccgaga ccggcgtggt ggacgtggat 3060
 gtggaggaaac tggaaatacca cgcggagacc ggggtggtgg agacccccag atccgccctg 3120
 aaggtgacag cccagcccaa cgacgtgctg ctgggcaact acgtggtgct gtccccccag 3180
 accgtgctga agagcagcaa gctggcccc gtcaccctc tggccgagca ggtgaagatc 3240
 atccccaca cggcagggc cggcagatac caggtcgacg gctacgacgg ccgggtgctg 3300
 ctgccatgag gctccgcat cctgtgccc gagttccagg cctgagcga gagcgcaca 3360
 atggtgtaca acgagcggga gttcgtgaac cggaagctgt accacattgc cgtgcacggc 3420
 cctagcctga acaccgatga ggaaaactac gagaaglgc gggccgagcg gaccgatgcc 3480
 gagtacgtgt tcgacgtgga caagaaatgc tgcgtgaagc gggaggaaagc cagcgggctg 3540
 gtgctggtgc gggagctgac caaccccccc ttccacgagt tcgcctacga gggcctgaag 3600
 atccggccct ccgcccccta caagaccaca gtggtggcg tgttcggcgt gcccggcagc 3660
 ggcaagagcg ccatcatcaa gtcctggtg accaagcacg acctggtgac ctccggcaag 3720
 aaagagaact gccaggaaat cgtcaacgac gtcaagaagc accggggcct ggacatccag 3780
 gccaaagacg tggacagcat cctgtgaac ggctgcagac gggccgtgga tatcctgtac 3840
 gtggacgagg ccttcgctg ccacagcggc accctgctgg cctgacgc cctggigaag 3900
 ccccggtcca aggtggtgct gtgcggcgac cccaagcagt gcggtctctt caacatgatg 3960
 cagctgaagg tgaacttcaa ccacacatc tgcaccgaag tgtgccaaa gagcatcagc 4020
 cggcgtgca ccagaccctg gaccgccatc gtgtccccc tgcactacgg cggcaagatg 4080
 cggaccacca acccctgcaa caagcccac atcatcgata ccaccggcca gaccaagccc 4140
 aagcccgcg acatcgtgct gacctgttc cgcggctggg tgaagcagct gcagctggac 4200
 taccggggcc acgaggtgat gaccgcgccc gcctcccagg gcctgaccag aaaggcgctg 4260
 tatcgctgc ggcagaaggt gaacgagaac cccctgtacg cccctgccag cagcacgtg 4320
 aatgtgctgc tgaccggac cgaggacagg ctggtgtgga aaacctlgc cggcgacccc 4380
 tggatcaagg tgctgtccaa catccccag ggcaacttca ccgccacct ggaagagtgg 4440
 caggaagagc acgacaagat catgaagtg atcagggcc ctgcgcccc agtggacgcc 4500
 ttccagaaca aggccaacgt gtgctgggcc aagagcctgg tgctgtgct ggacaccgcc 4560
 ggcacccggc tgaccgccga agagtggagc accatcatca ccgccttcaa agaggaccgg 4620
 gcctacgcc ccgtggtggc cctgaacgag atctgcacca agtactacgg cgtggacctg 4680
 gacagcgccc tgttcagcg cccaagggtg tcctgtact acgagaaca cactgggac 4740
 aaccggccag gcggcaggat gtacggctt aacgcggcca ccgcgcagc actggaagcc 4800
 cggcacacct ttctgaagg ccagtggc acggcaagc aggcctgat cgcgagaga 4860
 aagatccagc cctgtccgt gctggataac gtgatcccta tcaaccggcg gctgccccac 4920
 gccctggtg ccgagtacaa gacagtgaag ggcagccggg tggagtggct ggtgaacaaa 4980
 gtgcggggct accacgtgct gctggtgtct gactacaacc tggccctgcc tggcggagg 5040
 gtgacctggc tgccccctt gaacgtgaca ggcgcccaca ggtgctacga cctgagcctg 5100
 ggctgcctg ccgacgccg cagattcgac ctggtgttcg tgaacatcca caccgagttc 5160
 agaatccacc actaccagca gtgcgtggac cagccatga agctgcagat gctgggcggc 5220
 gacgccctga ggtgctgaa gcctggcggc agcctgctga tgcgggccta cggctacgcc 5280
 gacaagatct ccgagggcgt ggtgtccagc ctgagccgga agttcagctc gcgcagggtg 5340

[0035]

ctgagacccg actgcgtgac cagcaacaca gaagtgtttc tgcgtgtcag caacttcgac 5400
 aacggcaagc ggcccagcac cctgcaccag atgaacacca agctgtccgc cgtgtacgcc 5460
 ggcgaggcca tgcacaccgc cggatgcgcc ccagctacc gggtgaagcg ggccgacatc 5520
 gccacctgca ccgaggccgc cgtggtgaat gccccaatg ccaggggcac cgtgggcgac 5580
 ggctgttgca gggccgtggc caaaaagtgg ccagcgcct tcaaggcgga gggcaccctt 5640
 gtgggcacca tcaaaaccgt gatgtgcggc agctaccccg tgatecacgc cgtggccccc 5700
 aatttcagcg ccaccacaga ggccgagggc gaccgggaac tggccgccgt gtatagagcc 5760
 gtggccgcgc aagtgaacag actgagcctg agcagcgtgg ccacccctct gctgtccacc 5820
 ggctgtttca gggcgcgagc ggaccggtg cagcagagcc tgaaccacct gttaccgct 5880
 atggacgcca ccgacgccga cgtgacaatc tactgccggg acaagagctg ggagaagaag 5940
 atccaggaag ccacgcacat gaggaccgcc gtggagctgc tgaacgacga cgtggagctg 6000
 acaaccgacc tggctgcgct gcaccccgac agcagcctgg tggcccgga gggctacagc 6060
 accaccgagc gctccctgta cagctacttc gagggcacca agttcaacca ggccgccatc 6120
 gatattggcg agatcctgac cctgtggccc agctgcagg aagccaacga gcagatctgt 6180
 ctgtacgcc tggcgagac aatggacaac atccggcca agtgcgccgt gaacgacagc 6240
 gacagcagca cccccctcg gaccgtgccc tgcctgtgca gatacgccat gaccgccgag 6300
 cggatgcgcc ggctgcggag ccaccagtg aagagcatgg tggltgcag cagcttcccc 6360
 ctgccaagt accacgtgga tggcgtgcag aaagtgaagt gcgagaaggt gctgtgttc 6420
 gacccaccgc tgcctagcgt ggtgtcccc cggaagtacg ccgcctccac caccgaccac 6480
 agcgacagaa gcctgcgggg cttcgacctg gactggacca ccgactccag cagcaccgcc 6540
 agcgacacca tgagcctgcc cagcctgcag agctgcgaca tcgacagcat ctacgagcct 6600
 atggccccc tcgtggtgac cgccgacgtg caccctgagc cagccggcat cgccgacctg 6660
 gccgccgatg tgcaccaga acccgccgac cactggatc tggaaaacc catccccct 6720
 ccagaccca agaggccgc ctacctggcc agcagagccg ccgagaggcc cgtgcctgcc 6780
 cccagaaagc ccacccagc cccagaaacc gccttcagga acaagctgcc cctgaccttc 6840
 ggcgacttcg acgagcacga ggtggacgcc ctggccagcg gcatcacctt cgcgatattt 6900
 gatgacgtgc tgcggctggg cagagccgga gcctatatct tcagcagcga caccggctcc 6960
 ggccacctgc agcagaaaag cgtgagacag cacaacctgc agtgcgcca gctggacgcc 7020
 gtggaagagg aaaagatgta ccccccaag ctggataccg agcgggaaaa gctgctgtg 7080
 ctgaaaatgc agatgcacce cagcgaggcc aacaagagcc gctaccagtc taggaaggctg 7140
 gagaacatga aggccaccgt ggtggaccgg ctgaccagcg gcgccaggct gtacacaggg 7200
 gccgacgtgg gcagaatccc tacctacgcc gtgcgtacc ccaggccctg gtacagcccc 7260
 accgtgatcg agcggltcag cagcccgac gtggccatcg ccgcctgcaa tgagtacctg 7320
 tctaggaact acccaaccgt ggccagctac cagatcccg atgagtacga tgcctacctg 7380
 gacatgttgg acggcagcga cagctgcctg gaccgggcca cttctgtcc cgccaagctg 7440
 cggtgttacc ccaagcacca cgcctatcac cagccaccg tgagaagcgc cgtgcccagc 7500
 cccttcaga atacctgca gaatgtgtg gccgccgcca ccaagcgga ctgcaacctg 7560
 acccagatga gagaactgcc cacaatggac agcgcctgt ttaacgtgga gtgcttcaag 7620
 agatacgct gcagcgcgga gtactgggag gaatacgcca agcagcccat ccggtaccc 7680
 accgagaaca tcaccaccta cgtgaccaag ctgaagggcc ccaaggccgc cgccctgttc 7740

[0036]

gccaaagaccc acaacctggt gcccttcgag gaagtgccta tggacagggt caccgtggac 7800
 atgaagcggg acgtgaaggt gacctctggc accaagcaca ccgaggaacg gcccagggtg 7860
 caggtgatcc aggccgccga gcctctggcc accgcctatc tgtgcggcat ccaccgggag 7920
 ctggtgcggc ggctgaacgc cgtgttgagg cccaacgtgc acacctgtt cgacatgtcc 7980
 gccgaggact tcgacgccat catgccagc cacttccacc ccggcgaccc agtgcctgaa 8040
 accgatatcg ccagcttcga caagagccag gacgacagcc tggccctgac cggcclgatg 8100
 atcttggaag atctgggcgt ggaccagtac ctgctggatc tgategagge cgctctcggc 8160
 gagatcagca gctgccacct gcctaccggc acccggttca agttcggcgc catgatgaag 8220
 agcggcatgt ttctgacct gttcatcaac acagtgtga alacaccat cgccagcagg 8280
 gtgctggaac agcggctgac cgacagcgcc tgcgcgcct tcctcggega cgacaacatc 8340
 gtgcacggcg tgatecagca caagctgatg gccgagcggg gcgccagctg ggtgaacatg 8400
 gaagtgaaga ttatcgacgc cgtgatgggc gaaaagcccc cctacttctg cggcggcttc 8460
 atctgttcc acagcgtgac acagaccgcc tgcagagtga gcgacccct gaagcggctg 8520
 ttcaagctgg gcaaacctct gacagccgag gacaagcagg acgaggaccg gcggagggcc 8580
 ctgtccgacg aggtgtccaa gtggttccgg accggccttg gcgcagagct ggaagtggcc 8640
 ctgacaagcc gctacgaggt ggagggtgc aagagcatcc tgatectat gccaccctg 8700
 gcccgggaca tcaaggcctt taagaagctg agaggccctg tcctccacct gtacggcgga 8760
 ccccgctgg tgcggtgaga gctcgtgat cagcctcgac tgtgccttct agttgccagc 8820
 catctgttgt ttgcccccc cccgtgcctt ccttgacct ggaaggtgcc actccactg 8880
 tcctttccta ataaatgag gaaattgcat cgcattgtct gactaggtgt catctatc 8940
 tggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg 9000
 cttaatcaac aggccttgcc gcgcggggtc tgggtaagct ctagtctca tgtttgacag 9060
 cttatcatcg ataagcttta atgcggtagt ttagcagcaa ggagtcacaa tgttagaaga 9120
 tctcaaacgc taggtattag aagccaacct ggcgctgcca aaacacaacc tggtcacgct 9180
 cacatggggc aacgtcagc cgttgatcg cgagcgggc gtctttgtga tcaaaccttc 9240
 cggcgctgat tacagcgtca tgaccgctga cgataggctc gtggttagca tcgaaaccgg 9300
 tgaagtgggt gaaggtacga aaaagccctc ctccgacacg ccaactcacc ggtgtctcta 9360
 tcaggcatc cctccattg gcggcatigt gcatacgac tcgcgccacg ccaccatctg 9420
 ggcgaggcg ggtcagtcga ttccagcaac cggcaccacc cagccgact atttctacgg 9480
 caccattccc tgcacccgca aatgaccga cgcagaaatc aacggcgaat atgagtggga 9540
 aaccggtaac gtcacgttag aaaccttga aaaacagggt atcgatgcag cgcaaatgcc 9600
 cggcgttctg gtccattccc acggccggtt tgcattgggc aaaaatgcg aagatcggt 9660
 gcataacgcc atcgtgtcgg aagagtcgc ttatatggg atattctgcc gtcagtlagc 9720
 gccgcagtta ccgatatgc agcaaacgct gctggataaa cactatctgc gtaagcatgg 9780
 cgcgaaggca tattacgggc agtaatgaca gccgcctaa tgagcgggct ttttttcca 9840
 tgacaaaaat ccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga 9900
 tcaaaggatc ttcttgagat ctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaanaa 9960
 aaccacgct accagcgggt gtttgttgc cggatcaaga gclaccaact ctttttccga 10020
 aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt cttctagt tagccgtagt 10080
 taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgtctg ctaatcctgt 10140
 taccagtggc tgcgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat 10200

	agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacggggggg ttcgtgca	10248
	<210> 7	
	<211> 10258	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 质粒pHEF1aHTLV-Nsp1234	
	<400> 7	
	cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat	60
	gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaaa aggcggacag giatccggtg agcggcaggg	120
	tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc	180
	ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc	240
	ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcat cgataaaata aaagatttta tttagtctcc	300
	agaaaaaggg gggaatgaaa gacccacact gtaggtttgg caagctagcg tatacggatc	360
	ctctagctag agctccggtg cccgtcagtg ggcagagcgc acatcgccca cagtccccga	420
	gaagttgggg ggaggggtcg gcaattgaac cgggtcctag agaaggtggc gcggggtaaa	480
	ctgggaagt gatgtcgtgt actggciccg ctttttccc gagggggggg gagaaccgta	540
	tataagtgca gtagtcgctg tgaacgttct ttttcgcaac gggtttgccc ccagaacaca	600
	gctgaagctt cgaggggtc gcactctctc ttcacgcgcc cgcgcacctc cctgaggccg	660
	ccatccacgc cggttgagtc gcgttctgcc gcctcccgcc tgtggtgctt cctgaactgc	720
	gtccgccgtc taggtaagtt taaagctcag gtcgagaccg ggcctttgtc cggcgtcccc	780
	ttggagccta cctagactca gccggctctc cacgctttgc ctgacctgc ttgctcaact	840
[0037]	ctacgtcttt gtttcgtttt ctgttctgcg ccgttacaga tccaagctgt gaccggcgcc	900
	tactccggtc gccaccatgg ccgccaaggt gcacgtggac atcgaggccg acagccctt	960
	catcaagagc ctgcagaagg ccttccccag cttcgaggig gagtccctgc aggtgacccc	1020
	caacgaccac gccaacgccg gggecttcag ccacctggcc accaagctga tcgagcagga	1080
	aaccgacaag gacacctga tcttgacat cggcagcgcc cctcaaggt gagtttgggg	1140
	acctttgatt gttcttctt tttcgtatt gtaaaattca tgttatatgg agggggcaaa	1200
	gttttcaggg tgttgtttag aatgggaaga tgtcccttgt atcactatgg acctcatga	1260
	taattttgtt tctttcactt tctactctgt tgacaacct tgttctctt tattttcttt	1320
	tcattttctg taacttttct gttaaacttt agcttgcat tgltaacgaat tttaaattc	1380
	acttttgttt atttgcaga ttgtaagtac tttctctaat cacttttttt tcaaggcaat	1440
	cagggtatat tatattgtac ttcagcacag ttttagagaa caattgttat aattaaatga	1500
	taaggtagaa tatttctgca tataaattct ggctggcgtg gaaalatctt tattggtaga	1560
	aacaactaca ccctggctcat catcctgcct tctctttat ggttacaatg atataactg	1620
	tttgagatga ggataaaata ctctgagtc aaaccgggcc cctctgctaa ccatgttcat	1680
	gcctttctt ttttctaca ggcggatgat gagcacccac aagtaccact gcgtgtgcc	1740
	catgcggagc gccgaggacc ccgagcggct ggtgtgctac gccagaagc tggccggccg	1800
	cagcggcaag gtgctggacc gggagatcgc cggcaagatc accgacctgc agacctgat	1860
	ggccaccccc gaccccgaga gcccacact ctgctgcac accgacgtga cctgccggac	1920
	agcccgccgag gtggccgtgt accaggacgt gtacgcctg cacgccccca cctccctgta	1980
	ccaccaggcc atgaaggcgc tgcggaccgc ctactggatc ggcttcgaca ccacccctt	2040

[0038]

```

catgttcgac gccctggccg gagcctaccc cacctacgcc accaactggg ccgacgagca 2100
ggtgctgcag gcccggaaca tggcctgtg cggcccgagc ctgaccgagg gccggctggg 2160
caagctgtcc atctcgcga agaagcagct gaagccctgc gacaccgtga tgttcagcgt 2220
gggcagcaca ctgtacaccg agagccgaa gctgctgcgg agctggcacc tggccagcgt 2280
gttccacctg aagggaagc agagcttcac ctgcagatgc gacaccatcg tgagctgcga 2340
gggtactgtg gtgaagaaa tcaccatgig ccctggcctg tacggcaaga ccgtgggcta 2400
cgccgtgacc taccacgccg agggctttct ggtgtgcaag accaccgata ccgtgaaggg 2460
cgagagagtg agcttcccc tcigcaccta cgtgcccgag accatctgcg accagatgac 2520
cggtatcctg gccaccgatg tgacccccga ggacggccag aaactgctgg tcggcctgaa 2580
ccagcggate gtggtgaacg gccggaccca gcggaacacc aacaccatga agaactacct 2640
gtgcccac cgtggcctgg ccttcagcaa gtgggcccaga gactacaagg ccgacctgga 2700
cgacgagaag cccctgggcg tggggagcg gagcctgacc tgctgtgccc tgtgggcctt 2760
caagaccggg aagatgcaca ccatgtacaa gaagcccgac acccagacca tcgtgaaggt 2820
ggccagcgag ttcaacagct lcgtgatccc cagcctgtgg agcaccggcc tggccatccc 2880
cgtgcggagc cggatcaaga tgctgctggc caagaaaacc aagcgggagc tgatccccgt 2940
gctggagccc agcagcgcca gggacggcga gcaggaagag aaagagcggc tggaaaggca 3000
gctgaccggg gagggcctgc cccccctggt gcctatgcc cctgccgaga ccggcgtggt 3060
ggacgtggat gtggaggaac tggaaacca cggcgagccc ggggtgtgg agacccccag 3120
atccgccctg aaggtgacag cccagcccaa cgacgtgtg ctgggcaact acgtggtgct 3180
gtccccccag accgtgtga agagcagcaa gctggcccc gtgcaccctc tggccgagca 3240
ggtgaagatc atcaccaca acggcaggcg cggcagatac caggtcgacg gctacgacgg 3300
ccgggtgtg ctgcctgcg gctccgccat cctgtgccc gagttccagg cctgagcga 3360
gagcggcaca atggtgtaca acgagcggga gttcgtgaac cggaagctgt accacattgc 3420
cgtgcacggc cctagcctga acaccgatga ggaaaactac gagaagtgcc ggcccgagcg 3480
gaccgatgcc gactacgtgt tcgacgtgga caagaaatgc tgctgtaagc gggaggaagc 3540
cagcgggctg gtgtgtgtgc gggagctgac caaccccccc ttccacgagt tcgcctacga 3600
ggccctgaag atccggcct cggcccccta caagaccaca gtgtggggcg tgttcggcgt 3660
gcccggcagc ggcaagagcg ccatcatcaa gtccctgggt accaagcacg acctggtgac 3720
ctccggcaag aaagagaact gccaggaaat cgtcaacgac gtcaagaagc accggggcct 3780
ggacatccag gccaaagacg tggacagcat cctgtgaac ggctgcagac gggccgtgga 3840
tatcctgtac gtggacgagg ccttcgcctg ccacagcgcc acctgtgtgg cctgatcgc 3900
cctggtgaag ccccgtcca aggtgtgtgt gtgcggcgac cccaagcagt gcggcttctt 3960
caacatgatg cagctgaagg tgaacttcaa ccacaacatc tgcaccgaag tgtgccaaa 4020
gagcatcagc cggcgggtga ccagaccgtg gaccgccatc gtgtccacc tgcactacgg 4080
cgcaagatg cggaccacca acccctgcaa caagcccatc atcatcgata ccaccggcca 4140
gaccaagccc aagcccgcg acatcgtgtg gacctgttc cggcgctggg tgaagcagct 4200
gcagctggac taccggggcc acgaggtgat gaccggccc gcctcccagg gcctgaccag 4260
aaaggcgctg tatccgtgc ggcagaaggt gaacgagaa cccctgtacg cccctgccag 4320
cgagcacgtg aatgtgtgc tgaccggac cgaggacagg ctggtgtgga aaacctgtgc 4380
cggcgacccc tggatcaagg tgctgtccaa catccccag ggcaacttca ccgccacct 4440
ggaagagtgg cagggaagac acgacaagat catgaaggtg atcgaggccc ctgccgcccc 4500

```

[0039]

```

agtggacgcc ttccagaaca aggccaaact gtgctgggcc aagagcctgg tgcctgtgct 4560
ggacaccgcc ggcatccggc tgaccgccga agagtggagc accatcatca ccgccttcaa 4620
agaggaccgg gcctacagcc ccgtggtggc cctgaacgag atctgcacca agtactacgg 4680
cgtggacctg gacagcggcc tgttcagcgc cccaaggtg tcctgtact acgagaacaa 4740
ccactgggac aaccggccag gcggcaggat gtacggcttc aacgcccca ccgccccag 4800
actggaagcc cggcacacct ttctgaaggg ccagtggcac accggcaagc aggcctgat 4860
cgccgagaga aagatccagc cctgtccgt gctggataac gtatcccta tcaaccggcg 4920
gtgccccac gccctggtgg ccgagtaca gacagtgaag ggcagccggg tggagtggct 4980
ggtgaacaaa gtgcggggt accacgtgct gctggtgtct gagtacaacc tggccctgcc 5040
tcggcggagg gtgacctggc tgtccctct gaacgtgaca ggcgccgaca ggtgctacga 5100
cctgagcctg ggcctgccig ccgacgccgg cagattcgac ctggtgttcg tgaacatcca 5160
caccgagttc agaatccacc actaccagca gtgcgtggac cagccatga agctgcagat 5220
gctggcgccg gacgccctga ggctgctgaa gcctggcgcc agcctgctga tgcgggccta 5280
cggctacgcc gacaagatct ccgaggccgt ggtgtccagc ctgagccgga agttcagctc 5340
cgccagggtg ctgagaccgg actgcgtgac cagcaacaca gaagigtctc tgcgttcag 5400
caacttcgac aacggcaagc ggcccagcac cctgcaccag atgaacacca agctgtccgc 5460
cgtgtacgcc ggcgaggcca tgcacaccgc cggatgcgcc ccagctacc gggtaagcgc 5520
ggccgacatc gccacctgca ccgaggccgc cgtggtgaat gccccaatg ccaggggcac 5580
cgtggcgccg ggcgtgtgca ggcgcgtggc caaaaagtgg ccagcgcct tcaaggcgca 5640
ggccaccctt gtgggcacca tcaaaacct gatgtgggc agctaccccg tgatccacgc 5700
cgtggccccc aatttcagcg ccaccacaga ggcgagggc gaccgggaac tggccgccgt 5760
gtatagagcc gtggcccgcc aagtgaacag actgagcctg agcagcgtgg ccatacctct 5820
gctgtccacc ggcgtgttca gcggcgccag ggaccggctg cagcagagcc tgaaccacct 5880
gttaccgcct atggacgcca ccgacgccga cgtgacaatc tactgccggg acaagagctg 5940
ggagaagaag atccaggaag ccategacat gaggaccgcc gtggagctgc tgaacgacga 6000
cgtggagctg acaaccgacc tgggtgcgct gcaccccgac agcagcctgg tggccggaa 6060
gggtacagc accaccgacg gctccctgta cagctacitc gagggcacca agttcaacca 6120
ggccgccatc gatatggccg agatcctgac cctgtggccc aggcctgcagg aagccaacga 6180
gcagatctgt ctgtacgccc tgggcgagac aatggacaac atccggtcca agtgcctcgt 6240
gaacgacagc gacagcagca cccccctcg gaccgtgccc tgcctgtgca gatagccat 6300
gaccgccgag cggatcgccc ggctgcggag ccaccagtg aagagcatgg tgggtgcag 6360
cagcttcccc ctgcccaagt accacgtgga tggcgtgcag aaagtgaagt gcgagaaggt 6420
gctgtgttc gacccaccg tgcctagcgt ggtgtccccc cggaagtac ccgcctccac 6480
caccgaccac agcgacagaa gcctgcgggg ctctgacctg gactggacca ccgactccag 6540
cagcacccgc agcgacacca tgagcctgcc cagcctgcag agctgcgaca tcgacagcat 6600
ctacgagcct atggcccca tcgtggtgac cgccgacgtg caccctgagc cagccggcat 6660
cgccgacctg gccgccgatg tgcacccaga acccgccgac cagtggtatc tggaaaaccc 6720
catccccct cccagaccca agaggccgc ctacctggcc agcagagccg ccgagaggcc 6780
cgtgcctgcc cccagaaagc ccacccagc cccagaacc gccttcagga acaagctgcc 6840
cctgaccttc ggcgacttcg acgagcacga ggtggacgcc ctggccagcg gcatcacctt 6900

```

	cggcgatttt gatgacgtgc tgcggctggg cagagccgga gcctatatct tcagcagcga	6960
	caccggctcc ggccacctgc agcagaaaag cgtgagacag cacaacctgc agtgcgcca	7020
	gtctgacgcc gtggaagagg aaaagatgta ccccccaag ctggataccg agcgggaaaa	7080
	gtctgtctg ctgaaaatgc agatgcaccc cagcgaggcc aacaagagcc gctaccagtc	7140
	taggaagggt gagaacatga aggccaccgt ggtggaccgg ctgaccagcg gcgccaggct	7200
	gtacacaggg gccgacgtgg gcagaatccc tacctacgcc gtgcgctacc ccaggcccg	7260
	gtacagcccc accgtgatcg agcgggttcag cagccccgac gtggccatcg ccgctgcaa	7320
	tgagtacctg tctaggaact acccaaccgt ggccagctac cagatcaccc atgagtaaga	7380
	tgcttacctg gacatgtgtg acggcagcga cagctgcctg gaccgggcca cttctgtcc	7440
	cgccaagctg cgggtctacc ccaagcacca cgcctatcac cagcccaccg tgagaagcgc	7500
	cgtgcccagc cccltcaga ataccctgca gaatgtgtg gccgcgccca ccaagcgga	7560
	ctgcaacgtg acccagatga gagaactgcc cacaatggac agcgccgtgt ttaacgtgga	7620
	gtgtctcaag agatagcct gcagcggcga gtactgggag gaatacgcca agcagcccat	7680
	ccggatcacc accgagaaca tcaccaacta cgtgaccaag ctgaagggcc ccaaggccgc	7740
	cgcctgttc gccaaagacc acaacctggt gccctgcag gaagtgccta tggacaggtt	7800
	caccgtggac atgaagcggg acgtgaaggt gacccctggc accaagcaca ccgaggaacg	7860
	gcccgaagggt caggatgacc aggcgccga gcctctggcc accgcctatc tgtgcggcat	7920
	ccaccgggag ctggtgcgac ggctgaacgc cgtgtgagg cccaacgtgc acacctgtt	7980
	cgacatgtcc gccgaggact tcgacgccat catcgccage cacttcaccc ccggcgaccc	8040
	agtgctggaa accgatatcg ccagcttcga caagagccag gacgacagcc tggccctgac	8100
[0040]	cggcctgatg atcciggaag atctgggctg ggaccagtac ctgtggatc tgatcgagge	8160
	cgccttggcg gagatcagca gtgcacact gcctaccggc acccggttca agtgcggcg	8220
	catgatgaag agcggcatgt ttctgacct gtccatcaac acagtgtga atalcacat	8280
	cggcagcagg gtgttggaac agcggctgac cgacagcgc tgcgccctc tcacggcgga	8340
	cgacaacatc gtgcacggcg tgatcagcga caagctgatg gccgagcgtg gcgccagcig	8400
	ggtgaacatg gaagtgaaga ttatcgacgc cgtgatgggc gaaaagcccc cctacttctg	8460
	cggcggttc atcgtgttcg acagcgtgac acagaccgcc tgcagagtga gcgacccct	8520
	gaagcggctg ttcaagctgg gcaaacctct gacagccgag gacaagcagg acgaggaccg	8580
	gcggagggcc ctgtccgacg aggtgtccaa gtggttccgg accggcctgg gcgccagct	8640
	ggaagtggcc ctgacaagcc gctacgaggt ggagggtgc aagagcatcc tgatcgctat	8700
	ggccaccctg gccgggaca tcaaggcctt taagaagctg agaggccctg tcacccacct	8760
	gtacggcgga ccccggtg tgcggtgaga gctcgtgat cagcctcgac tgtgccttct	8820
	agttgccagc catctgttgt ttgccctcc cccgtgcctt cttgacctt ggaaggtgcc	8880
	actccactg tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct gtagtagtgt	8940
	cattctatc tgggggttg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat	9000
	agcaggcatg cttaatatc aggccttggc gcgccgggtc tgggtaagct ctagtctca	9060
	tglttgacag cttatcatcg ataagcttta atgcggtagt ttagcacgaa ggagtcaaca	9120
	tgttagaaga tctcaaagc taggtattag aagccaacct ggcgctgcca aaacacaacc	9180
	tggtcacgct cacatggggc aacgtcagcg ccgttgatcg cgagcgcggc gtctttgtga	9240
	tcaaacctc cggcgtgat tacagcgtca tgaccgctga cgatatggtc gtggttagca	9300
	tcgaaccggg tgaagtgggt gaaggtacga aaaagccctc ctccgacacg ccaactcacc	9360

	ggctgctcta tcaggcattc ccctccattg gcggcattgt gcatacgcac tcgcgccacg	9420
	ccaccatctg ggcgcaggcg ggtcagtcga ttccagcaac cggcaccacc cagccgact	9480
	atttctacgg caccattccc tgcacccgca aaatgaccga cgcagaaatc aacggcgaat	9540
	atgagtggga aaccggtaac gtcacgtag aaacctttga aaaacagggt atcgatgcag	9600
	cgcaaatgcc cggcgttctg gtccattccc acggcccgtt tgcattgggc aaaaatgccg	9660
	aagatgcggt gcataacgcc atcgtgctgg aagaggtcgc ttatatgggg atattctgcc	9720
	gtcagittagc gccgcagtta cgggatatgc agcaaacgct gctggataaa cactatctgc	9780
[0041]	gtaagcatgg cgcaaggca tattacgggc agtaatgaca gcccgcctaa tgagcgggct	9840
	tttttttcca tgaccaaact ccctaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc	9900
	gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ccttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg	9960
	caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact	10020
	ctttttccga aggttaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ctttctagt	10080
	tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg	10140
	ctaactctgt taccagtggc tgcigccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac	10200
	tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgca	10258

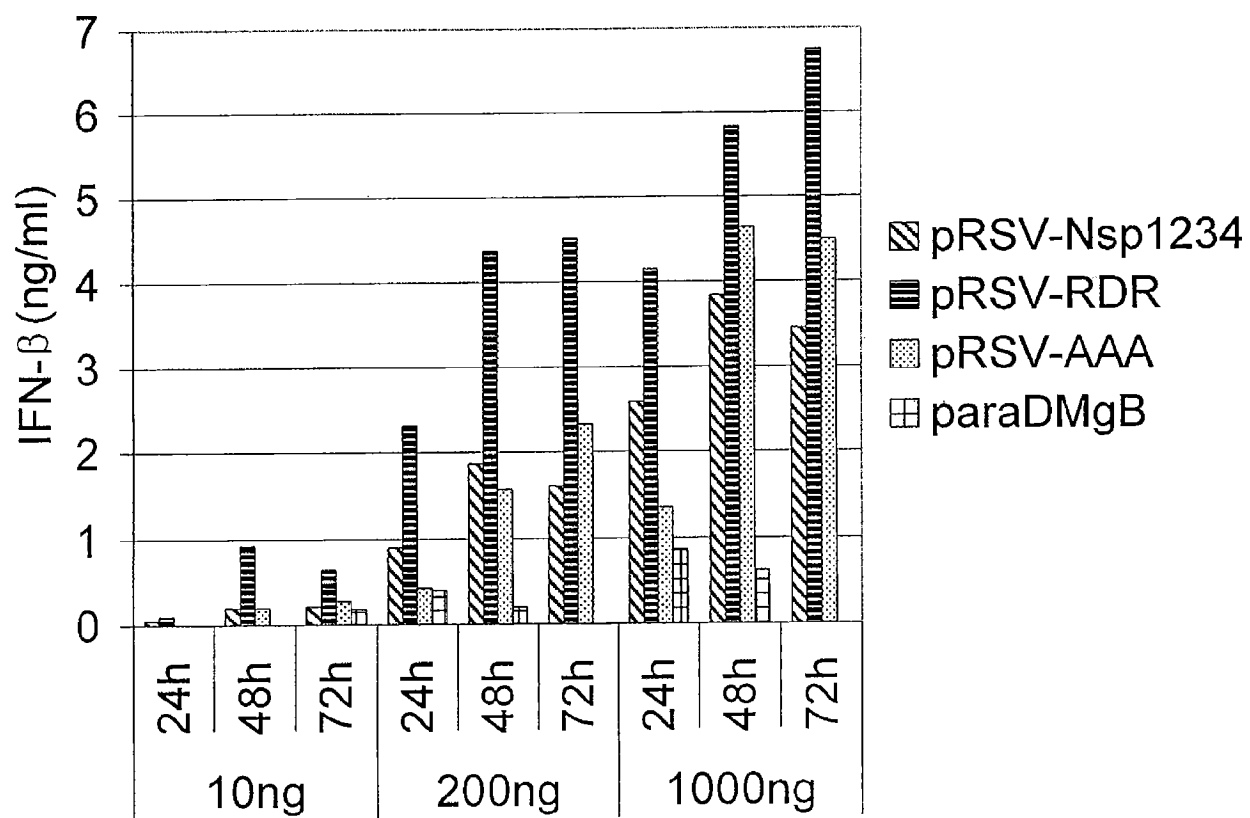


图1

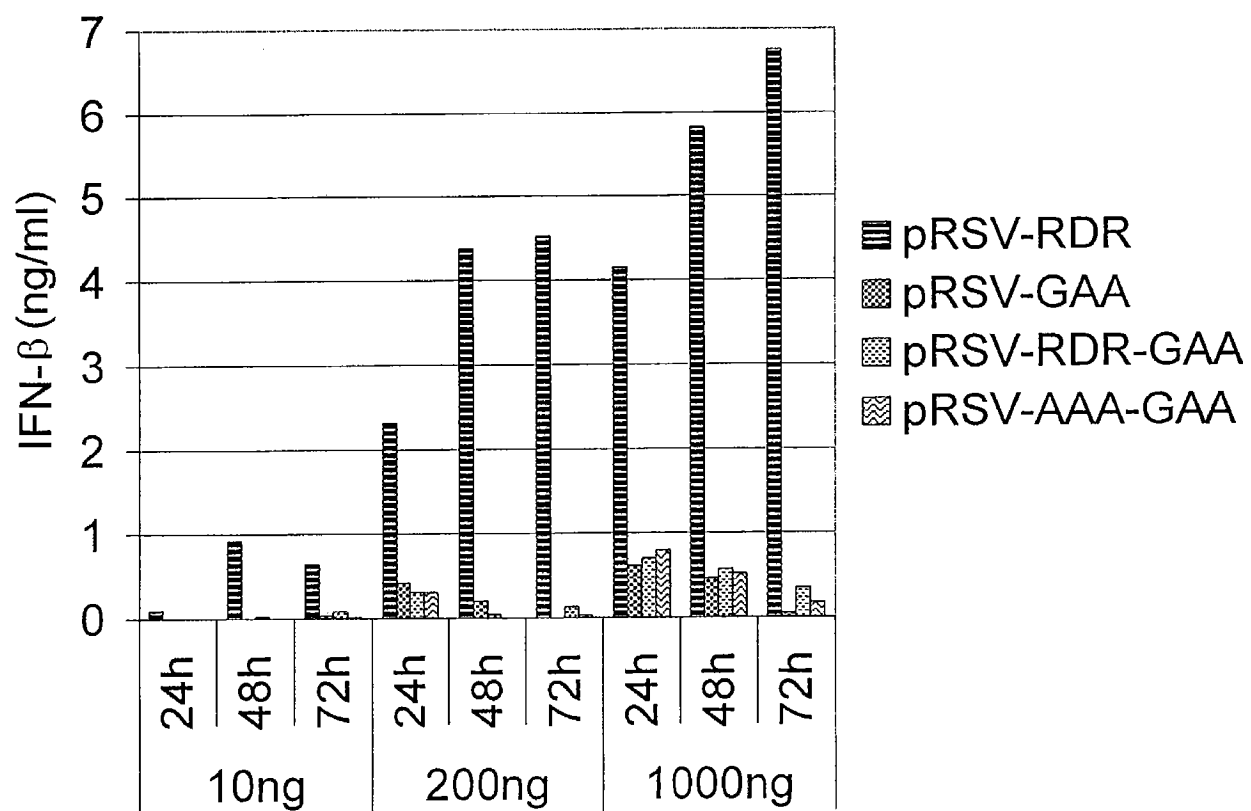


图2

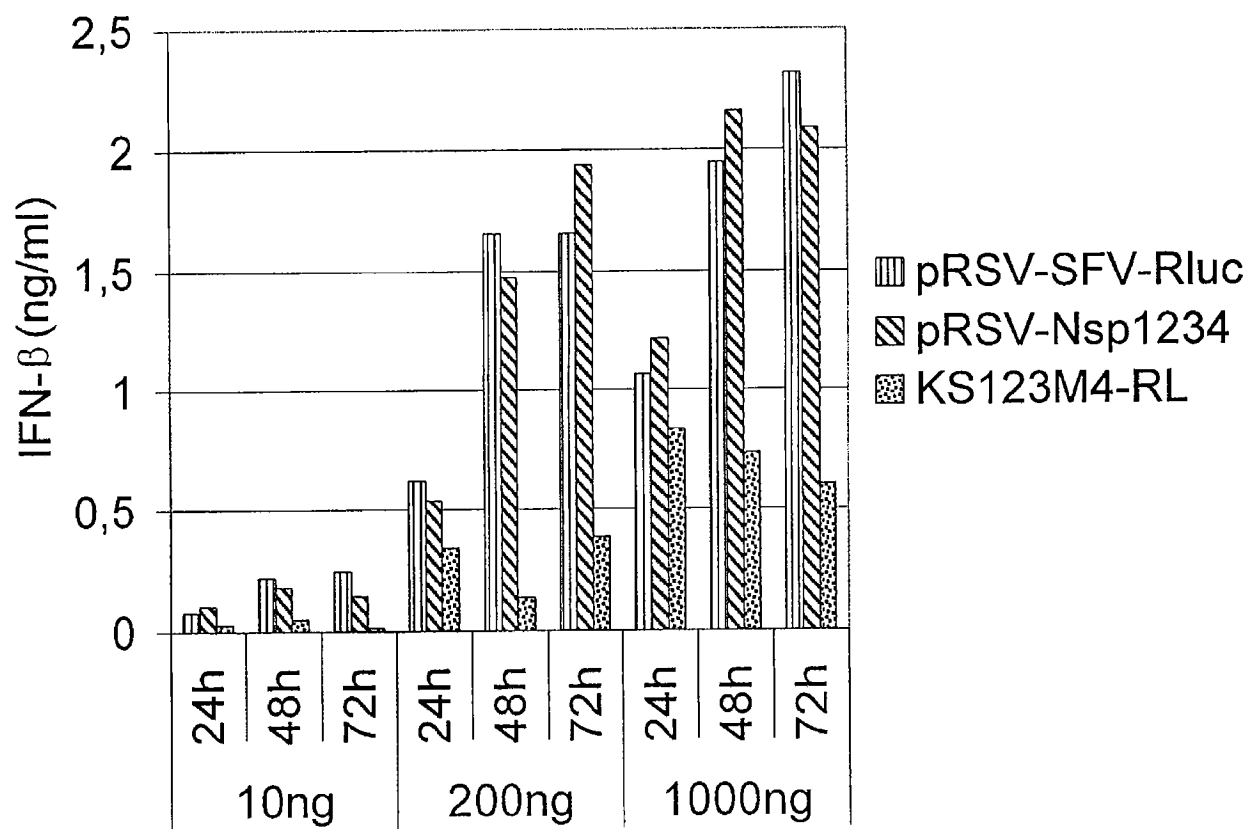


图3

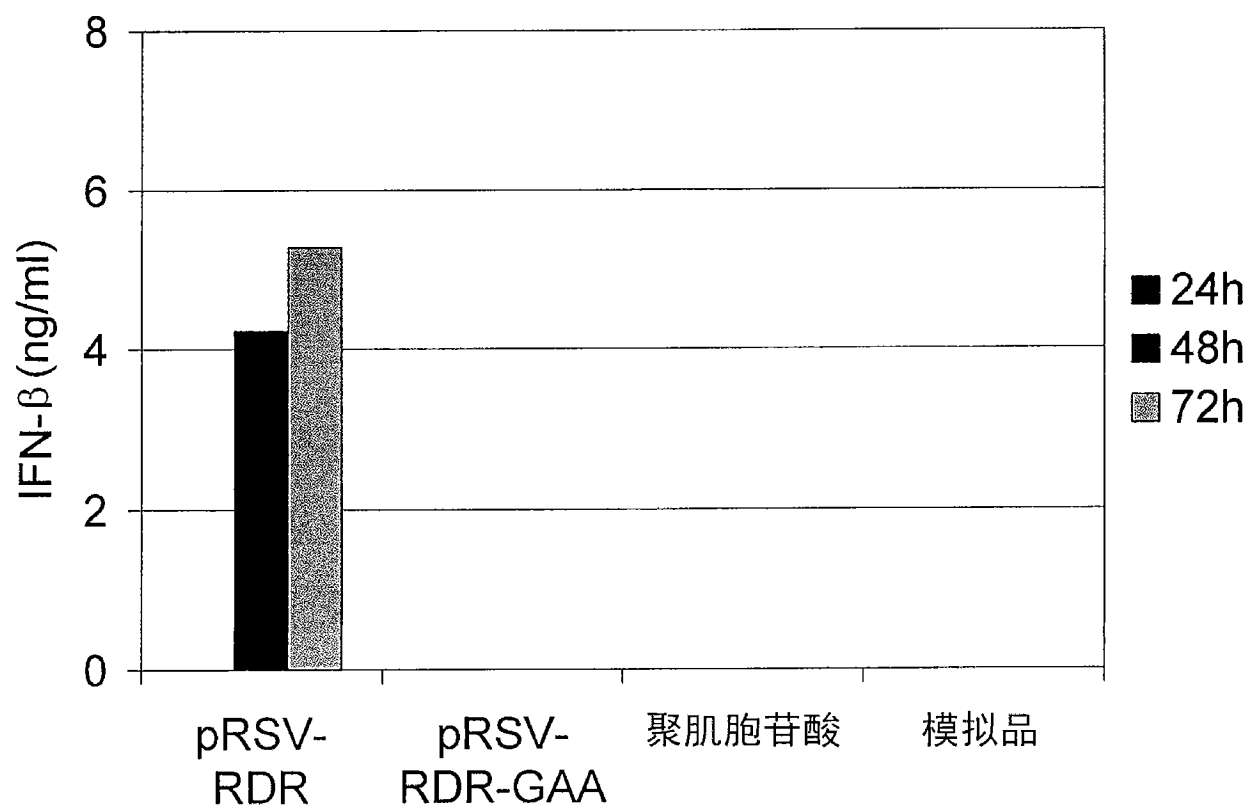


图4

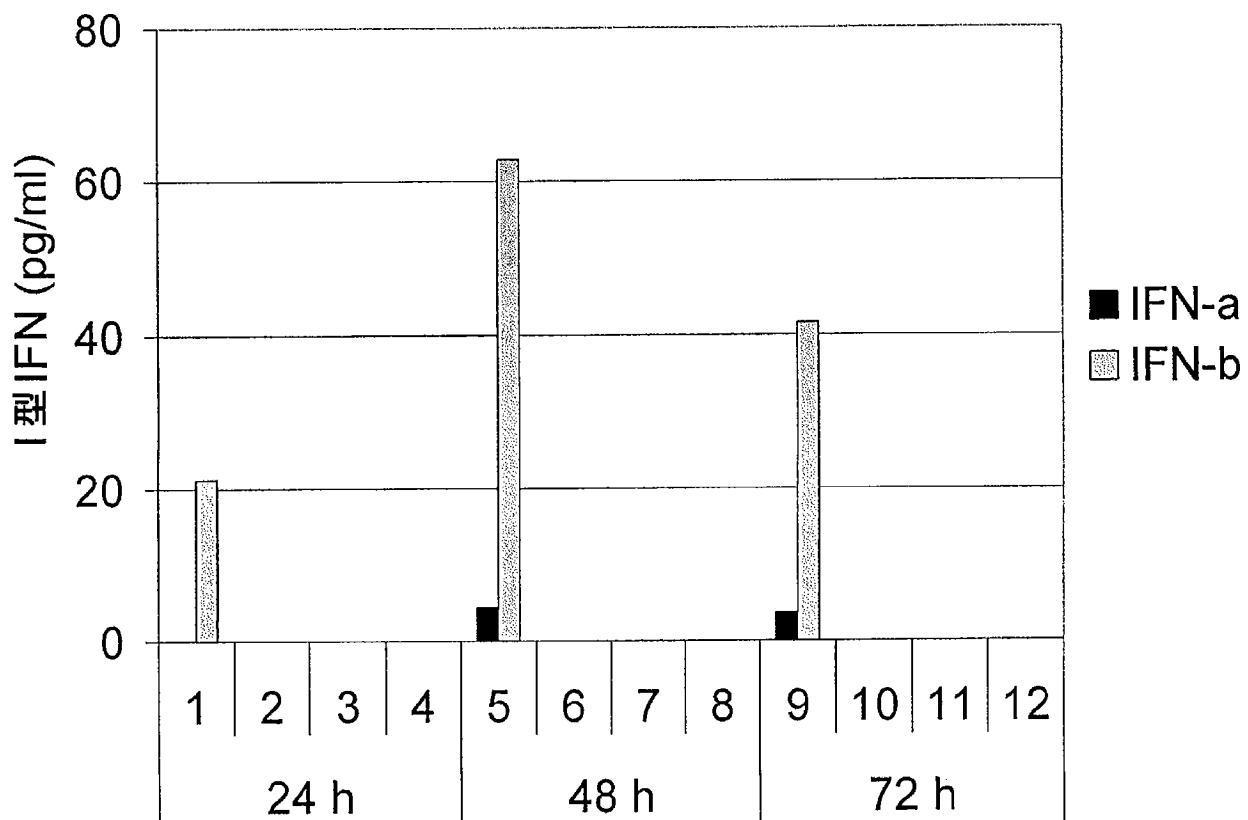


图5

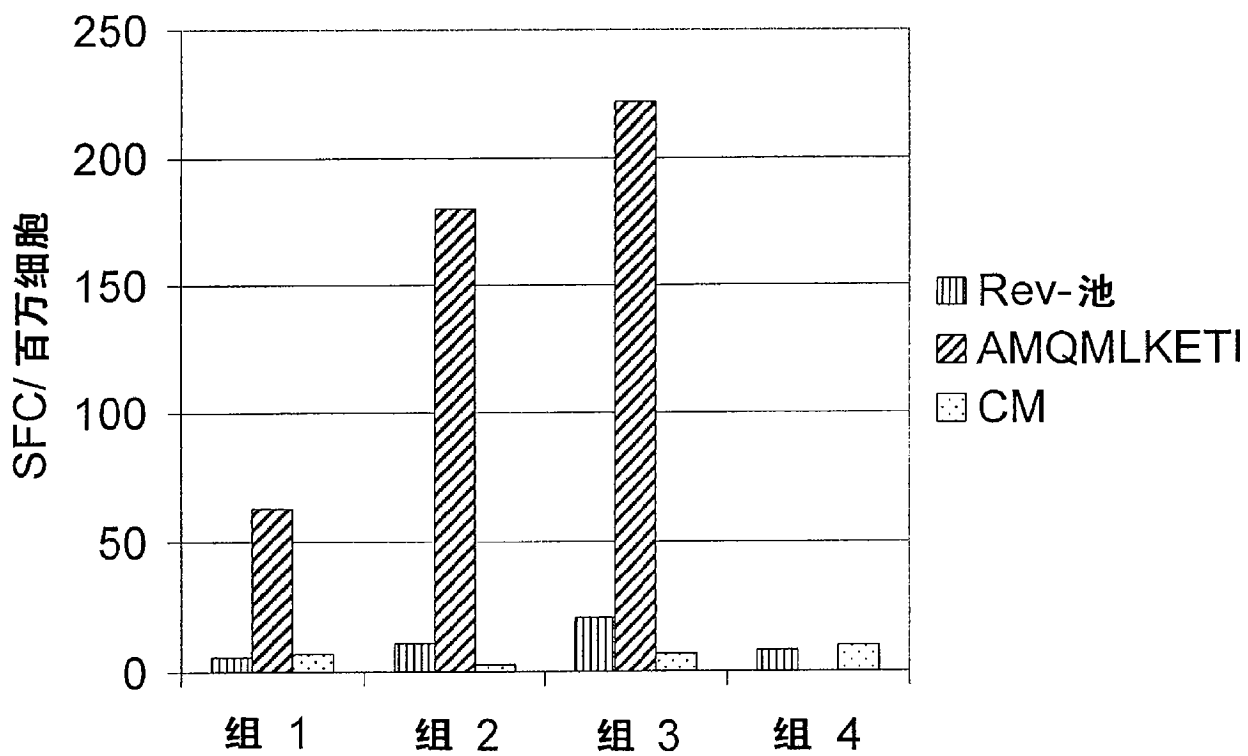


图6

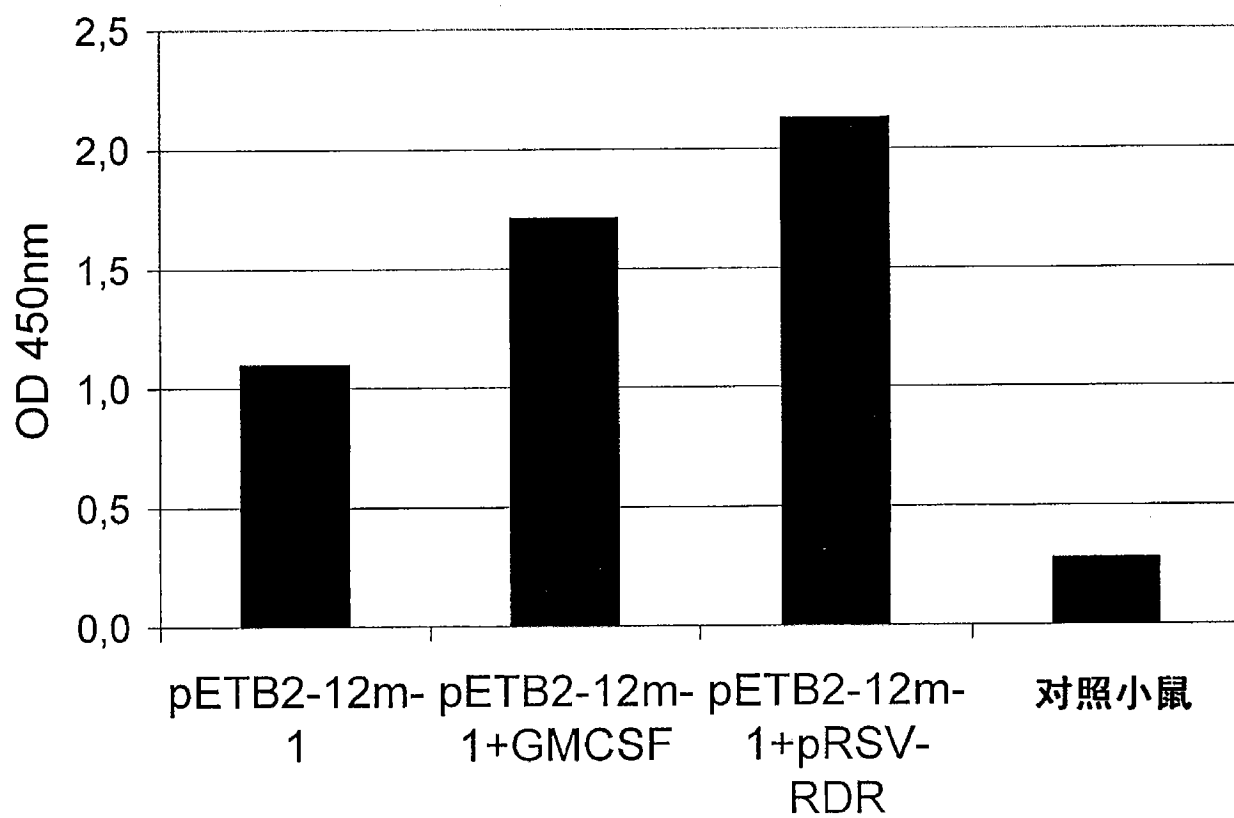


图7

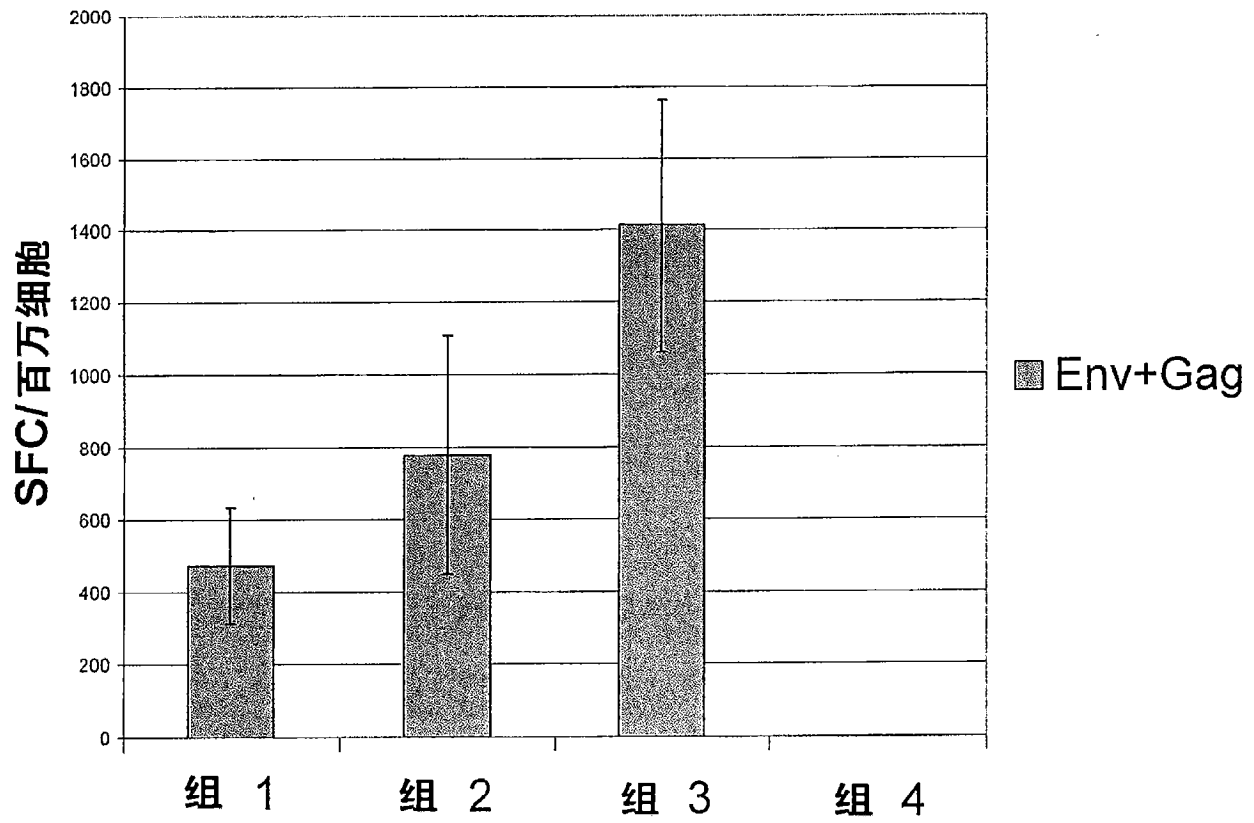


图8

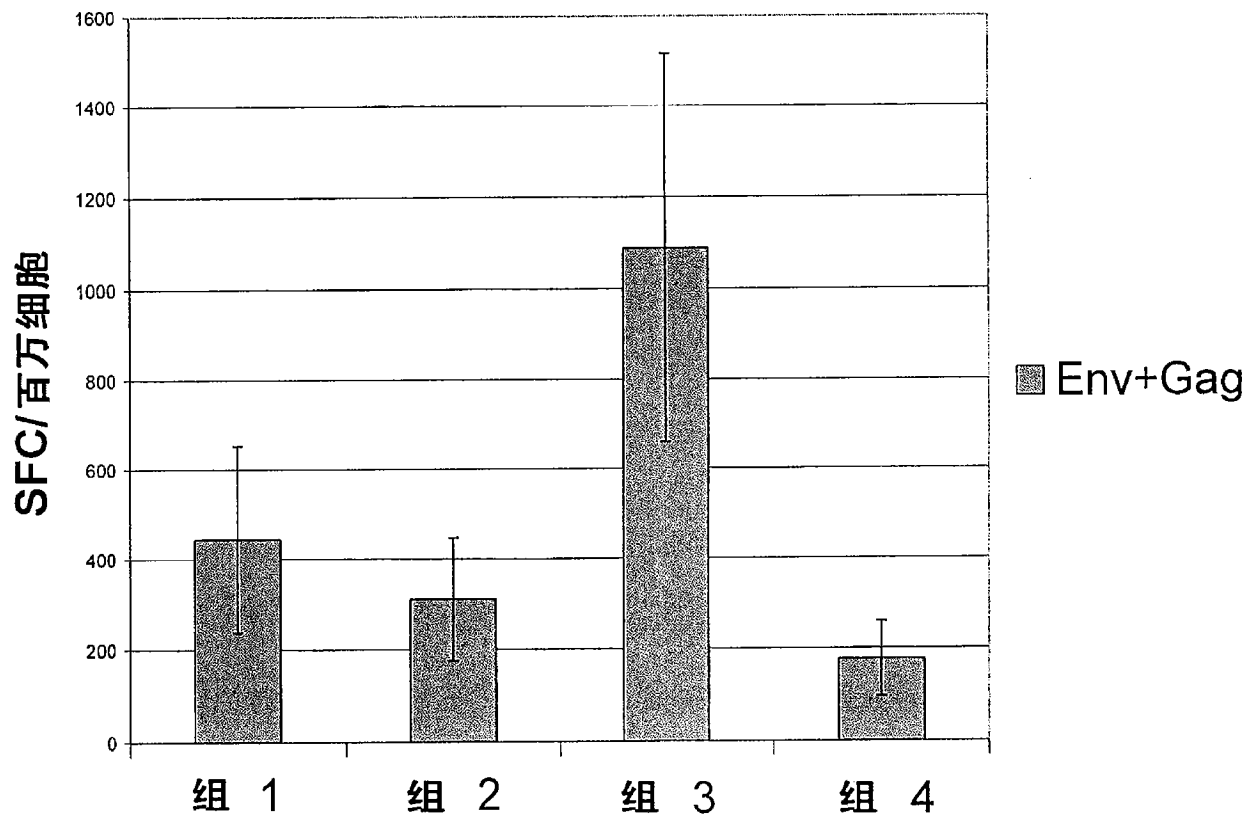


图9