



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0044836  
(43) 공개일자 2011년05월02일

(51) Int. Cl.

C12N 9/12 (2006.01) C12N 15/85 (2006.01)  
A61K 38/45 (2006.01) A61K 39/39 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7029034

(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년05월22일  
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2010년12월23일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2009/056240

(87) 국제공개번호 WO 2009/141434  
국제공개일자 2009년11월26일

(30) 우선권주장

61/071,898 2008년05월23일 미국(US)

(71) 출원인

펫 바이오테크 오와이

핀랜드 에프아이-33520 탐페레 바이오카투 8

(72) 발명자

키이버 카자

에스토니아 이이-51006 타르투 에이.에이치 탐사  
아르 3-9

시쿠트 레인

에스토니아 이이-50411 타르투 라자 스트리트 1  
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김성기, 강승옥

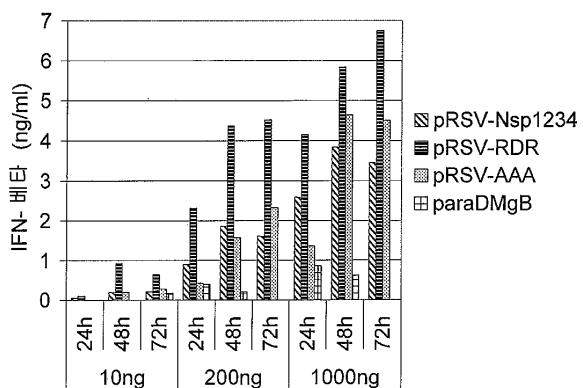
전체 청구항 수 : 총 43 항

(54) 알파바이러스 레플리카제를 코딩하는 발현 벡터 및 면역 보조제로서 이의 용도

### (57) 요 약

본 발명은 면역계 조절 보조제로서 사용하기 위한, 알파바이러스 레플리카제, 특히 셀리키 포레스트 바이러스 레플리카제, 또는 알파바이러스를 코딩하는 발현 벡터에 관한 것으로서, 상기 알파바이러스 레플리카제는 RNA 의존적 RNA 중합효소 활성을 포함한다. 알파바이러스 레플리카제는 백신과 조합되어 그 안에서 보조제 기능을 제공하도록 사용될 수 있는데, 백신에 존재시에, 이 조합물을 투여받은 피험체는, 백신 단독으로 이를 필요로하는 피험체에 투여될 경우와 비교하여 면역 반응에 대한 추가 증가가 일어난다. 본 발명의 목적은 오늘날 백신과 함께 사용되는 보조제에 이점을 제공하는, 효율적이고 용이하게 투여되는, 종-독립적 보조제를 제공하는 것이다.

**대 표 도** - 도1



(72) 발명자

**투츠 우르베**

에스토니아 이이-50415 타르투 아르달라 146-1

**웰더 타모**

에스토니아 이이-50415 타르투 우우스 13씨-77

**멘니크 안드레스**

에스토니아 이이-50409 타르투 나이투스 스트리트  
9-4

**우스타브 마르트**

에스토니아 이이-50604 타르투 자아마 스트리트 5  
8에이

**칼드마 카트린**

에스토니아 이이-51007 타르투 헤르네 40-1

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

면역계를 조절하기 위한 보조제로 사용하기 위한 알파바이러스 레플리카제로서, RNA 의존적 RNA 중합효소를 포함하는 것인 알파바이러스 레플리카제.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 알파바이러스는 셈리키 포레스트 바이러스(Semliki Forest Virus)인 알파바이러스 레플리카제.

### 청구항 3

제2항에 있어서, 레플리카제의 아미노산 서열은 서열번호 1에 실질적으로 상응하는 것인 알파바이러스 레플리카제.

### 청구항 4

제3항에 있어서, 레플리카제는 nsP2 영역이 돌연변이되어 서열번호 1의 위치 1185-1187에 돌연변이체 RRR>RDR이 생성되는 것인 알파바이러스 레플리카제.

### 청구항 5

제3항에 있어서, 레플리카제는 nsP2 영역이 돌연변이되어 서열번호 1의 위치 1185-1187에 돌연변이체 RRR>AAA가 생성되는 것인 알파바이러스 레플리카제.

### 청구항 6

면역계를 조절하기 위한 보조제로 사용하기 위한, 제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 정의된 바와 같은 알파바이러스 레플리카제를 코딩하는 발현 벡터.

### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 벡터는 DNA 벡터인 발현 벡터.

### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 레플리카제 또는 상기 레플리카제를 코딩하는 발현 벡터는 약학적으로 허용되는 부형제 및/또는 성분과 함께 제제화되는 것인 알파바이러스 레플리카제 또는 발현 벡터.

### 청구항 9

면역계를 조절하기 위한 보조제로서의 알파바이러스 레플리카제의 용도로서, 상기 레플리카제는 RNA 의존적 RNA 중합효소를 포함하는 것인 용도.

### 청구항 10

제9항에 있어서, 상기 알파바이러스는 셈리키 포레스트 바이러스인 용도.

### 청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 레플리카제의 아미노산 서열은 서열번호 1에 실질적으로 상응하는 것인 용도.

### 청구항 12

제11항에 있어서, 레플리카제는 nsP2 영역이 돌연변이되어 서열번호 1의 위치 1185-1187에 돌연변이체 RRR>RDR이 생성되는 것인 용도.

### 청구항 13

제11항에 있어서, 레플리카제는 nsP2 영역이 돌연변이되어 서열번호 1의 위치 1185-1187에 돌연변이체 RRR>AAA가 생성되는 것인 용도.

### 청구항 14

면역계를 조절하기 위한 보조제로서의, 제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 정의된 바와 같은 알파바이러스 레플리카제를 코딩하는 발현 벡터의 용도.

### 청구항 15

제14항에 있어서, 상기 벡터는 DNA 벡터인 용도.

### 청구항 16

제9항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 레플리카제는 약학적으로 허용되는 부형제 및/또는 성분과 함께 제제화되는 것인 용도.

### 청구항 17

감염성 질환의 예방 및/또는 치료를 위한 약물을 제조하기 위한 백신 조성물에서의, 제9항 내지 제16항 중 어느 하나의 항에 정의된 바와 같은 알파바이러스 레플리카제의 용도.

### 청구항 18

제17항에 있어서, 상기 백신 조성물은 박테리아성 질환의 예방 및/또는 치료를 위해 사용되는 것인 용도.

### 청구항 19

암의 예방 및/또는 치료를 위한 약물을 제조하기 위한 백신 조성물에서의, 제9항 내지 제16항 중 어느 하나의 항에 정의된 바와 같은 알파바이러스 레플리카제의 용도.

### 청구항 20

제17항에 있어서, 상기 레플리카제는 바이러스성 질환의 예방 및/또는 치료를 위해 사용되는 것인 용도.

### 청구항 21

제20항에 있어서, 바이러스성 질환은 HIV인 용도.

### 청구항 22

제17항 내지 제21항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 백신 조성물은 단백질 기반의 백신을 포함하는 것인 용도.

### 청구항 23

제17항 내지 제21항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 백신 조성물은 1 이상의 항원(들)을 코딩하는 발현 벡터를 포함하는 것인 용도.

### 청구항 24

제23항에 있어서, 상기 레플리카제 및 상기 1 이상의 항원(들)은 동일한 발현 벡터에 의해 코딩되는 것인 용도.

### 청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서, 상기 1 이상의 항원(들)을 코딩하는 발현 벡터는 DNA 벡터인 용도.

### 청구항 26

제25항에 있어서, 상기 벡터는 하기 a) 및 b)를 포함하는 발현 벡터이고, 이때 상기 벡터는 포유동물 세포에서

기능하는 복제 기점이 결여된 것인 용도:

- a) 이종성 프로모터에 작동적으로 연결된 핵-앵커링(nuclear-anchor ing) 단백질을 코딩하는 DNA 서열로서, 상기 핵-앵커링 단백질은
  - i) 특정 DNA 서열에 결합하는 DNA 결합 도메인, 및
  - ii) 핵 성분에 결합하는 기능성 도메인
 을 포함하는 것인 DNA 서열; 및
- b) 핵-앵커링 단백질에 대한 다량체화된 DNA 결합 서열.

#### 청구항 27

제26항에 있어서, 부분 i) 및/또는 부분 ii)는 1형 소 유두종 바이러스(Bovine Papilloma Virus type 1)의 E2 단백질에서 획득되는 것인 용도.

#### 청구항 28

서열번호 3의 아미노산 서열에 실질적으로 상응하는 단백질.

#### 청구항 29

제28항에 있어서, 약물로 사용하기 위한 것인 단백질.

#### 청구항 30

실질적으로 서열번호 4에 개시된 바와 같은 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터로서, 돌연변이가 서열번호 4의 위치 4126-4133에 도입되어, 발현시 서열번호 1의 위치 1185-1187에 돌연변이체 RRR>AAA가 생성되는 것(서열번호 3)인 발현 벡터.

#### 청구항 31

실질적으로 서열번호 4에 개시된 바와 같은 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터로서, 돌연변이가 서열번호 4의 위치 4129-4131에 도입되어, 발현시 서열번호 1의 위치 1185-1187에 돌연변이체 RRR>RDR이 생성되는 것인 발현 벡터.

#### 청구항 32

제31항에 있어서, 상기 발현 벡터는 pRSV-RDR인 발현 벡터.

#### 청구항 33

제30항 또는 제31항에 있어서, 약물로서 사용하기 위한 것인 발현 벡터.

#### 청구항 34

서열번호 4에 실질적으로 상응하는 핵산 서열로서, CGGCGGAG에서 GCCGCCGC로의 돌연변이가 서열번호 4의 위치 4126-4133에 도입된 것인 핵산 서열.

#### 청구항 35

면역계를 조절하기 위한 보조제를 제조하기 위한, 알파바이러스 레플리카제의 용도로서, 상기 레플리카제는 RNA 의존적 RNA 중합효소를 포함하는 것인 용도.

#### 청구항 36

제35항에 있어서, 상기 알파바이러스는 셈리키 포레스트 바이러스인 용도.

#### 청구항 37

제36항에 있어서, 레플리카제의 아미노산 서열은 서열번호 1에 실질적으로 상응하는 것인 용도.

**청구항 38**

제37항에 있어서, 레플리카제는 nsP2 영역이 돌연변이되어 서열번호 1의 위치 1185-1187에 돌연변이체 RRR>RDR이 생성되는 것인 용도.

**청구항 39**

제37항에 있어서, 레플리카제는 nsP2 영역이 돌연변이되어 서열번호 1의 위치 1185-1187에 돌연변이체 RRR>AAA가 생성되는 것인 용도.

**청구항 40**

면역계를 조절하기 위한 보조제를 제조하기 위한, 제35항 내지 제39항 중 어느 하나의 항에 정의된 바와 같은 알파바이러스 레플리카제를 코딩하는 발현 벡터의 용도.

**청구항 41**

제40항에 있어서, 상기 발현 벡터는 pRSV-RDR인 용도.

**청구항 42**

제40항 또는 제41항에 있어서, 상기 벡터는 DNA 벡터인 용도.

**청구항 43**

제35항 내지 제42항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 레플리카제 또는 상기 레플리카제를 코딩하는 상기 발현 벡터는 약학적으로 허용되는 부형제 및/또는 성분과 함께 제제화되는 것인 용도.

**명세서****기술 분야**

[0001]

본 발명은 면역학적 도구 분야, 구체적으로 백신 분야 및 백신 조성물에 사용하기 적합한 보조제에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002]

포유동물의 면역계는 피부, 장, 상하 기도, 비뇨생식기 등과 같은 수많은 적소에 콜로니를 형성하는 광범위한 미생물을 함유하는 환경에서 생존하기 위해 진화되었다. 결장 및 피부 등의 일부 적소는 내생성 미생물총이 항시적으로 콜로니를 형성하고 있는 반면, 다른 적소(내장 및 하기도)는 정상적으로는 면역적격성 숙주에서 무균 상태를 유지한다. 많은 장내 공생 박테리아의 경우에서처럼, 미생물의 영향은 숙주에게 양성적일 수 있다. 다른 경우에서, 미생물 콜로니화는 숙주에게 유해할 수 있다. 이러한 음성적 영향은 숙주의 면역계 상태-일정 병원체(기회 병원체라고 알려짐)가 면역능저하 개체에만 영향을 주는 상태에 따라 좌우된다. 미생물 감염의 잠재하는 유해 영향에 의해 다양한 숙주-방어 기전이 진화되어 왔다. 턱이 있는 척추동물은, 2가지 유형의 방어 기전: 선천성 및 후천성 면역 반응이 존재한다. 이들 사이의 주요한 차이점은 병원체를 인식하는데 사용되는 수용체 유형, 반응을 개시하는데 필요한 시간 지연 및 기억의 존재/부재이다. 이러한 2가지 유형의 방어 기전은 상호 완전하게 독립적으로 작동되지 않는다. 이하에서 알수 있듯이, 선천성 면역계는 특이적 신호를 후천성 면역계에 전달하여, 특정 병원체에 가장 효과적인 반응을 차수하도록 돋고; 반대로 후천성 면역 반응은 또한 선천성 면역계의 일부 모듈을 활성화시킨다.

[0003]

선천성 면역 반응

[0004]

선천성 면역은 건강한 개체에 언제나 존재하며 이의 주요 기능은 미생물과 바이러스의 침입을 차단하고 또한 숙주 조직 침입에 성공한 병원체의 신속한 제거를 제공하는 것이다. 이는 다세포 생물에 대해 즉각적인 보호성을 제공한다.

[0005]

선천성 면역계는 단일 독립체가 아니다. 상이한 진화 단계에서 출연한 개별 모듈 또는 하위계의 컬렉션이다:

[0006]

- 병원체 침입으로부터 숙주를 보호하는, 항미생물성 팝티드를 생성하는 점성 상피;

- [0007] - 세포내 및 세포외 박테리아에 대한 항미생물 기전을 갖는 식세포;
- [0008] - 순환계 및 체액에서 작동하는 급성기 단백질 및 보체계;
- [0009] - 바이러스 감염된 세포 사멸에 관여하는 자연 살해 세포;
- [0010] - 다세포 기생충으로부터의 보호에 관여하는, 호산구, 호염기구 및 비만 세포;
- [0011] - 바이러스에 대한 방어 기전에서 결정적인 역할을 하는, I형 인터페론 및 이들에 의해 유도된 단백질.
- [0012] 선천성 면역 반응은 침입한 미생물의 초기 검출 및 파괴를 담당하고, 검출에 대한 한정된 배선-코딩된 패턴-인식 수용체(PRR) 세트에 의존적이다. 면역 반응을 개시하기 위해, PRR은 병원체-연관된 문자 패턴(PAMP)을 인식하고 몇몇 세포외 활성화 캐스케이드 예컨대 보체 경로 및 염증 반응을 일으키는 다양한 세포내 신호전달 경로를 유도시킨다.
- [0013] 선천성 면역계는 3종의 상이한 구획; 체액, 세포막 및 세포질에 존재하는 PRR을 활용한다. 체액 내 PRR은 PAMP 읍소닌화, 보체 경로의 활성화, 및 일부 경우에는 다른 PRR로 PAMP의 전달에서 주요한 역할을 한다. 세포막에 위치하는 PRR은 다양한 기능, 예컨대 다른 PRR에 PAMP 제시(presentation), 식작용에 의한 미생물 흡수 촉진, 및 주요 신호전달 경로의 개시 등의 기능을 갖는다.
- [0014] 몇몇 기능적으로 구별되는 PRR 부류가 존재한다. 가장 특징적인 부류는 Toll-유사 수용체(TLR)이다. 이 수용체는 리포폴리사카라이드 및 리포테이코산을 포함한, 몇몇 박테리아 산물 및 바이러스 핵산을 인식하는 경막 수용체이고, 주요 신호-생성 PRR이다(Akira, S 2006). 또한, 세포질 PRR은 3가지 부류로 나눌 수 있는데; 즉 인터페론(IFN)-유도성 단백질, 캐스케이드-모집 도메인(CARD) 헬리카제, 및 뉴클레오티드-결합 올리고머화 도메인(NOD)-유사 수용체(NLRs)이다. 이중에서 가장 연구된 IFN-유도된 항바이러스 단백질은 믹소바이러스 내성 단백질(Mx) 패밀리, 단백질 키나제 R(PKR), 올리고아데닐레이트 합성효소(2'-5' OAS)이다. 이들 항바이러스 단백질 및 CARD 헬리카제 예컨대 RIG-I 및 Mda5는 항바이러스 방어에 관여한다. 대조적으로, NLR은 주로 항박테리아성 면역 반응에 관여한다.
- [0015] *Toll-유사 수용체(TLR)*
- [0016] TLR은 PRR 중 가장 특징적인 신호-생성 수용체이다. 이 수용체는 핵심 염증 반응을 개시하고 또한 후천성 면역을 형성시킨다. 포유동물에서 알려진 모든 TLR (TLR1-11)은 리간드 인식을 담당하는 세포외 류신-脯부 반복부(LRR) 및 신호전달을 개시하는데 필요한 세포질 Toll-인터루킨-1 수용체 상동성(TIR) 도메인을 함유하는 I형 내재 막 당단백질이다. TLR은 핵산을 포함하여 박테리아, 진균, 기생충 및 바이러스 내 매우 다양한 미생물 성분을 인식한다. 정상적으로 세포외 PAMP를 검출하기 위해 원형질막에 존재하지만, TLR3, TLR7, TLR8 및 TLR9를 포함한, 몇몇 TLR은 세포내 구획 예컨대 엔도솜 내 그들의 리간드를 인식한다. 후자의 TLR은 dsRNA(TLR3), ssRNA (마우스는 TLR7, 인간은 TLR8), 및 비메틸화된 CpG DNA 모티프(TLR9)를 검출하는, 핵산 인식 능력을 공유한다.
- [0017] TLR은 4종의 TIR 도메인 함유 어댑터 분자 MyD88, TIRAP, Trif 및 TRAM의 다른 조합을 모집하여 공유되는 개별 신호전달 경로를 개시한다. TLR3을 제외하고, 모든 다른 TLR은 IL-수용체-연관된 키나제(IRAK) 패밀리의 구성원과 연관있는, 골수성 분화 인자 88(MyD88)를 동원시킨다(Mouldy Sioud 2006). 이들 신호전달 경로는 전사 인자 핵 인자 카파 B(NF- $\kappa$ B) 및 활성인자 단백질-1(AP-1)을 활성화시키고, 이는 모든 TLR에 공통적이며, 염증성 사이토카인 및 케모카인을 생성시키게 된다. 이들은 또한 I형 인터페론 예컨대 IFN- $\alpha$  및 IFN- $\beta$ 를 생성하기 위한 선결요건인, TLR 3, 4, 7, 8 및 9에서 인터페론 조절 인자-3(IRF3) 및/또는 IRF7을 활성화시킨다(다음 문헌을 참조한다: Edwards et al 2007, Vercammen et al 2008, Medzitov R 2007).
- [0018] 선천성 숙주-방어 기전의 직접 활성화 이외에도, 일부 PRR은 후천성 면역 반응의 유도와 커플링된다. 후천성 면역계에서 주요한 2 부류 세포, T 세포 및 B 세포는 무작위 특이성을 갖는 항원 결합 수용체를 발현하므로, 그 기원의 임의의 고유한 특징적 지표가 결여된 항원을 인식한다. 따라서, T 림프구 및 B 림프구는 이들이 인식하는 항원의 기원을 표시하는 지시가 필요하다. 이러한 지시는 PRR에 의해 유도되는 특수한 신호 형태로 선천성 면역계에서 비롯된다. T 세포에 대해, 이러한 연관성은 수지상 세포를 통해 설명된다. I형 인터페론은 수지상 세포의 활성화 및 이동에 관여한다(항바이러스성 반응에서 보다 상세히 기술함). 활성화된 수지상 세포가 림프절로 이동하면, 이들은 PRR 유도 신호와 함께 병원체 유래 항원을 T 세포에게 전해준다. 그 결과 T 세포가 활성화되고 T 헬퍼(Th) 세포가 몇몇 유형의 이펙터 Th 세포(Th1, Th2 및 Th-17 세포) 중 하나로 분화된다. 예를 들어, TLR-관여는 수지상 세포에 의해 IL-12 생성을 유도시키고, 이는 Th 세포가 Th1 세포로 분화되도록 지시한다. 따라서 이펙터 반응의 유형은 선천성 면역계에 의해 영향받는다. 또한, I형 인터페론은 IL-15 생성을

유도하여 직접적으로 또는 간접적으로, 세포독성 T 세포 및 NK 세포의 기능을 조절한다.

[0019] 선천성 면역계는 또한 후천성 면역계로부터 양성 피드백 신호를 받는다. 예를 들어, 이팩터 Th 세포는 선천성 면역계의 특이적 모듈을 활성화시키는 적절한 사이토카인을 생성하는데: 마크로파지는 Th1 세포가 분비하는 사이토카인(인터페론-γ)에 의해 활성화되고, 호중구는 Th-17 세포(인터루킨-17) 세포에 의해 활성화되며, 비만 세포 및 호연기구는 Th2 세포(인터루킨-4 및 인터루킨-5)에 의해 활성화된다. 유사하게, 결합된 항체(IgG)는 보체 단백질을 활성화시키고 병원체를 옴소닌화시켜 식작용을 돋는다.

[0020] 후천성 면역 반응

[0021] 후천성 면역계는 이의 활성을 위해 광범위한 분자들을 이용한다. 이들 분자 중 일부는 또한 선천성 면역계, 예를 들어, 보체 단백질에 의해 이용되며, 항원 특이적 B 세포 및 T 세포 수용체를 포함한 다른 것들은 후천성 면역계에 고유한 것이다. 선천성 면역과 구별되는, 후천성 면역계의 가장 중요한 특성은 B 세포 및 T 세포 수용체의 미세한 특이성, 및 항원에 노출 전 보다 느린 반응 및 기억의 발생이다. 후자의 특성은, 병원체 대면서 보다 신속하고 보다 효과적으로 반응을 촉발시키는, 면역 기억의 발생을 일으키는 다른 방식(예를 들어, 병원체에서 선별된 항원을 코딩하는 DNA 백신에 의함)으로 감염을 모방하거나, 선별된 병원체 성분에 의해서, 또는 약독화된 병원체에 의해 면역계를 프라이밍하는, 백신접종의 기초를 형성한다.

[0022] 2가지 유형의 후천성 면역, 즉 체액성 면역 및 세포 매개 면역이 존재한다. 체액성 면역은 B 세포에 의해 매개된다. 활성화된 B 세포는 순환계 및 점액체로 수용체를 분비하기 시작하며, 이 경우는 항체(면역글로불린)라고 한다. 이러한 수용체를 코딩하는 유전자들은 병원체를 만나기 전, 다양한 수용체 래파토리를 산출하는, 체세포 재조합 과정에서 가변 및 불변 단편으로부터 어셈블리된다. 각각의 B 세포 또는 T 세포는 특이적 분자 구조(예 피토프)에 결합하는 단일 특이성의 T 세포 수용체 또는 면역글로불린을 합성할 수 있다. 항체는 특이적 항원에 비공유 결합하여 그들을 고정시키고, 무해하게 만들거나 또는 면역계의 다른 성분에 의해 제거 및 파괴(예를 들어, 보체 단백질 또는 마크로파지에 의함)되도록 그 항원을 태깅한다.

[0023] 세포 매개 면역은 T 세포에 의해 매개된다. T 세포는 대부분의 후천성 면역 반응의 핵심 작용체이다. 이들은 감염된 세포(CD8+ 세포독성 T 세포)를 직접 제거하는데 참여하거나 또는 다양한 사이토카인을 생성시켜 다른 세포(CD4+ T 헬퍼 세포)의 활성을 조율 및 조절한다. 또한, B 세포에 의한 항체 유도는 대부분의 경우에서 T 헬퍼 세포에 의존적이다. T 세포 항원 수용체의 두드러진 특징은 가용성 분자를 인식하지 못하는 무능력으로서, 이들은 MHC(major histocompatibility complex)라고 하는, 특수화된 웨პ티드 디스플레이 분자에 결합된 세포 표면상의 단백질 항원의 웨პ티드 단편을 인식할 수 있다. T-헬퍼 세포는 항원성 웨პ티드 단편을 인식하기 위해, MHC 클래스 II 분자를 필요로 하고, 세포독성 T 세포는 MHC 클래스 I 분자를 필요로 한다. 이러한 특징은 그렇지 않으면 면역계에 의해 검출되지 않고남아 있을 세포내 병원체를 T 세포가 검출할 수 있게 하는데, 진핵동물 세포에서 합성되는 모든 단백질(병원체 유래 웨პ티드 포함) 유래의 짧은 웨პ티드(9-10 아미노산)가 MHC 분자의 웨პ티드 포켓에서 세포 표면 상에 노출되기 때문이다. 후천성 면역 반응은 전문적인 항원 제시 세포(APC)에 의해 병원체가 포획된 이후에 개시된다. 비면역화(naive) T 림프구는 APC 상에 MHC-항원에 의해 제시된 항원을 인지하는 것이 필요하다. 이들 세포는 신체와 외부 환경 사이의 경계면인, 모든 상피에 존재한다. 이뿐만 아니라, APC는 대부분의 다른 장기에는 소량으로 존재한다. 상피의 APC는 수지상 세포 계통에 속한다. 피부에서, 상피 수지상 세포는 랑제ハン스 세포라고 한다. 수지상 세포는 식작용 또는 음작용 과정을 통해, 상피로 들어온 미생물의 항원을 포획한다. 항원 포획 후 수지상 세포는 라운드 업(round up)되어 상피에 대한 그들의 부착성이 손실되고, 이들은 상피를 떠나 림프관을 통해 그 상피를 배수하는 림프절로 이동한다. 이동 과정 동안 수지상 세포는 T 세포를 자극할 수 있는 세포로 성숙된다. 이러한 성숙화는 T 세포에 항원을 디스플레이하는 MHC 분자, 및 완전한 T 세포 반응에 필요한 다른 분자, 공동자극인자의 합성 증가 및 안정한 발현으로 반영된다. 이러한 일련의 사건들의 결과는 미생물의 단백질 항원이 림프절의 특정 영역으로 수송되고 여기서 항원은 T 림프구와 만나게 된다는 것이다. 비면역화 T 림프구는 연속적으로 림프절을 통해 재순환되며, 체내 모든 비면역화 T 세포가 1일 1회 이상 일부 림프절을 통해 순환하는 것으로 추정된다. 따라서, 항원과 T 세포의 초기 대면은 림프절에서 일어나고, 이를 프라이밍이라고 한다. 프라이밍된 CD4+ T 헬퍼 세포는 면역계의 다른 세포가 반응하도록 도움을 주는, 다양한 사이토카인을 분비하기 시작한다. 수지상 세포는 병원체 유래의 웨პ티드 단편뿐만 아니라, 선천성 면역계에서 보내진 PRR-유도 신호(상기에서 언급한 바와 같이, I형 IFN은 수지상 세포의 활성화 및 분화에 영향을 줌)를 림프절로 운반한다. 수지상 세포는 이러한 정보를 T 세포의 특이적 클론(병원체 웨პ티드를 인식)의 활성화 및 적절한 유형의 T 헬퍼 세포의 분화로 전환시킨다. CD8+ T 세포의 프라이밍은 또한 수지상 세포에 의해 수행되지만, CD8+ T 세포의 완전한 기능성 킬러 세포로의 후속 증식 및 성숙화는 T 헬퍼 세포가 분비하는 사이토카인에 의해

좌우된다. 의존적이다.

- [0024] 이와 함께, 선천성 및 후천성 면역계 사이에는, 연속적이고 복잡한 상호작용이 존재한다. 현재로는 백신이 입수 불가한 "까다로운" 병원체(HIV-1, TB 및 말라리아)에 대한 백신 개발 성공 여부는 보호 면역 반응을 유도하기 위한 완전하게 새로운 방법을 개발하느냐에 달려있다.
- [0025] 양성 가닥 RNA 바이러스 및 이들의 복제 부산물에 대한 항바이러스성 반응
- [0026] 양성 가닥 RNA 바이러스
- [0027] 양성 가닥 RNA 바이러스는 모든 바이러스 속의 1/3을 포함한다. 양성 가닥 RNA 바이러스 계놈은 번역 및 복제 둘 모두에 대한 주형으로서, 다수의 수준에서 숙주 번역 인자 및 RNA 복제 간 상호작용을 야기시킨다. 모든 공지의 양성 가닥 RNA 바이러스는 계놈 복제에 이용되는 RNA 의존적 RNA 중합효소(RdRp)에 대한 유전자를 보유한다. 그러나, 다른 RNA 바이러스와 달리, 양성 가닥 RNA 바이러스는 이 중합효소를 캡시드화하지 않는다. 따라서, 새로운 세포 감염시, 바이러스 RNA 복제는, 계놈 RNA가 번역되어 중합효소, 및 대부분의 양성 가닥 RNA 바이러스에 대한, 추가의 복제 인자가 생성되기 전까지는 시작될 수 없다. 모든 특징적인 양성 가닥 RNA 바이러스는 그들의 RNA 복제 복합체를 세포내 막 상에서 어셈블링한다. 알파바이러스 유사 수퍼페밀리와 그 이상은, 바이러스 RNA의 복제가 세포내 막의 구형 합입과 연관되어 일어난다. 예를 들어, 알파바이러스는 그들의 복제 복합체 어셈블리를 위해 엔도솜 막 및 리소솜 막을 이용한다. 이러한 막은 복제 인자가 위치하고 놓축되는 표면을 제공한다. 이러한 구성은 또한 임의의 dsRNA 복제 중간체를, dsRNA-유도된 숙주 방어 반응 예컨대 RNA 간섭 또는 인터페론 유도 반응으로부터 보호되도록 돋는다(Ahlquist P et al 2003).
- [0028] 계놈 구성, 비리온 형태 및 숙주 범위의 차이에도 불구하고, 양성 가닥 RNA 바이러스는 근본적으로 계놈 복제에 있으나 유사한 전략을 갖는다. 정의하면, 바이러스 (+)RNA 계놈은 세포 mRNA와 동일한 극성을 가지며, 바이러스 계놈 RNA는 세포의 번역 기구에 의해 직접적으로 번역된다. 먼저, 비구조 단백질이 전구체 폴리단백질로서 합성되고 바이러스 프로테아제에 의해 성숙한 비구조 단백질로 절단된다. 바이러스 계놈의 많은 부분은, 바이러스 복제 동안 중요 기능을 수행하고 비리온의 일부가 아닌 비구조 단백질에 할애된다. 번역 및 폴리단백질 프로세싱 후, RdRp, 추가의 부속 비구조 단백질, 바이러스 RNA 및 숙주 세포 인자를 포함하는 복합체가 어셈블링된다. 이를 소위 복제 복합체(RC)는 바이러스-RNA 합성을 수행한다. 음성 센스 바이러스 RNA는 감염 초기에 합성되고, 복제 복합체가 형성된 후 이 음성 가닥 RNA는 전체 길이 양성 센스 계놈 RNA를 비롯하여 서브계놈 RNA를 합성하기 위한 주형으로 이용된다. 이 단계를 책임지는 핵심 효소가 레플리카제 복합체에서 작용하는 RNA-의존적 RNA-중합효소이다(Moradpour et al 2007, Miller and Krijnse-Locker 2008).
- [0029] 바이러스 RNA 센싱
- [0030] 양성 가닥 RNA 바이러스는 복제 과정 중에, 음성 가닥 RNA, 양성 가닥 RNA, 이중 가닥 RNA(dsRNA) 및 서브계놈 mRNA를 생산하며, 이들은 선천성 면역 반응 경로의 강력한 유도인자들이다. TLR3(dsRNA), TLR7/8(ssRNA), 및 ssRNA의 2차 구조 내 특이적 구조 성분을 인식하는 일부 다른 TLR을 통해서 효과가 유도된다. 예를 들어, 양성 가닥 RNA 바이러스, 황열 바이러스 생 약독화 백신은 확실히, 장기 지속성 항원-특이적 T 세포 반응의 특성에 대해 차등적인 효과를 또한 유도시키는, 다수의 Toll-유사 수용체를 통해 선천성 면역을 활성화시키는 이용 가능한 가장 효과적인 백신 중 하나이다(Querec TD and Pulendran B Adv Exp Med Biol. 2007;590:43-53).
- [0031] 상기 언급한 바와 같이, 세포는 시토졸의 바이러스 존재에 반응하여 항바이러스성 유전자 발현을 유도시키는 수용체 및 신호전달 경로를 보유한다. 인터루킨-6(IL-6), IL-12 p40 및 종양 피사 인자(TNF)를 포함한 복수의 사이토카인이 바이러스 감염에 의해 유도되지만, 항바이러스성 반응의 특징은 I형 인터페론의 생성이다. I형 인터페론은 종종 따라서, 개별 무인트론 유전자에 의해 코딩되는 복수의 아형: 하나의 IFN- $\beta$  및 13-14 IFN- $\alpha$  아형을 포함한다. I형 인터페론은 바이러스 감염에 반응하는, 상피 세포, 점막 표면의 섬유아세포, 및 수지상 세포를 포함한, 모든 유핵 세포에 의해 생산될 수 있다. 또한, 모든 세포는 모든 아형에 결합하는, I형 인터페론 수용체(IFNAR)를 통해 I형 인터페론에 반응할 수 있다.
- [0032] 시토졸 PRR 및 하류 신호전달 경로의 성분을 코딩하는 유전자는 그 자체가 인터페론 유도성이고, 선천성 항바이러스 반응을 크게 증폭시킬 수 있는 양성-피드백 루프를 이끌어 낸다. 이 루프는 세포내 dsRNA 존재에 의해 움직이게 되는 것으로 여겨졌다. 미감염된 세포에는 부재하지만 RNA 바이러스의 복제동안 생산된 RNA의 2가닥이 상보적 어닐링되어 형성될 수 있는 한, dsRNA는 바이러스 감염 마커로서의 기준을 충족시키다. dsRNA는 I형 IFN 합성에 필수적인 핵인자 카파 B(NF- $\kappa$ B) 및 인터페론 조절 인자-3(IRF-3) 및 -7을 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 인터페론은 특이적 세포 표면 수용체 IFNAR을 통해 그들의 항바이러스 반응을 매개하는 하는데, IFNAR은

전사의 세포질 신호 전달인자 및 활성인자(STAT)를 활성화시키고, 이 STAT는 핵으로 전위되어 다양한 IFN-자극 유전자(ISG)를 활성화시킨다(Rautsi et al 2007).

[0033] 레티노산-유도성 유전자 I(RIG-I) 및 흑색종 분화-연관 유전자 5(MDA5)는 IRF3과 IRF7의 활성화 및 IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  및 IFN- $\lambda$  유전자 발현 유도를 위한 신호, 및 세포내 바이러스 생성물, 예컨대 게놈 RNA를 검출할 수 있는 세포질 IFN-유도성 DEXD/H 박스 RNA-헬리카제이다. RIG-I은 RNA 결합 헬리카제 도메인 및 2 캐르파체 활성화 및 모집 도메인(CARD)를 포함하는 시토졸 단백질이다. RIG-I과 유사하게, MDA5는 RNA-헬리카제 도메인 및 2 CARD를 보유한다. 이 둘 모두는 인터페론- $\beta$  프로모터 자극인자-1(IPS-1)을 통해 신호를 전달한다. 신호 어탭터 IPS-1은 미토콘드리아 상에 위치하고 Mda5 및 RIG-I의 CARD와 동형성 상호작용을 형성하는 N-말단 CARD를 포함한다. 이는 C 말단 촉매 도메인을 활성화시키고, NF- $\kappa$ B 및 IRF3의 활성화를 통해 사이토카인 유전자의 전사에 이르게 되는 신호전달 캐스케이드를 개시시킨다. RIG-I 및 Mda5가 합성 dsRNA, poly(I:C)에 결합하고, 공통 경로를 통해 신호전달하지만, 이들은 상이한 바이러스에 선택적으로 반응한다. 예를 들어 RIG-I은 인플루엔자 A 바이러스, 소포성 구내염 바이러스(VSV), 일본 뇌염 바이러스(JEV) 및 센다이 바이러스(SeV)를 검출하는 반면, MDA5는 피코마바이러스, 예컨대 뇌심근염 바이러스(EMCV), 타일러 뇌척수염 바이러스 및 맹고바이러스를 검출한다. 단일 가닥 또는 이중 가닥과는 독립적으로, RNA에 의한 RIG-I 자극에서의 핵심 요소는 5'-트리포스페이트 존재이다. 이는 또한 RIG-I의 바이러스 특이성에 대한 설명을 제공한다.

[0034] I형 인터페론은 수지상 세포(DC)의 다양한 아형에 영향을 준다. 인터페론은 일정 천연 인터페론 생성 세포에 대한 자가분비 생존 인자로서 작용할 수 있고, 말초 혈액 단핵구가 DC로 분화되는 것을 촉진하며 그들의 표현형 및 기능적 성숙화를 유도할 수 있다. 대부분의 세포 유형이 I형 인터페론을 발현할 수 있기 때문에, 비림프양 조직에서 DC의 성숙화는 이웃 세포의 감염 후에 촉발될 수 있다. 이들 DC는 림프양 기관으로 이동하고 T 세포 반응을 개시하는 능력을 획득하게 된다(LeBon and Tough 2002).

[0035] I형 인터페론 신호전달은 또한 DC 및 T 세포에 의한 IFN- $\gamma$  생성을 상향조절하여 Th1 세포의 유도 및 유지를 유리하게 한다. 부가적으로, 직접적으로 또는 간접적으로 작용하여, 다양한 사이토카인의 발현 및 기능에 영향을 줄 수 있다. 예를 들어 인터루킨-6(IL-6) 신호전달, 및 항염증성 전환 성장 인자  $\beta$ (TGF- $\beta$ ), IL-1 수용체 길항제 및 가용성 종양 괴사 인자(TNF) 수용체의 생성을 증가시킨다. I형 인터페론 또는 이들의 유도인자는 또한 DC에 의한 높은 IL-15 발현을 유발시켜, 기억-표현형 CD8+ T 세포에 대해 강력하고 선택적인 자극을 야기시킨다(Theofilopoulos et al 2005).

[0036] 특정한 바이러스 병원체 감염 관련 패턴(바이러스 감염된 세포의 세포질 내 dsRNA의 측적 등), 이러한 패턴에 반응하는 인식 인자(예를 들어, Toll-유사 수용체), 및 이들 상호작용으로 촉발되는 다양한 항바이러스 방어 경로를 상기에 기술하였다. 선천성 면역이라 불리는 복합계는 바이러스 감염된 세포를 파괴하고 신체에서 바이러스 감염을 신속하게 제거하기 위해 병원체 인식으로부터 일련의 캐스케이드가 일어나도록 지시한다. 또한, 선천성 면역계의 활성화는 바이러스 항원에 대해 일어난 후천성 면역 반응의 질과 양에 대한 중요 결정요인이다(Germain RN 2004).

#### 면역 보조제

[0038] 본래 면역 보조제는 항원 단독인 경우보다 강력한 면역 반응을 일으키는 특정 항원과 조합되어 사용되는 물질로서 1924년 Ramon이 기술하였다. 이러한 대략적인 정의는 광범위한 물질을 포함한다. 오늘날 이용 가능한 면역 보조제는 대략적으로 2 카테고리: 전달 시스템 및 면역보강제로 분류된다(하기 문헌 참조: Fraser C K , Diener K R , Brown M P and Hayball J D (2007) Expert Reviews in Vaccines 6(4)559-578).

[0039] 전달 시스템은 백신 내 항원 제시(presentation)를 변화시켜서 면역계에 항원 노출을 최대화하고, 일정 형태의 항원을 특정 생리적 위치로 표적화하여 전문적인 항원 제시 세포(APC)에 의한 항원 퍽업을 보장할 수 있다. 백신 조제물 중 전달 시스템 유형의 보조제로서 존재하는 면역 보조제의 예는 백반, 예열선, 사포닌 및 양이온 지질이다.

[0040] 면역 활성인자는 후천성 면역을 유도하는데 중요한 경로를 활성화시켜 면역 세포에 직접적으로 작용한다. 이들은 외생성 미생물 또는 바이러스 성분, 그들의 합성 유도체 또는 내생성 면역활성 화합물 예컨대 사이토카인, 케모카인 및 공동자극성 분자일 수 있다. 이러한 유형의 분자는 표적 항원에 대한 특이적 면역을 증가시킬 수 있다. 현재로서, Toll-유사 수용체 작동제, 뉴클레오티드 올리고머화 도메인-유사 수용체 작동제, 재조합 내생성 화합물 예컨대 사이토카인, 케모카인 또는 공동자극 분자가 이용가능하고 면역 보강제로서 작용할 수 있다. 그러나 중요한 것은 사이토카인 및 케모카인은 종 특이적 분자이므로 다른 동물에서는 쉽게 비교할 수 없다는

것이다. 이러한 경우들은, 개별 분자의 상동체를 사용할 것이 요구되어, 이런 보조제의 사용을 비롯하여 한 종에서의 실험 결과 해석 및 다른 종에 대한 외삽법이 상당히 복잡하다.

[0041] 몇몇 다른 유전자 백신과 같이 DNA 백신이 수년간 개발되어 왔고 시험 동물에서 특이적 면역 반응 유도에 대한 유망한 접근법을 제시하였다. 그러나, 이들 백신은 인간 및 거대 동물에서는 비효율적인 것으로 밝혀졌다. 그 이유 중 하나는 아마도 반응성 및 면역원성이 전통적인 백신보다 낮기 때문인 듯 하다. 이런 결핍성에 대한 가능한 이유는 인간을 포함한, 이종교배 동물에서 매우 중요한, 생체 내 한정된 단백질 발현 용량뿐만 아니라 실제 백신 준비시 오염된 병원체 유래 성분의 결여 및 보다 균질한 성질이다.

[0042] 그 결과 심각한 독성 효과없이 면역계 활성화를 표적으로 하는, 백신을 제조하기 위한 특이적인, 미세 조율된 면역 보조제의 개발이 요구된다. 이러한 요구때문에, DNA 백신을, DNA 백신이 코딩하는 항원에 대한 면역 반응을 개선시킬 수 있는, 사이토카인 또는 케모카인, 예컨대 조혈 성장 인자, 예를 들어 GM-CSF, 또는 케모카인 예컨대 MIP-1 $\alpha$ 와 조합하려는 시도가 있어 왔다. 그러나, 불행하게도, 이러한 시도는 여전히 미약하다. 단백질로서 케모카인 및 사이토카인의 공동 전달은 동물 또는 인간에서 실제 사용할 수 있는 우수한 품질의 단백질이 생산될 수 있기 전에는 막대한 작업을 요구한다.

[0043] DNA 백신과 조합하여 사용하기 위한 보조제를 발현시키기 위해 핵산 기반 발현 벡터를 사용시, 백신이 투여되는 조직 상에서 이러한 발현으로 인한 영향 및 특정 보조제 분자의 적절한 발현 수준 및 부위에 대한 문제가 제기된다.

[0044] 면역 자극시 보조제의 가능성있는 유용한 효과는 Gaston Ramon이 초창기에 관찰하였는데, 그는 백신접종 후 종기가 발병된 말에서 보다 높은 항체 역가가 발생된다는 것을 발견하였다. 항원 특이적 면역 반응을 증가시키기 위해 면역 보조제를 사용하는 개념은 초기 발견부터 오염으로 인해 염증 과정을 유도시키는 이들의 용량과 불가분 관련있다. 그 결과, 이러한 면역 보조제의 사용은 임상적으로 허용되지 않는 독성 및 심각한 건강상 문제를 초래할 수 있다. 따라서, 인간에 대해 유일하게 세계에서 허가된 보조제는 체액성 면역만을 유도할 수 있는 약한 보조제인, 백반이다. 체액성 면역과 세포 매개 면역 둘 모두를 유도할 수 있는 오늘날 이용가능한 강력한 다른 모든 보조제는 실험용으로만 제한된다.

[0045] 현재 백신 보조제의 대표로는 HIV 1, 말라리아 및 결핵을 포함한 심각한 병원체에 대해 효과적인 백신을 생성시키는데 부적절하다(Riedmann et al. 2007; Fraser et al. 2007). 공지된 보조제의 조합들은 이용가능한 백신과 연관된 일부 문제를 극복할 수 있긴 하지만, 보조제 형태의, 신뢰할 수 있으며, 안전하고 진보된 차세대 면역 조절제가 분명히 요구된다.

[0046] 따라서, 상기 설명한 종래 당분야에 여전히 존재하는 문제점의 관점에서, 본 발명의 목적은 오늘날 이용가능한 백신에 비하여 동반하여 반응을 향상시키는데 보다 효과적인 보조제를 찾고자 하는 것이다. 본 발명에 따른 보조제는 면역계의 조절제로서, 백신을 투여한 피험체에서 면역 반응이 향상되고 강화되는 것을 의미한다.

### 발명의 내용

[0047] 오늘날 당분야에서 이용가능한 보조제와 연관된 상기 문제점들은, 오늘날 이용가능한 면역계 조절 보조제 보다 투여가 더욱 효과적이고 용이하며, 종-독립적인 면역계 조절 보조제로서 알파바이러스 레플리카제 또는 알파바이러스 레플리카제를 코딩하는 발현 벡터의 신규 의약 용도를 제공하는 본 발명을 통해 해결된다.

[0048] 본 발명은 RNA 의존적 RNA 중합효소(RdRp) 활성을 포함하고 세포 내 정확한 구획으로 구획화되는, 알파바이러스 레플리카제의 단독 제공이 세포에서 선천성 면역 반응을 유도할 수 있다는 놀라운 발견을 기초로 한다. 이는 바이러스 계놈 또는 임의의 다른 비구조적 또는 구조적 바이러스 단백질 존재 없이 가능하다.

[0049] 따라서, 본 발명은 백신 그 자체만을 투여할 때 보다 백신 항원에 대해 양적으로 그리고 질적으로 보다 유효한 반응을 제공하는 면역 반응을 활성화시킬 수 있는 효과적인 보조제의 개발을 가능하게 하는 획기적인 발견이다.

[0050] 이러한 이유로, 일 측면에서, 본 발명은 면역 반응을 조절하기 위한 보조제로 사용하기 위한, RNA 의존적 RNA 중합효소(RdRp)를 포함하는 알파바이러스 레플리카제를 포함한다. 또한, 본 발명은 면역 반응을 조절하기 위한 보조제를 제조하는데 있어서 알파바이러스 레플리카제의 용도에 관한 것이고, 상기 레플리카제는 RNA 의존적 RNA 중합효소를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 면역계를 조절하기 위한 보조제로서 사용하기 위해 상기 레플리카제는 발현 벡터, 예컨대 DNA 벡터에 의해 코딩된다. 바람직한 일 구체예에서, 상기 레플리카제는 SFV(셈리키 포레스트 바이러스; Semliki Forest Virus) 레플리카제이다.

[0051]

알파바이러스 레플리카제의 면역계 조절 활성의 효능은 레플리카제의 nSP2 서브유닛의 핵 국재화 영역 내 특이적 돌연변이를 통해 조정될 수 있다. 따라서, 본 발명은 면역계를 조절하기 위한 보조제로서 사용하기 위한, 야생형 레플리카제의 nSP2 영역에 특이적 돌연변이를 갖는 알파바이러스 레플리카제, 및 면역계를 조절하기 위한 보조제로서 사용하기 위한 야생형 레플리카제의 nSP2 영역에 특이적 돌연변이를 갖는 알파바이러스 레플리카제를 코딩하는 발현 벡터에 관한 것이고, 여기서 돌연변이체는 선택된 백신과 함께 투여시 피험체에서 면역 반응을 유도하는데 보다 효율적인 것으로 확인되었다. 본 명세서에서 효율적인 것으로 확인된 특이적 돌연변이는 야생형 SFV 레플리카제 아미노산 서열의 위치 1185-1187에 존재하는 RDR 및 AAA 돌연변이체이고, 본원에서 더욱 기술한다.

[0052]

알파바이러스 레플리카제는 예를 들어 핵산 기반 백신 형태의 백신을 투여한 피험체에서 면역 반응을 부양시키고 증대시킬 수 있는 보조제로서 특히 적합한 것으로 확인되었다. 본 발명자들은 레플리카제 형태의 보조제를 백신과 함께 투여한 경우, 백신만을 투여한 경우와 비교하여 생체 내에서 인터페론 반응이 증가되었음을 확인하였다.

[0053]

또한, 본 발명은 면역 반응을 조절하기 위한 보조제로서의 알파바이러스 레플리카제 또는 알파바이러스 레플리카제를 코딩하는 발현 벡터의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 감염성 질환의 예방 및/또는 치료를 위한 약물을 제조하기 위한 백신 조성물에서의 보조제로서 본원에 개시된 알파바이러스 레플리카제의 용도에 관한 것이다. 상기 보조제를 수반하는 백신은, 예를 들어 핵산 기반 백신 또는 단백질 기반 백신의 형태일 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 보조제를 포함하는 백신 조성물의 제조 방법을 본원에서 제공한다. 본 발명은 또한 레플리카제 활성을 갖는 신규한 단백질을 비롯하여 상기 레플리카제를 코딩하는 발현 벡터에 관한 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0054]

도 1은 다양한 DNA 농도를 사용하여 RdRp로 형질감염시킨 Cop5 세포 배양 상등액에서 측정된 IFN-베타를 나타낸 도면이다. 10 ng, 200 ng, 또는 1000 ng의 발현 벡터 pRSV-Nsp1234, pRSV-RDR, pRSV-AAA 또는 HIV 복수항원 발현 벡터 paraDMgB(음성 대조군, RdRp 활성 없음)로 Cop5 세포를 형질감염시켰다. 세포 배양 상등액을 3 시점(24h, 48h 및 72h)에 회수하고 인터페론-β 발현을 분석하였다.

도 2는 다양한 DNA 농도를 사용하여 RdRp로 형질감염시킨 Cop5 세포 배양 상등액에서 측정된 IFN-베타를 나타낸 도면이다. 10 ng, 200 ng, 또는 1000 ng의 pRSV-RDR, pRSV-GAA, pRSV-RDR-GAA 및 pRSV-AAA-GAA로 Cop5 세포를 형질감염시켰다. 세포 배양 상등액을 3 시점(24h, 48h, 및 72h)에 회수하고 인터페론-β 발현을 분석하였다.

도 3은 트랜스레플리카제 또는 RdRp 구성체로 형질감염시킨 Cop5 세포 배양 상등액에서 측정한 IFN-베타를 나타낸 도면이다. 10 ng, 200 ng, 또는 1000 ng의 pRSV-SFV-Rluc, pRSV-Nsp1234, 및 KS123M4-RL(음성 대조군, RdRp 활성 없음)로 Cop5 세포를 형질감염시켰다. 세포 배양 상등액을 3 시점(24h, 48h, 및 72h)에서 회수하고 인터페론-β 발현에 대해 분석하였다.

도 4는 HEK293 세포에서 IFN-베타를 나타낸 도면이다. HEK293 세포를 전기천공 및 캐리어 DNA의 부가를 통해 형질감염시켰다. 1 µg의 플라스미드 DNA 또는 poly(1:C)를 사용하였다. 3 시점(24h, 48h, 및 72h)에서 상등액을 회수하고 인터페론-β 발현을 분석하였다.

도 5는 HACAT 세포에서 IFN-알파 및 IFN-베타를 나타낸 도면이다. 세포를 전기천공 및 캐리어 DNA의 부가를 통해 형질감염시켰다. 1 µg의 플라스미드 DNA 또는 poly(1:C)를 사용하였다. 상등액을 3 시점(24h, 48h, 및 72h)에 회수하고 인터페론-β 및 인터페론-α 발현을 분석하였다. 레인 1, 5, 9 pRSV-RDR; 레인 2, 6, 10 pRSV-RDR-GAA; 레인 3, 7, 11 poly(1:C); 레인 4, 8, 12 모의체(mock) 형질감염.

도 6은 마우스의 IFN-감마 ELISPOT를 나타낸 도면이다. 4:1 비율(800 ng 백신 벡터 및 200 ng 보조제 벡터)로 플라스미드 DNA를 플라스미드 pRSV-RDR와 공동투여시 마우스에서 세포 면역 반응이 증가하였다. 그룹 1: GTU-MultiHIV; 그룹 2: GTU-MultiHIV+pRSV-Nsp1234; 그룹 3: GTU-MultiHIV+pRSV-RDR; 그룹 4: 대조군.

도 7은 인플루엔자 바이러스 HA 및 NA를 코딩하는 플라스미드 벡터를 DNA 플라스미드 pRSV-RDR과 공동투여시 인플루엔자 벡터 유래 항원에 대한 체액성 면역 반응이 증대되었음을 나타낸 도면이다.

도 8은 그룹 평균으로, Gag 및 Env의 2 인식 에피토프에 대한 누적 IFN-감마 ELISPOT 결과를 나타내는 도면이다. 3 그룹의 Balb/C 마우스를 2회(0주 및 4주) MultiHIV 항원을 코딩하는 플라스미드 DNA 단독 또는 1차 또는 2차 면역화가 부가된 pRSV-RDR와 함께 면역화시켰다. 제4 그룹은 면역화하지 않았다(naive). 2차 면역화 이후 10일 후 신선하게 단리한 비장 세포에 대해 Elispot를 수행하였다. 그룹 1: GTU-MultiHIV, 그룹 2: 2차 면

역화 수반한 GTU-MultiHIV+pRSV-RDR, 그룹 3: 1차 면역화 수반한 GTU-MultiHIV+pRSV-RDR, 그룹 4 비면역화(naive) 마우스.

도 9는 그룹 평균으로, Gag 및 Env의 2 인식 에피토프에 대한 누적 그랜자임 B ELISPOT 결과를 나타낸 도면이다. 3 그룹의 Balb/C 마우스를 2회(0주 및 4주) MultiHIV 항원을 코딩하는 플라스미드 DNA 단독 또는 1차 또는 2차 면역화가 부가된 pRSV-RDR와 함께 면역화하였다. 제4 그룹은 면역화하지 않았다. 그랜자임 B Elispot은 2차 면역화 후 10일후 신선하게 단리된 비장 세포에서 수행하였다. 그룹 1: GTU-MultiHIV, 그룹 2: 2차 면역화 수반된 GTU-MultiHIV+pRSV-RDR, 그룹 3: 1차 면역화 수반된 GTU-MultiHIV+pRSV-RDR, 그룹 4: 비면역화 마우스.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] 정의

"발현 벡터"는 핵산 서열의 형태로 유전자 정보를 보유하는 DNA 또는 RNA 기반 벡터 또는 플라스미드를 의미한다. 용어 "플라스미드", "벡터" 및/또는 "발현 벡터"는 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있다.

"RNA 의존적 RNA 중합효소" 또는 "RdRp"는 RNA 주형으로부터 RNA의 새로운 합성을 촉매하는 효소 활성을 보유한 효소, 단백질 또는 웨티드이다. 레플리카제는 RdRp 활성을 가지고 특정 바이러스 RNA의 복제를 촉매하는 바이러스 폴리단백질 또는 폴리단백질 프로세싱 산물의 복합체이다. 이들은 통상 RNA 계음을 갖는 바이러스에 의해 코딩된다. 따라서, 레플리카제는 RNA 의존적 RNA 중합효소의 기능을 제공할 뿐만 아니라, RdRp 활성 이외에도 다른 기능을 제공하는 추가의 바이러스 비구조 폴리단백질 서브유닛을 더 포함한다. "구획화된" RdRp(CRdRp)는 본원에서 RdRp 활성을 제공할 수 있고, 그 기능을 제공하기 위해 세포 내 정확한 구획에 지정될 수 있는 레플리카제의 RdRp로서 정의된다.

[0058] 본원에서 언급하는 용어 "항원" 및 "목적 유전자"는 예를 들어, 발현 벡터의 형태 또는 웨티드 또는 단백질의 형태로, 이를 필요로 하는 피험체에 투여시, 직접적으로 또는 간접적으로 투여된 피험체에서 면역 반응을 일으킬 수 있는, 독립체를 포함한다. 항원이 항원성 단백질/웨티드의 발현을 제공할 수 있는 유전자인 경우, 이를 또한 "목적 유전자"라고 할 수 있다. 목적 유전자가 발현 벡터, 예컨대 DNA 벡터 형태로 투여되면, 면역 반응은 벡터에 의해 코딩되는 유전자가 숙주에서 발현시 촉발된다.

[0059] 본원에서 사용하는 용어 "백신"은 특정 질환에 대한 면역성을 향상시키기 위해 사용되는 조제물이다. 백신은 병원체에서 유래된 1 이상의 항원(들)을 포함할 수 있는데, 이 항원(들)은, 백신 투여를 필요로 하는 피험체에 투여시, 상기 1 이상의 항원(들)에 대한 면역 반응을 촉발시켜, 피험체에서 면역성을 유발시키고 대상 병원체에 의한 이후 "실제" 감염에 대한 보호능을 제공한다. 백신은 예방적일 수 있는데, 예를 들어 임의의 천연 병원체에 의한 향후 감염 영향을 방지하거나 또는 감소시킬 수 있거나 또는 이를 백신은 감염이 이미 존재할 경우에는 치료적으로 작용할 수 있다. 본 발명에 있어서, 알파바이러스 레플리카제 또는 알파바이러스 레플리카제를 코딩하는 발현 벡터는 예방 및/또는 치료 백신 둘 모두와 함께 면역 반응을 조절하기 위한 보조제로서 사용하고자 한다. 백신은 사멸 또는 불활성화된 미생물이거나 또는 이러한 미생물에서 유래된 정제 생성물일 수 있다. 대체로, 4가지 유형의 전통적인 백신이 존재한다. 이들은, 이전에 병독성인 미생물을 사멸시킨 사멸 미생물을 함유하는 백신, 생 약독화 바이러스 미생물, 불활성화된 미생물인 톡소이드, 또는 약독화 또는 불활성화된 미생물의 서브유닛이다. 백신은 단백질 형태로 존재하거나, 또는 간접적으로 1 이상의 항원(들)을 발현하여 피험체에서 면역 반응을 유도하는 발현 벡터의 형태일 수 있다. 본원에 개시한 바와 같은, 백신 조성물에서, 임의의 백신, 상기 제공된 예들은, 본 발명에 따른 보조제와 함께 투여될 수 있다. 따라서, 본 명세서에서, "백신"은 1 이상의 항원(들)을 포함하거나 또는 목적하는 1 이상의 유전자(들)을 코딩하고, 본원에서 설명한 바와 같이 투여시 면역 반응을 생성시키는 임의의 독립체를 의미한다. "백신"은 또한 이를 필요로 하는 피험체에 투여를 돋는 추가 성분, 예컨대 본원에 제공한 예들의, 성분 및/또는 부형제를 포함할 수도 있다.

[0060] 본원에서 사용하는 "보조제(adjuvant)"는 선천성 면역계를 활성화시키고, 다른 제제, 예컨대 백신의 효과를 변형시킬 수 있는 면역 제제로서 정의할 수 있다. 보조제는 면역계를 자극하고 백신에 대한 반응을 증가시켜, 백신만을 투여했을 때보다, 백신접종한 피험체에 대해 보다 강력하고 보다 효과적인 면역 반응을 제공할 수 있는 제제이다. 따라서, 보조제는 흔히, 특정 질환에 대해 높은 면역성을 제공하도록, 예를 들어 면역계가 백신에 보다 활발하게 반응하도록 자극시켜 백신의 효과를 증가시키거나 또는 임의의 다른 방식으로 영향을 주기 위해 사용된다. 보조제는 이러한 과제를, 진화적으로 보존된 분자의 특정 세트를 모방하여 수행할 수 있다. 이러한 분자의 예로는 리포솜, 리포폴리사카라이드(LPS), 박테리아 세포 벽 성분, 이중 가닥 RNA(dsRNA), 단일 가닥 DNA(ssDNA), 및 비메틸화된 CpG 디뉴클레오티드-함유 DNA 등이다. 백신과 함께하는 보조제의 존재는 천연 감염

을 모방하여 항원에 대한 선천성 면역 반응을 상당히 증가시킬 수 있다. "보조제"를 본원에서 언급할 때, 보조제 기능을 제공하는, 본원에 개시된 RNA 의존적 RNA 중합효소 활성을 갖는 알파바이러스 레플리카제 또는 알파바이러스 레플리카제를 코딩하는 발현 벡터를 지칭하려는 의도이다. 보조제는 또한, RNA 의존적 RNA 중합효소 활성을 포함하는 알파바이러스 레플리카제의 발현을 제공하는, 발현 벡터, 예컨대 DNA 벡터일 수 있다. 따라서, 알파바이러스 레플리카제는 그 자체로 투여되거나, 또는 발현 벡터의 형태로 투여되어, 그로부터 보조제 기능을 제공하는 알파바이러스 레플리카제가 발현될 수 있다. 본원에서 지칭하는 백신 조성물은 일부 구체예에서, 이를 필요로 하는 환자에게 투여되는 백신 칸테일을 제공하도록, 예를 들어 단백질 기반 백신을 통해 1 이상의 항원(들)을 제공하거나, 또는 1 이상의 목적 유전자를 코딩하는, 예컨대 1 이상의 발현 벡터(들)의 형태로, 1 이상의 백신 독립체를 포함한다.

- [0061] "면역계를 조절하는", "면역 반응을 조절하는", 또는 "면역계 조절 활성"은 본원에서 정의한 바와 같은, 보조제가 제공하는 작용 또는 활성을 의미하고, 이의 효과는 상기 보조제 용어와 관련하여 추가로 설명하였다. 예를 들어, 이는 보다 활발하게 백신에 반응하도록 면역계를 자극하는 형태 및/또는 특정 질환에 높은 면역성을 제공하는 형태일 수 있다. 본 발명에 따른 보조제는 백신과 함께 투여시, 백신이 보조제없이 그 자체만 투여되었을 때보다, 백신 형태로 투여된 항원에 대해 높은 반응을 제공하는 것을 특징으로 한다.
- [0062] 본원에 개시된 "발현 카세트"는 1 이상의 유전자를 코딩하는 핵산 서열 또는 경우에 따라 유전자 발현 조절을 위한 다양한 조절 서열을 동반하는 코딩 서열을 포함한다. 이들 유전자는 발현시 숙주 내에서 면역 반응을 일으키게 되는 다양한 항원을 코딩하는 백신의 일부를 형성할 수 있다.
- [0063] 본원에서 지칭하는 "돌연변이"는 본 발명에 따른 보조제 기능의 성능을 변화시키기 위해 핵산 서열에 수행된 결실, 치환, 삽입 및/또는 특이적 점돌연변이를 포함한다. 본 발명에 따른 그 보조제 특성을 향상시키기 위해 레플리카제에 도입되는 특이적 돌연변이를 본원에서 추가로 설명한다.
- [0064] "프로모터"는 유전자의 안티센스 가닥의 3' 영역을 향해 상류에 위치하는 조절 영역으로서, 조절하는 유전자 전사에 제어점을 제공한다. 프로모터는 반응 성분이라고도 하는, 특정 DNA 서열을 함유하는데, 이 서열은 유전자의 코딩 영역으로부터 RNA를 합성하는 효소인 RNA 중합효소를 모집하는 프로모터 서열에 결합하는 전사 인자에 의해 인식된다.
- [0065] 본원에서, 핵산 서열 또는 아미노산 서열이 일정 핵산 또는 아미노산 서열"에 실질적으로 상응하는" 경우, 이는 언급한 서열과의 동일성이 90% 부터, 예컨대 대상 서열과 약 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 99 또는 100%에 근접한 동일성을 갖는 서열을 의미한다. 물론, 일부 구체예에서, 핵산 또는 아미노산 서열을 특정한 서열로 이루어진다.
- [0066] **본 발명의 구체적인 설명**
- [0067] 본 발명자들은 기능적 RNA 의존적 RNA 중합효소(RdRp) 활성을 보유한 알파바이러스 레플리카제가 면역계 조절 효과를 일으킬 수 있다는 것, 즉 이러한 효과를 제공하기 위한 임의의 추가적인 구조 또는 비구조 바이러스 단백질 또는 게놈 핵산 서열의 필요없이 단독 투여시 면역계 조절 보조제로서 작용할 수 있다는 것을 처음으로 개시한다.
- [0068] 본원에서는 세포에 단독 투여된 기능성 RdRp를 포함하는 알파바이러스 레플리카제가, 선천성 면역을 활성화시키고 후천성 체액 및 세포 면역 반응의 질과 효능을 향상시키는, I형 인터페론을 유도시킬 수 있다는 것을 처음으로 확인하였다. 기능성 RdRp를 갖는 알파바이러스 레플리카제가 대체로 임의 유형의 백신 또는 항원과 조합되어 면역계 조절 보조제로서 사용될 수 있다는 것을 확인하였다.
- [0069] 또한, 면역계 조절 보조제로서 알파바이러스 레플리카제의 기능은 nSP2 서브유닛의 핵 국재화 신호로서 정의된 레플리카제 영역에 특정 돌연변이를 도입하여 더욱 향상시킬 수 있음이 확인되었다(Rikkonen et al 1992).
- [0070] 주목할 것은, 레플리카제의 RdRp와의 상호작용을 위한 시스-신호를 함유하는 특정 바이러스 주형 RNA가 면역계 조절 보조제로서의 활성을 위해 필요하지 않다는 것인데, 이는 어떠한 이론에 한정되지 않고, RdRp가 세포 세포 질에서 RNA 복제 중간체의 합성을 개시하기 위한 주형으로서 일부 세포 RNA를 이용할 수 있다는 것을 의미한다. 이는 면역 반응의 활성화를 획득하기 위해, 바이러스의 임의의 다른 부분없이, 예를 들어 단백질 형태로 또는 발현 벡터, 예컨대 DNA 벡터에 의해 코딩되는 형태로, 알파바이러스 레플리카제를 투여하는 것만이 필요하게 되는, 보조제를 제작하기 위한 신규 접근법을 제공하는 획기적인 발견이다.
- [0071] 따라서, 본 발명의 제1 측면은 면역계를 조절하기 위한 보조제로 사용하기 위한, RNA 의존적 RNA 중합효소를 포

함하는 알파바이러스 레플리카제에 관한 것이다. 본원의 어떠한 구체예에서건, 면역계를 조절하기 위한 보조제로서 사용하기 위한 RNA 의존적 RNA 중합효소를 포함하는 알파바이러스 레플리카제를 언급하는 경우, 이는 또한 면역 반응을 조절하기 위한 보조제를 제조하기 위한, RNA 의존적 RNA 중합효소를 포함하는 알파바이러스 레플리카제의 용도를 의미하는 것임을 이해해야 한다. 따라서, 유사 측면에서 본 발명은 또한, 면역 반응을 조절하기 위한 보조제를 제조하기 위한, 예컨대 발현 벡터 형태인, RNA 의존적 RNA 중합효소를 포함하는 알파바이러스 레플리카제의 용도에 관한 것이다.

[0072] 본 발명의 바람직한 일 측면에서, 알파바이러스는 셈리키 포레스트 바이러스(Semliki Forest Virus)이다. 본원에서, 레플리카제를 언급하는 경우, 이는 항상 레플리카제 선택권이 SFV 레플리카제를 포함한다는 것을 이해해야 한다. 일 구체예에서, 셈리키 포레스트 바이러스의 레플리카제의 아미노산 서열은 실질적으로 서열 번호 1에 상응하고, 면역계를 조절하기 위한 보조제로 사용하기에 적합하다. 셈리키 포레스트 바이러스의 레플리카제의 아미노산 서열은 또한 서열번호 1에 상응하는 서열, 또는 돌연변이체 레플리카제에 상응하는 서열로 이루어질 수 있다. 바람직한 일 구체예에서, 상기 레플리카제는 nsP2 영역이 돌연변이되어 서열번호 1의 위치 1185-1187에 돌연변이체 RRR>RDR가 생성되며, 면역계를 조절하기 위한 보조제로 사용하기 적합하다. 이 돌연변이된 서열은 서열번호 2에 제공된 아미노산 서열에 상응하고, 또한 면역 반응을 조절하기 위한 보조제로 사용하기 위해 본 발명에 포함된다. 다른 바람직한 구체예에서, 레플리카제는 nsP2 영역이 돌연변이되어 서열번호 1의 위치 1185-1187에 돌연변이체 RRR>AAA가 생성되고, 또한 면역계를 조절하기 위한 보조제로 사용하기 적합하다. 이 돌연변이된 서열은 서열번호 3에 제공된 아미노산 서열에 상응하고, 이 또한 면역 반응을 조절하기 위한 보조제로 사용하기 위해 본 발명에 포함된다. 본 발명은 또한 면역 반응을 조절하기 위한 보조제로서 사용하기 위한, 본원의 임의의 구체예에서 정의된 바와 같은 레플리카제를 코딩하는 발현 벡터에 관한 것이다. 펩티드 및/또는 단백질의 형태, 및/또는 발현 벡터에 의해 코딩되는 형태의, 상기 레플리카제는 본원에 제공한 예의, 약학적으로 허용되는 부형제 및/또는 성분과 함께 제제화될 수 있다. 다른 구체예에서, 경우에 따라 1 이상의 발현 벡터(들)에 의해 발현되는, 야생형 레플리카제와 함께 및/또는 본원에 언급한 바와 같은 돌연변이된 레플리카제 중 어느 것 또는 둘 모두의 혼합물을 면역 반응을 조절하기 위한 보조제로 사용할 수 있다.

[0073] 본 발명이, 임의의 추가적인 바이러스 항원 존재없이, 알파바이러스 레플리카제가 그 자체로 면역계 조절 보조제로서 작용할 수 있다는 것을 처음 발견했다는 것을 특별히 언급한다. 예를 들어, 발현 벡터의 형태로 존재할 경우, 그 발현 벡터가 발현시 이종성 항원 또는 임의의 다른 알파바이러스 핵산 서열을 코딩하는 추가적인 핵산 서열을 동시 투여하지 않고도 피험체에서 면역계 조절 효과를 일으킬 수 있다. 이러한 효과를 제공하기 위해, 레플리카제의 RdRp 활성이 결정적일 뿐만 아니라, 세포의 세포질 내 정확한 구획으로 옮겨가는 레플리카제의 능력, 즉 레플리카제의 구획화 과정이 중요하다는 것을 확인하였고, 이하에 더욱 설명한다.

[0074] 이론에 한정되지 않으면서, 보조제를 발현 벡터의 형태로 투여하는 경우, 레플리카제는 표적 조직의 형질감염된 세포 핵에서 발현을 위해 활성화되는 듯 하다. 발현 벡터의 전사 시, 레플리카제를 코딩하는 mRNA가 세포질로 수송되고, 여기서 세포질 RNA 의존적 RNA 중합효소 활성을 보유한 레플리카제 단백질로 번역되는 것이 더욱 관찰되었다. 이 효소는 특정 세포질 구획으로 구획화되고, 여기서 RNA 의존적 RNA 중합효소 활성이, 세포의 세포질 내부에, 이에 제한되는 것은 아니고, 이중 가닥 RNA를 포함한 이პ터 분자를 생성시켜서, I형 인터페론의 발현 유도를 포함한, 대규모의, 강력한 장기 지속적 세포 항바이러스 반응이 촉발된다. 이러한 유형의 항바이러스 반응 유도는 보편적이고, 종-독립적이며, 세포 매개 반응 및 체액성 면역 반응 둘 모두를 활성화시킨다.

[0075] 따라서, 다른 측면에서, 본 발명은 면역계를 조절하기 위한 보조제로 사용하기 위한, 본원에 정의된 바와 같은, 알파바이러스 레플리카제, 예컨대 SFV 레플리카제를 코딩하는 발현 벡터, 바람직하게는 DNA 벡터, 예컨대 플라스미드 DNA 발현 벡터에 관한 것이며, 일 구체예에서는, 실질적으로 서열번호 5에 개시된 서열에 상응하는, pRSV-Nsp1234에 관한 것이다. 셈리키 포레스트 바이러스의 레플리카제의 핵산 서열은 또한, 서열번호 5에 상응하는 서열, 또는 돌연변이체 레플리카제에 상응하는 서열로 이루어질 수 있다. 일부 구체예에서, 발현 벡터에 의해 코딩되는 레플리카제는 nsP2 영역이 돌연변이된다. 개괄적인 참조로서, SFV 레플리카제의 nsP2 영역(서열 번호 1)은 서열번호 1의 대략 아미노산 위치 538-1336에 존재한다. 일 구체예에서, 발현 벡터는 nsP2 영역이 돌연변이되어 서열번호 1의 위치 1185-1187에 돌연변이체 RRR>RDR가 생성되는 레플리카제를 코딩하고, 면역계를 조절하기 위한 보조제로 사용하기 적합하다. 일 구체예에서, 상기 발현 벡터는 실질적으로 서열번호 4에 상응하는 서열에 의해 코딩되지만, 여기서 면역 반응을 조절하기 위한 보조제로서 사용하기 위해, 돌연변이가 이 서열의 위치 4129-4131에 도입되는데, 예컨대 일 구체예에서, 돌연변이는 CGG에서 GAC로의 돌연변이이다. 셈리키 포레스트 바이러스의 레플리카제의 핵산 서열은 또한, 서열번호 4에 상응하는 서열로 이루어질 수 있지만, 여기서 돌연변이가 이 서열의 위치 4129-4131에 도입되며, 예컨대 일 구체예에서, 돌연변이는 CGG에서 GAC로의 돌연변

이이다. 다른 구체예에서, 발현 벡터는 nsP2 영역이 돌연변이되어 서열번호 1의 위치 1185-1187에 돌연변이체 RRR>AAA가 생성되는 레플리카제를 코딩하고, 면역계를 조절하기 위한 보조제로서 사용된다. 일 구체예에서, 발현 벡터는 실질적으로 서열번호 4에 상응하는 서열에 의해 코딩되지만, 여기서 면역 반응을 조절하기 위한 보조제로 사용하기 위해, 돌연변이가 이 서열의 위치 4126-4133에 도입되는데, 예컨대 일 구체예에서 돌연변이는 CGGCGGAG에서 GCCGCCGC로의 돌연변이이다. SFV의 레플리카제의 핵산 서열은 서열번호 4에 상응하는 서열로 이루어질 수 있지만, 여기서, 돌연변이가 이 서열의 위치 4126-4133에 도입되며, 예컨대 일 구체예에서 돌연변이는 CGGCGGAG에서 GCCGCCGC로의 돌연변이이다. 이는 각각의 아미노산 서열에 있어서, 서열번호 1의 위치 1185-1187에서, 야생형 아미노산 서열이 RRR에서 각각 RDR 및 AAA로 변화된다는 것을 의미한다. 돌연변이되거나 또는 그렇지 않은 상기 발현 벡터는, 바람직한 구체예에서, DNA 벡터일 수 있다. 상기 벡터는 또한 바이러스 발현 벡터, 예컨대 아데노바이러스 벡터 또는 헤르페스 바이러스 기반 벡터 또는 임의의 다른 유용한 바이러스 발현 벡터이다. 일 구체예에서, 발현 벡터는 RNA-기반 벡터이다. 또 다른 구체예에서, 보조제는 알파바이러스 레플리카제 mRNA의 형태로 투여된다. 일 구체예에서, 본 발명은 실질적으로 서열번호 5에 개시된 핵산 서열에 상응하는 pRSV-AAA인, 알파바이러스 레플리카제 플라스미드 DNA 발현 벡터에 관한 것으로서, 여기서 면역계를 조절하기 위한 보조제로 사용하기 위해, 서열의 위치 5126-5133는 CGGCGGAG에서 GCCGCCGC로 돌연변이되었다. 다른 구체예에서, 본 발명은 실질적으로 서열번호 5에 상응하는 pRSV-RDR인, 알파바이러스 플라스미드 DNA 발현 벡터에 관한 것으로서, 여기서 면역계를 조절하기 위한 보조제로 사용하기 위해, 서열의 위치 5129-5131은 CGG에서 GAC로 돌연변이되었다. 셀리키 포레스트 바이러스의 레플리카제의 핵산 서열은 또한 서열번호 5에 상응하는 서열, 또는 상기 언급한 돌연변이체 레플리카제에 상응하는 서열로 이루어질 수 있다.

[0076]

당분야의 숙련가가 이해하는 바와 같이, 면역계를 조절하기 위한 보조제로 사용하기 위한 레플리카제를 코딩하는 본 발명에 따른 발현 벡터는 또한 벡터의 발현을 돋는 추가적인, 통용 성분, 예컨대 프로모터, 인핸서 등의 형태인 다양한 조절 서열을 포함할 수 있다. 면역계를 조절하기 위한 보조제로 사용하기 위한, 본원에 정의된 바와 같은 레플리카제를 코딩하는 발현 벡터는 또한, 복제 기점 및/또는 선별 마커, 예컨대 항생제 선별 마커, 또는 본 출원인의 WO2005/026364에서 제공한, *araD* 유전자를 기반으로 하는 선별 시스템 등을 포함할 수 있다. WO2005/026364에 개시된 바와 같은 선별 시스템은 *araD* 유전자, 바람직하게는 박테리아 *araD* 유전자, 예컨대 *Escherichia coli* 유래 *araD* 유전자, 이의 상보적 서열, 또는 이의 촉매 활성 단편을 보유한 벡터가 선별 마커로서 부가된 *araD* 유전자 결핍 박테리아 세포를 포함한다. *araD* 유전자는 기능성 L-리불로스-5-포스페이트 4-에피머제를 코딩한다(EC 5.1.3. 4.).

[0077]

실시예 부분에서 검증한 바와 같이, 돌연변이형 레플리카제의 발현은, 또한 면역계 조절 보조제로서 작용한다. 뿐만 아니라, 돌연변이는 레플리카제의 보조제 활성을 조절할 수 있는데: RDR 돌연변이체는 wt(야생형) 레플리카제 발현과 비교하여 I형 IFN 유도 능력이 향상되었다(실시예 2). RRR>AAA 돌연변이된 레플리카제는 야생형 레플리카제와 유사한 면역계 조절 보조제로서 작용하였다(실시예 2). 레플리카제 기반 발현 벡터 단독으로 형질감염된 상이한 인간 및 마우스 세포들이 I형 인터페론 생성의 활성화를 유도시킨다는 것을 실시예 부분에서 또한 검증하였다.

[0078]

실시예 부분에 기술한 결과들은 레플리카제의 RNA-의존적 RNA 중합효소(RdRp) 활성이 면역 조절 활성에 절대적으로 필요하다는 것을 분명하게 증명해 주었다. 바이러스 RNA 중합 효소의 서명 GDD 모티프는 알파바이러스 레플리카제의 nsp4 영역에 위치하는데, 여기에 RdRp 효소 활성이 존재한다. 이 모티프의 GDD>GAA 돌연변이는 RdRp 활성을 파괴한다(Tomar et al 2006). 레플리카제로 GDD>GAA 돌연변이의 도입은 I형 인터페론 반응 유도를 완전하게 제거시켰으며(실시예 2), 따라서, 면역계 조절 효과를 위한 RdRp 활성의 필요성이 증명되었다.

[0079]

실험 데이터는 또한 기능성 RdRp 활성을 갖는 레플리카제의 발현은 형질감염된 세포의 세포질에 dsRNA를 축적시켰지만 GDD>GAA 돌연변이를 갖는 레플리카제는 그렇지 않다는 것을 보여주었다. 이론에 제한되지 않으면서, 이러한 결과들은 레플리카제의 면역계 조절 활성이 적어도 부분적으로 dsRNA 인식 경로에 의해 매개될 수 있다는 것을 시사하며, 여기서 레플리카제는 세포질 내 내생성 RNA로부터 dsRNA를 생성시킨다. 그러나, 다른 경로(예를 들어, 비캡핑된 RNA의 인식을 통한 경로)가 관여된다는 것을 배제하지는 않는다. 일부 경우에서, 세포질에 dsRNA 축적 징후 없이 I형 IFN 반응 유도가 관찰되었다(실시예 3).

[0080]

또한, 합성 dsRNA(poly I:C) 형질감염에 의한 유도와 비교하여 SFV 레플리카제 발현으로 IFN 반응을 유도시킨 경우에 상이한 동역학 패턴이 관찰되었다. 레플리카제 발현 벡터 형질감염 실험에서, IFN 수준은 형질감염 이후 제1일 동안 증가되었다. 대조적으로, 합성 dsRNA로 형질감염 후 제1 시점(24h)에 IFN 수준이 최고값으로 확인되었고, 그 이후에 감소되었다(실시예 2).

- [0081] 실시예 부분에서 제시한 면역학적 데이터는 레플리카제, 이 경우에는 SFV 레플리카제를 코딩하는 발현 벡터와 함께 MultiHIV 항원 DNA 백신(Blazevic et al 2006)을 공동투여한 결과, DNA 백신 단독만으로 면역화시킨 경우와 비교하여 세포-매개 면역 반응이 양적으로 향상되는 것(ELISPOT 분석으로 측정함)이 분명하게 증명되었다(도 6). 또한, 그 값이 야생형 레플리카제 보다 돌연변이를 갖는 레플리카제의 경우 확실히 더 높았다(실시예 4). 따라서, 면역학적 데이터는 IFN 반응 유도 결과와 상관관계가 있었다: 과교된 RdRp 활성(GDD>GAA) 돌연변이를 갖는 레플리카제를 DNA 백신과 함께 투여한 경우 세포 매개 면역에 대해 어떠한 양성적 효과도 관찰되지 않았다. 이는 본 발명에 따른 보조제 효과를 제공하기 위한 RdRp 활성의 중요성을 보여주는 것이다.
- [0082] SFV 감염에 의한 I형 IFN 반응처럼, 선천성 면역 반응의 유발은 당분야에 공지이다. 알파바이러스의 면역 조절 활성은 레플리카제의 비구조 폴리펩티드의 nsP2 영역에 돌연변이를 도입시켜 조율할 수 있다는 것이 또한 확인되었다. nsP2 NLS에 단일 점 돌연변이 RRR>RDR를 갖는 SFV(셈리키 포레스트 바이러스)로 1차 마우스 섬유아세포를 감염시킨 결과, 바이러스 감염 세포에서 I형 IFN 및 프로염증성 사이토카인 TNF- $\alpha$ 의 발현이 야생형 SFV 감염과 비교하여 증가되었다(Breakwell et al. 2007). 그러나, 지적하고자 하는 것은, Breakwell 등의 결과에서, 세포들은 전체 바이러스 입자로 감염되어, 그 결과 전체 바이러스 계놈이 전달, 발현 및 복제되어서, IFN 반응이 일어났다는 것이다.
- [0083] 그러나, 종래와 달리, 본 발명은 IFN 반응 유도가 바이러스 감염 및 바이러스 계놈 복제 자체에 한정되지 않고, 바이러스 계놈, 바이러스 입자 또는 구조 단백질을 포함시키지 않고 바이러스 비구조 폴리단백질, 즉 레플리카제 단독 발현을 통해서도 획득될 수 있다는 것을 증명하였다. 또한, SFV 레플리카제가, SFV의 천연 핵산과 상동성이 낮지만 여전히 보조제 효과를 제공하는 코돈-최적화된 cDNA로부터 발현될 수 있다는 것을 확인하였다. 이러한 코돈 최적화 서열의 예는 서열번호 4로 제공하였다. 발현시, 서열번호 4의 서열은 서열번호 1에 개시된 바와 같은 아미노산 서열을 제공한다.
- [0084] 본 발명의 일부를 형성하는 본원에서 언급하는 핵산 및 아미노산 서열은 또한 이러한 서열과 대략 90% 동일성, 예컨대 상기 서열과 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 동일성을 갖는 핵산 및 아미노산 서열을 포함한다는 것을 이해할 것이다. 이는 서열이 본원에 개시된 서열보다 짧거나 또는 더 길 수 있거나 또는 동일한 길이를 가질 수 있지만, 여기서 핵산 서열 또는 아미노산 서열의 일부 위치가 적절한 방식으로 변화되었다는 것을 의미한다. 하지만, 돌연변이된 알파바이러스 레플리카제를 사용할 경우, 돌연변이된 서열이 항상 존재하게 되므로 본원에 개시된 특정 서열과 서열 동일성을 결정할 때 배제된다. 따라서, 본 발명에서 사용되는 서열은 의도하는 목적을 위해, 적절한 방식으로, 예컨대 핵산 서열의 특정 핵산, 또는 아미노산 서열의 아미노산을 도입, 변화 및/또는 제거하여 변화될 수 있다. 중요한 것은, 서열이 변화되더라도, 발현 벡터로부터 발현된 레플리카제의 RNA 의존적 RNA 중합효소 활성은 남아있는다는 것이다.
- [0085] 본 발명의 일부 구체예에서, 면역계를 조절하기 위한 보조제로 사용하기 위한, 본원에 정의된 바와 같은 상기 보조제는 약학적으로 허용되는 보조제 및/또는 성분과 함께 제제화된다. 이러한 약학적으로 허용되는 부형제 및/또는 성분은 적절한 임의의 공급원에서 선택된다. 약학 부형제의 예로는 액체, 예컨대 물 또는 오일, 예를 들어 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원 오일, 예컨대 땅콩유, 대두유, 광유, 참깨유 등을 포함한 오일 등이 있다. 약학 부형제는 염수, 겸 아카시아, 젤라틴, 전분 페이스트, 탈크, 케라틴, 콜로이드성 실리카, 우레아 등일 수 있다. 또한, 보조제, 안정화제, 중점제, 윤활제 및 착색제를 사용할 수 있다. 일 구체예에서, 약학적으로 허용되는 부형제는 동물에 투여시 무균 상태이다. 염수액 및 수성 텍스트로스 및 글리세롤 용액도 액체 부형제, 특히 주사 용액으로 적용할 수 있다. 적절한 약학 부형제는 또한, 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 말트, 쌀, 밀가루, 초크, 실리카겔, 스테아르산나트륨, 모노스테아르산글리세롤, 탈크, 염화나트륨, 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 보조제를 포함하는 조성물은, 필요하다면, 또한 소량의 습윤제 또는 유화제, 또는 pH 완충제를 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 또한 용액, 혼탁제, 에멀션, 정제, 알약, 펠렛, 캡슐, 액체 함유 캡슐, 분말, 서방형 제형, 좌제, 에멀션, 에어로졸, 분무제, 혼탁제, 또는 사용에 적절한 임의의 다른 형태를 취할 수 있다. 일 구체예에서, 조성물은 캡슐 형태이다. 적절한 약학 부형제의 다른 예는 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 1447-1676(Alfonso R Gennaro ed, 19th ed 1995)]을 참조한다. 일 구체예에서, 본 발명에 따른 보조제는 인간에 경구 투여하기 적합한 조성물로서 통상의 절차에 따라 제제화된다. 경구 전달용 조성물은 예를 들어 정제, 로젠지, 수성 또는 유성 혼탁제, 과립, 분말, 에멀션, 캡슐, 시럽 또는 엘리시르 형태일 수 있다. 경구 조성물은 표준 부형제 예컨대 만니톨, 락토스, 스테아르산마그네슘, 나트륨 사카린, 셀룰로스, 탄산마그네슘을 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 부형제는 약학 등급이다. 다른 바람직한 구체예에서, 보조제는 정맥내 투여용으로 제제화될 수 있다. 전형적으로, 정맥내 투여용 조성물은 멸균된 등장성 수성 완충액을 포함한다. 필요한 경우, 조성물은 또한 가용화제를 포함할 수 있다.

- [0086] 본 발명에 따른 발현 벡터의 투여 방법은, 이에 제한되지 않으나, 피내, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하, 비내, 경막외, 경구, 설하, 대뇌내, 질내, 경피, 직장 투여, 흡입 또는 특히 귀, 코, 눈 또는 피부에 국부적 투여를 포함한다. 투여 방식은 참관의의 판단에 따른다. 특히 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따른 보조제는, 경우에 따라 적절한 백신과 조합하여, 이를 필요로 하는 환자에게 유전자 총 방법(Klein et al 1992)에 의해, 전기천공과 조합된 주사("전기천공-매개 DNA 약물 전달법"; 피내 또는 근육내)를 통해서, 점막 표면 상에 국부 투여(예를 들어, 비내 분무 형태)를 통해 투여된다. 유전자 보조제는 또한 세포에 의한 플라스미드 DNA 흡수를 촉진하는, 특정 전달 보조제(예를 들어, 폴리에틸렌이미드 및 다른 유사물)와 조합될 수 있다.
- [0087] 전기천공(EP)은 조직의 표적 영역에 목적 제제의 세포내 전달성을 강화시키기 위해 생체 내 전기장 적용법을 활용한다. EP 전달법은 목적 제제가 상기 조직의 간질 공간 내에 분포된 이후 표적 조직 부위를 통해 역치 수준 전기장을 전파시키는 것에 의존한다. 표적 조직에서 치료제 및 전기장의 공간적이고 일시적인 "공동 국재(co-localization)"가 효율적인 DNA 전달을 성취하기 위한 핵심 요건이다.
- [0088] 전기천공은 원핵생물 및 진핵생물 세포 둘 모두에 효과적인 것으로 증명되었고 높은 효율로 DNA, 큰 거대분자(예를 들어, 항체), 단백질, 염료, 대사 전구체(예를 들어, 32P-ATP), 및 불투과성 약물 및 대사물질을 세포로 도입시킬 수 있다(De Lise et al, Developmental Biology Protocols; Jan 21 ;2000).
- [0089] 본 발명의 일 측면에서, 보조제는 경우에 따라, 이를 필요로 하는 환자에 1차 면역화로서 백신 조성물 내 선택 백신과 함께 투여될 수 있다. 본 발명자들이 제공하는 일부 결과들은 이러한 보조제 투여 방식이, 2차 면역화시 백신과 함께 보조제를 투여하는 경우에 비해 향상된 면역 반응을 제공하게 된다는 것을 보여주었다(도 8 및 9). 따라서, 일 측면에서, 본 발명은 본원에 정의된 바와 같은 백신 조성물을 투여하는 방법에 관한 것으로서, 상기 백신 조성물은 본원에 정의된 바와 같은 보조제를 포함하고, 여기서 상기 보조제는 상기 치료를 필요로 하는 필요로 하는 환자에게 1차 면역화시 백신 조성물의 일부로서 투여된다. 경우에 따라, 백신 조성물 내 백신과 보조제의 공동 투여는 1차 면역화 용량으로만 수행되는데, 다시 말해서, 추가 용량의 백신을 이를 필요로 하는 개체에게 이후 단계에서 투여할 경우 보조제가 투여되지 않는다.
- [0090] 따라서, 본 발명의 또 다른 측면은 1차 면역화 용량으로서 투여되는 백신 조성물에서 사용하기 위한, 알파바이러스 레플리카제에 관한 것으로서, 상기 레플리카제는 RNA 의존적 RNA 중합효소를 포함한다. 따라서, 일 측면에서, 본 발명은 본원에서 정의된 바와 같은 백신 조성물에서 보조제를 투여하는 방법에 관한 것으로서, 상기 보조제는 알파바이러스 레플리카제를 포함하고, 상기 레플리카제는 RNA 의존적 RNA 중합효소를 포함하며, 여기서 상기 보조제의 투여는 이를 필요로 하는 환자에 대해 백신 조성물의 1차 면역화 용량으로 수행된다. 본원에서, "1차 면역화 용량(first immunization dose)"은 1 이상의 항원(들)을 포함하는 백신을 이를 필요로 하는 환자에게 처음 투여하여, 이후 백신(즉, 이와 함께 투여된 1 이상의 항원(들))에 대한 면역 반응을 유발시키는 것을 의미한다. 다른 측면에서, 본 발명은 백신 조성물의 제조에서 알파바이러스 레플리카제의 용도에 관한 것이고, 여기서 상기 레플리카제는 RNA 의존적 RNA 중합효소를 포함하고, 상기 보조제를 1차 면역화 용량으로 투여하게 된다.
- [0091] 그러나, 주의할 것은, 본 발명이 상기 언급한 투여 방식, 즉 1차 면역화 용량으로 투여하는 것(단지 선택적으로)에 한정되지 않으며, 전문의는 유사하고 동등하게 바람직한 방식으로 기능하는 추가적인 대안 투여 방법을 선택할 수 있다.
- [0092] 다른 측면에서, 본 발명은 면역계를 조절하기 위한 보조제로서, 알파바이러스 레플리카제, 또는 알파바이러스 레플리카제를 코딩하는 발현 벡터를 사용하는 것에 관한 것으로서, 상기 레플리카제는 RNA 의존적 RNA 중합효소를 포함한다. 일 구체예에서, 상기 알파 바이러스는 셀리키 포레스트 바이러스이다. 다른 구체예에서, 면역계를 조절하기 위한 보조제로서 사용되는 상기 레플리카제는 실질적으로 서열번호 1에 개시된 아미노산 서열에 상응한다. 셀리키 포레스트 바이러스의 레플리카제의 아미노산 서열은 서열번호 1에 상응하는 서열, 또는 돌연변이체 레플리카제에 상응하는 서열로 이루어질 수 있다. 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 면역계를 조절하기 위한 보조제로서, 알파바이러스 레플리카제를 사용하는 것에 관한 것으로서, 상기 레플리카제는 RNA 의존적 RNA 중합효소를 포함하며, 여기서 레플리카제는 nsP2 영역이 돌연변이되어 서열번호 2로 표시된, 서열번호 1의 위치 1185-1187에 돌연변이체 RRR>RDR가 생성된다. 다른 바람직한 구체예에서, 레플리카제는 nsP2 영역이 돌연변이되어, 서열번호 2로 표시된, 서열번호 1의 위치 1185-1187에 돌연변이체 RRR>AAA가 생성된다. 일부 구체예에서, 본원에서 정의된 바와 같은 레플리카제는 발현 벡터, 일부 구체예에서 DNA 벡터에 의해 코딩된다. 경우에 따라, 상기 레플리카제는 약학적으로 허용되는 부형제 및/또는 성분과 함께 제제화될 수 있다.
- [0093] 실시예 5에서 증명한 바와 같이, 돌연변이 RRR>RDR를 갖는 레플리카제는 또한 인플루엔자 항원을 발현하는 DNA

백신을 이용한 면역화를 통해 야기된 항체 반응의 양을 증가시킨다. 실험 데이터는 항체 수준이 SFV 레플리카제 유닛을 인플루엔자 DNA 백신과 함께 투여한 경우 최고였고, 백신 벡터와 함께 투여시 명확한 보조제 GM-CSF 발현 벡터보다도 높은 값을 제공하는 것을 보여주었다.

[0094] 또 다른 바람직한 측면에서, 본 발명은 감염성 질환의 예방 및/또는 치료를 위한 약물을 제조하기 위해, 백신 조성물에 존재할 경우 면역 반응을 조절하기 위한 보조제로서, 야생형이거나 코돈-최적화되거나 또는 예컨대 본원에서 더욱 정의하는 바와 같은 RDR 또는 AAA 돌연변이를 갖게 돌연변이된, 알파바이러스 레플리카제, 또는 본원에 정의된 알파바이러스 레플리카제를 코딩하는 발현 벡터, 예컨대 DNA 벡터를 사용하는 것에 관한 것이고, 상기 레플리카제는 RNA 의존적 RNA 중합효소를 포함한다. 본 발명은 또한, 백신 조성물의 제조에서, 보조제로서, 본원에 정의된 바와 같은, 알파바이러스 레플리카제를 사용하는 것에 관한 것이다. 상기 백신은 바람직하게 감염성 질환의 예방 및/또는 치료를 위해 사용된다. 본 발명은 또한, 감염성 질환의 예방 및/또는 치료를 위해, 백신 조성물에 존재시 면역 반응을 조절하기 위한 보조제로서 사용하기 위한, 야생형이거나, 코돈 최적화되거나 또는 본원에서 더욱 정의한 바와 같은 예컨대 RDR 또는 AAA 돌연변이를 갖게 돌연변이된 본원에 정의한 바와 같은, 알파바이러스 레플리카제, 또는 알파바이러스 레플리카제를 코딩하는 발현 벡터에 관한 것이고, 상기 레플리카제는 RNA 의존적 RNA 중합효소를 포함한다. 본원에서 앞서 언급한 바와 같이, 레플리카제는 실질적으로 서열번호 1, 2 또는 3에 개시된 아미노산 서열에 상응할 수 있다. 또한, 레플리카제는 서열번호 1, 2 또는 3에 개시된 바와 같은 서열로 이루어질 수 있다. 일 구체예에서, 백신 조성물로서, 여기서 경우에 따라 발현 벡터에 의해 코딩되는, 알파바이러스 레플리카제가 보조제로 존재하는 백신 조성물이 감염성 질환의 예방 및/또는 치료를 위해 사용된다. 일 구체예에서, 경우에 따라 발현 벡터에 의해 코딩되는 알파바이러스 레플리카제가 보조제로 존재하는 백신 조성물이 박테리아성 질환의 예방 및/또는 치료를 위해 사용된다. 다른 구체예에서, 경우에 따라 발현 벡터에 의해 코딩되는, 알파바이러스 레플리카제가 보조제로서 존재하는 백신 조성물이 바이러스성 질환의 예방 및/또는 치료를 위해 사용되며, 여기서 바이러스성 질환은 바람직하게, AIDS를 발병시킬 가능성이 있는, HIV(인간 면역결핍성 바이러스; HIV-I, HIV-II)에 의해 야기된다. 또 다른 구체예에서, 경우에 따라 발현 벡터에 의해 코딩되는 알파바이러스 레플리카제가 보조제로 존재하는 백신 조성물은 암의 예방 및/또는 치료를 위해 사용된다. 조성물의 보조제 특성을 제공하는 레플리카제와 조합되어 투여되는 백신은 본 목적에 적절한 임의의 백신일 수 있다. 일부 구체예에서, 백신은 단백질 기반이고, 다른 구체예에서, 백신은 1 이상의 항원(들) 또는 목적 유전자(들)을 코딩하는 발현 벡터이다. 발현 벡터는 백신 조성물이 투여되는 숙주에서 특이적 면역 반응을 유도시킬 수 있는 1 이상의 목적 유전자 또는 항원을 코딩하는 임의의 적절한 핵산 기반 발현 벡터일 수 있다. 바람직한 일 구체예에서, 백신 조성물의 벡터는 인플루엔자 바이러스를 기반으로 한다.

[0095] 따라서, 일 측면에서, 본 발명은 본원에서 정의한 바와 같은, 선택 백신, 및 보조제 효과를 제공하는 본원의 임의의 구체예에서 정의한 바와 같은 알파바이러스 레플리카제를 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다. 백신은 경우에 따라 GTU-MultiHIV일 수 있다(Blazevic V, et al AIDS Res Hum Retroviruses 2006 Jul, 22(7): 667-77) 따라서, 백신 조성물 내 백신은 일부 측면에서, 선택된 1 이상의 구조 또는 비구조 HIV 단백질(들), 예컨대 본 출원인의 WO20090558에 개시된 항원을 함유할 수 있다.

[0096] 레플리카제 보조제 및 항원은 본원에서 동일한 발현 벡터에 의해 코딩될 수 있고, 여기서 레플리카제는 보조제 특성을 제공하고 벡터의 백신 부분은 레플리카제와 독립적으로 그 기능을 제공하는 벡터의 개별 독립 부분이다. 그럼에도 불구하고, 레플리카제는 경우에 따라 항원을 코딩하는 임의의 발현 벡터에서 임의의 다른 코딩 서열에 융합될 수 있다. 보조제 및/또는 백신을 코딩하는 발현 벡터는 일부 구체예에서 DNA 벡터일 수 있다. 당분야의 숙련가가 이해하는 바와 같이, 본 발명에 따른 조성물은 또한 1 이상의 백신 유전子를 포함할 수 있는데, 이는 몇몇 백신 칵테일을 이를 필요로 하는 피험체에게 본 발명에 따른 보조제와 함께 투여할 수 있다는 것을 의미한다.

[0097] 또 다른 측면에서, 본 발명은 감염성 질환의 예방 및/또는 치료를 위한 약물의 제조를 위해 면역 반응을 조절하기 위한 보조제로서 백신 조성물에 본원에 정의된 알파바이러스 레플리카제를 사용하는 것 또는 백신 조성물을 제조하기 위한 보조제로서 본원에 정의된 알파바이러스 레플리카제를 사용하는 것에 관한 것이고, 여기서 1 이상의 목적 유전자(들)를 포함하는 백신은 하기 a 및 b를 포함하는 발현 벡터이고, 이때 상기 벡터는 포유동물 세포에서 기능하는 복제 기점이 결여되어 있다:

[0098] a. 이종성 프로모터에 작동적으로 연결된 핵-앵커링(anchor ing) 단백질을 코딩하는 DNA 서열로서, 상기 핵-앵커링 단백질은 하기 (i) 및 (ii)를 포함하는 것인 DNA 서열:

[0099] (i) 특정 DNA 서열에 결합하는 DNA 결합 도메인, 및

- [0100] (ii) 핵 성분에 결합하는 기능성 도메인, 또는 이의 기능성 균등물; 및
- [0101] b. 핵-앵커링 단백질에 대한 다량체화된 DNA 결합 서열.
- [0102] 본원에 정의한 상기 백신 조성물은 감염성 질환, 예컨대 HIV 감염의 치료 및/또는 예방뿐만 아니라 박테리아성 질환 또는 암의 치료에 사용될 수 있다.
- [0103] 본 발명은 또한 감염성 질환의 예방 및/또는 치료를 위한 백신 조성물에서 면역 반응을 조절하기 위한 보조제로 사용하기 위한 본원에 정의된 알파바이러스 레플리카제에 관한 것이고, 여기서 1 이상의 목적 유전자(들)을 포함하는 백신은 하기 a) 및 b)를 포함하고, 이때 상기 벡터는 포유동물 세포에서 기능성이 복제 기점이 결여되어 있다:
- [0104] a) 이종성 프로모터에 작동적으로 연결된 핵-앵커링 단백질을 코딩하는 DNA 서열로서, 상기 핵-앵커링 단백질은 하기 (i) 및 (ii)를 포함하는 것인 DNA 서열:
- [0105] (i) 특정 DNA 서열에 결합하는 DNA 결합 도메인, 및
- [0106] (ii) 핵 성분에 결합하는 기능성 도메인, 또는 이의 기능성 균등물; 및
- [0107] b) 핵 앵커링 단백질에 대한 다량체화된 DNA 결합 서열.
- [0108] 용어 "핵-앵커링 단백질(nuclear-anchoring protein)"은 특정 DNA 서열에 결합하고 벡터에 핵 구획화 기능을 제공할 수 있는 단백질, 즉 벡터를 특정 핵 구획에 앵커링시키거나 또는 부착시킬 수 있는 단백질을 의미한다. 일 구체예에서, 상기 핵-앵커링 단백질은 1형 소 유두종 바이러스 유래의 E2 단백질이다. 다른 바람직한 구체예에서, 부분 i) 및/또는 부분 ii), 즉 특정 DNA 서열에 결합하는 DNA 결합 도메인 및/또는 핵 성분에 결합하는 기능성 도메인은 1형 소 유두종 바리서르의 E2 단백질로부터 얻는다. 일 구체예에서, 상기 단백질은 재조합 및/또는 합성 단백질이다. 핵 성분은 예를 들어, 유사분열 염색질, 핵 매트릭스, 핵 도메인 10(ND10), 또는 핵 도메인 POD일 수 있다.
- [0109] 본 발명에 따른 레플리카제 보조제와 함께 사용하기 위한 백신 조성물의 일부를 형성할 수 있는 이러한 벡터는 본 출원인의 WO20090558 및 문헌 [Blazevic V, et al. AIDS Res Hum Retroviruses. 2006 Jul;22(7):667-77]에 더욱 개시되어 있다. 그러나, 주목할 것은 이들 벡터가 단지 본원에 개시된 바와 같은 백신 조성물을 형성하는 본 발명에 따른 보조제로서 사용하기 위한 레플리카제와 조합할 수 있는 벡터의 일례라는 것이다. 백신으로서 기능하는 임의의 적절한 발현 벡터를 본 발명에 따라 본원에서 보조제로서 사용하기 위한 레플리카제와 함께 제제화시켜, 백신 단독 투여보다, 이 벡터를 투여한 피험체에서 보다 강력하고 보다 효과적인 면역 반응을 일으키는 조성물을 제조할 수 있다. 일 구체예에서, 본 발명은 감염성 질환의 예방 및/또는 치료를 위한 약물을 제조하기 위해 백신 조성물에서 면역계를 조절하기 위한 보조제로서 사용하기 위한 알파바이러스 레플리카제의 용도에 관한 것이고, 상기 레플리카제는 RNA 의존적 RNA 중합효소를 포함한다.
- [0110] 레플리카제를 보조제로 사용하는 백신 조성물과 관련하여, 주의할 것은, 본원에 개시된 보조제를 이용한 치료를 필요로 하는 피험체에 대해 백신 조성물에 존재하는 보조제 및/또는 백신의 적절한 용량 및 양을 결정하는 것은 숙련의가 담당한다는 것이다. 바람직한 일 측면에서, 백신 조성물의 일부로서 레플리카제는 발현 벡터, 바람직하게는 DNA 벡터에 의해 코딩된다. 상기 백신은 또한 일부 구체예에서 발현 벡터, 예컨대 DNA 벡터이거나 또는 단백질 기반 백신일 수 있다.
- [0111] 다른 측면에서, 본 발명은 보조제로 사용하기 위한 알파바이러스 레플리카제를 포함하는 본원에 개시된 백신 조성물을 제조하는 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 RNA 의존적 RNA 중합효소를 포함하는 알파바이러스 레플리카제 또는 이 알파바이러스 레플리카제를 코딩하는 발현 벡터의 적절한 양을 적절한 양의 백신과 혼합하는 단계 및 경우에 따라 약학적으로 허용되는 부형제 및/또는 성분을 부가하는 단계를 포함한다. 개별 성분에 대해 적절한 양은 숙련의가 결정할 수 있지만, 일부 바람직한 용량의 예를 본원에서도 제공한다.
- [0112] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 보조제로서 사용하기 위한 알파바이러스 레플리카제 또는 알파바이러스 레플리카제를 코딩하는 발현 벡터를 포함하는 백신 조성물의 적절한 양을 이의 투여를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다. 백신 조성물의 투여 경로는 본원에 제공한 예를 비롯하여, 숙련의가 결정한 임의의 적절한 경로일 수 있다. 이를 필요로 하는 피험체는 임의의 포유동물, 예컨대 인간 또는 동물일 수 있다.
- [0113] 또 다른 측면에서, 본 발명은 면역 반응을 조절하기 위한 보조제로서, 경우에 따라 발현 벡터에 의해 코딩되는,

RNA 의존적 RNA 중합효소를 포함하는 알파바이러스 레플리카제를, 이를 필요로 하는 피험체에게 투여하기 위한 방법에 관한 것이고, 상기 보조제는 적절한 양으로 백신 보조제와 조합되어 투여되고 투여시 백신만을 투여한 경우에 비교하여 보조제 및 백신을 투여한 피험체에서 면역 반응을 증가시킨다.

[0114] 또 다른 측면에서, 본 발명은 실질적으로 서열번호 3에 개시된 아미노산에 상응하는 단백질에 관한 것이다. 이 단백질은 또한 서열번호 3에 개시된 아미노산 서열로 이루어질 수 있다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열번호 1에 실질적으로 상응하지만, RRR에서 AAA로 아미노산 변화를 일으키는 돌연변이가 서열번호 1의 위치 1185-1187에서 수행된, 단백질에 관한 것이다. 이 단백질은 또한, 서열번호 1에 상응하지만, RRR에서 AAA로의 아미노산 변화가 일어난 돌연변이가 서열번호 1의 위치 1185-1187에서 수행된 서열로 이루어질 수 있다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 약물로 사용하기 위한, 실질적으로 서열번호 3에 개시된 아미노산 서열에 상응하는 단백질에 관한 것이다. 다른 측면에서, 본 발명은 약물로 사용하기 위한, 서열번호 3에 개시된 아미노산 서열로 이루어진 단백질에 관한 것이다. 다른 측면에서, 본 발명은 면역 반응을 조절하기 위한 보조제로 사용하기 위한, 서열번호 3에 개시된 아미노산 서열에 실질적으로 상응하는 단백질에 관한 것이다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 면역 반응을 조절하기 위한 보조제를 제조하기 위한, 서열번호 3에 개시된 아미노산 서열에 실질적으로 상응하는 단백질에 관한 것이다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열번호 4에 개시된 서열에 실질적으로 상응하지만, CGGCGGAG에서 GCCGCCGC로 변화된 돌연변이가 위치 4126-4133에 도입된 핵산 서열에 의해 코딩되는 단백질에 관한 것이다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열번호 4에 개시된 서열로 이루어지지만, CGGCGGAG에서 GCCGCCGC로 변화된 돌연변이가 위치 4126-4133에 도입된, 핵산 서열에 의해 코딩되는 단백질에 관한 것이다. 또 다른 측면 옛, 본 발명은 서열번호 4에 개시된 서열에 실질적으로 상응하지만, CGGCGGAG에서 GCCGCCGC로 변화되는 돌연변이가 위치 4126-4133에 도입된, 핵산 서열에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 서열번호 4에 개시된 서열로 이루어지지만, CGGCGGAG에서 GCCGCCGC로 변화되는 돌연변이가 위치 4126-4133에 도입된, 핵산 서열에 관한 것이다.

[0115] 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열번호 4에 개시된 서열에 실질적으로 상응하지만, 서열번호 4의 위치 4126-4133에 돌연변이가 도입되어, 발현시 서열번호 1의 위치 1185-1187에 돌연변이체 RRR>AAA가 생성되는 것인 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다(서열번호 3). 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열번호 4에 개시된 서열에 실질적으로 상응하지만, 서열번호 4의 위치 4126-4133에 돌연변이가 도입되어, 발현시 서열번호 1의 위치 1185-1187에 돌연변이체 RRR>AAA가 생성되는 것인 서열로 이루어진 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다(서열번호 3). 또 다른 측면에서, 본 발명은 약물로 사용하기 위한, 서열번호 4에 개시된 서열에 실질적으로 상응하는 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터에 관한 것으로서, 여기서 서열번호 4의 위치 4126-4133에 돌연변이가 도입되어, 발현시 서열번호 1의 위치 1185-1187에 돌연변이체 RRR>AAA가 생성되고, 돌연변이시 서열번호 3에 개시된 아미노산 서열이 생성된다.

[0116] 또 다른 측면에서, 본 발명은 면역계를 조절하기 위한 보조제를 제조하기 위한, 알파바이러스 레플리카제의 용도에 관한 것으로서, 여기서 레플리카제는 RNA 의존적 RNA 중합효소를 포함한다. 상기 알파 바이러스는 경우에 따라 셀리키 포레스트 바이러스이다. 일부 측면에서, 레플리카제의 아미노산 서열을 실질적으로 서열번호 1에 상응한다. 레플리카제의 아미노산 서열은 서열번호 1에 상응하는 서열, 또는 본원에 언급한 레플리카제의 돌연변이형 서열로 이루어질 수 있다. 다른 측면에서, 레플리카제는 nsP2 영역이 돌연변이되어 서열번호 1의 위치 1185-1187에 돌연변이체 RRR>RDR가 생성된다. 또 다른 측면에서, 레플리카제는 nsP2 영역이 돌연변이되어 서열번호 1의 위치 1185-1187에 돌연변이체 RRR>AAA가 생성된다.

[0117] 본 발명은 또한 면역계를 조절하기 위한 보조제를 제조하기 위한, 본원에 정의된 바와 같은 알파바이러스 레플리카제를 코딩하는 발현 벡터의 용도에 관한 것이다. 일부 측면에서, 상기 발현 벡터는 DNA 벡터이다. 상기 레플리카제 또는 상기 레플리카제를 코딩하는 발현 벡터는 약학적으로 허용되는 부형제 및/또는 성분과 함께 제제화될 수 있다.

[0118] 실시예

[0119] 발현 벡터

[0120] pRSV-Nsp1234(서열번호 5)는 RSV LTR 프로모터로부터 코돈 최적화된 SFV 레플리카제(서열번호 4)를 발현시키는 10342 bp 플라스미드 벡터이다. 이종성 토키 베타글로불린 유전자 유래된 인트론이 레플리카제 코딩 서열에 도입되어 있다.

[0121] 주요 특징:

[0122] 출발-말단 설명

[0123]	9933-268	pUCori
[0124]	437-963	RSV LTR
[0125]	1001-8869	인트론을 갖는 SFV 레플리카제 코딩 서열(서열번호 4)
[0126]	1213-1785	인트론
[0127]	8878-9090	bgh pA
[0128]	9204-9899	araD 선별 마커
[0129]	pRSV-AAA는 pRSV-Nsp1234(서열번호 5)와 동일하지만 서열번호 1의 aa 1185-1187에 RRR에 AAA로의 돌연변이를 포함한다: 위치 5126-5133의 뉴클레오티드 서열이 CGGCGGAG에서 GCCGCCGC로 돌연변이되었다.	
[0130]	pRSV-RDR는 pRSV-Nsp1234(서열번호 5)와 동일하지만 서열번호 1의 aa 1185-1187에 RRR에 RDR로의 돌연변이를 포함한다: 위치 5129-5131의 뉴클레오티드 서열이 CGG에서 GAC로 돌연변이되었다.	
[0131]	pRSV-GAA는 pRSV-Nsp1234(서열번호 5)와 동일하지만 서열번호 1의 aa 2283-2285에 GDD에서 GAA로의 돌연변이를 포함한다: 위치 8424-8427의 뉴클레오티드 서열이 ACGA에서 CCGC로 돌연변이되었다.	
[0132]	pRSV-AAA-GAA는 pRSV-Nsp1234(서열번호 5)와 동일하지만 서열번호 1의 aa 1185-1187에 RRR에서 AAA로의 돌연변이(위치 5126-5133의 뉴클레오티드 서열이 CGGCGGAG에서 GCCGCCGC로 돌연변이됨); 및 Nsp1234의 aa 2283-2285에 GDD에서 GAA로의 돌연변이(위치 8424-8427의 뉴클레오티드 서열이 ACGA에서 CCGC로 돌연변이됨)를 포함한다.	
[0133]	pRSV-RDR-GAA는 pRSV-Nsp1234(서열번호 5)와 동일하지만 서열번호 1의 aa 1185-1187에 RRR에서 RDR로의 돌연변이(위치 5129-5131의 뉴클레오티드 서열이 CGG에서 GAC로 돌연변이됨); 및 Nsp1234의 aa 2283-2285에 GDD에서 GAA로의 돌연변이(위치 8424-8427의 뉴클레오티드 서열이 ACGA에서 CCGC로 돌연변이됨)를 포함한다.	
[0134]	pheIF4A1-Nsp1234(서열번호 6)는 인간 eIF4A1 프로모터로부터 코된 최적화된 SFV 레플리카제(서열번호 4)를 발현하는 10248 bp 플라스미드 벡터이다. 이종성 토키 베타글로불린 유전자 유래된 인트론이 레플리카제 코딩 서열에 도입되었다.	
[0135]	주요 특징:	
[0136]	출발-말단	설명
[0137]	9839-268	pUCori
[0138]	367-894	heIF4A1 프로모터
[0139]	907-8775	인트론을 갖는 SFV 레플리카제 코딩 서열(서열번호 4)
[0140]	1119-1691	인트론
[0141]	8784-8996	bgh pA
[0142]	9110-9805	araD 선별 마커
[0143]	pheIF4A1-AAA는 pheIF4A1-Nsp1234(서열번호 6)와 동일하지만 서열번호 1의 aa 1185-1187에 RRR에서 AAA로의 돌연변이를 포함한다: 위치 5032-5039의 뉴클레오티드 서열이 CGGCGGAG에서 GCCGCCGC로 돌연변이되었다.	
[0144]	pheIF4A1-RDR는 pheIF4A1-Nsp1234(서열번호 6)와 동일하지만 서열번호 1의 aa 1185-1187에 RRR에서 RDR로의 돌연변이를 포함한다: 위치 5035-5037의 뉴클레오티드 서열이 CGG에서 GAC로 돌연변이되었다.	
[0145]	pheEF1aHTLV-Nsp1234(서열번호 7)는 HTLV UTR이 더해진 인간 EF1a 프로모터로부터 코된 최적화된 SFV 레플리카제(서열번호 4)를 발현하는 10258 bp 플라스미드 벡터이다. 이종성 토키 베타글로불린 유전자 유래된 인트론이 레플리카제 코딩 서열에 도입되었다.	
[0146]	주요 특징:	
[0147]	출발-말단	설명
[0148]	9849-268	pUCori

- [0149] 372-903 hEF1a/HTLV
- [0150] 917-8785 인트론을 갖는 SFV 레플리카제 코딩 서열(서열번호 4)
- [0151] 1129-1701 인트론
- [0152] 8794-9006 bgh pA
- [0153] 9120 9815 araD 선별 마커
- [0154] phEF1aHTLV-AAA는 phEF1aHTLV-Nsp1234(서열번호 7)과 동일하지만 서열번호 1의 aa 1185-1187에 RRR에서 AAA로의 돌연변이를 포함한다: 위치 5042-5049의 뉴클레오티드 서열이 CGGCGGAG에서 GCCGCCGC로 돌연변이되었다.
- [0155] phEF1aHTLV-RDR는 phEF1aHTLV-Nsp1234(서열번호 7)와 동일하지만 서열번호 1의 aa 1185-1187에 RRR에서 RDR로의 돌연변이를 포함한다: 위치 5045-5047의 뉴클레오티드 서열이 CGG에서 GAC로 돌연변이되었다.
- [0156] phEF1aHTLV-GAA는 phEF1aHTLV-Nsp1234(서열번호 7)와 동일하지만 서열번호 1의 aa 2283-2285에 GDD에서 GAA로의 돌연변이를 포함한다: 위치 8340-8343의 뉴클레오티드 서열이 ACGA에서 CCGC로 돌연변이되었다.
- [0157] **실시예 1: nsP2 영역에 돌연변이 RRR>RDR를 갖는 SFV 레플리카제를 발현하는 DNA 플라스미드의 제작.**
- [0158] 이전에, SFV 레플리카제 단백질 서열(비구조 폴리펩티드 nsP1234)(서열번호 1)를 역번역시키고 이종성 토키 베타글로불린 유전자 유래된 인트론(코딩 서열에 도입됨)을 갖는 코돈 최적화된 합성 cDNA를 합성하였다(서열번호 4). 이 cDNA를 발현 플라스미드에 삽입시켜 코돈 최적화된 코딩 서열로부터 SFV 레플리카제를 발현시키기 위해 상이한 이종성 Pol II 프로모터 및 UTR 성분을 사용하였다(도 5). 구체적으로, 루이스 육종 바이러스 5'LTR, 인간 eIF4A1 프로모터, 및 HTLV UTR과 인간 EF1a 프로모터로 이루어진 키메라 프로모터를 사용하였다. SFV 레플리카제(서열번호 1)를 발현하는 벡터를 pRSV-Nsp1234(서열번호 5), pheIF4A1-Nsp1234(서열번호 6), 및 phEF1aHTLV-Nsp1234(서열번호 7)이라 명명하였다. 또한, nsP2 NLS 영역 내, 아미노산 1185-1187에 RRR>AAA의 돌연변이를 벡터 pRSV-Nsp1234, pheIF4A1-Nsp1234, 및 phEF1aHTLV-Nsp1234에 도입하였다. 이 플라스미드들을 각각 pRSV-AAA, pheIF4A1-AAA, 및 phEF1aHTLV-AAA라 명명하였다.
- [0159] 문헌 데이터로 알려진 바에 의하면, 야생형 SFV 레플리카제를 코딩하는 유전자의 aa 1185-1187에 RRR>RDR로의 특정 돌연변이는 바이러스 감염된 세포에서 IFN 반응 유도를 야생형 바이러스가 감염된 세포에 비하여 유의하게 증가시켰다(Breakwell et al. 2007). 따라서, RRR>RDR의 돌연변이를 벡터 pRSV-Nsp1234, pheIF4A1-Nsp1234, 및 phEF1aHTLV-Nsp1234에 도입하였다. 이 플라스미드들을 각각 pRSV-RDR, pheIF4A1-RDR, 및 phEF1aHTLV-RDR라 명명하였다.
- [0160] 문헌 데이터로 알려진 바에 의하면, 알파바이러스 nsP4 단백질의 고도로 보존된 GDD 모티프(SFV Nsp1234의 aa 2283-2285) 내 GDD>GAA 돌연변이는 RNA 의존적 RNA 중합효소 활성을 완전하게 제거하였다(Tomar et al. 2006). 사전에, GDD>GAA 돌연변이를 벡터 pRSV-Nsp1234, 및 pRSV-AAA에 의해 코딩되는 레플리카제에 도입하였다. 클로닝된 벡터를 각각 pRSV-GAA, 및 pRSV-AAA-GAA라 명명하였다. 또한, GDD>GAA 돌연변이를 플라스미드 pEF1aHTLV-Nsp1234에 도입하여, 벡터 pEF1aHTLV-GAA를 생성시켰다. nsP2 영역에 RRR>RDR 돌연변이를 갖는 대조군 벡터를 제작하기 위해, GDD>GAA 돌연변이를 벡터 pRSV-RDR에 도입하여 플라스미드 pRSV-RDR-GAA를 생성시켰다.
- [0161] **실시예 2: RdRp 발현에 의한 I형 인터페론 반응 유도**
- [0162] 본 발명자들은 I형 인터페론 발현 유도능에 대해 상이한 레플리카제 구성체간의 구별을 위한 모델 세포주로서 Cop5 마우스 섬유아세포주(ATCC 번호 CRL-1804)를 사용하였다. Cop-5 세포를 10% 소태아 혈청, 2 mM L-글루타민, 및 스트렙토마이신-페니실린이 보충된 Iscove 변형된 Dulbecco 배지(IMDM)에서 증식시켰다. 2종의 다른 인간 세포주, HEK293 및 HACAT를 비교해서 사용하였다. 세포를 5% CO<sub>2</sub> 하에 37°C에서 증식시켜 50 내지 70% 세포 포화도까지 성장시켰다.
- [0163] **형질감염**
- [0164] Bio-Rad Gene Pulser를 이용해 전기천공을 수행하였다. 10 ng, 200 ng 및 1000 ng의 3가지 플라스미드 DNA 농도 및 등물량의 대조군 플라스미드를 형질감염에 사용하였다. 이하 모든 5종의 상이한 구성체를 그들의 인터페론 반응 유도능에 대해 분석하였다: pRSV-Nsp1234, pRSV-RDR, pRSV-AAA, pRSV-RDR-GAA, 및 pRSV-AAA-GAA. 세포를 트립신으로 처리하고, 원심분리로 회수한 후 성장 배지에 혼탁하고 5 mM NaBzS를 보충하였다. 천기 천공은 50 µg의 캐리어 DNA(연어 정자 DNA) 존재하에 0.4 mm 큐벳에서 수행하였고, 15분간 큐벳에 남겨둔 후, 성장 배

지로 세척하고, 6웰 플레이트에 과종하였다.

#### [0165] 인터페론- $\beta$ 분석

[0166] 형질감염 후 24h, 48h, 및 72h 후에 세포 배양 상등액을 회수하고 인터페론 -  $\alpha$  및 -  $\beta$  키트(PBL Biomedical Laboratories)를 사용하여 후속 분석하기 전까지 -20°C에 동결시켰다. 세포 배양 상등액을 적절하게 회석하고 제조사의 설명서에 따라 효소-연결 면역흡착 분석(PBL Biomedical Laboratories)에 사용하였다.

#### [0167] 결과

[0168] 인터페론- $\beta$ 의 수준은 제조사의 설명서에 따라 효소-연결된 면역흡착 분석(ELISA)(PBL Biomedical Laboratories)을 통해 회수된 상등액에서 정량하였다.

#### [0169] 결론

[0170] 인터페론 반응의 발생은 구획화된 RdRp 복합체 내 RNA 의존적 RNA 중합효소(RdRp) 활성에 기인하는 것이다. RdRp 효과는, RdRp의 효소 활성이 중합효소 유닛의 활성 중심부에 GAA 돌연변이를 도입시켜 제거시 완전하게 철회되었다(도 2). GAA 돌연변이를 포함하는 구성체로 형질감염시킨 후 세포 배양 상등액에서 측정한 인터페론 발현 프로파일은 임의의 효소 활성을 코딩하지 않는 구성체와 유사하였다(도 1, 레인 paraDMgB).

[0171] 세포 배양 실험을 기초로, RDR 돌연변이가 도입되어 Nsp2 영역 내 핵 국제화 신호(NLS)가 변형된 돌연변이체가 가장 유망한 보조제 후보물로서 선택되었다. 야생형 RdRp 또는 NLS의 동일 위치에 다른 변형(AAA)을 갖는 돌연변이체도 그들의 I형 인터페론 반응 유도능에 대해 분석하였지만, 실질적으로 효과가 낮았다(도 1). 본 발명자들은 또한 레플리카제 발현 벡터 pRSV-Nsp1234(서열번호 5)를, 특정 바이러스 cis-서열 함유 주형 RNA와 레플리카제를 발현하는 벡터 pRSV-SFV-Rluc와 비교하였다. 후자는 레플리카제에 대한 특이적 기질로서 작용한다. IFN 반응 유도 분석 결과는 특정 주형 RNA의 존재가 인터페론 반응 유도의 핵심 인자가 아님을 보여주었다(도 3). 인간 세포주 HEK293 및 HACAT에서, 본 발명자들은 또한, pRSV-RDR에 의한 특이적 인터페론- $\beta$ , 및 보다 낮은 정도의 인터페론- $\alpha$  유도를 확인할 수 있었다(도 4 및 5).

#### [0172] 실시예 3: 레플리카제 발현 세포의 세포질 내 dsRNA의 측정

[0173] dsRNA 중간체가 레플리카제 주형 RNA 또는 SFV 계놈의 복제 주기 동안 생성되는 것이 알려져 있다. 세포질 구획내 dsRNA의 존재는 세포에 바이러스 감염을 신호전달하고 I형 인터페론 반응을 포함한, 항바이러스 반응 캐스케이드를 유도시킬 수 있다.

[0174] 상기 보고한 바와 같이(실시예 2), SFV 레플리카제 단독 발현은 형질감염된 세포에서 I형 인터페론 반응을 유도시킨다. 또한, 레플리카제의 RdRp 활성은 IFN 반응에 결정적인데, RdRp 활성을 없애는 GDD>GAA 돌연변이를 보유하는 발현 벡터로 형질감염시킨 이후, IFN 반응이 관찰되지 않았기 때문이다(실시예 2).

[0175] 따라서, 레플리카제 발현 벡터 단독으로 형질감염된 세포에서 dsRNA의 존재 및 국제화를 실험하였다. 이러한 목적을 위해, 항-dsRNA 단일클론 항체 J2(Scicons, Hungary)를 이용한 IF 분석을 활용하였다. 이러한 접근법은 이전에 + 가닥 RNA 바이러스로 감염시킨 후 세포에서 dsRNA를 검출하기 위해 사용되었다(Weber et al 2006). 간략하게, 세포를 레플리카제 발현 벡터로 형질감염시키고, 형질감염 후 다음 날, 파라포름알데히드 고정된 세포의 면역형광발광 분석을 항-Nsp1 및 항-dsRNA 항체(혼합)를 이용해 수행하였다. 형광 현미경을 통한 신호 검출을 위해, 2차 항체를 형광색소 Alexa488 및 Alexa568로 표지화하였고 DAPI에 의해 핵 염색을 이용하였다.

#### [0176] 실험 1

[0177] RD 세포를 0.5  $\mu$ g의 phEF1aHTLV-Nsp1234 또는 0.5  $\mu$ g의 phEF1aHTLV-GAA를 이용하여 PEI-DNA 복합체를 통해 형질감염시켰다. 결과는 분명하게, Nsp1 신호가 양쪽 배양물에서 관찰되었음을 보여주었다. 항-nsP1 염색된 구형 패턴과 함께 공동국재된 세포질 dsRNA 신호가 phEF1aHTLV-Nsp1234로 형질감염된 세포에서는 검출되었지만 phEF1aHTLV-Nsp1234-GAA로 형질감염된 세포에서는 검출되지 않았다.

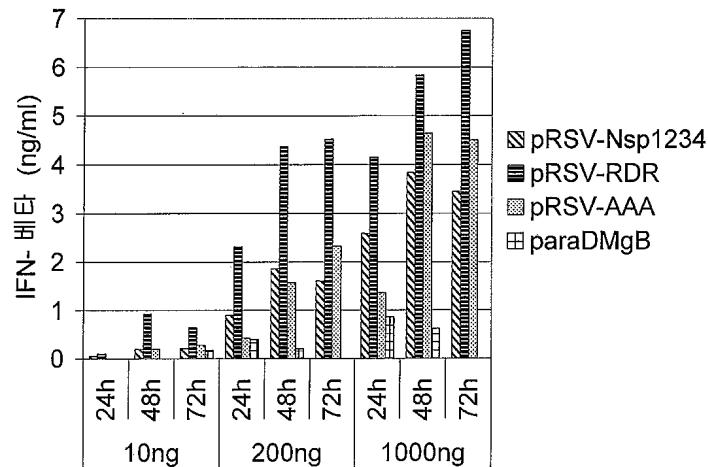
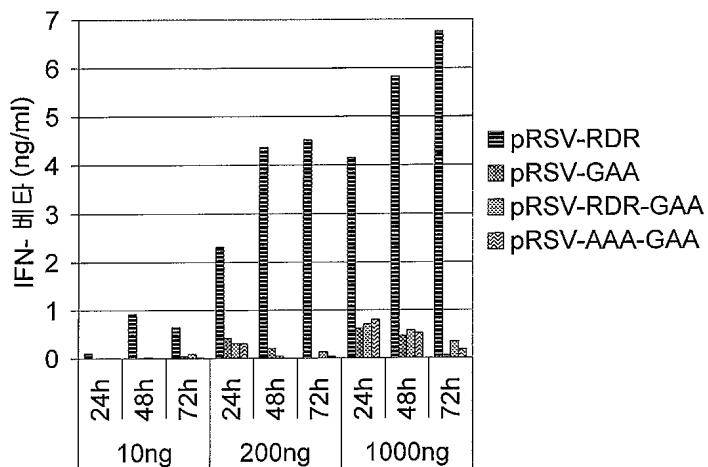
#### [0178] 실험 2

[0179] Cop5 세포를 전기천공을 통해 1  $\mu$ g의 pRSV-Nsp1234, pRSV-GAA, pRSV-RDR 또는 pRSV-RDR-GAA로 형질감염시켰다. 결과에 따르면, Nsp1 신호가 모든 배양물에서 관찰되었지만, 세포질 dsRNA와 공동국재하는 레플리카제는 pRSV-Nsp1234 또는 pRSV-RDR로 형질감염된 세포에서는 검출가능하였지만, 플라스미드 pRSV-GAA 또는 pRSV-RDR-GAA로 형질감염된 세포에서는 검출되지 않았다.

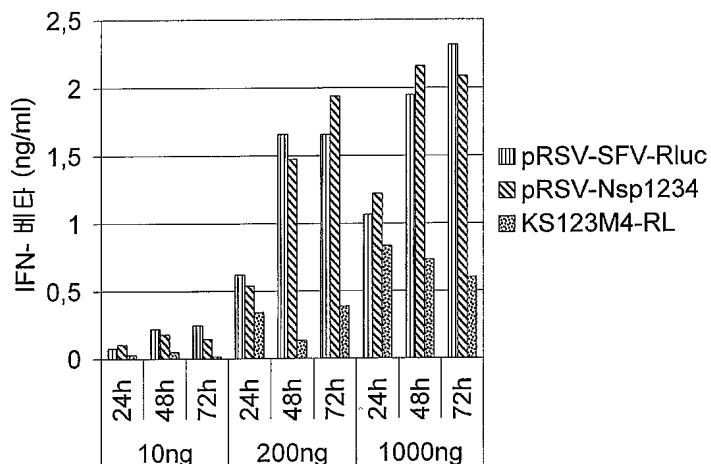
- [0180] 실험 3
- [0181] RD 세포를 0.5 또는 1  $\mu\text{g}$ 의 pRSV-Nsp1234, pRSV-AAA 또는 pRSV-RDR를 사용하여 PEI-DNA 복합체를 통해 형질감염시켰다. 결과는 Nsp1 신호가 모든 배양물에서 관찰됨을 보여주었다. 항-nsP1 염색된 구형 패턴과 공동국재하는 세포질 dsRNA 신호가 pRSV-Nsp1234 또는 pRSV-RDR로 형질감염된 세포에서는 관찰되었지만 pRSV-AAA로 형질감염된 세포에서는 관찰되지 않았다.
- [0182] 결론
- [0183] 본원에서 앞서 정의한 바와 같이, nsP2 영역 내 돌연변이 RRR>RDR를 갖는 레플리카제 또는 야생형 SFV 레플리카제의 발현이, nsp1 양성 구형 패턴과 공동국재하는 형질감염 세포의 세포질내에서 dsRNA 축적을 분명하게 유도한다는 것이 증명되었다. 대조적으로, RdRp 활성을 없애는 GDD>GAA 돌연변이를 보유하는 레플리카제로 형질감염된 세포에서는 이러한 dsRNA 축적이 검출되지 않았다.
- [0184] 따라서, 이러한 결과는 상이한 레플리카제 돌연변이체에 의한 I형 IFN 유도 및 dsRNA 축적 간 상호관련성을 보여준다. 그러나, 레플리카제의 RRR>AAA 돌연변이체로 형질감염시킨 후 dsRNA 축적은 검출되지 않았지만, I형 IFN 반응의 유도는 여전히 관찰되었다. 이는 유도된 IFN 반응이 dsRNA 신호전달뿐만 아니라, 레플리카제의 RdRp 와 관련된 다른 경로에 의해서도 촉발된다는 것을 시사한다. 그러나, 사용된 분석 조건으로 검출할 수 없는 소량의 dsRNA가 RRR>AAA 레플리카제 돌연변이체에 의해 생성될 수 있다는 것을 배제할 수는 없다.
- [0185] 실시예 4: 세포 매개 면역 반응에 대한 SFV 레플리카제 발현의 보조제 효과
- [0186] 3종의 다른 마우스 그룹(Balb/c, 그룹당 5 마리)을 2주 간격으로 2회 유전자 총을 이용해 면역화하였다. 2회 모두 면역화시 1  $\mu\text{g}$ 의 플라스미드 DNA를 투여하였다. 플라스미드 벡터 GTU-MultiHIV(HIV-1에서 선택한 유전자를 코딩함)가 HIV-1에 대한 실험 DNA 백신이다. GTU-MultiHIV 플라스미드를 보조제 pRSV-Nsp1234 또는 pRSV-RDR와 공동투여할 경우, 0.8  $\mu\text{g}$ 의 GTU-MultiHIV 및 0.2  $\mu\text{g}$ 의 보조제 플라스미드를 함께 혼합하였다. GTU-MultiHIV 벡터를 단독으로 투여받은 마우스의 경우, 1  $\mu\text{g}$ 의 플라스미드 DNA를 사용하였다. 마우스를 10일 후에 희생시켰다. 새롭게 단리한 비장세포를 사용해 인터페론  $\gamma$  ELISPOT 분석을 수행하였다. 세포를 자극하기 위해, Balb/c 마우스의 MHC 클래스 I 분자가 제시하는 것으로 알려진, HIV-1의 p24 단백질에서 유래된 하나의 단일 웨프티드(AMQMLKETI)를 이용하였다. 다른 자극제는, DNA 백신에 의해 코딩되는 다른 성분, HIV-1의 Rev 단백질을 포함하는 중첩 웨프티드의 풀이었다.
- [0187] 결과에 따르면, SFV 유래 레플리카제를 코딩하는 벡터와 DNA 백신을 공동투여하였을 때, 세포 면역 반응이 최대 3배 증가하는 것으로 관찰되었다(도 6).
- [0188] 실시예 5: 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 체액성 면역 반응 유도에 대한 SFV 레플리카제 발현 효과
- [0189] 3개의 다른 마우스 그룹(그룹 당 5 마리)을 인플루엔자 바이러스 유래의 HA 항원 및 NA 항원을 코딩하는 플라스미드 벡터 pETB-12m-1로 면역시켰다. 마우스를 이전 실시예에서와 유사한 방식으로 면역화하였다(면역화 당 1  $\mu\text{g}$  플라스미드 DNA, 플라스미드를 유전자 보조제와 함께 공동투여하는 경우, 4:1 비율을 사용하였음- 800 ng 면역화 벡터 및 200 ng 보조제 벡터). 2차 면역화 이후 2주에 특이적 항체의 존재에 대해 혈액 샘플을 ELISA에서 분석하였다. 이 실험에서는, 비교를 위해, 다른 유전자 보조제, 체액성 면역 반응을 증가시키는 것으로 알려진 사이토카인 GM-CSF 코딩 벡터를 사용하였다. 결과에 따르면, 2회 면역화 이후, 유전자 보조제 pRSV-RDR를 항원 코딩 플라스미드와 혼합한 그룹에서 최고의 역가가 검출되었다(도 7).
- [0190] 실시예 6: 마우스에서 세포 매개 면역 반응에 대한 SFV 레플리카제 발현의 보조제 효과
- [0191] 3개의 다른 마우스 그룹(Balb/c)(그룹 당 4 또는 5 마리)을 4주 간격으로 2회 유전자 총으로 면역화하였다. 2회 면역화 모두 각각 1  $\mu\text{g}$ 의 플라스미드 DNA를 투여하였다. 플라스미드 벡터 GTU-MultiHIV(HIV-1에서 선택된 유전자를 코딩함)는 HIV-1에 대한 실험 DNA 백신이다. 1차 또는 2차 면역화 시에 GTU-MultiHIV 플라스미드를 보조제 pRSV-RDR와 공동 투여할 경우, 0.8  $\mu\text{g}$ 의 GTU-MultiHIV 및 0.2  $\mu\text{g}$ 의 보조제 플라스미드를 함께 혼합하였다. GTU-MultiHIV 벡터를 단독으로 투여받는 마우스에 대해, 1  $\mu\text{g}$ 의 플라스미드 DNA를 사용하였다. 마우스를 2차 면역화 후 10일 후에 희생시켰다. 새롭게 단리한 비장세포에 대해 인터페론  $\gamma$  및 그랜자임 B ELISPOT 분석을 수행하였다. 세포를 자극하기 위해, Balb/c 마우스의 MHC 클래스 I 분자에 의해 제시되는 것으로 알려진, HIV-1의 p24 단백질에서 유래된 하나의 단일 웨프티드(AMQMLKETI) 및 HIV-1의 Env 단백질 유래 웨프티드(RGPGRAFVTI)를 사용하였다.
- [0192] 결과에 따르면, 보조제 SFV 레플리카제의 공동투여 시에 세포 면역 반응에 대해 복합적인 효과가 있는 것으로

나타났다. 면역화 혼합물에 보조제 부가는 GTU-MultiHIV 만을 투여받은 동물과 비교하여 인터페론 감마 반응을 증가시켰다. 세포의 상이한 기능적 용량은 그랜자임 B 발현 분석 이후에 밝혀졌다. 보조제는 1차 면역화된 마우스에 투여시 그랜자임 B 반응을 거의 3배 증가시켰다.

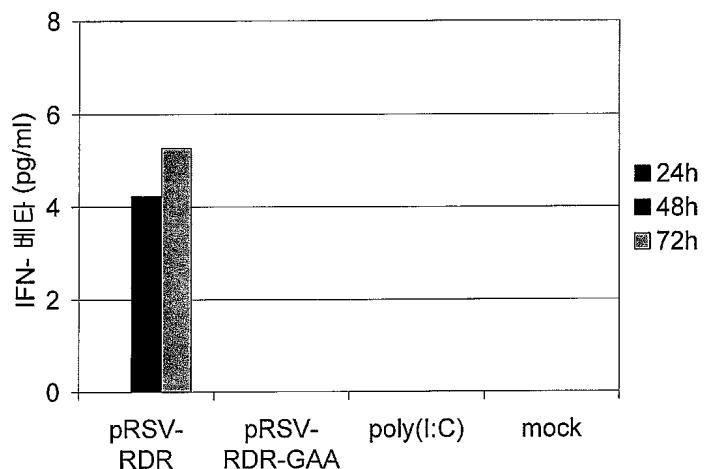
- [0193] [참조문헌]
- [0194] Nature Reviews Microbiology 6, 363-374 (May 2008) "Modification of intracellular membrane structures for virus replication" Sven Miller and Jacomine Krijnse-Locker.
- [0195] Ahlquist P et al "Host Factors in Positive-Strand RNA Virus Genome Replication" Journal of Virology Aug 2003 vol 77 p8181-8186.
- [0196] Blazevic V, Mannik A, Malm M, et al 2006 "Induction of human immunodeficiency virus type-1-specific immunity with a novel gene transport unit (GTU)-MultiHIV DNA vaccine" AIDS Research and Human Retroviruses Vol 22, No 7, pp 667-677.
- [0197] Edwards MR1 Slater L, Johnston SL 2007 "Signalling pathways mediating type I interferon gene expression" Microbes and Infection 9, 1245-1251.
- [0198] Medzhitov R "Recognition of microorganisms and activation of the immune response" Nature, Vol 449, 18 October 2007, p 819-826.
- [0199] 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.
- [0200] Darius Moradpour, Francois Penin, Charles M Rice 2007 "Replication of hepatitis C virus" Nature Reviews Microbiology 5, 453-463.
- [0201] 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.
- [0202] 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.
- [0203] Rikkonen et al 1992 Nuclear and nucleolar targeting signals of Semhki forest virus nonstructural protein nSP2 Virology 189:462-73.
- [0204] Agnes LeBon and David F Tough 2002 "Links between innate and adaptive immunity via type I interferon" Current Opinion in Immunology 14:432-436.
- [0205] Theofilopoulos AN et al 2005. "Type I interferons ( $\alpha/\beta$ ) in immunity and autoimmunity". Annu.Rev.Immunol. 25:307-335.
- [0206] Tomar et al. 2006. Catalytic Core of Alphavirus Nonstructural Protein nsP4 Possesses Terminal Adenylyltransferase Activity J Virol. 80:9962-9.

**도면****도면1****도면2**

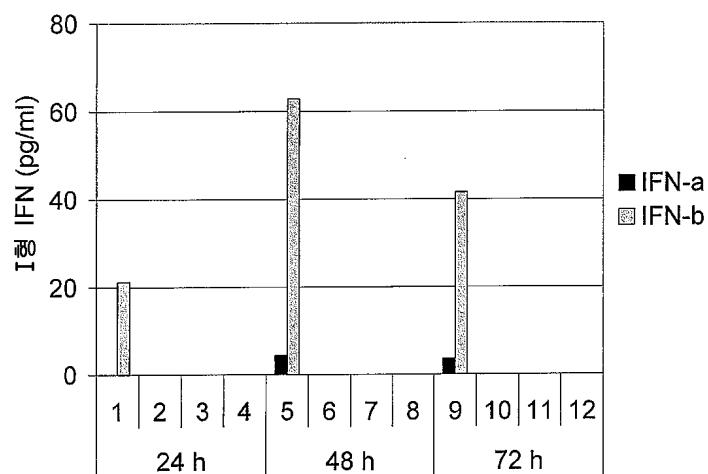
## 도면3



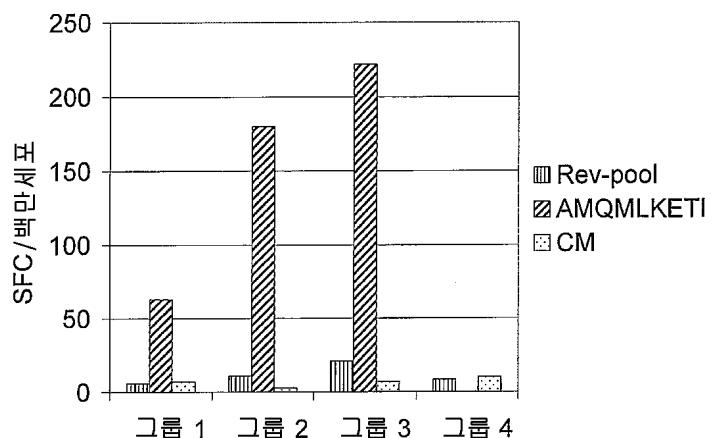
## 도면4



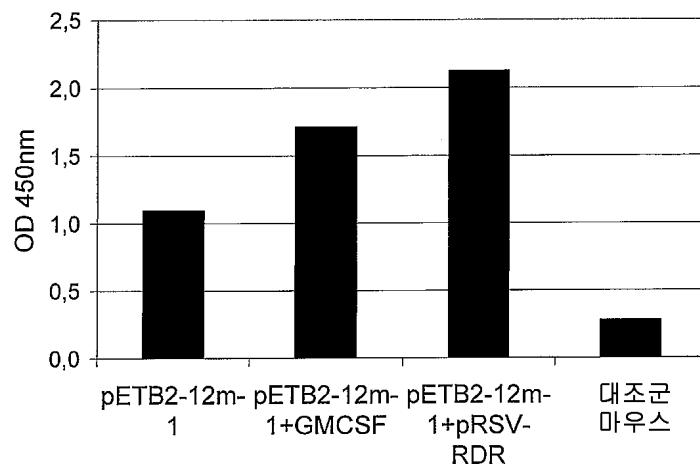
## 도면5



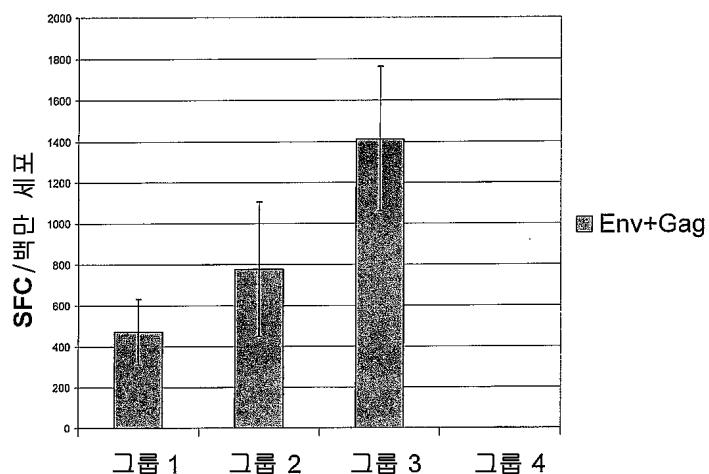
도면6



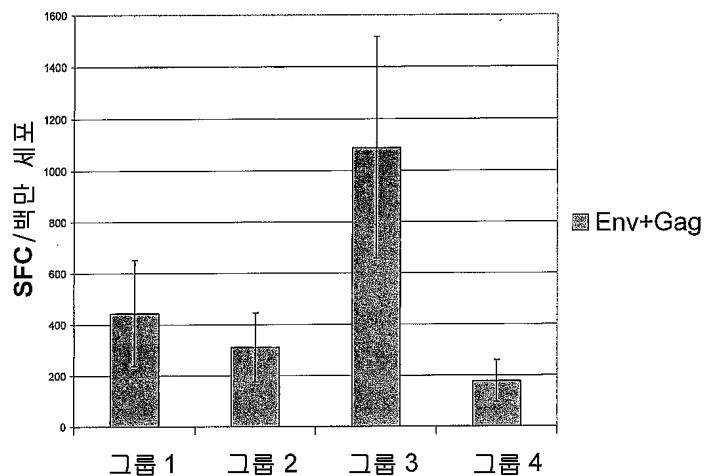
도면7



도면8



## 도면9



## 서 열 목록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Fit Biotech Oy

&lt;120&gt; Genetic Adjuvant

&lt;130&gt; PD53981PC00

&lt;150&gt; US61/071,898

&lt;151&gt; 2008-05-23

&lt;160&gt; 7

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2432

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Virus

&lt;400&gt; 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

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

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

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
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
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  
 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
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
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  
 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
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

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 2432

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

<220><223> Amino acid sequence of the SFV replicase with the RDR mutation in  
positions 1185-1187

&lt;400&gt; 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 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
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
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
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

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 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  
 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

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

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

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

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
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> 3

<211> 2432

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Amino acid sequence of the SFV replicase with the AAA mutation in

positions 1185-1187

<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 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 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

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
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
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
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

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
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  
 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 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  
 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

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> Artificial

<220><223> Nucleic acid sequence of resynthesized sequence of SFV replicase

with inserted heterologous intron which when expressed correspond

to SEQ ID NO:1

<400> 4

atggccgcca aggtgcacgt ggacatcgag gccgacagcc cttcatcaa gagcctgcag 60

aaggccttc ccagttcga ggtggagtcc ctgcaggtga ccccaacga ccacgccaac	120
gccagggcct tcagccacct ggccaccaag ctgatcgac agggaaaccga caaggacacc	180
ctgatcctgg acatcgccag cgccccctca aggtgagttt gggaccctt gattgttctt	240
tcttttcgc tattgtaaaa ttcatgttat atggaggggg caaagtttc agggtgttgt	300
ttagaatggg aagatgtccc ttgtatcact atggaccctc atgataattt tgttcttc	360
actttctact ctgttgacaa ccattgtcctc ctcttatttt ctttcattt tctgttaactt	420
tttcgttaaa cttagcttgcattgttaac gaattttaa attcactttt gtttatttgt	480
cagattgtaa gtactttctc taatcacttt ttttcaagg caatcaggat atattatatt	540
gtacticagc acagtttag agaacaattt ttataattaa atgataaggt agaatatttcc	600
tgcataaaaa ttctggctgg cgtggaaata ttcttattgg tagaaacaac tacaccctgg	660
tcatcatect gccttctct ttatggttac aatgatatac actgttgag atgaggataa	720
aatactctga gtccaaaccg ggccctctg ctaaccatgt tcatgccttc ttctttcc	780
tacaggcgga ttagtggcac ccacaagttac cactgcgtgt gccccatgcg gagcgccgag	840
gaccggcggc ggctgggtgt ctacgccaag aagctggccg ccggcagcgg caagggtctg	900
gaccgggaga tcgcccccaa gatcaccgac ctgcagaccg ttagtggccac cccgacgccc	960
gagagccccca cttctgcct gcacaccgac gtgacccgtcc ggacagccgc cgagggtggcc	1020
gtgttaccagg acgtgtacgc cgtgcacgccc cccacccccc tgtaccacca ggccatgaag	1080
ggcgtgcggaa ccgcctactg gatcgccctt gacaccaccc cttcatgtt cgacgccttgc	1140
gccggggcct accccaccta cgccaccaac tggccgacg agcagggtgt gcaggccgg	1200
aacatcgcc tttgtggccgc cagcctgacc gaggccggc tggcaagct gtccatcttgc	1260
cggaagaagc agctgaagcc ctgcgacacc gtgtatgttca gcgtggcag cacactgtac	1320
accgagagcc ggaagctgct gcggagctgg cacctgccccca gcgtgttcca cctgaaggc	1380
aagcagagct tcacctgcac atgcgacacc atcgatgtact gcggaggctt cgtgttgc	1440
aaaatcacca ttgtccctgg cctgtacggc aagaccgtgg gctacccgtt gacccatcac	1500
gccggggcct ttctgggtgtt caagaccacc gataccgttga agggcgagag agtggatcc	1560
cccgctgtca cctacgtgcc cagcaccatc tgccgaccaga tgaccgtt cctggccacc	1620
gtatgtgaccc ccgaggacgc ccagaaactt ctggcgcc tgaaccagcg gatcgatgttgc	1680
aacggccggaa cccagcggaa caccaacacc atgaagaact acctgctgcc catcgatggcc	1740
gtggccttca gcaagtgggc cagagagtac aaggccgacc tggacgacga gaaggccctg	1800
ggcgtgcgggg agcggagctt gacccgttgc tgcctgtgg cttcaagac ccggaaagatg	1860
cacaccatgt acaagaagcc cgacacccag accatcgatgttga aggtgcccag cgagggttcaac	1920

agcttcgtga tccccaggct gtggagcacc ggcctggcca tccccgtgct gagccggatc	1980
aagatgtgc tggcaagaa aaccaagcgagactgtatcc ccgtgtcgaa cgccagcagc	2040
gccagggacg ccgagcagga agagaaagag cggctggaag ccgagctgac ccgggaggcc	2100
ctgccccccc tggtgccat cgcctgtcc gagaccggcg tggtgacgt ggatgtggag	2160
gaacttggaa accacgcccgg agccgggggtg gtggagaccc ccagatccgc cctgaagggt	2220
acagccccagc ccaacgacgt gctgtggc aactacgtgg tgctgtcccc ccagaccgtg	2280
ctgaagagca gcaagctggc cccctgtcac cctctggccg agcaggtgaa gatcatcacc	2340
cacaacggca gggccggcag ataccaggta gacggctacg acggccgggt gctgtgcca	2400
tgcggctccg ccatccctgt gcccggatc caggccctga gcgagagcgc cacaatggtg	2460
tacaacgagc gggagttcgt gaaccggaaat ctgttaccaca ttgccgtcga cggcccttagc	2520
ctgaacacccg atgaggaaaaa ctacgagaaa gtgcggcccg agggaccga tgccgactac	2580
gtgttcgacg tggacaagaa atgctgcgt aagcgggagg aagccagcgg gctggtgctg	2640
gtcggggagc tgaccaaccc ccccttccac gagttcgct acgagggct gaagatccgg	2700
ccctccgccc cctacaagac cacagtggc ggcgtgttcg gcgtgcccgg cagggcaag	2760
agcgccatca tcaagtccct ggtgaccaag cacgacctgg tgacccccc caagaaagag	2820
aactgccagg aaatcgtcaa cgacgtcaag aagcaccggg gcctggacat ccaggccaa	2880
acagtggaca gcatcctgct gaacggctgc agacggcccg tggatatcct gtacgtggac	2940
gaggccctcg cctgccacag cggcacccctg ctggccctga tcgcccctgt gaagccccgg	3000
tccaagggtgg tgctgtgcgg cgaccccaag cagtgcggct tcttcaacat gatgcagctg	3060
aaggtaact tcaaccacaa catctgcacc gaagtgtgcc acaagagcat cagccggcgg	3120
tgcaccagac ccgtgaccgc catcggtcc accctgcact acggccgaa gatgcggacc	3180
accaaccctt gcaacaagcc catcatcatc gataccacccg gccagaccaa gcccaagccc	3240
ggcgacatcg tgctgacccctg ctcccgccg tgggtgaagc agctgcagct ggactaccgg	3300
ggccacgagg ttagtgcgcg cgccgcctcc caggccctga ccagaaaggg cgtgtatgcc	3360
gtgcggcaga aggtgaacga gaacccctg tacgccccctg ccagcgagca cgtaatgt	3420
ctgctgaccc ggaccgagga caggctggtg tggaaaaccc tggccggcga cccctggatc	3480
aagggtgtgtt ccaacatccc ccaggcaac ttccacccca ccctggaaat gtggcaggaa	3540
gagcacgaca agatcatgaa ggtgtcgag ggccctgcgg cccctgtgg cgccttccag	3600
aacaaggcca acgtgtgctg ggccaaagagc ctgggtgcctg tgctggacac cgccggcatc	3660
cggtgtaccc cgaaagatgtg gagcaccatc atcaccgcct tcaaagagga ccggccctac	3720
agccccgtgg tggccctgaa cgagatctgc accaagtact acggcggtgaa cctggacagc	3780

ggcctgttca gcgc(ccaa ggtgtccctg tactacgaga acaaccactg ggacaaccgg	3840
ccaggcggca ggatgtacgg cttcaacgcc gccaccgccc ccagactgga agcccgac	3900
accttctga agggccagtgc acacaccggc aagcaggccg tgcgtccga gagaaagatc	3960
cagccccgtt ccgtgctgga taacgtgatc cctatcaacc ggcggctgcc ccacgcctg	4020
gtggccagat acaagacagt gaagggcagc cgggtggagt ggctggtaa caaagtgcgg	4080
ggcttaccacg tgctgctggt gtctgagttac aacctggccc tgcctcgccg gagggtgacc	4140
tggctgtccc ctctgaacgt gacaggcgcc gacagggtct acgacactgag cctggccctg	4200
cctggccgacg ccggcagatt cgacctggtg ttctgtgaaca tccacaccga gttcagaatc	4260
caccactacc agcagtgcgt ggaccacgcc atgaagctgc agatgctggg cggcgac	4320
ctgaggctgc tgaaggctgg cggcagccctg ctgatcgccc cctacggcta cgccgaca	4380
atctccgagg ccgtgggtgc cagcctgagc cggaagttaa gctccggccag ggtgctgaga	4440
cccgactgctg tgaccagcaa cacagaagtgtttctgctgt tcagcaactt cgacaacggc	4500
aagcggccca gcaccctgca ccagatgaac accaagctgtt ccgcgtgtt cgccggcgag	4560
gccatgcaca ccgcggatc cgcccccagc taccgggtga agcggccga catgcacc	4620
tgcaccgagg ccgcgtggtaatgccc aatgccagg gcaccgtggg cgacggcg	4680
tgcagggccg tgccaaaaa gtggcccagc gccttcaagg gcgaggccac ccctgtggc	4740
accatcaaaa ccgtgatgtc cggcagctac cccgtatcc acgcgtggc ccccaatttc	4800
agcgcacca cagaggccga gggcgaccgg gaactggccg ccgtgtatag agccgtggcc	4860
gccgaagtga acagactgag cctgagcagc gtggccatcc ctgtgtgtc caccggcg	4920
ttcagcggcg gcagggaccgc gctgcagcagc agcctgaacc acctgttac cgctatggac	4980
gccaccgacg ccgacgtgac aatctactgc cgggacaaga gctggagaa gaagatccag	5040
gaagccatcg acatgaggac cggcgtggag ctgctgaacg acgacgtgga gctgacaacc	5100
gacctgggtgc gcgtgcaccc cgacagcagc ctgggtggcc ggaaggcata cagcaccacc	5160
gacggctccc tgtacagcta ctgcaggccc accaagttca accaggccgc catcgatatg	5220
gccgagatcc tgaccctgtg gcccaggctg caggaagcca acgagcagat ctgtctgtac	5280
gccctggccg agacaatgga caacatccgg tccaagtgcc ccgtgaacga cagcgac	5340
agcacccccc ctggaccgtt gcccgcctg tgcatgatc ccatgaccgc cgagcggatc	5400
gccccggctgc ggagccacca ggtgaagac atgggtgggt gcagcagctt cccctgccc	5460
aagtaccacg tggatggcgt gcagaaagtgaatg cgcgaga aggtgcgtct gttcgacccc	5520

accgtgccta gcgtgggtc ccccggaag tacgcccct ccaccaccga ccacagcgac	5580
agaaggctgc gggcgttcga cctggactgg accaccgact ccagcagcac cgccagcgac	5640
accatgagcc tgcccagcct gcagagctgc gacatcgaca gcatctacga gcctatggcc	5700
cccatcggtt tgaccggcga cgtgcacctt gagccagccg gcatcgccga cctggccccc	5760
gatgtgcacc cagaacccgc cgaccacgtg gatctggaaa accccatccc ccctcccaga	5820
cccaagaggg ccgcctacct ggccagcaga gccgcccaga ggccctgtcc tgcccccaga	5880
aagccccacc cagccccag aaccgccttc aggaacaagc tgccctgac ctgcggcgac	5940
ttcgacgagc acgaggtgga cgccctggcc agcggcatca cttcgccga ttttgatgac	6000
tgctgcggc tggcagagc cggagcctat atcttcagca ggcacaccgg ctccggccac	6060
ctgcagcaga aaagcgttag acagcacaac ctgcagtgcg cccagctgga cgccgtggaa	6120
gaggaaaga tgtacccccc caagctggat accgagcggg aaaagctgt gctgtgaaa	6180
atgcagatgc accccagcga gccaacaag agccgctacc agtcttagaa ggtggagaac	6240
atgaaggcca ccgtggtgga ccggctgacc agcggcgcca ggctgtacac agggccgac	6300
gtggcagaa tccctaccta cgccgtgcgc tacccagac ccgtgtacag ccccacccgt	6360
atcgagcggt tcagcagccc cgacgtggcc atcgccgcct gcaatgagta cctgtctagg	6420
aactacccaa ccgtggccag ctaccagatc accgatgagt acgatgccta cttggacatg	6480
gtggacggca ggcacagctg cctggaccgg gccacccct gtccggccaa gctgcgggtc	6540
taccccaagc accacgccta taccagcccc accgtgagaa ggcgcgtgcc cagcccttc	6600
cagaataccc tgcagaatgt gctggccgcc gccaccaagc ggaactgcaa cgtgaccag	6660
atgagagaac tccccacaat ggacagegccc gtgttaacg tggagtgctt caagagatac	6720
gcctgcagcg gcgagactg ggaggaatac gccaaggcgc ccatccggat caccaccgag	6780
aacatcacca cctacgtgac caagctgaag ggcccccaagg ccgcgcgcct gttcgccaa	6840
acccacaacc tggtgccct gcaggaagtgc cctatggaca gttcacccgt ggacatgaa	6900
cgggacgtga aggtgacccc tggcaccaag cacaccgagg aacggccaa ggtgcagggt	6960
atccaggccc ccgagcctct ggccaccgc tatctgtgcg gcatccaccg ggagctgggt	7020
cgccggctga acgcccgtct gaggcccaac gtgcacaccc tttcgacat gtccggcag	7080
gacttcgacg ccatcatcgc cagccacttc cacccggcg acccagtgt gaaaccgat	7140
atcgccagct tcgacaagag ccaggacgac agcctggccc tgaccggcct gatgatcctg	7200
gaagatctgg gcgtggacca gtacctgctg gatctgatcg aggccgcctt cggcgagatc	7260
agcagctgcc acctgcctac cggcacccgg ttcaagttcg ggcgcattgt gaagagcgcc	7320
atgtttctga ccctgttcat caacacagtgc tgaatatca ccatcgccag cagggtgctg	7380

gaacagcggc tgaccgacag cgccctgcgcc gccttcatcg ggcacgacaa catcgacac 7440  
 ggcgtatca gcgacaagct gatggccgag cggtgccca gctgggtgaa catggaaatg 7500  
 aagattatcg acgcgtat gggcgaaaag cccccctact tctgcggcgg cttcatctg 7560  
 ttgcacacgc tgacacagac cgccctgcaga gtgagcgacc ccctgaagcg gctgticaag 7620

ctggcggcaaac ctctgacagc cgaggacaag caggacgagg accggcggag ggccctgtcc 7680  
 gacgagggtgt ccaagtggtt ccggaccggc ctgggcggc agctggaagt ggccctgaca 7740  
 agccgctacg aggtggaggg ctgcaagagc atcctgatcg ctatggccac cctggcccgg 7800  
 gacatcaagg ccttaagaa gctgagaggg cctgtcatcc acctgtacgg cggacccgg 7860  
 ctggtgccgt ga 7872

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 10342

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Plasmid pRSV-Nsp1234

&lt;400&gt; 5

cacagcccag ctggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat 60

gagaaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggccggacag gtatccggta agcggcaggg 120  
 tcggAACAGG agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggat ctttatagtc 180  
 ctgtcgggtt tcgcacaccc tgcattttt gtagatgtcg tcagggggc 240  
 ggagcctatg gaaaaacgcc acgaacgcac cgataaaata aaagatttt ttttagtctcc 300  
 agaaaaaggg gggaatgaaa gaccccacct gtaggttgg caagctacgc tataccctcg 360  
 acctgcaggt cgatcgactc tagtatggc cactctcagt acaatctgt ctgatgccgc 420  
 atagttaaac cagtatctgc tccctgctt gttgtggag gtcgtgatg agtgcgcgag 480

caaattaa gctacaacaa ggcaaggctt gaccgacaat tgcattttt atctgtttt 540  
 ggttaggcgt tttgcgttc ttgcgtatgt acggccaga tatacgatgt tctgagggg 600  
 ctaggggtgt tttaggcgaa aacggggct tcgggtgtac gcggttagga gtccctcag 660  
 gatatagtag tttgcctttt gcatagggag gggaaatgt agtcttgc aatactttt 720  
 tagtcttgc acatggtaac gatgagttttag caacatgcct tacaaggaga gaaaaagcac 780  
 cgtgcattcc gattgggtt gatgggtgg acgttttttacgtatgt cttttttttt aaggcaacag 840  
 acgggtctga catggattgg acgaaccact gaattccgca ttgcagatgtt attgtattt 900

agtgccttgc tcgatataat aaacggccatt tgaccattca ccacatttgtt gtgcaccc 960

aagctggtag aggatcggtc gatcgactt agacgccacc atggcccca aggtgcacgt	1020
ggacatcgag gccgacagcc cttcatcaa gagcctgcag aaggccttcc ccagcttcga	1080
ggtgaggtcc ctgcaggtga ccccaacga ccacgccaac gccagggcct tcagccacct	1140
ggccaccaag ctgatcgagc agggaaaccga caaggacacc ctgatctgg acatcgccag	1200
cgcggccatca aggtgagttt ggggaccctt gattgttctt tcttttcgc tattgtaaaa	1260
ttaatgttat atggaggggg caaagttttca agggtgttgtt ttagaatggg aagatgtccc	1320
ttgtatcaat atggaccctc atgataattt tgtttcttc actttctact ctgttgacaa	1380
ccattgtctc ctcttatttt ctttcattt tctgttaactt ttgcgttaaa cttagcttg	1440
cattttaac gaattttaa attcactttt gtttattttgt cagattgtaa gtacttctc	1500
taatcaattt ttttcaagg caatcagggt atattatattt gtacttcagc acagttttag	1560
agaacaattt ttataattaa atgataaggta agaatatttca tgcatataaa ttctggctgg	1620
cgtggaaata ttcttattgg tagaaacaac tacaccctgg tcatcatcct gccttctct	1680
ttatggttac aatgatatac actgttttagt atgaggataa aatactctga gtccaaaccg	1740
ggccctctg ctaaccatgt tcatgccttc ttctttcc tacaggcggg tgatgagcac	1800
ccacaagtac cactgcgtgt gccccatgctg gagcgcggag gacccggcggc ggctgggtgt	1860
ctacgccaag aagctggccg cccgcggcgg caaggtgctg gaccgggaga tcgcccggaa	1920
gatcaccgac ctgcagaccg tcatggccac cccgcacgccc gagagccccca cttctgcct	1980
gcacaccgac gtgacctgccc ggacagccgc cgaggtggcc gtgtaccagg acgtgtacgc	2040
cgtgcacgccc cccacccccc tgtaccacca ggccatgaag ggctgcggaa ccgcctactg	2100
gatcggttcc gacaccaccc cttcatgtt cgacgcctgg gccggagcct accccaccta	2160
cgccaccaac tggggccgacg agcagggtgt gcaggccgg aacatcgcc tgcgcgcgc	2220
cagcctgacc gaggccggc tggcaagct gtccatctg cgaaagaagc agctgaagcc	2280
ctgcgacacc gtgtatgtca gcgtggcag cacactgtac accgagagcc ggaagctgct	2340
gcggagctgg caccgtccca gcgtgttcca cctgaaggcc aagcagagct tcacctgcag	2400
atgcgacacc atcgtgagct gcgagggtca cgtggtaag aaaatccacca tgcgcctgg	2460
cctgtacggc aagaccgtgg gctacgcgt gacctaccac gccgagggtt ttctgggtgt	2520
caagaccacc gataccgtga agggcgagag agtgcgttcc cccgtctgca cctacgtgcc	2580
cagcaccatc tgccgaccaga tgaccgtat cctggccacc gatgtgaccc ccgaggacgc	2640
ccagaaactg ctggcggcc tgaaccagcg gatcgtggtg aacggccggaa cccagcggaa	2700
caccaacacc atgaagaact acctgctgcc catcgtggcc gtggccatca gcaagtggc	2760
cagagagtac aaggccgacc tggacgacga gaagccctg ggcgtgcggg agcggagcct	2820

gacctgtgc tgccgtggg cttcaagac ccggaagatg cacaccatgt acaagaagcc	2880
cgacacccag accatcgtga aggtgcccag cgagttcaac agcttcgtga tccccagcct	2940
gtggagcacc ggcctggcca tccccgtgca gagccggatc aagatgctgc tggccaagaa	3000
aaccaagcgg gagctgatcc ccgtgctgga cgccagcagc gccagggacg ccgagcagga	3060
agagaaaagcg cgctggaag ccgagctgac ccggggaggcc ctgcccccc ttgtgcctat	3120
cgcctgccc gagaccggcg ttgtggacgt ggatgtggag gaactggaat accacggcgg	3180
agccgggtt gtggagaccc ccagatccgc cctgaaggtg acagcccagc ccaacgacgt	3240
gctgctggc aactacgtgg tgctgtcccc ccagaccgtg ctgaagagca gcaagctggc	3300
ccccgtgcac cctctggccg agcaggtgaa gatcatcacc cacaacggca gggccggcag	3360
ataccaggc gacggctacg acggccgggt gctgctgcca tgccgctccg ccatccctgt	3420
gcccgagttc caggccctga gcgagagcgc cacaatggtg tacaacgagc gggagttcgt	3480
gaaccggaa ctgtaccaca ttgccgtgca cggcccttagc ctgaacaccg atgaggaaaa	3540
ctacgagaaa gtgcggccg agcggaccga tgccgagtac gtgttcgacg tggacaagaa	3600
atgctcgctg aagcgggagg aagccagcgg gctgggtctg gtccgggagc tgaccaaccc	3660
ccccctccac gagttcgct acgaggcct gaagatccgg ccctccgccc cctacaagac	3720
cacagtggtg ggcgtgttcg gcgtgcccgg cagcggcaag agcggccatca tcaagtccct	3780
ggtgaccaag cacgacactgg tgacctccgg caagaaagag aactgccagg aaatcgtaaa	3840
cgacgtcaag aagcaccggg gcctggacat ccaggccaag acagtggaca gcattctgt	3900
gaacggctgc agacggccg tggataatct gtacgtggac gaggccttcg cctgccacag	3960
cggcaccctg ctggccctga tcggcccttgtt gaagccccgg tccaagggtgg tgctgtgcgg	4020
cgaccccaag cagtgcggct tttcaacat gatgcagctg aaggtgaact tcaaccacaa	4080
catctgcacc gaagtgtgcc acaagagcat cagccggcgg tgcaccagac ccgtgaccgc	4140
catctgtcc accctgcact acggccggaa gatgcggacc accaaccctt gcaacaagcc	4200
catcatcatc gataccaccc gccagaccaa gcccaagccc ggccgacatcg tgctgacctg	4260
cttcgcggc tgggtgaagc agctgcagct ggactaccgg ggccacgagg tggatgaccgc	4320
cggccctcc cagggccctga ccagaaaggg cgtgtatgcc gtggccaga aggtgaacga	4380
gaaccccttg tacgccccctg ccagcggac cgtgaatgtg ctgctgaccc ggaccgagga	4440
caggctggtg tggaaaaccc tggccggcga cccctggatc aaggtgtgtt ccaacatccc	4500
ccagggcaac ttacccgcca ccctggaga gtggcaggaa gagcggacaca agatcatgaa	4560
ggtgatcgag ggcctgccc cccctggatc cgccttccag aacaaggcca acgtgtgctg	4620

ggccaagagc ctgggcctg tgctggacac cgccggcatc cggctgaccg ccgaagagtg	4680
gagcaccatc atcacccgc tcaaagagga ccgggcctac agccccgtgg tggccctgaa	4740
cgagatctgc accaagtact acggcgtgga cctggacagc ggctgttca ggcgcggccaa	4800
ggtgtccctg tactacgaga acaaccactg ggacaaccgg ccaggccgca ggtatgtacgg	4860
cttcaacgcc gccaccggcg ccagactgga agccggcac acctttctga agggccagtg	4920
gcacaccggc aaggcaggcg tgatcgccga gagaaagatc cagcccgtt ccgtgctgga	4980
taacgtgatc cctatcaacc ggccgctgcc ccacgcctg gtggccgagt acaagacagt	5040
gaagggcagc cgggtggagt ggctggtaa caaagtgcgg ggctaccacg tgctgctggt	5100
gtctgagtag aacctggccc tgcctcgccg gagggtgacc tggctgtccc ctctgaacgt	5160
gacaggcgcc gacagggtct acgacactgag cctggccctg cctggccacg ccggcagatt	5220
cgacctggtg ttctgtaca tccacaccga gttcagaatc caccactacc agcagtgcgt	5280
ggaccacgcc atgaagctgc agatgctggg cggcgcacgcc ctgaggctgc tgaagctgg	5340
cggcgcctg ctgatgcggg cctacggcta cgccgacaag atctccgagg ccgtgggtgc	5400
cagcctgagc cggaaagttaa gtcggccag ggtgctgaga cccgactgctg tgaccagcaa	5460
cacagaagtgt ttctgtgt tcagcaactt cgacaacggc aagcggccca gcaccctgca	5520
ccagatgaac accaagctgt ccggcgtgta cgccggcgag gccatgcaca ccggccggatg	5580
cgcccccagc taccgggtga agcgggcccga catgcacc tgcaccgagg ccggcgtgg	5640
gaatgccgcc aatgccaggg gcaccgtggg cgacggcgtg tgcagggccg tggccaaaaa	5700
gtggcccgac gccttcaagg gcgaggccac ccctgtggc accatcaaaa ccgtgatgt	5760
cggcagctac cccgtgatcc acggcgtggc ccccaatttc agcgcacca cagaggccga	5820
gggcgaccgg gaactggccg ccgttatag agccgtggcc gccgaagtga acagactgag	5880
cctgagcagc gtggccatcc ctctgtgtc caccggcgta ttctggccg gcagggaccg	5940
gctgcagcag agcctgaacc acctgttac cgctatggac gccaccgacg ccgacgtgac	6000
aatctactgc cggacaaga gctggagaa gaagatccag gaagccatcg acatgaggac	6060
cgccgtggag ctgtgtacaacg acgacgtgga gctgacaacc gacctgggtgc gctgtcaccc	6120
cgacagcagc ctggggcc ggaaggctta cagcaccacc gacggctccc tgtacagcta	6180
cttcgagggc accaagttca accaggccgc catcgatatg gccgagatcc tgaccctgt	6240
gcccaggctg caggaagcca acgagcagat ctgtgtac gccctggcg agacaatgga	6300
caacatccgg tccaagtgcc ccgtgaacga cagcgcacgc agcaccggcc ctggaccgt	6360

gccctgcctg tgcagatacg ccatgaccgc cgagcggatc gcccggctgc ggagccacca	6420
ggtaagagc atggtgtgt gcagcagtt cccccgtccc aagtaccacg tggatggcgt	6480
gcagaaagtg aagtgcgaga aggtgctgt gttcgacccc accgtgccta gcgtgggtgc	6540
cccccgaaag tacggccct ccaccaccga ccacagcgac agaagcctgc gggcgtcga	6600
cctggactgg accaccgact ccagcagcac cgccagcgac accatgagcc tgcccagect	6660
gcagagctgc gacatcgaca gcatctacga gcctatggcc cccatcgtgg tgaccgcca	6720
cgtgcacctt gagccagccg gcatgcccga cctggccgcc gatgtgcacc cagaaccgc	6780
cgaccacgtg gatctggaaa accccatccc ccctccaga cccaagaggg ccgcctacct	6840
ggccagcaga gccgcccaga ggcccgtgcc tgccccaga aagcccaccc cagccccag	6900
aaccgccttc aggaacaaggc tgccctgtac cttcggcgac ttgcacgagc acgaggtgga	6960
cgcctggcc ageggcatca cttcggcga ttttgatgac gtgctgcggc tggcagagc	7020
cgaggcctat atttcagca ggcacaccgg ctccggccac ctgcagcaga aaagcgtgag	7080
acagcacaac ctgcagtgcg cccagctgga cgccgtggaa gaggaaaaga tgtacccccc	7140
caagctggat accgagcggg aaaagctgt gctgctgaaa atgcagatgc accccagcga	7200
ggccaacaag agccgctacc agtcttagaa ggtggagaac atgaaggcca ccgtggtgga	7260
ccggctgacc agccggccca ggctgtacac agggggccgac gtggcagaa tccctaccta	7320
cgcctgcgc taccccgaggc ccgtgtacag ccccaccgtg atcgacgggt tcagcagccc	7380
cgacgtggcc atcggccct gcaatgagta cctgtctagg aactacccaa ccgtggccag	7440
ctaccagatc accgatgagt acgatgcata cctggacatg gtggacggca ggcacagctg	7500
cctggaccgg gccaccttct gtcccgccaa gctgcgggtgc taccccaagc accacgccta	7560
tcaccagccc accgtgagaa ggcgcgtgcc cagcccttc cagaataccc tgcagaatgt	7620
gctggccgcc gccaccaagc ggaactgcaa cgtgacccag atgagagaac tgcccacaat	7680
ggacagcgcc gtgttaacg tggagtgttt caagagatac gcctgcagcg ggcgtactg	7740
ggaggaatac gccaaggcgc ccatccggat caccaccgag aacatcacca cctacgtgac	7800
caagctgaag gcccccaagg ccggccgcct gttcgccaaag acccacaacc tggtgcccct	7860
gcaggaagtg cctatggaca gtttcaccgt ggacatgaag cggacgtga aggtgacccc	7920
tggcacaag cacaccgagg aacggcccaa ggtgcaggtg atccaggccg ccgagcctct	7980
ggccaccggcc tatctgtgcg gcatccaccg ggagctggtg cggcggctga acgcccgtct	8040
gaggcccaac gtgcacaccc tggatcgacat gtccggcggag gacttcgacg ccatcatcg	8100
cagccacttc cacccggcg acccagtgtt ggaaaccgtat cgcgcacatc tcgacaaagag	8160
ccaggacgac accctggccc tgaccggct gatgatcctg gaagatctgg gcgtggacca	8220

gtacctgctg gatctgatcg aggccgcctt cggcgagatc agcagctgcc acctgcctac	8280
cggcacccgg ttcaagttcg gcgcctatgt gaagagcggc atgtttctga ccctgttcat	8340
caacacagtgc tgaatatca ccatgcccag cagggtgctg gaacagcggc tgaccgacag	8400
cgcctgcgcc gccttcatcg gcgacgacaa catcgacac ggctgtatca gcgacaagct	8460
gatggccgag cggtgccca gctgggtgaa catggaagt aagattatcg acgcccgtat	8520
ggcgaaaag cccccctact tctgcggcgg cttcatctg ttgcacagcg tgacacagac	8580
cgcctgcaga gtgagcggacc ccctgaagcg gctgttcaag ctggcaaacc ctctgacagc	8640
cgaggacaag caggacgagg accggcggag ggccctgtcc gacgagggtgt ccaagtggtt	8700
ccggaccggc ctggcgccg agcttggaaat ggccctigaca agccgtacg agtgtggaggg	8760
ctgcaagagc atcctgatcg ctatggccac cctggcccg gacatcaagg ccttaagaa	8820
gctgagagggc cctgtcatcc acctgtacgg cggacccgg ctggcggt gagagctgc	8880
tgatcagcct cgactgtgcc ttctagttgc cagccatctg ttgtttgccc ctccccgtg	8940
ccttccttga ccccttggaaagg tgccactccc actgtctttt cctaataaaa tgaggaaatt	9000
gcatcgcat gtctgagtag gtgtcattt attctgggg gtgggtgg gcaggacagc	9060
aagggggagg atttggaaaga caatagcagg catgttaat taacaggcct tggcgcccg	9120
ggcttggta agctctagtt ctatgtttt acagtttac atcgataagc ttatgtgg	9180
tagtttagca cgaaggagtc aacatgttag aagatctaa acgcttagta tttagaagcca	9240
acctggcgct gccaaaacac aacctggta cgctcacatg ggcaacgac agcccggtt	9300
atcgcgagcg cggcgctttt gtatcaaacc cttccggcgt cgattacagc gtcgtacccg	9360
ctgacgatat ggtcggtt agcatcgaaa ccggtaagt ggttgaaggt acgaaaaagc	9420
cctctccga caacccaaact caccggctgc tctatcaggc atccccctcc attggcgca	9480
ttgtgcatac gcaactcgcc cacggccacca tctggcgca ggccggcgt tcgattccag	9540
caacccggcac caccggccac gactatttct acggcaccat tccctgcacc cgaaaaatga	9600
ccgacgcaga aatcaacggc gaatatgagt gggaaaccgg taacgtcatc gtggaaacct	9660
ttgaaaaaca ggatcgat gcagcgcaaa tgccggcgt tctggccat tcccacggcc	9720
cgtttgcattt gggaaaaat gcccggatcg cggcgatccat cggatcgatc ctggaaagg	9780
tcgccttatat gggatattc tgccgtcagt tagcgccgca gttaccggat atgcagcaaa	9840
cgctgcgtttaaaactat ctgcgtatgc atggcgccaa ggcatttttac gggcgtat	9900
gacagccgc ctaatgagcg ggctttttt tccatgacca aaatccctt acgtgagttt	9960
tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttctt agatccttt	10020
tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggttgt	10080

ttgccggatc aagagctacc aacttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgac 10140  
 ataccaaata ctgccttct agtgtagccg tagttaggcc accactcaa gaactctgt 10200  
 gcaccgccta catabctcg tctgctaatt ctgttaccag tggctgtgc cagtggcgt 10260  
 aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cgataaggc gcagcggct 10320  
 ggctgaacgg ggggttcgtc ca 10342  
 <210> 6  
 <211> 10248  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Plasmid pheIF4A1-Nsp1234  
 <400> 6

cacagcccag	cttgagcga	acgacctaca	ccgaacttag	atacctacag	cgtgagctat	60
gagaaagcgc	cacgttccc	gaaggagaa	aggcggacag	gtatccgta	agcggcaggg	120
tcggaacagg	agagcgcacg	agggagctc	cagggggaaa	cgcctggtat	ctttatagtc	180
ctgtcggtt	tcgcacctc	tgacttgagc	gtcgatttt	gtgatgtcg	tcagggggc	240
ggagcctatg	gaaaaacgcc	agcaacgcatt	cgataaaata	aaagatttt	tttagtctcc	300
agaaaaagg	ggaatgaaa	gacccacact	gtagtttgg	caagctagcg	tatacggatc	360
ctctagctag	atgatttct	tcatccctgg	cacacgtcca	ggcagtgctc	aatccatctc	420
tgctacaggg	gaaaacaat	aacatttgag	tccagtgag	accggagca	gaagtaaagg	480
gaagtgataa	ccccagagc	ccggaagcct	ctggaggctg	agacctcgcc	ccccttgcgt	540
gatagggcct	acggagccac	atgaccaagg	cactgtcgcc	tccgcacgtg	tgagagtgc	600
ggccccaag	atggctgcca	ggcctcgagg	cctgactctt	ctatgtcact	tccgtaccgg	660
cgagaaaggc	ggccctcca	gccaatgagg	ctgcggggcg	ggccttcacc	ttgataggca	720
ctcgagttat	ccaatggtc	ctgcggggcg	gagcgactag	gaactaacgt	catggcgagt	780
tgctgagcgc	cggcaggcgg	ggccggggcg	gccaacccaa	tgcgatggcc	ggggcggagt	840
cggcgcctct	ataagttgtc	gataggcggg	cactccccc	tagttctaa	ggaaccggtc	900
gccaccatgg	ccgccaaggt	gcacgtggac	atcgaggccg	acagccctt	catcaagagc	960
ctgcagaagg	cctccccag	cttcgaggtg	gagtccctgc	aggtgacccc	caacgaccac	1020
gccaacgcca	gggccttcag	ccacctggcc	accaagctga	tcgagcagga	aaccgacaag	1080
gacaccctga	tcctggacat	cgccagcgc	ccctcaaggt	gagtttgggg	acccttgatt	1140
gttctttctt	tttcgttatt	gtaaaattca	tgttatatgg	agggggcaaa	gtttcaggg	1200

tgttgttag aatggaga a tgccttgt atcactatgg accctcatga taatttgg	1260
tcttcactt tctactctgt tgacaaccat tgtctcctct tattttctt tcattttctg	1320
taacttttc gttaaacctt agcttgcatt tgtaacgaat tttaaattt acttttgtt	1380
atttgtcaga ttgttaagtac tttctcta cacttttt tcaaggcaat cagggtatat	1440
tatattgtac ttccagcacag ttttagagaa caattgttat aattaaatga taaggtagaa	1500
tatttctgca tataaattct ggctggcgtg gaaatattct tattggtaga aacaactaca	1560
ccctggtcat catcctgcct ttctctttat ggttacaatg atatacactg tttgagatga	1620
ggataaaaata ctctgagtc aaaccgggcc cctctgctaa ccatgttcat gccttctct	1680
ttttcctaca ggcggatgtt gagcacccac aagtaccact gcgtgtgcc catgcggagc	1740
gccgaggacc ccgagcggct ggtgtgctac gccaaagaagc tggccggccgc cagcggcaag	1800
gtgctggacc gggagatcgc cggcaagatc accgacatgc agaccgtat ggccaccccc	1860
gaccccgaga gccccaccc ttgcctgcac accgacgtga cctgcccggac agccggccgag	1920
gtggccgtgt accaggacgt gtacggcgtg cacggcccca cttccctgtt ccaccaggcc	1980
atgaaggcg tggggaccgc ctactggatc ggcttcgaca ccacccctt catttcgac	2040
gccctggccg gagectaccc cacctacgac accaactggg ccgacgagca ggtgtgcag	2100
gccccggaaaca tcggcctgtg cgccggccagc ctgaccgagg gccggctggg caagctgtcc	2160
atcctgcgga agaaggcagct gaagccctgc gacaccgtga tttcagcgt gggcagcaca	2220
ctgtacaccg agagccggaa gctgctgccc agctggacc tggccagcgt gttccaccc	2280
aaggcaagc agagttcac ctgcagatgc gacaccatcg tgagctgcga gggctacgt	2340
gtgaagaaaa tcaccatgtg ccctggcctg tacggcaaga ccgtggctta cgccgtgacc	2400
taccacgccc aggctttct ggtgtgcaag accaccgata ccgtgaagg cgagagatg	2460
agctccccg tctgcaccta cgtgcccagc accatctgcg accagatgac cggtatctg	2520
gccaccgatg tgaccccgaa ggacgcccag aaactgctgg tggccctgaa ccagcggatc	2580
gtggtaacg gccggaccca gcggAACACC AACACCATGA AGAACTACCT GCTGGCCATC	2640
gtggccgtgg cttcagcaa gtggggccaga gactacaagg ccgacccgttga cgacgagaag	2700
ccctggccg tgccggagcg gaggctgacc tgctgctgcc tggccctt caagaccgg	2760
aagatgcaca ccatgtacaa gaagccgcac acccagacca tctgtgaaggt gcccagcgc	2820
ttcaacagct tctgtatccc cagcctgtgg agcaccggcc tggccatccc cgtgcggagc	2880
cggatcaaga tctgtgttgc caagaaaacc aagcggggagc tggatccccgt gctggacgcc	2940
agcagcggcca gggacgcccga gcaggaagag aaagagcggc tggaaagccga gctgaccgg	3000

gaggccctgc cccccctggc gcctatcgcc cctgccgaga ccggcggtgg ggacgtggat	3060
gtggaggaac tggaaatacca cgccggagcc ggggtggtgg agaccccccag atccgcccgt	3120
aagggtgacag cccagcccaa cgacgtgtcg ctggcaact acgtggtgct gtccccccag	3180
accgtgtga agagcagcaa gctggccccc gtgcaccctc tggccgagca ggtgaagatc	3240
atcacccaca acggcagggc cgccagatac caggtcgacg gctacgacgg ccgggtgctg	3300
ctgccccatgcg gctccgccc catccgtgccc gagttccagg ccctgagcga gagcggcaca	3360
atggtgtaca acgagcggga gttcgtgaac cggaagctgt accacattgc cgtgcacggc	3420
ccttagcctga acaccgatga gaaaaactac gagaaagtgc gggccgagcg gaccgatgcc	3480
gagtaacgtgt tcgacgtgga caagaaatgc tgcgtgaagc gggaggaagc cagcgggctg	3540
gtgctggtcg gggagctgac caacccccc ttccacgagt tcgcctacga gggcctgaag	3600
atccggccct ccgcccccta caagaccaca gtgggtggcg tggccggcgt gcccggcagc	3660
ggcaagagcg ccatcatcaa gtccctggtg accaagcacg acctggtgac ctccggcaag	3720
aaagagaact gccaggaaat cgtcaacgcgtcaagaagc accggggct ggacatccag	3780
gccaagacag tggacagcat cctgctgaac ggctgcagac gggccgtgga tatcctgtac	3840
gtggacgagg cttcgccctg ccacagcgcc accctgctgg ccctgatcgc cctggtaag	3900
ccccggtcca aggtggtgc gtgcggcgac cccaaaggact gggcttctt caacatgtat	3960
cagctgaagg tgaacttcaa ccacaacatc tgcaccgaag tggccacaa gagcatcagc	4020
cggccgtgca ccagaccgt gaccgcattc gtgtccaccc tgcactacgg cggcaagatg	4080
cgaccacca acccctgcaa caagccatc atcatcgata ccaccggcca gaccaagccc	4140
aagccggcg acatcggtct gacctgcttc cgccgtggg tgaaggact gcagctggac	4200
taccggggcc acgaggtat gaccggccgc gcctccagg gcctgaccag aaaggccgtg	4260
tatgccgtgc ggcagaaggt gaacgagaac cccctgtacg cccctgccag cgagcacgt	4320
aatgtgtgc tgacccggac cgaggacagg ctgggtgga aaaccctggc cggcgacccc	4380
tggatcaagg tgcgttccaa catccccag ggcaacttca cggccacccct ggaagagtgg	4440
caggaagagc acgacaagat catgaagggt atcgaggccc ctggccccc agtggacgcc	4500
ttccagaaca aggccaaacgt gtgcgtggcc aagagcctgg tgcctgtgct ggacaccgccc	4560
ggcatccggc tgaccggcga agagtggagc accatcatca ccgccttcaa agaggaccgg	4620
gcctacagcc ccgtgggtggc cctgaacgag atctgcacca agtactacgg cgtggacactg	4680
gacagcggcc tggcagcgc ccccaagggtg tccctgtact acgagaacaa ccactggac	4740

aaccggccag	gccccaggat	gtacggctc	aacgcccca	ccggcccgag	actggaagcc	4800
cgccacacct	ttctgaaggg	ccagtggcac	accggcaagc	aggccgtgat	cggcagaga	4860
aagatccagc	ccctgtccgt	gctggataac	gtgatcccta	tcaaccggcg	gctgccccac	4920
gcccgtgg	ccgagtacaa	gacagtgaag	ggcagccggg	tgaggatggct	ggtgaacaaa	4980
gtgcgggct	accacgtct	gctgggtct	gagtaaaccc	tggccctgcc	tcggcggagg	5040
gtgacctggc	tgtccctct	gaacgtgaca	ggcgccgaca	ggtgctacga	cctgagcctg	5100
ggcctgcctg	ccgacgcccgg	cagattcgac	ctggtgttgc	tgaacatcca	caccgagttc	5160
agaatccacc	actaccagca	gtgcgtggac	cacgcatga	agctgcagat	gctggcggc	5220
gacccctiga	ggcigctgaa	gcctggcgcc	agcctgctga	tgccggccta	cggctacgcc	5280
gacaagatct	ccgaggccgt	ggtgtccagc	ctgagccgga	agttcagctc	cgccagggtg	5340
ctgagacccg	actgcgtgac	cagcaacaca	gaagtgttgc	tgctgttcag	caacttcgac	5400
aacggcaagc	ggcccagcac	cctgcaccag	atgaacacca	agctgtccgc	cgtgtacgcc	5460
ggcgaggcca	tgcacaccgc	cgatgccc	cccagctacc	gggtgaagcg	ggccgacatc	5520
gccacctgca	ccgaggccgc	cgtggtaat	ggcgccaaatg	ccagggcac	cgtggcgcac	5580
ggcgtgtgca	ggcccggtggc	caaaaagtgg	cccagcgct	tcaaggcgac	ggccacccct	5640
gtggcacca	tcaaaaccgt	gatgtgcggc	agctaccccg	tatccacgc	cgtggcccc	5700
aattcagcg	ccaccacaga	ggccgagggc	gaccggaaac	tggccggcgt	gtatagagcc	5760
gtggccggc	aagtgaacag	actgagcctg	agcagcggtg	ccatccctct	gctgtccacc	5820
ggcgtgttca	ggccggcgag	ggaccggctg	cagcagagcc	tgaaccacct	gttaccgct	5880
atggacgcca	ccgacgcccga	cgtgacaatc	tactgcggg	acaagagctg	ggagaagaag	5940
atccaggaag	ccatcgacat	gaggaccgac	gtggagctgc	tgaacgacga	cgtggagctg	6000
acaaccgacc	tggtgccgt	gcaccccgac	agcagcctgg	tggccggaa	ggctacagc	6060
accaccgacg	gtccctgta	cagctacttc	gagggcacca	agttcaacca	ggccgcccac	6120
gatatggccg	agatcctgac	cctgtggccc	aggctcgagg	aagccaaacga	cgatctgt	6180
ctgtacgccc	tggcgagac	aatggacaac	atccggtcca	agtggccgt	gaacgacagc	6240
gacagcagca	ccccccctcg	gaccgtgccc	tgcctgtgca	gatacgccat	gaccgcccag	6300
cgatcgccc	ggctgcccgg	ccaccaggtg	aagagcatgg	tgggtgcag	cagttcccc	6360
ctgccaagt	accacgtgga	tggcgatgcag	aaagtgaagt	gctgatgttc	6420	
gacccaccg	tgcctagcgt	gggtcccccc	cggaagtacg	ccgcctccac	caccgaccac	6480
agcgacagaa	gcctgcccgg	cttcgacctg	gactggacca	ccgactccag	caccgacc	6540
agcgacacca	tgagcctgcc	cagcctgcag	agctgcgaca	tgcacagcat	ctacgacc	6600

atggccccca tcgtggtgac cgccgacgtg caccctgagc cagccggcat cgccgacgtg 6660  
 gccgccgatg tgacccaga acccgccgac cacgtggatc tggaaaaccc catccccct 6720  
 cccagaccca agagggccgc ctacctggcc agcagagccg ccgagaggcc cgtgcctgcc 6780  
 cccagaagaag ccaccccagc ccccagaacc gcctttagga acaagctgcc cctgaccitc 6840

ggcgaactcg acgagcacga ggtggacgcc ctggccagcg gcatcacctt cggcgatttt 6900  
 gatgacgtgc tgccgtggg cagagccgga gcctataatct tcagcagcga caccggctcc 6960  
 ggccacacgtc agcagaaaag cgtgagacag cacaacctgc agtgcgccca gctggacgcc 7020  
 gtggaaaggagg aaaaagatgta ccccccaag ctggataccg agcgggaaaa gctgctgctg 7080  
 ctgaaaatgc agatgcaccc cagcgaggcc aacaagagcc gctaccagt taggaagggt 7140  
 gagaacatga aggccaccgt ggtggaccgg ctgaccagcg gcgcaggct gtacacaggg 7200  
 gccgacgtgg gcagaatccc tacctacgcc gtgcgttacc ccaggcccgt gtacagcccc 7260

accgtgatcg agcggttcag cagccccgac gtggccatcg ccgcctgcaa tgagtacctg 7320  
 tcttaggaact acccaaccgt ggcctactac cagatcaccg atgagtaacga tgcctacctg 7380  
 gacatggtgg acggcagcga cagctgcctg gaccgggcca cttctgtcc cgccaaagctg 7440  
 cggtgctacc ccaaggacca cgcctatcac cagcccaccc tgagaagcgc cgtgcccagc 7500  
 cccttcaga ataccctgca gaatgtgctg gccgecccca ccaagggaa ctgcaacgtg 7560  
 acccagatga gagaactgcc cacaatggac agcgccgtgt ttacgttggaa gtgcttcaag 7620  
 agatacgcct gcagcggcga gtactgggag gaatacgcca agcagcccat ccggatcacc 7680

accgagaaca tcaccaccta cgtgaccaag ctgaaggccc ccaaggccgc cgccctgttc 7740  
 gccaagaccc acaacctggt gcccctgcag gaagtgccta tggacagggtt caccgtggac 7800  
 atgaagcggg acgtgaaggt gacccttgcc accaagcaca ccgaggaacg gcccaagggtg 7860  
 caggtgatcc aggccggcga gcctctggcc accgcctatc tgtgcggcat ccaccgggag 7920  
 ctggtgccgc ggctgaacgc cgtgctgagg cccaaacgtgc acaccctgtt cgacatgtcc 7980  
 gccgaggact tcgacgccat catgcccagc cacttccacc ccggcgaccc agtgcgttggaa 8040  
 accgatatcg ccagttcga caagagccag gacgacagcc tggccctgac cgccctgtatg 8100

atcccttggaaat atctgggcgt ggaccagtac ctgctggatc tgatcgaggc cgcccttggc 8160  
 gagatcagca gctgccaccc ctaccggc acccggttca agttcggcgc catgtgaag 8220  
 agcggcatgt ttctgaccct gttcatcaac acagtgttga atatcaccat cgccagcagg 8280  
 gtgcttggaaac agcggctgac cgacagcgcc tgcggccct tcatcgccga cgacaacatc 8340  
 gtgcacggcg ttagttagcga caagctgtatg ccggagccgtt ggcggactgt ggtgaacatg 8400  
 gaagtgaaga ttatcgacgc cgtgatggc gaaaagcccc cctacttctg cgccggcttc 8460

atcggtttcg acagcgtgac acagaccgcc tgcagagtga gcgaccctt gaagcggctg	8520
ttcaagctgg gcaaacctct gacagccgag gacaaggcagg acgaggaccg gcggaggccc	8580
ctgtccgacg aggtgtccaa gtggttccgg accggcctgg gcccggact ggaagtggcc	8640
ctgacaagcc gctacgaggt ggagggctgc aagagcatcc tgatcgctat ggccaccctg	8700
gccccggaca tcaaggcctt taagaagctg agaggccctg tcatccacct gtacggcgg	8760
ccccggctgg tgcgtgaga gctcgctgat cagcctcgac tgtgccttct agttgccagc	8820
catctgttgtt ttgccttc cccgtgcctt ccttgaccct ggaaggtgcc actccactg	8880
tccttccta ataaaatgag gaaattgcat cgcatgtct gagtaggtgt cattctattc	8940
tgggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg	9000
cttaattaac aggcttggc gcgcgggtc tggtaagct ctgttctca tggttgcag	9060
cttatcatcg ataagcttta atgcgttagt ttagcacgaa ggagtcaaca tgtagaaga	9120
tctcaaacgc taggtattag aagccaacct ggcgctgcca aaacacaacc tggtcacgct	9180
cacatggggc aacgtcagcg ccgttgatcg cgagcgcggc gtctttgtga tcaaaccctc	9240
cggcgtcgat tacagcgtca tgaccgctga cgatatggc gtggtagca tcgaaaccgg	9300
tgaagtggtt gaaggtacga aaaagccctc ctccgacacg ccaactcacc ggctgctcta	9360
tcaggcattc ccctccattt gggcattgt gcatacgac tcgcgcac ccaccatcg	9420
ggcgcaggcg ggtcagtgcg ttccagcaac cggcaccacc caegccgact atttctacgg	9480
caccattccc tgcacccgca aatgaccga cgcagaaatc aacggcaat atgagtggga	9540
aaccggtaac gtcatcgtag aacaccttga aaaacagggt atcgatgcag cgcaatgcc	9600
cggcgttctg gtccattccc acggcccggt tgcatggggc aaaaatgccg aagatgcgg	9660
gcataacgcc atcggtctgg aagaggctcg ttatatgggg atattctgcc gtcagttac	9720
gcccgagtta ccggatatgc agcaaacgct gctggataaa cactatctgc gtaagcatgg	9780
cgcgaaggca tattacgggc agtaatgaca gcccgcctaa tgagcgggt ttttttcca	9840
tgaccaaaat cccttaacgt gagtttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaaga	9900
tcaaaggatc ttcttgagat ctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa	9960
aaccaccgct accagcgggt gttgtttgc cggatcaaga gctaccaact cttttccga	10020
aggttaactgg cticagcaga gcgcagatac caaatactgt cttcttagt tagccgtag	10080
taggccacca ctcaagaac tctgttagcac cgccatata cctcgctctg ctaatcctgt	10140
taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtttac cgggttggac tcaagacgat	10200

agttaaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgca 10248  
<210> 7  
<211> 10258  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> Plasmid phEF1aHTLV-Nsp1234  
<400> 7  
cacagcccag ctggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat 60  
gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggccggacag gtatccgta agcggcaggg 120  
tcggaacagg agagcgcacg agggagctc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc 180  
ctgtcggtt tcgccaccc tgacttgagc gtcgatttt gtatgctcg tcagggggc 240  
ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcat cgataaaata aaagattta tttagtctcc 300  
  
agaaaaaggg gggaatgaaa gaccccacct gtaggtttgg caagctagcg tatacgatc 360  
ctctagctag agctccggtg cccgtcagtg ggcagagcgc acatcgccca cagtccccga 420  
gaagtgggg ggaggggtcg gcaattgaac cggtgcttag agaagggtggc gcggggtaaa 480  
ctggaaagt gatgtcgtgt actggctcg ccttttccc gaggggtggg gagaaccgt 540  
tataagtgcg ttagtcgccc tgaacgttct ttttcgcaac gggtttgcgc ccagaacaca 600  
gctgaagctt cgagggctc gcatctctcc ttacgcgcc cgccgccta cctgaggccg 660  
ccatccacgc cggttgagtc gcgttctgcc gcctccgc tgggtgcct cctgaactgc 720  
  
gtccggcgtc taggttaagtt taaagctcg gtcgagaccg ggccttgtc cggcgctccc 780  
ttggagccta cctagactca gccggcttc cacgcttgc ctgaccctgc ttgtcaact 840  
ctacgtctt gttcggtt ctgttctgcg ccgttacaga tccaagctgt gaccggcgcc 900  
tactccggtc gccaccatgg ccgccaagg gcacgtggac atcgaggccg acagccctt 960  
catcaagagc ctgcagaagg cttccccag cttcgaggtg gagtccctgc aggtgacccc 1020  
caacgaccac gccaacgcca gggccttcag ccacctggcc accaagctga tcgagcagga 1080  
aaccgacaag gacaccctga tcctggacat cggcagcgc ccctcaaggt gagttgggg 1140  
  
acccttgatt gtttttctt ttgcgtatt gtaaaattca ttttatatgg agggggcaaa 1200  
gtttcaggg ttttttttag aatgggaaga tgtccctgt atcactatgg accctcatga 1260  
taattttgtt tcttcactt tctactctgt tgacaaccat tgcctctt tattttttt 1320  
tcatttctg taacttttc gttaaacttt agcttgcatt tgtaacgaat tttaaattc 1380  
acttttgtt atttgtcaga ttgttaagtac tttctctaatt cactttttt tcaaggcaat 1440  
cagggtatat tatattgtac ttacgcacag ttttagagaa caattgttat aattaaatga 1500

taaggtagaa tattctgca tataaattct ggctggcgtg gaaatattct tattggtaga	1560
aacaactaca ccctggtcat catcctgcct ttcttttat ggttacaatg atatacactg	1620
tttgagatga ggataaaata ctctgagtcc aaaccggcc cctctgctaa ccatgttcat	1680
gccttcttct tttcctaca ggcggatgtat gagcacccac aagtaccact gcgtgtgcc	1740
catgcggagc gccggaggacc ccgagcggct ggtgtgctac gccaagaagc tggccgcgc	1800
cagcggaag gtgctggacc gggagatcgc cggcaagatc accgacctgc agaccgtat	1860
ggccaccccc gacgcccaga gccccacctt ctgcctgcac accgacgtga cctggcgac	1920
agccggccgag gtggccgtgt accaggacgt gtacggcgtg cacgccccca cctccctgt	1980
ccaccaggcc atgaagggcg tgccggaccgc ctactggatc ggcttcgaca ccacccctt	2040
catgttcgac gccctggccg gggccctaccc cacctacgcc accaactggg ccgacgagca	2100
ggtgtgcag gcccggaaaca tcggcctgtg cgccggccagc ctgaccgagg gcccggctgg	2160
caagctgtcc atcctgcgga agaagcagct gaagccctgc gacaccgtga tggtcagcgt	2220
gggcagcaca ctgtacaccg agagccggaa gctgctgggg agctggcacc tgcccagcgt	2280
gttccacctg aaggcaagc agagcttac ctgcagatgc gacaccatcg tgagctgcga	2340
gggctacgtg gtgaagaaaa tcaccatgtg ccctggcctg tacggcaaga ccgtgggcta	2400
cgcgtgacc taccacgccc agggcttct ggtgtgcaag accaccgata ccgtgaaggg	2460
cggagagtg agcttcccg tctgcaccta cgtgccagc accatctgcg accagatgac	2520
cggatctcg gccaccgatg tgaccccgaa ggacgcccag aaactgctgg tgccctgaa	2580
ccagcggatc gtggtaacg gccggacca gccaacacc aacaccatga agaactacat	2640
gctgccatc gtggccgtgg cttcagcaa gtggccaga gatcacaagg ccgacctgga	2700
cgacgagaag cccctggcg tgccggagcg gagcctgacc tgctgtgcc tgtggcctt	2760
caagacccgg aagatgcaca ccatgtacaa gaagcccgac acccagacca tcgtgaaggt	2820
gcccagcgag ttcaacagct tcgtgatccc cagcctgtgg agcacccggcc tggccatccc	2880
cgtgcggagc cgatcaaga tgctgctggc caagaaaacc aagcgggagc tgatccccgt	2940
gctggacgcc agcagcgcca gggacgcccga gcaggaagag aaagagccgc tggaagccga	3000
gctgacccgg gaggccctgc ccccccgtt gcctatcgcc cctggcggaga ccggcgtgg	3060
ggacgtggat gtggaggaac tgaaatcca cgccggagcc ggggtggtgg agaccccccag	3120
atccgcctg aaggtgacag cccagccaa cgacgtgctg ctggcaact acgtgggtgt	3180
gtccccccag accgtgctga agagcagcaa gctggccccc gtgcacccctc tggccgagca	3240

ggtaagatc atcacccaca acggcaggc cgccagatac caggtcgacg gctacgacgg	3300
ccgggtgctg ctgccatgcg gctccgccc ccctgtccc gagttccagg ccctgagcga	3360
gagcgccaca atggtgtaca acgagcggga gttcgtaac cgaaagctgt accacattgc	3420
cgtgcacggc cctagcctga acaccgtga ggaaaactac gagaaagtgc gggccgagcg	3480
gaccgatgcc gagtacgtgt tcgacgtgga caagaaatgc tgcgtgaagc gggaggaagc	3540
cagcggctg gtgctggc gggagctgac caaaaaaaaaa ttccacgagt tcgcctacga	3600
gggcctgaag atccggccct ccgcccccta caagaccaca gtggtggcgt tggtcgccgt	3660
gccccggcagc ggcaagagcg ccatcatcaa gtccctggtg accaagcacg acctgggtac	3720
ctccggcaag aaagagaact gccaggaaat cgtcaacgcgtcaagaagc accggggcct	3780
ggacatccag gc当地agacag tggacagcat cctgctgaac ggctgcagac gggccgtgga	3840
tatcctgtac gtggacgagg ctttcgttgcc ccacagcgcc accctgtgg ccctgategc	3900
cctggtaag ccccggtcca aggtggtgct gtgcggcgtcccaaggcactgtggccacaa	3960
caacatgatg cagctgaagg tgaacttcaa ccacaacatc tgacccgaag tgtgccacaa	4020
gagcatcagc cggcggtgca ccagaccgt gaccgcatac gtgtccaccc tgactacgg	4080
cgccaagatg cggaccacca acccctgcaa caagccatc atcatcgata ccaccggcca	4140
gaccaagccc aagccggcg acatcggtct gacctgcttc cgccgtgg tgaaggcact	4200
gcagctggac taccggggcc acgaggtgtat gaccggccgc gcctccagg gcctgaccag	4260
aaagggctgt tatggcgatgc ggcagaaggt gaacgagaac cccctgtacg cccctggcag	4320
cgagcacgtg aatgtgctgc tgacccggac cgaggacagg ctgggtgga aaaccctggc	4380
cgccgacccc tggatcaagg tgctgtccaa catccccag ggcaacttca ccggccaccc	4440
ggaagagtgg caggaagagc acgacaagat catgaaggtg atcgagggcc ctggccccc	4500
agtggacgcc ttccagaaca aggccaaacgt gtgctggcc aagagcctgg tgcctgtgct	4560
ggacaccgccc ggcattccggc tgaccggcga agagtggagc accatcatca ccgccttcaa	4620
agaggaccgg gcctacagcc ccgtggcgc cctgaacgag atctgcacca agtactacgg	4680
cgtggacctg gacagcggcc tggatccggcgc ccccaaggtg tccctgtact acgagaacaa	4740
ccactggac aaccggccag gcccggcaggat gtacggcttc aacggcccca ccggccaccc	4800
actggaagcc cggcacacct ttctgaaggg ccagtggcac accggcaagc aggccgtat	4860
cggccgagaga aagatccagc ccctgtccgt gctggataac gtatcccta tcaaccggcg	4920
gctggccac gccctggtgcc cgagttacaa gacagtgaag ggcagccggg tggagtggt	4980
ggtaacaaa gtgcgggctt accacgtgtct gctgggtctt ggttacaacc tggccctggc	5040
tggccggagg gtgacccggc tggccctctt gacgtgaca ggcggccaca ggtgtacga	5100

cctgagcctg ggcgcctg ccgacgcgg cagattcac ctgggttcg tgaacatcca	5160
caccgagttc agaatccacc actaccagca gtgcgtggac cacccatga agctgcagat	5220
gctggcgcc gacccctga ggctgctgaa gcctggcgcc agcctgctga tgcggccta	5280
cggtacgcc gacaagatct ccgaggccgt ggtgtccagc ctgagccgga agttcagtc	5340
cgccagggtg ctgagacccg actgcgtac cagcaacaca gaagtgttgc tgctgttc	5400
caacttcgac aacggcaagc ggcccagcac cctgcaccag atgaacacca agctgtccgc	5460
cgtgtacgcc ggcgaggcca tgcacaccgc cggtgcgc cccagctacc gggtgaagcg	5520
ggccgacatc gccacctgca ccgaggccgc cgtgtgaat gccgccaatg ccagggcac	5580
cgtggcgac ggcgtgtgca gggccgtggc caaaaagtgg cccagcgc tcaagggcga	5640
ggccacccct gtggcacca taaaaacgt gatgtgcggc agtaccccg tgatccacgc	5700
cgtggcccc aatttcagcg ccaccacaga ggccgaggc gaccggaaac tggccgcgt	5760
gtatagagcc gtggccgccc aagtgaacag actgagcctg agcagcgtgg ccattccct	5820
gctgtccacc ggcgtgttca gcggcgccag ggaccggctg cagcagagcc tgaaccacct	5880
gttaccgcgt atggacgcca ccgacgcga cgtgacaatc tactgcgcgg acaagagctg	5940
ggagaagaag atccaggaag ccatcgacat gaggaccgc gtggagctgc tgaacgcga	6000
cgtggagctg acaaccgacc tggtgccgt gcacccgc acgagcctgg tggccggaa	6060
gggtacagc accaccgacg gtcctgtta cagctacttc gagggcacca agttcaacca	6120
ggccgcctc gatatggccg agatcctgac cctgtggccc aggctgcagg aagccaacga	6180
cgagatctgt ctgtacgccc tggcgagac aatggacaac atccgtcca agtgcggcgt	6240
gaacgacagc gacagcagca ccccccctcg gaccgtcccc tgcctgtca gatacgccat	6300
gaccgcgcgag cggatcgccc ggctgcccag ccaccaggta aagagcatgg tgggtgcag	6360
cagttcccc ctgccaagt accacgtgga tggcgtgcag aaagtgaagt gcgagaaggt	6420
gctgcgttgc gacccacccg tgcctagcgt ggtgtcccc cggaaatcgc cgcctccac	6480
caccgaccac agcgacagaa gcctgcgggg cttcgacccgactggacca ccgactccag	6540
cagcaccgcg acgcacacca tgacccctgc cagcctgcag agctgcgaca tcgacagcat	6600
ctacgagcct atggccccc tgcgtggac cggccacgtg caccctgagc cagccggcat	6660
cggccacccgatg tgcacccaga accccgcgcac cacgtggatc tggaaaaccc	6720
catccccct cccagaccca agagggccgc ctacccgttgc agcagagccg ccgagaggcc	6780
cgtgcctgcc cccagaaagc ccaccccagc ccccaaaacc gccttcaggaa acaagctgcc	6840
cctgacccctc ggcgacttcg acgacccacga ggtggaccc cttccggcagcg gcatcacctt	6900
cggcgattt gatgacgtgc tgcggctggc cagagccgga gcctatatct tcagcagcga	6960

caccggctcc gcccacactgc agcagaaaag cgtgagacag cacaacctgc agtgcgccta 7020

gctggacgcc gtggaagagg aaaagatgt a ccccccaag ctggataccg agcggaaaa 7080

gctgtctgt ctgaaaatgc agatgcaccc cagcgaggcc aacaagagcc gctaccagtc 7140

taggaaggtg gagaacatga aggccaccgt ggtggaccgg ctgaccagcg ggcgcaggct 7200

gtacacaggg gccgacgtgg gcagaatccc tacctacgcc gtgcgcgtacc ccaggcccgt 7260

gtacagcccc accgtgatcg agcggttcag cagccccgac gtggccatcg ccgcctgcaa 7320

ttagtacctg tcttaggaact acccaaccgt ggccagctac cagatcaccg atgagttacga 7380

tgcctacctg gacatggtgg acggcagcga cagctgcctg gaccggccca cttctgtcc 7440

cgcgaagctg cgggtgttacc ccaagcacca cgcctatcac cagcccaccg tgagaagcgc 7500

cgtgcccagc cccttccaga ataccctgc a gaatgtgtc ggcgcgc a ccaagcgaa 7560

ctgcaacgtg acccagatga gagaactgcc cacaatggac agcgcgtgt ttaacgtgga 7620

gtgcttcaag agatacgcc gcagcggcga gtactggag gaatacgcc a gcagcccat 7680

ccggatcacc accgagaaca tcaccacca cgtgaccaag ctgaaggccca ccaaggccgc 7740

cgcctgttc gccaagaccc acaacctgtt gcccctgcag gaagtgccta tggacaggtt 7800

caccgtggac atgaagcggg acgtgaaggt gaccctggc accaagcaca ccgaggaacg 7860

gccccaaagggtg caggtgatcc aggccgcccga gcctctggcc accgcctatc tgtgcggcat 7920

ccaccggag ctgggtgcggc ggctgaacgc cgtgtgagg cccaaacgtgc acacccttt 7980

cgacatgtcc gccgaggact tcgacgcatt catgcgcagc cacttccacc ccggcgacc 8040

agtgcgtgaa accgatatacg ccagcttgc a caagagccag gacgacagcc tggccctgac 8100

cggcctgtatg atccctggaa atctggcggt ggaccagtac ctgctggatc tgatcgaggc 8160

cgccttcggc gagatcagca gctgccacct gcctaccggc acccggttca agttcggcgc 8220

catgatgaag agcggcatgt ttctgaccct gttcatcaac acagtgcgtga atatcaccat 8280

cgcgcaggcagg gtgctggaa acggcgtgac cgacagcgcc tgcgcgcct tcatcgccga 8340

cgacaacatc gtgcacggcg tgcacgcga caagctgtatg ggcgcgcgtt ggcgcagctg 8400

ggtaacatg gaagtgaaga ttatcgacgc cgtgtatggc gaaaagcccc cctacttctg 8460

cggcggcttc atcggttgc acagcgtgac acagaccggc tgcagagtga ggcgcgcct 8520

gaagcggctg ttcaagctgg gcaaaccctt gacagccgag gacaagcagg acgaggaccg 8580

gcggaggccc ctgtccgacg aggtgtccaa gtggttccgg accggcctgg ggcgcgcgtt 8640

ggaagtggcc ctgacaagcc gtcacgaggt ggaggcgtgc aagagcatcc tgatcgctat 8700

ggccaccctg gcccggaca tcaaggcctt taagaagctg agaggccctg tcatccacct	8760
gtacggcgg a cccggctgg tgccgtgaga gctcgctgat cagcctcgac tgtgcctct	8820
agtggccagc catctgttgt ttgccccctcc cccgtgcctt ccttgaccct ggaaggtgcc	8880
actcccactg tcctttccta ataaaatgag gaaatigcat cgattgtct gagtaggtgt	8940
cattctattc tgggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat	9000
agcaggcatg ctaattaac aggcttggc gcgcgggtc tggtaagct ctatctca	9060
tgttgacag ctatcatcg ataagctta atgcggtagt ttagcacgaa ggagtcaaca	9120
tgtagaaga tctcaaacgc taggtattag aagccaacct ggcgctgcc aaacacaacc	9180
tggtcacgct cacatgggc aacgtcagcg ccgttgatcg cgagcgcggc gtcttigtga	9240
tcaaaccttc cggcgtcgat tacagcgtca tgaccgctga cgatatggtc gtggtagca	9300
tcgaaaccgg tgaagtgggtt gaaggtacga aaaagccctc ctccgacacg ccaactcacc	9360
ggctgctcta tcaggcattc ccctccatttgc gggcattgt gcatacgcac tcgcgccacg	9420
ccaccatctg ggcgcaggcg ggtcagtcga ttccagcaac cggcaccacc cacggcact	9480
atttctacgg caccattccc tgcacccgca aaatgaccga cgcagaaatc aacggcgaat	9540
atgagtggga aaccggtaac gtcatcgtag aaaccttga aaaacagggt atcgatgcag	9600
cgcaaatgcc cggcggtctg gtccattccc acggcccggt tgcatgggc aaaaatgccc	9660
aagatgcggt gcataacgcc atcgctgg aagaggctcg ttatatgggg atattctgcc	9720
gtcagtttagc gcccgagtta cggatatgc agcaaacgct gctggataaa cactatctgc	9780
gtaagcatgg cgcgaaggca tattacgggc agtaatgaca gcccgcctaa tgagcggcgt	9840
ttttttcca tgacaaaat cccttaacgt gagtttctgt tccactgagc gtcagacccc	9900
gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ctttttttc tgcgctaat ctgctgttg	9960
caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgggtgc cggatcaaga gctaccaact	10020
cttttccga aggttaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaaatactgt cttcttagtg	10080
tagccgttgt taggccacca cttcaagaac tctgttagcac cgcctacata cctcgctctg	10140
ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac	10200
tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcggcgt gaacgggggg ttcgtgca	10258