



(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

핏 바이오테크 오와이

핀란드 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, 강승욱

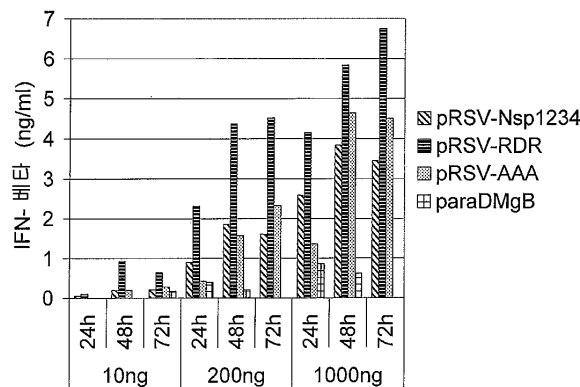
전체 청구항 수 : 총 43 항

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

(57) 요약

본 발명은 면역계 조절 보조제로서 사용하기 위한, 알파바이러스 레플리카제, 특히 쉼키 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 필요로 하는 피험체에 투여될 경우와 비교하여 면역 반응에 대한 추가 증가가 일어난다. 본 발명의 목적은 오늘날 백신과 함께 사용되는 보조제에 이점을 제공하는, 효율적이고 용이하게 투여되는, 중-독립적 보조제를 제공하는 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

투츠 우르베

에스토니아 이이-50415 타르투 아르달라 146-1

필더 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 쉼리키 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 쉼리키 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) 이중성 프로모터에 작동적으로 연결된 핵-앵커링(nuclear-anchoring) 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 썸리키 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

기술분야

[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 항상적으로 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 착수하도록 돕고; 반대로 후천성 면역 반응은 또한 선천성 면역계의 일부 모듈을 활성화시킨다.

[0003] 선천성 면역 반응

[0004] 선천성 면역는 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 펩티드를 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 분자 패턴(PAMP)을 인식하고 몇몇 세포의 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 옵소닌화, 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. 이 중에서 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-풍부 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- κ B) 및 활성화인자 단백질-1(AP-1)을 활성화시키고, 이는 모든 TLR에 공통적이며, 염증성 사이토카인 및 케모카인을 생성시키게 된다. 이들은 또한 I형 인터페론 예컨대 IFN- α 및 IFN- β 를 생성하기 위한 선결조건인, 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, Medzhitov 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 결합된 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 건네준다. 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, 이펙터 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 호염기구는 Th2 세포(인터루킨-4 및 인터루킨-5)에 의해 활성화된다. 유사하게, 결합된 항체(IgG)는 보체 단백질을 활성화시키고 병원체를 용소닌화시켜 식작용을 돕는다.

[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 대면시 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 만나기전, 다양한 수용체 레파토리를 산출하는, 체세포 재조합 과정에서 가변 및 불변 단편으로부터 어셈블리된다. 각각의 B 세포 또는 T 세포는 특이적 분자 구조(에피토프)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(CD4+ 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 펩티드 디스플레이 분자에 결합된 세포 표면 상의 단백질 항원의 펩티드 단편을 인식할 수 있다. T-헬퍼 세포는 항원성 펩티드 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 않고 남아 있을 세포내 병원체를 T 세포가 검출할 수 있게 하는데, 진핵동물 세포에서 합성되는 모든 단백질(병원체 유래 펩티드 포함) 유래의 짧은 펩티드(9-10 아미노산)가 MHC 분자의 펩티드 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 랑게한스 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 펩티드 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 펩티드를 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 불가능한 "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 계통은 번역 및 복제 둘 모두에 대한 주형으로서, 다수의 수준에서 숙주 번역 인자 및 RNA 복제 간 상호작용을 야기시킨다. 모든 공지의 양성 가닥 RNA 바이러스는 계통 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, 계통 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 수퍼패밀리와 그 이상은, 바이러스 RNA의 복제가 세포내 막의 구형 함입과 연관되어 일어난다. 예를 들어, 알파바이러스는 그들의 복제 복합체 어셈블리를 위해 엔도솜 막 및 리소솜 막을 이용한다. 이러한 막은 복제 인자가 위치하고 농축되는 표면을 제공한다. 이러한 구성은 또한 임의의 dsRNA 복제 중간체를, dsRNA-유도된 숙주 방어 반응 예컨대 RNA 간섭 또는 인터페론 유도 반응으로부터 보호되도록 돕는다(Ahlquist P et al 2003).
- [0028] 계통 구성, 비리온 형태 및 숙주 범위의 차이에도 불구하고, 양성 가닥 RNA 바이러스는 근본적으로 계통 복제에 있어 유사한 전략을 갖는다. 정의하면, 바이러스 (+)RNA 계통은 세포 mRNA와 동일한 극성을 가지며, 바이러스 계통 RNA는 세포의 번역 기구에 의해 직접적으로 번역된다. 먼저, 비구조 단백질이 전구체 폴리단백질로서 합성되고 바이러스 프로테아제에 의해 성숙한 비구조 단백질로 절단된다. 바이러스 계통의 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. 이들 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 계통 RNA를 비롯하여 서브게놈 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 서브게놈 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 이용가능한 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 괴사 인자(TNF)를 포함한 복수의 사이토카인이 바이러스 감염에 의해 유도되지만, 항바이러스성 반응의 특징은 I형 인터페론의 생성이다. I형 인터페론은 종에 따라서, 개별 무인트론 유전자에 의해 코딩되는 복수의 아형: 하나의 IFN- β 및 13-14 IFN- α 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 충족시킨다. dsRNA는 I형 IFN 합성에 필수적인 핵인자 카파 B(NF- κ 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- α , IFN- β 및 IFN- λ 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 카르복제 활성화 및 모집 도메인(CARD)를 포함하는 시토솔 단백질이다. RIG-I과 유사하게, MDA5는 RNA-헬리카제 도메인 및 2 CARD를 보유한다. 이 둘 모두는 인터페론- β 프로모터 자극인자-1(IPS-1)를 통해 신호를 전달한다. 신호 어댑터 IPS-1은 미토콘드리아 상에 위치하고 Mda5 및 RIG-I의 CARD와 동형성 상호작용을 형성하는 N-말단 CARD를 포함한다. 이는 C 말단 촉매 도메인을 활성화시키고, NF- κ 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 뎅고바이러스를 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- γ 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 β (TGF- β), 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 축적 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).

[0037] 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 이용가능한 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 픽업을 보장할 수 있다. 백신 조제물 중 전달 시스템 유형의 보조제로서 존재하는 면역 보조제의 예는 백반, 에멀션, 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 유도제 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, 뉴클레오타이드 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-1a와 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 레파토리는 HIV 1, 말라리아 및 결핵을 포함한 심각한 병원체에 대해 효과적인 백신을 생성시키는데 부적절하다(Riedmann et al. 2007; Fraser et al. 20007). 공지된 보조제의 조합물은 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, 중-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 게놈 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 국제화 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 측정된 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-RDR와 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 Elispo는 2차 면역화 후 10일후 신선하게 단리된 비장 세포에서 수행하였다. 그룹 1: GTU-MultiHIV, 그룹 2: 2차 면역화 수반한 GTU-MultiHIV+pRSV-RDR, 그룹 3: 1차 면역화 수반한 GTU-MultiHIV+pRSV-RDR, 그룹 4: 비면역화 마우스.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

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 펩티드이다. 레플리카제는 RdRp 활성을 가지고 특정 바이러스 RNA의 복제를 촉매하는 바이러스 폴리단백질 또는 폴리단백질 프로세싱 산물의 복합체이다. 이들은 통상 RNA 게놈을 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.

본원에서 언급하는 용어 "항원" 및 "목적 유전자"는 예를 들어, 발현 벡터의 형태 또는 펩티드 또는 단백질의 형태로, 이를 필요로 하는 피험체에 투여시, 직접적으로 또는 간접적으로 투여된 피험체에서 면역 반응을 일으킬 수 있는, 독립체를 포함한다. 항원이 항원성 단백질/펩티드의 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.

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 이들 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 돕는 추가 성분, 예컨대 본원에 제공한 예들의, 성분 및/또는 부형제를 포함할 수도 있다.

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 디뉴클레오타이드-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 각테일을 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 국제화 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 세포질에서 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

합하는 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 쉼리키 포레스트 바이러스(Semliki Forest Virus)이다. 본원에서, 레플리카제를 언급하는 경우, 이는 항상 레플리카제 선택권이 SFV 레플리카제를 포함한다는 것을 이해해야 한다. 일 구체예에서, 쉼리키 포레스트 바이러스의 레플리카제의 아미노산 서열은 실질적으로 서열 번호 1에 상응하고, 면역계를 조절하기 위한 보조제로 사용하기에 적합하다. 쉼리키 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 이중성 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 이펙터 분자를 생성시켜서, I형 인터페론의 발현 유도를 포함한, 대규모의, 강력한 장기 지속적 세포 항바이러스 반응이 촉발된다. 이러한 유형의 항바이러스 반응 유도는 보편적이고, 중-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. 쉼리키 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(서열번호 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. 쉼리키 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 돌연변이

이다. 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 5126-5133은 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. 쉘리키 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 돕는 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 W02005/026364에서 제공한, *araD* 유전자를 기반으로 하는 선별 시스템 등을 포함할 수 있다. W02005/026364에 개시된 바와 같은 선별 시스템은 *araD* 유전자, 바람직하게는 박테리아 *araD* 유전자, 예컨대 *이.콜라이* 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-리볼로스-5-포스페이트 4-에피머라제를 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 활성화에 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 완전히 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 징후없이 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 형질감염후 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: 파괴된 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(샘리키 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 게놈이 전달, 발현 및 복제되어서, IFN 반응이 일어났다는 것이다.
- [0083] 그러나, 종래와 달리, 본 발명은 IFN 반응 유도가 바이러스 감염 및 바이러스 게놈 복제 자체에 한정되지 않고, 바이러스 게놈, 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 남아있다는 것이다.
- [0085] 본 발명의 일부 구체예에서, 면역제를 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, 감 아카시아, 젤라틴, 전분 페이스트, 탈크, 케라틴, 콜로이드성 실리카, 우레아 등일 수 있다. 또한, 보조제, 안정화제, 증점제, 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, 현탁제, 에멀션, 정제, 알약, 펠렛, 캡슐, 액체 함유 캡슐, 분말, 서방형 제형, 좌제, 에멀션, 에어로졸, 분무제, 현탁제, 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 현탁제, 과립, 분말, 에멀션, 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르 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 참관인의 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, 전기전공과 조합된 주사("전기전공-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] 전기전공(EP)은 조직의 표적 영역에 목적 제제의 세포내 전달성을 강화시키기 위해 생체 내 전기장 적용법을 활용한다. EP 전달법은 목적 제제가 상피 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] 전기전공은 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 용량으로 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 썬키 포레스트 바이러스이다. 다른 구체예에서, 면역계를 조절하기 위한 보조제로서 사용되는 상기 레플리카제는 실질적으로 서열번호 1에 개시된 아미노산 서열에 상응한다. 썬키 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)를 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 W002090558에 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 유신을 포함할 수 있는데, 이는 몇몇 백신 각테일을 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. 이중성 프로모터에 작동적으로 연결된 핵-앵커링(anchoring) 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)를 포함하는 백신은 하기 a) 및 b)를 포함하고, 이때 상기 박터는 포유동물 세포에서 기능성이 복제 기점이 결여되어 있다:
- [0104] a) 이중성 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 박터에 핵 구획화 기능을 제공할 수 있는 단백질, 즉 박터를 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 바이러스의 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 박터는 본 출원인의 W002090558 및 문헌 [Blazevic V, et al. AIDS Res Hum Retroviruses. 2006 Jul;22(7):667-77]에 더욱 개시되어 있다. 그러나, 주목할 것은 이들 박터가 단지 본원에 개시된 바와 같은 백신 조성물을 형성하는 본 발명에 따른 보조제로서 사용하기 위한 레플리카제와 조합할 수 있는 박터의 일례라는 것이다. 백신으로서 기능하는 임의의 적절한 발현 박터를 본 발명에 따라 본원에서 보조제로서 사용하기 위한 레플리카제와 함께 제제화시켜, 백신 단독 투여보다, 이 박터를 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 박터, 바람직하게는 DNA 박터에 의해 코딩된다. 상기 백신은 또한 일부 구체예에서 발현 박터, 예컨대 DNA 박터이거나 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 박터의 적절한 양을 적절한 양의 백신과 혼합하는 단계 및 경우에 따라 약학적으로 허용되는 부형제 및/또는 성분을 추가하는 단계를 포함한다. 개별 성분에 대해 적절한 양은 숙련의가 결정할 수 있지만, 일부 바람직한 용량의 예를 본원에서도 제공한다.
- [0112] 또다른 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 보조제로 사용하기 위한 알파바이러스 레플리카제 또는 알파바이러스 레플리카제를 코딩하는 발현 박터를 포함하는 백신 조성물의 적절한 양을 이의 투여를 필요로 하는 피험체에 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 박터에 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 측면에서, 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 쉼리키 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. 이중성 토끼 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. 이중성 토끼 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]	pheIF1aHTLV-Nsp1234(서열번호 7)는 HTLV UTR이 더해진 인간 EF1a 프로모터로부터 코된 최적화된 SFV 레플리카제(서열번호 4)를 발현하는 10258 bp 플라스미드 벡터이다. 이중성 토끼 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 이중성 토끼 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 이중성 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 에 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% CO₂ 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 현탁하고 5 mM NaBes를 보충하였다. 전기 천공은 50 µg의 캐리어 DNA(연어 정자 DNA) 존재하에 0.4 mm 큐벳에서 수행하였고, 15분간 큐벳에 남겨둔 후, 성장 배

지로 세척하고, 6웰 플레이트에 파종하였다.

[0165] **인터페론- β 분석**

[0166] 형질감염 후 24h, 48h, 및 72h 후에 세포 배양 상등액을 회수하고 인터페론 - α 및 - β 키트(PBL Biomedical Laboratories)를 사용하여 후속 분석하기 전까지 -20℃에 동결시켰다. 세포 배양 상등액을 적절하게 희석하고 제조사의 설명서에 따라 효소-연결 면역흡착 분석(PBL Biomedical Laboratories)에 사용하였다.

[0167] **결과**

[0168] 인터페론- β 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) 활성화에 기인하는 것이다. RdRp 효과는, RdRp의 효소 활성이 중합효소 유닛의 활성 중심부에 GAA 돌연변이를 도입시켜 제거시 완전하게 철 회되었다(도 2). GAA 돌연변이를 포함하는 구성체로 형질감염시킨 후 세포 배양 상등액에서 측정된 인터페론 발 현 프로파일은 임의의 효소 활성을 코딩하지 않는 구성체와 유사하였다(도 1, 라인 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 돌연 변이체도 그들의 I형 인터페론 반응 유도능에 대해 분석하였지만, 실질적으로 효과가 낮았다(도 1). 본 발명자 들은 또한 레플리카제 발현 벡터 pRSV-Nsp1234(서열번호 5)를, 특정 바이러스 cis-서열 함유 주형 RNA와 레플리 카제를 발현하는 벡터 pRSV-SFV-R1uc와 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- β , 및 보다 낮은 정 도의 인터페론- α 유도를 확인할 수 있었다(도 4 및 5).

[0172] **실시예 3: 레플리카제 발현 세포의 세포질 내 dsRNA의 축적**

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

[0174] 상기 보고한 바와 같이(실시예 2), SFV 레플리카제 단독 발현은 형질감염된 세포에서 I형 인터페론 반응을 유도 시킨다. 또한, 레플리카제의 RdRp 활성은 IFN 반응에 결정적인데, RdRp 활성을 없애는 GDD>GAA 돌연변이를 보유 하는 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 목 적을 위해, 항-dsRNA 단일클론 항체 J2(Scicons, Hungary)를 이용한 IF 분석을 활용하였다. 이러한 접근법은 이 전에 + 가닥 RNA 바이러스로 감염시킨 후 세포에서 dsRNA를 검출하기 위해 사용되었다(Weber et al 2006). 간략 하게, 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 μ g의 pHEF1aHTLV-Nsp1234 또는 0.5 μ g의 pHEF1aHTLV-GAA를 이용하여 PEI-DNA 복합체를 통해 형 질감염시켰다. 결과는 분명하게, Nsp1 신호가 양쪽 배양물에서 관찰되었음을 보여주었다. 항-nsP1 염색된 구형 패턴과 함께 공동국제된 세포질 dsRNA 신호가 pHEF1aHTLV-Nsp1234로 형질감염된 세포에서는 검출되었지만 pHEF1aHTLV-Nsp1234-GAA로 형질감염된 세포에서는 검출되지 않았다.

[0178] **실험 2**

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

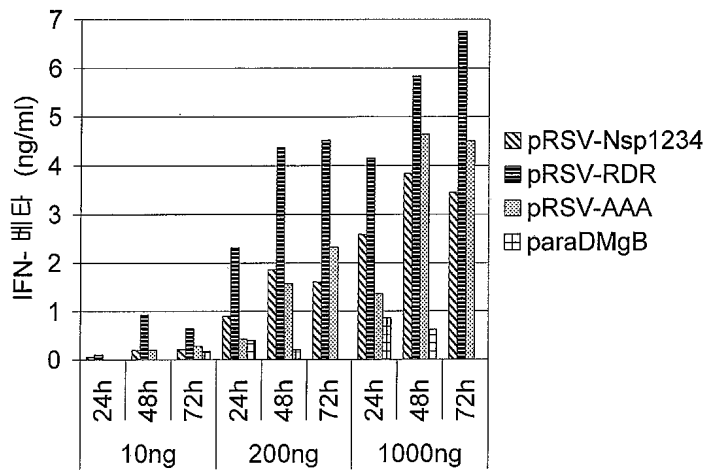
- [0180] 실험 3
- [0181] RD 세포를 0.5 또는 1 μ g의 pRSV-Nsp1234, pRSV-AAA 또는 pRSV-RDR를 사용하여 PEI-DNA 복합체를 통해 형질감염시켰다. 결과는 Nsp1 신호가 모든 배양물에서 관찰됨을 보여주었다. 항-nsP1 염색된 구형 패턴과 공동국제하는 세포질 dsRNA 신호가 pRSV-Nsp1234 또는 pRSV-RDR로 형질감염된 세포에서는 관찰되었지만 pRSV-AAA로 형질감염된 세포에서는 관찰되지 않았다.
- [0182] 결론
- [0183] 본원에서 앞서 정의한 바와 같이, nsP2 영역 내 돌연변이 RRR>RDR를 갖는 레플리카제 또는 야생형 SFV 레플리카제의 발현이, nsp1 양성 구형 패턴과 공동국제하는 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 RdRp와 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 μ g의 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 μ g의 GTU-MultiHIV 및 0.2 μ g의 보조제 플라스미드를 함께 혼합하였다. GTU-MultiHIV 벡터를 단독으로 투여받은 마우스의 경우, 1 μ g의 플라스미드 DNA를 사용하였다. 마우스를 10일 후에 희생시켰다. 새롭게 단리한 비장세포를 사용해 인터페론 γ ELISPOT 분석을 수행하였다. 세포를 자극하기 위해, Balb/c 마우스의 MHC 클래스 I 분자가 제시하는 것으로 알려진, HIV-1의 p24 단백질에서 유래된 하나의 단일 펩티드(AMQMLKETI)를 이용하였다. 다른 자극제는, DNA 백신에 의해 코딩되는 다른 성분, HIV-1의 Rev 단백질을 포함하는 중첩 펩티드의 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 μ 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 μ g의 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 μ g의 GTU-MultiHIV 및 0.2 μ g의 보조제 플라스미드를 함께 혼합하였다. GTU-MultiHIV 벡터를 단독으로 투여받은 마우스에 대해, 1 μ g의 플라스미드 DNA를 사용하였다. 마우스를 2차 면역화 후 10일 후에 희생시켰다. 새롭게 단리한 비장세포에 대해 인터페론 γ 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 펩티드(AMQMLKETI) 및 HIV-1의 Env 단백질 유래 펩티드(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.

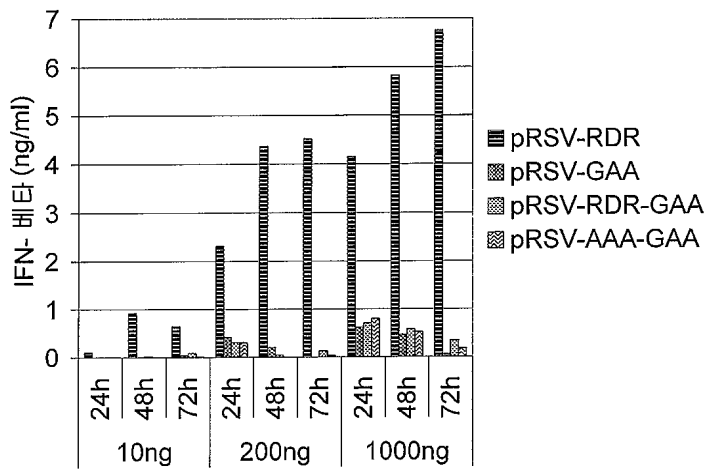
- [0193] [참조문헌]
- [0194] Nature Reviews Microbiology 6, 363-374 (May 2008) "Modification of intracellular membrane structures for virus replication" Sven Miller and Jacomine Krijnse-Locker.
- [0195] Ahlquist P et al "Host Factors in Positive-Strand RNA Virus Genome Replication" Journal of Virology Aug 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] Rikonen 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 (α/β) 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

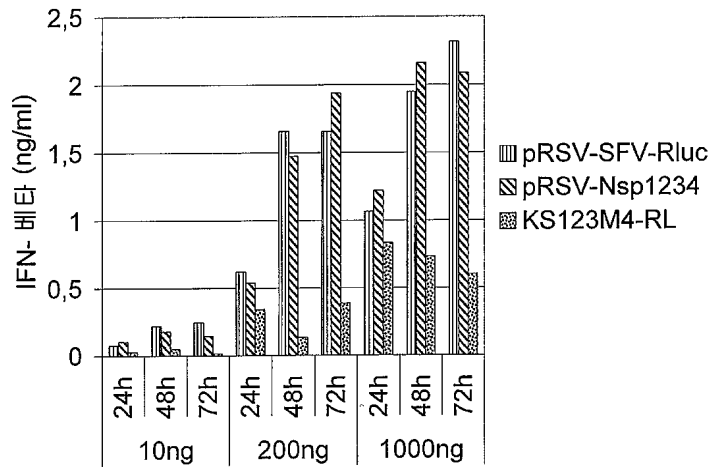
도면1



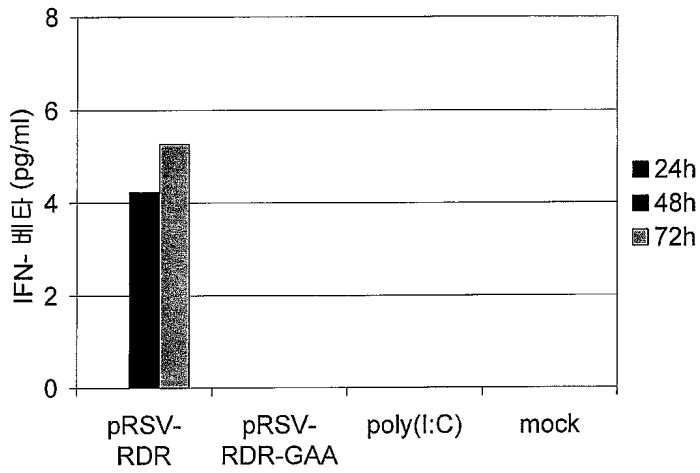
도면2



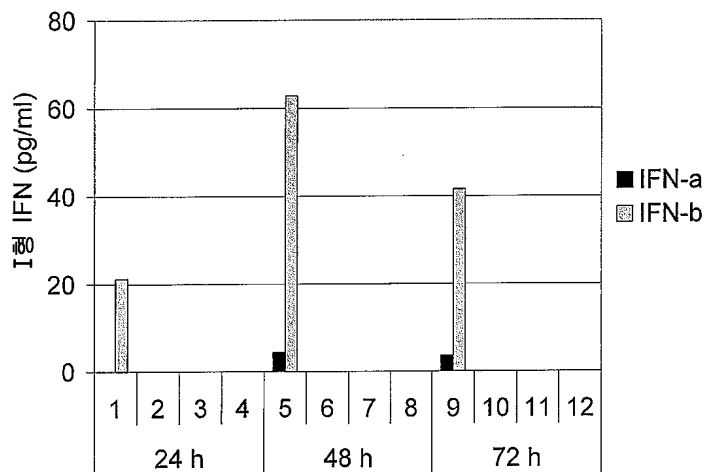
도면3



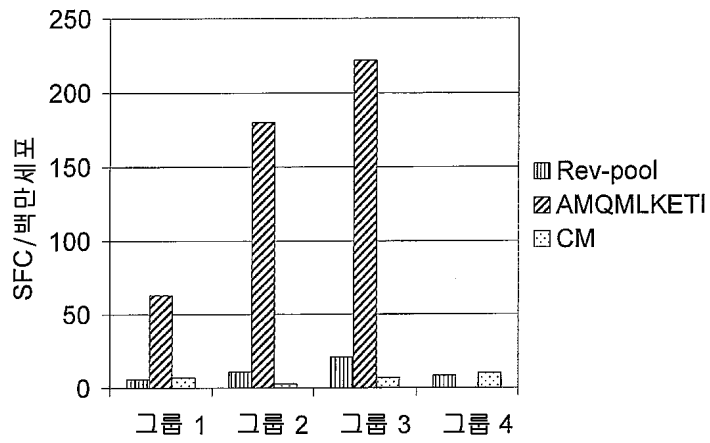
도면4



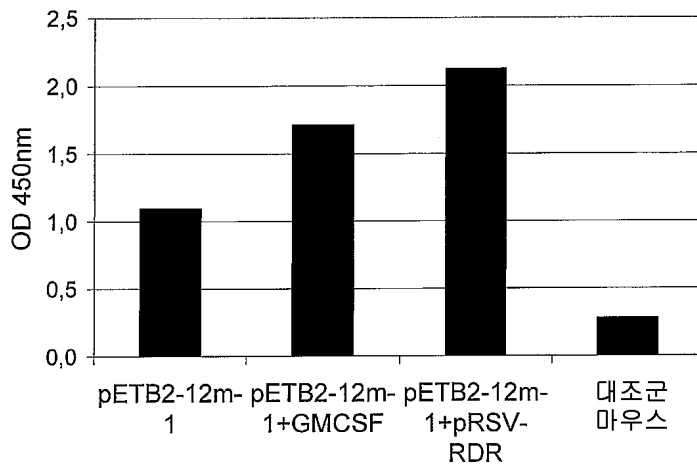
도면5



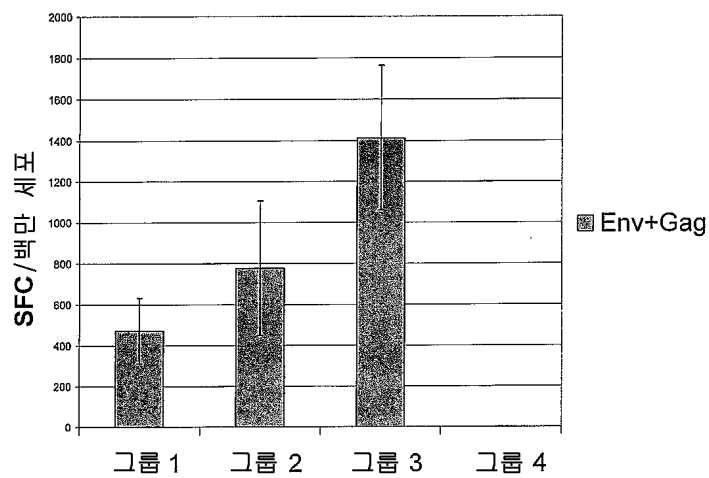
도면6



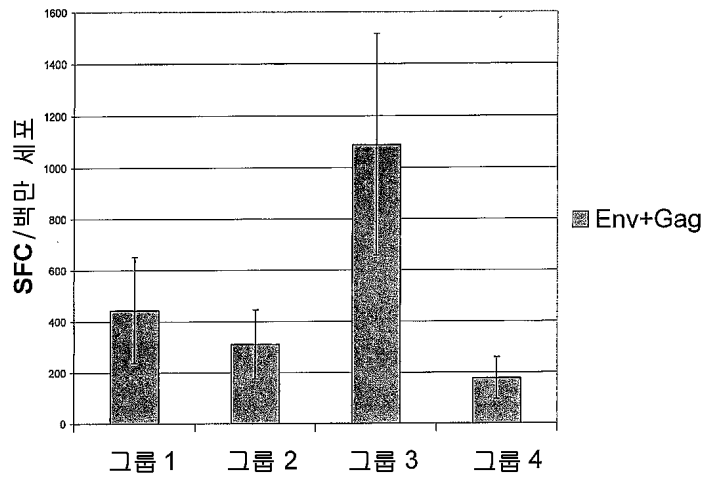
도면7



도면8



도면9



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Fit Biotech Oy

<120> Genetic Adjuvant

<130> PD53981PC00

<150> US61/071,898

<151> 2008-05-23

<160> 7

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 2432

<212> PRT

<213> Virus

<400> 1

Met Ala Ala Lys Val His Val Asp Ile Glu Ala Asp Ser Pro Phe Ile

1 5 10 15

Lys Ser Leu Gln Lys Ala Phe Pro Ser Phe Glu Val Glu Ser Leu Gln

20 25 30

Val Thr Pro Asn Asp His Ala Asn Ala Arg Ala Phe Ser His Leu Ala

35 40 45

Thr Lys Leu Ile Glu Gln Glu Thr Asp Lys Asp Thr Leu Ile Leu Asp

50 55 60

Ile Gly Ser Ala Pro Ser Arg Arg Met Met Ser Thr His Lys Tyr His
65 70 75 80
Cys Val Cys Pro Met Arg Ser Ala Glu Asp Pro Glu Arg Leu Val Cys
85 90 95

Tyr Ala Lys Lys Leu Ala Ala Ala Ser Gly Lys Val Leu Asp Arg Glu
100 105 110
Ile Ala Gly Lys Ile Thr Asp Leu Gln Thr Val Met Ala Thr Pro Asp
115 120 125
Ala Glu Ser Pro Thr Phe Cys Leu His Thr Asp Val Thr Cys Arg Thr
130 135 140
Ala Ala Glu Val Ala Val Tyr Gln Asp Val Tyr Ala Val His Ala Pro
145 150 155 160

Thr Ser Leu Tyr His Gln Ala Met Lys Gly Val Arg Thr Ala Tyr Trp
165 170 175
Ile Gly Phe Asp Thr Thr Pro Phe Met Phe Asp Ala Leu Ala Gly Ala
180 185 190
Tyr Pro Thr Tyr Ala Thr Asn Trp Ala Asp Glu Gln Val Leu Gln Ala
195 200 205
Arg Asn Ile Gly Leu Cys Ala Ala Ser Leu Thr Glu Gly Arg Leu Gly
210 215 220

Lys Leu Ser Ile Leu Arg Lys Lys Gln Leu Lys Pro Cys Asp Thr Val
225 230 235 240
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
 865 870 875 880
 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	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 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> 2

<211> 2432

<212> PRT

<213> Artificial

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

<400> 2

Met Ala Ala Lys Val His Val Asp Ile Glu Ala Asp Ser Pro Phe Ile

1 5 10 15

Lys Ser Leu Gln Lys Ala Phe Pro Ser Phe Glu Val Glu Ser Leu Gln

20 25 30

Val Thr Pro Asn Asp His Ala Asn Ala Arg Ala Phe Ser His Leu Ala

35 40 45

Thr Lys Leu Ile Glu Gln Glu Thr Asp Lys Asp Thr Leu Ile Leu Asp

50 55 60

Ile Gly Ser Ala Pro Ser Arg Arg Met Met Ser Thr His Lys Tyr His

65 70 75 80

Cys Val Cys Pro Met Arg Ser Ala Glu Asp Pro Glu Arg Leu Val Cys

85 90 95

Tyr Ala Lys Lys Leu Ala Ala Ala Ser Gly Lys Val Leu Asp Arg Glu

100 105 110

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	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

 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 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 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
 865 870 875 880
 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 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

atggccgccca aggtgcacgt ggacatcgag gccgacagcc ccttcacaa gaggcctgcag 60

aaggccttcc ccagcttcca ggtggagtcc ctgcaggtga cccccaacga ccacgccaac	120
gccagggcct tcagccacct ggccaccaag ctgacgcagc aggaaccga caaggacacc	180
ctgatcctgg acatcggcag cgcacctca aggtgagttt ggggaccctt gattgttctt	240
tccttttcgc tattgtaaaa ttcatgttat atggaggggg caaagttttc aggggtgtgt	300
ttagaatggg aagatgtccc ttgtatcact atggaccctc atgataattt tttttcttc	360
actttctact ctgttgacaa ccattgtctc ctcttatttt cttttcattt tctgtaactt	420
tttcgttaaa ctttagcttg catttgtaac gaatttttaa attcactttt gtttatttgt	480
cagattgtaa gtactttctc taatcacttt tttttcaagg caatcagggt atattatatt	540
gtacttcagc acagttttag agaacaattg ttataattaa atgataaggt agaataattc	600
tgcataataa ttctggctgg cgtggaaata ttcttattgg tagaaacaac tacaccctgg	660
tcacatcctt gcctttctct ttatggttac aatgatatac actgtttgag atgaggataa	720
aatactctga gtccaaaccg ggccctctg ctaacatgt tcatgccttc tttttttcc	780
tacaggcgga tgatgagcac ccacaagtac cactgcgtgt gcccacgcg gagcgccgag	840
gaccccgagc ggctgggtgt ctacgccaag aagctggccg ccgccagcgg caagggtctg	900
gaccgggaga tcgccggcaa gatcaccgac ctgcagaccg tgatggccac ccccgacgcc	960
gagagcccca cttctgcct gcacaccgac gtgacctgcc ggacagccgc cgagggtggcc	1020
gtgtaccagg acgtgtacgc cgtgcacgcc cccacctccc tgtaccacca ggccatgaag	1080
ggcgtgcgga ccgcctactg gatcggtctc gacaccaccc cttcatgtt cgacgcctg	1140
gccggagcct accccaccta cgccaccaac tgggccgacg agcaggtgct gcaggcccg	1200
aacatcgcc tgctgcgccg cagcctgacc gagggccggc tgggcaagct gtccatcctg	1260
cggaagaagc agctgaagcc ctgcgacacc gtgatgttca gcgtgggcag cacactgtac	1320
accgagagcc ggaagctgct gcggagctgg cacctgccca gcgtgttcca cctgaagggc	1380
aagcagagct tcacctgcag atgcgacacc atcgtgagct gcgagggcta cgtggtgaag	1440
aaaatcacca tgtgccctgg cctgtacggc aagaccgtgg gctacgccgt gacctaccac	1500
gccgagggct ttctggtgtg caagaccacc gataccgtga agggcgagag agtgagcttc	1560
cccgtctgca cctacgtgcc cagcaccatc tgcgaccaga tgaccggtat cctggccacc	1620
gatgtgaccc ccgaggacgc ccagaaactg ctggtcggcc tgaaccagcg gatcgtggtg	1680
aacggccgga ccagcgga caaccaacc atgaagaact acctgctgcc catcgtggcc	1740
gtggccttca gcaagtgggc cagagagtac aaggccgacc tggacgacga gaagcccctg	1800
ggcgtgcggg agcggagcct gacctgctgc tgcctgtggg ccttcaagac ccggaagatg	1860
cacacatgt acaagaagcc cgacaccag accatcgtga aggtgcccag cgagttaac	1920

agcttcgtga tccccagcct gtggagcacc ggccctggcca tccccgtgcg gagccggatc 1980
 aagatgctgc tggccaagaa aaccaagcgg gagctgatcc ccgtgctgga cgccagcagc 2040
 gccagggacg ccgagcagga agagaaagag cggctggaag ccgagctgac cggggaggcc 2100
 ctgccccccc tgggtgcctat cgccccctgcc gagaccggcg tggtagacgt ggatgtggag 2160

 gaactggaat accacgccgg agccgggggtg gtggagaccc ccagatccgc cctgaaggtg 2220
 acagcccagc ccaacgacgt gctgctgggc aactacgtgg tgctgtcccc ccagaccgtg 2280
 ctgaagagca gcaagctggc ccccgctgcac cctctggccg agcaggtgaa gatcatcacc 2340
 cacaacggca gggccggcag ataccaggtc gacggctacg acggccgggt gctgctgcca 2400
 tgcggctccg ccatccctgt gcccaggttc caggccctga gcgagagcgc cacaatggtg 2460
 tacaacgagc gggagttcgt gaaccggaag ctgtaccaca ttgccgtgca cggccctagc 2520
 ctgaacaccg atgaggaaaa ctacgagaaa gtgcggggccg agcggaccga tgccgagtac 2580

 gtgttcgacg tggacaagaa atgctgcgtg aagcgggagg aagccagcgg gctggtgctg 2640
 gtcggggagc tgaccaaccc ccccttccac gagtctgcct acgagggcct gaagatccgg 2700
 ccctccgccc cctacaagac cacagtgggtg ggctgttctg gcgtgcccgg cagcggcaag 2760
 agcgccatca tcaagtcctt ggtgaccaag cagcactgg tgacctccgg caagaaagag 2820
 aactgccagg aaatcgtcaa cgacgtcaag aagcaccggg gcctggacat ccaggccaag 2880
 acagtggaca gcatcctgct gaacggctgc agacgggccc tggatatcct gtacgtggac 2940
 gaggccttcg cctgccacag cggcacccctg ctggccctga tcgccctggt gaagccccgg 3000

 tccaaggtgg tgctgtgagg cgacccaag cagtgcggct tcttcaacat gatgcagctg 3060
 aaggtgaact tcaaccacaa catctgcacc gaagtgtgcc acaagagcat cagccggcgg 3120
 tgcaccagac ccgtgaccgc catcgtgtcc accctgact acggcggcaa gatgcggacc 3180
 accaaccctt gcaacaagcc catcatcatc gataccaccg gccagaccaa gccaagccc 3240
 ggcgacatcg tgctgacctg cttccgcggc tgggtgaagc agctgcagct ggactaccgg 3300
 ggccacgagg tgatgaccgc cgccgcctcc caggccctga ccagaaaggg cgtgtatgcc 3360
 gtgcggcaga aggtgaacga gaacccctg tacgccctg ccagcgagca cgtgaatgtg 3420

 ctgctgacct ggaccgagga caggctggtg tggaaaaccc tggccggcga cccctggatc 3480
 aaggtgctgt ccaacatccc ccagggaac ttaccgcca ccttgaaga gtggcaggaa 3540
 gagcacgaca agatcatgaa ggtgatcgag ggccctgccg cccagtgga cgccttcag 3600
 aacaaggcca acgtgtgctg ggccaagagc ctggtgcctg tgctggacac cgccggcatc 3660
 cggtgaccg ccgaagagtg gagcaccatc atcaccgcct tcaaagagga cggggcctac 3720
 agccccgtgg tggccctgaa cgagatctgc accaagtact acggcgtgga cctggacagc 3780

ggcctgttca gcgccccaa ggtgtccctg tactacgaga acaaccactg ggacaaccgg 3840

ccaggcggca ggaigtacgg cttcaacgcc gccaccgccg ccagactgga agcccggcac 3900

acctttctga agggccagtg gcacaccggc aagcaggccg tgatcgccga gagaaagatc 3960

cagccctgtt ccgtgctgga taacgtgatc cctatcaacc ggcggtgcc ccacgcctg 4020

gtggccgagt acaagacagt gaagggcagc cgggtggagt ggctggtaa caaagtgcgg 4080

ggctaccacg tgctgctggt gtctgagtac aacctggccc tgctcgccg gagggtgacc 4140

tggctgtccc ctctgaacgt gacaggcgcc gacagggtgt acgacctgag cctgggcctg 4200

cctgccgacg ccggcagatt cgacctggtg ttcgtgaaca tccacaccga gttcagaatc 4260

caccactacc agcagtgcgt ggaccacgcc atgaagctgc agatgctggg cggcgacgcc 4320

ctgaggctgc tgaagcctgg cggcagcctg ctgatgcggg cctacggcta cgccgacaag 4380

atctccgagg ccgtggtgtc cagcctgagc cggaagtcca gctccgccag ggtgctgaga 4440

cccactgctg tgaccagcaa cacagaagtg tttctgctgt tcagcaactt cgacaacggc 4500

aagcgcccca gcacctgca ccagatgaac accaagctgt ccgccgtgta cgccggcgag 4560

gccatgcaca ccgccgatg gcgccccagc taccgggtga agcgggccga catcgccacc 4620

tgcaccgagg ccgccgtggt gaatgccgcc aatgccaggg gcaccgtggg cgacggcgtg 4680

tgcagggccg tggccaaaa gtggcccagc gccttcaagg gcgaggccac ccctgtgggc 4740

accatcaaaa ccgtgatgtg cggcagctac cccgtgatcc acgccgtggc cccaatttc 4800

agcgccacca cagaggccga gggcgaccgg gaactggccg ccgtgtatag agccgtggc 4860

gccgaagtga acagactgag cctgagcagc gtggccatcc ctctgctgtc caccggcgtg 4920

ttcagcgcg gcagggaccg gctgcagcag agcctgaacc acctgttcac cgctatggac 4980

gccaccgacg ccgacgtgac aatctactgc cgggacaaga gctgggagaa gaagatccag 5040

gaagccatcg acatgaggac cgccgtggag ctgctgaacg acgacgtgga gctgacaacc 5100

gacctggtgc gcgtgcacc cgacagcagc ctggtgggcc ggaagggcta cagcaccacc 5160

gacggctccc tgtacagcta cttcgagggc accaagtcca accaggccgc catcgatatg 5220

gccgagatcc tgacctgtg gccaggctg caggaagcca acgagcagat ctgtctgtac 5280

gccctggcg agacaatgga caacatccg tccaagtgcc ccgtgaacga cagcgacagc 5340

agcaccccc ctcggaacct gccctgcctg tgcagatacg ccatgaccgc cgagcggatc 5400

gcccggctgc ggagccacca ggtgaagagc atggtggtgt gcagcagctt cccctgccc 5460

aagtaccacg tggatggcgt gcagaaagtg aagtgcgaga aggtgctgct gttcgacccc 5520

accgtgccta gcgtggtgtc cccccggaag tacgccgcct ccaccaccga ccacagcgac 5580
 agaagcctgc ggggcttcga cctggactgg accaccgact ccagcagcac cgccagcgac 5640
 accatgagcc tgcccagcct gcagagctgc gacatcgaca gcatctacga gcctatggcc 5700
 cccatcgtgg tgaccgccga cgtgcaccct gagccagccg gcatcgccga cctggccgcc 5760
 gatgtgcacc cagaaccgcg cgaccacgtg gatctggaaa accccatccc cctcccaga 5820
 cccaagaggg ccgcctacct ggccagcaga gccgccgaga ggcccgtgcc tgccccaga 5880
 aagccccccc cagccccag aaccgccttc aggaacaagc tgcccctgac cttcggcgac 5940

ttcgacgagc acgaggtgga cgccctggcc agcggcatca ccttcggcga ttttgatgac 6000
 gtgctcggcg tgggcagagc cggagcctat atcttcagca gcgacaccgg ctccggccac 6060
 ctgcagcaga aaagcgtgag acagcacaac ctgcagtgcg ccagctgga gccctggaa 6120
 gaggaaaaga tgtaccccc caagctggat accgagcggg aaaagctgct gctgctgaaa 6180
 atgcagatgc accccagcga ggccaacaag agccgctacc agtctaggaa ggtggagaac 6240
 atgaaggcca ccgtggtgga ccggtgacc agcggcgcca ggctgtacac aggggccgac 6300
 gtgggcagaa tccttaccta cgccgtgcgc taccacaggc ccgtgtacag cccaccgtg 6360

atcgagcggc tcagcagccc cgacgtggcc atcgccgcct gcaatgagta cctgtctagg 6420
 aactacccaa ccgtggccag ctaccagatc accgatgagt acgatgccta cctggacatg 6480
 gtggacggca gcgacagctg cctggaccgg gccaccttct gtccgcgcaa gctgcggtgc 6540
 taccccaagc accacgccta tcaccagccc accgtgagaa gcgccgtgcc cagccccttc 6600
 cagaatacc tgcagaatgt gctggccgcc gccaccaagc ggaactgcaa cgtgaccag 6660
 atgagagaac tgcccacaat ggacagcgcc gtgtttaacg tggagtgttt caagagatac 6720
 gcctgcagcg gcgagtactg ggaggaatac gccaagcagc ccatccggat caccaccgag 6780

aacatcacca cctacgtgac caagetgaag ggccccaaagg ccgccgcct gttcgccaag 6840
 acccacaacc tggtgccct gcaggaagt cctatggaca ggttcaccgt ggacatgaag 6900
 cgggacgtga aggtgacccc tggccaag cacaccagg aacggccaa ggtgcaggtg 6960
 atccaggcgg ccgagcctct ggccaccgcc tatctgtgcg gcatccaccg ggagctggtg 7020
 cggcggtga acgccgtgct gaggcccaac gtgcacacc tgttcgacat gtccgccgag 7080
 gatttcgacg ccatcatcgc cagccacttc caccggcg acccagtgt ggaaccgat 7140
 atgccagct tcgacaagag ccaggacgac agcctggccc tgaccggcct gatgatcctg 7200

gaagatctgg gcgtggacca gtacctgtg gatctgatc aggccgcctt cggcgagatc 7260
 agcagctgcc acctgcctac cggcacccgg ttcaagtct gcgccatgat gaagagcggc 7320
 atgtttctga ccctgttcat caacacagt ctgaatatca ccatcgccag cagggtgctg 7380

gaacagcggc tgaccgacag cgcctgcgcc gccttcacg gcgacgacaa catcgtgcac 7440
ggcgtgatca gcgacaagct gatggccgag cgggtgcgcca gctgggtgaa catggaagt 7500
aagattatcg acgccgtgat gggcgaaaag cccccctact tctgcggcgg cttcacgtg 7560
ttcgacagcg tgacacagac cgcctgcaga gtgagcgacc ccctgaagcg gctgttcaag 7620

ctgggcaaac ctctgacagc cgaggacaag caggacgagg accggcggag ggccctgtcc 7680
gacgagggtg ccaagtgtt ccggaccggc ctgggcgccg agctggaagt ggccctgaca 7740
agccgctacg aggtggaggg ctgcaagagc atcctgatcg ctatggccac cctggcccgg 7800
gacatcaagg cttttaagaa gctgagaggc cctgtcatcc acctgtacgg cggaccccgg 7860
ctggtgcggt ga 7872

<210> 5
<211> 10342
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Plasmid pRSV-Nsp1234
<400> 5

cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat 60

gagaaaagcgc cacgcttccc gaaggagaaa aggcggacag gtatccggtg agcggcaggg 120
tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc 180
ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc 240
ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcat cgataaaata aaagatttta tttagtctcc 300
agaaaaaggg gggaatgaaa gacccacct gtaggtttgg caagctagcg tataccctcg 360
acctgcaggt cgatcgactc tagtatgtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc 420
atagttaagc cagtatctgc tccctgcttg tgtgttgag gtcgctgagt agtgcgcgag 480

caaaatttaa gctacaacaa ggcaaggctt gaccgacaat tgcatgaaga atctgcttag 540
ggttaggcgt ttgcgctgc ttgcgatgt acgggccaga tatacgcgta tctgagggga 600
ctagggtgtg tttaggcgaa aagcggggct tcggttgtag gcggttagga gtcccctcag 660
gatatagtag tttcgctttt gcataggag ggggaaatgt agtcttatgc aatactcttg 720
tagtcttgca acatggtaac gatgagttag caacatgcct tacaaggaga gaaaaagcac 780
cgtgcatgcc gattggtgga agtaaggtgg tacgatcgtg ctttattagg aaggcaacag 840
acgggtctga catggattgg acgaaccact gaattccgca ttgcagagat attgtattta 900

agtccttagc tcgatacaat aaacgccatt tgaccattca ccacattggt gtgcacctcc 960

aagctggtag aggatcggtc gatcgactct agacgccacc atggccgcca aggtgcacgt	1020
ggacatcgag gccgacagcc ccttcatcaa gagcctgcag aaggccttcc ccagcttcga	1080
ggtggagtcc ctgcaggatga cccccaacga ccacgccaac gccagggcct tcagccacct	1140
ggccaccaag ctgatcgagc aggaaccga caaggacacc ctgatcctgg acatcggcag	1200
cgcacctca aggtgagttt ggggacctt gattgttctt tctttttcgc tattgtaaaa	1260
tcatgttat atggaggggg caaagttttc aggtgttgt ttagaatggg aagatgtccc	1320
ttgtatcact atggaccctc atgataattt tgtttctttc actttctact ctgttgacaa	1380
ccattgtctc ctcttatttt cttttcattt tctgtaactt tttcgtaaa ctttagcttg	1440
catttgaac gaatttttaa attcactttt gtttatttgt cagattgtaa gtactttctc	1500
taatcacttt ttttcaagg caatcagggt atattatatt gtacttcagc acagttttag	1560
agaacaattg ttataattaa atgataaggt agaatatttc tgcataataa ttctggctgg	1620
cgtggaaata ttcttattgg tagaaacaac tacaccctgg tcatcatcct gcctttctct	1680
ttatggttac aatgatatac actgtttgag atgaggataa aatactctga gtccaaaccg	1740
ggccctctg ctaaccatgt tcatgccttc ttttttttcc tacaggcgga tgatgagcac	1800
ccacaagtac cactgcgtgt gcccattgag gagcgccgag gaccccgagc ggctgggtgtg	1860
ctacgccaag aagctggccg ccgccagcgg caaggtgctg gaccgggaga tcgccggcaa	1920
gatcaccgac ctgcagaccg tgatggccac ccccgacgcc gagagcccca cttctgcct	1980
gcacaccgac gtgacctgcc ggacagccgc cgaggtggcc gtgtaccagg acgtgtacgc	2040
cgtgcacgcc cccacctccc tgtaccacca ggccatgaag ggctgtcgga ccgctactg	2100
gatcggcttc gacaccacc ctttcatgtt cgacgccctg gccggagcct accccaccta	2160
cgccaccaac tgggccgacg agcaggtgct gcaggcccg aacatcgcc tgtgcgccgc	2220
cagcctgacc gagggccggc tgggcaagct gtccatcctg cggaagaagc agctgaagcc	2280
ctgcgacacc gtgatgttca gcgtgggcag cacactgtac accgagagcc ggaagctgct	2340
gcggagctgg cacctgcccc gcgtgttcca cctgaagggc aagcagagct tcacctgcag	2400
atgcgacacc atcgtgagct gcgagggtta cgtggtgaag aaaatcacca tgtgccctgg	2460
cctgtacggc aagaccgtgg gctacccgt gacctaccac gccgaggct tcttggtgtg	2520
caagaccacc gataccgtga agggcgagag agtgagcttc ccgctctgca cctacgtgcc	2580
cagcaccatc tgcgaccaga tgaccggtat cctggccacc gatgtgacct ccgaggacgc	2640
ccagaaactg ctggtcgcc tgaaccagcg gatcgtggtg aacggccgga cccagcgga	2700
accaacacc atgaagaact acctgtgcc catcgtggcc gtggccttca gcaagtgggc	2760
cagagagtac aaggccgacc tggacgacga gaagccctg ggctgtcgga agcggagcct	2820

gacctgctgc tgcctgtggg ccttcaagac ccggaagatg cacaccatgt acaagaagcc 2880
cgacacccag accatcgtga aggtgcccag cgagttcaac agcttcgtga tccccagcct 2940
gtggagcacc ggcctggcca tccccgtgcg gagccgcatc aagatgctgc tggccaagaa 3000

aaccaagcgg gagctgatcc ccgtgctgga cgccagcagc gccagggacg ccgagcagga 3060
agagaaagag cggttggaag ccgagctgac ccgggaggcc ctgccccccc tgggtgcctat 3120
cgccccctgcc gagaccggcg tgggtggacgt ggatgtggag gaactggaat accacgccgg 3180
agccgggggtg gtggagaccc ccagatccgc cctgaagggtg acagcccagc ccaacgacgt 3240
gctgctgggc aactacgtgg tctgttcccc ccagaccgtg ctgaagagca gcaagctggc 3300
ccccgtgcac cctctggccg agcaggtgaa gatcatcacc cacaacggca gggccggcag 3360
ataccaggtc gacggctacg acggccgggt gctgctgcca tgcggctccg ccatccctgt 3420

gcccagagttc caggccctga gcgagagcgc cacaatggtg tacaacgagc gggagttcgt 3480
gaaccggaag ctgtaccaca ttgccgtgca cggccctagc ctgaacaccg atgaggaaaa 3540
ctacgagaaa gtgcggggccg agcggaccga tgcaggtac gtgttcgacg tggacaagaa 3600
atgctgcgtg aagcgggagg aagccagcgg gctggtgctg gtcggggagc tgaccaaccc 3660
cccttccac gagtctgcct acgagggcct gaagatccgg ccctccgcc cctacaagac 3720
cacagtgggtg ggcgtgttcg gcgtgcccgg cagcggcaag agcgccatca tcaagtcct 3780
ggtgaccaag cagacctgg tgacctccg caagaaagag aactgccagg aaatcgtcaa 3840

cgacgtcaag aagcaccggg gcctggacat ccaggccaag acagtggaca gcatcctgct 3900
gaacggctgc agacggggccg tggatatact gtacgtggac gaggccttcg cctgccacag 3960
cggcaccctg ctggccctga tcgccctggt gaagcccccg tccaaggtgg tgctgtgcgg 4020
cgacccaag cagtgcggct tcttcaacat gatgcagctg aaggtgaact tcaaccacaa 4080
catctgcacc gaagtgtgcc acaagagcat cagccggcgg tgcaccagac ccgtgaccgc 4140
catcgtgtcc acctgcact acggcggcaa gatcgggacc accaaccct gcaacaagcc 4200
catcatcacc gataccaccg gccagaccaa gcccaagccc ggcgacatcg tgctgacctg 4260

cttcccgggc tgggtgaagc agctgcagct ggactaccgg ggccacgagg tgatgaccgc 4320
cgccgcctcc cagggcctga ccagaaaggg cgtgtatgcc gtgcggcaga aggtgaacga 4380
gaacccctg tacgccctg ccagcgagca cgtgaatgtg ctgctgaccc ggaccgagga 4440
caggctgggtg tggaiaaccc tggccggcga ccctggatc aaggtgctgt ccaacatccc 4500
ccagggcaac ttcaccgcca ccctggaaga gtggcaggaa gagcacgaca agatcatgaa 4560
ggtgatcgag ggcctgccc cccagtgga cgccttcag aacaaggcca acgtgtgctg 4620

ggccaagagc ctggtgcctg tgctggacac cgccggcatc cggctgaccg ccgaagagt 4680

gagcaccatc atcaccgcct tcaaagagga cgggcctac agccccgtgg tggccctgaa 4740

cgagatctgc accaagtact acggcgtgga cctggacagc ggctgttca gcgccccaa 4800

ggtgtccctg tactacgaga acaaccactg ggacaaccgg ccaggcggca ggatgtacgg 4860

cttcaacgcc gccaccgccg ccagactgga agcccgccac acctttctga agggccagt 4920

gcacaccggc aagcaggccg tgatcgccga gagaaagatc cagcccctgt ccgtgctgga 4980

taacgtgatc cctatcaacc ggcggctgcc ccacgccctg gtggccgagt acaagacagt 5040

gaagggcagc cgggtggagt ggctggtgaa caaagtgcgg ggctaccacg tgctgctggt 5100

gtctgagtac aacctggccc tgcctcggcg gagggtgacc tggctgtccc ctctgaacgt 5160

gacaggcgcc gacagggtgt acgacctgag cctgggcctg cctgccgacg ccggcagatt 5220

cgacctggtg ttctgtaaca tccacaccga gttcagaatc caccactacc agcagtgcgt 5280

ggaccacgcc atgaagtgc agatgctggg cggcgacgcc ctgaggctgc tgaagcctgg 5340

cggcagcctg ctgatgcggg cctacggcta cgccgacaag atctccagg ccgtggtgtc 5400

cagcctgagc cggaagtta gctccgccag ggtgctgaga cccgactgcg tgaccagcaa 5460

cacagaagtg tttctgctgt tcagcaactt cgacaacggc aagcggccca gcacctgca 5520

ccagatgaac accaagctgt ccgccgtgta cgccggcgag gccatgcaca ccgccgatg 5580

cgccccagc taccgggtga agcgggccga catcgccacc tgcaccgagg ccgccgtggt 5640

gaatccgcc aatgccaggg gcacctggg cgacggcgtg tgcagggccg tggccaaaaa 5700

gtggcccagc gccttcaagg gcgaggccac cctgtgggc accatcaaaa ccgtgatgtg 5760

cggcagctac cccgtgatcc acgccgtggc cccaatttc agcgccacca cagaggccga 5820

ggcgaccgg gaactggccg ccgtgtatag agccgtggcc gccgaagtga acagactgag 5880

cctgagcagc gtggccatcc ctctgctgtc caccggcgtg ttcagcgcg gcagggaccg 5940

gctgcagcag agcctgaacc acctgttac cgctatggac gccaccgacg ccgacgtgac 6000

aatctactgc cgggacaaga gctgggagaa gaagatccag gaagccatcg acataggac 6060

cgccgtggag ctgctgaacg acgacgtgga gctgacaacc gacctggtgc gcgtgcaccc 6120

cgacagcagc ctggtgggcc ggaagggcta cagcaccacc gacggctccc tgtacagcta 6180

cttcagggg accaagtta accaggccgc catcgatatg gccgagatcc tgacctgtg 6240

gcccaggctg caggaagcca acgagcagat ctgtctgtac gccctggcg agacaatgga 6300

caacatccgg tccaagtgcc ccgtgaacga cagcgacagc agcaccctcc ctcggaccgt 6360

gccctgcctg tgcagatacg ccatgaccgc cgagcggatc gcccggctgc ggagccacca 6420
 ggtgaagagc atggtgggtg gcagcagctt cccctgccc aagtaccacg tggatggcgt 6480
 gcagaaagtg aagtgcgaga aggtgctgct gttcgacccc accgtgccta gcgtggtgtc 6540
 cccccggaag tacgccgcct ccaccaccga ccacagcgac agaagcctgc ggggcttcga 6600
 cctggactgg accaccgact ccagcagcac cgccagcgac accatgagcc tgcccagcct 6660
 gcagagctgc gacatcgaca gcatctacga gcctatggcc cccatcgtgg tgaccgccga 6720
 cgtgcaccct gagccagccg gcatcgccga cctggccgcc gatgtgcacc cagaaccgcg 6780

 cgaccacgtg gatctggaag accccatccc cctcccaga cccaagaggg ccgcctacct 6840
 ggccagcaga gccgcccaga ggcccgtgcc tgccccaga aagcccaccc cagccccag 6900
 aaccgccttc aggaacaagc tgcccctgac ctccggcgac ttcgacgagc acgaggtgga 6960
 cgccctggcc agcggcatca ccttcggcga tttgatgac gtgctgcggc tgggcagagc 7020
 cggagcctat atcttcagca gcgacaccgg ctccggccac ctgcagcaga aaagcgtgag 7080
 acagcacaac ctgcagtgcg ccagctgga cgccgtgga gagaaaaga tgtaccccc 7140
 caagctggat accgagcggg aaaagctgct gctgctgaaa atgcagatgc accccagcga 7200

 ggccaacaag agccgctacc agtctaggaa ggtggagaac atgaaggcca ccgtggtgga 7260
 ccggctgacc agcggcgcca ggctgtacac aggggcccgc gtgggcagaa tccctaccta 7320
 cgccgtgcgc taccacagc ccgtgtacag cccacccgtg atcgagcggg tcagcagccc 7380
 cgacgtggcc atcgccgct gcaatgagta cctgtctagg aactaccaa ccgtggccag 7440
 ctaccagatc accgatgagt acgatgccta cctggacatg gtggacggca gcgacagctg 7500
 cctggaccgg gccaccttct gtcccgcga gctgcgggtc taccacaagc accacgccta 7560
 tcaccagccc accgtgagaa gcgccgtgcc cagccccttc cagaataccc tgcagaatgt 7620

 gctggccgcc gccaccaagc ggaactgcaa cgtgaccag atgagagaac tgcccacaat 7680
 ggacagcgcc gtgtttaacg tggagtgtt caagagatac gcctgcagcg gcgagtactg 7740
 ggaggaatac gccaaagcgc ccatccgat caccaccgag aacatcacca cctacgtgac 7800
 caagctgaag ggccccaaag ccgccgcct gttcgccaag acccacaacc tggtgccct 7860
 gcaggaagtg cctatggaca ggttcaccgt ggacatgaag cgggacgtga aggtgacccc 7920
 tggcaccaag cacaccgagg aacggcccaa ggtgcaggtg atccaggccg ccgagcctct 7980
 ggccaccgcc tatctgtgcg gcatccaccg ggagctggtg cgccggctga acgccgtgct 8040

 gagggccaaac gtgcacaccc tgttcgacat gtccgccgag gacttcgacg ccatcatcgc 8100
 cagccacttc caccceggcg acccagtgtt ggaaccgat atcgccagct tcgacaagag 8160
 ccaggacgac agcctggccc tgaccggcct gatgatcctg gaagatctgg gcgtggacca 8220

gtacctgctg gatctgatcg aggccgcctt cggcgagatc agcagctgcc acctgcctac 8280
cggcaccggt ttcaagtctg gcgcatgat gaagagcggc atgtttctga cctgttcat 8340
caacacagtg ctgaatatca ccatgccag cagggtgctg gaacagcggc tgaccgacag 8400
cgctgcgc gccttcatcg gcgacgacaa catcgtgcac ggctgatca gcgacaagct 8460

gatggccgag cggcgcgcca gctgggtgaa catggaagt aagattatcg acgccgtgat 8520
gggcgaaaag cccccctact tctgcggcgg cttcatcgtg ttcgacagcg tgacacagac 8580
cgcctgcaga gtgagcgacc ccctgaagcg gctgttcaag ctgggcaaac ctctgacagc 8640
cgaggacaag caggacgagg accggcggag ggccctgtcc gacgaggtgt ccaagtgggt 8700
ccggaccggc ctgggcgcgg agctggaagt ggccctgaca agccgctacg aggtggaggg 8760
ctgcaagagc atcctgatcg ctatggccac cctggcccgg gacatcaagg cctttaagaa 8820
gctgagaggc cctgtcatcc acctgtacgg cggaccccgg ctggtgcggt gagagctcgc 8880

tgatcagcct cgactgtgcc ttctagtgc cagccatctg ttgtttgcc cccccctg 8940
ccttccttga ccttgaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt 9000
gcatcgatt gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtggggtggg gcaggacagc 9060
aagggggagg attgggaaga caatagcagg catgcttaat taacaggcct tggcgcgccg 9120
ggtctgggta agctctagtt ctcatgtttg acagcttacc atcgataagc tttaatgcgg 9180
tagtttagca cgaaggagtc aacatgttag aagatctcaa acgctaggta ttagaagcca 9240
acctggcgct gccaaaacac aacctggtca cgctcacatg gggcaacgtc agcgccgttg 9300

atcgcgagcg cggcgtcttt gtgatcaaac cttccggcgt cgattacagc gtcattgaccg 9360
ctgacgatat ggctgtggtt agcatcgaaa ccggtgaagt ggttgaagg acgaaaaagc 9420
cctcctcga cagccaact caccggctgc tctatcaggc attccctcc attggcggca 9480
ttgtgcatac gcactcgcgc cagccacca tctgggcgca ggccgggtcag tcgattccag 9540
caaccggcac caccacgcc gactatttct acggcaccat tccctgcacc cgcaaatga 9600
ccgacgcaga aatcaacggc gaatatgagt gggaaaccgg taacgtcacc gtagaaacct 9660
ttgaaaaaca ggttatcgat gcagcgcaaa tgcccggcgt tctggtccat tcccacggcc 9720

cgtttgcatt gggcaaaaat gccgaagatg cggcgcataa cgccatcgtg ctggaagagg 9780
tcgtttatat ggggatattc tgccgtcagt tagcgccgca gttaccggat atgcagcaaa 9840
cgctgctgga taaacactat ctgcgtaagc atggcgcgaa ggcatattac gggcagtaat 9900
gacagcccgc ctaatgagcg ggcttttttt tccatgacca aaatccctta acgtgagttt 9960
tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt 10020
tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaaa aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt 10080

ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgag 10140

ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta 10200

gcaccgccta catacctcgc tctgctaata ctgttaccag tggtctgtgc cagtggcgat 10260

aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggtcg 10320

ggctgaacgg ggggttcgtg ca 10342

<210> 6

<211> 10248

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Plasmid pheIF4A1-Nsp1234

<400> 6

cacagcccag ctiggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat 60

gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa aggcggacag gtatccgta agcggcaggg 120

tcggaacagg agagcgacag agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat ctttatagtc 180

ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgtcgc tcaggggggc 240

ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgat cgataaaata aaagatttta tttagtctcc 300

agaaaaaggg gggaatgaaa gacccacct gtaggtttgg caagctagcg tatacggatc 360

ctctagctag atgatttctt tcatccctgg cacacgtcca ggagtgctgc aatccatctc 420

tgctacaggg gaaaacaaat aacatttgag tccagtggag accgggagca gaagtaaagg 480

gaagtataa cccccagagc ccggaagcct ctggaggctg agacctcgcc ccccttgcgt 540

gataggcct acggagccac atgaccaagg cactgtcgcc tccgcacgtg tgagagtga 600

gggcccacag atggctgcca ggctcgagg cctgactctt ctatgtcact tccgtaccgg 660

cgagaaaggc gggccctcca gccaatgagg ctgcggggcg ggcccttacc ttgataggca 720

ctcgagttat ccaatggctc ctgcggggcg gagcgactag gaactaacgt catgccgagt 780

tgctgagcgc cggcaggcgg ggccggggcg gccaaacaa tgcgatggcc ggggcggagt 840

cgggcgctct ataagttgtc gataggcggg cactccgcc tagtttctaa ggaaccggtc 900

gccaccatgg ccgccaaggt gcacgtggac atcgaggccg acagcccctt catcaagagc 960

ctgcagaagg ccttccccag cttcgaggig gactccctgc aggtgacccc caacgaccac 1020

gccaacgcca gggccttcag ccacctggcc accaagctga tcgagcagga aaccgacaag 1080

gacacctga tcttgacat cggcagcgcc cctcaaggt gagtttgggg acccttgatt 1140

gttctttctt tttcgctatt gtaaaattca tgttatatgg agggggcaaa gttttcaggg 1200

tggtgttttag aatgggaaga tgtcccttgt atcactatgg accctcatga taattttgtt	1260
tcttttcaatt tctactctgt tgacaacat tgctctctct tatittcttt tcattttctg	1320
taactttttc gttaaacttt agcttgcat tgtaacgaat ttttaaatc acttttgttt	1380
atttgcaga ttgtaaglac tttctcta atcactttttt tcaaggcaat cagggtatat	1440
tatatgtac ttcagcacag ttttagagaa caattgttat aattaaatga taaggtagaa	1500
tattttctgca tataaattct ggctggcgtg gaaatatctt tattggtaga aacaactaca	1560
ccctggatcat catcctgcct ttctctttat ggttacaatg atatacactg ttgagatga	1620
ggataaaata ctctgagtc aaaccgggcc cctctgctaa ccatgttcat gccttcttct	1680
ttttctaca ggcggtgat gagcaccac aagtaccact gcgtgtgcc catgcggagc	1740
gccgaggacc ccgagcggt ggtgtgtac gccagaagc tggccgccgc cagcggaag	1800
gtgctggacc gggagatgc cggaagatc accgacctgc agaccgtgat ggccacccc	1860
gacgccgaga gcccacatt ctgcctgcac accgacgtga cctgccggac agccgccgag	1920
gtggccgtgt accaggacgt gtacgccgtg cagccccca cctccctgta ccaccaggcc	1980
atgaaggcg tgcggaccgc ctactggatc ggcttcgaca ccacccctt catgttcgac	2040
gccctggccg gagcctacc cacctacgcc accaactggg ccgacgagca ggtgtctcag	2100
gcccgaaca tcggcctgtg cgccgccagc ctgaccgagg gccggctggg caagctgtcc	2160
atcctgcgga agaagcagct gaagccctgc gacaccgtga tgttcagct gggcagcaca	2220
ctgtacaccg agagccgga gctgtgtcgg agctggcacc tgcccagct gtccacctg	2280
aagggaagc agagcttcac ctgcagatgc gacaccatcg tgagctgca gggctacgtg	2340
gtgaagaaaa tcacatgtg ccctggcctg tacggcaaga ccgtgggcta cgccgtgacc	2400
taccacgcc agggctttct ggtgtgcaag accaccgata ccgtgaagg cgagagagt	2460
agcttccccg tctgcacctg cgtgcccagc accatctgcg accagatgac cggatctctg	2520
gccaccgatg tgacccccga ggacgccag aaactgctgg tcggcctgaa ccagcgatc	2580
gtggtgaacg gccggacca gcggaacacc aacacatga agaactacct gctgcccac	2640
gtggccgtgg ccttcagaa gtgggccaga gactacaagg ccgacctgga cgacgagaag	2700
cccctggcg tgcgggagcg gagcctgacc tgctgtgcc tgtggcctt caagaccgg	2760
aagatgcaca ccatgtaca gaagcccgac acccagacca tcgtgaaggt gccacggag	2820
ttcaacagct tcgtgatccc cagcctgtgg agcaccggcc tggccatccc cgtgcggagc	2880
cggatcaaga tgctgtggc caagaaaacc aagcgggagc tgatccccgt gctggacgcc	2940
agcagcgcca gggacgccga gcaggaagag aaagagcggc tgggaagcca gctgaccgg	3000

gaggccctgc cccccctggt gcctatcgcc cctgccgaga ccggcgtggt ggacgtggat 3060

gtggaggaac tggaatacca cgccggagcc ggggtggtgg agacccccag atccgccctg 3120

aaggtgacag ccagcccaa cgacgtgctg ctgggcaact acgtggtgct gtccccccag 3180

accgtgctga agagcagcaa gctggcccc gtgcaccctc tggccgagca ggtgaagatc 3240

atcaccaca acggcagggc cggcagatac caggtcgacg gctacgacgg ccgggtgctg 3300

ctgcatgcg gtcgcccat ccctgtgcc gagttccagg ccctgagcga gagcgccaca 3360

atggtgtaca acgagcggga gtctgtgaac cggaaagtgt accacattgc cgtgcacggc 3420

cctagcctga acaccgatga ggaaaactac gagaaagtgc gggccgagcg gaccgatgcc 3480

gagtacgtgt tcgacgtgga caagaaatgc tgcgtgaagc gggaggaagc cagcgggctg 3540

gtgctggtcg gggagctgac caaccccc ttccacgagt tcgcctacga gggcctgaag 3600

atccggccct ccgcccta caagaccaca gtggtgggcg tgttcggcgt gcccggcagc 3660

ggcaagagcg ccatcatcaa gtccctggtg accaagcacg acctggtgac ctccggcaag 3720

aaagagaact gccaggaaat cgtcaacgac gtcaagaagc accggggcct ggacatccag 3780

gccaagacag tggacagcat cctgtgaac ggtgcagac gggccgtgga tatcctgtac 3840

gtggacgagg ctttcgctg ccacagcggc accctgctgg ccctgatcgc cctggtgaag 3900

ccccgtcca agtggtgct gtgcggcgac cccaagcagt gcggttctt caacatgatg 3960

cagctgaagg tgaacttcaa ccacaacatc tgcaccgaag tgtgccaca gagcatcagc 4020

cggcggtgca ccagaccgt gaccgccatc gtgtccacc tgcactacgg cggcaagatg 4080

cggaccacca acccctgcaa caagccatc atcatcgata ccaccggcca gaccaagccc 4140

aagcccggcg acatcgtgct gacctgttc cgcggctggg tgaagcagct gcagctggac 4200

taccggggcc acgaggtgat gaccgccgc gcctcccagg gcctgaccag aaaggcgtg 4260

tatgcctgc ggcagaaggt gaacgagaac ccctgtacg ccctgccag cgagcacgtg 4320

aatgtgctgc tgaccggac cgaggacagg ctggtgtgga aaacctggc cggcgacccc 4380

tggtatcaagg tctgtccaa cateccccag ggcaacttca ccgccacct ggaagagtgg 4440

caggaagagc acgacaagat catgaagggt atcgagggcc ctgccgccc agtggacgcc 4500

ttccagaaca aggccaacgt gtgctgggcc aagagcctgg tgctgtgct ggacaccgcc 4560

ggcatccggc tgaccggcga agagtggagc accatcatca ccgcttcaa agaggaccgg 4620

gcctacagcc ccgtggtggc cctgaacgag atctgcacca agtactacgg cgtggacctg 4680

gacagcggcc tgttcagcg cccaaggtg tcctgtact acgagaaca cactgggac 4740

aaccggccag gcggcaggat gtacggcttc aacgcccca ccgccgccag actggaagcc	4800
cggcacacct ttctgaaggc ccagtggcac accggcaagc aggccgtgat cgccgagaga	4860
aagatccagc cctgtccgt gctggataac gtgatcccta tcaaccggcg gctgccccac	4920
gccctggtgg ccgagtacaa gacagtgaag ggcagccggg tggagtggct ggtgaacaaa	4980
gtgcggggct accacgtgct gctggtgtct gagtacaacc tggccctgcc tcggcgagg	5040
gtgacctggc tgtccctct gaacgtgaca ggcgccgaca ggtgtacga cctgagcctg	5100
ggcctgcctg ccgacgccgg cagattcgac ctggtgttcg tgaacatcca caccgagttc	5160
agaatccacc actaccagca gtgcgtggac cacgcatga agctgcagat gctgggcggc	5220
gacgccctga ggctgctgaa gcctggcggc agcctgctga tgcgggcta cggtacgcc	5280
gacaagatct ccgaggccgt ggtgtccagc ctgagccgga agttcagctc cgccagggtg	5340
ctgagacccg actgcgtgac cagcaacaca gaagtgttc tgcgttcag caacttcgac	5400
aacggcaagc ggcccagcac cctgcaccag atgaacacca agctgtccgc cgtgtacgcc	5460
ggcgaggcca tgcacaccgc cggatgcgcc ccagctacc gggagaagcg ggcgacatc	5520
gccacctgca ccgaggccgc cgtggtgaat gccgccaatg ccaggggcac cgtgggcgac	5580
ggcgtgtgca gggccgtggc caaaaagtgg ccagcgcct tcaaggcgga ggccaccct	5640
gtgggcacca tcaaaaccgt gatgtgcggc agctaccccg tgatccacgc cgtggcccc	5700
aatttcagcg ccaccacaga ggccgagggc gaccgggaac tggccgccgt gtatagagcc	5760
gtggccgccg aagtgaacag actgagcctg agcagcgtgg ccatccctct gctgtccacc	5820
ggcgtgttca gcggcggcag ggaccggctg cagcagagcc tgaaccacct gttaccgct	5880
atggacgcca ccgacgccga cgtgacaatc tactgccggg acaagagctg ggagaagaag	5940
atccaggaag ccatcgacat gaggaccgcc gtggagctgc tgaacgacga cgtggagctg	6000
acaaccgacc tgggtgcgct gcaccccgac agcagcctgg tgggccggaa gggctacagc	6060
accaccgacg gctccctgta cagctacttc gagggcacca agttcaacca ggccgcatc	6120
gatatggccg agatcctgac cctgtggccc aggtgcagg aagccaacga gcagatctgt	6180
ctgtacgcc tgggcgagac aatggacaac atccggtcca agtccccgt gaacgacagc	6240
gacagcagca cccccctcg gaccgtgcc tgctgtgca gatacggcat gaccgcccag	6300
cggatcgccc ggtgcggag ccaccagtg aagagcatgg tgggtgacg cagcttcccc	6360
ctgccaagt accacgtgga tggcgtgac aaagtgaagt gcgagaaggt gctgctgttc	6420
gacccaccg tgcctagcgt ggtgtcccc cggaagtac ccgcctccac caccgaccac	6480
agcgacagaa gcctgcgggg ctctgacctg gactggacca ccgactccag cagcaccgcc	6540
agcgacacca tgagcctgcc cagcctgcag agctgcgaca tcgacagcat ctacgacct	6600

atggccccc tctgtgtgac cgccgacgtg caccctgagc cagccggcat cgccgacctg 6660
 gccgccgatg tgcaccaga acccgccgac cacgtggatc tggaaaacc catccccct 6720
 cccagaccca agagggccgc ctacctggcc agcagagccg ccgagaggcc cgtgcctgcc 6780
 cccagaaaag ccaccccage cccagaacc gccttcagga acaagctgcc cctgaccttc 6840

ggcgacttcg acgagcacga ggtggacgcc ctggccagcg gcatcacctt cggcgatit 6900
 gatgacgtgc tgcggctggg cagagccgga gcctatatct tcagcagcga caccggctcc 6960
 ggccacctgc agcagaaaag cgtgagacag cacaacctgc agtgcgcca gctggacgcc 7020
 gtggaagagg aaaagatgta ccccccaag ctggataccg agcgggaaaa gctgctgctg 7080
 ctgaaaatgc agatgcacc cagcagggcc aacaagagcc gctaccagtc taggaaggtg 7140
 gagaacatga aggccaccgt ggtggaccgg ctgaccagcg gcgccaggct gtacacaggg 7200
 gccgacgtgg gcagaatccc tacctacgcc gtgcgctacc ccaggcccgt gtacagcccc 7260

accgtgatcg agcgggttcag cagccccgac gtggccatcg ccgctgcaa tgagtacctg 7320
 tctaggaact acccaaccgt ggccagctac cagatcaccg atgagtacga tgcctacctg 7380
 gacatggtgg acggcagcga cagctgcctg gaccgggcca ccttctgtcc cgccaagctg 7440
 cggtgtctacc ccaagcacca cgcctatcac cagcccaccg tgagaagcgc cgtgcccagc 7500
 cccttcaga atacctgca gaatgtgtg gccgccgcca ccaagcggaa ctgcaacctg 7560
 accagatga gagaactgcc cacaatggac agcgccgtgt ttaacgtgga gtgcttcaag 7620
 agatacgct gcagcggcga gtactgggag gaatacgcca agcagcccat ccggatcacc 7680

accgagaaca tcaccaccta cgtgaccaag ctgaagggcc ccaaggccgc cgccctgttc 7740
 gccagagccc acaacctggt gccctgcag gaagtgccta tggacaggtt caccgtggac 7800
 atgaagcggg acgtgaaggt gaccttggc accaagcaca ccgaggaacg gcccaaggtg 7860
 caggtgatcc aggccgcga gcctctggcc accgcctatc tgtgcggcat ccaccgggag 7920
 ctggtgcggc ggctgaacgc cgtgtgagg cccaacgtgc acacctgtt cgacatgtcc 7980
 gccgaggact tcgacccat catcgccagc cacttcacc ccggcgaccc agtgcctgaa 8040
 accgatatcg ccagcttga caagagccag gacgacagcc tggccctgac cggcctgatg 8100

atcctggaag atctgggct ggaccagtac ctgctggatc tgatcgagc cgccttcggc 8160
 gagatcagca gctgccacct gcctaccggc acccggttca agttcggcgc catgatgaag 8220
 agcggcatgt ttctgacct gttcatcaac acagtgtga atatcacat cgccagcagg 8280
 gtgctggaac agcggctgac cgacagcgcc tgcgccgct tcatcggcga cgacaacatc 8340
 gtgcacggcg tgatcagcga caagctgatg gccgagcggc gcgccagctg ggtgaacatg 8400
 gaagtgaaga ttatcgacgc cgtgatgggc gaaaagcccc cctacttctg cggcggcttc 8460

atcgtgttcg acagcgtgac acagaccgcc tgcagagtga gcgacccct gaagcggctg 8520

ttcaagctgg gcaaacctct gacagccgag gacaagcagg acgaggaccg gcggagggcc 8580

ctgtccgacg aggtgtccaa gtggttccgg accggcctgg gcgccgagct ggaagtggcc 8640

ctgacaagcc gctacgaggt ggagggtgc aagagcatcc tgatcgctat ggccaccctg 8700

gccccgggaca tcaaggcctt taagaagctg agaggccctg tcatccacct gtacggcgga 8760

ccccggctgg tgcggtgaga gctcgtgat cagcctcgac tgtgccttct agttgccagc 8820

catctgttgt ttccccctcc cccgtgcctt ccttgaccct ggaagggtgcc actcccactg 8880

tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct gtagtagtgt cattctattc 8940

tggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg 9000

cttaattaac aggccttggc gcgccgggtc tgggtaagct ctagttctca tgtttgacag 9060

cttatcatcg ataagcttta atgcggtagt ttagcacgaa ggagtcaaca tgttagaaga 9120

tctcaaacgc taggtattag aagccaacct ggcgctgcca aaacacaacc tggtcacgct 9180

cacatggggc aacgtcagcg ccgttgatcg cgagcgcggc gtctttgtga tcaaaccctc 9240

cggcgtcgat tacagcgta tgaccgctga cgatatggtc gtggttagca tcgaaaccgg 9300

tgaagtgggt gaaggtacga aaaagccctc ctccgacag ccaactcacc ggctgctcta 9360

tcaggcattc cctccattg gcggcattgt gcatacgac tcgcgccacg ccaccatctg 9420

ggcgcaggcg ggtcagtcga ttccagcaac cggcaccacc cacgccgact atttctacgg 9480

caccattccc tgcaccgca aaatgaccga cgcagaaatc aacggcgaat atgagtggga 9540

aaccgtaac gtcacgttag aaacctttga aaaacagggt atcgatgcag cgcaaatgcc 9600

cggcgttctg gtccattccc acggcccgtt tgcattgggc aaaaatgccg aagatgcggt 9660

gcataacgcc atcgtgctgg aagaggtcgc ttatatgggg atattctgcc gtcagttagc 9720

gccgcagtta ccggatatgc agcaaacgt gctggataaa cactatctgc gtaagcatgg 9780

cgcaaggca tattacgggc agtaatgaca gcccgcctaa tgagcgggct tttttttcca 9840

tgacaaaat ccttaacct gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga 9900

tcaaaggatc ttcttgagat ctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa 9960

aaccaccgt accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttcga 10020

aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ctttctagt tagccgtagt 10080

taggccacca cttaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt 10140

taccagtggc tgctgccagt ggcgataagi cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat 10200

agttaccgga taaggcgag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgca 10248

<210> 7

<211> 10258

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Plasmid phEF1aHTLV-Nsp1234

<400> 7

cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat 60

gagaaagcgc cagccttccc gaaggagagaa aggcggacag gtatccggtg agcggcaggg 120

tcggaacagg agagcgacag agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc 180

ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc 240

ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcat cgataaaata aaagatttta tttagtctcc 300

agaaaaaggg gggaatgaaa gacccacact gtaggtttgg caagctagcg tatacggatc 360

ctctagctag agctccggtg cccgtcagtg ggagagcgc acatcgcca cagtcgccga 420

gaagttaggg ggaggggtcg gcaattgaac cgggtgcctag agaaggtggc gcggggtaaa 480

ctgggaaagt gatgtcgtg actggtccg cctttttccc gaggtgggg gagaaccgta 540

tataagtga gtagtcgccc tgaacgttct ttttcgcaac gggtttgccc ccagaacaca 600

gctgaagctt cgaggggctc gcatctctcc ttcacgcgcc cgccgcccta cctgaggccg 660

ccatccacgc cggttgagtc gcgttctgcc gcctccgcc tgtggtgcct cctgaactgc 720

gtccgccgtc taggtaagtt taaagctcag gtcgagaccg ggcctttgtc cggcgtcccc 780

ttggagccta ctagactca gccgctctc cagcctttgc ctgacctgc ttgtcaact 840

ctacgtcttt gtttcgtttt ctgttctcg ccgttacaga tccaagctgt gaccggcgcc 900

tactccggtc gccaccatgg ccgccaaggt gcacgtggac atcgaggccg acagcccctt 960

catcaagagc ctgcagaagg ccttccccag cttcgaggtg gagtccctgc aggtgacccc 1020

caacgaccac gccaacgcca gggccttcag ccacctggcc accaagctga tcgagcagga 1080

aaccgacaag gacaccctga tcctggacat cggcagcgcc ccctcaaggt gagtttgggg 1140

acccttgatt gttctttctt tttcgtatt gtaaaattca tggtatatgg agggggcaaa 1200

gttttcaggg tgtgttttag aatgggaaga tgtccctgt atcactatgg accctcatga 1260

taattttgtt tctttcactt tctactctgt tgacaacat tgtctcctct tattttcttt 1320

tcattttctg taacttttct gttaaacttt agcttgcat tgaacgaat ttttaaattc 1380

acttttgatt atttgtcaga ttgtaagtac tttctcta cactttttt tcaaggcaat 1440

cagggtatat tatattgtac ttcagcacag ttttagagaa caattgttat aattaaatga 1500

taaggtagaa tatttctgca tataaattct ggctggcgtg gaaatattct tattggtaga 1560

aacaactaca ccttggatcat catcctgcct ttctctttat ggttacaatg atatacactg 1620

tttgagatga ggataaaata ctctgagtcc aaaccgggccc cctctgctaa ccatgttcat 1680

gcctttcttct ttttcttaca ggcggatgat gagcacccac aagtaccact gcgtgtgccc 1740

catgcggagc gccgaggacc ccgagcggct ggtgtgctac gccagaagc tggccgccgc 1800

cagcggcaag gtgctggacc gggagatgcg cggcaagatc accgacctgc agaccgtgat 1860

ggccaccccc gagcccgaga gcccacctt ctgcctgcac accgacgtga cctgccggac 1920

agccgccgag gtggccgtgt accaggacgt gtacgccgtg cagccccca cctccctgta 1980

ccaccaggcc atgaaggcg tgcggaccgc ctactggatc ggcttcgaca ccacccctt 2040

catgttcgac gccctggccg gacctaacc cacctacgc accaactggg ccgacgagca 2100

ggtgtctcag gcccggaaca tcggcctgtg cgcgccagc ctgaccgagg gccggctggg 2160

caagctgtcc atcctgcgga agaagcagct gaagccctgc gacaccgtga tgttcagcgt 2220

gggcagcaca ctgtacaccg agagccgga gctgtgtcgg agctggcacc tgcccagcgt 2280

gttcacctg aagggaagc agagcttcac ctgcagatgc gacaccatcg tgagctgcga 2340

gggctacgtg gtgaagaaaa tcacatgtg ccttggcctg tacggcaaga ccgtgggcta 2400

cgccgtgacc taccagccg agggctttct ggtgtgcaag accaccgata ccgtgaaggg 2460

cgagagagtg agcttccccg tctgcacctt cgtgccagc accatctgcg accagatgac 2520

cggatcctg gccaccgatg tgacccccga ggacgccag aaactgctgg tcggcctgaa 2580

ccagcggatc gtggtgaacg gccggacca gcggaacacc aacacatga agaactacct 2640

gtgtcccatc gtggccgtgg ccttcagcaa gtgggccaga gactacaagg ccgacctgga 2700

cgacgagaag cccctgggagc tgcgggagcg gacctaacc tgcctgtgcc tgtgggcctt 2760

caagaccggg aagatgcaca ccatgtacaa gaagcccgac acccagacca tcgtgaaggt 2820

gcccagcgag ttcaacagct tcgtgatccc cagcctgtgg agcaccggcc tggccatccc 2880

cgtgcggagc cggatcaaga tgctgttggc caagaaaacc aagcgggagc tgatccccgt 2940

gttgagcgc agcagcgcca gggacgccga gcaggaagag aaagagcggc tggaagccga 3000

gttgaccggg gaggccttgc cccccctgtt gcctatgcc cctgccgaga ccggcgtggt 3060

ggacgtggat gtggaggaac tggaatacca cgcggagcc ggggtggtgg agacccccag 3120

atccgccctg aaggtgacag cccagcccaa cgacgtgctg ctgggcaact acgtggtgct 3180

gtccccccag accgtgctga agagcagcaa gctggcccc gtgcaccctc tggccgagca 3240

ggtgaagatc atcaccacaca acggcagggc cggcagatac caggtcgacg gctacgacgg 3300
 ccgggtgctg ctgcatcgcg gctccgcat cctgtgccc gagttccagg cctgagcga 3360
 gagcgccaca atggtgtaca acgagcggga gttcgtgaac cggaagctgt accacattgc 3420
 cgtgcacggc cctagcctga acaccgatga ggaaaactac gagaaagtgc gggccgagcg 3480
 gaccgatgcc gactacgtgt tcgactgga caagaaatgc tgcgtgaagc gggaggaagc 3540
 cagcgggctg gtgctggctg gggagctgac caaccccccc ttccacgagt tcgcctacga 3600
 gggcctgaag atccggccct ccgccccctia caagaccaca gtggtggcg tgttcggcgt 3660

 gcccgcagc ggcaagagcg ccatcatcaa gtccctggtg accaagcacg acctggtgac 3720
 ctccggcaag aaagagaact gccaggaaat cgtcaacgac gtcaagaagc accggggcct 3780
 ggacatccag gccaaagacag tggacagcat cctgctgaac ggctgcagac gggccgtgga 3840
 tatctgtac gtggacgagg ccttcgcctg ccacagcggc acctgctgg cctgatcgc 3900
 cctggtgaag ccccggtcca aggtggtgct gtgcggcgac ccaagcagt gcggcttctt 3960
 caacatgatg cagctgaagg tgaacttcaa ccacaacatc tgcaccgaag tgtgccaaa 4020
 gagcatcagc cggcgggtgca ccagaccctg gaccgccatc gtgtccacc tgcactacgg 4080

 cggcaagatg cggaccacca acccctgcaa caagcccatc atcatcgata ccaccggcca 4140
 gaccaagccc aagcccggcg acatcgtgct gacctgttc cgcggctggg tgaagcagct 4200
 gcagctggac taccggggcc acgaggtgat gaccgccgc gcctcccagg gcctgaccag 4260
 aaaggcgctg tatccctgic ggcagaaggt gaacgagaac cccctgtacg cccctgccag 4320
 cgagcacgtg aatgtgctgc tgaccgggac cgaggacagg ctggtgtgga aaacctggc 4380
 cggcgacccc tggatcaagg tgctgtccaa catccccag ggcaacttca cggccacct 4440
 ggaagagtgg caggaagagc acgacaagat catgaagtg atcgagggcc ctgccgccc 4500

 agtggacgcc ttccagaaca aggccaacgt gtgctgggcc aagagcctgg tgcctgtgct 4560
 ggacaccgcc ggcatccggc tgaccgccga agagtggagc accatcatca ccgccttcaa 4620
 agaggaccgg gcctacagc ccgtggtggc cctgaacgag atctgcacca agtactacgg 4680
 cgtggacctg gacagcggcc tgttcagcgc cccaagggtg tcctgtact acgagaacaa 4740
 cactgggac aaccggccag gcggcaggat gtacggcttc aacgcccca ccgccccag 4800
 actggaagcc cggcacacct ttctgaaggg ccagtggcac accggcaagc aggccgtgat 4860
 cgccgagaga aagatccagc ccctgtccgt gctggataac gtgatcccta tcaaccggcg 4920

 gctgccccac gccctggtgg ccgagtacaa gacagtgaag ggcagccggg tggagtggct 4980
 ggtgaacaaa gtgcggggct accacgtgct gtggtgtct gagtacaacc tggccctgcc 5040
 tcggcggagg gtgacctggc tgtccctct gaacgtgaca ggcccgaca ggtgctacga 5100

cctgagcctg ggccctgcctg ccgacgccgg cagattcgac ctggtgttcg tgaacatcca 5160
caccgagttc agaatccacc actaccagca gtgcgtggac caccgcatga agctgcagat 5220
gctgggcggc gacgccctga ggctgctgaa gcctggcggc agcctgctga tgcgggccta 5280
cggctacgcc gacaagatct ccgaggccgt ggtgtccagc ctgagccgga agttcagctc 5340

cgccagggtg ctgagaccg actgcgtgac cagcaacaca gaagtgttc tgctgttcag 5400
caacttcgac aacggcaagc ggcccagcac cctgcaccag atgaacacca agctgtccgc 5460
cgtgtacgcc ggcgaggcca tgcacaccgc cggatgcgcc ccagctacc gggatgaagc 5520
ggccgacatc gccacctga ccgaggccgc cgtggtgaat gccccaatg ccaggggcac 5580
cgtgggcgac ggcgtgtgca gggccgtggc caaaaagtgg ccagcgcct tcaaggcgca 5640
ggccacccct gtgggcacca tcaaaaccgt gatgtgcggc agctaccccg tgatccacgc 5700
cgtggccccc aatttcagcg ccaccacaga ggccgagggc gaccgggaac tggccgccgt 5760

glatagagcc gtggccgccg aagtgaacag actgagcctg agcagcgtgg ccatccctct 5820
gctgtccacc ggcgtgttca gcggcggcag ggaccggctg cagcagagcc tgaaccacct 5880
gttcaccgct atggacgcca ccgacgccga cgtgacaatc tactgccggg acaagagctg 5940
ggagaagaag atccaggaag ccatcgacat gaggaccgcc gtggagctgc tgaacgacga 6000
cgtggagctg acaaccgacc tgggtcgcgt gcaccccgac agcagcctgg tgggccggaa 6060
gggctacagc accaccgacg gctccctgta cagctacttc gagggcacca agttcaacca 6120
ggccgccatc gatatggccg agatcctgac cctgtggccc aggctgcagg aagccaacga 6180

gcagatctgt ctgtacgccc tgggcgagac aatggacaac atccgggtcca agtgcgccgt 6240
gaacgacagc gacagcagca cccccctcg gaccgtgccc tgcctgtgca gatacgccat 6300
gaccgccgag cggatcgccc ggctgcggag ccaccagggtg aagagcatgg tgggtgtcag 6360
cagcttcccc ctgccaagt accacgtgga tggcgtgcag aaagtgaagt gcgagaaggt 6420
gctgctgttc gacccaccg tgcctagcgt ggtgtcccc cggaagtacg ccgcctccac 6480
caccgaccac agcgacagaa gcctgcgggg ctctgacctg gactggacca ccgactccag 6540
cagcaccgcc agcgacacca tgagcctgcc cagcctgcag agctgcgaca tcgacagcat 6600

ctacgagcct atggccccc tcgtggtgac cgccgacgtg caccctgagc cagccggcat 6660
cgccgacctg gccgccgatg tgcaccaga accgccgac cactggatc tggaaaaccc 6720
catcccccct ccagaccca agaggccgc ctacctggcc agcagagccg ccgagaggcc 6780
cgtgcctgcc ccagaaaagc ccacccagc cccagaacc gccttcagga acaagctgcc 6840
cctgaccttc ggcgacttcg acgagcacga ggtggacgcc ctggccagcg gcatcacctt 6900
cggcgatctt gatgacgtgc tgcggctggg cagagccgga gcctatatct tcagcagcga 6960

caccggctcc ggccacctgc agcagaaaaag cgtgagacag cacaacctgc agtgcgcca 7020

gctggacgcc gtggaagagg aaaagatgta ccccccaag ctggataccg agcgggaaaa 7080

gctgctgctg ctgaaaatgc agatgcaccc cagcgaggcc aacaagagcc gctaccagtc 7140

taggaaggtg gagaacatga aggccaccgt ggtggaccgg ctgaccagcg gcgccaggct 7200

gtacacaggg gccgacgtgg gcagaatccc tacctacgcc gtgcgtacc ccaggcccgt 7260

gtacagcccc accgtgatcg agcggttcag cagccccgac gtggccatcg ccgcctgcaa 7320

tgagtacctg tctaggaact acccaaccgt ggccagctac cagatcaccg atgagtacga 7380

tgctacctg gacatggtgg acggcagcga cagctgcctg gaccgggcca ctttctgtcc 7440

cgccaagctg cggtgctacc ccaagcacca cgcctatcac cagcccaccg tgagaagcgc 7500

cgtgcccagc cctttccaga ataccctgca gaatgtgctg gccgccgcca ccaagcgga 7560

ctgcaacgtg acccagatga gagaactgcc cacaatggac agcgcctgt ttaacgtgga 7620

gtgcttcaag agatacgctt gcagcggcga gtactgggag gaatacgcca agcagcccat 7680

ccggatcacc accgagaaca tcaccaccta cgtgaccaag ctgaagggcc ccaaggccgc 7740

cgccctgttc gccaaagacc acaacctggt gccctgcag gaagtgccta tggacaggtt 7800

caccgtggac atgaagcggg acgtgaaggt gacccctggc accaagcaca ccgaggaacg 7860

gcccaggtg caggtgatcc aggcgcgcca gcctctggcc accgcctatc tgtgcggcat 7920

ccaccgggag ctggtgcggc ggctgaacgc cgtgctgagg cccaacgtgc acacctgtt 7980

cgacatgtcc gccgaggact tcgacgcat catcgccagc cacttccacc ccggcgaccc 8040

agtgttgga accgatatcg ccagcttcca caagagccag gacgacagcc tggccctgac 8100

cggcctgatg atcctggaag atctgggcgt ggaccagtac ctgctggatc tgatcgaggc 8160

gccttccgc gagatcagca gctgccacct gcctaccggc acccggttca agttcggcgc 8220

catgatgaag agcggcatgt ttctgacctt gttcatcaac acagtgtga atatcccat 8280

cgccagcagg gtgctggaac agcggctgac cgacagcgcc tgcgccctc tcacggcgga 8340

cgacaacatc gtgcacggcg tgatcagcga caagctgatg gccgagcggc gcgccagctg 8400

ggtgaacatg gaagtgaaga ttatcgacgc cgtgatgggc gaaaagcccc cctacttctg 8460

cggcggttc atcgtgttcg acagcgtgac acagaccgcc tgcagagtga gcgacccct 8520

gaagcggctg ttcaagctgg gcaaacctct gacagccgag gacaagcagg acgaggaccg 8580

gcggagggcc ctgtccgacg aggtgtccaa gtggttccgg accggcctgg gcgccgagct 8640

ggaagtggcc ctgacaagcc gctacgaggt ggagggtgc aagagcatcc tgatcgctat 8700

ggccaccctg gcccgggaca tcaaggcctt taagaagctg agaggccctg tcatccacct 8760
 gtacggcgga ccccggtgg tgcggtgaga gctcgctgat cagcctcgac tgtgccttct 8820
 agttgccagc catctgttgt ttgccccctcc cccgtgcctt ccttgaccct ggaaggtgcc 8880
 actcccactg tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgatttgtct gagtaggtgt 8940
 cattctattc tgggggggtg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat 9000
 agcaggcatg ctttaattaac aggccttggc gcgccgggtc tgggtaagct ctagtctca 9060
 tgtttgacag cttatcatcg ataagcttta atgcggtagt ttagcacgaa ggagtcaaca 9120

tgtagaaga tctcaaacgc taggtattag aagccaacct ggcgctgcca aaacacaacc 9180
 tggtcacgct cacatggggc aacgtcagcg ccgttgatcg cgagcgcggc gtctttgtga 9240
 tcaaaccctc cggcgctgat tacagcgtca tgaccgctga cgatatggtc gtggtagca 9300
 tcgaaaccgg tgaagtgtt gaaggtacga aaaagccctc ctccgacag ccaactcacc 9360
 ggctgtctta tcaggcattc ccctccattg gcggcattgt gcatacgac tcgcgccacg 9420
 ccaccatctg ggcgaggcg ggtcagtcga ttccagcaac cggcaccacc cagccgact 9480
 atttctacgg caccattccc tgcaccgca aatgaccga cgcagaaatc aacggcgaat 9540

atgagtggga aaccggtaac gtcacgtag aaaccttga aaaacagggt atcgatgcag 9600
 cgcaaatgcc cggcgctctg gtccattccc acggcccgtt tgcattgggc aaaaatgccg 9660
 aagatcggt gcataacgcc atcgtgctgg aagaggtcgc ttatatgggg atattctgcc 9720
 gtcagttagc gccgcagtta ccggatatgc agcaaacgct gctggataaa cactatctgc 9780
 gtaagcatgg cgcgaaggca tattacgggc agtaatgaca gcccgcctaa tgagcgggct 9840
 tttttttcca tgacaaaaat cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc 9900
 glagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ccttttttcc tgcgcgtaat ctgctgcttg 9960

caaacaaaaa aaccaccgct accagcgggt gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact 10020
 ctttttccga aggttaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ctttctagt 10080
 tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac gcctacata cctcgctctg 10140
 ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgac 10200
 tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgca 10258